

СИНОНИМИЧНАЯ ЗАМЕНА В ГЕНЕ GSK КАК ПРИЧИНА ГЕСТАЦИОННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА



© Н.А. Зубкова^{1*}, П.М. Рубцов², Ф.Ф. Бурумкулова³, Л.И. Ибрагимова¹, Н.А. Макрецкая¹, Е.В. Васильев¹, В.М. Петров¹, А.Н. Тюльпаков¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва

³Московский областной НИИ акушерства и гинекологии, Москва

Диагностика случаев MODY в структуре гестационного сахарного диабета (СД) необычайно важна, так как это определяет тактику ведения пациентов во время беременности и в послеродовом периоде. В настоящей публикации нами представлен случай гестационного СД, обусловленного синонимичной заменой с.666C>G р.V222V в гене GSK. Патогенность выявленного варианта, первоначально интерпретированного как «вероятно доброкачественный», была доказана в эксперименте *in vitro*. Замена с.666C>G приводит к появлению нового донорного сайта сплайсинга и образованию измененной мРНК с делецией 16 пар нуклеотидов. Данный случай иллюстрирует сложности интерпретации результатов секвенирования, которая может потребовать дополнительного анализа клинической информации и проведения экспериментальных исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: синонимичная замена; глюкокиназа; гестационный сахарный диабет; сплайсинг

A SYNONYMOUS VARIANT IN GSK GENE AS A CAUSE OF GESTATIONAL DIABETES MELLITUS

© Natalya A. Zubkova^{1*}, Petr M. Rubtsov², Fatima F. Burumkulova³, Liudmila I. Ibragimova¹, Nina A. Makretskaya¹, Evgeny V. Vasiliev¹, Vasily M. Petrov¹, Anatoly N. Tiulpakov¹

¹Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

³Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Moscow, Russia

The diagnosis of MODY as a subtype of gestational diabetes mellitus (GDM) is important for an adequate management during pregnancy and the postnatal period. The present report describes a case of GDM caused by a synonymous c.666C>G p.V222V substitution in the GSK gene. The variant, which was initially ranked as 'likely benign', was later proven to be pathogenic by *in vitro* studies. The c.666C>G substitution led to the use of a new donor splice site and synthesis of the aberrant mRNA with deletion of 16 base pairs. The case illustrates that additional clinical and experimental data may be required for the correct interpretation of sequence variants pathogenicity.

KEYWORDS: synonymous variant; glucokinase; gestation diabetes; splicing

АКТУАЛЬНОСТЬ

Течение сахарного диабета (СД) типа MODY2, обусловленного гетерозиготными мутациями в гене глюкокиназы (GSK), долгие годы может оставаться бессимптомным. Глюкокиназа (гексокиназа IV, глюкозо-6-фосфотрансфераза) – фермент, принадлежащий к семейству гексокиназ, который катализирует первую реакцию гликолитического метаболического пути – фосфорилирование глюкозы в глюкозо-6-фосфат в гепатоцитах и β-клетках поджелудочной железы (ПЖ). Глюкокиназа играет важную роль в регуляции секреции инсулина, являясь связующим звеном между уровнем гликемии и началом секреции инсулина [1]. Вследствие мутаций в GSK нарушается способность глюкокиназы фосфорилировать глюкозу и, как результат, увеличивается минимальная концентрация глюкозы, необходимая для стимуляции выброса инсулина, но секреторный ответ инсулина на стимуляцию глюкозой всегда сохранен.

Во время беременности по мере созревания плаценты нарастает инсулинорезистентность, в связи с чем ги-

пергликемия у пациентов с GSK-MODY2 часто выявляется при пренатальном скрининге I или III триместров. Диагностика случаев GSK-MODY2 в структуре гестационного сахарного диабета (ГСД) необычайно важна, так как это определяет тактику ведения пациентов во время беременности и в послеродовом периоде [2].

В последние годы молекулярно-генетический анализ, в том числе и при моногенных формах СД, становится все более рутинным, особенно после внедрения технологии секвенирования следующего поколения (NGS). С одной стороны, это значительно упрощает возможности диагностики, с другой – все возрастающий объем данных делает затруднительной оценку патогенности выявляемых изменений нуклеотидной последовательности, так как наряду с известными мутациями, с доказанной связью с наследственной патологией, нередко детектируются изменения, достоверно оценить вклад которых в ту или иную патологию сразу невозможно. Американским обществом медицинской генетики (American College of Medical Genetics, ACMG) [3] и российским обществом генетиков [4] предложены си-



Данные сенсора (ммоль/л)

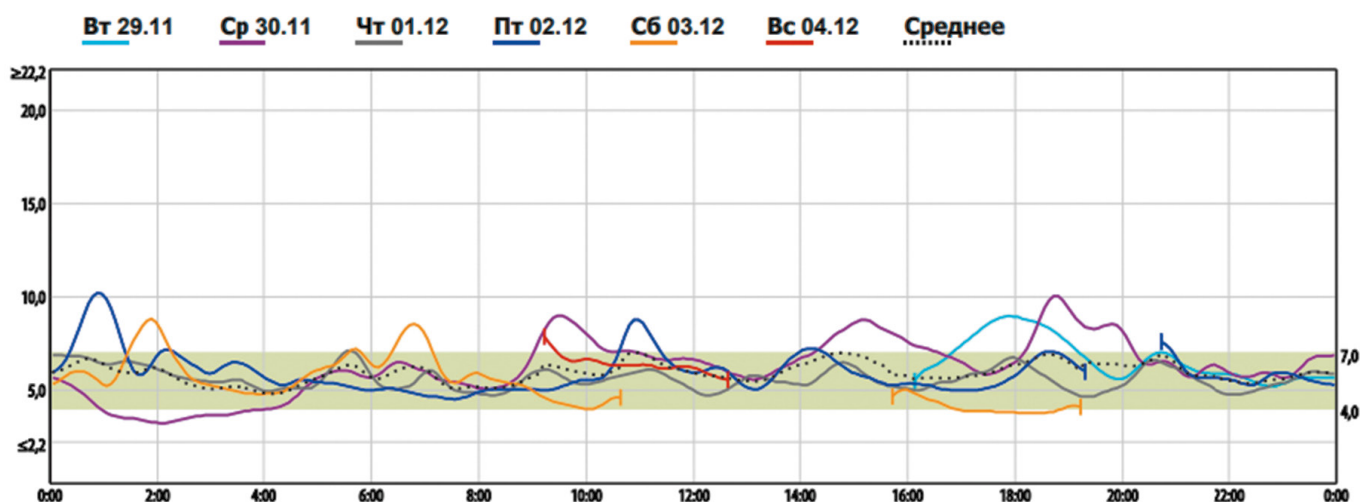


Рис. 1. Суточное мониторирование гликемии пациентки Л. до назначения инсулинотерапии.

Данные сенсора (ммоль/л)

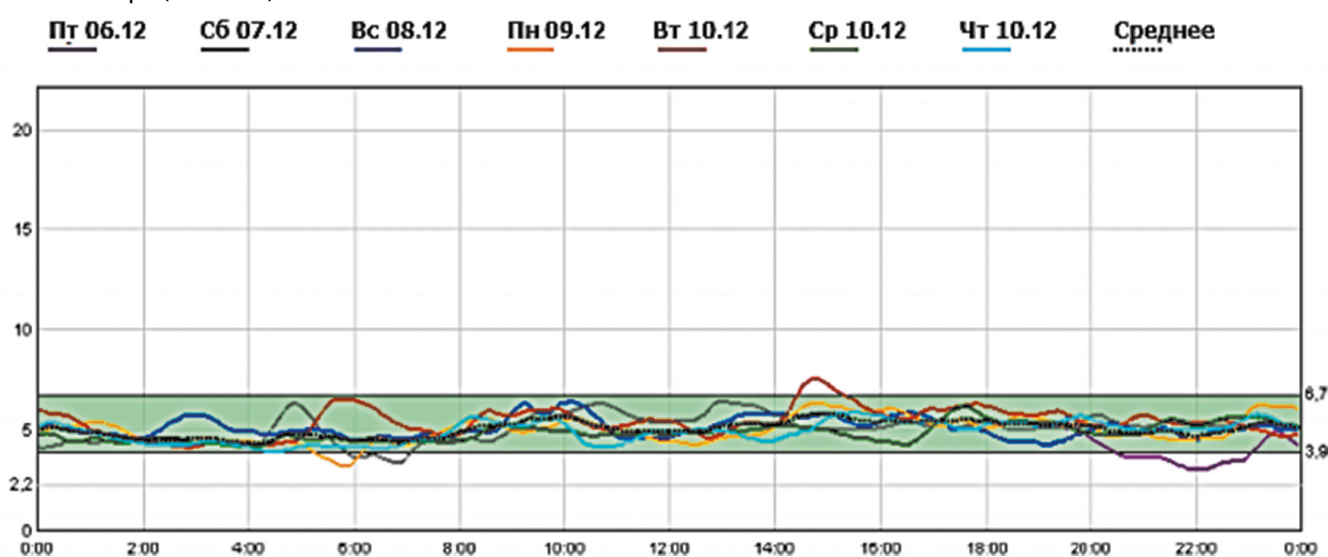


Рис. 2. Суточное мониторирование гликемии пациентки Л. после назначения инсулинотерапии.

стемы оценки патогенности нуклеотидных вариантов, в соответствии с которыми последние ранжированы на 5 категорий: доброкачественные, вероятно доброкачественные, варианты с неопределенной значимостью, вероятно патогенные и патогенные. К первым двум категориям (т.е. клинически незначимым изменениям) в соответствии с используемыми критериями относятся и так называемые «синонимичные» мутации, при которых замена одного нуклеотида на другой в кодирующей части гена теоретически не должна приводить к изменению аминокислотной последовательности белка.

В представленной работе приводится описание клинического случая ГСД, ассоциированного с синонимичным вариантом в гене *GSK*, патогенность которого была подтверждена функциональными исследованиями *in vitro*.

ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО СЛУЧАЯ

Беременная Л., 22 лет. Впервые повышение гликемии в биохимическом анализе крови до 6,7 ммоль/л было выявлено в возрасте 8 лет, в связи с чем проведен оральный глюкозотолерантный тест (ОГТТ), по результатам которого диагностировано нарушение толерантности

к глюкозе. В 13 лет при очередном обследовании HbA_{1c} – 6,0%, по данным ОГТТ, гликемия натощак 5,6 ммоль/л, на 120 минуте – 11,2 ммоль/л. Установлен диагноз «Сахарный диабет». Маркеры аутоиммунного сахарного диабета (антитела (АТ) к островковым клеткам (islet cell antibodies, ICA), тирозинфосфатазе (cytoplasmic islet cell antibody, IA-2A), глутаматдекарбоксилазе (glutamic acid decarboxylase antibodies, GADA)) – отрицательные. Далее пациентка придерживалась диеты с ограничением легкоусвояемых углеводов. Дальнейшее обследование в 16 лет, когда при уровне глюкозы венозной плазмы натощак 7,0 ммоль/л С-пептид – 140 пмоль/л (референсные значения 100–1010), инсулин – 31 пмоль/л (референсные значения 15–180).

На сроке беременности 6–7 нед (первый пренатальный скрининг) выявлено повышение уровня глюкозы в биохимическом анализе крови – 6,1 ммоль/л, диагностирован ГСД, рекомендовано соблюдение диеты с исключением легкоусвояемых углеводов. На этом фоне показатели гликемии натощак – до 5,5 ммоль/л, через 1 ч после еды – до 7,5 ммоль/л. После 22-й недели беременности отмечалось периодическое повышение показателей гликемии натощак до 5,6 ммоль/л, обусловлен-

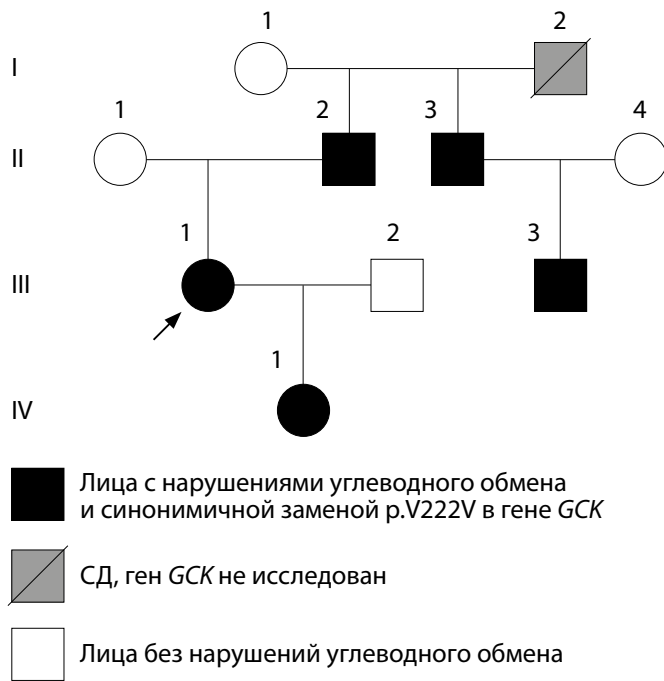


Рис. 3. Родословная семьи пациентки Л.: СД - сахарный диабет.

ное нарушением диеты. На сроке беременности 29 нед: гликемия натощак 6,1–6,4 ммоль/л, через 1 ч после еды максимально до 8,0 ммоль/л при адекватном режиме питания. Общая прибавка массы тела за 29 нед – 17 кг (вес до беременности 63 кг, ИМТ = 21,8 кг/м²). По данным УЗИ плода на сроке 29 нед 3 дня выявлена тенденция к крупному плоду: окружность груди (ОГ) – 289 мм, окружность живота (ОЖ) – 276 мм, предполагаемая масса плода (ПМП) – 1873 г (>90 перцентилей). Проведено непрерывное мониторирование гликемии системой iPro2, по данным которого подтверждено повышение гликемии натощак и постпрандиально (рис. 1). С 30-й недели беременности инициирована инсулинотерапия в базис-болюсном режиме: инсулин пролонгированного действия детемир 16 ЕД (0,2 Ед/кг) в 22.00 с последующим постепенным увеличением дозы до 24 Ед в связи с повышенными показателями гликемии утром натощак, инсулин ультракороткого действия аспарт по 4 Ед перед завтраком, обедом и ужином за 15 минут до еды (0,43 Ед/кг). На фоне инсулинотерапии и диеты к 33-й неделе беременности достигнуты целевые показатели гликемии: натощак – до 5,1 ммоль/л, через 1 ч после еды – до 7,0 ммоль/л (рис. 2). Дальнейшей коррекции доз инсулина не требовалось.

Родоразрешение на 39 нед через естественные родовые пути. При рождении вес ребенка (девочка) – 3280 г (-0,02 SD), рост – 51 см (+0,91 SD). В возрасте 3 мес при измерении сахара крови у ребенка зафиксирована гипергликемия 6,2 ммоль/л (голодный промежуток 3 ч).

Семейный анамнез (рис. 3).

Дед по линии отца, 55 лет, инфаркт миокарда (I.2). Гипергликемия до 8,0 ммоль/л впервые зафиксирована при обследовании по поводу перенесенного инфаркта в возрасте 45 лет. На фоне приема пероральных сахароснижающих препаратов (ПССП), без соблюдения диеты показатели гликемии в течение дня – до 9,0 ммоль/л.

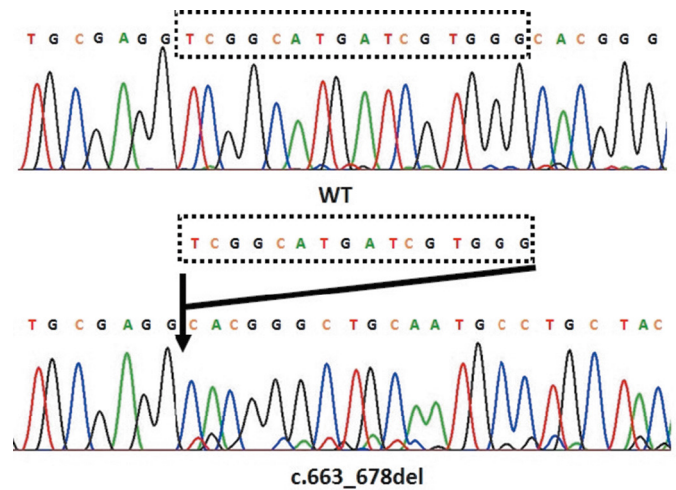


Рис. 4. Хроматограммы с результатами секвенирования продуктов сплайсинга, полученных in vitro с использованием технологии «мини-гена» [5]. WT – фрагмент последовательности транскрипта дикого типа; c663_678del – фрагмент транскрипта с делецией 16 пар нуклеотидов как результат синонимичного варианта с.666C>G.

Отец пробанда, 49 лет (II.2). В возрасте 16 лет выявлена гипергликемия. При ОГТТ гликемия натощак 7,2 ммоль/л, на 120-й минуте – 10,4 ммоль/л. Диету не соблюдал. В возрасте 25 лет повторно обследован: уровень аутоантител отрицательный, С-пептид 0,2 пмоль/л (0,36–1,7), аглюкозурия. Далее наблюдался эндокринологом с диагнозом «СД 2 типа». Гликемия в течение дня на фоне обычного режима питания достигала 16,0 ммоль/л, HbA_{1c} – 7,8%.

Дядя пробанда, 43 года (II.3). Повышение гликемии натощак до 7,2 ммоль/л выявлено в 34 года. К эндокринологу не обращался, дополнительного обследования не проходил.

Двоюродный брат, 11 лет (III.3). В возрасте 1 года 9 мес проведено обследование в связи с полиурией: в биохимическом анализе крови повышение гликемии натощак 6,5 ммоль/л, после еды – 9,9 ммоль/л, HbA_{1c} – 6,6%, аглюкозурия. При уровне гликемии 6,7 ммоль/л (период голодания 6,5 ч) С-пептид – 0,03 нмоль/л (0,1–1,01), инсулин – 8,0 пмоль/л (10–120), AT ICA, IAA, GADA – отрицательные. Гликемия, по данным непрерывного суточного мониторирования уровня гликемии (Continuous Glucose Monitoring System, CGMS), достигала 10 ммоль/л, в связи с чем в возрасте 2 лет 1 мес был назначен пролонгированный инсулин (гларгин) в дозе 2 Ед/сут – 0,12 Ед/кг. В возрасте 2 лет 9 мес к терапии добавлен короткий инсулин (актрапид) в связи с постпрандиальной гликемией до 14,9 ммоль/л.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отсутствие аутоиммунных маркеров СД 1 типа, данные семейного анамнеза (см. рис. 3) позволили предположить наличие у пациентки моногенной формы СД. При проведении молекулярно-генетического исследования методом NGS (методика описана ранее [5]) выявлен редкий гетерозиготный вариант в кодоне V222 гена GSK (NM_000162: с.666C>G p.V222V; ExAC MAF, 0.0001). Аналогичный вариант был подтвержден при проведении секвенирования по Сэнгеру у родственников пробанда, имеющих нарушения углеводного обмена (см. рис. 3).

Согласно существующим рекомендациям [3, 4], дан-

ный синонимичный вариант следовало классифицировать как «вероятно доброкачественный», что ставило под сомнение его связь с выявленными нарушениями углеводного обмена. Между тем в предыдущем исследовании в эксперименте *in vitro* с использованием технологии «минигена» было показано, что трансверсия с.666С>G в экзоне 6 гена *GSK* может быть причиной нарушения процесса сплайсинга (исследование проведено в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарта Российской академии наук, под руководством д.б.н., г.н.с. Рубцова П.М., описано ранее [6]). Данная нуклеотидная замена приводит к появлению нового донорного сайта сплайсинга и образованию измененной мРНК с делецией 16 пар нуклеотидов (рис. 4). Таким образом, дополнительные экспериментальные данные позволили переклассифицировать вариант с.666С>G p.V222V с «вероятно доброкачественного» в «патогенный» [3, 4].

По оценкам некоторых авторов, патогенный эффект не менее чем 15% диагностируемых мутаций обусловлен полными или частичными нарушениями механизма сплайсинга, а не только аминокислотными заменами в затронутых кодонах [7, 8], при этом доля внутриэкзонных патогенных вариантов, согласно биоинформатическим исследованиям, может достигать 25% [9, 10]. О существовании таких механизмов следует помнить при интерпретации данных молекулярно-генетических исследований. Как демонстрирует представленный нами клинический пример, именно синонимичная мутация, первоначально интерпретированная как «вероятно доброкачественная» нуклеотидная замена, была причиной снижения функции глюкокиназы и нарушения углеводного обмена у пациентки с ГСД и ее прямых родственников. Подтверждение функциональной значимости выявленной в гене *GSK* синонимичной замены позволит избежать назначения медикаментозной терапии и достичь целевых показателей гликемии на фоне диетотерапии в послеродовом периоде, а также обеспечить персонализированный подход

к сахароснижающей терапии при планировании последующих беременностей нашей пациентки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем сообщении подчеркивается важность тщательной клинической оценки всех случаев моногенных форм СД, проанализированных методом NGS. В случае характерных фенотипических проявлений и отягощенной в нескольких поколениях наследственности показано проведение дополнительных функциональных методов исследования для оценки патогенности вариантов, первично классифицированных как «возможно доброкачественные».

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование частично выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №16-15-10408). Результаты изучения сплайсинга *in vitro* получены в рамках Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (тема № 01201363822).

Согласие пациентов. Пациентка добровольно подписала информированное согласие на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме в журнале «Сахарный диабет».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов. Н.А. Зубкова, Ф.Ф. Бурумкулова, Н.А. Макрецькая, А.Н. Тюльпаков – концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста; Ф.Ф. Бурумкулова, Л.И. Ибрагимова, Е.В. Васильев – сбор материала, анализ полученных данных; А.Н. Тюльпаков, Н.А. Макрецькая, Е.В. Васильев, П.М. Рубцов – проведение молекулярно-генетического исследования. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Matschinsky FM. Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 3:S394-404. doi: 10.2337/diabetes.51.2007.s394
- Colom C, Corcoy R. Maturity onset diabetes of the young and pregnancy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;24(4):605-615. doi: 10.1016/j.beem.2010.05.008
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424. doi: 10.1038/gim.2015.30
- Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., и др. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) // *Медицинская генетика*. – 2017. – Т. 16. – №7. – С. 4-17. [Ryzhkova OP, Kardymon OL, Prohorchuk EB, et al. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants. *Medical genetics*. 2017;16(7):4-17. (In Russ.)]
- Зубкова Н.А., Бурумкулова Ф.Ф., Петрухин В.А., и др. Весоростовые показатели детей, рожденных от матерей с гестационным сахарным диабетом, обусловленным мутациями в гене глюкокиназы // *Сахарный диабет*. – 2018. – Т. 21. – №2. – С. 92-98. [Zubkova NA, Burumkulova FF, Petrukhin VA, et al. Birth weight and length in offsprings of mothers with gestational diabetes mellitus due to mutations in GSK gene. *Diabetes mellitus*. 2018;21(2):92-98. (In Russ.)] doi: 10.14341/DM9429
- Игудин Е.Л., Спирин П.В., Прасолов В.С., и др. Функциональная характеристика двух новых мутаций сплайсинга в гене глюкокиназы при моногенном диабете MODY2 // *Молекулярная биология*. – 2014. – Т. 48. – № 2. – С. 288-294. [Igudin EL, Spirin PV, Prasolov VS, et al. Functional characterization of two novel splicing mutations of glucokinase gene associated with maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY2). *Molecular biology*. 2014;48(2):288-294. (In Russ.)] doi: 10.7868/S0026898414020074
- Baralle D, Lucassen A, Buratti E. Missed threads. The impact of pre-mRNA splicing defects on clinical practice. *EMBO Rep*. 2009;10(8):810-816. doi: 10.1038/embor.2009.170
- Soukarieh O, Gaildrat P, Hamieh M, et al. Exonic Splicing Mutations Are More Prevalent than Currently Estimated and Can Be Predicted by Using In Silico Tools. *PLoS Genet*. 2016;12(1):e1005756. doi: 10.1371/journal.pgen.1005756
- Sterne-Weiler T, Howard J, Mort M, et al. Loss of exon identity is a common mechanism of human inherited disease. *Genome Res*. 2011;21(10):1563-1571. doi: 10.1101/gr.118638.110
- Lim KH, Ferraris L, Filloux ME, et al. Using positional distribution to identify splicing elements and predict pre-mRNA processing defects in human genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(27):11093-11098. doi: 10.1073/pnas.1101135108

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ [AUTHORS INFO]

***Зубкова Наталья Анатольевна**, к.м.н., с.н.с. [**Natalia A. Zubkova**, MD, PhD, senior research associate]; адрес: Россия, 117036, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11 [address: 11 Dm. Ulyanova street, 117036, Moscow, Russian Federation]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6097-7831>; eLibrary SPIN: 5064-9992; e-mail: zunata2006@yandex.ru

Рубцов Петр Михайлович, д.б.н., г.н.с. [Petr M. Rubtsov, PhD in Biology, leading research associate];

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9867-2344>; eLibrary SPIN: 8227-7362; e-mail: rubtsov@eimb.ru

Бурумкулова Фатима Фархадовна, д.м.н., в.н.с. [Fatima F. Burumkulova, MD, PhD, leading research associate];

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9943-0964>; eLibrary SPIN: 6592-7736; e-mail: fatima-burumkulova@yandex.ru

Ибрагимова Людмила Ибрагимовна, к.м.н., с.н.с. [Liudmila I. Ibragimova, MD, PhD, senior research associate];

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3535-520X>; eLibrary SPIN: 5013-8222; e-mail: ibragimovaludmila@gmail.com

Макрецкая Нина Алексеевна, н.с. [Nina A. Makretskaya, MD, research associate];

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0412-7140>; eLibrary SPIN: 4467-7880; e-mail: makretskayan@gmail.com

Васильев Евгений Витальевич, к.б.н., с.н.с. [Evgeny V. Vasilyev, PhD in Biology, senior research associate];

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1107-362X>; eLibrary SPIN: 5767-1569; e-mail: vas-evg@yandex.ru

Петров Василий Михайлович, к.х.н., с.н.с. [Vasily M. Petrov, PhD in Chemistry, senior research associate];

eLibrary SPIN: 4358-2147; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0520-9132>; e-mail: petrov.vasily@gmail.com

Тюльпак Анатоль Николаевич, д.м.н. [Anatoly N. Tiulpakov, MD, PhD];

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8500-4841>; eLibrary SPIN: 8396-1798; e-mail: ant@endocrincentr.ru

ЦИТИРОВАТЬ:

Зубкова Н.А., Рубцов П.М., Бурумкулова Ф.Ф., Ибрагимова Л.И., Макрецкая Н.А., Васильев Е.В., Петров В.М., Тюльпак А.Н. Синонимичная замена в гене GSK как причина гестационного сахарного диабета // *Сахарный диабет*. — 2019. — Т. 22. — №2. — С. 165-169. doi: 10.14341/DM9938

TO CITE THIS ARTICLE:

Zubkova NA, Rubtsov PM, Burumkulova FF, Makretskaya NA, Vasilyev EV, Petrov VM, Tiulpakov AN. A synonymous variant in GSK gene as a cause of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Mellitus*. 2019;22(2):165-169. doi: 10.14341/DM9938