DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2022.12.1.006>
УДК 616-053.3-056.7-007.2

Гусина А.А.¹ ✉, Гусина Н.Б.¹, Наумчик И.В.¹, Румянцева Н.В.¹, Кулак В.Д.¹, Мотюк И.Н.², Будейко Е.С.¹, Мясников С.О.¹, Криницкая К.А.¹, Сталыбко А.С.¹

¹ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Беларусь

² Гродненский областной клинический перинатальный центр, Гродно, Беларусь

Молекулярно-генетическая характеристика муколипидозов II/III альфа/бета в Республике Беларусь

Вклад авторов: выполнение молекулярно-генетических исследований, анализ полученных данных, написание текста статьи – Гусина А.А.; выполнение биохимических исследований, редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи – Гусина Н.Б.; описание и наблюдение пациентов, редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи – Наумчик И.В.; описание и наблюдение пациентов – Румянцева Н.В., Кулак В.Д., Мотюк И.Н.; выполнение биохимических исследований – Будейко Е.С.; выполнение молекулярно-генетических исследований, подготовка иллюстраций – Мясников С.О., Сталыбко А.С., Криницкая К.А.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Подана: 22.10.2021

Принята: 31.01.2022

Контакты: asya.gusina@mail.ru

Резюме

Введение. Муколипидозы II/III альфа/бета (МЛ IIA/B, МЛ IIIA/B) – редкие заболевания с аутосомно-рецессивным типом наследования из группы лизосомных болезней накопления. Клинические проявления МЛ IIA/B и МЛ IIIA/B включают выраженную задержку роста и психомоторного развития, черепно-лицевые дисморфии, патологию клапанного аппарата сердца, деформации грудной клетки, длинных трубчатых костей и позвоночника, остеопороз, переломы, контрактуры крупных суставов, грыжи, помутнение роговицы, частые инфекции лор-органов. Причиной МЛ IIA/B и МЛ IIIA/B является дефицит активности UDP-GlcNAc 1-фосфотрансферазы вследствие мутаций в гене GNPTAB.

Цель исследования. Установить спектр мутаций в гене GNPTAB у пациентов с МЛ IIA/B и IIIA/B в Республике Беларусь.

Материалы и методы. В исследуемую группу включены 5 пробандов, 11 родителей и 9 здоровых сибсов из 8 семей, имеющих ребенка с подтвержденным диагнозом «МЛ IIA/B или МЛ IIIA/B». Поиск мутаций в гене GNPTAB проведен методом секвенирования по Сэнгеру.

Результаты и обсуждение. В семьях пациентов выявлено 7 патогенных мутаций: p.Ser399Phe, p.Arg375Ter, p.Gly508CysfsTer5, p.Thr484IlefsTer23, p.Ser738Ter, p.Asp919GluTer21, p.Arg1189Ter. Варианты p.Gly508CysfsTer5, p.Thr484IlefsTer23 и p.Asp919GluTer21 описаны авторами у лиц с МЛ IIA/B и МЛ IIIA/B впервые. Носительство мутации p.Arg375Ter отмечено в 5 (62,5%), p.Thr484IlefsTer23 – в 2 (25%) семьях. Эти варианты составили 50% и 12,5% всех мутантных аллелей соответственно. Остальные мутации отмечены в единичных случаях.

Заключение. Определен спектр патогенных мутаций в гене GNPTAB у пациентов с МЛ IIA/B и IIIA/B в Республике Беларусь. Идентифицированы три ранее не описанных у лиц с этими заболеваниями варианта: p.Gly508CysfsTer5, p.Thr484IlefsTer23

и p.Asp919GlufsTer21. Установлено, что преобладающими в Беларуси являются p.Arg375Ter и p.Thr484IlefsTer23, на долю которых приходится 50% и 12,5% мутантных аллелей соответственно.

Ключевые слова: муколипидозы II/III альфа/бета, GNPTAB, лизосомные болезни накопления

Gusina A.¹ ✉, Gusina N.¹, Naumchik I.¹, Rumiantseva N.¹, Kulak V.¹, Motyuk I.², Budzeika E.¹, Miasnikov S.¹, Krinitskaya K.¹, Stalybko A.¹

¹ Republican Scientific and Practical Center "Mother and Child", Minsk, Belarus

² Grodno Regional Clinical Perinatal Center, Grodno, Belarus

Molecular Characterization of Mucopolidosis II/III A/B in the Republic of Belarus

Authors' contribution: conducting of molecular genetic studies, analysis of the data obtained, writing – Gusina A.; conducting of biochemical research, editing, approving the final version of the article – Gusina N.; description and observation of patients, editing, approval of the final version of the article – Naumchik I.; description and observation of patients – Rumyantseva N., Kulak V., Motyuk I.; performance of biochemical research – Budzeika E.; conducting of molecular genetic studies, preparation of illustrations – Miasnikov S., Stalybko A., Krinitskaya K.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Submitted: 22.10.2021

Accepted: 31.01.2022

Contacts: asya.gusina@mail.ru

Abstract

Introduction. Mucopolidosis II/III alpha/beta (ML IIA/B, ML IIIA/B) are rare autosomal recessive disorders from the group of lysosomal storage diseases. ML II/III A/B clinical manifestations include marked growth retardation and impaired psychomotor development, craniofacial dysmorphic features, cardiac valvular pathology, chest, long bones and spine deformities, osteoporosis, fractures, joint contractures, hernias, corneal opacity, frequent infections. ML II/III A/B caused by a deficiency of UDP-GlcNAc-1-phosphotransferase due to mutations in the GNPTAB gene.

Purpose of the study. To investigate the molecular genetic characteristics of the GNPTAB gene in ML II/III patients in Belarus.

Materials and methods. Five probands, eleven parents and nine healthy siblings from eight families were enrolled in the study. Sanger sequencing analysis was performed for all coding exons and respective flanking regions of the GNPTAB gene.

Results and discussion. Seven pathogenic mutations were identified: p.Ser399Phe, p.Arg375Ter, p.Gly508CysfsTer5, p.Thr484IlefsTer23, p.Ser738Ter, p.Asp919GlufsTer21, p.Arg1189Ter. Variants p.Gly508CysfsTer5, p.Thr484IlefsTer23 and p.Asp919GlufsTer21 were novel. p.Arg375Ter mutation was noted in five (62.5%), p.Thr484IlefsTer23 – in two (25%) families. These variants accounted for 50 and 12.5% of all mutant alleles, respectively. The rest of the mutations were noted in isolated cases.

Conclusion. Pathogenic GNPTAB mutation spectrum in ML II/III A/B patients in Belarus was determined. Three variants previously not described in ML II/III patients have been identified: p.Gly508CysfsTer5, p.Thr484IlefsTer23, and p.Asp919GlufsTer21. The most

prevalent GNPTAB mutations in Belarus were p.Arg375Ter and p.Thr484IlefsTer23, which account for 50 and 12.5% of mutant alleles, respectively.

Keywords: mucopolidoses II/III alpha/beta, GNPTAB, lysosomal storage disorders

■ ВВЕДЕНИЕ

Муколипидозы II и III альфа/бета (МЛ IIA/B, МЛ IIIA/B) – редкие заболевания с аутосомно-рецессивным типом наследования из группы лизосомных болезней накопления.

Первые симптомы МЛ IIA/B могут присутствовать при рождении или даже в антенатальном периоде. Клинические проявления у плода неспецифичны: задержка роста, укорочение длинных трубчатых костей, ризомелия, микромелия, переломы, маловодие, многоводие, водянка плода [1]. В период новорожденности отмечают снижение массы и длины тела при рождении, утолщенную кожу, плоское лицо, мелкие глазницы, седловидное переносье, деформации грудной клетки и длинных трубчатых костей, вывих в тазобедренных суставах, косолапость, переломы, ограничение подвижности в крупных суставах [2]. Позже отмечают выраженную задержку роста и психомоторного развития, грубые черты лица, гипертрофию десен, патологию клапанного аппарата сердца, контрактуры крупных суставов, грыжи. Заболевание имеет прогрессирующее течение и приводит к смерти пациентов главным образом вследствие тяжелого поражения бронхолегочной и сердечно-сосудистой систем [3].

МЛ IIIA/B манифестирует чаще на втором году и характеризуется задержкой роста, которая становится очевидной к старшему дошкольному – младшему школьному возрасту, тугоподвижностью и болью в суставах, деформацией позвоночника, остеопорозом, постепенным огрублением черт лица, помутнением роговицы, частыми инфекциями верхних дыхательных путей, рецидивирующим острым средним отитом [2]. Вовлечение клапанов сердца проявляется аортальной недостаточностью, реже стенозом [4]. Умственное развитие пациентов обычно не страдает, заболевание прогрессирует медленно, прогноз для жизни благоприятный [2–4].

Некоторые авторы выделяют также промежуточный фенотип – МЛ II/IIIA/B [2].

Впервые муколипидозы были описаны Leroу и DeMars в 1967 г. [5]. Авторы наблюдали двух пациентов с фенотипом синдрома Гурлер, у которых, однако, отсутствовала гиперэкскреция гликозаминогликанов с мочой и симптомы заболевания появились в более раннем возрасте. В фибробластах этих пациентов при фазово-контрастной микроскопии были выявлены плотные темные гранулярные включения, которые заполняли практически всю цитоплазму клеток. Leroу назвал клетки с такими гранулами «inclusion cells» – «клетки с включениями», сокращенно «I-cells», и заболевание соответственно получило название «болезнь клеток с включениями» или «I-cell disease» [6]. Такие же клетки обнаружили у пациентов с другой патологией – псевдо-Гурлер полидистрофией [3]. Характерные цитоплазматические включения были обнаружены не только в фибробластах, но и в лимфоцитах, и в клетках костного мозга. При электронной микроскопии выяснилось, что эти включения представляют собой набухшие лизосомы, заполненные разнообразным по плотности, текстуре и виду материалом. Такие лизосомы не были описаны ни при каких других лизосомных болезнях накопления. При биохимическом исследовании было показано, что

содержимым включений являются липиды и кислые гликозаминогликаны, поэтому Spranger и Wiedermann в 1970 г. классифицировали это заболевание как муколипидоз II типа [7]. Это название прочно закрепилось за заболеванием. В 1972 г. Hickman и Neufeld отметили, что активность многих лизосомных ферментов в культивируемых фибробластах кожи пациентов с I-cell disease снижена, а в среде, на которой культивируются клетки, напротив, аномально высокая. Кроме того, исследователи обнаружили, что лизосомные ферменты, которые продуцируют клетки здоровых людей, могут проникать в клетки пациентов с муколипидозом, однако энзимы, которые выделяют клетки пациентов с I-cell disease, не попадают в клетки здоровых лиц [8]. Эти наблюдения привели ученых к предположению, что при муколипидозе II типа на лизосомных ферментах отсутствует какой-то маркер, который необходим для транспортировки энзимов в лизосомы. В 1977–1979 гг. были опубликованы данные в подтверждение этой гипотезы, а отсутствующим маркером оказался маннозо-6-фосфат [9]. Ферментативный дефект при I-cell disease был установлен в 1981 г.: причиной заболевания оказался дефицит UDP-GlcNAc 1-фосфотрансферазы (уридилдифосфат-N-ацетилглюкозамин-1-фосфотрансферазы) [10]. Этот энзим переносит N-ацетилглюкозамин-1-фосфат на шестой атом углерода остатка маннозы углеводной части молекулы лизосомных ферментов. При отсутствии или недостаточности фосфорилирования маннозы лизосомные гидролазы не проникают в лизосомы, а выделяются из клеток и обнаруживаются в различных биологических жидкостях, в частности в плазме крови. При этом в лизосомах накапливаются нерасщепленные субстраты этих ферментов, что и приводит к развитию фенотипа болезни накопления. В 1996 г. Bao и соавт. установили, что UDP-GlcNAc 1-фосфотрансфераза представляет собой гексамерный комплекс, который состоит из двух альфа-, двух бета- и двух гамма-субъединиц [11]. В 1998 г. Canfield и соавт. обнаружили, что альфа- и бета-субъединицы фермента кодирует один ген [12], а в 2005 г. Tiede и соавт. удалось этот ген идентифицировать и секвенировать [13]. Мутации в гене GNPTAB были обнаружены как у пациентов с I-cell disease, так и у пациентов с псевдо-Гурлер полидистрофией, таким образом, стало очевидно, что это одна и та же патология. В современной классификации I-cell disease получила название «МЛ IIA/B», а псевдо-Гурлер полидистрофию, обусловленную мутациями в гене GNPTAB, стали обозначать как «муколипидоз III альфа/бета» (МЛ IIIA/B). Заболевание, фенотипически неотличимое от псевдо-Гурлер полидистрофии, но обусловленное мутациями в гене GNPTG, который кодирует гамма-субъединицу UDP-GlcNAc 1-фосфотрансферазы, назвали «муколипидоз III гамма» [14].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить спектр мутаций в гене GNPTAB у пациентов с МЛ IIA/B и IIIA/B в Республике Беларусь.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследуемую группу включены 8 семей, имеющих ребенка с подтвержденным диагнозом «МЛ IIA/B или МЛ IIIA/B» (пять пробандов: двое – женского пола, трое – мужского, одиннадцать родителей и девять здоровых сибсов). У двух пробандов очевидные клинические проявления заболевания были обнаружены при рождении, у четырех – на втором году жизни, у одной пациентки узнаваемый фенотип

сформировался к возрасту трех с половиной лет. В одном случае признаки патологии были отмечены у плода в 20 недель беременности. Подробное описание фенотипа пациентов представлено в наших работах, посвященных описанию клинических случаев [15–18]. В семи семьях диагноз был установлен на основании результатов исследования активности лизосомных ферментов (бета-галактозидазы, альфа-маннозидазы, альфа-фукозидазы, арилсульфатазы А, общей бета-гексозаминидазы, бета-глюкуронидазы, щелочной фосфатазы, кислой фосфатазы) в плазме крови и, в некоторых случаях [15], в культуре фибробластов кожи пациентов, как описано Гусиной Н.Б. и Цукерманом Г.Л. [19]. В семье с пренатальной манифестацией заболевания было диагностировано на основании результатов молекулярно-генетического исследования [16]. Семь наблюдений были классифицированы как МЛ IIA/B, одно – как МЛ IIIA/B. Родители пяти пробандов в дальнейшем неоднократно обращались за проведением дородовой диагностики. В общей сложности были проведены одно молекулярно-генетическое и десять биохимических пренатальных исследований для 10 плодов. В двух случаях был диагностирован МЛ IIA/B и беременности были прерваны, остальные завершились рождением здоровых детей.

Поиск мутаций в гене GNPTAB в описанной группе пациентов проведен методом прямого секвенирования на автоматическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems). Амплификация экзонов гена проводилась с помощью олигонуклеотидных праймеров, предложенных Cury и соавт. [20]. В качестве материала для исследования использовали образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов методом солевой экстракции [21]. В одной семье было проведено высокопроизводительное секвенирование на приборе NextSeq500 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) с применением панели TruSight Inherited Disease, Illumina [16]. Наличие выявленных вариантов было подтверждено секвенированием по Сэнгеру.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования в семьях пациентов выявлено 7 патогенных мутаций: p.Ser399Phe (GNPTAB(NM_024312.5):c.1196C>T, rs281865026) и p.Arg375Ter (GNPTAB(NM_024312.5):c.1123C>T, rs397507447) – в 10-м экзоне, p.Gly508CysfsTer5 (GNPTAB(NM_024312.5):c.1503_1521dup) и p.Thr484IlefsTer23 (GNPTAB(NM_024312.5):c.1450_1451insT) – в 12-м экзоне, p.Ser738Ter (GNPTAB(NM_024312.5):c.2213C>A, rs1298654156) – в 13-м экзоне, p.Asp919GlufsTer21 (GNPTAB(NM_024312.5):c.2757_2758del, rs757574720) – в 14-м экзоне, p.Arg1189Ter (GNPTAB(NM_024312.5):c.3565C>T, rs137852897) – в 19-м экзоне гена GNPTAB. Варианты p.Gly508CysfsTer5, p.Thr484IlefsTer23 и p.Asp919GlufsTer21 описаны нами у лиц с МЛ IIA/B и МЛ IIIA/B впервые [16, 17]. Шесть из семи (85,7%) мутаций (85,7% всех мутантных аллелей) являлись вариантами с утратой функции гена вследствие образования преждевременного стоп-кодона: было зарегистрировано 3 (42,9%, 62,5% всех патогенных аллелей) нонсенс-мутации и 3 (42,9%, 25% всех мутантных аллелей) варианта со сдвигом рамки считывания. Миссенс-мутация была обнаружена только в одном аллеле. Вариант p.Arg375Ter оказался наиболее распространенным повреждением гена GNPTAB в Беларуси: его доля от всех мутантных аллелей гена составила 50%. Носительство мутации p.Arg375Ter отмечено в 5 (62,5%) семьях. В 3 семьях (37,5%) развитие заболевания было обусловлено наличием этой мутации в гомозиготном состоянии, еще в 2 семьях причиной болезни стало компаундное гетерозиготное

носительство p.Arg375Ter в сочетании с мутацией p.Ser399Phe и p.Gly508CysfsTer5. Мутация p.Thr484IlefsTer23 – второе частое повреждение гена GNPTAB в Беларуси: ее доля от всех мутантных аллелей гена составила 12,5%. Носительство этой мутации выявлено в двух семьях: в одной семье второй патогенный аллель не был установлен, во второй семье возникновение заболевания было связано с компаундным гетерозиготным носительством мутации p.Thr484IlefsTer23 и p.Ser738Ter. Результаты исследования гена GNPTAB в обследованных семьях представлены в таблице.

Некоторые клинические и молекулярно-генетические характеристики обследованных семей
Some clinical and molecular genetic characteristics of the families surveyed

№ ¹	Обследованы, n=26	Пол ²	Диагноз ³	Возраст ⁴	Пренатальная диагностика	Генотип пробанда	Генотипы в семье
1	Оба родителя, пробанд	м	МЛ IIA/B	9 дней	Нет	p.Arg375Ter/p.Arg375Ter	Отец p.Arg375Ter/N Мать p.Arg375Ter/N
2	Оба родителя, двое здоровых сибсов пробанда	м	МЛ IIA/B	1 год 10 месяцев	Биохимическая – 2 раза	p.Arg375Ter/p.Arg375Ter	Отец p.Arg375Ter/N Мать p.Arg375Ter/N Сибс 1 N/N Сибс 2 p.Arg375Ter/N
3	Оба родителя, пробанд, двое здоровых сибсов	ж	МЛ IIIA/B	3 года 6 месяцев	Биохимическая – 3 раза	p.Ser399Phe/p.Arg375Ter	Отец p.Ser399Phe/N Мать p.Arg375Ter/N Сибс 1 N/N Сибс 2 N/N
4	Оба родителя, трое здоровых сибсов пробанда	ж	МЛ IIA/B	14 дней	Биохимическая – 2 раза	p.S738Ter/p.Thr484IlefsTer23	Отец p.S738Ter/N Мать p.Thr484IlefsTer23/N Сибс 1 p.S738Ter/N Сибс 2 p.Thr484IlefsTer23/N Сибс 3 p.Thr484IlefsTer23/N
5	Пробанд	м	МЛ IIA/B	1 год	Нет	p.Arg375Ter/p.Gly508CysfsTer5	Нет данных
6	Мать, один здоровый сибс пробанда	м	МЛ IIA/B	1 год 6 месяцев	Биохимическая – 2 раза	p.Thr484IlefsTer23/?	Мать p.Thr484IlefsTer23/N Сибс 1 N/?
7	Пробанд	м	МЛ IIA/B	1 год 4 месяца	Нет	p.Arg375Ter/p.Arg375Ter	Нет данных
8	Оба родителя, пробанд, один здоровый полусибс пробанда	ж	МЛ IIA/B	24 недели гестации	Биохимическая + молекулярно-генетическая – 1 раз	p.Asp919GlufsTer21/p.Arg1189Ter	Мать p.Asp919GlufsTer21/N Отец p.Arg1189Ter/N Полусибс N/N

Примечания: ¹ номер семьи; ² пол пробанда (м – мужской, ж – женский); ³ диагноз у пробанда; ⁴ возраст пробанда на момент установления диагноза.

Ген GNPTAB картирован на 12-й хромосоме в локусе 12q23.2, состоит из 21 экзона и имеет протяженность 85 000 пар оснований. В структуре альфа- и бета-субъединиц UDP-GlcNAc 1-фосфотрансферазы, которые кодирует этот ген, выделяют 3 домена, разделенных так называемыми спейсерными регионами: Stealth-домен,

обладающий ферментативной активностью, Notch-повторы и DMAP-домен, ответственные за распознавание ферментом лизосомных гидролаз [22]. В 2019 г. Velho и соавт. суммировали сведения о 258 мутациях в GNPTAB, выявленных у 459 пациентов с МЛ IIA/B и МЛ IIIA/B из 38 стран Северной и Южной Америки, Европы, Африки, Азии, Австралии и Новой Зеландии, и отметили, что доминирующим типом мутаций в гене GNPTAB являются варианты со сдвигом рамки считывания – 39%, далее следуют замены аминокислот (26%), нонсенс-мутации (23%), мутации сплайсинга (9%), делеции/дупликации/инсерции/делеции-инсерции (3%) [23]. В России на долю мутаций со сдвигом рамки и наиболее распространенных нонсенс-вариантов приходится по 39,6% мутантных аллелей соответственно, другие единичные миссенс- и нонсенс-мутации составляют 11,6% патогенных аллелей [4]. Спектры мутаций в гене GNPTAB в Беларуси и России представлены на рисунке.

Наши собственные наблюдения и результаты исследований других авторов позволяют прийти к заключению, что в структуре мутаций гена GNPTAB преобладают варианты, которые ассоциируются с образованием преждевременного стоп-кодона. Такие мутации приводят к синтезу укороченного пептида, который удерживается в эндоплазматической сети, поскольку лишен цитоплазматического С-конца, содержащего последовательность, необходимую для транспорта белка в аппарат Гольджи. В аппарате Гольджи происходит протеолитическая активация предшественника альфа/бета-субъединиц, что является неперенным условием обеспечения ферментативной функции. Следовательно, мутации с утратой функции гена в гомо- и компаундном гетерозиготном состоянии приводят к полной утрате или существенному (менее 10%) снижению активности UDP-GlcNAc 1-фосфотрансферазы, что сопровождается развитием фенотипа МЛ IIA/B [23].

Самой частой мутацией со сдвигом рамки считывания и наиболее распространенным патогенным аллелем гена GNPTAB в целом, по сведениям Velho и соавт., является делеция двух оснований в 19-м экзоне – c.3503_3504del, которая была идентифицирована у 131 из 459 (28,5%) пациентов из всех стран мира [23]. В России эта мутация также занимает лидирующее положение – 31,4% мутантных аллелей [4].

Спектр мутаций в гене GNPTAB в Беларуси и России
GNPTAB mutation spectrum in Belarus and Russia

У наших пациентов аллель c.3503_3504del не зарегистрирован. В контрольной выборке Genome Aggregation Database* носительство этого варианта отмечено во всех исследованных популяциях, за исключением евреев-ашкенази и жителей Восточной Азии с частотой 0,0185–0,0659%.

Носительство наиболее частой в Беларуси мутации p.Arg375Ter в работе Velho и соавт. отмечено только у 7 (1,5%) пациентов. В России это третий частый (после c.3503_3504del и p.S738Ter) вариант – 18,6% патогенных аллелей. По данным Genome Aggregation Database, носительство этой мутации отмечено только у европейцев нефинского происхождения с частотой 0,00879%. Второе распространенное повреждение гена GNPTAB в нашей стране – p.Thr484IlefsTer23, впервые обнаруженное нами в двух неродственных семьях, происходящих из одного района Беларуси, не зарегистрировано ни в gnomAD exomes, ни в gnomAD genomes. Также не значится в этих базах данных впервые описанный нами вариант p.Gly508CysfsTer5.

Мутация p.S738Ter, на долю которой приходится 21% патогенных аллелей гена GNPTAB, выявленных у пациентов с МЛ IIA/B и МЛ IIIA/B в России [4], в обследованной нами группе пациентов обнаружена только один раз: носителем патогенного аллеля был отец пробанда, по национальности русский. В контрольной выборке Genome Aggregation Database этот вариант отмечен лишь у европейцев нефинского происхождения с частотой 0,000883%. Мутация p.S738Ter в компаундном гетерозиготном состоянии также однажды описана у пациента из Китая [24], ее частота среди случаев, рассмотренных Velho и соавт., составляет 0,2% (0,1% аллелей) [23].

В одной семье в нашем исследовании выявлена нонсенс-мутация p.Arg1189Ter. Этот вариант оказался вторым распространенным мутантным аллелем гена GNPTAB в мире: его частота среди пациентов из разных стран мира равна 9,4% (43 из 459 пациентов). Кроме того, p.Arg1189Ter является самой частой мутацией у лиц с МЛ IIA/B и МЛ IIIA/B в странах Азии, в основном в Корее и Японии – 19,2% и 41% аллелей соответственно [25]; идентифицирована она и у пациентов из Австралии, Германии, Ирландии, Израиля и США.

В Genome Aggregation Database носительство этого варианта зарегистрировано в популяции европейцев нефинского происхождения (в северо-западных регионах) – 0,00176%, а также у жителей Южной Азии – 0,00327%.

Вторая мутация в этой семье – p.Asp919GlufsTer21 – отмечена в Genome Aggregation Database у европейцев нефинского происхождения с частотой 0,000879%. В доступных нам источниках о наличии этого варианта у лиц с МЛ IIA/B и МЛ IIIA/B не упоминается.

Сохранение остаточной активности фермента характеризуется формированием медленно прогрессирующего МЛ IIIA/B. Пациенты с МЛ IIIA/B имеют хотя бы один аллель, обеспечивающий синтез фермента с активностью не менее 10% от нормы, представленный, как правило, миссенс-вариантом. Большинство (40%) замен аминокислот локализуется в Stealth-домене, 15% миссенс-мутаций располагаются в Notch-повторах, на DMAP-домен приходится 4% таких вариантов [23]. Порядка 38% известных миссенс-мутаций сопровождаются значительным снижением активности трансферазы в связи с нарушениями вторичной структуры белка, внутриклеточного

* Здесь и далее приводятся частоты аллелей по данным gnomAD exomes.

транспорта молекул или протеолитической активацией предшественника альфа/бета-субъединиц [23]. Замены аминокислот, при которых отмечается относительно высокий уровень резидуальной активности UDP-GlcNAc 1-фосфотрансферазы, идентифицируют чаще в Notch-повторах и DMAP-домене. В то же время значительная часть (60,7%) миссенс-мутаций в Stealth-домене обнаружена у пациентов с МЛ IIA/B и ассоциируется с потерей активности фермента [23]. Мутация p.Ser399Phe, выявленная нами у пациентки с МЛ IIIA/B, находится в Stealth-домене. Остаточная активность UDP-GlcNAc 1-фосфотрансферазы при наличии этого варианта сохраняется на уровне $8 \pm 2\%$ [26], является достаточной для предотвращения тяжелого течения болезни. В источниках, использованных Velho и соавт., p.Ser399Phe обнаружена у 8 из 459 (1,7%) пациентов. В контрольной выборке Genome Aggregation Database p.Ser399Phe отмечена в популяции европейцев нефинского происхождения – 0,00264% и в Южной Азии – 0,00327%.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований удалось определить спектр патогенных мутаций в гене GNPTAB у пациентов с МЛ IIA/B и IIIA/B в Республике Беларусь и идентифицировать три ранее не описанных у лиц с этими заболеваниями варианта: p.Gly508CysfsTer5, p.Thr484IlefsTer23 и p.Asp919GlufsTer21. Установлено, что преобладающими в нашей стране являются p.Arg375Ter и p.Thr484IlefsTer23, на долю которых приходится 50% и 12,5% мутантных аллелей соответственно. На современном уровне развития медицинской генетики верификация диагноза наследственного заболевания с помощью молекулярно-генетических методов является важнейшим этапом диагностики, поскольку позволяет прогнозировать тяжесть течения патологического процесса, повышает эффективность медико-генетического консультирования, создает возможность проведения пренатальной диагностики в ранние сроки беременности. Выполненная работа позволила оптимизировать тактику лабораторной диагностики МЛ IIA/B и IIIA/B и расширить представления о молекулярно-генетических основах этой патологии.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Costain G., Inbar-Feigenberg M., Saleh M. (2018) Challenges in diagnosing rare genetic causes of common in utero presentations: report of two patients with mucopolidosis type II (I-cell disease). *J. Pediatr. Genet.*, vol. 7, no 3, pp. 134–137. doi: 10.1055/s-0038-1636995.
2. Leroy J.G., Cathey S.S., Friez M.J. (2019) *GNPTAB-related disorders*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1828/> (accessed 23 July 2021).
3. Kornfield S., Sly W.S. (2011) *I-cell disease and pseudo-hurler polydystrophy: disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New-York, pp. 3469–3482.
4. Semyachkina A.N., Voskoboeva E.Y., Bukina T.M. (2017) Kliniko-geneticheskaya harakteristika mukopolidozo II i IIIA tipov u detei [Clinical and genetic characteristics of mucopolidosis II and IIIa types in children]. *Ros. Vestn. Perinatol. i pediatri.*, vol. 62, no 3, pp. 71–78. doi: 10.21508/1027-4065-2017-62-3-71-78. (in Russian)
5. Leroy J.G., DeMars R.I. (1967) Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblasts. *Science*, vol. 157, p. 804.
6. Leroy J.G., Spranger J.W., Feingold M. (1971) I-cell disease: a clinical picture. *The Journal of Pediatrics*, vol. 79, no 3, pp. 360–365. doi: 10.1016/s0022-3476(71)80142-7.
7. Spranger J.W., Wiedemann H.R. (1970) The genetic mucopolidoses. *Neuropediatric*, vol. 2, no 1, pp. 3–16. doi: 10.1055/s-0028-1091836.
8. Hickman S., Neufeld E.F. (1972) A hypothesis for I-cell disease: defective hydrolases that do not enter lysosomes. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, vol. 49, no 4, pp. 992–999.
9. Kaplan A., Achord D.T., Sly W.S. (1977) Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 74, no 5, pp. 2026–2030.
10. Reitman M.L., Varki A., Kornfeld S. (1981) Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminylphosphotransferase activity. *J Clin Invest.*, vol. 67, no 5, pp. 1574–1579.

11. Bao M., Booth J.L., Elmendorf B.J. (1996) Bovine UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase I. Purification and subunit structure. *J Biol. Chem.*, vol. 271, no 49, pp. 31437–31445.
12. Canfield W.M., Bao M., Pan J. (1998) Mucopolipidosis II and mucopolipidosis IIIA are caused by mutations in the GlcNAc-phosphotransferase alpha/beta gene on chromosome 12p. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 63, p. A15.
13. Tiede S., Storch S., Lubke T. (2005) Mucopolipidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase. *Nature Med.*, vol. 11, pp. 1109–1112.
14. Cathey S.S., Kudo M., Tiede S. (2008) Molecular order in mucopolipidosis II and III nomenclature. *Am. J. Med. Genet Part A*, vol. 146A, pp. 512–513.
15. Gusina A.A., Gusina N.B., Kulak V.D. (2018) The first experience of molecular-genetic diagnostics of mucopolipidosis of the II–III types in Belarus. *Pediatrics. Vostochnaja Evropa*, vol. 6, no 3, pp. 429–439. (in Russian)
16. Gusina A.A., Novikova I.V., Kleckij S.K. (2019) A case of prenatal diagnosis of mucopolipidosis II alpha/beta manifested as chondrodysplasia punctata. *Prenatal'naja diagnostika*, vol. 18, no 1, pp. 73–81. (in Russian)
17. Gusina A.A., Gusina N.B., Naumchik I.V. (2019) Novel mutations in GNPTAB gene in patients with mucopolipidoses II A/B from Belarus. *Molekuljarnaja i prikladnaja genetika*, vol. 26, pp. 126–135. (in Russian)
18. Gusina A.A., Gusina N.B., Rumjanceva N.V. (2019) Homozygous mutation p. Arg375X as the cause of mucopolipidosis II alfa/beta: analysis of two cases. *Medicinskaja genetika*, no 5, pp. 37–44. (in Russian)
19. Gusina N.B., Tsukerman G.L. (1988) Lysosomal hydrolase activity of the plasma and leukocytes of homo- and heterozygotes with various types of I-cell disease. *Vopr. Med. Khim.*, vol. 34, no 3, pp. 21–25. (in Russian)
20. Cury G.K., Matte U.O., Artigalás T. (2013) Mucopolipidosis II and III alpha/beta in Brazil: analysis of the GNPTAB gene. *Gene*, vol. 524, pp. 59–64. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.105.
21. Salah M.A., Martinez I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, no 22, pp. 4692–4693.
22. Qian Y., van Meel E., Flanagan-Steet H. (2015) Analysis of mucopolipidosis II/III GNPTAB missense mutations identifies domains of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase involved in catalytic function and lysosomal enzyme recognition. *J Biol Chem.*, vol. 290, no 5, pp. 3045–3056. doi: 10.1074/jbc.M114.612507.
23. Velho R.V., Harms F.L., Danyukova T. (2019) The lysosomal storage disorders mucopolipidosis type II, type III alpha/beta and type III gamma: update on GNPTAB and GNPTG mutations. *Human Mutation*, vol. 40, no 7, pp. 842–864. doi: 10.1002/humu.23748.
24. Liu S., Zhang W., Shi H. (2016) Mutation analysis of 16 mucopolipidosis II and III alpha/beta Chinese children revealed genotype-phenotype correlations. *PLoS One*, vol. 11, no 9, pp. e0163204. doi: 10.1371/journal.pone.0163204.
25. Wang Y., Ye J., Qiu W.J. (2019) Identification of predominant GNPTAB gene mutations in Eastern Chinese patients with mucopolipidosis II/III and a prenatal diagnosis of mucopolipidosis II. *Acta Pharmacol Sin.*, vol. 40, no 2, pp. 279–287. doi: 10.1038/s41401-018-0023-9.
26. Qian Y., van Meel E., Flanagan-Steet H. (2015) Analysis of mucopolipidosis II/III GNPTAB missense mutations identifies domains of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme GlcNAc-1-phosphotransferase involved in catalytic function and lysosomal enzyme recognition. *J Biol Chem.*, vol. 290, no 5, pp. 3045–3056. doi: 10.1074/jbc.M114.612507.