

Молекулярно-генетическая и биохимическая характеристика изолированной метилмалоновой ацидурии у российских пациентов

Куркина М.В., Байдакова Г.В., Захарова Е.Ю.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический Научный Центр», Москва, Россия
e-mail: labnbo@yandex.ru

После расшифровки генетических основ метилмалоновой ацидурии (ММА) стало понятно, что это обширная группа наследственных болезней, которую объединяет повышение уровня метилмалоновой кислоты (ММК) в биологических жидкостях. С биохимической точки зрения выделяют две группы ММА: изолированную и комбинированную. Первая объединяет заболевания, связанные с мутациями в генах метилмалонил-КоА мутаза, метилмалонил-КоА эпимеразы и болезни, обусловленные нарушением метаболизма витамина В12. Во вторую группу включают комбинированную ММА с гомоцистеинемией/гомоцистинурией, обусловленную мутациями в нескольких генах, участвующих в биогенезе митохондрий. Своевременная диагностика этих заболеваний крайне важна, поскольку разработаны подходы к диетотерапии ММА, а применение гидроксикобаламина для В12-чувствительных форм позволяет практически нивелировать все клинические проявления болезни. Немаловажным фактором, затрудняющим ДНК-диагностику многих наследственных заболеваний, является выявление изменений нуклеотидной последовательности, трактовка патогенетического значения которых затруднена. В данной работе нами проведен анализ биохимического фенотипа у 31 пациента с изолированной ММА, ДНК-диагностика проведена 18 пациентам. У 13 больных обнаружены мутации в гене *MUT* и у 3 пациентов — в гене *ММАА*, у 2 пациентов проведен анализ гена *ММАВ* и мутаций выявлено не было, планируется провести исследование гена *ММАВ*. Мутации, выявленные в гене *MUT*, впервые были проанализированы с применением нескольких программ по предсказанию патогенности мутаций.

Ключевые слова: метилмалоновая ацидемия, биохимия, молекулярно-генетическая диагностика, программы оценки патогенности мутаций

Введение

ММА — это генетически гетерогенная группа наследственных болезней, которую объединяет повышение уровня метилмалоновой кислоты (ММК) в крови и моче. Повышение ММК в моче может быть изолированным или наблюдаться в сочетании с повышением уровня других метаболитов. Известно 13 различных генов, мутации в которых приводят к повышению ММК в биологических жидкостях. При этом для лечения ММА у пациентов с мутациями в генах метилмалонил-КоА мутаза (*MUT*) и дефектами в синтезе аденозилкобаламина AdoCbl с успехом применяют специализированное лечебное питание и витамин В12 — (гидроксикобаламин) в высоких дозах. Другие формы ММА практически не поддаются терапии, но они различаются по типу наследования и прогнозу заболевания. Описаны и не наследственные состояния, при которых повышение ММК вызвано алиментарной недостаточностью витамина В12 или нарушениями его всасывания в желудочно-кишечном тракте. Поэтому дифференциальная молекулярная диагностика состояний, сопровождающихся повышением ММК важна для отягощенной семьи.

Генетика

Наиболее частая форма изолированной ММА обусловлена мутациями в гене метилмалонил-КоА мутаза (*MUT*), что приводит к частичной (*mut⁻*) или полной

(*mut⁰*) потере активности фермента и нарушению превращения L-метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА [2, 3]. Другие формы изолированной ММА связаны с дефектами синтеза витамина В12, являющимся кофактором фермента, и обусловлены мутациями в генах *ММАА*, 4q31; *ММАВ*, 12q24 и крайне редко в гене метилмалонил-КоА эпимеразы (*MCEE*). Комбинированная ММА с гомоцистеинемией/гомоцистинурией связана с нарушениями в генах *ММАСНС*, 1q34; *ММАДНС*, 2q23; *LMBRD1*, 6q13; *АВСВ4*, 14q24; *НСFC1*, Xq28 [4]. Формы ММА, обусловленные истощением митохондриальной ДНК, связаны с мутациями в генах *SUCLA2*, 13q14.2 и *SUCLG1*, 2p11.2. Крайне редко встречается форма ММА, связанная с недостаточностью рецептора транскобаламина и мутациями в гене *CD320*, который картирован на 19p13.2.

Эпидемиология и патогенез

Изолированная ММА относится к числу редких наследственных заболеваний, ее частота в среднем оценивается как 1:50 000 [5]. В отдельных странах мира частота колеблется от 1:48 000 новорожденных в США [6], до 1:115 000 в Италии и 1:169 000 в Германии [7]. В Российской Федерации точная частота заболевания неизвест-

на, поскольку массовый скрининг на это заболевание не проводится.

Патогенез изолированной ММА связан с накоплением производных метилмалоновой и пропионовой кислот вследствие блокирования реакции образования сукцинил-КоА из метилмалонил-КоА, катализируемой метилмалонил-КоА мутазой. Нарушение активности этого фермента связано с мутациями в гене *MUT* или в генах, ответственных за синтез кофактора фермента — аденозил КоА, который образуется из витамина В12. Также описан только один случай изолированной ММА, связанный с мутациями в гене, который кодирует фермент метилмалонил-КоА эпимеразу (*MCEE*), ответственную за превращение D-метилмалонил КоА в L-метилмалонил КоА.

Предшественниками пропионатов в организме служат аминокислоты изолейцин, валин, треонин и метионин (50% общего количества пропионатов), жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода и холестерин (25%); остальная часть пропионатов образуется в кишечнике в результате деятельности эндогенной микрофлоры. Накопление органических кислот (пропионовой, метилмалоновой, метиллимонной (метилцитрата) и др.) ведет к тяжелому метаболическому кетоацидозу, вторичной гипераммониемии, гиперглицинемии, гипогликемии. Повышенный уровень в крови, и высокая почечная экскреция пропионилкарнитина обуславливают истощение запасов карнитина и его вторичный дефицит [8, 9].

Клинические проявления

В большинстве случаев изолированная ММА характеризуется острым началом и кризовым течением. Метаболический криз провоцируется факторами, ведущими к усилению процессов катаболизма: интеркуррентными инфекциями, хирургическими вмешательствами, приемом больших количеств белка и др. [10, 11] Если диагноз не устанавливают вовремя и не назначают низкобелковую диету с ограничением изолейцина, валина, треонина и метионина, развиваются тяжелые неврологические осложнения, метаболический ацидоз, дыхательные нарушения.

Изолированную ММА подразделяют на две формы: В12-резистентную (примерно половина случаев) и В12-зависимую.

При В12-резистентной форме ММА первые симптомы обычно появляются в возрасте 2 недель — 4 месяцев: упорная рвота, отказ от еды, дегидратация, вялость, сонливость, дыхательные нарушения, задержка психомоторного и физического развития, иногда развиваются инсультоподобные эпизоды. В более старшем возрасте, помимо значительной задержки психоречевого и моторного развития, у детей отмечаются различные экстрапирамидные нарушения (хореоатетоидные и миоклонические гиперкинезы, мышечная дистония), а также инсультоподобные эпизоды, эпилептические приступы, из экстра-

невральных осложнений наиболее тяжелыми являются поражение почек по типу тубулоинтерстициального нефрита с артериальной гипертензией и почечной недостаточностью, эритематозный дерматит, в отдельных случаях — панкреатит и кардиомиопатия. При компьютерном и магнитно-резонансном томографическом исследованиях выявляются характерные нарушения: корково-подкорковая атрофия, расширение желудочков, утолщение борозд, задержка миелинизации, очаги некрозов в области базальных ганглиев [10, 11]. В12-зависимая форма болезни обычно имеет более позднюю манифестацию — после неонатального периода. При всех формах в период метаболического криза отмечаются следующие расстройства: тяжелый метаболический ацидоз, кетоз, гиперглицинемия, гипераммониемия, нейтро- и тромбоцитопения, у части больных — гипогликемия. Иногда наблюдается гипергликемия [10, 11].

Диагностика ММА

Лабораторная диагностика ММА представляет определенные трудности ввиду клинической гетерогенности признаков, симптомов и неспецифической манифестации заболевания. Большинство заболеваний, обусловленных повышением уровня органических кислот (органические ацидурии, аминокислотопатии), можно диагностировать методами tandemной масс-спектрометрии (МС/МС) и газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ГХ-МС) [12, 13]. При ММА наблюдается повышение концентрации пропионилкарнитина (C3) и иногда метилмалонил-/сукцинилкарнитина (C4DC) в пятнах высушенной крови методом МС/МС [12, 13]. Сходные изменения наблюдаются при пропионовой ацидурии, поэтому на основании анализа ацилкарнитинов невозможно разграничить эти два наследственных нарушения метаболизма. Кроме того, в ряде случаев концентрация C3 при ММА может быть в пределах референсных значений, а повышаются только соотношения C3/C2, C3/C0 (норма <0,25 и <0,1 соответственно). Определение концентрации аминокислот не имеет диагностического значения, поскольку уровень изолейцина, валина, метионина и треонина в крови у многих пациентов, как правило, в пределах нормы. У некоторых пациентов с ММА в крови и моче может наблюдаться повышение уровня глицина. Однако оно не является специфичным и может наблюдаться и при других наследственных нарушениях обмена веществ.

Методом ГХ-МС в моче у пациентов с ММА выявляют повышение концентрации ММК, а также ее производной — метилцитрата. Уровень ММК может быть повышен в сотни и даже в тысячи раз по отношению к контролю, или может повышаться умеренно и быть в десять раз выше нормы.

Для диагностики ММА, кроме определения органических кислот и ацилкарнитинов, необходимо провести

ряд дополнительных биохимических тестов. Схема дифференциальной диагностики ММА приведена на рис. 1.

Молекулярная диагностика заболевания осложняется его генетической гетерогенностью, но она необходима как для медико-генетического консультирования, так и для выбора тактики лечения. На основании биохимических данных сложно предсказать первичный молекулярно-генетический дефект. Согласно данным

литературы, молекулярно-генетический анализ изолированных форм ММА следует проводить в следующем порядке:

1) исследование генов *MUT* и *MMAV* при витамин В12-нечувствительных формах и генов *MMAA* и *MMAV* при витамин В12-чувствительных формах;

2) исследование гена *MCEE* в случае если мутации в генах *MUT*, *MMAV*, *MMAA* не обнаружены (рис. 1).

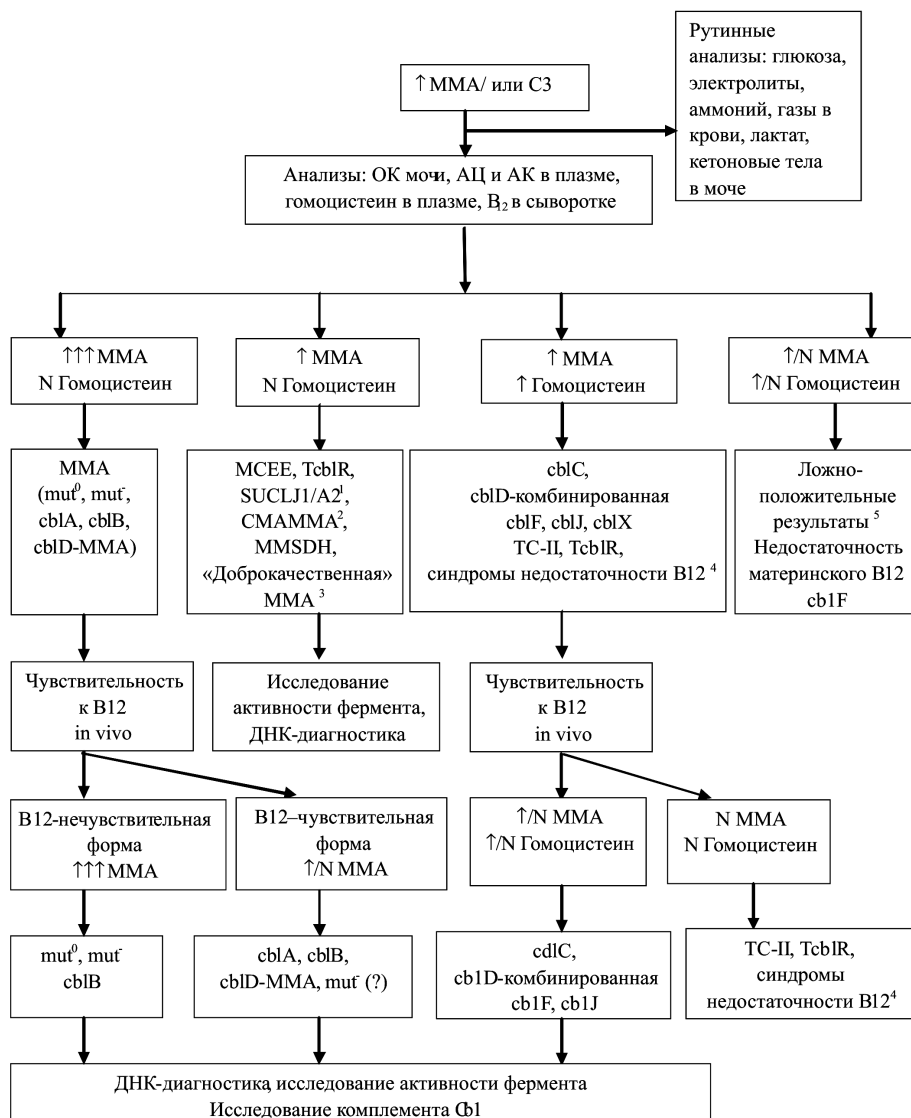


Рис. 1. Схема дифференциальной диагностики ММА.

ММА — метилмалоновая ацидурия; C3 — пропионилкарнитин; ОК — органические кислоты; АЦ — ацилкарнитины; АК — аминокислоты, mut — мутация; cbl — кобаламин; TC-II — транскобаламин II.

¹ Недостаточность сукцинат лигазы (обусловлена мутациями в *SUCLA2/SUCLG1*) манифестирует лактат-ацидозом, повышенной экскрецией 2-метилцитрата, 3-гидроксипропионата, 3-гидроксиизовалериановой кислоты в моче; повышенной экскрецией C3-пропионилкарнитина и C4-дикарбонового карнитина (C4DC) в крови или моче.

² CMAMMA манифестирует с концентрацией C3 в пределах нормы в плазме и повышенной концентрацией метилмалоновой кислоты и малоновой кислоты.

³ Недостаточность метилмалонил-семиальдегид-дегидрогеназы (MMASDH), «доброкачественная ММА».

⁴ Синдромы недостаточности витамина B12, включающие синдром Imerslund-Grasbeck и т.д.

⁵ В редком случае метаболиты могут быть в пределах референсных значений у больных.

Материалы и методы

Пациенты

Пациенты были направлены в лабораторию наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ МГНЦ для исключения органических ацидурий и/или аминокислотопатий. Подавляющее число пациентов с установленным в дальнейшем диагнозом ММА было направлено из инфекционных и психоневрологических отделений стационаров. Возраст пациентов составил от 1 месяца до 26 лет, среди них 13 пациентов мужского пола (41%) и 18 женского пола (59%).

Анализ органических кислот мочи методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией

Для анализа органических кислот использовалась утренняя порция мочи, собранная в стерильный контейнер. Собранные образцы мочи хранились при -20°C . Органические кислоты в моче анализировались методом ГХ-МС в виде триметилсилиловых эфиров. Пробоподготовка проводилась аналогично [14] с модификациями. Анализ выполнялся на приборе 7890A/5975C (Agilent Technologies, США) с колонкой HP-5MS (30 м*0,25 мм*4 мкм). Расчет полученных результатов осуществляли методом внутреннего стандарта.

Анализ аминокислот и ацилкарнитинов методом tandemной масс-спектрометрии

Для анализа аминокислот и ацилкарнитинов использовалась капиллярная или венозная кровь, собранная на стандартную карточку-фильтр №903. Высушенные образцы крови хранились при $+4^{\circ}\text{C}$. Пробоподготовка проводилась с использованием набора «NeoGram Amino Acids and Acylcarnitines Tandem Mass Spectrometry Kit» (Perkin Elmer, Finland). Поскольку данный набор является готовым к применению продуктом, производителем определены линейность и чувствительность для каждого измеряемого параметра, что приведено в инструкции к набору.

Анализ аминокислот и ацилкарнитинов проводится на квадрупольном tandemном масс-спектрометре Sciex 3200 QTrap (ABSciex, США) с положительной ионизацией в электроспрее. Концентрации аминокислот и ацилкарнитинов определялись в виде бутиловых эфиров методом дейтерированных внутренних стандартов. Значения концентраций аминокислот и ацилкарнитинов рассчитывались автоматически путем сравнения интенсивности пиков анализируемых соединений с интенсивностью внутренних стандартов с помощью программ NeoGram (Perkin Elmer Life and Analytical Science, Wallac OY, Finland) и ChemoView (ABSciex, USA).

Молекулярно-генетические методы анализа

Биологический материал для проведения ДНК-диагностики был доступен для 18 пациентов из 17 семей.

Геномную ДНК из цельной или высушенной на фильтрах крови выделяли, используя набор реактивов Diatom DNA Prep (ООО Биокот, Россия) по методике, рекомендованной изготовителем. Исследование генов *MUT*, *ММАА* проводили методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием. Секвенирование проводилось согласно протоколу фирмы производителя на приборе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems). Праймеры были выбраны на основании референсной последовательности гена *MUT*: NM_000255.3, гена *ММАА*: NM_172250.1 и включали все кодирующие экзоны генов и прилегающие к ним участки интронов.

Оценка патогенности выявленных мутаций

Проверка найденных изменений нуклеотидной последовательности проводилась с использованием баз данных: The Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.org/>) и National Center for Biotechnology dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Для оценки возможных нарушений сайта сплайсинга применяли программу NetGene2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>). Оценка патогенности ранее неописанных миссенс-мутаций выполнялась с использованием ресурсов SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) и Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>). Межвидовая эволюционная консервативность оценивалась с использованием UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Для оценки влияния изменений нуклеотидной последовательности на структуру белка, замены аминокислот были отображены на трехмерной (3D) модели с использованием программ DeepView (версия 4.1) и CMBI (<http://www.cmbi.ru.nl/hope/>). Для анализа использовалась кристаллографическая структура человеческого белка МКМ в разрешении $1,95 \text{ \AA}$ (PDB ID: 2XIJ, ранее описанная Froese et. al.) [15]. Оценка частоты распространенности неописанных замен проводилась с помощью Exac Database (<http://exac.broadinstitute.org/>).

Результаты и обсуждение

В лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ «МГНЦ» диагноз «изолированная ММА» был подтвержден 31 пациенту на основании характерных биохимических изменений — повышения уровня МКМ в моче, пропионилкарнитина (C3) в крови, повышения соотношений C3/C2, C3/C0 и отсутствия гомоцистинурии/гомоцистеинемии. Примеры хроматограмм приведены на рис. 2, 3.

Анализ аминокислот и ацилкарнитинов

При проведении MC/MC у пациентов в нашей выборке наблюдалось повышение концентрация C3 от 8 до 30 мкМ/л (норма: 0,2—6,5 мкМ/л). У одного пациента (С.А.) концентрация C3 находилась в пределах референсных значений — 4,49 мМ/л, а были повышены только соотношения C3/C2, C3/C0 (0,26 и 0,11 соответственно). При проведении массового скрининга новорожден-

ных в разных странах, было показано, что дефицит витамина B12 у матери также является причиной повышения С3 у новорожденных и может приводить к тяжелой энцефалопатии [18]. Это нарушение может наблюдаться при грудном вскармливании, если мать является вегетарианкой, а также у матерей, перенесших операции на желудке. При этом не обязательно снижение концентрации витамина B12 в крови у матери [19—21]. В нашем исследовании у одного из пациентов было выявлено повышение С3, и снижение концентрации витамина B12 у матери в крови и, после коррекции данного нарушения, все показатели у ребенка нормализовались. По мнению некоторых авторов, ММА вследствие дефицита витамина B12 является более частым явлением, чем наследственные формы ММА [21].

Повышение концентрации метилмалонил-/сукцилкарнитина C4DC у обследованных пациентов не наблюдалось. Следует отметить, что C4DC может повышаться при ММА, связанной с недостаточностью сукци-

нил-КоА лигазы, и у некоторых пациентов с изолированной ММА [16, 17].

Анализ органических кислот в моче

Концентрация ММК у 31 пациента, включенного в исследование, варьировала от 964 до 20 182 мМ/М креатинина (норма: 0—2 мМ/М креатинина). Концентрация метилцитрата — от 17 до 35 мМ/М креатинина (норма: 0—12 мМ/М креатинина). Для выявления B12-чувствительной формы заболевания всем пациентам проводилось определение уровня ММК в моче на фоне внутримышечного введения витамина B12 в дозе 1,0 мг в течение 1—2 недель. По данным литературы, критерием чувствительности к витамину B12 является снижение ММК более чем на 50% [18, 24]. Чувствительность к введению витамина B12 была выявлена у 5 пациентов. У них концентрация ММК снизилась более чем в девять раз; у пациента Б.И. с 7850 до 900 мМ/М креатинина, у пациента Г.В. с 14 087 до 256 мМ/М креатинина, у пациента С.С. с 2811,6 до 19,54 мМ/М креати-

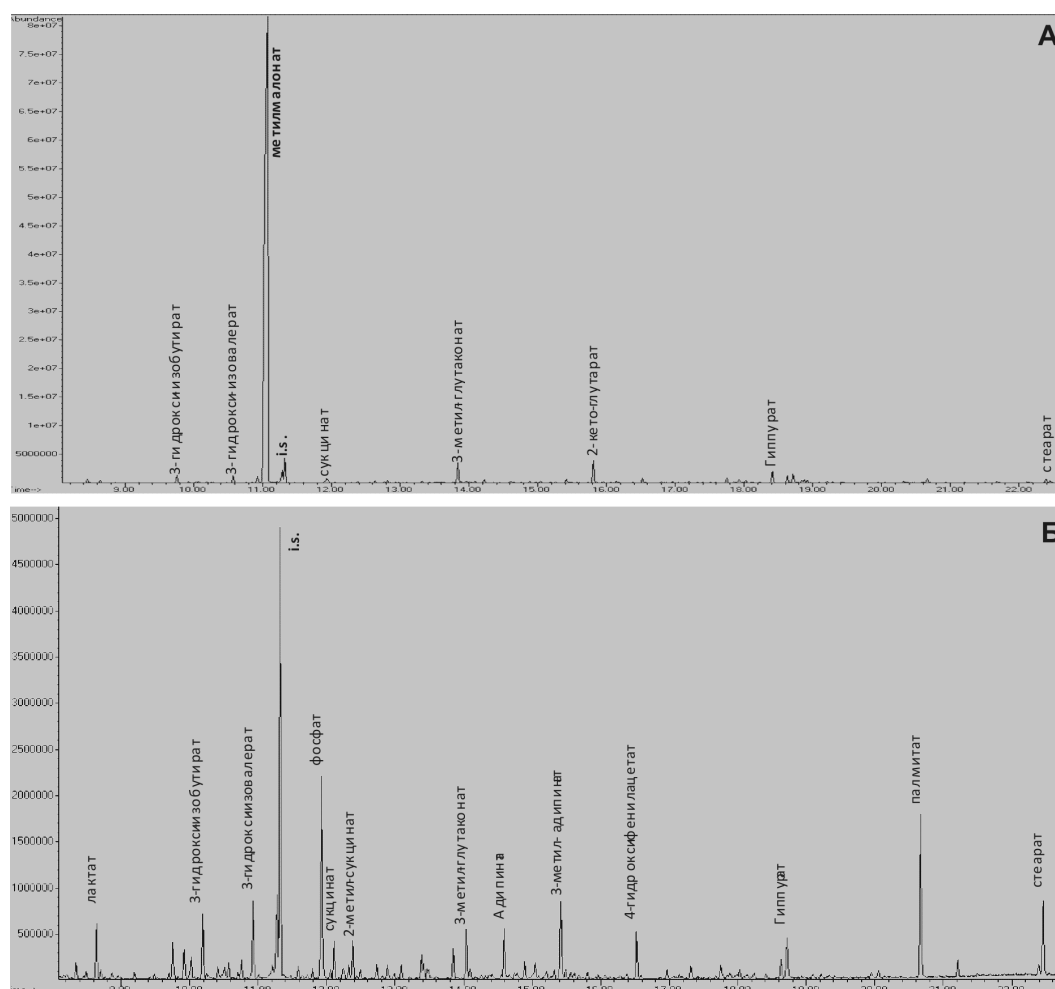


Рис. 2. Примеры хроматограмм органических кислот по полному ионному току:
А — пациент с метилмалоновой ацидурией; Б — норма.

нина, у пациента Р.И. с 1746,73 до 7,98 мМ/М креатинина, у пациента Ф.А. с 964 до 1,98 мМ/М креатинина.

Нами не было выявлено повышение уровня малоновой кислоты в моче и концентрации гомоцистеина и/или гомоцистина, что являлось основанием для подтверждения диагноза изолированной ММА.

Довольно интересно, что при скрининге, проведенном в провинции Квебек (Канада) были найдены новорожденные с умеренной экскрецией ММК. При этом у детей не наблюдалось характерных для ММА клинических проявлений [23, 24]. Авторы считают, что эта «врожденная» доброкачественная форма заболевания может проявляться в виде метаболического криза только в период действия стрессовых факторов. Несколько новорожденных, выявленных в ходе скрининга в провинции Квебек, имели комбинированную метилмалоновую малоновую ацидурию (СМАММА) и у них были выявлены мутации в гене *ACSF3*. Продукт этого гена относится к семейству ацил-КоА синтетаз и участвует в переводе метилмалоната и малоната в соответствующие тиоэфиры. Биохимической характеристикой заболевания является повышение ММК, нормальный уровень витамина В12, ацилкарнитинов и гомоцистеина. Основываясь на частоте мутаций в гене *ACSF3* в программе по анализу 1000 геномов, рассчитали частоту за-

болевания, которая составила от 1: 9,000 до 1: 92,000, и считают, что это одна из частых форм ММА [25].

Молекулярно-генетическая характеристика

Молекулярно-генетическая диагностика была проведена 18 пациентам. У 13 пациентов из 12 семей выявлены мутации в гене *MUT*: 7 из них были описаны впервые и 6 из них были описаны ранее. У 3 пациентов были найдены описанные ранее мутации в гене *MMAA*. У 2 пациентов мутаций в генах *MUT* и *MMAA* обнаружено не было.

Мутации в гене *MMAA*

Ген *MMAA*, состоит из 7 экзонов размером примерно 17,1 т.п.н., картирован на хромосоме 4q31.1-q31.2 [15]. Ген *MMAA* кодирует белок hMMAA. hMMAA существует в виде гомодимера и участвует в переносе кобаламина (Cbl) в митохондрии на финальном этапе синтеза AdoCbl [21]. Показано, что ряд мутаций нарушают взаимодействие между hMMAA и его субстратом Cbl [15]. По данным, представленным в базе HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>), в гене *MMAA* описано 20 миссенс- и нонсенс-мутаций, причем 12/20 — это нонсенс-мутации. Частые мутации в гене *MMAA* не описаны.

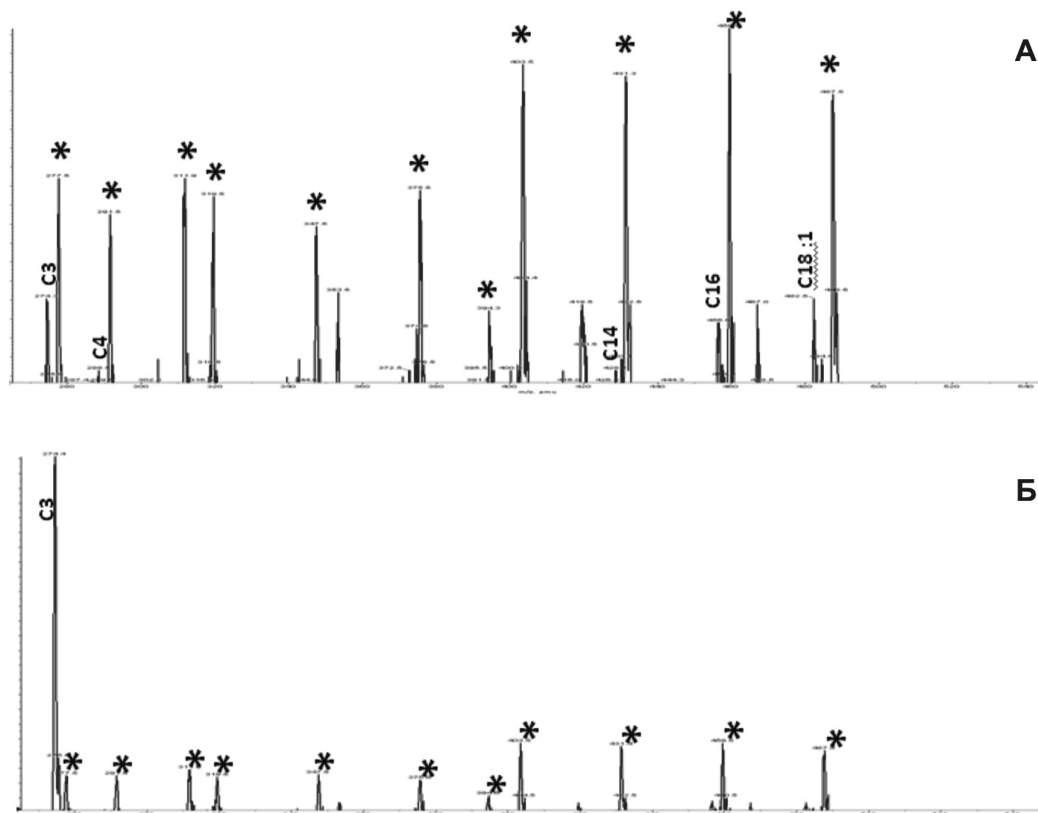


Рис. 3. Примеры хроматограмм сканирования родительских ионов:

А — контроль (звездочками отмечены внутренние стандарты); Б — пациент с метилмалоновой ацидурией (звездочками отмечены внутренние стандарты).

Для пациентов с установленной чувствительностью к витамину В12 в первую очередь был проведен анализ гена *ММАА*. У двух пациентов были выявлены три ранее описанные в литературе мутации с.592_595delACTG (p.Thr198Serfs*6), с.433C>T (p.Arg145*), с.266T>C (p.Leu89Pro). Мутация с.266T>C (p.Leu89Pro) была выявлена в гомозиготном состоянии в семье пациента Б.И., родители которого состоят в близкородственном браке. Мутация с.592_595delACTG (p.Thr198Serfs*6) приводит к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона [26]. У пациента Г.В. она была выявлена в сочетании с нонсенс мутацией с.433C>T (p.Arg145*). Такой генотип приводит к тяжелым нарушениям белка hMMAA, но его можно корректировать приемом витамина В12. У больного наблюдался выраженный ответ на прием этого препарата, уровень ММК снизился практически в 55 раз и клинические признаки болезни были скорректированы. Мутация с.266T>C (p.Leu89Pro) была описана ранее [27]. Она располагается в N-концевом удлинении белка hMMAA, который может взаимодействовать с метилмалонил-КоА мутазой, что может привести к дестабилизации белкового комплекса MMAA-MUT [15]. У пациента Р.И. данная мутация выявлена в сочетании с нонсенс мутацией с.433C>T (p.Arg145*). Такой генотип может привести к сильной дестабилизации белкового комп-

лекса MMAA-MUT. На фоне приема витамина В12 у пациента Р.И. концентрация ММК снизилась в 219 раз.

Мутации в гене *MUT*

Ген *MUT* картирован на хромосоме 6p12.3, состоит из 13 экзонов и кодирует фермент метилмалонил-КоА мутазу, катализирующую реакцию образования сукцинил-КоА из метилмалонил-КоА. Белок представляет гомодимер, который локализован в матриксе митохондрий и состоит из нескольких функциональных доменов. Первые 32 основания образуют митохондриальную таргетную последовательность, направляющую поступление белка-предшественника в митохондрии. В дальнейшем они удаляются и образуется белок из 718 аминокислот. Две готовые субъединицы образуют гомодимер. Домен димеризации (аминокислоты 33—87) участвует во взаимодействии между субъединицами; остатки 88—422 и 578—750 образуют два главных функциональных домена, соответственно субстрат- (аминокислоты 578—750) и кобаламин-связывающий домены, который объединены длинной линкерной областью (аминокислоты 423—577) [28]. Большое число мутаций в гене *MUT* являются миссенс-мутациями (54%), эффект которых довольно сложно предсказать [29, 30]. Также описаны варианты, не влияющие на функцию белка и категоризируемые как «доброкачественные варианты» с.1494G>A (p.Ala499Thr), с.1594G>A

Таблица 1

Генетическая и биохимическая характеристика выборки пациентов с ММА

Пациент	Ген/Домен	Генотип	Концентрация ММК (мМ/М креатинина)	Чувствительность к витамину В12
К.А.	ССД/КСД	p.Asn219Tyr/p.Arg727* (с.655A>T/ с.2179C>T)	7550	Нет
Л.А.	ССД/ЛД	p.Asn219Tyr/p.Arg467* (с.655A>T/ с.1399C>T)	3760	Нет
Н.А.	ССД/ЛД	p.Arg369His/ IVS9 -1G>C (с.1106G>A/с.1561-1 G>C)	9174	Нет
С.И.	ССД/ССД	p.Arg369His/p.Leu358Pro (с.1106G>A/ с.1073T>C)	5730	Нет
З.Е.	КСД/ЛД	p.Val733Valfs*6/p.Glu495* (с.2197_2200insTGCC/ с.1483G>T)	2026	Нет
А.Б.	ССД/ССД	p.Gly284Arg /p.Leu358Pro (с.850 G>A/с.1073T>C)	14807	Нет
У.И.	КСД/КСД	p.Leu674Phe/p.Leu674Phe (с.2020C>T/ с.2020C>T)	1646	Нет
Х.Б.	ССД/ССД	p.Lys223Arg/p.Lys223Arg (с.669A>G/с.669A>G)	8833	Нет
М.А.	КСД/КСД	p.Arg616Pro/p.Arg616Pro (с.1847G>C/ с.1847G>C)	5656	Нет
П. Т.	ССД/ССД	p.Asn219Tyr/p.Leu358Pro (с.655A>T /с.1073T>C)	3534	Нет
П.Е.	ССД/ССД	p.Asn219Tyr/p.Leu358Pro (с.655A>T / с.1073T>C)	20182	Нет
М..В.	ССД/ССД	p.Asn219Tyr/p.Asn219Tyr (с.655A>T/ с.655A>T)	1807	Нет
С.А.	МТП/ССД	p.Met1Thr/p.Gly284Arg (с.2 T>G/ с.850 G>A)	13500	Нет
Г.В.	Ген <i>ММАА</i>	с.592_595delACTG/p.Arg145* (p.Thr198Serfs*6 /с.433C>T)	14087	Да
Б.И.	Ген <i>ММАА</i>	p.Leu89Pro/ p.Leu89Pro (с.266T>C/ с.266T>C)	7850	Да
Р.И.	Ген <i>ММАА</i>	p.Leu89Pro/ p.Arg145* (с.266T>C/ с.433C>T)	1746,73	Да
Ф.А.	Ген <i>ММАА</i>	Мутации не обнаружены	964	Да
С.С.	Ген <i>ММАА</i>	Мутации не обнаружены	2351	Да

Примечание. Жирным шрифтом выделены мутации, обнаруженные впервые

(p.Arg532His) и c.2010A>G (p.Ile671Val) [31, 32]. Традиционно фенотипы MMA, связанные с мутациями в гене *MUT*, классифицируют на mut^0 и mut^- субтипы на основании ответа клеток на введение гидроксикобаламина и пропионата [33]. Мутации, при которых сохраняется остаточная активность фермента *MUT* и способность включать [1-14C]-пропионат в присутствии гидроксикобаламина, обозначают как mut^- , а мутации, приводящие к полному отсутствию ферментной активности без ответа на включение пропионата — mut^0 . Как правило, у пациентов с mut^0 мутациями клинические проявления гораздо более тяжелые и начинаются еще в неонатальный период. А у больных с mut^- фенотипом заболевание имеет более доброкачественное течение и сопровождается низким риском осложнений [12, 34].

В нашем исследовании у 13 пациентов было обнаружено 13 различных мутаций, в том числе 7 не описанных ранее в литературе (табл. 1). Анализ базы Exac Database (<http://exac.broadinstitute.org/>) показал, что ранее не описанные замены в гене *MUT* не были обнаружены при анализе различных популяций.

Мутации равномерно расположены по кодирующим экзонам гена (рис. 4). Мутацию p.Asn219Tyr (c.655A>T) можно отнести к категории относительно частых, она была выявлена у 5 пациентов из 4 неродственных семей и составила 23,1% от всех мутантных аллелей. Вторая по частоте мутация — p.Leu358Pro (c.1073T>C) — была найдена у 4 пациентов (15,4% мутантных аллелей). Эти результаты сходны с данными, полученными при молекулярном исследовании 40 пациентов с MMA из стран Западной Европы, согласно которым p.Asn219Tyr (c.655A>T) также является одной из частых — 19% мутантных аллелей [35]. При молекулярном исследовании

19 пациентов с MMA из стран Западной Европы мутация p.Leu358Pro (c.1073T>C) в странах Европы составила 5,3% [36].

Превалирование определенных мутаций также было описано в Испании — мутация p.Arg108Cys (c.322C>T) (60%), у афроамериканцев — мутация p.Gly717Val (c.2151G>T) (41%), в Южном и Северном Китае — p.Gly427Asp (c.1280G>A) (15,5%) и p.Asp244Leufs*39 (c.729_730insTT) (10,7%) соответственно [28].

Выявленные нами мутации локализованы во всех функциональных областях белка *MUT*: субстрат-связывающем домене (ССД) (n = 5), кобаламин-связывающем (КСД) (n = 4), междоменной линкерной области (n = 3), одна миссенс-мутация — p.Met1Thr расположена в митохондриальной таргетной последовательности (МТП).

По данным литературы, большинство mut^- патогенных вариантов локализованы в субстрат-связывающем домене и некоторые из них оказывают влияние на такие характеристики ферментативной активности, как Km и Vmax [37]. Мутации в линкерном домене приводят, как правило, к mut^0 фенотипу [35]. Мутации, располагающиеся в аминокислотах от 86 до 423, могут нарушать связывание субстрата и каталитические свойства фермента и чаще всего приводят к mut^0 фенотипу [32].

В митохондриальной таргетной последовательности ранее были описаны три мутации: c.18C>T (p.Gln7Term) [36], c.51C>T (p.Gln18Term) и c.90C>T (p.Arg31Term) [32]. Считается, что мутантный белок не проникает в митохондрии и не является функциональным. Все они относятся к mut^0 фенотипу.

Из 7 ранее не описанных мутаций было выявлено 4 миссенс-мутации, 1 нонсенс-мутация, 1 мутация сайта

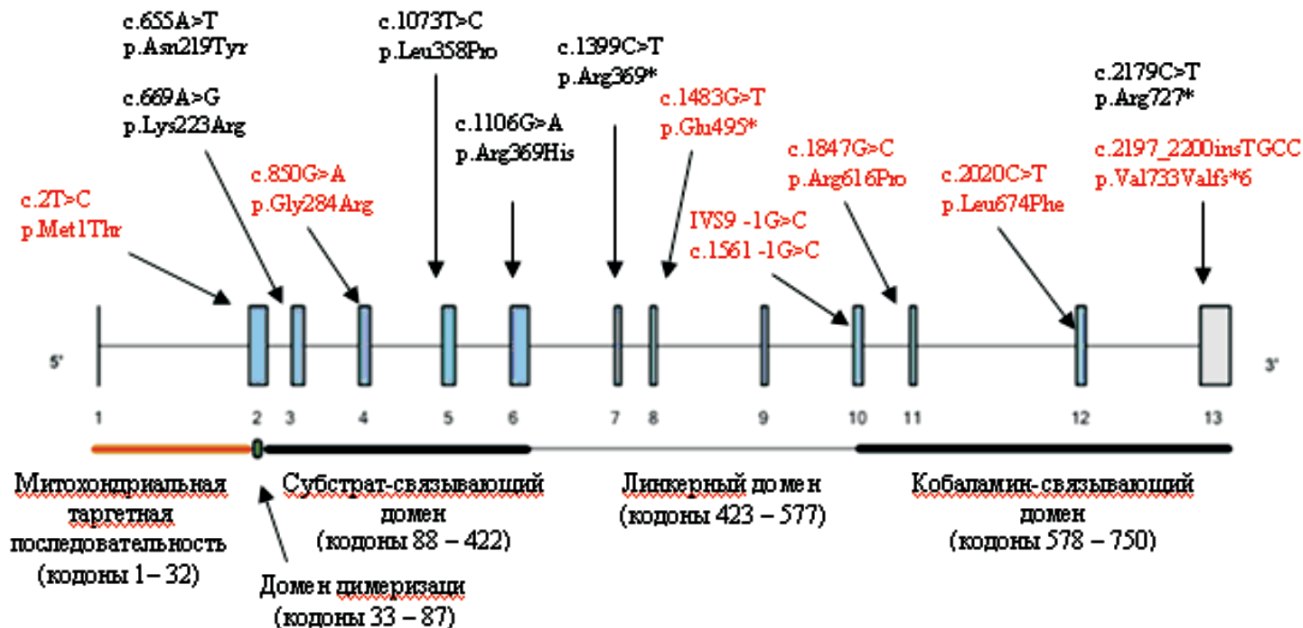


Рис. 4. Расположение мутаций в гене *MUT*.

сплайсинга, 1 инсерция. Пять из них были в компанд-гетерозиготном состоянии, две — в гомозиготном состоянии. Нонсенс-мутация p.Glu495* и инсерция со сдвигом рамки считывания c.2197_2200insTGCC (p.Val733Valfs*6), которая приводит к образованию преждевременного стоп-кодона в 739 положении, практически без сомнения являются патогенными.

Для мутации сайта сплайсинга IVS9-1G>C (c.1561-1G>C), проведен анализ с помощью программы NetGene2, который показал, что данная мутация приводит к исчезновению сайта сплайсинга. В результате чего в процессе трансляции происходит инсерция 22 нуклеотидов в интроне 9 и образование преждевременного стоп-кодона в экзоне 10.

Оценка патогенности впервые выявленных мисенс-мутаций представляет определенные трудности. Некоторые из найденных вариантов могут являться редкими полиморфизмами, оценка их патогенности по разным программам и базам данных может давать неоднозначные результаты, а проведение функциональных исследований затруднено их продолжительностью и трудоемкостью. Так, анализ с применением стандартных программ для четырех найденных мутаций показал расхождения в интерпретации патогенности мутаций для одной из них. Поэтому в данном исследовании наряду со стандартными программами оценки патогенности мутаций дополнительно был применен подход по оценке влияния мутаций на пространственную структуру белка. Оценка потенциальной патогенности аминокислотных замен, их влияние на структуру белка проводилась с помощью сервера CMBI (<http://www.cmbi.ru.nl/hope/>), с использованием программы Deep View (версия 4.1) и кристаллографической структуры человеческого белка МКМ в разрешении 1,95 Å (PDB ID: 2XIJ, ранее описанной Froese et al.) [14] (табл. 2).

Мутация p.Met1Thr

Анализ патогенности замены p.Met1Thr (c.2T>G) проводился с помощью сервера CMBI в виду ограничения данных по кристаллографической структуре человеческого белка МКМ и невозможности проведения анализа с использованием программы Deep View (версия 4.1).

Мутация p.Met1Thr (c.2T>G) является четвертой из описанных в мире, которая приводит к изменению митохондриальной таргетной последовательности и нарушает поступление белка-предшественника в митохондрию.

Также следует учитывать, что мутация p.Met1Thr (c.2T>G) располагается в инициаторном кодоне. Данная замена с высочайшей долей вероятности приводит к сбою узнавания точки начала трансляции малой субъединицей рибосомы и, как следствие этого, сдвигу инициаторного кодона и синтезированию неполноразмерного белкового продукта [38]. Следующим инициаторным кодоном может стать Met, располагающийся в кодоне 79. Таким образом, при наличии мутации p.Met1Thr (c.2T>G) возможно получение мутантного белкового продукта на 78 аминокислот короче.

Мутация p.Gly284Arg

Замена незаряженной аминокислоты Gly на большую по размерам, полярную, положительно заряженную аминокислоту Arg в 284 положении приводит к образованию новой водородной связи с Ser в положении 288. Также из-за более объемной структуры возникают конформационные изменения в белке, что может приводить к нарушению активности фермента (рис. 5).

Мутация p.Arg616Pro

Замена полярного, положительно заряженного и более разветвленного из-за боковых групп Arg на меньший по размеру и более объемный из-за гетероциклического кольца в структуре, неполярный Pro в положении 616 приводит к исчезновению водородной связи с Ala в положении 664 и к новым пространственным взаимодействиям с Pro в 615 положении (отмеченные стрелочками фиолетовые линии) (рис. 6).

Мутация p.Leu674Phe

Замена Leu на более объемную аминокислоту Phe в 674 положении приводит к новым пространственным взаимодействиям с Gly703 и аденозилкобаламином в момент ферментативной реакции при образовании комплекса аденозилкобаламина и метилмалонил-КоА

Таблица 2

In silico анализ ранее не описанных мутаций

Экзон	Изменение нуклеотидной последовательности	Обозначение по белку	Консервативность	Mutation taster	PolyPhen-2	SIFT
2	c.2 T>G	p.Met1Thr	Высокая	Патогенная	Непатогенная	Патогенная
4	c.850 G>A	p.Gly284Arg	Высокая	Патогенная	Возможно, патогенная	Патогенная
11	c.1847G>C	p.Arg616Pro	Высокая	Патогенная	Возможно, патогенная	Патогенная
12	c.2020C>T	p.Leu674Phe	Высокая	Патогенная	Возможно, патогенная	Патогенная

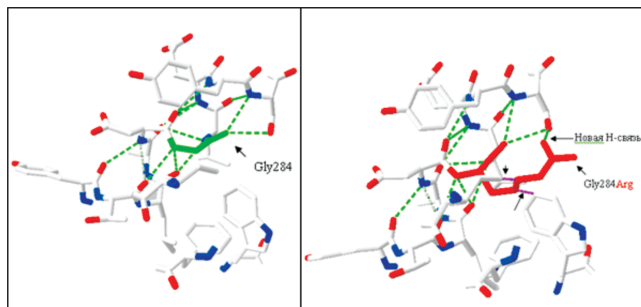


Рис. 5. Миссенс-мутация p.Gly284Arg (с.850 G>A) в гене *MUT*.

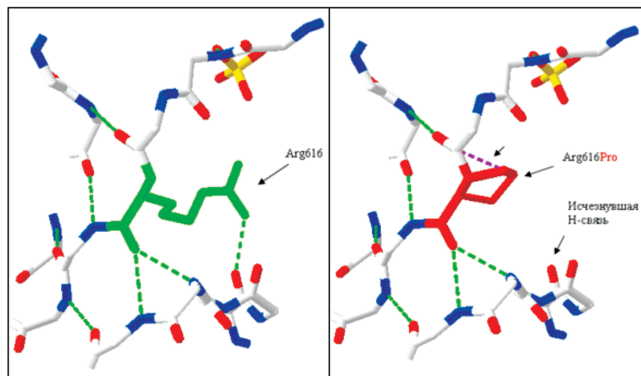


Рис. 6. Миссенс-мутация p.Arg616Pro (с.1847G>C) в гене *MUT*.

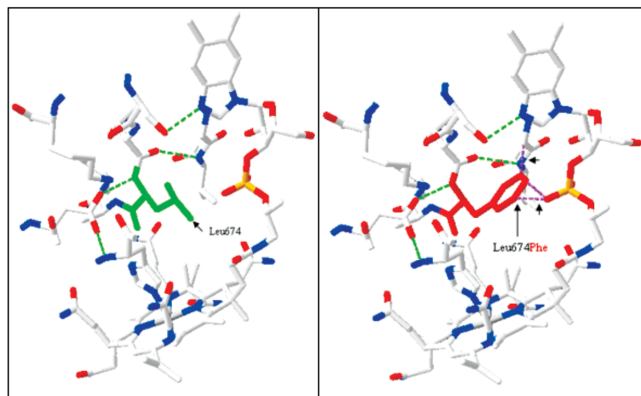


Рис. 7. Миссенс-мутация p.Leu674Phe (с.2020C>T) в гене *MUT*.

мутады (отмеченные стрелочками фиолетовые линии) (рис. 7).

На основании проведенного анализа *in silico*, а также того факта, что данные замены не выявлены в базе данных Exac Database (<http://exac.broadinstitute.org/>) по оценке частоты распространенности замен в популяции, они могут с высокой вероятностью быть признаны патогенными.

Заключение

В работе для 18 из 31 пациента с изолированной MMA проведена ДНК-диагностика. Показано, что мутация p.Asn219Tyr (с.655A>T) в гене *MUT* в нашей выборке является наиболее частой и составляет 23,1% от всех выявленных мутантных аллелей, что согласуется с данными литературы. У 3 пациентов выявлены описанные ранее мутации в гене *MMAA*, что позволило подтвердить В12-чувствительную форму MMA. У 2 пациентов мутаций обнаружено не было.

Молекулярно-генетическая диагностика MMA осложняется генетической гетерогенностью данного заболевания, при этом знание о точной молекулярной природе является важной с точки зрения назначения лечения и прогноза заболевания. Разработка генодиагностики MMA на базе технологий секвенирования нового поколения (NGS) безусловно, является одним из перспективных подходов к диагностике этого и других гетерогенных заболеваний [39].

В работе выявлено 7 ранее не описанных замен в гене *MUT*. В нашем исследовании были применены для функциональной оценки различные программы. Наряду со стандартными программами оценки патогенности мутаций (MutationTaster, PolyPhen2, SIFT) был применен подход по оценке влияния мутаций на пространственную структуру белка с помощью программы DeepView. Анализ не описанных ранее замен показал, что они приводят к нарушению структуры метилмалонил-КоА мутады.

Комбинация биохимической и ДНК-диагностики важна для определения формы MMA, выбора дальнейшей тактики лечения и медико-генетического консультирования семьи.

Список литературы

1. Mello DM, da Silva V, Rosas F. Serum biochemical analytes in captive Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*). *Vet Clin Pathol*. 2011; 40 (1): 74-77.
2. Tanpaiboon P. Methylmalonic academia. *Mol Genet Metab*. 2005; 85 (1): 2-6.
3. Manoli I, Sloan JL, Venditti CP. Isolated Methylmalonic Acidemia. Seattle (WA): University of Washington, Seattle: GeneReviews®[Internet]. 1993-2016.

4. Hung-Chun Yu, Jennifer L. Sloan, Gunter Scharer, et al. An X-Linked Cobalamin Disorder Caused by Mutations in Transcriptional Coregulator HCFC1. *The American Journal of Human Genetics*. 2013; 93: 506-514.
5. Baumgartner MR, Horster F, Dionisi-Vici C, et al. Proposed guidelines for the diagnosis and management of methylmalonic and propionic academia. *Orphanet J Rare Dis*. 2014; 2: 9-130.
6. Coulombe JT, Shih VE, Levy HL. Massachusetts Metabolic Disorders Screening Program. II. Methylmalonic aciduria. *Pediatrics*. 1981; 67 (1): 26-31.
7. Deodato F1, Boenzi S, Santorelli FM et al. Methylmalonic and propionic aciduria. *Am J Med Genet*. 2008; 142 (C2): 104-112.
8. Coelho D, Suormala T, Stucki M, Lerner-Ellis J et al. Gene identification for the cblD defect of vitamin B12 metabolism. *N Engl J Med*. 2008; 358: 1454-1464.
9. Coelho D, Kim JC, Miousse IR et al. Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat Genet*. 2012; 44: 1152-1155.
10. Николаева ЕА, Боровик ТЭ, Бушуева ТВ и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению метилмалоновой ацидемии. Москва: Министерство здравоохранения. 2013; 23 с.
11. Левиашвили ЖГ, Савенкова НД, Смирнова ММ и др. Метилмалоновая ацидемия у sibсов. *Нефрология*. 2013; 17 (3): 93-98.
12. Полякова СИ, Рославцева ЕА, Тепаев РФ и др. Протокол лечения острого метаболитического криза при метилмалоновой ацидемии. *Педиатрическая фармакология*. 2014; 11 (4): 116-119.
13. Байдакова Г.В. Алгоритмы дифференциальной диагностики наследственных болезней обмена веществ, сопровождающихся нарушениями метаболизма аминокислот и ацилкарнитинов: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.б.н. Москва. 2012; 24 с.
14. Lefevre MF, Verhaeghe BJ, Declerck DH et al. Metabolic Profiling of Urinary Organic Acids by Single and Multicolumn Capillary Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 1989; 27 (1): 23-29.
15. Froese DS, Kochan G, Muniz JR et al. Structures of the human GTPase MMAA and vitamin B12-dependent methylmalonyl-CoA mutase and insight into their complex formation. *J Biol Chem*. 2010; 285: 38204-13.
16. Fowler B, Leonard JV, Baumgartner MR. Causes of and diagnostic approach to methylmalonic acidurias. *J Inherit Metab Dis*. 2008; 31: 350-360.
17. Horster F, Garbade SF, Zwicker T et al. Prediction of outcome in isolated methylmalonic acidurias: combined use of clinical and biochemical parameters. *J Inherit Metab Dis*. 2009; 32 (6): 762-763.
18. Chace DH, DiPerna JC, Kalas TA et al. Rapid diagnosis of methylmalonic and propionic acidemias: quantitative tandem mass-spectrometric analysis of propionylcarnitine in filter-paper blood specimens obtained from newborns. *Clin Chem*. 2001; 47 (11): 2040-44.
19. Marble M, Copeland S, Khanfar N et al. Neonatal vitamin B12 deficiency secondary to maternal subclinical pernicious anemia: identification by expanded newborn screening. *J Pediatr*. 2008; 152 (5): 731-733.
20. Grange DK, Finlay JL. Nutritional vitamin B12 deficiency in a breastfed infant following maternal gastric bypass. *Pediatr Hematol Oncol*. 1994; 11 (3): 311-318.
21. Celiker MY, Chawla A. Congenital B12 deficiency following maternal gastric bypass. *J Perinatol*. 2009; 29 (9): 640-642.
22. Kruszka PS, Manoli I, Sloan JL et al. Renal growth in isolated methylmalonic acidemia. *Genet Med*. 2013; 15 (12): 990-996.
23. Ledley FD, Levy HL, Shih VE et al. Benign methylmalonic aciduria. *N Engl J Med*. 1984; 311 (16): 1015-18.
24. Sniderman LC, Lambert M, Giguere R et al. Outcome of individuals with low-moderate methylmalonic aciduria detected through a neonatal screening program. *J Pediatr*. 1999; 134 (6): 675-680.
25. Sloan JL, Johnston JJ, Manoli I et al. Exome sequencing identifies ACSF3 as a cause of combined malonic and methylmalonic aciduria. *Nat Genet*. 2011; 43 (9): 883-886.
26. Dobson CM, Wai T, Leclerc D et al. Identification of the gene responsible for the cblB complementation group of vitamin B12-dependent methylmalonic aciduria. *Hum Mol Genet*. 2002; 11 (26): 3361-69.
27. Lerner-Ellis JP, Dobson CM, Wai T et al. Mutations in the MMAA gene in patients with the cblA disorder of vitamin B12 metabolism. *Hum Mutat*. 2004; 24 (6): 509-516.
28. Liu MY1, Liu TT, Yang YL et al. Mutation Profile of the MUT Gene in Chinese Methylmalonic Aciduria Patients. *JIMD Rep*. 2012; 6: 55-64.
29. Froese DS, Kochan G, Muniz JR et al. Structures of the human GTPase MMAA and vitamin B12-dependent methylmalonyl-CoA mutase and insight into their complex formation. *J Biol Chem*. 2010; 85 (49): 38204-13.
30. Forny P, Froese DS, Suormala T et al. Functional characterization and categorization of missense mutations that cause methylmalonyl-CoA mutase (MUT) deficiency. *Hum Mutat*. 2014; 35 (12): 1449-58.
31. Ledley FD, Rosenblatt DS. Mutations in methylmalonic acidemia: clinical and enzymatic correlations. *Hum Mutat*. 1997; 9 (1): 1-6.
32. Worgan LC, Niles K, Tirone JC et al. Spectrum of mutations in mut methylmalonic acidemia and identification of a common Hispanic mutation and haplotype. *Hum Mutat*. 2006; 27 (1): 31-43.
33. Lempp TJ, Suormala T, Siegenthaler R et al. Mutation and biochemical analysis of 19 probands with mut0 and 13 with mut-methylmalonic aciduria: identification of seven novel mutations. *Mol Genet Metab*. 2007; 90 (3): 284-90.
34. Horster F, Baumgartner MR, Viardot C et al. Long-term outcome in methylmalonic acidurias is influenced by the underlying defect (mut0, mut-, cblA, cblB). *Pediatr Res*. 2007; 62 (2): 225-30.
35. Acquaviva C, Benoist JF, Pereira S et al. Molecular basis of methylmalonyl-CoA mutase apoenzyme defect in 40 European patients affected by mut0 and mut- forms of methylmalonic acidemia: identification of 29 novel mutations in the MUT gene. *Hum Mutat*. 2005; 25 (2): 167-176.
36. Merinero B, Perez B, Perez-Cerda C et al. Methylmalonic acidemia: examination of genotype and biochemical data in 32 patients belonging to mut, cblA or cblB complementation group. *J Inherit Metab Dis*. 2008; 31 (1): 55-66.
37. Janata J, Kogekar N, Fenton WA. Expression and kinetic characterization of methylmalonyl-CoA mutase from patients with the mut- phenotype: evidence for naturally occurring interallelic complementation. *Hum Mol Genet*. 1997; 6 (9): 1457-64.
38. Jeremy P.Cheadle, Elena Belloni, Maurizio Ferrari et al. A novel mutation (M1V) in the translation initiation codon of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, in three CF chromosomes of Italian origin. *Human Molecular Genetics*. 1994; 3 (8): 1431-1432.
39. Смирнов АМ, Зайцева МА, Павлов АЕ. Перспективы применения метода NGS в клинической практике скрининга новорожденных. *Журнал «Российский вестник перинатологии и педиатрии»*. 2013;58 (2): 12-17.

Molecular and biochemical characteristics of the isolated methylmalonic aciduria in Russian patients

Kurkina M.V., Baydakova G.V., Zakharova E.Y.

FSBI «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, Russian Federation; e-mail: labnbo@yandex.ru

Methylmalonic aciduria (MMA) — genetically heterogeneous group of hereditary diseases, which characterized by increase of methylmalonic acid (MA) in biological fluids. Biochemically MMA is divided into two groups: isolated and combined. The first one includes diseases associated with mutations in the genes of methylmalonyl-CoA mutase, methylmalonyl-CoA epimerase and diseases caused by disturbance of vitamin B12 metabolism. The second one includes combined MMA with homocysteinemia/homocystinuria caused by mutations in several genes involved in mitochondrial biogenesis. Early diagnosis of the disease is extremely important, since developed approaches to diet therapy of MMA, and the using of hydroxocobalamin for B12-responsive forms allows virtually neutralize all the clinical manifestations of the disease. One of the difficulties of DNA diagnostics is verification of variants in the genes, which pathogenicity is not clear enough. In this research, we studied a biochemical phenotype analysis of 31 patients with isolated MMA. DNA diagnostics was carried out in 18 patients. Mutations in the *MUT* gene were found in 13 patients. Mutations in the *MMAA* gene were found in 3 patients. In 2 patients mutations were not found in the *MMAA* gene. It is planned to study *MMAB* gene. At first time in our research were found mutations in the *MUT* gene which were analyzed with programs for the prediction of pathogenicity.

Key words: methylmalonic acidemia, biochemistry, genetic testing, software for prediction pathogenicity of unknown substitutions