

Редкие варианты митохондриальной ДНК у ребенка с энцефаломиопатией

А.С. Воронкова, Н.А. Литвинова, Е.А. Николаева, В.С. Сухоруков

ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева» ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, Москва, Россия

Rare variants of mitochondrial DNA in a child with encephalomyopathy

A.S. Voronkova, N.A. Litvinova, E.A. Nikolaeva, V.S. Sukhorukov

Academician Yu.E. Veltishchev Research Clinical Institute of Pediatrics, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Проводится клиническое наблюдение ребенка с подозрением на митохондриальную энцефаломиопатию: циклическая рвота, выраженная утомляемость, мышечная слабость, головная боль, трудности усвоения школьного материала. Сходная симптоматика отмечена у старшего сибса, мать страдает сахарным диабетом 1-го типа. Проведено секвенирование полного митохондриального генома пробанда. Несмотря на то что достоверно патогенных вариантов не выявлено, был обнаружен ряд индивидуальных особенностей митохондриальной ДНК, которые могут иметь клиническую значимость. Особый интерес представляют два варианта: m.T8477C и m.C12562G, обладающие достаточно высоким патогенным потенциалом. Для установления их роли требуются дальнейшие исследования митохондриальной ДНК матери и сибса.

Ключевые слова: дети, энцефаломиопатия, митохондрии, митохондриальная ДНК, секвенирование, m.T8477C, m.C12562G.

Для цитирования: Воронкова А.С., Литвинова Н.А., Николаева Е.А., Сухоруков В.С. Редкие варианты митохондриальной ДНК у ребенка с энцефаломиопатией. Рос вестн перинатол и педиатр 2016; 61: 5: 42–46. DOI: 10.21508/1027–4065–2016–61–5–42–46

The paper considers a clinical case of a child with suspected mitochondrial encephalomyopathy: cyclic vomiting, evident fatigue, muscle weakness, headache, and difficulties in learning school material. The similar symptoms are noted in an older sibling; the mother suffers from type 1 diabetes mellitus. The entire mitochondrial genome was sequenced in the proband. Despite the fact that significantly pathogenetic variants have not been identified, there are a number of individual mitochondrial DNA characteristics that may be of clinical significance. Of particular interest are two variants: m.T8477C and C12562G, which have a sufficiently high pathogenic potential. To establish their role requires further investigations of mitochondrial DNA in the mother and sibling.

Keywords: children, encephalomyopathy, mitochondria, mitochondrial DNA, sequencing, m.T8477C, m.C12562G.

For citation: Voronkova A.S., Litvinova N.A., Nikolaeva E.A., Sukhorukov V.S. Rare variants of mitochondrial DNA in a child with encephalomyopathy. Ros Vestn Perinatol i Peditr 2016; 61: 5: 42–46 (in Russ). DOI: 10.21508/1027–4065–2016–61–5–42–46

Митохондриальные болезни — группа генетических заболеваний, которые характеризуются первичным нарушением митохондриального окислительного фосфорилирования — важнейшего этапа клеточного дыхания. Этот процесс, жизненно необходимый для работы практически всех клеток организма, локализован на внутренней мембране митохондрий [1].

Белки окислительного фосфорилирования находятся под двойным генетическим контролем митохондриального и ядерного геномов. Кольцевой митохондриальный геном (мтДНК) состоит всего из 16 569 пар оснований, но присутствует во множестве копий почти во всех клетках организма. мтДНК кодирует только 37 генных продуктов, из которых 13 — полипептидные структурные субъединицы дыхательных комплексов, 22 — транспортные РНК (тРНК) и 2 — рибосомальные РНК (рРНК), необходимые для их синтеза. Остальная часть митохондриального протеома, включая

большую часть респираторных комплексов, их сборочных и вспомогательных факторов, а также белки, необходимые для поддержания и экспрессии мтДНК, белкового синтеза и митохондриальной динамики, кодируется ядерной ДНК, синтезируется в цитозоле и затем импортируется внутрь митохондрии [1].

Митохондриальные энцефаломиопатии — распространенная форма митохондриальных заболеваний. Причиной являются нарушения генов, отвечающих за важнейшие функции митохондрий. Вызывать нарушения могут варианты как митохондриальной ДНК, так и ядерно-кодируемых митохондриальных генов. Более 50% синдромных и несиндромных форм энцефаломиопатий при этом связаны с вариантами именно мтДНК [2]. Ниже (табл. 1) приведены ключевые митохондриально-кодируемые синдромы, а также гены, дефекты которых обуславливают указанные синдромы.

Наиболее тяжелые формы митохондриальных энцефаломиопатий вызываются, как правило, мутациями в генах *АТР6* и РНК. Нарушения тРНК приводят к существенному снижению синтетической активности органеллы: падает уровень белковой продукции [2]. Белок же, кодируемый геном *АТР6*, является необходимой частью комплекса V дыхательной цепи (F_1F_0 -АТФ-синтазы), которая функционирует как ионный канал, используя межмембранный протонный градиент

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: Воронкова Анастасия Сергеевна — н. сотр. научно-исследовательской лаборатории общей патологии НИКИ педиатрии имени академика Ю.Е. Вельтищева

Литвинова Наталия Александровна — н. сотр. лаборатории

Сухоруков Владимир Сергеевич — д.м.н., проф., зав. лабораторией

Николаева Екатерина Александровна — д.м.н., и.о. рук. отдела психоневрологии и наследственных заболеваний с нарушением психики

125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2.

Таблица 1. Типичные митохондриальные синдромы и связанные с ними гены, согласно сведениям литературы [2]

Синдром	Гены
MELAS	<i>MTTL1, MTTQ, MTTH, MTTK, MTTC, MTND1, MTND4, MTND5, MTND6, MTTS1, MTTS2</i>
MERRF	<i>MTTK, MTTL1, MTTH, MTTF, MTTS1, MTTS2</i>
NARP	<i>MTATP6</i>
LS	<i>MTND2, MTND3, MTND5, MTND6</i>
LHON	<i>MTCOI, MTCO3, MTCYB, MTATP6, MTND1, MTND2, MTND4, MTND5, MTND6</i>
MIDD	<i>MTTL1, MTTE, MTTK</i>
KSS	Крупные делеции, <i>MT-TL, MT-TK</i>

Примечание. MELAS — митохондриальная энцефаломиопатия, лактат-ацидоз, инсультоподобные эпизоды; MERRF — миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами; NARP — невропатия, атаксия, пигментная дегенерация сетчатки; LS — синдром Ли; LHON — наследственная оптическая нейропатия Лебера; MIDD — наследуемый по материнской линии синдром диабета и глухоты; KSS — синдром Кернса—Сейра.

для синтеза АТФ, универсального источника энергии клетки [2].

Основной диагностической загадкой остается возможность формирования клинических картин таких разных заболеваний, как MERRF и MELAS за счет однотипных мутаций в определенных точках генов тРНК (например, точечная замена А3243G). Следует отметить, что мутации генов тРНК в других точках не имеют таких существенных подтвержденных последствий для организма. В то же время описано как минимум девять различных мутаций гена *ATP6*, которые приводят к синдромам NARP, MILS и др. [3].

Превалирует на сегодняшний день теория о накоплении соответствующей мутации в тканях и органах, поражение которых характерно для синдрома. Эта теория косвенно подтверждена иммуногистохимическими исследованиями [3]. Однако широко распространена и теория о влиянии так называемых вторичных (т.е. являющихся звеном формирования патогенеза) нарушений мтДНК. Вторичные изменения имеют менее явный характер поражения: они могут способствовать увеличению восприимчивости к различным заболеваниям или действовать синергично с патогенными вариантами. Вторичные варианты мало описаны в литературе и редко ассоциируются с заболеваниями. Выявление и исследование патогенетического потенциала таких вариантов представляет особую значимость.

В среднем каждый человек несет около 30 вариантов мтДНК, отличающихся от принятой референсной последовательности. В зависимости от этнической принадлежности число отклонений от референса может достигать 100 и более вариантов [4]. Большинство из них имеет высокую встречаемость в субпопуляциях и поэтому признано непатогенными. В то же время практически любой человек является носителем в среднем пяти редких или новых вариантов, которые могут быть ассоциированы с заболеваниями или не описаны в литературе. Каждый из таких вариантов может являться определяющим фактором при развитии заболевания. В связи с этим корректная интерпретация потенциальной патогенности редких и новых вариантов крайне важна для выяснения

их клинической значимости. Вариант может быть классифицирован как вредоносный в том случае, если несущая его митохондрия имеет дефекты в функционировании дыхательной цепи. Это должно быть подтверждено функциональными исследованиями, трансмитохондриальными гибридами и т.д. Однако такие исследования требуют больших временных и финансовых затрат. Зачастую нет возможности и необходимости проводить подобные исследования для каждого обнаруженного редкого или нового варианта. Поэтому необходим предварительный анализ полученных результатов с помощью коммерческих и открытых баз данных, алгоритмов исследования белковой структуры и предсказания патогенности вариантов. Такой анализ будет представлен в настоящей статье.

Характеристика пациента и методы исследования

Ребенок П., 4 лет, впервые был обследован в отделении психоневрологии и наследственных заболеваний ОСП НИКИ педиатрии им. Ю.Е. Вельтищева. Поступил с жалобами на периодические приступы бледности, тошноты, рвоты, вялости, головной боли. В родословной случай повторный — у старшей сестры 8 лет имеются аналогичные жалобы. У матери через 6 мес после рождения мальчика манифестировал сахарный диабет 1-го типа.

Ребенок от второй физиологически протекавшей беременности. Роды вторые на 38-й неделе плановым кесаревым сечением. При рождении масса тела 2450 г, длина 49 см, оценка по шкале Апгар 7/8 баллов. Раннее развитие протекало по возрасту. С 1,5 лет появились приступы боли в животе с тошнотой, рвотой, вялостью, сопровождались появлением запаха ацетона. Позднее присоединились приступы головной боли. При обследовании однократно была выявлена гипогликемия 2,4 ммоль/л. Наблюдался педиатром и неврологом по месту жительства. При обследовании в нашей клинике в возрасте 4 лет обращала внимание задержка физического развития: рост — 94 см (10-й перцентиль), масса тела — 12 кг (<3-го перцентиль). Отмечена задержка темпов психоречевого развития,

моторная неловкость, нечеткость выполнения координаторных проб, умеренная диффузная мышечная гипотония, гипотрофия, симптом Бабинского справа. Кожные покровы чистые. В легких дыхание везикулярное. Сердечные тоны ясные, ритмичные. Живот мягкий, безболезненный. Печень и селезенка не пальпируются. Стул, диурез в норме. Слух и зрение не нарушены.

Изменений в клинических анализах крови и мочи, биохимическом анализе крови не обнаружено. Ацидоза, гиперлактатацидемии нет. На электроэнцефалограмме (ЭЭГ) патологических изменений не выявлено. По данным ультразвукового исследования (УЗИ) нарушений внутренних органов не обнаружено. При повторных исследованиях мочи методом газожидкостной хроматографии — хроматомасс-спектрометрии выявлена дикарбоновая и монокрбоновая ацидурия, повышенная экскреция гидроксималяной и янтарной кислот. В спектре аминокислот и ацилкарнитинов крови изменений не обнаружено (метод тандемной масс-спектрометрии). Таким образом, были исключены болезни группы органических ацидурий и дефектов окисления жирных кислот. Установлен диагноз: циклические ацетонемические состояния (рвота), задержка физического и темпов психоречевого развития.

В дальнейшем на фоне соблюдения диетических рекомендаций (снижение квоты липидов в рационе, частое дробное питание) и курсов левокарнитина произошло улучшение состояния: исчезли приступы боли в животе, тошноты и рвоты. Однако сохранялись жалобы на выраженную утомляемость, мышечную слабость, головную боль, трудности усвоения школьного материала. В связи с подозрением на митохондриальный генез патологии (в том числе учитывая данные родословной — аналогичное заболевание у сибса, наличие сахарного диабета у матери) было произведено секвенирование по Сэнгеру полной последовательности мтДНК ребенка.

ДНК выделялась из сухих капель крови. Далее проводилась амплификация мтДНК с использованием 50 пар праймеров, полученные фрагменты секвенировались с помощью BigDye Terminator (Applied Biosystems Inc, США) на генетическом анализаторе ABI 3500.

Базы данных и инструменты анализа митохондриальных вариантов

Полученные данные сравнивались с пересмотренной Кембриджской референсной последовательностью (rCRS): GenBank NC_012920 gi:251831106.40.4. Применяли программное обеспечение Applied Biosystems: Sequencing Analysis 6, Seqscape Software 3.

Для анализа выявленных отличий от референсной последовательности использовали международные базы данных: PhyloTree, MITOMAP, The Human Mitochondrial Genome Database, The Mamit-tRNA database.

PhyloTree (<http://www.phyloree.org/>) [5] содержит наиболее полную информацию о митохондриальном

филогенетическом древе человека [6]. Частота встречаемости вариантов в разных гаплогруппах неодинакова. Если редкие варианты обычно встречаются в определенной гаплогруппе, то низкие аллельные частоты могут быть связаны с недостаточной этнической представленностью в базе данных. Зачастую у одного человека может обнаруживаться несколько гаплогрупповых мотивов. Гаплогруппу принято определять по доминирующему мотиву, при этом варианты, ассоциированные с другими гаплогруппами, считаются непатогенными [5].

MITOMAP (<http://www.MITOMAP.org/MITOMAP>) [7] содержит данные как публичных, так и коммерческих ресурсов; является основным источником информации по митохондриальным вариантам. Все варианты в нем разделены на две категории: полиморфизмы и мутации. К полиморфизмам относятся непатогенные, соматические и неопубликованные варианты. К мутациям относятся подтвержденные патогенные или ассоциированные с каким-либо заболеванием варианты.

The Human Mitochondrial Genome Database (mtDB) (<http://www.mtDB.igp.uu.se/>) [8] содержит около 3000 митохондриальных геномов здоровых людей и является важным инструментом для определения частоты встречаемости. Для определения варианта мтДНК как редкого используется пороговая аллельная частота $\leq 0,2\%$. Следует отметить, что представленность разных этнических групп (и соответственно, гаплогрупп) на данном ресурсе сильно различается. Некоторые варианты могут оказаться редкими только в связи с недостаточной представленностью российской популяции.

The Mamit-tRNA database (<http://mamit-trna.u-strasbg.fr/human.asp>) [9] содержит информацию о тРНК млекопитающих и используется для оценки значения варианта в генах тРНК митохондрий.

Классификация вариантов мтДНК в нашем исследовании

При интерпретации полученных вариантов мтДНК основным документом является рекомендация по классификации митохондриальных вариантов, выпущенная в 2012 г. исследовательской группой Американского колледжа генетики и геномики [10]. В ней предлагается рассматривать варианты в рамках трех групп:

1. *Непатогенный вариант* — вариант обозначен на MITOMAP как «полиморфизм»; нет сведений о его ассоциированности с заболеваниями в популяционных или семейных исследованиях; его аллельная частота в mtDB $\geq 0,2\%$.

2. *Неклассифицированный вариант* — любой вариант, соответствующий по крайней мере одному из следующих критериев:

- новый вариант;
- редкий вариант, который обозначен на MITOMAP как «полиморфизм», но его нет в базе mtDB или частота его встречаемости $\leq 0,2\%$;

в) редкий вариант, обозначенный в литературе или на MITOMAP как «мутация» на основании исследования одной семьи или одной статьи без функциональных исследований его патогенности.

Неклассифицированные варианты в этой категории должны быть дополнительно оценены *in silico* инструментами по предсказанию структуры белка или с помощью других баз данных:

1) для миссенс-вариантов, эволюционной консервативности и компьютерных алгоритмов используют *in silico* предсказания патогенности;

2) если вариант мтДНК встречается в одном из митохондриальных tРНК генов, используется база данных Mamit-tRNA.

3. *Патогенный вариант* — вариант, который обозначен как «подтвержденная мутация» на MITOMAP; был описан в нескольких клинических исследованиях отдельных пациентов или семей; содержит функциональные исследования.

Результаты

Полученные отличия от референсной последовательности представлены в табл. 2. Всего найдено: 32 варианта. Гаплогруппа: U5b (U5b1e1).

К гаплогрупповым мотивам относятся 27 (84%) вариантов. Эти варианты считаются непатогенными. Согласно данным литературы, подобная картина наблюдается практически всегда: в среднем 70–95% найденных вариантов являются маркерами гаплогрупп [11, 12]. Причина заключается в том, что референсная последовательность rCRS относится к гаплогруппе H2a2a. Если исследуемый образец относится к другой гаплогруппе, число точечных отклонений от референса может колебаться от 20 до 100.

Также были исключены из рассмотрения крайне полиморфные варианты, прежде описанные в литературе в гипервариабельных сегментах контрольного региона митохондриального генома 303–315 и 522–523 [11]. Таким образом, в фокус нашего исследования попали варианты, представленные в табл. 3.

Согласно указанным ранее критериям (аллельная частота в mtDB $\leq 0,2\%$, вариант обозначен на MITOMAP как полиморфизм), эти варианты относятся к неклассифицированным. A9644G приводит к синонимичной замене, в связи с чем вероятность его патогенности минимальна. T8477C является миссенс- (т.е. приводит к замене аминокислоты в белке) вариантом в гене субъединицы 8 АТФазы, C12562G является миссенс вариантом в *cor*-субъединице 5 НАДН-убихинон-оксидоредуктазы. В табл. 4 приведены показатели, позволяющие оценить потенциальную патогенность найденных вариантов.

Как упоминалось выше, *in silico* оценка носит предварительный характер и может быть использована только в качестве основания для дальнейших исследований. В данном случае оценки *in silico* различных алгоритмов расходятся. Вариант m.C12562G находится

Таблица 2. Результаты наложения полученного сиквенса пациента П. на референсную последовательность rCRS

Позиция нуклеотида	Значение в rCRS	Значение в образце
73	A	G
150	C	T
263	A	G
314	T	Инсерция TCC
523	CA	Делеция
750	A	G
1438	A	G
2706	A	G
2757	A	G
3197	T	C
4769	A	G
5656	A	G
7028	C	T
7768	A	G
8337	T	C
8477	T	C
8860	A	G
9477	G	A
9644	A	G
10283	A	G
11467	A	G
11719	G	A
12308	A	G
12372	G	A
12562	C	G
12616	T	C
13617	T	C
14182	T	C
14766	C	T
15326	A	G
16270	C	T
16465	C	T

в достаточно консервативном локусе белка, что указывает на его значимость. Кроме того, несинонимичные замены могут иметь вторичный характер; влиять на структуру белка не напрямую, а опосредованно — через ДНК-зависимые регуляторные факторы, взаимосвязи с ядерными генами и т.д. Как известно, индивидуальные точечные особенности мтДНК могут иметь латентные патогенные свойства, проявление которых зависит от внешних и наследственных факторов [6]. В связи с предположительно митохондриальным генезом клинических проявлений у ребенка имеются основания считать, что обнаруженные варианты

Таблица 3. Варианты-кандидаты на патогенное влияние

Вариант	Локус	Тип а/к замены	Аллельная частота в mtDB, %	Обозначение на MITOMAP
m.T8477C	MTATP8	Несинонимичная S→P	0	Полиморфизм
m.A9644G	MTCO3	Синонимичная W→W	0,03	Полиморфизм
m.C12562G	MTND5	Несинонимичная L→V	0	Полиморфизм

Примечание. Здесь и в табл. 4: а/к — аминокислотная.

Таблица 4. Данные in silico инструментов предсказания значения аминокислотной замены

Вариант	А/к замена	Предсказанная патогенность			Консервативность локуса аминокислоты, MITOMAP
		PolyPhen	Provean	Sift	
m.T8477C	p.S38P	Непатогенный (оценка 0,02)	Непатогенный (оценка -1,841)	Непатогенный (оценка -0,31)	17%
m/C12562G	p.L76V	Скорее всего патогенный (оценка 0,996)	Непатогенный (оценка -2,295)	Непатогенный (оценка 0,31)	80%

Примечание. PolyPhen — in silico инструмент для предсказания потенциальной вредоносности аминокислотной замены. Оценивает вариант от 0 (непатогенный) до 1 (патогенный); Provean — in silico инструмент для предсказания потенциальной вредоносности аминокислотной замены. Оценка проводится на основании порогового значения: оценки менее -2,5 свидетельствуют в пользу патогенности варианта; Sift — in silico инструмент для предсказания потенциальной вредоносности аминокислотной замены. Оценивает вероятность изменения функции белка при аминокислотной замене. Достоверной считает оценку (вероятность) <0,05; консервативность аминокислотного локуса оценивается на основании пептидных последовательностей 45 видов позвоночных животных. Приводится процентная доля видов, для которых характерно то же аминокислотное основание в данном локусе, что и для rCRS.

потенциально могут вносить вклад в развитие патологических процессов.

Заключение

Проведено молекулярно-генетическое исследование митохондриальной ДНК ребенка с подозрением на митохондриальный генез патологии. Несмотря на то что достоверно патогенных вариантов у пациента не выявлено, некоторые из обнаруженных особенностей мтДНК могут иметь клиническую значимость.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

- Chinnery P., Hudson G. Mitochondrial genetics. Br Med Bull 2013; 106: 1: 135–159.
- Schon E., DiMauro S., Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutation. Nat Rev Genet 2012; 13: 12: 878–890.
- He Y., Jian Wu J., Iacobuzio-Donahue C. et al. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumor cells. Nature 2010; 464: 7288: 610–614.
- Ingman M., Kaessmann H., Pääbo S. et al. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. Nature 2000; 408: 708–713.
- Oven M., Kayser M. Updated Comprehensive Phylogenetic Tree of Global Human Mitochondrial DNA. Var Hum Mut Mutation in Brief 2008; 30: E394.
- Сухоруков В.С., Воронкова А.С., Литвинова Н.А. Клиническое значение индивидуальных особенностей митохондриальной ДНК. Рос вестн перинатол и педиатр 2015; 60: 2: 10–20. (Sukhorukov V.S., Voronkova A.S., Litvinova N.A. Clinical value of specific features of mitochondrial DNA Ros vestn perinatol i pediatri 2015; 60: 2: 10–20. (in Russ))
- Ruiz-Pesini E., Lott M., Procaccio V. et al. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. Nucleic Acids Res 2007; 35: D823 — D828.
- Ingman M., Gyllenstein U. MtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences. Nucleic Acids Res 2006; 34: D749 — D751.
- Pütz J., Dupuis B., Sissler M. et al. Mamit-tRNA, a database of mammalian mitochondrial tRNA primary and secondary structures. RNA 2007; 13: 1184–1190.
- Wang J., Schmitt E., Megan L. et al. An integrated approach for classifying mitochondrial DNA variants: one clinical diagnostic laboratory's experience. Genetics in Medicine 2012; 14: 6: 620–626.
- Zaragoza M., Brandon M., Diegoli M. et al. Mitochondrial cardiomyopathies: how to identify candidate pathogenic mutations by mitochondrial DNA sequencing, MITOMASTER and phylogeny. Eur J Hum Genet 2011; 19: 2: 200–207.
- Yano T., Nishio S., Usami S. Frequency of mitochondrial mutations in non-syndromic hearing loss as well as possibly responsible variants found by whole mitochondrial genome screening. J Hum Genet 2014; 59: 2: 100–106.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15–04–08416.

Поступила 01.05.2016
Received on 2016.05.01