

**Т.И. Мещерякова¹, Р.А. Зинченко^{1,2}, С.С. Жилина¹,
Т.А. Васильева², Н.В. Петрова², А.Н. Петрин^{1,3},
Г.Р. Мутовин¹**

¹ Научно-практический центр медицинской помощи детям с пороками развития черепно-лицевой области и врожденными заболеваниями нервной системы Департамента здравоохранения г. Москвы

² Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

³ Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова

Клинический полиморфизм и молекулярная диагностика бранхио-окуло-фациального синдрома

Бранхио-окуло-фациальный синдром (BOFS) – редкое аутомно-доминантное заболевание с неполной пенетрантностью и широким клиническим полиморфизмом. Статья посвящена анализу клинических проявлений BOFS у 6 пациентов, представлены результаты молекулярно-генетической диагностики в сравнении с литературными данными зарубежных исследователей.

Ключевые слова: бранхио-окуло-фациальный синдром, ген *TFAP2A*, орофациальные расщелины.

Контактная информация: Мещерякова Татьяна Ивановна.

E-mail: Ivanovna-76@mail.ru

© Коллектив авторов, 2013

Бранхио-окуло-фациальный синдром (BOFS; OMIM # 113620) относится к редким заболеваниям с аутомно-доминантным типом наследования. Первых больных описали W. Lee и соавт. в 1982 году [1], B. Hall и соавт. в 1983 году [2]. В названии «бранхио-окуло-фациальный синдром», которое предложили A. Fujimoto и соавт. в 1987 году [3], отражены участие трех систем и соответственно основные диагностические критерии синдрома.

Типичные проявления аномалии жаберных дуг – линейные дефекты кожи в области шеи, которые варьируют от едва заметных участков аплазии до эрозивного поражения кожи. Черепно-лицевые дизмор-

фии включают псевдорасщелину или расщелину верхней губы с расщелиной неба или без нее, широкую переносицу, высокий лоб. Псевдорасщелина – особенно важный клинический признак, который в сочетании с другими признаками указывает на данный синдром. Глазные аномалии клинически более разнообразны и характеризуются микрофтальмией/анофтальмией, колобомами различных структур глаза, страбизмом, катарактой, птозом, стенозом или атрезией носослезного канала. *Дополнительные симптомы:* кондуктивная или нейросенсорная тугоухость, пороки развития внутреннего уха, проявления эктодермальной дисплазии (мелкие

T.I. MESHCHERYAKOVA, R.A. ZINCHENKO, S.S. ZHILINA, T.A. VASILYeva, N.V. PETROVA, A.N. PETRIN, G.R. MUTOVIN

Clinical polymorphism and molecular diagnostics of branchio-oculo-facial syndrome

Branchio-oculo-facial syndrome (BOFS) is a rare autosomal dominant disease with incomplete penetrance and wide clinical polymorphism. The article discusses BOFS clinical manifestations in 6 patients; the results of molecular-genetic diagnostics compared published data of foreign researches and shown.

Key words: branchio-oculo-facial syndrome, gene *TFAP2A*, orofacial clefts.

зубы, диспластичные ногти, редкие волосы и преждевременное их поседение), наружная эктопия тимуса, околоушные фистулы, ямочки на верхней губе, широкий или раздвоенный кончик носа, аномалии развития почек (дисплазия, поликистоз, агенезия), врожденные пороки сердца, полидактилия и клинодактилия. Интеллект, как правило, нормальный.

В 1995 году *A. Lin и соавт.* [4] опубликовали большой обзор по BOFS с анализом фенотипических проявлений данного синдрома у 43 пациентов и определили его диагностические критерии.

По фенотипическим проявлениям BOFS схож с бронхо-ото-ренальным синдромом (BOR; OMIM # 113650). Оба синдрома наследуются по аутосомно-доминантному типу и включают аномалии развития жаберных дуг. Но эти синдромы, несмотря на их широкий клинический полиморфизм, имеют различия: при бронхо-ото-ренальном синдроме ведущий признак – поражение мочевыводящей системы, а при бронхо-окуло-фациальном чаще встречаются орофациальные расщелины и поражение глаз. В спорных случаях поиск мутаций в гене *TFAP2A* (транскрипционный фактор *AP-2* альфа) может подтвердить диагноз и повысить эффективность медико-генетического консультирования.

В 2008 году впервые показано, что мутации в гене *TFAP2A* приводят к появлению фенотипа BOFS [5]. Ген *TFAP2A* относится к *AP-2* семейству транскрипционных факторов и отвечает за развитие краниофациальной области и глаз [6]. По данным *J. Milunsky и соавт.*, более 95% пациентов с BOFS – носители мутаций в гене *TFAP2A* [7]. С помощью метода прямого секвенирования обнаруживаются небольшие внутригенные делеции или дупликации, миссенс- и нонсенс-мутации и мутации сайта сплайсинга. Различные по протяженности делеции гена *TFAP2A*, описанные *J. Milunsky и соавт.* [5], *G. Gestri и соавт.* [8], встречаются менее чем у 5% пациентов с BOFS. Большие делеции локуса 6p24-p25, затрагивающие в том числе ген *TFAP2A*, редки [9, 10].

Статья посвящена анализу клинических проявлений BOFS с использованием семейного материала, результатов молекулярно-генетической диагностики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 6 пациентов (3 – мужского пола и 3 – женского) из пяти семей (русской национальности). Возраст пациентов – от 5 мес до 29 лет. Во всех случаях при заборе биологического материала (кровь) получено письменное информационное согласие родителей и взрослого пациента на проведение исследования. Всем пациентам проведено цитогенетическое обследование с целью исключения хромосомной патологии.

ДНК-диагностика выполнена 5 пациентам. Методом прямого секвенирования проведен анализ нуклеотидной последовательности кодирующей области гена *TFAP2A*. Для выделения ДНК из лейкоцитов периферической крови использовали стандартную методику, рекомендованную производителем *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* [11]. Разработан дизайн праймеров для амплификации кодирующей последовательности 7 экзонов гена *TFAP2A* и фланкирующих интронных областей (табл. 1). Для анализа полученных нуклеотидных последовательностей использовали общедоступные программы пакета BLAST [12, 13].

Таблица 1

Праймеры для амплификации кодирующей последовательности гена *TFAP2A*

Экзон	Прямой праймер	Обратный праймер
1	TTGCCTAAGCGATTCCAGGGA	ACATCCTAGATCTCCCGAAATC
2	CTTGTCAAGTGGATTTGTGTG	GGGTAGAAGCTCGCAACTACTTT
3	CATGGATTATTTGCTGGAGG	ATGAGTCAGAACAAGCTAGCC
4.1	TTGGGGGTGATCCACGACG	TGAGACACTCGGGTGGTGA
4.2	TGGTGAACCCCAACGAAGTC	CAGAAGCTCGCTCGCGGGAA
5	ACGCAGATGTCAGAATAACTTA	ATTGGGATTGGTGTGATTGTA
6	GTTTCCTGCAACATCTGGGGT	GATGAGAGGAAAAAGATGGGA
7	TGAAGGTAGGAAGTAAAGAGAG	TGTTGCTGAGGTACATTTTG

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты клинического и молекулярно-генетического тестирования пациентов с BOFS мы сравнили с данными на выборке 57 пациентов с BOFS, описанными в литературе [7, 8, 14–16] (табл. 2, 3).

У 3 из 6 пациентов выявлены три ведущих клинических проявления BOFS: линейные участки аплазии кожи на шее, глазные аномалии и орофациальные расщелины (*foto*); у 3 пациентов наблюдались только глазные аномалии и орофациальные расщелины в сочетании с дополнительными. Только у 3 из 6 пациентов имелись дефекты кожи в области боковых поверхностей шеи. Значит, аномалии жаберных дуг не являются 100%-ным признаком синдрома BOFS. Наличие этого признака варьирует в пределах 50–75% [7, 8, 14–16].

Кроме того, синдром характеризуется вариабельностью клинических проявлений и наличием дополнительных признаков. У одной пациентки, помимо участка аплазии кожи, отмечался рост волос на шее. У 5 пациентов диагностирован стеноз носослезного канала, причем у одного из них отмечена дистопия слезной точки в области верхней губы. У всех больных разрез глаз эллипсоидной формы, отмечены орофациальные расщелины: псевдорасщелина верхней губы – у двоих, врожденная расщелина верхней губы – у одного, врожденная расщелина губы и неба – у троих.

Таблица 2

Результаты клинического и молекулярно-генетического тестирования пациентов с BOFS

Признак	Пациент	A	B	C	D1 (мать)	D2 (реб.)	E	Кол-во пациентов	Данные литературы [7, 8, 14-16], %
Экзон			4		4	4			
Белки	Молекуляр. диагност. не проводилась	R251G p.Arg 251 Gly rs121909574	Мутаций в гене <i>TFAP2A</i> не найдено	R213S с.637 C>A p.Arg213Ser	R213S с.637 C>A p.Arg213Ser	Мутаций в гене <i>TFAP2A</i> не найдено			
Пол	Муж.	Муж.	Муж.	Муж.	Жен.	Жен.	Жен. 3/6	Жен. 29/57 (51)	
Возраст на момент осмотра	1 год 3 мес	10 мес	5 мес	29 лет	10 мес	15 лет	0,5-29 лет	0,5-69 лет	
Семейный случай			+ со стороны отца поражены 6 членов семьи	+ поражены 1 ребенок и 1 плод	+		2/5*	26/57 (46)	
Аномалии жаберных дуг	• участки аплазии кожи на шее • эктопия тимуса	+			+	+	3/6 0/6	43/57 (75) 6/35 (17)	
Аномалии глаз	• микрофтальмия • стеноз носослез. канала		+	+	+	+	1/6 5/6	25/56(45) 36/53(68)	
	• колобомы		+ сетчатки	+ радужки, сосудистой оболочки, цилиарного тела, диска зрит. нерва	+ зрит. нерва OD			3/6	30/52(58)
	• страбизм	+	+	+	+	+	6/6	Нд	
	• птоз	R		B		B переменный	3/6	Нд	
	• халазионы	+					1/6	Нд	
Лицевые аномалии									
	• дисплазия ушных раковин	+		+		+	3/6	43/56 (77)	
	• околушные фистулы			+		+	3/6	17/51 (33)	
	• аномалия развития внутреннего уха	H	+	+	+	H	2/2	7/23 (30)	
	• орофациальные расщелины	ОВРГН	ДВРГН	ДВРГН	ДВРГ	Двустор. скрыт. РГ	Двустор. скрыт. РГ	6/6	39/57 (68)
	• ямочки на нижней губе					+	1/6	4/40 (10)	
Эктодермальная дисплазия									
	• преждеврем. поседение волос				+		1/6	20/46 (43)	
	• бронхиальная киста/свищ шеи	+		+		+	3/6	9/42 (21)	
Дополнительные признаки									
	• вес при рождении (г)/срок гестации	2400 (36-37 н.)	2250 (39 н.)	3400 (40 н.)	H	3100 (39 н.)	2650 (40 н.)		
	• врожденные пороки сердца	ООО				ОАП	2/6	3/28 (11)	
	• тугоухость	B			R	H	4/5	34/56 (61)	
	• пороки развития почек		B			R	1/6	15/41 (37)	
	• клинодактилия	+			+	+	4/6	Нд	
	• интеллект. дефицит					+	1/6	5/50 (10)	

Примечание: «+» – признак присутствует; «-» – отсутствие признака; «H» – неизвестно; «Нд» – нет данных; В – билатеральный; R – правосторонний; L – левосторонний; ОВРГН – односторонняя врожденная расщелина губы и неба; ДВРГН – двусторонняя врожденная расщелина губы и неба; ДВРГ – двусторонняя врожденная расщелина верхней губы; РГ – расщелина верхней губы; ООО – открытое овальное окно; ОАП – открытый артериальный проток; *2/5 – двое из пяти обследованных больных.

Таблица 3

Результаты молекулярного анализа гена *TFAP2A*

Экзон	Мутация	Аннотация	Количество пациентов
4	R251G/+	R251G (p.Arg 251Gly rs121909574)	1
4	R213S/+	Не зарегистрирована	2, семья

Фото. Линейные участки аплазии кожи на шее у пациентов B и D2

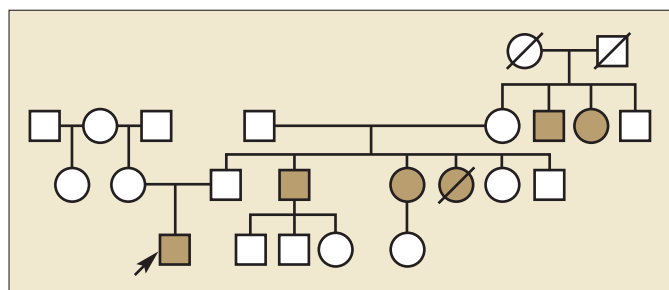


А. Lin и соавт. в 2009 году предложили относить такой признак, как эктопия тимуса, к дополнительным критериям диагностики BOFS при наличии двух ведущих признаков [4]. По данным J. Milunsky и соавт., частота эктопии тимуса достигает 32%; у наших пациентов данного признака не наблюдалось [7]. Исследователи C. Stoetzel и соавт. [15], M. Tekin и соавт. [16] отмечают, что у пациентов с BOFS встречаются аномалии развития внутреннего уха и слуховых косточек. Среди наших пациентов у двоих были диагностированы аномалии развития слуховых косточек, у троих – анатомически узкие слуховые проходы. Кондуктивная форма тугоухости имелась у 4 из 6 пациентов. Психомоторное и интеллектуальное развитие у пациентов с BOFS соответствует возрасту, но среди наших пациентов один был с умственной отсталостью. В двух из пяти обследованных семей (семьи С и D) отмечены клинические проявления синдрома (рис. 1).

Прямое секвенирование гена TFAP2A, проведенное у пробандов С и Е, не обнаружило мутаций. Не исключено, что в данных случаях, возможно, имеют место крупные делеции гена TFAP2A, которые не определяются методом прямого секвенирования. Пропуск поколений свидетельствует о неполной пенетрантности гена. У пробанда С наблюдались тяжелые пороки развития глаз (колобомы радужки, сосудистой оболочки, цилиарного тела, диска зрительного нерва, страбизм, эллипсоидная форма разреза глаз, стеноз носослезного канала).

В семье пробанда D2 мать также имела клинические проявления BOFS. Первая ее беременность закончилась прерыванием на 22-й неделе гестации по медицинским показаниям. В ходе ультразвукового исследования плода женского пола зафиксированы множественные врожденные пороки развития (двусторонняя ВРГН, микрофтальмия), что подтверждено результатами патологоанатомического исследования. По результатам цитогенетического исследования лимфоцитов крови плода исключена хромосомная патология. В этой семье у матери и у ребенка в 4-м экзоне (кодирующая последовательность высоко консервативной области гена TFAP2A) обнаружена ранее неописанная миссенс-мутация R213S

Рис. 1. Родословная семьи пробанда С



(с.637 G>A p.Arg213Ser) в гетерозиготном состоянии. Можно предположить, что данная мутация не является нейтральной, так как замена нуклеотида G на A приводит к замене аминокислоты – основного аргинина, способного образовывать множественные водородные связи, – на серин. Изменение затрагивает эволюционно консервативный мотив нуклеотидной последовательности гена транскрипционного фактора AP2A, может приводить к нарушению функции белка и быть причиной заболевания в данной семье.

У пробанда В обнаружена мутация R251G (с.751A>G) в 4-м экзоне гена TFAP2A (рис. 2, 3). Замена

Рис. 2. Результаты секвенирования экзона 4 гена TFAP2A в образце ДНК матери пробанда В: обнаружен только нормальный аллель А

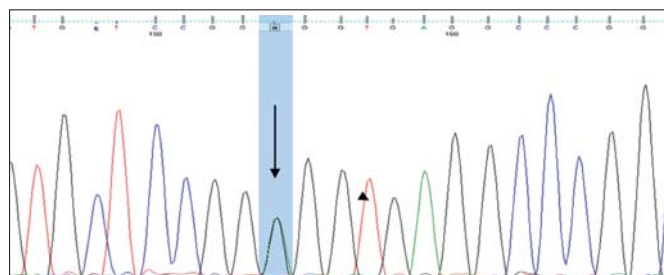


Рис. 3. Последовательность участка открытой рамки считывания гена TFAP2A дикого типа

```

631 ccgggtcgccctctcgcctcctcagctccacctcgaagtacaaggtc
    P G R L S L L S S T S K Y K V
676 acggtggcgggaagtgcagcggcggtctcaccaccggagtgtctc
    T V A E V Q R R L S P P E C L
721 aacgcgctcgctgctggcggaagtgcctccggaggcggaagtctaaa
    N A S L L G G V L R G A K S K
766 aatggaggaagatctttaagagaaaaactggacaaaataggatta
    N G G R S L R E K L D K I G L
    
```

Рис. 4. Результаты секвенирования экзона 4 гена TFAP2A в образце ДНК пробанда В: стрелкой обозначена замена А на G в гетерозиготном состоянии

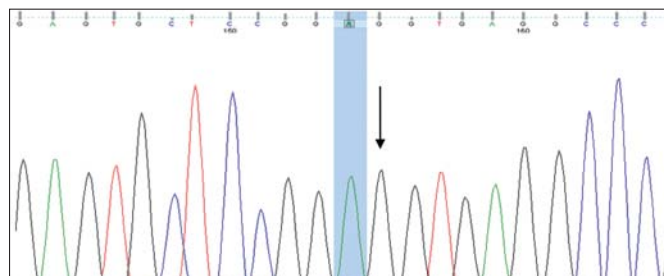


Рис. 5. Последовательность участка открытой рамки считывания с заменой нуклеотида в 751 положении, с. 751A>G (R251G), в экзоне 4 гена TFAP2A

```

631 ccgggtcgccctctcgcctcctcagctccacctcgaagtacaaggtc
    P G R L S L L S S T S K Y K V
676 acggtggcgggaagtgcagcggcggtctcaccaccggagtgtctc
    T V A E V Q R R L S P P E C L
721 aacgcgctcgctgctggcggaagtgcctccggaggcggaagtctaaa
    N A S L L G G V L R G A K S K
766 aatggaggaagatctttaagagaaaaactggacaaaataggatta
    N G G R S L R E K L D K I G L
    
```

нуклеотида А на С приводит к замене аминокислоты в высоко консервативной области гена *TFAP2A*. Мутация описана ранее у двоих пациентов с синдромом BOFS из госпиталей в Балтиморе и Вашингтоне (США) [17]. Интересно, что у матери пробанда, имеющей только околоушные фистулы, при прямом секвенировании гена *TFAP2A* (7 экзонов и фланкирующих интронных областей) мутаций не обнаружено (рис. 4, 5).

J. Milunsky и соавт. отметили в своем исследовании семью, в которой у отца пробанда с классическим фенотипом BOFS и подтвержденной мутацией (R254G мутации в экзоне 4), имеющего мягкие признаки заболевания в виде преждевременного поседения волос, преаурикулярных фистул и дополнительного соска, в крови был установлен мозаицизм по данной мутации [7]. Учитывая наличие минимальных клинических проявлений у матери пробанда В (околоушные фистулы), можно предположить возможный мозаицизм.

Бранхио-окуло-фациальный синдром – мультисистемное заболевание, требующее медицинского сопровождения многих специалистов: черепно-лицевых хирургов, офтальмологов, ЛОР-врачей, сурдологов, педиатров, логопедов, дефектологов, генетиков. Оперативное лечение орофациальных расщелин необходимо проводить в специализированных центрах. Псевдорасщелины не всегда требуют хирургической коррекции. Для исключения аномалий развития слуховых косточек необходимо проводить компьютерную томограмму височной кости. Исследование слуха должно включать аудиограмму. Несмотря на то что врожденные пороки сердца и аномалии мочевыделительной системы встречаются редко, рекомендуется выполнять эхокардиографию и ультразвуковое исследование почек. Учитывая широкий внутрисемейный клинический полиморфизм, необходимо проводить молекулярное тестирование родителей для более точной оценки риска повторения данного заболевания у детей.

ВЫВОДЫ

Идентификация мутаций – важный этап в диагностике моногенных заболеваний. Клиническая диагностика бранхио-окуло-фациального синдрома в большинстве случаев не вызывает затруднений. Тем не менее молекулярное тестирование мутаций в гене *TFAP2A* поможет в подтверждении диагноза BOFS в атипичных случаях и повысит эффективность медико-генетического консультирования семей. После обнаружения мутации у семьи целесообразно проведение пренатальной диагностики.

Литература

1. *Lee W.K., Root A.W., Fenske N.* Bilateral branchial cleft sinuses associated with intrauterine and postnatal growth retardation, premature aging, and unusual facial appearance: a new syndrome with dominant transmission. *Am J Med Genet* 1982; 11: 345–52.
2. *Hall B.D., deLorimier A., Foster L.H.* Brief clinical report: a new syndrome of hemangiomas of branchial clefts, lip pseudoclefts, and unusual facial appearance. *Am J Med Genet* 1983; 14: 135–8.
3. *Fujimoto A., Lipson M., Lacro R.V., et al.* New autosomal dominant branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Med Genet* 1987; 27: 943–51.
4. *Lin A.E., Gorlin R.J., Lurie I.W., et al.* Further delineation of the branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Med Genet* 1995; 56: 42–59.
5. *Milunsky J.M., Maher T.A., Zhao G., et al.* *TFAP2A* mutations result in branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 1171–7.
6. *Ahituv N., Erven A., Fuchs H., et al.* An ENU-induced mutation in AP-2 alpha leads to middle ear and ocular defects in Doarad mice. *Mamm Genome* 2004; 15 (6): 424–32.
7. *Milunsky J.M., Maher T.M., Zhao G., et al.* Genotype-phenotype analysis of the branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Med Genet. Part A.* 2011; 155A: 22–32.
8. *Gestri G., Osborne R.J., Wyatt A.W., et al.* Reduced *TFAP2A* function causes variable optic fissure closure and retinal defects and sensitizes eye development to mutations in other morphogenetic regulators. *Hum Genet* 2009; 126: 791–803.
9. *Davies A.F., Mirza G., Flintner F., Ragoussis J.* An interstitial deletion of 6p24-p25 proximal to the *FKHL7* locus and including AP-2A that affects anterior eye chamber development. *J Med Genet* 1999; 36: 708–10.
10. *Misceo D., Bjorgo K., Ormerod E., et al.* A de novo 6p interstitial deletion and a complex translocation involving chromosomes 2, 6, and 14 in a mildly developmentally delayed patient. *Am J Med Genet. Part A.* 2008; 146A: 3230–3.
11. Мед. интернет – ресурсы. URL: <http://worldwide.promega.com> (дата обращения 23.06.2013).
12. Мед. интернет-ресурсы. URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 23.06.2013).
13. Мед. интернет-ресурсы. URL: <http://www.wip.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html> (дата обращения: 23.06.2013).
14. *Reiber J., Sznajder Y., Guillen Posteguillo E., et al.* Additional clinical and molecular analyses in patients with branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Med. Genet. Part A.* 2010a; 152A: 994–9.
15. *Stoetzel C., Riehm S., Bennouna Greene V., et al.* Confirmation of *TFAP2A* gene involvement in branchio-oculo-facial syndrome (BOFS) and report of temporal bone anomalies. *Am J Med Genet Part A.* 2009; 149A: 2141–6.
16. *Tekin M., Sirmaci A., Yuksel-Konuk B., et al.* A complex *TFAP2A* allele is associated with branchio-oculo-facial syndrome and inner ear malformation in a deaf child. *Am J Med Genet. Part A.* 2009; 149A: 427–30.
17. Мед. интернет-ресурсы. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/varvu?gene=7020&rs=121909574> (дата обращения: 23.06.2013).