

На правах рукописи

**Шинвари Хайбер**

**НОВЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ В ОЦЕНКЕ ВРОЖДЕННЫХ ОШИБОК  
ИММУНИТЕТА: ДЕФИЦИТ RVSK1, ВРОЖДЕННАЯ  
НЕЙТРОПЕНИЯ, СИНДРОМ ХЕННЕКАМА**

3.2.7 – иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Екатеринбург - 2023

Работа выполнена на кафедре иммунохимии Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный Университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» и в лаборатории иммунологии воспаления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

**Научные руководители:**

Доктор медицинских наук, профессор,  
ЗДН РФ

Академик РАН, доктор медицинских наук,  
профессор

**Тузанкина  
Ирина Александровна**

**Черешнев  
Валерий Александрович**

**Официальные оппоненты:**

Доктор медицинских наук, профессор,  
профессор кафедры организации и правления  
в сфере обращения лекарственных средств  
Института профессионального образования  
ФГАОУ ВО «Первый Московский  
государственный медицинский университет  
им. И.М. Сеченова» Минздрава России  
(Сеченовский университет)

**Козлов  
Иван Генрихович**

Доктор медицинских наук, директор Центра  
иммунологии и клеточных биотехнологий,  
профессор кафедры Фундаментальной  
медицины Медицинского института ФГАОУ  
ВО «Балтийский федеральный университет  
имени Иммануила Канта»

**Литвинова  
Лариса Сергеевна**

**Ведущая организация** - Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Санкт-Петербург).

Защита состоится «27» июня 2023 года в \_\_\_\_ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.063.01 на базе ИИФ УрО РАН (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106)

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН и на сайте ИИФ УрО РАН – <http://iip.uran.ru>, с авторефератом – на сайте ВАК РФ <http://vak2.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 года

Ученый секретарь Совета 24.1.063.01  
на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН,  
кандидат биологических наук

Ю.А. Журавлева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность и степень разработанности темы исследования.** Иммунная система – это сложная биологическая система, предназначенная для борьбы с чужеродными антигенами, для распознавания чужеродных внешних и внутренних антигенов, для уничтожения инфицированных и аномально развивающихся клеток, а также для контроля толерантности к аутоантигенам и комменсальной микробиоте, выполняющая важнейшую биологическую задачу сохранения вида.

Вследствие этого врожденные ошибки иммунитета (ВОИ) или первичные иммунодефициты (ПИД) могут приводить к повышенной восприимчивости к инфекциям, аутоиммунным процессам, аутовоспалительным заболеваниям, злокачественным опухолям или аллергии. Причиной этому могут быть, в первую очередь, генетические изменения как на уровне генома, так и отдельных генов, кодирующих протеиновые молекулы, участвующие в обеспечении иммунных механизмов.

Несмотря на то, что до недавнего времени ВОИ считали редкими болезнями, а отдельные генетические нарушения могут встречаться нечасто, в совокупности они могут наблюдаться у значительной части популяции. Более того, в результате улучшения диагностики и развития технологий секвенирования следующего поколения, за последние годы констатируемая распространенность первичных иммунодефицитов увеличилась до 40 на 100 000 населения (Rubin Z. et al., 2018).

Для разработки новых методов диагностики и терапии иммунопатологии необходимо глубокое понимание реализации иммунных функций в организме. Появление высокопроизводительных биологических методов позволило получить беспрецедентное представление о молекулярных механизмах, лежащих в основе функционирования иммунной системы и её взаимосвязи с другими системами организма. Однако огромная сложность анализируемых параметров, охватывающая несколько порядков пространственных и временных масштабов, может быть постигнута только с помощью системной вычислительной иммунологии - в частности, путем использования вычислительных методов обработки и моделирования больших иммунологических данных.

Поэтому в нашей работе были использованы методы биоинформационного анализа при отдельных синдромах, развивающихся в результате врожденных ошибок иммунитета. Для этого были отобраны три патологии – врожденная нейтропения (одна из самых распространенных форм ПИД), синдром Хеннекама (одна из самых редких), а также дефицит RBSK1, относящийся к

аутовоспалительным синдромам ПИД, но при этом с повышенной восприимчивостью к пиогенным инфекциям. Дефицит RBSK1 впервые был описан в 2012 году (Boisson V. et al., 2011), синдром Хеннекама в 1989 (Hennekam R.C. et al., 1989), а первые открытия в генетике врожденной нейтропении относятся к 1999 году (Horwitz M. et al., 1999). Тем не менее, до настоящего времени диагностика каждого из этих синдромов представляет сложность, продолжают выявляться новые варианты генов, которые приводят к фенотипам этих болезней, а точные механизмы патологии синдрома Хеннекама и дефицита RBSK1 остаются предметом дискуссии.

Кроме того, важно не только выявить варианты генов, но и доказать их влияние на конечный продукт - белок, дестабилизацию структуры которого возможно оценить инструментами *in silico*. Это позволит ускорить оценку патогенности варианта гена, а также включить выявленные варианты в список причиннозначимых для ускорения диагностики, а также приблизиться к разработке методов патогенетической или генотерапии, что является конечной целью при исследовании врожденной патологии человека.

В нашей работе, направленной на поиск значимых патофизиологических механизмов формирования отдельных видов иммунозависимой патологии, с помощью исследовательских методов биоинформационного анализа при нарушениях, характерных для первичных иммунодефицитов, в качестве моделей иммунозависимой патологии были выбраны различные объекты с врожденными иммунными нарушениями, включая аутовоспалительный синдром дефицита RBSK1, врожденную нейтропению и синдром Хеннекама.

Дефицит RBSK1 - это аутовоспалительный синдром, отличительной чертой которого является повышенная восприимчивость к инфекциям. Белок RBSK1, также известный как HOIL-1, участвует в сборке комплекса линейной убиквитиновой цепи (LUBAC). Её функционирование связано с активацией классического сигнального пути NF-κB, предотвращением воспаления и участием в апоптозе (Gerlach B. et al., 2011). Для дефицита RBSK1 характерно нарушение обмена гликогена, приводящее к его накоплению в мышцах (амилопектиноз). Пациенты с дефектом RBSK1 имеют широкие и вариабельные клинические проявления, включая лихорадку, инфекционный синдром (различные кожные воспаления, рецидивирующие бактериальные инфекции, вплоть до сепсиса), а также миопатии, кардиомиопатии и энцефалопатии (Nilsson J et al., 2013).

Врожденная нейтропения может встречаться при самых разных наследственных нарушениях иммунной системы. Пациенты с врожденной

нейтропенией страдают от острых и хронических инфекционных состояний, таких как отит, гингивит, кожные инфекции, пневмония, глубокие абсцессы и сепсис. Дебютировать болезнь может в неонатальном периоде и без соответствующего лечения проявления болезни остаются на всю жизнь (Skokowa J. et al., 2017).

Причинами врожденной нейтропении могут быть дефекты созревания и функции нейтрофилов, синдромы иммунной дисрегуляции (различные гемофагоцитарные лимфогистиоцитозы), некоторые тяжелые комбинированные иммунодефициты (например, ретикулярный дисгенез и дефект активации RAC2), а также первичная аутоиммунная нейтропения на разных стадиях развития нейтрофилов. Обычно пациентам с тяжелой врожденной нейтропенией требуется антимикробная профилактика и лечение гранулоцитарным колониестимулирующим фактором, а радикальное излечение невозможно без трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (Skokowa J. et al., 2017). В настоящее время существует более 30 врожденных ошибок иммунитета (или первичных иммунодефицитов), при которых наблюдается нейтропения, и, хотя каждое состояние в отдельности встречается редко, общая распространенность этих состояний в популяции серьезная, и для назначения адекватной терапии необходима хорошая и своевременная диагностика (McNulty S.N. et al., 2021). Около половины всех случаев тяжелой врожденной нейтропении вызваны вариантами в гене *ELANE*. На долю других связанных генов, включая *TCIRG1*, приходится небольшой процент всех случаев этого заболевания. Генетическая основа >30 % случаев остается невыясненной.

Синдром Хеннекама – это аутосомно-рецессивное заболевание, и это одна из самых редких форм первичного иммунодефицита, который в своём фенотипе имеет пороки развития лимфатической системы (Hilliard R.I. et al., 1990). Основными проявлениями синдрома Хеннекама является лимфедема-лимфангиоэктазия, поражающая любую часть тела с преобладанием нижних конечностей, кишечника, брюшной и плевральной полостей. Кроме того, у таких пациентов часто уплощены черты лица, имеется широкая переносица, гипертелоризм, эпикант, могут наблюдаться и другие аномалии (Hennekam R.C. et al., 1989). Синдром Хеннекама может быть вызван мутациями в гене *CCBE1* (25% случаев), а также в гене *FAT4* и *ADAMTS3*, и при этом каждый из них так или иначе влияет на сигнальные пути VEGF-C / VEGFR-3 (Alders M. et al., 2013).

Таким образом, важность выявления причиннозначимых вариантов генов иммунопатологии, а также поиск механизмов развития патологии, которые приводят к фенотипу исследуемых синдромов, обусловили цель нашего исследования.

**Цель исследования** – Определить роль потенциально патологических вариантов причиннозначимых генов в патогенезе врожденных ошибок иммунитета – дефиците RBCK1, врожденной нейтропении и синдроме Хеннекама, используя методы биоинформационного анализа.

**Задачи исследования:**

1. Провести сравнительный анализ экспрессии генов при дефиците RBCK1 относительно здоровых детей и пациентов с синдромами CINCA/NOMID, Макл-Уэллса и дефицита мевалонаткиназы.
2. Оценить патогенность несинонимичных однонуклеотидных замен в генах *ELANE* и *TCIRG1* при врожденной нейтропении.
3. Выявить потенциально возможные новые гены-кандидаты при развитии болезней, относящихся к группе врожденных нейтропений.
4. Выявить новые варианты генов *CCBE1*, *ADAMTS3* и *FAT4*, приводящих к развитию синдрома Хеннекама.

**Научная новизна.** В результате проведенных научных исследований впервые выполнено следующее.

Впервые выявлены различия экспрессии генов в мононуклеарах периферической крови у лиц с дефицитом RBCK1 относительно здоровых лиц.

Впервые выявленные новые патогенные варианты генов *TCIRG1* и *ELANE*, также, как и уже опубликованные варианты nsSNP, были проанализированы на предмет их влияния на соответствующие белки.

Впервые выявлены новые гены-кандидаты врожденной нейтропении, которые в будущем могут быть использованы для диагностики болезни и разработки патогенетически обоснованных методов лечения.

Впервые выявленные новые несинонимичные однонуклеотидные полиморфизмы в причиннозначимых генах синдрома Хеннекама (*CCBE1*, *FAT4* и *ADAMTS3*) были определены вместе с ранее опубликованными вариантами как оказывающие значительное влияние на структуру и функцию соответствующих белков.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Теоретическая значимость исследования заключается в получении с помощью разработанной программы последовательного использования методов биоинформационного анализа, включая симуляцию молекулярной динамики, новых данных о генетико-фенотипических взаимосвязях, составляющих патогенетическую основу формирования болезней, ассоциированных с врожденными ошибками иммунитета, а именно: дефицита RBCK1, врожденной нейтропении и синдрома Хеннекама. Это

позволит использовать полученные сведения в дальнейших исследованиях при поиске терапевтических мишеней при данных болезнях.

Практическая значимость исследования заключается в открывающейся возможности использования предсказанных вариантов генов в дифференциально-диагностическом процессе при определении таких синдромов первичных иммунодефицитов как дефицит RBSK1, врожденная нейтропения и синдром Хеннекама.

Разработанная программа последовательного использования методов биоинформационного анализа может быть применена при поиске новых генов-кандидатов болезней, ассоциированных с врожденными ошибками иммунитета.

**Методология и методы исследования.** Работа выполнена на кафедре иммунохимии Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный Университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» и в лаборатории иммунологии воспаления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

Для решения поставленных в работе задач были проанализированы 4 набора данных, загруженных из базы данных GEO с общим числом образцов транскриптов 443, данные однонуклеотидных полиморфизмов для генов *ELANE*, *TCIRG1*, *CCBE1*, *FAT4* и *ADAMTS3* из базы данных dbSNP-NCBI и Ensembl общим числом 222251 SNP и 2 результата полногеномного секвенирования пациентов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. При дефиците RBSK1 снижена экспрессия генов сигнальных путей иммунного ответа, воспалительного ответа и фосфорилирования белков.
2. Выявленный при врожденной нейтропении перечень генов расширяет спектр известных генов этой группы первичных иммунодефицитов.
3. Новые несинонимичные однонуклеотидные замены в генах *TCIRG1* и *ELANE* являются дестабилизирующими для белков TCIRG1 и ELANE.
4. Идентифицированные новые несинонимичные однонуклеотидные замены в генах, приводящих к развитию синдрома Хеннекама, являются дестабилизирующими структуру и функцию белков CCBE1, ADAMTS3 и FAT4.

**Степень достоверности полученных результатов** Достоверность полученных результатов исследования обеспечена обоснованностью исходных теоретических позиций, применением современных методов исследования, соблюдением правил использования соответствующих инструментов сбора данных и высокотехнологичным современным анализом данных. Дизайн исследования был основан на обширном обзоре современных литературных данных, а гипотезы были

проверены с использованием различных статистических и биоинформационных методов. Достоверность полученных данных подтверждена экспертной комиссией Института иммунологии и физиологии УрО РАН (составлен акт проверки первичной документации от 07.04.2023).

**Личный вклад автора** Личный вклад автора состоит в прямом участии на всех этапах диссертационного исследования. Создание основной идеи, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, целей, задач, определение методологии исследования, интерпретация и анализ полученных результатов были проведены диссертантом совместно с научными руководителями.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты работы внедрены в учебный процесс отдела аспирантуры Института иммунологии и физиологии УрО РАН и кафедры иммунохимии Химико-технологического института Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, а также в научно-исследовательскую практику лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН. Полученные результаты внедрены в практику работы ГАУЗ СО Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка».

**Апробация работы.** Основные положения диссертации представлены на Международном Евро-Азиатском Конгрессе по вопросам биоэтики, молекулярной и персонализированной медицины "Biomed-inn-2019" (Пермь, 08.11.2019), Международной конференции «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии» (Екатеринбург, 21.11.2020), Российской конференции с международным участием «Экспериментальная и компьютерная биомедицина» памяти члена-корреспондента РАН Владимира Семёновича Мархасина (Екатеринбург, 28.05.2021), Второй международной конференции «Врач – Пациент — Общество: иммунология и генетика 2022» (Екатеринбург, 25.05.2022).

**Публикации.** По результатам диссертации соискателем опубликовано 13 работ, из них в изданиях, рецензированных ВАК, имеющих категорию К1 – 4 статьи, индексируемые в МБД Scopus квинтиль Q1 – 2 статьи, индексируемые в МБД WoS и Scopus, квинтиль Q2 – 1 публикация, в МБД Scopus Q3 и Q4 - 6 статей.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 230 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех глав с результатами собственных исследований, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы (228 источников, из них 12 отечественных и 216 иностранных). Работа иллюстрирована 20 таблицами, 79 рисунками и 2 формулами.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы.** Для исследования патогенеза дефицита RBCK1 был проведен сравнительный анализ экспрессии генов, для чего из базы данных NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) были загружены 2 датасета: GSE31064, включавший данные, полученные по результатам исследования фибробластов кожи пациентов – 2 с дефицитом RBCK1, один с дефицитом MYD88, один с синдромом NEMO и 3 образца здоровых людей (в качестве контроля); GSE40561, включавший данные, полученные по результатам исследования цельной крови, собранной у 2 пациентов с болезнью CINCA/NOMID, пяти пациентов с синдромом Макл-Уэллса, 2 пациентов с дефицитом мевалонаткиназы, одного пациента с дефицитом RBCK1 и 41 здорового ребенка (в качестве контроля). Для поиска генов-кандидатов врожденной нейтропении был проведен анализ различий экспрессии генов двух наборов данных, загруженных из NCBI GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Набор данных GSE142347 включал результаты анализа экспрессии генов 93 пациентов женского пола, 95 пациентов мужского пола, 193 контрольных результатов здоровых лиц; набор данных GSE6322 включал результаты анализа экспрессии генов 2 родителей и 2 детей с нейтропенией из одной семьи.

Данные по различным генам и однонуклеотидным заменам (SNP) при врожденной нейтропении и синдроме Хеннекама были загружены из баз данных dbSNP-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) и Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>). Для исследования однонуклеотидных полиморфизмов или замен (SNP) в генах врожденной нейтропении были загружены следующие SNP: для гена ELANE: 3646 SNP, из которых несинонимичных однонуклеотидных замен (nsSNP): 301; для гена TCIRG1, соответственно, всего 5627 SNP, из которых 811 nsSNP. Для исследования SNP в генах синдрома Хеннекама: CCBE1 – 73845 SNP и 407 nsSNP; FAT4 - 68257 SNP и 3434 nsSNP; ADAMTS3: 70876 SNP и 911 nsSNP. Для оценки вариантов генов были использованы другие базы данных, включая Swiss-Prot ([http://expasy.org./](http://expasy.org/)) и OMIM (<https://www.omim.org/>).

Исследование вариантов генов у пациентов с врожденной нейтропенией и синдромом Хеннекама из Свердловской области выполнено благодаря имеющимся результатам секвенирования (выполненных в МГЦ Геномед), добровольно предоставленным пациентами для исследования в Институте иммунологии и физиологии УрО РАН, далее обезличенным. Для проведения оценки вредоносности несинонимичной однонуклеотидной замены на структуру и функцию белка использовалась следующая очередность действий. Сначала все выявленные в базах данных nsSNP оценивались инструментом SIFT, затем отсортированные вероятно

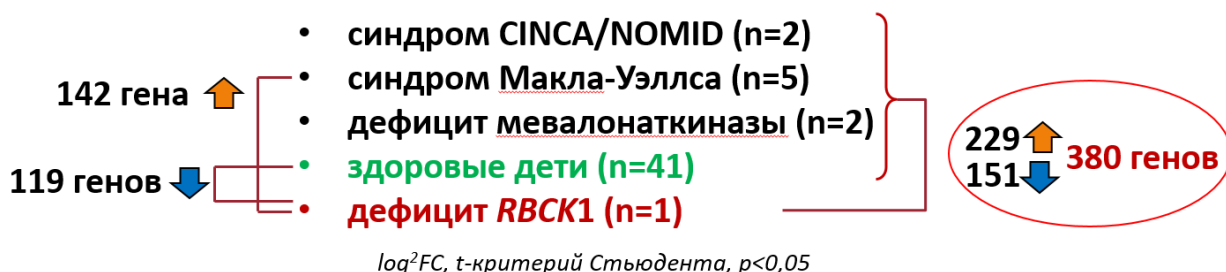
вредоносные мутации проходили через программу PolyPhen-2, а в дальнейшем отправлялись на оценку другими инструментами биоинформатики, как программами, так и онлайн-сервисами, общим числом до 18 - PROVEAN, FATHMM, LRT, M-CAP, META SVM, METALR, Mutation Assessor, Mutation Taster, FATHMM MKLCoding, CAAD, PHD-SNP, Panter, SNP&GO, PON-P2, DANN, SNAP2 - все эти инструменты были доступны через VarCard и MutPred. Пороговыми значениями для перечисленных выше инструментов были следующие значения: Mutation Taster:  $< 0.5$ ; CADD:  $> 15$ ; MetaLR:  $> 0.5$ ; M-Cap:  $> 0.025$ ; PANTHER: вероятно повреждающая (probably) замена при  $\text{time} > 450\text{my}$  возможно повреждающая (possibly, «при возможности», менее вероятная) при  $450\text{my} > \text{time} > 200\text{my}$ , вероятно доброкачественная при  $\text{time} < 200\text{my}$ ; VEST3:  $> 0.5$ ; LRT:  $> 0.001$ ; PROVEAN:  $> -2.667$ ; FATHMM-MKK:  $< 0.5$ ; PhDSNP:  $> 0.5$ ; SNP-GO:  $> 0.5$ ; SNAP2: шкала от  $-100$  (полностью нейтральная) до  $+100$  (оказывает сильный эффект); DANN:  $> 0.5$ ; Mutation Assessor:  $> 0.65$  (от  $-5.545$  до  $5.975$ , чем выше значение, тем более повреждающая); FATHMM:  $> 0.453$ ; PON-P2:  $> 0.5$ .

Для оценки влияния однонуклеотидных замен на структуру и стабильность белков использовались программы биоинформационного анализа I-Mutant 3.0, iStable 2.0 и MU-PRO. Для оценки белок-белковых взаимодействий использовался пакет программного обеспечения STRING и Cytoscape. Для анализа функционального обогащения использовалась база KEGG. Для анализа ко-экспрессии генов использовалась программа SemiTool. Для построения 3D-модели структуры белков дикого и мутантного типов при оценке влияния мутаций на функцию белка были использованы программы HHPred, Alpha fold 2, Phyre2, I-Taser, Chimera UCSF Chimera и PyMOL. Симулирование молекулярной динамики проводилось с помощью пакетов Maestro и Gromacs 4.5.3 от компании Schrödinger LLC. Анализ результатов полногеномного секвенирования и выявление однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) проводился на суперкомпьютере, предоставленном центром коллективного пользования ИММ УрО РАН -ИММ УрО РАН «Суперкомпьютерный центр» (Екатеринбург). От родителей пациентов было получено информированное согласие на использование обезличенных результатов исследования. Статистический анализ, биоинформационные инструменты и математические модели были выполнены с использованием Python версии 3.7.1 (<https://www.python.org/>) и R версии 3.4.3 (<https://www.r-project.org/>) на операционной системе Linux.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Оценка различия экспрессии генов и исследование основных сигнальных путей у пациентов с дефицитом RBCK1.** Для того, чтобы приблизиться к пониманию механизмов, лежащих в основе патогенеза этой патологии, был проведен сравнительный анализ экспрессии генов между данными транскрипции пациентов с дефицитом RBCK1, с синдромом CINCA/NOMID, с синдромом Макла-Уэллса, с дефицитом мевалонаткиназы (MVK) и данными транскрипции здоровых лиц (*рисунок 10*). Полученные в результате анализа гены с разницей в экспрессии были аннотированы и функционально обогащены, то есть была получена информация об их роли в функционировании организма, в каких сигнальных путях задействованы данные гены и при каких состояниях они экспрессировались по сведениям, полученным ранее другими исследователями.

Из набора данных GSE40561, включающего в сумме 48803 генов у разных лиц, было обнаружено 380 различных генов с дифференциальной экспрессией: 229 генов имели повышенную экспрессию, а 151 ген - сниженную. Сравнительный анализ транскрипции образцов здоровых лиц и пациентов с дефицитом RBCK1 показал наибольшее количество DEG – 119 генов с достоверно сниженной экспрессией. Кроме того, при сравнении образцов RBCK1 и MWS было выявлено значительное отличие в сравнительно высокой экспрессии 142 генов при дефиците RBCK1 (*рисунок 1*).



**Рисунок 1 – Достоверные различия экспрессии генов при дефиците RBCK1 в сравнении со здоровыми детьми и пациентами с другими аутовоспалительными синдромами**

Следующим этапом стало определение вовлеченности дифференциально экспрессируемых генов при дефиците RBCK1 в ключевые сигнальные пути и оценка их влияния на биологические функции.

Результат генной аннотации в категории биологических процессов продемонстрировал вовлеченность сигнальных путей иммунологического ответа, воспалительного ответа и фосфорилирования белков.

При функциональном обогащении дифференциально экспрессированных генов нами выяснилось, что при дефиците RBCK1 (относительно здоровых) задействованы сигнальные пути развития лейшманиоза, восприимчивости к стафилококковой инфекции, холере, NK-клеточной цитотоксичности и различные другие пути, влияющие на иммунный ответ. Это не означает, что при дефиците RBCK1 повышается вероятность соответствующей патологии, однако становится более понятным системное влияние дефицита одного белка на различные процессы, так или иначе затрагивающие иммунную систему и противoinфекционную защиту. Вместе с тем, изменение активности генов сигнальных путей mTOR, PI3K/AKT, Rho и Nf-kB, прямо или косвенно влияет на экспрессию генов иммунной системы.

В результате исследований выявлено высоко достоверное снижение экспрессии гена CISD2 у данного пациента с дефицитом RBCK1. Известно, что дефект CISD2 ведет к стрессу эндоплазматического ретикулума и апоптозу (Shen Z.Q. et al., 2021). Принимая во внимание тесную функциональную взаимосвязь данного белка с процессами апоптоза и клеточного стресса, можно предположить, что влияние низкой экспрессии данного гена на патогенез оказывает негативное влияние на устойчивость мононуклеаров периферических крови к апоптозу и клеточной гибели.

Найденные отличия в экспрессии генов раскрывают некоторые аспекты молекулярных взаимосвязей, позволяя приблизить понимание патогенеза дефицита RBCK1.

#### **Исследование влияния несинонимичных однонуклеотидных замен в гене *ELANE* и *TCIRG1* на структуру и функцию белков *ELANE* и *TCIRG1*, причиннозначимых для тяжелой врожденной нейтропении**

Определение вредоносности несинонимичных однонуклеотидных замен с помощью инструментов SIFT и PolyPhen-2 позволило выявить в гене *ELANE* 8 nsSNP как вредоносные из общего числа 301 nsSNP, полученных из базы данных NCBI. В гене *TCIRG1* результат объединенного анализа этих двух программ позволил выбрать только 34 nsSNP из общего числа 811 nsSNP.

Для подтверждения деструктивности полиморфизмов, отобранных через SIFT и PolyPhen-2, были использованы дополнительные инструменты *in silico*. Восемнадцать вычислительных инструментов позволили подтвердить число вероятно вредоносных замен в гене *ELANE* и отобрать 15 наиболее вредоносных несинонимичных однонуклеотидных замен в гене *TCIRG1*.

Оценка влияния nsSNP с высоким риском патогенности на стабильность и функцию белка *ELANE* с помощью веб-сервиса I-Mutant 3.0 позволила

предположить, что аминокислотные замены V101L и A166V повышают стабильность белка ELANE, тогда как R34W, C71R, V101M, P139L, R143C, C151Y, A166T, T175M, R182H, V190M, R193W, G203S, L206F, N209K, G210R, G214R, F218L, P262S и P262L R50C снижают его расчётную стабильность.

Относительно TCIRG1 результаты оценки отобранных nsSNP в I-Mutant 3.0. показали, что аминокислотные замены G405R, S474W и A778V повышают стабильность белка, в то время как P572L, M546V, I730N, F610S, A732T, F51S, A717D, E722K, R57H, R109W, R191W, S532C, G192S, F529L, H804Q, G458S, R444L, R56P, G379S, R757C, N730S, V375M, T314M, D517N, R92W, T368M, A417T, R363C, R56W и R50C снижают его расчётную стабильность.

В то же время, алгоритм Mu-pro показал, что все выявленные по предыдущим тестам nsSNP с высокой оценкой патогенности снижают стабильность исследуемых белков.

Для обоих белков был проведен анализ влияния аминокислотных замен на высококонсервативные регионы белков с использованием сервиса ConSurf. Результаты показали, что многие из предположительно патогенных замен влияют на высококонсервативные регионы белка, в том числе функциональные аминокислотные остатки.

Предсказание структур ELANE с учетом отобранных аминокислотных замен, было проведено с помощью Pyre2, а 3D-моделирование с помощью I-Tasser. Затем 3D-модели из I-Tasser были загружены в онлайн-сервис Zhanggroup, который выдал результаты в виде метрики сравнения моделей (TM-score) и среднеквадратичного отклонения (RMSD) C-альфа атомов белка ELANE дикого типа относительно мутантного (таблица 1).

Четыре nsSNP с наибольшими значениями RMSD (C71Y, G214R, R34W и F218L) были выбраны и переданы в I-Tasser для ремоделирования и сравнения структур с диким типом. Результаты проверки для дикого и мутантного вариантов 3D-моделей были удовлетворительными. В дальнейшем эти избранные мутантные типы ELANE были использованы в эксперименте *in silico* при скрининге молекулярного докинга.

Докинг визуально оценивался с помощью Discovery Studio и PyMol. Взаимодействия участков докинга были рассчитаны для выявления сил связывания, которые были решающими в стабилизации образования комплексов рецептор-лиганд. Результаты исследования докинга, включая анализ различных водородных связей, Ван-дер-Ваальсовы и гидрофобные контакты продемонстрировал, что мутации, G214R и R34W имеют взаимодействия, довольно близкие к дикому типу.

Две другие замены – C71Y и F218L – имели меньше водородных связей, что указывает на то, что эти две мутации могут влиять на стабильность и энергию белка ELANE.

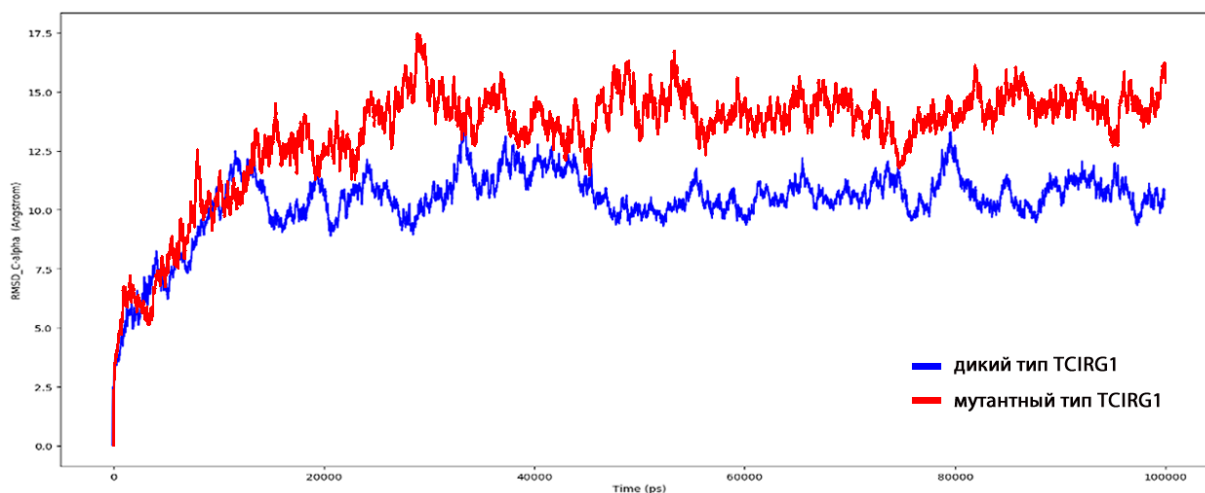
**Таблица 1 – TM-score и значения среднеквадратичного отклонения (RMSD) для выбранных nsSNP в белке ELANE**

nsSNP	замена	TM-Score	RMSD
rs28931611	C71Y	0.85993	2.05
rs201163886	R34W	0.86482	1.98
rs200384291	F218L	0.87828	1.96
rs137854451	G214R	0.96114	1.12
rs201723157	R193W	0.95176	0.96
rs201139487	G203S	0.99524	0.49
rs137854448	P139L	0.99994	0.04

Для белка TCIRG1, после предыдущего этапа исследований было отобрано 15 наиболее вредоносных несинонимичных однонуклеотидных замен (и соответствующих аминокислотных замен), которые по предсказаниям использованных алгоритмов окажут наибольшее влияние на структуру и функцию белка TCIRG1: rs199902030, rs200149541, rs372499913, rs267605221, rs374941368, rs375717418, rs80008675, rs149792489, rs116675104, rs121908250, rs121908251, rs121908251, rs149792489, rs116675104, rs118141250. Дополнительно была включена одна из замен (rs118141250, Val52Leu), которая была ранее выявлена у пациента из Свердловской области по результатам полногеномного секвенирования. Все эти мутации были включены в одну трехмерную структуру белка TCIRG1, поскольку все они располагались в разных участках. Таким образом, при наложении и сравнении моделей удалось увидеть отличия в 3D-структуре для каждого из участков, где могла бы появиться замена. В дальнейшем была проведена симуляция молекулярной динамики 3D-моделей дикого и мутантного вариантов TCIRG1 в AlphaFold2.

Результаты оценки RMSD указывают на то, что мутантный белок имеет более высокий RMSD в течение периода моделирования в 100 нс (*рисунок 2*).

Результаты оценки влияния аминокислотных замен на молекулярную динамику с учетом вторичных структур белков свидетельствуют о том, что стабильность молекулы TCIRG1 мутантного типа снижена относительно дикого типа белка.



**Рисунок 2 – Среднеквадратичное отклонение (RMSD) C $\alpha$  атомов дикого типа и мутанта TCIRG1 по данным HHpred с течением времени (100 нс)**

*Примечание:* по оси абсцисс – время в пс, по оси ординат – RMSD (Å).

Таким образом, несинонимичные однонуклеотидные замены в генах *TCIRG1* (rs199902030, rs200149541, rs372499913, rs267605221, rs374941368, rs375717418, rs80008675, rs149792489, rs116675104, rs121908250, rs121908251, rs121908251, rs149792489 и rs116675104) и *ELANE* (rs200384291, rs201163886, rs193141883, rs201139487 и rs201723157) дестабилизируют белки TCIRG1 и ELANE, позволяя предположить их влияние на реализацию синдрома тяжелой врожденной нейтропении.

**Для поиска и предсказания новых генов-кандидатов тяжелой врожденной нейтропении** первым шагом стал обзорный анализ опубликованной информации, анализ информации в базах данных генома и наследственных болезней, а также обзор генетических исследований, связанных с фенотипом.

При помощи базы данных STRING, была извлечена информация о белок-белковых взаимосвязях для всех известных генов первичных иммунодефицитов. Полученные результаты продемонстрировали сильное взаимодействие генов врожденной нейтропении друг с другом.

На основе корреляционного анализа Пирсона и белок-белковых взаимодействий (Cheng F., et al., 2018), было получено 4 613 специфических взаимодействий генов, функционально связанных с врожденной нейтропенией, и 177 генов-кандидатов. Используя данные KEGG, мы провели анализ функционального обогащения известных генов врожденной нейтропении, фактически, связав гены из списка с их биологическими функциями. Наш анализ KEGG-путей показал 5 статистически значимых сигнальных путей ( $p < 0,05$ ), таких

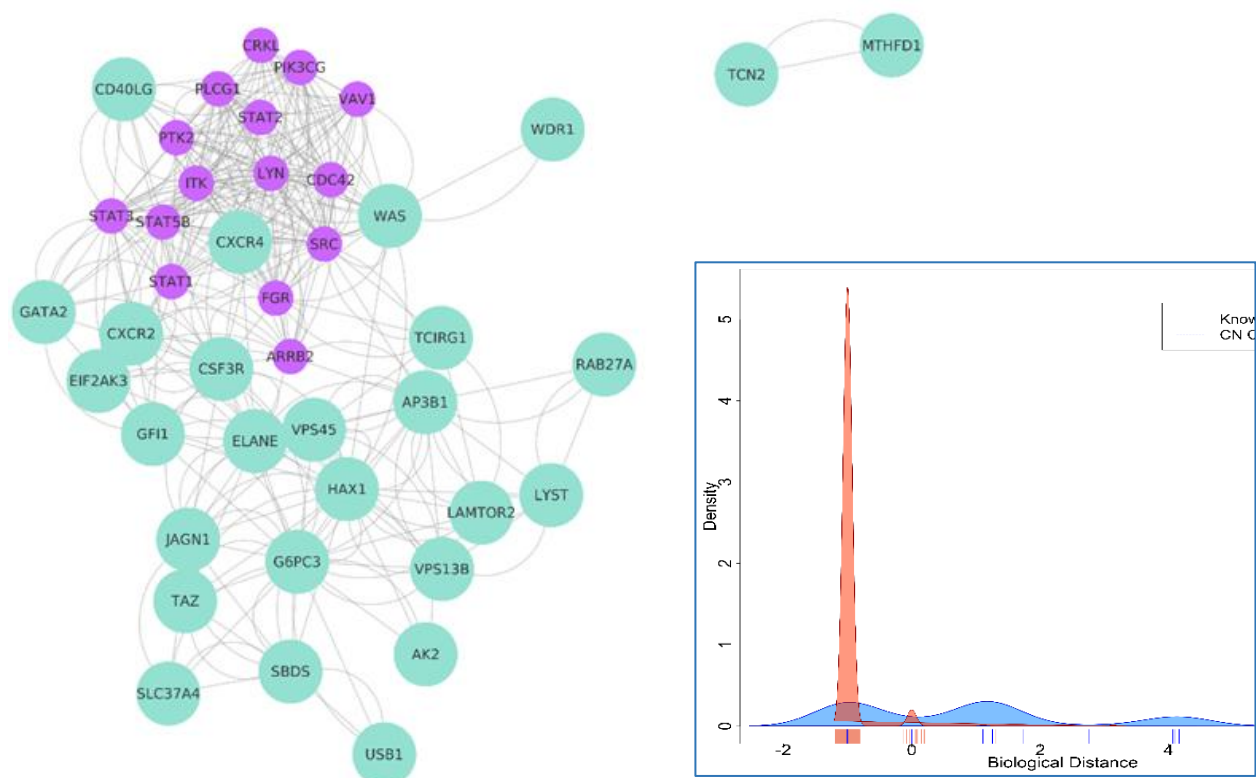
как взаимодействие цитокин-цитокиновых рецепторов, хемокиновые сигнальные пути и прочие. На основе этих данных, мы провели поиск конкретных генов-кандидатов, которые функционально схожи с известными генами врожденной нейтропении и обогащены по крайней мере одним из вышеупомянутых пяти путей KEGG. Таким образом было получено 15 новых генов-кандидатов врожденной нейтропении: STAT1, STAT2, STAT3, STAT5B, LYN, FGR, SRC, PIK3CG, ITK, VAV1, CDC42, PTK2, CRKL, PLCG1, ARRB2.

Анализ функционального обогащения генов врожденной нейтропении с включением 15 генов-кандидатов, показал, что в общей сложности задействовано 15 статистически значимых сигнальных путей, описанных в базе данных KEGG (например, инфекция вируса Эпштейна-Барр, взаимодействие цитокин-цитокиновый рецептор и сигнальный путь рецептора В-клеток).

Для 15 генов-кандидатов врожденной нейтропении и 31 известного гена врожденной нейтропении было проведено сравнение плотности генной сети и биологической дистанции. Результаты сравнения свидетельствуют о том, что гены-кандидаты врожденной нейтропении имеют сопоставимые сильные биологические связи (*рисунок 3*).

Кроме того, каждый ген-кандидат врожденной нейтропении был смешан с известными генами врожденной нейтропении, и биологическое расстояние смешанного гена было определено заново. Затем смешанные гены были подвергнуты филогенетическому анализу FGA для определения биологического родства между геном врожденной нейтропении и геном-кандидатом врожденной нейтропении. Результаты показали, что 15 генов-кандидатов врожденной нейтропении равномерно распределены по всему диапазону известных генов, что подразумевает их тесную связь с известными генами врожденной нейтропении. Оценка разницы экспрессии генов в нейтрофилах периферической крови пациентов в анализируемых наборах данных позволила подтвердить предварительные результаты с помощью другого подхода. Кроме того, при сравнении генов с разницей в экспрессии генов нейтрофилов периферической крови и В-клеток пациентов с врожденной нейтропенией были выявлены общие гены со сниженной и повышенной экспрессией относительно контрольных образцов. Фактически это означало выявление общих свойств транскриптома нейтрофилов и В-клеток пациентов с врожденной нейтропенией.





**Рисунок 3 – Сеть межбелковых взаимодействий известных и генов-кандидатов врожденной нейтропении (Cytoscape). Во врезке – сравнение биологической дистанции известных генов и генов-кандидатов врожденной нейтропении**

*Примечание:* на основном рисунке - зеленым цветом отмечены известные гены врожденной нейтропении, фиолетовым – гены-кандидаты. Во врезке: голубым – сетевая плотность и биологическая дистанция известных генов врожденной нейтропении, красным – генов-кандидатов.

Определив новые гены-кандидаты, мы провели исследование качества прогноза, ознакомившись с результатами других исследователей. В частности, десять генов-кандидатов врожденной нейтропении (STAT1, STAT2, STAT3, STAT5B, LYN, FGR, SRC, PIK3CG, ITK, VAV1, CDC42), которые отсутствовали в перечне ESID, но были предсказанные нами, были выявлены другими авторами в клинических случаях врожденной нейтропении. Это подтверждает значимость выявленных нами генов-кандидатов врожденной нейтропении.

**Для проверки потенциальной патогенности новых nsSNP генов синдрома Хеннекама (CCBE1, FAT4 и ADAMTS3) с помощью современных инструментов *in silico* нами были исследованы наиболее патогенные несинонимичные однонуклеотидные полиморфизмы генов CCBE1, FAT4 и ADAMTS3.**

Наши результаты демонстрируют, что семь nsSNP в гене CCBE1 (rs115982879, rs149792489, rs374941368, rs121908254, rs149531418, rs121908251 и rs372499913) вероятно оказывают патогенное влияние, а четыре из них (G330E,

C102S, C174R и G107D) являются патогенными с очень высокой вероятностью, при этом две из них (G330E и G107D) никогда не встречались в контексте синдрома Хеннекама.

Кроме того, были оценены две важные замены в гене *CCBE1* (rs374941368 и rs200149541), которые могут оказывать влияние на посттрансляционные изменения, поскольку они влияют на возможный участок фосфорилирования.

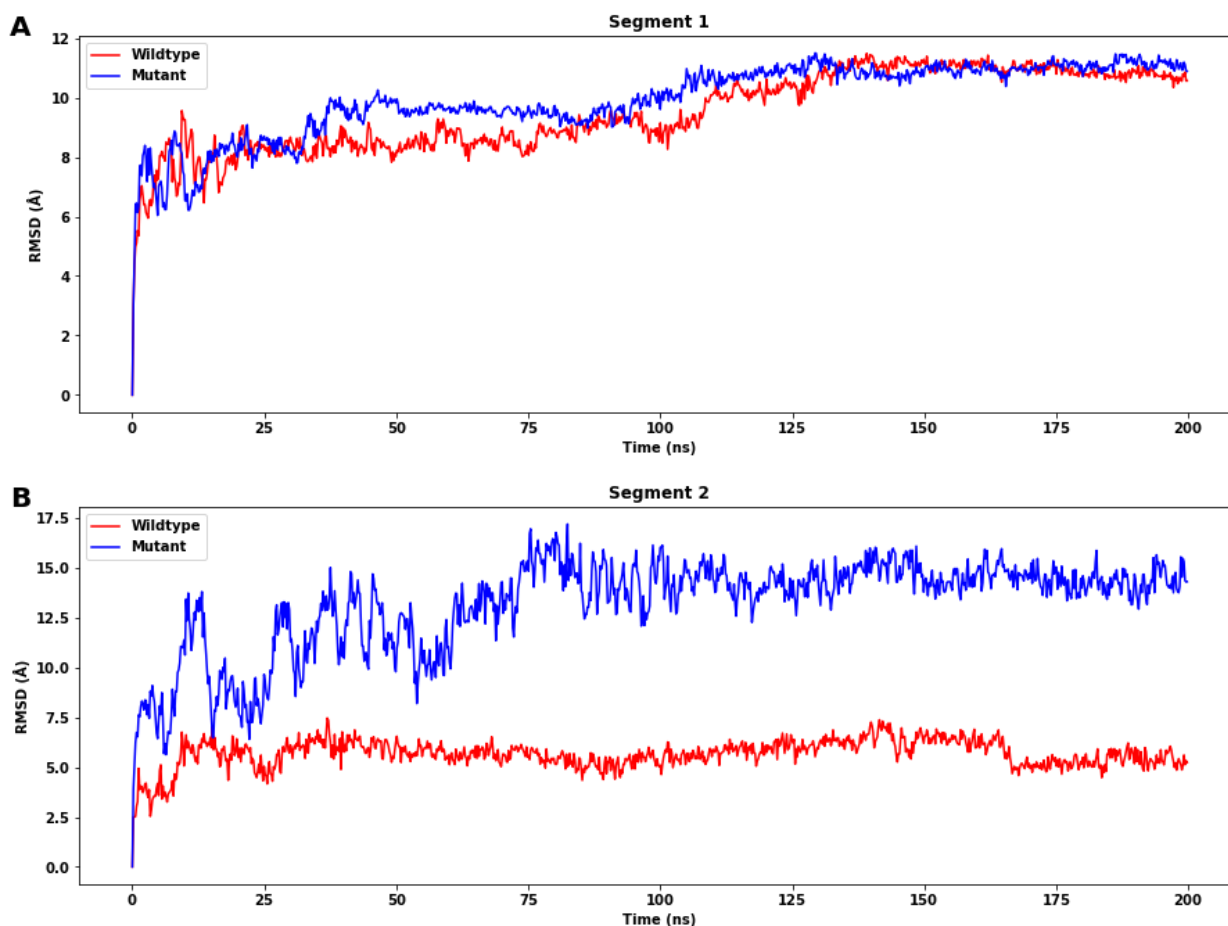
При анализе вариантов гена *ADAMTS3* из базы dbSNP предварительно было отсортировано 919 nsSNP, из которых 5 замен (G298R, C567Y, A370T, C567R и G374S) были предсказаны как наиболее опасные, которые могут быть связаны с болезнью.

Моделирование белка *ADAMTS3* показало, что его можно разделить на сегменты 1, 2 и 3, которые соединены короткими петлями. С помощью различных инструментов симуляции молекулярной динамики было обнаружено, что некоторые замены значительно дестабилизируют структуру белка и нарушают вторичные структуры, особенно в сегменте 2 (рисунок 4).

Патогенное воздействие мутаций в сегменте 1, возможно, связано не с дестабилизацией, а с другими факторами, такими как изменение фосфорилирования, что предполагают исследования посттрансляционной модификации.

Наша работа – первое исследование полиморфизмов гена *ADAMTS3* множеством инструментов, включая симуляцию молекулярной динамики. О некоторых из предсказанных замен в белке *ADAMTS3* сообщений в библиотеке PubMed еще нет, и мы надеемся, что полученные данные будут полезными для диагностических задач и поиска методов терапии.

При анализе различных вариантов гена *FAT4* из 3 343 nsSNP, имеющих в библиотеке NCBI с помощью различных инструментов предсказания патогенности 11 замен в белке *FAT4* (D2978G, V986D, Y1912C, R4799C, D1022G, G4786R, D2439E, E2426Q, R4643C, N1309I и Y2909H) были предсказаны как потенциально патогенные. Кроме того, три замены в гене *FAT4* (rs12650153, rs1567047 и rs1039808) у пациента с фенотипом синдромом Хеннекама из Свердловской области ранее были обнаружены с помощью фильтрации вариантов-кандидатов при полногеномном секвенировании, а исследование этих мутаций *in silico* продемонстрировало, что они должны значительно дестабилизировать структуру и функцию белка.



**Рисунок 4 - Среднеквадратичное отклонение (RMSD) Ca атомов белка ADAMTS3 дикого типа (красный) и мутанта (синий) сегментов 1 (A) и 2 (B) с течением времени (в наносекундах)**

*Примечание:* для сегмента 1 (A) разница в равновесных RMSD незначительна. Для сегмента 2 (B) существует значительная разница между RMSD. Все средние значения и SD рассчитаны со значениями после 170 нс.

С помощью метода симуляции молекулярной динамики мы сфокусировались на 19 мутациях в гене *FAT4* – из 11 предсказанных в нашем исследовании *in silico*, 3 nsSNP обнаружены у пациента и 5 nsSNP уже опубликованы как вероятные причины синдрома Хеннекама и синдрома Ван Мальдергема, фенотипически отличающегося от синдрома Хеннекама.

Результаты примененного метода симуляции молекулярной динамики подтвердили более низкую стабильность «мутантного» белка по сравнению с «диким» типом. Генетические варианты, обнаруженные в этой когорте исследований, ранее не были зарегистрированы как причины синдрома Хеннекама. Стоит отметить, что в силу ограниченности ресурсов суперкомпьютера и программного обеспечения, такой длинный белок, как *FAT4*, который состоит из 4981 аминокислот, мог быть симулирован только фрагментарно. В нашем эксперименте молекула *FAT4* анализировалась пятью моделями – участками,

содержащими анализируемую замену длиной менее, чем 1000 аминокислот. Тем не менее, мы надеемся, что данные результаты могут способствовать лучшему пониманию предрасположенности к заболеваниям, связанным с активацией белка FAT4 и в дальнейшем могут помочь в разработке эффективных подходов для диагностики и лечения болезней, связанных с этим геном.

**Перспективы дальнейшего развития темы.** Идентификация специфических генетических изменений и определение молекулярной основы иммунопатологии позволит исследовать патогенетические механизмы, дифференцировать нозологические формы из обширной гетерогенной группы врожденных ошибок иммунитета, а также приблизить создание специфической таргетной терапии, включая геноредактирование и применение антисмысловых олигонуклеотидов. Это позволит решать вопросы радикального излечения пациентов. Кроме того, даже простое ускорение диагностического процесса поможет своевременно поставить диагноз, назначить заместительную и патогенетическую терапию, улучшить прогноз и качество жизни пациентов.

Процесс верификации генов первичного иммунодефицита может быть улучшен за счет разработки программного обеспечения для предсказания генов-кандидатов различных иммунопатологий, а включение методов предсказания влияния генетических изменений на белок *in silico* обеспечивает возможность его эффективного применения в клинических исследованиях.

Кроме того, изучение редких случаев патологии человека позволяет решать общепатологические вопросы формирования болезней, обогащая науку знаниями о закономерностях функционирования иммунной системы и всего организма человека. Погружаясь на молекулярный уровень патологии, исследователям становятся доступны объективные обоснования для разработки и применения целенаправленной терапевтической тактики, что открывает перспективу создания новых таргетных лекарственных средств.

## **ВЫВОДЫ**

1. Выявлены новые генетические нарушения при трех видах врожденных ошибок иммунитета (первичных иммунодефицитах): дефиците RBCK1, врожденной нейтропении и синдроме Хеннекама.

2. Выявлены достоверные отличия в экспрессии генов при дефиците RBCK1 относительно данных здоровых детей и пациентов с синдромом CINCA/NOMID, синдромом Макл-Уэллса и дефицита мевалонаткиназы.

3. Выявленные несинонимичные однонуклеотидные замены в гене *TCIRG1* (rs199902030, rs200149541, rs372499913, rs267605221, rs374941368, rs375717418, rs80008675, rs149792489, rs116675104, rs121908250, rs121908251, rs121908251, rs149792489, rs116675104) и *ELANE* (rs200384291, rs201163886, rs193141883, rs201139487, rs201723157) дестабилизируют белки *TCIRG1* и *ELANE* в нейтрофилах.

4. Гены *CDC42*, *CRKL*, *FGR*, *CRC*, *NYK*, *PLCG1*, *ARRB2*, *PIK3CG*, *PTK2*, *STAT1*, *STAT2*, *STAT3*, *STAT5B*, *VAV1* и *ITK* являются новыми генами-кандидатами развития врожденной нейтропении.

5. Несинонимичные однонуклеотидные замены в генах *CCBE1* (rs115982879, rs149792489, rs374941368, rs121908254, rs149531418, rs121908251 и rs372499913), *FAT4* (rs147663284, rs192514171, rs138137489, rs199895179, rs372060616, rs138173652, rs142184187, rs147633644, rs181607904, rs184971791, rs148655455) и *ADAMTS3* (rs61757480, rs61741624, rs140806973, rs140595148, rs140914273, rs142268705, rs142781084, rs143059623, rs146979323, rs372067284, rs370857003, rs375983592, rs367831484, rs202031187 и rs150012152) приводят к дестабилизации структуры белков *CCBE1*, *FAT4* и *ADAMTS3*, и могут стать причиной развития синдрома Хеннекама.

6. Разработанная программа последовательного использования методов биоинформационного анализа эффективна при поиске генов, оказывающих влияние на патогенез болезней, ассоциированных с врожденными ошибками иммунитета.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам при диагностике первичных иммунодефицитов (врожденных ошибок иммунитета) определение профиля экспрессии генов путем анализа дифференциальной экспрессии генов, сигнальных путей и генетических онтологий, а также определение биомаркеров патологии, позволит снизить затраты на лечение и предотвратить развитие побочных эффектов.

2. При проведении исследований по прогнозированию новых генов-кандидатов при врожденной нейтропении необходимо включать в анализ факторы ко-экспрессии, белок-белковые взаимодействия и сигнальные пути.

3. Для дифференциальной диагностики врожденной нейтропении в дополнение к генам, перечисленным на сайте ESID и в классификации IUIS, следует включить дополнительные гены (*CDC42*, *CRKL*, *FGR*, *CRC*, *NYK*, *PLCG1*, *ARRB2*, *PIK3CG*, *PTK2*, *STAT1*, *STAT2*, *STAT3*, *STAT5B*, *VAV1* и *ITK*), определенные в нашем исследовании в качестве генов-кандидатов.

4. Для дифференциальной диагностики синдрома Хеннекама и врожденной нейтропении, в дополнение к перечисленным миссенс-мутациям генов *ADAMTS3*, *FAT4*, *CCBE1*, *ELANE* и *TCIRG1* необходимо оценить наличие миссенс-мутаций nsSNP, выявленных в нашем исследовании для следующих генов:

- *CCBE1* (rs115982879, rs149792489, rs374941368, rs121908254, rs149531418, rs121908251 и rs372499913),

- *ELANE* (rs200384291, rs201163886, rs193141883, rs201139487 и rs201723157),

- *TCIRG1* (rs199902030, rs200149541, rs372499913, rs267605221, rs374941368, rs375717418, rs80008675, rs149792489, rs116675104, rs121908250, rs121908251, rs121908251, rs149792489 и rs116675104),

- *FAT4* (rs147663284, rs192514171, rs138137489, rs199895179, rs372060616, rs138173652, rs142184187, rs147633644, rs181607904, rs184971791, rs148655455) и

- *ADAMTS3* (rs61757480, rs61741624, rs140806973, rs140595148, rs140914273, rs142268705, rs142781084, rs143059623, rs146979323, rs372067284, rs370857003, rs375983592, rs367831484, rs202031187, и rs150012152).

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи из перечня изданий, рекомендуемых ВАК (К-1):

1. Ретроспективный анализ случаев первичных иммунодефицитов у детей с врожденными пороками сердца / С.С. Дерябина, Д.А. Черемохин, И.А. Тузанкина, Х. Шинвари // Российский иммунологический журнал. 2020. Т. 23, № 4. С. 505-514 (RSCI, ИФ РИНЦ – 0.165, ВАК К1).

2. Классификация врожденных ошибок иммунитета человека, обновленная экспертами комитета международного союза иммунологических обществ в 2019 году / М.А. Болков, И.А. Тузанкина, Х. Шинвари, Д.А. Черемохин // Российский иммунологический журнал. 2021. Т. 24 (1). С. 7-68 (RSCI, ИФ РИНЦ – 0.165, ВАК К1).

3. Роль врожденных ошибок иммунитета в группе детей с летальными исходами на первом году жизни / Д.А. Черемохин, И.А. Тузанкина, В.А. Черешнев, М.А. Болков, Х. Шинвари // Российский иммунологический журнал. 2022. Т. 25 (4). С. 555-560 (RSCI, ИФ РИНЦ – 0.165, ВАК К1).

4. Analysis of the TREC and KREC Levels in the Dried Blood Spots of Healthy Newborns with Different Gestational Ages and Weights / D.A. Cheremokhin, K. Shinwari, S.S. Deryabina, M.A. Bolkov, I.A. Tuzankina, D.A. Kudlay // Acta naturae. 2022. V. 14 (1). P. 101–108 (RSCI, ИФ РИНЦ – 2.121, ВАК К1).

### Статьи, индексируемые в МБД Scopus и Web of Science (Q1-Q4):

5. Is Up-Regulation Gene Expression of the Certain Genes During the Viral Respiratory Tract Infection Would Have Any Influence in Pathogenesis of the SAR-CoV-2 Infection? / K. Shinwari, G. Liu, M. Bolkov, I. Ahmad, M. Daud, I. Tuzankina, V. Chereshevnev // Acta Med. Iran. 2020. Vol. 58 (5). P. 246-248 (Scopus Q4).

6. Identifying Main Genes and Pathways by Using Gene Expression Profiling in Primary Immunodeficiency HOIL-1/RBCK1 Disorder Patients / K. Shinwari, G. Liu, M.A. Bolkov, M. Ullah, I. Tuzankina // *Acta Med. Iran.* 2021. V. 59 (5). P.265-279 (Scopus Q4).
7. Predicting the Most Deleterious Missense Nonsynonymous Single-Nucleotide Polymorphisms of Hennekam Syndrome-Causing CCBE1 Gene, In Silico Analysis / K. Shinwari, L. Guojun, S.S. Deryabina, M.A. Bolkov, I.A. Tuzankina, V.A. Chereshevnev // *The Scientific World Journal.* 2021. Vol. 2021. P. 6642626. (Scopus Q3).
8. Additional Pathogenic Pathways in RBCK1 Deficiency / E.I. Demicheva, K. Shinwari, K.S. Ushenin, M.A. Bolkov // *Mathematical Biology and Bioinformatics.* 2022. V. 17 (2). P. 174-187 (Scopus Q4, RSCI, ИФ РИИЦ – 0.527).
9. Checking gene expression profile associated with IRF7 and UNC93B deficient patient peripheral blood mononuclear cells infected with pH1N1 influenza virus / K. Shinwari, G. Liu, M.A. Bolkov, I.A. Tuzankina, V.A. Chereshevnev // *AIP Conference Proceedings.* 2022. Vol. 2390. P. 030089 (Scopus).
10. Gene expression and pathway analysis in patients with inborn error of TLRs and IL-IRs signaling using microarray data / K. Shinwari, G. Liu, M.A. Bolkov, I.A. Tuzankina, V.A. Chereshevnev // *AIP Conference Proceedings.* 2022. Vol. 2390. P.030088 (Scopus).
11. In Silico Analysis Revealed Five Novel High-Risk Single-Nucleotide Polymorphisms (rs200384291, rs201163886, rs193141883, rs201139487, and rs201723157) in ELANE Gene Causing Autosomal Dominant Severe Congenital Neutropenia 1 and Cyclic Hematopoiesis / K. Shinwari, M.A. Bolkov, M. Yasir Akbar, L. Guojun, S.S. Deryabina, I.A. Tuzankina, V.A. Chereshevnev // *Scientific World Journal.* 2022. Vol. 2022. P.3356835 (Scopus Q1)
12. Novel Disease-Associated Missense Single-Nucleotide Polymorphisms Variants Predication by Algorithms Tools and Molecular Dynamics Simulation of Human TCIRG1 Gene Causing Congenital Neutropenia and Osteopetrosis / K. Shinwari, H.M. Rehman, G. Liu, M.A. Bolkov, I.A. Tuzankina, V.A. Chereshevnev // *Front. Mol. Biosci.* 2022. Vol.9. P. 879875. (WoS Q2, Scopus Q1).
13. Novel high-risk missense mutations identification in FAT4 gene causing Hennekam syndrome and Van Maldergem syndrome 2 through molecular dynamics simulation / K. Shinwari, H.M. Rehman, N. Xiao, L. Guojun, M.A. Khan, M.A. Bolkov, I.A. Tuzankina, V.A. Chereshevnev // *Informatics in Medicine Unlocked.* 2023. Vol. 37. P. 101160 (Scopus Q2).

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

<b>ВОИ</b>	Врожденные ошибки иммунитета
<b>ПИД</b>	Первичные иммунодефициты
<b>CINCA/NOMID</b>	Хроническая инфантильная неврологическая кожно-суставная болезнь / Мультисистемное воспалительное заболевание с неонатальным началом
<b>ELANE</b>	Эластаза, экспрессируемая нейтрофилами
<b>FEL</b>	Ландшафт свободной энергии
<b>LUBAC</b>	Комплекс сборки линейной убиквитиновой цепи

<b>NF-kB</b>	Ядерный фактор kB
<b>nsSNP</b>	Несинонимичная однонуклеотидная замена/полиморфизм
<b>PAC2</b>	Шаперон для сборки протеасом 2
<b>PCA</b>	Анализ главных компонент
<b>RBCK1 (HOIL-1)</b>	RanBP-тип и C3HC4-тип цинковый палец-содержащий белок 1 (Гем-окисленная убиквитиновая лигаза-1 IRP2)
<b>RMSD</b>	Среднеквадратичное отклонение
<b>RMSF</b>	Среднеквадратичная флуктуация
<b>SASA</b>	Площади поверхности, доступной для растворителя
<b>VEGF-C / VEGFR-3</b>	Фактор роста эндотелия сосудов C / Рецептор к фактору роста эндотелия сосудов 3

## **Шинвари Хайбер**

# **НОВЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ В ОЦЕНКЕ ВРОЖДЕННЫХ ОШИБОК ИММУНИТЕТА: ДЕФИЦИТ RBCK1, ВРОЖДЕННАЯ НЕЙТРОПЕНИЯ, СИНДРОМ ХЕННЕКАМА**

3.2.7 – иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Подписано в печать 25.04.2023 Формат 60\*84 1/16

Усл.печ.л.1.0 Тираж 90 экз.