

Анализ спектра мутаций в генах COL1A1 и COL1A2 с использованием массового параллельного секвенирования у больных несовершенным остеогенезом в Томской области

Скрябин Н.А., Васильева О.Ю., Сивцев А.А., Жалсанова И.Ж., Постригань А.Е., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Назаренко Л.П., Сеитова Г.Н., Беляева Е. О., Филимонова М.Н., Степанов В.А.

Научно-исследовательский институт медицинской генетики, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН», Томск, Россия

Проведен поиск мутаций в генах COL1A1 и COL1A2 с использованием массового параллельного секвенирования у 16 больных из 10 семей с несовершенным остеогенезом I, III и IV типов. Для анализа мутаций в данных генах была разработана панель праймеров для секвенирования полной последовательности генов. В результате проведенной работы выявлено 10 мутаций: шесть из них расположены в гене COL1A1, четыре мутации – в гене COL1A2. Все мутации, кроме одной, были ранее описаны в литературе и встречались у пациентов с различными типами несовершенного остеогенеза. В пяти семьях были выявлены миссенс-мутации, в двух семьях – нонсенс мутации, еще в двух случаях – мутации в сайтах сплайсинга и у одного пациента – мутация со сдвигом рамки считывания. Во всех семьях были найдены уникальные мутации, не повторяющиеся у неродственных пациентов. Выявленная высокая гетерогенность спектра мутаций в генах COL1A1 и COL1A2 при несовершенном остеогенезе указывает на эффективность использования методов, основанных на технологии массового параллельного секвенирования для диагностики данной патологии.

Ключевые слова: несовершенный остеогенез, массовое параллельное секвенирование (МПС), ген COL1A1, ген COL1A2.

Для цитирования: Скрябин Н.А., Васильева О.Ю., Сивцев А.А., Жалсанова И.Ж., Постригань А.Е., Минайчева Л.И., Агафонова А.А., Петрова В.В., Назаренко Л.П., Сеитова Г.Н., Беляева Е. О., Филимонова М.Н., Степанов В.А. Анализ спектра мутаций в генах COL1A1 и COL1A2 с использованием массового параллельного секвенирования у больных несовершенным остеогенезом в Томской области. *Медицинская генетика* 2020; 19(1): 38-45.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.01.38-45

Автор для корреспонденции: Скрябин Николай Алексеевич, e-mail: nikolay.skryabin@medgenetics.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания на фундаментальные научные исследования НИИ медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по теме «Персонализированное геномное профилирование при орфанных заболеваниях человека» (№ АААА-А19-119090990020-0)

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 15.01.2020.

Analysis of mutation spectrum of COL1A1 and COL1A2 genes using massively parallel sequencing in patients with osteogenesis imperfecta in the Tomsk region

Skryabin N.A., Vasilyeva O.Yu., Sivtsev A.A., Zhalsanova I.Zh., Postrigan A.E., Minaicheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Nazarenko L.P., Seitova G.N., Belyaeva E.O., Filimonova M.N., Stepanov V.A.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Science
Tomsk, Russia

Using massively parallel sequencing, the COL1A1 and COL1A2 genes were analyzed in 16 patients from 10 families with osteogenesis imperfecta types I, III, and IV. To analyze the mutations in these genes, a panel of primers was developed for sequencing the complete gene sequence. As a result of the work, 10 mutations were revealed: six of them are in the COL1A1 gene, four mutations – in the COL1A2 gene. All mutations, except one, were previously described in the literature and were found in patients with various types of osteogenesis imperfecta. Missense mutations were identified in five families, nonsense mutations in two families, splice site mutations in two cases, and a frameshift mutation in one patient. Unique mutations that were not repeated in unrelated patients were found in all families. The revealed high heterogeneity of the spectrum of mutations in the COL1A1 and COL1A2 genes in osteogenesis imperfecta indicates the effectiveness of using MPS-based methods for the diagnosis of this pathology.

Key words: osteogenesis imperfecta, massively parallel sequencing, COL1A1 gene, COL1A2 gene.

For citation: Skryabin N.A., Vasilyeva O.Yu., Sivtsev A.A., Zhalsanova I.Zh., Postrigan A.E., Minaicheva L.I., Agafonova A.A., Petrova V.V., Nazarenko L.P., Seitova G.N., Belyaeva E.O., Filimonova M.N., Stepanov V.A. Analysis of mutation spectrum of COL1A1 and COL1A2 genes using massively parallel sequencing in patients with osteogenesis imperfecta in the Tomsk region. *Medical genetics*. 2020; 19(1): 38-45 (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.01.38-45

Corresponding author: Skryabin Nikolay, e-mail: skryabin@medgenetics.ru

Funding. The study was carried out as part of the state assignment for basic scientific research of the Research Institute of Medical Genetics of the Federal State Budget Scientific Institution «Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences» «Personalized genomic profiling in human orphan diseases» (No. AAAA-A19-119090990020-0)

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Accepted: 15.01.2020.

Введение

Несовершенный остеогенез (НО) – самое частое наследственное заболевание костной системы, встречающееся в различных странах мира с частотой примерно от 1:10000 до 1:20000 новорожденных [1]. Клиническая картина зависит от тяжести заболевания и может проявляться летальными вариантами, явными скелетными аномалиями у детей или иметь типичную манифестацию у людей зрелого возраста. В настоящее время описано 18 клинических форм НО, наследующихся аутосомно-доминантно, аутосомно-рецессивно или X-сцеплено рецессивно [2–4]. К основным клиническим признакам НО относятся повышенная ломкость костей, голубые склеры, низкий рост, снижение слуха, деформация костей скелета и аномалии дентина. Тяжесть заболевания обуславливается частотой переломов, прогрессирующей деформацией, хронической болью в костях и потерей подвижности. Количество переломов, сроки их возникновения значительно варьируют – от 1 в 1-2 года до 15–20 и более в год, а сроки манифестации – от 20 недели внутриутробного развития до 2-3 года жизни [5, 6].

Несмотря на то, что к настоящему времени идентифицировано 17 различных генов, вовлеченных в развитие различных типов НО, у 85–90% больных с клиническим диагнозом *несовершенный остеогенез* найдены мутации в генах *COL1A1* и *COL1A2* [2–4]. Эти гены ответственны за синтез аминокислотных последовательностей $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -цепей коллагена типа I, являющегося главным структурным белком костной ткани и важным компонентом соединительной ткани других органов. Ген *COL1A1*, протяженностью в 18 т.п.н., содержит 51 экзон, в которых идентифицировано более 600 различных мутаций. Ген *COL1A2* имеет протяженность 38 т.п.н., содержит 52 экзона, в которых обнаружено более 400 мутаций. Эти гены лишены «мутационных горячих точек» и большая часть обнаруживаемых мутаций, как правило, уникальна для каждой семьи. Вследствие этого, стандартные молекулярно-генетические методы диагностики (полимеразная цепная реакция – ПЦР, секвенирование по Сэнгеру) являются малоэффективными и трудозатратными. Наиболее подходящим методом в данном случае является массовое параллельное секвенирование (МПС), для которого

отсутствие мажорных мутаций не является ограничением, поскольку анализируются все кодирующие регионы анализируемых генов.

Целью настоящего исследования являлся поиск мутаций в генах *COL1A1* и *COL1A2* с использованием МПС у больных НО в Томской области.

Материалы и методы

Молекулярно-генетический анализ проводился 16 пациентам в возрасте от 1 года до 49 лет из 10 семей с НО I, III и IV типов. По несколько пациентов было в четырех семьях, шесть случаев были спорадическими. Классификация по типам НО проведена в соответствии с системой классификации Van Dijk и Sillence [7]. Исследование было выполнено с использованием оборудования центра коллективного пользования «Медицинская геномика» на базе НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, а также с использованием образцов ДНК из биобанка «Биобанк населения Северной Евразии». Все семьи, принявшие участие в исследовании, подписали информированное согласие. Проведение работы было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Геномную ДНК обследуемых выделяли из цельной венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Для анализа мутаций в генах *COL1A1* и *COL1A2* была разработана панель праймеров для секвенирования полной последовательности генов с использованием таргетного МПС (**рис. 1**). Обогащение интересующих регионов генома проводилось с помощью ПЦР длинных фрагментов с использованием набора BioMaster LR HS-ПЦР-Color (2x) (Biolabmix, Россия) с наработкой фрагментов на амплификаторе SureCycler 8800 (Agilent Technologies, США) (**табл. 1**). Амплификация проводилась при следующем режиме: 94 °C, 4 мин; 10 циклов: 94 °C, 20 с; 57 °C, 30 с; 68 °C, 13 мин; 20 циклов: 94 °C, 20 с; 57 °C, 30 с; 68 °C, 13 мин (+10 с за цикл). Присутствие амплифицированных продуктов проверялось путём электрофореза в агарозном геле.

Приготовление ДНК-библиотек производилось с использованием набора Nextera Flex (Illumina, США) по протоколу, рекомендованному производителем.

МПС осуществлялось на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора для секвенирования MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina, США) по рекомендованному производителем протоколу.

Полученные в результате МПС данные прошли биоинформационную обработку, включающую в себя следующие ключевые этапы: оценку качества прочтений с помощью программы FastQC, удаление адаптеров и тримминга последовательности с помощью пакета Trimmomatic-0.36, выравнивание на целевые последовательности с помощью Bowtie2, преобразование в bam-файлы, их сортировку и преобразование в vcf формат с

помощью набора утилит Samtools. Оценка патогенетической значимости выявленных вариантов производилась в соответствии с рекомендованным протоколом [8].

Все выявленные мутации были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру. Реакцию секвенирования проводили в соответствии с протоколом производителя с использованием набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Thermo Fisher Scientific», США). Секвенирование осуществлялось на капиллярном секвенаторе ABI Prism 3730 («Applied Biosystems», США). Результаты анализировали с помощью программы BioEdit 7.2.

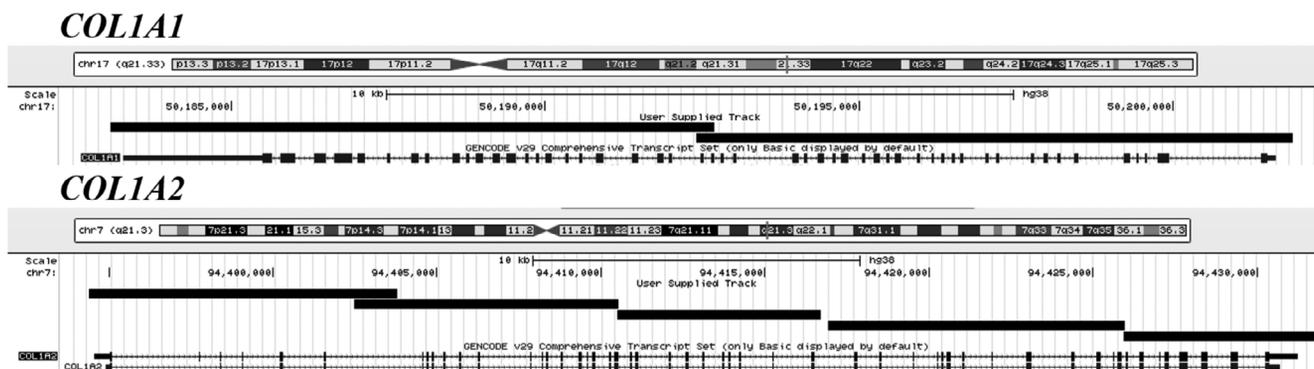


Рис. 1. Амплифицируемые фрагменты для секвенирования полной последовательности генов COL1A1 и COL1A2 с использованием таргетного МПС.

Примечание: черными линиями обозначены продукты амплификации. Для создания рисунка использована база данных UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>).

Таблица 1

Праймеры для амплификации фрагментов генов COL1A1, COL1A2

Ген	Последовательности праймеров	Длина ПЦП-продукта (п.н.)	Координаты (GRCh38)
COL1A1	F1 5'-TAGCCCACGCCATTCTGAGG-3'	9496	chr17:50192417-50201912
	R1 5'-GCCTGTCCCTCTGGATTCCC-3'		
	F2 5'-GCTGGCGAGAGAGGTGAACA-3'	9605	chr17:50183083-50192687
	R2 5'-GCCCTGGATTCTCTGTCCCC-3'		
COL1A2	F1 5'-CCACGCTATCGAGTCTTCCC-3'	9400	chr7:94394390-94403789
	R1 5'-AGCTCATCCGTAGGGTCTGT-3'		
	F2 5'-CAGTGGAGCACCGCTTAGAA-3'	8051	chr7:94402481-94410531
	R2 5'-СТАСТCTAGCCCAGGAGGT-3'		
	F3 5'-GACCTCCTGGGCTGAGAGTA-3'	6197	chr7:94410511-94416707
	R3 5'-TTCCCCACAGTTGTGCT-3'		
	F5 5'-GGCAATACATTCACCCCA-3'	9034	chr7:94416925-94425958
	R5 5'-AAGATACCCCTCCCACTCC-3'		
	F6 5'-GGAGTGGGGAGGGTATCTT-3'	5884	chr7:94425939-94431822
R6 5'-GGTGCAGGGGAGGAAATGA-3'			

Результаты и обсуждение

В результате проведенной работы выявлено 10 мутаций: шесть из них расположены в гене *COL1A1*, четыре мутации – в гене *COL1A2* (табл. 2). Все мутации, кроме одной, были описаны ранее в литературе и встречались у пациентов с различными типами НО.

Ранее неописанная мутация была идентифицирована в семье №7 и локализована в гене *COL1A2*. Все выявленные варианты нуклеотидной последовательности не зарегистрированы в базах данных популяционных выборок (EXAC, gnomAD, 1000 genomes).

В семье № 1 диагноз НО I типа поставлен матери (пациент 1.1, возраст на момент осмотра 36 лет) и до-

Таблица 2

Мутации в генах *COL1A1* и *COL1A2*, идентифицированные у больных с НО

№ семьи	№ пациента	Возраст	Тип НО	Ген	Экзон/интрон	Транскрипт	Мутация	Примечание	Идентификационные номера в базах данных
1	1.1	36	I	<i>COL1A2</i>	19	NM_000089	c.1000G>A:p.Gly334Ser	Описана ранее у одного пациента с I типом НО и у двух пациентов с IV типом НО	OIVD: COL1A2_00028
	1.2	7	I						
2	2.1	10	IV	<i>COL1A1</i>	51	NM_000088	c.4274C>T:p.Thr1425Ile	Описана ранее у одного пациента с III типом НО	OIVD: COL1A1_00898
3	3.1	8	I	<i>COL1A1</i>	32	NM_000088	c.2172delT:(p.Gly725AlafsTer41)	Описана ранее у двух пациентов с I типом НО	ClinVar: 599232
4	4.1	21	III	<i>COL1A2</i>	17	NM_000089	c.856G>A:p.Gly286Ser	Описана ранее у одного пациента с I типом НО	OIVD: COL1A2_00564
5	5.1	3	I	<i>COL1A1</i>	48i	NM_000088	c.3532-2A>C	Описана ранее у одного пациента с I типом НО и у двух пациентов с IV типом НО	OIVD: COL1A1_00654
6	6.1	32	I	<i>COL1A1</i>	17	NM_000088	c.1081C>T:p.Arg-361Ter	Описана ранее у десяти пациентов с I типом НО	OIVD: COL1A1_00056
	6.2	25	I						
	6.3	2	I						
7	7.1	35	I	<i>COL1A2</i>	10	NM_000089	c.434G>A:p.Gly145Asp	Ранее не описанная мутация	-
	7.2	16	I						
	7.3	12	I						
8	8.1	49	I	<i>COL1A1</i>	5	NM_000088	c.391C>T:p.Arg-131Ter	Описана ранее у двух пациентов с I типом НО, у одного пациента с IV типом НО и у одного пациента без классификации по типу НО	OIVD: COL1A1_00456
	8.2	27	I						
9	9.1	2	I	<i>COL1A1</i>	16i	NM_000088	c.1056+1G>A	Описана ранее у одного пациента с I типом НО, у трех пациентов с III типом НО и у одного пациента с IV типом НО	OIVD: COL1A1_00392
10	10.1	1	III	<i>COL1A2</i>	44	NM_000089	c.2918G>T:p.Gly973Val	Описана ранее у трех пациентов с III типом НО	OIVD: COL1A2_00195

чери (пациент 1.2, возраст на момент осмотра 7 лет). Анализ родословной позволил уточнить, что отцу пациента 1.1 также поставлен диагноз НО, он проживает в другом городе, молекулярно-генетические исследования не проводились. У матери (пациентки 1.1.) первый перелом бедренной кости произошел в 3 года, всего в анамнезе 6 переломов. Во время осмотра отмечены фенотипические особенности: голубые склеры, несовершенный дентиногенез, укорочение трубчатых костей (плечевых и бедренных) и умеренная мышечная гипотония. У дочери (пациент 1.2) первый перелом обеих бедренных костей был выявлен пренатально при ультразвуковом исследовании на 28 неделе беременности. Всего у неё было два перелома, второй – в 2 года, перелом средней трети правого бедра. Телосложение пропорциональное, ходит самостоятельно, деформаций скелета нет, голубые склеры. В результате секвенирования генов *COL1A1* и *COL1A2* найден ранее описанный патогенный вариант в экзоне 19 гена *COL1A2* (chr7:94409786G>A) в гетерозиготном состоянии, приводящий к замене глицина на серин в положении 334 (p.Gly334Ser, NM_000089). Аналогичные мутации описаны у одного пациента с I типом НО и у двух пациентов с IV типом НО (здесь и далее OIVD – номер в базе данных Osteogenesis Imperfecta Variant Database (<https://oi.gene.le.ac.uk>), OIVD: COL1A2_00028).

Пациент 2.1 с НО IV типа (пол женский, на момент настоящего осмотра пациенту 10 лет). Первый перелом – в родах обеих ключиц, всего 8 переломов, в основном бедренных костей. При осмотре: телосложение диспропорциональное, на правой бедренной кости сформировался ложный сустав, отмечены голубые склеры. Из-за укорочения и деформации правой нижней конечности самостоятельно не ходит. По результатам молекулярно-генетического исследования выявлен ранее описанный вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 51 гена *COL1A1* (chr17:48262984G>A) в гетерозиготном состоянии, приводящий к замене треонина на изолейцин в позиции 1425 (p.Thr1425Ile, NM_000088). Вариант описан как патогенный у одного больного с НО, тип III (OIVD: COL1A1_00898).

Пациенту 3.1 поставлен диагноз НО, I тип (пол женский, возраст на момент обследования – 8 лет). Первый перелом в 1 год, 2 месяца – закрытый косой перелом средней трети левой бедренной кости. На настоящий момент в анамнезе пациента 4 перелома: 3 перелома левой бедренной кости, 1 перелом обеих костей левой голени. При объективном осмотре: телосложение пропорциональное, ходит самостоятельно, костных деформаций скелета нет, склеры голубые. У пациента выявлена мутация в экзоне 32 гена *COL1A1* (chr17:48268807CA>C) в гетерозиготном

состоянии, приводящая к замене глицина на аланин со сдвигом рамки считывания, начиная с 725 кодона (p.Gly725Alafs, NM_000088.3), и образованием терминирующего кодона через 41 кодон. Вариант описан в базе данных ClinVar, как патогенный у двух больных НО, тип I (Variation ID: 599232).

Пациент 4.1 с НО III типа, осложненным рецидивирующими переломами костей нижних и верхних конечностей (пол мужской, возраст на момент обследования – 21 год). Стойкое умеренно выраженное нарушение стато-динамической функции вследствие множественных костных деформаций. Первый перелом произошел в пренатальном периоде (перелом бедренных костей). Множественные патологические переломы конечностей (всего 15): левой плечевой кости, обоих бедер – справа в верхней трети, слева в средней и нижней трети, правой большеберцовой кости. У пациента отмечены макроцефалия, широкая бочкообразная грудная клетка, множественные костные деформации, укорочение плечевых и бедренных костей, плоско-вальгусные стопы, голубые склеры, эмаль зубов изменена – имеет «янтарный» цвет. В результате секвенирования генов *COL1A1* и *COL1A2* выявлен ранее описанный вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 17 гена *COL1A2* (chr7:94038697G>A) в гетерозиготном состоянии, приводящий к замене глицина на серин в позиции 286 (p.Gly286Ser, NM_000089.3). Вариант описан как патогенный у пациента с НО I типа (OIVD: COL1A2_00564).

Пациенту № 5.1 поставлен диагноз НО, I тип (пол женский, возраст на момент обследования – 3 года). Первый перелом в 1 год 2 месяца – закрытый косой перелом средней трети левой бедренной кости. Всего 4 перелома (3 перелома левой бедренной кости, 1 перелом обеих костей левой голени). При осмотре отмечено пропорциональное телосложение, ходит самостоятельно, костных деформаций скелета нет, склеры голубые. В результате молекулярно-генетического исследования выявлен ранее описанный вариант нуклеотидной последовательности в сайте сплайсинга экзона 48 гена *COL1A1* (chr17:48264285T>G) в гетерозиготном состоянии. Вариант описан ранее у одного пациента с I типом НО и у двух пациентов с IV типом НО (OIVD: COL1A1_00654).

В семье № 6 трем членам поставлен диагноз НО, I тип: двум сибсам (пациенты 6.1 и 6.2), а также пациентке 6.3, являющейся дочерью пациента 6.1. У пациента 6.1 (пол мужской, возраст на момент обследования – 32 года) в 1 год был перелом костей правого предплечья, в 2 года – перелом левой большеберцовой кости. С 7 лет – переломы бедренных костей и костей

голении обеих конечностей, костей фаланг пальцев кистей и стоп, нижней и верхней челюсти (всего 27 переломов). При денситометрии отмечалось снижение минеральной плотности костей на 27%. Слух снижен, в 22 года диагностирован отосклероз слева. При осмотре: яркого, интенсивного цвета голубые склеры, относительное укорочение и деформация правого плеча (состояние после оперативного лечения). У пациента 6.2 (пол женский, возраст на момент обследования – 25 лет) в школьном периоде были переломы и деформация фаланг пальцев правой кисти (4 и 5 пальцы) и левой стопы (1 палец), в 14 лет – компрессионный перелом позвоночника поясничного отдела (L3), в 21 год – компрессионный перелом позвоночника поясничного отдела (L1-2) (всего переломов 5). При проведении денситометрии отмечалось снижение минеральной плотности костей, диагностирован остеопороз. Снижение слуха отмечает с 23 лет. У пациента 6.3 (пол женский, возраст на момент обследования – 2 года) было 2 перелома: в 1,5 месяца перелом правой большеберцовой кости, в 8 месяцев – левой. При осмотре: яркого, интенсивного цвета голубые склеры. У пациентов 6.1 и 6.2 есть необследованный сибс, у которого со слов, есть внешне симптомы НО: голубые склеры, после 20 лет – 2 перелома позвоночника, глухота односторонняя. У всех обследованных членов семьи выявлен ранее описанный вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 17 гена *COL1A1* (chr17:48273002G>A) в гетерозиготном состоянии, приводящий к появлению сайта преждевременной терминации трансляции в кодоне 361 (p.Arg361Ter, NM_000088). Вариант патогенный, ранее описан у десяти пациентов с НО I типа из разных популяций (OIVD: COL1A1_00056).

В семье № 7 проанализировано три пациента: пациент 7.1 (пол женский, возраст на момент осмотра – 35 лет) с НО I типа, в анамнезе 3 перелома: бедра – в 2 года, компрессионный перелом позвоночника, поясничного отдела – в 10 лет, перелом малоберцовой кости в 24 года. Отмечает снижение слуха с 20 лет. Наблюдается у нефролога с диагнозом: хроническая болезнь почки, 2 ст., хронический нефротический синдром неуточненного генеза. При осмотре: голубые склеры, зубы желтоватые, эмаль истончена, множественный кариес. Пациентам 7.2 и 7.3, являющимся сыновьями пациента 7.1, также поставлен диагноз НО, I тип. У пациента 7.2 (пол мужской, возраст на момент осмотра – 16 лет) в 1 год был перелом правого предплечья, в 3 года – закрытый перелом теменных костей. Наблюдается у психоневролога с диагнозом: смешанные специфические расстройства психологического развития, органическое эмоционально лабильное (астеническое) расстройство. При осмотре: макроцефалия, крупные

черты лица, жесткие волосы, голубые склеры, зубной ряд неровный, дефекты зубов, эмаль с желто-коричневым оттенком, нарушение осанки, плоско-вальгусная установка стоп, сандалевидная щель, пупочная грыжа. У пациента 7.3 в анамнезе два перелома плюсневых костей стоп (в 1 год и в 3 года). Наблюдается у психоневролога с диагнозом: смешанное расстройство учебных навыков, гиперкинетическое расстройство поведения. При осмотре: макроцефалия, крупные черты лица, жесткие волосы, голубые склеры, зубной ряд неровный, дефекты зубов, эмаль с желто-коричневым оттенком, плоско-вальгусные стопы. В результате секвенирования генов *COL1A1* и *COL1A2* у всех обследованных членов семьи выявлен ранее не описанный вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 10 гена *COL1A2* (chr7:94034512G>A) в гетерозиготном состоянии, приводящий к замене глицина на аспарагиновую кислоту в позиции 145 белка (p.Gly145Asp, NM_000089). Алгоритмы предсказания патогенности (SIFT, Polyphen2, MutationTaster, MutationAssessor, FATMM, PROVEAN, MetaSVM) расценивают данный вариант как патогенный.

В семье № 8 выявлен семейный случай НО I типа – отец (пациент 8.1, возраст на момент осмотра – 49 лет) и сын (пациент 8.2 – возраст на момент осмотра – 27 лет). У пациента 8.1, переломы костей предплечья и лодыжки в младшем детском возрасте, последний перелом в 39 лет. При осмотре: голубые склеры, грудной кифоз (в анамнезе возможен перелом позвоночника). У пациента 8.2 первый перелом – перелом правого бедра – в 9 мес., затем переломы ключицы, локтевой кости, перелом правого бедра, разрывы связок коленного сустава (всего 6 переломов). При осмотре: видимых деформаций нет, голубые склеры. У обоих пациентов в результате секвенирования генов *COL1A1* и *COL1A2* выявлен ранее описанный вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 5 гена *COL1A1* (chr17:48276667G>A) в гетерозиготном состоянии, приводящий к появлению сайта преждевременной терминации трансляции в кодоне 131 (p.Arg131Ter, NM_000088). Вариант описан как патогенный у двух пациентов с I типом НО, у одного пациента с IV типом НО и у одного пациента без классификации по типу НО (OIVD: COL1A1_00456).

Пациенту 9.1 поставлен диагноз НО, I тип (пол женский, возраст на момент обследования – 2 года). Первый перелом в 1,5 месяца (перелом левой плечевой кости), всего 6 переломов: в 3 месяца перелом правой плечевой кости и правой большеберцовой кости, в 4 месяца – правой плечевой кости, в 11 месяцев – левого бедра, в 1 год 3 месяца – левого бедра, в 1 год 9 месяцев – нижней трети правой большеберцовой кости.

При осмотре: телосложение пропорциональное, ходит самостоятельно с осторожностью, грубых костных деформаций скелета нет, склеры голубые. У пациента выявлен ранее описанный вариант нуклеотидной последовательности в сайте сплайсинга в экзоне 16 гена *COL1A1* (chr17:48273283C>T) в гетерозиготном состоянии. Данный вариант описан как патогенный у одного пациента с I типом НО, у трех пациентов с III типом НО и у одного пациента с IV типом НО (OIVD: COL1A1_00392).

Пациент 10.1 с НО III типа (пол женский, возраст на момент осмотра – 1 год). Первый перелом в 2 месяца (правая плечевая кость). В 7 месяцев – перелом нижней трети обеих костей левой голени, в 10 месяцев – перелом нижней трети правой бедренной кости и чрезмышелковый перелом левой плечевой кости, в 1 год – перелом левого бедра. При осмотре: задержка физического развития, дефицит роста, самостоятельно не ходит, не сидит. Костная деформация в области левого бедра, правой плечевой кости, склеры голубые. В результате молекулярно-генетического анализа выявлен вариант нуклеотидной последовательности в экзоне 44 гена *COL1A2* (chr7:94055144G>T) в гетерозиготном состоянии, приводящий к замене глицина на валин в позиции 973 белка (p.Gly973Val, NM_000089). Вариант ранее описан как патогенный у трех пациентов с НО III типа (OIVD: COL1A2_00195).

Из шести найденных миссенс-мутаций, включая ранее не описанную, пять приводят к замене глицина на другую аминокислоту. Высокая частота мутаций в кодонах, кодирующих глицин ожидаема, поскольку данная аминокислота является доминирующей в составе тройной полипептидной спирали молекулы коллагена (33 %) – каждая третья аминокислота в полипептидной α -цепи является глицином [9]. При этом замена глицина на другую аминокислоту приводит к нарушению образования водородных связей между полипептидными цепями тройной спирали [10]. Также показано, что миссенс-мутации с заменой глицина нарушают связывание коллагена с фибронектином, что в свою очередь приводит к повышенной деградации коллагена I типа [11]. Мутации, приводящие к появлению сайта преждевременной терминации трансляции, мутации со сдвигом рамки считывания и мутации в сайтах сплайсинга генов *COL1A1* и *COL1A2* также характерны для НО в различных популяциях [12, 13, 14].

Таким образом, в результате проведенной работы в пяти семьях были выявлены миссенс-мутации, в двух семьях – нонсенс-мутации, еще в двух случаях – мутации в сайтах сплайсинга и у одного пациен-

та – мутация со сдвигом рамки считывания. В четырех семьях с отягощенным анамнезом были выявлены идентичные мутации у всех обследованных членов семей с диагнозом НО. Во всех семьях были найдены уникальные мутации, не повторяющиеся у неродственных пациентов. Выявленная высокая гетерогенность спектра мутаций в генах *COL1A1* и *COL1A2* при НО указывает на эффективность использования методов, основанных на технологии МПС для диагностики данной патологии.

Список литературы

1. Бурцев МЕ, Фролов АВ, Логвинов АН, и др. Современный подход к диагностике и лечению детей с несовершенным остеогенезом. Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. 2019;7(2):87–102
2. Brizola E, Félix TN, Shapiro JR. Pathophysiology and therapeutic options in osteogenesis imperfecta: an update. Research and Reports in Endocrine Disorders. 2016;6:17–30
3. Boban L, Rod ER, Plečko M, et al. Molecular basis of osteogenesis imperfecta and future medical treatment. Paediatr Croat. 2017;61:147–55
4. Kang H, Aryal ACS, Marini JC. Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. Transl Res. 2017 Mar;181:27–48
5. Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, et al. Osteogenesis imperfecta. Nat Rev Dis Primers. 2017 Aug 18;3:17052
6. Palomo T, Vilaça T, Lazaretti-Castro M. Osteogenesis imperfecta: diagnosis and treatment. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2017 Dec;24(6):381–388
7. Van Dijk FS, Sillence DO. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. Am J Med Genet A. 2014 Jun;164A(6):1470–1481
8. Рыжкова ОП, Кардымон ОЛ, Прохорчук ЕБ, и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). Медицинская генетика. 2019;18(2):3–23
9. Потехина ЮП. Структура и функции коллагена. Российский остеопатический журнал. 2016;1-2(32-33):87–99
10. Engel J, Bächinger HP. Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix. Top Curr Chem. 2005;247:7–33
11. Chhum P, Yu H, An B, et al. Consequences of Glycine Mutations in the Fibronectin-binding Sequence of Collagen. J Biol Chem. 2016 Dec 30;291(53):27073–27086
12. Nadyrshina, D.D., Khusainova, R.I. & Khusnutdinova, E.K. Studies of type I collagen (*COL1A1*) $\alpha 1$ chain in patients with osteogenesis imperfecta. Russ J Genet. 2012; 48: 321–328
13. Stephen J, Shukla A, Dalal A, et al. Mutation spectrum of *COL1A1* and *COL1A2* genes in Indian patients with osteogenesis imperfecta. Am J Med Genet A. 2014 Jun;164A(6):1482–1489
14. Zhytnik L, Maasalu K, Reimann E, et al. Mutational analysis of *COL1A1* and *COL1A2* genes among Estonian osteogenesis imperfecta patients. Hum Genomics. 2017 Aug 15;11(1):19

References

1. Burtsev M.E., Frolov A.V., Logvinov A.N., Ilyin D.O., Korolev A.V. Sovremennyy podkhod k diagnostike i lecheniyu detey s nesovershennym osteogenezom [Current approach to diagnosis and treatment

- of children with osteogenesis imperfect]. *Ortopediya, travmatologiya i vosstanovitel'naya khirurgiya detskogo vozrasta* [Pediatric Traumatology, Orthopaedics and Reconstructive Surgery]. 2019;7(2):87–102 (In Russ.)
2. Brizola E, Félix TN, Shapiro JR. Pathophysiology and therapeutic options in osteogenesis imperfecta: an update. *Research and Reports in Endocrine Disorders*. 2016;6:17–30
 3. Boban L, Rod ER, Plečko M, et al. Molecular basis of osteogenesis imperfect and future medical treatment. *Paediatr Croat*. 2017;61:147–55
 4. Kang H, Aryal ACS, Marini JC. Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia. *Transl Res*. 2017 Mar;181:27–48
 5. Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, et al. Osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Aug 18;3:17052
 6. Palomo T, Vilaça T, Lazaretti-Castro M. Osteogenesis imperfecta: diagnosis and treatment. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2017 Dec;24(6):381–388
 7. Van Dijk FS, Sillence DO. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *Am J Med Genet A*. 2014 Jun;164A(6):1470–1481
 8. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prohorchuk E.B., Konovalov F.A., Maslennikov A.B., Stepanov V.A., Afanasyev A.A., Zaklyazminskaya E.V., Rebrikov D.V., Savostianov K.V., Glotov A.S., Kostareva A.A., Pavlov A.E., Golubenko M.V., Polyakov A.V., Kutsev S.I. Rukovodstvo po interpretatsii dannykh posledovatel'nosti DNK cheloveka, poluchennykh metodami massovogo parallel'nogo sekvenirovaniya (MPS) (redaktsiya 2018, versiya 2) [Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2)]. *Medit-sinskaya genetika* [Medical Genetics]. 2019;18(2):3–23 (In Russ.)
 9. Potekhina Y. Struktura i funktsii kollagena [Collagen Structure and Function]. *Rossiyskiy osteopaticheskiy zhurna.* [Russian Osteopathic Journal]. 2016;1-2(32-33):87–99 (In Russ.)
 10. Engel J, Bächinger HP. Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix. *Top Curr Chem*. 2005;247:7–33
 11. Chhum P, Yu H, An B, et al. Consequences of Glycine Mutations in the Fibronectin-binding Sequence of Collagen. *J Biol Chem*. 2016 Dec 30;291(53):27073–27086.
 12. Nadyrshina, D.D., Khusainova, R.I. & Khusnutdinova, E.K. Studies of type I collagen (COL1A1) $\alpha 1$ chain in patients with osteogenesis imperfecta. *Russ J Genet*. 2012; 48: 321–328
 13. Stephen J, Shukla A, Dalal A, et al. Mutation spectrum of COL1A1 and COL1A2 genes in Indian patients with osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet A*. 2014 Jun;164A(6):1482–1489
 14. Zhytnik L, Maasalu K, Reimann E, et al. Mutational analysis of COL1A1 and COL1A2 genes among Estonian osteogenesis imperfecta patients. *Hum Genomics*. 2017 Aug 15;11(1):19