

Поиск и классификация генетических вариантов в генах фосфоорилакиназного комплекса у группы пациентов с подозрением на наследственные нарушения метаболизма гликогена

Каменец Е.А.¹, Строкова Т.В.^{2,3}, Багаева М.Э.^{2,3}, Zubovich A.I.²,
Меликян М.А.⁴, Гусарова Е.А.¹, Милованова Н.В.¹, Захарова Е.Ю.¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», e-mail: elenakamenec@yandex.ru

² ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии»

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии»

Гликогеновые болезни (ГБ) — это гетерогенная группа наследственных нарушений метаболизма гликогена, наиболее распространенным из которых является ГБ IX типа — дефект фермента фосфоорилакиназы (Фк). ГБ IX типа относится к печеночным формам ГБ и подразделяется на несколько подтипов, которые различаются по типу наследования и вовлечению печеночной и мышечной тканей. Фк состоит из нескольких субъединиц, кодируемых различными генами. Наиболее частыми являются подтипы ГБ IX, ассоциированные с мутациями генов *PHKA2*, *PHKB* и *PHKG2*. Целью данного исследования является анализ генетических особенностей и гено-фенотипических корреляций у пациентов с мутациями в генах комплекса Фк. В исследование включены 36 пациентов из 30 неродственных семей. Методом массового параллельного секвенирования у пациентов были исследованы 47 целевых генов, ответственных за наследственные болезни, протекающие с поражением печени. У 28 пациентов выявлено 18 различных вариантов в гене *PHKA2* в гомозиготном состоянии, у 4 пациентов — 5 различных аллелей в гене *PHKG2* в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии. 14 вариантов в гене *PHKA2* и 3 в гене *PHKG2* ранее не описаны. Гетерозиготные варианты в генах *PHKB* и *PHKG2* выявлены у 3 и 1 пациента соответственно. Клиническое значение некоторых вариантов в генах *PHKA2*, *PHKB* и *PHKG2* неоднозначно. Большинство изменений составили миссенс-замены. Имеется несколько сомнительных случаев с миссенс-заменами неясного значения, либо гетерозиготными изменениями и неоднозначными клиническими симптомами. Показано, что обнаружение редкого варианта не всегда является основанием для верификации диагноза. Для его подтверждения необходимо комплексное изучение всей доступной информации о встречаемости, гомологии, структуре гена и активности фермента, сводный анализ генетических, клинических и лабораторных данных.

Ключевые слова: гликогеноз, фосфоорилакиназа, *PHKA2*, *PHKB*, *PHKG2*, массовое параллельное секвенирование.

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов.

Molecular-genetic characteristics of group of patients with mutations in genes of phosphorylase kinase complex

Kamenets E.A.¹, Strokov T.V.^{2,3}, Bagaeva M.E.^{2,3}, Zubovich A.I.²,
Melikyan M.A.⁴, Gusarova E.A.¹, Milovanova N.V.¹, Zakharova E.Y.¹

¹ Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics, e-mail: elenakamenec@yandex.ru»

² Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Nutrition and Biotechnology»

³ Pirogov Russian National Research Medical University

⁴ Federal State Budgetary Institution «National Research Centre for Endocrinology»

Glycogen storage diseases (GSD) are a heterogeneous group of inherited defects of metabolism of glycogen. GSD due to phosphorylase kinase (PhK) deficiency named GSD IX is the most common of them. It belongs to liver GSDs and occurs in several subtypes that differ in mode of inheritance and tissue-specificity. PhK consists of several subunits coding by different genes. The genes *PHKA2*, *PHKB* and *PHKG2* make the main contribution to GSD IX etiology. The aim of this study is analysis of genetic specificity and genotype-phenotype correlations in patients with mutations in genes of PhK complex. 36 children with liver pathology from 30 unrelated families were studied. Using massively parallel sequencing technology 47 target genes with mutations resulted in liver pathology were analyzed in patients. In 28 patients 18 different hemizygous mutant alleles of *PHKA2* were found. In 4 patients 5 homozygous or compound-heterozygous mutations of *PHKG2* were detected. 14 *PHKA2* variants and 3 *PHKG2* variants are novel. Heterozygous mutations of *PHKB* and *PHKG2* were found in 3 and 1 pts respectively. Clinical significance of some variants in *PHKA2*, *PHKB* and *PHKG2* is unclear. Most of detected mutations are missense-mutations. There are a few unclear cases with unreliable missense variants and variants in heterozygous state combined with ambiguous clinical features. The analysis of determined novel mutations and its

possible effects on PhK complex shows that the finding of a rare variant is not ample for the diagnosis. Diagnosis confirmation must be based on complex study of all available data of frequencies, homology, gene structure and enzyme activity and combine analysis of genetic, clinical and laboratory features and signs.

Key words: glycogen storage disease, phosphorylase kinase, *PHKA2*, *PHKB*, *PHKG2*, massively parallel sequencing.

Введение

Нарушения обмена гликогена (гликогенозы, гликогеновые болезни, ГБ) — гетерогенная группа наследственных заболеваний углеводного обмена, в основе патогенетических механизмов которых лежат дефекты генов, кодирующих белки, участвующие в процессах метаболизма гликогена. В настоящее время используется классификация, построенная по хронологическому принципу: типы ГБ обозначаются римскими цифрами в порядке описания заболевания. В зависимости от ведущих клинических проявлений выделяют мышечные и печеночные формы. К ГБ с преимущественным поражением печени относятся I, III, IV, VI и IX типы. Клинические проявления печеночных форм ГБ сходны и включают гепатомегалию, гипогликемию, цитолиз, гиперлипидемию. ГБ имеет крайне вариабельные проявления — от тяжелых, сходных с ГБ I, до мягких, практически бессимптомных форм. В литературе описаны случаи, протекающие с умеренной гепатомегалией без гипогликемических состояний.

Суммарная частота ГБ оценивается как 1:20000 — 1:43000 [1]. ГБ IX является наиболее распространенной формой гликогеноза — его доля среди всех случаев ГБ, по данным литературы, составляет около 25% [2]. Причиной ГБ IX типа служат генетические дефекты фермента фосфорилазкиназы (Фк), играющего регуляторную роль в каскаде ферментативных реакций расщепления гликогена [3]. В совокупности с ферментом-мишенью — фосфорилазой гликогена — они составляют фосфорилазную систему.

Фк — комплекс, состоящий из 16 субъединиц 4 различных типов, каждая из которых кодируется генами, расположенными на разных хромосомах и по-разному экспрессирующимися в тканях: α (*PHKA1*, *PHKA2*), β (*PHKB*), γ (*PHKG1*, *PHKG2*), δ (*CALM1*, *CALM2*, *CALM3*).

Субъединицы α и γ имеют по две изоформы — мышечную (кодирующуюся генами *PHKA1* и *PHKG1*) и печеночную (кодирующуюся генами *PHKA2* и *PHKG2*). Таким образом, к печеночной форме ГБ IX приводят дефекты в генах *PHKA2*, *PHKB*, *PHKG2*, а также (крайне редко) мутации генов, кодирующих субъединицу δ — главным образом *CALM1*. Подтипы заболевания, соответственно, носят названия IXa, IXb, IXc и IXd. ГБ IXa имеет X-сцепленный рецессивный тип наследования, остальные подтипы — аутосомно-рецессивный.

Фк — сложный по структуре фермент, представляющий собой гексодекамерный комплекс, состоящий из четырех долей. Доли включают 4 разных субъединицы: (α , β , γ , δ)₄. Каталитической активностью обладает субъединица γ со встроенной малой субъединицей δ , связывающей ионы Ca^{2+} . альфа- и бета-субъединицы составляют 81% от всего ферментативного комплекса и выполняют несколько функций. Во-первых, они отвечают за распознавание уровня Ca^{2+} и влияют на изменение афинности субъединицы δ к регуляторному домену субъединицы γ и/или на стабильность комплекса [4]. Во-вторых, C-терминальные домены альфа- и бета-субъединиц влияют на активность гамма-субъединицы, связываясь непосредственно с ее регуляторным сайтом [5]. В-третьих, доказано, что все 4 субъединицы Фк способны напрямую вступать в реакцию с гликоген-фосфорилазой [6; 7]. М. Pallen на основании высокой гомологии Фк с бактериальными гидролазами сделал предположение, что N-концевые домены крупных субъединиц обладают амилазной активностью и могут связываться непосредственно с гликогеном и отщеплять концевые остатки глюкозы [8]. Хотя последняя гипотеза пока так и не получила экспериментального подтверждения, Фк представляет собой мультифункциональный комплекс с регуляторной и каталитической активностью, играющий решающую роль в процессах расщепления гликогена.

Диагностика ГБ представляет трудную задачу из-за большой генетической гетерогенности, а также большой протяженности многих генов — таких, как *PHKA2* и *PHKB*. Технологии массового параллельного секвенирования (MPS) стали революционными для диагностики генетически гетерогенных заболеваний. Таргетное секвенирование позволяет одновременно провести молекулярный анализ множества генов, ответственных не только за развитие ГБ, но и других заболеваний печени, протекающих со сходной клинической симптоматикой.

Целью данного исследования являлся поиск и анализ значимости генетических вариантов в генах субъединиц Фк, мутации в которых ассоциированы с ГБ IX типа.

Материалы и методы

В исследование включены образцы ДНК, выделенные из цельной крови 36 детей из 30 семей (34 мальчика и 2 девочки) в возрасте от 6 месяцев до 16 лет (табл.1).

Этническое происхождение пациентов исследуемой выборки различно, большинство из них русские (64%).

34 пациентам установлен клинический диагноз *гликогенот IX типа*. 2 пациента были обследованы по поводу диагнозов: *прогрессирующий внутрипеченочный холестаз* и *дисфункция билиарного тракта*. Клинический диагноз основывался на результатах рутинных лабораторных тестов, ультразвуковом исследовании брюшной полости, эластографии печени и микроскопическом исследовании препаратов печени.

Таргетное секвенирование с применением разработанной панели генов «Заболевания с поражением печени» проведено методом MPS на приборе Ion Torrent PGM™ System for Next-Generation Sequencing (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Пробоподготовка образцов ДНК проводилась набором реагентов Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (дизайн пула праймеров по технологии Ampliseq) согласно протоколу производителя. В панель включено 47 генов, ответственных за различные НБО с преимущественным поражением печени: *ABCB11, ABCB4, ABCD3, AGL, AKR1D1, ALAD, ALDOB, ATP7B, ATP8B1, BCS1L, C10orf2, CYP7B1, DGUOK, FAH, FBPI, G6PC, GAA, GALE, GALT, GBA, GBE1, GYS2, HADHA, JAG1, LARS, LIPA, MPI, MPV17, NBAS, OTC, PFKM, PGAM2, PGM1, PHKA2, PHKB, PHKG2, POLG, PYGL, SCO1, SERAC1, SERPINA1, SLC25A13, SLC37A4, SMPD1, TALDO1, TJP2, TRMU*.

Клональную эмульсионную ПЦР проводили с использованием PGM Template OT2 200 Kit (Life Technologies) на приборе Ion One Touch 2 в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование мультиплексированных образцов выполняли на секвенаторе Ion Torrent PGM на чипах Ion 318 с использованием Ion PGM Sequencing 200 Kit (Life Technologies) по протоколу производителя.

Результаты секвенирования анализировали с использованием программного обеспечения Torrent Suite. Аннотацию функционального значения генетических вариантов и фильтрацию известных полиморфизмов с использованием базы данных dbSNP проводили с помощью компьютерной программы ANNOVAR. Визуальный анализ данных, ручную фильтрацию артефактов секвенирования и выравнивания последовательностей осуществляли с использованием программы Integrative Genomics Viewer.

Верификацию выявленных мутаций проводили методом прямого автоматического секвенирования согласно протоколу фирмы-производителя на приборе ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Анализ результатов прямого секвенирования осуществлялся с использованием программ Chromas и Nucleotide BLAST (NCBI, США) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bblast>).

Оценка клинического значения выявленных вариантов проводилась согласно Рекомендациям для интерпретации данных, полученных методом NGS [10]. Для анализа патогенности миссенс-замен использовались компьютерные алгоритмы PolyPhen-2, SIFT и

PROVEAN, замен в регионах сплайсинга — программа NetGene-2.

Результаты

У всех 36 пациентов были выявлены изменения в генах, кодирующих субъединицы комплекса Фк.

У 28 мальчиков из 23 семей (семьи *1 — *23) выявлены изменения в гене *PHKA2* в гемизиготном состоянии. Всего выявлено 18 различных вариантов: 4 миссенс-замены, описанные в литературе как патогенные (в семьях *6, *8, *10, *15, *19, *21, *22) и 14 вариантов, которые ранее описаны не были. Из них: 3 нонсенс-замены (семьи *3, *7, *16, *18), 2 одонуклеотидные делеции со сдвигом рамки считывания (семьи *1 и *14), 1 мутация сайта сплайсинга (семья *20), 7 миссенс-замен (семьи *2, *4, *5, *9, *11, *12, *13, *17) и 1 делеция без сдвига рамки считывания (семья *23).

Пробандам из всех семей за исключением семьи *4 на основании результатов клинко-лабораторного обследования был поставлен диагноз ГБ IX типа. В 9 семьях проведено исследование ДНК матерей пробандов, в 8 случаях установлено гетерозиготное носительство мутаций в гене *PHKA2*, у одной из матерей мутация не была обнаружена, что может быть связано с возникновением ее у пациента *de novo*, либо с гонадным мозаицизмом. В 4 семьях (семьи *2, *3, *19, *20) семейные мутации в гене *PHKA2* были выявлены у ближайших родственников пробандов: трех родных братьев и двух двоюродных братьев со схожей клинической картиной.

У одного пациента (семья *4), с предположительным диагнозом *прогрессирующий внутрипеченочный холестаз* в гене *PHKA2* была выявлена не описанная ранее миссенс-замена с.1814C>T (p.S605L) в гемизиготном состоянии (у матери пробанда замена обнаружена в гетерозиготном состоянии).

У 4 пациентов (семьи *24 — *27) выявлены изменения в гене *PHKG2* в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии. Две описанные нонсенс-мутации в компаунд-гетерозиготном состоянии: с.30C>T и 899G>A, и три миссенс-замены в гомозиготном состоянии: одна описанная ранее с.658G>A и две не описанные с.112G>A и с.925C>T. На основании клинических данных всем четверым поставлен диагноз ГБ IX.

У 4 пациентов (семьи *28 — *30) были обнаружены мутации в гетерозиготном состоянии. У пациентов из семей *28 и *29 с диагнозом ГБ IX — в гене *PHKB*: не описанная ранее нонсенс-замена с.39G>A (p.W13*) и миссенс-замена с.1969C>A (p.Q657K), описанная как изменение неясного клинического значения [9] соответственно.

У девочки из семьи *30 с диагнозом *дисфункция билиарного тракта* выявлена неописанная миссенс-замена

c.403C>T (p.R135W) в гене *PHKG2* в гетерозиготном состоянии.

В табл. 1 представлены генотипы пробандов.

Оценка патогенности выявленных вариантов

В табл. 1 показано, что все обнаруженные нами варианты либо имеют частоты, не превышающие ожида-

емой для патогенных вариантов, наследуемых по ауто-сомно-рецессивному типу (менее 0,005 [10]), либо не встречаются в контрольных выборках вовсе. Далее, 6 различных изменений в гене *PHKA2*, 1 вариант в гене *PHKB* и 2 в гене *PHKG2* являются LOF-вариантами, предположительно приводящими к прекращению синтеза белка. Однако большая доля среди выявленных изменений приходится на миссенс-замены, в основном

Таблица 1

Генотипы пациентов с выявленными изменениями в генах Фк комплекса и характеристика генетических вариантов

Код генетической семьи	Ген*	Генотип	Тип мутации	Аллельная частота в контрольной выборке gnomAD	HGMD ID	PolyPhen-2**	PROVEAN	SIFT	Клинический диагноз	Генотип матери/родителей	Другие члены семьи с клиническими проявлениями
1	PHKA2	PHKA2: c.2536delT.p.S846fs	сдвиг рамки считывания	НД	не описана	Сдвиг рамки считывания, нарушение трансляции			ГБ IXa	не определялся	-
2	PHKA2	PHKA2: c.G772A.p.G258R	миссенс	НД	не описана	0.979	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	носитель	2 двоюродных брата
3	PHKA2	PHKA2: c.C3331T.p.R1111*	нонсенс	НД	не описана	Образование стоп-кодона и преждевременное окончание трансляции белка			ГБ IXa	не определялся	брат
4	PHKA2	PHKA2: c.C1814T.p.S605L	миссенс	0.000017	не описана	0.508	Повреждающая	Повреждающая	?	носитель	-
5	PHKA2	PHKA2: c.C2578T.p.R860W	миссенс	0.000224	не описана	1.000	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	не определялся	-
6	PHKA2	PHKA2: c.G884A.p.R295H	миссенс	НД	CM991038	1.000	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	не определялся	-
7	PHKA2	PHKA2: c.C3331T.p.R1111*	нонсенс	НД	не описана	Образование стоп-кодона и преждевременное окончание трансляции белка			ГБ IXa	носитель	-
8	PHKA2	PHKA2: c.C3614T.p.P1205L	миссенс	НД	CM950938	1.000	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	не определялся	-
9	PHKA2	PHKA2: c.C755T.p.S252F	миссенс	НД	не описана	1.000	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	носитель	-
10	PHKA2	PHKA2: c.A401G.p.Q134R	миссенс	НД	CM117207	1.000	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	не носитель	-
11	PHKA2	PHKA2: c.C749T.p.S250L	миссенс	НД	не описана	1.000	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	не определялся	-
12	PHKA2	PHKA2: c.C749T.p.S250L	миссенс	НД	не описана	1.000	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	не определялся	-
13	PHKA2	PHKA2: c.G1262A.p.G421D	миссенс	НД	не описана	0.975	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	не определялся	-
14	PHKA2	PHKA2: c.268delC.p.Q90fs	сдвиг рамки считывания	НД	не описана	Сдвиг рамки считывания, нарушение трансляции			ГБ IXa	носитель	-
15	PHKA2	PHKA2: c.C3614T.p.P1205L	миссенс	НД	CM950938	1.000	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	носитель	-
16	PHKA2	PHKA2: c.C3190T.p.Q1064*	нонсенс	НД	не описана	Образование стоп-кодона и преждевременное окончание трансляции белка			ГБ IXa	носитель	-
17	PHKA2	PHKA2: c.G226A.p.E76K	миссенс	0.000011	не описана	1.000	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	носитель	-
18	PHKA2	PHKA2: G2635T.p.E879*	нонсенс	НД	не описана	Образование стоп-кодона и преждевременное окончание трансляции белка			ГБ IXa	не определялся	-
19	PHKA2	PHKA2: c.G134A.p.R45Q	миссенс	НД	CM078768	0.999	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	не определялся	брат
20	PHKA2	PHKA2: c.1324+1G>T	сплайсинг	НД	не описана	Нарушение сплайсинга транскрипта Делеция сайта сплайсинга по NetGene-2			ГБ IXa	носитель	брат
21	PHKA2	PHKA2: c.G134A.p.R45Q	миссенс	НД	CM078768	0.999	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	не определялся	-
22	PHKA2	PHKA2: c.G884A.p.R295H	миссенс	НД	CM991038	1.000	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXa	не определялся	-
23	PHKA2	PHKA2: c.3432_3434del.p.1144del	делеция без сдвига рамки считывания	НД	не описана	-	Повреждающая	-	ГБ IXa	не определялся	-
24	PHKG2	PHKG2: c.[G658A.p.G220R](c.G658A.p.G220R)	миссенс	НД	не описана	1.000	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXc	не определялся	-
25	PHKG2	PHKG2: c.[C130T.p.R44*](c.G899A.p.W300*)	нонсенс нонсенс	0.000004 НД	CM981537 CM154463	Образование стоп-кодона и преждевременное окончание трансляции белка			ГБ IXc	не определялся	-
26	PHKG2	PHKG2: c.[C925T.p.R309W](c.C925T.p.R309W)	миссенс	0.000012	CM1414443	1.000	Повреждающая	Повреждающая	ГБ IXc	не определялся	-
27	PHKG2	PHKG2: c.[G112A.p.V38I](c.G112A.p.V38I)	миссенс	0.000004	не описана	0.978	Нейтральная	Повреждающая	ГБ IXc	не определялся	-
28	PHKB	PHKB: c.G39A.p.W13*	нонсенс	0.002535	не описана	Образование стоп-кодона и преждевременное окончание трансляции белка			?	носители	-
29	PHKB	PHKB: c.C1969A.p.Q657K	миссенс	0.002744	CM031327	0.998	Повреждающая	Повреждающая	?	носители	брат
30	PHKG2	PHKG2: c.C403T.p.R135W	миссенс	0.000065	не описана	1.000	Повреждающая	Повреждающая	?	носители	-

Примечание. *PHKA2 RefSeq: NM_000292

PHKB RefSeq: NM_000293

PHKG2 RefSeq: NM_000294

**ЗаклЮчения программы PolyPhen-2 даны в долях вероятности повреждающего действия мутации

— не описанные в литературных источниках. Как вспомогательное средство для интерпретации последних, было использовано несколько программ-предикторов, заключения которых также продемонстрированы в табл. 1.

Варианты гена *PHKA2*: с.134G>A (p. R45Q), с.884G>A (p. R295H), с.3614C>T (p.P1205L), а также вариант *PHKG2* с.130C>T (p.R44*) являются патогенными

согласно независимым друг от друга литературным источникам [11–18]. Вся имеющаяся информация об остальных вариантах отражена в наборе критериев патогенности, предложенных в Рекомендациях по интерпретации данных NGS, и заключение о функциональном значении каждого варианта вынесено согласно правилам комбинирования критериев [10]. Эти данные суммированы в табл. 2.

Таблица 2

Оценка функционального значения выявленных вариантов генов Фк на основании данных литературы и комбинирования критериев патогенности, согласно [10]

Ген	Изменение по кДНК	Дефект в аминокислотной цепи	Литературные источники	Критерии патогенности	Заключение
<i>PHKA2</i>	с.134G>A	p.R45	[11; 12]	PM2, PP1, PP3, PP4	Патогенный
<i>PHKA2</i>	с.226G>A	p.E76K		PM2, PP3, PP4	Неопределенного значения
<i>PHKA2</i>	с.268delC	p. 90Sfs*2		PVS1, PM2, PP4	Патогенный
<i>PHKA2</i>	с.401A>G	p. 134R		PS2, PM2, PP3, PP4	Вероятно патогенный
<i>PHKA2</i>	с.749C>T	p.S250L		PM2, PP3, PP4	Неопределенного значения
<i>PHKA2</i>	с.755C>T	p.S252F		PM2, PP3, PP4	Неопределенного значения
<i>PHKA2</i>	с.772G>A	p.G258R		PM2, PP1, PP3, PP4	Неопределенного значения
<i>PHKA2</i>	с.884G>A	p.R295H	[13; 14]	PM2, PP3, PP4	Патогенный
<i>PHKA2</i>	с.1262G>A	p.G421D		PM2, PM5, PP3, PP4	Вероятно патогенный
<i>PHKA2</i>	с.1324+1G>T	—		PVS1, PM2, PP1, PP4	Патогенный
<i>PHKA2</i>	с.1814C>T	p.S605L		PM2	Неопределенного значения
<i>PHKA2</i>	с.2536delT	p.S846Rfs*73		PVS1, PM2, PP4	Патогенный
<i>PHKA2</i>	с.2578C>T	p.R860W		PM2, PP3, PP4	Неопределенного значения
<i>PHKA2</i>	с.2635G>T	p.E879*		PVS1, PM2, PP4	Патогенный
<i>PHKA2</i>	с.3190C>T	p. 1064*		PVS1, PM2, PP4	Патогенный
<i>PHKA2</i>	с.3331C>T	p.R1111*		PVS1, PM2, PP1, PP4	Патогенный
<i>PHKA2</i>	с.3432_3434del3	p.1144del1		PM2, PM4, PP4	Неопределенного значения
<i>PHKA2</i>	с.3614C>T	p.P1205L	[15; 16; 17]	PM2, PP3, PP4	Патогенный
<i>PHK</i>	с.39G >A	p.W13*		PVS1, PM2, PP4	Патогенный
<i>PHK</i>	с.1969C >A	p. 657K		PM2, PP1, PP3	Неопределенного значения
<i>PHKG2</i>	с.G112A	p.V38I		PM2, PP4	Неопределенного значения
<i>PHKG2</i>	с.C130T	p.R44*	[14; 18]	PVS1, PM2, PP4	Патогенный
<i>PHKG2</i>	с.C403T	p.R135W		PM2, PP3	Неопределенного значения
<i>PHKG2</i>	с.G658A	p.G220R		PM2, PP3, PP4	Неопределенного значения
<i>PHKG2</i>	с.G899A	p.W300*		PVS1, PM2, PP4	Патогенный
<i>PHKG2</i>	с.C925T	p.R309W		PM2, PP3, PP4	Неопределенного значения

Таким образом, из 18 вариантов гена *PHKA2* патогенными или вероятно патогенными являются 11; у пациентов из семей *1, *3, *6 — *8, *10, *13 — *16, *18 — *22 (всего 15 семей из 23) с изменениями в гене *PHKA2* и клинической картиной ГБ IX с высокой долей вероятности установлен генетический диагноз ГБ IXa. Из 5 гомозиготных и компаунд-гетерозиготных вариантов гена *PHKG2* патогенными можно считать 2; в семье *25 с двумя нонсенс-заменами в гене *PHKG2* установлен генетический диагноз ГБ IXc.

Для однозначного суждения о вкладе остальных генетических вариантов в фенотип больных данных недостаточно.

Обсуждение

Мутации в генах, кодирующих любой из компонентов Фк, могут напрямую влиять на его гликоген-связывающую и глюкозамилазную функции [19].

Мутации в гене *PHKA2* составляют около 3/4 от всех дефектов Фк [20]. Ген *PHKA2* (Хр22.2-р22.1) имеет размер более 92 т.п.н. и состоит из 33 экзонов, зрелый продукт содержит 1235 аминокислотных остатков. По данным HGMD, на сегодняшний день описано 57 различных патогенных изменений в альфа-субъединице [21]. В нашем исследовании у подавляющего большинства пациентов также были обнаружены мутации в данном гене. Вероятно, данная форма ГБ относится к наиболее частым у российских пациентов наряду с ГБ I типа.

Большинство описанных мутаций в гене *PHKA2* представляют собой точковые мутации, меняющие первичную структуру альфа-субъединицы Фк и расположенные в GH15-домене и СВ-подобном домене D — в непосредственной близости от предсказанного центра амилазной активности и сайта, связывающего регуляторный центр субъединицы γ. Та же закономерность на-

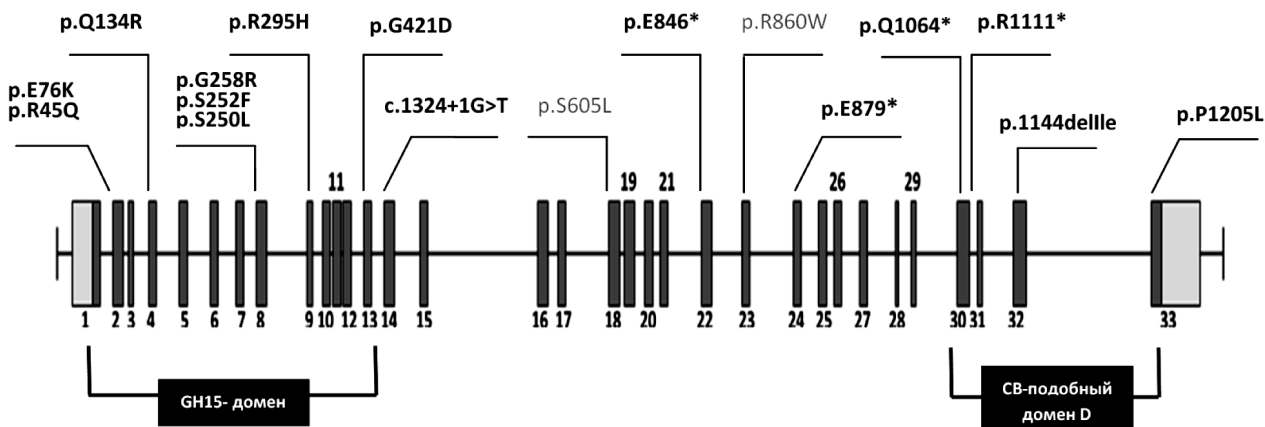
блюдается и в отношении мутаций, впервые выявленных в данном исследовании (рисунок).

Все обнаруженные мутации затрагивают регионы с высокой консервативностью, и 10 из 12 выявленных миссенс-замен расположены вблизи предполагаемых реакционных центров, что может косвенно указывать на их значимое влияние на функцию альфа-субъединицы.

Клинические проявления у 27 пациентов с изменениями в гене *PHKA2* полностью соответствовали диагнозу ГБ IX. Заболевание манифестировало в детском возрасте ($19,8 \pm 4,5$ мес.). Примерно в половине случаев первые признаки заболевания отмечались на первом году жизни, у остальных — в интервале между 1 и 3 годами жизни. Клинические симптомы включали ухудшение самочувствия (потливость, вялость, в четырех наблюдениях — судороги) при увеличении интервала между приемами пищи, увеличение размеров живота за счет гепатомегалии. При обследовании выявляли синдром цитолиза разной степени выраженности, гипогликемию и умеренную дислипидемию.

Исключение составляет пациент из семьи *4. Ведущим синдромом у больного является синдром холестаза (повышение ГГТ, общего и прямого билирубина, синдром цитолиза), уровень глюкозы, триглицеридов в пределах нормы, что нетипично для ГБ IX типа. Функциональная значимость замены с.1814C>T (p.S605L) представляется наиболее сомнительной из всех: помимо малой вероятности ее ассоциации с основными клиническими проявлениями, она имеет крайне мало и иных признаков патогенности, включая противоречивые заключения предсказательных программ (по данным SIFT и PROVEAN, данное изменение с высокой вероятностью оказывает повреждающее влияние, тогда как по данным программы PolyPhen-2, вероятность повреждающего влияния средняя, оценивается в 50,8% — табл. 1).

Гены *PHKB* и *PHKG2* локализованы на хромосоме 16 (16q12-q13 и 16p11.2 соответственно). Размер гена *PHKB*



Распределение выявленных мутаций в гене *PHKA2*.

Жирным шрифтом выделены мутации, расположенные в наиболее функционально значимых регионах, кодирующих GH15-домен и СВ-подобный домен D соответственно. Серым шрифтом выделены миссенс-мутации, расположенные вне наиболее функционально значимых регионов

239 т.п.н., он состоит из 31 экзона, размер кодируемого им белка 1093 аминокислотных остатков, однако патогенных мутаций в нем описано всего 24 [21]. Субъединица γ имеет сравнительно малые размеры (406 аминокислотных остатков), кодируется геном *PHKG2* длиной 13 т.п.н., который состоит из 10 экзонов, в нем описана 31 патогенная мутация [21].

Каталитическая субъединица γ состоит из собственного N-концевого киназного домена, к которому относятся аминокислотные остатки с 1 по 298, и ауторегуляторной части, связывающей субъединицу δ , (с 299 остатка по 386) [22]. ГБ IXc — одна из редких форм гликогеноза IX типа. Новые миссенс-замены, обнаруженные в нашем исследовании, p.G220R (семья *24) и p.V38I (семья *27) находятся в киназном домене, в регионах, обладающих высокой консервативностью не только для обеих изоформ *PHKG*, но и для многих других серин-треониновых киназ [23], что может говорить об их повреждающем эффекте.

Интересно отметить, что в семьях *24, *26 и *27 были выявлены редкие, либо неописанные мутации в гомозиготном состоянии. Исследование ДНК родителей в данных семьях не представлялось возможным, однако в семье *26 велика вероятность близкородственного брака. У пациентов из семей *24 и *27 помимо гомозиготного состояния мутантного аллеля можно предположить, что он находится в компаунд-гетерозиготном состоянии с протяженной делецией фрагмента гена *PHKG2*, не выявляемой методами секвенирования.

Клинические проявления у всех четверых пациентов *24 — *27 полностью соответствовали диагнозу ГБ IX и включали манифестацию в возрасте от 1 месяца до 4 лет, увеличение размеров печени, синдром цитолиза. Синдром цитолиза у пациентов отличался от пациентов с диагнозом ГБ IXa более высокими значениями трансаминаз; степень выраженности дислипидемии, гипогликемии была идентична выявляемой у пациентов с ГБ IXa типа. При морфологическом исследовании ткани печени цирроз печени был подтвержден у одной пациентки с изменениями в гене *PHKG2* (семья *24). Существенных различий в клинических проявлениях у пациентов с вариантами генов *PHKA2* и *PHKG2* не выявлено.

При аутосомно-рецессивном типе наследования в случае если выявлена одна патогенная мутация в гетерозиготном состоянии, диагноз не может быть однозначно исключен или подтвержден. Второй мутантный аллель может быть не выявлен, так как он располагается в глубине интрона, регуляторных участках гена или представляет собой крупную перестройку. С другой стороны, нельзя исключить вероятность носительства гена заболевания.

В нашем исследовании у пациента из семьи *28 была выявлена нонсенс-мутация с.39G>A (p.W13*) с высоковероятным повреждающим эффектом в гене *PHKB* в гетерозиготном состоянии. Клинические проявления у пациента свидетельствуют в пользу диагноза ГБ IXb.

Возможно, что второй мутантный аллель представляет собой протяженную делецию, поскольку мутации данного типа описаны в гене [24, 25]. Поиск второй мутации в данном случае возможен при дополнительном исследовании с применением метода MLPA-анализа.

У братьев из семьи *29 найдена описанная ранее миссенс-замена с.1969C>A (p.Q657K) в гене *PHKB* в гетерозиготном состоянии. По данным литературы, ее клиническое значение неоднозначно [9]. Клинические проявления у двух братьев из этой семьи включали выраженную гепатомегалию (+8—10 см из-под края реберной дуги), при обследовании были выявлены анемия, минимальная дислипидемия, синдром цитолиза до 9—10 норм, гипогликемия, что не согласуется со сравнительно мягким течением заболевания в случае ГБ IXb. Данный генетический диагноз в семье, как и повреждающее действие замены с.1969C>A представляются маловероятными.

У пациентки из семьи *30 выявлена мутация с.403C>T (p.R135W) в гетерозиготном состоянии в гене *PHKG2*. Среди клинических симптомов ребенка преобладают гипогликемия невыясненной этиологии, незначительное увеличение печени (+1 см из-под края реберной дуги). При проведении ультразвукового исследования определяется умеренная гиперэхогенность и неоднородность паренхимы печени, деформация желчного пузыря. Синдром цитолиза и дислипидемия отсутствуют. Со стороны нервной системы обращает на себя внимание диффузная мышечная гипотония. Девочка наблюдается у иммунолога по поводу недифференцированного врожденного иммунодефицита. Отмечается учащение эпизодов гипогликемии при проявлениях ОРВИ и приступах рецидивирующей лихорадки. Общая клиническая картина не позволяет сделать однозначного вывода в пользу диагноза ГБ IX. В данном случае диагноз подтвержден не был и рекомендовано проведение дополнительных биохимических исследований и биопсии печени.

Заключение

В вышеописанных случаях, неоднозначных как по клинической картине, так и с точки зрения генетических находок, ясность могла бы внести биохимическая диагностика (измерение концентрации гликогена и активности фосфорилат-киназного комплекса в биоптатах печени). Однако в случае ГБ процедура забора материала травматична, а методики довольно трудоемки. Тем не менее, биохимические методы не утратили своей актуальности. До эры массового параллельного секвенирования эти тесты предшествовали анализу отдельных генов [26]. На данном этапе развития генетического тестирования, биохимические методы следует применять для локализации ферментативного дефекта и верификации диагноза ГБ того или иного типа в неоднозначных случаях, когда анализ значимости выявленных генетических вариантов исчерпывает свои возможности.

Развитие технологий генетического тестирования существенно ускорило и упростило диагностику широчайшего ряда наследственных заболеваний, однако, не следует забывать, что в большинстве случаев первостепенную роль играет клинический диагноз и при выявлении изменений в таргетных генах, необходимо проводить тщательное сопоставление клинических, лабораторных и генетических данных.

В исследованной выборке наибольшее число случаев приходится на долю новых, неописанных вариантов с неясным влиянием на структуру и функцию изучаемого фермента (суммарно 69,2% от всех мутантных аллелей в генах *PHKA2*, *PHKB* и *PHKG2*). Анализ патогенности этих изменений далеко не всегда позволяет с уверенностью интерпретировать результаты. Только сопоставление результатов биоинформатического анализа со структурой изучаемого фермента и клиническими проявлениями у больного может принести достоверные данные о патогенетической значимости того или иного молекулярного варианта.

Список литературы

- Ozen H. Glycogen storage disease new perspectives *World J. Gastroenterol* 2007;13(18):2541-2553.
- Hendrickx J, Willems P.J., Genetic deficiencies of the glycogen phosphorylase system, *Hum. Genet.* 1996;97:551-6.
- Brushia RJ and Walsh DA Phosphorylase kinase: The complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure. *Front. Biosci.* 1999;4:618-41.
- Carriere C, Mornon J-P, Venien-Bryan C, Boisset N, Callebaut I. Calcineurin B-like domains in the large regulatory α/β subunits of phosphorylase kinase. *Proteins.* 2008; 71(4):1597-606.
- Carriere C, Jonic S, Mornon JP, Callebaut I. 3D mapping of glycogenosis-causing mutations in the large regulatory α subunit of phosphorylase kinase *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1782(11):664-70.
- Takrama JF and Donald JG. Solution conformations of the N-terminal CNBr fragment of glycogen phosphorylase and its interaction with calmodulin *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991;1077:371-8.
- Andreeva IE, Rice NA and Carlson GM The regulatory α subunit of phosphorylase kinase may directly participate in the binding of glycogen phosphorylase *Biochemistry (Mosc)* 2002;67(10):1197-202.
- Pallen MJ. Glucoamylase-like domains in the α - and β -subunits of phosphorylase kinase. *Protein Science* 2003;12:1804-7.
- Burwinkel B, Hu B, Schroers A, Clemens PR, Moses SW, Shin YS, Pongratz D, Vorgerd M and Kilimann MW. Muscle glycogenosis with low phosphorylase kinase activity: mutations in *PHKA1*, *PHKG1* or six other candidate genes explain only a minority of cases *Eur J Hum Genet.* 2003;11(7):516-26.
- Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Заклязьминская Е.В., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Куцев С.И. Руководство по интерпретации данных, полученных методом массового параллельного секвенирования (MPS). *Медицинская генетика.* 2017 (7): 4 — 17
- Beauchamp 2007; *Arch Dis Child* 92S1 A91
- Zhang J, Yuan Y, Ma M, Liu Y, Zhang W, Yao F, Qiu Z. Clinical and genetic characteristics of 17 Chinese patients with glycogen storage disease type IXa. *Gene* 2017 Sep 5;627:149-156
- Hendrickx J, Lee P, Keating JP, Carton D, Sardharwalla IB, Tuchman M, Baussan C, Willems PJ Complete genomic structure and mutational spectrum of *PHKA2* in patients with x-linked liver glycogenosis type I and II. *Am J Hum Genet.* 1999 Jun;64(6):1541-9.
- Xiong HY, Alipanahi B, Lee LJ, Bretschneider H, Merico D, Yuen RK, Hua Y, Guerousov S, Najafabadi HS, Hughes TR, Morris Q, Barash Y, Krainer AR, Jovic N, Scherer SW, Blencowe BJ, Frey BJ. RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science.* 2015 Jan 9;347(6218):1254806.
- van den Berg IE, van Beurden EA, Malingre HE, van Amsstel HK, Poll-The BT, Smeitink JA, Lamers WH, Berger R. X-linked liver phosphorylase kinase deficiency is associated with mutations in the human liver phosphorylase kinase α subunit. *Am J Hum Genet.* 1995 Feb;56(2):381-7
- Achouitar S, Goldstein JL, Mohamed M, Austin S, Boyette K, Blanpain FM, Rehder CW, Kishnani PS, Wortmann SB, den Heijer M, Lefeber DJ, Wevers RA, Bali DS, Morava E Common mutation in the *PHKA2* gene with variable phenotype in patients with liver phosphorylase b kinase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2011 Dec;104(4):691-4.
- Roscher A, Patel J, Hewson S, Nagy L, Feigenbaum A, Kronick J, Raiman J, Schulze A, Siriwardena K, Mercimek-Mahmutoglu S. The natural history of glycogen storage disease types VI and IX: Long-term outcome from the largest metabolic center in Canada. *Mol Genet Metab.* 2014 Nov;113(3):171-6.
- Burwinkel B, Shiomi S, Al Zaben A, Kilimann MW. Liver glycogenosis due to phosphorylase kinase deficiency: *PHKG2* gene structure and mutations associated with cirrhosis. *Hum Mol Genet.* 1998 Jan;7(1):149-54.
- Thompson JA and Carlson GM. The regulatory α - and β -subunits of phosphorylase kinase directly interact with its substrate, glycogen phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482(2):22-5.
- Bali DS, Goldstein JL, Fredrickson K, Austin S, Pendyal S, Rehder C, Kishnani PS. Clinical and Molecular Variability in Patients with *PHKA2* Variants and Liver Phosphorylase b Kinase Deficiency *JIMD Rep.* 2017;3(12).
- Human Genetic Mutation Database Professional 2017.4 <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
- Lowe ED, Noble MEM, Skamnaki VT, Oikonomakos NG, Owen DJ, Johnson LN. The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition *EMBO J* 1997;16(22):6646-58.
- HaMPS SK and Quinn AM. Protein Kinase Catalytic Domain Sequence Database: Identification of Conserved Features of Primary Structure and Classification of Family Members *Methods In Enzymology*, 1991;200:38-62.
- Burwinkel B, Maichele AJ, Aagenaes O, Bakker HD, Lerner A, Shin YS, Strachan JA, Kilimann MW. Autosomal glycogenosis of liver and muscle due to phosphorylase kinase deficiency is caused by mutations in the phosphorylase kinase β subunit (*PHKB*) *Hum Mol Genet.* 1997;6(7):1109-15.
- Alfadhel M, Benmeakel M, Hossain MA, Al Mutairi F, Al Othaim A, Alfares AA, Al Balwi M, Alzaben A, Eyaid W. Thirteen year retrospective review of the spectrum of inborn errors of metabolism presenting in a tertiary center in Saudi Arabia *Orphanet J Rare D* 2016;11(1):126.
- Davit-Spraul A, Piraud M., Dobbelaere D., Valayannopoulos V., Labrune P., Habes D., Bernard O., Jacquemin E., Baussan C. Liver Glycogen Storage Diseases due to Phosphorylase System Deficiencies: Diagnosis Thanks to Non Invasive Blood Enzymatic and Molecular Studies. *Molecular Genetics and Metabolism* 2011;104:137