

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-ВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.К. АММОСОВА»

На правах рукописи



Жожиков Леонид Русланович

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

1.5.7 Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Максимова Надежда Романовна

Якутск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 SORH-СИНДРОМ	16
1.1.1 Эпидемиология.....	16
1.1.2 Этиология и спектр патогенных вариантов	17
1.1.3 Клиника	18
1.1.4 Диагностика и медико-генетическое консультирование	19
1.1.5 Лечение SORH-синдрома	19
1.2 ГЕН И БЕЛОК NBAS.....	20
1.2.1 Функции белка NBAS.....	22
1.2.1.1 NBAS в комплексе NBAS-RINT1-ZW10	22
1.2.1.2 NBAS в комплексе с UPF1	25
1.2.2 Патофизиология NBAS.....	28
1.3 ГЕНОТИП-ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ NBAS-ПАТОЛОГИЙ.....	32
1.3.1 Подгруппа пациентов с вариантами в β -пропеллер	33
1.3.2 Подгруппа пациентов с вариантами в SEC39	35
1.3.3 Подгруппа пациентов с вариантами в С-конце.....	36
1.3.4 Другие состояния, ассоциированные с NBAS	37
1.4 СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ – ALPHAFOLD	39
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2.1 ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ	45
2.2.1 Оценка фенотипических признаков у пациентов SORH.....	45
2.2.2 Объект исследования при иммунопрофилировании	46
2.2.3 Мета-анализ	46
2.2.3.1 Литературный поиск для исследования домен-специфического фенотипа SORH	46
2.2.3.2 Литературный поиск для белок-вариант-фенотипического исследования NBAS.....	47
2.3 ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	48
2.3.1 Иммунопрофилирование.....	48
2.3.1.1 Иммунофенотипирование	48
2.3.1.2 Определение сывороточного уровня иммуноглобулинов.....	49
2.3.2 Выделение ДНК	49
2.3.3 Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.....	50
2.3.3.1 Дизайн олигонуклеотидов.....	50
2.3.3.2 Проведение количественной ПЦР в реальном времени	51
2.3.3.3 Анализ графиков количественной ПЦР в реальном времени	51
2.4 БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ	52
2.4.1 AlphaFold.....	52

2.4.1.1	Метрика достоверности локальной структуры.....	53
2.4.1.2	Метрика достоверности глобальной структуры.....	53
2.4.1.3	Картирование фенотипа	54
2.4.1.4	Метрика качества структур.....	54
2.4.2	Вычислительные исследования белка NBAS.....	55
2.4.2.1	Оценка нарушения стабильности белка при миссенс вариантах.....	55
2.4.2.2	Создание сети белок-белковых взаимодействий.....	57
2.4.2.3	Статистическая обработка данных.....	57
2.4.3	Репозиторий.....	57
Глава 3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	58
3.1	ГЕНОТИП-ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА SOPH-СИНДРОМА	58
3.1.1	Демография.....	58
3.1.2	Сердечно-сосудистая система.....	61
3.1.3	Дыхательная система и ЛОР органы.....	61
3.1.4	Офтальмологические признаки	62
3.1.5	Костная система	63
3.1.6	Неврологические признаки	65
3.1.7	Внутренние органы	66
3.1.8	Эндокринологическая система	67
3.1.9	Кроветворение	68
3.1.10	Фенотип варианта NBAS с.5741G>A (p.Arg1914His) в компаунд-гетерозиготном состоянии	69
3.2	ИММУНОПРОФИЛИРОВАНИЕ.....	72
3.2.1	Иммунофенотипирование	80
3.2.2	Исследование сывороточного содержания иммуноглобулинов	82
3.3	РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВАРИАНТА NBAS C.5741G>A (p.Arg1914His) МЕТОДОМ ПЦР С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ ЗОНДАМИ	83
3.3.1	Разработка ПЦР-системы	84
3.3.1.1	Подбор праймеров	84
3.3.1.2	Дизайн зондов.....	85
3.3.2	Оптимизация тест-системы.....	90
3.3.2.1	Реакционная смесь	91
3.3.2.2	Праймеры	92
3.3.2.3	Зонды с флуоресцентными метками	93
3.3.2.4	Деионизированная вода.....	94
3.3.3	Подбор условий для проведения диагностики разработанной тест-системой	94
3.3.3.1	Температура удлинения цепи	96
3.3.3.2	Добавление магния	97
3.3.4	Валидация и испытания разработанной методики	97
3.3.4.1	Подбор образцов ДНК для валидации и испытания тест-системы ..	97
3.3.4.2	Проведение испытаний тест-системы.....	102

3.3.5 Алгоритм молекулярно-генетической диагностики SOPH-синдрома .	105
3.4 БЕЛОК-ВАРИАНТ-ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ SOPH.....	108
3.4.1 Сеть белок-белковых взаимодействий.....	108
3.4.2 <i>In silico</i> анализ стабильности белка NBAS при патогенных миссенс-вариантах.....	110
3.4.3 Моделирование структур комплекса NRZ	112
3.4.3.1 Консенсусные сайты связывания NBAS как части комплекса NRZ	115
3.4.3.2 Связывание Rab18 с NBAS как часть комплекса NRZ	117
3.4.3.3 Анализ комплекса NRZ и TANGO1 и его прямого контакта через NBAS	120
3.4.3.4 Формирование комплекса членов NMD с NBAS	122
3.4.3.5 Картирование вариантов, ассоциированных с фенотипическими признаками, на смоделированную структуру белка NBAS и его сайты связывания	124
3.4.3.6 Картирование вариантов, ассоциированных с триадой SOPH, на структуру белка NBAS	128
3.4.3.7 Выводы.....	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	132
ВЫВОДЫ	136
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.....	137
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	138
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	141
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 – ИЗВЕСТНЫЕ ПАТОГЕННЫЕ ВАРИАНТЫ В ГЕНЕ NBAS	157
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 – ФЕНОТИПЫ И ИХ ВАРИАНТЫ.....	172
ПРИЛОЖЕНИЕ 3 – ЗАПУСКИ ALPHAFOLD	183
ПРИЛОЖЕНИЕ 4 – ТАБЛИЦА ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ПАЦИЕНТОВ С ПАТОГЕННЫМИ ВАРИАНТАМИ НА С-КОНЦЕ.....	185
ПРИЛОЖЕНИЕ 5 – ТАБЛИЦА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ НАРУШЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКА ПРИ ПАТОГЕННЫХ ВАРИАНТАХ ИНСТРУМЕНТОМ FOLDX.....	191

ВВЕДЕНИЕ

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].

Например, в России частота врожденных аномалий скелета варьирует от 47 до 237 случаев на 1000 детского населения. Наследственные заболевания скелета составляют более половины всех врожденных заболеваний [Бережный А. с соавт., 1991]. Врожденные заболевания и аномалии развития скелета составляют более 30% в структуре инвалидизирующей патологии детей, а к четырехлетнему возрасту количество инвалидов увеличивается в 2,5 раза [Тенилин Н. А., 2009], что обусловлено относительно поздней манифестацией и прогрессированием многих наследственных заболеваний скелета [Wynne-Davies R., Gormley J., 1985].

Новые наследственные заболевания скелета продолжают описываться до сих пор.

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 (Short Stature, Optic Atrophy, Pelger-Huet anomaly), 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. et al., 2016]. Наличие в Республике Саха (Якутия) большого груза наследственной патологии с различным типом наследования 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 (низкий рост, атрофия зрительного нерва, пельгеровская аномалия лейкоцитов, MIM #614800, SOPH) – 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 p.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 и кожу. Патогенные варианты *NBAS* ранее были поделены на патогенетические группы в зависимости от того, какие участки белка *NBAS* были поражены: β -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 широкого 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]

Недавние исследования подтвердили связь белка *NBAS* с нонсенс-опосредованным распадом (NMD), расщепляющим РНК, содержащие стоп-кодоны в открытых рамках считывания [Longman D. et al., 2020]. Данная система позволяет контролировать нежизнеспособные РНК от контакта с рибосомами на выходе из ядра. Считается, что эффективность работы NMD, может быть, напрямую связана с выраженностью симптомов и исходом генетических болезней. Исследования в данной области единичны, и данная функция белка *NBAS* недостаточно изучена [Longman D. et al., 2020].

На сегодняшний день в мировых научных базах данных накоплено большое количество геномных, транскриптомных, протеомных и метаболомных данных [Thul P.J., Lindskog C., 2018; Fokkema I.F.A.C. et al., 2021; Varadi M. et al., 2024]. Большинство из них находятся в открытом доступе. Это позволяет проводить биоинформатические исследования на исходных данных. 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., Sammito M.D., Read R.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 исследования

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 исследования

1. Определить клинический полиморфизм у пациентов с SOPH-синдромом в Республике Саха (Якутия) на основе 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 генотип-фенотипическая 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

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 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.

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. Трёхмерная структура

белков, а также их последовательности были взяты из базы данных AlphaFold Protein Structure Database. Обнаружение предполагаемых белковых сайтов связывания проводилось с помощью инструмента AlpfoFoldComplex, 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 генетическими 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).

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

Работа одобрена этическим комитетом Медицинского Института Северо-Восточного Федерального Университета (МИ СВФУ) и прошла экспертную комиссию (№ 79 от 23 апреля 2021 г.), а также научно-технический совет (НТС) СВФУ № 14 – 21 мая 2021 г.

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), 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 анализ генетических карт больных с SOPH-синдромом, забор и культивирование фибробластов у больных, набор на исследование пациентов с SOPH-синдромом, 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 источника (из них 11 отечественных и 133 зарубежных).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Варианты в гене *NBAS* (OMIM #608025) ассоциированы с двумя группами заболеваний – SOPH-синдром и синдром детской печёночной недостаточности 2 типа (ILFS2, RALF, ALF), отличающимися клиническим проявлением, течением и прогнозом [Staufner C. et al., 2020]. Ниже приведён литературный обзор клиничко-генетических аспектов SOPH-синдрома и молекулярной биологии белка *NBAS*, а также его предполагаемого патогенеза. В данном разделе рассмотрены особенности клинического полиморфизма фенотипических признаков SOPH и ILFS2 и их взаимосвязь с генотипом.

1.1 SOPH-СИНДРОМ

SOPH-синдром (SOPH, Short stature, Optic atrophy, Pelger-Huet anomaly of leucocytes – OMIM #614800) – является моногенным аутосомно-рецессивным наследственным заболеванием, характеризующимся триадой признаков: постнатальной гипоплазией, атрофией зрительных нервов и пельгеровской аномалией лейкоцитов [Maksimova N. et al., 2010].

1.1.1 Эпидемиология

SOPH-синдром, впервые описанный в 2010 году, считался распространенным только в якутской популяции, тем не менее каждый год по литературным данным выявляются новые единичные случаи SOPH-подобных состояний по всему миру. Распространенность SOPH-синдрома в Якутии составляет 1 на 10 000 якутов [Максимова Н.Р. с соавт., 2016].

Ранее было предложено, что имеется «эффект основателя» у данного варианта в якутской популяции. Возраст патогенного варианта с.5741G>A в гене *NBAS* составил 804 ± 140 лет [Максимова Н.Р. с соавт., 2016]. Учитывая дату исследования и выборку, эти данные указывали на начало распространения патогенного варианта G5741 → A в якутской популяции в первой половине XII в. (1192-й год ± 140 лет). Данный временной промежуток в истории Якутии соответствует расцвету кулун-атахской археологической культуры. Носители

данной культуры были адаптированы к местным условиям и вели кочевой образ жизни на бассейне средней Лены [Fedorova S.A., Khusnutdinova E.K., 2022].

Патогенные варианты в гене *NBAS* были обнаружены в 39 странах (Австралия, Бразилия, Великобритания, Германия, Израиль, Индия, Ирландия, Испания, Италия, Канада, Китай, Корея, Ливия, Пакистан, Польша, Португалия, Россия, Саудовская Аравия, Словения, США, Турция, Финляндия, Франция, Хорватия, Швейцария, Швеция, Япония) [Li Z.D. et al., 2020; Staufner C. et al., 2020]. Число пациентов с каждым годом растет (Рисунок 1).



Рисунок 1. Распространенность пациентов с патогенными вариантами в гене *NBAS* в мире, без учета случаев в Якутии, где обнаружено 93 случая SOPH. Наибольшее количество пациентов наблюдается в Германии и Китае, в остальных странах встречаются единичные случаи, зачастую публикуемые в клинических случаях. Буквами a,b,c,d обозначены количество пациентов, белым цветом обозначены страны, по которым нет данных.

1.1.2 Этиология и спектр патогенных вариантов

SOPH-синдром ассоциирован с гомозиготным вариантом с.5741G>A в гене *NBAS* (neuroblastoma amplified sequence), локус которого расположен на коротком плече второй хромосомы. Вариант приводит к замене гуанина на аденин в 45 экзоне, что приводит к замене аргинина на гистидин (p.R1914H) в структуре белка *NBAS*. Вариант локализован на той половине белка, которая связывает белок *NBAS* с белками RINT1 и ZW10, входящих в состав комплекса Syntaxin 18; который, в свою очередь, играет роль в слиянии мембран органелл клетки и транспорте между эндоплазматическим ретикуломом и аппаратом Гольджи. Ген *NBAS* состоит из 52 экзонов и содержит 420 т.п.н. Нарушения в гене модулируют экспрессию 1444 генов человека, что соответствует почти 10% всех

экспрессируемых генов. Некоторые из них связаны с эмбриональным развитием и биосинтезом холестерина [Longman D. et al., 2013].

Кроме гомозиготного варианта с.5741G>A, фенотип SOPH также может быть обнаружен при вариантах в компаунд-гетерозиготном состоянии в гене *NBAS*. Тем не менее, клиника данных вариантов иногда частично совпадает с другими *NBAS*-ассоциированными состояниями не похожими на SOPH [Fischer-Zirnsak B. et al., 2019].

1.1.3 Клиника

В данный синдром изначально были включены пациенты с постнатальной гипоплазией, низким пропорциональным ростом, лицевыми дизморфиями с частичной атрофией зрительного нерва и пельгеровской аномалией лейкоцитов в общем анализе крови. При этом у данной группы были исключены эндокринологические патологии и отсутствовали интеллектуальные нарушения [Maksimova N. et al., 2010].

Дети с SOPH-синдромом рождаются в срок и с нормальными показателями роста и веса. Первые жалобы появляются после 3-летнего возраста на отставания в росте, частые простудные заболевания и снижение зрения. Фенотипические особенности характеризуются сниженным тургором кожи, легким экзофтальмом, тонкими губами и пропорциональным туловищем при низком росте [Maksimova N. et al., 2010].

С появлением всё более новых данных о пациентах с SOPH-подобными состояниями клинический спектр SOPH только расширяется, но основные фенотипические признаки, определённые в названии данного синдрома, как правило, присутствуют [Li X. et al., 2018; Fischer-Zirnsak B. et al., 2019]. Тем не менее, имеются также и другие состояния тесно связанные с SOPH и ассоциированные с его вариантом. Например, к имеющейся триаде могут также добавляться несовершенный остеогенез, первичный иммунодефицит, поражения печени, в некоторых случаях осложняющиеся до ОПН (острая печеночная недостаточность) [Staufner C. et al., 2016].

1.1.4 Диагностика и медико-генетическое консультирование

На данный момент диагностика проводится методами ПЦР для скринингового поиска уже известных патогенных вариантов, в частности в диагностике SOPH. Массовое параллельное секвенирование (МПС) используется при пограничных состояниях, когда поиск известных вариантов не дал положительных результатов и имеется перекрытие имеющихся симптомов с описанными ранее [Kim K.W. et al., 2015; Ritelli M. et al., 2020; Zhernakova D.V. et al., 2020]. Функциональные исследования фибробластов также могут быть использованы для подтверждения дефицита белка NBAS, но, по некоторым данным, снижение уровня белка может не обнаруживаться [Fischer-Zirnsak B. et al., 2019].

1.1.5 Лечение SOPH-синдрома

В настоящее время не существует стандартизированной терапии болезни SOPH-синдром. Рекомендуется лечение и наблюдение у многопрофильных специалистов из-за мультисистемного характера SOPH-синдрома [Li Z.D. et al., 2023].

Особую настороженность к состоянию иммунной системы у больных SOPH должно привлекать, помимо частых инфекций, также наличие отита и синусита. Поскольку пациенты имеют ослабленный иммунитет и склонны к частым инфекциям, рекомендуется тщательное иммунологическое обследование и рассмотрение вопроса о заместительной терапии иммуноглобулином и профилактической антибиотикотерапии при диагностированном иммунодефиците [Lenz D. et al., 2021].

В настоящее время двое пациентов с вариантами SOPH в компаунд-гетерозиготном состоянии находятся под медицинским наблюдением с множественными переломами и повышенным уровнем печеночных ферментов. Следует отметить, что на данный момент не практикуется агрессивная жаропонижающая терапия для пациентов с SOPH, как это было предложено для ILFS2 [Staufner C. et al., 2020]. Хотя у SOPH не развивается ОПН, хотелось бы

подчеркнуть, что вариант p.Arg1914His в компаунд-гетерозиготном состоянии может быть связан с выраженными поражениями печени [Petukhova D.A. et al., 2020]. Врачи должны обратить внимание на возможность возникновения у этих больных жизнеугрожающих печеночных кризисов.

В целом, клинический обзор показывает, что для данной группы пациентов существует период примерно в 3 года после рождения, в течение которого можно применить специальные меры для лечения основных симптомов, а также возможное патогенетическое лечение, которое еще предстоит изучить.

1.2 ГЕН И БЕЛОК NBAS

Ген *NBAS* (neuroblastoma amplified sequence), также известный как *NAG* (neuroblastoma amplified gene, OMIM*608025), был впервые обнаружен в конце прошлого века в клеточных линиях нейробластом, как коамплифицирующийся ген, вместе с *MYCN*, он считался предиктором течения нейробластомы [Scott D.K. et al., 2003]. Амплификация фрагментов ДНК при онкологических заболеваниях считается неблагоприятным признаком течения, и обнаруженный новый ген во фрагментарном бульоне опухолевого ДНК помог пролить свет на разнообразие клинических исходов нейробластом. Несмотря на то, что коамплификация гена *NBAS* + *MYCN* была связана с более благоприятным течением заболевания у пациентов, функция гена оставалась неизвестной [De Preter K. et al., 2002; Kaneko S. et al., 2007; Wimmer K. et al., 1999].

Позже Aoki с соавторами было установлено, что белок NBAS является частью комплекса синтаксина 18 (STX18), участвующим в ретроградном транспорте везикул с аппарата Гольджи (аГ) до эндоплазматического ретикулума (ЭР) [Aoki T. et al., 2009]. Longman с соавторами, на примере эмбрионального развития рыбок *D. Rerio*, показал участие NBAS в нонсенс опосредованном распаде РНК (NMD) [Longman D. et al., 2007]. Впоследствии, на клеточных линиях HeLa была подтверждена локализация NBAS в ЭР-ассоциированном NMD при участии хеликазы UPF1 [Anastasaki C. et al., 2011]. Этим же коллективом автором впоследствии была опубликована модель механизма взаимодействия

NBAS с другими участниками NMD [Longman D. et al., 2020].

В структуре NBAS выделяют два ключевых домена – β -пропеллер и SEC39. Регион с β -пропеллером совпадает с тремя схожими доменами: β -цепью хинопротеинаминодегидрогиназы, повторами WD40/YVTN и одноимённым доменом N-конца «Neuroblastoma-amplified sequence». По результатам исследований на археях, β -пропеллер защищает клетку от воздействий экстремальных факторов, а повторы WD40 являются скаффолдом для белок-белковых взаимодействий различных белковых комплексов [Jing H. et al., 2002]. В настоящее время считается, что домен SEC39 ассоциирован с мембранным транспортом везикул от аппарата Гольджи к ЭР (Рисунок 2).

Эксперименты, проведённые с урезанными белками NBAS, показали отсутствие связи с белком партнёром по мембранному трафику p31(Use1) при укорочении с C-конца, а при укорочении с N-конца не наблюдалось взаимодействие с ZW10 и RINT1 [Aoki T. et al., 2009]. Белок NBAS не обладает тканевой специфичностью и обнаруживается во всех типах клеток. Тем не менее в исследованиях на эмбрионах мышах был обнаружен особый паттерн экспрессии NBAS, характеризующийся диффузной экспрессией на конечностях на начальных стадиях развития (11 день), и затем постепенным смещением экспрессии больше к эктодерме и перихондриальной мезодерме (на 13 день). Аналогичный паттерн наблюдался при окрашивании срезов всего тела эмбриона мыши: на ганглиях дорсальных корешков и в нервной трубке, а также в коронарном отделе головного мозга (на 13 день). Также специфичное окрашивание было обнаружено на хондроцитах тел позвонков. Принимая это во внимание можно сказать, что белок NBAS востребован на начальных этапах развития эмбрионов млекопитающих.

Тем не менее эти данные, а именно участие NBAS в раннем физиологическом развитии не объясняют некоторые клинические наблюдения, связанные с нередкой поздней манифестацией ILFS2 (примерно в 6,5 лет), предполагая, что NBAS имеет постоянную роль в жизнедеятельности клетки и не ограничивается физиологическим развитием [Palagano E. et al., 2018].

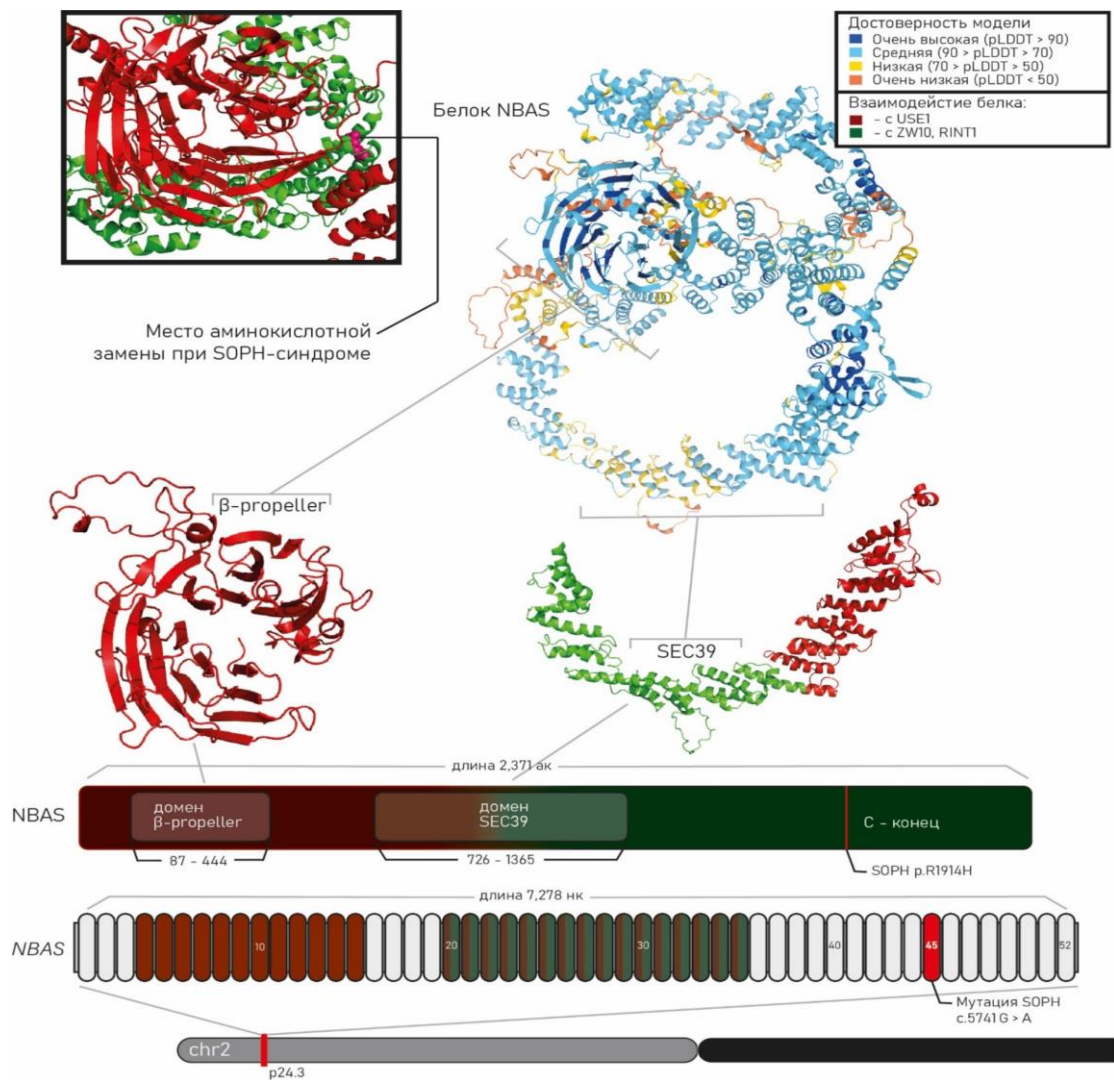


Рисунок 2. Ген *NBAS* и белок с основными доменами с указанием миссенс-варианта SOPH (с.5741 G>A, p.R1914H). *NBAS* расположен на коротком плече второй хромосомы, его длина 563 278 п.н., включает в себя 52 экзона. Каноничный транскрипт состоит из 7,3 т.п.н., из них 7,1 т.п.н. являются кодирующими. Основными доменами считаются два: SEC39 и β -пропеллер. Регионы взаимодействия белка NBAS с основными партнерами указаны зеленым и красным цветом для ZW10, RINT1 и для USE1, соответственно. Достоверность остается под вопросом из-за низких значений метрики pLDDT, характеризующей уверенность AlphaFold в локальной структуре. Тем не менее, для белков такого размера это может указывать и на то, что NBAS имеет множество конформаций.

1.2.1 Функции белка NBAS

1.2.1.1 NBAS в комплексе NBAS-RINT1-ZW10

Мембранный трафик хорошо изучен у таких организмов как дрожжи и бактерии [Kraynack B.A. et al., 2005; Schmitt H.D., 2010; Diefenbacher M., Thorsteinsdottir H., Spang A., 2011; Meiringer C.T.A. et al., 2011; Diefenbacher M., Thorsteinsdottir H., Spang A., 2011; Spang A., 2012; Tagaya M. et al., 2014; Brunet S.,

Sacher M., 2014; Chou H.-T. et al., 2016; Wang T., Li L., Hong W., 2017; Witkos T.M. et al., 2019; Zhang Y., Yang J., 2020; Roy Chowdhury S. et al., 2020; Travis S.M. et al., 2020; Santana-Molina C., Gutierrez F., Devos D.P., 2021]. Органеллы, участвующие в секреторном и эндокринном путях клетки, взаимодействуют между собой при помощи транзитных везикул, отпочковывающихся от донорной органеллы и транспортирующихся к акцепторной. При отпочковании везикула покрывается специальным покрытием – белками коатомерами COPI или COPII (Coat Protein), которое она теряет при слиянии с акцепторной органеллой. Сцепка везикул с целевой органеллой осуществляется семейством малых гуанозинтрифосфат гидролаз RAB (RAB-ГТФаз) и связывающими факторами, после чего следует слияние мембран везикулы и органеллы при помощи комплекса SNARE (Soluble NSF Attachment Receptor), локализующегося на мембране акцепторной органеллы. Связывающие факторы, которые регулируют не только сцепку, но и процесс слияния везикулы, можно поделить на две группы: группа белков содержащих вытянутые суперспирали и мультисубъединичные комплексы (MTC, Multisubunit Tethering Complex). Таким образом взаимодействуют такие органеллы как аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум: везикулы, покрытые COPII, отпочковываются от ЭР и транспортируются в аГ, где затем сливаются с его мембраной – антероградный транспорт, а от аГ обратно в ЭР возвращаются везикулы, покрытые COPI – ретроградный транспорт. Сцепка и слияние COPI с ЭР у дрожжей регулируется комплексом Dsl1. Этот комплекс, включающий Dsl1, Tip20 и SEC39/Dsl3, входит в подсемейство комплексов CATCHR (Complexes Associated with Tethering Containing Helical Rods), являющимися MTC. Механизм действия комплекса заключается в том, что Dsl1 как «лассо» связывается с COPI, в то время как Tip20 и Dsl3 держатся за комплекс SNARE, а конкретно за его компоненты Sec20 и Use1, соответственно. Комплекс SNARE далее, являясь предполагаемым донором механохимической энергии, завершает процесс слияния везикулы с органеллой [Travis S.M. et al., 2020].

Ортологом у млекопитающих комплекса Dsl1 является комплекс NRZ: NBAS – SEC39/Dsl3, RINT1 – Tip20 и ZW10, являющийся ортологом Dsl1 соответственно. Как и комплекс Dsl1, NRZ взаимодействует со SNARE: RINT1 с BNIP1(Sec20) и NBAS с p31(Use1), тем самым выполняя аналогичные функции сцепки и слияния везикулы с ЭР [Perry R.J., Mast F.D., Rachubinski R.A., 2009; Perry R.J., Mast F.D., Rachubinski R.A., 2009; Ren Y. et al., 2009; Spang A., 2012; Rogers J.V. et al., 2014].

NBAS, как часть комплекса NRZ, также участвует в созревании и транспорте липидных капель (ЛК) посредством белков семейства RAB [Xu D. et al., 2018]. Одним из ключевых факторов, регулирующих процессы созревания и формирования ЛК, является Rab18, который ассоциирован с ЛК в основном в преадипоцитах и адипоцитах. Варианты в данном гене вызывают аутосомно-рецессивное заболевание Микросиндром Варбурга. Варианты в *Rab3GAP1* и *Rab3GAP2* также ассоциированы с данным синдромом. Он характеризуется, в частности, наличием гигантских липидных капель в фибробластах пациентов. Дальнейшие исследования патогенеза показали, что регуляторными факторами для Rab18 могут выступать компоненты комплекса NRZ [Xu D. et al., 2018].

Исследования связывания отдельных компонентов комплекса NRZ с активной формой Rab18 (описание активных и пассивных форм белков семейства Rab будет представлено в последующих главах) выявили большую ассоциацию последнего с ZW10, чем с NBAS. Более того, исследования связывания на урезанном белке ZW10 выявили ключевую роль С-конца белка в этом взаимодействии. NBAS же в свою очередь показывал взаимодействие с Rab18 лишь в присутствии ZW10. Обобщая, можно сказать, что комплекс NRZ принимает непосредственное участие в созревании и увеличении размеров липидных капель посредством Rab18. Функциональные исследования выявили, что компоненты NRZ в клетках дикого типа были локализованы на мембране ЭР и липидных капель, нокдаун Rab18 приводил же к полному вымыванию NRZ из мембраны липидных капель. Данные результаты могут говорить о том, что

местом взаимодействия Rab18 и NRZ является мембрана липидных капель. Хотя и Rab18 напрямую не связывается с белком NBAS, а лишь опосредовано через ZW10, тем не менее, нокдаун обоих компонентов комплекса приводил к похожему белковому фенотипу, выраженному в снижении количества липидных капель и увеличении их формы до гигантских. Похожие изменения наблюдались и при нокдауне Rab18, что согласуется с тем, что данные белки участвуют в одном процессе, контролирующем созревание и формирование липидных капель [Xu D. et al., 2018].

Комплекс NRZ также участвует в транспорте коллагена посредством белка TANGO1. Секреция коллагена представляется для клетки не самой ординарной задачей, с точки зрения сегодняшних знаний. Коллаген, образуясь в ЭР, является слишком большим грузом для стандартных белковых транспортеров типа везикул COPII/I, так как размер COPII в диаметре меньше 90 нм, в то время как коллаген в собранном виде представляет собой макромолекулу длиной в 400 нм. В ЭР компоненты коллагена тримеризуются (три молекулы собираются в одну) в жесткую стержне-подобную структуру, а учитывая, что секреция коллагена проходит в собранном виде, транспортировка через стандартные везикулы представляется невозможной задачей [Raote I. et al., 2018].

Основным белком ответственным за транспортировку коллагена считается TANGO1. Экспериментальные исследования с применением метода иммунопреципитации позволили установить, что комплекс NRZ демонстрирует признаки прямого взаимодействия с TANGO1, а именно с его доменом TEER. Причем необходимым условием связывания NRZ и TANGO1 является образование самосборного комплекса из TANGO1, cTAGE5 и TANGO1-short, что как раз и приводит к образованию кольцевой структуры [Raote I. et al., 2018].

1.2.1.2 NBAS в комплексе с UPF1

Нонсенс-опосредованный распад РНК (Nonsense Mediated RNA Decay, NMD) – это механизм контроля качества и регуляции мРНК на уровне трансляции

белка на рибосомах, предотвращающий накопление неправильно собранных белков в клетке. NMD влияет на 5–10% экспрессирующихся генов у различных эукариот [Kishor A., Fritz S.E., Hogg J.R., 2019]. В основном считается, что NMD находит и предотвращает от трансляции транскрипты, содержащие преждевременные кодоны терминации (PTC, Premature Termination Codon). В свою очередь, PTC возникают из-за патогенных вариантов и ошибок процессинга мРНК. Цели NMD не ограничиваются контролем PTC, также ими являются комплексы сращивания экзонов (EJC, Exon Junction Complex), расположенные ниже нетранслируемой области (Таблица 1). Стоит отметить, что белковые цели для деградации системой NMD принадлежат к эволюционно консервативным путям. Более того, были найдены вирусные транскрипты, являющиеся целями для распада, что указывает на более широкую зону ответственности данной системы, либо на её низкую специфичность [Kishor A., Fritz S.E., Hogg J.R., 2019]. Составными частями NMD являются группа белков UPF (Up-Frameshift), их ещё называют «коровыми» факторами NMD, и белки, стимулирующие UPF к процессам распада транскриптов (SMG1, SMG6 и другие) [Longman D. et al., 2020].

Пример механизма работы выглядит так: UPF1 и SMG1 вместе с другими факторами NMD образуют комплекс SURF (SMG-1–Upf1–eRF1–eRF3) распознающий PTC. Данный комплекс после сборки движется вдоль мРНК. При обнаружении PTC, комплекс SURF с помощью дополнительных белков UPF2 и UPF3B, связывается с EJC, находящемся ниже PTC, и вместе они образуют комплекс индуцирующий распад РНК (DECID, decay-inducing complex), который инициирует фосфорилирование хеликазы UPF1 с помощью PI3K-подобной киназы (Phosphatidylinositol 3-Kinase-like kinases) SMG1 (Suppressor of Morphogenesis in Genitalia 1), после чего происходит контакт с распад-ассоциированными белками и начинается сам процесс. Белки UPF могут действовать вместе как в примере, но также демонстрируют одиночную активность. Существует также и альтернативный способ активации NMD без

контакта с EJC, который нацелен на транскрипты с удлинённым 3' UTR [Mitchell P., Tollervey D., 2003; Kashima I. et al., 2006; Isken O., Maquat L.E., 2008; Anastasaki C. et al., 2011; Schweingruber C. et al., 2013; Fatscher T., Boehm V., Gehring N.H., 2015; Hug N., Longman D., Cáceres J.F., 2016; Zhu L. et al., 2019] (Таблица 1).

Таблица 1. Механизмы активации и функции NMD

Роль NMD	Архитектура транскрипта	Механизм NMD
Контроль качества	Ошибка сплайсинга	Стимулированный комплекс сращивания экзонов (EJC)
	РТС во внутреннем экзоне	
	РТС во внешнем экзоне	Стимулированный длиной нетранслируемой области (3'UTR)
	Нарушенный поли-А конец	
Регуляция	Альтернативный экзон	Стимулированный комплекс сращивания экзонов (EJC)
	Короткие открытые рамки считывания	
	Удлинённый 3'конец нетранслируемой области	Стимулированный длиной нетранслируемой области (3'UTR)

Примечание. * – адаптировано со статьи [Nasif S., Contu L., Mühlemann O., 2018].

Представленная таблица 1 обобщает механизмы активации NMD (nonsense-mediated mRNA decay) в зависимости от их функциональной роли. Механизмы контроля качества преимущественно инициируются при наличии преждевременных стоп-кодонах (РТС) или дефектов в структуре мРНК, тогда как регуляторные функции NMD часто связаны с физиологическими вариантами альтернативного сплайсинга или вариабельностью 3'UTR. Таким образом, NMD функционирует как универсальный механизм, сочетающий элементы контроля качества и тонкой посттранскрипционной регуляции [Karousis E.D., Nasif S., Mühlemann O., 2016].

Longman с соавторами обнаружил локальный путь ER-NMD, звеном которого является белок NBAS, модулирующий трансляцию белков клеточного

стресса на ЭР [Longman D. et al., 2020].

Для того, чтобы узнать на каком этапе происходит участие NBAS в процессе NMD, были использованы два мутантных варианта UPF1 в гипофосфорилированном состоянии, имитирующим состояния UPF1 в комплексе SURF, и гиперфосфорилированном состоянии для имитации состояния в комплексе DECID. Более предпочтительной связью для NBAS оказался комплекс SURF, образующийся на начальных этапах NMD, что может также говорить о том, что большинство регуляторных шагов процесса распада РНК проходит на начальных этапах. Что интересно, NBAS показывает временное взаимодействие и с SMG5, SMG6, SMG7, участвующих на более поздних этапах NMD [Longman D. et al., 2020].

Результаты данных исследований подтверждают непосредственное участие NBAS в процессах нонсенс-опосредованного распада РНК. Трудно определить, где кончается функция контроля качества и начинается функция регуляции транскриптов [Isken O., Maquat L.E., 2008]. Не ясно и то, как система NMD «распознает» свои цели для деградации, тем не менее считается, что белки-участники NMD могут распознавать конформацию рибонуклеопротеинов (mRNP, Messenger Ribonucleoprotein), несущих нарушенные мРНК. Как известно, мРНК после синтеза не перемещается до рибосомы в чистом виде, а нуждается в несущих белках-переносчиках, которыми выступают mRNP. Данный комплекс представляет из себя гранулы самособирающихся белков, содержащие РНК и РНК-связывающие белки. Одной из основных функций данного комплекса является пространственно-временная организация мРНК для дальнейшей трансляции [Buchan J.R., 2014]. При возникновении нарушений в структуре мРНК, предполагается, что меняется и архитектура крепления мРНК к mRNP, что впоследствии распознаётся системой NMD [Karousis E.D., Nasif S., Mühlemann O., 2016].

1.2.2 Патофизиология NBAS

Исследования смены температурного режима с 37°C до 40°C в

фибробластах пациентов выявили снижение уровней белка NBAS и его партнера p31, а также снижение темпа роста мутантных фибробластов по сравнению с контролем. Тем не менее есть данные об отсутствии связи патологического фенотипа с дефицитом NBAS на некоторых исследованиях с фибробластами, в которых не было выявлено значительного снижения мутантного NBAS в фибробластах пациента по сравнению с контролем [Ono S. et al., 2019].

Проведены исследования, установившие связь между нокдауном NBAS и увеличением маркеров стресса ЭР в контексте ЭР-NMD пути на клеточных моделях [Longman D. et al., 2020]. Однако анализ количества шаперона эндоплазматического ретикулума BiP (GRP78), который является индикатором стресса ЭР, наоборот показал незначительное увеличение при смещении температуры и у клеток пациентов, и в контрольных клетках. Учитывая вышесказанное, можно сделать предположение о том, что в патогенезе SOPH стресс ЭР является скорее вторичным звеном, а не ключевым [Cotrina-Vinagre F.J. et al., 2021].

Такие же противоречивые данные были получены при анализе процессов гликозилирования, нарушения процессов которого являются маркерами дефекта ретроградного транспорта. В клеточных моделях было выявлено нарушение процессов гликозилирования, однако в исследованиях фибробластов пациентов оно не подтвердилось [Aoki T. et al., 2009; Haack T.B. et al., 2015].

Исследования биопсийных гепатоцитов в литературе показывают явления стеатоза и фиброза [Staufner C. et al., 2016; Ono S. et al., 2019; Jiang B. et al., 2021]. Эти наблюдения согласуются с данными о том, что NBAS может быть задействован в метаболизме липидных капель, как фактор его трафика и созревания, и может быть логичным, что нарушение его работы может привести к подобным исходам [Rudkowska I. et al., 2015; Xu D. et al., 2018; Jackson C.L., 2019; Lenz D. et al., 2021; Wang X. et al., 2022].

Дополнительно, в биопсийном материале печени была обнаружена инфильтрация Т-клетками. Инфильтрация органов дефектными иммунными

клетками также согласуется с недавними работами о нарушении иммунных клеток при вариантах *NBAS*, приводящие в отдельных случаях к гемофагоцитарному лимфогистиоцитозу (ГЛГ) [Lenz D. et al., 2021; Bi X. et al., 2022]. Анализ иммунных клеток, проведенный с целью исследования способности НК-клеток к цитотоксической дегрануляции при нарушениях в *NBAS*, обнаружил снижение маркеров грануляции CD107a по сравнению с контролем, а также снижение перфорины. При этом уровень гранзима В оставался неизменным. Но стимуляцией ИЛ-2, являющимся фактором роста Т-клеток, исследователи смогли усилить цитотоксические способности даже мутантных клеток, после стимуляции сравнимых даже с клетками контроля. Основываясь на этом, спекулятивно, можно сказать, что у НК-клеток детей с *SOPH* также нарушена цитотоксичность из-за чего они страдают частыми детскими инфекциями. Можно ожидать, что ранняя терапия ИЛ-2 может снизить частые инфекции и в общем иммунный фенотип, в особенности частые повышения температуры, с которыми связывают также и приступы ОПН [Lenz D. et al., 2021].

Исследования на модельных животных, таких как эмбрионы мышей и рыбках *D. rerio*, выявили активное участие *NBAS* в эмбриогенезе. *NBAS* был обнаружен в развивающейся костной системе, а именно в хрящах и сухожилиях, что согласуется с данными о низком росте, задержкой костного возраста и с наличием, например, высокого голоса у некоторых пациентов. Тем не менее, патологические изменения в костной системе также могли быть индуцированы не только нарушением белка, но и вызванным этим нарушением экспрессии ключевых генов, отвечающих за костное развитие (например *MGP*), как было показано на экспериментах с *D. rerio*. Также белок был обнаружен в зачатках структур головного мозга, таких как передний мозг, мозжечок и спинной мозг. Это может объяснить наличие аномалий головного мозга на МРТ некоторых пациентов, а также неврологические проявления напоминающие резидуальную энцефалопатию у пациентов с *SOPH* [Maksimova N. et al., 2010].

NBAS считается участником ретроградного мембранного трафика между ЭР

и аГ, и данная роль белка хорошо освещена в литературе. Существуют исследования, освещающие участие *NBAS* не только в каноничном (ЭР-аГ), но и в альтернативном пути секреции (UPS) [Wang X. et al., 2022]. Каноничный путь предполагает, что белок проходит созревание и секрецию через ЭР, далее к аГ, опосредованную COPII везикулами. Также был описан альтернативный путь аутофагосомной секреции, когда белок идет в обход аГ через аутофагосому. Ранее предполагалось участие комплекса NRZ в аутофагии, так как ЭР это основной донор биогенеза аутофагосомы [Tagaya M. et al., 2014]. Исследования на дрожжах выявили роль комплекса Dsl1, гомологичного комплексу NRZ, в рекрутинге Ykt6 на аутофагосому. Ykt6 является аутофагосомным SNARE-белком, необходимым для слияния аутофагосомы с лизосомой/вакуолью [Gao J. et al., 2020].

Анализ коллагена в фибробластах пациентов *NBAS* выявил накопление предполагаемого зрелого mCOL I α 2 и его предшественника pro-COL I α 1 внутри клетки, но тогда предположили, что это связано с другим вариантом в гене *P4HB*. Чтобы проверить секрецию коллагена, в другом исследовании были трансфицированы транскриптом с обнаруженным патогенным вариантом клетки Saos-2. Было обнаружено значительное снижение секреции коллагена клетками с «мутантной» плазмидой по сравнению с контролем «дикого типа». Исследователями было сделано заключение, что *NBAS* играет ключевую роль в образовании больших везикул через секреторный путь путём взаимодействия с *TANGO1* [Ritelli M. et al., 2020; Cotrina-Vinagre F.J. et al., 2021]. В другом исследовании было показано, что TGF- β 1 повышает секрецию pro-COL I α 1 в супернатанте культур клеток и увеличивает колокализацию COL I с Rab8a, маркером аутофагосомных секреторных везикул.

Rab-8 известен своим регулированием нетрадиционных путей секреции интегральных белков в обход аппарата Гольджи через SMGL-1 (гомологом *NBAS*) как фактор обмена гуанина в кишечнике нематод [Wang X. et al., 2022]. Аутофагосомная секреция снижает стресс ЭР посредством высвобождения COL I через аутофагосомо-зависимую секреторную систему, и спекулятивно можно

сказать, что *NBAS* может играть в этом значимую роль. *NBAS* может быть ассоциирован с UPS, который ответственен за секрецию больших клеточных молекул в стадии нормальной работы клетки и/или при стрессе клетки. Нарушения в обмене коллагена могут объяснить не только низкий рост, но и кожные аномалии в виде прогероидных черт лица. Пути UPS консервативны среди различных видов и активируются стрессовыми факторами. Можно также спекулятивно ожидать, что атрофия зрительного нерва может быть вызвана световым раздражением – как постоянным стрессовым фактором для клеток сетчатки; стрессом – с которым они не могут справиться с нарушенной UPS системой.

Таким образом, роль *NBAS* как белка, участвующего в регуляции традиционных и нетрадиционных путей секреции, остаётся неясной [Wang X. et al., 2022].

1.3 ГЕНОТИП-ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ *NBAS*-ПАТОЛОГИЙ

Пациенты с вариантами в гене *NBAS* имеют большое фенотипическое разнообразие признаков, характеризующееся мультисистемным поражением органов и тканей. Ввиду относительной редкости данных наследственных патологий в мире, в основном данные о пациентах из литературы можно получить от клинических случаев, которые не могут предоставить исчерпывающий систематический анализ спектра признаков при патогенных вариантах *NBAS* [Maksimova N. et al., 2010].

Тем не менее, международный многоцентровой обзор имеющихся на тот момент научных данных о клинике патогенных вариантов *NBAS* 110 пациентов, проведённый Staufner с соавторами выявил генотип-фенотипическую зависимость локализации миссенс-вариантов или делеций от фенотипических проявлений [Staufner C. et al., 2020]. Авторы выделили три генотип-фенотипические группы в зависимости от локализации варианта: группа с патогенными вариантами в регионе β -пропеллера (1), в регионе SEC39 (2) и на С-конце (3).

Таблица 2 иллюстрирует различия в фенотипических проявлениях между

тремя основными генотип-фенотипическими группами, ассоциированными с мутациями в *NBAS*. Отмечается, что поражения печени преобладают при мутациях в доменах β -пропеллера и SEC39, тогда как скелетные, неврологические и иммунологические нарушения чаще встречаются при изменениях в С-концевой области. Другими словами, группы с вариантами на С-конце включают SOPH-подобные состояния, группа SEC39 включает пациентов с ILFS2. Стоит отметить, что регион с β -пропеллером характеризуется перекрытием фенотипических признаков SOPH и ILFS2.

Данные исследования могут быть использованы для поиска подходов к терапии подобных состояний, так как зная регион варианта можно спрогнозировать предрасположенность к развитию острой печёночной недостаточности и начать своевременную поддерживающую терапию у данных пациентов [Calvo P.L. et al., 2017; Geem D. et al., 2021].

1.3.1 Подгруппа пациентов с вариантами в β -пропеллер

Подгруппа с патогенными вариантами в β -пропеллер (примерные аминокислотные остатки – 86–446) в опубликованных работах демонстрирует наиболее тяжёлые эпизоды острой печёночной недостаточности [Staufner C. et al., 2020]. Согласно статистике (n=18), до 83% таких пациентов переносят острые печеночные кризы, зачастую уже в детском возрасте, а у 12% зафиксировано постоянное повышение трансаминаз без выраженных острых приступов.

Примерно 61% больных имеют низкий рост, 69% – сниженную минеральную плотность костной ткани, 55% – задержку закрытия переднего родничка и 50% – различные аномалии позвонков или нестабильность шейного отдела позвоночника. В неврологической картине у 19% отмечается атрофия зрительного нерва, а у половины (50%) наблюдается задержка моторного развития. При этом интеллектуальное развитие чаще не страдает, хотя в литературе встречаются отдельные упоминания о когнитивных нарушениях [Staufner C. et al., 2020].

По иммунологическим показателям у 36% регистрируется сниженный

уровень IgG, у 56% – уменьшенная функция NK-клеток, а у 55% – пельгеровская аномалия лейкоцитов, приводящая к изменённой сегментации нейтрофилов. В мышечной системе выявляются мышечная гипотония (43%) и атрофия скелетных мышц (67%) [Staufner C. et al., 2020].

Таблица 2. Клинические проявления трёх генотип-фенотипических групп (1, 2, 3).

Признаки:	β-пропеллер (1)	SEC39 (2)	С-конец (3)
Эпизод острой печёночной недостаточности	Очень часто	Очень часто	Очень редко
Постоянно повышенные трансаминазы	Очень редко	Очень редко	Часто
Низкий рост	Часто	Редко	Очень часто
Остеопороз	Часто	Не обнаружено	Очень часто
Задержка закрытия родничка	Часто	Очень редко	Очень часто
Дисплазия тел позвонков, аномалии позвонка	Часто	Не обнаружено	Часто
Атрофия зрительного нерва	Очень редко	Не обнаружено	Очень часто
Задержка моторного развития	Часто	Очень редко	Очень часто
Нарушения интеллекта	Не обнаружено	Очень редко	Редко
Сенильная кожа	Редко	Очень редко	Часто
Низкий уровень IgG	Редко	Очень редко	У всех обнаруженных случаев
Низкий уровень NK-клеток	Часто	Часто	Очень часто
Пельгеровская аномалия лейкоцитов	Часто	Очень редко	Очень часто
Гипотония мышц	Редко	Очень редко	Очень часто
Скелетно-мышечная атрофия	Часто	Не обнаружено	Часто

Примечание. Перечислены отдельные фенотипические признаки характерные для одних и отсутствующих для других состояний, ассоциированных с вариантами в гене *NBAS*. (В данной таблице: очень часто 75–100%, часто 50–75%, редко 25–50%, очень редко 0–25%). (Адаптировано с работы [Staufner C. et al., 2020].)

Примерная клиническая картина пациентов в этой группе выглядит следующим образом. При первом наблюдении: ребёнок уже в первый год жизни перенёс несколько эпизодов острой печёночной недостаточности, потребовавших интенсивной терапии, при этом наблюдались задержка в формировании моторных навыков и умеренные нарушения иммунитета в виде снижения уровня IgG и NK-функции. Поиск генетической причины подтверждает гомозиготный или компаунд-гетерозиготный вариант в области β -пропеллер, и также позволяет своевременно назначить поддерживающие меры и предотвратить более тяжёлые осложнения. Основной отличительной чертой этой подгруппы считается высокая частота острых печёночных кризов с выраженной аномалией костной системы, относительно частые иммунные нарушения и заметная мышечная гипотония [Staufner C. et al., 2020].

1.3.2 Подгруппа пациентов с вариантами в SEC39

Подгруппа с вариантами в области SEC39 (примерные аминокислотные остатки – 722–1369) проявляет себя преимущественно фенотипом ILFS2 (около 96%). Постоянное повышение ферментов печени было зарегистрировано у 4% больных этой группы, в то время как низкий рост встречается в 36%, а типичные скелетные аномалии вроде снижения минеральной плотности костей встречаются лишь у 7% (n=27). Моторные задержки и интеллектуальные дисфункции описываются у 12% и 5% соответственно, что существенно ниже, чем в подгруппе β -пропеллер. Иммунные нарушения сохраняются на значимом уровне: у 67% наблюдается уменьшение функции NK-клеток, у 17% – сниженный уровень IgG и примерно у такого же числа выявлена пельгеровская аномалия лейкоцитов. При этом мышечная гипотония и атрофия скелетной мускулатуры отмечаются крайне редко (около 4%) [Staufner C. et al., 2020].

Детская печёночная недостаточность 2 типа (ILFS2, Infantile Liver Failure Syndrome type 2 – OMIM #616483) – аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся повторяющимися эпизодами острой печёночной недостаточности во время лихорадки, описанное впервые в 2015 году. Данный

синдром встречается повсеместно и манифестирует во младенческом, раннем детском возрасте, и считается одной из основных причин детской смертности неизвестной этиологии [Calvo P.L. et al., 2017; Haack T.B. et al., 2015]. Особенностью синдрома является полное выздоровление между эпизодами печёночной недостаточности, характеризующееся нормализацией печёночных ферментов, коагулограммы, а также общего состояния. Триггером развития ILFS2 чаще всего выступает вирусная инфекция, вызывающая лихорадку [Staufner C. et al., 2020].

Синдром детской печёночной недостаточности 2 типа является жизнеугрожающей патологией. По данным исследований в 50% всех случаев этиология острой печёночной недостаточности у детей остаётся неизвестной. Зачастую единственным вариантом лечения является трансплантация печени.

Клиника характеризуется частыми приступами печёночной недостаточности, тем не менее с возрастом частота эпизодов RALF спадает. Пациенты доставляются в клинику в тяжелом состоянии, характеризующимся рвотой и нарастающей вялостью. На лабораторных анализах повышены АЛТ и АСТ, обнаруживается тяжелая коагулопатия с печёночной желтухой. ЩФ и ГГТП как правило в пределах нормы [Staufner C. et al., 2016]. Тем не менее, если пациент выживает после приступа, то симптомы проходят через дни или недели с полным восстановлением лабораторных показателей. Как правило первые эпизоды ILFS2 самые тяжелые [Staufner C. et al., 2020].

1.3.3 Подгруппа пациентов с вариантами в С-конце

Подгруппа с вариантами в С-концевой части белка NBAS (после аминокислотного остатка 1369) представлена самым большим числом описанных пациентов (n=55) и отличается сочетанием эпизодических, но не столь частых, как при вариантах в β -пропеллер, острых поражений печени с хронически повышенными трансаминазами, которые присутствуют у 60% больных. При этом острые кризы печёночной недостаточности регистрируются у 14% пациентов, что заметно ниже, чем при вариантах в подгруппе SEC39. Одной из ключевых

отличительных черт считается крайне высокая доля задержки роста, достигающая 96%, а также значимый процент костно-скелетных аномалий, таких как сниженная минеральная плотность (78%), задержка закрытия переднего родничка (79%), аномалии позвоночника (50%). В неврологической картине примерно половина (50%) пациентов страдает от задержки моторного развития, а более четверти (28%) сталкивается с интеллектуальными проблемами. Атрофия зрительного нерва встречается у 50%. Иммунные нарушения имеют наиболее выраженный характер, так как снижен уровень IgG у 75%, наблюдается дефицит функции NK-клеток у 75%, а пельгеровская аномалия фиксируется у 94%. Гипотония (50%) и мышечная атрофия (80%) здесь описаны намного чаще, чем в подгруппе SEC39. В эту подгруппу входит классический фенотип SOPH-синдрома – постнатальный нанизм, атрофия зрительного нерва и пельгеровская аномалия лейкоцитов [Maksimova N. et al., 2010]. Основное отличие этой группы заключается в наивысшем проценте задержки роста, усиленных иммунных нарушениях, а также промежуточном характере поражения печени, то есть возможны как хронические изменения, так и острая недостаточность, хотя и не столь частая, как при вариантах в подгруппах β -пропеллер и SEC39 [Staufner C. et al., 2020].

1.3.4 Другие состояния, ассоциированные с NBAS

Причинами ILFS2 и SOPH патологий являются варианты в гене NBAS. Были также несколько вариантов в компаунд-гетерозиготном состоянии, связанных с несовершенным остеогенезом и первичным иммунодефицитом у детей [Balasubramanian M. et al., 2017; Ricci S. et al., 2019; Petukhova D.A. et al., 2020; Khoreva A. et al., 2020; Cotrina-Vinagre F.J. et al., 2021; Lenz D. et al., 2021]. Помимо данных патологий, варианты в гене также обнаруживались при таких состояниях как сахарный диабет 2 типа, эпилепсия, синдром прерывания ножки гипофиза, atopический дерматит и акрофронтотациональный дизостоз 1 типа. Список новых состояний, при которых обнаруживаются новые варианты NBAS, пополняется с каждым годом благодаря распространению в клинической

практике технологии массового параллельного секвенирования [Naack T.B. et al., 2015].

Клиническое разнообразие NBAS-ассоциированных патологий также наталкивает на проблемы с поиском подходов к лечению таких состояний. Тактика лечения и профилактики печёночных осложнений трансплантацией печени не актуальна при терапии SOPH, равно как и поиск терапии атрофии зрительных нервов при патогенных вариантах детской печёночной недостаточности 2 типа, ввиду частичного отсутствия офтальмологических патологий у данной группы. Различными группами исследователей на протяжении многих лет так и не удалось найти эмпирически тех патогномоничных изменений в организме человека, к которым чувствительны стандартные и углубленные клинические и лабораторные методы. Поиску подходов к лечению должно предшествовать тщательное исследование той ключевой роли белка и клеточных механизмов, в которых он участвует. Выявление уязвимых точек приложения белка укажет примерное направление терапевтических подходов к лечению – нужно либо ингибировать токсическое воздействие патогенного белка, либо наоборот возмещать его недостаточную функцию. Если за вторую гипотезу – сниженное количество белка – есть множество подтверждающих исследований [Staufner C. et al., 2016; Balasubramanian M. et al., 2017; Palagano E. et al., 2018; Ritelli M. et al., 2020], то за поддержку первой гипотезы может служить исследование патогенного варианта с.938_939delGC и с.1342T>C, где исследователи сначала сравнили уровень белка у нормальных клеток и у клеток с патогенным вариантом с.1342T>C, p.C448R [Ji J. et al., 2023]. Было обнаружено, что в immortalized Т-лимфоцитах (Jurkat cells) уровень экспрессии мутантного мРНК и мутантного белка был ниже, чем у дикого типа, хотя количество вектора было трансфицировано одинаковое. Исследователи увеличили количество эктопического мутантного NBAS до уровня дикого типа и обнаружили, что данное воздействие вызывает увеличение содержания активных форм кислорода и апоптоз клеток, указывая на то, что у

мутантных белков могут появиться новые патогенные функции отличные от вариантов дикого типа [Ji J. et al., 2023].

1.4 СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ – ALPHAFOLD

Белковое моделирование играет ключевую роль в исследовании структуры и функции белков, что имеет особую значимость в контексте редких наследственных заболеваний. Точное моделирование структуры белка может помочь в понимании патогенеза этих заболеваний, а также в разработке новых терапевтических подходов. В последние годы появились несколько передовых методов моделирования белковых структур, включая AlphaFold, RosettaFold и ESMFold, которые продемонстрировали впечатляющие результаты [Abramson J. et al., 2024].

AlphaFold, разработанный DeepMind, представляет собой один из наиболее продвинутых методов предсказания структуры белка [Jumper J. et al., 2021]. Модель, основанная на глубоких нейронных сетях и обученная на тысячах экспериментально определенных белковых структур, значительно повысила точность предсказания, особенно для сложных и длинных последовательностей. Ключевой особенностью AlphaFold является его использование системы «attention», что позволяет модели учитывать контекст аминокислотной последовательности и предсказывать межатомные взаимодействия с высокой точностью. Исследования показали, что AlphaFold успешно предсказывает структуры белков даже для таких последовательностей, которые ранее считались слишком сложными для точного моделирования. Однако, как и у любого метода, у AlphaFold есть ограничения, такие как трудности с моделированием белок-белковых взаимодействий и динамических изменений структуры белков, что важно для понимания механизма действия патогенных вариантов [Pak M.A. et al., 2023].

RosettaFold, разработанный группой Дэвида Бейкера, также представляет собой метод глубокого обучения для предсказания структуры белка [Baek M. et

al., 2021]. В отличие от AlphaFold, RosettaFold использует гибридный подход, сочетающий в себе элементы традиционных методов моделирования с глубокими нейронными сетями. RosettaFold интегрирует информацию о структуре белка из нескольких источников, что позволяет ему достигать высокой точности предсказаний, особенно для белков, для которых имеются лишь частичные экспериментальные данные. Одним из преимуществ RosettaFold является его способность моделировать белок-белковые взаимодействия и мультимерные комплексы, что является важным аспектом при исследовании сложных биологических систем, таких как белковые сети, связанные с патогенезом заболеваний [Krishna R. et al., 2024].

ESMFold представляет собой метод, основанный на модели языкового типа, аналогичной GPT, но специально обученной на аминокислотных последовательностях [Lin Z. et al., 2023]. Этот метод использует трансформеры для предсказания контактов между аминокислотами и дальнейшего создания структурных моделей белков. ESMFold отличается высокой скоростью предсказания и способностью моделировать белки на основе минимальной информации о последовательности. Несмотря на относительную новизну, ESMFold показал конкурентоспособные результаты в сравнении с AlphaFold и RosettaFold, особенно в условиях, когда требуются быстрые предсказания для большого количества последовательностей. Однако, как и другие методы, ESMFold сталкивается с трудностями при моделировании белок-белковых взаимодействий и структурных изменений, вызванных патогенными вариантами [Barbarin-Bocahu I., Graille M., 2022]. AlphaFold, RosettaFold и ESMFold представляют собой три различных подхода к белковому моделированию, каждый из которых имеет свои сильные и слабые стороны. AlphaFold предлагает высокую точность в предсказании структуры одиночных белков, что делает его предпочтительным для базового моделирования.

RosettaFold, благодаря гибриднему подходу, лучше справляется с моделированием белок-белковых комплексов, что важно для понимания

взаимодействий в клеточных процессах. ESMFold, несмотря на свою новизну, предлагает быструю и эффективную альтернативу, особенно полезную в условиях ограниченного времени и ресурсов (Таблица 3).

Таблица 3. Сравнения методов белкового моделирования

Критерий	AlphaFold	RosettaFold	ESMFold
Методология	Глубокие нейронные сети, attention mechanism	Гибридный подход (традиционные + нейронные сети)	Обучение на последовательностях белков
Точность предсказания	Высокая	Высокая, но при наличии частичных данных	Сопоставимая, но ниже, чем у AlphaFold
Моделирование белок-белковых взаимодействий	Справляется	Хорошо справляется	Возможна при комбинации с другими методами
Скорость предсказания	Требуется вычислительных ресурсов	Быстрее, но зависит от доступных данных	Высокая скорость
Требования к вычислительным ресурсам	Высокие	Умеренные	Низкие
Основное применение	Предпочтительно для одиночных белков	Подходит для мультимеров и взаимодействий	При массовом анализе

Другими словами, AlphaFold обеспечивает наивысшую точность, RosettaFold более гибок в условиях неполных данных, а ESMFold оптимален для быстрого и масштабного анализа при ограниченных ресурсах [Li E.H. et al., 2023].

Для белка NBAS на сегодняшний день нет данных криоэлектронной микроскопии, на которые можно было бы опереться для предсказания его структуры с помощью RosettaFold. ESMfold хоть и показывает конкурентоспособные результаты, всё же AlphaFold (АФ) показал более высокоточные предсказательные способности относительно белковых структур [Jumper J. et al., 2021; Abramson J. et al., 2024]. Недавние публикации продемонстрировали, что предсказания АФ могут значительно улучшить процесс фазирования молекулярного замещения в рентгеновской кристаллографии, о чем свидетельствуют многочисленные исследования [Millán C. et al., 2021; Barbarin-

Bocahu I., Graille M., 2022; McCoy A.J., Sammito M.D., Read R.J., 2022]. Передовые методы глубокого обучения, такие как AlphaFold, широко применяются к данным ядерного магнитного резонанса [Huang Y.J. et al., 2021; Klukowski P., Riek R., Güntert P., 2023; Sedinkin S.L. et al., 2023] и криогенной электронной микроскопии [Maddhuri Venkata Subramaniya S.R., Terashi G., Kihara D., 2019; Zhong E.D. et al., 2021], что облегчает получение комплексной структурной информации о белках и их функциях [Dai X. et al., 2023; Chen J. et al., 2024]. AlphaFold служит направляющим и дополняющим инструментом при анализе экспериментальных данных, помогает генерировать гипотезы и тем самым ускоряет исследования в области структурной биологии [Li E.H. et al., 2023; Lai C.-H. et al., 2024]. Дальнейшие модификации AF расширили его использование для предсказания структуры белковых комплексов [Evans R. et al., 2022]. Это позволяет исследователям не только изучать структуру белка [Rossi Sebastiano M. et al., 2022; Legrand D. et al., 2023; Suleman M. et al., 2023], но и его пространственное расположение относительно других белков, а также места их прямого контакта [Gao M. et al., 2022]. Однако, несмотря на свою сильную предсказательную способность [Schmidt A. et al., 2022], судя по текущим исследованиям, AlphaFold имеет противоречивые доказательства для анализа свойств мутантных белков [Brandes N. et al., 2023; Cheng J. et al., 2023; Lin Z. et al., 2023; Pak M.A. et al., 2023]. Таким образом можно сделать вывод, что применение современных методов изучения белков и белковых комплексов дает новые возможности для анализа структуры и субдоменов белка. Однако, подобный анализ требует тщательного понимания ограничений данных инструментов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование заключалось в том, чтобы на первом этапе собрать клинико-генеалогические данные и описать фенотипические признаки у якутских пациентов SOPH, затем провести мета-анализ всех описанных мировых случаев и сравнить с якутскими пациентами (Таблица 4).

Таблица 4. Материалы и методы исследования

Ретроспективное обсервационное исследование	
Работа с данными Регистра наследственной и врожденной патологии МГЦ РБ №1-НЦМ	
Отбор больных с клинически подтвержденным диагнозом SOPH-синдром	93 пациента
Изучение генетических карт больных: описания фенотипа и течения заболевания	
Анализ данных инструментальных исследований: рентгенологические снимки, УЗИ	
Исследование «мета-анализ»	
Работа с литературными данными	
Литературный поиск пациентов с патогенными вариантам в гене <i>NBAS</i>	133 пациента
Генотип-фенотипический анализ патогенных вариантов <i>NBAS</i> : определение домен-специфического фенотипа	
Методы исследования	
Молекулярно-генетические методы	
Выделение ДНК пациентов с SOPH-синдромом, носителей, а также здоровых индивидов	45 индивидов
Разработка ПЦР-тест системы для диагностики патогенного варианта с.5741G>A	
Иммунологические исследования: измерение уровня Ig и иммунофенотипирование у пациентов SOPH и здоровых индивидов	23 индивида
Биоинформатические методы	
Моделирование белковых комплексов, участником которых является белок NBAS	27 комплексов
Исследование нарушения стабильности белка при патогенных вариантах	75 вариантов

После этого вычислительными методами молекулярной биологии (при помощи инструмента AlphaFold) исследовать мультисистемный фенотип *NBAS*-ассоциированных патологий (Рисунок 3). Опираясь на предыдущие литературные исследования физиологии белка, попробовать объяснить патофизиологию развития *NBAS*-ассоциированных патологий, включая SOPH-синдром. Таблица 4 обобщает дизайн исследования, включающего ретроспективный анализ клинических данных, мета-анализ литературы, молекулярно-генетические, иммунологические и биоинформатические методы. Такой комплексный подход позволил провести всестороннюю оценку генотип-фенотипических связей при *NBAS*-ассоциированных патологиях.

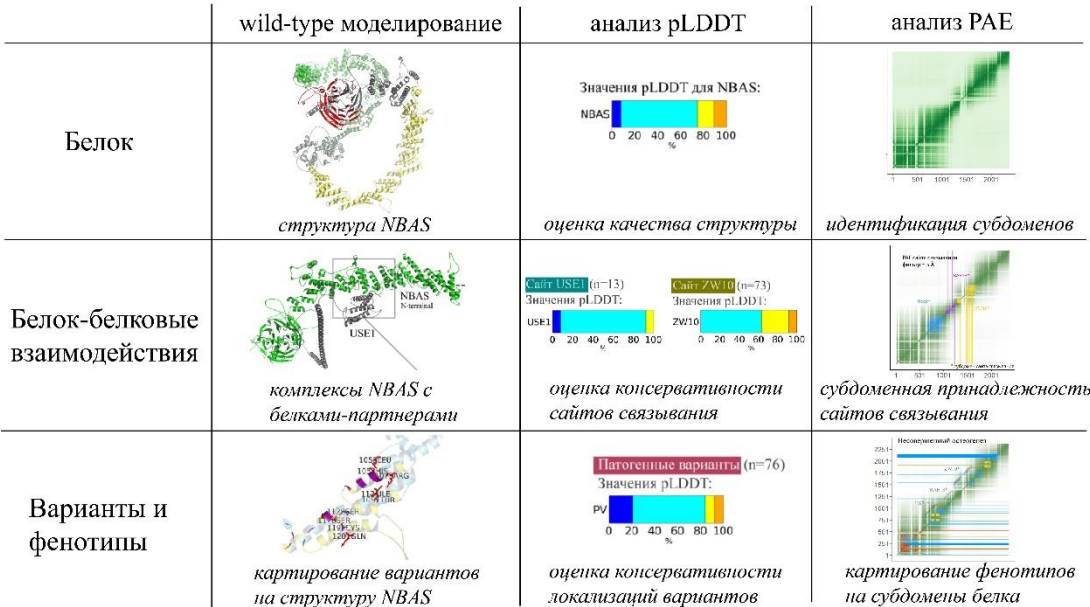


Рисунок 3. Дизайн исследования с применением AlphaFold для анализа белка NBAS. Приведены этапы исследований, включающие анализ одиночного белка, анализ комплексов белка с его белками-партнерами, а также оценку влияния патогенных вариантов и их фенотипов на свойства NBAS дикого типа.

Дизайн исследования заключался в поиске фенотипических признаков якутских пациентов SOPH в историях болезни. Все пациенты наблюдались в Медико-генетическом центре г. Якутска. Фенотипические признаки пациентов с *NBAS*-ассоциированными патологиями были взяты из публикаций клинических случаев и оригинальных исследований. Для иммунопрофилирования была взята выборка из пациентов SOPH и здоровых индивидов.

Для поиска патогенных вариантов использовались популяционные базы данных (Gnomad и др.), а также специализированные базы данных патогенных вариантов (LOVD и др.). Кроме этого, также использовались опубликованные клинические случаи.

Для моделирования белковых структур и обнаружения белок-белковых взаимодействий использовался инструмент AlphaFold (Рисунок 3).

2.2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ

2.2.1 Оценка фенотипических признаков у пациентов SOPH

Материалом для клинико-генетического исследования являлись генетические карты ранее не описанных 59 пациентов с SOPH-синдромом, а также новые осмотры ранее описанных 34 пациентов [Maksimova N. et al., 2010], полученных путем исследований либо рутинной клинической диагностики. Все пациенты были осмотрены в Медико-генетическом центре г. Якутска.

При включении пациентов в выборку оценивалось наличие фенотипических признаков SOPH, включающих постнатальную гипоплазию, атрофию зрительного нерва и/или пельгеровскую аномалию лейкоцитов. Эти же признаки были критерием для проведения молекулярно-генетического тестирования для подтверждения носительства варианта SOPH методами ПЦР-ПДРФ, ПЦР в реальном времени, а также таргетным панельным секвенированием.

Для описания фенотипа в диссертации используется информация о доле лиц с данными клиническими симптомами, а также количество человек в группе, которые также исследовались на данный признак. Для описания определенной системы или внешнего вида, сообщается о частоте данного признака в виде наиболее частого признака, встречающегося в половине случаев и встречающегося редко. Также предоставляются характеристики некоторых клинических проявлений, например иммунологических исследований и описания структур головного мозга. Далее проводится сравнение литературных данных с данными якутских пациентов с SOPH-синдромом.

2.2.2 Объект исследования при иммунопрофилировании

Объектами исследования являлись: 1) Сыворотка периферической крови условно здоровых индивидов и пациентов с SOPH-синдромом; 2) Иммунокомпетентные клетки условно здоровых индивидов и пациентов с SOPH-синдромом. Образцы цельной крови были получены в ГАУ РС(Я) «РБ№1-НЦМ». Выборка сформирована из числа жителей г. Якутска (Республика Саха (Якутия), Россия) в возрасте от 6 до 47 лет ($n=32$, 11 мужчины, 21 женщин; средний возраст: 34 ± 9 года).

2.2.3 Мета-анализ

2.2.3.1 Литературный поиск для исследования домен-специфического фенотипа SOPH

Для поиска патогенных вариантов в гене *NBAS* проведен поиск в международных базах данных GnomAD, LOVD, а также в публикациях в рецензируемых научных журналах. Поиск в таком случае проводился через ресурс scholar.google.com с ключевыми словами: *NBAS*, *NAG* (прежняя версия *NBAS*), *NRZ* (*NBAS*, *RINT1*, *ZW10*) комплекс, *ILFS2* (*RALF*, *ALF*), *SOPH*.

Для сравнительной характеристики *SOPH* с другими *NBAS*-ассоциированными состояниями использовались обзорные исследования и клинические случаи, описывающие пациентов с вариантами на С-конце гена *NBAS*. Был проведен мета-анализ, по результатам которого было найдено 63 статьи на тему генетического и клинического описания пациентов с вариантами в гене *NBAS* ($n = 140$). Из них были отобраны 28 статей, которые в своем описании имеют пациентов с патогенными вариантами на С-конце гена ($n=58$). Так как известна генотип-фенотипическая связь доменов с клиническими проявлениями патогенных вариантов, из них дополнительно были исключены пациенты с компаунд-гетерозиготным носительством вариантов на домене β -пропеллер, SEC39. В финальную выборку попали 11 статей с описанием 18 пациентов с гомозиготными, компаунд-гетерозиготными вариантами на С-конце. Всего в данное исследование вошло 111 пациентов с вариантами только на

С-конце гена *NBAS*, включая якутских пациентов (Приложение 1).

2.2.3.2 Литературный поиск для белок-вариант-фенотипического исследования *NBAS*

Данные о пациентах были получены из обзорных статей и клинических случаев, описывающих патогенные варианты и связанные с ними фенотипы (Приложение 2). Первоначально были собраны данные для пациентов только с вариантами, приводящими к изменениям в последовательности белков, в частности, для миссенс-гомозигот или миссенс-компаундов. Однако описаны также случаи дупликаций и делеций, как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состояниях, затрагивающие аминокислоты, не вызывающие сдвига рамки считывания. После тщательной проверки их фенотипа эти пациенты также были включены в исследование. Для некоторых клинических случаев авторы предоставили подтверждающие РНК-исследования, в которых последовательности РНК были нарушены из-за делеций или вариантов пропуска экзона без смещения рамки считывания. Эти исследования также были включены, если предполагается, что эта РНК в дальнейшем будет принимать участие в трансляции белков.

С данных статей были собраны все возможные фенотипические признаки. После сбора были отобраны только наиболее часто представленные в подборке. Что касается скелетных аномалий, был сделан акцент на низком росте, поскольку это была наиболее распространенная особенность среди скелетных аномалий. Для несовершенного остеогенеза оценка основывалась на отсутствии патологических переломов в истории болезни, что указывает на отсутствие несовершенного остеогенеза. Были включены только случаи ОПН, описанные в анамнезе пациента по печеночному фенотипу, тогда как просто случаи с повышенным уровнем АЛТ и АСТ были отфильтрованы как отдельный признак. Для дефицита Ig были взяты случаи с любыми изменениями уровня иммуноглобулинов ниже соответствующих нормальных значений. В выборку также были включены единичные случаи дефицита одного типа иммуноглобулина.

При возникновении противоречивых данных рассматриваемый признак был заменен на NA (данных нет).

2.3 ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.3.1 Иммунопрофилирование

2.3.1.1 Иммунофенотипирование

Общий анализ крови (с лимфоцитарной формулой) был определен стандартным методом с помощью гематологического анализатора ABX Micros 60 («Horiba», Франция).

Забор периферической крови (9 мл.) проводился в вакуумную пробирку VACUETTE, содержащую в качестве антикоагулянта K3-EDTA («Greiner Bio-One», Австрия). В исследовании использовались образцы цельной крови. 50 мкл крови окрашивались с моноклональными антителами фирмы «Beckman Coulter» (США) в соответствии с рекомендациями производителя: HLA-DR-FITC, CD56-PE, CD16-PE, CD4-ECD, CD19-ECD, CD8-PC5.5, CD3-PC7, CD45-APC. После внесения антител образцы тщательно перемешивали, затем инкубировали при комнатной температуре 15 минут в защищенном от света месте. По завершении инкубации при постоянном перемешивании добавляли 500 мкл лизирующего раствора VersaLyse Lysing Solution («Beckman Coulter», США), инкубировали еще 10 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте. Анализ образцов проводили на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов набиралось не менее 10000 лимфоцитов. Для настройки напряжения по каналам флуоресценции использовали образцы крови, окрашенные каждым из антител по отдельности. Настройка компенсаций осуществлялась в автоматическом режиме программного обеспечения проточного цитометра Navios [Кудрявцев И.В., Субботовская А.И., 2015]. Анализ полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения Navios™ Software v1.2 («Beckman Coulter», США).

2.3.1.2 Определение сывороточного уровня иммуноглобулинов

Для определения уровня иммуноглобулинов были использованы образцы сыворотки крови условно здоровых индивидов и пациентов с SORH-синдромом. Для получения образцов сыворотки набирали по 4 мл венозной крови в вакуумные пробирки VACUETTE, содержащие активатор свертываемости («Greiner Bio-One», Австрия). Уровни иммуноглобулинов в сыворотке крови определяли с помощью коммерческих наборов фирмы АО «Вектор-Бест» (Россия) методом иммуноферментного анализа. Детекция результатов проводилась на спектрофотометре FilterMax F5 («Molecular Devices», США).

2.3.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК проводилось несколькими способами в зависимости от материала и доступности реагентов. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции, а также экспресс-наборами согласно инструкции («Евроген», «Алькор-Био»). Кровь забирали с помощью стандартной процедуры из локтевой вены в пробирку с ЭДТА. Образцы крови пациентов хранились в холодильнике при -20°C , перед процедурой выделения ДНК кровь размораживали при комнатной температуре и перемешивали. Выделенную ДНК хранили при температуре -20°C .

Измерение концентрации и проверку чистоты исследуемой ДНК и контрольных образцов проводили с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 («Nanodrop», США). Оптимальная концентрация ДНК в образце для проведения ПЦР в режиме реального времени составляла 10 нг/мкл (6,1–16,4 нг/мкл). Чистота образцов определялась значениями соотношений A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} , характеризующих оптическую плотность раствора при длинах волн 260 нм и 280 нм, 260 нм и 230 нм. ДНК считалась свободной от белковых примесей при $A_{260}/A_{280} \approx 1,8\text{--}2,0$, и свободной от солей при $A_{260}/A_{230} > 1$.

2.3.3 Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

С целью выявления патогенного варианта SOPH в гене *NBAS* была разработана ПЦР тест-система. В качестве контрольного набора для ПЦР в реальном времени использовался набор компании ООО «Тестген» (Россия).

2.3.3.1 Дизайн олигонуклеотидов

Подбор праймеров осуществлялся с помощью программы Benchling – Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) и баз данных Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), NCBI Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu>). Проверка специфичности выбранных праймеров проводилась с использованием программ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

При подборе оптимальных праймеров учитывались следующие условия:

1. рекомендуемая длина праймера – 18-23 п.н.;
2. размер продукта амплификации – 80-150 п.н.;
3. температура плавления (T_m) – 58-60°C, причем T_m праймеров, работающих в паре, должна отличаться не более, чем на 1°C;
4. содержание C/G – 40-60%;
5. четыре и более 3'-концевых нуклеотида не должны быть комплементарны самому праймеру и праймеру в паре, иным синтетическим олигонуклеотидам, добавляемым в реакцию;
6. в составе последовательности не должно быть четыре и более подряд расположенных одинаковых нуклеотида.

Праймеры высокой степени очистки синтезировали в ООО «Синтол» (Россия).

При дизайне ПЦР набора были использованы флуоресцентные зонды R6G и ROX, с тушителями (гасителями) BHQ1 и BHQ2, соответственно. ПЦР-смесь с полимеразой («Синтол»). Последовательности и свойства праймеров и зондов, использованных на различных этапах создания тест-системы приведены в

результатах.

2.3.3.2 Проведение количественной ПЦР в реальном времени

Составление пропорций мастер-микса проводилось по инструкции изготовителя. Объем смеси был уменьшен с 20 до 10 мкл. Запуск амплификатора проводился с параметрами, указанными в инструкции изготовителя. Эксперименты с изменениями параметров проведения ПЦР приведены в результатах.

В качестве контрольных образцов были использованы материалы биобанка Научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная Медицина и Генетика Человека» Медицинского института Северо-восточного федерального университета им М.К. Аммосова (МИ СВФУ) – WT/WT (n=15), WT/MT (n=15), MT/MT (n=15). ПЦР реакция проводилась с использованием термоциклера Bio-RAD CFX96 Real-Time System C1000 Touch Thermal Cycler («Bio-Rad», США).

2.3.3.3 Анализ графиков количественной ПЦР в реальном времени

Оценка относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) по графикам аллельной дискриминации проводилась программным обеспечением Bio-Rad CFX Manager («Bio-Rad», США).

Графики аллельной дискриминации использовались для определения генотипа образца путем сравнения флуоресцентных сигналов от различных зондов. Каждый зонд имеет свой флуоресцентный сигнал, который соответствует определенному аллелю. Оценка проводилась по величине свечения зондов, выраженных в ОЕФ. Например, если образец содержит только аллель, который соответствует зонду FAM, то будет наблюдаться только флуоресцентный сигнал от зонда FAM по соответствующей оси на графике. Если образец содержит только аллель, который соответствует зонду ROX, то будет наблюдаться только флуоресцентный сигнал от зонда ROX. Если образец содержит оба аллеля, то будет наблюдаться флуоресцентное свечение от обоих зондов, хоть и немного слабое по сравнению с их гомозиготными вариантами.

2.4 БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Белковые последовательности и структуры, в виде форматов файла FASTA и PDB соответственно, были взяты из баз данных AlphaFold Protein Structure Database и Interpro EBI [Paysan-Lafosse T. et al., 2023; Varadi M. et al., 2022]. Структуры были визуализированы в PyMOL v.2.0 (Schrödinger, LLC).

Для анализа сайтов связывания компонентов комплекса был использован ресурс PRODIGY (PROtein binDIng enerGY prediction) [Xue L.C. et al., 2016]. Данный пакет программ представляет собой набор сервисов, ориентированных на предсказание интерфейса связывания в биологических комплексах. Был написан код на языке Python3 для быстрой обработки выходных данных.

2.4.1 AlphaFold

При отсутствии PDB файлов, трехмерная структура белков была воссоздана с использованием программного обеспечения AlphaFold. На текущий момент существуют две версии AlphaFold – AlphaFold2 (AF2) в виде репозитория и базы данных, и AlphaFold3 (AF3) в виде веб-сервиса [Abramson J. et al., 2024; Jumper J. et al., 2021]. Для запуска AF2 использовалась платформа AD3, которая включает собственную версию AF2, называемую AD3 Complex. AD3 Complex – это метод предсказания сложных структур с использованием метода AlphaFold-Gap. Метод AlphaFold-Gap предсказывает структуры белковых комплексов, используя модель AlphaFold с промежутками в 200 остатков между цепями. Разница между этим методом и AD3 Complex заключается в этапе генерации MSA; AD3 Complex использует парный метод генерации MSA, соответствующий AlphaFold-Multimer, а AlphaFold-Gap использует mmseq2. Данные о последовательностях белков партнеров NBAS были получены из собственной библиотеки платформы AD3.

Платформа ограничена вводом 2000 аминокислот. Чтобы устранить эти ограничения, был сделан акцент в первую очередь на дизайн экспериментальных данных, представленных в предыдущих статьях. Для оценки расстояний между цепями в комплексе использовали метрику расстояний аминокислотных остатков для оценки наличия контактов (значение фильтра = 10 Å). Для визуализации

данных тепловой карты расстояний был использован Python 3 и библиотека Seaborn (версия 0.12.2). Все используемые коды доступны на GitHub.

Первоначально данное исследование проводилось полностью с использованием второй версии инструмента AlphaFold. В ходе выполнения работ была выпущена третья версия, и все анализы AlphaFold 2 (AF2) были повторены с использованием AlphaFold 3 (AF3) (Приложение 3). Порядок запусков AF3 был аналогичен порядку запусков AF2 для достижения лучшей репрезентативности. Однако были проведены запуски более крупных комплексов для оценки обнаруженных взаимодействий в более обширных комплексах (данные не показаны). Во всех случаях эти взаимодействия были подтверждены. AF3 сам генерирует данные о контакте между цепями комплекса. Основное отличие состоит в том, что, в AF2 были использованы фактические расстояния, а тут в первую очередь на собственный показатель присутствия контакта в данных инструмента AF3. Шкала наличия контактов варьировалась от 0 до 1 для данных AF3 (значение фильтра = 0,5). Визуализация также выполнялась с использованием Python 3 и библиотеки Seaborn.

2.4.1.1 Метрика достоверности локальной структуры

Для оценки достоверности локальной структуры используется pLDDT (предсказываемый тест на разницу локальных расстояний, predicted local distance difference test). Была использована модель белка NBAS из базы данных структуры белков AlphaFold. При сравнении созданного белка NBAS в AF3 с версией из базы данных, в версии AF2 наблюдался более высокий процент аминокислот с высокими значениями pLDDT, что стало мотивацией выбрать эту модель.

2.4.1.2 Метрика достоверности глобальной структуры

Для анализа достоверности глобальной структуры используются графики PAE (предсказанная ошибка выравнивания, predicted aligned error). В работе использованы пять созданных моделей белка NBAS из AF3. Все пять моделей были наложены на матрицу и объединены путем усреднения значений каждой

ячейки.

Для оценки упаковки одной аминокислоты с другими мы использовали два фильтра: 5 ангстрем и 3 ангстрема. Например, это означает, что аминокислота А будет расположена в диапазоне ошибок в 3 или 5 ангстрем от аминокислоты В. Чем меньше ожидаемая ошибка, тем более плотно упакованы А и В относительно друг друга. Поскольку график PAE несимметричен, при оценке упаковки одной аминокислоты с другими мы брали список упакованных аминокислот по фильтру как по осям X, так и по Y и объединяли списки по сходству. Это означает, что мы отфильтровали упакованные аминокислоты, которые присутствовали только на одной оси, оставив те, которые были упакованы на обеих осях. Это было сделано для большей достоверности данных. Графики PAE были визуализированы с использованием библиотеки ggplot2 в R. Все коды доступны на GitHub.

2.4.1.3 Картирование фенотипа

Для картирования фенотипов мы использовали наложение субдоменов вариантов – варианты с наличием фенотипа в гомозиготном состоянии или компаунд-гетерозиготном состоянии – и случаев, когда фенотип пациента был описан, но было подтверждено отсутствие исследуемого признака. Чтобы представить эти данные, были послойно наложены данные на график – начиная с субдоменов, где фенотип не был описан, затем следовали компаунд-гетерозиготные варианты и, сверху, гомозиготные патогенные варианты (Рисунок 4).

2.4.1.4 Метрика качества структур

Метрика качества была соблюдена, когда все пять предсказанных моделей, созданных AlphaFold, показывали идентичные сайты связывания с белком-партнером. Чтобы отфильтровать случаи с ненадежными предсказаниями, была усреднена матрица атомных расстояний и повторно оценена близость аминокислотных остатков друг к другу (Рисунок 5).

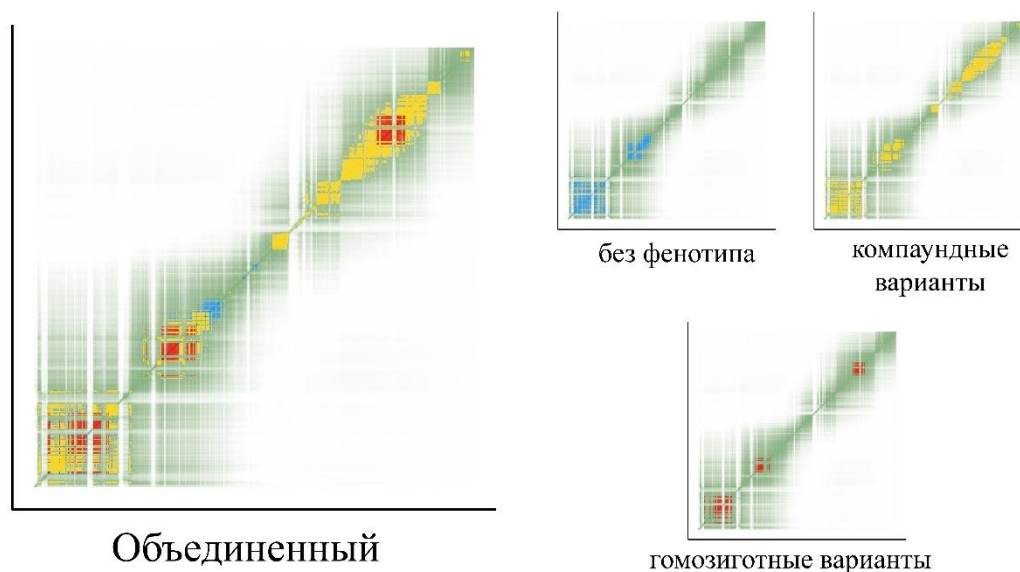


Рисунок 4. Пример картирования фенотипа низкого роста. Локализация каждого варианта с фенотипическими данными и без картируется на структуру графика PAF. Далее происходит их объединение путем наложения сначала графика с отсутствием фенотипа, фенотипа при варианте в компаунд-гетерозиготном состоянии, и на верхнем слое – варианты в гомозиготном состоянии.

На этом рисунке представлен случай, в котором первоначально был идентифицирован предполагаемый сайт связывания между TANGO1 и ZW10. Однако это взаимодействие исчезло после изменения дизайна исследования с использованием более длинного сегмента белка. Таким образом, взаимодействие ZW10/TANGO1 не прошло проверку качества, и консенсусные сайты связывания не были идентифицированы. Сайты связывания, представленные в основной работе, прошли данную проверку качества.

2.4.2 Вычислительные исследования белка NBAS

2.4.2.1 Оценка нарушения стабильности белка при миссенс вариантах

Стабильность белка исследована при помощи программного обеспечения YASARA, плагином FoldX [Buß O., Rudat J., Ochsenreither K., 2018; Land H., Humble M.S., 2018]. YASARA является молекулярным графическим программным обеспечением для визуализации трехмерных структур, а FoldX является алгоритмом, который использует эмпирическое поле силы для анализа белковых молекул и ДНК.

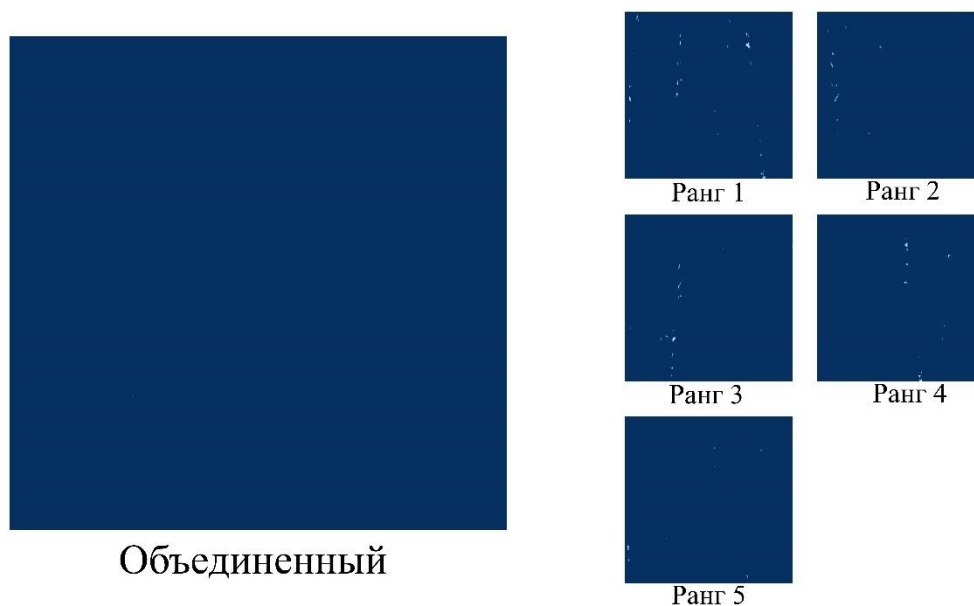


Рисунок 5. Пример создания консенсусного сайта связывания ZW10/TANGO1. Пять сгенерированных моделей белкового взаимодействия объединяются в один график атомных расстояний. При совпадении близких участков на всех пяти моделях они будут указаны белыми точками, при несовпадении – размываться и отображаться синими.

Канонические PDB файлы соответствующих белков были взяты из базы данных AlphaFold. Функцией RepairPDB были обработаны файлы перед проведением анализа стабильности белка.

С целью исследования влияния множества описанных вариантов с предсказанной патогенностью на стабильность белка был создан скрипт на языке программирования Python использующий FoldX для анализа стабильности, который представлен в соответствующем репозитории. Входными данными являются текстовые файлы, содержащие однобуквенное обозначение аминокислот дикого типа и мутантного варианта, позицию и цепь. На выходе генерируется текстовый файл, содержащий все результаты работы программы FoldX при заданных вариантах замены и анализ стабильности.

В контексте измерения стабильности белка используется изменение свободной энергии Гиббса для определения термодинамической устойчивости белка. Чем меньше изменение свободной энергии Гиббса, тем более устойчивым является белок. Для оценки изменения стабильности при миссенс-вариантах была взята разница между стабильностью белка дикого типа и мутантным.

2.4.2.2 Создание сети белок-белковых взаимодействий

Для создания сети белок-белковых взаимодействий был использован веб-ресурс <https://string-db.org/> [Szklarczyk D. et al., 2021]. Параметры при установке: minimum required interaction score = 0.7, max number of interactors to show = 50. Остальные параметры были по умолчанию.

2.4.2.3 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 7.0 («StatSoft», США). Статистически значимые различия проверялись t-тестом Стьюдента. Результаты в графиках представлены в виде среднего и стандартного отклонения. Все выявленные различия считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Для решения специфических задач обработки данных использованы скрипты Python3 и R. Графики были сделаны с помощью языка статистического анализа и визуализации R (<https://www.r-project.org>) на пакетах dplyr, ggplot2. Сглаживание при построении центильных распределений и таблиц данных проводили с помощью процедуры LOWESS с параметрами SmoothF = 0,3. Центильные карты взяты из популяционных данных якутов («Динамика антропометрических характеристик и артериального давления у детей Республики Саха (Якутия)», 2017).

2.4.3 Репозиторий

Данные и код для работы с таблицами фенотипов пациентов SOPH выложены в открытом доступе при помощи ресурса GitHub – <https://github.com/LyonyaZhozhikov/Article-Origins-of-SOPH-script>. Скрипты работы с трехмерными структурами белков также в открытом доступе в репозитории GitHub – <https://github.com/LyonyaZhozhikov/Abstract-Structural-Insights-of-SOPH-script>. Скрипты для работы с данными AF приведены в следующем репозитории – <https://github.com/LyonyaZhozhikov/Article-PVP-Study-of-SOPH-script>.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 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) методом ПЦР-ПДРФ (Рисунок 6), ПЦР в реальном времени, секвенированием по Сэнгеру либо таргетным панельным секвенированием, кроме одного пациента у которого выявлено гетерозиготное носительство данного варианта и одной девочки с компаунд-гетерозиготным вариантом с.2535G>T (p.W845C), с.5741G>A (p.R1914H) описанным нами ранее [Petukhova D.A. et al., 2020]. Также при наличии дополнительных показаний у данных пациентов проводилось молекулярно-генетическое тестирование на наличие 3М-синдрома, нейронального цероидного липофусциноза 6 типа и атаксии Фридрейха (данные не представлены).

3.1.1 Демография

Всего за данный временной период было обследовано 93 пациента из 86 семей с подтвержденным случаем SOPH. Количество мужчин 37 (39,8%), а женщин 56 человек (60,2%). Частота заболеваемости составила чуть более 1,8 пациентов на 10 000 якутской популяции, ранее она составляла 1 на 10 000 якутов [Максимова Н.Р. с соавт., 2016]. Все пациенты из якутских семей, кроме одного из эвенской. Максимальный возраст осмотренного пациента равен 53 годам (Рисунок 7).

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.

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). Также данные пациенты хорошо достигали своих контрольных точек развития (сидения, переворачивания и так далее).



Рисунок 6. Фенотип якутских пациентов с SOPH (p. R1914H). Фотографии пациентов. Лицевые признаки включают круглую голову, короткую шею, круглое лицо, длинный фильтр. В некоторых случаях наблюдается эпикантус, круглые глаза, гипоплазия скуловой кости, маленький нос, тонкие губы, старческая кожа, тонкие волосы. На конечностях: микромелия конечностей, широкая стопа, сандалевидная щель.

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%).

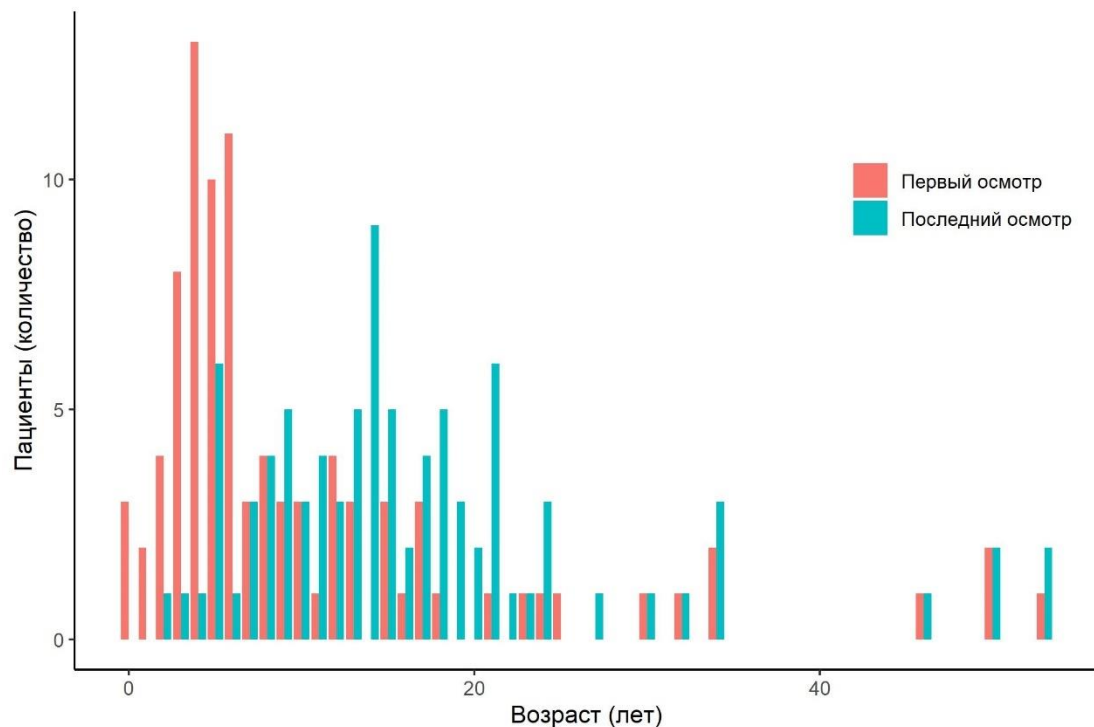


Рисунок 7. Возраст и количество пациентов с SOPH-синдромом во время первого и последнего осмотра. Волна первичных осмотров приходится на возраст от 3 до 5 лет, когда впервые обнаруживаются признаки потери остроты зрения и отставания в росте. В то время как последние осмотры (на момент составления графика) приходятся в основном с 15 до 20 лет, когда пациенты начинают переходить с педиатрического приема на терапевтический. Можно обратить внимание, что SOPH-синдром не жизнеугрожающее состояние, так как на графике отображены первичные приемы пациентов в возрасте более 40 лет.

Общий фенотип представлен диспластическим типом телосложения, гипотрофией, низким ростом с микромелией конечностей (Рисунок 5, 6 и 7). Примерно в половине случаев встречаются аномалии черепа в виде гидроцефалии, брахицефалии, микроцефалии и так далее, 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 *NBAS* (Приложение 4). Из них двое пациентов представлены в научном комментарии о гемофагоцитарном лимфогистиоцитозе

без подробных фенотипических данных [Bi X. et al., 2022]. Один пациент представлен в исследовании по поиску вариантов при ALF неизвестной этиологии, также без подробного описания [Hegarty R. et al., 2021]. Оставшиеся 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-конца белка NBAS.

3.1.2 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 не наблюдается.

3.1.3 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.

Стоит отметить, что оценка распространенности и частоты заболеваний ЛОР органов довольно сложна при SOPH, так как первичные жалобы у пациентов

и так связаны с частыми инфекционными заболеваниями. Данные приведенные ниже могут быть интерпретированы как признаки заболеваний ЛОР органов, продолжающих рецидивировать после раннего детского возраста. Средний возраст первого обращения к специалисту ЛОР составил ~10 лет, а последнего обращения ~12 лет. Всего было осмотрено 48 человек. 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.

Жалобы на частые инфекционные заболевания, например бронхиты и пневмонии, встречались в половине случаев, описанных в литературе [Staufner C. et al., 2020]. Также в одном случае была обнаружена тугоухость смешанной этиологии, что в целом соответствует фенотипу С-конца.

3.1.4 Офтальмологические признаки

У всех пациентов была обнаружена частичная атрофия зрительного нерва на этапе первых осмотров, тем не менее у некоторых пациентов (n=5) отсутствовали повторные осмотры офтальмологом. В целях объективности данные пациенты не были включены в выборку по офтальмологическим признакам.

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, лагофталм 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 [Staufner C. et al., 2020]. 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.

3.1.5 Костная система

Показанием к направлению в Медико-генетическую службу являлся синдром нанизма с подтвержденным отсутствием эндокринологической этиологии (Рисунок 8).

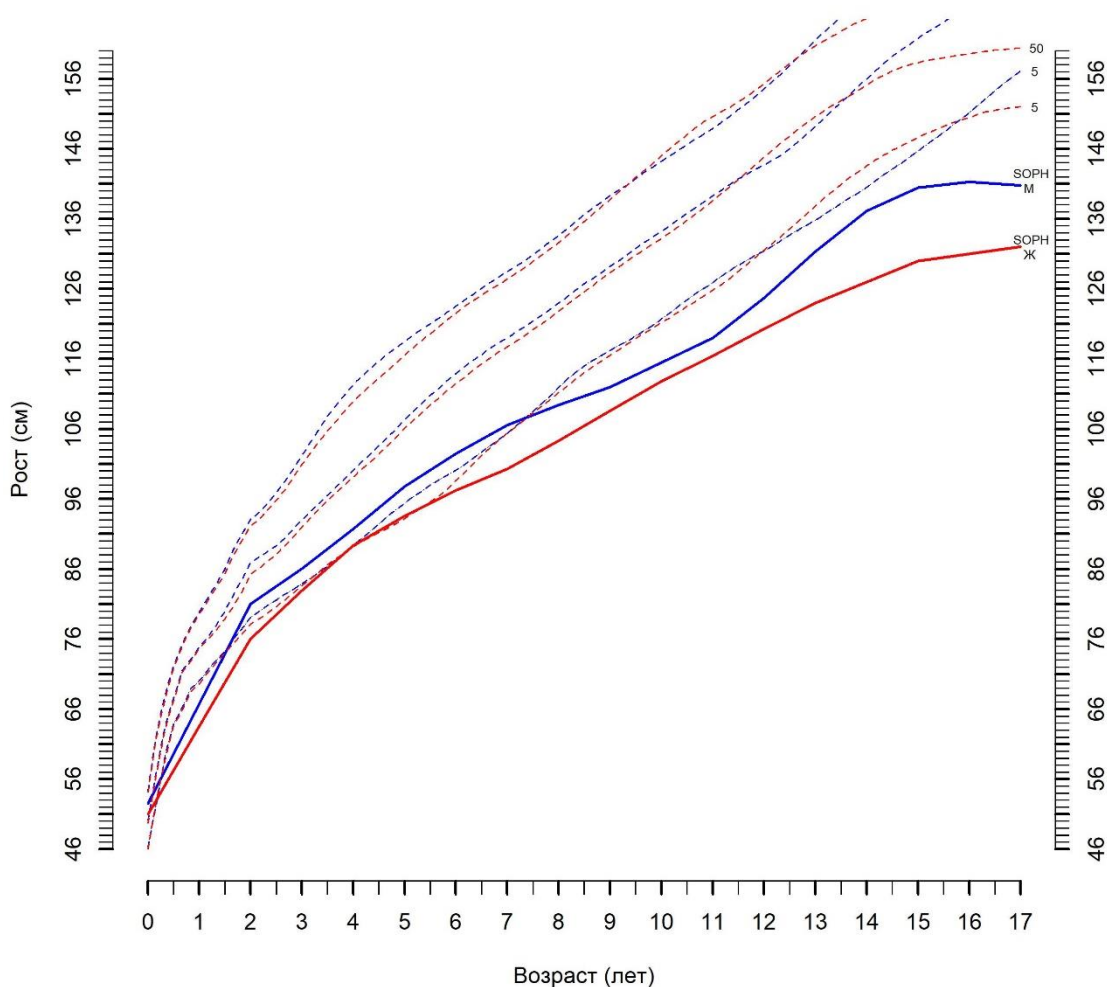


Рисунок 8. График роста и возраста. Показывает развитие отставания в росте у пациентов с SOPH примерно в возрасте трёх лет. Хотя показатели роста и на нижней границе центильных значений в начале, далее показатели роста не поднимаются выше 5 центильных значений якутской популяции, это указывает на сильное отставание в росте по мере взросления ребенка. Верхние пунктирные линии соответствуют 95, средние 50, нижние 5 центили. Красные линии соответствуют женщинам, синие мужчинам SOPH.

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 (Рисунок 9).

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. Травматические эпизоды в виде переломов, вывихов и растяжений встречались у 6 пациентов. Нарушения осанки наблюдались у 26 пациентов.

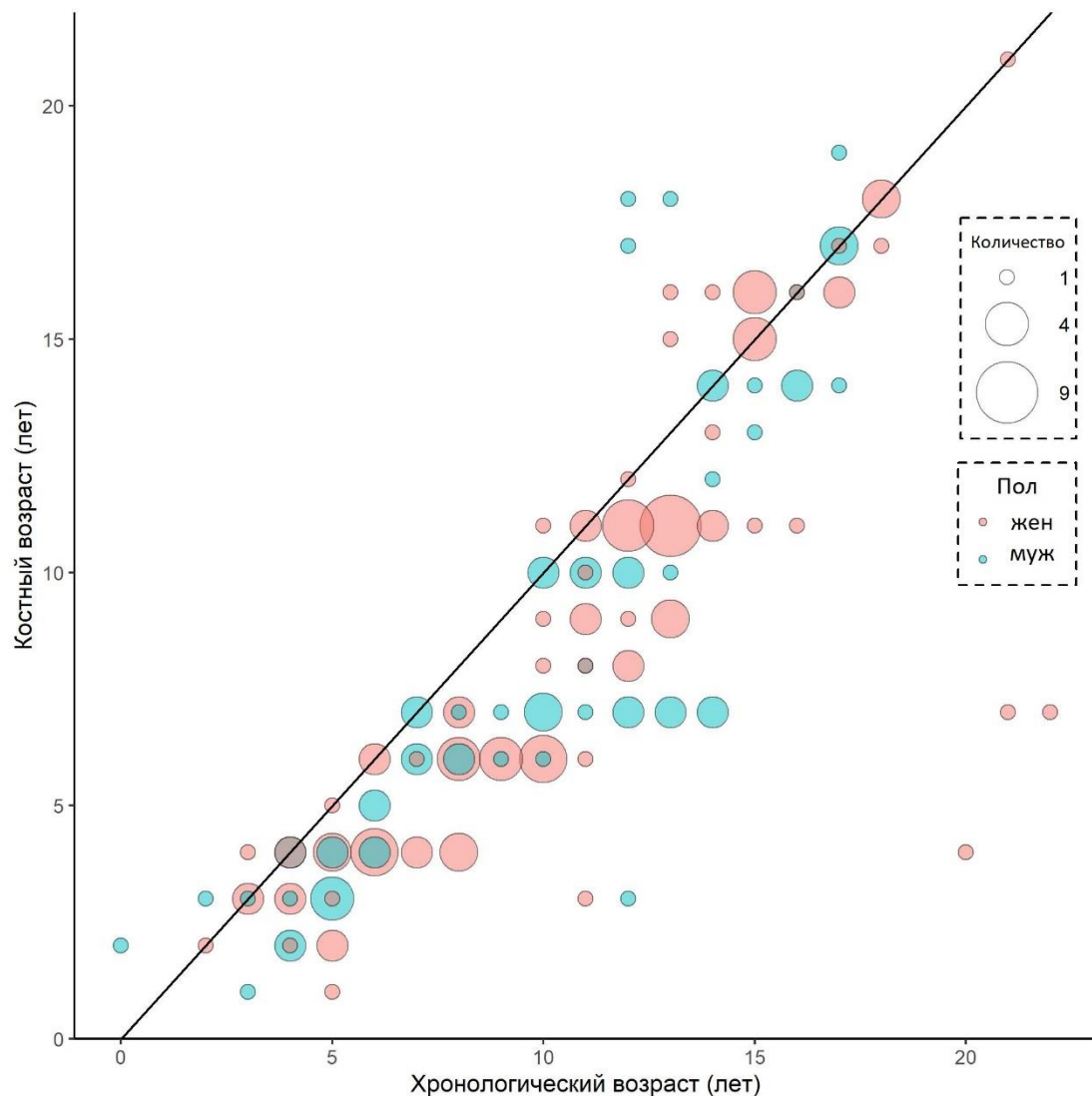


Рисунок 9. Клиническая характеристика якутских пациентов с SOPH: рентгенологические данные в зависимости от возраста. График соотношения костного и хронологического возраста указывает на то, что пациенты с SOPH склонны к отставанию костного возраста вне зависимости от пола и возраста.

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. Однако, в литературе у одного пациента из Германии был описан нормальный рост при варианте на С-конце со смещением рамки считывания. До сих пор это единственный описанный пациент без постнатальной задержки роста при варианте на С-конце [Staufner C. et al., 2020].

3.1.6 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 6 пациентов в анамнезе были обнаружены эпизоды судорог, но без ЭМГ или ЭЭГ подтверждения. 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 случаев 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, неврологическая картина соответствует фенотипу вариантов на С-конце белка NBAS.

3.1.7 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 двенадцать. Большое количество пациентов с аномалиями и клиническими проявлениями в желчном пузыре у пациентов с SOPH также может говорить о возможном нарушении в липидном обмене при варианте SOPH с геном NBAS. Участие белка NBAS в котором подтверждалось исследованиями ранее [Xu D. et al., 2018].

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. Были также 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 также обнаружена аномалия развития в виде поликистоза обеих почек у одного пациента.

Пациенты также страдали от случаев эзофагита, гастрита, дуоденита, энтерита, колита, проктита, целиакии, дисбактериоза и пиелонефрита, но без тяжелых осложнений (данные не приведены). Был также обнаружен 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 [Staufner C. et al., 2020]. Из них у пяти описаны случаи полноценного ALF. Учитывая данное обстоятельство, было проведено более глубокое исследование лабораторных данных якутских пациентов, сложность которого заключалась в разных стандартах количественной оценки АЛТ и АСТ в разные временные промежутки. Приблизительно можно сказать лишь о нескольких пациентах ($\sim 10/83$) у которых можно обнаружить повышение АЛТ и АСТ, но без известных описанных эпизодов ALF. В целом можно сказать, что повышение печеночных ферментов можно встретить при вариантах NBAS даже при SOPH синдроме, но с более редкими случаями тяжелого осложнения в виде ALF.

3.1.8 Эндокринологическая система

Всем пациентам был диагностирован синдромальный нанизм не гипофизарного генеза. При этом показатели ИМТ практически во всех случаях находятся на нижних центилях (Рисунок 10). Дополнительные 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 примерно 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 показали три случая инсулин-зависимого нетипичного сахарного диабета. Как было описано в предыдущей главе, у якутских пациентов с SOPH также был обнаружен подобный случай. В целом можно сказать, что эндокринологическая картина у пациентов с вариантами на С-конце белка NBAS стабильна.

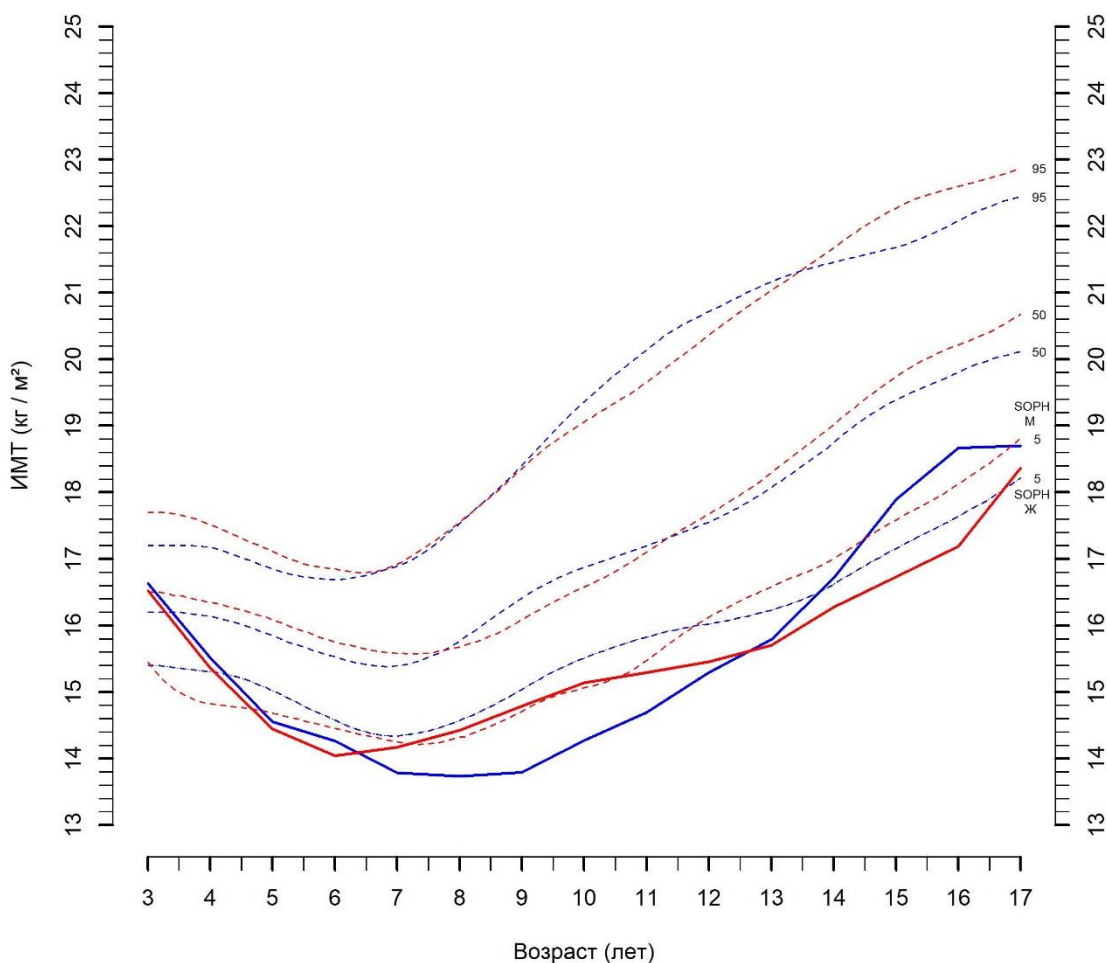


Рисунок 10. График ИМТ и возраста, показывающий развитие отставания в массе тела в возрасте около 5 лет. Несмотря на то, что в показателях роста наблюдались сильные отставания от центильных значений, в показателях ИМТ пациенты с SOPH-синдромом примерно находятся на нижних границах 5 центили графиков ИМТ якутской популяции. Верхние пунктирные линии соответствуют 95, средние 50, нижние 5 центили. Красные линии соответствуют женщинам SOPH, синие мужчинам SOPH.

3.1.9 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 агглютинабельности (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 [Staufner C. et al., 2020]. Были также описаны случаи анемии, тромбоцитопении и лейкопении, что в целом соответствует фенотипу вариантов на С-конце белка NBAS [He T.Y. et al., 2017].

3.1.10 Фенотип варианта NBAS c.5741G>A (p.Arg1914His) в компаунд-гетерозиготном состоянии

Также была произведена попытка сравнительного анализа между фенотипом SOPH и носителями варианта p.R1914H в компаунд-гетерозиготном состоянии. Всего было обнаружено 17 случаев с компаунд-гетерозиготным вариантом в литературе. Генетические варианты во второй аллели включали 1 миссенс, 7 нонсенс варианта, 4 варианта со смещением рамки считывания, 3 варианта сайта сплайсинга и 2 протяженные делеции.

Все пациенты имели низкий рост (17/17), атрофию зрительного нерва (17/17), пельгеровскую аномалию лейкоцитов (17/17), и задержку в психофизиологическом развитии (17/17) с нарушением интеллекта и без. Большинство пациентов страдали от частых респираторных инфекций с гипогаммаглобулинемией (15/17). Следует отметить, что у половины лиц с компаунд-гетерозиготными вариантами сообщалось о множественных переломах костей (9/17). Лихорадка-ассоциированная острая печёночная недостаточность наблюдалась в шести случаях (6/17). Патогенные варианты у данных пациентов были локализованы в N-концевой области и представляли собой варианты с прогнозируемой потерей функции белка (2/6), но варианты сайта сплайсинга (3/6) и варианты со сдвигом рамки считывания (1/6) были локализованы на С-конце.

К сожалению, мы ограничены в информации о фенотипических

характеристиках иммунокомпетентных клеток (6/17).

Лица с компаунд-гетерозиготными вариантами, так же, как и пациенты с SOPH, характеризовались сниженным уровнем NK (5/6) и В-клеток (4/6). У одного пациента также было выявлено снижение уровня CD3+ Т-клеток.



Рисунок 11. Сводная таблица фенотипических признаков SOPH синдрома, полученных из генетических карт якутских пациентов. В левой части графиков приведены абсолютные значения пациентов и фенотипические признаки, обнаруженные в этих выборках, по которым была доступна информация. В правой части приведены относительные количества. На графике наглядно проиллюстрирована триада SOPH: низкий рост, атрофия зрительного нерва и пельгеровская аномалия лейкоцитов.

В целом, можно сказать, что фенотип SOPH является патогномоничным для фенотипа вариантов на С-конце гена *NBAS*. Низкий рост вкупе с атрофией

зрительных нервов встречаются в преобладающем количестве клинических описаний при вариантах на С-конце (Рисунок 11). Тем не менее, пельгеровская аномалия лейкоцитов при этом не всегда описана, либо же исключена. Данное обстоятельство на текущий момент не позволяет обобщить пельгеровскую аномалию для домен-специфического фенотипа С-конца.

3.2 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 ИРИ, снижение абсолютного содержания В- и НК-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.

В более чем половине из случаев, описанных в литературе, встречался иммунодефицит в виде снижения уровня IgG, гипогаммаглобулинемии. В трех из этих случаев было также обнаружено снижение уровня В-клеток. Как упоминалось ранее, есть публикация о двух пациентах, страдающих гемофагоцитарным лимфогистиоцитозом (ГЛГ), с вариантом *NBAS* на С-конце [Bi X. et al., 2022]. ГЛГ – это дефект гранула-опосредованной цитотоксичности НК-клеток и цитотоксических Т-клеток, что приводит к избыточной продукции цитокинов и накоплению активированных Т-клеток и макрофагов в различных органах. Стоит отметить, что это единственный иммунологический признак, до сих пор не описанный при вариантах на С-конце белка *NBAS*.

При этом если говорить в целом о нарушениях иммунитета при вариантах в гене *NBAS*, то можно предварительно сказать, что нарушения в количественном составе Ig и НК-клеток могут иметь разный патогенез (Таблица 5).

В ряде случаев из данной выборки, таких как пациенты 50 и 51, которые не являются сибсами, наблюдается соответствие между фенотипическими проявлениями и патогенными вариантами. Однако встречаются клинические случаи, демонстрирующие значительную фенотипическую гетерогенность, как, например, у пациентов 47 и 48.

Пациенты 47 и 48, будучи сибсами, имеют одинаковый генетический

вариант, ассоциированный, кроме всего остального характерного для *NBAS*-ассоциированных патологий, с уменьшением уровня IgG, однако только у одного из них выявляется снижение числа NK-клеток. Такие различия могут указывать на сложные механизмы, регулирующие патогенез нарушений иммунитета, включая возможные эпигенетические факторы и взаимодействие с другими генетическими или внешними влияниями. Дальнейшее изучение функциональной роли белка *NBAS* и механизмов, определяющих фенотипические проявления, представляется необходимым для лучшего понимания природы данных расстройств.

Таблица 5. Патогенные варианты в гене *NBAS* ассоциированные с иммунодефицитными состояниями

№	Пациент	Аллель 1	Аллель 2	Гипогаммаглобулинемия	Снижение НК-клеток	Источник
1	Пробанд	c.17C>A, p.Ser6*	c.5741G>A, p.Arg1914His	+	+	[Lacassie Y. et al., 2020]
2	Пробанд	c.284C>T, p.Ala95Val	c.2802G>A, p.Trp934*	+	NA	[Staufner C. et al., 2020]
3	Пробанд	c.284C>T, p.Ala95Val	c.850A>T, p.Lys284*	+	+	[Staufner C. et al., 2016]
4	Пробанд	c.336-3C>G, p.	c.5123T>C, p.Leu1708Pro	+	+	[Staufner C. et al., 2020]
5	Пробанд	c.409C>T, p.Arg137Trp	c.1186 T>A, p.Trp396Arg	-	+	[Staufner C. et al., 2016]
6	Пробанд	c.500_501delTT, p.Phe167Cysfs7	c.5752 A>C, p.Thr1918Pro	+	+	[Li X. et al., 2018]
7	Пробанд	c.558_560del, p.Ile187del	c.686dup, p.Ser230Glnfs*4	-	+	[Haack T.B. et al., 2015]
8	Пробанд	c.603_605del, p.Leu202del	c.3164T>C, p.Leu1055Pro	-	+	[Haack T.B. et al., 2015]
9	Пробанд	c.686dup, p.Ser230Glnfs*4	c.2411A>G, p.Glu804Gly	+	NA	[Ritelli M. et al., 2020]
10	Пробанд	c.686dupT, p.Ser230Glnfs*4	c.5761G>C, p.Ala1921Pro	+	-	[Staufner C. et al., 2020]
11	Пробанд	c.686dupT, p.Ser230Glnfs*4	c.6840G>A, p.Thr2280Thr	+	NA	[Carli D. et al., 2019]

Продолжение Таблицы 5. Патогенные варианты в гене *NBAS* ассоциированные с иммунодефицитными состояниями

№	Пациент	Аллель 1	Аллель 2	Гипогаммаглобулинемия	Снижение НК-клеток	Источник
12	Пробанд	c.812T>C, p.Leu271Pro	c.812T>C, p.Leu271Pro	+	NA	[Staufner C. et al., 2020]
13	Пробанд	c.1241C>T, p.Ser414Phe	c.2950delA, p.Ile984Leufs*8	+	NA	[Staufner C. et al., 2020]
14	Пробанд	c.1278A>C, p.Cys426Trp	c.(4582 + 1_45831)_ (4797 + 1_4798-1) del, p.Val1528Glyfs*2	+	+	[Staufner C. et al., 2016]
15	Пробанд	c.1339G>A, p.Glu447Lys	c.5454_5455delTT, p.Leu1818fsX16	+	NA	[Sunwoo Y. et al., 2018]
16	Пробанд	c.1342-6A>G, p.	c.3534C>A, p.Ser1178Arg	+	+	[Staufner C. et al., 2020]
17	Пробанд	c.NA, p.Pro454Arg	c.NA, p.Gln2232Glu	NA	+	[Bi X. et al., 2022]
18	Пробанд	c.1501C>T, p.Arg501*	c.6840G>A, p.Thr2280Thr	+	NA	[Carli D. et al., 2019]
19	Пробанд	c.1528C>T, p.Arg510*	c.5741G>A, p.Arg1914His	+	NA	[Staufner C. et al., 2020]
20	Пробанд	c.1549C>T, p.Arg517Cys	c.5041_5048del, p.Ser1681Glnfs*37	+	NA	[Staufner C. et al., 2020]
21	Пробанд	c.1549C>T, p.Arg517Cys	c.4646T>C, p.Leu1549Pro	+	+	[Geem D. et al., 2021]
22	Пробанд	c.1556T>A, p.Val519Glu	c.1556T>A, p.Val519Glu	+	NA	[Nazmi F. et al., 2021]

Продолжение Таблицы 5. Патогенные варианты в гене NBAS ассоциированные с иммунодефицитными состояниями

№	Пациент	Аллель 1	Аллель 2	Гипогаммаглобулинемия	Снижение НК-клеток	Источник
23	Пробанд	c.1628_1629insA, p.Ser544fs	c.5741G>A, p.Arg1914His	+	+	[Khoreva A. et al., 2020]
24	Пробанд	c.1948C>T, p.Pro650Ser	c.1948C>T, p.Pro650Ser	+	+	[Ricci S. et al., 2019]
25	Пробанд	c.2032C>T, p.Gln678*	c.5741G>A, p.Arg1914His	+	NA	[Balasubramanian M. et al., 2017]
26	Пробанд	c.2239 T>C, p.Tyr747Asp	c.7003C>T, p.Arg2335Trp	+	NA	[Li Z.D. et al., 2020]
27	Пробанд	c.2535G>T, p.Trp845Cys	c.5741G>A, p.Arg1914His	+	NA	[Petukhova D.A. et al., 2020]
28	Пробанд	c.2708T>G, p.Leu903Arg	c.2708T>G, p.Leu903Arg	NA	+	[Chavany J. et al., 2020]
29	Пробанд	c.2708T>G, p.Leu903Arg	c.2827G>T, p.Glu943*	-	+	[Haack T.B. et al., 2015]
30	Пробанд	c.2819A>C, p.His940Pro	c.2819A>C, p.His940Pro	NA	+	[Staufner C. et al., 2020]
31	Пробанд	c.2822G>A, p.Arg941His	c.2822G>A, p.Arg941His	NA	+	[Chavany J. et al., 2020]
32	Пробанд	c.2827G>T, p.Glu943*	c.(6432+1_6433-1) (6711+1_6712-1)del, p.Val2145_Glu2237del	+	+	[Staufner C. et al., 2016]

Продолжение Таблицы 5. Патогенные варианты в гене NBAS ассоциированные с иммунодефицитными состояниями

№	Пациент	Аллель 1	Аллель 2	Гипогаммаглобулинемия	Снижение НК-клеток	Источник
33	Пробанд	c.2827G>T, p.Glu943*	c.5741G>A, p.Arg1914His	+	+	[Kortüm F. et al., 2017]
34	Пробанд	c.2950delA, p.Ile984Leufs*8	c.3158 A>G, p.His1053Arg	+	NA	[Fischer-Zirnsak B. et al., 2019]
35	Пробанд	c.3010C>T, p.Arg1004*	c.5741G>A, p.Arg1914His	+	NA	[Balasubramanian M. et al., 2017]
36	Пробанд	c.3115C>T, p.Gln1039*	c.7041_7043delTCT, p.2346delLeu	+	NA	[Li Z.D. et al., 2020]
37	Пробанд	c.3164T>C, p.Leu1055Pro	c.[5027 + 1_5028-1] _[5724 + 1_5725-1] del, p.Glu1676Aspfs*10	+	NA	[Staufner C. et al., 2020]
38	Пробанд	c.NA, p.Arg1073Cys	c.NA, p.Met1743Val	NA	+	[Bi X. et al., 2022]
39	Пробанд	c.NA, p.Thr1097Met	c.NA, p.Tyr1495His	NA	+	[Bi X. et al., 2022]
40	Пробанд	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	-	+	[Cheng Y. et al., 2022]
41	Пробанд	c.NA, p.Pro1474Leu	c.NA, p.Lys1517Glu	NA	+	[Bi X. et al., 2022]
42	Пробанд	c.NA, p.Glu1521Gln	c.NA, p.Glu2269Lys	NA	+	[Bi X. et al., 2022]

Окончание Таблицы 5. Патогенные варианты в гене NBAS ассоциированные с иммунодефицитными состояниями

№	Пациент	Аллель 1	Аллель 2	Гипогаммаглобулинемия	Снижение НК-клеток	Источник
43	Пробанд	c.5547delC, p.Trp1850Glyfs*32	c.6966_6969delinsTC, p.Gln2322Hisfs*18	+	+	[Staufner C. et al., 2020]
44	Пробанд	c.5740C>G, p.Arg1914Gly	c.6877delC, p.Leu2293Cysfs*9	+	NA	[Staufner C. et al., 2020]
45	Пробанд	c.5741C>T, p.Arg1914His	c.6496-6497insA, p.Ser2166Phefs*	+	NA	[He T.Y. et al., 2017]
46	Пробанд	c.5741 G>A, p.Arg1914His	c.6564dupT, p.Glu2189*	+	+	[Fischer-Zirnsak B. et al., 2019]
47	Пробанд (Сибс 24)	c.5741G>A, p.Arg1914His	ex. 35-47 del.	+	-	[Khoreva A. et al., 2020]
48	Пробанд (Сибс 23)	c.5741G>A, p.Arg1914His	ex. 35-47 del.	+	+	[Khoreva A. et al., 2020]
49	Пробанд	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.6433-2A>G, p.	+, с 1 года жизни	+	[Suzuki S. et al., 2020]
50	Пробанд	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.6572+1delG, p.	+	NA	[Kim Y.-M. et al., 2017]
51	Пробанд	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.6572+1delG, p.	+	NA	[Kim Y.-M. et al., 2017]
52	Пробанд	c.6840G>T, p.	c.6840G>T, p.	+	NA	[Staufner C. et al., 2020]

Примечание. NA – нет данных

Дефицит иммуноглобулинов и NK-клеток хоть и встречается зачастую вместе, но при этом наблюдаются также и случаи лишь с одним из этих признаков в описании фенотипа (Рисунок 12). Нельзя с точностью сказать о недостаточной диагностике или действительном отсутствии признака в большинстве случаев. Более того, встречаются случаи с изолированными дефицитами отдельных иммуноглобулинов. В целом, можно констатировать, что иммунодефицитное состояние при патогенных вариантах в гене *NBAS* является само по себе сложным фенотипическим признаком, требующего отдельного изучения.

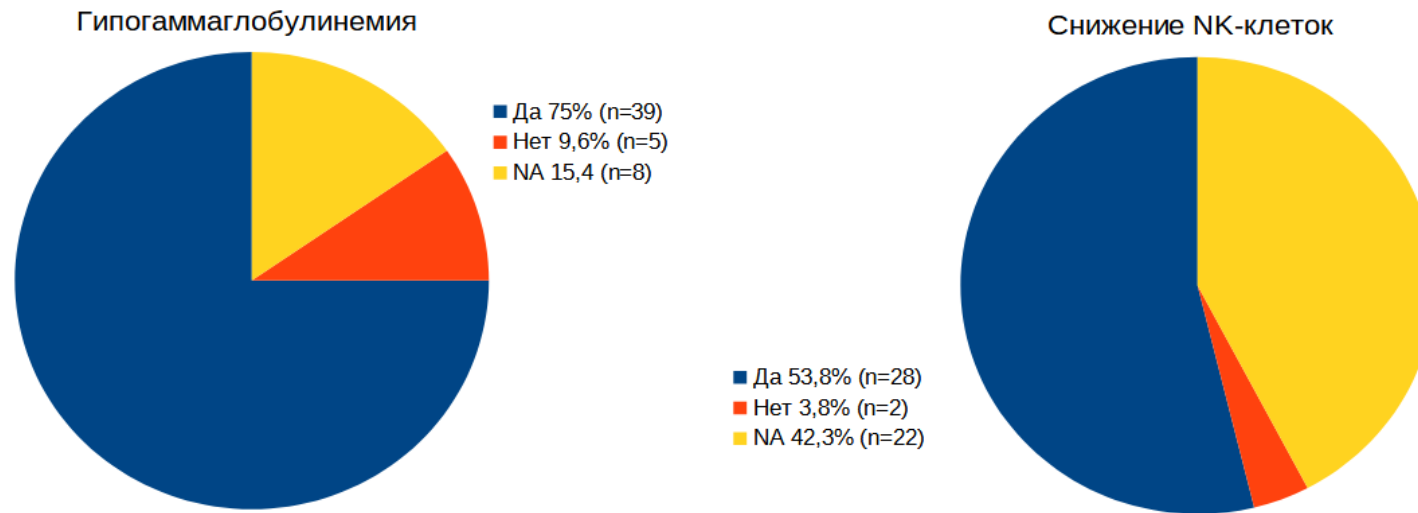


Рисунок 12. Круговая диаграмма представленности гипогаммаглобулинемии и сниженных NK-клеток в выборке Таблицы 5. Можно заметить, что сниженные иммуноглобулины наблюдаются в $\frac{3}{4}$ случаях, а сниженные NK-клетки в половине случаев. Это может указывать на различный патогенез этих двух признаков, несмотря на то что они относятся к иммунной системе и встречаются при вариантах в одном гене. NA – нет данных.

3.2.1 Иммунофенотипирование

Количественное определение субпопуляционного состава лимфоцитов было проведено методом проточной цитофлуориметрии. Был определен как процент, так и абсолютное количество иммунокомпетентных клеток. На рисунке 13 представлен пример гейтирования иммунокомпетентных клеток.

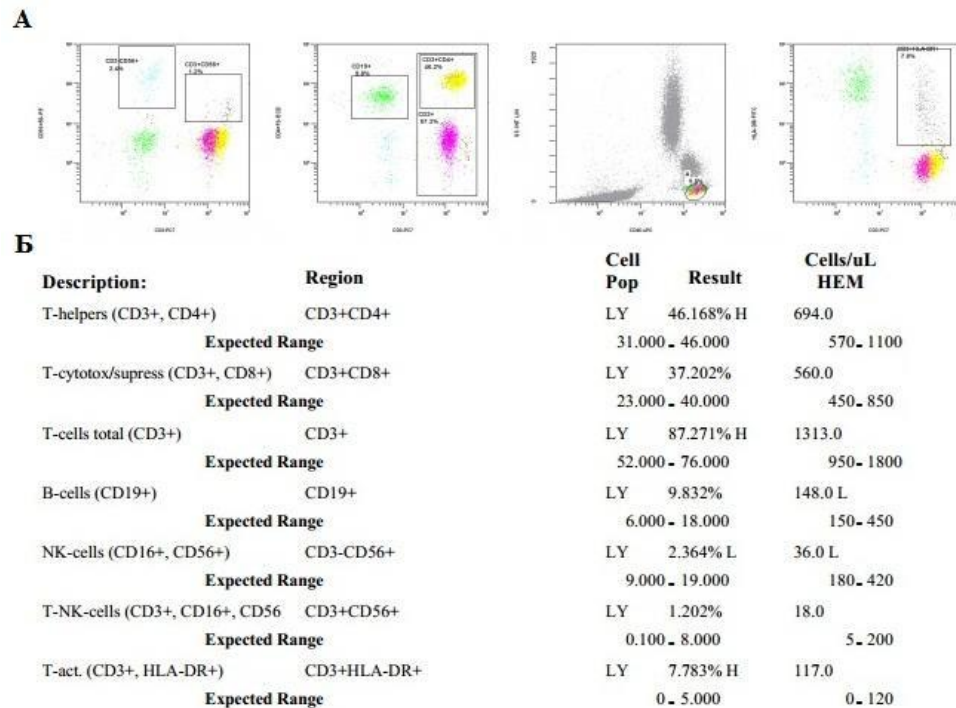


Рисунок 13. Иммунофенотипирование на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Графики отображают распределение клеток в зависимости от экспрессии маркеров CD3, CD4, CD8, CD19, CD16/56 и HLA-DR, с выделением основных субпопуляций: Т-хелперы (CD3+CD4+), цитотоксические Т-клетки (CD3+CD8+), общая популяция Т-клеток (CD3+), В-клетки (CD19+), NK-клетки (CD16+, CD56+) и активированные Т-клетки (CD3+HLA-DR+). Б. Таблица содержит количественные результаты анализа, включая процентное содержание и абсолютное число клеток в каждой субпопуляции, сопоставленные с ожидаемыми референсными диапазонами.

В исследовании Segarra с соавторами были представлены сведения о больных с вариантами в гене *NBAS* [Segarra N.G. et al., 2015]. Исследователи отмечают, что у больных с вариантом в гене *NBAS* наблюдаются выраженные мультисистемные нарушения: патология глаз, печени, иммунной системы, костной ткани и т.д. Для данных больных также 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. Также у больных с SOPH-синдромом было выявлено повышение процента CD3+ клеток (Рисунок 14 и 15).

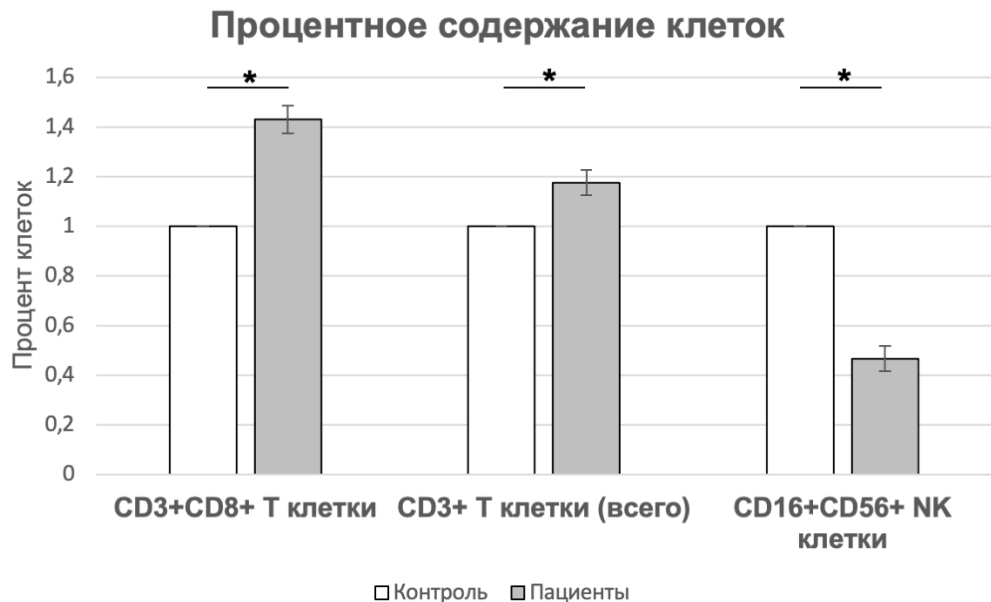


Рисунок 14 – Процентное содержание иммунокомпетентных клеток. Данные представлены в виде средних величин и стандартного отклонения (*: $p < 0,05$). Выявлено повышение относительных величин Т-хелперов, общего количества Т-клеток и значительное снижение относительных величин NK-клеток по сравнению с нормой.

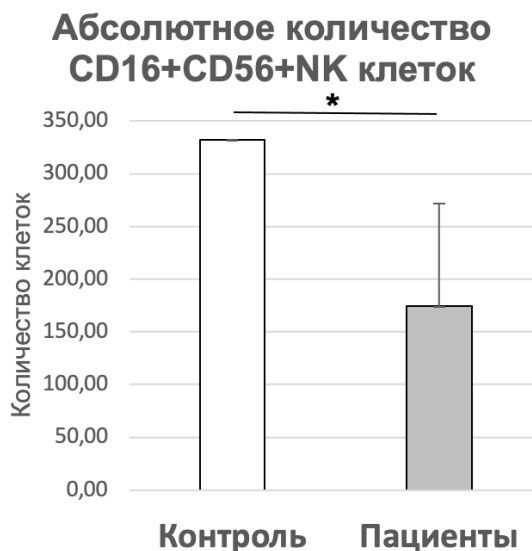


Рисунок 15 – Абсолютное количество CD16+CD56+NK-клеток. Данные представлены в виде средних величин и стандартного отклонения (*: $p < 0,05$). Представлено снижение NK-клеток в абсолютных значениях.

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 компаунд-гетерозиготном варианте *SOPH*-синдрома в другой работе [Khoreva A. et al., 2020].

3.2.2 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 16).

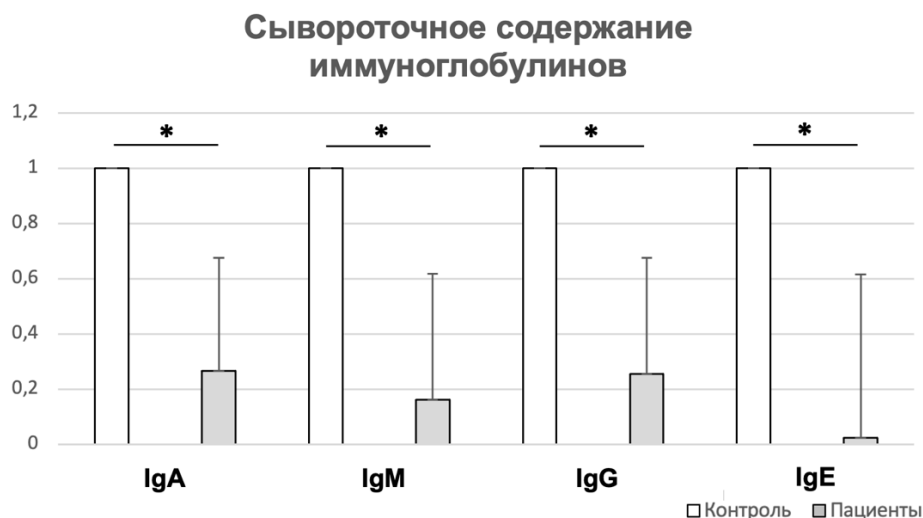


Рисунок 16 – Сывороточное содержание уровня иммуноглобулинов. Данные представлены в виде средних величин и стандартного отклонения (*: $p < 0,05$). Выявлено снижение иммуноглобулинов А, М, Е и G в выборке пациентов с *SOPH*-синдромом в якутской популяции.

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 патологические варианты *NBAS* связаны со снижением иммунологического статуса пациентов с *SOPH*-синдромом, что может быть связано с частыми инфекционными заболеваниями в детстве.

3.3 РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВАРИАНТА NBAS C.5741G>A (p.Arg1914His) МЕТОДОМ ПЦР С ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫМИ ЗОНДАМИ

В Якутии 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 c.5741G>A.

На текущий момент диагностика патогенных вариантов в мировой практике первично производится методом массового параллельного секвенирования с последующей валидацией прямым секвенированием Сенгера, что по сей день является «золотым стандартом». Тем не менее, при поиске уже известных вариантов требуется более дешёвый и простой методы, доступный в большинстве генетических консультаций. Методом является ПЦР в реальном времени с использованием флуоресцентных зондов. Наиболее подходящим методом для подобных скрининговых исследований является одностадийная ПЦР с флуоресцентными зондами, где детекция свечения происходит в реальном времени в процессе амплификации. Свечение возникает при диссоциации молекул зонда, состоящего из флуорофора и тушителя, соединенных с олигонуклеотидом. Каждый флуорофор имеет свою длину волны, что обеспечивает специфичность диагностики: один флуорофор соответствует одному зонду, и их присоединение к матрице зависит от комплементарности с ней. Этот метод обеспечивает более точную и чувствительную диагностику в реальном времени, что делает его полезным инструментом для многих исследований в области генетики и молекулярной биологии.

Данный метод был выбран из-за его относительной простоты и чувствительности. Выбор этого метода предполагает разработку праймеров, а также разработку зондов для детекции двух аллелей – 5741A и 5741G. Для каждого из этих аллелей необходимо будет подобрать свой зонд, а к каждому

зонду свой тушитель. Необходимо также учесть соответствие зондовых пар друг другу по квантовому выходу, то есть свечению, они должны быть примерно равными, что будет отражаться на одинаковых значениях относительной единицы флуоресценции (ОЕФ). Далее нужно будет подобрать необходимый температурный режим для такого набора тест-системы, то есть температуру, при которой цепи ДНК будут диссоциировать и отжигаться снова, давая свечение и амплификацию. Кроме того, необходимо провести подбор образцов ДНК для контрольных испытаний, включая ДНК больных носителей и здоровых людей.

3.3.1 Разработка ПЦР-системы

3.3.1.1 Подбор праймеров

Подбор олигонуклеотидов заключается в задании последовательностей прямого (форвард, F) и обратного (реверс, R) праймеров. Олигонуклеотид, который является прямым праймером, должен быть комплементарен антисмысловой цепи ДНК, а обратный – смысловой цепи. Праймеры играют роль точки инициации полимеразы, благодаря которой полимеразы начинают свой процесс образования дочерней цепи. Существуют консенсусные рекомендации по дизайну праймеров:

1. Размер праймера: должен составлять 16–25(30) нуклеотидов. Этот диапазон размера обеспечивает оптимальное сочетание специфичности и эффективности амплификации.
2. Состав GC: должен лежать в пределах 40–60%. Этот диапазон обеспечивает уравновешенное содержание гуанина и цитозина, что способствует улучшению специфичности и стабильности связывания праймеров с таргетной последовательностью.
3. Разница в температуре отжига: разница в температуре отжига обоих праймеров не должна превышать 6°C (в идеале разница составляет не более 1°C). Это обеспечивает одновременный отжиг обоих праймеров при условиях однородной амплификации.
4. Само- и взаимно- комплементарность: праймеры не должны быть

самокомплементарными или взаимно-комплементарными, чтобы избежать нежелательного образования димеров и альтернативных структурных форм, что может негативно повлиять на амплификацию и специфичность реакции.

В ходе выполнения проекта были подобраны праймеры для амплификации целевого участка SOPH. В первом заказе, выполненном в 2022 году, набор праймеров, хоть и обладал достаточной специфичностью, не дал удовлетворительных результатов при первых испытаниях. Один из факторов, который мог повлиять на это – неудачный подбор температуры плавления. В июне 2023 года был произведен второй заказ, в ходе которого разница в температуре отжига праймеров составила менее 1 градуса. В сравнении с предыдущим дизайном, где разница была более трех градусов, второй образец показывает значительное улучшение (Таблица 6). Инструменты, использованные для предсказания температуры отжига, включали Benchling SantaLucia 1998, Benchling Modified Breslauer 1986, Oligo Evaluator Sigma-Aldrich, и ApE software.

Таблица 6. Последовательности праймеров.

Название:	Последовательность 5' – 3'	Модификации	Длина
Праймер F (№1)	ATGCAGGGTTCTTTGGTCTCA	Нет	21
Праймер R (№1)	TCAGAGAAAGGATGAAGCTGT	Нет	21
Праймер F (№2)	AATGCAGGGTTCTTTGGTCTCA	Нет	22
Праймер R (№2)	TGAGCTTCGTCTTCTGAGTTTCTT	Нет	24

Таблица 6 содержит используемые в исследовании последовательности праймеров, применявшихся для амплификации участка гена *NBAS*. Все праймеры не содержали модификаций и имели длину от 21 до 24 нуклеотидов.

3.3.1.2 Дизайн зондов

Консенсусные требования к зондам включали следующие параметры:

1. GC состав: 20-80%.
2. Температура плавления: 68-70°C (либо на 5 градусов выше температуры плавления праймеров).
3. Минимум одинаковых нуклеотидов подряд (особенно G: не более

4 подряд).

4. Выбор цепи ДНК, на которой в пробе будет чаще встречаться С, чем G.
5. На 5'-конце не должно быть G.
6. Флуоресцентная метка: лучше всего FAM или VIC.
7. Тушител: предпочтительно использовать BHQ1 (Blackhole), но также можно использовать TAMRA, который является распространенным и более доступным вариантом.

В начальной версии использовалась зондовая пара FAM и ROX ввиду того, что VIC не был представлен в компаниях-производителях. Первоначальные результаты и испытания были проведены относительно успешно; однако наблюдалось фоновое свечение по зонду ROX, превышающее 1000 ОЕФ. Хотя это не влияло на суть диагностики и все еще позволяло выявить различия между тремя группами ДНК (больными, носителями и здоровыми), это фоновое свечение могло создать путаницу. Например, зонд, который должен был светиться только при наличии аллеля мутантного типа, давал свечение в диапазоне свечения зонда дикого типа. Такая ситуация была нежелательна для медицинского генетика и могла усложнить интерпретацию результатов (Рисунок 17).

Таблица 7 включает полный перечень зондов, использованных в исследовании для детекции патогенного варианта SOPH. Указаны последовательности, флуорофоры и соответствующие тушители, что отражает этапы оптимизации ПЦР-диагностики с 2022 по 2024 год.

Параллельно с использованием зондов FAM и ROX были подобраны последовательности зондов с другими флуорофорами и тушителями, такими как R6G и CY5 (Таблица 7). Однако их комбинации также не привели к получению достоверных результатов, несмотря на то что они соответствовали общим требованиям.

При втором дизайне были учтены температурные аспекты, включая подбор

другой температуры плавления, однако это не привело к желаемому результату, и фоновое свечение все еще наблюдалось.

Таблица 7. Последовательности зондов.

Дата	Флуорофор	Последовательность	Тушитель
11.2022	ROX	TGTCTGTGGAAGCCCGTAAAGAGATGACTA	BHQ2
11.2022	FAM	TGTCTGTGGAAGCCCATAAAGAGATGACTA	BHQ1
11.2022	R6G	TGTCTGTGGAAGCCCGTAAAGAGATGACTA	BHQ1
11.2022	CY5	TGTCTGTGGAAGCCCATAAAGAGATGACTA	BHQ2
6.2023	ROX	GCTGTCTGTGGAAGCCCGTAAAGAGATGA	BHQ2
6.2023	FAM	GCTGTCTGTGGAAGCCCATAAAGAGATGA	BHQ1
11.2023	ROX	ATCTCTTTACGGGCTTCCACA	BHQ2
11.2023	ROX	ACGGGCTTCCACAGACA	BHQ2
11.2023	ROX	ACGGGCTTCCACAGA	BHQ2
11.2023	ROX	TCATCTCTTTACGGGC(T-Туш)TCCACAGACAGC	BHQ2
11.2023	CY5	TGTGGAAGCCCATAAAGAGAT	BHQ2
11.2023	CY5	TGTCTGTGGAAGCCCAT	BHQ2
11.2023	CY5	TCTGTGGAAGCCCAT	BHQ2
11.2023	FAM	CTGTGGAAGCCCATAAAGAG	BHQ1
11.2023	FAM	GCTGTCTGTGGAAGCCCA(T-Туш)AAAGAGATGA	BHQ1
12.2023	ROX	CTGTCTGTGGAAGCCCGT	BHQ2
12.2023	FAM	GCTGTCTGTGGAAGCCCAT	BHQ1
1.2024	FAM	GCTGTCTGTGGAAGCCCAT	BHQ1
1.2024	FAM	GCTGTCTGTGGAAGCCCAT	BHQ1
1.2024	R6G	CTGTCTGTGGAAGCCCGT	BHQ1
1.2024	FAM	CTGTCTGTGGAAGCCCGT	BHQ1
1.2024	ROX	GCTGTCTGTGGAAGCCCAT	BHQ2

В ходе третьего эксперимента были использованы зонды с минимальным количеством олигонуклеотидов для откалибровки алгоритмов предсказания температуры плавления.

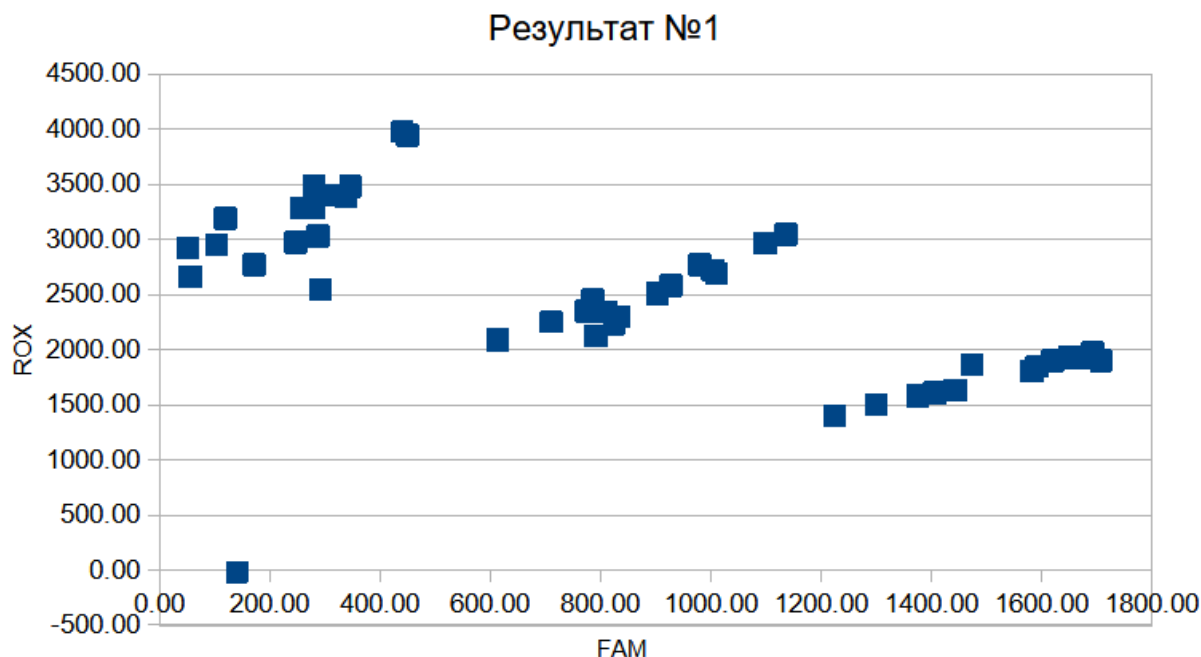


Рисунок 17. Результаты предварительного испытания №1. Несмотря на удовлетворительную кластеризацию образцов по свечению в определенных флуорофорах, все же имеется фоновое свечение по каналу ROX – более 1500 ОЕФ.

Для этого был применен инструмент OligoAnalyzer™ Tool. После проведения серии экспериментов система была откалибрована с учетом следующих параметров:

- Oligo Conc = 1 μ M,
- Na⁺ Conc = 50 mM,
- Mg⁺⁺ Conc = 1,1 mM,
- dNTPs Conc = 0,8 mM

Эти параметры позволили более точно предсказывать подходящие температурные условия для олигонуклеотидов (Таблица 8).

Таблица 8 демонстрирует параметры температурной стабильности зондов, применённых на разных стадиях оптимизации ПЦР, с указанием T_m комплементарного и мутантного аллеля, а также ΔT_m – ключевого показателя дискриминации. Выбранная пара обеспечивает наилучший баланс между стабильностью и различием T_m . Для оценки оптимальной температуры отжига зонда и матрицы, а также влияния нуклеотидной замены на силу связи между зондом и матрицей, была использована функция « T_m mismatch».

Таблица 8. Параметры зондов.

Тип	Последовательность	Флуорофор	Длина	T _m компл.	T _m при замене	ΔT _m
ДТ	ATCTCTTTACGGGCTTCCACA	ROX	21	55.6 °C	48.9 °C	6.7 °C
ДТ	ACGGGCTTCCACAGACA	ROX	17	56.7 °C	48.8 °C	7.9 °C
ДТ	ACGGGCTTCCACAGA	ROX	15	58.1 °C	47.6 °C	10.5 °C
ДТ	TCATCTCTTTACGGGC(T-RTQ)TCCACAGACAGC	ROX	29	63.8 °C	60.5 °C	3.3 °C
М	TGTGGAAGCCCATAAAGAGAT	CY5	21	53.9 °C	50.1 °C	3.8 °C
М	TGTCTGTGGAAGCCCAT	CY5	17	52.8 °C	47.6 °C	5.2 °C
М	TCTGTGGAAGCCCAT	CY5	15	57.1 °C	49.8 °C	7.3 °C
М	CTGTGGAAGCCCATAAAGAG	FAM	20	55.4 °C	51.8 °C	3.6 °C
М	GCTGTCTGTGGAAGCCCA(T-RTQ)AAAGAGATGA	FAM	29	60 °C	58 °C	2 °C
	2 стадия:					
ДТ	CTGTCTGTGGAAGCCCGT	ROX	18	61.3 °C	55.9 °C	5.4 °C
М	GCTGTCTGTGGAAGCCCAT	FAM	20	61.7 °C	57.9 °C	3.8 °C
	3 стадия:					
М	GCTGTCTGTGGAAGCCCAT	CY5	20	61.7 °C	57.9 °C	3.8 °C
М	GCTGTCTGTGGAAGCCCAT	R6G	20	61.7 °C	57.9 °C	3.8 °C
М	GCTGTCTGTGGAAGCCCAT	ROX	20	61.7 °C	57.9 °C	3.8 °C
ДТ	CTGTCTGTGGAAGCCCGT	FAM	18	61.3 °C	55.9 °C	5.4 °C
ДТ	CTGTCTGTGGAAGCCCGT	ROX	18	61.3 °C	55.9 °C	5.4 °C
М	GCTGTCTGTGGAAGCCCAT	FAM	20	61.7 °C	57.9 °C	3.8 °C
	Выбранная пара:					
ДТ	CTGTCTGTGGAAGCCCGT	ROX	18	61.3 °C	55.9 °C	5.4 °C
М	GCTGTCTGTGGAAGCCCAT	R6G	20	61.7 °C	57.9 °C	3.8 °C

Эта функция алгоритма предсказания оценивала возможность и температуру, при которой неправильный зонд мог связаться с неподходящей матрицей (например, здоровый зонд с мутантной матрицей и наоборот). С использованием вышеуказанных параметров удалось добиться приблизительной разницы в 5 градусов между температурой отжига комплементарного зонда и матрицы, и температурой отжига не комплементарного к матрице.

Понимание этой динамики было важным, поскольку рабочая гипотеза предполагала, что фоновое свечение происходит из-за того, что зонд дикого типа связывается с мутантной матрицей. Это означало, что при оптимальных температурах отжиг зонда происходил в обеих матрицах, но с разной эффективностью. Это отражалось в том, что образцы дикого типа светились до 3000 ОЕФ у своего канала, в то время как образцы пациентов давали свечение с максимумом в 1000 ОЕФ у того же канала зонда дикого типа.

С учетом этого вывода были получены подтверждающие результаты относительно специфичности каждого флуорофора (Рисунок 18).

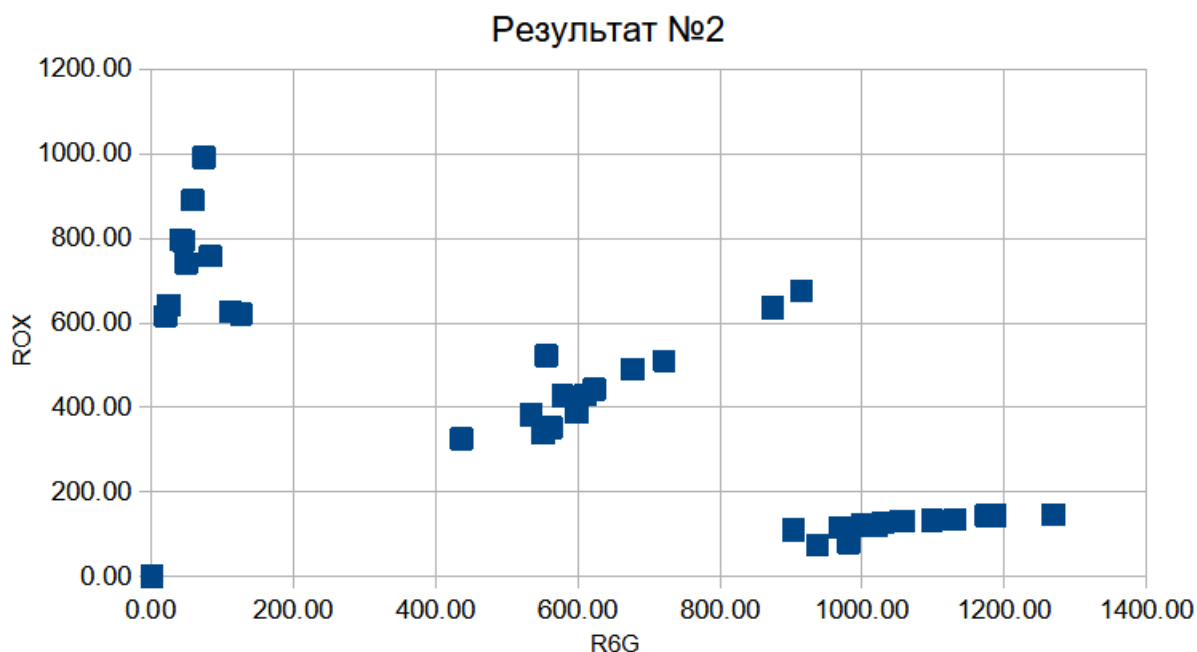


Рисунок 18. Результаты предварительного испытания №2. По сравнению с первыми испытаниями исчезло фоновое свечение по каналу ROX. Теперь оно составляет не более 200 ОЕФ.

В результате проведенных экспериментов и испытаний были подобраны оптимальные праймеры и зонды с высокой специфичностью, что исключило возможность появления побочных фоновых результатов, способных исказить интерпретацию данных. Это имеет особенное значение в контексте медицинской генетики и диагностики заболеваний. Таким образом, была достигнута необходимая эффективность и специфичность методики.

3.3.2 Оптимизация тест-системы

Для создания готового лабораторного образца в первую очередь акцентировалось внимание на снижении себестоимости одной реакционной пробирки. Для этого было необходимо определить минимальный объем реагентов, необходимых для успешного проведения анализа результатов. К инструкции реакционной смеси компании «Синтол» (Россия), использованной при разработке текущей тест-системы, предоставлялись указания для объемов

смеси, равных 25 мкл. В качестве референсного и целевого значения оптимальных объемов использовались наборы компании «Тестген» (Россия), где объем одной пробирки составлял 10 мкл. Задачей было уменьшить объем реакционной смеси тест-системы, использующей готовую смесь ПЦР и соответствующие олигонуклеотиды, без ущерба для интерпретации результатов.

Исходные объемы были следующие:

- 2,5х реакционная смесь, 10 мкл
- Смесь праймеров 10 пкмоль/мкл каждого, 1 мкл
- Флуоресцентные зонды 10 пкмоль/мкл, 0,1-0,5 мкл (x2)
- NF-вода до 25 мкл
- Образец ДНК 1-5 мкл

Задачей стояло уменьшение объема компонентов смеси с целью снижения стоимости тест-системы без ущерба ее функциональности и чувствительности.

3.3.2.1 Реакционная смесь

На первых этапах разработки была проведена работа по дизайну тест-системы, предполагающая использование готовой смеси компании «Синтол» (Россия). Стоимость смеси «2,5х Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» составляет 2 260 рублей на 200 реакций объемом 25 мкл, то есть по 10 мкл на одну пробирку, и состоит из дезоксинуклеозидтрифосфатов, $MgCl_2$ и *Taq* ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами. Рекомендуемый объем, предоставленный изготовителем, составляет 10 мкл на одну пробирку. Поскольку 10 мкл является полным объемом целевой готовой смеси для ПЦР, требовалось уменьшить объем реакционной смеси в итоговой смеси ПЦР.

В первых двух заказах итоговый объем был уменьшен с 25 мкл до 15 мкл, при этом количество реакционной смеси составляло 6 мкл. На предварительных испытаниях такой объем справлялся удовлетворительно, но было выявлено заметное фоновое свечение, характерное для данных олигонуклеотидов. Стоит отметить, что фоновое свечение не было прямо связано с реакционной смесью.

Оно было вызвано не комплементарным отжигом зондов к чужой матрице, что впоследствии было устранено изменением последовательности олигонуклеотидов и пары флуорофоров.

При четвертом и пятом заказах был проверен объем смеси, равный 5 мкл в итоговой ПЦР-смеси, составляющей 10 мкл. Такая комбинация работала без значительных изменений в худшую или лучшую сторону при интерпретации результатов ПЦР, основанной на количестве свечения, выраженном в ОЕФ для каждой пары зондов. Поскольку данная тест-система продемонстрировала свою работоспособность и функциональность, в дальнейших экспериментах использовался объем реакционной смеси, равный 5 мкл.

Таким образом, удалось без ущерба эффективности снизить объем реакционной смеси в итоговой смеси ПЦР с 10 мкл до 5 мкл, что, хотя и вызвало снижение ОЕФ зондовых пар, но уменьшило стоимость одной пробирки (Таблица 9).

3.3.2.2 Праймеры

Если реакционные смеси обычно готовы к использованию без дополнительных изменений, то праймеры и зонды требуют разведения. Пробирки с синтезированными праймерами поставляются в виде лиофилизата. На них указывается объем деионизированной воды, который необходимо добавить для получения раствора праймеров с концентрацией 100 пкмоль/мкл. В рекомендациях по изготовлению смесей указана концентрация 10 пкмоль/мкл. Для создания такого раствора в пробирку добавляют 80 мкл воды, 10 мкл раствора прямого праймера концентрацией 100 пкмоль/мкл и 10 мкл раствора обратного праймера концентрацией 100 пкмоль/мкл. В итоге должен получиться раствор с требуемой концентрацией, содержащий как прямой, так и обратный праймеры.

В изначальном варианте использовался объем праймеров в 1 мкл. В первых двух заказах все работало удовлетворительно; однако при экспериментах с уменьшением объема праймеров до 0,5 мкл на одну пробирку в 10 мкл ПЦР-смеси

наблюдалось такое же уменьшение ОЕФ, как и при уменьшении объема смеси. При выборе между этими двумя компонентами основным критерием был вопрос о стоимости реагентов: смесь ПЦР стоит намного дороже на одну пробирку, чем смесь праймеров. Праймеры (10 ОЕ) стоят 3668 рублей за два лиофилизата (прямого и обратного праймера), при минимальном объеме 200 мкл, которую разводим в 10 раз, чтобы получить всего 2000 мкл. Необходим 1 мкл зонда на реакцию, что составляет 2000 реакций на сумму в 3668 руб. (смесь стоит 2 260 рублей на 200 реакций, даже если брать по 5 мкл вместо 10 мкл, то итоговое количество реакций составит 400 – это в пять раз меньше реакций, чем в смеси праймеров).

В виду вышеперечисленного, было решено оставить объем праймеров неизменным для дальнейшего дизайна тест-системы. Объем праймеров остался равным 1 мкл для целевого объема пробирки в 10 мкл.

3.3.2.3 Зонды с флуоресцентными метками

Зонды также поставляются в виде лиофилизатов. Процесс разбавления аналогичен процессу разбавления лиофилизатов праймеров. Основным различием является то, что растворы зондов готовятся в различных пробирках, поэтому объем воды составляет 90 мкл на 100 мкл, а объем одного зонда составляет 10 мкл. В результате получается две пробирки объемом 100 мкл с концентрацией зондов 10 пкмоль/мкл.

Изначальные рекомендации предполагали использование каждого зонда в объеме от 0,1-0,5 мкл, как мы делали в первом и втором заказах. Тем не менее, в последующих экспериментах было решено в целях достижения более высоких ОЕФ сделать объем каждого зонда 0,5 мкл в итоговой смеси ПЦР объемом 10 мкл. Зонды, при покупке 2 ОЕ, обходятся в 3194 рубля. Минимальный объем растворенного лиофилизата составляет 80 мкл. Мы разводим его в 10 раз, что дает нам общий объем 800 мкл. Для каждой реакции нам нужно 0,5 мкл зонда, что означает, что мы можем провести 1600 реакций с 2 ОЕ зонда.

Таким образом, объем зондовых компонентов составил 0,5 мкл в итоговой

смеси ПЦР объемом 10 мкл, в целях улучшения анализа и интерпретации результатов диагностики.

3.3.2.4 Деионизированная вода

Установленные объемы реакционной смеси, праймеров и зондов составили 5 мкл, 1 мкл и 0,5*2 мкл соответственно. Исходя из этих значений, объем деионизированной воды подбирался таким образом, чтобы общий объем реакционной смеси соответствовал заданному количеству, обеспечивая тем самым оптимальные пропорции компонентов. Учитывая, что итоговая объемная доля ПЦР смеси составляет 10 мкл, а компоненты, такие как праймеры и зонды, занимают в ней 7 мкл, необходимо добавить 2 мкл деионизированной воды для достижения общего объема. Это объясняется тем, что минимальный объем ДНК, который можно добавить, составляет 1 мкл, а оставшийся объем в 2 мкл может быть заполнен деионизированной водой.

Таблица 9 отражает расчет себестоимости ПЦР-реакции при различных объемах (25, 15 и 10 мкл). Наиболее экономичный вариант – 10 мкл, при этом снижение объема реакционной смеси существенно влияет на итоговую стоимость, не затрагивая доли стоимости праймеров и зондов.

После проведенной оптимизации удалось значительно снизить итоговый объем ПЦР-смеси путем уменьшения объема реакционной смеси и воды. Сокращение объема пробирки с 25 до 10 мкл позволило существенно снизить себестоимость одной пробирки, что в контексте генетического скрининга играет ключевую роль (Таблица 9). Таким образом, разработанная тест-система после завершения всех этапов готова к проведению первых испытаний на реальных образцах.

3.3.3 Подбор условий для проведения диагностики разработанной тест-системой

После подготовки реакционной смеси и образцов ДНК, пробирки устанавливаются в амплификатор, в котором происходит циклическое изменение температуры. Циклы нагрева и охлаждения необходимы для того, чтобы

полимераза могла связываться и отщепляться в нужные моменты амплификации ДНК, а также для других этапов реакции.

Таблица 9. Расчеты объемов и цен компонентов ПЦР-смеси (Р. смесь – реакционная смесь).

Компоненты:	мкл	руб.
Р. смесь	2000	2260
Праймеры	2000	3668
Зонд 1	800	3194
Зонд 2	800	3194
Стоимость компонентов для одной пробирки:		
Р. смесь в 25 мкл	10	11,3
Р. смесь в 15 мкл	6	6,78
Р. смесь в 10 мкл	5	5,65
Праймеры	1	1,834
Зонд 1	0,5	1,99625
Зонд 2	0,5	1,99625
Итоговая себестоимость пробирки:		
Итог 25	25	17,1265
Итог 15	15	12,6065
Итог 10	10	11,4765

В амплификаторе процесс начинается с расхождения двухцепочечной молекулы ДНК при температуре около 95°C в течение примерно 5 минут. Этот этап, известный как денатурация, приводит к образованию двух отдельных одноцепочечных молекул ДНК в пробирке. Последующее снижение температуры позволяет ДНК полимеразе присоединиться к отдельным цепям и инициировать синтез новой комплементарной цепи ДНК. Этот этап называется этапом удлинения цепи. Детекция сигнала флюоресценции проводится на каждом этапе реакции и продолжается на протяжении всех циклов. Детектируемый сигнал флюоресценции прямо коррелирует с количеством амплифицированного ДНК в пробирке. В конечном итоге, после завершения всех циклов, получаем кривую, на которой отображается количество флюоресценции на каждом цикле.

Этап денатурации является необходимым для любого ПЦР и проходит при одинаковых температурах, тем не менее температура этапа удлинения цепи может меняться в зависимости от дизайна тест-системы. Также могут в итоговую ПЦР-

смесь добавляться дополнительные компоненты смеси, например, магний. А также модифицируемым фактором при текущем дизайне исследования является температура удлинения цепи, оптимальная для выбранных нами на первом этапе праймеров и зондов.

3.3.3.1 Температура удлинения цепи

Температура удлинения цепи важна для оптимального процесса амплификации и, соответственно, для дальнейшей детекции свечения амплификации. Наиболее общепринятой температурой является 60°C. Данная температура также указана как оптимальная для выбранной на предыдущих этапах ПЦР-смеси.

Тем не менее, учитывая большое количество использованных для оптимизации пар гидролизных зондов, была предпринята попытка определить наиболее оптимальную температуру для каждой из них. Полученные результаты позволили оценить влияние определенной температуры на этап удлинения цепи. Температура плавления не была модифицирована для заказываемых олигонуклеотидов, менялась лишь их последовательность. Следовательно, полученные результаты могут быть применимы для всех последующих олигонуклеотидов, приведенных на первых этапах разработки.

Полученные результаты позволили установить следующее: при снижении температуры на один градус (то есть при температурах 59, 58, 57°C) наблюдается постепенное увеличение фонового свечения, которое изначально планировалось снизить. Однако, при увеличении температуры до 61, 62°C наблюдается снижение образования ПЦР-продукта, вероятно, из-за не оптимальной температуры для олигонуклеотидов. Интересно то, что эта картина сохранялась даже в случаях, когда ожидаемая температура плавления между двумя сравниваемыми олигонуклеотидами была достаточно различной, чтобы обнаружить разницу в кривых амплификации. Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что готовая смесь содержала достаточные компоненты, такие как магний, которые оптимизировали температуру для олигонуклеотидов, тем самым приближая

температурный оптимум к 60°C.

3.3.3.2 Добавление магния

Как уже отмечалось выше, было предположено, что смесь уже содержит необходимое количество магния для оптимальной температуры удлинения цепи в 60°C. Тем не менее, чтобы убедиться в необходимости дополнительного добавления магния, были проведены эксперименты по оптимизации амплификации с дополнением ионов магния амплификации при дополнительном введении магния.

В рекомендациях к смеси был указан диапазон добавления магния (25 мМ), который составил от 0 до 1,5 мкл для готовой пробирки объемом 25 мкл. При проведении экспериментов не были получены удовлетворительные результаты в поддержку гипотезы о необходимости добавления дополнительного магния для разработанной тест-системы первой и второй версии, что в целом можно экстраполировать и для дальнейших работ. Важно отметить, что добавление магния не только ухудшало картину, но и делало анализ по конечным точкам невозможным.

По итогам экспериментов по оптимизации разработанной методики проведения тест-системы была определена оптимальная температура для проведения диагностики ДНК, а также подтверждено отсутствие необходимости добавления дополнительных компонентов в смесь.

3.3.4 Валидация и испытания разработанной методики

3.3.4.1 Подбор образцов ДНК для валидации и испытания тест-системы

При подборе образцов ДНК следует обращать внимание на такие параметры, как качество выделения ДНК, которое отражается в параметрах концентрации ДНК и отношении поглощений на длинах волн A260/280 и A260/230. Эти параметры указывают на возможное загрязнение белками или фенолом, а также наличие ЭДТА и других примесей, которые в дальнейшем могут влиять на ДНК диагностику.

Снижение отношения длин волн 260/280 ниже значения 1,8, может указывать на наличие белков, фенола или других загрязнителей, которые сильно поглощают свет на длине волны около 280 нм. Также значение 260/280 может быть отклонено из-за изменения кислотности образца, а также зависит от точности измерения длины волн спектрофотометром или наличия нуклеотидных смесей в образце. Параметр 260/230 считается оптимальным и указывает на чистоту образца ДНК при значениях 2,0—2,2, однако, главное условие – чтобы это значение было выше, чем параметр 260/280, поскольку последний является основным для характеристики чистоты ДНК. Кроме технических параметров, также нужно обратить внимание на метод выделения ДНК. Существует два основных метода: экспресс-метод, который требует приблизительно 45 минут для очистки 6 образцов, и фенол-хлороформный метод, который занимает около двух суток, но обеспечивает более высокую концентрацию и чистоту ДНК.

Образцы ДНК были взяты из биобанка Научно-исследовательской Лаборатории «Молекулярная медицина и генетика человека» Медицинского Института СВФУ им. М.К. Аммосова. Они хранятся при температуре -80°C в специальных холодильниках в микроцентрифужных пробирках. При получении образца необходимо знать точный диагноз и идентификационный номер. Иногда у одного пациента могут быть несколько идентификационных номеров из-за многократного забора образцов. После отбора необходимых пробирок производится их аликвотирование, то есть отбор необходимого количества ДНК, разведенного до необходимых значений. На первых этапах разработки было принято решение использовать тест-систему при концентрациях ДНК достаточно низких, соответствующих экспресс-методам выделения. Эта концентрация примерно составляет 10-20 нг/мкл. На данном этапе был произведен отбор образцов от больных, носителей и здоровых индивидов.

3.3.4.1.1 Образцы с гомозиготным вариантом SOPN 5741A/A

Информация о пациентах, страдающих синдромом SOPN, была получена из регистра Медико-Генетического Центра Республиканской Больницы

№1 Национального Центра Медицины в г. Якутске.

Таблица 10. Образцы больных SOPH-синдромом.

ID образца	нг/мкл	A260	A280	260/280	260/230
ав470	13,62	0,272	0,156	1,75	1,08
ав2728	11,63	0,233	0,136	1,71	0,98
ав4773	12,39	0,248	0,132	1,88	1,4
а67277	16,9	0,338	0,18	1,88	1,08
а68350	14,42	0,288	0,166	1,74	1,48
а69534	15,82	0,316	0,167	1,9	1,81
а69843	14,72	0,294	0,149	1,98	1,44
877	16,17	0,323	0,186	1,74	1,59
925	17,84	0,357	0,189	1,89	2,02
1373	9,65	0,193	0,101	1,92	0,71
1441	14,75	0,295	0,16	1,85	1,43
аа4111	15,33	0,307	0,163	1,89	1,88
аа8216	11,17	0,223	0,114	1,96	1,11
аа9441	15	0,3	0,17	1,76	1,4
ав9843	51,45	1,029	0,55	1,87	2,22

Примечание. Таблица 10 демонстрирует концентрации ДНК и показатели чистоты образцов больных SOPH-синдромом. Большинство образцов имеют удовлетворительное соотношение 260/280, свидетельствующее о достаточной чистоте ДНК.

В их медицинских записях содержатся идентификационные номера (коды) для каждого пациента, по которым проводился подбор образцов. Однако, все образцы, полученные от этих пациентов, были выделены фенол-хлороформным методом. Из-за высокой концентрации их аликвоты пришлось разбавить до примерно 15 нг/мкл. Однако по вторичным показателям чистоты образцов лишь два из них соответствовали необходимым значениям. Хотя данные параметры могут оказать влияние на результаты испытаний, эти образцы могут послужить хорошим испытанием для разработанной методики.

Таким образом были подготовлены 15 образцов ДНК больных SOPH-синдромом необходимой концентрации (Таблица 10).

3.3.4.1.2 Образцы с гетерозиготным вариантом SORH 5741G/A

При подборе носителей в основном использовались коды ДНК из историй болезней, где также проводился забор крови у родителей и сибсов пациентов (Таблица 11). При тщательной ревизии доступных образцов в биологическом банке было выявлено только 8 из них, поэтому было подготовлено только 8 из 15 необходимых образцов.

Таблица 11. Образцы носителей SORH-синдрома.

ID образца	нг/мкл	A260	A280	260/280	260/230
а69844	15,5	0,31	0,166	1,86	0,77
aa4112	6,89	0,138	0,098	1,41	0,9
aa4113	12,2	0,244	0,136	1,79	0,86
4114	13,08	0,262	0,151	1,73	1,33
aa8217	20,17	0,403	0,238	1,7	1,09
aa8228	16,79	0,336	0,178	1,88	0,39
70	19,9	0,398	0,357	1,11	0,43
aa8217	83,7	-	-	-	-
г39	15,32	0,306	0,175	1,75	0,89
г22	18,98	0,38	0,225	1,69	0,73
в67г	9,86	0,197	0,109	1,81	0,84
aa7014	15,19	0,304	0,168	1,81	1,57
г8а	15,81	0,316	0,312	1,02	0,64
г22т	17,92	0,358	0,395	0,91	0,38
т14г	22,85	0,457	0,426	1,07	0,52

Примечание. В таблице 11 представлены образцы гетерозиготных носителей SORH-синдрома. У большинства образцов показатель чистоты по соотношению 260/280 находится в допустимых пределах (1,7–1,9), за исключением образцов 70, г8а, г22т и т14г, где наблюдается значительное снижение, что может свидетельствовать о примеси белков или фенола.

Для добора оставшихся 7 образцов были использованы образцы ДНК, полученные во время проведения экспедиций в районы Якутии. Данные образцы были проверены на 10 часто встречающихся наследственных заболеваний в Якутии, включая SORH-синдром. Образцы ДНК были взяты у носителей, обнаруженных в Оленекском и Усть-Янских улусах (70, г39, г22, в67г, г8а, г22т, т14г).

Таким образом, были подготовлены образцы носителей заболевания SOPH-синдром. Выделение этих образцов было выполнено различными методами: образцы родственников пациентов были выделены фенол-хлороформным методом, а ДНК пациентов из экспедиционных материалов были выделены экспресс-методом. Дизайн разработанной тест-системы подразумевал использование экспресс-методов выделения ДНК и дальнейшего использования образцов с низкой концентрацией.

Следует отметить, что ни один из образцов не демонстрировал удовлетворительные значения по вторичным метрикам качества, выделенного ДНК, таким как отношение поглощения на длине волны 260/280 и 260/230.

3.3.4.1.3 Образцы с диким типом 5741G/G

Образцы условно здоровых индивидов были отобраны из экспедиционных материалов, в которых не было обнаружено никаких патологий по исследованным вариантам (Таблица 12). Образцы были взяты из экспедиций в п. Депутатский (Усть-Янский улус), с. Оленек (Оленекский улус), с. Харыялах (Оленекский улус), г. Анадырь (Чукотский автономный округ), и в с. Рассолода (Мегино-Кангаласский улус).

Таким образом, были получены образцы условно здоровых индивидов, выделенные экспресс-методами.

Следует отметить, что у некоторых образцов наблюдались экстремально низкие значения концентрации ДНК, достигающие 4,55 нг/мкл. Хотя эти концентрации не учитывались при разработке тест-системы на первом этапе разработки, эти образцы были сохранены для проверки чувствительности метода к таким низким концентрациям ДНК. Здесь также стоит отметить, что, как и образцы с гетерозиготным носительством, ни один из образцов не демонстрировал удовлетворительные значения по вторичным метрикам качества ДНК.

Таблица 12. Образцы здоровых индивидов.

ID образца	нг/мкл	A260	A280	260/280	260/230
1	15,91	0,318	0,203	1,57	0,87
2в	14,87	0,297	0,18	1,66	0,74
н14в	9,16	0,183	0,114	1,61	0,54
2а	17,65	0,353	0,34	1,04	0,78
н3а	15,79	0,316	0,303	1,04	0,67
4а	15,37	0,307	0,34	0,9	0,55
в31	13,43	0,269	0,15	1,79	0,38
н25в	16,5	0,33	0,185	1,79	0,82
в47	14,05	0,281	0,161	1,75	0,86
н54в	16,26	0,325	0,185	1,76	1,37
с83	12,71	0,254	0,209	1,22	0,41
с84	12,19	0,244	0,187	1,3	0,5
с109	9,03	0,181	0,121	1,5	0,59
с116	8,73	0,175	0,107	1,62	0,79
в31	4,55	0,091	0,053	1,72	0,48

Примечание. В таблице 12 представлены образцы ДНК здоровых индивидов. У значительной части проб наблюдаются отклонения коэффициента 260/280 от нормы, особенно у образцов 2а, н3а, 4а, с83, с84, что указывает на возможное загрязнение белками или другими примесями.

3.3.4.2 Проведение испытаний тест-системы

3.3.4.2.1 Валидация с помощью коммерческого набора

По итогам работ на данном этапе были отобраны и измерены показатели концентрации и чистоты контрольных образцов для проведения первых испытаний разработанной тест-системы. Основной задачей испытаний является обеспечение воспроизводимости результатов. Для начала была проведена валидация референсной тест-системой компании «Тестген» (Россия) имеющихся образцов ДНК (Рисунок 19).

Образцы показали соответствие. Далее были последовательно проведены три испытания разработанной тест-системы.

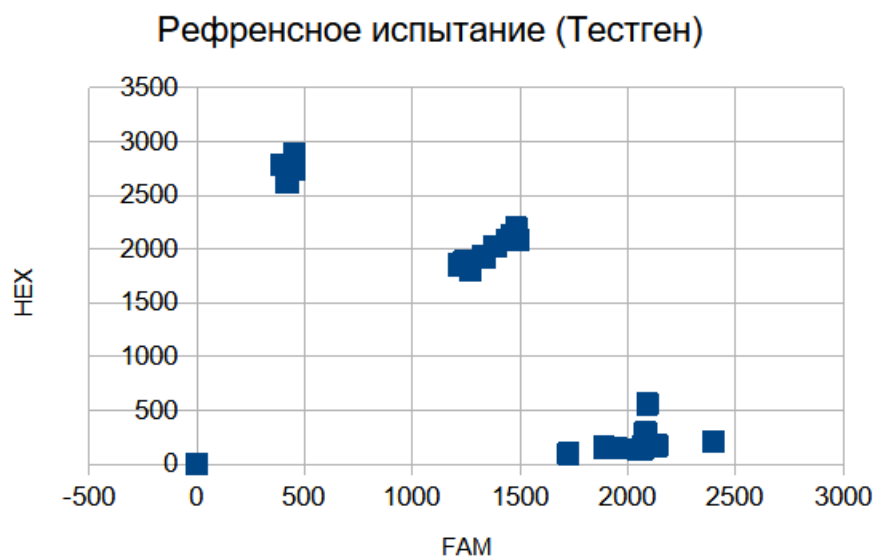


Рисунок 19. Валидация образцов на носительство соответствующих аллелей. Наблюдается четкая кластеризация образцов по соответствию наличию варианта 5741A в гомозиготном и гетерозиготном состоянии, а также при его отсутствии.

3.3.4.2.2 Испытания разработанной тест-системы для диагностики SOPH-синдрома

В результате первых испытаний наблюдались удовлетворительные распределения аллелей у здоровых и гетерозиготных образцов (Рисунок 20).

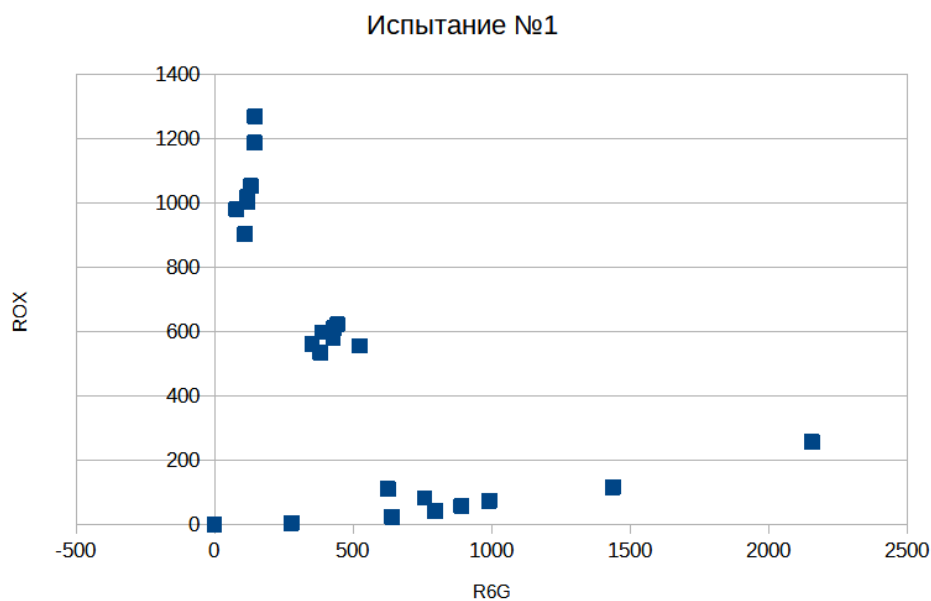


Рисунок 20. Первое испытание тест-системы. Несмотря на удовлетворительную кластеризацию образцов дикого типа и гетерозигот, присутствует сильный разброс по каналу детекции R6G у образцов mut.

Однако среди образцов от больных наблюдалось полярное распределение ОЕФ по оси R6G. Одной из гипотез, объясняющих это явление, может быть использование устаревшей и деградированной ДНК. В процессе разработки тест-системы образцы многократно замораживались и размораживались в течение полутора лет с момента валидации, что могло быть причиной отсутствия свечения у некоторых образцов. Также мог иметь место человеческий фактор – недостаточный забор реагента и/или материала, ошибки в расчетах и тд.

Во втором испытании были исключены испорченные образцы ДНК, а также была проведена полная загрузка амплификатора на 96 лунок. Три партии образцов, каждая из 10 образцов, были загружены на амплификатор: больные, носители и здоровые (Рисунок 21).

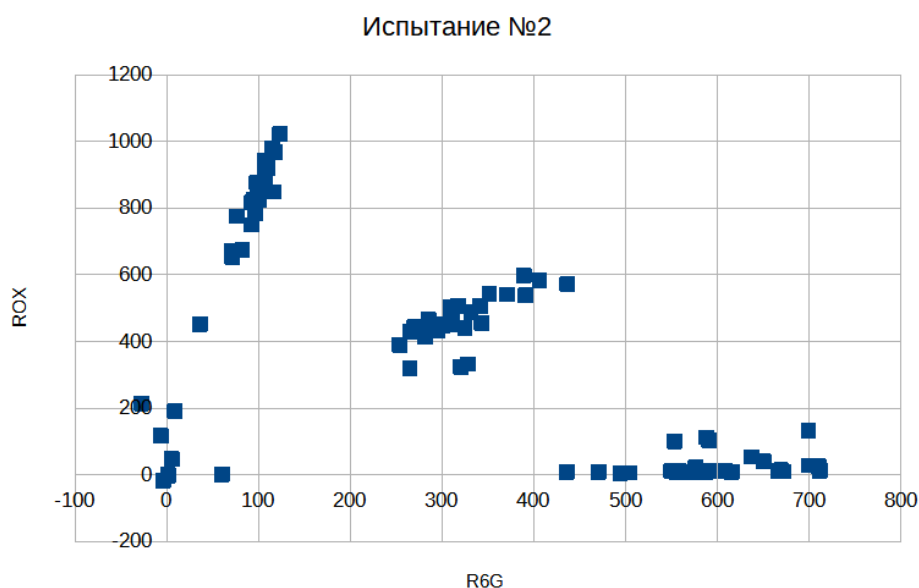


Рисунок 21. Второе испытание тест-системы. Разброс по каналу R6G уменьшен по сравнению с первым испытанием и теперь образцы *mut* кластеризуются удовлетворительно. Тем не менее, имеются несколько образцов дикого типа с низким свечением по своему каналу детекции.

В процессе загрузки образцы, расположенные в 12-ом ряду, не показали свечения. Тем не менее, их реплики в двух остальных рядах демонстрировали нормальные ожидаемые показатели ОЕФ. Это может указывать на техническую ошибку при раскапывании или на особенности работы амплификатора.

При проведении третьего испытания тест-система продемонстрировала

удовлетворительное свечение относительно обоих каналов флуоресценции. Фоновое свечение отсутствовало, а показатели ОЕФ составляли от 800 до 1000. Гетерозиготные образцы четко отличались от гомозиготных (Рисунок 22).

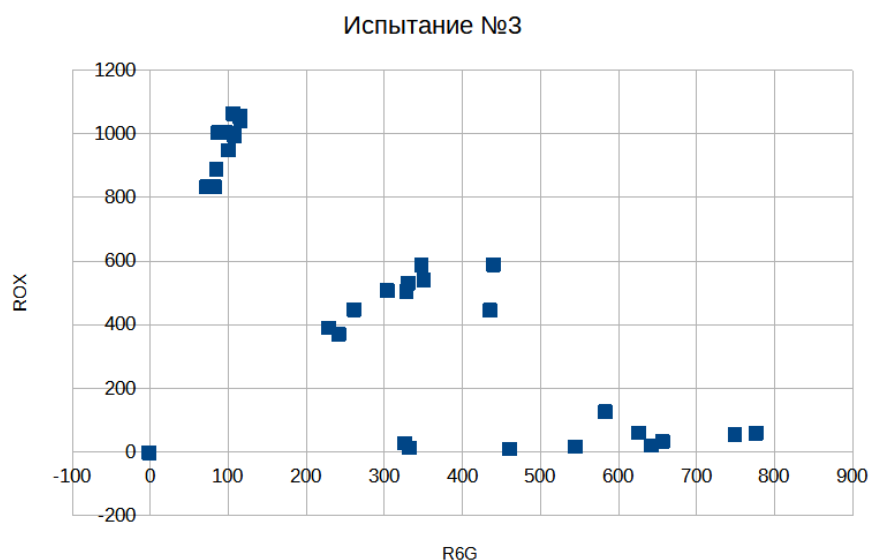


Рисунок 22. Третье испытание тест-системы. В третьем испытании устранены проблемы, затрудняющие интерпретацию по каналам детекции ROX и R6G.

В результате трех испытаний тест-система продемонстрировала значительное улучшение по сравнению с предварительными испытаниями, проведенными на начальных этапах разработки. Отсутствие фонового свечения позволяет однозначно интерпретировать результаты.

Разработанный диагностический метод чувствителен к патогенному варианту с.5471G>A, ассоциированному с SOPH-синдромом.

3.3.5 Алгоритм молекулярно-генетической диагностики SOPH-синдрома

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 амплификатора: 95°C – 5 мин, (95°C – 15 с., 60°C – 50 с.) x

39 циклов.

4. Интерпретация результатов (Рисунок 23).

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

- Образцы с преимущественным свечением по зонду ROX (канал ROX на термоциклере – 1000-1200 ОЕФ) и низким свечением по зонду R6G (200-300 ОЕФ). Эти образцы представляют собой носителей двух аллелей дикого типа (здоровые).
- Образцы со свечением по обоим зондам R6G и ROX (600-1000 ОЕФ). Это носители двух аллелей – больной и здоровой (носители SOPH).
- Образцы с преимущественным свечением по зонду R6G (канал HEX на амплификаторе), которые являются носителями двух аллелей SOPH (больные).
- Образцы без свечения – контроль без матрицы.

В исследовании был применен амплификатор для проведения ПЦР в реальном времени модели CFX96 Touch («BioRad», США), с 6 каналами детекции и предназначенный для работы с пробирками объемом 96×0,2 мл.

Таким образом, представлена общая схема для проведения диагностики SOPH-синдрома при помощи разработанной тест-системы.

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 повторены 5 раз. 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 переставленными 5 раз. Диагностическая специфичность составила 100%.

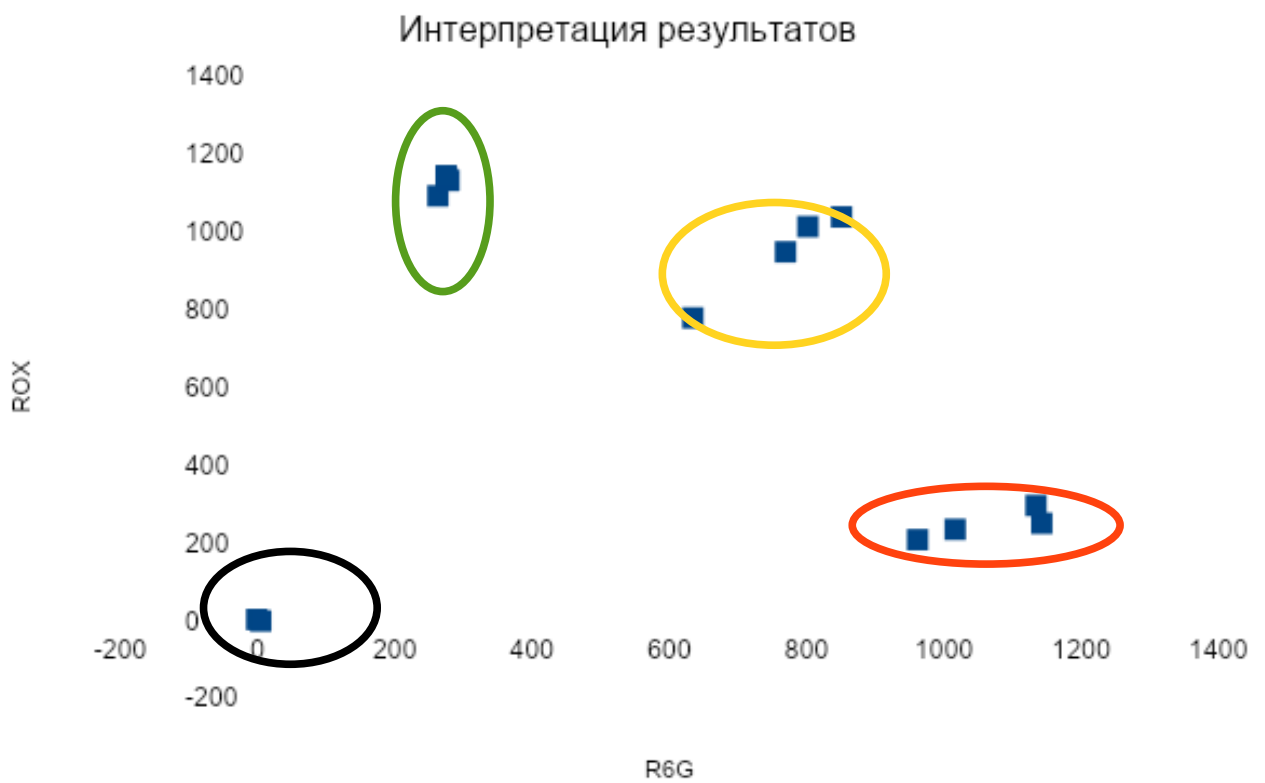


Рисунок 23. Пример кластеризации образцов ДНК на результатах запуска тест-системы. Зеленым выделены образцы с диким типом, желтым – гетерозиготы, красным – пациенты SOPH, черным – вода.

3.4 БЕЛОК-ВАРИАНТ-ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ SOPH

3.4.1 Сеть белок-белковых взаимодействий

Для наглядной демонстрации обширной сети белковых взаимодействий была создана карта всех известных (описанных в данной работе) белок-белковых взаимодействий. На рисунке 24 представлена цветовая кластеризация белков по «параметру инфляции MCL», который относится к параметру, используемому в алгоритме марковской кластеризации (Markov Cluster Algorithm, MCL). Алгоритм MCL – это алгоритм кластеризации графов, который можно использовать для поиска кластеров или групп связанных элементов в большом наборе данных. Параметр инфляции влияет на степень детализации кластеров, создаваемых алгоритмом, причем большие значения приводят к меньшим кластерам. Другими словами, он контролирует степень усиления сильных потоков и ослабления слабых во время процесса инфляции алгоритма MCL. В контексте данного графа были использованы параметры по умолчанию.

В верхнем левом углу отображены белки связанные с NMD. Что интересно, один из факторов NMD кластеризуется с белками, ассоциированными с цветовым зрением. У пациентов SOPH было обнаружено нарушение цветового зрения и можно предположить, что данный белок может быть косвенно связан с данным фенотипическим проявлением.

Ниже, тёмно-зеленым и синим цветом, кластеризованы белки, связанные с образованием липидных капель. Можно предположить наличие связи между двумя основными белками-партнерами NBAS – RAB18 и RAB8A (фиолетовым), хоть действие последнего на человеке пока что не ассоциировано с NBAS.

Ожидаемо, что белки в одном кластере с NBAS также имеют сильную связь с белками мембранного трафика ЭР и аГ (светло-коричневый кластер). Стоит отметить, что вариант SOPH вызывает костные аномалии в виде низкого роста и несовершенного остеогенеза, с которым чаще ассоциируют нарушение обмена коллагена.

Однако, можно сделать вывод, что это действие белка возможно только

опосредовано через другие белки мембранного трафика, например TANGO1, но не напрямую.

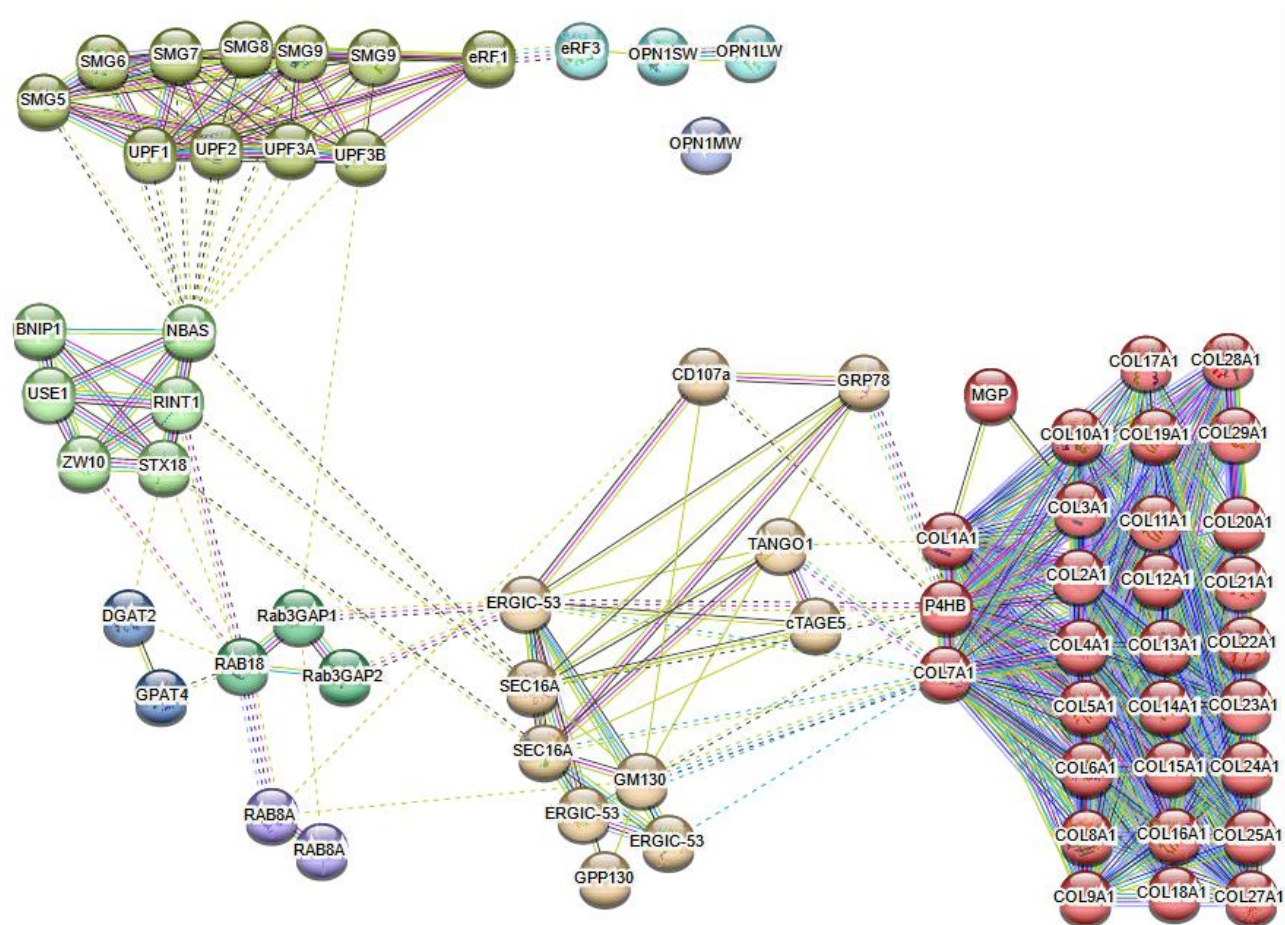


Рисунок 24. Сеть известных белок-белковых взаимодействий белков, ассоциированных с NBAS. Сеть построена с использованием базы данных STRING, с акцентом на белок NBAS. Белок NBAS выделен как центральный компонент одной из функциональных кластерных групп, включающей белки, связанные с внутриклеточным транспортом и поддержанием структуры эндоплазматического ретикула (ZW10, RINT1). Помимо этого, NBAS демонстрирует взаимодействия с белками, находящимися в других функциональных кластерах, участвующих в регуляции транспортных процессов через эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи (Sec16A), а также нонсенс-опосредованного распада РНК (UPF1). Также примечательны его связи с Rab-белками (RAB18 и Rab3GAP1), которые регулируют динамику липидных капель.

То же самое можно сказать и о маркере грануляции НК-клеток – CD107a. В целом по сети взаимодействий можно сделать вывод, что белок NBAS находится на перепутье нескольких клеточных путей метаболизма, что лишний раз объясняет широкий фенотипический спектр его патогенных вариантов.

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

Для начала 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, хоть ген *NBAS* и не обладает гаплонедостаточностью согласно базе данных gnomAD. Также были исключены пациенты с вариантами в компаунд-гетерозиготном состоянии, имеющие по две измененные версии белка, приводящей к образованию стоп-кодона. Все использованные в анализе патогенные варианты и их соответствующие дельты стабильности приведены в Приложении 5. 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 25).

На рисунке видно, 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, и, как правило, они были описаны в работах с ALF. Но, в связи с тем, что у пациентов с SOPH нет ALF, нарушения стабильности пока невозможно ассоциировать с печёночным фенотипом. Тем не менее, возможно он влияет на тяжесть заболевания. Вариант Gln1201Pro был описан у двух sibсов, один из которых умер во время приступа ALF [Nazmi F. et al., 2021]. Вариант Gly254Asp был найден у пациента с четырьмя приступами ALF, 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 ALF [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.

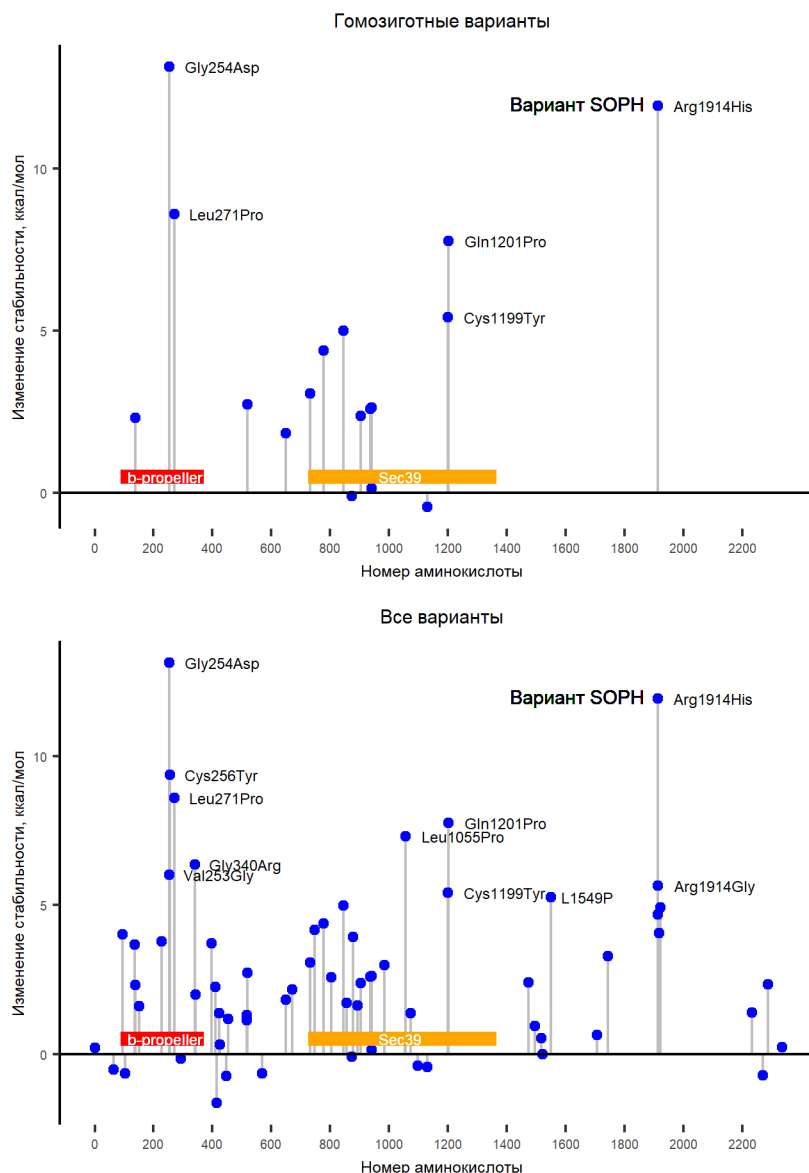


Рисунок 25. График изменения стабильности белка при патогенных вариантах гена *NBAS*. На рисунке красным и оранжевым цветом указаны домены белка на соответствующих аминокислотных позициях. Верхний рисунок – только гомозиготные миссенс-варианты, нижний рисунок – все варианты, включая компаунд-миссенс и те, которые были описаны при стоп-кодонах (но не сами стоп-кодоны). Можно сделать вывод, что вариант p.Arg1914His является наиболее дестабилизирующим белок (вместе с вариантом Gly254Asp) среди всех описанных на сегодняшний день миссенс-вариантов, что может являться звеном в патогенезе SOPH-синдрома.

Информация о пациенте с вариантом p.Leu271Pro была опубликована 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.

Что интересно, некоторые варианты не ведут к нарушению стабильности, что может говорить о том, что стабильность белка является одним из факторов мультисистемной клиники NBAS, но не ключевым. 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.

3.4.3 Моделирование структур комплекса NRZ

Патогенные варианты NBAS вызывают аутосомно-рецессивную мультисистемную патологию, включая аномалии скелетной, нервной, мышечной и иммунной систем, а также общую задержку развития [Segarra N.G. et al., 2015]. Было показано, что N-концевые варианты более склонны к опасному для жизни состоянию ILFS2 (синдром детской печеночной недостаточности типа 2, OMIM #616483), тогда как С-концевые варианты имели в своем репертуаре признаки SOPH (OMIM #614800). Интересно, что пациенты с ILFS2 имеют нормальный рост и зрение, тогда как пациенты с SOPH не имеют острой печеночной недостаточности [Li X. et al., 2018; Li Z.D. et al., 2020]. Исследователи Staufner и др. выявили ассоциацию фенотипа ILFS2 с вариантами, локализованными в домене SEC39 белка NBAS (Рисунок 25a) [Staufner C. et al., 2020]. В диссертации были проанализированы фенотипы всех описанных пациентов с патогенными вариантами на С-конце гена NBAS и обнаружена их сильную связь с атрофией зрительного нерва и низкорослостью. Однако, помимо основных симптомов, перечисленных выше, существуют и тяжелые фенотипы, такие как сахарный диабет, эпилепсия, синдром прерывания ножки гипофиза, atopический дерматит и акролобно-лицевой дизостоз 1 типа. Данные обстоятельства предвещают изучение

патофизиологии вариантов NBAS [Tagaya M. et al., 2014].

Ключевые молекулярные исследования, проведенные различными исследовательскими группами, показали, что белок NBAS играет множество ролей в клеточных процессах [Çivril F. et al., 2010]. По этой причине его еще называют «подрабатывающим» (англ. “moonlighting”) белком [Tagaya M. et al., 2014]. Хронологически первое исследование белка NBAS в 2007 году выявило его роль в нонсенс-опосредованном распаде РНК (NMD), сначала на *C.elegans* и *D.rerio* [Longman D. et al., 2007; Anastasaki C. et al., 2011], позже и на человеческих клеточных линиях [Longman D. et al., 2013]. Longman и др. идентифицировали локализованный в ЭР путь NMD, в котором NBAS взаимодействует с UPF1-хеликазой, чтобы модерировать деградацию локализованного в ЭР транскриптов [Longman D. et al., 2020]. Помимо NMD, NBAS является членом комплекса NRZ (NBAS, RINT1, ZW10), который регулирует ретроградный мембранный трафик от аГ к ЭР [Perry R.J., Mast F.D., Rachubinski R.A., 2009; Rogers J.V. et al., 2014]. Предыдущие исследования выявили роль NRZ в функционировании комплекса STX18, локализованного в ЭР [Aoki T. et al., 2009]. Механистически, NBAS связывает NRZ с STX18 через белок USE1 SNARE по своему N-концу, а его C-конец связывается с ZW10-RINT1. Недавние исследования показывают, что NRZ не ограничивается только ретроградным движением по умолчанию, но также важен для более специфических функций, таких как образование везикул при отпочковании коллагена VII из ЭР и созревание липидных капель [Bersuker K. et al., 2018; Xu D. et al., 2018; Raote I. et al., 2018; Jackson C.L., 2019]. Raote и др. показали, что стабильные комплексы TANGO1 привлекают NRZ для сборки в кольцо-подобную структуру, необходимое для физиологической секреции коллагена VII из ЭР [Raote I. et al., 2018]. Другая исследовательская группа выявила взаимодействие между Rab18-связанными липидными каплями (LD) и локализованным в ЭР комплексом NRZ и SNARE [Xu D. et al., 2018]. Интересно, что комплекс Rab18-NRZ-STX18 также участвует в инфекциях ВК-полиомавируса и SARS-CoV-

2 путем захвата меченных Rab18 везикул, содержащих вирус, в ЭР [Zhao L., Imperiale M.J., 2017; Granata V. et al., 2023].

Несмотря на всестороннее и обширное изучение белка NBAS, полный спектр его функций еще полностью не выяснен. Изучение того, как функции NBAS могут влиять на развитие мультисистемного фенотипа у пациентов, остается интересной и до сих пор нерешенной задачей (Рисунок 26).

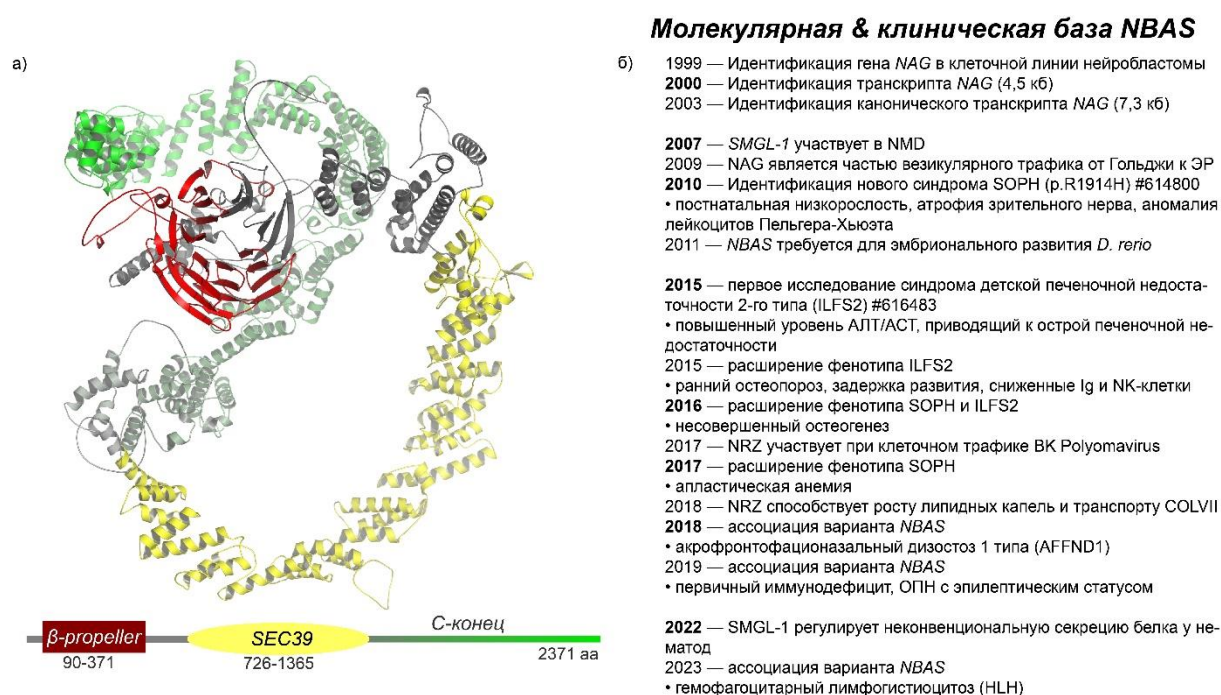


Рисунок 26. Структура белка NBAS и основные исследования. а – Традиционная доменная архитектура белка NBAS включает домен β -пропеллера (красный) и домен SEC39 (желтый). Неаннотированный С-конец окрашен в зеленый цвет. б – Основные исследования, проведенные молекулярными биологами и врачами относительно функции и фенотипа NBAS.

AlphaFold (АФ) продемонстрировал значительные способности к предсказанию структуры белка [Jumper J. et al., 2021; Abramson J. et al., 2024]. Модификации АФ позволяют исследователям изучать не только структуру белка, но и его пространственное расположение относительно других белков, а также места их прямого контакта [Gao M. et al., 2022; Evans R. et al., 2022; Rossi Sebastiano M. et al., 2022; Suleman M. et al., 2023; Legrand D. et al., 2023]. Однако, несмотря на свою сильную предсказательную способность [Brandes N. et al., 2023; Lin Z. et al., 2023], судя по текущим исследованиям, АФ имеет противоречивую эффективность анализа свойств мутантных белков [Brandes N. et al., 2023; Cheng

J. et al., 2023; Lin Z. et al., 2023; Pak M.A. et al., 2023].

В данной работе использован АФ для изучения редкого наследственного заболевания – SOPH синдром, а также других состояний, связанных с вариантами гена *NBAS*. Определены предполагаемые сайты связывания для основных партнеров по взаимодействию *NBAS* и оценить влияние патогенных вариантов на субдомены *NBAS* с помощью АФ. Исследование выявило уязвимые субдомены и дало представление о возможном патогенезе вариантов *NBAS*.

3.4.3.1 Консенсусные сайты связывания *NBAS* как части комплекса *NRZ*

Наиболее изученная роль *NBAS* заключается в его участии в ретроградном транспорте в качестве компонента комплекса *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. 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 запустили АФ 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 27в), тогда как С-концевая область с 1336 по 1643 была связана с *ZW10* (Рисунок 27а). Чтобы выяснить, действительно ли предсказанные регионы *USE1* и *ZW10* являются сайтами связывания *NBAS*, прогоны АФ2 также были выполнены с их уже известными партнерами. Перекрывание 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 27б, 27г). Полученные результаты были перепроверены 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.

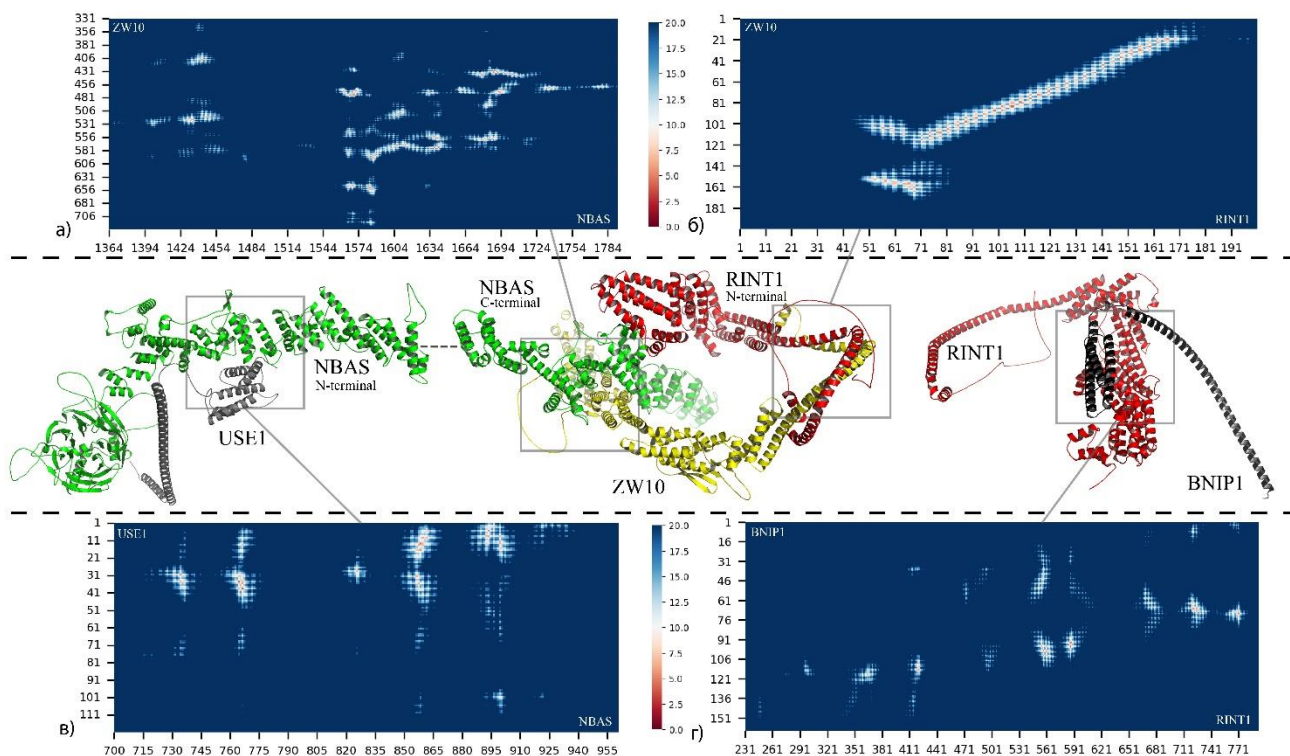


Рисунок 27. Трехмерная структура комплекса NRZ и тепловая карта консенсусных сайтов связывания. а – Тепловая карта сайтов взаимодействия ZW10 (331-730, ось y) и NBAS (1364-1792, ось x). б – Тепловая карта сайтов взаимодействия ZW10 (1-200, ось y) и RINT1 (1-200, ось x). в – Тепловая карта сайтов взаимодействия USE1 (1-120, ось y) и NBAS (700-960, ось x). г – Тепловая карта сайтов взаимодействия BNIP1 (1-160, ось y) и RINT1 (230-792, ось x). Белковые комплексы, созданные AlphaFold2 и визуализированные с помощью PyMOL. Расстояния между аминокислотами в паре белков представлены в виде тепловой карты: красный цвет представляет расстояние менее 10 Å, а синий – расстояние более 10 Å.

Ранее исследователи проанализировали укороченные фрагменты NBAS с помощью иммунопреципитации, чтобы определить, какие участки белка отвечают за специфическое связывание [Aoki T. et al., 2009]. Было показано, что укороченный NBAS 1-1035 связывался с USE1, но не с ZW10-RINT1, тогда как укороченный NBAS 1036-2371, наоборот, ассоциировался с ZW10-RINT1, но не с USE1 и STX18. Результаты АФ, полученные в настоящей работе, соответствуют предыдущим результатам и более точно определяют точки связывания. Полученные консенсусные области расположены на периферии эволюционно консервативного домена SEC39. Однако, учитывая, что вариант SOPH

расположен в позиции 1914, по-видимому, сборка комплекса NRZ, а также функция ретроградного мембранного транспорта может не быть нарушена при синдроме SOPH очевидным образом.

3.4.3.2 Связывание Rab18 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]. Хотя эти комплексы, по-видимому, представляют собой универсальный механизм связывания на мембране ЭР, активность Rab18 в этом взаимодействии специфична для преадипоцитов, адипоцитов и клеток Лейдига. В других клетках (клетках AML12, HeLa, Cos7 и 293T) такого не наблюдается. Механистически, локализованный в ЛК Rab18 связывается с локализованным в ЭР комплексом NRZ.

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 были запущены 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.

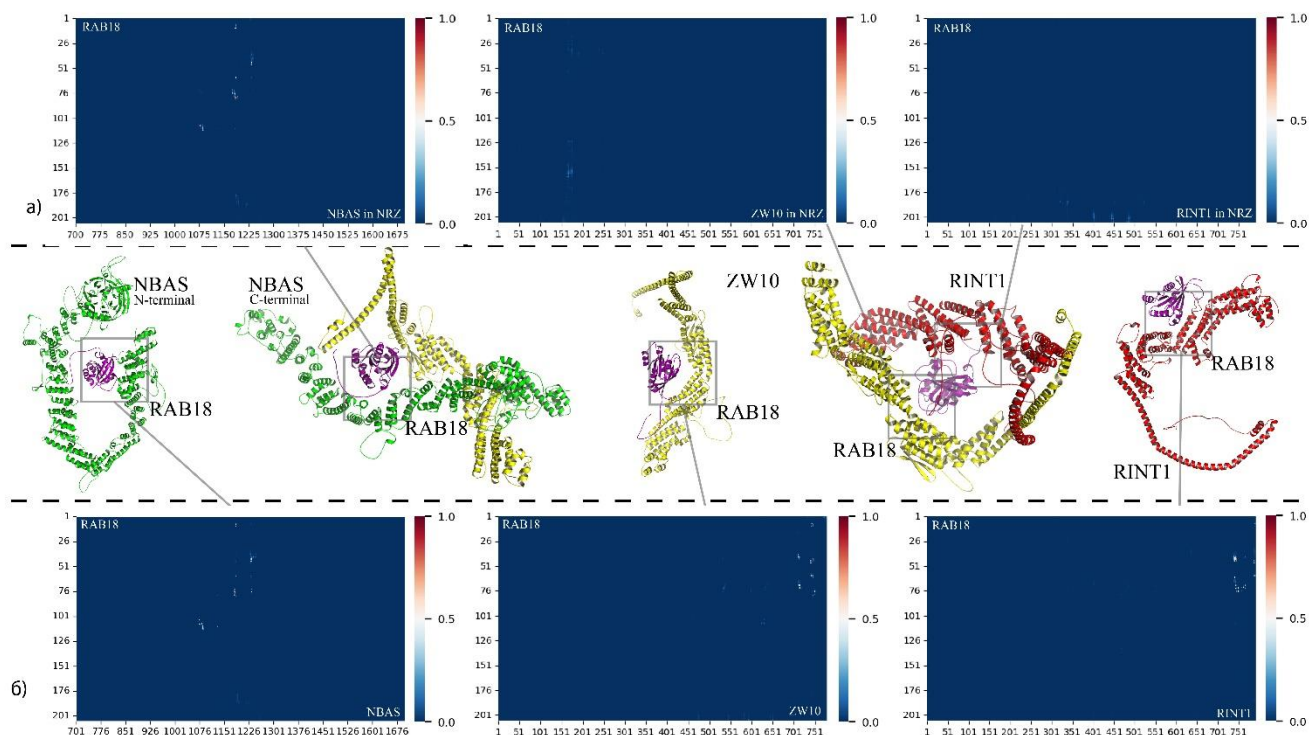


Рисунок 28. Трехмерная структура компонентов NRZ с Rab18 и тепловая карта консенсусных сайтов связывания. а – Тепловая карта NBAS, ZW10 и RINT1 в комплексе NRZ с Rab18. б – Тепловая карта компонентов NRZ в паре исключительно с Rab18. Белковые комплексы, созданные AlphaFold2 и визуализированные PyMOL в иллюстративных целях. Сайты связывания между парами белков представлены в виде тепловой карты, где красный цвет представляет собой консенсусный сайт связывания, а синий – менее возможный контакт.

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 С-концами ZW10 и RINT1 соответственно, но что интересно, эти сайты исчезали в присутствии NBAS (Рисунок 28а). 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 (Рисунок 28б).

Ху и др. провели всестороннее исследование Rab18 и его функции в отношении формирования и созревания LD, особенно в аспекте механизма контакта ER-LD [Xu D. et al., 2018].

Далее мы проанализировали предыдущие результаты изучения

взаимодействия Rab18 с комплексом NRZ. Во-первых, Xu с соавт. обнаружили связывание Rab18 исключительно с эндогенными ZW10 и NBAS. Однако, нам не удалось идентифицировать надежно стабильные точки контакта Rab18 ни с NBAS, ни с RINT1, ни с ZW10 с использованием AF2. Однако AF3 смог сгенерировать структуры, которые имеют консенсусные сайты связывания Rab18 с членами NRZ.

Во-вторых, в экспериментах с укороченными формами ZW10 было обнаружено, что только полноразмерный ZW10 (1-779) связывается с Rab18 (некоторые данные, обсуждаемые в текущих параграфах, доступны в дополнительных материалах соответствующей статьи, рисунок S4 [Xu D. et al., 2018]). Остальные варианты белка, усеченные на С-конце (1-722, 1-358, 1-318, 1-224), больше не проявляли связывания. Затем был сделан вывод, что С-конец ZW10 (722-779) необходим для взаимодействия с Rab18. Интересно, что согласно предсказаниям AF3, сайт связывания ZW10 действительно расположен на его С-конце, что было подтверждено ранее экспериментально. Однако в составе комплекса NRZ ZW10 не контактирует с Rab18. Результаты нашего прогноза могут пролить свет на два возможных способа взаимодействия между компонентами NRZ и комплексом NRZ с Rab18. В тех же экспериментах с укороченным ZW10 было обнаружено, что укороченный ZW10 (1-224) связывается с RINT1, но не с NBAS, тогда как остальные усеченные формы белка связываются с обоими белками (1-318, 1-358, 1-722). Эти эксперименты согласуются с нашими результатами, указывающими на то, что области ZW10 20–116 и 404–655 ответственны за связывание с RINT1 и NBAS соответственно. Однако, усеченный ZW10 (1-318, 1-358) также связывается с NBAS, поскольку этот разрыв не попадает в предсказанную область консенсусного контакта ZW10-NBAS. К сожалению, мы не смогли обнаружить консенсусные сайты связывания между усеченной изоформой ZW10 и NBAS с использованием AF для подтверждения этого взаимодействия. Однако на мой взгляд, предсказанные сайты связывания с полноразмерными NBAS и ZW10 достаточно точны для

текущего исследования, поскольку AF не предназначен для прогнозирования мутированных или усеченных белков.

В-третьих, интересные результаты наблюдались в экспериментах с укороченными формами белка NBAS. NBAS, укороченный строго по домену SEC39 (734-1355), не связывался с ZW10, но С-конец NBAS (1355-2371) имел сильные полосы с ZW10. Эти эксперименты согласуются с нашими результатами, поскольку области связывания для белков-партнеров NBAS действительно располагались не на самом аннотированном домене SEC39, а на его периферии. Интересным открытием здесь также является то, что одинаково слабые полосы наблюдались для Rab18 в обеих усеченных формах белка NBAS. Но добавление ZW10 помогло усилить полосы только у NBAS (1355–2371), а не NBAS (734–1355). Хотя AF3 демонстрирует сходную картину взаимодействия между NBAS/RAB18 и NBAS/RAB18/ZW10, похоже, что для достижения этого конформационного состояния для NBAS требуется предварительное связывание ZW10/NBAS, чтобы иметь возможность взаимодействовать с Rab18 (Рисунок 28а и 28б).

Здесь также стоит отметить, что полосы Rab18, коиммунопреципитированные с полноразмерным NBAS, имеют более яркую люминесценцию, чем полосы усеченного NBAS (1355-2371), в которых отсутствует предсказанная в текущем исследовании область связывания NBAS/RAB18 (1074-1237). Эти данные подтверждают гипотезу о том, что область связывания NBAS/RAB18, предсказанная AF, возможно, более физиологична для комплекса Rab18-NRZ и имеет более сильную аффинность связывания.

В целом, результаты моделирования нашего исследования согласуются с предыдущими экспериментами относительно особенностей связывания NRZ-Rab18, предвосхищая новые гипотезы о возможных способах взаимодействия между Rab18 и NRZ.

3.4.3.3 Анализ комплекса NRZ и TANGO1 и его прямого контакта через NBAS

TANGO1 (MIA3) – белок, который координирует этапы секреции коллагена

и расположен на мембране ЭР [Raote I. et al., 2018]. Он образует кольцевую структуру, похожую на забор, на поверхности ЭР, которая затем рекрутирует компартменты ERGIC для увеличения объема секретлируемой везикулы, достаточно подходящей для объемистых тримеров коллагена. Комплекс NRZ здесь также принимает непосредственное участие в рекрутировании, и без него не формируется физиологическая кольцевая структура для секреции коллагена, и коллаген запирается внутри ЭР. Интересно отметить, что варианты *NBAS* связаны с патологиями скелета, такими как несовершенный остеогенез, деформации костей и низкий рост.

Были выполнены отдельные запуски AF2 для членов NRZ с С-концевой частью TANGO1 (907-1907, 1200-1907), обращенной к цитоплазме. Не получая консенсусные сайты связывания в отдельных запусках с полноразмерным С-концом, были также сгенерированы комплексы только с минимальным TEER-доменом TANGO1 (1200-1700), который необходим для рекрутирования мембраны ERGIC. Эта комбинация также не дала результата, как и запуски AF3 димерного комплекса доменов TANGO1 TEER с USE1-NBAS, NBAS-ZW10, NBAS-RINT1 и ZW10-RINT1.

Raote и др. в своей работе над механизмами формирования коллагеновых транспортных везикул экспериментально выявили, что TANGO1, TANGO1-short и cTAGE5 образуют стабильный комплекс [Raote I. et al., 2018]. Хотя NRZ необходим для формирования кольцевой структуры, вызванной стабильными комплексами TANGO1, стоит отметить, что образование самого комплекса TANGO1 не регулируется NRZ. Прямые запуски AF не выявили надежных предполагаемых точек контакта между TANGO1 и компонентами комплекса NRZ. Однако связывание TANGO1 с этими белками, включая NBAS, было показано в экспериментах методом ко-иммунопреципитации. Гипотезу об отсутствии прямого контакта между TANGO1 и NRZ косвенно подтверждают данные STED-микроскопии, где вблизи колец TANGO1 наблюдалось лишь несколько точек RINT1. Это позволяет предположить, что эти комплексы могут

быть частью одного и того же пути секреции коллагена, тем не менее, они не имеют прямого белок-белкового контакта. Неоднозначность взаимодействия TANGO1 с NRZ, сочетающаяся с коллаген-связанными фенотипами вариантов TANGO1 и NBAS, может указывать на то, что это событие контакта NRZ-TANGO1 сопровождается формированием структуры более высокого порядка с пока еще визуально непонятным паттерном взаимодействия.

3.4.3.4 Формирование комплекса членов NMD с NBAS

Нонсенс-опосредованный распад представляет собой эволюционно консервативный механизм деградации транскриптов, содержащих РТС, а также известно, что он облегчает клеточные реакции путем регуляции нормальных транскриптов [Karousis E.D., Mühlemann O., 2019]. NMD управляется «коровыми» факторами NMD: UPF1, UPF2 и UPF3B. В недавних исследованиях NBAS был связан с регуляцией NMD посредством контакта с UPF1 [Longman D. et al., 2020]. Вместе они играют центральную роль в ответе NMD, локализованном в ЭР.

Последовательные прогоны NBAS на AF2 были проведены с каждым членом NMD (прил. 3). При этом не удалось идентифицировать консенсусные сайты связывания для NBAS и UPF1 (Рисунок 29в). Однако, при создании комплекса NBAS и UPF3B (а также его паралога UPF3A) удалось обнаружить тонкую связь С-конца UPF3' с участком 1600-1800 белка NBAS (Рисунок 29а). Однако этот сайт связывания исчез после повторной оценки результатов AF2 с использованием AF3 (Рисунок 29б).

По результатам моделирования не удалось обнаружить консенсусные сайты связывания NBAS/UPF1, несмотря на то, что UPF1 и NBAS имеют убедительную экспериментальную основу, подтверждающую их взаимосвязь [Longman D. et al., 2020]. Обнаружение предполагаемой связи между NBAS и UPF3 было неожиданным, учитывая, что UPF3B конкретно участвует в UPF2-зависимом пути NMD [Sun L., Mailliot J., Schaffitzel C., 2023].

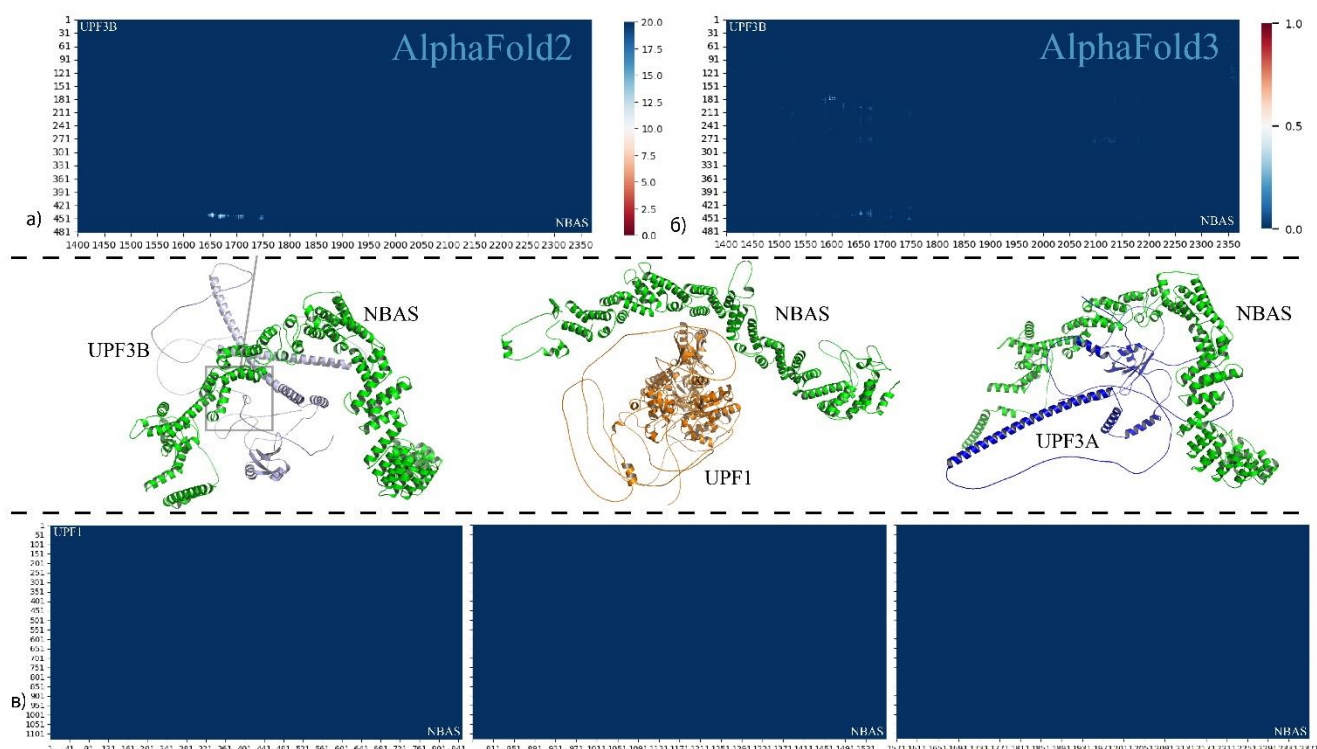


Рисунок 29. Трехмерная структура NBAS с белками UPF и тепловая карта консенсусных сайтов связывания. а – Тепловая карта сайтов взаимодействия UPF3B и NBAS, созданная с помощью AF2. б – Тепловая карта сайтов взаимодействия UPF3B и NBAS, созданная с использованием AF3. в – Тепловая карта мест взаимодействия UPF1 и NBAS. Белковые комплексы, созданные AlphaFold2 и визуализированные PyMOL в иллюстративных целях. Для данных AF2 расстояния между аминокислотами в паре белков представлены в виде тепловой карты, где красный цвет представляет расстояние менее 10 Å, а синий – расстояние более 10 Å. Для данных AF3 сайты связывания между парами белков представлены в виде тепловой карты, где красный цвет представляет собой консенсусный сайт связывания, а синий – менее возможный контакт.

Истощение UPF2 привело к усилению регуляции преимущественно цитоплазматических транскриптов, тогда как NBAS и UPF1 регулируют преимущественно мембраносвязанные транскрипты. Недавние исследования выявили путь с участием белков АКТ, который обходит активацию UPF2 [Cho H. et al., 2022]. Однако запуск AF белков АКТ1 (АКТ2 и АКТ3) с NBAS также не дал убедительных результатов. Интересно, что были идентифицированы возможные консенсусные сайты контактов с белками SMG, что указывает на потенциальную регуляторную роль NBAS при NMD, но им не хватает экспериментальной основы для дальнейшего обсуждения.

В целом мы не наблюдали прямой связи между основными компонентами NMD и NBAS, как мы ожидали. Для поддержки гипотезы о взаимосвязи NBAS-NMD необходимы дополнительные экспериментальные данные.

3.4.3.5 Картирование вариантов, ассоциированных с фенотипическими признаками, на смоделированную структуру белка NBAS и его сайты связывания

По сути, AF генерирует два показателя достоверности для своих структур – тест прогнозируемой разницы локальных расстояний (pLDDT) и прогнозируемую ошибку выравнивания (PAE). Если pLDDT представляет собой достоверность аминокислоты в локальной структуре, то PAE является глобальным показателем достоверности аминокислот относительно всей структуры белка. Недавние исследования показали связь между этими показателями и данными молекулярной динамики [Guo H.-B. et al., 2022]. Здесь картированы и оцениваются идентифицированные предполагаемые сайты связывания и рассматривается структура белка NBAS.

pLDDT

Значения pLDDT варьируются от 1 до 100, где более высокие значения соответствуют более высокой достоверности. Оценка выше 90 указывает на то, что как остов, так и боковые цепи правильно расположены в локальной структуре. Значения выше 70 обычно соответствуют правильному расположению остова аминокислот. Низкие значения pLDDT могут возникать, когда область гибкая или структура изначально неупорядочена.

Сайт связывания USE1 является единственным среди предсказанных сайтов, который содержит аминокислотные остатки с высокой достоверностью. Это может говорить о том, что предсказанный сайт может быть наиболее консервативным и не подвергаться значительным конформационным изменениям во время взаимодействия (Рисунок 30в). Более того, учитывая то, что он находится ближе к домену β -пропеллера, сайт связывания USE1 может играть роль в его ориентации, поскольку сам β -пропеллер, как видно, также демонстрирует высокие значения pLDDT по сравнению с другими частями белка (Рисунок 30б).

С другой стороны, сайт связывания ZW10 содержит гибкие части со значениями pLDDT ниже 50, что указывает на потенциальные большие

конформационные изменения, происходящие во время взаимодействия.

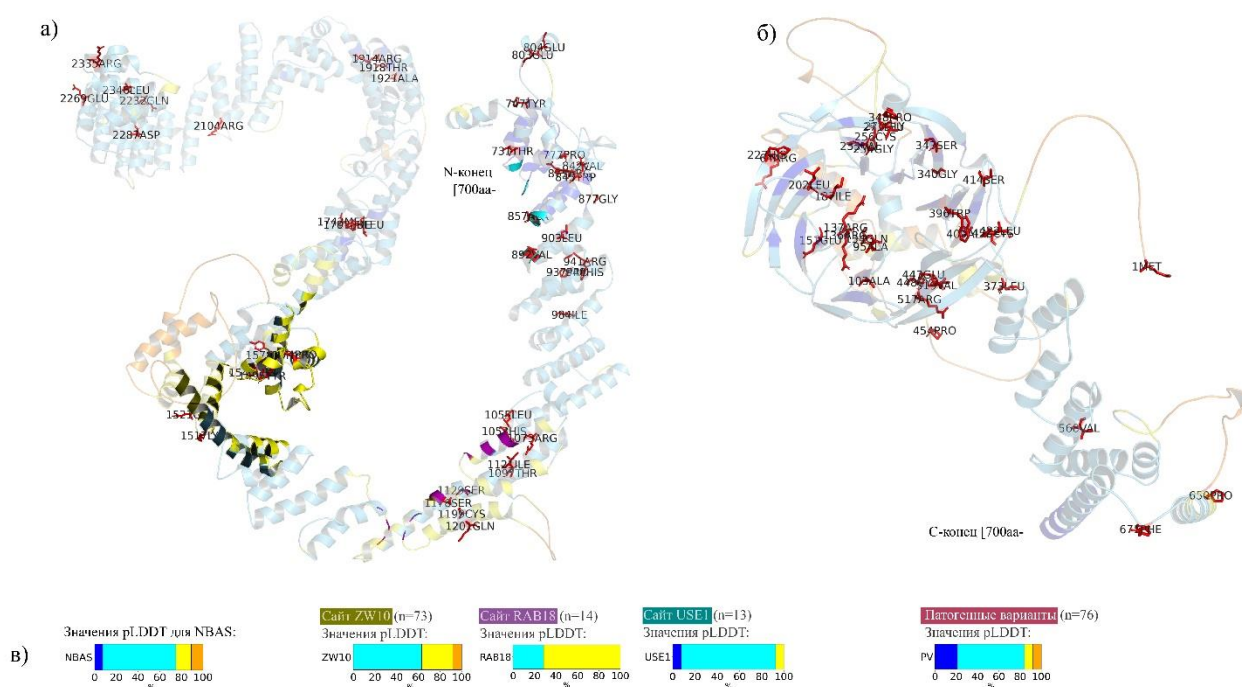


Рисунок 30. Белок NBAS с выделенными предсказанными сайтами связывания. а и б – структура белка, генерируемая AF2. Цветные области обозначают предполагаемые сайты связывания с соответствующими белками. Кроме того, выделены места расположения аминокислот дикого типа, на которые влияют патогенные миссенс-варианты. а – Изображены основные сайты связывания: ZW10 желтым, RAB18 фиолетовым и USE1 голубым. б – β -пропеллерный домен (соотношение с 5A не сохранилось). в – значения pLDDT (%) структуры белка NBAS, каждого сайта связывания и местоположения патогенных вариантов.

Контакт с ZW10 может быть активирующим взаимодействием для NBAS, поскольку его сайт связывания содержит наибольшее количество остатков (Рисунок 30в). В этом случае сайт связывания RAB18 может модулировать это большое конформационное изменение в зависимости от определенных реальных ситуаций и сред.

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 30а). Однако варианты, расположенные ниже сайта связывания ZW10, также обнаруживают накопление в регионах с еще неясной функцией. Несмотря на их предполагаемую важность, наряду с β -пропеллером, эти области не показали взаимодействия во время моделирования, и их точное назначение

остается неясным.

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 31б, 30г).

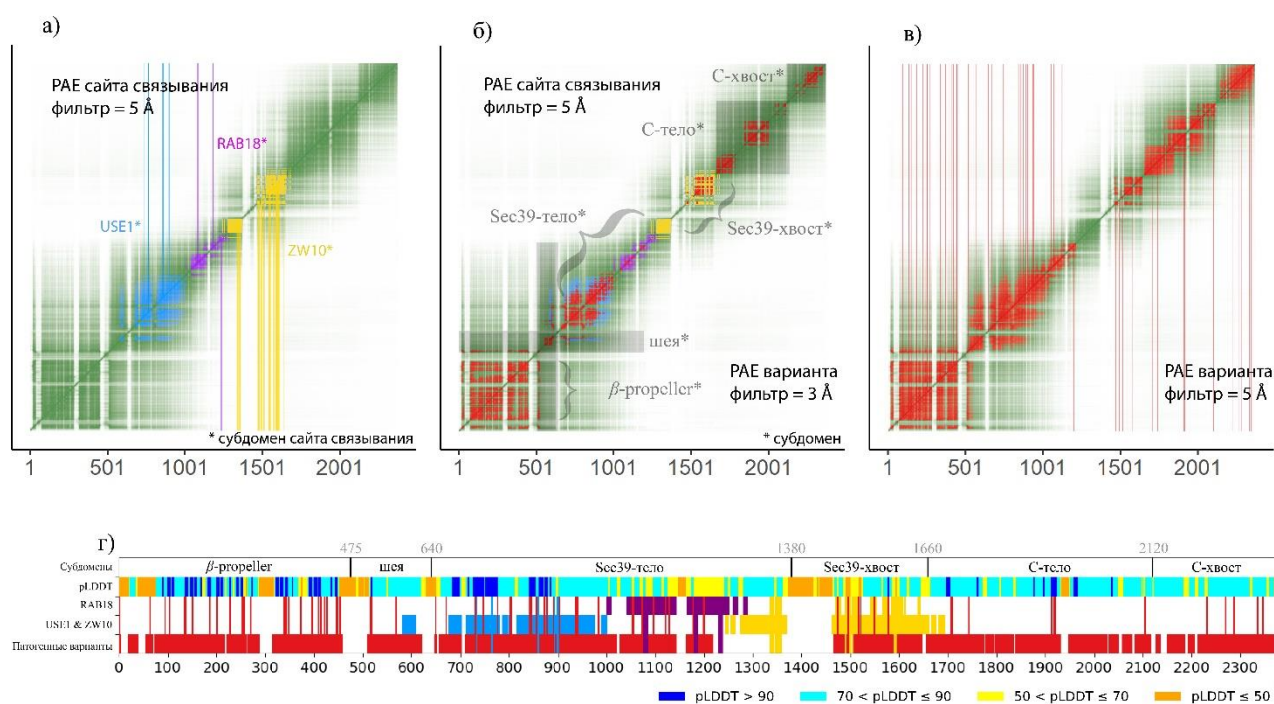


Рисунок 31. Картирование сайтов связывания на графике РАЕ. Темно-зеленый – менее 1 Å, белый – более 30 Å. а – Картирование и идентификация субдоменов, принадлежащих соответствующим сайтам связывания (синий – USE1, фиолетовый – Rab18, желтый – ZW10). б – Картирование воздействия патогенных вариантов (красный) на субдомены сайтов связывания. в – Картирование патогенных вариантов на субдоменах NBAS. г – Линейное изображение субдоменов сайтов связывания и патогенных вариантов. Субдомены показаны как цветные области. Связывающие остатки и расположение патогенных вариантов показаны вертикальными линиями. Помимо картирования РАЕ, приводятся значения pLDDT. Координаты субдоменов показаны для наглядности.

Рисунок 31 демонстрирует, что некоторые аминокислотные остатки плотно упакованы с другими в предсказанной структуре белка, что позволяет предположить, что они могут влиять на позиционирование других и последующее

сворачивание. Области сайтов связывания, ранее локализованные изолированно на рисунке 30, здесь показывают, что их субдоменная принадлежность достаточно широка, чтобы достигать остатков, с которыми их линейно не очевидно связать (Рисунок 31а, 30г).

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 31в, 30г). 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.

Хотя «субдомен» β -пропеллера демонстрирует прочную упаковку на N-конце, сам аннотированный «домен» β -пропеллера (показанный на рисунке 25) занимает там чуть больше половины области (соответствует нижнему левому квадрату на рисунке 1 субдомена β -пропеллера. Примечательно, что субдомен между β -пропеллером и сайтом связывания USE1 демонстрирует низкие значения PAE для обоих из них соответственно. Это может указывать на то, что этот субдомен является своего рода «шеей» из-за его низких прогнозируемых отклонений от β -пропеллера и SEC39-тела, что позволяет предположить, что, хотя субдомен не является частью ни одной из двух частей белка, он является ключевым для их взаимного расположения (Рисунок 31б). С-концевая область на графике PAE демонстрирует упаковку в два отдельных субдомена – С-тело и С-хвост. Вариант SOPH (p.R1914H) находится на субдомене С-тела, что указывает на вклад данного субдомена на развитие соответствующего сложного фенотипа. Область С-тела также демонстрирует области с высокими значениями pLDDT вблизи и в месте расположения варианта SOPH. Возможно, С-конец играет свою роль в функциональности NBAS, помимо субдоменов SEC39 и β -пропеллера, которую еще предстоит обнаружить.

В целом, данные значений pLDDT AlphaFold помогли определить гибкие и

консервативные области белка. Графики РАЕ расширили субдоменную принадлежность сайтов связывания, чего было нетривиально достичь исключительно за счет линейного представления NBAS.

3.4.3.6 Картирование вариантов, ассоциированных с триадой SOPH, на структуру белка NBAS

График фенотипа РАЕ, показанный на рисунке 32, состоит из известных миссенс-вариантов с соответствующими фенотипами. Как правило, SOPH обозначает три фенотипических признака: низкий рост, атрофия зрительного нерва и пельгеровская аномалия.

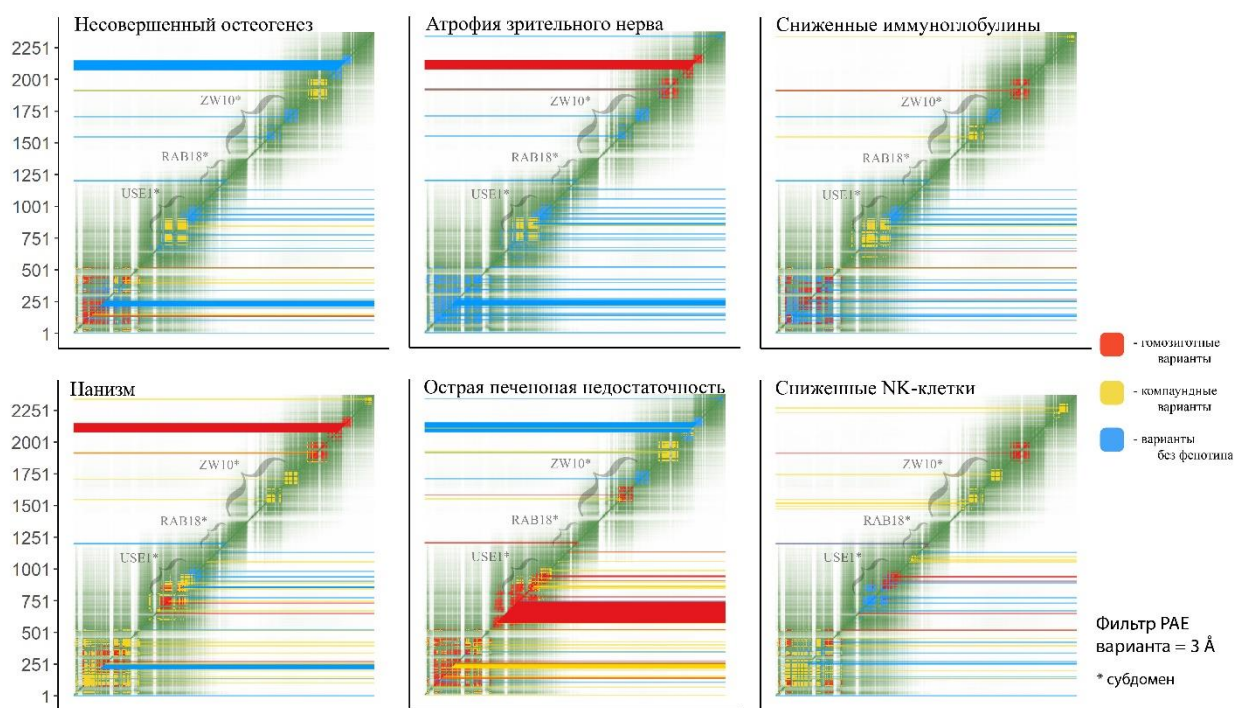


Рисунок 32. График фенотипа РАЕ. Наличие фенотипа обозначается тремя цветами: красным – фенотип обнаружен у пациента с гомозиготным миссенс-вариантом; желтый – фенотип обнаружен у пациента со сложным гетерозиготным патогенным вариантом; и синий – фенотип не присутствовал у пациента с этим вариантом. Линии соответствуют определенным вариантам.

Кроме этого, был выявлен дефицит Ig и NK-клеток у якутских пациентов SOPH. Для сбора фенотипа были включили данные фенотипические признаки в обзор литературы на предмет аналогичных признаков в других клинических случаях с патогенными вариантами NBAS в исследовательских статьях с 2010 по 2023 год ($n = 223$). После этого были отобраны только пациенты с миссенс-

вариантами (n=45). Наиболее многочисленными и хорошо описанными фенотипическими признаками были острая печеночная недостаточность (n=40) и низкорослость (n=32). Патологические переломы были отнесены к категории несовершенного остеогенеза (НО) (n=28). Наиболее описанным неврологическим признаком была атрофия зрительного нерва (n=32). Иммунологические признаки были сосредоточены на дефиците Ig (n=30) и NK-клеток (n=28) у пациентов с NBAS патологиями. К сожалению, пельгеровская аномалия в большинстве случаев не представлена/не диагностируется, поэтому она была исключена из картирования фенотипа.

В отличие от НО, низкорослость может развиваться с патогенными вариантами практически во всех участках белка. При этом субдомены, пораженные НО, локализуются преимущественно вблизи β -пропеллера. График РАЕ указывает на то, что ключевыми факторами патогенеза тяжелого нарушения метаболизма коллагена у пациентов с вариантами NBAS могут быть «домен» и «субдомен» β -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 β -пропеллера.

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 ALF – на оставшихся субдоменах NBAS. Примечательно, что ОПН, как известно, провоцируется лихорадкой. Учитывая, что фенотип ALF может быть обусловлен вариантами, расположенными в каждом из предсказанных сайтов связывания, можно предположить, что варианты ALF 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 С-конца, обсуждавшейся ранее.

Варианты, связанные с низкими уровнями Ig и NK-клеток, не демонстрируют явного накопления в определенных субдоменах NBAS. Однако, хотя оба этих фенотипических признака являются частью иммунной системы, можно сказать, что они имеют разный патогенез, поскольку у некоторых пациентов эти признаки проявляются по отдельности. NK-клетки, по-видимому, поражаются вариантами, влияющими на сайты связывания USE1 и Rab18, в то время как график РАЕ дефицита Ig имеет общий паттерн в субдоменах β -пропеллера и С-тела относительно вышеописанного графика РАЕ дефицита NK-клеток.

В целом графики РАЕ прояснили сложную природу этих фенотипов, указывая на особо «уязвимые» области NBAS и возможные нарушения, возникающие при соответствующих патогенных вариантах.

3.4.3.7 Выводы

Результаты данного исследования могут способствовать выяснению механизмов, лежащих в основе патологий, связанных с NBAS, и открывают потенциал для разработки таргетной терапии в будущем. Кроме того, картирование фенотипов пациентов с патологиями, связанными с NBAS, может помочь в диагностике и выборе индивидуальной стратегии лечения. 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, поскольку эти предсказания в значительной степени полагаются на эволюционную информацию и не всегда дают представление о динамике белков или функциональных механизмах, поскольку AlphaFold фокусируется в первую очередь на статических структурах и не предсказывает конформации, на которые влияют такие факторы, как pH и

температура.

В целом, белок-вариант-фенотипический подход (PVP) с использованием AlphaFold может служить примером для анализа фенотипа пациентов с вариантами генов в «подрабатывающих» многофункциональных белках, патогенность которых демонстрирует мультисистемный фенотип.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ультимативный фенотип С-конца

В ходе выполнения диссертационной 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 3 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 (Рисунок 33).

В неврологической картине больных SOPH отмечаются жалобы, сходные с резидуальной энцефалопатией. Тем не менее, невозможно с такой же уверенностью сказать об интеллектуальной недостаточности, так как не наблюдается аналогичной тенденции у якутских больных SOPH. В связи с тем, что не наблюдаются частые аномалии на МРТ и другие неврологические нарушения, такие как умственная отсталость и судороги, предполагается умеренная степень тяжести неврологической картины SOPH. Что касается эндокринологических признаков, то в связи с относительно высокой частотой заболеваний щитовидной железы в Якутии и отсутствием данных в литературе, сложно связать аномалии щитовидной железы со фенотипом С-конца.

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 С-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 вариантами в компаунд-гетерозиготном состоянии в домене β -

пропеллера и SEC39. Таким образом, предполагается, что носительство варианта SOPH приводит к легкому фенотипу без ОПН в случае гомозиготного состояния (Рисунок 33).

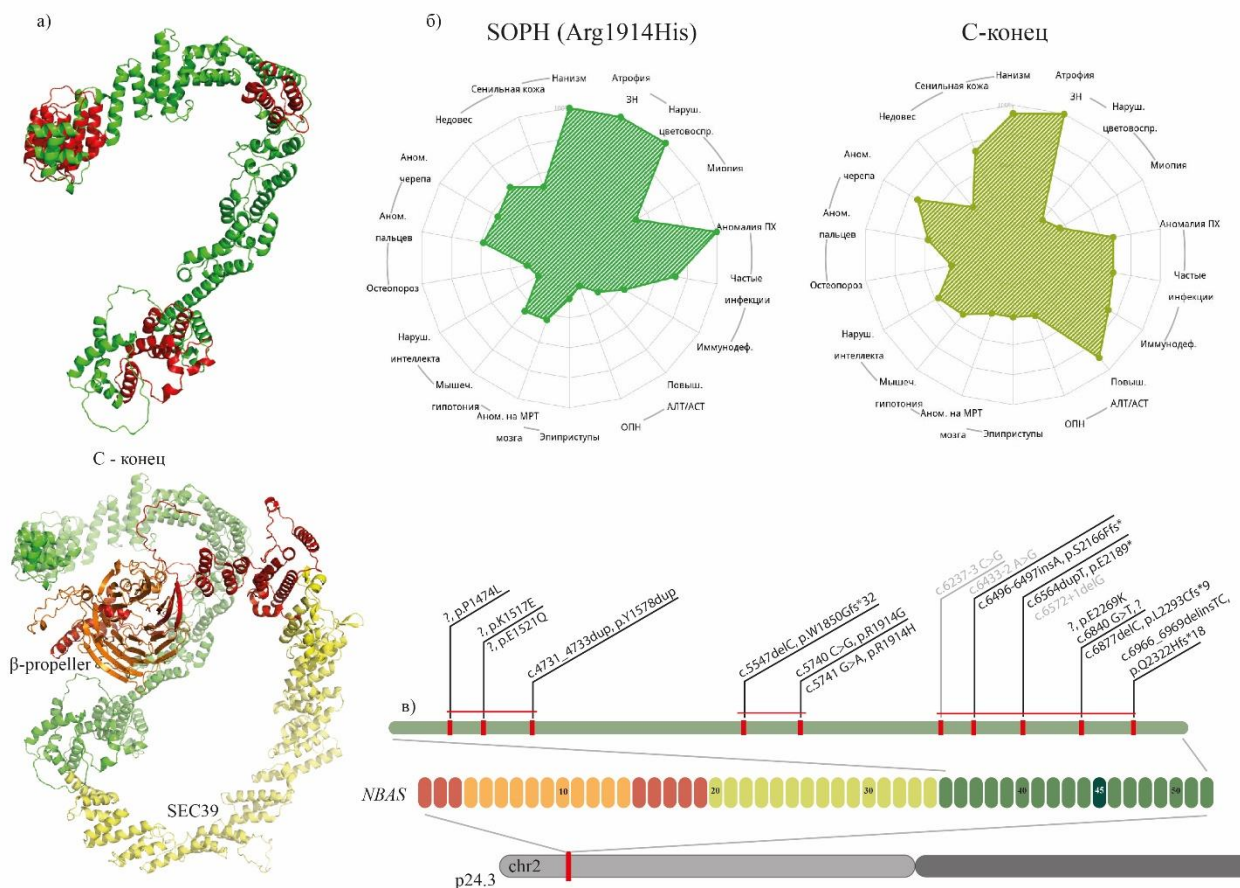


Рисунок 33. Белковый фенотип NBAS. (а) Трехмерная структура белка NBAS и его С-конца, предсказанная AlphaFold, была воссоздана с использованием системы молекулярной визуализации PYMOL. Участки: оранжевый – β -пропеллер, желтый – SEC39, зеленый – С-конец. (б) Радарная диаграмма ключевых фенотипических признаков SOPH и С-конца (%). По часовой стрелке: представлены скелетная система, общий вид, офтальмологические и иммунологические данные, фенотип печени с неврологическими признаками. Нарушения в структуре и функции С-конца NBAS связаны с развитием SOPH-синдрома и других SOPH подобных патологий, что подтверждает его значимость как объекта изучения в патогенезе редких заболеваний. (в) Известные С-концевые варианты. Красной линией отмечены «уязвимые» области, также выделенные в 3D-модели С-конца.

Низкий рост с атрофией зрительного нерва по результатам данного исследования являются ведущими фенотипическими признаками для С-концевых вариантов гена *NBAS*, особенно в аспекте пациентов с SOPH. Это единственные симптомы, обнаруживаемые у всех пациентов. Хотя и описан один случай пациента без значимой задержки роста, все другие случаи в литературе

согласуются с этим утверждением. Задержка роста проявляется в возрасте 3 лет и является поводом для обращения к врачу. Атрофию зрительного нерва обычно обнаруживают позднее при дальнейшем обследовании. В настоящее время эффективные терапевтические подходы к этим состояниям отсутствуют.

Низкие показатели иммуноглобулинов и NK-клеток у пациентов с SOPH

Хотя иммунодефицит и не диагностируется с высокой частотой, чтобы бить тревогу, количество больных с частыми инфекционными заболеваниями позволяет предположить, что эта группа больных может быть гиподиагностирована. Это согласуется с данными диссертационной 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.

Ослабленные иммунологические функции организма способствуют рецидивирующим инфекциям у пациентов с SOPH-синдромом. Лечащим врачам пациентов с SOPH-синдромом рекомендуется учитывать данные риски иммунологического статуса и вести соответствующую терапию подобных состояний. Функциональный анализ мутационного воздействия на иммунокомпетентные клетки необходим для понимания патофизиологии патологии гена *NBAS*.

Создана ПЦР тест-система для диагностики варианта SOPH-синдром

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. Был получен патент на изобретение.

Вариант SOPH вызывает нарушение стабильности белка, но не компрометирует образование комплекса NRZ

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 ассоциирован с 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

Изучены патогенетические основы *NBAS*-ассоциированных заболеваний в контексте синдрома *SOPH* на уровне клинического полиморфизма *SOPH*, нарушения стабильности белка при различных патогенных вариантах, а также субдоменной архитектуры *NBAS* и принадлежности к ним сайтов связывания. *NBAS* задействован в нескольких внутриклеточных функциях, реализуемых связыванием *NBAS* с его белками-партнерами, нарушение взаимодействия с которыми может приводить к развитию тех или иных фенотипических признаков при *NBAS*-ассоциированных заболеваниях. Основные результаты представлены ниже:

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 генетических карт не выявил у этих пациентов в анамнезе признаков острой печёночной недостаточности (ОПН), характерной для *ILFS2* (Infantile Liver Failure Syndrome 2).

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 (*SOPH*) 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. Таким образом, выявленная субдоменная принадлежность патогенных вариантов и их фенотипов проливает свет на патогенетические основы различных клинических форм и подчёркивает значимость белок-вариант-фенотипического подхода при анализе мультисистемных *NBAS*-ассоциированных заболеваний.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Разработана тест-система для диагностики носительства патогенного варианта с.5741G>A в гене *NBAS*, ассоциированного с развитием SOPH-синдрома. Тест-система позволяет проводить высокоспецифичное выявление данного варианта с.5741A у пациентов и их родственников с целью генетического консультирования, скрининга и уточнения диагноза.

Ее внедрение способствует раннему выявлению носительства, что особенно важно при планировании семьи, а также для своевременного клинического наблюдения за носителями и их родственниками.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AF – AlphaFold

ALF – acute liver failure – острая печеночная недостаточность

BAFF – B cell Activating Factor belonging to the TNF Family

BNIP1 – B-cell lymphoma 2/AdeNovirus E1B Interacting Protein 1

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

COPI (II) – COat Protein I (II) – белок коатомер

DECID – DECay-InDucing complex – комплекс индуцирующий распад мРНК

Dsl1 – Dependence on SLY1-20

EJC – Exon Junction Complex – комплекс контакта экзонов

eRF1 – ekaryotic Release Factor 1 – фактор терминации трансляции 1

ERGIC – ER-Golgi Intermediate Compartment – промежуточный компартмент между аппаратом Гольджи и эндоплазматическим ретикулумом

GEF – guanine nucleotide exchange factor – фактор обмена гуанидина

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

MTC – Multisubunit Tethering Complex

MYCN – N-муc протоонкоген, член семейства транскрипционных факторов Мус (с-мус, l-мус, n-мус)

NAG – Neu**roblastoma-Amplified Gene**

NBAS – Neu**roblastoma-Amplified Sequence**

NF – nuclease free – вода, очищенная от нуклеаз

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

NRZ complex – комплекс NBAS-RINT1-ZW10

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man – база данных Менделевского наследования у человека

PI3K – PhosphatidyInositol 3-Kinase – фосфатидилинозитол-3-киназа

PTC – Premature Termination Codon – преждевременный стоп-кодон

RAB – RAt sarcoma virus analog in Brain

RALF – Recurrent Acute Liver Failure – рецидивирующая острая печёночная недостаточность

RINT1 – RAD50-INTeracting protein 1

ROD – ROugh Deal gene

SEC39 – general SECretory pathway protein 39 (domain) – белок конвенционального секреторного пути 39 (домен)

SRP – signal recognition particle – сигнал-узнающая частица

SMG – Suppressor with Morphological effect on Genitalia

SMGL-1 – SMG Lethal 1

SNARE – Soluble N-ethylmaleimide-Sensitive Factor Attachment Receptor – рецептор, осуществляющий слияние внутриклеточных транспортных везикул

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

SURF complex – комплекс SMG1-Upf1-eRF1-eRF3

TANGO1 – Transport And Golgi Organization protein 1

TIP1 – SEC Twenty Interacting Protein 1

UPF1 – UP-Frameshift 1

UPS – Unconventional Protein Secretion – неконвенциональный путь секреции белка

USE1 – Unconventional SNARE in the ER 1

UTR – UnTranslated Region – некодирующий участок мРНК на 3' конце

WD40 – белковый мотив из 40 аминокислот, часто оканчивающийся дипептидом триптофан-аспарагиновая кислота (W-D).

YVTN motif – Tyr-Val-Thr-Asn повторы

ZW10 – Zeste-White 10

аГ – аппарат Гольджи

АФ – AlphaFold

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

ИМТ – индекс массы тела

ИРИ – иммунорегуляторный индекс

МРТ – магнитно-резонансная томография

МПС – массовое параллельное секвенирование

ОПН – острая печёночная недостаточность

ЭКГ – электрокардиография

ЭР – эндоплазматический ретикулум

ЭхоКГ – эхокардиография

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барашков Н. А., Джемилева Л. У., Федорова С. А., Терютин Ф. М., Федотова Э. Е., Гуринова Е. Е., Алексеева С. П., Кононова С. К., Ноговицына А. Н., Хуснутдинова Э. К. Мутация сайта сплайсинга q.-3179 (IVS1+ 1G> A) гена GJB2-основная причина наследственной несиндромальной аутосомно-рецессивной глухоты у якутов // Медицинская генетика. 2010. Т. 9. № 7. С. 22–32.
2. Бережный А., Меерсон Е., Юкина Г., Раззоков А. Остеохондродисплазия у детей // Душанбе: Ирфон. 1991. С. 192.
3. Галеева Н. М., Назаренко Л. П., Назаренко С. А. Молекулярно-генетическая причина наследственной метгемоглобинемии первого типа в Якутии // Медицинская генетика. 2006. Т. 5. № 9. С. 15–21.
4. Голикова П. И., Петухова Д. А., Сухомясова А. Л., Николаева Т. Я., Гуринова Е. Е., Иванова Р. Н., Максимова Н. Р. Клинико-генетическое описание нейронального цереоидного липофусциноза 6 типа в якутской семье // Журнал Неврологии И Психиатрии Им. С.с. Корсакова. 2021. Т. 121. № 8. С. 71-76.
5. Иванова О. Н., Гуринова Е. Е., Сухомясова А. Л. Наследственная тирозинемия i типа // Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. № 4 (54). С. 107–108.
6. Кудрявцев И. В., Субботовская А. И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17. № 1. С. 19–26.
7. Куцев С.И. «О деятельности медико-генетических консультаций и центров в субъектах Российской Федерации» // АНАЛИТИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК. 2020. Т. 14. № 757. С. 1–59.
8. Максимова Н. Р., Ноговицына А. Н., Куртанов Х. А., Алексеева Е. И. Популяционная частота и возраст мутации G5741 → A в гене NBAS , являющейся причиной SOPH-синдрома в республике Саха (Якутия) // Генетика. 2016. Т. 52. № 10. С. 1194–1201.
9. Назаренко Л. П., Ноговицына А. Н., Салюкова О. А., Филимонова М. Н. Распространенность моногенных наследственных болезней среди сельского населения Республики Саха (Якутия) // Медико-генетическое исследование населения Республики Саха (Якутия). , 2002. С. 92–114.
10. Платонов Ф. А. Клинико-генетическая характеристика наследственной мозжечковой атаксии первого типа в Якутии // 1996.
11. Тенилин, Н. А. Ортопедо-хирургическая реабилитация детей с редкими врожденными аномалиями нижних конечностей // 2009.

12. Abramson J., Adler J., Dunger J., Evans R., Green T., Pritzel A., Ronneberger O., Willmore L., Ballard A. J., Bambrick J., Bodenstein S. W., Evans D. A., Hung C.-C., O'Neill M., Reiman D., Tunyasuvunakool K., Wu Z., Žemgulytė A., Arvaniti E., Beattie C., Bertolli O., Bridgland A., Cherepanov A., Congreve M., Cowen-Rivers A. I., Cowie A., Figurnov M., Fuchs F. B., Gladman H., Jain R., Khan Y. A., Low C. M. R., Perlin K., Potapenko A., Savy P., Singh S., Stecula A., Thillaisundaram A., Tong C., Yakneen S., Zhong E. D., Zielinski M., Židek A., Bapst V., Kohli P., Jaderberg M., Hassabis D., Jumper J. M. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 // *Nature*. 2024. C. 1–3.
13. Anastasaki C., Longman D., Capper A., Patton E. E., Cáceres J. F. Dhx34 and Nbas function in the NMD pathway and are required for embryonic development in zebrafish // *Nucleic Acids Research*. 2011. T. 39. № 9. C. 3686–3694.
14. Aoki T., Ichimura S., Itoh A., Kuramoto M., Shinkawa T., Isobe T., Tagaya M. Identification of the Neuroblastoma-amplified Gene Product as a Component of the Syntaxin 18 Complex Implicated in Golgi-to-Endoplasmic Reticulum Retrograde Transport // *MBoC*. 2009. T. 20. № 11. C. 2639–2649.
15. Baek M., DiMaio F., Anishchenko I., Dauparas J., Ovchinnikov S., Lee G. R., Wang J., Cong Q., Kinch L. N., Schaeffer R. D., Millán C., Park H., Adams C., Glassman C. R., DeGiovanni A., Pereira J. H., Rodrigues A. V., Dijk A. A. van, Ebrecht A. C., Opperman D. J., Sagmeister T., Buhlheller C., Pavkov-Keller T., Rathinaswamy M. K., Dalwadi U., Yip C. K., Burke J. E., Garcia K. C., Grishin N. V., Adams P. D., Read R. J., Baker D. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network // *Science*. 2021. T. 373. № 6557. C. 871–876.
16. Balasubramanian M., Hurst J., Brown S., Bishop N. J., Arundel P., DeVile C., Pollitt R. C., Crooks L., Longman D., Cáceres J. F., Shackley F., Connolly S., Payne J. H., Offiah A. C., Hughes D., Parker M. J., Hide W., Skerry T. M. Compound heterozygous variants in NBAS as a cause of atypical osteogenesis imperfecta // *Bone*. 2017. T. 94. C. 65–74.
17. Barbarin-Bocahu I., Graille M. The X-ray crystallography phase problem solved thanks to AlphaFold and RoseTTAFold models: a case-study report // *Acta Cryst D*. 2022. T. 78. № 4. C. 517–531.
18. Bersuker K., Peterson C. W. H., To M., Sahl S. J., Savikhin V., Grossman E. A., Nomura D. K., Olzmann J. A. A Proximity Labeling Strategy Provides Insights into the Composition and Dynamics of Lipid Droplet Proteomes // *Developmental Cell*. 2018. T. 44. № 1. C. 97–112.e7.
19. Bi X., Zhang Q., Chen L., Liu D., Li Y., Zhao X., Zhang Y., Zhang L., Liu J., Wu C., Li Z., Zhao Y., Ma H., Huang G., Liu X., Wang Q., Zhang R. NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic

- lymphohistiocytosis // *Journal of Hematology & Oncology*. 2022. T. 15. № 1. C. 101.
20. Brandes N., Goldman G., Wang C. H., Ye C. J., Ntranos V. Genome-wide prediction of disease variant effects with a deep protein language model // *Nat Genet*. 2023. T. 55. № 9. C. 1512–1522.
21. Brunet S., Sacher M. Are All Multisubunit Tethering Complexes Bona Fide Tethers? // *Traffic*. 2014. T. 15. № 11. C. 1282–1287.
22. Buchan J. R. mRNP granules // *RNA Biol*. 2014. T. 11. № 8. C. 1019–1030.
23. Buß O., Rudat J., Ochsenreither K. FoldX as Protein Engineering Tool: Better Than Random Based Approaches? // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2018. T. 16. C. 25–33.
24. Calvo P. L., Tandoi F., Haak T. B., Brunati A., Pinon M., Olio D. D., Romagnoli R., Spada M. NBAS mutations cause acute liver failure: when acetaminophen is not a culprit // *Ital J Pediatr*. 2017. T. 43. № 1. C. 88.
25. Carli D., Giorgio E., Pantaleoni F., Bruselles A., Barresi S., Riberi E., Licciardi F., Gazzin A., Baldassarre G., Pizzi S., Niceta M., Radio F. C., Molinatto C., Montin D., Calvo P. L., Ciolfi A., Fleischer N., Ferrero G. B., Brusco A., Tartaglia M. NBAS pathogenic variants: Defining the associated clinical and facial phenotype and genotype–phenotype correlations // *Human Mutation*. 2019. T. 40. № 6. C. 721–728.
26. Chavany J., Cano A., Roquelaure B., Bourgeois P., Boubnova J., Gaignard P., Hoebeke C., Reynaud R., Rhomer B., Slama A., Badens C., Chabrol B., Fabre A. Mutations in NBAS and SCYL1, genetic causes of recurrent liver failure in children: Three case reports and a literature review // *Archives de Pédiatrie*. 2020. T. 27. № 3. C. 155–159.
27. Chen J., Zia A., Luo A., Meng H., Wang F., Hou J., Cao R., Si D. Enhancing cryo-EM structure prediction with DeepTracer and AlphaFold2 integration // *Briefings in Bioinformatics*. 2024. T. 25. № 3. C. bbae118.
28. Cheng J., Novati G., Pan J., Bycroft C., Žemgulytė A., Applebaum T., Pritzel A., Wong L. H., Zielinski M., Sargeant T., Schneider R. G., Senior A. W., Jumper J., Hassabis D., Kohli P., Avsec Ž. Accurate proteome-wide missense variant effect prediction with AlphaMissense // *Science*. 2023. T. 381. № 6664. C. eadg7492.
29. Cheng Y., Xia Z., Huang C., Xu H. Case report: A novel cause of acute liver failure in children: A combination of human herpesvirus-6 infection and homozygous mutation in NBAS gene // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2022. T. 36. № 5. C. e24343.
30. Cho H., Abshire E. T., Popp M. W., Pröschel C., Schwartz J. L., Yeo G. W., Maquat L. E. AKT constitutes a signal-promoted alternative exon-junction complex that

regulates nonsense-mediated mRNA decay // *Molecular Cell*. 2022. T. 82. № 15. C. 2779–2796.e10.

31. Chou H.-T., Dukovski D., Chambers M. G., Reinisch K. M., Walz T. CATCHR, HOPS and CORVET tethering complexes share a similar architecture // *Nat Struct Mol Biol*. 2016. T. 23. № 8. C. 761–763.

32. Çivril F., Wehenkel A., Giorgi F. M., Santaguida S., Di Fonzo A., Grigorean G., Ciccarelli F. D., Musacchio A. Structural Analysis of the RZZ Complex Reveals Common Ancestry with Multisubunit Vesicle Tethering Machinery // *Structure*. 2010. T. 18. № 5. C. 616–626.

33. Cohen J. L., Duyzend M., Adelson S. M., Yeo J., Fleming M., Ganetzky R., Hale R., Mitchell D. M., Morton S. U., Reimers R., Roberts A., Strong A., Tan W., Thiagarajah J. R., Walker M. A., Green R. C., Gold N. B. Advancing precision care in pregnancy through a treatable fetal findings list // *The American Journal of Human Genetics*. 2025. T. 112. № 6. C. 1251–1269.

34. Cotrina-Vinagre F. J., Rodríguez-García M. E., Martín-Hernández E., Durán-Aparicio C., Merino-López A., Medina-Benítez E., Martínez-Azorín F. Characterization of a complex phenotype (fever-dependent recurrent acute liver failure and osteogenesis imperfecta) due to NBAS and P4HB variants // *Molecular Genetics and Metabolism*. 2021. T. 133. № 2. C. 201–210.

35. Dai X., Wu L., Yoo S., Liu Q. Integrating AlphaFold and deep learning for atomistic interpretation of cryo-EM maps // *Briefings in Bioinformatics*. 2023. T. 24. № 6. C. bbad405.

36. De Preter K., Speleman F., Combaret V., Lunec J., Laureys G., Eussen B. H. J., Francotte N., Board J., Pearson A. D. J., De Paepe A., Van Roy N., Vandesompele J. Quantification of MYCN, DDX1, and NAG Gene Copy Number in Neuroblastoma Using a Real-Time Quantitative PCR Assay // *Mod Pathol*. 2002. T. 15. № 2. C. 159–166.

37. Diefenbacher M., Thorsteinsdottir H., Spang A. The Dsl1 Tethering Complex Actively Participates in Soluble NSF (N-Ethylmaleimide-sensitive Factor) Attachment Protein Receptor (SNARE) Complex Assembly at the Endoplasmic Reticulum in *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. T. 286. № 28. C. 25027–25038.

38. Evans R., O'Neill M., Pritzel A., Antropova N., Senior A., Green T., Žídek A., Bates R., Blackwell S., Yim J., Ronneberger O., Bodenstein S., Zielinski M., Bridgland A., Potapenko A., Cowie A., Tunyasuvunakool K., Jain R., Clancy E., Kohli P., Jumper J., Hassabis D. Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer // 2022. C. 2021.10.04.463034.

39. Fatscher T., Boehm V., Gehring N. H. Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. T. 72. № 23. C. 4523–4544.
40. Fedorova S. A., Khusnutdinova E. K. Genetic Structure and Genetic History of the Sakha (Yakuts) Population // *Russ J Genet.* 2022. T. 58. № 12. C. 1409–1426.
41. Feldmann A., Bekbulat F., Huesmann H., Ulbrich S., Tatzelt J., Behl C., Kern A. The RAB GTPase RAB18 modulates macroautophagy and proteostasis // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2017. T. 486. № 3. C. 738–743.
42. Fischer-Zirnsak B., Koenig R., Alisch F., Güneş N., Hausser I., Saha N., Beck-Woedl S., Haack T. B., Thiel C., Kamrath C., Tüysüz B., Henning S., Mundlos S., Hoffmann K., Horn D., Kornak U. SOPH syndrome in three affected individuals showing similarities with progeroid cutis laxa conditions in early infancy // *J Hum Genet.* 2019. T. 64. № 7. C. 609–616.
43. Fokkema I. F. A. C., Kroon M., López Hernández J. A., Asscheman D., Lugtenburg I., Hoogenboom J., Dunnen J. T. den. The LOVD3 platform: efficient genome-wide sharing of genetic variants // *Eur J Hum Genet.* 2021. T. 29. № 12. C. 1796–1803.
44. Gao J., Kurre R., Rose J., Walter S., Fröhlich F., Piehler J., Reggiori F., Ungermann C. Function of the SNARE Ykt6 on autophagosomes requires the Dsl1 complex and the Atg1 kinase complex // *EMBO Rep.* 2020. T. 21. № 12. C. e50733.
45. Gao M., Nakajima An D., Parks J. M., Skolnick J. AF2Complex predicts direct physical interactions in multimeric proteins with deep learning // *Nat Commun.* 2022. T. 13. № 1. C. 1744.
46. Geem D., Jiang W., Rytting H. B., Chandrakasan S., Salem A., Stevens J. P., Karpen S. J., Magliocca J. F., Romero R., Rodriguez D. S. Resolution of recurrent pediatric acute liver failure with liver transplantation in a patient with NBAS mutation // *Pediatric Transplantation.* 2021. T. 25. № 7. C. e14084.
47. Granata V., Pagani I., Morengi E., Schiavone M. L., Lezzi A., Ghezzi S., Vicenzi E., Poli G., Sobacchi C. Modulation of NBAS-Related Functions in the Early Response to SARS-CoV-2 Infection // *International Journal of Molecular Sciences.* 2023. T. 24. № 3. C. 2634.
48. Guo H.-B., Perminov A., Bekele S., Kedziora G., Farajollahi S., Varaljay V., Hinkle K., Molinero V., Meister K., Hung C., Dennis P., Kelley-Loughnane N., Berry R. AlphaFold2 models indicate that protein sequence determines both structure and dynamics // *Sci Rep.* 2022. T. 12. № 1. C. 10696.
49. Haack T. B., Staufner C., Köpke M. G., Straub B. K., Kölker S., Thiel C., Freisinger P., Baric I., McKiernan P. J., Dikow N., Harting I., Beisse F., Burgard P., Kotzaeridou

- U., Kühr J., Himbert U., Taylor R. W., Distelmaier F., Vockley J., Ghaloul-Gonzalez L., Zschocke J., Kremer L. S., Graf E., Schwarzmayr T., Bader D. M., Gagneur J., Wieland T., Terrile C., Strom T. M., Meitinger T., Hoffmann G. F., Prokisch H. Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy // *The American Journal of Human Genetics*. 2015. T. 97. № 1. C. 163–169.
50. He T. Y., Zhang N., Xia Y., Luo Y., Li C. R., Yang J. [Short stature, optic nerve atrophy and Pelger-Huët anomaly syndrome with antibody immunodeficiency and aplastic anemia: a case report and literature review] // *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2017. T. 55. № 12. C. 942–946.
51. Hegarty R., Gibson P., Sambrotta M., Strautnieks S., Foskett P., Ellard S., Baptista J., Lillis S., Bansal S., Vara R., Dhawan A., Grammatikopoulos T., Thompson R. J. Study of Acute Liver Failure in Children Using Next Generation Sequencing Technology // *The Journal of Pediatrics*. 2021. T. 236. C. 124–130.
52. Huang Y. J., Zhang N., Bersch B., Fidelis K., Inouye M., Ishida Y., Kryshtafovych A., Kobayashi N., Kuroda Y., Liu G., LiWang A., Swapna G. v. t, Wu N., Yamazaki T., Montelione G. T. Assessment of prediction methods for protein structures determined by NMR in CASP14: Impact of AlphaFold2 // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2021. T. 89. № 12. C. 1959–1976.
53. Hug N., Longman D., Cáceres J. F. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway // *Nucleic Acids Res*. 2016. T. 44. № 4. C. 1483–1495.
54. Isken O., Maquat L. E. The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation // *Nat Rev Genet*. 2008. T. 9. № 9. C. 699–712.
55. Jackson C. L. Lipid droplet biogenesis // *Current Opinion in Cell Biology*. 2019. T. 59. C. 88–96.
56. Ji J., Yang M., Jia J., Wu Q., Cong R., Cui H., Zhu B., Chu X. A novel variant in NBAS identified from an infant with fever-triggered recurrent acute liver failure disrupts the function of the gene // *Hum Genome Var*. 2023. T. 10. № 1. C. 1–7.
57. Jiang B., Xiao F., Li X., Xiao Y., Wang Y., Zhang T. Case Report: Pediatric Recurrent Acute Liver Failure Caused by Neuroblastoma Amplified Sequence (NBAS) Gene Mutations // *Front. Pediatr*. 2021. T. 8. C. 607005.
58. Jing H., Takagi J., Liu J., Lindgren S., Zhang R., Joachimiak A., Wang J., Springer T. A. Archaeal Surface Layer Proteins Contain β Propeller, PKD, and β Helix Domains and Are Related to Metazoan Cell Surface Proteins // *Structure*. 2002. T. 10. № 10. C. 1453–1464.
59. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Žídek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl

S. A. A., Ballard A. J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A. W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // *Nature*. 2021. T. 596. № 7873. C. 583–589.

60. Kaneko S., Ohira M., Nakamura Y., Isogai E., Nakagawara A., Kaneko M. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma // *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007. T. 133. № 3. C. 185–192.

61. Karousis E. D., Mühlemann O. Nonsense-Mediated mRNA Decay Begins Where Translation Ends // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2019. T. 11. № 2. C. a032862.

62. Karousis E. D., Nasif S., Mühlemann O. Nonsense-mediated mRNA decay: novel mechanistic insights and biological impact: Nonsense-mediated mRNA decay // *WIREs RNA*. 2016. T. 7. № 5. C. 661–682.

63. Kashima I., Yamashita A., Izumi N., Kataoka N., Morishita R., Hoshino S., Ohno M., Dreyfuss G., Ohno S. Binding of a novel SMG-1–Upf1–eRF1–eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay // *Genes Dev*. 2006. T. 20. № 3. C. 355–367.

64. Khoreva A., Pomerantseva E., Belova N., Povolotskaya I., Kononov F., Kaimonov V., Gavrina A., Zimin S., Pershin D., Davydova N., Burlakov V., Viktorova E., Roppelt A., Kalinina E., Novichkova G., Shcherbina A. Complex Multisystem Phenotype With Immunodeficiency Associated With NBAS Mutations: Reports of Three Patients and Review of the Literature // *Front. Pediatr*. 2020. T. 8. C. 577.

65. Kim K. W., Myers R. A., Lee J. H., Igartua C., Lee K. E., Kim Y. H., Kim E.-J., Yoon D., Lee J.-S., Hirota T., Tamari M., Takahashi A., Kubo M., Choi J.-M., Kim K.-E., Nicolae D. L., Ober C., Sohn M. H. Genome-wide association study of recalcitrant atopic dermatitis in Korean children // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015. T. 136. № 3. C. 678- 684.e4.

66. Kim Y.-M., Lee Y.-J., Park J. H., Lee H.-D., Cheon C. K., Kim S.-Y., Hwang J.-Y., Jang J.-H., Yoo H.-W. High diagnostic yield of clinically unidentifiable syndromic growth disorders by targeted exome sequencing // *Clinical Genetics*. 2017. T. 92. № 6. C. 594–605.

67. Kishor A., Fritz S. E., Hogg J. R. Nonsense-mediated mRNA decay: The challenge of telling right from wrong in a complex transcriptome // *WIREs RNA*. 2019. T. 10. № 6.

68. Klukowski P., Riek R., Güntert P. Time-optimized protein NMR assignment with an

integrative deep learning approach using AlphaFold and chemical shift prediction // Science Advances. 2023. T. 9. № 47. C. eadi9323.

69. Kondo H., Maksimova N., Otomo T., Kato H., Imai A., Asano Y., Kobayashi K., Nojima S., Nakaya A., Hamada Y., Irahara K., Gurinova E., Sukhomyasova A., Nogovicina A., Savvina M., Yoshimori T., Ozono K., Sakai N. Mutation in VPS33A affects metabolism of glycosaminoglycans: a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms // Human Molecular Genetics. 2017. T. 26. № 1. C. 173–183.

70. Kortüm F., Marquardt I., Alawi M., Korenke G. C., Spranger S., Meinecke P., Kutsche K. Acute Liver Failure Meets SOPH Syndrome: A Case Report on an Intermediate Phenotype // Pediatrics. 2017. T. 139. № 1. C. e20160550.

71. Kraynack B. A., Chan A., Rosenthal E., Essid M., Umansky B., Waters M. G., Schmitt H. D. Dsl1p, Tip20p, and the Novel Dsl3(Sec39) Protein Are Required for the Stability of the Q/t-SNARE Complex at the Endoplasmic Reticulum in Yeast □D // Molecular Biology of the Cell. 2005. T. 16. C. 15.

72. Krishna R., Wang J., Ahern W., Sturmfels P., Venkatesh P., Kalvet I., Lee G. R., Morey-Burrows F. S., Anishchenko I., Humphreys I. R., McHugh R., Vafeados D., Li X., Sutherland G. A., Hitchcock A., Hunter C. N., Kang A., Brackenbrough E., Bera A. K., Baek M., DiMaio F., Baker D. Generalized biomolecular modeling and design with RoseTTAFold All-Atom // Science. 2024.

73. Lacassie Y., Johnson B., Lay-Son G., Quintana R., King A., Cortes F., Alvarez C., Gomez R., Vargas A., Chalew S., King A., Guardia S., Sorensen R. U., Aradhya S. Severe SOPH syndrome due to a novel NBAS mutation in a 27-YEAR-OLD woman—Review of this pleiotropic, autosomal recessive disorder: Mystery solved after two decades // Am J Med Genet. 2020. T. 182. № 7. C. 1767–1775.

74. Lai C.-H., Ko K.-T., Fan P.-J., Yu T.-A., Chang C.-F., Draczkowski P., Hsu S.-T. D. Structural insight into the ZFAND1–p97 interaction involved in stress granule clearance // Journal of Biological Chemistry. 2024. T. 300. № 5. C. 107230.

75. Land H., Humble M. S. YASARA: A Tool to Obtain Structural Guidance in Biocatalytic Investigations // Protein Engineering: Methods and Protocols / под ред. U. T. Bornscheuer, M. Höhne. New York, NY: Springer, 2018. C. 43–67.

76. Legrand D., Herbaut M., Durin Z., Brysbaert G., Bardor M., Lensink M. F., Foulquier F. New insights into the pathogenicity of TMEM165 variants using structural modeling based on AlphaFold 2 predictions // Computational and Structural Biotechnology Journal. 2023. T. 21. C. 3424–3436.

77. Lenz D., Pahl J., Hauck F., Alameer S., Balasubramanian M., Baric I., Boy N., Church J. A., Crushell E., Dick A., Distelmaier F., Gujar J., Indolfi G., Lurz E., Peters

- B., Schwerd T., Serranti D., Kölker S., Klein C., Hoffmann G. F., Prokisch H., Greil J., Cerwenka A., Giese T., Stauffer C. NBAS Variants Are Associated with Quantitative and Qualitative NK and B Cell Deficiency // *J Clin Immunol*. 2021. T. 41. № 8. C. 1781–1793.
78. Li E. H., Spaman L. E., Tejero R., Janet Huang Y., Ramelot T. A., Fraga K. J., Prestegard J. H., Kennedy M. A., Montelione G. T. Blind assessment of monomeric AlphaFold2 protein structure models with experimental NMR data // *Journal of Magnetic Resonance*. 2023. T. 352. C. 107481.
79. Li X., Cheng Q., Li N., Chang G., Ding Y., Li J., Shen Y., Wang J., Wang X. SOPH Syndrome with Growth Hormone Deficiency, Normal Bone Age, and Novel Compound Heterozygous Mutations in *NBAS* // *Fetal and Pediatric Pathology*. 2018. T. 37. № 6. C. 404–410.
80. Li Z. D., Abuduxikuer K., Zhang J., Yang Y., Qiu Y., Huang Y., Xie X., Lu Y., Wang J. NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients // *Hepatol Res*. 2020. T. 50. № 11. C. 1306–1315.
81. Li Z. D., Li Y. C., Shen C. H., Wang J. S., Xie X. B. [Liver transplantation for the treatment of acute liver failure in 3 cases with NBAS gene deficiency and literature review] // *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2023. T. 61. № 1. C. 66–69.
82. Lin Z., Akin H., Rao R., Hie B., Zhu Z., Lu W., Smetanin N., Verkuil R., Kabeli O., Shmueli Y., Santos Costa A. dos, Fazel-Zarandi M., Sercu T., Candido S., Rives A. Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model // *Science*. 2023. T. 379. № 6637. C. 1123–1130.
83. Longman D., Hug N., Keith M., Anastasaki C., Patton E. E., Grimes G., Cáceres J. F. DHX34 and NBAS form part of an autoregulatory NMD circuit that regulates endogenous RNA targets in human cells, zebrafish and *Caenorhabditis elegans* // *Nucleic Acids Research*. 2013. T. 41. № 17. C. 8319–8331.
84. Longman D., Jackson-Jones K. A., Maslon M. M., Murphy L. C., Young R. S., Stoddart J. J., Hug N., Taylor M. S., Papadopoulos D. K., Cáceres J. F. Identification of a localized nonsense-mediated decay pathway at the endoplasmic reticulum // *Genes Dev*. 2020. T. 34. № 15–16. C. 1075–1088.
85. Longman D., Plasterk R. H. A., Johnstone I. L., Cáceres J. F. Mechanistic insights and identification of two novel factors in the *C. elegans* NMD pathway // *Genes Dev*. 2007. T. 21. № 9. C. 1075–1085.
86. Maddhuri Venkata Subramaniya S. R., Terashi G., Kihara D. Protein secondary structure detection in intermediate-resolution cryo-EM maps using deep learning // *Nat Methods*. 2019. T. 16. № 9. C. 911–917.

87. Maksimova N., Hara K., Miyashita A., Nikolaeva I., Shiga A., Nogovicina A., Sukhomyasova A., Argunov V., Shvedova A., Ikeuchi T., Nishizawa M., Kuwano R., Onodera O. Clinical, molecular and histopathological features of short stature syndrome with novel CUL7 mutation in Yakuts: new population isolate in Asia // *J Med Genet*. 2007. T. 44. № 12. C. 772–778.
88. Maksimova N., Hara K., Nikolaeva I., Chun-Feng T., Usui T., Takagi M., Nishihira Y., Miyashita A., Fujiwara H., Oyama T., Nogovicina A., Sukhomyasova A., Potapova S., Kuwano R., Takahashi H., Nishizawa M., Onodera O. Neuroblastoma amplified sequence gene is associated with a novel short stature syndrome characterised by optic nerve atrophy and Pelger-Huet anomaly // *Journal of Medical Genetics*. 2010. T. 47. № 8. C. 538–548.
89. Mallakmir S., Nagral A., Bagde A., Mirza D., Merchant R., Yewale V. Mutation in the Neuroblastoma Amplified Sequence Gene as a Cause of Recurrent Acute Liver Failure, Acute Kidney Injury, and Status Epilepticus // *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2019. T. 9. № 6. C. 753–756.
90. McCoy A. J., Sammito M. D., Read R. J. Implications of AlphaFold2 for crystallographic phasing by molecular replacement // *Acta Cryst D*. 2022. T. 78. № 1. C. 1–13.
91. Meiringer C. T. A., Rethmeier R., Auffarth K., Wilson J., Perz A., Barlowe C., Schmitt H. D., Ungermann C. The Dsl1 Protein Tethering Complex Is a Resident Endoplasmic Reticulum Complex, Which Interacts with Five Soluble NSF (N-Ethylmaleimide-sensitive Factor) Attachment Protein Receptors (SNAREs) // *Journal of Biological Chemistry*. 2011. T. 286. № 28. C. 25039–25046.
92. Millán C., Keegan R. M., Pereira J., Sammito M. D., Simpkin A. J., McCoy A. J., Lupas A. N., Hartmann M. D., Rigden D. J., Read R. J. Assessing the utility of CASP14 models for molecular replacement // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2021. T. 89. № 12. C. 1752–1769.
93. Mitchell P., Tollervey D. An NMD Pathway in Yeast Involving Accelerated Deadenylation and Exosome-Mediated 3'→5' Degradation // *Molecular Cell*. 2003. T. 11. № 5. C. 1405–1413.
94. Nasif S., Contu L., Mühlemann O. Beyond quality control: The role of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in regulating gene expression // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018. T. 75. C. 78–87.
95. Nazmi F., Ozdogan E., Mungan N. O., Arikan C. Liver involvement in neuroblastoma amplified sequence gene deficiency is not limited to acute injury: Fibrosis silently continues // *Liver Int*. 2021. T. 41. № 10. C. 2433–2439.
96. Ono S., Matsuda J., Watanabe E., Akaike H., Teranishi H., Miyata I., Otomo T.,

Sadahira Y., Mizuochi T., Kusano H., Kage M., Ueno H., Yoshida K., Shiraishi Y., Chiba K., Tanaka H., Miyano S., Ogawa S., Hayashi Y., Kanegane H., Ouchi K. Novel neuroblastoma amplified sequence (NBAS) mutations in a Japanese boy with fever-triggered recurrent acute liver failure // *Hum Genome Var.* 2019. T. 6. № 1. C. 2.

97. Pak M. A., Markhieva K. A., Novikova M. S., Petrov D. S., Vorobyev I. S., Maksimova E. S., Kondrashov F. A., Ivankov D. N. Using AlphaFold to predict the impact of single mutations on protein stability and function // *PLOS ONE.* 2023. T. 18. № 3. C. e0282689.

98. Palagano E., Zuccarini G., Prontera P., Borgatti R., Stangoni G., Elisei S., Mantero S., Menale C., Forlino A., Uva P., Oppo M., Vezzoni P., Villa A., Merlo G. R., Sobacchi C. Mutations in the Neuroblastoma Amplified Sequence gene in a family affected by Acrofrontofacionasal Dysostosis type 1 // *Bone.* 2018. T. 114. C. 125–136.

99. Paysan-Lafosse T., Blum M., Chuguransky S., Grego T., Pinto B. L., Salazar G. A., Bileschi M. L., Bork P., Bridge A., Colwell L., Gough J., Haft D. H., Letunić I., Marchler-Bauer A., Mi H., Natale D. A., Orengo C. A., Pandurangan A. P., Rivoire C., Sigrist C. J. A., Sillitoe I., Thanki N., Thomas P. D., Tosatto S. C. E., Wu C. H., Bateman A. InterPro in 2022 // *Nucleic Acids Research.* 2023. T. 51. № D1. C. D418–D427.

100. Perry R. J., Mast F. D., Rachubinski R. A. Endoplasmic Reticulum-Associated Secretory Proteins Sec20p, Sec39p, and Dsl1p Are Involved in Peroxisome Biogenesis // *Eukaryot Cell.* 2009. T. 8. № 6. C. 830–843.

101. Petukhova D. A., Gurinova E. E., Sukhomyasova A. L., Maksimova N. R. Identification of a Novel Compound Heterozygous Variant in NBAS Causing Bone Fragility by the Type of Osteogenesis Imperfecta // *Bioinformatics Research and Applications Lecture Notes in Computer Science.* / под ред. Z. Cai, I. Mandoiu, G. Narasimhan, P. Skums, X. Guo. Cham: Springer International Publishing, 2020. C. 38–43.

102. Raote I., Ortega-Bellido M., Santos A. J., Foresti O., Zhang C., Garcia-Parajo M. F., Campelo F., Malhotra V. TANGO1 builds a machine for collagen export by recruiting and spatially organizing COPII, tethers and membranes // *eLife.* 2018. T. 7. C. e32723.

103. Ren Y., Yip C. K., Tripathi A., Huie D., Jeffrey P. D., Walz T., Hughson F. M. A Structure-Based Mechanism for Vesicle Capture by the Multisubunit Tethering Complex Dsl1 // *Cell.* 2009. T. 139. № 6. C. 1119–1129.

104. Ricci S., Lodi L., Serranti D., Moroni M., Belli G., Mancano G., La Barbera A., Forzano G., Mangone G., Indolfi G., Azzari C. Immunological Features of Neuroblastoma Amplified Sequence Deficiency: Report of the First Case Identified Through Newborn Screening for Primary Immunodeficiency and Review of the

Literature // Front. Immunol. 2019. T. 10. C. 1955.

105. Ritelli M., Palagano E., Cinquina V., Beccagutti F., Chiarelli N., Strina D., Hall I. F., Villa A., Sobacchi C., Colombi M. Genome-first approach for the characterization of a complex phenotype with combined NBAS and CUL4B deficiency // Bone. 2020. T. 140. C. 115571.
106. Rogers J. V., McMahon C., Baryshnikova A., Hughson F. M., Rose M. D. ER-associated retrograde SNAREs and the Dsl1 complex mediate an alternative, Sey1p-independent homotypic ER fusion pathway // MBoC. 2014. T. 25. № 21. C. 3401–3412.
107. Rossi Sebastiano M., Ermondi G., Hadano S., Caron G. AI-based protein structure databases have the potential to accelerate rare diseases research: AlphaFoldDB and the case of IAHSF/Alsin // Drug Discovery Today. 2022. T. 27. № 6. C. 1652–1660.
108. Roy Chowdhury S., Bhattacharjee C., Casler J. C., Jain B. K., Glick B. S., Bhattacharyya D. ER arrival sites associate with ER exit sites to create bidirectional transport portals // Journal of Cell Biology. 2020. T. 219. № 4. C. e201902114.
109. Rudkowska I., Pérusse L., Bellis C., Blangero J., Després J.-P., Bouchard C., Vohl M.-C. Interaction between Common Genetic Variants and Total Fat Intake on Low-Density Lipoprotein Peak Particle Diameter: A Genome-Wide Association Study // J Nutrigenet Nutrigenomics. 2015. T. 8. № 1. C. 44–53.
110. Santana-Molina C., Gutierrez F., Devos D. P. Homology and Modular Evolution of CATCHR at the Origin of the Eukaryotic Endomembrane System // Genome Biology and Evolution. 2021. T. 13. № 7. C. evab125.
111. Schmidt A., Röner S., Mai K., Klinkhammer H., Kircher M., Ludwig K. U. Predicting the pathogenicity of missense variants using features derived from AlphaFold2 // 2022. C. 2022.03.05.483091.
112. Schmitt H. D. Dsl1p/Zw10: common mechanisms behind tethering vesicles and microtubules // Trends in Cell Biology. 2010. T. 20. № 5. C. 257–268.
113. Schweingruber C., Rufener S. C., Zünd D., Yamashita A., Mühlemann O. Nonsense-mediated mRNA decay — Mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms. 2013. T. 1829. № 6–7. C. 612–623.
114. Scott D. K., Board J. R., Lu X., Pearson A. D. J., Kenyon R. M., Lunec J. The neuroblastoma amplified gene, NAG : genomic structure and characterisation of the 7.3 kb transcript predominantly expressed in neuroblastoma // Gene. 2003. T. 307. C. 1–11.
115. Sedinkin S. L., Burns D., Shukla D., Potoyan D. A., Venditti V. Solution Structure Ensembles of the Open and Closed Forms of the ~130 kDa Enzyme I via AlphaFold

Modeling, Coarse Grained Simulations, and NMR // *J. Am. Chem. Soc.* 2023. T. 145. № 24. C. 13347–13356.

116. Segarra N. G., Ballhausen D., Crawford H., Perreau M., Campos-Xavier B., Spaendonck-Zwarts K. van, Vermeer C., Russo M., Zambelli P.-Y., Stevenson B., Royer-Bertrand B., Rivolta C., Candotti F., Unger S., Munier F. L., Superti-Furga A., Bonafé L. NBAS mutations cause a multisystem disorder involving bone, connective tissue, liver, immune system, and retina // *Am. J. Med. Genet.* 2015. T. 167. № 12. C. 2902–2912.

117. Spang A. The DSL1 Complex: The Smallest but Not the Least CATCHR: DSL Complex News // *Traffic.* 2012. T. 13. № 7. C. 908–913.

118. Staufner C., Haack T. B., Köpke M. G., Straub B. K., Kölker S., Thiel C., Freisinger P., Baric I., McKiernan P. J., Dikow N., Harting I., Beisse F., Burgard P., Kotzaeridou U., Lenz D., Kühn J., Himbert U., Taylor R. W., Distelmaier F., Vockley J., Ghaloul-Gonzalez L., Ozolek J. A., Zschocke J., Kuster A., Dick A., Das A. M., Wieland T., Terrile C., Strom T. M., Meitinger T., Prokisch H., Hoffmann G. F. Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts // *J Inherit Metab Dis.* 2016. T. 39. № 1. C. 3–16.

119. Staufner C., Peters B., Wagner M., Alameer S., Barić I., Broué P., Bulut D., Church J. A., Crushell E., Dalgıç B., Das A. M., Dick A., Dikow N., Dionisi-Vici C., Distelmaier F., Bozbulut N. E., Feillet F., Gonzales E., Hadzic N., Hauck F., Hegarty R., Hempel M., Herget T., Klein C., Konstantopoulou V., Kopajtich R., Kuster A., Laass M. W., Lainka E., Larson-Nath C., Leibner A., Lurz E., Mayr J. A., McKiernan P., Mention K., Moog U., Mungan N. O., Riedhammer K. M., Santer R., Palafoll I. V., Vockley J., Westphal D. S., Wiedemann A., Wortmann S. B., Diwan G. D., Russell R. B., Prokisch H., Garbade S. F., Kölker S., Hoffmann G. F., Lenz D. Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients // *Genet Med.* 2020. T. 22. № 3. C. 610–621.

120. Suleman M., Luqman M., Wei D.-Q., Ali S., Ali S. S., Khan A., Khan H., Ali Z., Khan W., Rizwan M., Ullah N. Structural insights into the effect of mutations in the spike protein of SARS-CoV-2 on the binding with human furin protein // *Heliyon.* 2023. T. 9. № 4. C. e15083.

121. Sun L., Mailliot J., Schaffitzel C. Nonsense-Mediated mRNA Decay Factor Functions in Human Health and Disease // *Biomedicines.* 2023. T. 11. № 3. C. 722.

122. Sunwoo Y., Kim Y.-M., Kim E. N., Oh S.-H., Lee B. H. Severe form of neuroblastoma amplified sequence deficiency in an infant with recurrent acute liver failure // *Pediatrics International.* 2018. T. 60. № 3. C. 302–304.

123. Suzuki S., Kokumai T., Furuya A., Nagamori T., Matsuo K., Ueda O., Mukai T., Ito Y., Yano K., Fujieda K., Okuno A., Tanahashi Y., Azuma H. A 34-year-old

Japanese patient exhibiting NBAS deficiency with a novel mutation and extended phenotypic variation // *European Journal of Medical Genetics*. 2020. T. 63. № 11. C. 104039.

124. Szklarczyk D., Gable A. L., Nastou K. C., Lyon D., Kirsch R., Pyysalo S., Doncheva N. T., Legeay M., Fang T., Bork P., Jensen L. J., von Mering C. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets // *Nucleic Acids Research*. 2021. T. 49. № D1. C. D605–D612.

125. Tagaya M., Arasaki K., Inoue H., Kimura H. Moonlighting functions of the NRZ (mammalian Dsl1) complex // *Front. Cell Dev. Biol.* 2014. T. 2. C. 25.

126. Thul P. J., Lindskog C. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome // *Protein Science*. 2018. T. 27. № 1. C. 233–244.

127. Travis S. M., DAmico K., Yu I.-M., McMahon C., Hamid S., Ramirez-Arellano G., Jeffrey P. D., Hughson F. M. Structural basis for the binding of SNAREs to the multisubunit tethering complex Dsl1 // *Journal of Biological Chemistry*. 2020. T. 295. № 30. C. 10125–10135.

128. Unger S., Ferreira C. R., Mortier G. R., Ali H., Bertola D. R., Calder A., Cohn D. H., Cormier-Daire V., Girisha K. M., Hall C., Krakow D., Makitie O., Mundlos S., Nishimura G., Robertson S. P., Savarirayan R., Sillence D., Simon M., Sutton V. R., Warman M. L., Superti-Furga A. Nosology of genetic skeletal disorders: 2023 revision // *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2023. T. 191. № 5. C. 1164–1209.

129. Varadi M., Anyango S., Deshpande M., Nair S., Natassia C., Yordanova G., Yuan D., Stroe O., Wood G., Laydon A., Židek A., Green T., Tunyasuvunakool K., Petersen S., Jumper J., Clancy E., Green R., Vora A., Lutfi M., Figurnov M., Cowie A., Hobbs N., Kohli P., Kleywegt G., Birney E., Hassabis D., Velankar S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models // *Nucleic Acids Research*. 2022. T. 50. № D1. C. D439–D444.

130. Varadi M., Bertoni D., Magana P., Paramval U., Pidruchna I., Radhakrishnan M., Tsenkov M., Nair S., Mirdita M., Yeo J., Kovalevskiy O., Tunyasuvunakool K., Laydon A., Židek A., Tomlinson H., Hariharan D., Abrahamson J., Green T., Jumper J., Birney E., Steinegger M., Hassabis D., Velankar S. AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences // *Nucleic Acids Res.* 2024. T. 52. № D1. C. D368–D375.

131. Wang T., Li L., Hong W. SNARE proteins in membrane trafficking: WANG et al. // *Traffic*. 2017. T. 18. № 12. C. 767–775.

132. Wang X., Li X., Wang J., Wang J., Hu C., Zeng J., Shi A., Lin L. SMGL-1/NBAS

acts as a RAB-8 GEF to regulate unconventional protein secretion // *Journal of Cell Biology*. 2022. T. 221. № 7. C. e202111125.

133. Wimmer K., Zhu X. X., Lamb B. J., Kuick R., Ambros P. F., Kovar H., Thoraval D., Motyka S., Alberts J. R., Hanash S. M. Co-amplification of a novel gene, NAG, with the N-myc gene in neuroblastoma // *Oncogene*. 1999. T. 18. № 1. C. 233–238.

134. Witkos T. M., Chan W. L., Joensuu M., Rhiel M., Pallister E., Thomas-Oates J., Mould A. P., Mironov A. A., Biot C., Guerardel Y., Morelle W., Ungar D., Wieland F. T., Jokitalo E., Tassabehji M., Kornak U., Lowe M. GORAB scaffolds COPI at the trans-Golgi for efficient enzyme recycling and correct protein glycosylation // *Nat Commun*. 2019. T. 10. № 1. C. 127.

135. Wynne-Davies R., Gormley J. The prevalence of skeletal dysplasias. An estimate of their minimum frequency and the number of patients requiring orthopaedic care // *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*. 1985. T. 67-B. № 1. C. 133–137.

136. Xu D., Li Y., Wu L., Li Y., Zhao D., Yu J., Huang T., Ferguson C., Parton R. G., Yang H., Li P. Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions // *Journal of Cell Biology*. 2018. T. 217. № 3. C. 975–995.

137. Xue L. C., Rodrigues J. P., Kastiris P. L., Bonvin A. M., Vangone A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes // *Bioinformatics*. 2016. T. 32. № 23. C. 3676–3678.

138. Zhang Y., Yang J. Securing SNAREs for assembly // *Journal of Biological Chemistry*. 2020. T. 295. № 30. C. 10136–10137.

139. Zhao L., Imperiale M. J. Identification of Rab18 as an Essential Host Factor for BK Polyomavirus Infection Using a Whole-Genome RNA Interference Screen // *mSphere*. 2017. T. 2. № 4. C. 10.

140. Zhernakova D. V., Brukhin V., Malov S., Oleksyk T. K., Koepfli K. P., Zhuk A., Dobrynin P., Kliver S., Cherkasov N., Tamazian G., Rotkevich M., Krashenninnikova K., Evsyukov I., Sidorov S., Gorbunova A., Chernyaeva E., Shevchenko A., Kolchanova S., Komissarov A., Simonov S., Antonik A., Logachev A., Polev D. E., Pavlova O. A., Glotov A. S., Ulantsev V., Noskova E., Davydova T. K., Sivtseva T. M., Limborska S., Balanovsky O., Osakovsky V., Novozhilov A., Puzyrev V., O'Brien S. J. Genome-wide sequence analyses of ethnic populations across Russia // *Genomics*. 2020. T. 112. № 1. C. 442–458.

141. Zhong E. D., Bepler T., Berger B., Davis J. H. CryoDRGN: reconstruction of heterogeneous cryo-EM structures using neural networks // *Nat Methods*. 2021. T. 18. № 2. C. 176–185.

142. Zhu L., Li L., Qi Y., Yu Z., Xu Y. Cryo-EM structure of SMG1–SMG8–SMG9 complex // Cell Res. 2019. T. 29. № 12. C. 1027–1034.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 – ИЗВЕСТНЫЕ ПАТОГЕННЫЕ ВАРИАНТЫ В ГЕНЕ NBAS

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2015	Neuroblastoma Amplified Sequence (NBAS) mutation in recurrent acute liver failure: Confirmatory report in a sibship with very early onset, osteoporosis and developmental delay	Whole-genome SNP genotyping, followed by exome sequencing	c.409C>T (p.Arg137Trp)	Ливан (Канада)
2015	Neuroblastoma Amplified Sequence (NBAS) mutation in recurrent acute liver failure: Confirmatory report in a sibship with very early onset, osteoporosis and developmental delay	Whole-genome SNP genotyping, followed by exome sequencing	c.409C>T (p.Arg137Trp)	Ливан (Канада)
2015	Neuroblastoma Amplified Sequence (NBAS) mutation in recurrent acute liver failure: Confirmatory report in a sibship with very early onset, osteoporosis and developmental delay	Whole-genome SNP genotyping, followed by exome sequencing	c.409C>T (p.Arg137Trp)	Ливан (Канада)
2015	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy	Exome sequencing, Sanger sequencing, Immunoblot	c.[558_560del];[686dup], p.[Ile187del];[Ser230Glnfs*4]	Польша (Германия)
2015	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy	Exome sequencing, Sanger sequencing, Immunoblot	c.[2708T>G];[2708T>G], p.[Leu903Arg];[Leu903Arg]	Германия
2015	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy	Exome sequencing, Sanger sequencing, Immunoblot	c.[603_605del];[3164T>C], p.[Leu202del];[Leu1055Pro]	Германия
2015	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy	Exome sequencing, Sanger sequencing, Immunoblot	c.[2708T>G];[2827G>T], p.[Leu903Arg];[Glu943*]	Германия
2015	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy	Exome sequencing, Sanger sequencing, Immunoblot	c.[3010C>T];[3164T>C], p.[Arg1004*];[Leu1055Pro];	Германия
2015	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy	Exome sequencing, Sanger sequencing, Immunoblot	c.1533_1545del];[2951T>G], p.[Ile512Thrfs*4];[Ile984Ser]	Великобритания (Германия)
2015	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy	Exome sequencing, Sanger sequencing, Immunoblot	c.[1042C>T];[2203-3C>G], p.[Pro348Ser];[?]	Хорватия (Германия)
2015	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy	Exome sequencing, Sanger sequencing, Immunoblot	c.[1042C>T];[2203-3C>G], p.[Pro348Ser];[?]	Хорватия (Германия)
2015	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy	Exome sequencing, Sanger sequencing, Immunoblot	c.[1187G>A];[2330C>A], p.[Trp396*];[Pro777His]	Германия/Турция (Германия)
2015	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy	Exome sequencing, Sanger sequencing, Immunoblot	c.[1182A>G];[2524G>T], p.[?];[Val842Phe]	США (Германия)
2015	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy	Exome sequencing, Sanger sequencing, Immunoblot	c.[686dup];[3164T>C], p.[Ser230Glnfs*4]; [Leu1055Pro]	США (Германия)

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2015	Genome-wide association study of recalcitrant atopic dermatitis in Korean children	DNA was genotyped; sets of common SNPs were in the GWAS	c.4180-10258C>T	Корея
2015	Genome-wide association study of recalcitrant atopic dermatitis in Korean children	DNA was genotyped; sets of common SNPs were in the GWAS	c.4180-10477G>A	Корея
2015	Genome-wide association study of recalcitrant atopic dermatitis in Korean children	DNA was genotyped; sets of common SNPs were in the GWAS	c.4179+10364G>A	Корея
2015	Genome-wide association study of recalcitrant atopic dermatitis in Korean children	DNA was genotyped; sets of common SNPs were in the GWAS	c.4179+9505T>C	Корея
2015	Genome-wide association study of recalcitrant atopic dermatitis in Korean children	DNA was genotyped; sets of common SNPs were in the GWAS	c.4179+9364C>G	Корея
2015	Genome-wide association study of recalcitrant atopic dermatitis in Korean children	DNA was genotyped; sets of common SNPs were in the GWAS	c.4179+6765A>T	Корея
2015	Genome-wide association study of recalcitrant atopic dermatitis in Korean children	DNA was genotyped; sets of common SNPs were in the GWAS	позиция 15486515	Корея
2015	Interaction between Common Genetic Variants and Total Fat Intake on Low-Density Lipoprotein Peak Particle Diameter: A Genome-Wide Association Study	SNPs from GWAS using Illumina Human610-Quad BeadChip	c.3703+2009A>G	Канада
2015	Interaction between Common Genetic Variants and Total Fat Intake on Low-Density Lipoprotein Peak Particle Diameter: A Genome-Wide Association Study	SNPs from GWAS using Illumina Human610-Quad BeadChip	c.1083+795A>G	Канада
2015	NBAS Mutations Cause a Multisystem Disorder Involving Bone, Connective Tissue, Liver, Immune System, and Retina	Exome Sequencing, Sanger sequencing	c.284C>T, p.Ala95Val; c.850A>T, p.Lys284Ter	Швейцария
2015	NBAS Mutations Cause a Multisystem Disorder Involving Bone, Connective Tissue, Liver, Immune System, and Retina	Exome Sequencing, Sanger sequencing	c.409C>T, p.Arg137Trp; c.1186T>A, p.Trp396Arg	США (Швейцария)
2016	Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts	Exome Sequencing	c.[2827G>T];[exons 39–40 del], p.[Glu943*]; [Val2145_Glu2237del]	Франция (Германия)

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2016	Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts	Exome Sequencing	c.[1278A>C];[exons 49–50 del = c.((4582 + 1_45831)_ (4797 + 1_4798-1) del)], p.[Cys426Trp]; [Val1528Glyfs*2]	Германия
2016	Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts	Exome Sequencing	c.[173-2A>G];[3363A>G], p.[=];[Ile1121Met]	Германия
2016	Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts	Exome Sequencing	c.[284C>T];[850A>T], p.[Ala95Val];[Lys284Ter]	Швейцария (Германия)
2016	Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts	Exome Sequencing	c.[409C>T];[1186 T>A], p.[Arg137Trp];[Trp396Arg]	США (Германия)
2017	Compound heterozygous variants in NBAS as a cause of atypical osteogenesis imperfecta	Whole exome sequencing	c.5741G>A p.(Arg1914His); c.3010C>T p.(Arg1004*)	North European origin (Великобритания)
2017	Compound heterozygous variants in NBAS as a cause of atypical osteogenesis imperfecta	Whole exome sequencing	c.5741G>A p.(Arg1914His); c.2032C>T p.(Gln678*)	mother is of Northern-Spanish origin whilst father is of Italian (Великобритания)
2017	NBAS mutations cause acute liver failure: when acetaminophen is not a culprit	Exome sequencing	c.[809G>C];[2926del], p.[Gly270Ala];[Ser976Profs*16]	Италия
2017	Acute Liver Failure Secondary to Neuroblastoma Amplified Sequence Deficiency	Genetic testing	c.409C>T (p.Arg137Trp); c.758T>G (p.Val253Gly)	США
2017	Acute Liver Failure Meets SOPH Syndrome: A Case Report on an Intermediate Phenotype	Whole exome sequencing	p.(Arg1914His) and p.(Glu943*)	Германия
2017	Novel NBAS mutations and fever-related recurrent acute liver failure in Chinese children: a retrospective study	Whole exome sequencing, Sanger sequencing	c.3596G>A, p.C1199Y (missense); c.6611_6612insCA, p.M2204Ifs*3 (frameshift)	Китай
2017	Novel NBAS mutations and fever-related recurrent acute liver failure in Chinese children: a retrospective study	Whole exome sequencing, Sanger sequencing	c.3596G>A, p.C1199Y (missense); c.586C>T, p.Q196X (nonsense)	Китай
2017	Novel NBAS mutations and fever-related recurrent acute liver failure in Chinese children: a retrospective study	Whole exome sequencing, Sanger sequencing	c.2407G>A, p.E803K (missense); c.5389 + 1G>T (splice-site)	Китай

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2017	Recurrent elevated liver transaminases and acute liver failure in two siblings with novel bi-allelic mutations of NBAS	Whole exome sequencing, Sanger sequencing	c.680A>C (p.His227Pro); c.1749G>A (p.Trp583*), causing a premature stop codon	Португалия
2017	Recurrent elevated liver transaminases and acute liver failure in two siblings with novel bi-allelic mutations of NBAS	Whole exome sequencing, Sanger sequencing	c.680A>C (p.His227Pro); c.1749G>A (p.Trp583*), causing a premature stop codon	Португалия
2017	Analyse du séquençage de l'exome basé sur le phénotype pour le diagnostic moléculaire des syndromes polymalformatifs	no data	c.(5741G>A) p.(Arg1914His) ; c.(686dupT) p.(Ser230fs*4)	Франция
2017	High diagnostic yield of clinically unidentifiable syndromic growth disorders by targeted exome sequencing	Targeted exome sequencing	c.6572+1delG and p.Arg1914His	Корея
2017	High diagnostic yield of clinically unidentifiable syndromic growth disorders by targeted exome sequencing	Targeted exome sequencing	c.6572+1delG and p.Arg1914His	Корея
2017	Short stature, optic nerve atrophy and Pelger-Huët anomaly syndrome with antibody immunodeficiency and aplastic anemia: a case report and literature review	gene sequencing	c.5741C> T, pR1914H and c.6496-6497insA, p.S2166Ffs*	Китай
2018	Features of Feingold syndrome 1 dominate in subjects with 2p deletions including MYCN	SNP microarray	deletion 2p	США
2018	SOPH Syndrome with Growth Hormone Deficiency, Normal Bone Age, and Novel Compound Heterozygous Mutations in NBAS	targeted gene sequencing (TGS), captured libraries were sequenced using the Illumina HiSeq 2500	c.5752A>C (Thr1918Pro); c.500_501delTT (Phe167Cysfs7)	Китай
2018	Genetic effects on bone health	genome-wide association study	-	Словения

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2018	Mutations in the Neuroblastoma Amplified Sequence gene in a family affected by Acrofrontofacionasal Dysostosis type 1	Whole exome sequencing, Sanger sequencing, Site-directed mutagenesis, Western blot analysis, Immunoprecipitation, Immunofluorescence analysis, Immunohistochemical stainings on mouse tissues, Gene knockdown in zebrafish	c.6237-3C>G intronic region close to exon 48 canonical acceptor splice site	Индия (Италия)
2018	Mutations in the Neuroblastoma Amplified Sequence gene in a family affected by Acrofrontofacionasal Dysostosis type 1	Whole exome sequencing, Sanger sequencing, Site-directed mutagenesis, Western blot analysis, Immunoprecipitation, Immunofluorescence analysis, Immunohistochemical stainings on mouse tissues, Gene knockdown in zebrafish	c.6237-3C>G intronic region close to exon 48 canonical acceptor splice site	Индия (Италия)
2018	Severe form of neuroblastoma amplified sequence deficiency in an infant with recurrent acute liver failure	Whole exome sequencing	c.[1339G>A]; and [5454_5455delTT] (p.[Glu447Lys];[Leu1818fsX16])	Корея
2018	Targeted next-generation sequencing reveals two novel mutations of NBAS in a patient with infantile liver failure syndrome-2	targeted gene sequencing (TGS), captured libraries were sequenced using the Illumina HiSeq 2000; Sanger sequencing	c.3596G>A (p.C1199Y), splice site mutation, c.209+1G>A	Китай

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2019	NBAS pathogenic variants: Defining the associated clinical and facial phenotype and genotype–phenotype correlations	Whole exome sequencing, Sanger sequencing	c.1501C>T, p.Arg501*; c.6840G>A, p.Thr2280Thr caused skipping of exon 51	Италия
2019	NBAS pathogenic variants: Defining the associated clinical and facial phenotype and genotype–phenotype correlations	Whole exome sequencing, Sanger sequencing	c.686dupT, p.Ser230Glnfs*4; c.6840G>A, p.Thr2280Thr caused skipping of exon 51	Италия
2019	SOPH syndrome in three affected individuals showing similarities with progeroid cutis laxa conditions in early infancy	exome Sequencing	c.5741 G>A p.(Arg1914His); c.405 G>A premature termination codon p.(Trp135*)	Турция (Германия)
2019	SOPH syndrome in three affected individuals showing similarities with progeroid cutis laxa conditions in early infancy	exome Sequencing	c.2950delA frameshift and premature termination of translation after eight additional codons p.(Ile984Leufs*8); c.3158 A>G p.(His1053Arg)	Caucasian (Германия)
2019	SOPH syndrome in three affected individuals showing similarities with progeroid cutis laxa conditions in early infancy	exome Sequencing	c.5741 G>A p.(Arg1914His); c.6564dupT premature termination of translation p.(Glu2189*)	Caucasian (Германия)
2019	Generation of an iPSC line from a patient with infantile liver failure syndrome 2 due to mutations in NBAS: DHMCi004-A	from №5	c.[2708T>G]; c.[2708T>G]/p.[Leu903Arg]; p.[Leu903Arg]	Германия
2019	Mutation in the Neuroblastoma Amplified Sequence Gene as a Cause of Recurrent Acute Liver Failure, Acute Kidney Injury, and Status Epilepticus	Exome sequencing and mitochondrial genome sequencing	c.761G>A; p.Gly254Asp	Индия
2019	Novel neuroblastoma amplified sequence (NBAS) mutations in a Japanese boy with fever-triggered recurrent acute liver failure	Whole-exome and Sanger sequencing	c.1018G>C (p.Gly340Arg) and c.2674 G>T (p.Val892Phe)	Япония
2019	Immunological Features of Neuroblastoma Amplified Sequence Deficiency: Report of the First Case Identified Through Newborn Screening for Primary Immunodeficiency and Review of the Literature	Whole exome sequencing	c.1948C>T, hydrophobic proline with polar serine (p.Pro650Ser)	Пакистан (Италия)
2019	A novel compound heterozygous mutation in NBAS gene causes SOPH syndrome and liver function damage	?	c.(7041_7043delTCT) c.(3759delC)	Китай

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2019	Cryptic intronic NBAS variant reveals the genetic basis of recurrent liver failure in a child	Whole exome sequencing; reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)	c.2617C>T, p.(Arg873Trp) c.2423 + 404G>C, leading to the inclusion of a pseudo-exon	Австралия
2020	Pituitary stalk interruption syndrome is characterized by genetic heterogeneity	Exome sequencing	c.1083+4C>T essential splice site	Франция
2020	Pituitary stalk interruption syndrome is characterized by genetic heterogeneity	Exome sequencing	c. G6311A:p.R2104Q; c. T1118C:p.L373P	Франция
2020	Mutations in NBAS and SCYL1, genetic causes of recurrent liver failure in children: Three case reports and a literature review	Targeted exome sequencing	c.2822G>A, p.(Arg941His)	Франция
2020	Mutations in NBAS and SCYL1, genetic causes of recurrent liver failure in children: Three case reports and a literature review	Targeted exome sequencing	c.2708T>G p.(Leu903Arg)	Франция
2020	Neuroblastoma Amplified Sequence Gene Mutations Inducing Acute Kidney and Liver Injury in an Adolescent Female	exome sequencing analysis confirmed a	biallelic abnormality in the NBAS	Израиль
2020	Complex Multisystem Phenotype With Immunodeficiency Associated With NBAS Mutations: Reports of Three Patients and Review of the Literature	Exome Sequencing	c.5741G>A, p.Arg1914His; ex. 35-47 del.	Россия
2020	Complex Multisystem Phenotype With Immunodeficiency Associated With NBAS Mutations: Reports of Three Patients and Review of the Literature	Exome Sequencing	c.5741G>A, p.Arg1914His; ex. 35-47 del.	Россия
2020	Complex Multisystem Phenotype With Immunodeficiency Associated With NBAS Mutations: Reports of Three Patients and Review of the Literature	Exome Sequencing	c.5741G>A, p.Arg1914His; c.1628_1629insA, p.Ser544fs	Россия
2020	Severe SOPH syndrome due to a novel NBAS mutation in a 27-year-old woman–Review of this pleiotropic, autosomal recessive disorder: Mystery solved after two decades	Clinical whole exome sequencing	c.17C>A (p.Ser6*); c.5741G>A (p.Arg1914His)	США
2020	Infantile fever-triggered acute liver failure caused by novel neuroblastoma amplified sequence mutations: a case report		(c.3386C>T (p.Ser1129Phe), c.1A>C (p.Met1Leu) and c.875G>A (p.Gly292Glu))	Китай
2020	Identification of a Novel Compound Heterozygous Variant in NBAS Causing Bone Fragility by the Type of Osteogenesis Imperfecta	Targeted panel sequencing	c.2535G>T (p.Trp845Cys), c.5741G>A (p.Arg1914His)	Россия
2020	A case of recurrent abnormal liver function in children resulting from neuroblastoma amplified sequence gene defect	тестирования в компании Beijing Jinzhun Gene Technology Co., Ltd.	c.5725-1G>A, сайт сплайсинга. – 3; c.401A>T, что привело к замене аминокислоты p.Q134	Китай

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2020	Oculofacial alterations in NBAS-SOPH like mutations: Case report	genetic assessment	NBAS-SOPH like mutation	Италия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(284C>T); p.(Ala95Val) Я-пропеллер c.(2802G>A); p.(Trp934*) n.a.	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(812T>C); p.(Leu271Pro) Я-пропеллер c.(812T>C); p.(Leu271Pro) Я-пропеллер	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(1241C>T); p.(Ser414Phe) Я-пропеллер c.(2950delA); p.(Ile984Leufs*8) n.a.	Ирландия (Германия)
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(1241C>T); p.(Ser414Phe) Я-пропеллер c.([6236 + 1_6237–1]_[6432 + 1_6433–1] del); p.(Glu2080*) n.a.	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(1549C>T); p.(Arg517Cys) Between Я-пропеллер and SEC39 c.(5041_5048del); p.(Ser1681Glnfs*37) n.a.	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(1550G>A); p.(Arg517His) Between Я-пропеллер and SEC39 c.(6805G>T); p.(Glu2269*) n.a.	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(1550G>A); p.(Arg517His) Between Я-пропеллер and SEC39 c.(6805G>T); p.(Glu2269*) n.a.	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(2191A>C); p.(Thr731Pro) SEC39 c.(2191A>C); p.(Thr731Pro) SEC39	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(2330C>A); p.(Pro777His) SEC39 c.(2330C>A); p.(Pro777His) SEC39	Германия

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(2330C>A); p.(Pro777His) SEC39 c.(2330C>A); p.(Pro777His) SEC39	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(2809C>G); p.(Pro937Ala) SEC39 c.([5138 + 1_5139-1] _7116del); p.(?) n.a.	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(2819A>C); p.(His940Pro) SEC39 c.(2819A>C); p.(His940Pro) SEC39	Саудовская Аравия (Германия)
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(2951T>G); p.(Ile984Ser) SEC39 c.(2827G>T); p.(Glu943*) n.a.	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(3164T>C); p.(Leu1055Pro) SEC39 c.([5027 + 1_5028-1] _[5724 + 1_5725-1] del); p.(Glu1676Aspfs*10) n.a.	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(3363A>G); p.(Ile1121Met) SEC39 c.(513 + 2T>C); p.(?) n.a.	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(3386C>T); p.(Ser1129Phe) SEC39 c.(3386C>T); p.(Ser1129Phe) SEC39	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(3386C>T); p.(Ser1129Phe) SEC39 c.(3386C>T); p.(Ser1129Phe) SEC39	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(3534C>A); p.(Ser1178Arg) SEC39 c.(1342-6A>G); p.(?) n.a.	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(3602A>C); p.(Gln1201Pro) SEC39 c.(3602A>C); p.(Gln1201Pro) SEC39	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(5741G>A); p.(Arg1914His) C- terminal c.(1528C>T); p.(Arg510*) n.a.	Германия

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(5740C>G); p.(Arg1914Gly) C-terminal c.(6877delC); p.(Leu2293Cysfs*9) n.a.	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(5761G>C); p. (Ala1921Pro) C-terminal c.(686dupT); p.(Ser230Glnfs*4) n.a.	Хорватия (Германия)
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(6840G>T); p.(?) C-terminal c.(6840G>T); p.(?) C-terminal	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(6966_6969delinsTC); p. (Gln2322Hisfs*18) C-terminal c.(5547delC); p.(Trp1850Glyfs*32) n.a.	США (Германия)
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(767G>A); p.(Cys256Tyr) Я-пропеллер c.(2012T>G); p.(Phe671Cys) Between Я-пропеллер and SEC39	Германия
2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	trio-exome sequencing or Sanger sequencing	c.(2535G>T); p.(Trp845Cys) SEC39 c.(5761G>C); p.(Ala1921Pro) C-terminal	Германия
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.426C>G p.Tyr142Ter; c.3596G>A p.Cys1199Tyr	Китай
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.501delT p.Phe167LeufsTer10; c.2570C>T p.Ala857Val	Китай
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.648-1G>A; c.3596G>A p.Cys1199Tyr	Китай
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.1018G>C p.Gly340Arg; c.5740C>T p.Arg1914Cys	Китай

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.2563_c.2577+5del p.His855_Gln859del; c.3596G>A p.Cys1199Tyr	Китай
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.2563_c.2577+5del p.His855_Gln859del; c.3596G>A p.Cys1199Tyr	Китай
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.3284G>A p.Trp1095Ter; c.3596G>A p.Cys1199Tyr	Китай
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.3432_3435dupCAGT p.Ala1146GlnfsTer14; c.6859G>T p.Asp2287Tyr	Китай
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.2822G>A p.Arg941His; c.2423+404G>A	Китай
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.680_690dupACTGTTTCAGC p.Phe231ThrfsTer35; c.1361C>G p.Pro454Arg	Китай
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.1028G>A p.Ser343Asn; c.5741G>A p.Arg1914His	Китай
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.1177_1182delinsAGATAGA p.Val393ArgfsTer2; c.5752A>C p.Thr1918Pro	Китай
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.2239 T>C p.Tyr747Asp; c.7003C>T p.Arg2335Trp	Китай
2020	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients	whole-exome sequencing, or whole-genome sequencing	c.3115C>T p.Gln1039Ter; c.7041_7043delTCT p.2346delLeu	Китай

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2020	Genome-first approach for the characterization of a complex phenotype with combined NBAS and CUL4B deficiency	Whole exome sequencing	heterozygosity NBAS frameshift (c.686dup, p.Ser230Glnfs*4), c.2411A>G, p.(Glu804Gly), putative NOTCH1 splice donor variant (c.1441+5G>A), EP300 (c.4831C>T, p.Pro1611Ser), DPP6 (c.757C>A, p.Gln253Lys), and KCNQ2 (c.2030G>C, p.Arg677Pro), hemizyosity CUL4B (c.1450C>T, p.Arg484*)	Италия
2020	A 34-year-old Japanese patient exhibiting NBAS deficiency with a novel mutation and extended phenotypic variation	Whole-exome and Sanger sequencing	p.Arg1914His, splice site variant, c.6433-2A>G	Япония
2020	Infantile fever-triggered acute liver failure caused by novel neuroblastoma amplified sequence mutations: a case report	whole exome sequencing	(c.3386C>T (p.Ser1129Phe), c.1A>C (p.Met1Leu) and c.875G>A (p.Gly292Glu))	Китай
2020	Neuroblastoma amplified sequence gene mutation: A rare cause of recurrent liver failure in children	whole exome sequencing	c.(2819A>C) ; p.(His940Pro)	Саудовская Аравия
2020	Neuroblastoma amplified sequence gene mutation: A rare cause of recurrent liver failure in children	whole exome sequencing	c.(2819A>C) ; p.(His940Pro)	Саудовская Аравия
2021	Resolution of recurrent pediatric acute liver failure with liver transplantation in a patient with NBAS mutation	whole exome sequencing	c.1549C>T(p.R517C); c.4646T>C(p.L1549P)	США
2021	Case Report: Pediatric Recurrent Acute Liver Failure Caused by Neuroblastoma Amplified Sequence (NBAS) Gene Mutations	whole exome sequencing	c.3596G> A (p.C1199Y)/ex.9del (p.216-248del)	Китай
2021	Prenatal lead exposure and cord blood DNA methylation in the Korean Exposome Study	CpG sites	intron 10	Корея
2021	Characterization of a complex phenotype (fever-dependent recurrent acute liver failure and osteogenesis imperfecta) due to NBAS and P4HB variants	Whole-exome sequencing	(c.[1265 T>C];[1549C>T]:p. [(Leu422Pro)];[(Arg517Cys)]), and a heterozygous variant in P4HB (c.[194A>G];[194=]:p.[(Lys65Arg)]; [(Lys65=)])	Испания

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2021	Oligogenic Inheritance of Monoallelic TRIP11, FKBP10, NEK1, TBX5, and NBAS Variants Leading to a Phenotype Similar to Odontochondrodysplasia	Exome sequencing and bioinformatic analysis	c.4228A>G, p.(Thr1410Ala)	Финляндия (Швеция)
2021	Foveal hypoplasia in short stature with optic atrophy and Pelger-HuT et anomaly syndrome with neuroblastoma-amplified sequence (NBAS) gene mutation	genome-wide association study, Sanger DNA sequencing	c. 5741G.A	Корея
2021	Foveal hypoplasia in short stature with optic atrophy and Pelger-HuT et anomaly syndrome with neuroblastoma-amplified sequence (NBAS) gene mutation	genome-wide association study, Sanger DNA sequencing	NBAS gene mutation	Корея
2021	Study of Acute Liver Failure in Children Using Next Generation Sequencing Technology	Whole-exome sequencing	c.4731_4733dup; p.Tyr1578dup	Великобритания
2021	Study of Acute Liver Failure in Children Using Next Generation Sequencing Technology	Whole-exome sequencing	copy number variant (CNV) ratio of 2 was identified in exon 17-19 in NBAS	Великобритания
2021	Study of Acute Liver Failure in Children Using Next Generation Sequencing Technology	Whole-exome sequencing	c.191G>A, p.Arg64His; c.1702G>A, p.Val568Ile	Великобритания
2021	NBAS deficiency due to biallelic c.2809C>G variant presenting with recurrent acute liver failure with severe hyperammonemia, acquired microcephaly and progressive brain atrophy	NGS panel containing 5000 genes	c.2809C>G, p.(Pro937Ala)	Польша
2021	Liver involvement in neuroblastoma amplified sequence gene deficiency is not limited to acute injury: Fibrosis silently continues	Whole-exome sequencing	c.3602A>C p. Gln1201Pro	Турция
2021	Liver involvement in neuroblastoma amplified sequence gene deficiency is not limited to acute injury: Fibrosis silently continues	Whole-exome sequencing	c.3602A>C p. Gln1201Pro	Турция
2021	Liver involvement in neuroblastoma amplified sequence gene deficiency is not limited to acute injury: Fibrosis silently continues	Whole-exome sequencing	c.1556T>A p. Val519Glu	Турция
2021	Liver involvement in neuroblastoma amplified sequence gene deficiency is not limited to acute injury: Fibrosis silently continues	Whole-exome sequencing	c.307G>A p. Ala103Thro ; c . 5119 T>A p. Phe1707Ile	Турция
2021	Liver involvement in neuroblastoma amplified sequence gene deficiency is not limited to acute injury: Fibrosis silently continues	Whole-exome sequencing	c.1628_1629InsA p. Ser544ValfsTer11 ; c.1226C>T p. Ala409Val	Турция
2021	Expanding the genotypes and phenotypes for 19 rare diseases by exome sequencing performed in pediatric intensive care unit	Whole exome sequencing	2630G>T and c.4288C>T p.(Gly877Val) and p.(Gln1430Ter)	Китай

Продолжение Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2021	NBAS Variants Are Associated with Quantitative and Qualitative NK and B Cell Deficiency			Германия
2021	Novel compound heterozygous variants in the NBAS gene in a child with osteogenesis imperfecta and recurrent acute liver failure	no data	no data	Китай
2022	Distinct diagnostic trajectories in NBAS-associated acute liver failure highlights the need for timely functional studies	genome sequencing	c.2951T>G; p.(Ile984Ser) ; c.406A>G; p.(Arg136Gly)	Австралия
2022	Distinct diagnostic trajectories in NBAS-associated acute liver failure highlights the need for timely functional studies	Exome Sequencing	c.2951T>G; p.(Ile984Ser) ; c.1213C>T; p.(Arg405*)	Австралия
2022	Distinct diagnostic trajectories in NBAS-associated acute liver failure highlights the need for timely functional studies	Exome Sequencing	c.2951T>G; p.(Ile984Ser) ; c.1213C>T; p.(Arg405*)	Австралия
2022	Distinct diagnostic trajectories in NBAS-associated acute liver failure highlights the need for timely functional studies	trio genome sequencing	c.2617C>T p. (Arg873Trp) ; c.2423+404G>C	Австралия
2022	Case report: A novel cause of acute liver failure in children: A combination of human herpesvirus-6 infection and homozygous mutation in NBAS gene	Whole exome sequencing	c.3596G>A p. (Cys1199Tyr)	Китай
2022	Diagnosis and treatment of fever-related recurrent acute liver failure in children	Обсуждение		Китай
2022	Клинические особенности и анализ генетической изменчивости ребенка с синдромом печеночной недостаточности 2 типа	секвенирование нового поколения	c.2746A>T (p.R916X, 1456), экзон 24, и экзон 31 c.3596G>A (p.C1199Y).)	Китай
2022	PEPD, and NBAS gene variants and elevated serum cytokines in a patient with unilateral sporadic Meniere's disease and vascular congestion over the endolymphatic sac	секвенирование нового поколения	c.4049T>C/p.I1350T	Китай
2022	O8 Characterisation of the pathobiology acute liver failure secondary to NBAS deficiency	no data	no data	Великобритания
2022	O8 Characterisation of the pathobiology acute liver failure secondary to NBAS deficiency	no data	no data	Великобритания
2022	O8 Characterisation of the pathobiology acute liver failure secondary to NBAS deficiency	no data	no data	Великобритания
2022	O8 Characterisation of the pathobiology acute liver failure secondary to NBAS deficiency	no data	no data	Великобритания
2022	NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis	WES or WGS	p.Q2232E/p.P454R	Китай

Окончание Приложения 1 – известные патогенные варианты в гене *NBAS*

Год	Статья	Метод	Вариант	Страна пациент(статья)
2022	NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis	WES or WGS	p.R1073C/p.M1743V	Китай
2022	NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis	WES or WGS	p.K1517E/p.P1474L	Китай
2022	NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis	WES or WGS	p.E2269K/p.E1521Q	Китай
2022	NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis	WES or WGS	p.Y1495H/p.T1097M	Китай
2022	EP08.02-092 Coexistence of a Novel NBAS-ALK, EML4-ALK Double-Fusion in a Lung Adenocarcinoma Patient With LM and Response to Ensartinib	онкология	-	Китай

ПРИЛОЖЕНИЕ 2 – ФЕНОТИПЫ И ИХ ВАРИАНТЫ

Пробанд	Аллель 1	Аллель 2	ALF	ALT/AST	Optic Atrophy	Nanism	OI COL1	Hu-GE	R-NK	Источник
Группа	Миссенс, гомозигота									
1	c.409C>T, p.Arg137Trp	c.409C>T, p.Arg137Trp	1	NA	0	рано умерли	1	NA	NA	Neuroblastoma Amplified Sequence (NBAS) mutation in recurrent acute liver failure: Confirmatory report in a sibship with very early onset, osteoporosis and developmental delay
2	c.409C>T, p.Arg137Trp	c.409C>T, p.Arg137Trp	1	NA	0	рано умерли	1	NA	NA	Neuroblastoma Amplified Sequence (NBAS) mutation in recurrent acute liver failure: Confirmatory report in a sibship with very early onset, osteoporosis and developmental delay
3	c.409C>T, p.Arg137Trp	c.409C>T, p.Arg137Trp	1	NA	0	рано умерли	1	NA	NA	Neuroblastoma Amplified Sequence (NBAS) mutation in recurrent acute liver failure: Confirmatory report in a sibship with very early onset, osteoporosis and developmental delay
4	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	1	NA	NA	NA	NA	0	1	Case report: A novel cause of acute liver failure in children: A combination of human herpesvirus-6 infection and homozygous mutation in NBAS gene
5	c.1556T>A, p.Val519Glu	c.1556T>A, p.Val519Glu	1	NA	0	0	1	1	NA	Liver involvement in neuroblastoma amplified sequence gene deficiency is not limited to acute injury: Fibrosis silently continues
6	c.3602A>C, p.Gln1201Pro	c.3602A>C, p.Gln1201Pro	1	NA	0	0	NA	0	NA	Liver involvement in neuroblastoma amplified sequence gene deficiency is not limited to acute injury: Fibrosis silently continues
7	c.3602A>C, p.Gln1201Pro	c.3602A>C, p.Gln1201Pro	1	NA	0	0	NA	0	NA	Liver involvement in neuroblastoma amplified sequence gene deficiency is not limited to acute injury: Fibrosis silently continues
8	c.2809C>G, p.Pro937Ala	c.2809C>G, p.Pro937Ala	1	NA	0	0	NA	0	NA	NBAS deficiency due to biallelic c.2809C>G variant presenting with recurrent acute liver failure with severe hyperammonemia, acquired microcephaly and progressive brain atrophy
9	c.4731_4733dup, p.Tyr1578dup	c.4731_4733dup, p.Tyr1578dup	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Study of Acute Liver Failure in Children Using Next Generation Sequencing Technology
10	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.5741G>A, p.Arg1914His	NA	1	1	1	NA	NA	NA	Foveal hypoplasia in short stature with optic atrophy and Pelger-Hu� et anomaly syndrome with neuroblastoma-amplified sequence (NBAS) gene mutation
11	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.5741G>A, p.Arg1914His	NA	1	1	1	NA	NA	NA	Foveal hypoplasia in short stature with optic atrophy and Pelger-Hu� et anomaly syndrome with neuroblastoma-amplified sequence (NBAS) gene mutation
12	c.2819A>C, p.His940Pro	c.2819A>C, p.His940Pro	1	NA	NA	1	NA	0	0	Neuroblastoma amplified sequence gene mutation: A rare cause of recurrent liver failure in children

Продолжение Приложения 2 – фенотипы и их варианты

Пробанд	Аллель 1	Аллель 2	ALF	ALT/AST	Optic Atrophy	Nanism	OI COL1	Hy-GE	R-NK	Источник
13	c.2535G>T, p.Trp845Cys	c.2535G>T, p.Trp845Cys	NA	NA	1	1	NA	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
14	c.3602A>C, p.Gln1201Pro	c.3602A>C, p.Gln1201Pro	1	NA	NA	0	NA	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
15	c.3386C>T, p.Ser1129Phe	c.3386C>T, p.Ser1129Phe	1	NA	NA	0	0	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
16	c.3386C>T, p.Ser1129Phe	c.3386C>T, p.Ser1129Phe	1	NA	NA	0	0	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
17	c.2191A>C, p.Thr731Pro	c.2191A>C, p.Thr731Pro	1	NA	NA	1	0	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
18	c.2330C>A, p.Pro777His	c.2330C>A, p.Pro777His	1	NA	NA	0	0	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
19	c.2330C>A, p.Pro777His	c.2330C>A, p.Pro777His	1	NA	NA	0	0	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
20	c.2819A>C, p.His940Pro	c.2819A>C, p.His940Pro	1	NA	NA	0	0	NA	1	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
21	c.812T>C, p.Leu271Pro	c.812T>C, p.Leu271Pro	1	NA	NA	1	NA	1	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
22	c.2617C>T, p.Arg873Trp	c.2617C>T, p.Arg873Trp	1	NA	0	0	0	0	NA	Cryptic intronic NBAS variant reveals the genetic basis of recurrent liver failure in a child
23	c.2822G>A, p.Arg941His	c.2822G>A, p.Arg941His	1	1	NA	NA	NA	NA	1	Mutations in NBAS and SCYL1, genetic causes of recurrent liver failure in children: Three case reports and a literature review
24	c.2708T>G, p.Leu903Arg	c.2708T>G, p.Leu903Arg	1	NA	0	0	NA	NA	1	Mutations in NBAS and SCYL1, genetic causes of recurrent liver failure in children: Three case reports and a literature review
25	c.1948C>T, p.Pro650Ser	c.1948C>T, p.Pro650Ser	NA	1	0	1	NA	1	1	Immunological Features of Neuroblastoma Amplified Sequence Deficiency: Report of the First Case Identified Through Newborn Screening for Primary Immunodeficiency and Review of the Literature
26	c.761G>A, p.Gly254Asp	c.761G>A, p.Gly254Asp	1	NA	NA	0	0	0	NA	Mutation in the Neuroblastoma Amplified Sequence Gene as a Cause of Recurrent Acute Liver Failure, Acute Kidney Injury, and Status Epilepticus
27	c.2708T>G, p.Leu903Arg	c.2708T>G, p.Leu903Arg	1	1	0	1	NA	0	NA	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy

Продолжение Приложения 2 – фенотипы и их варианты

Про-банд	Аллель 1	Аллель 2	ALF	ALT/AST	Optic Atrophy	Nanism	OI COL1	Hy-GE	R-NK	Источник
Группа	Миссенс компаунд									
28	c.603_605del, p.Leu202del	c.3164T>C, p.Leu1055Pro	1	1	0	1	NA	0	1	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy
29	p.Gln2232Glu	p.Pro454Arg	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis
30	p.Arg1073Cys	p.Met1743Val	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis
31	p.Lys1517Glu	p.Pro1474Leu	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis
32	p.Glu2269Lys	p.Glu1521Gln	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis
33	p.Tyr1495His	p.Thr1097Met	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis
34	c.2951T>G, p.Ile984Ser	c.406A>G, p.Arg136Gly	1	NA	0	0	0	0	NA	Distinct diagnostic trajectories in NBAS-associated acute liver failure highlights the need for timely functional studies
35	c.191G>A, p.Arg64His	c.1702G>A, p.Val568Ile	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Study of Acute Liver Failure in Children Using Next Generation Sequencing Technology
36	c.1549 C>T, p.Arg517Cys	c.451 G>A, p.Glu151Lys	1	1	0	1	1	0	0	Distinct diagnostic trajectories in NBAS-associated acute liver failure highlights the need for timely functional studies
37	c.307G>A, p.Ala103Thr	c.5119 T>A, p.Phe1707Ile	0	NA	0	1	NA	0	NA	Liver involvement in neuroblastoma amplified sequence gene deficiency is not limited to acute injury: Fibrosis silently continues
38	c.3386C>T, p.Ser1129Phe	c.875G>A, p.Gly292Glu	1	NA	NA	0	NA	0	0	Infantile fever-triggered acute liver failure caused by novel neuroblastoma amplified sequence mutations: a case report
39	c.1549C>T, p.Arg517Cys	c.4646T>C, p.Leu1549Pro	1	NA	NA	1	NA	1	1	Resolution of recurrent pediatric acute liver failure with liver transplantation in a patient with NBAS mutation
40	c.1265 T>C, p.Leu422Pro	c.1549C>T, p.Arg517Cys	1	NA	0	1	1	0	0	Characterization of a complex phenotype (fever-dependent recurrent acute liver failure and osteogenesis imperfecta) due to NBAS and P4HB variants
41	c.2239 T>C, p.Tyr747Asp	c.7003C>T, p.Arg2335Trp	0	1	0	1	NA	1	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
42	c.1028G>A, p.Ser343Asn	c.5741G>A, p.Arg1914His	0	1	0	NA	NA	0	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients

Продолжение Приложения 2 – фенотипы и их варианты

Пробанд	Аллель 1	Аллель 2	ALF	ALT/AST	Optic Atrophy	Nanism	OI COL1	Hy-GE	R-NK	Источник
43	c.1018G>C, p.Gly340Arg	c.5740C>T, p.Arg1914Cys	1	NA	0	1	NA	0	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
44	c.2535G>T, p.Trp845Cys	c.5761G>C, p.Ala1921Pro	1	NA	NA	1	NA	NA	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
45	c.767G>A, p.Cys256Tyr	c.2012T>G, p.Phe671Cys	0	1	NA	1	NA	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
46	c.2535G>T, p.Trp845Cys	c.5741G>A, p.Arg1914His	1	NA	1	1	1	1	NA	Identification of a Novel Compound Heterozygous Variant in NBAS Causing Bone Fragility by the Type of Osteogenesis Imperfecta
47	c.3386C>T, p.Ser1129Phe	c.1A>C, p.Met1Leu	1	NA	NA	0	0	0	0	Infantile fever-triggered acute liver failure caused by novel neuroblastoma amplified sequence mutations: a case report
48	c.1018G>C, p.Gly340Arg	c.2674 G>T, p.Val892Phe	1	NA	0	1	NA	0	0	Novel neuroblastoma amplified sequence (NBAS) mutations in a Japanese boy with fever-triggered recurrent acute liver failure
49	c.409C>T, p.Arg137Trp	c.758T>G, p.Val253Gly	1	1	NA	1	NA	0	0	Acute Liver Failure Secondary to Neuroblastoma Amplified Sequence Deficiency
50	c.409C>T, p.Arg137Trp	c.1186 T>A, p.Trp396Arg	1	1	0	1	0	0	1	Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts
Группа	Вариант со стоп-кодоном									
51	c.558_560del, p.Ile187del	c.686dup, p.Ser230Glnfs*4	1	1	1	1	NA	0	1	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy
52	c.2708T>G, p.Leu903Arg	c.2827G>T, p.Glu943*	1	0	0	1	NA	0	1	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy
53	c.3164T>C, p.Leu1055Pro	c.3010C>T, p.Arg1004*	1	1	0	0	NA	0	NA	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy
54	c.2951T>G, p.Ile984Ser	c.1533_1545del, p.Ile512Thrfs*4	1	1	0	1	NA	0	NA	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy
55	c.2330C>A, p.Pro777His	c.1187G>A, p.Trp396*	1	1	0	0	NA	0	NA	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy

Продолжение Приложения 2 – фенотипы и их варианты

Пробанд	Аллель 1	Аллель 2	ALF	ALT/AST	Optic Atrophy	Nanism	OI COL1	Hy-GE	R-NK	Источник
56	c.3164T>C, p.Leu1055Pro	c.686dup, p.Ser230Glnfs*4	1	1	0	1	NA	0	NA	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy
57	c.(6432+1_6433-1)_(6711+1_6712-1)del, p.Val2145_Glu2237del	c.2827G>T, p.Glu943*	1	NA	1	1	NA	1	1	Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts
58	c.1278A>C, p.Cys426Trp	c.(4582 + 1_45831)_(4797 + 1_4798-1) del, p.Val1528Glyfs*2	1	1	0	1	NA	1	1	Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts
59	c.284C>T, p.Ala95Val	c.850A>T, p.Lys284*	0	1	1	1	0	1	1	Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts
60	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.3010C>T, p.Arg1004*	0	1	1	1	1	1	NA	Compound heterozygous variants in NBAS as a cause of atypical osteogenesis imperfecta
61	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.2032C>T, p.Gln678*	0	1	1	1	1	1	NA	Compound heterozygous variants in NBAS as a cause of atypical osteogenesis imperfecta
62	c.809G>C, p.Gly270Ala	c.2926del, p.Ser976Profs*16	1	1	0	0	0	NA	NA	NBAS mutations cause acute liver failure: when acetaminophen is not a culprit
63	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.2827G>T, p.Glu943*	0	1	1	1	1	1	1	Acute Liver Failure Meets SOPH Syndrome: A Case Report on an Intermediate Phenotype
64	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	c.6611_6612insCA, p.Met2204Ifs*3	1	1	NA	0	0	0	0	Novel NBAS mutations and fever-related recurrent acute liver failure in Chinese children: a retrospective study
65	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	c.586C>T, p.Gln196*	1	1	NA	0	0	NA	NA	Novel NBAS mutations and fever-related recurrent acute liver failure in Chinese children: a retrospective study

Продолжение Приложения 2 – фенотипы и их варианты

Про-банд	Аллель 1	Аллель 2	ALF	ALT/AST	Optic Atrophy	Nanism	OI COL1	Hy-GE	R-NK	Источник
66	c.680A>C, p.His227Pro	c.1749G>A, p.Trp583*	0	1	NA	1	0	NA	NA	Recurrent elevated liver transaminases and acute liver failure in two siblings with novel bi-allelic mutations of NBAS
67	c.680A>C, p.His227Pro	c.1749G>A, p.Trp583*	1	1	0	1	0	NA	0	Recurrent elevated liver transaminases and acute liver failure in two siblings with novel bi-allelic mutations of NBAS
68	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.686dupT, p.Ser230fs*4	0	1	1	1	NA	NA	NA	Analyse du séquençage de l'exome basée sur le phénotype pour le diagnostic moléculaire des syndromes polymalformatifs
69	c.5741C> T, p.Arg1914His	c.6496-6497insA, p.Ser2166Ffs*	NA	1	1	1	NA	1	NA	Short stature, optic nerve atrophy and Pelger-Huët anomaly syndrome with antibody immunodeficiency and aplastic anemia: a case report and literature review
70	c.5752A>C, p.Thr1918Pro	c.500_501del TT, p.Phe167Cysfs7	NA	1	1	1	NA	1	1	SOPH Syndrome with Growth Hormone Deficiency, Normal Bone Age, and Novel Compound Heterozygous Mutations in NBAS
71	c.1339G>A, p.Glu447Lys	c.5454_5455delTT, p.Leu1818fsX16	1	1	1	1	1	1	NA	Severe form of neuroblastoma amplified sequence deficiency in an infant with recurrent acute liver failure
72	c.6840G>A, p.Thr2280Thr	c.1501C>T, p.Arg501*	0	1	NA	1	NA	1	NA	NBAS pathogenic variants: Defining the associated clinical and facial phenotype and genotype–phenotype correlations
73	c.6840G>A, p.Thr2280Thr	c.686dupT, p.Ser230Glnfs*4	0	1	NA	1	NA	1	NA	NBAS pathogenic variants: Defining the associated clinical and facial phenotype and genotype–phenotype correlations
74	c.5741 G>A, p.Arg1914His	c.405 G>A, p.Trp135*	1	1	NA	1	NA	NA	0	SOPH syndrome in three affected individuals showing similarities with progeroid cutis laxa conditions in early infancy
75	c.3158 A>G, p.His1053Arg	c.2950delA, p.Ile984Leufs*8	1	1	NA	1	NA	1	NA	SOPH syndrome in three affected individuals showing similarities with progeroid cutis laxa conditions in early infancy
76	c.5741 G>A, p.Arg1914His	c.6564dupT, p.Glu2189*	0	1	1	1	NA	1	1	SOPH syndrome in three affected individuals showing similarities with progeroid cutis laxa conditions in early infancy

Продолжение Приложения 2 – фенотипы и их варианты

Пробанд	Аллель 1	Аллель 2	ALF	ALT/AST	Optic Atrophy	Nanism	OI COL1	Hy-GE	R-NK	Источник
77	c.7041_7043delTCT, p.2347_2348delLeuLeuinsLeu	c.3759delC, p.Thr1254Hisfs*16	NA	1	1	1	NA	NA	NA	A novel compound heterozygous mutation in NBAS gene causes SOPH syndrome and liver function damage
78	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.1628_1629insA, p.Ser544fs	1	1	1	1	1	1	1	Complex Multisystem Phenotype With Immunodeficiency Associated With NBAS Mutations: Reports of Three Patients and Review of the Literature
79	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.17C>A, p.Ser6*	NA	NA	1	1	1	1	1	Severe SOPH syndrome due to a novel NBAS mutation in a 27-year-old woman—Review of this pleiotropic, autosomal recessive disorder: Mystery solved after two decades
80	c.284C>T, p.Ala95Val	c.2802G>A, p.Trp934*	1	NA	NA	1	NA	1	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
81	c.1241C>T, p.Ser414Phe	c.2950delA, p.Ile984Leufs*8	1	NA	1	1	1	1	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
82	c.1241C>T, p.Ser414Phe	c.[6236 + 1_6237–1]_[6432 + 1_6433–1]del, p.Glu2080*	0	1	1	1	NA	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
83	c.1549C>T, p.Arg517Cys	c.5041_5048del, p.Ser1681Glnfs*37	1	NA	NA	0	1	1	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
84	c.1550G>A, p.Arg517His	c.6805G>T, p.Glu2269*	1	NA	NA	0	0	0	0	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
85	c.1550G>A, p.Arg517His	c.6805G>T, p.Glu2269*	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
86	c.2951T>G, p.Ile984Ser	c.2827G>T, p.Glu943*	1	NA	NA	1	NA	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients

Продолжение Приложения 2 – фенотипы и их варианты

Пробанд	Аллель 1	Аллель 2	ALF	ALT/AST	Optic Atrophy	Nanism	OI COL1	Hy-GE	R-NK	Источник
87	c.3164T>C, p.Leu1055Pro	c.[5027 + 1_5028-1] _[5724 + 1_5725-1] del, p.Glu1676Asp fs*10	1	NA	NA	0	NA	1	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
88	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.1528C>T, p.Arg510*	0	1	NA	1	NA	1	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
89	c.5740C>G, p.Arg1914Gly	c.6877delC, p.Leu2293Cys fs*9	1	NA	1	1	NA	1	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
90	c.5761G>C, p.Ala1921Pro	c.686dupT, p.Ser230Glnfs *4	0	1	0	0	0	1	0	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
91	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	c.426C>G, p.Tyr142*	1	NA	0	0	NA	0	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
92	c.2570C>T, p.Ala857Val	c.501delT, p.Phe167LeufsTer10	1	NA	0	0	NA	0	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
93	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	c.2563_c.2577 +5del, p.His855_Gln 859del	1	NA	0	0	NA	0	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
94	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	c.2563_c.2577 +5del, p.His855_Gln 859del	1	NA	0	NA	NA	0	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
95	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	c.3284G>A, p.Trp1095*	1	NA	0	0	NA	0	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
96	c.6859G>T, p.Asp2287Tyr	c.3432_3435d upCAGT, p.Ala1146Gln fsTer14	1	NA	0	0	NA	0	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients

Продолжение Приложения 2 – фенотипы и их варианты

Пробанд	Аллель 1	Аллель 2	ALF	ALT/AST	Optic Atrophy	Nanism	OI COL1	Hy-GE	R-NK	Источник
97	c.1361C>G, p.Pro454Arg	c.680_690dup ACTGTTTCA GC, p.Phe231Thrfs Ter35	0	1	0	0	NA	0	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
98	c.5752A>C, p.Thr1918Pro	c.1177_1182d elinsAGATA GA, p.Val393Argfs Ter2	0	1	0	1	NA	0	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
99	c.7041_7043d elTCT, p.2346delLeu	c.3115C>T, p.Gln1039*	0	1	0	NA	NA	1	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
100	c.2411A>G, p.Glu804Gly	c.686dup, p.Ser230Glnfs *4	0	0	NA	1	1	1	NA	Genome-first approach for the characterization of a complex phenotype with combined NBAS and CUL4B deficiency
101	c.1226C>T, p.Ala409Val	c.1628_1629I nsA, p.Ser544Valfs Ter11	1	NA	0	0	NA	ИгА	NA	Liver involvement in neuroblastoma amplified sequence gene deficiency is not limited to acute injury: Fibrosis silently continues
102	c.2630G>T, p.Gly877Val	c.4288C>T, p.Gln1430*	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Expanding the genotypes and phenotypes for 19 rare diseases by exome sequencing performed in pediatric intensive care unit
103	c.2951T>G, p.Ile984Ser	c.1213C>T, p.Arg405*	1	1	NA	1	NA	NA	NA	Distinct diagnostic trajectories in NBAS-associated acute liver failure highlights the need for timely functional studies
104	c.2951T>G, p.Ile984Ser	c.1213C>T, p.Arg405*	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Distinct diagnostic trajectories in NBAS-associated acute liver failure highlights the need for timely functional studies
105	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	c.2746A>T, p.Arg916*	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Клинические особенности и анализ генетической изменчивости ребенка с синдромом печеночной недостаточности 2 типа
106	c.6966_6969delinsTC, p.Gln2322Hisfs*18	c.5547delC, p.Trp1850Glyfs*32	0	1	1	0	0	1	1	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients

Продолжение Приложения 2 – фенотипы и их варианты

Про-банд	Аллель 1	Аллель 2	ALF	ALT/AST	Optic Atrophy	Nanism	OI COL1	Hy-GE	R-NK	Источник
Группа	Интронные варианты в компаунд-гетерозиготном состоянии/либо приводящие к потере экзона									
107	c.1083+4C>T	c.1083+4C>T	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA	Pituitary stalk interruption syndrome is characterized by genetic heterogeneity
108	c.6840G>T	c.6840G>T	0	1	1	1	NA	1	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
109	c.6237-3C>G	c.6237-3C>G	0	0	1	1	NA	NA	NA	Mutations in the Neuroblastoma Amplified Sequence gene in a family affected by Acrofrontofacionasal Dysostosis type 1
110	c.6237-3C>G	c.6237-3C>G	0	0	1	1	NA	NA	NA	Mutations in the Neuroblastoma Amplified Sequence gene in a family affected by Acrofrontofacionasal Dysostosis type 1
111	c.1042C>T, p.Pro348Ser	c.2203-3C>G	1	1	0	0	NA	0	NA	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy
112	c.1042C>T, p.Pro348Ser	c.2203-3C>G	1	1	0	1	NA	0	NA	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy
113	c.2524G>T, p.Val842Phe	c.118-2A>G	1	0	0	1	NA	0	0	Biallelic Mutations in NBAS Cause Recurrent Acute Liver Failure with Onset in Infancy
114	c.3363A>G, p.Ile1121Met	c.173-2A>G	1	1	0	0	NA	0	0	Recurrent acute liver failure due to NBAS deficiency: phenotypic spectrum, disease mechanisms, and therapeutic concepts
115	c.2407G>A, p.Glu803Lys	c.5389 + 1G>T	1	1	0	0	0	0	0	Novel NBAS mutations and fever-related recurrent acute liver failure in Chinese children: a retrospective study
116	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.6572+1delG	0	1	1	1	NA	1	NA	High diagnostic yield of clinically unidentifiable syndromic growth disorders by targeted exome sequencing
117	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.6572+1delG	0	1	1	1	NA	1	NA	High diagnostic yield of clinically unidentifiable syndromic growth disorders by targeted exome sequencing
118	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	c.209+1G>A	1	0	NA	0	0	NA	NA	Targeted next-generation sequencing reveals two novel mutations of NBAS in a patient with infantile liver failure syndrome-2
119	c.401A>T, p.Gln134Arg	c.5725-1G>A	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	A case of recurrent abnormal liver function in children resulting from neuroblastoma amplified sequence gene defect
120	c.2809C>G, p.Pro937Ala	c.[5138 + 1_5139-1]_7116del	1	NA	NA	1	0	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
121	c.3363A>G, p.Ile1121Met	c.513 + 2T>C	0	1	NA	1	0	NA	NA	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients

Окончание Приложения 2 – фенотипы и их варианты

Пробанд	Аллель 1	Аллель 2	ALF	ALT/AST	Optic Atrophy	Nanism	OI COL1	Hy-GE	R-NK	Источник
122	c.3534C>A, p.Ser1178Arg	c.1342-6A>G	1	NA	NA	0	0	1	1	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
123	c.5123T>C, p.Leu1708Pro	c.336-3C>G	0	1	1	1	NA	1	1	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients
124	c.3596G>A, p.Cys1199Tyr	c.648-1G>A	1	NA	0	0	NA	0	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
125	c.5741G>A, p.Arg1914His	ex. 35-47 del.	NA	1	1	1	1	1	0	Complex Multisystem Phenotype With Immunodeficiency Associated With NBAS Mutations: Reports of Three Patients and Review of the Literature
126	c.5741G>A, p.Arg1914His	ex. 35-47 del.	NA	1	1	1	1	1	1	Complex Multisystem Phenotype With Immunodeficiency Associated With NBAS Mutations: Reports of Three Patients and Review of the Literature
127	c.2822G>A, p.Arg941His	c.2423+404G>A	1	NA	0	0	NA	0	NA	NBAS disease: 14 new patients, a recurrent mutation, and genotype–phenotype correlation among 24 Chinese patients
128	c.5741G>A, p.Arg1914His	c.6433-2A>G	1	1	опять же в начале было норм, а потом развилась ЧАЗН к 5 годам,	1	NA	сначала были норм, но с 1 года сниж Иг,	1	A 34-year-old Japanese patient exhibiting NBAS deficiency with a novel mutation and extended phenotypic variation
129	c.2617C>T, p.Arg873Trp	c.2423+404G>C	1	NA	0	0	NA	0	NA	Case report: A novel cause of acute liver failure in children: A combination of human herpesvirus-6 infection and homozygous mutation in NBAS gene
130	c.3596G> A, p.Cys1199Tyr	ex.9del, p.216-248del	1	NA	0	0	0	NA	NA	Case Report: Pediatric Recurrent Acute Liver Failure Caused by Neuroblastoma Amplified Sequence (NBAS) Gene Mutations

ПРИЛОЖЕНИЕ 3 – ЗАПУСКИ ALPHAFOLD

Запуск AF	система	цепь А	цепь В	цепь С	AF-M	AF3	В рисунках
1	NMD	AKT1	NBAS 1-1000	-	есть		
2	NMD	AKT1	NBAS 1000-2371	-	есть		
3	NMD	DHX34	NBAS 1-850	-	есть		
4	NMD	DHX34	NBAS 850-1700	-	есть		
5	NMD	DHX34	NBAS 1600-2371	-	есть		
6	NMD	SEC61A1	SEC61B	NBAS 1186-2371	есть		
7	NMD	SEC61A1	SEC61B	NBAS 1-1185	есть		
8	NMD	SMG5	NBAS 1500-2371	-	есть		
9	NMD	SMG5	NBAS 1-980	-	есть		
10	NMD	SMG5	NBAS 900-1800	-	есть		
11	NMD	SMG7	NBAS 1700-2371	-	есть		
12	NMD	SMG7	NBAS 1-860	-	есть		
13	NMD	SMG7	NBAS 860-1700	-	есть		
14	NMD	UPF1	NBAS 1571-2371	-	есть	есть	есть
15	NMD	UPF1	NBAS 1-850	-	есть	есть	есть
16	NMD	UPF1	NBAS 771_1571	-	есть	есть	есть
17	NMD	UPF2	NBAS 300-1000	-	есть		
18	NMD	UPF2	NBAS 1000-1700	-	есть		
19	NMD	UPF2	NBAS 1700-2371	-	есть		
20	NMD	UPF3A	NBAS 1400-2371	-	есть	есть	есть
21	NMD	UPF3B	UPF2 699-1272	NBAS 1500-2371	есть		
22	NMD	UPF3B	NBAS 1400-2371	-	есть	есть	есть
23	NMD	UPF3B	NBAS 1-1510	-	есть		
24	NRZ	BNIP1	RINT1	-	есть	есть	есть
25	NRZ	USE1	NBAS 1-1199	-	есть	есть	есть
26	NRZ	ZW10	NBAS 1171-2371	-	есть	есть	есть
27	NRZ	ZW10	RINT1	-	есть	есть	есть
28	NRZ	NBAS 1271-1771	ZW10	RINT1 1-600	есть		

Окончание Приложения 3 – запуски Alphafold

Запуск AF	система	цепь А	цепь В	цепь С	AF-M	AF3	В рисунках
29	RAB18-s	RAB18	NBAS 1-1700	-	есть	есть	есть
30	RAB18-s	RINT1	RAB18	-	есть	есть	есть
31	RAB18-s	RAB18	ZW10	NBAS 1400-2371	есть		
32	RAB18-s	RAB18	ZW10	NBAS 700-1700	есть	есть	есть
33	RAB18-s	RAB18	ZW10	RINT1	есть		
34	RAB18-s	RAB18	ZW10	-	есть	есть	есть
35	TANGO1-s	ZW10 179-779	NBAS 1300-2371	TANGO1 1150-1450	есть		
36	TANGO1-s	ZW10	TANGO1 1000-1908	-	есть		
37	TANGO1-s	ZW10	TANGO1 700-1800	-	есть		
38	TANGO1-s	NBAS 1600-2371	TANGO1 907-1907	-	есть		
39	TANGO1-s	TANGO1 1-907	NBAS 1-999	-	есть		
40	TANGO1-s	NBAS 1600-2371	TANGO1 1100-1500	-	есть		
41	TANGO1-s	NBAS 1-1110	TANGO1 1100-1500	-	есть		
42	TANGO1-s	TANGO1 1199-1399	NBAS 1-1700	-	есть		
43	TANGO1-s	ZW10	TANGO1 1199-1399	-	есть		
44	TANGO1-s	USE1	NBAS 1-940	TANGO1 1150-1450	есть		
45	TANGO1-s	TANGO1 1150-1450	ZW10 179-779	NBAS 700-1700	есть		

ПРИЛОЖЕНИЕ 4 – ТАБЛИЦА ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ПАЦИЕНТОВ С ПАТОГЕННЫМИ ВАРИАНТАМИ НА С-КОНЦЕ

№	год	статья	вариант	ССС	ДС	ЛОР	Иммун.	Офтальм.	Скелет	Неврол.	Внутр.	Эндокр.	Кроветв.	Другое
1	2019	SOPH syndrome in three affected individuals showing similarities with progeroid cutis laxa conditions in early infancy	c.5741 G>A p.(Arg1914His); c.6564dupT premature termination of translation p.(Glu2189*)	NA	NA	NA	гипогамм аглобулинемия	ЧАЗН ОИ, миопия в 10 лет	к двум годам тяжелое отставание в росте, 2 года 75 см, рост-125 вес-27 возраст-19	отставание в моторном и менталь развитии, выявлена гипоплазия мозолистого тела и гипоплазия червя мозжечка на МРТ	УЗИ гепатомегалия, жировая инфильтрация печени по биопсии, гепатомегалия прошла, АЛТ АСТ повышены в 4 года	инсулин-зависимый СД к 14 годам	пельгер	NA
2	2020	Complex Multisystem Phenotype With Immunodeficiency Associated With NBAS Mutations: Reports of Three Patients and Review of the Literature	c.5741G>A, p.Arg1914His; ex. 35-47 del.	NA	бронхит рецид, несколько пневмоний, бронхоэктаз	NA	гипогамм аглобулинемия; уменьш Б-клеток, ИгМ, ИгГ, ИгА	ЧАЗН, экзофтальм	множеств переломы; низкий рост к 11 годам; мышечная гипотония; рост-105 вес-18 возраст-11; тяжелый остеопороз	интеллект отстав	один эпизод ОПН; АСТ Алт повысились при инфекции; эпизод повыш глюкозы	СД 2 типа	пельгер	NA

Продолжение Приложения 4 – таблица фенотипических признаков пациентов с патогенными вариантами на с-конце

№	год	статья	вариант	ССС	ДС	ЛОР	Иммун.	Офтальм.	Скелет	Неврол.	Внутр.	Эндокр.	Кроветв.	Другое
3	2020	Complex Multisystem Phenotype With Immunodeficiency Associated With NBAS Mutations: Reports of Three Patients and Review of the Literature	c.5741G>A, p.Arg1914His; ex. 35-47 del.	NA	пневмония	частые инфекции и с 6 мес; фарингит	гипогаммаглобулинемия; уменьш Б-клеток, ИгМ, ИгГ, ИгА	NA	первый перелом в 5 лет, затем в 6; рост-93 вес-возраст-5; тяжелый остеопороз	интеллект отстав	гастроэнтерит; повыш АЛТ АСТ в год; повыш АЛТ АСТ ЛДГ в 5 лет; УЗИ диффуз изм паренхимы печени; на биопсии печени без фиброза	NA	пельгер	NA
4	2020	A 34-year-old Japanese patient exhibiting NBAS deficiency with a novel mutation and extended phenotypic variation	p.Arg1914His, splice site variant, c.6433-2A>G	NA	с года начал болеть пневмонией	NA	гипогаммаглобулинемия в 14 мес	экзофтальм; микроретрогнатия; ЧАЗН; миопия; глаукома в 17 лет	Маленькие руки и ноги; в 17 лет открытый родничок, укорочение фаланг, спондилолиз L5 ; рост-124 вес-30 возраст-34;	и мышечной гипотрофией; получал лечение от эпилепсии, анемия возможно изза лечения; нормальные майлстоуны; интеллект отстав; по МРТ мозга всё норм;	АЛТ АСТ повыш при рождении; эпизод АЛФ в 8 мес с гепатомегалией; еще три АЛФ потом;; ПГ, спленомагалия; в 34 гидроторакс печеночный, фиброз печени;	инсулин-зависимый СД к 6 годам но не типичный 2 типа или 1 типа	из-за спленомагалии лейкопения и тромбоцитопения; аутоиммунная гемолитическая анемия дважды с 20 лет; пельгер;	NA

Продолжение Приложения 4 – таблица фенотипических признаков пациентов с патогенными вариантами на с-конце

№	год	статья	вариант	ССС	ДС	ЛОР	Иммун.	Офтальм.	Скелет	Неврол.	Внутр.	Эндокр.	Кроветв.	Другое
5	2021	Foveal hypoplasia in short stature with optic atrophy and Pelger-Hu€ et anomaly syndrome with neuroblastoma-amplified sequence (NBAS) gene mutation	c. 5741G.A	NA	NA	NA	NA	ахроматопсия; нистагм; ЧАЗН;	рост-95 вес-14 возраст-4;	эпизод судорог и повыш темп в 9 мес но на МРТ и сонографии норм; нормальный интеллект;	эпизод повыш АЛТ АСТ; биопсия печени норм	NA	пельгер	NA
6	2021	Foveal hypoplasia in short stature with optic atrophy and Pelger-Hu€ et anomaly syndrome with neuroblastoma-amplified sequence (NBAS) gene mutation	NBAS gene mutation	NA	NA	NA	NA	ахроматопсия; ЧАЗН	NA	нормальный интеллект	эпизод повыш АЛТ АСТ; биопсия печени норм	NA	пельгер	NA
7	2018	Mutations in the Neuroblastoma Amplified Sequence gene in a family affected by Acrofrontofacionasal Dysostosis type 1	c.6237-3C>G intronic region close to exon 48 canonical acceptor splice site	NA	NA	NA	NA	ЧАЗН; экзотропия	мышечная гипотония; рост-78 вес-7,250 возраст -2,6	нейропсихическая задержка; слегка истонченно е мозолистое тело на МРТ; пирамидные знаки; интеллект отстав; эпилепсия;	NA	NA	NA	NA

Продолжение Приложения 4 – таблица фенотипических признаков пациентов с патогенными вариантами на с-конце

№	год	статья	вариант	ССС	ДС	ЛОР	Иммун.	Офтальм.	Скелет	Неврол.	Внутр.	Эндокр.	Кроветв.	Другое
8	2018	Mutations in the Neuroblastoma Amplified Sequence gene in a family affected by Acrofrontofacionasal Dysostosis type 1	c.6237-3C>G intronic region close to exon 48 canonical acceptor splice site	небольшой дефект межжелудочковой перегородки	NA	смешанная тугоухость	NA	атрофия зрительных нервов	на рентгене скелетные аномалии; лордоз сколиоз;	умственная отсталость; аномалии ЭЭГ; МРТ мозга норм; эпилепсия	NA	NA	NA	NA
9	2021	Study of Acute Liver Failure in Children Using Next Generation Sequencing Technology	c.4731_4733dup; p.Tyr1578dup	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	ОПН	NA	NA	NA
10	2022	NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis	p.K1517E/p.P1474L	NA	NA	NA	ГЛГ; цитотоксичность НК понижена; аутоиммунное воспаление	NA	NA	ЦНС норм	Аст АЛТ резко повыш	NA	цитопения; анемия; нейтропения; гемофагоцитоз; гиперферритинемия;	NA
11	2022	NBAS, a gene involved in cytotoxic degranulation, is recurrently mutated in pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis	p.E2269K/p.E1521Q	NA	NA	NA	ГЛГ; цитотоксичность НК понижена	NA	NA	ЦНС норм	сплеомегалия; повыш АСТ	NA	цитопения; нейтропения; гиперТГ; гемофагоцитоз; гиперферритинемия	NA

Продолжение Приложения 4 – таблица фенотипических признаков пациентов с патогенными вариантами на с-конце

№	год	статья	вариант	ССС	ДС	ЛОР	Иммун.	Офтальм.	Скелет	Неврол.	Внутр.	Эндокр.	Кроветв.	Другое
12	2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	c.(6840G>T); p.(?) C-terminal c.(6840G>T); p.(?) C-terminal	NA	NA	NA	NA	ЧАЗН; вращательный нистагм	синдактилия 2 и 3 на ногах, отставание в скелет созревании	отстав в мотор развитии; мышцы норм	эпизод повыш АСТ АЛТ	NA	пельгер; сниж ИгГ	NA
13	2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	c.(6966_6969delins TC); p.(Gln2322Hisfs*18) C-terminal c.(5547del C); p.(Trp1850Glyfs*32) n.a.	NA	пневмонии; ателектаз	частые инфекции	NA	ЧАЗН	скелет норм!	отстав в мотор развитии	эпизод повыш АСТ АЛТ	NA	нейтропения; сниж ИгГ; сниж НК; сниж ответа на вакцинацию	NA
14	2020	Defining clinical subgroups and genotype–phenotype correlations in NBAS-associated disease across 110 patients	c.(5740C>G); p.(Arg1914Gly) C-terminal c.(6877del C); p.(Leu2293Cysfs*9) n.a.	NA	NA	NA	NA	ЧАЗН	замедленное созревание скелета; снижение минеральной плотности кости; замедленное закрытие черепных швов; мышечная гипотония и гипотрофия	отстав в мотор развитии	NA	NA	нейтропения; сниж ИгГ; пельгер	NA

Окончание Приложения 4 – таблица фенотипических признаков пациентов с патогенными вариантами на с-конце

№	год	статья	вариант	ССС	ДС	ЛОР	Иммун.	Офтальм.	Скелет	Неврол.	Внутр.	Эндокр.	Кроветв.	Другое
15	2020	Oculofacial alterations in NBAS-SOPH like mutations: Case report	NBAS-SOPH like mutation	NA	NA	NA	NA	страбизм; нистагм; миопия; ЧАЗН	задержка зубного развития	ментальное отставание	АЛТ Аст повыш	NA	NA	NA
16	2017	Short stature, optic nerve atrophy and Pelger-Huët anomaly syndrome with antibody immunodeficiency and aplastic anemia: a case report and literature review	c.5741C>T, pR1914H and c.6496-6497insA, p.S2166Ffs*	NA	NA	NA	Гипогаммаглобулинемия, сниж Б кл	атрофия ЗН, экзофтальм	низкий рост, остеопороз	NA	Гепатомегалия, АЛТ АСТ повыш	NA	пельгер, апластическая анемия, гипоплазия эритроид роста	сниж эластичности кожи, прогероидная внешность
17	2017	High diagnostic yield of clinically unidentifiable syndromic growth disorders by targeted exome sequencing	c.6572+1delG and p.Arg1914His	NA	NA	NA	гипогаммаглобулинемия	атрофия ЗН, экзофтальм	низкий рост, брахидактилия	На МРТ увеличенное J-образное турецкое седло и множественные червеобразные кости;	рецидивирующий гепатит	NA	пельгер	сниж эластичности кожи;
18	2017	High diagnostic yield of clinically unidentifiable syndromic growth disorders by targeted exome sequencing	c.6572+1delG and p.Arg1914His	NA	NA	NA	гипогаммаглобулинемия	атрофия ЗН, экзофтальм	низкий рост, брахидактилия	На МРТ увеличенное J-образное турецкое седло и множественные червеобразные кости	рецидивирующий гепатит	NA	пельгер	сниж эластичности кожи;

**ПРИЛОЖЕНИЕ 5 – ТАБЛИЦА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ НАРУШЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКА
ПРИ ПАТОГЕННЫХ ВАРИАНТАХ ИНСТРУМЕНТОМ FOLDX**

ID	Domain 1	Protein 1	Stability 1 (ddG, ccal/mol)	Domain 2	Protein 2	Stability 2 (ddG, ccal/mol)
7	b-пропеллер	Gly254Asp	13,12	b-пропеллер	Gly254Asp	13,12
33	C-terminal	Arg1914His	11,93	C-terminal	Arg1914His	11,93
34	C-terminal	Arg1914His	11,93	C-terminal	Arg1914His	11,93
14	SEC39	Trp845Cys	4,99	C-terminal	Arg1914His	11,93
27	b-пропеллер	Ser343Asn	2	C-terminal	Arg1914His	11,93
15	b-пропеллер	Leu271Pro	8,59	b-пропеллер	Leu271Pro	8,59
22	SEC39	Gln1201Pro	7,76	SEC39	Gln1201Pro	7,76
37	SEC39	Gln1201Pro	7,76	SEC39	Gln1201Pro	7,76
38	SEC39	Gln1201Pro	7,76	SEC39	Gln1201Pro	7,76
6	b-пропеллер	Arg137Trp	2,31	b-пропеллер	Val253Gly	6,01
43	SEC39	Cys1199Tyr	5,42	SEC39	Cys1199Tyr	5,42
31	N-intermediate	R517C	1,14	C-terminal	L1549P	5,25
24	SEC39	Trp845Cys	4,99	SEC39	Trp845Cys	4,99
25	SEC39	Trp845Cys	4,99	C-terminal	Ala1921Pro	4,91
26	b-пропеллер	Gly340Arg	6,35	C-terminal	Arg1914Cys	4,68
17	SEC39	Pro777His	4,38	SEC39	Pro777His	4,38
18	SEC39	Pro777His	4,38	SEC39	Pro777His	4,38
5	b-пропеллер	Arg137Trp	2,31	N-intermediate	Trp396Arg	3,72
42	SEC39	Ile984Ser	2,99	b-пропеллер	Arg136Gly	3,67
45	SEC39	R1073C	1,36	C-terminal	M1743V	3,28
16	SEC39	Thr731Pro	3,07	SEC39	Thr731Pro	3,07
39	N-intermediate	Val519Glu	2,73	N-intermediate	Val519Glu	2,73
19	SEC39	His940Pro	2,62	SEC39	His940Pro	2,62
30	SEC39	His940Pro	2,62	SEC39	His940Pro	2,62
36	SEC39	Pro937Ala	2,59	SEC39	Pro937Ala	2,59
46	C-terminal	K1517E	0,53	C-terminal	P1474L	2,40

Окончание Приложения 5 – таблица результатов исследования нарушения стабильности белка при патогенных вариантах инструментом FoldX

ID	Domain 1	Protein 1	Stability 1 (ddG, ccal/mol)	Domain 2	Protein 2	Stability 2 (ddG, ccal/mol)
4	SEC39	Leu903Arg	2,37	SEC39	Leu903Arg	2,37
12	SEC39	Leu903Arg	2,37	SEC39	Leu903Arg	2,37
1	b-пропеллер	Arg137Trp	2,31	b-пропеллер	Arg137Trp	2,31
2	b-пропеллер	Arg137Trp	2,31	b-пропеллер	Arg137Trp	2,31
3	b-пропеллер	Arg137Trp	2,31	b-пропеллер	Arg137Trp	2,31
23	b-пропеллер	Cys256Tyr	9,37	N-intermediate	Phe671Cys	2,16
9	N-intermediate	Pro650Ser	1,83	N-intermediate	Pro650Ser	1,83
8	b-пропеллер	Gly340Arg	6,35	SEC39	Val892Phe	1,62
41	N-intermediate	R517C	1,14	b-пропеллер	E151K	1,61
44	C-terminal	Q2232E	1,38	N-intermediate	P454R	1,17
32	N-intermediate	Leu422Pro	1,36	N-intermediate	Arg517Cys	1,14
40	b-пропеллер	Ala103Thr	-0,65	C-terminal	Phe1707Ile	0,64
28	SEC39	Tyr747Asp	4,17	C-terminal	Arg2335Trp	0,23
13	SEC39	Ser1129Phe	-0,43	N-terminal	Met1Leu	0,21
11	SEC39	Arg941His	0,15	SEC39	Arg941His	0,15
47	C-terminal	E2269K	-0,71	C-terminal	E1521Q	-0,01
10	SEC39	Arg873Trp	-0,10	SEC39	Arg873Trp	-0,10
29	SEC39	Ser1129Phe	-0,43	b-пропеллер	Gly292Glu	-0,15
48	C-terminal	Y1495H	0,93	SEC39	T1097M	-0,40
20	SEC39	Ser1129Phe	-0,43	SEC39	Ser1129Phe	-0,43
21	SEC39	Ser1129Phe	-0,43	SEC39	Ser1129Phe	-0,43
35	N-terminal	Arg64His	-0,52	N-intermediate	Val568Ile	-0,66

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю, доктору медицинских наук, доценту Надежде Романовне Максимовой за доверие в выборе подходов к исследованию, терпение и поддержку, благодаря которым стало возможным выполнение данной диссертационной работы.

Отдельную благодарность выражаю моему наставнику, кандидату медицинских наук Филиппу Филипповичу Васильеву за высокий профессиональный пример отношения к своему делу, задающий стандарт работы исследователя в якутской генетике. Именно благодаря его помощи и поддержке я преодолевал трудности и завершал этапы исследования, как в рамках диссертации, так и в других научных проектах.

Особая признательность моим коллегам из научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная медицина и генетика человека» МИ СВФУ за открытость, бесконечные разговоры на кухне, помощь и поддержку в трудные периоды. Эта атмосфера доброжелательности и чувство «общего дела» стали важнейшим условием завершения диссертационной работы. Хочу особо поблагодарить кандидата медицинских наук Айталину Лукичну Сухомясову за всестороннюю помощь и поддержку в организации работы, кандидатов биологических наук Александру Еремеевну Яковлеву, Афанасия Ивановича Федорова и Анастасию Лукичну Данилову за шутки, доброту и постоянное внимание. Мою руководительницу отдела протеомики Миру Таиржановну Саввину благодарю за понимание к моим опаздываниям и доброжелательное отношение. Также выражаю благодарность Елизавете Егоровне Гуриновой за увлекательные клинические истории, из которых рождаются идеи для новых исследований.

Благодарю коллег из Медико-генетического центра г. Якутска за собранный материал, совместную работу, участие в экспедициях, которые стали не только профессионально полезными, но и запоминающимися. Отдельная благодарность Архипу Николаевичу Слепцову за прием пациентов с SOPH-синдромом и приятную компанию даже в отпуск, а также Алексею Алексеевичу Сивцеву за биоинформатические дискуссии и продуктивные споры.

В рамках работы над статьями хочу отдельно выразить признательность коллегам и друзьям из разных институтов и стран. Благодарю Анастасию Русанову за помощь в оформлении молекулярных структур гена и белка NBAS в моей первой научной публикации в рамках диссертации. Отдельное спасибо Татьяне Васильевой за содействие в сборе клинических данных пациентов, Анатолию Зубрицкому за рецензию раздела обсуждения, Софрону Долгунову за помощь с переводом, а Антону Желонкину — за разработку концепции сводной таблицы моей второй публикации, посвященной клиническим проявлением SOPH у 93 якутских пациентов. Я благодарен Валерии Ладыгиной и Xiaoqin Zou за помощь с программным обеспечением на ранних этапах исследования, Анне Королевой, Алексею Финкельштейну, Дмитрию Иванкову и Василию Раменскому — за ценные дискуссии по вопросам применения AlphaFold и дизайна исследования в моей третьей публикации об использовании AlphaFold при анализе мультисистемного фенотипа «moonlighting» белков. Также выражаю признательность Михаилу Слижень за помощь в интерпретации данных масс-спектрометрии и обсуждение потенциальных белковых взаимодействий NBAS.

Наконец, хочу поблагодарить свою семью — маму и бабушку — за любовь, заботу и веру в меня. Ваша моральная поддержка и бесконечное тепло всегда были и будут источником сил и вдохновения!