

Изучение интерактома при синдроме Ашера в российской популяции для выбора приоритетных патогенетически ориентированных терапевтических подходов

М.Е. Иванова¹, Д.С. Атарщиков², А.М. Демчинский³, В.В. Стрельников⁴, Д. Бар⁵, Г.В. Порядин⁶, Л.М. Балашова⁷, Ж.М. Салмаси⁶

¹НКЦ «Офтальмик», Москва, Россия

²ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой», Москва, Россия

³АНО «Лаборатория Сенсор-Тех», Москва, Россия

⁴ФГБНУ «МГНЦ», Москва, Россия

⁵Центр геномики и прикладной геномной технологии, Бангалор, Индия

⁶ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

⁷НП «МНПЦПТ», Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение: синдром Ашера (*Usher syndrome, USH*) является гетерогенным синдромом сочетанного снижения слуха и зрения, с распространенностью 5:100 000 населения. Существуют 1-й, 2-й и 3-й подтипы синдрома, вызванного мутациями в одном из генов: *MYO7A, USH1C, CDH23, PCDH15, USH1G, CIB2* для 1-го; *USH2A, ADGRV1, DFNB31* для 2-го и в *CLRN1* для 3-го подтипа. *USH* требует генетического подтверждения для диагностики, ведения пациентов и подходов к патогенетически направленному лечению. Также рассматривается исторический аспект и развитие молекулярной диагностики заболевания, эволюция подходов к лечению пациентов.

Цель исследования: изучить спектр мутаций российской когорты пациентов с *USH* и провести анализ метаболома и интерактома, а также патогенетических путей развития *USH* для поиска путей таргетного лечения.

Материал и методы: 28 пациентов с *USH* были отобраны из 3200 пациентов и прошли обследование в рамках протокола NCT03319524 клинического исследования. Полное офтальмологическое, ЛОР и генетическое обследование было проведено каждому пациенту. Секвенирование NGS, MLPA и по Сэнгеру было проведено для генетического подтверждения диагноза.

Результаты исследования: 53,57% и 39,28% пациентов имели 1-й и 2-й подтип *USH* соответственно. 17,85% случаев не были подтверждены генетически, что укладывается в мировые показатели статистики. 11 пациентов имели мутации в генах *MYO7A* (72,72%), *CDH23* (9,09%), *PCDH15* (9,09%), *USH1C* (9,09%). 11 мутаций обнаружено в гене *MYO7A*, где 54,54% являются впервые описанными патогенными мутациями. *MYO7A*: p.Q18* была наиболее частой (27,27%) мутацией и связана с ранними проявлениями и наиболее тяжелой клинической картиной. Две новые мутации (p.E1301* и c.158-?_318+? del) (хромосомные координаты этой делеции следующие: chr10:56138542–56138702) обнаружены в гене *PCDH15*. У 90% пациентов с подозрением на 2-й тип синдрома Ашера диагноз подтвержден генетически. 11 мутаций обнаружено в гене *USH2A*, 27% из них впервые описанные причинные патогенные мутации. Наиболее распространенной мутацией *USH2A* является p.W3955* (50%), за которой следуют p.E767fs, p.R1653* и c.8682–9A>G (по 20% каждой).

Заключение: авторами проведен подробный *in silico* анализ метаболома и интерактома, а также патогенетических путей развития синдрома *USH* в обследуемой когорте пациентов с обсуждением наиболее перспективных подходов к терапевтическому воздействию, в т. ч. с применением геномной терапии.

Ключевые слова: *USH, USH2A, MYO7A, мутация, синдром Ашера, синдром Ушера, наследственная глухота и слепота, геномная терапия, интерактом, моделирование.*

Для цитирования: Иванова М.Е., Атарщиков Д.С., Демчинский А.М. и др. Изучение интерактома при синдроме Ашера в российской популяции для выбора приоритетных патогенетически ориентированных терапевтических подходов. Клиническая офтальмология. 2019;19(4):180–188.

The study of interactome in Russian patients with Usher syndrome to select priority approaches in pathogenetically oriented treatment

M.E. Ivanova¹, D.S. Atarshchikov², A.M. Demchinsky³, V.V. Strelnikov⁴, D. Barh⁵, G.V. Poryadin⁶, L.M. Balashova⁷, J.M. Salmasi⁶

¹LLC "Oftalmic", Moscow, Russian Federation

²Central Clinical Hospital under Presidential Affairs, Moscow, Russian Federation

³Autonomous nonprofit organization "Scientific and industrial laboratory "Sensor technology for deafblind", Moscow, Russian Federation

⁴Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation

⁵Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology (IIOAB), Bangalore, India

⁶Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

⁷Non-profit partnership International Scientific and Practical Center for the Proliferation of Tissues of Russia, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Background: Usher syndrome (USH) is a heterogeneous syndrome characterized by hearing loss and vision loss. The prevalence of USH is estimated to 5:100,000. USH is classified into three subtypes (I, II, and III) depending on the specific gene mutation, i.e., MYO7A, USH1C, CDH23, PCDH15, USH1G, CIB2 for type 1; USH2A, ADGRV1, DFNB31 for type 2; and CLRN1 for type 3. USH requires genetic studies to confirm the diagnosis, to manage patients, and to develop pathogenetically oriented treatment approaches. Historical aspects and development of molecular diagnosis of the disease, as well as evolution of approaches to the treatment are discussed.

Aim: to study mutational spectrum in a cohort of Russian patients with USH and to analyze metabolome and interactome as well as pathogenic pathways of USH development to discover targeted therapies.

Patients and Methods: 28 patients with USH were enrolled in the study and underwent examinations (clinical trial protocol No. NCT03319524). Comprehensive eye and ENT examination as well genetic studies were performed. The diagnosis was confirmed by MLPA next-generation sequencing and Sanger sequencing.

Results: type 1 USH was diagnosed in 53.57% of patients and type 2 USH in 39.2% of patients. 17.85% were not confirmed genetically being in line with world statistics. Mutations in genes MYO7A (72.72%), CDH23 (9.09%), PCDH15 (9.09%), and USH1C (9.09%) were found in 11 patients. 11 mutations were identified in MYO7A gene, 54.54% were pathogenic mutations described for the first time. MYO7A: p.Q18* was the most common (27.27%) mutation associated with early and the most severe clinical manifestations. Two novel mutations (p.E1301* u c.158-?_318+?del) were identified in PCDH15 gene. In 90% of patients with type 2 USH, the diagnosis was confirmed genetically. 11 mutations were identified in USH2A gene, 27% were pathogenic causative mutations described for the first time. The most common mutations in USH2A were p.W3955* (50%), p.E767fs, p.R1653*, and c.8682-9A>G (20% each).

Conclusion: detailed in silico analysis of metabolome and interactome as well as pathogenic pathways of USH development in Russian cohort was performed. The most promising treatment strategies including gene therapy are discussed.

Keywords: USH, USH2A, MYO7A, mutation, Usher syndrome, congenital deaf-blindness, gene therapy, interactome, modeling.

For citation: Ivanova M.E., Atarshchikov D.S., Demchinsky A.M. et al. The study of interactome in Russian patients with Usher syndrome to select priority approaches in pathogenetically oriented treatment. Russian Journal of Clinical Ophthalmology. 2019;19(4):180–188.

ВВЕДЕНИЕ

Синдром Ашера (Usher syndrome, USH) является ауто-сомно-рецессивным заболеванием, на которое приходится почти половина всех случаев сочетанной наследственной глухоты и слепоты. По оценкам, распространенность USH составляет от 3,2 до 6,2 на 100 000 [1]. Тем не менее распространенность может быть до 1 на 6000. USH проявляется нарушением слуха, вестибулярной дисфункцией и пигментным ретинитом (RP) (синоним — тапеторетинальная абиотрофия сетчатки). В зависимости от возраста начала и тяжести клинических проявлений USH подразделяют на три основных клинических подтипа: USH1, USH2 и USH3. USH1 является наиболее тяжелой формой, наблюдающейся с рождения или с манифестацией до 5 лет, которая возникает в результате мутаций в любом из 6 генов: MYO7A, USH1C, CDH23, PCDH15, USH1G и CIB2. USH2 связан с мутациями в 3 генах: USH2A, ADGRV1 и DFNB31. USH3 вызван мутациями в гене CLRN1. Недавно был выделен 4-й атипичный USH, который возникает в результате мутаций в любом из генов: HARS, CEP250, PDZD7, C2orf71. На долю USH1 приходится около трети всех зарегистрированных случаев USH, на долю USH2 — две трети. USH3 протекает клинически наиболее благоприятно, встречается очень редко (~3%).

В течение последних нескольких лет были предприняты значительные усилия для описаний молекулярных характеристик, спектра мутаций и диагностики USH в различных популяциях, в т. ч. в испанской [2], американской [3], европейской [1], датской [4], финской [5], британской [1], алжирской [6], итальянской [7], немецкой [8], арабской [9], африканской [6] и китайской [10]. Современные методы секвенирования следующего поколения (next generation sequencing — NGS) значительно улучшили эффективность молекулярной характеристики в USH [1, 3, 11–13]. Кроме того, традиционный метод Сэнгера и метод мультиплексной амплификации (Multiplex ligation-dependent probe amplification — MLPA) успешно применяются для выявления глубоких интронных мутаций, больших делеций/

дупликаций и вариаций числа копий генов (copy number variation — CNV).

Работы, в которых были представлены молекулярный профиль пациентов при центральных дистрофиях сетчатки в российской популяции [14] и генотип/фенотип корреляции в единичных клинических случаях пациентов с USH [15], уже были опубликованы авторами. Тем не менее нет опубликованных данных по USH в российской когорте в соответствии с утвержденным протоколом клинических исследований.

Цель исследования: изучить спектр мутаций российской когорты пациентов с USH в рамках наблюдательного исследования NCT03319524 [16] и провести анализ метаболома и интерактома, а также патогенетических путей развития USH для поиска путей таргетного лечения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

28 пациентов из группы 3214 пациентов (11 мужчин, 17 женщин; возраст — 47,6±12,7 года; возрастной диапазон проявления заболевания — 0–18 лет) с наиболее выраженными клиническими симптомами USH (нейросенсорная тугоухость 3–4 степени и сужение полей зрения до 5–15 градусов) были приглашены к участию. Национальный состав группы: 21 пациент (75%) — русские, 3 (10%) — украинцы, 2 (7%) — евреи, 1 (4%) — белорус и 1 (4%) — чуваш. Письменное информированное согласие было получено у всех 28 пациентов, исследование было одобрено Независимым международным этическим комитетом (Москва).

Клиническое обследование: каждому пациенту проводилась биомикроскопия, периметрия, визометрия, оптическая когерентная томография (ОКТ), офтальмоскопия с фоторегистратией, электроретинография (ЭРГ), запись зрительно вызванных потенциалов, 32-оттеночный цветотест Хью, тональная и электронная аудиометрия, измерение акустического импеданса, вестибулометрия, электронистагмография и постурометрия. Молекулярно-генетическое подтверждение клинического диагноза

выполнено методом высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК. Был проведен подробный компьютерный анализ патогенетических путей развития клинической картины у 20 пациентов с подтвержденным диагнозом USH. Использовались программное обеспечение HGVS, Genemap, Genemania, CLINVAR, Genego, STRING, Cytoscape и база данных консорциума EMBL для моделирования интерактома и анализа полученных данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота обнаруженных мутаций в обследованной когорте пациентов составила: 50% в гене *USH2A*, 39% — *MYO7A*, 5% — *PCDH15*, 3% — *USH1C*, 3% — *CDH23*, характеристика

которых представлена авторами ранее [17] (табл. 1). Для обсуждения терапевтических подходов к коррекции утраченных или недостаточных функций генов в данной группе пациентов необходимо изучение и сопоставление всех факторов, которые влияют на патогенез заболевания, в т. ч. учет молекулярно-генетических факторов и факторов внешней среды: (геном → транскриптом → протеом → метаболом), в совокупности образующих интерактом, которые определяют фенотип того или иного пациента [18]. Регуляции метаболизма в сетчатке обеспечиваются: 1) количеством ферментов в зависимости от активации или ингибирования транскрипции и синтеза белков; 2) каталитической активностью ферментов, что контролируется аллостерическими модуляторами, активаторами, конкурент-

Таблица 1. Описание исследованной российской когорты пациентов с синдромом Ашера

Table 1. Characteristics of Russian cohort of patients with Usher syndrome

Ген Gene	Генотип Genotype	Расположение Position	Позиция в кДНК c-DNA position	Аминокислотная замена Aminoacid change	Зиготность Zygosity	Частота аллеля Allele frequency (ExAC)	Уровень патогенности аллеля Allele score (ClinVar, LOVD)	Описанный/Новый Known/New	Подтвержденный тип Confirmed type	rsID (dbSNP)	Популяция Population
USH2A	T/T	61	c.G11864A	p.W3955*	Гомо/ Homo	8,48E-05	Патогенный/ Pathogenous	Описанный/ Known	USH2	rs111033364	Голландцы/ Dutch
MYO7A	T/T	3	c.C52T	p.Q18*	Гомо/ Homo	ND	Патогенный/ Pathogenous	Описанный/ Known	USH1	–	Европейцы/ Europeans
USH2A	G/T	29	c.C5816A	p.S1939*	Гетеро/ Hetero	ND	Патогенный/ Pathogenous	Новый/New	USH2	–	–
USH2A	T/C	интрон 43 intron 43	c.8682-9A>G	–	Гетеро/ Hetero	9,19E-05	Uv2	Описанный/ Known		–	Немцы/ Germans
USH2A	C/T	61	c.G11864A	p.W3955*	Гетеро/ Hetero	8,48E-05	Патогенный/ Pathogenous	Описанный/ Known	USH2	rs111033364	Голландцы/ Dutch
USH2A	G/A	24	c.C4957T	p.R1653*	Гетеро/ Hetero	1,92E-05	Патогенный/ Pathogenous	Описанный/ Known		rs754768875	Голландцы/ Dutch
MYO7A	T/T	38	c.C5215T	p.R1739*	Гомо/ Homo	ND	Патогенный/ Pathogenous	Описанный/ Known	USH1	–	Европейцы/ Europeans
MYO7A	C/T	5	c.C448T	p.R150*	Гетеро/ Hetero	ND	Патогенный/ Pathogenous	Описанный/ Known	USH1	rs121965079	Европейцы/ Europeans
MYO7A	GAAGGAG- CTCCTGG/	23	c.2766_2779del	p.K922fs	Гетеро/ Hetero	0,0002	Патогенный/ Pathogenous	Описанный/ Known		rs782339376	Финны/ Finns
USH2A	C/T	61	c.G11864A	p.W3955*	Гетеро/ Hetero	8,48E-05	Патогенный/ Pathogenous	Описанный/ Known	USH2	rs111033364	Голландцы/ Dutch
USH2A	C/-	13	c.2299delG	p.E767fs	Гетеро/ Hetero	0,0008	Патогенный/ Pathogenous	Описанный/ Known		rs80338903	Европейцы/ Europeans
USH2A	G/A	29	c.C5836T	p.R1946*	Гетеро/ Hetero	9,43E-06	Патогенный/ Pathogenous	Описанный/ Known	USH2	rs751130485	Британцы/ British
USH2A	G/A	24	c.C4957T	p.R1653*	Гетеро/ Hetero	1,92E-05	Патогенный/ Pathogenous	Описанный/ Known		rs754768875	Голландцы/ Dutch
PCDH15	wt/del	4	c.158-?_318+?del	–	Гетеро/ Hetero	ND	Uv4	Новый/New	USH1	–	–
PCDH15	C/A	27	c.G3901T	p.E1301*	Гетеро/ Hetero	ND	Патогенный/ Pathogenous	Новый/New		–	–
USH2A	C/T	интрон 43 intron 43	c.8682-9A>G	–	Гетеро/ Hetero	9,19E-05	Uv2	Описанный/ Known	USH1	rs372347027	Немцы/ Germans

Таблица 1 (продолжение)

Table 1 (continuation)

Ген Gene	Генотип Genotype	Расположение Position	Позиция в кДНК c.DNA position	Аминокислотная замена Aminoacid change	Зиготность Zygosity	Частота аллеля Allele frequency (ExAC)	Уровень патогенности аллеля Allele score (ClinVar, LOVD)	Описанный/Новый Known/New	Подтвержденный тип Confirmed type	rsID (dbSNP)	Популяция Population
USH2A	C/-	13	c.2299delG	p.E767fs	Гетеро/ Hetero	0,0008	Патогенный/ Pathogenic	Описанный/ Known	USH1	rs80338903	Европейцы/ Europeans
USH2A	C/T	61	c.G11864A	p.W3955*	Гетеро/ Hetero	8,48E-05	Патогенный/ Pathogenic	Описанный/ Known	USH2	rs111033364	Голландцы/ Dutch
USH2A	G/T	18	c.C3932A	p.S1311*	Гетеро/ Hetero	9,42E-06	Патогенный/ Pathogenic	Описанный/ Known		-	Скандинавы/ Scandinavians
MYO7A	G/T	интрон 24 intron 24	c.3109-12G>A	-	Гетеро/ Hetero	0,00003	Uv3	Новый/New	USH2	rs782566244	-
MYO7A	T/T	3	c.C52T	p.Q18*	Гомо/ Homo	ND	Патогенный/ Pathogenic	Описанный/ Known	USH1	-	Европейцы/ Europeans
USH1C	G/A	26	c.C2585T	p.P862L	Гетеро/ Hetero	6,59E-05	Uv1	Описанный/ Known	USH1	rs749460267	Испанцы/французы Spanish/French
SPATA7	C/T	6	c.C769T	p.R257C	Гетеро/ Hetero	ND	Uv4	Новый/New		-	-
USH2A	-/-	63	c.13374delA	p.E4458fs	Гомо/ Homo	9,42E-06	Патогенный/ Pathogenic	Описанный/ Known	USH2	rs727503715	Европейцы/ Europeans
MYO7A	C/T	3	c.C52T	p.Q18*	Гетеро/ Hetero	ND	Патогенный/ Pathogenic	Описанный/ Known	USH1	-	Европейцы/ Europeans
MYO7A	G/T	6	c.G496T	p.E166*	Гетеро/ Hetero	ND	Патогенный/ Pathogenic	Новый/New		-	-
MYO7A	C/T	25	c.C3262T	p.Q1088*	Гетеро/ Hetero	ND	Патогенный/ Pathogenic	Описанный/ Known	USH1	rs376535635	Европейцы/ Europeans
MYO7A	G/A	17	c.G1955A	p.C652Y	Гетеро/ Hetero	ND	Uv3	Новый/New		-	-
MYO7A	G/A	39	c.G5389A	p.D1797N	Гетеро/ Hetero	9,15E-05	Uv3	Новый/New		rs376674270	-
MYO7A	-TGCC	16	c.1877_1878insTGCC	p.G626fs	Гетеро/ Hetero	ND	Патогенный/ Pathogenic	Новый/New	USH1	-	-
MYO7A	C/T	25	c.C3262T	p.Q1088*	Гетеро/ Hetero	ND	Патогенный/ Pathogenic	Описанный/ Known		rs376535635	Европейцы/ Europeans
USH2A	C/A	54	c.G10709T	p.C3570F	Гетеро/ Hetero	ND	Uv3	Новый/New	USH2	-	-
USH2A	T/C	интрон 67 intron 67	c.14791+4A>G	-	Гетеро/ Hetero	ND	Патогенный/ Pathogenic	Описанный/ Known		-	Европейцы/ Europeans
CDH23	C/T	35	c.C4504T	p.R1502*	Гетеро/ Hetero	3,79E-05	Патогенный/ Pathogenic	Описанный/ Known	USH1	rs769742202	Американцы/ Americans
MYO7A	G/A	27	c.G3397A	p.G1133R	Гетеро/ Hetero	0	Uv4	Новый/New		rs782313913	-
USH2A	C/T	61	c.G11864A	p.W3955*	Гетеро/ Hetero	8,48E-05	Патогенный/ Pathogenic	Описанный/ Known	USH2	rs111033364	Голландцы/ Dutch
USH2A	T/C	интрон 56 intron 56	c.11048-2A>G	-	Гетеро/ Hetero	0,000009431	UV4	Новый/New		rs200871041	-

Примечание. к.ДНК – кодирующая цепь дезоксирибонуклеиновой кислоты, rsID – уникальный идентификатор единичной однонуклеотидной замены в базе данных (dbSNP).

Note. c.DNA – coding chain of deoxyribonucleic acid, rsID – reference single nucleotide polymorphism ID in database (dbSNP).

ными ингибиторами (т. е. агонистами и антагонистами) и посттрансляционными модификациями, такими как фосфорилирование, ацетилирование и гликозилирование под контролем гормонов, ростовых факторов и нейротрансмиттеров; 3) субстратной доступностью (концентрацией), которая зависит от систем активного мембранного транспорта (помпы, транспортеры, требующие затрат энергии) и пассивной диффузии через субстрат-специфические мембранные белки (ионные каналы), которые контролируются концентрационным градиентом. В процессе *фототрансдукции* происходит передача зрительного сигнала, начиная с захвата фотонов сетчаткой глаза и завершая формированием зрительных образов в зрительной коре головного мозга. Подробнее о геномном контроле фототрансдукции можно узнать, изучая функцию каждого из белков фототрансдукции, транскрибуемых с указанных генов, сначала по отдельности, а затем собирая в одну общую сеть интерактома. Изучение *интерактома*, т. е. полного набора взаимодействий между молекулами в отдельной клетке, как непосредственных физических контактов между белками (белок-белковые взаимодействия), так и не прямых взаимодействий генов (например, эпистаз, ап-регулирование, ко-активация, влияние факторов транскрипции и пр.), позволяет выделять наиболее перспективные терапевтические мишени. В то время как данные об экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) генов и данные протеомного анализа не раскрывают полностью всего того, что может происходить в клетке, метаболические профили (изучение *метаболизма* сетчатки) [19, 20] могут дать мгновенный снимок физиологических процессов в клетке. Одна из задач современной медицины, системной биологии и функциональной геномики — это интегрирование данных протеомики, транскриптомики и метаболической информации для получения более целостного представления о строении и функции сетчатки у конкретного пациента. При компьютерном анализе и изучении взаимодействия наиболее активных генов метаболизма сетчатки при USH в изучаемой когорте выяснилось, что в 67% случаев наблюдается физическое взаимодействие генов, в 13% — ко-экспрессия, в 6% — ко-локализация, в 4% — совместные метаболические пути, в 1,4% — геновые взаимодействия, 0,59% имеют общие белковые домены. В 6% случаев взаимодействие генов или белков, синтезируемых с этих генов, не доказано, но по некоторым предсказательным алгоритмам их взаимодействие вероятно.

Анализ интерактома (рис. 1) показывает, что у протокадгерина (PCDH15) большая сеть контактов с кадгеринами (CDH23), у ушерина (USH2A) — с разными видами коллагенов (COL4A3), у миозина (MYO7A) — с вирулиновым комплексом (WHRN) и различными подвидами актина (ACTA2, ACTG2). Примечательно, что MYO7A взаимодействует с гармоином, что позволяет предположить, что он может участвовать в закреплении верхнего конца цилии стержня фоторецептора (видоизмененные реснички). MYO7A также взаимодействует с некоторыми сплайс-формами протокадгерина (PCDH15), предполагается, что этот моторный белок может участвовать в формировании комплексов на обоих концах реснички (рис. 2).

MYO7A — ген, кодирует одну из форм белка миозина, расположен на 11-й хромосоме и имеет 55 экзонов. Миозин действует как моторный белок, управляемый АТФазой, для транспорта меланосом и фагосом вдоль нитей актина в пигментном эпителии сетчатки, а также для транспорта

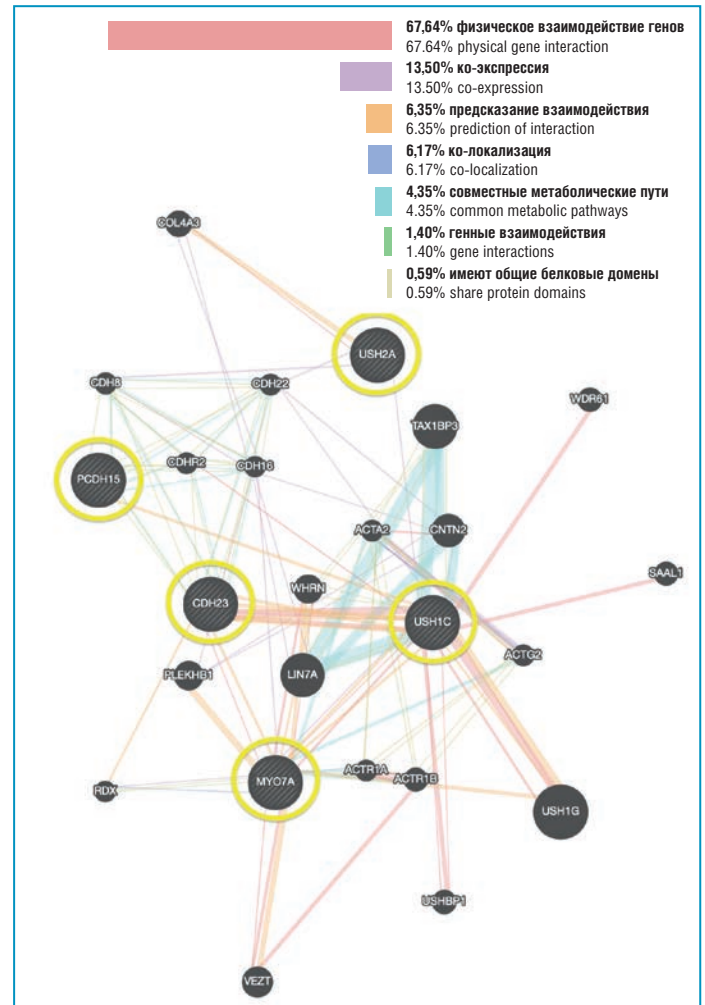


Рис. 1. Визуализация генового взаимодействия в интерактоме пациентов с синдромом Ашера в российской популяции с количественными характеристиками, высчитанными на основе нейронных сетей и алгоритмов анализа баз данных. Для построения схемы использован online программный инструмент GeneMANIA®

Fig. 1. Schematic gene interactions in Russian patients with Usher syndrome and quantitative characteristics calculated on the basis of neural network and database analysis algorithms. GeneMANIA® online software tool was applied to generate the diagram

опсина и других белков фототрансдукции в фоторецепторах. Мутации в гене MYO7A вызывают тяжелую и глубокую непрогрессирующую нейросенсорную тугоухость, пигментный ретинит до начала подросткового периода и часто с вестибулярной арефлексией. Острота центрального зрения обычно лучше, чем 0,3, в первые два десятилетия жизни. Поля зрения у пациентов с USH1B начинают сужаться в средней периферии и переходят к остаточным небольшим центральным островкам с небольшими участками периферических полей зрения на самых поздних стадиях заболевания. Офтальмоскопически у пациентов наблюдаются ступеванность артерий и атрофия ретиального пигментного эпителия (РПЭ) с пигментацией по типу «костных телец». Аутофлуоресценция глазного дна может показать кольцо гиперфлуоресценции в макуле. ОКТ часто выявляет потерю наружных слоев сетчатки и присутствие кистозного макулярного отека. Ганцфельд-ЭРГ почти всегда нерегистрируемая или амплитуды сигналов сильно снижены.

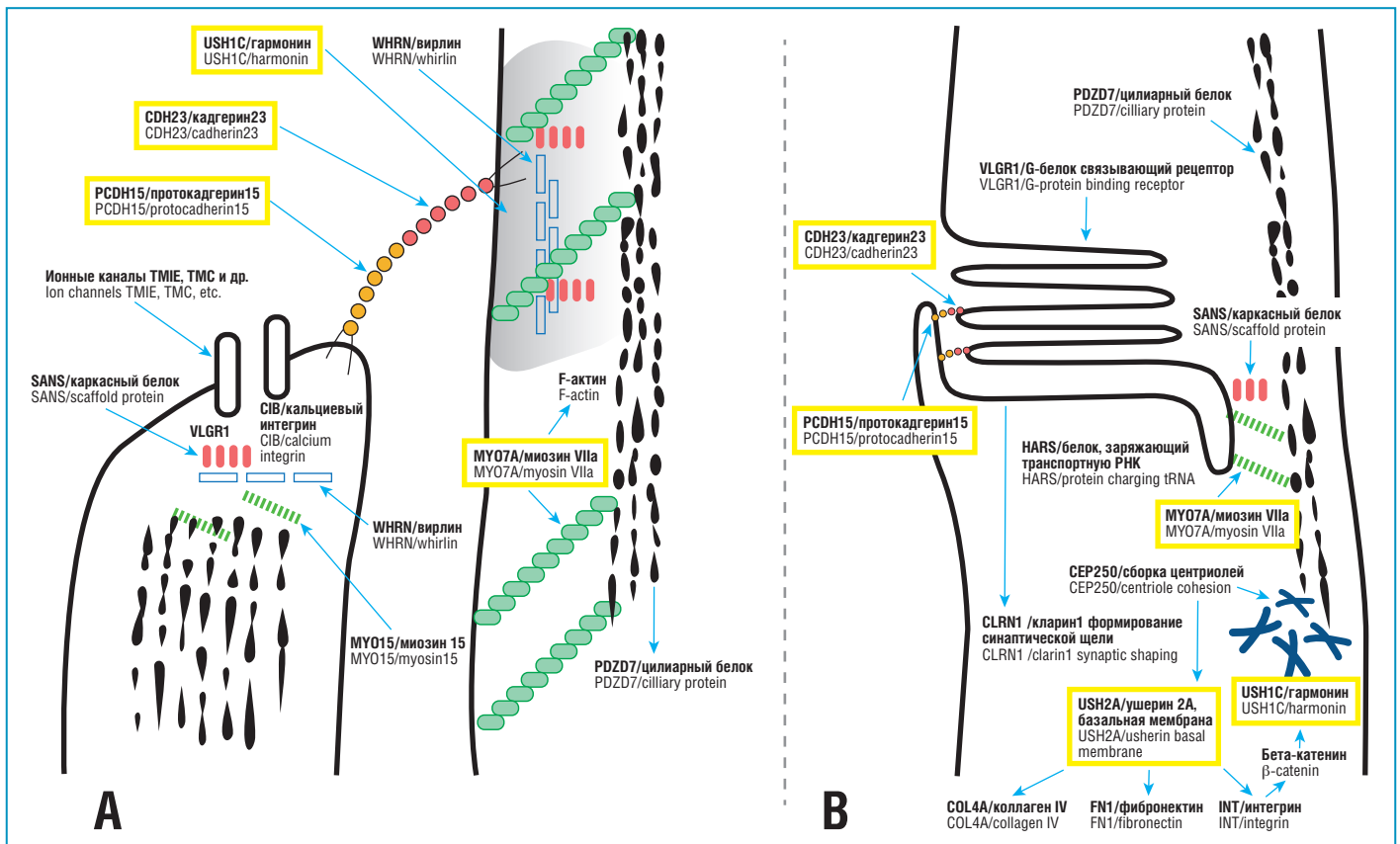


Рис. 2. Схематичное представление основных звеньев интерактома при синдроме Ашера: структура волоска улитки внутреннего уха (А) и палочкового фоторецептора сетчатки глаза (В). Стрелками и желтым выделением указаны основные места локализации белковых комплексов или мест действия факторов транскрипции¹

Fig. 2. Major interactome components in Usher syndrome: the structure of cochlear hair cell (A) and retinal rod cell (B). Major sites of protein complex localization or transcription factor effects are shown with arrows or in yellow¹

В сетчатке большая часть молекул миозина MYO7A находится в пигментном эпителии сетчатки (ПЭ), где происходят многие реакции зрительного ретиноидного цикла. V.S. Lopes et al. наблюдали [21], что сетчатка с мутациями в MYO7A устойчива к острому световому повреждению по причине более низкого уровня RPE65, изомеразы RPE, которая играет ключевую роль в ретиноидном цикле. Было показано, что RPE65 обычно подвергается светозависимой транслокации, чтобы стать более сконцентрированным в центральной области клеток RPE. Эта транслокация требует участия моторного белка MYO7A, поэтому при мутациях в гене MYO7A RPE65 частично локализован на свету и распадается быстрее, возможно, из-за его неправильной локализации, что дает правдоподобное объяснение его более низким уровням. После 50–60% фотозасвета сетчатка с мутацией в MYO7A демонстрирует повышенные уровни всех трансретиниловых эфиров на начальных стадиях темнового восстановления, что согласуется с дефицитом активности RPE65. Наконец, MYO7A и RPE65 совместно иммунопреципитируются из клеточного лизата RPE антителами против любого из белков, и два белка были локализованы в одних и тех же участках клетки, что указывает на их прямое или косвенное взаимодействие. Вместе результаты подтверждают роль MYO7A в транслокации RPE65, иллюстрируя

участие молекулярного мотора в пространственно-временной организации ретиноидного цикла в процессе фототрансдукции [21].

На основе этих знаний можно предположить, что зарегистрированный и разрешенный к применению на территории США препарат Luxturna (воретиген непарвовек), представляющий собой рабочую копию гена RPE65 на аденовирусном носителе, в будущем может показать свою эффективность при терапии MYO7A, ассоциированного с USH1. Также разрабатывается генно-терапевтический препарат UshStat (компания Sanofi совместно с Oxford biomedica) с доставкой правильно работающей копии гена MYO7A на лентивирусном носителе [22–25], однако продвижения в этой области происходят относительно медленно, в т. ч. в связи с повышенной иммуногенностью лентивирусной технологии доставки.

USH2A — ген, кодирующий белок ушерин, расположен на 1-й хромосоме и имеет 72 экзона. Ушерин содержит участки ламинина эндотелиального ростового фактора, домен пентаксина и множество участков фибронектина типа III, он находится в базальной мембране и важен для развития и поддержания гомеостаза внутреннего уха и сетчатки. Для этого гена было найдено несколько вариантов транскриптов, кодирующих разные изоформы белка. Мутации в гене USH2A являются наи-

¹ Рисунок создан авторами статьи (Иванова М.Е., графическая редакция – Демчинский А.М.) на основе данных литературы и баз данных Genbank, Uniprot, SwissProt

¹ Created by the authors (Ivanova M.E., design – Demchinsky A.M.) based on published data and Genbank, Uniprot, and SwissProt databases

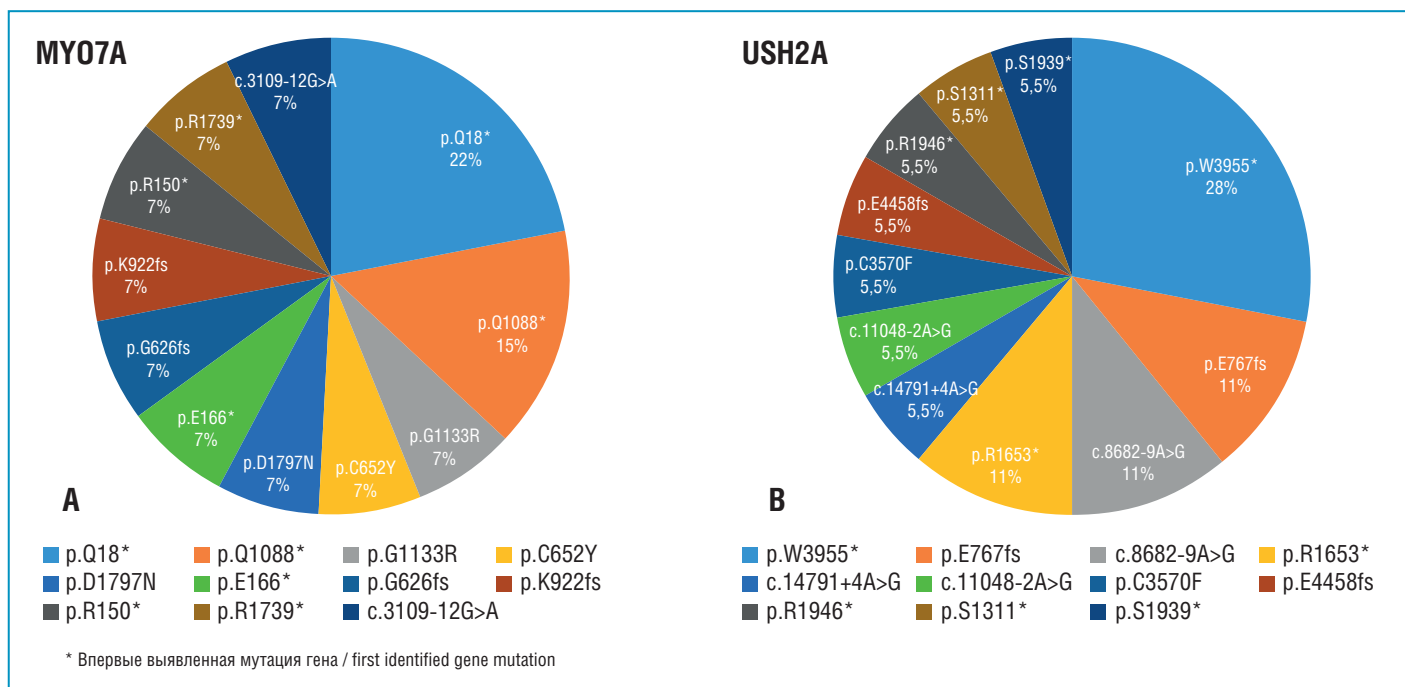


Рис. 3. Частота мутаций в генах, наиболее частых при синдроме Ашера, полученная в обследованной когорте пациентов: А – MYO7A, В – USH2A

Fig. 3. The rate of the most common genetic mutations in Russian patients with Usher syndrome. A – MYO7A, B – USH2A

более частой причиной аутосомно-рецессивного несиндромального пигментного ретинита и USH2 в мировой статистике, однако в нашей группе пациентов в связи с особенностями формирования когорты (по критериям включения в группу принимались пациенты с наиболее серьезными нарушениями) большой процент составили пациенты с USH1. Никталопия и потеря периферического поля зрения в течение первых двух десятилетий, прогрессирующая с возрастом, наблюдались у пациентов с этим типом заболевания, хотя темпы прогрессирования варьировались с существенной внутри- и межсемейной фенотипической изменчивостью. Терапевтические подходы к коррекции недостаточной функции белка ушерина в связи с большим размером гена затруднены, однако разрабатываются различные подходы к доставке более длинных генов (так называемые наночастицы) и попытки замены частей гена (генная терапия мутаций в 13-м экзоне гена *USH2A*, разрабатываемая компанией ProQR), в т. ч. с применением технологии CRISPR [26]. Описание исследованной российской когорты пациентов с синдромом Ашера и частота мутаций в генах, наиболее частых при данном синдроме, представлены на рисунке 3 и в таблице 1.

PCDH15 — ген суперсемейства кадгеринов, кодирует один из подтипов протокадгерина, расположен на 10-й хромосоме и насчитывает 48 экзонов. Протокадгерин кодирует интегральные мембранные белки, которые обеспечивают кальций-зависимую клеточно-клеточную адгезию. Он играет существенную роль в поддержании нормальной функции сетчатки и кортиева органа. *CDH23* вместе с *PCDH15* образуют концевые звенья, которые соединяют стереоцилии, что крайне важно для поддержания жизнеспособности фоторецепторов и клеток кортиева органа. Мутации в этом гене приводят к потере слуха и развитию USH1. Характерен альтернативный сплайсинг, что приводит к появлению нескольких изоформ белка [27].

USH1C — ген ушерин 1С, расположен на 11-й хромосоме, имеет 29 экзонов. Этот ген кодирует белок-каркас, который участвует в сборке белковых комплексов. Белок содержит PDZ-домены, область сверхскрученной спирали с двойным сигналом ядерной локализации. Дефекты в этом гене являются причиной развития USH1C и несиндромальной нейросенсорной тугоухости аутосомно-рецессивного типа 18. Для этого гена было обнаружено множество вариантов транскриптов, кодирующих разные изоформы белка.

CDH23 — кадгерин-связанный белок 23-го подтипа, расположен на 10-й хромосоме, имеет 71 экзон. Этот ген также является членом суперсемейства кадгеринов. Белок с этого гена участвует в организации стереоцилий и формировании ресничек фоторецепторов. USH1D и несиндромальная аутосомно-рецессивная глухота DFNB12 вызваны аллельными мутациями этого кадгерин-подобного гена. Описаны альтернативные варианты сплайсинга, кодирующие разные изоформы этого белка [28].

Терапевтические подходы к коррекции функции генов *USH1C*, *CDH23* и *PCDH15* пока ограничиваются косвенными методиками — использованием аминокликозидов как *ex vivo*, так и *in vivo* для считывания преждевременных стоп-кодонов или нонсенс-мутаций [29]. Аминокликозиды в данном случае работают путем ослабления строгого механизма отбора рибосомой при синтезе белка из мРНК. Как при антибактериальном действии, когда они нарушают правильную генерацию полипептидов бактерий, так и в этом случае, расслабляя трансляцию, аминокликозид позволяет вставлять аминокислоту в область стоп-кодона вместо обрыва синтеза белка. Хотя эта аминокислота может быть не той аминокислотой, которая наблюдается в белке дикого типа, существует возможность восстановления правильной функции или по крайней мере лучшей функциональности получаемого белка ушерина, кадгерина или протокадгерина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Авторами изложены результаты наблюдательного клинического исследования NCT03319524 и проведен подробный компьютерный анализ метаболизма и интерактома, а также патогенетических путей развития USH в обследуемой когорте пациентов с обсуждением важности патогенетически направленных подходов к терапии и наиболее перспективных подходов к терапевтическому воздействию, в т. ч. с применением генной терапии.

Финансирование/Funding

Исследование спонсировано БФ «Фонд поддержки слепоглухих «Со-единение» и АНО «Лаборатория Сенсор-Тех». *Autonomous non-commercial organization Laboratory "Sensor technology for deafblind" and Deaf-Blind Support Foundation "Con-nection".*

Литература/References

- Bonnet C., Riahi Z., Chantot-Bastarud S. et al. An innovative strategy for the molecular diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. *Eur J Hum Genet.* 2016;24:1730–1738. DOI: 10.1038/ejhg.2016.99.
- Bernal S., Medà C., Solans T., Ayuso C., Garcia-Sandoval B., Valverde D. et al. Clinical and genetic studies in Spanish patients with Usher syndrome type II: description of new mutations and evidence for a lack of genotype — phenotype correlation. *Clin Genet.* 2005;68(3):204–214. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2005.00481.x.
- Weston M.D., Eudy J.D., Fujita S. et al. Genomic structure and identification of novel mutations in usherin, the gene responsible for Usher syndrome type IIa. *Am J Hum Genet.* 2000;66:1199–1210. DOI:10.1086/302855.
- Dad S., Rendtorff N.D., Tranebjærg L. et al. Usher syndrome in Denmark: mutation spectrum and some clinical observations. *Mol Genet Genomic Med.* 2016;4:527–539. DOI: 10.1002/mgg3.228.
- Vastinsalo H., Isosomppi J., Aittakorpi A., Sankila E.M. Two Finnish USH1B patients with three novel mutations in myosin VIIA. *Mol Vis.* 2006;12:1093–1097.
- Abdi S., Bahloul A., Behloul A. et al. Diversity of the Genes Implicated in Algerian Patients Affected by Usher Syndrome. *PLoS One.* 2016;11: e0161893. DOI: 10.1371/journal.pone.0161893.
- Sodi A., Mariottini A., Passerini I. et al. MYO7A and USH2A gene sequence variants in Italian patients with Usher syndrome. *Mol Vis.* 2014;20:1717–1731. PMID 25558175.
- Dreyer B., Brox V., Tranebjærg L. et al. Spectrum of USH2A mutations in Scandinavian patients with Usher syndrome type II. *Hum Mutat.* 2008;29:451. DOI: 10.1002/humu.9524.
- Rizel L., Safieh C., Shalev S.A., Mezer E., Jabaly-Habib H., Ben-Neriah Z. et al. Novel mutations of MYO7A and USH1G in Israeli Arab families with Usher syndrome type I. *Mol Vis.* 2011;17:3548–3555. PMID: 22219650.
- Liu F., Li P., Liu Y. et al. Novel compound heterozygous mutations in MYO7A in a Chinese family with Usher syndrome type I. *Mol Vis.* 2013;19:695–701. PMID: 23559863.
- Van Wijk E., Pennings R.J., Brinke H. et al. Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type 2A (USH2A) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II. *Am J Hum Genet.* 2004;74:738–744. DOI: 10.1086/383096.
- Aparisi M.J., Aller E., Fuster-García C. et al. Targeted next generation sequencing for molecular diagnosis of Usher syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:168. DOI: 10.1186/s13023-014-0168-7.
- Cremers F.P., Kimberling W.J., Külm M. et al. Development of a genotyping microarray for Usher syndrome. *J Med Genet.* 2007;44:153–160. DOI: 10.1136/jmg.2006.044784.
- Zolnikova I.V., Strelnikov V.V., Ivanova M.E. et al. Stargardt disease-associated mutation spectrum of a Russian Federation cohort. *Eur J Med Genet.* 2017;60:140–147. DOI: 10.1016/j.ejmg.2016.12.002.
- Зольникова И.В., Иванова М.Е., Стрельников В.В. и др. Фенотипическая вариабельность клинико-функциональных проявлений синдрома Ашера 2 типа (USH2A) с молекулярно-генетической верификацией диагноза. *Российский офтальмологический журнал.* 2014;2:83–89 [Zolnikova I.V., Ivanova M.E., Strelnikov V.V. et al. Variability of clinical and functional manifestations of the phenotype of Usher syndrome of 2A type (USH2A) with molecular and genetic verification of the diagnosis Rossiyskiy oftalmologicheskii zhurnal. 2014;2:83–89 (in Russ.)].
- Clinical and Genetic Testing of Patients With Usher Syndrome. (Electronic resource). URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03319524?term=NCT03319524&rank=1>. Access date: 21.02.2019.

- Ivanova M.E., Trubilin V.N., Atarshchikov D.S. et al. Genetic screening of Russian Usher syndrome patients toward selection for gene therapy. *Ophthalmic Genet.* 2018;39(6):706–713. DOI: 10.1080/13816810.2018.1532527.
- Prakash G., Iwata T. *Advances in Vision Research, Volume I. Genetic Eye Research in Asia and the Pacific*; New York: Springer; 2017.
- William J. Griffiths *Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling*. Royal Society of Chemistry, 2008.
- Tan S.Z., Begley P., Mullard G. et al. Introduction to metabolomics and its applications in ophthalmology *Eye (Lond)*. 2016;30(6):773–783. DOI: 10.1038/eye.2016.37.
- Lopes V.S., Gibbs D., Libby R.T. et al. The Usher 1B protein, MYO7A, is required for normal localization and function of the visual retinoid cycle enzyme, RPE65. *Hum Mol Genet.* 2011;20(13):2560–2570. DOI: 10.1093/hmg/ddr155.
- A Study to Determine the Long-Term Safety, Tolerability and Biological Activity of UshStat® in Patients With Usher Syndrome Type 1B. (Electronic resource). URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02065011>. Access date: 21.02.2019.
- Study of SAR421869 in Patients With Retinitis Pigmentosa Associated With Usher Syndrome Type 1B. (Electronic resource). URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01505062>. Access date: 21.02.2019.
- Zallocchi M., Binley K., Lad Y. et al. EIAV-based retinal gene therapy in the shaker1 mouse model for usher syndrome type 1B: development of UshStat. *PLoS One.* 2014;9: e94272. DOI: 10.1371/journal.pone.0094272.
- Jacobson S.G., Cideciyan A.V., Gibbs D. et al. Retinal disease course in Usher syndrome 1B due to MYO7A mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(11):7924–736. DOI: 10.1167/iovs.11-8313.
- Fuster-García C., García-García G., González-Romero E. et al. USH2A Gene Editing Using the CRISPR System. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2017;8:529–541. DOI: 10.1016/j.omtn.2017.08.003.
- Roux A.F., Faugère V., Le Guédard S. et al. Survey of the frequency of USH1 gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%. *J Med Genet.* 2006;43(9):763–768. DOI: 10.1136/jmg.2006.041954.
- Astuto L.M., Bork J.M., Weston M.D. et al. CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness. *Am J Hum Genet.* 2002;71:262–275. DOI: 10.1086/341558.
- Rebibo-Sabbah A., Nudelman I., Ahmed Z.M. et al. In vitro and ex vivo suppression by aminoglycosides of PCDH15 nonsense mutations underlying type 1 Usher syndrome. *Hum Genet.* 2007;122(3–4):373–381. DOI: 10.1007/s00439-007-0410-7.

Сведения об авторах:

¹Иванова Марианна Евгеньевна — к.м.н., руководитель, ORCID iD 0000-0002-1089-4293;

²Атаршиков Дмитрий Сергеевич — к.м.н., врач-офтальмолог, ORCID iD 0000-0003-4401-9099;

³Демчинский Андрей Михайлович — к.м.н., руководитель медицинских проектов, ORCID iD 0000-0002-1689-9394;

⁴Стрельников Владимир Викторович — д.б.н., заведующий лабораторией эпигенетики, ORCID iD 0000-0001-9283-902X;

⁵Бар Дебмала — PhD, начальник отдела исследований и разработки, ORCID iD 0000-0002-2557-7768;

⁶Порядин Геннадий Васильевич — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, почетный заведующий кафедрой патофизиологии, ORCID iD 0000-0003-2010-3296;

⁷Балашова Лариса Маратовна — д.м.н., профессор, руководитель, ORCID iD 0000-0001-9349-7092;

⁸Салмаси Жеан Мустафаевич — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патофизиологии, ORCID iD 0000-0001-8524-0019.

¹НКЦ «Офтальмик», 125167, Россия, г. Москва, Ленинградский пр-т, д. 47/3–3.

²ФГБУ «ЦКБ с поликлиникой». 121359, Россия, г. Москва, ул. Маршала Тимошенко, д. 15.

³АНО «Лаборатория Сенсор-Тех». 115114, Россия, г. Москва, Павелецкая наб., д. 2, стр. 3.

⁴ФГБНУ «МГНЦ». 115478, Россия, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1.

⁵Центр геномики и прикладной генной технологии. 560032, Индия, г. Бангалор, ул. Чоланаяканахалли, д. 209.

⁶ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. 117513, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

⁷НП «МНПЦПТ». 119034, Россия, г. Москва, ул. Пречистенка, д. 29/14.

Контактная информация: Иванова Марианна Евгеньевна, e-mail: info@oftalmic.ru. **Прозрачность финансовой деятельности:** никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. **Конфликт интересов:** Иванова М.Е. является сотрудником НКЦ «Офтальмик». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. **Статья поступила 07.05.2019.**

About the authors:

¹Marianna E. Ivanova — MD, PhD, Head of CRO, ORCID iD 0000-0002-1089-4293;

²Dmitry S. Atarshchikov — MD, PhD, ophthalmologist, ORCID iD 0000-0003-4401-9099;

³Andrey M. Demchinsky — MD, PhD, Head of Medical Projects, ORCID iD 0000-0002-1689-9394;

⁴Vladimir V. Strelnikov — PhD, Head of Epigenetics Laboratory, ORCID iD 0000-0001-9283-902X;

⁵Debmalya Barh — PhD, Head of R&D Department, ORCID iD 0000-0002-2557-7768;

⁶Gennadiy V. Poryadin — MD, PhD, Professor, Corresponding Member of RAS, Honorary Head of Pathophysiology Department, ORCID iD 0000-0003-2010-3296;

⁷Larisa M. Balashova — MD, PhD, Professor, Head of the Center, ORCID iD 0000-0001-9349-7092;

⁶Jean M. Salmasi — MD, PhD, Professor, Head of Pathophysiology Department, ORCID iD 0000-0001-8524-0019.

¹LLC "Oftalmic". 47/3–3, Leningradsky Prospekt, Moscow, 125167, Russian Federation.

²Central Clinical Hospital for Presidential Affairs. 15, Marshala Timoshenko str., Moscow, 121359, Russian Federation.

³Autonomous nonprofit organization "Scientific and industrial laboratory "Sensor technology for deafblind". 2, bld. 3, Paveletskaya naberezhnaya, Moscow, 115114, Russian Federation.

⁴Research Centre for Medical Genetics. 1, Moskvorechie str., Moscow, 115478, Russian Federation.

⁵Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology. 209, Cholanayakanahalli str., Bangalore, 560032, India.

⁶Pirogov Russian National Research Medical University. 1, Ostrovityanov str., Moscow, 117513, Russian Federation.

⁷Non-profit partnership International Scientific and Practical Center for the Proliferation of Tissues of Russia. 29/14, Prechistenka str., Moscow, 119034, Russian Federation.

Contact information: Marianna E. Ivanova, e-mail: info@oftalmic.ru. **Financial Disclosure:** Marianna E. Ivanova is the collaborator of LLC "Oftalmic". Other authors declare that there is no **conflict of interests**. **Received 07.05.2019.**