

На правах рукописи



Жожиков Леонид Русланович

**ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ ВАРИАНТОВ  
В ГЕНЕ *NVAS* ПРИ SORH-СИНДРОМЕ**

1.5.7 Генетика

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Томск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», г. Якутск.

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, доцент

**Максимова Надежда Романовна**

**Официальные оппоненты:**

**Карунас Александра Станиславовна**, доктор биологических наук, доцент, обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Институт биохимии и генетики, и.о. директора (г. Уфа).

**Маркова Татьяна Владимировна**, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н. П. Бочкова», Научно-консультативный отдел, заведующая (г. Москва).

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург).

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_\_ года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу г. Томск, Московский тр., 3, Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <http://tnimc.ru/>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 202\_\_ года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, доцент



Назаренко Мария Сергеевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Российская Федерация переживает второй демографический переход, обусловленный трансформацией традиционного общества в индустриальное, характеризующийся снижением рождаемости ниже уровня, обеспечивающего простое воспроизводство населения, что приводит, в частности, к сознательному планированию рождения каждого ребёнка. В связи с этим, ценность человеческой жизни в индустриальном (и постиндустриальном) обществе становится больше, чем в традиционном. По данным ВОЗ 5% детей рождается с наследственной патологией, манифестирующей в различные периоды жизни. В России с 2006 года проводится генетический скрининг на фенилкетонурию, врожденный гипотиреоз, муковисцидоз, галактоземию и адреногенитальный синдром, а с 2023 года расширенный неонатальный скрининг включает уже 36 заболеваний. С 2006 по 2020 год было выявлено более 14 тысяч детей с наследственными и врожденными заболеваниями. Благодаря неонатальному скринингу на пять генетических заболеваний ежегодно обнаруживаются более тысячи детей с наследственной патологией [Куцев С.И., 2020]. В наиболее авторитетной международной базе данных ORPHANET насчитывается 6172 орфанных заболевания, из которых подавляющее большинство являются наследственными (4438). Алгоритмы лечения и диагностики существуют лишь для примерно 300 генетических заболеваний [Cohen J.L. et al., 2025].

В Республике Саха (Якутия) в якутской популяции обнаружен наиболее высокий уровень накопления болезней с аутосомно-доминантным типом наследования [Платонов Ф.А., 1996]. Также следует отметить разнообразие нозологических форм наследственных заболеваний – в 2,5 раза выше, чем в других субъектах Российской Федерации [Назаренко Л.П. с соавт., 2002]. В медико-генетическом центре Республиканской Больницы №1 – Национального Центра Медицины (МГЦ РБ№1-НЦМ) на конец 2021 года было поставлено на учёт 2763 больных по 139 формам моногенных заболеваний из регионов республики. В результате клинических и молекулярно-генетических исследований проведённых медико-генетической службой, был создан селективный скрининг на 7 частых аутосомно-рецессивных заболеваний: 3М-синдром [Maksimova N. et al., 2007], несиндромальная глухота 1А типа [Барашков Н.А. с соавт., 2010], метгемоглобинемия 1 типа [Галеева Н.М., Назаренко Л.П., Назаренко С.А., 2006], тирозинемия 1 типа [Иванова О.Н., Гуринова Е.Е., Сухомясова А.Л., 2013], SOPH-синдром [Maksimova N. et al., 2010], нейрональный цероидный липофусциноз 6 типа [Голикова П.И. с соавт., 2021], мукополисахаридоз-плюс синдром [Kondo H. et al., 2017]. Одним из наиболее распространённых заболеваний среди них является SOPH-синдром (низкий рост, атрофия зрительного нерва, пельгеровская аномалия лейкоцитов, MIM #614800, SOPH), ассоциированный с вариантом с.5741G>A, p.Arg1914His в гене *NBAS*, частота которого составляет 4,5 и 9,95 (на 100 тысяч) среди населения Якутии и якутской популяции, соответственно [Максимова Н.Р. с соавт., 2016]. Наличие в Республике Саха (Якутия) большого груза наследственной патологии предполагает проведение обширных клинико-патогенетических исследований наследственных заболеваний с использованием современных генетических и биоинформатических методов. В связи с вышесказанным, в данной работе было решено провести углублённое исследование одного из наиболее значимых для региона наследственных заболеваний – SOPH-синдрома.

**Степень разработанности темы.** SOPH-синдром – это аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, характеризующееся нарушениями в костном аппарате, атрофией зрительных нервов и пельгеровской аномалией лейкоцитов. Данный синдром был впервые описан в 2010 году в якутской популяции и в настоящее время насчитывается 93 пациента с установленным диагнозом SOPH-синдром. SOPH ассоциирован с гомозиготным вариантом в гене

*NBAS* (neuroblastoma amplified sequence) с.5741G>A, приводящего к аминокислотной замене р. R1914H в структуре белка [Maksimova N. et al., 2010]. Согласно нозологической классификации генетических скелетных заболеваний SOPH-синдром относится к 13 группе, включающей спондилоэпи(мета)физарные дисплазии. А также ограниченно SOPH-синдром включен в 26 группу, включающую несовершенный остеогенез и заболевания со сниженной плотностью костной ткани [Unger S. et al., 2023].

Начиная с 2015 года, были описаны новые патологические состояния, ассоциированные с патогенными вариантами в гене *NBAS*, в том числе детская печеночная недостаточность 2 типа, которая не имеет признаков, перекрывающихся с SOPH. Клиника заболеваний, связанных с вариантами в гене *NBAS* разнообразна, и затрагивает иммунную, мышечную и нервную системы, костный аппарат, печень, кожу. Патогенные варианты *NBAS* ранее были поделены на патогенетические группы в зависимости от того, какие участки белка *NBAS* были поражены:  $\beta$ -пропеллер (комбинированный фенотип), SEC39 (детская печёночная недостаточность тип 2, ILFS2, MIM 616483), С-конец (SOPH-синдром) [Staufner C. et al., 2020]. На данный момент, среди подтвержденных патогенных вариантов, большинство приходится на участок, кодирующий С-конец белка *NBAS*. В современной литературе обнаруживаются несколько вариантов в компаунд-гетерозиготном состоянии, ассоциированных с SOPH-синдромом. Интерес международного научного сообщества вызывает изучение молекулярных основ высокого клинического полиморфизма патогенных вариантов *NBAS*, который чрезвычайно сложен в диагностике. Кроме классической триады симптомов со скелетной дисплазией, атрофией зрительных нервов и пельгеровской аномалией лейкоцитов различными исследователями описываются фенотипы с первичным иммунодефицитом, детской печёночной недостаточностью 2 типа, синдромом прерывания ножки гипофиза, несовершенным остеогенезом, эпилепсией и т.д. [Balasubramanian M. et al., 2017; Carli D. et al., 2019; Mallakmir S. et al., 2019]

Трёхмерное моделирование строения белка и белковых комплексов, докинг белковых структур, а также молекулярные симуляции физико-химических свойств белка сегодня активно изучаются благодаря применению исследователями алгоритмов машинного обучения и искусственного интеллекта [Barbarin-Bocahu I., Graille M., 2022; McCoy A.J., 2022]. Преимуществом данного подхода является многопоточность и скорость исследований. Данные подходы позволяют проверять патофизиологические механизмы развития заболеваний на белковом уровне, вплоть до разработки дизайна патогенетических лекарственных средств. Исследования белка *NBAS* с использованием вычислительных методов практически отсутствуют, ограничиваясь лишь предсказанием патогенности тех или иных новых вариантов, обнаруженных при массовом параллельном секвенировании у пациентов со сложной клинической картиной [Carli D. et al., 2019].

После внедрения ПЦР-методики выявления патогенного варианта, вызывающего SOPH-синдром, в медико-генетическом центре РБ№1-НЦМ в г. Якутске, выявилась острая необходимость в углублении знаний по SOPH-синдрому и гену *NBAS*. Механизмы развития заболевания остаются невыясненными, что исключает возможность разработки патогенетической терапии SOPH-синдрома. Исследования патогенетики SOPH-синдрома раскроют молекулярные механизмы развития болезни, и, следовательно, подскажут путь к новым алгоритмам лечения и профилактики данной патологии. А также возможно откроют путь к изучению других, схожих по генетическому механизму, синдромов. Успех в данной области исследования существенно снизит груз наследственной патологии в Республике Саха (Якутия) и в структуре общей заболеваемости Российской Федерации.

**Цель работы:** расширить и охарактеризовать клинико-фенотипический спектр *NBAS*-ассоциированных заболеваний в аспекте *SOPH*-синдрома и определить их патогенетические основы, на уровне сайтов связывания и субдоменной архитектуры белка *NBAS*.

**Задачи:**

1. Определить клинический полиморфизм у пациентов с *SOPH*-синдромом в Республике Саха (Якутия) на основе медико-генетических карт и результатов иммунопрофилирования.
2. Установить домен-специфический фенотип *NBAS*-ассоциированных заболеваний и сопоставить с ним фенотип *SOPH*-синдрома у обследованных пациентов.
3. Проанализировать изменения стабильности белка *NBAS* при патогенных вариантах (включая p.R1914H).
4. Идентифицировать сайты связывания белка *NBAS* с белками-партнёрами и оценить их субдоменную принадлежность с помощью программы AlphaFold, а также их взаимосвязь с клиническим фенотипом пациентов.

**Научная новизна.** Впервые описана и обобщена ассоциация патогенных вариантов в гене *NBAS* с клинической картиной якутских пациентов с *SOPH*-синдромом. Впервые описана субдоменная архитектура и сайты связывания белка *NBAS*, ответственного за развитие *SOPH*-синдрома и *ILFS2*. Впервые у пациентов, имеющих различный клинико-фенотипический спектр *NBAS*-ассоциированных состояний, исследованы патогенетические звенья заболевания в аспекте белка *NBAS* – нарушение стабильности белка и субдоменная принадлежность патогенных вариантов и их корреляции с фенотипическими проявлениями.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** На основании проведённой работы разработана тест-система для ДНК диагностики *SOPH*-синдрома методом ПЦР в реальном времени. Тест-система может найти применение для диагностики мажорной мутации c.5741G>A в гене *NBAS* у больных и их родственников, а также пренатальной диагностике для проспективного медико-генетического консультирования вступающих в брак. Получен патент на изобретение №2819985 «Способ диагностики варианта *SOPH* c.5741G>A в гене *NBAS*» 28 мая 2024 г.

Полученные в работе данные расширили знания о *SOPH*-синдроме. Представлено детальное описание по системам и органам фенотипа пациентов с патогенными вариантами на С-конце гена *NBAS*, куда также входит и *SOPH*-синдром.

Идентифицированы биомаркеры *SOPH*-ассоциированного иммунодефицита, что поможет врачам-клиницистам лучше контролировать течение заболевания и снизить риск осложнений. Впервые получены новые знания о сайтах связывания белков партнеров *NBAS* и их субдоменная локализация. Впервые исследована стабильность белка в аспекте *SOPH*-синдрома. Изучено влияние на субдоменную структуру белка известных патогенных вариантов гена *NBAS*.

Результаты проведённой работы по генотип-фенотипической характеристике, а также трёхмерные структуры белка *NBAS* и его партнеров по взаимодействию могут быть использованы при преподавании медицинской генетики студентам медицинских и биологических факультетов, а также врачам на курсах повышения квалификации для более глубокого понимания молекулярных основ гетерогенности патологии, способствующему развитию персонализированной терапии и профилактики.

**Методология и методы исследования.** Исследование включало ретроспективный анализ клинико-генеалогических данных якутских пациентов с *SOPH*-синдромом, а также мета-анализ описанных мировых случаев *NBAS*-ассоциированных патологий. Литературный поиск проводился в GnomAD, LOVD, Google Scholar и рецензируемых публикациях. Для молекулярной части были использованы образцы ДНК пациентов, носителей и здоровых индивидов; ДНК выделяли фенол-

хлороформным методом и экспресс-наборами. Для диагностики варианта с.5741G>A разработана ПЦР-тест-система с использованием праймеров и флуоресцентных зондов, подбор которых выполнялся через Ensembl, Primer3 и Primer-BLAST. Реакции проводили на системе Bio-Rad CFX96 с последующей аллельной дискриминацией в CFX Manager. Иммунопрофилирование включало иммунофенотипирование периферической крови на проточном цитометре Navios и определение сывороточных иммуноглобулинов ИФА-методом. Для биоинформатической части использовали программы AlphaFold2/3 и AD3 Complex, базы AlphaFold DB и InterPro; визуализировали в PyMOL. Анализ интерфейсов белковых комплексов проводился через программу PRODIGY; данные обрабатывались скриптами на Python3 и R.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Расширен фенотипический спектр якутского SOPH-синдрома, у пациентов было выявлено снижение иммуноглобулинов и NK-клеток.
2. Установлен домен-специфический фенотип патогенных вариантов, локализованных на С-конце белка NBAS, который включает лидирующие фенотипические признаки, такие как атрофию зрительного нерва и низкий рост.
3. Миссенс-вариант p.R1914H (SOPH) является наиболее дестабилизирующим среди описанных вариантов на С-конце белка NBAS, что может служить патогенетическим звеном SOPH-синдрома.
4. Определена субдоменная архитектура белка NBAS с установлением основных сайтов связывания с USE1, Rab18 и ZW10: патогенные варианты, ассоциированные с ILFS2, затрагивают эти сайты, а варианты, связанные с атрофией зрительного нерва, не затрагивают и локализованы исключительно на С-концевых субдоменах.

**Степень достоверности результатов.** Была исследована на сегодняшний день самая обширная когорта пациентов с патологией в гене *NBAS* (n=93) в мире.

В работе была использована программа на базе искусственного интеллекта, которая выполняет предсказания пространственной структуры белка – AlphaFold. Программа разработана как система глубокого обучения и имеет свою базу данных, включающую структуры белков полного протеома человека и насчитывающую более 365 000 белков.

#### **Апробация материалов диссертационной работы.**

Результаты по иммунофенотипированию пациентов с SOPH-синдромом были представлены в стендовом докладе на международной конференции «European Human Genetics Conference 2021» (онлайн, 2021 г.), в конференции «Аспирантские чтения» (Якутск, май и ноябрь 2021 г.). Результаты по моделированию белка NBAS и его взаимодействий методом AlphaFold были представлены на 11-ой Московской конференции по вычислительной молекулярной биологии MCCMB23 (Москва, 2023 г.), научно-образовательном семинаре «Наследственные болезни: клиника, диагностика, лечение» (Якутск, 2023 г.), конференции «Первичные иммунодефициты: от науки к практике» (Москва, 2024 г.). Часть диссертационной работы, посвященная использованию AlphaFold в анализе мультисистемного фенотипа, была апробирована в конкурсах молодых ученых на конференции «ПОЭЗИЯ ГЕНОМА» (2 место, Санкт-Петербург, 2024) и съезде Российского Общества Медицинских Генетиков (1 место, Санкт-Петербург, 2025).

Работа поддержана «конкурсом статей» и «конкурсом академической мобильности» Фонда молодых учёных Якутии (2023), грантом УМНИК с проектом «Разработка новых диагностических флуоресцентных тест-систем для генетического тестирования частых наследственных заболеваний» (договор №18999ГУ/2023). Представленные результаты получены в рамках выполнения государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской

Федерации («Геномика Арктики: эпидемиология, наследственность, патология», FSRG–2020–0014 и «Геномика Арктики: диагностика, профилактика и лечение», FSRG-2024–0001).

**Публикации.** Материалы диссертационной работы представлены в 4 печатных работах, в том числе в 3 статьях (Web of Science и Scopus), опубликованных в журналах, рекомендованных высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для соискателей ученой степени кандидата наук. В опубликованных научных работах и автореферате полностью отражены основные результаты диссертации, положения и выводы. Был получен патент Российской Федерации на изобретение.

**Личный вклад автора.** Автор провел набор на исследование пациентов с SOPH-синдромом, анализ медико-генетических карт больных с SOPH-синдромом, забор и культивирование фибробластов у больных, а также дизайн и написание статей по теме диссертации. Автором написаны скрипты для программного обеспечения, а также проведён дизайн и исполнение исследования белка вычислительными методами. Автором проведены все этапы создания ПЦР тест-системы. Автором проанализирована и проработана отечественная и зарубежная литература по теме диссертации, обработаны полученные результаты, сформулированы выводы и написана рукопись.

**Объем и структура диссертационной работы.** Диссертационная работа изложена на 192 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц, 33 иллюстрации, 5 приложений. Состоит из следующих разделов: оглавление, введение, основная часть с результатами собственных исследований, заключение, выводы, список сокращений, список литературы и приложения. Библиографический указатель включает 142 источников (из них 11 отечественных и 131 зарубежных).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Многолетнее диспансерное наблюдение за пациентами с редким наследственным заболеванием SOPH-синдром позволило провести обширный фенотипический поиск признаков, характерных для данной патологии. Фенотипические признаки пациентов с SOPH-синдромом были взяты из медико-генетических карт МГЦ РБ№1-НЦМ. Забор фибробластов проводился совместно с врачом-генетиком на базе МГЦ РБ№1-НЦМ. Данные о пациентах записывались в электронную таблицу, включающую анамнез заболевания, сроки проявления признаков заболевания и данные функциональной и инструментальной диагностики.

В исследовании было проведено количественное определение субпопуляционного состава лимфоцитов методом проточной цитофлуориметрии у пациентов с SOPH-синдромом. Дизайн праймеров и зондов проводился с помощью инструмента Benchling, оценка специфичности олигонуклеотидов к участку геномной ДНК проводилась с помощью Primer-BLAST (NCBI). Оценка вероятности неспецифического связывания олигонуклеотидов с геномной ДНК проводилась инструментом OligoAnalyser™ Tool (IDT), функцией Tm mismatch. Трехмерная структура белков, а также их последовательности были взяты из базы данных AlphaFold Protein Structure Database. Обнаружение предполагаемых белковых сайтов связывания проводилось с помощью инструмента AlpoFoldComplex, который основан на AlphaFold2, а также инструментом AlphaFold3. Предсказание нарушения стабильности белка при патогенных вариантах проводилось с помощью инструмента FoldX, через интерфейс программы Yasara. Скрипты для работы с данными о трехмерных структурах, аннотированными генетическим вариантами, фенотипическими признаками и антропометрическими данными были написаны с помощью языков программирования Python3 и R. Экспериментальные исследования проведены на базе

Центра коллективного пользования Арктического инновационного центра Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова» (СВФУ им. М.К. Аммосова). Работа одобрена этическим комитетом Медицинского Института Северо-Восточного Федерального Университета им. М.К. Аммосова и прошла экспертную комиссию (№ 79 от 23 апреля 2021 г.), а также научно-технический совет (НТС) СВФУ № 14 – 21 мая 2021 г.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Генотип-фенотипическая характеристика SOPH-синдрома

В зависимости от временного периода, с 1995 по 2022, у всех пациентов было выявлено гомозиготное носительство с. 5741G>A (p.R1914H). Все описанные в данной работе пациенты живы, кроме одного мужчины, который умер во время приступа эпилепсии – это первый известный случай смерти пациента SOPH под диспансерным наблюдением в Республике Саха. Как минимум трое женщин из данной выборки родили по одному здоровому ребенку, у каждого из них было подтверждено гетерозиготное носительство причинного варианта. Данные об этих событиях не представлены в текущей работе. Максимальный возраст осмотренного пациента равен 53 годам (Рисунок 1).

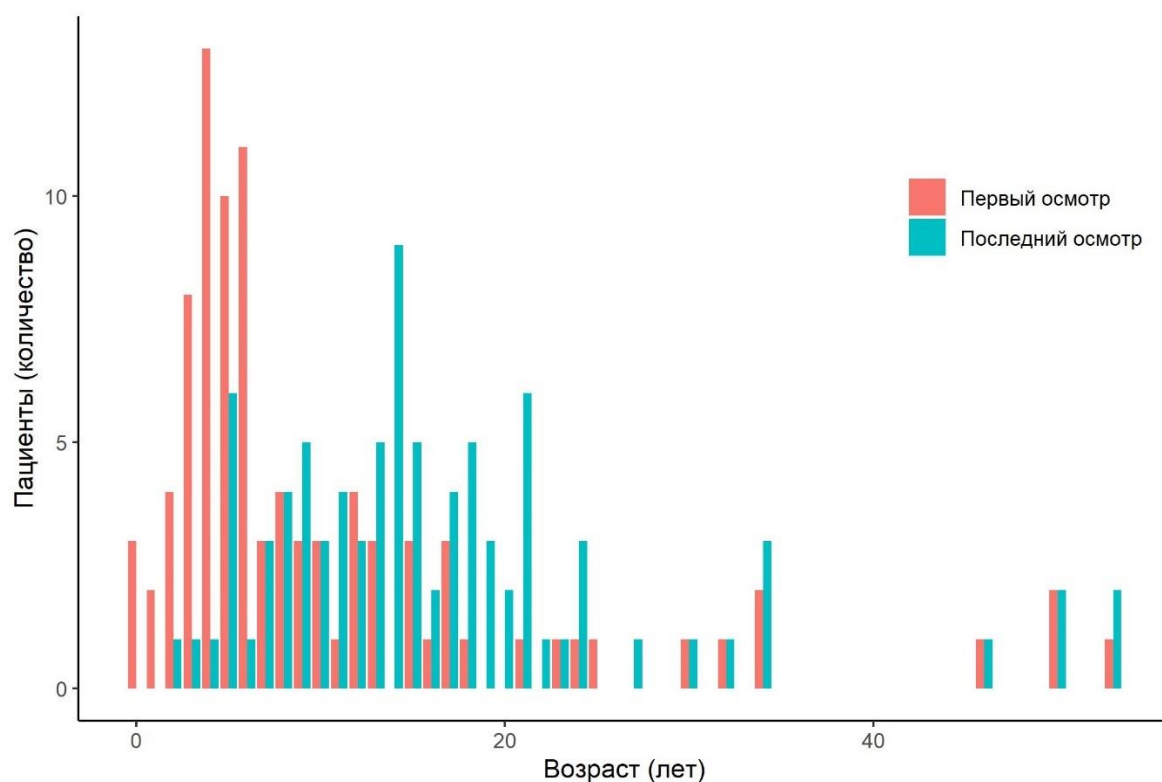


Рисунок 1. Возраст и количество пациентов с SOPH-синдромом во время первого и последнего осмотра.

Подавляющее большинство пациентов SOPH родились в срок (72/75), при физиологических родах (34/43), нормальным весом (71/77) и длиной (69/72), с Апгар не ниже 7 баллов (40/43). Первичные жалобы пациентов с SOPH выражаются в отставании в росте по сравнению со сверстниками (90%), ухудшении зрения (72%) в том числе в исчезновении полей зрения, а также в частых инфекционных заболеваниях (71%). Также существенную часть занимают жалобы на проблемы с желудочно-кишечным трактом (27%) и на неврологические расстройства (37%).

Общий фенотип представлен диспластическим типом телосложения, гипотрофией, низким ростом с микромелией конечностей (Рисунок 2).

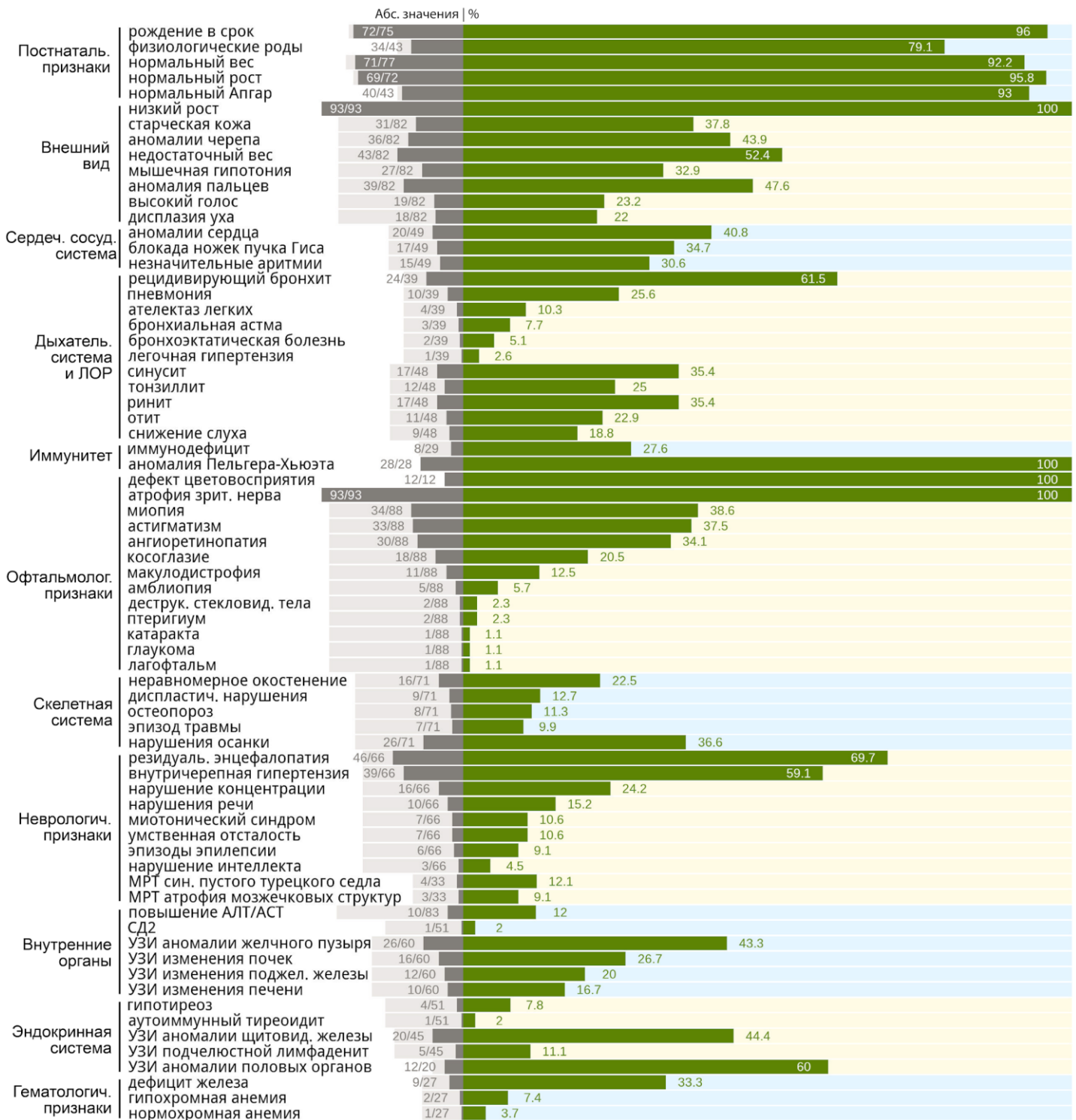


Рисунок 2. Сводная таблица признаков SOPH синдрома.

Примерно в половине случаев встречаются аномалии черепа в виде гидроцефалии (брахицефалии, микроцефалии), короткая шея, высокий лоб, широкая грудная клетка, брахидактилия, гипотония мышц, а также дряблость и сухость кожи. Реже можно обнаружить стоматологические аномалии зубов, высокий голос, дисплазии ушных раковин, миндалевидные глаза и клинодактилию пальцев.

В литературе было найдено описание 18 пациентов с патогенными вариантами только на С-конце белка NBAS. Из них 15 пациентов подошли для сравнительного анализа. Фенотип данных пациентов в основном представлен низким ростом, в примерно половине случаев выявляются прогероидные черты лица, лицевые дисморфии, аномалии черепа и пальцев, реже встречаются дисплазии ушных раковин, высокий голос и гипотрофия. Можно сказать, что данные признаки характерны для фенотипа вариантов на С-конце белка NBAS.

**Сердечно-сосудистая система.** Из всех пациентов 49 прошли обследование сердечно-сосудистой системы у кардиолога посредством ЭКГ и ЭхоКГ. Почти в половине случаев были обнаружены малые аномалии сердца не имеющих клинически значимых проявлений (20/49), но также был обнаружен врожденный порок сердца у одного пациента. Нарушения проводимости проявлялись в большинстве случаев блокадой ножек пучка Гиса (17/49), нарушения ритма встречались реже и проявлялись в основном эпизодами невыраженных аритмий (15/49). В литературе был описан лишь один случай дефекта межжелудочковой перегородки без клинических проявлений. Можно сказать, что значимых нарушений сердечно-сосудистой системы при вариантах на С-конце белка NBAS не наблюдается.

**Дыхательная система и ЛОР органы.** У пациентов, прошедших диагностику дыхательной системы (n=39), наиболее часто обнаруживался рецидивирующий бронхит (24/39). К остальным явлениям можно отнести пневмонии (10/39), ателектаз легкого (4/39), бронхиальную астму (3/39), бронхоэктатическую болезнь (2/39) и единичный случай легочной гипертензии. Среди патологий ЛОР-органов наиболее частыми являются синуситы (17/48), тонзиллиты (12/48), риниты (17/48) и отиты (11/48). В восьми случаях наблюдалась кондуктивная потеря слуха и в одном сенсоневральная. В литературе жалобы на частые инфекционные заболевания, например бронхиты и пневмонии, встречались в половине случаев. Также в одном случае была обнаружена тугоухость смешанной этиологии, что в целом соответствует фенотипу С-конца белка NBAS.

**Офтальмологические признаки.** У всех пациентов была обнаружена частичная атрофия зрительного нерва. Наиболее частыми сопутствующими признаками к атрофии зрительного нерва оказались миопия (34/88), астигматизм (33/88) и ангиоретинопатия (30/88). Реже встречались страбизм (18/88), макулодистрофия (11/88). Были также обнаружены несколько случаев с амблиопией (5/88), деструкцией стекловидного тела (2/88), птеригиумом (2/88). Единичными случаями проявлялись катаракта, глаукома, лагофтальм и у одного пациента обнаружили одновременно энтропион, трихиаз, птеригиум. Также было выявлено в том числе и нарушение при прохождении псевдоизохроматического теста Ишихары пациентами с SOPH (n=12). В литературе у всех подробно описанных пациентов (n=15) была обнаружена атрофия зрительного нерва. В половине случаев обнаружился экзофтальм, реже миопия, нистагм, страбизм и в одном случае глаукома. У двух пациентов был выявлен дефект цветовосприятия. В целом офтальмологические признаки соответствуют фенотипу вариантов на С-конце белка NBAS.

**Костная система.** Показанием к направлению в Медико-генетическую службу являлся синдром нанизма с подтвержденным отсутствием эндокринологической этиологии (Рисунок 3А и 3Б). Радиологические исследования с оценкой костного возраста у пациентов (n=70) выявили склонность к отставанию костного возраста у пациентов с SOPH в возрасте примерно до 12 лет без наблюдаемой зависимости от пола. Дополнительными радиологическими находками оказались неравномерное окостенение (16/71), диспластические изменения костей (9/71), включая *Coxa valga* и *Geni valgum*, остеопороз (8/71), очень редкие случаи артроза, остеохондроза, плоскостопия.

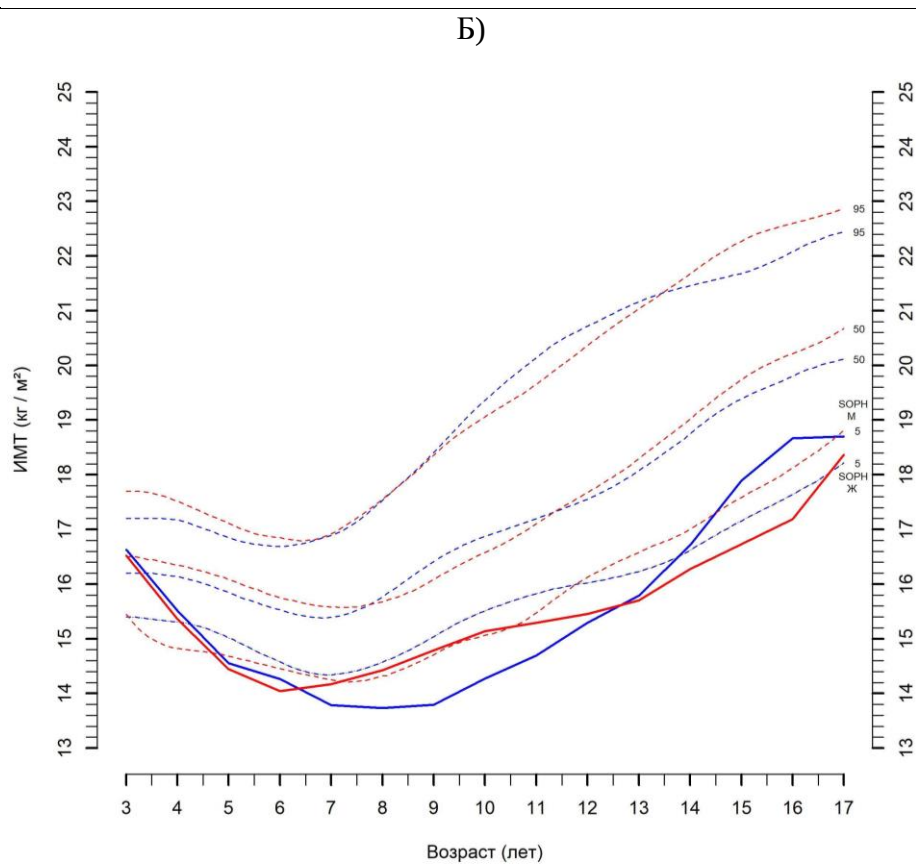
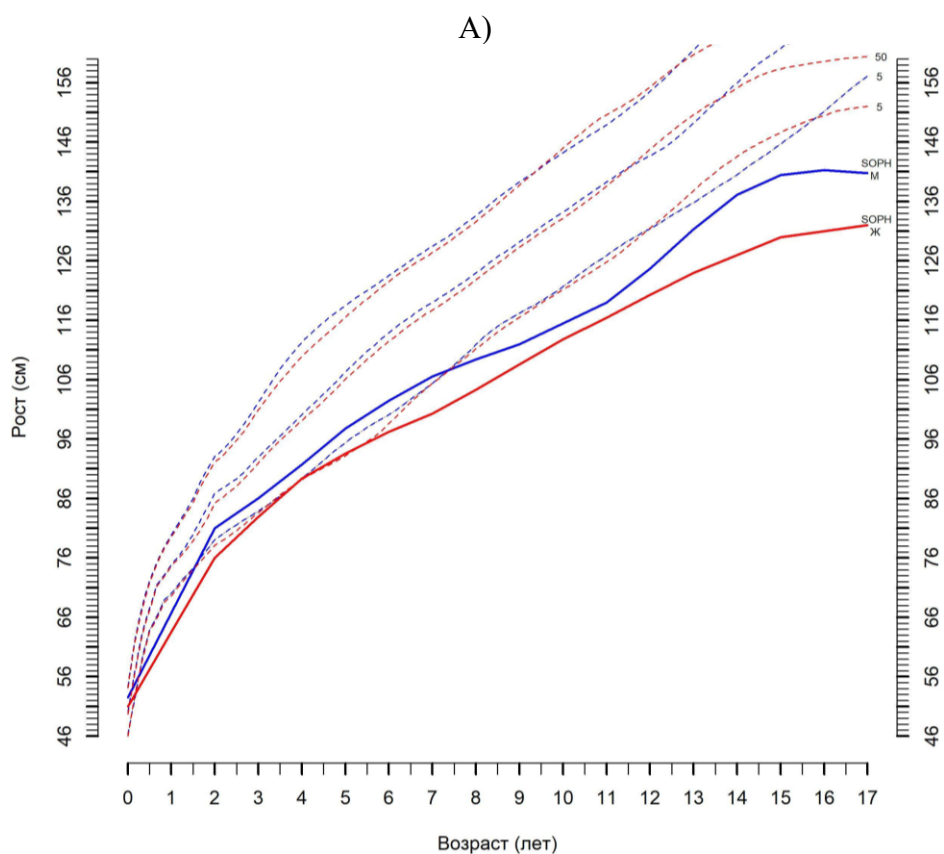


Рисунок 3. А) График роста и возраста. Б) График ИМТ и возраста. Верхние пунктирные линии соответствуют 95, средние 50, нижние 5 центили. Красные линии соответствуют женщинам, синие мужчинам с SOPH-синдромом.

Травматические эпизоды в виде переломов, вывихов и растяжений встречались у шести пациентов. Нарушения осанки наблюдались у двадцати шести пациентов. Среди данных литературы хоть и обнаруживались редкие случаи остеопороза ( $n=4$ ), аномалий развития скелета ( $n=3$ ), в том числе поражения позвоночника ( $n=2$ ), но никаких дополнительных признаков найдено не было. У нескольких пациентов ( $n=3$ ) имелись эпизоды переломов, но диагноза по типу несовершенного остеогенеза поставлено не было.

**Неврологические признаки.** У пациентов, прошедших осмотр неврологом ( $n=66$ ), в основном были жалобы на головную боль, нарушения сна, заторможенность и вялость (46/66), в целом напоминающих симптомы резидуальной энцефалопатии. Некоторые пациенты (16/66) жаловались на нарушение концентрации и быструю утомляемость. У большинства из них была обнаружена внутричерепная гипертензия (39/66), подтвержденная краниологическим исследованием. Более редкими неврологическими находками являлись миотонический синдром (7/66), задержка психического развития (7/66) и нарушения речи (10/66), при этом нарушения интеллекта было обнаружено у троих пациентов (3/66). У двоих пациентов был диагностирован ночной энурез. Были также обнаружены единичные случаи аномалии головного мозга вариант Денди-Уокера, а также единичный случай аффективно-респираторного пароксизма. У 33 пациентов было проведено исследование структур головного мозга. У трех из них была обнаружена атрофия структур мозжечка, а у четырех синдром пустого турецкого седла. У трех человек обнаружилось расширение перивентрикулярной зоны, периваскулярных пространств задних рогов боковых желудочков. Субарахноидальные пространства слегка расширены в области полюсов лобных долей и в области боковых щелей мозга.

Из неврологических находок по данным литературы у половины описанных пациентов было обнаружено нарушение интеллекта и мышечная гипотония, реже были описаны эпизоды судорог. У двух пациентов на МРТ были описаны аномалии мозга в виде J-образного турецкого седла, у одного было описано истончение мозолистого тела, а у другого в дополнение к этому еще и гипоплазия червя мозжечка. В целом можно сказать, что неврологическая картина соответствует фенотипу вариантов на С-конце белка NBAS.

**Внутренние органы.** Было также проведено ультразвуковое исследование внутренних органов ( $n=60$ ). Наиболее частым признаком были аномалии желчного пузыря (26/60), среди которых клинически значимыми были 12 из них. Усиление сосудистых рисунков и изменение паренхим печени (10/60) и поджелудочной железы (12/60) не сопровождалось значительными клиническими проявлениями, кроме одного подтвержденного случая сахарного диабета 2 типа и двух случаев с гепатитом В. Зафиксированы два эпизода транзиторного повышения уровня глюкозы в крови, но без дальнейшего обследования. Уплотнение синусов почек встречалось в шестнадцати случаях (16/60), было также описано два случая пиелоектазии с гидрокаликозом, но при этом наличие осадка в мочевом пузыре встречалось не всегда (5/60). Была обнаружена аномалия развития в виде поликистоза обеих почек у одного пациента, а также ирригоскопией один случай долихосигмы. Литературный обзор по поражениям внутренних органов выявил лишь несколько случаев гепатомегалии ( $n=3$ ) и спленомегалии ( $n=2$ ). Биопсия печени у одного пациента показала жировую инфильтрацию, у трех других изменений при биопсии не было обнаружено.

Несмотря на отсутствие у якутских пациентов эпизодов печеночной недостаточности или/и других значимых печеночных событий, почти во всех описанных литературных данных ( $n=13$ ) обнаружались эпизоды повышения АЛТ и АСТ. Из них у пяти описаны случаи полноценной острой печёночной недостаточности (ОПН). В целом можно сказать, что повышение печеночных ферментов можно встретить при вариантах NBAS даже при SOPH синдроме, но с более редкими

случаями тяжелого осложнениями в виде ОПН.

**Эндокринологическая система.** Осмотры эндокринологом (n=51) прошли пациенты с подозрением на гипотиреоз, который считался эндемичным на территории Республики Саха. Тем не менее достоверно можно говорить только о четырёх случаях гипотиреоза (4/51) и одном аутоиммунного тиреоидита. Ультразвуковое исследование, проведенное почти у всех данных пациентов (45/51), выявило аномалии щитовидной железы в около половине случаев (20/45). В пяти случаях дополнительно был обнаружен подчелюстной лимфаденит без клинически значимых проявлений.

Аномалии половых органов (12/20) проявлялись гипоплазией матки и яичников, гипогонадизмом, у двух пациенток была обнаружена ретроверсия матки. Литературные находки по эндокринологическим признакам обнаружили три случая инсулин-зависимого нетипичного сахарного диабета. В целом можно сказать, что эндокринологическая картина у пациентов с вариантами на С-конце белка NBAS стабильна.

**Кроветворение.** Двадцать семь пациентов наблюдались у гематолога в том числе по поводу железодефицитной (9/27), гипохромной (2/27) и нормохромной анемии (1/27). Шесть пациентов были направлены на исследование морфологии тромбоцитов, где наблюдалось в основном повышение агреггируемости (4/6), умеренный анизоцитоз (4/6), наличие атипичных форм тромбоцитов (5/6), а также вакуолизация гиаломера (3/6). Был зафиксирован эпизод лейкомоидной реакции у одного пациента. У всех 28 обследованных пациентов была обнаружена пельгеровская аномалия лейкоцитов. По литературным данным у более половины пациентов была обнаружена пельгеровская аномалия лейкоцитов. Были также описаны случаи анемии, тромбоцитопении и лейкопении, что в целом соответствует фенотипу вариантов на С-конце белка NBAS.

### Иммунопрофилирование

Иммунологические исследования проводились у пациентов с SOPH в Медико-генетическом центре и являлись частью рутинной диагностики. Осмотр иммунологом-аллергологом прошли 29 пациентов. По данным генетических карт у 8 пациентов было обнаружено иммунодефицитное состояние. У одной из пациенток в углубленном исследовании наблюдалась инверсия иммунорегуляторного индекса (ИРИ), снижение абсолютного содержания В- и NK-клеток, повышение содержания CD3+CD4-CD8- до 8,8% и CD+CD16,56+ клеток, а также изменения в субпопуляционном составе В-лимфоцитов, экспрессия BAFF-рецептора была резко снижена по сравнению с донором.

**Иммунофенотипирование.** Для пациентов из выборки характерны частые повторные эпизоды различных инфекционных заболеваний, гипогаммаглобулинемия, пониженное число NK-клеток. В текущем исследовании в иммунограмме всех больных SOPH-синдромом было обнаружено снижение как процента CD16+CD56+ NK-клеток, так и абсолютного количества CD16+CD56+ NK-клеток (Рисунок 4А и 4Б). Также у больных с SOPH-синдромом было выявлено повышение процента CD3+ клеток.

Согласно данным литературы, снижение уровня иммунокомпетентных клеток наблюдалось также при варианте NBAS с.1948C>T, при котором наблюдались такие симптомы как снижение интеллекта и печеночная недостаточность [Ricci S. et al., 2019]. Аналогичные иммунологические отклонения также наблюдались при компаундном варианте SOPH-синдрома в другой работе [Khoreva A. et al., 2020].

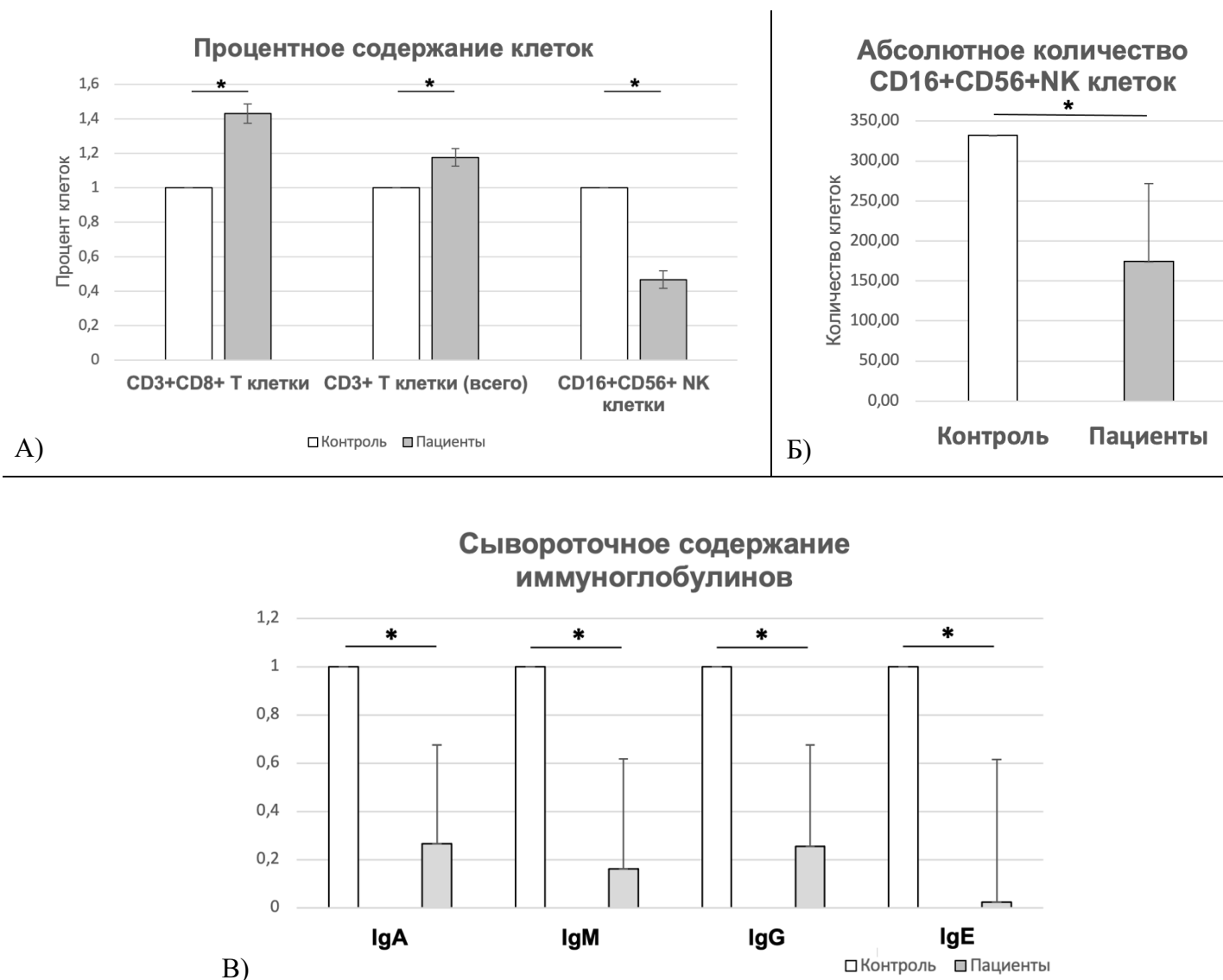


Рисунок 4. А) Процентное содержание иммунокомпетентных клеток. Б) Сывороточное содержание уровня иммуноглобулинов. В) Абсолютное количество CD16+CD56+NK-клеток. Данные представлены в виде средних величин и стандартного отклонения ( $p < 0,05$ ).

**Исследование сывороточного содержания иммуноглобулинов.** Уровень иммуноглобулинов был исследован в сыворотке условно здоровых индивидов и больных SOPH-синдромом. Уровни всех иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG, IgE) были значительно снижены у пациентов с SOPH-синдромом по сравнению с контролем (Рисунок 4В).

При анализе литературы также были обнаружены сниженные уровни сывороточных иммуноглобулинов у пациентов с патологическими вариантами гена *NBAS* [Khoreva A. et al., 2020; Ricci S. et al., 2019]. На основе этих данных можно предположить, что патогенные варианты *NBAS* связаны со снижением иммунологического статуса пациентов с SOPH-синдромом, что может быть связано с частыми инфекционными заболеваниями в детстве.

#### Разработка тест-системы для диагностики варианта с.5741G>A методом ПЦР с флуоресцентными зондами

В Якутии наблюдается высокая частота носительства варианта SOPH в якутской популяции. В Медико-генетическом регистре г. Якутска находятся 93 пациента с SOPH-синдромом. Только за

период 2021–2023 гг. в рамках экспедиций НИЛ «Молекулярная медицина и генетика человека» в регионы Республики Саха в собранных 540 образцах ДНК были обнаружены 4 гетерозиготных носителя варианта с.5741G>A.

Наиболее подходящим методом для скрининговых исследований является одностадийная ПЦР с флуоресцентными зондами, где детекция свечения происходит в реальном времени в процессе амплификации. Для этого метода были разработаны праймеры, а также зонды для детекции двух аллелей – 5741A и 5741G (Таблица 1). Далее был подобран необходимый температурный режим, подобраны образцы ДНК для контрольных испытаний, включая ДНК больных носителей и здоровых людей.

Таблица 1. Параметры зондов.

| Тип | Последовательность     | Флуорофор | Длина | Тм компл. | Тм зам. | Δ Тм  |
|-----|------------------------|-----------|-------|-----------|---------|-------|
| ДТ  | CTGTCTGTGGAAGCCCGT     | ROX       | 18    | 61.3°C    | 55.9°C  | 5.4°C |
| М   | GCTGTCTGTGGAAGCCCATATA | R6G       | 20    | 61.7°C    | 57.9°C  | 3.8°C |

Алгоритм диагностики носительства патогенного варианта SOPH включает следующие этапы:

1. Выделение ДНК: методом фенол-хлороформной экстракции либо экспресс методом, концентрация ДНК приемлема от 10 нг/мкл.
2. Приготовление ПЦР-смеси, куда входят: реакционная смесь, выделенная ДНК (матрица), праймеры, зонды.
3. Запуск термоциклера: 95°C – 5 мин, (95°C – 15 с., 60°C – 50 с.) x 39 циклов.
4. Интерпретация результатов (Рисунок 5).

Интерпретация результатов основывается на флуоресценции зондов R6G и ROX. На приведенном графике показаны четыре типа образцов (точки на графике рисунка 5).



Рисунок 5. Пример кластеризации образцов ДНК на результатах запуска тест-системы. Зеленым выделены образцы с диким типом, желтым – гетерозиготы, красным – пациенты SOPH, черным – вода. Значения флуоресценции приведены в ОЕФ (относительных единицах флуоресценции).

Клиническая (диагностическая) чувствительность была проверена на 10 образцах ДНК пациентов с синдромом SOPH, а также на 10 образцах носителей. Исследование проводилось трижды, и в одном из исследований ставились три реплики – то есть образцы были в 5 повторностях. Диагностическая чувствительность составила 100%. Диагностическая специфичность определялась на 10 образцах здоровых индивидов. Образцы были взяты из экспедиционных материалов. Данные образцы ставились вместе с образцами пациентов и носителей, также в 5 повторностях. Диагностическая специфичность составила 100%.

### ***In silico* анализ стабильности белка NBAS при патогенных миссенс-вариантах**

Был произведен поиск в литературе и базах данных патогенных вариантов и их фенотипических признаков. После составления сводной таблицы из неё были исключены варианты со стоп-кодонами, так как оценить стабильность белка по одной аллели представляется сложной задачей в плане интерпретации, хотя ген *NBAS* и не обладает гаплонедостаточностью согласно базе данных gnomAD. Также были исключены пациенты с компаунд-вариантами, имеющие по две измененные версии белка. Далее, с помощью программы визуализации молекул Yasara и программой для анализа белковых трехмерных структур FoldX, был произведен анализ стабильности белка NBAS при аминокислотных заменах (Рисунок 6).

На рисунке 6 продемонстрировано, что вариант SOPH является наиболее дестабилизирующим среди всех описанных вариантов на С-конце белка NBAS. Однако достоверной ассоциации выраженных нарушений стабильности белка с проявлением у пациентов конкретных фенотипических признаков выявлено не было.

Стоит отметить, что конкретно по данным пациентам информация ограничена клиническими случаями с описанием ОПН. Но, в связи с тем, что у пациентов с SOPH нет ОПН, нарушение стабильности белка пока невозможно ассоциировать с печёночным фенотипом. Тем не менее, возможно оно влияет на тяжесть заболевания.

Вариант Gln1201Pro был описан у двух сибсов, один из которых умер во время приступа ОПН [Nazmi F. et al., 2021]. Вариант Gly254Asp был найден у пациента с четырьмя приступами ОПН, сопровождающимися острой почечной недостаточностью и эпилептическими припадками, что не характерно для ILFS2 [Mallakmir S. et al., 2019]. Вариант Cys1199Tyr, найденный у годовалого ребёнка, также был ассоциирован с ОПН [Cheng Y. et al., 2022]. Авторы данной работы связали тяжелый фенотип у данного ребёнка с приемом внутрь амоксициллина и провели плазмаферез, после чего состояние у пациента улучшилось. Информация о пациенте с вариантом p.Leu271Pro был опубликован внутри мультицентрового исследования впервые, поэтому данные о нем доступны лишь в табличном формате. Хотя у него и обнаружили приступы ОПН, ни о количестве приступов, ни о возрасте пациента при данных приступах нет информации. Стоит лишь отметить, что, кроме неспецифических симптомов, включающий неврологические и мышечные симптомы, у данного пациента был обнаружен низкий рост и сниженные IgG.

Однако, некоторые варианты не ведут к нарушению стабильности, что может говорить о стабильности белка как об одном из факторов мультисистемной клиники NBAS, но не ключевом. Это может указывать на то, что в развитии клинических проявлений основную роль играют также и нарушенные взаимодействия с другими молекулами более, чем нарушенная стабильность. Учитывая роль NBAS в связке множеств молекул мембранного трафика, необходимы дальнейшие исследования связывания белка с его основными известными партнерами по взаимодействию – ZW10, RINT1.

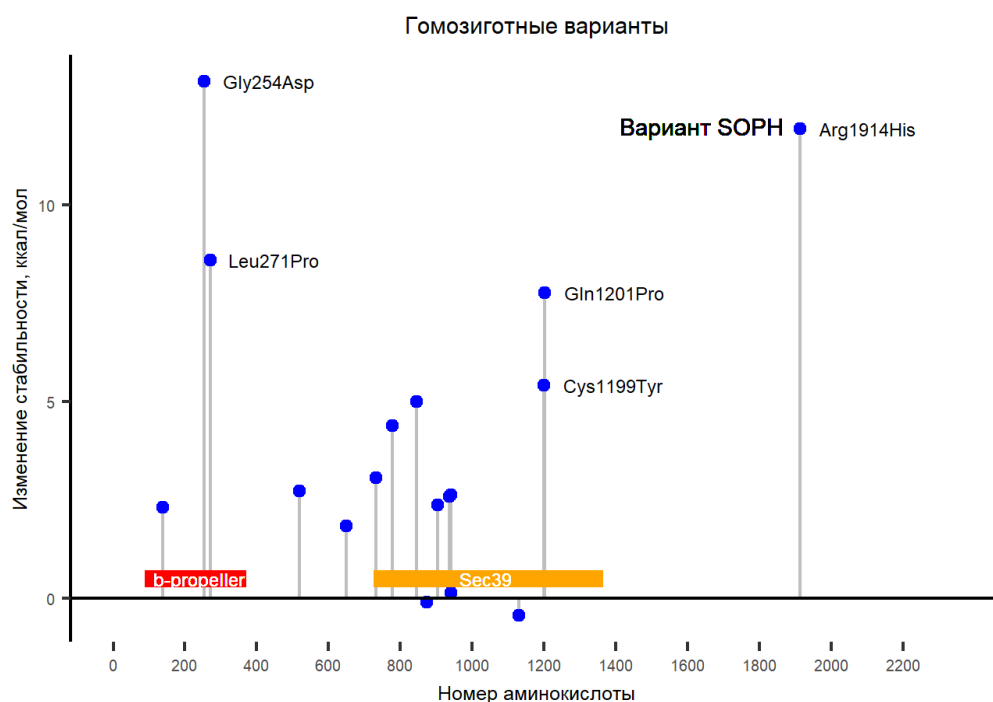
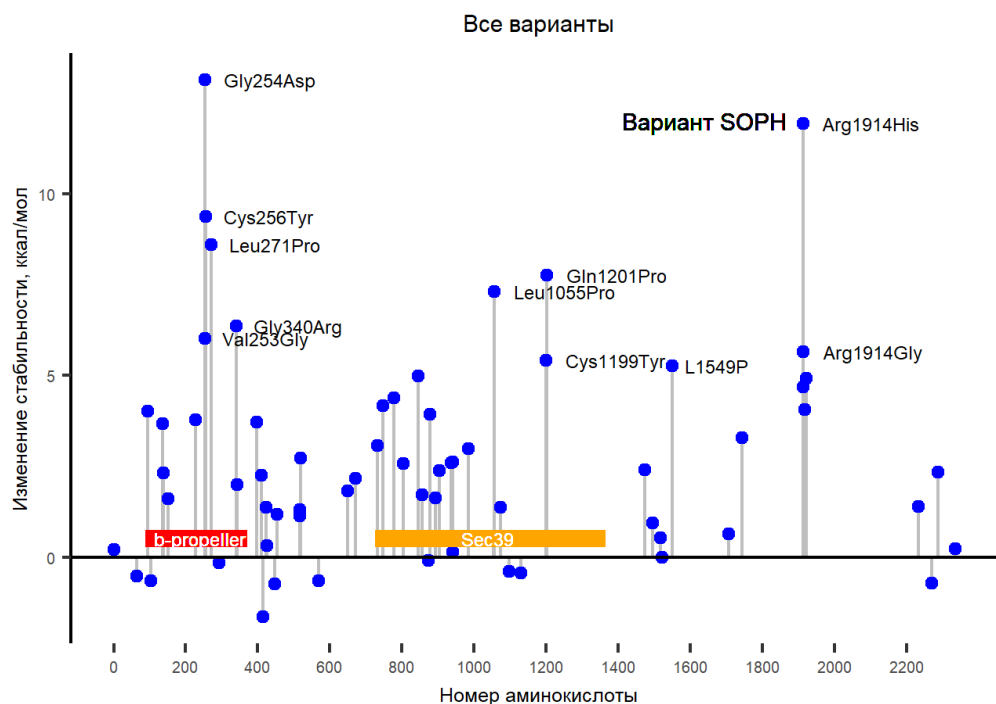


Рисунок 6. График изменения стабильности белка при патогенных миссенс гомозиготных (снизу) и компаунд-гетерозиготных (сверху) вариантах гена *NBAS*.

### Моделирование структур комплекса NBAS-RINT1-ZW10

**NBAS** содержит консенсусные сайты связывания как часть комплекса **NBAS-RINT1-ZW10**. Наиболее изученная роль **NBAS** заключается в его участии в ретроградном транспорте в качестве компонента комплекса **NBAS-RINT1-ZW10 (NRZ)**, который является частью более крупного комплекса **STX18**. Сам комплекс **STX18 (USE1, BNIP1, STX18)** является частью группы белков **t-SNARE**, участвующих в слиянии везикул, происходящих из аппарата Гольджи,

содержащих v-SNARE (Sec22b), с эндоплазматическим ретикуломом (ЭР). Перед стадией слияния начальная связь везикулы и ЭР происходит посредством группы белков CATCHR, которая включает комплекс NRZ. В этом контексте NBAS и RINT1 связываются с USE1 и BNIP1 соответственно, а ZW10 связывает NBAS и RINT1 вместе.

В данной работе мы использовали AlphaFold (AF) для исследования областей связывания белка NBAS. Входными данными были белковые последовательности в формате FASTA. N-концевая область NBAS с остатками с 734 по 900 была связана с USE1 (Рисунок 7в), тогда как С-концевая область с 1336 по 1643 была связана с ZW10 (Рисунок 7а). Чтобы выяснить, действительно ли предсказанные регионы USE1 и ZW10 являются сайтами связывания NBAS, запуски AF2 также были выполнены с их уже известными партнерами. Перекрытие точек связывания NBAS и других белков может указывать на низкую достоверность прогноза или на другой ранее неописанный способ взаимодействия. Однако этого не наблюдалось, и каждая область соответствующего белка отвечала за специфическое взаимодействие (Рисунок 7б и 7г).

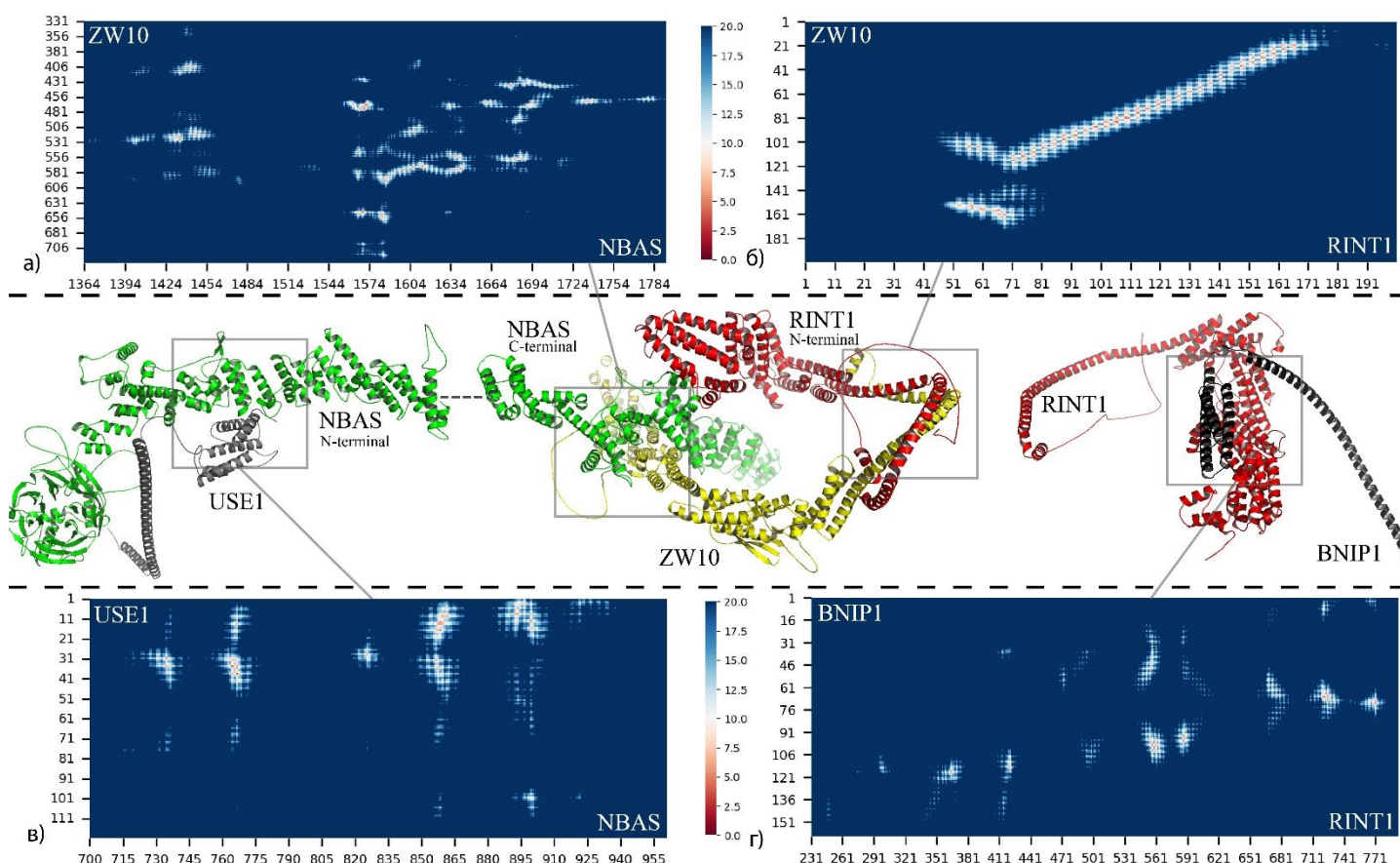


Рисунок 7. Трехмерная структура компонентов NRZ с Rab18 и тепловая карта консенсусных сайтов связывания. а – Тепловая карта NBAS, ZW10 и RINT1 в комплексе NRZ с Rab18. б – Тепловая карта компонентов NRZ в паре исключительно с Rab18.

Полученные результаты были верифицированы с помощью третьей версии AlphaFold [Abramson J. et al., 2024]. Были получены схожие результаты в отношении консенсусных сайтов связывания всех компонентов комплекса NRZ и их соответствующих партнеров по связыванию.

**Rab18 связывается с NBAS как часть комплекса NRZ.** Rab18 представляет собой Rab-ГТФазу, которая регулирует возникновение и созревание липидных капель (ЛК), а также, как известно, модулирует аутофагию [Feldmann A. et al., 2017; Xu D. et al., 2018]. ЛК происходят из ЭР и представляют собой места хранения липидов и играют ключевую роль в липидном гомеостазе.

После возникновения липидные капли далее контактируют с мембраной ЭР для последующего созревания. Это взаимодействие регулируется теми же комплексами: комплексом NRZ и SNARE [Raote I. et al., 2018].

В данной работе были идентифицированы консенсусные сайты связывания Rab18 с компонентами комплекса NRZ. Сначала была начата генерация комплекса Rab18 с каждым компонентом NRZ отдельно с использованием AF2.

Однако консенсусные сайты связывания не были найдены, которые могли бы удовлетворить нашим критериям уверенности. Затем был проведён анализ Rab18 с парой белков из комплекса NRZ (Rab18 с NBAS-ZW10 и ZW10-RINT1). Неожиданно консенсусные сайты связывания Rab18 были идентифицированы в области NBAS 1074-1237 аминокислот исключительно в присутствии ZW10. Эта область не перекрывается с обнаруженными ранее предсказанными точками взаимодействия NBAS/USE1 и NBAS/ZW10, что может косвенно указывать на достоверность этого предсказания.

Результаты AF3 были аналогичны результатам AF2 в отношении сайтов взаимодействия NBAS/RAB18, но парный анализ не потребовался для связывания NBAS/RAB18 (присутствие ZW10 не было необходимым, как было при запуске с AF2). Наблюдался сайт связывания Rab18 с C-концами ZW10 и RINT1 соответственно, но что интересно, эти сайты исчезали в присутствии NBAS. Согласно моделированию AF, можно сказать, что NBAS, по-видимому, является предпочтительным партнером связывания для Rab18 в отношении комплекса NRZ, в то время как ZW10 и RINT1 все еще имеют консенсусные сайты связывания с Rab18 по отдельности.

### **Картирование патогенных вариантов на смоделированную структуру белка NBAS и его сайты связывания.**

**pLDDT.** Картирование патогенных вариантов на структуру NBAS визуально демонстрирует их накопление в местах связывания, что может указывать на надежность предсказанных регионов как важных функциональных частей белка (Рисунок 8а и 8в).

Однако варианты, расположенные ниже сайта связывания ZW10, также обнаруживают накопление в регионах с еще неясной функцией. Несмотря на их предполагаемую важность, наряду с  $\beta$ -пропеллером, эти области не показали взаимодействия во время моделирования, и их точное назначение остается спекулятивным (Рисунок 8б).

**РАЕ.** График РАЕ иллюстрирует, как одна аминокислота расположена в структурном выравнивании относительно другой аминокислоты. Таким образом, график РАЕ определяет упаковку доменных структур и их взаимное расположение. В целях обсуждения наиболее упакованные или отличительные структурные области были названы «субдоменами» белка NBAS в соответствии с графиком РАЕ (Рисунок 9б, 9г).

Рисунок 9 демонстрирует плотность упаковки аминокислот с другими в предсказанной структуре белка, а также позволяет предположить их влияние на позиционирование и последующее сворачивание субдоменов белка. Области сайтов связывания, ранее локализованные изолированно на рисунке 8, здесь показывают, что их субдоменная принадлежность достаточно широка, чтобы достигать остатков, с которыми их линейно не очевидно связать (Рисунок 9а, 9г).

Известные миссенс-патогенные варианты локализованы всего на 76 аминокислотах, тем не менее, эти остатки находятся в пространственной зависимости почти с 80% всего белка NBAS, что позволяет предположить далеко идущие последствия влияния этих вариантов на структуру белка (Рисунок 9в, 9г).

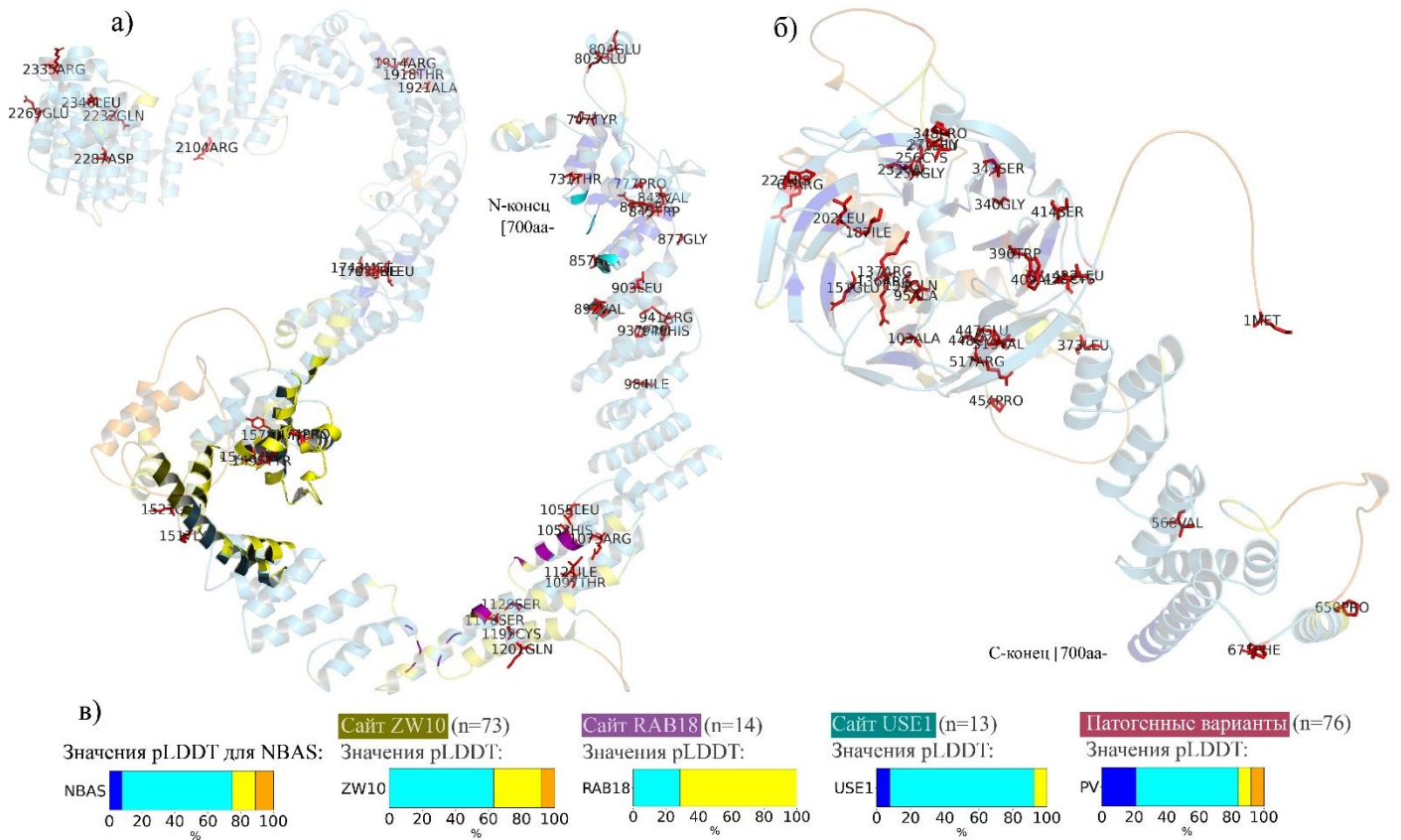


Рисунок 8. Белок NBAS с выделенными предсказанными сайтами связывания. а – Основные сайты связывания: ZW10 желтым, RAB18 фиолетовым и USE1 голубым. б –  $\beta$ -пропеллерный домен (соотношение с 8A не сохранилось). в – значения pLDDT (%) для компонентов белка NBAS

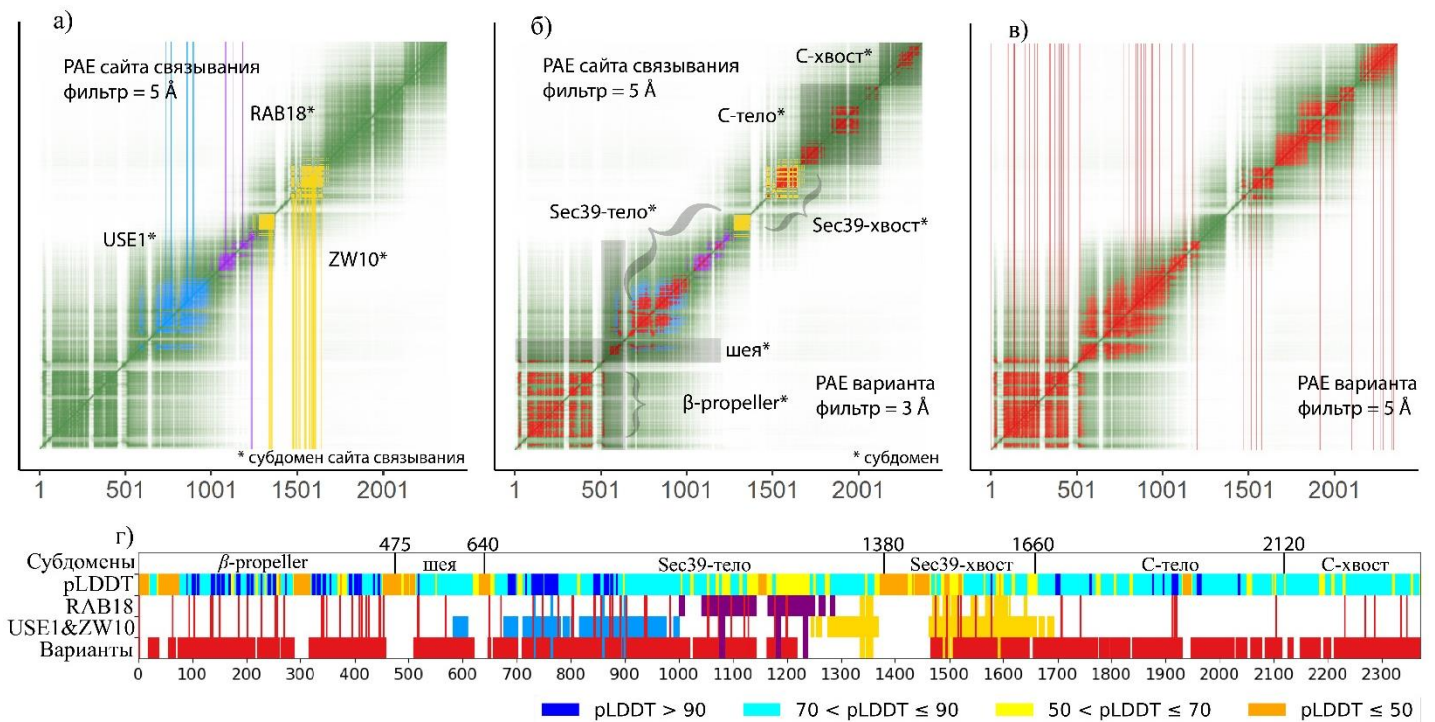


Рисунок 9. Картирование сайтов связывания на графике PAE. а – Субдомены сайтов связывания. б – Патогенные варианты и субдомены сайтов связывания. в – Субдомены патогенных вариантов. г – Линейное изображение субдоменов.

Интересно, что график PAE также показывает область на С-конце субдомена тела SEC39, где

не обнаружено воздействия патогенных вариантов. Эта область находится на стыке субдоменов сайтов связывания Rab18 и ZW10.

### Картирование вариантов, ассоциированных с триадой SOPH, на структуру белка NBAS.

График РАЕ, показанный на рисунке 10, состоит из известных миссенс-вариантов с соответствующими фенотипами. В отличие от несовершенного остеогенеза (НО), низкорослость может развиваться с патогенными вариантами практически во всех участках белка. При этом субдомены, пораженные НО, локализуются преимущественно вблизи  $\beta$ -пропеллера. График РАЕ указывает на то, что ключевыми факторами патогенеза тяжелого нарушения метаболизма коллагена у пациентов с вариантами NBAS могут быть «домен» и «субдомен»  $\beta$ -пропеллера и их ориентация. С другой стороны, низкий рост может развиваться из-за нарушения сборки С-тела, С-хвоста, USE1-части Sec39-тела или субдомена  $\beta$ -пропеллера.

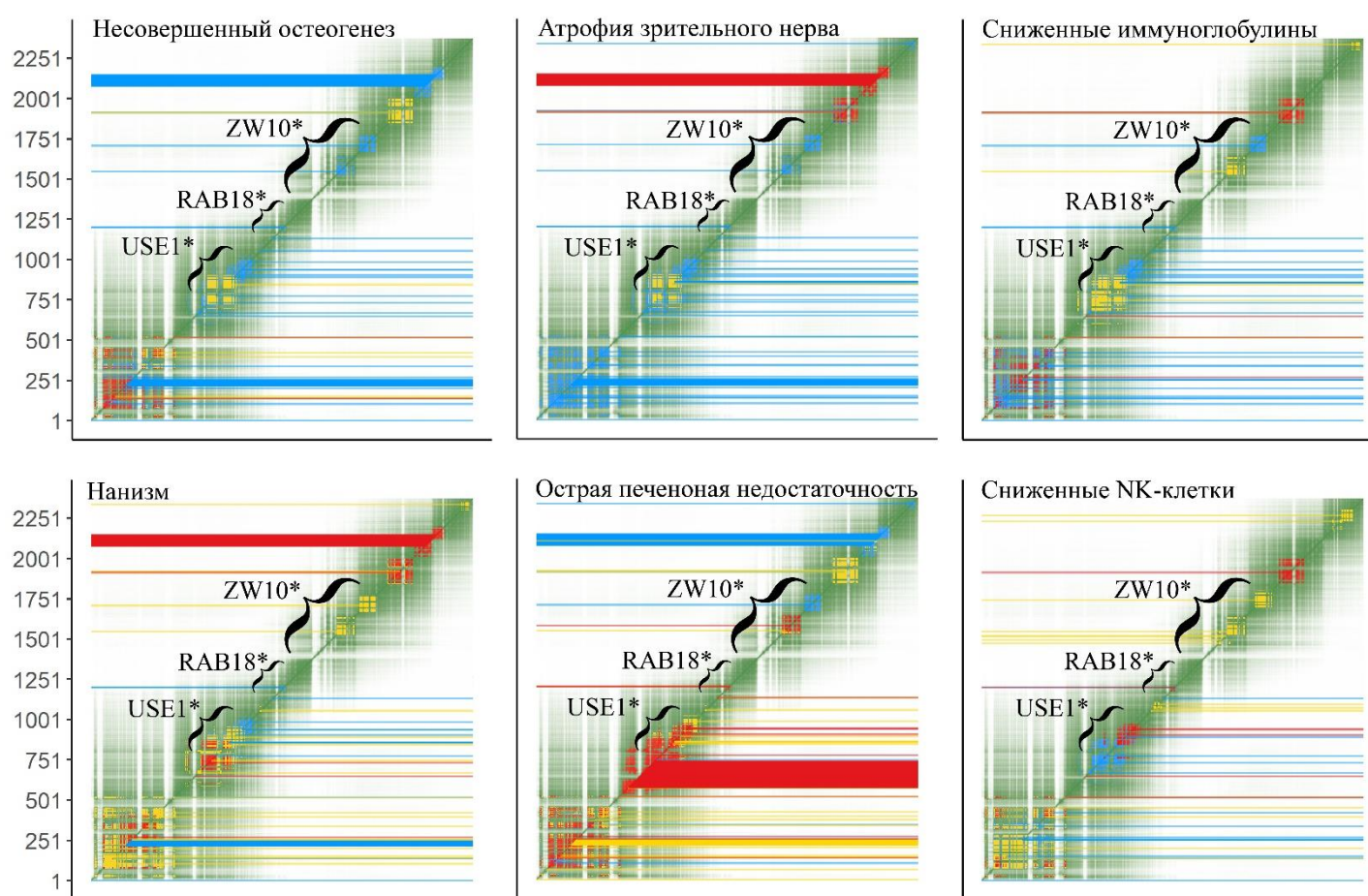


Рисунок 10. График РАЕ. Наличие фенотипа обозначается тремя цветами: красным – фенотип обнаружен у пациента с гомозиготным миссенс-вариантом; желтый – фенотип обнаружен у пациента со сложным гетерозиготным патогенным вариантом; и синий – фенотип не присутствовал у пациента с этим вариантом. Линии соответствуют определенным вариантам.

Интересно, что варианты, ассоциированные с атрофией зрительного нерва и острой печеночной недостаточностью (ОПН), имеют противоположный характер влияния на структуру NBAS; варианты атрофии зрительного нерва локализуются исключительно на С-теле и С-хвосте, а варианты ОПН – на оставшихся субдоменах NBAS. Примечательно, что ОПН, как известно, провоцируется лихорадкой. Учитывая, что фенотип ОПН может быть обусловлен вариантами, расположенными в каждом из предсказанных сайтов связывания, можно предположить, что

варианты ОПН нарушают физиологическую сборку комплекса NRZ и его основные взаимодействия. Нарушение сборки комплекса может усугубиться в условиях клеточного стресса, индуцированного высокой температурой при лихорадке. Однако варианты атрофии зрительного нерва, по-видимому, не нарушают известные функциональные части NBAS, и ее патогенез еще предстоит выяснить вместе со странной ролью C-конца, обсуждавшейся ранее.

В целом, белок-вариант-фенотипический подход (PVP) с использованием AlphaFold может служить примером для анализа фенотипа пациентов с вариантами генов в многофункциональных белках, патогенность которых демонстрирует мультисистемный фенотип. Крайне важно учитывать, что при использовании AlphaFold для анализа необходимо учитывать ограничения этого подхода. Предсказания AlphaFold могут быть менее надежными для белков с небольшим количеством гомологичных последовательностей в существующих базах данных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения научно-исследовательской работы проведена клинико-фенотипическая оценка 93 якутских пациентов с SOPH-синдромом. У новорождённых с SOPH-синдромом не наблюдалось отклонений по основным антропометрическим показателям. Дальнейшее их развитие происходит в нормальном темпе. Основные симптомы развиваются в возрасте около трех лет, когда родители начинают отмечать у детей задержку роста, частые инфекции, иногда доходящие до пневмонии. При дальнейшем обследовании обнаруживаются незначительные аномалии черепа и пальцев, атрофия зрительного нерва с дисфункцией колбочек.

Патологии внутренних органов, выявленные с помощью ультразвуковой диагностики, не имели выраженных клинических проявлений. Этот факт противоречит литературным данным об эпизодах повышения АЛТ/АСТ и ОПН у пациентов с вариантами на C-конце. Тем не менее, хоть при варианте SOPH p. Arg1914His наблюдаются эпизоды повышения уровня печеночных ферментов, это не является ведущим клиническим признаком. Клиническая картина, ассоциированная с поражением печени, у пациентов с SOPH не является ведущей, как например с компаунд-вариантами в домене  $\beta$ -пропеллера и SEC39. Таким образом, предполагается, что носительство варианта SOPH приводит к легкому фенотипу без ОПН в случае гомозиготного состояния.

Низкий рост с атрофией зрительного нерва по результатам данного исследования являются ведущими фенотипическими признаками для C-концевых вариантов гена NBAS, особенно в аспекте пациентов с SOPH. Это единственные симптомы, обнаруживаемые у всех пациентов. Хоть и описан один случай пациента без значимой задержки роста, все другие случаи в литературе согласуются с этим утверждением. Задержка роста проявляется в возрасте трех лет и является поводом для обращения к врачу. Атрофию зрительного нерва обычно обнаруживают позднее при дальнейшем обследовании. В настоящее время не существует адекватного лечения этих состояний.

Хотя иммунодефицит и не диагностируется с высокой частотой, количество больных с частыми инфекционными заболеваниями позволяет предположить, что эта группа больных может быть гиподиагностирована. Это согласуется с данными текущей работы и данными других исследовательских групп. Частые отиты и синуситы являются одними из ведущих симптомов фенотипа SOPH, требующих фармакологического вмешательства. Это один из немногих симптомов, который успешно лечится с положительным эффектом.

Разработана диагностическая тест-система для обнаружения патогенного варианта 5741G>A в гене NBAS, вызывающего заболевание SOPH-синдром. Тест-система основана на ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентных зондов. Разработка была испытана на

образцах пациентов с диагнозом SOPH-синдром, индивидов с гетерозиготным носительством данного варианта, а также здоровых индивидов.

Моделирование белкового комплекса NRZ выявило сайты-связывания его компонентов. По-видимому, вариант SOPH не влияет на образование комплекса NRZ. Была описана субдоменная структура белка NBAS, где вариант SOPH находится на субдомене С-тела. Картирование вариантов, ассоциированных с фенотипическими признаками, на структуру белка NBAS показало, что низкий рост может вызываться поражением различных субдоменов, в то время как атрофия зрительных нервов встречаются исключительно при локализации варианта на субдоменах С-тела и С-хвоста белка NBAS. Также вариант SOPH вызывает грубое нарушение стабильности белка, что может вносить существенный вклад в тяжесть заболевания и фенотипическую картину патогенного варианта.

## ВЫВОДЫ

1. У пациентов с синдромом SOPH выявлен расширенный клинический спектр, включающий не только скелетные и офтальмологические изменения, но и иммунодефицитное состояние, характеризующееся снижением уровней иммуноглобулинов (Ig) и натуральных киллеров (NK-клеток). Ретроспективный анализ лабораторных данных и медико-генетических карт не выявил у этих пациентов в анамнезе признаков острой печёночной недостаточности (ОПН).

2. Установлен домен-специфический фенотип для вариантов, локализованных на С-конце NBAS, проявляющийся низкорослостью и атрофией зрительного нерва. Сравнение пациентов с фенотипом SOPH и пациентов с другими NBAS-ассоциированными состояниями указывает на более лёгкое течение SOPH по сравнению с ILFS2; при этом признаки SOPH сохраняются во времени, а частота печёночных кризов при ILFS2, напротив, снижается с возрастом.

3. Патогенный вариант p.R1914H приводит к выраженному снижению стабильности белка и может служить важным патогенетическим фактором развития синдрома SOPH.

4. По результатам моделирования AlphaFold идентифицирована субдоменная архитектура NBAS, а также определены основные сайты связывания с его белками-партнёрами (ZW10, Rab18 и USE1). Варианты, ассоциированные с ОПН, преимущественно локализованы на субдоменах, где расположены эти сайты связывания. Тогда как атрофия зрительного нерва проявляется исключительно при вариантах, сосредоточенных в С-концевых субдоменах – С-тело и С-хвост, но при этом не затрагивающих известные сайты связывания.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах перечня ВАК РФ

1. **Жожиков Л.Р.** Литературный обзор NBAS-ассоциированных патологий. Все ли найдены? / **Л.Р. Жожиков**, Ф.Ф. Васильев, Н.Р. Максимова // Генетика. – 2023. – Т. 59, № 4. – С. 371-380. – DOI 10.31857/S0016675823040124 (РИНЦ, K2, Scopus Q4, WOS Q4, УБС-3)

2. **Zhozhikov L.** Origins of SOPH syndrome: A study of 93 Yakut patients with review of C-terminal phenotype / **L. Zhozhikov**, A. Sukhomyasova, E. Gurinova [et al.] // Clinical Genetics. – 2023. – Т. 103, №. 6. – С. 625-635. – DOI 10.1111/cge.14319 (Scopus Q2, WOS Q3)

3. **Zhozhikov L.** Protein-Variant-Phenotype Study of NBAS Using AlphaFold in the Aspect of SOPH Syndrome / **L. Zhozhikov**, F. Vasilev, N. Maksimova // Proteins: Structure, Function and Bioinformatics. – 2025. – Т. 93, №. 4. – С. 871-884. – DOI 10.1002/prot.26764 (Scopus Q1, WOS Q2)

### Результаты интеллектуальной собственности

1. Патент № 2819985 С1 РФ, МПК G01N 33/58, C12Q 1/6806, C12Q 1/6827. Способ диагностики варианта SOPH с.5741G>A в гене NBAS: № 2024106755: заявл. 15.03.2024: опубл. 28.05.2024 / **Л.Р. Жожиков**, Ф.Ф. Васильев, А.Л. Данилова [и др.]; заявитель ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова».

### Тезисы конференций

1. **Жожиков Л.Р.** Иммунологическое профилирование пациентов с редким наследственным заболеванием SOPH-синдром / **Л.Р. Жожиков**, Ф.Ф. Васильев, Н.Р. Максимова // Аспирантские чтения-2021: Сборник материалов научно-практической конференции аспирантов СВФУ, Якутск, 25 мая 2021 года. – Якутск: Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, 2021. – С. 70-72.

2. **Zhozhikov L.R.** Immunological profiling of patients with rare short stature, optic nerve atrophy, and Pelger-Huet anomaly (SOPH) syndrome / L.R. Zhozhikov, F.F. Vasilev, N.R. Maksimova // Advances in Health Sciences Research: Proceedings of the Conference on Health and Wellbeing in Modern Society (CHW 2021), Yakutsk, 27–29 октября 2021 года. – Amsterdam: Atlantis Press, 2021. – P. 261-264. – DOI 10.2991/ahsr.k.220103.052.

3. **Zhozhikov L.** Immunological profiling of patients with rare short stature, optic nerve atrophy, and Pelger-Huet anomaly (SOPH) syndrome / **L. Zhozhikov**, A. Ivanov, R. Ivanova, A. Sukhomyasova, F. Vasilev, N. Maksimova // Abstracts from the 54th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference: e-Posters // European Journal of Human Genetics. – 2022. – Vol. 30, No. S1. – P. 88-608. – DOI 10.1038/s41431-021-01026-1.

4. **Zhozhikov L.R.** Dissecting NBAS Protein Function using AlphaFold - Structural Insights of Rare Short Stature, Optic Nerve Atrophy, and Pelger-Huet Anomaly (SOPH) Syndrome / **L.R. Zhozhikov**, N.R. Maksimova // Proceedings of 11th Moscow Conference on Computational Molecular Biology MCCMB'23, Moscow, 03–06 августа 2023 года. – Moscow: IITP RAS, 2023.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CATCHR – Complexes Associated with Tethering Containing Helical Rods – комплексы содержащие в структуре спирали и ассоциированные со связыванием везикул

ILFS2 – Infantile Liver Failure Syndrome type 2 – синдром детской печёночной недостаточности 2 типа

NMD – Nonsense-Mediated mRNA Decay – нонсенс-опосредованный распад мРНК

SOPH – Short stature, Optic atrophy, Pelger-Huët anomaly – синдром низкого роста, атрофии зрительного нерва и пельгеровской аномалии лейкоцитов

pLDDT - предсказываемый тест на разницу локальных расстояний

PAE - предсказанная ошибка выравнивания

**Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:**

НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ

634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

Ученому секретарю диссертационного совета 24.1.215.03

д-ру мед. наук, доценту Назаренко М.С.

e-mail: [maria.nazarenko@medgenetics.ru](mailto:maria.nazarenko@medgenetics.ru)