

ЗАРИПОВА АЛИЯ РАМИЛЕВНА

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АРХИТЕКТУРА НЕЗАВЕРШЕННОГО ОСТЕОГЕНЕЗА

1.5.7 Генетика (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики человека Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ УФИЦ РАН)

Научный руководитель:

Хусаинова Рита Игоревна
доктор биологических наук, доцент

Ведущий научный сотрудник ИБГ УФИЦ РАН

Официальные оппоненты:

Глотов Андрей Сергеевич
доктор биологических наук

Руководитель отдела геномной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»

Зинченко Рена Абульфазовна
доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор

Заместитель директора по научно-клинической работе, заведующая лабораторией генетической эпидемиологии, заведующая кафедрой Организации здравоохранения, общественного здоровья и медико-генетического мониторинга, врач-генетик ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»

Ведущая организация:

ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита диссертации состоится 12 апреля 2023 года в « » часов на заседании диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71, конференц-зал ИБГ УФИЦ РАН (к. №406). С диссертацией можно ознакомиться на сайтах ВАК РФ и УФИЦ РАН (<http://ufaras.ru/>), e-mail: molgen@anrb.ru Автореферат разослан «__»_____ 2023

Учёный секретарь диссертационного совета 24.1.218.01
доктор биологических наук, доцент

Гульназ Фаритовна Корытина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Незавершенный (несовершенный) остеогенез (НО, МКБ-10: Q78.0) представляет собой орфанное наследственное заболевание соединительной ткани с распространённостью 1 на 10-20 тысяч новорожденных (Chen et al., 2022; Garibaldi et al., 2022) или 6-7 на 100 тысяч человек (Sponer et al., 2022). Заболевание характеризуется выраженной клинической вариабельностью с преимущественной склонностью к низкотравматичным переломам костей, снижением плотности костной ткани, деформациям трубчатых костей и грудной клетки. Помимо скелетных дефектов, у пациентов могут наблюдаться голубые склеры, аномалии дентина, прогрессирующее снижение слуха, низкий рост, гипермобильность суставов. (Sałacińska et al., 2022). Заболевание наследуется по аутосомно-доминантному и аутосомно-рецессивному типам, встречаются случаи с X-сцепленным наследованием и варианты *de novo*, болезнь может манифестировать в любом возрасте, начиная с внутриутробного периода жизни (Рябых и др., 2021).

Клиническая вариабельность заболевания обусловлена его генетической гетерогенностью. По данным Лейденской базы (Leiden Open Variation Database) в патогенез заболевания вовлечены 25 генов (<https://oi.gene.le.ac.uk/>). В большинстве случаев причиной НО являются молекулярные дефекты в генах коллагена I типа (*COL1A1*, *COL1A2*), кодирующих его альфа-1 и альфа-2 цепи (Marini et al., 2017). Мутации в этих генах встречаются при I-IV типах НО. От 1 до 5% случаев НО обусловлены мутациями в гене интерферон-индуцированного трансмембранного белка 5 (*IFITM5*), который участвует в дифференцировке остеобластов и минерализации костей (Zhytnik et al., 2019), приводя к НО V типа (Marom et al., 2020). Кроме того, в патогенез заболевания вовлечены гены белков, принимающих участие в фолдинге и посттрансляционных модификациях коллагена I типа (*CRTAP*, *P3H1*, *PP1B* и *BMPI*) или его внутриклеточном перемещении (*FKBP10* и *SERPINH1*), в контроле качества синтеза белка и реакции эндоплазматического ретикулума на стресс (*CREB3L1* и *MBTPS2*) (Marini et al., 2017), в минерализации костей (*SERPINF1* и *SPARC*) (Etich et al., 2020; Durkin et al., 2021), функционировании канонического сигнального пути WNT (*LRP5*, *WNT1* и *MESD*) (Moosa et al., 2019). Кроме того, в патогенез заболевания вовлечены гены белков с внутриклеточной или ядерной локализацией (*SP7* и *TENT5A*), влияющих на функцию остеобластов способом, который еще полностью не изучен (Fiscaletti et al., 2018; Doyard et al. 2018).

Несмотря на достигнутые успехи, все еще продолжается поиск новых причинных генов заболевания, т.к. генетическая архитектура незавершенного остеогенеза до конца не определена. Существуют популяционные и этнические различия по частоте и спектру мутаций в генах, вовлеченных в патогенез заболевания, практически в каждом исследовании идентифицируются ранее неописанные патогенные изменения.

В России в настоящее время нет официальной статистики и недостаточно сведений по распространенности заболевания и его молекулярном патогенезе. Нам доступны только

данные по распространенности, которые опубликованы в статьях российских учёных. Например, согласно статье Яхаевой и её коллег, в 2016 году в России было зарегистрировано 650 случаев НО, из них 421 – дети (Яхаева и др., 2016), в Сибирском и Приволжском федеральных округах - 1,5 и 1,35 случаев на 100 000 детей; в Северо-Западном федеральном округе - 0,28 на 100 000 детей; в Ставропольском крае - 1,42 на 100 000 детей (Сорокина и др., 2017). Алимова с коллегами сообщает, что распространенность НО на 2019 год составила 1,08:100 000 детей (Алимова и др., 2019).

НО является одним из наиболее распространенных скелетных наследственных заболеваний с выраженной клинической вариабельностью и генетической гетерогенностью, молекулярные аспекты которого все еще до конца не раскрыты.

Проведение молекулярно-генетического исследования необходимо для подтверждения диагноза, установления типа наследования и прогноза течения заболевания, а также для эффективного медико-генетического консультированияотягощенных семей.

Цель исследования. Поиск и идентификация патогенных вариантов генов, приводящих к развитию незавершенного остеогенеза, и определение молекулярной гетерогенности заболевания в Республике Башкортостан.

Задачи исследования:

1. Поиск и идентификация патогенных изменений нуклеотидной последовательности у пациентов с незавершенным остеогенезом с применением NGS технологии.
2. Оценка спектра и частоты мутаций в генах коллагена I типа, определение типа наследования, формы заболевания и гено-фенотипических корреляций.
3. Идентификация патогенных изменений в неколлагеновых генах и определение их роли в развитии незавершенного остеогенеза.
4. Верификация и поиск выявленных изменений у членов отягощенных семей с использованием секвенирования по Сэнгеру.
5. Разработка алгоритмов таргетного NGS секвенирования для диагностики незавершенного остеогенеза.

Научная новизна. Впервые проведен поиск и идентификация патогенных вариантов генов, приводящих к развитию незавершенного остеогенеза, и установлена молекулярная причина заболевания у 58,7% обследованных пациентов из Республики Башкортостан. Поиск патогенных изменений с применением NGS технологии выявил 43 мутации в 14 генах (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*, *ERCC4*, *PTH1R*, *ALOX12B*, *ARSB*, *PLEKHM1*, *SGMS2*, *TGFB1*, *CLCN7*, *FGF23*, *LAMB3*), 10 из которых ранее не были описаны в литературе в качестве генов, вовлеченных в патогенез НО. 31 патогенный вариант изменения нуклеотидной последовательности обнаружен в двух генах коллагена I типа (*COL1A1* и *COL1A2*), что составило 93,9% от всех выявленных патогенных мутаций в 4 причинных генах НО. Впервые обнаружена ранее неописанная мутация с.1051G>T (p.Glu351*) в гене пролил-3-гидроксилазы-1 (*P3H1*) у пациента башкирской этнической принадлежности. В

гене *IFITM5* впервые идентифицирована мутация с.-14C>T у трех неродственных пациентов с V типом НО из Республики Башкортостан.

Научно-практическая значимость работы. Результаты исследования вносят существенный вклад в понимание молекулярно-генетических основ незавершенного остеогенеза и являются теоретической и методической основой для разработки научно обоснованного алгоритма ДНК-диагностики, оптимального для конкретного региона с учетом популяционных особенностей народов, проживающих в Республике Башкортостан. На основе полученных результатов оптимизирован алгоритм диагностики незавершенного остеогенеза и создана таргетная NGS панель для анализа двух генов коллагена первого типа (*COL1A1* и *COL1A2*), что позволит проводить более эффективную ДНК диагностику заболевания. Полученные результаты имеют важное практическое значение для повышения эффективности медико-генетического консультирования отягощенных семей с незавершенным остеогенезом.

Методология и методы исследования. Использован системный подход, который основан на комплексном исследовании клинико-генеалогических и молекулярно-генетических аспектов незавершенного остеогенеза в отягощенных семьях, а также на анализе источников литературы отечественных и зарубежных авторов по исследуемой проблеме. Для проведения исследования собраны выборки пациентов, а также членов их семей и контрольные образцы здоровых индивидов. Используются современные методы исследования генома человека: выделение геномной ДНК с фенольно-хлороформной экстракцией, полимеразная цепная реакция синтеза ДНК (ПЦР-анализ), массовое параллельное секвенирование (NGS), секвенирование по Сэнгеру. Применены современные методы биоинформатической обработки полученных результатов и базы данных: Exome Aggregation Consortium; Exome Variant Server, 1000 Genomes Project, dbSNP, dbVar, Osteogenesis Imperfecta Variant Database, различные предсказательные программы (SIFT, Polyphen2, MutPred, VarSome, EIGEN, FATHMM, PROVEAN, LRT и т.д.). Для анализа результатов NGS – секвенирования использованы программы «VariFind» и «NGS Wizard».

Положения, выносимые на защиту.

1. Патогенные изменения нуклеотидной последовательности в 4 генах (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*) выявлены у 58,7% пациентов с НО из Республики Башкортостан.
2. Мутации в генах коллагена I типа (*COL1A1*, *COL1A2*) являются преобладающими (93,9%) среди выявленных патогенных изменений в причинных генах.
3. Мутации с.3076C>T, с.1265G>C, с.579delT в гене *COL1A1* выявлены у пациентов татарской этнической принадлежности, каждая в двух неродственных семьях. Остальные патогенные изменения в генах коллагена I типа (*COL1A1*, *COL1A2*) являются уникальными, 10 из которых описаны впервые.
4. Мутация с.-14C>T в гене *IFITM5* является причиной незавершенного остеогенеза V типа у трёх неродственных пациентов.

5. Алгоритм ДНК диагностики незавершенного остеогенеза с разработкой таргетной NGS панели на основе анализа двух генов коллагена первого типа, кодирующих цепи альфа-1 и альфа-2 (*COL1A1* и *COL1A2*).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов в ходе молекулярно-генетического исследования пациентов с незавершенным остеогенезом подтверждается проведением исследования на репрезентативной выборке пациентов, членов их семей и контрольной группе, с использованием актуальных в настоящий момент молекулярно-генетических и биоинформатических методов анализа. Выводы, сформулированные по результатам диссертационной работы, соответствуют поставленным задачам. Полученные результаты исследования были представлены на VIII научно-практической конференции с международным участием «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов-на-Дону, 2019), Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2020» (Москва, 2020), VII российском конгрессе по остеопорозу, остеоартриту и другим метаболическим заболеваниям скелета с международным участием (Санкт-Петербург, 2020), международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2021» (Москва, 2021); III Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы биохимии, генетики и биотехнологии» (Уфа, 2021); X Юбилейной международной научно-практической конференции "Молекулярная диагностика" (Москва, 2021); V Инновационном Петербургском медицинском форуме (Санкт-Петербург, 2022); III Всероссийской конференции "Высокопроизводительное секвенирование в геномике" (Новосибирск, 2022); Всероссийской конференции молодых ученых «Генофонд и репродуктивное здоровье человека» (Санкт-Петербург, 2022); VIII Российском конгрессе по остеопорозу, остеоартриту и другим метаболическим заболеваниям скелета с международным участием (Санкт-Петербург, 2022); XIII научной конференции «Генетика человека и патология» (Томск, 2022); Всероссийской научной конференции с международным участием «Геномика и биотехнология для медицины и сельского хозяйства» (Уфа, 2022).

Личный вклад автора в проведённые исследования. Определение темы, цели и задач диссертационной работы проводилось совместно с научным руководителем, д.б.н, доцентом Хусаиновой Ритой Игоревной. Формирование литературного обзора по теме исследования, экспериментальная работа, заключающаяся в проведении молекулярно-генетического исследования образцов ДНК больных незавершенным остеогенезом, формирование выборки (с последующим выделением ДНК), поиск и идентификация мутаций (ПЦР, NGS-технология, секвенирование по Сэнгеру, биоинформатическая обработка данных) автором были выполнены самостоятельно. Подготовка рукописи настоящей диссертационной работы, автореферата и материалов для публикаций проводились лично автором.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликованы 17 печатных работ, в том числе 7 статей, входящих в перечень ВАК, 3 из которых индексируются в международных базах Scopus и в Web of Science.

Соответствие диссертации паспорту научной деятельности. Работа соответствует формуле специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки). Проведен поиск патогенных изменений в генах, вовлеченных в метаболизм соединительной ткани, с использованием массового параллельного секвенирования (NGS-технологии). Полученные результаты валидированы секвенированием по Сэнгеру. Проведен гено-фенотипический анализ, определены тип наследования и форма заболевания. Идентифицированы мутации, приводящие к развитию незавершенного остеогенеза, оптимизирован алгоритм ДНК диагностики заболевания.

Структура и объём работы. Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты и обсуждение, заключение, выводы, библиографический список и приложения. Список литературы включает 209 источников, среди них 15 отечественных и 194 зарубежных. Работа изложена на 189 страницах машинописного текста, содержит 38 рисунков и 29 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования. В качестве материала исследования использовалась выборка из образцов ДНК 226 человек, среди которых: 80 образцов принадлежат пациентам с НО, 98 - членам их семей (всего 68 семей), и 48 образцов ДНК здоровых индивидов без костной патологии и с нормальным уровнем МПКТ, соответствующих по полу, возрасту и национальности исследуемым группам пациентов.

Методы исследования. Для проведения молекулярно-генетического исследования использовали геномную ДНК, выделенную из цельной венозной крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984).

Поиск вариантов изменений нуклеотидной последовательности генов, ответственных за развитие НО, осуществлялся в несколько этапов исследования с использованием массового параллельного секвенирования:

1. На первом этапе проводилось таргетное NGS - секвенирование 13 генов, вовлеченных в патогенез НО (Ion Torrent, Life Technologies, США);
2. На втором этапе - таргетное NGS - секвенирование 166 генов, участвующих в костном метаболизме у пациентов без патогенных изменений на предыдущем этапе исследования (Ion GeneStudio S5 System, ThermoFisher Scientific, США);
3. На третьем этапе - таргетное NGS - секвенирование 664 генов, участвующих в метаболизме соединительной ткани у пациентов с отсутствием мутаций в генах таргетных панелей предыдущих этапов исследования (Illumina NextSeq 500, США);

4. На четвертом этапе использовалась собственная таргетная NGS-панель генов коллагена I типа (*COL1A1*, *COL1A2*), которая разработана и произведена ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия. Секвенирование проводилось на платформе Illumina MiSeq System (США).

Для валидации результатов NGS-исследования и выявления патогенных мутаций у членов семьи проводилось секвенирование по Сэнгеру с использованием прибора 3500 XL Applied Biosystems (США). Все изменения нуклеотидной последовательности со статусом «патогенный» или «вероятно патогенный» проверялись в контрольной группе.

Подбор праймеров осуществлялся с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), референсная последовательность генов взята из базы данных Ensemble (<https://www.ensembl.org/>).

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.



Рисунок 1 - Дизайн исследования незавершенного остеогенеза

Биоинформатическая обработка данных. Оценку функциональной значимости выявленных изменений нуклеотидной последовательности генов проводили, используя базы данных экзомного секвенирования (Exome Aggregation Consortium; Exome Variant Server), геномного и таргетного секвенирования (1000 Genomes Project), однонуклеотидных вариантов (dbSNP) и структурных вариантов (dbVar), специализированную базу данных по НО (Osteogenesis Imperfecta Variant Database). Если вариант не был представлен в базах данных или сведения о нем недостаточны, проводился анализ патогенности с применением различных предсказательных программ (SIFT, Polyphen2, MutPred, VarSome, EIGEN, FATHMM, PROVEAN, LRT и т.д.). Для анализа результатов NGS секвенирования использовались программы «VariFind» и «NGS Wizard».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск и идентификация патогенных изменений нуклеотидной последовательности у пациентов с незавершенным остеогенезом

В результате проведенных исследований обнаружены 43 патогенных изменения в 14 генах (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*, *ERCC4*, *PTH1R*, *ALOX12B*, *ARSB*, *PLEKHM1*, *SGMS2*, *TGFB1*, *CLCN7*, *FGF23*, *LAMB3*) у 54 пациентов с НО из Республики Башкортостан. Из них 19 типов мутаций выявлены в гене *COL1A1*, 12 мутаций - в гене *COL1A2*, по одному патогенному изменению в генах *IFITM5*, *P3H1*, вовлеченных в патогенез НО, и по одному - в генах *ERCC4*, *PTH1R*, *ALOX12B*, *ARSB*, *PLEKHM1*, *SGMS2*, *TGFB1*, *CLCN7*, *FGF23*, *LAMB3*, ранее неописанных в качестве причинных генов НО.

Гены *COL1A1*, *COL1A2* кодируют альфа 1 и альфа 2 цепи коллагена типа I, который является основным структурным белком, входящим в состав костной ткани. Ген *P3H1* кодирует фермент пролил 3-гидроксилаза 1, который необходим для правильного синтеза и сборки I типа коллагена. Ген *IFITM5* (индуцированный интерфероном трансмембранный белок 5) кодирует мембранный белок, участвующий в минерализации костей.

Оценка спектра и частоты патогенных изменений в генах коллагена I типа

Коллаген I типа представляет собой гетеротример, содержащий две цепи альфа-1 и одну альфа-2. Спиральные домены содержат непрерывные триплеты Gly-Хаа-Уаа, где X и Y могут быть любыми аминокислотами. Каждый третий аминокислотный остаток - глицин.

Ген *COL1A1* находится на 17 хромосоме и содержит 51 экзон, ген *COL1A2* находится на 7 хромосоме и содержит 52 экзона. Согласно Лейденской базе данных на 2022 год в гене *COL1A1* описано 1415 мутаций, а в гене *COL1A2* - 788 мутаций у пациентов с НО из различных популяций мира (<https://oi.gene.le.ac.uk/>).

В нашем исследовании найдена 31 мутация в двух генах коллагена I типа, что составило 93,9% от всех выявленных мутаций в генах, ответственных за развитие НО.

Мутации в генах коллагена I типа делят на структурные и количественные (мутации гаплонедостаточности). Количественные мутации (нонсенс-мутации, сплайсинговые и мутации сдвига рамки считывания) приводят к уменьшению количества белка, что в свою очередь ведет к легкому течению заболевания, структурные мутации приводят аномальной структуре коллагена и более тяжелому течению НО (Marom et al., 2020).

На долю структурных мутаций в обоих генах коллагена I типа пришлось 41,94%, а на долю мутаций гаплонедостаточности - 58,06%. При этом в 10 случаях встретились мутации замены глицина на другую аминокислоту с большей боковой цепью (3 мутации в гене *COL1A1* - Gly422Ala, p.Gly821Ser, p.Gly857Cys и 7 мутаций в гене *COL1A2* - p.Gly292Ser, p.Gly316Arg, p.Gly781Arg, p.Gly919Asp, p.Gly991Arg, p.Gly1012Ser, p.Gly1093Ser), что составило 32,2%.

Показано, что простая замена глицина сильно дестабилизирует тройную цепь коллагена и влияет на клиническую тяжесть НО, кроме этого на степень дестабилизации

влияет то, какая именно аминокислота замещает глицин (Gly). Порядок потери стабильности от наименьшей к наибольшей следующий: Ala ≤ Ser < Cys < Arg < Val < Glu ≤ Asp (Beck et al., 2000; Bryan et al., 2011). Замены глицина на аланин и серин оказывают меньшее влияние на конформацию и стабильность пептида и, соответственно, приводят к более легкому течению заболевания, замены глицина на Val, Asp, Glu и Arg наблюдаются чаще при летальных типах НО (Persikov et al., 2004; Marini et al., 2007;; Xiao et al., 2011).

Семейные случаи заболевания, при которых выявлены патогенные изменения в генах, вовлеченных в патогенез НО, составили 30,5%, что согласуется с литературными данными. В Китае семейные случаи встречаются в 33% случаях (Zhang et al., 2012), у итальянцев – 32% (Venturi et al., 2006), у вьетнамцев - 53% (Lin al., 2015).

Поиск мутаций в гене альфа-1 цепи коллагена I типа

В гене *COL1A1* было найдено 19 патогенных изменений (p. Arg120*, p.Arg220*, p.Arg253*, p.Gly323*, p.Arg361*, p.Arg415*, p.Arg469*, p.Gln957*, p.Arg1026*, p.Ala126fs, p.Gly136fs, p.Gly194fs, p.Gly815fs, p.Met1264fs, c.858+1G>A, c.1354-12G>A, p.Gly422Ala, p.Gly821Ser, p.Gly857Cys), 3 из которых (c.375dupC, c.407dupG, c.3792delG) описаны впервые. Идентифицировано 9 нонсенс – мутаций, 5 мутаций сдвига рамки считывания, 3 миссенс-мутации, 2 мутации сайта сплайсинга. Мутации c.375dupC (p.Ala126fs), c.407dupG (p.Gly136fs), c.3792delG (p.Met1264fs) были выявлены впервые и не встречаются в известных базах данных (gnomAD, Ensemble, ClinVar и т.д.) (рисунок 2).

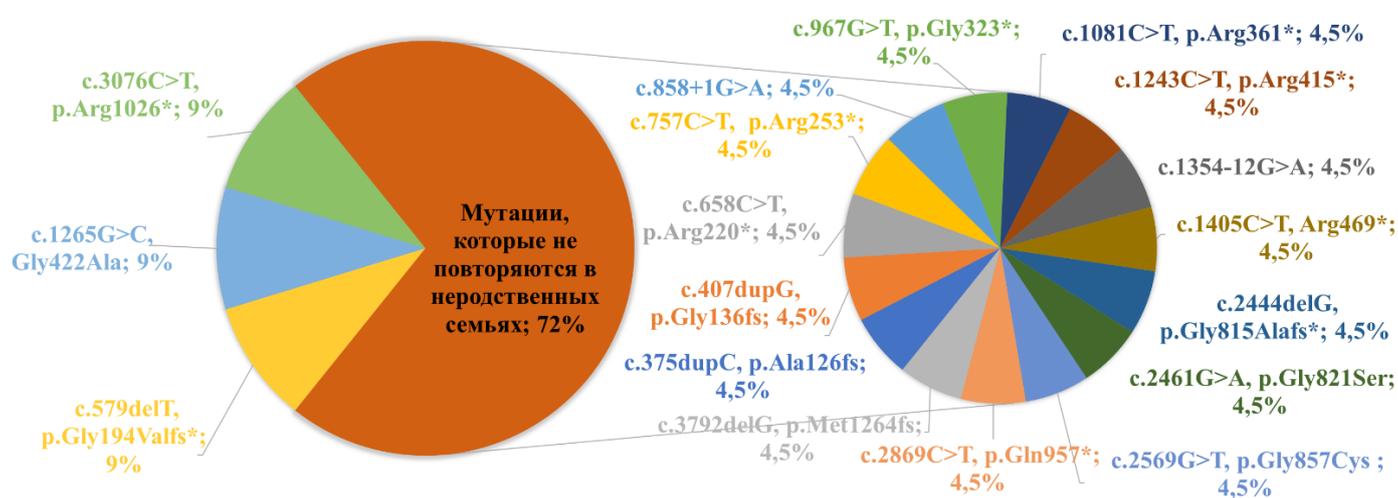


Рисунок 2 - Спектр и частота патогенных изменений в гене *COL1A1* в семьях пациентов с НО из Республики Башкортостан

Структурные мутации в гене *COL1A1* нашем исследовании составили 15,7%, мутации гаплонедостаточности, приводящие к количественному уменьшению белка, – 84,3%. В популяции китайцев на долю структурных изменений приходится 54%, а на мутации

гаплонедостаточности – 46% (Zhang, 2011), в украинской популяции соотношение равно 49%/51% (Zhytnik, 2019), что отличается от полученных нами данных.

Мутации с.358C>T, с.375dupC, с.407dupG, с.579delT, с.658C>T, с.757C>T, с.858+1G>A, с.967G>T, с.1243C>T, с.1354-12G>A, с.2444delG, с.2869C>T, с. 3076C>T в нашей выборке приводили к проявлению лёгкого типа НО (1 тип). Мутации с.1081C>T, с.1265G>C, с.2461G>A, с.2569G>T гена *COL1A1* приводили к тяжелому 3 типу НО. Мутации с.1405C>T, с.3792delG в гене *COL1A1* приводили к умеренному 4 типу НО.

Мутации с.358C>T, с.658C>T, с.1243C>T, с.2869C>T, с. 3076C>T, с.858+1G>A, с.1354-12G>A, с.3208-1G>C выявлены у пациентов с 1 типом НО, с.1265G>C - с 3 типом НО, что согласуется с литературными данными. У пациентов из РБ с мутациями с.757C>T, с.1081C>T, с.1405C>T, с.2461G>A и с.2569G>T клиническая картина заболевания отличается от ранее описанных случаев НО из других стран мира.

Так, замена цитозина на тимин в 757 положении кДНК (с.757C>T) была описана в литературе 11 раз, фенотипы больных отличались: встречались 1, 3 и 4 типы НО. Пациент из нашей выборки имел легкую форму с 1 типом НО.

Замена цитозина на тимин в 1081 положении кДНК у пробанда из РБ привела к тяжелым клиническим проявлениям 3 типа НО, у него наблюдались множественные переломы, которые привели к деформациям конечностей и инвалидизации. У отца с этой же мутацией клиника соответствовала 1 типу НО. Мутация с.1081C>T описана 11 раз, и авторы сообщают о развитии 1 типа НО с легким течением при всех случаях данной мутации (Körkkö et al., 1998; Venušienė and Kucinskas, 2003).

У нашего пациента с мутацией с.1405C>T наблюдался 4 тип НО, в базе данных данная мутация описана 4 раза у больных с 1 типом НО (<https://oi.gene.le.ac.uk/>).

Мутация с.2461G>A была зарегистрирована в базе данных 31 раз и описана у пациентов с 1, 2, 3 и 4 типами НО (<https://oi.gene.le.ac.uk/>). У нашего больного наблюдаются множественные переломы и деформации конечностей, что соотносится с 3 типом НО.

Мутация с.2569G>T в гене *COL1A1* описана 8 раз, фенотипы больных также отличались (2, 3, 4 типы НО). У нашего пациента данное изменение привело к 3 типу НО с множественными переломами, низким ростом и деформациями костной системы.

В целом, в гене *COL1A1* было выявлено 19 мутаций у 27 человек из 22 семей, из них 7 спорадических случаев, 5 семей с АД типом наследования, в 10 случаях не удалось установить тип наследования.

Большинство мутаций были единичными, за исключением трех патогенных вариантов (с.3076C>T, с.1265G>C, с.579delT) в гене *COL1A1*, каждая из которых встретилась в двух неродственных семьях татарской этнической принадлежности.

Несмотря на то, что мажорных мутаций при данном заболевании не наблюдается, некоторые патогенные изменения описываются многими исследователями. Так, мутация

c.579delT описана 25 раз, c.757C>T и c.1081C>T – 11 раз, c.1243C>T – 16 раз, c.2461G>A – 31 раз, c.3076C>T – 14 раз у пациентов из различных популяций мира (<https://oi.gene.le.ac.uk/>).

Поиск мутаций в гене альфа-2 цепи коллагена I типа

В гене *COL1A2* было найдено 12 патогенных изменений (p.Arg216His, p.Gly292Ser, p.Gly316Arg, p.Arg609Gln, p.Gly781Arg, p.Gly919Asp, p.Gly991Arg, p.Gly1012Ser, p.Gly1093Ser, p.Lys1326Arg, c.1197+5G>A, p.Ala633_Gly634dup) (рисунок 3). Мутации c.647G>A, c.1826G>A, c.1897_1902dupGCTGGT, c.2341G>C, c.2971G>C, c.3277G>A, c.3977A>G выявлены впервые и не встречаются в известных базах данных

Идентифицировано 10 миссенс-мутаций, 1 мутация сайта сплайсинга и 1 мутация сдвига рамки считывания в гене *COL1A2*. По данным международной базы по НО большинство мутаций в гене *COL1A2* составляют миссенс-мутации, на долю которых приходится примерно 74%, что сопоставимо с нашими результатами, в нашем исследовании структурные мутации составили 83,4%, мутации гаплонедостаточности - 16,6%.

Среди всех замен в гене *COL1A2* наиболее часто встречалась замена глицина на: аргинин – 3 раза (p.Gly316Arg, p.Gly781Arg, p.Gly991Arg), серин – 3 раза (p.Gly1093Ser, p.Gly292Ser, p.Gly1012Ser) и на аспарагин – 1 раз (p.Gly919Asp).

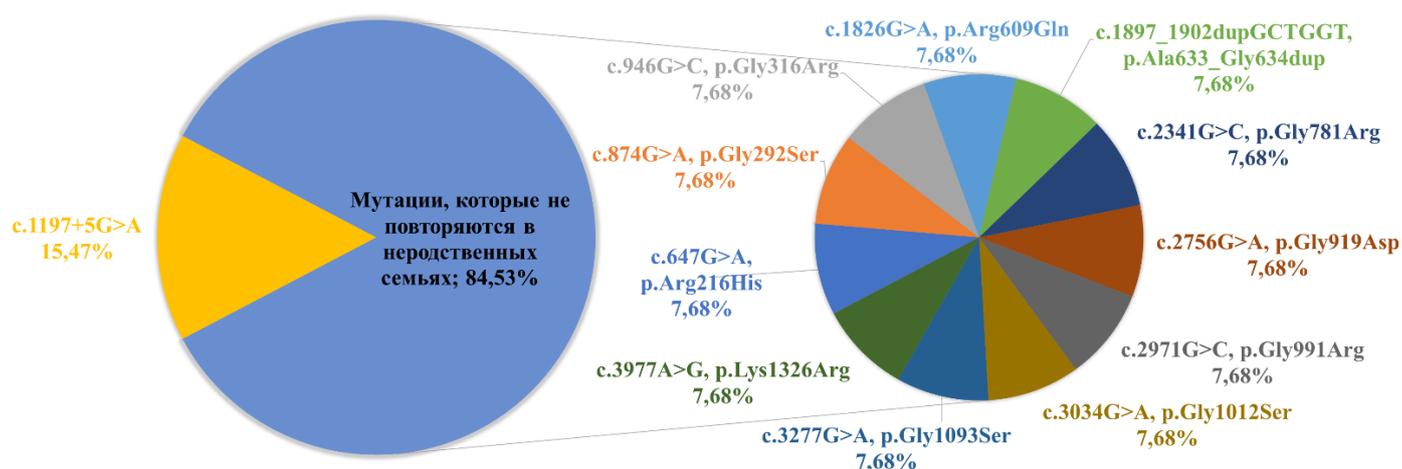


Рисунок 3 - Спектр и частота патогенных изменений в гене *COL1A2* у пациентов из Республики Башкортостан

Мутации c.647G>A, c.874G>A, c.946G>C, c.1197+5G>A, c.1826G>A, c.1897_1902dupGCTGGT, c.2341G>C, c.3277G>A в гене *COL1A2* в нашей выборке приводили к 1 типу НО с легким течением, c.2756G>A, c.3034G>A и c.3277G>A встречались при 3 типе НО с тяжелыми проявлениями, c.2971G>C, c.3977A>G - с умеренным 4 типом НО.

Мутация c.874G>A, выявленная в гене *COL1A2*, упоминается в литературе 6 раз и приводит к 1 типу у 5 пациентов из Швеции и Германии (Rolvien 2018; Lindahl 2015), - так же, как и у больного из РБ, и к 3 типу НО - у пациента из Вьетнама (Duy, 2016). Мутация c.2756G>A в гене *COL1A2* была ранее описана у пациента с внутриутробными переломами и различными аномалиями со 2 типом НО (Barkova, 2014). У нашего пациента определен 3 тип

НО, наблюдались низкий рост, голубые склеры, множественные переломы, которые привели к прогрессирующим деформациям конечностей.

Мутация с.3034G>A описана 26 раз в базе данных по НО (<https://oi.gene.le.ac.uk/>). Пациенты с этим изменением имели 3 и 4 типа НО. Наша пациентка с голубыми склерами, множественными деформирующими переломами была отнесена к 3 типу НО.

Таким образом, в гене *COL1A2* было выявлено 12 патогенных мутаций у 17 человек из 12 семей. Из них 3 спорадических случая, с аутосомно-доминантным типом наследования – 6 семей, в 3 случаях не удалось установить тип наследования.

Идентификация патогенных изменений в неколлагеновых генах, вовлеченных в развитие незавершенного остеогенеза

Кроме изменений в двух генах коллагена I типа, нами обнаружены патогенные изменения в двух неколлагеновых генах, которые также являются причинными генами незавершенного остеогенеза.

Белки генов *P3H1* и *IFITM5* участвуют в посттрансляционной модификации белка и минерализации костей, непосредственно влияя на костную ткань. И дефекты этих генов приводят к нарушениям прочности костей, вызывая переломы, которые являются основным клиническим проявлением заболевания.

Идентификация патогенного варианта в гене интерферон индуцированного трансмембранного белка 5 (*IFITM5*)

IFITM5 – ген интерферон-индуцированного трансмембранного белка 5 или BRIL (ограниченный костями Ifitm-подобный белок), экспрессируемый в остеобластах. Ген *IFITM5* вовлечен в патогенез V типа НО, который характеризуется образованием гиперпластического каллуса после переломов, кальцификацией межкостной мембраны предплечья, вывихом головки лучевой кости и сетчатым рисунком ламеллирования, наблюдаемого при гистологическом исследовании кости. По современной классификации для V типа НО характерен аутосомно-доминантный тип наследования.

Нами идентифицирована ранее описанная мутация с.-14C>T (rs587776916) в гене *IFITM5* сразу у трех неродственных пациентов, у всех мутация возникла *de novo* (таблица 1). Мутация приводит к появлению нового стартового кодона и добавлению 5 аминокислот (Met-Ala-Leu-Glu-Pro) в N-конец белка (Hedjazi et al., 2022).

Таблица 1 - Характеристика пациентов с мутацией в гене *IFITM5*

Семья	Пациент	Мутация	Тип НО	Пол	Возраст	Переломы
33 семья	44	с.-14C>T	5	м	7	10
34 семья	45	с.-14C>T	5	ж	26	50
35 семья	46	с.-14C>T	5	ж	27	15

У пациента 7 лет мужского пола башкирской этнической принадлежности клиническая картина заболевания полностью соответствовала НО типа V (рисунок 4). Первый перелом в 1,5 года, в анамнезе 10 переломов, имеет гиперпластическую костную мозоль на левой бедренной кости. У пациента плоское лицо с выступающими лобными буграми, плоская переносица, короткая шея, склеры тонкие с просвечивающими сосудами, голубоватые, на зубах тонкая эмаль и кариес, тонкая кожа, сгибательные контрактуры локтевых суставов, коническая грудная клетка, гипермобильность межфаланговых суставов.

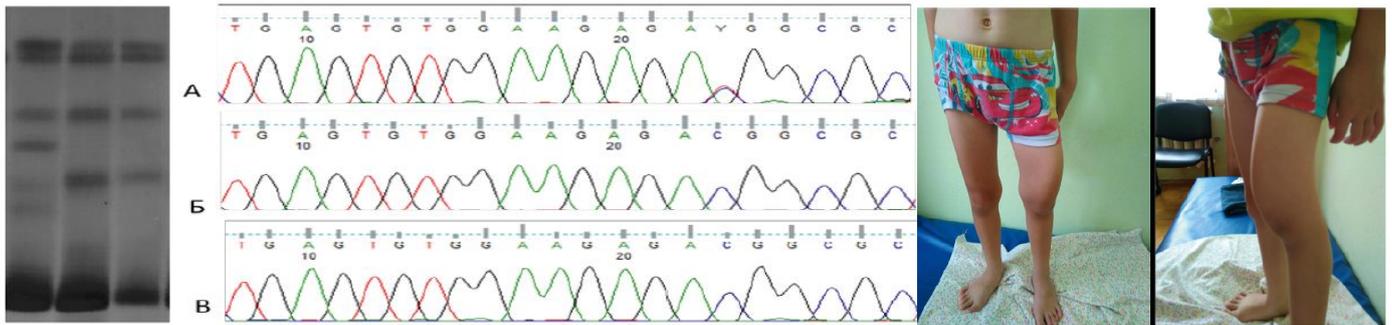


Рисунок 4 – Идентификация мутации с.-14C>Т в гене *IFITM5* у пациента с V типом НО (А-пробанд, Б и В – родители).

У второго пациента женского пола, русской этнической принадлежности наблюдалось более 50 переломов, выраженная саблевидная деформация берцовых костей, кифосколиотическая деформация позвоночника и грудной клетки, склеры белые. Сгибательные контрактуры локтевых, коленных, голеностопных суставов, отсутствует болевой синдром и признаки формирования гиперпластического каллуса после переломов.

У третьего пациента женского пола смешанной этнической принадлежности (мать - русская, отец - татарин), была выявлена дополнительная патогенная мутация с.1903C>Т (p.Arg635*, rs80356682) в гене *LAMB3* в гетерозиготном состоянии, кроме мутации с.-14C>Т в гене *IFITM5*. Вариант с.1903C>Т в гене *LAMB3* приводит к преждевременному терминирующему кодону и усечению либо полному отсутствию белка *LAMB3* из-за нонсенс-опосредованного распада, который является причиной буллезного эпидермолиза.

У пациента отсутствует формирование гипертрофического каллуса в области переломов трубчатых костей, а также наблюдается позднее и незначительное окостенение межкостной мембраны предплечья и голени.

Таким образом, у трех неродственных пациентов была найдена одинаковая мутация с.-14C>Т в промоторной области гена *IFITM5* в гетерозиготном состоянии. Частота НО V типа в нашем исследовании составила 3,75%. Это в целом согласуется с результатами, полученными другими исследователями. У 50 больных из Индии НО V типа выявлен в 2 случаях (4%) (Mrosk et al., 2018), среди 29 больных Малайзии — 1 случай (3,4%) (Nawawi et al., 2018), среди 53 больных японской популяции — 1 случай (1,8%) (Ohata et al., 2019) и среди 39 пациентов из Турции — 2 случая (5,13%) (Demir et al., 2021).

Идентификация патогенного варианта в гене пролил-3-гидроксилазы-1 (*P3H1*)

Нами обнаружена ранее неописанная мутация с.1051G>T (p.Glu351*) с вероятно патогенным клиническим значением у больного мужского пола башкирской этнической принадлежности. Пробанд был рожден в кровнородственном браке и характеризуется белыми склерами, круглым лицом, деформациями нижних конечностей, передвигается на инвалидном кресле с раннего детства. Родители пробанда и сибс здоровы. Фенотип нашего пациента схож с фенотипами пациентов, описанными Болдриджем и коллегами, которые отметили, что мутации в этом гене приводят к иным клиническим характеристикам по сравнению с больными, имеющими мутации в генах коллагена I типа (Baldrige et al., 2008).

Фермент *P3H1* вызывает 3-гидроксилирование $\alpha 1$ (I) Pro986 в коллагене I типа в составе комплекса из трех белков *P3H1*, *CRTAP* и *CyPB* в соотношении 1:1:1.

Пролил-4-гидроксилирование важно для термостабильности тройной спирали, в то время как гидроксилирование лизила и гидроксилизилгликозилирование вносят вклад во внеклеточную стабильность поперечных связей между молекулами (Lamande and Bateman, 1999; Myllyharju and Kivirikko, 2004). Отсутствие гидроксилирования $\alpha 1$ (I) Pro986 и / или прямого шаперонного эффекта *P3H1* приводит к задержке сворачивания спирали коллагена (Cabral et al., 2007). Исследователи отмечают, что чаще всего мутации в этом гене возникали у кровнородственных пациентов. Пепин с соавт. в 2013 г описали мутации с эффектом основателя в популяции африканцев (Perin et al., 2013).

Идентификация патогенных изменений в генах, не вовлеченных в патогенез незавершенного остеогенеза

У 7 пациентов было идентифицировано 8 мутаций и каждая в гетерозиготном состоянии в генах *CLCN7*, *ALOX12B*, *PLEKHM1*, *ERCC4*, *ARSB*, *PTH1R*, *SGMS2*, *TGFBI* (таблица 2), нарушения в которых ухудшают качество костной ткани, а переломы являются вторичными проявлениями основного заболевания. Это свидетельствует о необходимости более детального подхода к клиническому этапу диагностики.

Нами были идентифицированы ранее неописанные патогенные изменения с.141+4A>G в гене *CLCN7* и с.2902-9C>T в гене *PLEKHM1*, ответственных за развитие остеопетроза у двух пациентов с множественными переломами, нейросенсорной тугоухостью, миопией, артропатиями и поражением связочного аппарата.

У пациента с мутацией с.945G>C в гене *TGFBI* (трансформирующий фактор роста бета 1), ассоциированной с болезнью Камурати-Энгельмана, отмечался умеренный остеопороз наряду с мышечным болевым синдромом. У данного пациента была дополнительно выявлена мутация с.148C>T в гене *SGMS2*, отвечающем за развитие артериальной кальцификации, атеросклероза и остеопороза.

Идентифицирована мутация с.526G>A в гене *ALOX12B* (арахидонат-12-липоксигеназа) у пациента с переломами, ороговением кожного покрова и врожденным гидронефрозом. Мутации в гене *ALOX12B* вызывают коллодиевый ихтиоз.

В гене *ERCC4* была идентифицирована мутация с.2395C>T, характерная для пациентов с анемией Фанкони. У пациентки отмечалось незначительное снижение уровня гемоглобина до 107 г/л, склеры голубого оттенка, небольшие признаки поражения скелета.

Пациент с мутацией с.342C>A в гене *PTH1R* (рецептор паратиреоидного гормона 1) имел множественные проявления поражения соединительной ткани (разрыв связок коленного сустава, врожденные пороки клапанов сердца, остеопороз и сколиоз). Известно, что дефекты этого рецептора являются причиной метафизарной хондродисплазии. Мутация с.342C>A в гене *PTH1R* является ранее неописанной.

Таблица 2 - Клинические характеристики пациентов с мутациями в неколлагеновых генах

№	Пациенты	Мутация	Возраст	Пол	Голубые склеры	Количество переломов	Клинические проявления заболевания
1	43	<i>ALOX12B</i> с.526G>A, р.Glu176Lys	12	м	-	4	Гиперкератоз, переломы плюсневых и пястных костей
2	44	<i>PLEKHM1</i> с.2902-9C>T	15	ж	+	>9	Тугоухость, снижение МПКТ, миопия, артропатии
3	45	<i>ERCC4</i> с.2395C>, р.Arg799Trp	5	ж	+	Нет данных	Дальнозоркий астигматизм, анемия легкой степени
4	46	<i>ARSB</i> с.454C>T, р.Arg152Trp	12	м	+	Нет данных	Походка прихрамывает. Видимых деформаций нет.
5	47	<i>PTH1R</i> с.342C>A, р.His114Gln	8	м	+	>5	Снижение МПКТ, кифосколиотическая деформация грудной клетки, переломы пястных костей
6	48	<i>CLCN7</i> с.141+4A>C	31	м	+	>11	Выраженное снижение МПКТ, переломы костей кисти, стопы

В гене *ARSB* у пациента с остеопорозом и множественными переломами периферических костей была обнаружена мутация с.454C>T (арилсульфатаза В). Мутации *ARSB* являются причиной мукополисахаридоза VI.

Таким образом, при проведении массового параллельного секвенирования могут выявляться патогенные изменения в генах, которые приводят к развитию заболеваний, ухудшающих качество костной ткани и их значимость при НО еще предстоит выяснить.

Идентификация сочетанных вариантов мутаций

У 2 пациентов с 1 типом НО были выявлены сложные гетерозиготы по мутациям в генах *COL1A1* и *COL1A2*, у обоих наблюдается тяжелая клиническая картина заболевания с большим количеством переломов и деформациями костной системы (таблица 3).

Пациентка русской этнической принадлежности с сочетанными мутациями с.2869C>T, p.Gln957X в гене *COL1A1* и с.1197+5G>A в гене *COL1A2* имела 14 переломов в возрасте 17 лет и деформации бедренных костей. У ее отца идентифицирована только одна мутация с.2869C>T, p.Gln957X в гене *COL1A1*, отсутствовали переломы и деформации костей. Мутация с.1197+5G>A в гене *COL1A2* у дочери возникла de novo и привела к утяжелению клинических проявлений заболевания.

Мутация с.1197+5G>A гена *COL1A2* была выявлена в сочетании с мутацией с.579delT гена *COL1A1* у больного татарской этнической принадлежности, который к 19 годам имел 33 перелома, у родителей мутации не идентифицированы. Мутация с.579delT, p.Gly194ValfsX71 в гене *COL1A1* выявлена еще в одной семье, пробанд имел 15 переломов к 26 годам, а его мать - 3 перелома, что свидетельствует о том, что наличие второй мутации также привело к более тяжелому варианту заболевания.

Таблица 3 - Клинические характеристики пациентов с сочетанными мутациями

№	Мутация 1	Мутация 2	Тип наследования	Возраст	Голубые склеры	Переломы	Клинические проявления заболевания
1	с.2869C>T, p.Gln957X (<i>COL1A1</i>)	с.1197+5G>A (<i>COL1A2</i>)	АД	17	+	14	Деформации коленных суставов, бедренных костей
2	с.579delT, p.Gly194ValfsX71 (<i>COL1A1</i>)	с.1197+5G>A (<i>COL1A2</i>)	de novo	19	+	33	Гипермобильность суставов, деформация локтевого сустава
3	с.2971G>C, p.Gly991Arg (<i>COL1A2</i>)	с.212G>C, p.S71T (<i>FGF23</i>)	АД	58	-	*	Низкий рост

*нет данных

Мутации с.579delT, с.2869C>T гена *COL1A1* и с.1197+5G>A гена *COL1A2* ранее были описаны у пациентов с НО и описаны как патогенные варианты (Nicholls et al., 1996; Ries-Levavi, 2004; Marini, 2007; Swinnen, 2009; Zhang, 2011; Fuccio, 2011; Venturi, 2006; Lindahl, 2015; Lin, 2015; Rolvien, 2018; Zhytnik et al. 2019).

Таким образом, наличие двух мутаций в генах обеих цепей коллагена I типа приводит к увеличению числа переломов и деформациям костей.

У пациента русского происхождения с IV типом НО была выявлена сочетанная мутация с.2971G>C, p.Gly991Arg в гене *COL1A2* и с.212G>C, p.S71T в гене *FGF23*. У пациента легкое течение заболевания, белые склеры и низкий рост. У его сына 33 лет с единственной мутацией с.2971G>C, p.Gly991Arg в гене *COL1A2* более тяжелое течение НО. Мутации в гене *FGF23* делают белок устойчивым к протеолитическому расщеплению, что приводит к увеличению его активности и потере фосфата почками, характерной для

гипофосфатемического рахита, что, возможно, может способствовать накоплению кальция и уменьшению ломкости костей, приводя к стертой клинической картине.

Анализ вариантов с неизвестной клинической значимостью в таргетных генах

В процессе идентификации патогенных вариантов в генах, вовлеченных в патогенез НО, нами обнаружены 14 полиморфных вариантов в генах *COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *P3H1*, которые представляют определенный интерес для анализа их частоты и распространенности.

В гене *COL1A1* выявлено 4 варианта изменений нуклеотидной последовательности с неустановленной клинической значимостью.

Идентифицирован вариант rs72645362 (с.1045G>T, р.Val349Phe) в гене *COL1A1* у одного пациента мужского пола, 2001 года рождения, пациент имеет в анамнезе 7 переломов, фенотип соответствует НО типа I, других патогенных изменений в генах, вовлеченных в метаболизм соединительной ткани, у него не обнаружено. Локус расположен в 16 экзоне гена *COL1A1* и приводит к замене валина на фенилаланин в 349 положении в С-терминальном регионе белка и может привести к нестабильности тройной спиральной структуры коллагена. Однако, при данном изменении в гетерозиготном состоянии часть пула мономеров проколлагена альфа-1 может быть правильной и формировать правильно уложенные тройные спиральные мономеры проколлагена, поэтому расценивается как вариант с неизвестным клиническим значением (Witecka et al., 2008).

Выявлен полиморфный вариант rs193922146 (с.2236-17C>G) в гене *COL1A1* у одного пациента мужского пола, 1997 года рождения, в анамнезе более 5 переломов, низкий рост и множественные скелетные деформации, выражены лобные бугры, голубые склеры. Других патогенных вариантов в таргетных генах у него не обнаружено. В литературе данный вариант описан у двух пациентов с незавершенным остеогенезом и как случайная находка при полногеномном секвенировании у двух людей. В ClinVar нет функциональных доказательств для этого варианта и ему присвоен статус «неопределенного значения».

Выявлен вариант rs1906604888 (с.3531+3A>T) в гене *COL1A1* у одного пациента женского пола, 2010 года рождения, в анамнезе более 5 переломов, молекулярная причина заболевания не установлена, пациент находится под наблюдением врача-генетика. В литературе локус rs1906604888 описан у пациента с незавершенным остеогенезом 1 типа. Это изменение последовательности располагается в интроне 47 гена *COL1A1*. Он не изменяет аминокислотную последовательность белка *COL1A1* напрямую, но влияет на нуклеотид в консенсусном сайте сплайсинга интрона. Этот вариант отсутствует в популяционных базах данных (ExAC). Алгоритмы предсказания влияния изменений последовательности на сплайсинг РНК, предполагают, что этот вариант может нарушать консенсусный сайт сплайсинга, но это не было подтверждено исследованиями транскрипции, что не позволяет определить роль этого варианта в патогенезе заболевания, поэтому он был классифицирован как вариант неопределенного значения.

Обнаружен полиморфный вариант rs762042426 (с.4149C>T) в гене *COL1A1* у одного пациента, у которого наблюдались голубые склеры, низкий рост, микроглия, гипермобильность локтевых и коленных суставов, повышение уровня щелочной фосфатазы. В базе данных SNP зарегистрирован 1 случай данного варианта у индивида из Южной Азии при экзомном секвенировании. Данный вариант не описан в ClinVar, однако, VarSome предсказывает данный вариант как «вероятно доброкачественный» (<https://varsome.com>).

В гене *COL1A2* было идентифицированы 7 полиморфных вариантов, которые не соответствовали критерию «патогенный», но вызвали определенный интерес из-за различий в распространенности в популяциях мира по сравнению с нашими данными.

Нами был идентифицирован интронный вариант rs140452715 (с.70+674A>G) в гене *COL1A2*, который в нашей выборке встретился у трех пациентов. Частота данного варианта в среднем в мире составляет 0,2% (G), варьируя в разных регионах мира от 0 до 3% (в популяциях финнов, пуэрториканцев и итальянцев).

Нами был идентифицирован интронный вариант rs111331487 (с.1558-135C>T) в гене *COL1A2*, у одной пациентки. Частота данного варианта в мире составляет <1% (G), в ClinVar описан как «вероятно доброкачественный».

Идентифицирован вариант rs151000015 (с.70+804T>C) в гене *COL1A2* у трех пациентов. Частота данного варианта в мире составляет <1% (C). Данный вариант встретился в Пуэрто-Рико – 1 случай, в Италии – 1 случай и 6 случаев в Финляндии. Данный вариант ClinVar описывает как «вероятно доброкачественный».

Выявлен интронный вариант rs141980217 (с.279+149T>C) в гене *COL1A2* у двух пациентов. Частота встречаемости данного варианта в мире 1%. Всего известно 30 случаев в мире. Данный вариант в базе ClinVar описан как «вероятно доброкачественный».

Нами также идентифицированы два частых варианта – rs42524 (с.1645C>G, p.Pro549Ala) и rs58882596 (с.3106-56_3106-55del) в гене *COL1A2*.

Полиморфный вариант rs42524 (с.1645C>G, p.Pro549Ala) в нашей выборке встретился у 96% пациентов, частота минорного аллеля составила 48%, тогда как в популяциях мира его частота составляет 18%, самая высокая частота наблюдается в Европе – 24%.

Вариант rs58882596 встретился у 80% пациентов, частота в мире варьирует в зависимости от варианта аллеля delAAA/delAA/delA/dupA/dupAAA. В нашем случае идентифицирован вариант с.3106-56_3106-55del, в литературе очень мало данных про функциональную значимость этого полиморфного локуса, анализ в предсказательных программах *in silico* предполагает «вероятно доброкачественную» клиническую значимость.

В гене *P3H1* были найден полиморфный вариант rs371232413 (с.1720+4G>A), который влияет на нуклеотид в консенсусном сайте сплайсинга у одного пациента мужского пола, 1999 года рождения, в анамнезе более 5 переломов, зубы с прозрачной эмалью. Этот вариант выявлен в единичных случаях при скрининговых исследованиях популяций. Имеющихся

данных в настоящее время недостаточно для определения роли этого варианта в заболевании.

Идентифицирован полиморфный вариант с.-96Т>С (rs56069858) в гене *IFITM5*. В нашей выборке данный вариант встретился практически у всех пациентов. Частота встречаемости данного варианта в среднем в мире составляет 0,49, варьируя от 0,29 в Европе до 0,81 в популяциях Юго-Восточной Азии. В базе ClinVar данный вариант описан как «вероятно доброкачественный».

Идентифицирован полиморфный вариант rs57285449 (с.80G>C, p.Gly27Ala) в гене *IFITM5*. Частота данного варианта сопоставима со средними значениями его частоты в популяциях мира, несмотря на изменение аминокислотной последовательности белка. Самая высокая частота наблюдается в европейских популяциях – 0,65, реже встречается в Юго-Восточной Азии – 0,37. В популяциях России данный вариант не анализировался.

Полиморфные варианты генов *COL1A2*, *P3H1* и *IFITM5* с неопределенной клинической значимостью у пациентов с НО из Республики Башкортостан и в популяциях мира описаны в таблице 4.

Таблица 4 - Частота полиморфных вариантов генов *COL1A2*, *P3H1* и *IFITM5* с неизвестной клинической значимостью у пациентов с НО из РБ и в популяциях мира

№ п/п	Локус	Ген	Частота MAF у пациентов	Частота MAF в мире
1	rs140452715 с.70+674A>G	<i>COL1A2</i>	0,075	В среднем 0,002, у финнов 0,03
2	rs189041834 с.1765-109T>G	<i>COL1A2</i>	0,025	<0,01
3	rs111331487 с.1558-135C>T	<i>COL1A2</i>	0,075	<0,01
4	rs151000015 с.70+804T>C	<i>COL1A2</i>	0,075	0,002
5	rs141980217 (с.279+149T>C)	<i>COL1A2</i>	0,05	0,01
6	rs58882596 (с.3106-56_3106-55del)	<i>COL1A2</i>	0,40	От 0,01 до 0,60
7	rs42524 (с.1645C>G, p.Pro549Ala)	<i>COL1A2</i>	0,48	0,178
8	rs371232413 (с.1720+4G>A)	<i>P3H1</i>	1 пациент	<0,01
9	rs56069858 (с.-96T>C)	<i>IFITM5</i>	0,525	0,49
10	rs57285449 (с.80G>C, p.Gly27Ala)	<i>IFITM5</i>	0,4	0,41

Полученные нами данные по частотам полиморфных вариантов с неустановленной функциональной значимостью при незавершенном остеогенезе расширяют представление о генетических вариантах целевых генов, вовлеченных в патогенез заболевания.

Таким образом, НО является генетически гетерогенным заболеванием, характеризующимся внутри – и межсемейной клинической вариабельностью. У пациентов с НО из Республики Башкортостан обнаружен уникальный спектр мутаций, идентифицированы 11 ранее неописанных патогенных изменений в генах, ответственных за развитие заболевания. Кроме этого, выявлены мутации в 10 генах, которые приводят к состояниям, ухудшающим качество костной ткани и их значимость при НО еще предстоит выяснить. Обнаружены сочетанные варианты мутаций, влияющие на клиническое проявление НО, что осложняет определение типа заболевания, а большое количество мутаций *de novo* – медико-генетическое консультированиеотягощенных семей.

Разработка алгоритмов диагностики незавершенного остеогенеза

Полученные нами результаты показали, что для большинства пациентов с незавершенным остеогенезом из Республики Башкортостан характерны патогенные изменения в двух генах коллагена первого типа *COL1A1* и *COL1A2*, кодирующих цепи альфа-1 и альфа-2, однако для пациентов изученного региона характерен свой уникальный спектр мутаций и высокий процент случаев *de novo*. Поэтому мы создали собственную целевую NGS-панель для двух генов коллагена I типа.

Панель обладает рядом следующих характеристик: идентифицирует клинически значимые варианты, а также редкие и ранее неизвестные; имеет ссылки на внешние источники аннотации; есть автоматический контроль качества образца, включая определение пола и контаминацию, и гибкий поиск. Панель праймеров включает все кодирующие регионы и сайты сплайсинга генов *COL1A1* и *COL1A2*, не содержит адаптерные последовательности, поэтому может использоваться с любой совместимой платформой для секвенирования при условии использования соответствующей пробоподготовки. В пулы праймеров включены биологические идентификаторы (BID) – это дополнительная панель, состоящая из 13 пар праймеров на высокополиморфные участки генома. Биологические идентификаторы позволяют осуществлять контроль качества и определять уникальную природу каждого образца в запуске секвенирования (гаплотип по биологическим идентификаторам); контаминацию образца; родство на уровне родитель-ребенок; идентичные образцы с различным идентификатором; пол образца.

Длина прочтения при секвенировании библиотек на платформе Illumina MiSeq System составила 300 циклов в режиме одно-концевых прочтений.

Расчетная глубина покрытия не менее 500 и не менее 193500 прочтений на образец.

Обработка полученных результатов проводится с использованием программного обеспечения VariFind, который исполнен в виде web-приложения, доступ к которому осуществляется путем авторизации на сайте <https://varifind.parseq.pro>.

Показана высокая чувствительность и специфичность при анализе контрольных образцов с ранее идентифицированными мутациями. Все обнаруженные изменения подтверждались при секвенировании по Сэнгеру. Алгоритмы ДНК – диагностики НО заключаются в следующем: при отсутствии патогенных изменений в генах коллагена I типа (*COL1A1* и *COL1A2*) рекомендуется провести анализ мутации с.-14C>T в гене *IFITM5*, даже при отсутствии выраженной клинической манифестации НО типа V. Если мутации не идентифицированы, пациент должен находиться под динамическим наблюдением у врача генетика в течение нескольких лет, при нарастании клинических проявлений заболевания рекомендуется экзомное секвенирование.

ВЫВОДЫ

1. Молекулярный дефект заболевания идентифицирован у 58,7% пациентов с незавершенным остеогенезом. Патогенные изменения нуклеотидной последовательности выявлены в 4 генах, вовлеченных в патогенез незавершенного остеогенеза.

2. Обнаружен 31 патогенный вариант изменений нуклеотидной последовательности в двух генах коллагена I типа (*COL1A1* и *COL1A2*), 10 из которых ранее не были описаны в литературе, что составило 93,9% от всех выявленных патогенных изменений в генах, вовлеченных в развитие незавершенного остеогенеза.

3. Все выявленные мутации в генах коллагена I типа являются уникальными кроме трех патогенных вариантов с.3076C>T, с.1265G>C, с.579delT в гене *COL1A1*, каждая из которых идентифицирована в двух неродственных семьях пациентов татарской этнической принадлежности.

4. Обнаружена ранее неописанная мутация с.1051G>T (p.Glu351*) в гене пролил-3-гидроксилаза-1 (*P3H1*) у пациента башкирской этнической принадлежности.

5. Идентифицирована мутация с.-14C>T в гене *IFITM5* у трех неродственных пациентов с V типом незавершенного остеогенеза.

6. Выявлены мутации в генах *CLCN7*, *ALOX12B*, *PLEKHM1*, *ERCC4*, *ARSB*, *PTH1R*, *TGFBI*, *SGMS2*, неописанных в качестве причинных генов незавершенного остеогенеза.

7. Оптимизирован алгоритм ДНК диагностики незавершенного остеогенеза с разработкой таргетной NGS панели на основе анализа двух генов коллагена первого типа, кодирующих цепи альфа-1 и альфа-2 (*COL1A1* и *COL1A2*).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Зарипова А.Р. Поиск мутаций в гене интерферон индуцированного трансмембранного белка 5 (*IFITM5*) у больных несовершенным остеогенезом / А.Р. Зарипова, Л.Р. Нургалиева, А.В. Тюрин, И.Р. Миннихметов, Р.И. Хусаинова // Медицинская генетика 2019. – Т.18. - №10. - С. 21-29. doi: 10.25557/2073-7998.2019.10.21-29 (ВАК)

2. Зарипова А.Р. Современная классификация и молекулярно-генетические аспекты незавершенного остеогенеза / А.Р. Зарипова, Р.И. Хусаинова // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020. - Т. 24. - № 2. - С. 219-227. doi: 10.18699/VJ20.614 (ВАК, WoS, Scopus)

3. Зарипова А.Р. Генетическая архитектура незавершенного остеогенеза в Республике Башкортостан / А.Р. Зарипова, Н. А. Скрыбин, Т.С. Короткая, Е.Ю. Захарова, А.В. Тюрин, И.Р. Миннихметов, Р.И. Хусаинова // Медицинская генетика. - 2020. – Т.19. - №8. - С.57-58. doi: 10.25557/2073-7998.2020.08.57-58 (ВАК)

4. Зарипова А.Р. мутаций у больных незавершенным остеогенезом из Республики Башкортостан / А.Р. Зарипова, Р.И. Хусаинова // Биомика. - 2020. - Т.12. - №4. - С.460-463. doi: 10.31301/22216197.bmc.2020-38 (РИНЦ)

5. Nadyrshina, D. Osteogenesis Imperfecta: Search for Mutations in Patients from the Republic of Bashkortostan (Russia) / D. Nadyrshina, A. Zaripova, A. Tyurin, I. Minniakhmetov, E. Zakharova, R. Khusainova // Genes. - 2022. - V. 13. – P.124. doi: 10.3390/genes13010124 (WoS, Scopus, Q2)

6. Tyurin, A. Does the c.-14C>T Mutation in the *IFITM5* Gene Provide Identical Phenotypes for Osteogenesis Imperfecta Type V? Data from Russia and a Literature Review / Tyurin, A., Merkur'yeva, E., Zaripova, A., Markova, T., Nagornova, T., Dantsev, I., Nadyrshina, D., Zakharova, E., Khusainova, R. // Biomedicines. – 2022. – V. 10. – P.2363. doi:10.3390/biomedicines10102363 (WoS, Scopus, Q1)

7. Зарипова А.Р. Спектр и частоты патогенных изменений у пациентов с несовершенным остеогенезом из Республики Башкортостан / А.Р. Зарипова, Д.Д. Надыршина., Р.И. Хусаинова // Медицинская генетика. - 2022. – Т.21. - №9 - С.41-44. doi: 10.25557/2073-7998.2022.09.41-44 (ВАК)

8. Д.Д. Надыршина. Молекулярная диагностика наследственных заболеваний соединительной ткани / Д. Д. Надыршина, А. Р. Зарипова, А. В. Тюрин и др. // Медицинская генетика. – 2022. – Т. 21. – № 10. – С. 23-27. – doi: 10.25557/2073-7998.2022.10.23-27. (ВАК)

Тезисы докладов в сборниках конференций:

1. Зарипова А.Р. Анализ гена интерферон индуцированного трансмембранного белка 5 (*IFITM5*) у больных незавершённым остеогенезом / А.Р. Зарипова, Р.И. Хусаинова // Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции: Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием (Ростов-на-Дону, 26–29 сентября 2019 г). - 2019. – С. 254.

2. Зарипова А.Р. Молекулярно-генетическое исследование незавершенного остеогенеза в Республике Башкортостан / А.Р. Зарипова, Р.И. Хусаинова // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2020» [Электронный ресурс]. - 2020.

3. Зарипова А.Р. Проблема клинической гетерогенности несовершенного остеогенеза тип 5 / А.Р. Зарипова, Л.Р. Нургалиева, Тюрин А.В., Р.И. Хусаинова // Остеопороз и остеопатии. - 2020. - Т. 23. - №2. - С. 53-54.

4. Зарипова А.Р. Идентификация патогенных вариантов при незавершенном остеогенезе с использованием технологии секвенирования следующего поколения (NGS) / А.Р. Зарипова, Р.И. Хусаинова // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021». – 2021.

5. Зарипова А.Р. Идентификация мутаций в генах *COL1A1* и *COL1A2*, вовлеченных в патогенез незавершенного остеогенеза / А.Р. Зарипова, Р.И. Хусаинова // Сборник трудов X Юбилейной международной научно-практической конференции "Молекулярная диагностика". Сб. трудов / колл. авт. – Т. 1. – Тамбов: ООО фирма «Юлис». - 2021. – С.438

6. Зарипова А.Р. Анализ гено-фенотипических корреляций у больных с несовершенным остеогенезом с мутациями в генах коллагена I типа / А.Р. Зарипова, Д.Д. Надыршина, Р.И. Хусаинова // Трансляционная медицина. – 2022. – С.189.

7. Зарипова А.Р. Применение технологии секвенирования следующего поколения для поиска патогенных мутаций у пациентов с незавершенным остеогенезом / А.Р. Зарипова, Р.И. Хусаинова // III Всероссийская конференция “Высокопроизводительное секвенирование в геномике”. Тезисы - Новосибирск: Академиздат. - 2022. - С.- 122 с.

8. Зарипова А.Р. Клиническая и генетическая гетерогенность незавершенного остеогенеза / А.Р. Зарипова, Р.И. Хусаинова // Сборник тезисов всероссийской конференции молодых ученых "Генофонд и репродуктивное здоровье человека". – 2022.

9. Зарипова А.Р. Идентификация мутаций у пациентов с незавершенным остеогенезом / А.Р. Зарипова, Р.И. Хусаинова // Остеопороз и остеопатии. - 2022. – Т.25. - №3. – С.3-141. doi: 10.14341/osteo20223

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

НО	Незавершенный остеогенез
МПКТ	Минеральная плотность костной ткани
MAF	Частота редкого аллеля
<i>COL1A1</i>	Коллаген I типа альфа-1 цепи
<i>COL1A2</i>	Коллаген I типа альфа-2 цепи
<i>P3H1</i>	Пролил-3 – гидроксилаза-1
<i>IFITM5</i>	Интерферон индуцированный трансмембранный белок 5
<i>ERCC4</i>	эксцизионная репарация <i>ERCC</i> , каталитическая субъединица эндонуклеазы
<i>PTH1R</i>	рецептор паратиреоидного гормона 1
<i>ALOX12B</i>	арахидонат-12-липоксигеназа, тип 12R
<i>ARSB</i>	арилсульфатаза B
<i>PLEKHM1</i>	Гомология плекстрина и домен RUN, содержащий M1
<i>SGMS2</i>	Сфингомиелин синтаза 2
<i>TGFB1</i>	трансформирующий фактор роста бета 1
<i>CLCN7</i>	хлоридный потенциал-зависимый канал 7
<i>FGF23</i>	фактор роста фибробластов 23
<i>LAMB3</i>	субъединица ламинина бета 3