ДНК-диагностика X-сцепленной хронической гранулематозной болезни

Сермягина И.Г., Забненкова В.В., Шагина О.А., Поляков А.В.

ФГБНУ Медико-генетический научный центр,
115478, Россия, Москва, ул. Москворечье, д. 1

Хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ) – наследственное заболевание, относящееся к группе первичных иммунодефицитов с нарушением функции фагоцитоза. Наиболее частой является X-сцепленная форма ХГБ, которая развивается в результате молекулярного дефекта, возникающего в гене *CYBB*. В статье представлены результаты молекулярной диагностики X-сцепленной ХГБ у пациентов из разных регионов России в лаборатории ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра.

Ключевые слова: хроническая гранулематозная болезнь, ДНК-диагностика, ген *CYBB*.

Для цитирования: Сермягина И.Г., Забненкова В.В., Шагина О.А., Поляков А.В. ДНК-диагностика X-сцепленной хронической гранулематозной болезни. *Медицинская генетика* 2019; 18(4):47-51

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.04.47-51

Автор для корреспонденции: Сермягина Ирина Геннадьевна; **e-mail:** sirina74@mail.ru.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 27.12.2018

DNA-diagnosis of X-linked chronic granulomatous disease

Sermyagina I.G., Zabnenkova V.V., Schagina O.A., Polyakov A.V.

Research Centre for Medical Genetics,
115478, Russia, Moscow, Moscvorechie str.,1

Chronic granulomatous disease (CGD) is a hereditary disease belonging to the group of primary immunodeficiencies with impaired phagocytosis function. The most frequent is the X-linked form of CGB, which develops as a result of a molecular defect arising in the *CYBB* gene. The article presents the results accumulated in the Laboratory of DNA Diagnostics of the Medical Genetic Research Center during the molecular diagnosis of X-linked CGD in patients from different regions of Russia.

Key words: Chronic granulomatous disease, X-CGD, *CYBB* gene.

For citation: Sermyagina I.G., Zabnenkova V.V., Schagina O.A., Polyakov A.V. DNA-diagnosis of X-linked chronic granulomatous disease. *Medicinskaya genetika* [Medical genetics] 2019; 18(2): 47-51 (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2019.04. 47-51

Corresponding author. Sermyagina Irina; **e-mail:** sirina74@rambler.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

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

Accepted: 27.12.2018

Хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ) – генетически гетерогенная группа первичных иммунодефицитов, связанных с нарушением бактерицидной функции фагоцитов в результате различных дефектов фермента NADPH-оксидазы. Пациенты с ХГБ восприимчивы к инфекциям, вызываемым бактериями и грибами, для уничтожения которых необходимы активные метаболиты кислорода, которые синтезируются при помощи NADPH-оксидазы.

Заболевание, как правило, проявляется в виде рецидивирующих инфекций, поражающих органы дыхания, кожу, лимфатические узлы, печень, почки [1].

В состав фермента NADPH-оксидазы входят мембранные и цитоплазматические субъединицы, которые образуют активный комплекс в клеточной мембране. Частицы gp91phox и p22phox входят в состав цитохрома b558 и относятся к мембранным белкам. Цитоплазматические белки p47phox и p67phox соединяются с цитохромом b558 после активации фагоцита, образуя NADPH-оксидазу, катализирующую реакцию восстановления молекулярного кислорода до супероксидного радикала, который позже превращается в перекись водорода или другие токсичные формы кислорода [2].

Миграционная активность клеток при ХГБ, как правило, не изменяется, тогда как бактерицидная функция фагоцитов нарушена. Поглощённые патогенные микроорганизмы не разрушаются в фаголизосомах под действием активных метаболитов кислорода, а остаются жизнеспособными и активно размножаются. Это приводит к тяжелым повторным бактериальным и грибковым инфекциям. Из-за низкой концентрации кислородных метаболитов образующийся в повреждённой ткани гнойный экссудат не обладает выраженными литическими свойствами. Вследствие этого при ХГБ вместо обширного гнойного воспаления часто возникают множественные абсцессы и микроабсцессы. Это состояние также связано с повышенным скоплением иммунных клеток с образованием гранул в местах инфекции и очагах воспаления. Бронхолегочные инфекционные осложнения являются типичными для пациентов ХГБ. Самым тяжелым, жизнеугрожающим инфекционным осложнением является аспергиллез, который может протекать в виде диффузного поражения легких и других органов (жировой клетчатки, головного мозга, костей, суставов, эндокарда). Особенностью течения является разнообразие его клинических проявлений и молниеносное развитие симптоматики. Летальность при поздней диагностике инвазивного легочного аспергиллеза достигает 90% [3,6].

Заболеваемость различными формами ХГБ колеблется от 1:1 000 000 до 1:250 000 населения (1 на 200 000—250 000 живых новорождённых). Первые признаки ХГБ обычно проявляются в раннем детстве, но у некоторых пациентов заболевание может возникать позже, в ран-

нем подростковом возрасте. Заболевание с равной частотой встречается у представителей всех этнических групп [1, 3].

К ХГБ приводят разнообразные молекулярные дефекты (большие и малые делеции, инсерции, а также мутации сайта сплайсинга, миссенс- или нонсенс-мутации), возникающие в четырех генах, кодирующих компоненты NADPH-оксидазы. Известно два типа наследования данного первичного иммунодефицита. Наиболее частая X-сцепленная форма ХГБ (более 60% случаев ХГБ) связана с молекулярным дефектом в гене *CYBB*, кодирующем субъединицу gp91phox. Остальные случаи — это аутосомно-рецессивные формы, обусловленные мутациями в генах *NCF1*, *NCF2* и *CYBA*, кодирующих белки p47phox, p67phox или p22phox, соответственно (рис. 1) [4, 7].

Ген *CYBB*, кодирующий субъединицу gp91phox (NOX2), состоящую из 570 аминокислот, локализован в регионе Xp21.1-p11.4 и состоит из 13 экзонов. Согласно литературным данным, мутации зарегистрированы на всем протяжении гена. Наиболее распространенными причинами возникновения X-сцепленной формы ХГБ являются молекулярные нарушения, приводящие к укорочению белка или к полному его отсутствию. В базе мутаций человека HGMD наибольшее количество описанных молекулярных дефектов приходится на долю миссенс-, нонсенс-мутаций, различных делеций и мутаций сайта сплайсинга [5, 8, 9].

Данная работа посвящена анализу результатов ДНК-диагностики наиболее частой X-сцепленной формы ХГБ, которая проводится в лаборатории ДНК-диагностики Медико-генетического научного центра с 2005 года. Целью исследования является обобщение данных, полученных в результате поиска молекулярной причины возникновения X-сцепленной ХГБ у пациентов из разных регионов России.

Материалы и методы исследования.

На основании клинических данных и семейного анамнеза собраны и проанализированы образцы ДНК от 70 неродственных пробандов мужского пола с клиническим диагнозом *X-сцепленная хроническая гранулематозная болезнь*. На генетическое исследование направлялись больные из профильных медицинских учреждений различных российских регионов. Возраст обследуемых пробандов на момент проведения молекулярно-генетического анализа варьировал от 1 года до 25 лет. Во многих случаях при выявлении у пациента мутации в гене *CYBB* по инициативе родителей были исследованы образцы ДНК членов семьи.

Рис. 1. Структура NADPH-оксидазы. Гены и типы наследования ХГБ [4].

Образцы геномной ДНК получены из венозной крови пациентов с использованием наборов для выделения WizardGenomic DNA PurificationKit (PromegaCorporation, WI, USA) и DIAtom™ DNA Prep 200, согласно протоколам фирм-производителей. Для поиска мутаций в гене *CYBB* использованы пары праймеров, выбранные в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» и синтезированные в НПФ «Литех». Тринадцать амплифицируемых фрагментов включают в себя нуклеотидную последовательность и прилегающие интронные участки с 1 по 13 экзонов гена *CYBB*, а также участок промоторной области. Амплификация необходимых фрагментов ДНК проводилась методом полимеразной цепной реакции на программируемом термоциклере МС2 фирмы «ДНК-технология» (Россия). Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов ДНК осуществлялось по методу Сэнгера с использованием набора для секвенирования и протокола фирмы производителя на приборе ABIPrism 3100 (AppliedBiosystems).

Результаты и обсуждение

В результате исследования всей кодирующей последовательности и прилежащих интронных областей гена *CYBB* причину заболевания удалось установить у 49 пациентов, что составляет 70% от общего числа обследованных неродственных пробандов. Всего выявлено 43 патогенных варианта, из них 11 описаны впервые. Спектр выявленных мутаций представлен в **таблице**.

Как видно из **таблицы**, мутации распределены почти равномерно на всем протяжении гена *CYBB*. Распределение мутаций по типам, в основном, соответствует литературным данным и базам мутаций [10]. На долю малых делеций и нонсенс-мутаций в нашем исследовании приходится по 27%, мутации сайтов сплайсинга выявлены в 15% случаев, что в сумме составляет большинство зарегистрированных патогенных вариантов (**рис. 2**).

Протяженные делеции, затрагивающие один и более экзонов, возникают в гене *CYBB* довольно часто,

Рис. 2. Спектры выявленных в гене *CYBB* мутаций по данным настоящего исследования и HGMD. Молекулярные дефекты распределены по типам, с указанием их количества и доли от общего числа зарегистрированных мутаций в гене *CYBB*.

Мутации в гене *CYBB*, выявленные в выборке больных X-сцепленной ХГБ из разных регионов России

Ген <i>CYBB</i>		Белок	Число пробандов	Источник описания мутации (HGMD/данное исследование)
экзон/интрон	мутация			
1	c.27delG	p.Gly9fs*11	1	CD105650
2	c.80_83delTCTG	p.Val27fs*33	1	CD015973
2	c.110delC	p.Pro37Leufs*31	1	данное исследование
2	c.137T>C	p.Leu46Pro	1	данное исследование
интрон 2	c.141+1G>C		1	данное исследование
интрон 2	c.142-2A>G		1	CS982142
3	c.177C>A	p.Cys59*	1	CM105675
3	c.217C>T	p.Arg73*	1	CM910097
3	c.226delC	p.Leu76CysfsX30	2	CD105679
4	c.271C>T	p.Arg91*	1	CM960436
5	c.374G>A	p.Trp125*	1	CM105702
5	c.388C>T	p.Arg130*	2	CM960439
5	c.470delG	p.Arg157Glnfs*3	1	данное исследование
6	c.565_568delATTA	p.Ile189fs*24	1	CD015961
6	c.671C>G	p.Ala224Gly	1	CM001658
7	c.676C>T	p.Arg226*	4	CM940324
7	c.703_704delAG	p.Ser235fs*5	1	CD961946
8	c.838dupT	p.Tyr280Leufs*3	1	данное исследование
8	c.868C>T	p.Arg290*	2	CM960447
интрон 8	c.898-1G>A		1	CS105823
9	c.925G>A	p.Glu309Lys	1	CM960449
9	c.935T>G	p.Met312Arg	1	CM960450
9	c.1019_1020insAGGCACCCTTT	p.Phe339Leufs*6	1	данное исследование
9	c.1063_1070delATCCGCAT	p.Ile355Argfs*15	1	CD106207
9	c.1106delG	p.Cys369Leufs*17	1	данное исследование
9	c.1140G>A	p.Trp380*	1	CM106227
10	c.1165delG	p.Gly389fs*14	1	данное исследование
10	c.1169C>T	p.Pro390Leu	1	CM960459
10	c.1199_1202delGCTAinsTCTTACCAC	p.Phe399_Glu402delinsIlePheHisHis	1	данное исследование
10	c.1272delG	p.Trp424Cysfs*11	1	CD982576
интрон 11	c.1461+1G>A		1	CS011980
интрон 11	c.1462-1G>C		1	данное исследование
интрон 11	c.1462-1G>A		1	CS015948
12	c.1523delA	p.Lys508fs*25	1	CD015962
12	c.1524_1527delGACT	p.Lys508fs*24	1	CD106284
интрон 12	c.1586+2T>G		1	данное исследование
13	c.1662dupT	p.Glu555*	1	CI012026
Протяженные делеции одного и более экзонов				
4-6	делеция 4,5,6 эк		1	CG106835
6	делеция 6 эк		1	CG171353
1-13	делеция всего гена <i>CYBB</i>		4	CG962839

что подтверждается литературными данными. При обследовании изучаемой выборки больных Х-сцепленной ХГБ обширные делеции выявлялись в 12% случаев. В двух случаях зарегистрировано отсутствие части гена *CYBB*: 6-го экзона и экзонов 4,5,6. У четырех пациентов была обнаружена делеция всех экзонов гена *CYBB*. Оценить протяженность, а также клинический эффект этих мутаций не представляется возможным, так как границы делеций пока не определены. По данным HGMD среди протяженных делеций преобладают молекулярные дефекты, включающие часть гена [12].

При ДНК-диагностике Х-сцепленной ХГБ встречались патогенные варианты, которые выявлялись неоднократно. Дважды были найдены делеция с.226delC в экзоне 3, нонсенс-мутация с.388C>T в экзоне 5 и одонуклеотидная замена с.868C>T в экзоне 8. Нонсенс-мутация с.676C>T в экзоне 7 зарегистрирована у четырех неродственных пробандов.

Патогенные варианты, не зарегистрированные в базах мутаций человека HGMD и *CYBB*-base, а также не описанные в научной литературе, были выявлены у 11 пациентов [11,12]. Среди впервые найденных молекулярных дефектов чаще встречались делеции и мутации сплайсинга. Ранее были описаны замены нуклеотидов в тех же положениях, что и выявленные нами с.141+1G>C интроне 2 и с.1462-1G>C в интроне 11, однако это были замены на другие нуклеотиды. В случае с.1586+2T>G в интроне 12 ранее были известны патологические дефекты только в соседних нуклеотидах (+1, +3). Единственная выявленная нами делеция-инсерция в экзоне 10 гена *CYBB* с.1199_1202delGCTAins TCTTCACCAC также ранее не была описана в литературе.

У пациентов без молекулярных дефектов в гене *CYBB* (30%) поиск мутаций в генах редких аутосомно-рецессивных форм ХГБ *NCF1*, *NCF2* и *CYBA* не проводился. Возможно, у части этих больных могут быть выявлены одна из редких форм ХГБ или другие заболевания иммунной системы.

Нами было проведено обследование 28 матерей пробандов и их родственников на носительство мутаций Х-сцепленной ХГБ. В одной семье в образце ДНК, выделенном из периферической крови матери пробан-

да с установленной мутацией в гене *CYBB*, мутация не была найдена. Можно предположить, что у больного ребенка в этой семье мутация возникла *de novo*, однако нельзя исключить наличие герминального (гонадного) мозаицизма у матери.

Из девяти выполненных пренатальных диагностик в трех случаях у плода мутация не была выявлена (1 мальчик, 2 девочки), дважды было установлено гетерозиготное носительство мутации и в трех случаях зарегистрирована мутация гена *CYBB* в гемизиготном состоянии.

Таким образом, в лаборатории ДНК-диагностики ФГБНУ «МГНЦ» накоплен большой опыт поиска мутаций в гене *CYBB* у больных с Х-сцепленной ХГБ, что позволяет проводить эффективную и точную молекулярную диагностику данного заболевания.

Список литературы/ References

1. Rae J., et al. X-Linked Chronic Granulomatous Disease: Mutations in the *CYBB* Gene Encoding the gp91-Phox Component of Respiratory-Burst Oxidase. *American Journal of Human Genetics*. 1998;62.6:1320–1331.
2. Segal R.A., Tienenauer L., Matsunaga T., et al. Chronic granulomatous disease due to granulocytes with abnormal NADPH oxidase activity and deficient cytochrome-b. *Blood*. 1983; 61:423–428.
3. Marciano B.E., Spalding C., Fitzgerald A., et al. Common severe infections in chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis*. 2015 Apr 15; 60 (8): 1176–83
4. Stasia M.J., et al. Characterization of six novel mutations in the *CYBB* gene leading to different sub-types of X-linked chronic granulomatous disease. *Hum Genet*. 2005.
5. Roos D., et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis*. 2010.
6. Agarwal S. Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Diagn Res*. 2015 May; 9 (5): SD01–2.
7. Van den Berg J.M., van Koppen E., Ahlin A., et al. Chronic Granulomatous Disease: The European Experience. Alsbaugh A, ed. *PLoS ONE*. 2009;4(4):e5234.
8. Segal B.H., Leto T.L., Gallin J.I., et al. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. May 2000; 79 (3): 170–200.
9. Roos D. X-CGDbase: a database of X-CGD-causing mutations. *Immunol Today*. 1996; 17:517–521 Medline
10. Hilkka Piirilä et al. Immunodeficiency information services. *Central European Journal of Immunology* 2005; 30(3–4)
11. *Cybb*-base.: <http://www.uta.fi/imt/bioinfo/CYBBbase/>
12. HGMD database.: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/search.php>