

DOI: <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2020-1-54-57>  
УДК 617.735

## Особенности клинического течения наследственных заболеваний сетчатки у пациентов с редкими мутациями в гене ABCA4

Н.Л. Шеремет<sup>1</sup>, И.Г. Грушкэ<sup>1</sup>, Н.В. Жоржолодзе<sup>1</sup>, И.А. Ронзина<sup>1</sup>, А.А. Микаелян<sup>1</sup>, А.С. Танас<sup>2</sup>, К.И. Аношкин<sup>2</sup>, В.В. Стрельников<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ глазных болезней», Москва

<sup>2</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

### РЕФЕРАТ

**Цель.** Оценить особенности клинического течения наследственных заболеваний сетчатки (НЗС) у пациентов с редкими мутациями в гене ABCA4.

**Материал и методы.** 43 пациентам с НЗС с редкими мутациями в гене ABCA4 проводили офтальмологические методы исследования, высокопроизводительное параллельное секвенирование кодирующих последовательностей гена ABCA4.

**Результаты.** Из 54 пациентов с НЗС и мутациями в гене ABCA4 у 79,6% – редкие нуклеотидные замены, 55,8% – редкие мутации в компаунд-гетерозиготном состоянии с частыми мутациями: 23,2% в сочетании с p.G1961E, 32,5% – с мутацией p.[L541P;A1038V]. Ред-

кие мутации сайта сплайсинга в гетерозиготном состоянии – 11,6%. Сравнили морфофункциональные показатели у 16 пациентов, которые были разделены на 2 группы: 1-я – сочетание легкой и тяжелой мутации, 2-я – две тяжелые. Была подтверждена значимая их разница. Установлена корреляционная связь между тяжестью мутаций и изменениями параметров мфЭРГ и гЭРГ.

**Заключение.** Важной задачей для прогнозирования течения и прогрессирования НЗС, учитывая большое количество редких мутаций в гене ABCA4, является накопление данных для дальнейшей возможности клинко-генетических корреляций.

**Ключевые слова:** болезнь Штаргардта, палочко-колбочковая дистрофия, мутация, высокопроизводительное параллельное секвенирование. ■

Точка зрения. Восток – Запад. 2020;1:54-57.

### ABSTRACT

#### Clinical manifestations of hereditary retinal diseases in patients with rare mutations in the ABCA4 gene

N.L. Sheremet<sup>1</sup>, I.G. Grushke<sup>1</sup>, N.V. Zhorzholadze<sup>1</sup>, I.A. Ronzina<sup>1</sup>, A.A. Mikaelyan<sup>1</sup>, A.S. Tanas<sup>2</sup>, K.I. Anoshkin<sup>2</sup>, V.V. Strelnikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Eye Diseases, Moscow

<sup>2</sup>FSBI «Research Centre for Medical Genetics», Moscow

**Purpose.** To evaluate the clinical features of inherited retinal diseases (IRDs) in patients with rare mutations in the ABCA4 gene.

**Material and methods.** 43 patients affected of IRDs with rare ABCA4 gene mutations underwent an ophthalmic examination, a high-performance parallel sequencing of coding sequences and an adjacent sections of the ABCA4 gene introns.

**Results.** 79.6% out of 54 patients with IRDs and mutations in the ABCA4 gene had rare nucleotide substitutions, 55.8% had rare mutations at the compound heterozygous state with frequent mutations: 23.2% having combination with p. G1961E, 32.5% with p. mutation [L541P;A1038V]. Rare splicing mutations at the heterozygous state made

up 11.6%. To compare morphofunctional parameters, 16 patients were divided into 2 groups: 1 – a combination of mild and severe mutations, 2 – two severe ones. A significant difference between two groups was confirmed. A correlation between the severity of mutations and changes in the parameters of mfERG and ffERG was established.

**Conclusions.** Given a large number of rare mutations in the ABCA4 gene, an important concern of predicting the course and progression of IRDs is to accumulate the data for further clinical and genetic correlations.

**Key words:** Stargardt disease, cone-rod dystrophy, mutation, high-performance parallel sequencing. ■

Point of View. East – West. 2020;1:54-57.

Ген ABCA4 кодирует ретиноспецифичный АТФ-связывающий ABCR4 белок-транспортер, участвующий в зрительном цикле. В зависимости от степени остаточной функции белка, мутации гена ABCA4 вызывают широкий спектр рецессивных абиотрофий сетчатки, вклю-

чающий болезнь Штаргардта (БШ), палочко-колбочковую дистрофию (ПКД) и пигментную абиотрофию сетчатки (ПА) [1-3]. На сегодняшний день описано более 900 мутаций, ассоциированных с наследственными заболеваниями сетчатки (НЗС). Клинико-генетические корреляции при

наиболее часто встречающихся мутациях описаны ранее. Однако клинические данные НЗС при редких мутациях гена ABCA4 не систематизированы в силу редко встречающихся одинаковых комбинаций мутаций. Тем не менее, важность описания клинической картины каждо-

го пациента для дальнейшего суммирования знаний и возможности клинико-генетических корреляций неоспорима.

### ЦЕЛЬ

Оценить особенности клинического течения НЗС у пациентов с редкими мутациями в гене ABCA4.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 43 пациента с НЗС (86 глаз) с редкими мутациями в гене ABCA4.

Клинические исследования включали стандартные и дополнительные офтальмологические методы исследования: кинетическую и статическую периметрию в пределах 60° поля зрения (программа macula examination, Otopus 900, Interzeag AG), спектральную оптическую когерентную томографию сетчатки (ОКТ) (протоколы cross line, MM5, ONH и 3D Disc) (томограф RTVue-100, США), аутофлюоресценцию (АФ) (Heidelberg Engineering GmbH, Germany), регистрацию максимальной ганцфельд-ЭРГ (гЭРГ) и мультифокальной ЭРГ (мф-ЭРГ) («Tomey EP-1000 Multifocal», Germany).

Высокопроизводительное параллельное секвенирование кодирующих (экзонных) последовательностей и прилежащих участков интронов гена ABCA4, проводили на приборе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США).

Для обогащения образцов ДНК фрагментами целевых участков генома методом AmpliSeq использовали два пула праймеров (в общей сложности 294 пары), обеспечивающих полное покрытие экзонов ABCA4 и 99%-е покрытие прилежащих интронных последовательностей протяженностью не менее 100 п.н. В состав панели были включены 33 пары праймеров для секвенирования известных на сегодняшний день минорных экзонов ABCA4.

Результаты секвенирования анализировали с использованием программного обеспечения Torrent Suite в составе: Base Caller (первичный анализ результатов секвениро-

вания), Torrent Mapping Alignment Program – TMAP (выравнивание последовательностей относительно референсного генома NCBI build 37 – hg19), Variant Caller (выявление вариаций нуклеотидных последовательностей). Аннотацию функционального значения генетических вариаций и фильтрацию известных полиморфизмов проводили с помощью компьютерной программы ANNOVAR. Визуальный анализ данных, ручную фильтрацию артефактов секвенирования и выравнивание последовательностей осуществляли с применением программы Integrative Genomic Viewer – IGV. Достоверность выявления мутаций валидирована секвенированием ДНК по Сэнгеру. Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Из 54 пациентов с НЗС и мутациями в гене ABCA4 в 79,6% случаев (у 43 человек) обнаружены редкие нуклеотидные замены (в общей сложности 41 редкая мутация). У 55,8% (24) пациентов редкие мутации выявлены в компунд-гетерозиготном состоянии с частыми мутациями: у 23,2% (10) – в сочетании с p.G1961E и у 32,5% (14) – с мутацией p.[L541P;A1038V], которые были уже описаны [4-7]. Редкие мутации сайта сплайсинга в гетерозиготном состоянии выявлены у 11,6% (5) пациентов, их клинико-генетические корреляции были ранее представлены [8, 9].

Миссенс-мутация p.L541P приводит к синтезу белка с нарушенной функцией связывания АТФ, а также к аминокислотным заменам в других участках белка и является тяжелой мутацией гена ABCA4. Не всегда p.L541P и p.A1038V составляют комплексную мутацию. В редких случаях встречаются в компунд гетерозиготном состоянии с другими мутациями. У 3 наших пациентов (№ 1, 3, 4) p.L541P выявлена в сочетании с мутациями p.G1961E, с.5461-10T>C и p.Q635K. И если в сочетании с p.G1961E отмечен более легкий фенотип, то в гетерозиготном состоянии с тяжелыми мутациями p.Q635K и с.5461-10T>C отмечен среднетяжелый/тяжелый фенотип (табл. 1).

Миссенс-мутация p.G1977C приводит к полной или практически полной потере функции связывания АТФ белком ABCR4 в целом и является тяжелой мутацией гена ABCA4. У двух наших пациентов (№2, 5) p.G1977C находится в компунд гетерозиготном состоянии с p.[L541P;A1038V] и с миссенс-мутацией p.Y603H. В обоих случаях клиническая картина соответствует тяжелому фенотипу (ПКД).

Мутация p.P1380L является тяжелой мутацией гена ABCA4 (по данным литературы, ассоциирована с тяжелым фенотипом). У одного из наших пациентов (№6) выявлена в сочетании с умеренной мутацией p.G1961E и ассоциирована с тяжелым фенотипом, у другого (№7) – с легкой мутацией p.G863A и ассоциирована с более легким фенотипом. Но даже при позднем начале и высоких зрительных функциях отмечены значительные структурные и функциональные изменения, соответствующие ПКД.

Мутация p.L1126N в гетерозиготном состоянии с тяжелой мутацией p.Q876X выявлена у двух пациентов (№8.1, 8.2) и ассоциирована с легким/среднетяжелым фенотипом. Миссенс-мутации p.G2074V (пациенты №9 и №10) и p.Arg152Gln (пациент №11) также встречаются при легком/среднетяжелом фенотипе.

У 5 пациентов (№12-16) с мутациями p.Q625X p.D645Y, p.Arg2030Gln, p.A2082P, p.L737X, в сочетании с p.G863A/p.R943Q, p.L39W, p.Asp523Glu, p.Y1858N, p.P62Li у одного (№17) с одной выявленной мутацией p.T1112fs наблюдали легкий фенотип.

Для сравнения морфофункциональных показателей 16 пациентов с НЗС из нашей выборки (32 глаза) были разделены на две группы: 1-я группа – сочетание легкой и тяжелой мутации, 2-я группа – с двумя тяжелыми мутациями, с разным дебютом, однако с одинаковой длительностью заболевания (табл. 2). Была подтверждена значимая их разница по показателям остроты зрения ( $0,1 \pm 0,007 / 0,05 \pm 0,04$ ), потери цветового зрения ( $17,0 \pm 4,7 / 23,5 \pm 2,9$ ), тяжести фенотипа ( $1,7 \pm 0,5 / 2,5 \pm 0,6$ ), потери эллипсоидной зоны ( $K=0,8-0,85$ ,  $p<0,05$ ). Эти данные соответствовали изменениям по показателям тяжести мутаций.

Таблица 1

## Результаты молекулярно-генетического анализа гена ABCA4 и клиническая характеристика пациентов с НЗС

Пациент	Начало НЗС, лет	Длительность НЗС, лет	Острота зрения	Фенотип	Мутация (ДНК)а	Мутация белок	Тип мутации
			OD/OS				
1	18	3	0,3/0,2	I	c.G5882A c.1622T>C	p.G1961E p.L541P	миссенс миссенс
2	7	64	0,005/0,005	III	c.3113C>T c.1622T>C c.5929G>T	p.A1038V p.L541P p.Gly1977Cys	миссенс миссенс миссенс
3	7	36	0,01/0,01	III	c.T1622C 2)c.5461-10T>C	p.L541P	миссенс сайта сплайсинга
4	8	10	0,08/0,08	II	c.T1622C c.C1903A	p.L541P p.Q635K	миссенс миссенс
5	9	37	0,09/0,09	III	c.G5929T c.T1807C	p.G1977C p.Y603H	миссенс миссенс
6	32	13	0,02/0,02	III	c.G5882 c.C4139T	p.G1961E p.1380L	миссенс миссенс
7	65	15	0,7/0,5	II	c.C4139T c.G2588C	p.P1380L p.G863A	миссенс миссенс
8.1 1A*	15	10	0,06/0,06	II	c.T3377A c.C2626	p.L1126H p.Q876X	миссенс нонсенс
8.2 1B*	7	10	0,2/0,13	I	c.T3377A c.C2626	p.L1126H p.Q876X	миссенс нонсенс
9	46	22	0,06/0,06	I	c.G6221T	p.G2074V	миссенс
10	41	9	0,1/0,1	II	c.G6221T	p.G2074V	миссенс
11	57	3	0,06/0,05	II	c.455G>A	p.Arg152Gln	миссенс
12	25	10	0,1/0,1	I	C1873T: G2588C G2828A	p.Q625X p.G863A p.R943Q	нонсенс миссенс миссенс
13	32	2	0,6/0,5	I	c.1933G>T 2) c.1116T>G	p.D645Y p.L39W	миссенс миссенс
14	29	4	0,09/0,1	I	c.6089G>A c.1569T>G	p.Arg2030Gln p.Asp523Glu	миссенс миссенс
15	40	3	0,6/0,7	I	c.G6244C c.T5572A	p.A2082P p.Y1858N	миссенс миссенс
16	15	29	0,1/0,2	I	c.T2210A c.C185T	p.L737X p.P62L	нонсенс миссенс
17	29	7	0,3/0,1	I	c.3334_3346del	p.T1112fs	делеция со сдвигом рамки считывания

Примечание: I – первое поколение; IA, IB – сестры или братья.

При сравнении показателей мфЭРГ в этих двух группах отмечалось выраженное в разной степени снижение плотности и нарушение топографии биопотенциала, а также снижение амплитуды и увеличение латентности пика P1 преимущественно в 4-5 «кольцах». Снижение амплитуд основных волн гЭРГ отмечено в большей степени в груп-

пе с двумя тяжелыми мутациями, что свидетельствует о более значимом снижении общего биопотенциала сетчатки в результате структурных изменений сетчатки значительной степени выраженности и площади. Установлена прямая и обратная корреляционная связь высокой и средней степени между тяжестью мутаций и изменениями параметров

P1[ms], P1[nV/deg<sup>2</sup>], P1[uV] мфЭРГ преимущественно в 3-5 «кольцах» (K=0,57-0,94, p<0,05), а также показатели гЭРГ (K=0,56-0,78, p<0,05).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для прогнозирования течения и прогрессирования наследствен-

Таблица 2

## Показатели пациентов с НЗС в зависимости от тяжести редких мутаций

Показатели	Тяжесть мутации		P<
	1 гр. пациентов (легкая и тяжелая мутации)	2 гр. пациентов (2 тяжелых мутации)	
Дебют заболевания, лет	18,7±4,6	7,15±1,3	0,00002
Длительность НЗС, лет	13,7±7,3	13,3±8,3	0,83
Острота зрения	0,1±0,007	0,05±0,04	0,006
Количество нечитаемых цветовых таблиц	17,0±4,7	23,5±2,9	0,002
Фенотип	1,7±0,5	2,5±0,6	0,003
Размер потери эллипсоидной зоны по горизонтали/вертикали, мм	4,9±2,04/ 4,5±1,9	6,6±1,1/ 6,6±1,3	0,00/0,001
Показатели периметрии, dB	MD	16,6±6,5	0,04
	MS	14,2±6,6	0,05
Показатели мфЭРГ			
P1 плотность, нВ/град2, 4 кольцо	10,5±5,9	4,7±2,7	0,02
P1 плотность, нВ/град2, 5 кольцо	9,2±4,9	2,1±1,6	0,002
P1 латентность, мс, 1 кольцо	37,3±3,3	50,5±6,9	0,004
P1 латентность, мс, 3 кольцо	36,3±1,8	44,6±9,2	0,03
P1 латентность, мс, 4 кольцо	37,7±4,1	45,8±8,1	0,03
P1 латентность, мс, 5 кольцо	35,5±2,9	44,3±7,8	0,009
P1 амплитуда, мкВ, 4 кольцо	0,4±0,2	0,2±0,1	0,02
P1 амплитуда, мкВ, 5 кольцо	0,4±0,2	0,1±0,1	0,002
Показатели гЭРГ			
Амплитуда а-волны (μV)	48,5±24,4	14,9±25,9	0,003
Амплитуда в-волны (μV)	116,1±60,9	28,44±48,2	0,003

ных заболеваний сетчатки, определения тяжести заболевания важно знать степень патогенности мутации. Учитывая большое количество редких мутаций в гене ABCA4, а также разнообразие клинического течения, важной задачей является накопление данных для дальнейшей возможности клинико-генетических корреляций.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sheffield VC, Stone EM. Genomics and the eye. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364: 1932–1942.
2. Man Driel MA, Maugeri A, Klevering VJ et al. ABCR unites what ophthalmologists

divide(s). *Ophthalmic genet.* 1998; 19(3): 117-122.

3. Будзинская М.В., Шеланкова А.В., Михайлова М.А. и др. Изменения центральной зоны глазного дна при ретинальных венозных окклюзиях по данным оптической когерентной томографии-ангиографии. *Вестник офтальмологии.* 2016; 132 (5): 15-22.

4. Burke TR, Fishman GA, Zernant J et al. Retinal phenotypes in patients homozygous for the G1961E mutation in the ABCA4 gene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012; 53 (8): 4458-4467.

5. Шеремет Н.Л., Грушкэ И.Г., Жоржоладзе Н.В. и др. Клинико-генетические корреляции у пациентов с наследственными заболеваниями сетчатки при мутации p.G1961E в гене ABCA4. *Вестник офтальмологии.* 2019; 135 (4): 10-18.

6. Шеремет Н.Л., Грушкэ И.Г., Жоржоладзе Н.В. и др. Клинико-генетические

корреляции у пациентов с наследственными заболеваниями сетчатки при комплексной мутации [L541P;A1038V] в гене ABCA4. *Точка зрения. Восток-Запад.* 2018; 2:51-54.

7. Jiang F, Pan Z, Xu K et al. Screening of ABCA4 Gene in a Chinese Cohort With Stargardt Disease or Cone-Rod Dystrophy With a Report on 85 Novel Mutations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016; 57(1):145-152.

8. Шеремет Н.Л., Грушкэ И.Г., Жоржоладзе Н.В. и др. Полиморфизм клинических проявлений при мутациях сайта сплайсинга в гене ABCA4. *Вестник офтальмологии.* 2018; 134 (6): 82-91.

9. Schulz HL, Grassmann F, Kellner U et al. Mutation Spectrum of the ABCA4 Gene in 335 Stargardt Disease Patients From a Multicenter German Cohort—Impact of Selected Deep Intronic Variants and Common SNPs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017; 58(1): 394–403.