

## Авторы

А.А. Кубанов, В.В. Чикин\*, А.Э. Карамова, Е.С. Мончаковская

## Организации

Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии  
107076, Россия, г. Москва, ул. Короленко, 3, стр. 6

## Название статьи

Пограничный буллезный эпидермолиз: клинико-генетические корреляции

## Аннотация

Пограничный буллезный эпидермолиз в большинстве случаев вызывается различными мутациями генов *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *COL17A1*, *ITGA6* и *ITGB4* и характеризуется значительной вариабельностью клинических проявлений. К настоящему времени накоплены данные, позволяющие оценить корреляции между тяжестью болезни и характером генетических нарушений, лежащих в основе ее развития. Проведен анализ литературы, обнаруженной в базах данных научной литературы PubMed и РИНЦ при поиске по ключевым словам пограничный буллезный эпидермолиз (junctional epidermolysis bullosa), ламинин-332 (laminin 332), коллаген XVII типа (collagen XVII),  $\alpha\beta4$  интегрин ( $\alpha\beta4$  integrin). Описаны клинические проявления пограничного врожденного буллезного эпидермолиза, локализацию и тип мутации, ее влияние на синтез и функционирование белка. Для оценки влияния мутации гена на функционирование белка рассматривали строение и функции белков светлой пластинки базальной мембраны кожи, с мутациями которых наиболее часто ассоциируется пограничный врожденный буллезный эпидермолиз – ламинин-332, коллаген XVII типа и  $\alpha\beta4$ -интегрин. Обнаружено, что при пограничном врожденном буллезном эпидермолизе существует корреляция между носительством мутаций, приводящих к образованию преждевременных стоп-кодонов и отсутствию синтеза белка, и тяжелым течением болезни. Однако, необходима осторожность при проведении клинико-генетических корреляций, так как существуют механизмы, позволяющие восстанавливать синтез отсутствующего белка.

**Ключевые слова:** пограничный буллезный эпидермолиз, клинико-генетические корреляции, ламинин-332, коллаген XVII типа,  $\alpha\beta4$ -интегрин

## **Authors**

Alexey A. Kubanov, Vadim V. Chikin \*, Arfenya E. Karamova, Ekaterina S. Monchakovskaya

## **Affiliation**

State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology

Korolenko str., 3, bldg 6, 107076, Moscow, Russia

## **Title**

Junctional epidermolysis bullosa: genotype-phenotype correlations

## **Abstract**

Junctional epidermolysis bullosa most commonly results from mutations in the LAMA3, LAMB3, LAMC2, COL17A1, ITGA6 and ITGB4 genes. Junctional epidermolysis bullosa is characterized by clinical heterogeneity. To date, scientific findings allow to evaluate correlations between the severity of clinical manifestations and genetic defects underlying in the development of the disease. A systematic literature search was performed using PubMed and RSCI, and keywords including “junctional epidermolysis bullosa”, “laminin 332”, “collagen XVII”, “ $\alpha6\beta4$  integrin”. The review includes description of clinical findings of junctional epidermolysis bullosa, mutation location and types, its' impact on protein production and functions. To evaluate the impact of gene mutation on protein functions, this review explores the structure and functions of lamina lucida components, including laminin 332, collagen XVII and  $\alpha6\beta4$  integrin, which are frequently associated with the development of junctional epidermolysis bullosa. The correlation between severe types of junctional epidermolysis bullosa and mutations resulting in premature stop codon generation and complete absence of protein expression has been described. Although, genotype-phenotype correlations should be analyzed carefully due to mechanisms which enable to improve protein expression.

**Keywords:** junctional epidermolysis bullosa, genotype-phenotype correlations, laminin 332, collagen XVII, integrin  $\alpha6\beta4$

### Основной текст статьи

Пограничный врожденный буллезный эпидермолиз (ВБЭ) представляет собой группу редких генетически обусловленных заболеваний, вызванных мутациями генов, кодирующих белки, частично или полностью расположенные в светлой пластинке базальной мембраны кожи, в результате чего даже незначительные механические воздействия на кожу приводят к расщеплению эпидермиса и дермы на уровне светлой пластинки базальной мембраны, что клинически проявляется пузырьными и эрозивными высыпаниями. Выделены несколько клинических субтипов болезни (Таблица 1).

Таблица 1. Клинические субтипы пограничного ВБЭ [1]

Table 1. Junctional epidermolysis bullosa clinical subtypes

Клинический субтип пограничного ВБЭ	Мутантный белок
Тяжелый пограничный ВБЭ	Ламинин-332
Пограничный ВБЭ средней тяжести	Ламинин-332
Пограничный ВБЭ средней тяжести	Коллаген XVII типа
Пограничный ВБЭ с атрезией привратника	$\alpha\beta4$ интегрин
Пограничный ВБЭ локализованный	Ламинин-332, коллаген XVII типа, $\alpha\beta4$ интегрин, $\alpha3$ субъединица интегрин
Инверсный пограничный ВБЭ	Ламинин-332
Пограничный ВБЭ с поздним началом	Коллаген XVII типа
ЛОС-синдром	$\alpha3A$ -цепь ламинина
Пограничный ВБЭ с интерстициальным поражением легких и нефротическим синдромом	$\alpha3$ субъединица интегрин

Двумя основными субтипами пограничного врожденного буллезного эпидермолиза являются тяжелый пограничный ВБЭ (ранее – тяжелый генерализованный пограничный ВБЭ Герлица) и пограничный ВБЭ средней тяжести (ранее – генерализованный пограничный ВБЭ средней тяжести не-Герлица) [1]. Выделяют также локализованный пограничный ВБЭ, при котором поражение кожи и слизистых оболочек является ограниченным и может быть слабо выраженным, и пограничный ВБЭ с поздним началом. Известны также еще более редкие, в том числе синдромальные, субтипы болезни.

Общим признаком всех субтипов пограничного врожденного буллезного эпидермолиза является появление после незначительного механического воздействия пузырей на коже, а у многих больных – и на слизистых оболочках. На месте пузырей

образуются эрозии, длительность эпителизации которых может быть различна. Длительное существование эрозий, их повторное появление в местах, подверженных травмам, приводит к формированию избыточной грануляционной ткани, появлению рубцов или развитию атрофических изменений в местах бывших высыпаний [2, 3].

Поскольку белки, ассоциированные с развитием пограничного врожденного буллезного эпидермолиза, экспрессируются в базальных мембранах различных органов, от гена, который содержит патогенную мутацию, зависит, какие органы помимо кожи будут поражены у пациента. Абсолютный или функциональный дефицит ламинина-332 и коллагена XVII типа приводит к поражению слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, конъюнктивы и роговицы глаз. Участие данных белков в развитии придатков кожи и формировании зубов определяет возникновение ониходистрофии и алопеции, гипоплазии эмали и кариеса [4, 5]. С дефицитом  $\alpha\beta4$ -интегрин ассоциируется атрезия привратника, которая с рождения клинически проявляется рвотой фонтаном вследствие непроходимости антрального отдела желудка, что требует немедленной хирургической коррекции. Атрезия привратника первоначально рассматривалась как обязательный признак болезни, однако в последующем стало ясно, что у больных с мутациями генов  $\alpha6$ - и  $\beta4$ - субъединиц интегрин атрезия привратника может отсутствовать. Кроме того, вследствие дефицита  $\alpha\beta4$ -интегрин у пациентов с соответствующими мутациями развивается различной степени выраженности поражение эпителия мочеполового тракта [6].

Рубцевание очагов поражения слизистых оболочек мочеполовой системы и желудочно-кишечного тракта приводит к развитию стриктур и стенозов и как следствие к задержке мочи, гидронефрозу, гипертрофии мочевого пузыря, способствует развитию инфекционных осложнений – цистита, пиелонефрита, уросепсиса; гастроэзофагальной рефлюксной болезни, пептической язвы желудка, синдрома мальабсорбции, болезненные структуры и трещины в анальной области приводят к развитию запоров [2, 7].

Тяжесть проявлений пограничного врожденного буллезного эпидермолиза значительно варьирует. Наиболее известны формы заболевания, приводящие к смерти в младенческом или раннем детском возрасте – тяжелый пограничный ВБЭ и в ряде случаев – пограничный ВБЭ с атрезией привратника, тяжесть состояния при котором в некоторых случаях обусловлена не столько поражением кожи, которое может быть легким, сколько патологией мочевыводящих путей [6]. Однако у многих больных заболевание протекает менее тяжело, иногда проявляясь лишь ограниченными высыпаниями в местах, наиболее подверженных травмам, не влияя на продолжительность жизни [2].

В дебюте заболевания, который обычно приходится на младенческий возраст, опираясь только лишь на клинические данные прогнозировать дальнейшее течение болезни невозможно. Тем не менее, предполагается, что анализ клинико-генетических корреляций позволит определить течение различных субтипов врожденного буллезного эпидермолиза, так как клинические проявления заболеваний определяются геном, в котором произошла мутация, влиянием патогенной мутации на синтез белка и локализацией мутантного белка, который может экспрессироваться в различных органах и тканях помимо кожи [8, 9].

Развитие пограничного врожденного буллезного эпидермолиза связано с мутациями семи генов – *COL17A1*, *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *ITGA6*, *ITGB4* и *ITGA3*, кодирующих соответственно коллаген XVII типа,  $\alpha 3$ -,  $\beta 3$ - и  $\gamma 2$ -цепи ламинина-332,  $\alpha 6$ -,  $\beta 4$  и  $\alpha 3$ -субъединицы интегрина (Таблица 2) [1, 10]. В настоящее время известно более 500 различных мутаций, приводящих к развитию пограничного ВБЭ. Для заболевания характерен аутосомно-рецессивный тип наследования болезни, при котором манифестация болезни происходит в случае носительства мутаций на обоих аллелях соответствующего гена [1]. Аутосомно-доминантное наследование пограничного врожденного буллезного эпидермолиза регистрируется крайне редко [11].

Известно более 500 различных мутаций, приводящих к развитию пограничного ВБЭ. Накопленные данные о мутациях, ассоциированных с развитием пограничного врожденного буллезного эпидермолиза, позволяют проводить сопоставления с клиническими проявлениями болезни с целью выявления клинико-генетических корреляций.

Таблица 2. Гены и белки, ассоциированные с развитием пограничного врожденного буллезного эпидермолиза

Table 2. Mutated genes and affected proteins associated with junctional epidermolysis bullosa

Ген	Локализация гена	Кодируемый геном продукт	Белок
<i>LAMA3</i>	18q11.2	$\alpha 3$ -цепь ламинина	Ламинин-332
<i>LAMB3</i>	1q32	$\beta 3$ -цепь ламинина	
<i>LAMC2</i>	1q25-q31	$\gamma 2$ -цепь ламинина	
<i>COL17A1</i>	10q24.3	Коллаген XVII типа	Коллаген XVII типа

<i>ITGA6</i>	2q31.1	$\alpha 6$ - субъединица интегрин	$\alpha 6\beta 4$ интегрин
<i>ITGB4</i>	17q25	$\beta 4$ - субъединица интегрин	
<i>ITGA3</i>		$\alpha 3$ - субъединица интегрин	Молекулы интегрин, содержащие $\alpha 3$ - субъединицу, например, $\alpha 3\beta 1$ интегрин

Нашей целью стало охарактеризовать на основании данных литературы клинико-генетические корреляции при пограничном врожденном буллезном эпидермолизе путем сопоставления клинической картины заболевания и лежащих в основе его развития мутаций.

### **Ламинин-332**

Ламинин-332 – это мультидоменный белок из семейства белков ламининов, функцией которых является поддержание адгезии эпителия и эндотелия на подлежащих тканях, а также передача сигналов, регулирующих миграцию и пролиферацию клеток, сохранение жизнеспособности и дифференцировку стволовых клеток. Экспрессия ламинина-332 наиболее характерна для базальной мембраны кожи. В качестве второстепенного компонента он присутствует в большинстве других эпителиальных базальных мембран [12, 13].

По своей структуре ламинин-332 представляет собой облигатный гетеротример, состоящий из трех полипептидных цепей:  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  и  $\gamma 2$  [14–16]. В коже цепи ламинина-332 синтезируются кератиноцитами базального слоя эпидермиса и придатков кожи [13]. В эндоплазматическом ретикулуме базальных кератиноцитов  $\alpha 3$ -,  $\beta 3$ - и  $\gamma 2$ -цепи за счет образования между ними дисульфидных связей соединяются в гетеротример ламинин-332 [12, 17, 18]. Сборка тримера ламинина начинается с карбокси-терминальных областей  $\alpha 3$ -,  $\beta 3$ - и  $\gamma 2$ -цепей, которые содержат необходимые для этого короткие последовательности, содержащие не более 100 аминокислотных остатков [19–21].

Образовавшаяся молекула ламинина-332 имеет форму креста с одним длинным плечом, которое содержит карбокси-терминальные участки цепей ламинина, и тремя короткими плечами, образованными аминотерминальными последовательностями  $\alpha 3$ -,  $\beta 3$ - и  $\gamma 2$ -цепей [13]. В состав длинного плеча входят I и II домены цепей ламинина-332, которые могут также рассматриваться как единый длинный стержневой домен I/II или как

единый биспиральный LCC-домен [15, 22–24]. LCC-домен объединяет отдельные полипептидные цепи в гетеротример, удерживая их вместе в крестообразной структуре молекулы ламинина-332 за счет нековалентных взаимодействий и образования стабилизирующих дисульфидных мостиков между ними [25, 26].

Важным отличием  $\alpha 3$ -цепи ламининов от  $\beta 3$ - и  $\gamma 2$ -цепей является наличие на ее карбокси-терминальном конце пяти глобулярных субдоменов (LG1–5-субдоменов) [23]. LG1-субдомен примыкает к стержневому домену I, а LG5-субдомен является карбокси-терминальным. LG1–5-субдомены содержат наиболее высокоафинные сайты связывания рецепторов клеточной поверхности кератиноцитов [27].

Короткие плечи молекулы ламинина-332 образованы двумя типами доменов [22]. Домены III и V содержат повторы богатых цистеином LE-мотивов, гомологичных эпидермальному фактору роста. Глобулярные домены IV и VI бедны цистеином. Домен IV (L4- или LF-домен) располагаются между LE-мотивами цепей ламинина [15, 22, 23]. Наиболее аминокислотной частью коротких плеч ламинина-332 является глобулярный домен VI, или аминокислотный LN-домен.

После сборки молекулы ламинина-332 секретируются во внеклеточный матрикс и включаются в светлую пластинку базальной мембраны, где физиологически подвергаются модификации путем протеолиза цепей [15, 28, 29]. Предполагается, что протеолитическое созревание ламинина-332 делает возможным сборку якорных филаментов, одним из основных компонентов которых является этот белок [30]. В светлой пластинке базальной мембраны молекула ламинина-332, располагается таким образом, что ее карбокси-терминальный конец, содержащий LG-домены, обращен к поверхности кератиноцитов, а аминокислотный конец, содержащий LN-домены, – к дерме. Наличие у молекулы ламинина-332 множества доменов с различными сайт-специфическими участками позволяет ей связываться с различными белками внеклеточного матрикса и рецепторами клеточной поверхности кератиноцитов.

Предполагается, что включение ламинина-332 в базальную мембрану определяется взаимодействиями между LN-доменом  $\beta 3$ -цепи ламинина-332 и LE-доменом  $\alpha 3$ -цепи ламинина-311, а в последующем эти димеры ламинина-332 и ламинина-311 могут затем самоассоциироваться в сети более высокого порядка [23, 28, 31]. Формирующаяся белковая сеть усложняется и упрочняется переплетением ламинина-332 с коллагеном IV типа, связь которых закрепляется белком перлеканом [32, 33]. В эту сеть внедряются функциональные домены других белков, расположенных с одной стороны – на клеточной поверхности кератиноцитов и с другой стороны – во внеклеточном дермальном матриксе. В светлой пластинке базальной мембраны ламинин-332 соединяется с эктодоменом

коллагена XVII типа с образованием якорных филаментов [34]. Домены аминоконцевых коротких плеч своими LN- и LE-мотивами соединяются с другими ламининами базальной мембраны и основным компонентом якорных фибрилл коллагеном VII типа [23, 28]. Тем самым, якорные филаменты и якорные фибриллы соединяются напрямую, поддерживая адгезию дермо-эпидермальной базальной мембраны к дермальному внеклеточному матриксу [35–37].

Обращенные к поверхности кератиноцитов карбокси-терминальные глобулярные LG-субдомены  $\alpha$ -цепей ламинина содержат сайты связывания рецепторов клеточной поверхности кератиноцитов, таких как интегрины и синдеканы. Тем самым, LG1–3-субдомены  $\alpha$ -цепи ламинина-332 связываются с  $\alpha 3\beta 1$ -интегринами в участках фокальной адгезии и с  $\alpha 6\beta 4$ -интегринами в полудесмосомах, соединяя поверхность базальных кератиноцитов с дермо-эпидермальной базальной мембраной [38–41]. Своими LG4–5-субдоменами  $\alpha 3$ -цепь ламинина-332 напрямую соединяется с базальными кератиноцитами, предположительно связываясь с синдеканами-1 и -4 [13, 28, 42].

В результате одновременные взаимодействия комплексов ламинина-332 с интегринами  $\alpha 6\beta 4$  и  $\alpha 3\beta 1$ , а также коллагенами VII и XVII типов прочно связывают эпидермис с нижележащей базальной мембраной и внеклеточным матриксом дермы, обеспечивая устойчивость кожи к механическим воздействиям. В связи с этим ламинин-332 рассматривается как супрамолекулярный мост между базальными кератиноцитами эпидермиса и подлежащей дермой [5].

### **Коллаген XVII типа**

Коллаген XVII типа (также известный как 180 кДа антиген буллезного пемфигоида, BP180, и BPAG2) – трансмембранный белок, который представляет собой гомотример, состоящий из трех идентичных субъединиц, формирующих тройную спираль [43, 44]. Каждая его субъединица представляет собой 180-кДа коллагеновую  $\alpha 1$ -(XVII) цепь, которая содержит 1497 аминокислот и включает в себя внутриклеточный аминоконцевой глобулярный домен (эндодомен), состоящий из 466 аминокислот, короткую гидрофобную трансмембранную часть, включающую 23 аминокислоты, и длинный внеклеточный карбокси-терминальный домен (эктодомен), в который входит 1008 аминокислот. Эктодомен коллагена XVII типа содержит 15 коллагеновых (Col) субдоменов (Col1–15), которые состоят из трипептидных повторов Gly-X-Y с очень высоким содержанием пролина в позициях X и Y и чередуются с 16 неколлагеновыми регионами (NC1–16) [45]. Особое значение придается прилегающему к клеточной мембране кератиноцитов неколлагеновому NC16A-домену, который важен для образования тримера коллагена XVII типа и последующего свертывания тройной спирали



в направлении amino-терминального конца [46, 47].

Экспрессия коллагена XVII типа обнаружена в коже, слизистой оболочке полости рта, конъюнктиве глаза, эпителиальной базальной мембране роговицы, верхней части пищевода, переходном эпителии мочевого пузыря, головном мозге, сердце и почках [43, 48–51]. Этот белок является основным структурным компонентом полудесмосом – высокоспециализированного мультибелкового комплекса, который обеспечивает крепление базальных эпителиальных клеток к подлежащей базальной мембране в многослойном, псевдомногослойном и переходном эпителиях [43; 52]. Помимо участия в формировании полудесмосом коллаген XVII типа регулирует дифференцировку амелобластов и тем самым участвует в развитии зубов.

Для выполнения своих функций коллаген XVII типа взаимодействует с различными белками. В цитоплазматической бляшке полудесмосом внутриклеточный домен коллагена XVII типа связан с внутриклеточным хвостом  $\beta 4$ -субъединицы интегрин, антигеном буллезного пемфигоида BP230 и плектином [53, 54]. Эктодомен коллагена XVII типа связан с ламинином-332, принимая тем самым участие в формировании якорных филаментов в светлой пластинке базальной мембраны и поддерживая адгезию базальных кератиноцитов к базальной мембране [55]. Эктодомен действует также, как рецептор клеточной поверхности кератиноцитов для белков внеклеточного матрикса [43, 52]. Короткий участок аминокислотной последовательности внутри домена NC16 взаимодействует с прилегающей к клеточной мембране внеклеточной частью стержня  $\alpha 6$ -субъединицы интегрин [53].

Тем самым, коллаген XVII типа действует как рецептор клеточной поверхности кератиноцитов и как компонент матрикса, сохраняющий адгезию базальных кератиноцитов к базальной мембране.

### **Интегрин**

$\alpha 6\beta 4$ -интегрин представляет собой трансмембранный гетеродимерный белок, который состоит из мелкой  $\alpha 6$ -субъединицы, состоящей из 1130 аминокислотных остатков, и более крупной  $\beta 4$ -субъединицы, содержащей 1822 остатков аминокислот [56, 57]. Его экспрессия обнаруживается в различных эпителиях – в коже, слизистых оболочках мочевыводящих путей и желудочно-кишечного тракта. Функции  $\alpha 6\beta 4$ -интегрин разнообразны. С одной стороны, он играет роль клеточного рецептора, быстро реагирующего на изменения в локальной среде и осуществляющего передачу через клеточную мембрану сигналов, которые активируют миграцию, пролиферацию или апоптоз, выживание и инвазивное поведение клеток [58]. С другой стороны, он представляет собой важный структурный белок кожи. Предполагается, что ассоциация

$\alpha\beta 4$ -интегрин с плектином является иницирующим этапом сборки полудесмосом и придает им стабильность [59]. Кроме того, он участвует в прикреплении базальных кератиноцитов к нижележащей базальной мембране [58, 60].

Карбокси-терминальная внутриклеточная часть  $\beta 4$ -субъединицы имеет модульную организацию и содержит две пары доменов типа фибронектина III (фибронектин-III-подобных повторов – FnIII), разделенных соединительным сегментом. Аминокислотная последовательность внутриклеточной части  $\beta 4$ -субъединицы содержит сайты связывания с плектином, внутриклеточным доменом коллагена XVII типа, дистонином (аутоантигеном буллезного пемфигоида 230, BP230, BPAG1) [59, 61–64]. Соединение  $\beta 4$ -субъединицы интегрин с этими белками обеспечивает сборку полудесмосом.

Внеклеточный домен интегрин  $\beta 4$  содержит четыре гомологичных домена, богатых цистеином [65]. Важность этих богатых цистеином доменов, образующих собой тандемные повторы, состоит в их способности образовывать внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи [65]. Так, внеклеточная часть  $\beta 4$ -субъединицы интегрин взаимодействует с  $\alpha 6$ -субъединицей. Важным функциональным доменом внеклеточной части  $\beta 4$ -субъединицы является расположенный ближе к аминотерминальному концу домен, подобный домену А фактора фон Виллебранда, (VWFA-домен). Его значение определяется наличием сайтов, с активацией которых ассоциированы образование базальной мембраны, миграция клеток, связывание лигандов и передача сигналов [11, 66, 67].

$\alpha 6$ -субъединица интегрин состоит из амино-терминального  $\beta$ -пропеллерного домена, бедренного и икроножных доменов-1 и -2 (calf-1 и calf-2), трансмембранного и мелкого внутриклеточного доменов [68, 69]. Во всех интегрин взаимодействия между  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами опосредуются аминотерминальным  $\beta$ -пропеллерным доменом  $\alpha$ -полипептида [70, 71].  $\beta$ -пропеллерный домен, который содержит семь консервативных повторов, свернутых в определенной конформации в виде лопастей пропеллера, взаимодействует с  $\beta 4$ -субъединицей, образуя сайт связывания ламинина [72].

Собранный  $\alpha\beta 4$ -интегрин взаимодействует своими  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицами с коллагеном XVII типа и ламинином-332, который противоположным концом проникает в плотную пластинку базальной мембраны. Тем самым,  $\alpha\beta 4$  интегрин благодаря его взаимодействию с плектином, способствующему закреплению базальных кератиноцитов на базальной мембране, и связыванию внеклеточных аминотерминальных концов  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц интегрин с ламинином 332 и коллагеном XVII типа принимает участие в обеспечении устойчивости кожи к механическим воздействиям [60].

## Раздел 1

### Мутации при тяжелом течении пограничного ВБЭ

У больных с пограничным ВБЭ, характеризующимся тяжелым течением, уже при рождении или с первых дней жизни наблюдается распространенное буллезное и эрозивное поражение кожи и слизистых оболочек. Тяжелое течение пограничного врожденного буллезного эпидермолиза, приводящее к смерти больных в младенческом или в раннем детском возрасте, наиболее характерно для тяжелого пограничного ВБЭ, ассоциированного с определенными мутациями генов *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, кодирующих  $\alpha 3$ -,  $\beta 3$ -,  $\gamma 2$ -цепи ламинина-332. Кроме того, тяжелым состоянием больных и летальным исходом часто характеризуется пограничный ВБЭ с атрезией привратника, который вызывают мутации генов *ITGA6* и *ITGB4*, кодирующих  $\alpha 6$ - и  $\beta 4$ -субъединицы интегрин. В 2017 г. Т. Masunaga и соавт. указывали, что все описанные пациенты с мутацией *ITGA6* характеризовались летальным фенотипом, тогда как примерно 40% пациентов с пограничным ВБЭ с атрезией привратника с мутацией *ITGB4* имели несмертельный фенотип, означая соответственно, что примерно у 60% пациентов заболевание привело к летальному исходу [73]. Тем не менее, нельзя исключить возможность тяжелого течения болезни и в случае мутаций гена *COL17A1*, с которыми обычно ассоциируется пограничный врожденный буллезный эпидермолиз средней тяжести. Так, описан умерший на 54-й день жизни ребенок с гомозиготной нонсенс-мутацией с.505C>T (p.Arg169\*) гена *COL17A1* [74].

Иммунофлюоресцентные исследования биоптатов кожи пациентов с тяжелым пограничным врожденным буллезным эпидермолизом, приведшим к смерти в младенческом или раннем детском возрасте, демонстрируют полное отсутствие или значительное уменьшение продукции мутантного белка. При тяжелом пограничном врожденном буллезном эпидермолизе у пациентов в зоне дермо-эпидермального соединения отсутствует или значительно уменьшено свечение антител или к одной из цепей ламинина-332 ( $\alpha 3$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 2$ ), или ко всему тримеру, поскольку в случае полного отсутствия одной из его цепей сборка ламинина-332 может быть невозможной. У больных пограничным ВБЭ с атрезией привратника, умерших в младенческом или раннем детском возрасте, отсутствует или значительно уменьшено свечение антител к  $\alpha 6$ - или  $\beta 4$ -субъединице интегрин [73, 75, 76]

Причиной тяжелого течения болезни обычно становятся мутации, приводящие к формированию преждевременного стоп-кодона. Это – нонсенс-мутации, вставки, делеции и мутации сайта сплайсинга. Полное или почти полное отсутствие экспрессии белка в зоне дермо-эпидермального соединения обусловлено носительством патогенных мутаций

в обоих аллелях гена: то есть, пациенты с тяжелым течением болезни обычно являются носителями либо гомозиготных, либо компаунд-гетерозиготных мутаций генов *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *ITGA6* и *ITGB4*. По данным J. Hammersen и соавт. (2016), обследовавших 75 больных тяжелым пограничным ВБЭ, у 17% пациентов имелись гомозиготные или компаунд-гетерозиготные мутации гена *LAMA3*, 59% пациентов были носителями этих мутаций в обоих аллелях гена *LAMB3*, а 12% пациентов имели гомозиготные мутации гена *LAMC2* (у остальных пациентов мутацию не удалось определить) [77]. У пациентов с тяжелым течением пограничного ВБЭ с атрезией привратника, умерших в младенческом или раннем детском возрасте, также наиболее часто определялись мутации с формированием преждевременного стоп-кодона в обоих аллелях генов *ITGA6* и *ITGB4* либо в гомозиготном, либо в компаунд-гетерозиготном состоянии [78]. Исследования, проведенные N.Dang и соавт. (2008) показали, что у 78,6% умерших пациентов с пограничным ВБЭ с атрезией привратника, вызванным мутациями *ITGB4*, имелись мутации с образованием преждевременного стоп-кодона по крайней мере в одном аллеле [75].

Наиболее очевидной причиной развития тяжелых клинических проявлений пограничного ВБЭ является утрата укороченным в результате мутации полипептидом важных участков аминокислотной последовательности. В  $\alpha$ 3-,  $\beta$ 3- и  $\gamma$ 2-цепях ламинина такими участками являются короткие аминокислотные последовательности в карбокси-терминальных участках стержневого домена I/II, инициирующие сборку  $\alpha$ 3-,  $\beta$ 3- и  $\gamma$ 2-цепей в тримерный белок ламинин-332. Их отсутствие в мутантной цепи вследствие ее укорочения ассоциируется с полным или практически полным отсутствием ламинина-332 в зоне дермо-эпидермального соединения.

Тяжелыми были проявления болезни, вызванной мутациями *LAMA3*, *LAMB3* или *LAMC2*, приведшими к значительному укорочению соответствующей полипептидной цепи за счет полной или частичной утраты стержневого домена I/II. Так, продолжительность жизни пациентов с нонсенс-мутацией E281X (841G>T) и делецией 300delG в гене *LAMA3*, следствием которых стало укорочение стержневого домена I/II  $\alpha$ 3-цепи, составила 6 и 18 месяцев соответственно [79, 80].

Значительное сокращение продолжительности жизни, исчислявшейся неделями или месяцами, зафиксировано в случае утраты  $\beta$ 3-цепью своего стержневого домена вследствие гомозиготных и компаунд-гетерозиготных мутаций 1760delC, Q936X, 1929delCA/W610X гена *LAMB3* [81–83], Q186X/R349X, Q908X, 1899delGC, Q896X/764–10T>G в гене *LAMC2* [84, 85]. Даже если мутации с образованием преждевременного стоп-кодона расположены в последних двух экзонах гена *LAMC2* и приводят к

незначительному укорочению  $\gamma$ 2-цепи, утрата коротких последовательностей, критичных для формирования трехцепочечной спиральной структуры стержневого домена I/II ламинина-332, может сделать последствия таких мутаций очень тяжелыми [21, 86]. Примером является гомозиготная делеция с.3235delA в экзоне 22 гена *LAMC2* у пациента с тяжелым пограничным ВБЭ, который умер в возрасте 1 месяца от септического шока вследствие генерализованной инфекции [86].

Неожиданной особенностью тяжелого пограничного ВБЭ, вызванного гомозиготной мутацией R635X гена *LAMB3*, была названа в 2,3 раза большая средняя продолжительность жизни больных, составившая 10,8 месяцев, по сравнению с 4,6 месяцами жизни других больных тяжелым пограничным ВБЭ [77]. Максимальная продолжительность жизни у больных с мутацией R635X, наблюдавшихся С. Mühle и соавт. (2005), составляла лишь 30 месяцев [79].

Другим важным участком ламинина-332, генетически обусловленные изменения которого ассоциируются с тяжелым пограничным ВБЭ и смертельным исходом в младенческом возрасте, являются глобулярные субдомены (LG1–5)  $\alpha$ 3-цепи, которые связываются с белками кератиноцитов, чем способствуют дермо-эпидермальной адгезии. Например, следствием выявленной у пациента с тяжелым пограничным ВБЭ, умершего в возрасте 8 месяцев, гомозиготной нонсенс-мутации p.R782X (с.2344C→T) в экзоне 19 гена *LAMA3*, стал синтез укороченной  $\alpha$ 3-цепи, в которой отсутствуют глобулярные LG-субдомены, содержащие сайты связывания интегрина и протеогликанов клеточной поверхности кератиноцитов [27, 86, 87].

Влиянием на LG3-субдомен  $\alpha$ 3-цепи ламинина обусловлено патогенное значение нонсенс-мутации K1299X, выявленной у пациента с тяжелым пограничным ВБЭ, умершего в возрасте 6 месяцев [79]. Предполагается, что заряженные, особенно основные, аминокислотные остатки, такие как лизин в позиции 1299, участвуют в установлении связей между глобулярным LG-доменом  $\alpha$ 3-цепи ламинина и интегринами или гепариноподобными рецепторами клеточной поверхности кератиноцитов [88]. Поэтому изменения именно в этом участке молекулы способны значительно уменьшить дермо-эпидермальную адгезию.

Утрата важных сайтов связывания в результате укорочения полипептидной цепи является причиной тяжелого течения пограничного врожденного буллезного эпидермолиза с атрезией привратника, вызванного мутациями генов *ITGA6* и *ITGB4*. В возрасте 23 дней вследствие мультиорганной недостаточности умер пациент с гомозиготной делецией одного основания 791delC в гене *ITGA6*, в результате которой были утрачены большая часть внеклеточного домена и полностью – трансмембранный и

внутриклеточный домены  $\alpha 6$ -субъединицы интегрина [89]. Смерть пациента с компаунд-гетерозиготной мутацией p.C738X/c.4791delCA гена *ITGB4*, наступила в возрасте 3 месяцев [78]. Следствием делеции c.4791delCA стала потеря последних 278 аминокислот полипептидной цепи внеклеточного домена, которые связываются с антигеном буллезного пемфигоида BP180 [90]. В результате другой мутации – p.C738X полностью утрачивается его внутриклеточный домен  $\beta 4$ -субъединицы интегрина, что могло повлиять на сборку полудесмосомы [91].

Несмотря на то, что в случае мутаций, приводящих к образованию преждевременного стоп-кодона, можно прогнозировать синтез белка, хотя и укороченного, существуют механизмы, обеспечивающие полное отсутствие экспрессии мутантного белка. Наличие преждевременных стоп-кодонов ассоциируется с ускоренным распадом синтезирующихся аномальных транскриптов РНК и отсутствием экспрессии соответствующего полипептида [92]. Предполагается, что уменьшение уровня транскрипта мРНК обусловлено нестабильностью мутантной пре-мРНК из-за нарушений процессинга транскрипта [93]. Поэтому мутации с образованием преждевременных стоп-кодонов могут привести к значительному уменьшению уровня соответствующего транскрипта мРНК из-за нонсенс-опосредованного распада мРНК [94, 95]. Соответственно, полное отсутствие экспрессии ламинина-332 или  $\alpha\beta 4$ -интегрин у пациентов с тяжелым течением пограничного ВБЭ, вызванного мутациями с образованием преждевременных стоп-кодонов, может быть обусловлено быстрым распадом мутантной мРНК [79, 96, 97].

Распадом мутантной мРНК, приводящему к полному отсутствию экспрессии белка, был объяснен выраженный патологический эффект гомозиготных мутаций c.566+3\_+6delAAGT в гене *ITGB4* у пациентки, умершей в возрасте 5 недель от сепсиса, и c.388-5T>G в гене *ITGA6* у пациента, умершего в возрасте 3 месяцев от осложнений болезни [76]. Выраженное уменьшение уровня транскриптов мРНК, которые образовывались за счет активации скрытых сайтов сплайсинга со сдвигом рамки считывания, было отмечено у ребенка с гомозиготной мутацией сайта сплайсинга 3793+1G>A гена *ITGB4*. Смерть ребенка наступила в возрасте 1 месяца [98, 99]

Известны другие внутриклеточные факторы, которые препятствуют появлению мутантного белка в зоне дермо-эпидермального соединения. Поскольку сборка тримера ламинина считается необходимым условием для его внутриклеточной транслокации в аппарат Гольджи, дальнейшего созревания белка и его секреции из кератиноцита, предполагается, что в результате мутаций, нарушающих процесс сборки тримера,

функциональный ламинин-332 не может появиться в зоне дермо-эпидермального соединения [100].

Другим фактором, препятствующим появлению мутантного белка в зоне дермо-эпидермального соединения, является его деградация внутри кератиноцита, поскольку белки, структура которых отличается значительными нарушениями, может подвергнуться внутриклеточному протеолизу. Это стало одним из возможных объяснений биологического эффекта сложной перестройки R223X/Ex11\_Ex18dup гена *LAMC2*, которая была обнаружена в состоянии компаунд-гетерозиготности с нонсенс-мутацией R223X (784C→T) у пациентки с тяжелым пограничным ВБЭ, умершей в возрасте 4 недель [85]. Мутация R223X/Ex11\_Ex18dup представляет собой крупную дупликацию, при которой происходит вставка области кДНК, соответствующей экзонам 11–18 гена *LAMC2*, в рамку считывания между экзонами 6 и 7. Было обнаружено, что из-за дупликации фрагмента, кодирующего экзоны 11–18, кератиноциты пациентки экспрессируют, хотя и в незначительном количестве, крупный аномальный транскрипт мРНК *LAMC2* на 1286 нуклеотидов длиннее, чем аналог дикого типа. Предполагается, что этот транскрипт синтезирует  $\gamma$ 2-цепь, удлиненную на 429 аминокислот, соответствующих части домена I, всему домену II и части домена III, вставленным в глобулярный домен IV. Тем самым, эта крупная дупликационная мутация серьезно нарушает структурную организацию короткого плеча  $\gamma$ 2-цепи, что приводит к внутриклеточной протеолитической деградации белка. Не исключается также, что аномальный полипептид не будет синтезироваться из-за распада мРНК [85].

Внутриклеточный распад синтезированных мутантных субъединиц интегрина, у которых в результате мутации изменилась структура важных участков аминокислотной последовательности, может быть объяснением тяжелого течения пограничного врожденного буллезного эпидермолиза с атрезией привратника. Внутриклеточным протеолизом было объяснено отсутствие экспрессии  $\alpha$ 6-субъединицы интегрина у пациентки с мутацией c.387G>T/c.2506-1G>C, умершей в возрасте 96 дней из-за синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания и пациента с мутацией S47L (p.Ser47Leu; 286C>T), умершего на 26-ой день жизни, в гене *ITGA6* [73, 101]. Несмотря на то, что мутантный белок был синтезирован, в результате мутаций происходило aberrантное свертывание полипептида вследствие выраженных изменений структуры  $\beta$ -пропеллерного домена  $\alpha$ 6-субъединицы интегрина. Предполагается, что с такими aberrантно свернутыми полипептидами связываются шапероны, что обеспечивает их быструю протеолитическую деградацию внутриклеточными протеазами [73].

При пограничном ВБЭ с атрезией привратника летальный исход в младенческом или раннем детском возрасте может быть наступить даже в случае миссенс-мутаций, сопровождающихся продукцией полноразмерного мутантного белка. Миссенс-мутации гена *ITGB4* обнаруживались в 22% случаях пограничного ВБЭ с атрезией привратника с летальным исходом, причем 9% пациентов были компаунд-гетерозиготными носителями двух миссенс-мутаций, но лишь одна миссенс-мутация была описана в гене *ITGA6* [73, 101]. По данным N.Dang и соавт. (2008), анализировавших характер мутаций гена *ITGB4* у умерших больных с пограничным ВБЭ с атрезией привратника, у 14,3% из них были обнаружены миссенс-мутации в обоих аллелях гена, а в 7,1% случаях – делеции с сохранением рамки считывания [75].

Предполагается, что тяжесть состояния пациентов с пограничным ВБЭ с атрезией привратника определяется положением миссенс-мутации в нуклеотидной последовательности гена *ITGB4* [75]. Могут также иметь значение свойства заменяемой аминокислоты. Так, летальный исход наблюдался у пациентов с миссенс-мутациями p.C61Y, p.C245Y, p.R252C, p.G273D в гене *ITGB4*. Все эти мутации изменяют высококонсервативные области  $\beta 4$ -субъединицы интегрин и приводят к утрате лигандсвязывающих свойств синтезированного белка [97]. Это становится причиной тяжелого течения болезни. Так, пациентка с комбинацией миссенс-мутации и дупликации p.G273D/c.3903dupC умерла в возрасте 2 дней [75]. Полной утратой сайтов связывания лигандов  $\beta 4$ -субъединицы интегрин объясняют патогенные свойства комбинации миссенс-мутаций p.D131Y/p.G273D гена *ITGB4*, выявленных в состоянии компаунд-гетерозиготности у пациента, смерть которого наступила в 2-месячном возрасте [97].

Кроме того, многие из миссенс-мутаций с выраженным патогенным эффектом либо заменяют цистеин на другую аминокислоту, либо заменяют любую аминокислоту на цистеин. Появление серосодержащего цистеина на месте аргинина в результате миссенс-мутации p.R252C изменило структуру дисульфидных связей  $\beta 4$ -интегрин, в образовании которых цистеин принимает участие, и тем самым привело к изменению структуры полипептида и потере лиганд-связывающей способности  $\beta 4$ -интегрин у пациентки с комбинацией миссенс-мутации и делеции с нарушением рамки считывания p.R252C/c.658delC, умершей в возрасте 147 дней [75]. С заменой остатков цистеина связывают тяжелые последствия пограничного ВБЭ с атрезией привратника, вызванного гомозиготными миссенс-мутациями p.C61Y/p.C61Y и p.C245Y/p.C61Y, так как утрата цистеина препятствует образованию физиологических внутрицепочечных или межцепочечных дисульфидных связей и тем самым может изменить конформацию и/или



аффинность связывания лиганда с внеклеточным доменом  $\beta 4$ -субъединицы интегрина [78, 97, 102]

Таким образом, миссенс-мутации будут определять летальный фенотип пациентов с пограничным врожденным буллезным эпидермолизом с атрезией привратника, приводя к синтезу субъединиц интегрина, которые из-за замены аминокислоты значительно изменяют свою структуру и теряют способность выполнять свои функции [97].

## Раздел 2

### **Пограничный ВБЭ средней тяжести, вызванный мутациями, ассоциирующимися с тяжелым пограничным ВБЭ**

Несмотря на то, что мутации, приводящие к образованию преждевременных стоп-кодонов, ассоциируются с тяжелым течением пограничного врожденного буллезного эпидермолиза и смертью пациентов в младенческом или раннем детском возрасте, известны случаи, когда такие мутации обнаруживались у пациентов с пограничным врожденным буллезным эпидермолизом средней тяжести или при тяжелом течении пограничного ВБЭ с атрезией привратника. Например, в одной семье у двух больных с клиническими проявлениями пограничного ВБЭ средней тяжести – старшей сестры и младшего брата, была обнаружена комбинация мутаций R635X/1438del5, приводящих к образованию преждевременного стоп-кодона [103].

Отмечена также возможность значительного улучшения первоначально тяжелого состояния больных врожденным буллезным эпидермолизом со временем. В 7-летнем возрасте была обследована пациентка, у которой пузыри и обширные эрозии стали возникать вскоре после рождения в местах трения, в первые месяцы жизни появились поражение слизистой оболочки полости рта, изъязвления роговицы, изъязвления зубной эмали и ониходистрофия, а к 9 месяцам были утрачены ногти [104]. В гене *LAMB3* пациентки была выявлена комбинация мутаций R635X/1587delAG, каждая из которых привела к образованию преждевременного стоп-кодона. Обследование, проведенное вскоре после рождения ребенка, показало, что мутантная мРНК  $\beta 3$ -цепи ламинина подвергалась быстрому распаду. При иммунофлюоресцентном исследовании биоптата кожи было уменьшено свечение антител к  $\beta 3$ - и  $\gamma 2$ -цепям ламинина, а также ко всей молекуле ламинина-332. Тем не менее, на протяжении первых лет жизни ребенка склонность к образованию пузырей на коже постепенно уменьшалась, и к 4 годам чувствительность кожи ребенка к механическим воздействиям значительно уменьшилась, а интенсивность свечения антител к ламинину-332 и его цепям заметно увеличилась, хотя оно и не стало сплошным.

Объяснением улучшения состояния пациентки с комбинацией мутаций, приводящих к образованию стоп-кодона, стал синтез укороченной мРНК, которая содержала не только делецию двух пар оснований 1587delAG, но и полную делецию экзона 14 (379 п.н.), в котором образовался преждевременный стоп-кодон, из-за пропуска этого экзона при считывании. Это восстанавливало рамку считывания, делало транскрипт стабильным и приводило к синтезу и секреции  $\beta 3$ -цепи, укороченной на 127 аминокислот доменов II и III. Отсутствие этих аминокислотных остатков не нарушало способность мутантной  $\beta 3$ -цепи включаться в гетеротримеры ламинина-332, который секретировался в зону базальной мембраны кожи [104].

Делеция 1587delAG гена *LAMB3* была выявлена в гомозиготном состоянии у 15-летнего пациента с легким течением пограничного врожденного буллезного эпидермолиза, которое было объяснено тем же механизмом — пропуском экзона, несущего преждевременный стоп-кодон, при считывании генетической информации [85].

Пропуск экзона, несущего преждевременный стоп-кодон, при считывании возможен также при нонсенс-мутациях [105]. У двух братьев, обследованных в возрасте 32 и 39 лет, клиническая картина заболевания соответствовала пограничному врожденному эпидермолизу средней тяжести. У них отмечалось распространенное поражение кожи, представленное участками атрофии, рядом с которыми располагались эрозии и геморрагические корки, на некоторых участках — интактные пузыри. У обоих братьев были выявлены экзофитно растущие опухоли [106]. При обследовании была обнаружена продукция транскрипта с пропуском несущего нонсенс-мутацию Q834X экзона 17 гена *LAMB3* и с сохранением рамки считывания, хотя экспрессия белка не была обнаружена. Ожидается, что укороченные белки, кодируемые этим транскриптом, будут лишены важных доменов, участвующих в прикреплении к клеточному матриксу, но все же могут поддерживать адгезию, тем самым уменьшая тяжесть буллезного поражения кожи. Несоответствие между клинической картиной заболевания средней степени тяжести и полным отсутствием свечения антител к  $\beta 3$ -цепи было объяснено потерей эпитопов, с которыми связывается иммунофлюоресцентная метка на  $\beta 3$ -цепи, вызванной мутацией, но не с отсутствием  $\beta 3$ -цепи [105].

Причиной частичного восстановления экспрессии транскриптов мРНК, содержащих нонсенс-мутации или другие мутации со сдвигом рамки считывания, считается существование альтернативных механизмов контроля сплайсинга, в результате чего происходит aberrantный сплайсинг мРНК, приводящий к пропуску мутантного экзона или экзона, содержащего преждевременный стоп-кодон, с сохранением рамки считывания [105]. Хотя точная основа пропуска мутантного экзона при считывании

полностью неизвестна, считается, что действует механизм, который распознает преждевременный стоп-кодон путем сканирования рамки считывания мРНК-предшественника рибосомоподобными молекулами в ядре перед сплайсингом мРНК [93, 107]. Это указывает на необходимость осторожности при интерпретации корреляций генотипа/фенотипа в отношении мутаций ламинина-332 и прогнозируемого клинического исхода заболевания [103].

В случае мутаций сайта сплайсинга возможен другой механизм, восстанавливающий продукцию белка. Описан 14-летний юноша с пограничным врожденным буллезным эпидермолизом с атрезией привратника, у которого при рождении отмечалось генерализованное пузырное поражение кожи, но со временем склонность к образованию пузырей на месте механических воздействий значительно уменьшилась, и к 14 годам для того, чтобы вызвать образование пузырей, требовалось длительное растирание кожи [108]. У пациента были выявлены в состоянии компаунд-гетерозиготности две мутации сайта сплайсинга гена *ITGB4* – 3986-19T>A/3802+1G>A. Было показано, что часть мРНК  $\beta$ 4-субъединицы интегрина, транскрибированная на мутантном аллеле, избегала некорректного сплайсинга, в связи с чем продуцировался дикий тип мРНК, и чем было объяснено улучшение состояния пациента с возрастом [108].

### Раздел 3

#### Пограничный ВБЭ среднетяжелого течения

На основании результатов обследования пациентов с пограничным врожденным буллезным эпидермолизом, переживших младенческий и ранний детский возраст, в котором умирают пациенты с наиболее тяжелым течением болезни, были охарактеризованы мутации, которые ассоциированы с менее тяжелым течением пограничного врожденного буллезного эпидермолиза. У больных в возрасте 3 лет и старше обычно диагностируется пограничный врожденный буллезный эпидермолиз средней тяжести, реже – другие формы заболевания, в частности пограничный ВБЭ с атрезией привратника.

Пограничный ВБЭ средней тяжести обычно вызывается гомозиготными или компаунд-гетерозиготными мутациями генов *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* и *COL17A1*. Отмечается частое появление пузырей и эрозий, которые легко возникают на коже и иногда – на слизистых оболочках после незначительных травм. Высыпания обычно генерализованные. Продолжительность жизни таких больных чаще всего не уменьшается. В связи с этим отчетливо проявляются клинические признаки, характеризующие длительное течение пограничного врожденного буллезного эпидермолиза. Повторяющееся появление пузырей и эрозий, особенно в местах, наиболее подверженных

механическим воздействиям, приводит к развитию атрофических и рубцовых изменений кожи, влияющих на состояние придатков кожи. В случае локализации пузырьно-эрозивного поражения кожи в местах роста волос у пациентов может развиваться нерубцовая или рубцовая алопеция волосистой части головы, подмышечных и паховой областей. Часто развивается ониходистрофия, которая может привести к полной потере ногтей. Возможно появление милиумов. Проявляются дистрофические изменения зубов, кариес, со временем зубы могут быть утрачены. Поражение придатков кожи и зубов наблюдается также и у взрослых пациентов с пограничным ВБЭ с атрезией привратника, ассоциирующимся с мутациями генов  $\alpha 6$ - и  $\beta 4$ -субъединиц интегрин (*ITGA6* и *ITGB4*). Эти пациенты отличаются возможным развитием атрезии привратника и мочевыводящих путей. Однако атрезия привратника может отсутствовать, что затрудняет диагностику различных клинических форм пограничного врожденного буллезного эпидермолиза.

Результаты иммунофлюоресцентных исследований биоптатов кожи пациентов указывают, что пограничный ВБЭ средней тяжести, вызванный мутациями генов *LAMA3*, *LAMB3* и *LAMC2*, характеризуется наличием депозитов ламинина-332 в зоне дермо-эпидермального соединения, хотя и в меньшем количестве по сравнению с кожей здорового человека. Однако мутации гена *COL17A1* у пациентов с этим же заболеванием могут сопровождаться как уменьшением экспрессии коллагена XVII типа, так и полным отсутствием белка, обычно не приводя при этом к летальному исходу. В несмертельных случаях пограничного ВБЭ с атрезией привратника обычно выявляется ослабленное свечение антител к  $\beta 4$ - или  $\alpha 6$ -субъединицам интегрин в биоптатах кожи [97].

Соответственно, мутации генов *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* и *ITGB4* характеризуются у пациентов с пограничным ВБЭ в возрасте 3 лет и старше сохранением способности синтеза мутантного белка. В связи с этим обычно выявляются миссенс-мутации и мутации сайта сплайсинга. Выявление мутации, приводящей к образованию преждевременного стоп-кодона, тоже возможно, но она обычно присутствует в компаунд-гетерозиготном состоянии в комбинации с мутацией, допускающей синтез белка [75, 97]. В случае пограничного ВБЭ средней тяжести, обусловленного полным отсутствием экспрессии коллагена XVII типа, могут также выявляться гомозиготные и гетерозиготные мутации гена *COL17A1*, приводящие к образованию преждевременного стоп-кодона. Это подтверждается результатами обследования пациентов.

Наличие в составе компаунд-гетерозиготных мутаций в гене *LAMB3* миссенс-мутации обусловило синтез мутантного белка и развитие пограничного ВБЭ средней тяжести у пациентов, у которых мутация на другом аллеле привела к образованию преждевременного стоп-кодона [109, 110]. Характером изменений мутантного белка

определяется степень тяжести болезни. Так, у 75-летней пациентки с проявлениями пограничного ВБЭ средней тяжести, вызванного компаунд-гетерозиготной мутацией R635X/T350P гена *LAMB3*, синтезировалась полноразмерная  $\beta$ 3-цепь, несущая замену T350P [110]. Миссенс-мутация T350P, расположенная в экзоне 10, представляет собой замену остатка треонина на остаток пролина в домене III/V короткого плеча  $\beta$ 3-цепи. Предполагается, что появление остатка пролина в этой части молекулы приводит к конформационному изменению короткого плеча  $\beta$ 3-цепи, уменьшая способность белка выполнять свою функцию [110]. Другая точечная замена – E210K (628G>A) в экзоне 7 гена *LAMB3* в комбинации с нонсенс-мутацией 123C>T в экзоне 3 была обнаружена у трех больных пограничным ВБЭ средней тяжести, являющихся членами одной семьи, каждый из которых на момент обследования был старше 30 лет. Мутация E210K (628G>A) представляет собой замену кодона глутаминовой кислоты (GAG) на кодон лизина (AAG) и приводит к изменениям в глобулярном аминотерминальном домене VI  $\beta$ 3-цепи. Несмотря на расположение точечной мутации E210K в консенсусной последовательности сайта сплайсинга, признаков аномального сплайсинга экзона 7 выявлено не было. Предполагается, что патогенетическое значение миссенс-мутации E210K в данном случае обусловлено несколькими факторами. Так как отрицательно заряженная глутаминовая кислота заменяется на положительно заряженный остаток лизина, происходит значимое изменение полярности полипептида. Кроме того, предполагается, что домен VI  $\beta$ 3-цепи играет важную роль в сборке молекул ламинина и может быть важен для ассоциации ламинина-332 с другими белками во внеклеточном матриксе. Тем самым, вызванные мутацией изменения домена VI  $\beta$ 3-цепи способствуют нарушению структурной целостности дермально-эпидермального соединения и взаимодействиям ламинина-332 с другими макромолекулами зоны базальной мембраны [109].

Серьезные изменения структуры синтезированного белка, нарушающие его функционирование, стали причиной развития пограничного ВБЭ средней тяжести у пациентов, у которых имелась миссенс-мутация. Гомозиготная миссенс-мутация S265C в экзоне 11 гена *COL17A1* была обнаружена 29-летней пациентки с пограничным ВБЭ средней тяжести. Мутация S265C приводит к замене серина на цистеин в положении 265 в высококонсервативной области внутриклеточного домена коллагена XVII типа. Поскольку остатки цистеина могут образовывать дисульфидные связи, которые являются важным стабилизирующим фактором при свертывании белка, замена серина на цистеин может изменить конформацию коллагена XVII типа и, следовательно, его функционирование. Хотя эта мутация локализована во внутриклеточном домене белка, отсутствие свечения моноклонального антитела к внеклеточному домену указывает на то,

что ее патогенный эффект обусловлен отсутствием внеклеточного домена в коже пациентки. Предполагается, что эта миссенс-мутация препятствует правильному размещению белка в клеточной мембране. Остающийся внутри клетки мутантный белок, по-видимому, нестабилен и, вероятно, быстро разрушается [111].

У 50-летней женщины пограничный ВБЭ средней тяжести был вызван комбинацией миссенс-мутации G627V и вставки 3514ins25. Миссенс-мутация G627V представляет собой замену глицина на валин внутри внеклеточного коллагенового региона коллагена XVII типа, характеризующегося 25 повторами Gly-Xaa-Xaa [112]. Следствием нарушения непрерывности последовательности повторов Gly-Xaa-Xaa является повышение чувствительности к действию протеаз и быстрое разрушение белка протеазами. При обследовании членов семьи отмечено также, что у двух детей пациентки с компаунд-гетерозиготной мутацией G627V/3514ins25 не было поражения кожи, но имелись выраженная гипоплазия эмали зубов и ямки на эмали [112].

Мутации сайта сплайсинга у пациентов с пограничным ВБЭ средней тяжести характеризуются активацией скрытых сайтов сплайсинга и синтезом одного или нескольких транскриптов мРНК. Часть транскриптов может содержать преждевременный стоп-кодон и быстро разрушаться, но возможен также синтез укороченных транскриптов, позволяющих синтезировать укороченный мутантный белок, способный отчасти выполнять свои функции.

Способность как минимум одного из транскриптов обеспечивать синтез мутантного белка, который может встраиваться в тример и поддерживать адгезию, хотя и менее выраженную по сравнению со здоровыми людьми, определяет степень тяжести пограничного ВБЭ с мутациями сайта сплайсинга. Так, у 7-летнего пациента с пограничным ВБЭ средней тяжести, сопровождавшимся уменьшением экспрессии  $\gamma$ 2-цепи ламинина-332 в коже, была выявлена компаунд-гетерозиготная мутация 3511insA/522-1G→A гена *LAMC2* [113]. Наличие депозитов ламинина-332 в зоне дермо-эпидермального соединения этого пациента было объяснено последствиями мутации сайта сплайсинга 522-1G>A. Она влияет на акцепторный сайт сплайсинга интрона 3, нарушая корректный сплайсинг пре-мРНК *LAMC2*, в результате чего образуются два мутантных транскрипта. Один из транскриптов продуцировался с пропуском экзона 4 при считывании генетической информации, что сопровождалось сохранением рамки считывания и обеспечило синтез  $\gamma$ 2-цепи, в котором отсутствовали 33 аминокислоты в аминокислотном домене V. Экспериментально было показано, что  $\gamma$ 2-цепь в отсутствие подобных эпидермальному фактору роста повторов 2 и 3 домена V не лишается способности встраиваться в тример ламинина-332, который остается способен

выделяться клетками и откладываться в зоне дермо-эпидермальной мембраны [114]. Проявления болезни были обусловлены при этом уменьшением адгезивных свойств этой молекулы [113].

У 69-летней пациентки с пограничным ВБЭ средней тяжести, вызванным гомозиготной мутацией донорского сайта сплайсинга 4261+1G>C в экзоне 52 гена *COL17A1*, степень тяжести болезни была обусловлена синтезом среди множества других вариантов мРНК мутантных транскриптов содержащие делеции различной длины, в том числе с сохранением рамки считывания, что позволяло синтезировать мутантный укороченный белок [115]. Экспрессия коллагена XVII типа в ее коже была уменьшена [115]. Синтез измененного транскрипта мРНК, несущего делецию с сохранением рамки считывания, позволил предположить присутствие мутантного коллагена XVII типа в коже больных пограничным врожденным буллезным эпидермолизом средней тяжести, вызванным гомозиготной мутацией донорского сайта сплайсинга IVS51+1G>A в интроне 51 гена *COL17A1* [116]. Вследствие мутации IVS51+1G>A синтезирующийся коллаген XVII типа утрачивает часть повторов Gly-X-Y в пределах карбокси-терминального домена, что дестабилизирует белок, так как в этом участке утрачивается способность к образованию коллагеноподобной тройной спирали. Тем не менее, у 22-летней пациентки с компаунд-гетерозиготной мутацией 3053-1G→C/3871+1G→C в гене *COL17A1*, которая стала причиной развития пограничного ВБЭ средней тяжести, коллаген XVII типа в зоне дермо-эпидермального соединения не был обнаружен, несмотря на синтез множества aberrantных транскриптов мРНК, среди которых присутствовали как транскрипты с нарушением рамки считывания, содержащие преждевременный стоп-кодон, так и мутантные транскрипты, сохранявшие рамку считывания [117].

Полным отсутствием коллагена XVII типа в коже больных пограничным ВБЭ средней тяжести характеризовались также гомозиготные и компаунд-гетерозиготные мутации, сопровождавшиеся образованием преждевременного стоп-кодона.

Различным было влияние на синтез белка коллагена XVII типа нонсенс-мутаций гена *COL17A1*, что определялось локализацией мутации. Так, пограничный ВБЭ средней тяжести у 18-летней девушки с гомозиготной нонсенс-мутацией Q1016X (замена 3151C>T) в экзоне 45 гена *COL17A1* сопровождался ослабленным свечением антител к коллагену XVII типа короткими отрезками в зоне дермо-эпидермального соединения, что указывало на присутствие белка [118]. С другой стороны, проявления пограничного ВБЭ средней тяжести у 9-летней девочки с гомозиготной мутацией R1226X (замена 3781C>T) в экзоне 51 гена *COL17A1* характеризовались полным отсутствием свечения антител к коллагену XVII типа [118]. У 75-летнего мужчины и 45-летней женщины с пограничным

ВБЭ средней тяжести, вызванным компаунд-гетерозиготными мутациями R1226X/4424-5insC и R1226X/1706delA в гене *COL17A1* в биоптатах кожи также полностью отсутствовало свечение антител к коллагену XVII типа [119, 120]. Объяснением этих различий между нонсенс-мутациями Q1016X и R1226X стала их локализация. Преждевременный стоп-кодон в случае мутации Q1016X прерывает синтез белка в неколлагеновом домене белка, а мутация R1226X – в коллагеновом. Предполагается, что мутантный полипептид в случае мутаций в неколлагеновом домене более стабилен [118]. У пациентки с мутацией R1226X мутация привела к изменениям в коллагеновом домене, а свечение антител к коллагену XVII типа полностью отсутствовало [118].

Несмотря на то, что продолжительность жизни у пациентов с пограничным ВБЭ средней тяжести может быть нормальной, и описаны пожилые пациенты с этим заболеванием, вероятность смерти таких больных в молодом возрасте все же существует. В возрасте 23 лет умерла пациентка с пограничным ВБЭ, у которой была выявлена гомозиготная мутация сайта сплайсинга 1184-1G>A гена *LAMC2* [121]. Мутация 1184-1G>A располагается на границе интрона 8 и экзона 9 гена *LAMC2* и изменяет нормальную последовательность 3' акцепторного сайта сплайсинга (AG), что приводит к aberrantному сплайсингу экзона 9. Было показано, что эта мутация приводит к делеции 219 пар нуклеотидов с сохранением рамки считывания транскрипта мРНК, а в итоге – к укорочению короткого плеча  $\gamma$ 2-цепи на 73 аминокислоты в пределах ее субдоменов III и IV [121]. Предполагается, что укороченный полипептид синтезируется в нормальном количестве, поскольку эта мутация не приводит к образованию преждевременного стоп-кодона. Так как у этой пациентки домены I и II  $\gamma$ 2-цепи не изменены, синтезирующийся укороченный  $\gamma$ 2-полипептид остается способен встраиваться вместе с  $\alpha$ 3- и  $\beta$ 3-цепями в гетеротример. Тем не менее, вследствие мутации 1184-1G>A из последовательности  $\gamma$ 2-цепи в домене III удалены EGF-подобный повтор 1 и половина EGF-повтора 2, а также 26 аминокислотных остатков из глобулярного домена IV, содержащие участки связывания нидогена – белка, который может связывать ламинин с коллагеном IV типа и перлеканом. Это может нарушать адгезивную функцию  $\gamma$ 2-цепи ламинина. Другое возможное последствие мутации может быть связано с особенностями внеклеточного процессинга короткого плеча  $\gamma$ 2-цепи ламинина. Удаленный в результате мутации 1184-1G>A сегмент аминокислот граничит с участком протеолитического расщепления, находящимся всего на 6 аминокислотных остатков дальше от утраченного сегмента аминокислотной последовательности. Тем самым, удаление прилегающего региона  $\gamma$ 2-цепи может мешать протеолитическому расщеплению и, следовательно, уменьшать адгезию якорных



филаментов к молекулам матрикса базальной мембраны или ассоциированных с кератиноцитами интегринов, тем самым обуславливая развитие проявлений болезни [121].

Поражение кожи, клинически соответствующее пограничному ВБЭ средней тяжести, может быть проявлением пограничного ВБЭ, вызванному мутациями гена *ITGB4*, что должно соответствовать пограничному ВБЭ с атрезией привратника. Описаны 2 пациента – 7-летний мальчик и мужчина в возрасте 68 лет с типичными проявлениями пограничного ВБЭ средней тяжести уже при рождении, тем более что атрезии привратника у них не было [122, 123]. Однако 68-летнего пациента, начиная с 12 лет, беспокоили проявления рецидивирующего стеноза уретры, а при иммунофлюоресцентном исследовании биоптата кожи было выявлено значительное уменьшение свечения антител к  $\alpha 6$  и  $\beta 4$  субъединицам интегрин. Выраженное поражение мочевыводящих путей было отмечено у 7-летнего пациента. Генетические исследования выявили у них в гене *ITGB4* гомозиготную миссенс-мутацию G931D и компаунд-гетерозиготную мутацию p.P200R (c.599C>G)/c.3793+1G>A. Это позволило установить обоим пациентам диагноз пограничный ВБЭ без атрезии привратника [122, 123].

#### Раздел 4

#### Пограничный ВБЭ легкого течения

Легким является поражение кожи у пациентов с пограничным врожденным буллезным эпидермолизом, если высыпания локализованы на ограниченных участках кожи. Это характерно для локализованного пограничного ВБЭ. Тем не менее, генерализованное поражение кожи у пациента с пограничным ВБЭ также может рассматриваться как легкое, если индуцированное травмой появление пузырей происходит редко. В таких случаях может потребоваться значительное механическое воздействие на кожу, чтобы индуцировать появление буллезных высыпаний.

Поражение кожи у пациентов с легким течением болезни может манифестировать сразу после рождения, но при пограничном ВБЭ с поздним началом дебют заболевания происходит соответственно в более позднем возрасте. Легкое течение болезни не исключает развития иных поражений. У пациентов могут отмечаться атрофические рубцы, гиперпигментация, ониходистрофия, алопеция, аномалии зубов, но их наличие не является обязательным [124, 125]. Легкое поражение кожи при пограничном ВБЭ может сопровождаться поражением других органов, в том числе тяжелым. Так, при пограничном ВБЭ с атрезией привратника в клинической картине может преобладать поражение мочевыводящих путей. При этом ни поражение мочевыводящих путей, ни атрезия привратника [76, 126] не являются обязательным проявлением пограничного ВБЭ с атрезией привратника [126]. Задержки роста и развития пациентов обычно не наблюдается

[124, 125]. Течение пограничного врожденного буллезного эпидермолиза может быть легким с самого начала болезни [125], однако в ряде случаев заболевание манифестирует тяжелым поражением кожи, которое в последующем становится более легким [124].

Генетические изменения при легком течении пограничного ВБЭ состоят в том, что по крайней мере, одна из двух мутаций на обоих аллелях допускает синтез мутантного белка, хотя способность его выполнять свои функции уменьшена. Поэтому иммунофлюоресцентные исследования биоптатов кожи пациентов с легкими проявлениями пограничного ВБЭ обычно демонстрируют различной степени выраженности уменьшение экспрессии мутантного белка – от значительного до слабо выраженного [76, 85, 124–126]. Нарушением, но не полной потерей функции мутантного белка, у которого легкое пузырное поражение кожи было обусловлено компаунд-гетерозиготной мутацией p.C38R/c.4776delG гена *ITGB4* [126]. Тем не менее, легкое течение пограничного врожденного буллезного эпидермолиза, вызванного мутациями гена *COL17A1* может ассоциироваться и с практически полным отсутствием экспрессии белка в зоне дермо-эпидермального соединения [127].

Синтезом мутантного белка проявляются миссенс-мутаций, которые у пациентов с легким течением пограничного ВБЭ часто обнаруживались в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии. Возможны комбинации миссенс-мутации с другой миссенс-мутацией, с мутацией сайта сплайсинга, которая приводила к aberrantному сплайсингу и синтезу мутантного белка, и даже с мутациями, приводящими к образованию преждевременного стоп-кодона. Наиболее легкие проявления пограничного ВБЭ были ассоциированы с гомозиготными или компаунд-гетерозиготными миссенс-мутациями. У носителей этих мутаций отмечаются длительные ремиссии поражения кожи и/или позднее начало болезни.

Так, у пациента, родившегося с буллезным поражением кожи, была выявлена в состоянии компаунд-гетерозиготности комбинация миссенс-мутаций R366W/D982G гена *LAMB3*, что соответствовало диагнозу пограничного ВБЭ средней тяжести. Однако наблюдавшиеся у него сразу после рождения пузырьные высыпания регрессировали и более не появлялись, что было объяснено способностью мутантных белков выполнять свои функции [102].

Наоборот, с поздним началом болезни в школьном возрасте и ее легким течением ассоциировалась миссенс-мутация R1303Q (p.Arg1303Glu; c.3908G>A) в экзоне 52 гена *COL17A1*. Поражение кожи у него проявлялось пузырями в дистальных отделах верхних и нижних конечностей и периодически в полости рта [118]. Мутация R1303Q неоднократно описывалась в случаях пограничного ВБЭ с поздним началом. Она обнаруживалась в

гомозиготном состоянии у 17-летнего пациента, у которого пузыри впервые появились в возрасте 8 лет, и в компаунд-гетерозиготном состоянии с.1992\_1995delGGGT/p.R1303Q у двух пациентов из одной семьи, обследованных в возрасте 27 и 32 лет соответственно, у которых болезнь проявилась в 6-летнем возрасте [128, 129]. Наиболее вероятным объяснением ее патогенности представляется, что в результате появления в аминокислотной последовательности глутамин вместо аргинина создается новый сайт для действия трансглутаминаз, которые катализируют образование связей между молекулами, содержащими глутамин. Образование новых нефизиологических внутри- или межмолекулярных поперечных связей в молекуле коллагена XVII типа подтверждается обнаружением у носителей мутации R1303Q гена *COL17A1* помимо нормального 180-kD  $\alpha$ 1-(XVII)-полипептида, более крупной иммунореактивной полосы коллагена XVII, которая, вероятно, представляет собой агрегат белка с внутри- или межмолекулярными поперечными связями [118]. Вследствие образования этих связей взаимодействие лигандов с коллагеном XVII типа может быть нарушено и тем самым, ослабляется или полностью теряется способность сайтов связывания коллагена XVII типа образовывать связи со своими физиологическими лигандами [118].

Проявление поражения кожи в более позднем возрасте в случае носительства миссенс-мутаций возможно и у пациентов с пограничным ВБЭ с атрезией привратника. При обследовании 17-летнего пациента с легко выраженным пузырьным поражением кожи была выявлена компаунд-гетерозиготная миссенс-мутация p.P200L/P305L (с.599C>T/914C>T) гена *ITGB4* [76]. Заболевание у него манифестировало сразу после рождения атрезией привратника, однако пузырьные высыпания у него были впервые замечены лишь после того, как пациент начал ходить, и располагались они преимущественно на ногах. Легкость течения болезни подтверждалась тем, что буллезные высыпания могли не появляться на протяжении нескольких месяцев. Крайне редко появлялись пузыри в полости рта [76]. Аналогично этому пациенту, при обследовании 11-летнего мальчика с пограничным ВБЭ его родители помнили о возникновении первых пузырей, вызванных травмой и располагавшихся только на кистях и стопах, в возрасте 5 лет, хотя в медицинской документации был зарегистрирован факт появления пузырей на коже при рождении. Причиной заболевания была компаунд-гетерозиготная миссенс-мутация p.P305L/S306L (с.914C>T/917C>T) гена *ITGB4* [76]. Общим для аминокислот P200, P305 и S306 является их расположение во внеклеточном домене  $\beta$ 4-субъединицы-интегрин, в пределах богатого цистеином четвертого тандемного повтора VWFA-домена. При изучении возможных последствий мутаций p.P305L и p.S306L было показано, что они не влияют ни на сплайсинг, ни на уровень мРНК, ни на количество продуцируемого

белка [76]. К замене аминокислоты в том же VWFA-домене  $\beta 4$ -субъединицы-интегрина привела миссенс-мутация p.C590Y гена *ITGB4*, выявленная в комбинации с нонсенс-мутацией R751X (p.C590Y/R751X) (с.1769G>A/2251C>T) у 26-летней женщины с легким течением пограничного ВБЭ с атрезией привратника. Хотя образование пузырей на кистях и стопах отмечалось у нее уже при рождении и продолжалось на протяжении всей жизни в участках, подвергавшихся механическим воздействиям, со временем склонность к образованию пузырных высыпаний уменьшилась [76].

Лишь после полового созревания стали появляться пузыри в дистальных отделах конечностях – на ладонях, запястьях и подошвах у взрослого носителя наследуемой аутосомно-доминантно гетерозиготной миссенс-мутации p.Asp145Tyr (с.433G>T) в экзоне 5 гена *ITGB4*, хотя уже с рождения у него отмечалась ониходистрофия пальцев рук и ног, в итоге приведшая к потере всех ногтей [11]. Эта мутация была обнаружена также у двух его дочерей, у которых проявления поражения кожи и ее придатков были аналогичными. Другими проявлениями болезни у отдельных членов семьи были разрастания грануляционной ткани в гортани, уретре, слезных протоках и наружном слуховом проходе [11]. Миссенс-мутация p.Asp145Tyr заменяет в кодоне 145 высококонсервативный остаток аспартата с карбоксильной боковой цепью на тирозин с гидроксильной боковой цепью во внеклеточном домене VWFA  $\beta 4$ -интегрина. Предполагается, что замена p.Asp145Tyr может создать новый сайт фосфорилирования во внеклеточном домене  $\beta 4$ -интегрина и нарушить функцию белка [11].

Наличие миссенс-мутации может обусловить легкое течение пограничного ВБЭ, даже если она в компаунд-гетерозиготном состоянии комбинируется с мутацией, приводящей к образованию преждевременного стоп-кодона. Как легкое было расценено поражение кожи у 43-летней пациентки, которой был диагностирован пограничный ВБЭ средней тяжести, вызванный компаунд-гетерозиготной мутацией 1644delG/G1506E гена *LAMA3* [124]. Пузырное поражение кожи наблюдалось у пациентки с рождения, но после полового созревания состояние кожи значительно улучшилось, и в возрасте 43 лет пузырные высыпания, а также атрофические рубцы, у нее располагались только в местах, наиболее подверженных травмам или иным механическим воздействиям – на кистях, стопах, локтях и коленях. Экспрессия ламинина-332 в коже пациентки, хотя и значительно уменьшенная, была обусловлена продукцией транскрипта мРНК, несущего мутацию G1506E. Миссенс-мутация G1506E (4517G→A), расположенная в экзоне 34 гена *LAMA3*, приводит к замене в  $\alpha 3$ -цепи высококонсервативного остатка глицина на глутаминовую кислоту в четвертом глобулярном субдомene (LG4), что нарушает конформацию белка. Полипептидная  $\alpha 3$ -цепь физиологически должна свернуться таким образом, чтобы глицин

в позиции 1506 располагался в тесном пространстве между аминокислотными остатками T1398 и F1504. Однако заменяющая его из-за мутации G1506E глутаминовая кислота имеет больший размер и не может поместиться в это пространство, не вызвав структурных изменений  $\alpha 3$ -цепи. Тем самым, мутация G1506E, не влиявшая на стабильность мРНК, мешала правильному сворачиванию четвертого глобулярного субдомена (LG4), что приводило к удержанию большей части мутантного  $\alpha 3$ -полипептида в эндоплазматическом ретикулуме [85, 124]. Тем не менее, мутантные  $\alpha 3$ -цепи, содержащие замену G1506E, сохраняют способность объединяться с  $\gamma 2$ - и  $\beta 3$ -цепями ламинина, образуя гетеротримерные молекулы ламинина-332, которые в последующем все же в небольшом количестве секретируются из клетки и располагаются в зоне дермо-эпидермального соединения [124].

Комбинацией нонсенс-мутации и миссенс-мутации R145X/G633D в гене *COL17A1* были обусловлены легкие проявления пограничного ВБЭ средней тяжести у 13-летнего мальчика, у которого пузырьные высыпания впервые появились в возрасте 3 дней [127]. Миссенс-мутация G633D (2003G>A в экзоне 23) заменяет остаток глицина на остаток аспарагиновой кислоты. Предполагается, что мутации с заменой глицина в коллагеновых субдоменах эктодомена коллагена XVII типа, особенно в наиболее крупном из них Col15, препятствуют формированию тройной спирали. Это или приводит к частичному развертыванию эктодомена и делает его более чувствительным к воздействию протеаз и последующей протеолитической деградации, или препятствует его секреции из клетки в зону дермо-эпидермального соединения [112, 127, 130–132].

Комбинация миссенс-мутации и вставки с образованием преждевременного стоп-кодона p.R1281P/T1434LfsX69 (с.3842G>C/4295\_4298dup) в гене *ITGB4* была обнаружена у 3-летнего мальчика, у которого при рождении единственным проявлением болезни была только ониходистрофия пальцев ног, а легко выраженное пузырьное поражение кожи кистей и стоп появилось в возрасте двух месяцев [76]. Легкие проявления болезни были связаны с синтезом белка, несущего мутацию p.R1281P. Аминокислота R1281 расположена во втором цитоплазматическом домене типа фибронектина III. У отца этого пациента, который был гетерозиготным носителем мутации *ITGB4* с.4295\_4298dup (p.T1434LfsX69), была выявлена ониходистрофия больших пальцев ног, причем онихомикоз был исключен повторными диагностическими тестами [76]

Другой тип мутаций, допускающий синтез мутантного белка, – мутации сайта сплайсинга, которые у пациентов с пограничным ВБЭ легкого течения обнаруживались как в гетерозиготном состоянии, так и в компаунд-гетерозиготном состоянии в комбинации с другими мутациями сайта сплайсинга, миссенс-мутациями и нонсенс-

мутациями [75, 85, 99, 125, 126]. Легкая степень тяжести пограничного ВБЭ может быть обусловлена соответствующими последствиями aberrантного сплайсинга и приводить к затруднениям в диагностике субтипов болезни.

Например, в 8-летнем возрасте была обследована девочка, у которой при рождении имелись пузыри на кистях, при этом атрезии привратника у нее не было, что стало основанием для установления диагноза простого врожденного буллезного эпидермолиза Вебера-Кокейна [75]. В последующем пузырьные высыпания возникали преимущественно на ногах и провоцировались длительной ходьбой, особенно в летнее время, а поражение кожи расценивалось как легкое. Ни рубцовых, ни атрофических изменений на месте пузырьных высыпаний не возникало. Однако при обследовании у нее была выявлена компаунд-гетерозиготная мутация с.264G>A (с.264G>A/C)/ с.3111-1G>A в гене *ITGB4*. Обе мутации представляют собой мутации сайта сплайсинга (на границе сплайсинга – сайт соединения крайних нуклеотидов соседних экзона и интрона, по которому при процессинге мРНК происходит её разрезание с последующим сплайсингом экзонных последовательностей нуклеотидов). Мутация с.264G>A (с.264G>A/C) расположена на границе экзона 4 и интрона 4, а с.3111-1G>A – на границе интрона 26 и экзона 27 и изменяет консенсусную последовательность сплайсинга [75].

Последствия мутаций сайта сплайсинга определяются характером синтезирующихся мРНК, среди которых могут быть нормальные и мутантные варианты, причем мутантные мРНК могут содержать как преждевременный стоп-кодон, так замену основания, что также влияет на последствия мутации. При легком течении пограничного ВБЭ мутации сайта сплайсинга допускают синтез мутантного белка, хотя и с нарушенной функциональностью. Примером является комбинация мутаций сайта сплайсинга 361A→G/3317+1G→A гена *LAMA3* в компаунд-гетерозиготном состоянии, выявленных у женщины с пограничным ВБЭ в возрасте 31 лет [85]. Высыпания у нее располагались преимущественно в местах, подверженных травматизации. Выявленная у нее мутация 361A→G представляет собой замену 121Ser→Gly и происходит в позиции –2 донорского сайта сплайсинга интрона 3, в связи с чем можно ожидать aberrантного сплайсинга. Среди транскриптов мРНК, синтезированных в результате aberrантного сплайсинга один аномальный транскрипт представлял собой мутантную полноразмерную мРНК, несущую миссенс-мутацию S121G, наличие которой оставляло возможность синтеза α3-цепи нормального размера [85]. Другая мутация сайта сплайсинга, выявленная у 31-летней пациентки, – 3317+1G→A уничтожила консервативный донорский сайт сплайсинга интрона 25 и привела к активации скрытого сайта сплайсинга, локализованного в экзоне 25, и синтезу aberrантного транскрипта мРНК с нарушением рамки считывания и

образованием преждевременного стоп-кодона, что не позволяло синтезироваться белку. Незначительность изменений, вызванных мутацией сайта сплайсинга 361A→G, подтверждается результатами обследования мужчины в возрасте 59 лет с пограничным ВБЭ, вызванным гомозиготной мутацией 361A→G гена *LAMA3*. Поражение кожи у него также было расценено как легкое [85].

Сохранившаяся у мутантных β3-цепей способность встраиваться в тримерную молекулу ламинина-332 позволила объяснить легкое течение пограничного ВБЭ у 5-летнего мальчика с мутацией E210K (628G→A) гена *LAMB3*, выявленной в компаунд-гетерозиготном состоянии с делецией 904delT/E210K [125]. Мутация E210K располагается в позиции -1 донорского сайта сплайсинга интрона 7 и представляет собой замену последнего основания экзона 7, в результате которой кодон глутаминовой кислоты превратился в кодон лизина, что вызвало нарушение сплайсинга пре-мРНК гена *LAMB3* с продукцией двух aberrантных транскриптов β3-цепи ламинина-332.

Способностью синтезировать мутантный белок с незначительно уменьшенной функциональностью в результате активации сайта сплайсинга было объяснено легкое течение пограничного ВБЭ у 6-летнего пациента с пограничным ВБЭ с атрезией привратника, вызванным комбинацией мутации сайта сплайсинга и нонсенс-мутации 3793+1G>A/W1478X в гене *ITGB4*, и у его ровесника с комбинацией той же мутации сайта сплайсинга 3793+1G>A и миссенс-мутации p.R252L [99, 126]. Была также отмечена большая тяжесть поражения кожи у носителя гомозиготной мутации 3793+1G>A, чем у пациента с комбинацией мутации сайта сплайсинга 3793+1G>A и нонсенс-мутации W1478X, что позволило сделать предположение об активации у пациента с компаунд-гетерозиготной мутацией 3793+1G>A/W1478X менее патогенного скрытого сайта сплайсинга, чем у пациента с гомозиготной мутацией 3793+1G>A [126]. Это означает, что одна мутация сайта сплайсинга может активировать различные скрытые сайты сплайсинга, обладающие различной патогенностью и соответственно, тяжестью течения болезни.

Последствиями aberrантного сплайсинга, приведшему к пропуску экзона, несущего мутацию, с сохранением или восстановлением рамки считывания, вследствие чего синтезировался укороченный, но частично функциональный полипептид было объяснено легкое течение пограничного ВБЭ у пациентов с компаунд-гетерозиготными мутациями R635X/C293S и W95X/E210K (комбинации нонсенс-мутации и миссенс-мутации) гена *LAMB3* и даже в случае гомозиготной нонсенс-мутации R245X гена *LAMC2* [125, 133].

Результаты обследования трех пациентов с пограничным ВБЭ легкого течения, вызванным мутациями сайта сплайсинга гена *LAMB3*, не позволили Р. Ноу и соавт. (2021) подтвердить предположение, что уровень экспрессии транскрипта мРНК и выраженность экспрессии белка должны соответствовать тяжести клинических проявлений болезни [134]. У всех трех пациентов поражение кожи было ограниченным и соответственно легким, но все же Р. Ноу и соавт. (2021) расценили как более тяжелое поражение кожи у пациента с мутацией с.629-12Т>А/с.3512G>А (р.Cys1171Tyr). Несмотря на это, они обнаружили у этого пациента более выраженное свечение антител к ламинину-332 и большее содержание транскрипта мРНК дикого типа, чем у пациентов с более легким течением [134]. Более выраженная тяжесть поражения кожи у пациента с компаунд-гетерозиготной мутацией с.629-12Т>А и с.3512G>А (р.Cys1171Tyr) была объяснена последствиями миссенс-мутации р.Cys1171Tyr, которая привела к замене функционально значимого остатка цистеина в позиции 1171 на тирозин. Цистеин в позиции 1171 β3-цепи участвует в образовании межцепочечной дисульфидной связи с γ2-субъединицей, что предположительно способствует стабилизации двойной спирали гетеротримера ламинина-332 [28]. Тем самым, миссенс-мутация р.Cys1171Tyr, вероятно, не оказывая существенного влияние на количество синтезируемой β3-цепи, оказывает значимое вредное воздействие на функционирование ламинина-332 в зоне дермо-эпидермального соединения [134].

Мутации гена *COL17A1*, выявлявшиеся у больных с легким течением пограничного врожденного буллезного эпидермолиза, отличаются тем, что в их число входят мутации, приводящие к образованию преждевременных стоп-кодонов на обоих аллелях. Легкое течение заболевания наблюдалось у пациентов в возрасте от 30 до 70 лет с гомозиготными нонсенс-мутациями R795X в экзоне 33 и р.Q751X в экзоне 30 гена *COL17A1* [135–137]. У носителей гомозиготной мутации R795X поражение кожи наблюдалось с рождения и проявлялось генерализованными пузырьными высыпаниями, но после пубертатного периода его тяжесть значительно уменьшилась, и высыпания появлялись только в местах, наиболее подверженных травмам – на кистях, стопах, коленях, локтях, на голеньях. Поражение слизистых оболочек ограничивалось полостью рта, было легким. Свечение антител к коллагену XVII типа в коже имелось, хотя было значительно уменьшено.

Вследствие нонсенс-мутации R795X прерывается синтез полипептидной цепи коллагена XVII типа в аминокислотной позиции 795, соответствующей коллагеновому субдомену Col15 внеклеточной части белка [135, 136]. Анализ транскриптов *COL17A1* показал синтез двух вариантов мРНК – мРНК, несущая мутацию R795X в экзоне 33, которая подвергалась быстрому распаду, и второй транскрипт мРНК, образованный в



результате пропуска экзона 33 с сохранением рамки считывания. Образование второго транскрипта и остаточным синтезом и экспрессией коллагена XVII типа в зоне базальной мембраны кожи было объяснено обнаружение свечения антител к коллагену XVII типа в зоне дермо-эпидермального соединения у носителей гомозиготной мутации R795X [136]. В случае пациента со слабо выраженным поражением кожи, обусловленным мутацией p.Q751X в экзоне 30, выраженный патогенный эффект был устранен делецией в транскрипте мРНК экзона 30, содержащего преждевременный стоп-кодон. Рамка чтения была восстановлена, что в итоге привело к образованию укороченного на 36 нуклеотидов транскрипта и утрате в полипептидной цепи 12 аминокислот из субдомена Col15 [137]. Поскольку делеция этих 12 аминокислот не нарушает последовательность коллагенового мотива Gly-X-Y, предполагается, что синтезированная более короткая молекула коллагена XVII типа все же сохраняет способность свертываться в тройную спираль [135, 136].

### Заключение

Наиболее тяжелое течение заболевания с летальным исходом в младенческом или раннем детском возрасте ассоциируется с носительством мутаций, приводящих к образованию преждевременных стоп-кодонов на обоих аллелях генов *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, *ITGA6* и *ITGB4*. Это могут быть нонсенс-мутации, приводящие к образованию стоп-кодона в месте замены нуклеотида, или делеции и вставки, сдвигающие рамки считывания, и образующие преждевременный стоп-кодон на расстоянии от места мутации. Также имеют место мутации сайта сплайсинга, при которых синтезируется мРНК, несущая преждевременный стоп-кодон, результатом чего является полное или почти полное отсутствие кодируемого геном белка в светлой пластинке базальной мембраны кожи, выраженное снижение адгезии эпидермиса к дерме.

Вместе с тем, корреляцию между носительством подобных мутаций на обоих аллелях генов цепей ламинина-332 или  $\alpha\beta4$ -интегрин и тяжелым течением болезни нельзя назвать строгой. Существуют механизмы, позволяющие хотя бы частично восстановить экспрессию мутантного белка: пропуск экзона, содержащего преждевременный стоп-кодон; aberrantный сплайсинг мРНК при считывании с сохранением его рамки [105]. Считается, распознавание преждевременного стоп-кодона обеспечивается путем сканирования рамки считывания мРНК-предшественника рибосомоподобными молекулами в ядре перед сплайсингом мРНК [93, 137]. В результате синтезируется мутантный белок, способный отчасти выполнять свои функции. Реализация данных механизмов, частично восстанавливающих синтез мутантного белка, может начаться и проявиться спустя неопределенное время после рождения ребенка. [103].

В случае пограничного ВБЭ с атрезией привратника к летальному исходу приводят практически все мутации гена *ITGA6* [73]. Среди мутаций гена *ITGB4* летальными могут быть даже миссенс-мутации и мутации сайта сплайсинга, допускающие синтез полноразмерного белка. При этом тяжесть болезни будет определяться свойствами и локализацией замененной аминокислоты в полипептидной последовательности. Сообщается, что большинство миссенс-мутаций и делеций аминокислот, описанных при пограничном ВБЭ с атрезией привратника, вызванного мутациями гена *ITGB4*, были расположены во внеклеточном домене  $\beta 4$ -субъединицы интегрина [75]. Если замененная в критически важном месте аминокислота отличается размером или зарядом от аминокислоты, появившейся в результате замены, то это может помешать правильному свертыванию белка и формированию сайтов связывания с другими белками. С другой стороны, замена аминокислоты может, наоборот, сформировать сайт, на который смогут воздействовать ферменты, способные разрушить белок или изменить характер его связей с другими белками.

Среднетяжелое течение пограничного ВБЭ, обычно позволяет больным доживать до взрослого возраста. У пациентов с изменениями генов *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* и *ITGB4*, наиболее вероятно выявление хотя бы на одном аллеле мутации, которая не приводит к образованию преждевременного стоп-кодона – миссенс-мутации или мутации сайта сплайсинга, позволяющих синтезировать хотя бы незначительное количество белка. Практически во всех случаях не являются летальными мутации гена *COL17A1*, даже если у пациента на обоих аллелях гена образуется преждевременный стоп-кодон, а в коже полностью отсутствует экспрессия коллагена XVII типа.

Легким течением характеризовался пограничный ВБЭ у пациентов с различными мутациями. Чаще всего это – миссенс-мутации и мутации сайта сплайсинга на обоих аллелях генов *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* и *ITGB4*, позволяющие синтезировать белок в небольшом количестве или с нарушенной функцией. Однако у пациентов с легкими проявлениями болезни могут быть также выявлены мутации, приводящие к образованию преждевременных стоп-кодонов и сопровождающиеся низкой экспрессией белка. Это особенно вероятно в случае мутаций гена *COL17A1*. Имеются наблюдения легкого течения пограничного ВБЭ у пациентов с мутациями сайта сплайсинга гена *COL17A1* и низкой экспрессией коллагена XVII типа в коже [135, 138, 139]. Это затрудняет прогнозирование легкого течения пограничного ВБЭ на основании выявления патогенных мутаций. Только в случае пограничного ВБЭ с поздним началом часто обнаруживалась миссенс-мутация R1303Q.

Течение пограничного ВБЭ с легкими проявлениями может быть совершенно различным, что делает сложной его диагностику и дифференциальную диагностику. Заболевание может приобрести легкое течение, даже если изначально оно было более тяжелым, может проявиться пузырьными высыпаниями при рождении и более не проявляться длительное время, возможно начало у ребенка школьного возраста. Описан также вариант легкого течения буллезного поражения кожи, когда ухудшение ранее недиагностированного легкого пограничного ВБЭ наступает в пожилом возрасте. Так, по данным D.Kiritsi и соавт. (2011), предполагалось, что 4 пожилых пациентов, у которых на протяжении предыдущих десятилетий жизни имелись лишь незначительные эпизодические проявления буллезного поражения кожи, страдают приобретенным заболеванием. Тем не менее, с увеличением возраста и развитием сопутствующих болезней (сахарный диабет и др.) у данных пожилых пациентов активизировалось появление пузырей, и лишь в возрасте 80–90 лет, наконец, устанавливался диагноз пограничного ВБЭ, вызванного мутациями гена *COL17A1* [138]. Возможным объяснением описанного явления может быть влияние негенетических модифицирующих факторов на течение пограничного ВБЭ, таких как сопутствующие заболевания или воздействия окружающей среды. В связи с чем D.Kiritsi и соавт. (2011) обращают внимание на необходимость обследования взрослых пациентов с буллезным поражением кожи с целью исключения диагноза пограничного ВБЭ, если адекватная при предполагаемом изначально заболевании терапия неэффективна [138].

Особенности течения пограничного ВБЭ указывают на необходимость учета при диагностике и дифференциальной диагностике с другими заболеваниями возможного поражения других органов. Так, атрезия привратника, проявившаяся в первые дни жизни младенца и потребовавшая хирургической коррекции, может быть проявлением пограничного ВБЭ с атрезией привратника. Пациенты с данным субтипом заболеванием могут обращаться за медицинской помощью с жалобами на поражение мочевыводящих путей. Требуется внимания возможность развития клинических проявлений в случае носительства гетерозиготной мутации на одном аллеле гена, ассоциированного с развитием пограничного ВБЭ. Описание пограничного ВБЭ с аутосомно-доминантным наследованием, вызванным гетерозиготной мутацией, единично. Обследование являвшихся носителем гетерозиготной мутации родственников пациентов с пограничным ВБЭ показало возможность наличие у них отдельных проявлений пограничного ВБЭ – ониходистрофия, или выраженные дистрофические изменения эмали зубов и кариес. Данные изменения были признаком носительства мутации, способной в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии вызвать потенциально смертельное заболевание.

Диагностика пограничного ВБЭ требует учета всех возможных клинических проявлений, однако диагноз заболевания должен подтверждаться результатами либо генетического исследования, выявляющего мутации, либо результатами иммунофлюоресцентного антигенного картирования биоптата кожи, определяющего, какой белок является дефицитным. Возможно, в связи с этим в Российской Федерации, где диагностика в большей степени базируется на анализе клинико-anamnestических данных, имеются лишь единичные описания пациентов с пограничным ВБЭ [140, 141]. Согласно результатам эпидемиологического исследования, проведенного в 2016 г. в Российской Федерации, среди больных врожденным буллезным эпидермолизом диагноз пограничного субтипа болезни был установлен всего у 0,7% пациентов, тогда как в 25% случаях субтип заболевания не был установлен [142]. Несколько более высокая (6,3%) доля пациентов с пограничным типом заболевания среди всех больных врожденным буллезным эпидермолизом была отмечена в Республике Дагестан [143]. Данное обстоятельство требует внедрения и использования генетических и иммунофлюоресцентных методов исследования для диагностики пограничного ВБЭ у пациентов в Российской Федерации.

Таким образом, результаты этих исследований позволят прогнозировать течение заболевания: крайне тяжелое с летальным исходом в случае мутаций, приводящих к образованию преждевременного стоп-кодона в генах *LAMA3* и *LAMB3*, *LAMC2*, *ITGA6*, *ITGB4*, и отсутствию соответствующего белка в коже; или более легким, если характер мутации будет допускать синтез уменьшенного белка или белка с нарушенной функцией.

#### **Источник финансирования**

Рукопись подготовлена (работа/исследования выполнены) и опубликована за счет финансирования по месту работы авторов.

**Source of funding:** the work was done and published through financing at the place of work of the authors.

#### **Участие авторов**

Все авторы несут ответственность за содержание и целостность всей статьи.

Концепция и дизайн исследования — А.А. Кубанов; сбор и обработка материала, написание текста — В.В. Чикин; редактирование — А.Э. Карамова; сбор и обработка материала — Е.С. Мончаковская.

#### **Authors' participation**

All authors: approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Concept and design of the study – Alexey A. Kubanov; collection and processing of material, text writing – Vadim V. Chikin; editing – Arfenya E. Karamova; collection and processing of material – Ekaterina S. Monchakovskaya.

### Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Conflict of interest: the authors declare that there are no obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article.

### Литература

1. Has C, Bauer JW, Bodemer C, Bolling MC, Bruckner-Tuderman L, Diem A, et al. Consensus reclassification of inherited epidermolysis bullosa and other disorders with skin fragility. *Br J Dermatol.* 2020;183(4):614–627 doi: 10.1111/bjd.18921
2. Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C, et al. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *J Am Acad Dermatol.* 2014;70(6): 103–1126 doi: 10.1016/j.jaad.2014.01.903
3. Mariath LM, Santin JT, Schuler-Faccini L, Kiszewski AE. Inherited epidermolysis bullosa: update on the clinical and genetic aspects. *An Bras Dermatol.* 2020;95(5):551–569 doi: 10.1016/j.abd.2020.05.001
4. Has C, Kern JS. Collagen XVII. *Dermatol Clin.* 2010;28(1):61–66 doi: 10.1016/j.det.2009.10.007
5. Kiritsi D, Has C, Bruckner-Tuderman L. Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. *Cell Adh Migr.* 2013;7(1):135–141 doi: 10.4161/cam.22418
6. Lee M, Chen Q, Wang H, Zhang J, Lin Z, Yang Y. ITGB4-associated junctional epidermolysis bullosa without pylori atresia but profound genito-urinary involvement. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(1):112–113 doi: 10.2340/00015555-1888
7. Laimer M, Lanschuetzer CM, Diem A, Bauer JW. Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin.* 2010;28(1): 55–60 doi: 10.1016/j.det.2009.10.006
8. Ansai O, Shinkuma S, Kabata Y, Katsumi T, Hagiwara R, Tomii K, et al. Amino acid charge and epidermolysis bullosa simplex severity: genotype-phenotype correlations. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020;34(2):e87–e90.
9. Natale MI, Manzur GB, Lusso SB, Cella E, Giovo ME, Andrada R, et al. Analysis of COL7A1 pathogenic variants in a large cohort of dystrophic epidermolysis bullosa patients from Argentina reveals a new genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet A.* 2022;188(11):3153–3161 doi: 10.1002/ajmg.a.62957.

10. Uitto J, Has C, Vahidnezhad H, Youssefian L, Bruckner-Tuderman L. Molecular pathology of the basement membrane zone in heritable blistering diseases: The paradigm of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol.* 2017;57–58:76–85 doi: 10.1016/j.matbio.2016.07.009
11. Turcan I, Pasmooij AM, van den Akker PC, Lemmink H, Halmos GB, Sinke RJ, Jonkman MF. Heterozygosity for a novel missense mutation in the ITGB4 gene associated with autosomal dominant epidermolysis bullosa. *JAMA Dermatol.* 2016;152(5):558–562 doi: 10.1001/jamadermatol.2015.5236
12. Sugawara K, Tsuruta D, Ishii M, Jones JC, Kobayashi H. Laminin-332 and -511 in skin. *Exp Dermatol.* 2008;17(6):473–480 doi: 10.1111/j.1600-0625.2008.00721.x
13. Has C, Nyström A, Saeidian AH, Bruckner-Tuderman L, Uitto J. Epidermolysis bullosa: Molecular pathology of connective tissue components in the cutaneous basement membrane zone. *Matrix Biol.* 2018;71–72:313–329 doi: 10.1016/j.matbio.2018.04.001
14. Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, et al. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* 2005;24(5):3263–3332 doi: 10.1016/j.matbio.2005.05.006
15. Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional diversity of laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28:523–553 doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155750
16. Aumailley M. The laminin family. *Cell Adh Migr.* 2013;7(1):48–55 doi: 10.4161/cam.22826
17. Macdonald PR, Lustig A, Steinmetz MO, Kammerer RA. Laminin chain assembly is regulated by specific coiled-coil interactions. *J Struct Biol.* 2010;170(2):398–405 doi: 10.1016/j.jsb.2010.02.004
18. Matsui C, Wang CK, Nelson CF, Bauer EA, Hoeffler WK. The assembly of laminin-5 subunits. *J Biol Chem.* 1995;270(40):23496–23503 doi: 10.1074/jbc.270.40.23496
19. Nomizu M, Utani A, Beck K, Otaka A, Roller PP, Yamada Y. Mechanism of laminin chain assembly into a triple-stranded coiled-coil structure. *Biochemistry.* 1996;35(9):2885–2893 doi: 10.1021/bi951555n
20. Antonsson P, Kammerer RA, Schulthess T, Hänisch G, Engel J. Stabilization of the alpha-helical coiled-coil domain in laminin by C-terminal disulfide bonds. *J Mol Biol.* 1995; 250(1):74–79 doi: 10.1006/jmbi.1995.0359
21. Utani A, Nomizu M, Timpl R, Roller PP, Yamada Y. Laminin chain assembly. Specific sequences at the C terminus of the long arm are required for the formation of specific double- and triple-stranded coiled-coil structures. *J Biol Chem.* 1994;269(29):19167–19175. PMID: 8034675

22. Aumailley M, Smyth N. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat.* 1998; 193(Pt1):1–21 doi: 10.1046/j.1469-7580.1998.19310001.x
23. Shaw L, Sugden CJ, Hamill KJ. Laminin polymerization and inherited disease: Lessons from genetics. *Front Genet.* 2021 Aug 12;12:707087 doi: 10.3389/fgene.2021.707087
24. Zimmerman T, Blanco FJ. The coiled-coil structure potential of the laminin LCC domain is very fragmented and does not differentiate between natural and non-detected isoforms. *J Biomol Struct Dyn.* 2007;24(4):413–420 doi: 10.1080/07391102.2007.10507129
25. Beck K, Dixon TW, Engel J, Parry DA. Ionic interactions in the coiled-coil domain of laminin determine the specificity of chain assembly. *J Mol Biol.* 1993;231(2):311–323 doi: 10.1006/jmbi.1993.1284
26. Schneider H, Mühle C, Pacho F. Biological function of laminin-5 and pathogenic impact of its deficiency. *Eur J Cell Biol.* 2007;86(11–12):701–717 doi: 10.1016/j.ejcb.2006.07.004
27. Timpl R, Tisi D, Talts JF, Andac Z, Sasaki T, Hohenester E. Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol.* 2000;19(4):309–317 doi: 10.1016/s0945-053x(00)00072-x
28. Rousselle P, Beck K. Laminin 332 processing impacts cellular behavior. *Cell Adh Migr.* 2013;7(1):122–134 doi: 10.4161/cam.23132
29. Tsubota Y, Yasuda C, Kariya Y, Ogawa T, Hirosaki T, Mizushima H, Miyazaki K. Regulation of biological activity and matrix assembly of laminin-5 by COOH-terminal, LG4-5 domain of alpha3 chain. *J Biol Chem.* 2005;280(15):14370–14377 doi: 10.1074/jbc.M413051200
30. Baudoin C, Fantin L, Meneguzzi G. Proteolytic processing of the laminin alpha3 G domain mediates assembly of hemidesmosomes but has no role on keratinocyte migration. *J Invest Dermatol.* 2005;125(5):883–888 doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23881.x
31. Champlaud MF, Lunstrum GP, Rousselle P, Nishiyama T, Keene DR, Burgeson RE. Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol.* 1996;132(6):1189–1198 doi: 10.1083/jcb.132.6.1189
32. Van Agtmael T, Bruckner-Tuderman L. Basement membranes and human disease. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):167–188 doi: 10.1007/s00441-009-0866-y
33. Behrens DT, Villone D, Koch M, Brunner G, Sorokin L, Robenek H, et al. The epidermal basement membrane is a composite of separate laminin- or collagen IV-containing

- networks connected by aggregated perlecan, but not by nidogens. *J Biol Chem.* 2012;287(22):18700–18709 doi: 10.1074/jbc.M111.336073
34. Has C, Nyström A. Epidermal basement membrane in health and disease. *Curr Top Membr.* 2015;76:117–170 doi: 10.1016/bs.ctm.2015.05.003
35. Rousselle P, Keene DR, Ruggiero F, Champlaud MF, Rest M, Burgeson RE. Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol.* 1997;138(3):719–728 doi: 10.1083/jcb.138.3.719
36. Aumailley M, El Khal A, Knöss N, Tunggal L. Laminin 5 processing and its integration into the ECM. *Matrix Biol.* 2003;22(1):49–54 doi: 10.1016/s0945-053x(03)00013-1
37. Chen M, Marinkovich MP, Veis A, Cai X, Rao CN, O'Toole EA, Woodley DT. Interactions of the amino-terminal noncollagenous (NC1) domain of type VII collagen with extracellular matrix components. A potential role in epidermal-dermal adherence in human skin. *J Biol Chem.* 1997; 272(23):14516–14522 doi: 10.1074/jbc.272.23.14516
38. Ido H, Nakamura A, Kobayashi R, Ito S, Li S, Futaki S, Sekiguchi K. The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin gamma chains in integrin binding by laminins. *J Biol Chem.* 2007;282(15):11144–11154 doi: 10.1074/jbc.M609402200
39. Taniguchi Y, Ido H, Sanzen N, Hayashi M, Sato-Nishiuchi R, Futaki S, Sekiguchi K. The C-terminal region of laminin beta chains modulates the integrin binding affinities of laminins. *J Biol Chem.* 2009;284(12):7820–7831 doi: 10.1074/jbc.M809332200
40. Marinkovich MP. Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(5):370–380 doi: 10.1038/nrc2089
41. Yamada M, Sekiguchi K. Molecular Basis of Laminin-Integrin Interactions. *Curr Top Membr.* 2015;76:197–229 doi: 10.1016/bs.ctm.2015.07.002
42. Ogawa T, Tsubota Y, Hashimoto J, Kariya Y, Miyazaki K. The short arm of laminin gamma2 chain of laminin-5 (laminin-332) binds syndecan-1 and regulates cellular adhesion and migration by suppressing phosphorylation of integrin beta4 chain. *Mol Biol Cell.* 2007;18(5):1621–1633 doi: 10.1091/mbc.e06-09-0806
43. Van den Bergh F, Giudice GJ. BP180 (type XVII collagen) and its role in cutaneous biology and disease. *Adv Dermatol.* 2003;19:37–71. PMID: 14626817
44. Franzke CW, Tasanen K, Schumann H, Bruckner-Tuderman L. Collagenous transmembrane proteins: collagen XVII as a prototype. *Matrix Biol.* 2003;22(4):299–309 doi: 10.1016/s0945-053x(03)00051-9
45. Gatalica B, Pulkkinen L, Li K, Kuokkanen K, Ryyänen M, McGrath JA, Uitto J. Cloning of the human type XVII collagen gene (COL17A1), and detection of novel



- mutations in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet.* 1997;60(2):352–365. PMID: 9012408
46. Areida SK, Reinhardt DP, Muller PK, Fietzek PP, Kowitz J, Marinkovich MP, Notbohm H. Properties of the collagen type XVII ectodomain. Evidence for n- to c-terminal triple helix folding. *J Biol Chem.* 2001;276(2):1594–1601 doi: 10.1074/jbc.M008709200
  47. Van den Bergh F, Fu CL, Olague-Marchan M, Giudice GJ. The NC16A domain of collagen XVII plays a role in triple helix assembly and stability. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;350(4):1032–1037 doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.147
  48. Hurskainen T, Moilanen J, Sormunen R, Franzke CW, Soininen R, Loeffek S, et al. Transmembrane collagen XVII is a novel component of the glomerular filtration barrier. *Cell Tissue Res.* 2012;348(3):579–588 doi: 10.1007/s00441-012-1368-x
  49. Seppänen A, Suuronen T, Hofmann SC, Majamaa K, Alafuzoff I. Distribution of collagen XVII in the human brain. *Brain Res.* 2007;1158:50–56 doi: 10.1016/j.brainres.2007.04.073
  50. Kondo J, Kusachi S, Ninomiya Y, Yoshioka H, Oohashi T, Doi M, et al. Expression of type XVII collagen alpha 1 chain mRNA in the mouse heart. *Jpn Heart J.* 1998;39(2): 211–220 doi: 10.1536/ihj.39.211
  51. Asaka T, Akiyama M, Domon T, Nishie W, Natsuga K, Fujita Y, et al. Type XVII collagen is a key player in tooth enamel formation. *Am J Pathol.* 2009;174(1):91–100 doi: 10.2353/ajpath.2009.080573
  52. Koster J, Borradori L, Sonnenberg A. Hemidesmosomes: molecular organization and their importance for cell adhesion and disease. *Handb Exp Pharmacol.* 2004;(165):243–280 doi: 10.1007/978-3-540-68170-0\_9
  53. Hopkinson SB, Jones JC. The N terminus of the transmembrane protein BP180 interacts with the N-terminal domain of BP230, thereby mediating keratin cytoskeleton anchorage to the cell surface at the site of the hemidesmosome. *Mol Biol Cell.* 2000;11(1):277–286 doi: 10.1091/mbc.11.1.277
  54. Koster J, Geerts D, Favre B, Borradori L, Sonnenberg A. Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin alpha6beta4 important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 2):387–399 doi: 10.1242/jcs.00241
  55. Tasanen K, Tunggal L, Chometon G, Bruckner-Tuderman L, Aumailley M. Keratinocytes from patients lacking collagen XVII display a migratory phenotype. *Am J Pathol.* 2004; 164(6):2027–2038 doi: 10.1016/S0002-9440(10)63762-5

56. Tamura RN, Rozzo C, Starr L, Chambers J, Reichardt LF, Cooper HM, Quaranta V. Epithelial integrin alpha 6 beta 4: complete primary structure of alpha 6 and variant forms of beta 4. *J Cell Biol.* 1990;111(4):1593–1604 doi: 10.1083/jcb.111.4.1593
57. Hogervorst F, Kuikman I, von dem Borne AE, Sonnenberg A. Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *EMBO J.* 1990;9(3):765–770 doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb08171.x
58. de Pereda JM, Lillo MP, Sonnenberg A. Structural basis of the interaction between integrin alpha6beta4 and plectin at the hemidesmosomes. *EMBO J.* 2009;28(8):1180–1190 doi: 10.1038/emboj.2009.48
59. Schaapveld RQ, Borradori L, Geerts D, van Leusden MR, Kuikman I, Nievers MG, et al. Hemidesmosome formation is initiated by the beta4 integrin subunit, requires complex formation of beta4 and HD1/plectin, and involves a direct interaction between beta4 and the bullous pemphigoid antigen 180. *J Cell Biol.* 1998;142(1):271–284 doi: 10.1083/jcb.142.1.271
60. Chung HJ, Uitto J. Epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Dermatol Clin.* 2010;28(1):43–54 doi: 10.1016/j.det.2009.10.005
61. Dellambra E, Prislei S, Salvati AL, Madeddu ML, Golisano O, Siviero E, et al. Gene correction of integrin beta4-dependent pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa keratinocytes establishes a role for beta4 tyrosines 1422 and 1440 in hemidesmosome assembly. *J Biol Chem.* 2001;276(44):41336–41342 doi: 10.1074/jbc.M103139200
62. Nievers MG, Schaapveld RQ, Oomen LC, Fontao L, Geerts D, Sonnenberg A. Ligand-independent role of the beta 4 integrin subunit in the formation of hemidesmosomes. *J Cell Sci.* 1998;111(Pt 12):1659–1672 doi: 10.1242/jcs.111.12.1659
63. Niessen CM, Hulsman EH, Oomen LC, Kuikman I, Sonnenberg A. A minimal region on the integrin beta4 subunit that is critical to its localization in hemidesmosomes regulates the distribution of HD1/plectin in COS-7 cells. *J Cell Sci.* 1997;110(Pt15):1705–1716 doi: 10.1242/jcs.110.15.1705
64. Mainiero F, Pepe A, Wary KK, Spinardi L, Mohammadi M, Schlessinger J, Giancotti FG. Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: distinct beta 4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *EMBO J.* 1995;14(18):4470–4481 doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00126.x
65. Hogervorst F, Kuikman I, von dem Borne AE, Sonnenberg A. Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *EMBO J.* 1990;9(3):765–770 doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb08171.x

66. Tuckwell DS, Humphries MJ. A structure prediction for the ligand-binding region of the integrin beta subunit: evidence for the presence of a von Willebrand factor A domain. *FEBS Lett.* 1997;400(3):297–303 doi: 10.1016/s0014-5793(96)01368-3
67. Colombatti A, Bonaldo P. The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood.* 1991;77(11):2305–2315. PMID: 2039815
68. Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:619–647 doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618
69. Fu G, Wang W, Luo BH. Overview: structural biology of integrins. *Methods Mol Biol.* 2012;757:81-99 doi: 10.1007/978-1-61779-166-6\_7
70. Huang C, Springer TA. Folding of the beta-propeller domain of the integrin alphaL subunit is independent of the I domain and dependent on the beta2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(7):3162–3167 doi: 10.1073/pnas.94.7.3162
71. Lu C, Oxvig C, Springer TA. The structure of the beta-propeller domain and C-terminal region of the integrin alphaM subunit. Dependence on beta subunit association and prediction of domains. *J Biol Chem.* 1998;273(24):15138–15147 doi: 10.1074/jbc.273.24.15138
72. Kamata T, Tieu KK, Irie A, Springer TA, Takada Y. Amino acid residues in the alpha IIb subunit that are critical for ligand binding to integrin alpha IIbbeta 3 are clustered in the beta-propeller model. *J Biol Chem.* 2001;276(47):44275–44283 doi: 10.1074/jbc.M107021200
73. Masunaga T, Ogawa J, Akiyama M, Nishikawa T, Shimizu H, Ishiko A. Compound heterozygosity for novel splice site mutations of ITGA6 in lethal junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Dermatol.* 2017;44(2):160–166 doi: 10.1111/1346-8138.13575
74. Vaz SO, Dâmaso C, Liu L, Ozoemena L, Mota-Vieira L. Severe phenotype of junctional epidermolysis bullosa generalised intermediate type caused by homozygous COL17A1:c.505C>T (p.Arg169\*) mutation. *Eur J Dermatol.* 2018;28(3):412–413 doi: 10.1684/ejd.2018.3279
75. Dang N, Klingberg S, Rubin AI, Edwards M, Borelli S, Relic J, et al. Differential expression of pyloric atresia in junctional epidermolysis bullosa with ITGB4 mutations suggests that pyloric atresia is due to factors other than the mutations and not predictive of a poor outcome: three novel mutations and a review of the literature. *Acta Derm Venereol.* 2008;88(5):438–448 doi: 10.2340/00015555-0484

76. Schumann H, Kiritsi D, Pigors M, Hausser I, Kohlhase J, Peters J, et al. Phenotypic spectrum of epidermolysis bullosa associated with  $\alpha 6\beta 4$  integrin mutations. *Br J Dermatol.* 2013;169(1):115–124 doi: 10.1111/bjd.12317
77. Hammersen J, Has C, Naumann-Bartsch N, Stachel D, Kiritsi D, Söder S, et al. Genotype, clinical course, and therapeutic decision making in 76 infants with severe generalized junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 2016;136(11):2150–2157 doi: 10.1016/j.jid.2016.06.609
78. Pulkkinen L, Rouan F, Bruckner-Tuderman L, Wallerstein R, Garzon M, Brown T, et al. Novel ITGB4 mutations in lethal and nonlethal variants of epidermolysis bullosa with pyloric atresia: missense versus nonsense. *Am J Hum Genet.* 1998;63(5):1376–1387 doi: 10.1086/302116
79. Mühle C, Jiang QJ, Charlesworth A, Bruckner-Tuderman L, Meneguzzi G, Schneider H. Novel and recurrent mutations in the laminin-5 genes causing lethal junctional epidermolysis bullosa: molecular basis and clinical course of Herlitz disease. *Hum Genet.* 2005;116(1-2):33–42 doi: 10.1007/s00439-004-1210-y
80. Vidal F, Baudoin C, Miquel C, Galliano MF, Christiano AM, Uitto J, et al. Cloning of the laminin alpha 3 chain gene (LAMA3) and identification of a homozygous deletion in a patient with Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Genomics.* 1995;30(2):273–280 doi: 10.1006/geno.1995.9877
81. Vailly J, Pulkkinen L, Miquel C, Christiano AM, Gerecke D, Burgeson RE, et al. Identification of a homozygous one-basepair deletion in exon 14 of the LAMB3 gene in a patient with Herlitz junctional epidermolysis bullosa and prenatal diagnosis in a family at risk for recurrence. *J Invest Dermatol.* 1995;104(4):462–466 doi: 10.1111/1523-1747.ep12605898
82. Takizawa Y, Shimizu H, Pulkkinen L, Suzumori K, Kakinuma H, Uitto J, Nishikawa T. Combination of a novel frameshift mutation (1929delCA) and a recurrent nonsense mutation (W610X) of the LAMB3 gene in a Japanese patient with Herlitz junctional epidermolysis bullosa, and their application for prenatal testing. *J Invest Dermatol.* 1998;111(6):1239–1241 doi: 10.1038/sj.jid.5600370
83. Takizawa Y, Pulkkinen L, Shimizu H, Lin L, Hagiwara S, Nishikawa T, Uitto J. Maternal uniparental meroisodisomy in the LAMB3 region of chromosome 1 results in lethal junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1998;110(5):828–831 doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00186.x
84. Takizawa Y, Shimizu H, Pulkkinen L, Nonaka S, Kubo T, Kado Y, et al. Novel premature termination codon mutations in the laminin gamma2-chain gene (LAMC2) in

- Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1998;111(6):1233–1234 doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00438.x
85. Posteraro P, De Luca N, Meneguzzi G, El Hachem M, Angelo C, Gobello T, et al. Laminin-5 mutational analysis in an Italian cohort of patients with junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 2004;123(4):639–648 doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23302.x
86. Castori M, Floriddia G, De Luca N, Pascucci M, Ghirri P, Boccaletti V, et al. Herlitz junctional epidermolysis bullosa: laminin-5 mutational profile and carrier frequency in the Italian population. *Br J Dermatol.* 2008;158(1):38–44 doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08208.x
87. Mizushima H, Takamura H, Miyagi Y, Kikkawa Y, Yamanaka N, Yasumitsu H, et al. Identification of integrin-dependent and -independent cell adhesion domains in COOH-terminal globular region of laminin-5 alpha 3 chain. *Cell Growth Differ.* 1997;8(9):979–987. PMID: 9300180
88. Nielsen PK, Gho YS, Hoffman MP, Watanabe H, Makino M, Nomizu M, Yamada Y. Identification of a major heparin and cell binding site in the LG4 module of the laminin alpha 5 chain. *J Biol Chem.* 2000;275(19):14517–14523 doi: 10.1074/jbc.275.19.14517
89. Ruzzi L, Gagnoux-Palacios L, Pinola M, Belli S, Meneguzzi G, D'Alessio M, Zambruno G. A homozygous mutation in the integrin alpha6 gene in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Clin Invest.* 1997;99(12):2826–2831 doi: 10.1172/JCI119474
90. Aho S, Uitto J. Direct interaction between the intracellular domains of bullous pemphigoid antigen 2 (BP180) and beta 4 integrin, hemidesmosomal components of basal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;243(3):694–699 doi: 10.1006/bbrc.1998.8162
91. Spinardi L, Einheber S, Cullen T, Milner TA, Giancotti FG. A recombinant tail-less integrin beta 4 subunit disrupts hemidesmosomes but does not suppress alpha 6 beta 4-mediated cell adhesion to laminins. *J Cell Biol.* 1995;129(2):473–487 doi: 10.1083/jcb.129.2.473
92. Culbertson MR. RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet.* 1999;15(2):74–80 doi: 10.1016/s0168-9525(98)01658-8
93. Urlaub G, Mitchell PJ, Ciudad CJ, Chasin LA. Nonsense mutations in the dihydrofolate reductase gene affect RNA processing. *Mol Cell Biol.* 1989;9(7):2868–2880 doi: 10.1128/mcb.9.7.2868-2880.1989

94. Cui Y, Hagan KW, Zhang S, Peltz SW. Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* 1995;9(4):423–436 doi: 10.1101/gad.9.4.423
95. McIntosh I, Hamosh A, Dietz HC. Nonsense mutations and diminished mRNA levels. *Nat Genet.* 1993 Jul;4(3):219 doi: 10.1038/ng0793-219
96. Kivirikko S, McGrath JA, Baudoin C, Aberdam D, Ciatti S, Dunnill MG, et al. A homozygous nonsense mutation in the alpha 3 chain gene of laminin 5 (LAMA3) in lethal (Herlitz) junctional epidermolysis bullosa. *Hum Mol Genet.* 1995;4(5):959–962. doi: 10.1093/hmg/4.5.959
97. Nakano A, Pulkkinen L, Murrell D, Rico J, Lucky AW, Garzon M, et al. Epidermolysis bullosa with congenital pyloric atresia: novel mutations in the beta 4 integrin gene (ITGB4) and genotype/phenotype correlations. *Pediatr Res.* 2001;49(5):618–626 doi: 10.1203/00006450-200105000-00003
98. Pulkkinen L, Kurtz K, Xu Y, Bruckner-Tuderman L, Uitto J. Genomic organization of the integrin beta 4 gene (ITGB4): a homozygous splice-site mutation in a patient with junctional epidermolysis bullosa associated with pyloric atresia. *Lab Invest.* 1997;76(6): 823–833. PMID: 9194858
99. Ellis C, Eason C, Snyder A, Siegel M, Pai GS, Ryan E, et al. Novel missense p.R252L mutation of ITGB4 compounded with known 3793+1G>A mutation associated with nonlethal epidermolysis bullosa-pyloric atresia with obstructive uropathy. *JAAD Case Rep.* 2021 Mar 20;11:63–68 doi: 10.1016/j.jdc.2021.03.016
100. Peters BP, Hartle RJ, Krzesicki RF, Kroll TG, Perini F, Balun JE, et al. The biosynthesis, processing, and secretion of laminin by human choriocarcinoma cells. *J Biol Chem.* 1985;260(27):14732–14742. PMID: 3840485
101. Allegra M, Gagnoux-Palacios L, Gache Y, Roques S, Lestringant G, Ortonne JP, Meneguzzi G. Rapid decay of alpha6 integrin caused by a mis-sense mutation in the propeller domain results in severe junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J Invest Dermatol.* 2003;121(6):1336–1343 doi: 10.1111/j.1523-1747.2003.12625.x
102. Varki R, Sadowski S, Pfendner E, Uitto J. Epidermolysis bullosa. I. Molecular genetics of the junctional and hemidesmosomal variants. *J Med Genet.* 2006;43(8):641–652 doi: 10.1136/jmg.2005.039685
103. Pulkkinen L, Uitto J. Heterozygosity for premature termination codon mutations in LAMB3 in siblings with non-lethal junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1998;111(6):1244–1246 doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00399.x

104. Gache Y, Allegra M, Bodemer C, Pisani-Spadafora A, de Prost Y, Ortonne JP, Meneguzzi G. Genetic bases of severe junctional epidermolysis bullosa presenting spontaneous amelioration with aging. *Hum Mol Genet.* 2001;10(21):2453–2461 doi: 10.1093/hmg/10.21.2453
105. McGrath JA, Ashton GH, Mellerio JE, Salas-Alanis JC, Swensson O, McMillan JR, Eady RA. Moderation of phenotypic severity in dystrophic and junctional forms of epidermolysis bullosa through in-frame skipping of exons containing non-sense or frameshift mutations. *J Invest Dermatol.* 1999;113(3):314–321 doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00709.x
106. Swensson O, Christophers E. Generalized atrophic benign epidermolysis bullosa in 2 siblings complicated by multiple squamous cell carcinomas. *Arch Dermatol.* 1998;134(2):199–203 doi: 10.1001/archderm.134.2.199
107. Chavanas S, Gache Y, Vailly J, Kanitakis J, Pulkkinen L, Uitto J, et al. Splicing modulation of integrin beta4 pre-mRNA carrying a branch point mutation underlies epidermolysis bullosa with pyloric atresia undergoing spontaneous amelioration with ageing. *Hum Mol Genet.* 1999;8(11):2097–2105 doi: 10.1093/hmg/8.11.2097
108. McGrath JA, Pulkkinen L, Christiano AM, Leigh IM, Eady RA, Uitto J. Altered laminin 5 expression due to mutations in the gene encoding the beta 3 chain (LAMB3) in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1995;104(4):467–474 doi: 10.1111/1523-1747.ep12605904
109. McGrath JA, Christiano AM, Pulkkinen L, Eady RA, Uitto J. Compound heterozygosity for nonsense and missense mutations in the LAMB3 gene in nonlethal junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1996;106(5):1157–1159 doi: 10.1111/1523-1747.ep12340210
110. Wu Y, Li G, Zhu X. A novel homozygous point mutation in the COL17A1 gene in a Chinese family with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Dermatol Sci.* 2002;28(3):181–186 doi: 10.1016/s0923-1811(01)00163-3
111. McGrath JA, Gatalica B, Li K, Dunnill MG, McMillan JR, Christiano AM, et al. Compound heterozygosity for a dominant glycine substitution and a recessive internal duplication mutation in the type XVII collagen gene results in junctional epidermolysis bullosa and abnormal dentition. *Am J Pathol.* 1996;148(6):1787–1796. PMID: 8669466
112. Castiglia D, Posteraro P, Spirito F, Pinola M, Angelo C, Puddu P, et al. Novel mutations in the LAMC2 gene in non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa: effects on laminin-5 assembly, secretion, and deposition. *J Invest Dermatol.* 2001;117(3):731–739 doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01453.x

113. Gagnoux-Palacios L, Allegra M, Spirito F, Pommeret O, Romero C, Ortonne JP, Meneguzzi G. The short arm of the laminin gamma2 chain plays a pivotal role in the incorporation of laminin 5 into the extracellular matrix and in cell adhesion. *J Cell Biol.* 2001;153(4):835–850 doi: 10.1083/jcb.153.4.835
114. van Leusden MR, Pas HH, Gedde-Dahl T Jr, Sonnenberg A, Jonkman MF. Truncated typeXVII collagen expression in a patient with non-herlitz junctional epidermolysis bullosa caused by a homozygous splice-site mutation. *Lab Invest.* 2001;81(6):887–894 doi: 10.1038/labinvest.3780297
115. Whittock NV, Sher C, Gold I, Libman V, Reish O. A founder COL17A1 splice site mutation leading to generalized atrophic benign epidermolysis bullosa in an extended inbred Palestinian family from Israel. *Genet Med.* 2003;5(6):435–439 doi: 10.1097/01.gim.0000096494.61125.d8
116. Pulkkinen L, Marinkovich MP, Tran HT, Lin L, Herron GS, Uitto J. Compound heterozygosity for novel splice site mutations in the BPAG2/COL17A1 gene underlies generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1999;113(6):1114–1118 doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00793.x
117. Schumann H, Hammami-Hauasli N, Pulkkinen L, Mauviel A, Küster W, Lüthi U, et al. Three novel homozygous point mutations and a new polymorphism in the COL17A1 gene: relation to biological and clinical phenotypes of junctional epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet.* 1997;60(6):1344–1353 doi: 10.1086/515463
118. Pasmooij AM, Pas HH, Deviaene FC, Nijenhuis M, Jonkman MF. Multiple correcting COL17A1 mutations in patients with revertant mosaicism of epidermolysis bullosa. *Am J Hum Genet.* 2005;77(5):727–740 doi: 10.1086/497344
119. Jonkman MF, Scheffer H, Stulp R, Pas HH, Nijenhuis M, Heeres K, et al. Revertant mosaicism in epidermolysis bullosa caused by mitotic gene conversion. *Cell.* 1997;88(4):543–551 doi: 10.1016/s0092-8674(00)81894-2
120. Pulkkinen L, Christiano AM, Airenne T, Haakana H, Tryggvason K, Uitto J. Mutations in the gamma 2 chain gene (LAMC2) of kalinin/laminin 5 in the junctional forms of epidermolysis bullosa. *Nat Genet.* 1994;6(3):293–297 doi: 10.1038/ng0394-293
121. Inoue M, Tamai K, Shimizu H, Owaribe K, Nakama T, Hashimoto T, McGrath JA. A homozygous missense mutation in the cytoplasmic tail of beta4 integrin, G931D, that disrupts hemidesmosome assembly and underlies Non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa without pyloric atresia? *J Invest Dermatol.* 2000;114(5):1061–1064 doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00960-3.x



122. Yu Y, Wang Z, Mi Z, Sun L, Fu X, Yu G, et al. Epidermolysis bullosa in Chinese patients: Genetic analysis and mutation landscape in 57 pedigrees and sporadic cases. *Acta Derm Venereol.* 2021 Jul 15;101(7):adv00503 doi: 10.2340/00015555-3843
123. Scaturro M, Posteraro P, Mastrogiacomo A, Zaccaria ML, De Luca N, Mazzanti C, et al. A missense mutation (G1506E) in the adhesion G domain of laminin-5 causes mild junctional epidermolysis bullosa. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;309(1):96–103 doi: 10.1016/s0006-291x(03)01533-x
124. Posteraro P, Sorvillo S, Gagnoux-Palacios L, Angelo C, Paradisi M, Meneguzzi G, et al. Compound heterozygosity for an out-of-frame deletion and a splice site mutation in the LAMB3 gene causes nonlethal junctional epidermolysis bullosa. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;243(3):758–764 doi: 10.1006/bbrc.1998.8180
125. Mellerio JE, Pulkkinen L, McMillan JR, Lake BD, Horn HM, Tidman MJ, et al. Pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa syndrome: mutations in the integrin beta4 gene (ITGB4) in two unrelated patients with mild disease. *Br J Dermatol.* 1998;139(5):862–871 doi: 10.1046/j.1365-2133.1998.02515.x
126. Tasanen K, Floeth M, Schumann H, Bruckner-Tuderman L. Hemizyosity for a glycine substitution in collagen XVII: unfolding and degradation of the ectodomain. *J Invest Dermatol.* 2000;115(2):207–212 doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00049.x
127. Yuen WY, Pas HH, Sinke RJ, Jonkman MF. Junctional epidermolysis bullosa of late onset explained by mutations in COL17A1. *Br J Dermatol.* 2011;164(6):1280–1284 doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10359.x
128. Vanotti S, Chiaverini C, Charlesworth A, Bonnet N, Berbis P, Meneguzzi G, Lacour JP. Late-onset skin fragility in childhood: a case of junctional epidermolysis bullosa of late onset caused by a missense mutation in COL17A1. *Br J Dermatol.* 2013;169(3):714–715 doi: 10.1111/bjd.12353
129. Väisänen L, Has C, Franzke C, Hurskainen T, Tuomi ML, Bruckner-Tuderman L, Tasanen K. Molecular mechanisms of junctional epidermolysis bullosa: Col 15 domain mutations decrease the thermal stability of collagen XVII. *J Invest Dermatol.* 2005;125(6):1112–1118 doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23943.x
130. Tasanen K, Eble JA, Aumailley M, Schumann H, Baetge J, Tu H, et al. Collagen XVII is destabilized by a glycine substitution mutation in the cell adhesion domain Col15. *J Biol Chem.* 2000;275(5):3093–3099 doi: 10.1074/jbc.275.5.3093
131. Huilaja L, Hurskainen T, Autio-Harmainen H, Sormunen R, Tu H, Hofmann SC, et al. Glycine substitution mutations cause intracellular accumulation of collagen XVII and

- affect its post-translational modifications. *J Invest Dermatol.* 2009;129(9):2302–2306 doi: 10.1038/jid.2009.22
132. Pulkkinen L, Jonkman MF, McGrath JA, Kuijpers A, Paller AS, Uitto J. LAMB3 mutations in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa: consequences at the mRNA and protein levels. *Lab Invest.* 1998;78(7):859–867. PMID: 9690563 doi: 10.1038/jid.2009.22
133. Hou PC, Natsuga K, Tu WT, Huang HY, Chen B, Chen LY, et al. Complexity of transcriptional and translational interference of laminin-332 subunits in junctional epidermolysis bullosa with LAMB3 mutations. *Acta Derm Venereol.* 2021 Aug 24;101(8):adv00522 doi: 10.2340/00015555-3874
134. Mazzanti C, Gobello T, Posteraro P, Paradisi M, Meneguzzi G, Chinni L, Zambruno G. 180-kDa bullous pemphigoid antigen defective generalized atrophic benign epidermolysis bullosa: report of four cases with an unusually mild phenotype. *Br J Dermatol.* 1998;138(5):859–866 doi: 10.1046/j.1365-2133.1998.02226.x
135. Ruzzi L, Pas H, Posteraro P, Mazzanti C, Didona B, Owaribe K, et al. A homozygous nonsense mutation in type XVII collagen gene (COL17A1) uncovers an alternatively spliced mRNA accounting for an unusually mild form of non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 2001;116(1):182–187 doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.00229.x
136. Pasmooij AM, van Zalen S, Nijenhuis AM, Kloosterhuis AJ, Zuiderveen J, Jonkman MF, Pas HH. A very mild form of non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa: BP180 rescue by outsplicing of mutated exon 30 coding for the COL15 domain. *Exp Dermatol.* 2004;13(2):125–128 doi: 10.1111/j.0906-6705.2004.00141.x
137. Dietz HC, Kendzior RJ Jr. Maintenance of an open reading frame as an additional level of scrutiny during splice site selection. *Nat Genet.* 1994;8(2):183–188 doi: 10.1038/ng1094-183
138. Kiritsi D, Kern JS, Schumann H, Kohlhase J, Has C, Bruckner-Tuderman L. Molecular mechanisms of phenotypic variability in junctional epidermolysis bullosa. *J Med Genet.* 2011;48(7):450–457 doi: 10.1136/jmg.2010.086751
139. Franzke CW, Has C, Schulte C, Huilaja L, Tasanen K, Aumailley M, Bruckner-Tuderman L. C-terminal truncation impairs glycosylation of transmembrane collagen XVII and leads to intracellular accumulation. *J Biol Chem.* 2006;281(40):30260–30268 doi: 10.1074/jbc.M604464200
140. Коталевская Ю.Ю., Марычева Н.М. Трудности дифференциальной диагностики подтипов пограничного типа буллезного эпидермолиза: описание двух клинических наблюдений. *Альманах клинической медицины.* 2019; 47 (1): 83–93

- [Kotalevskaya YuYu., Marycheva NM. Challenges of the differential diagnosis between the subtypes of the junctional epidermolysis bullosa: presentation of two clinical cases. Almanac of Clinical Medicine. 2019;47(1):83–93. (In Russ.)] doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-009
141. Kubanov AA, Karamova AE, Chikin VV, Monchakovskaya ES, Nefedova MA. Efficacy of intradermal allogeneic fibroblast injections in junctional epidermolysis bullosa. Russian Open Medical Journal 2022;11:e0315 doi: 10.15275/rusomj.2022.0315
142. Кубанов А.А., Карамова А.Э., Чикин В.В. Богданова Е.В., Мончаковская Е.С. Эпидемиология и состояние оказания медицинской помощи больным врожденным буллезным эпидермолизом в Российской Федерации. Вестник РАМН. 2018; 73 (6): 420–430. [Kubanov AA, Karamova AE, Chikin VV, Bogdanova EV, Monchakovskaya ES. Epidemiology and providing of healthcare for patients with inherited epidermolysis bullosa in the Russian Federation. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2018;73(6):420–430. (In Russ.)] doi: 10.15690/vramn980
143. Гаджимурадова К.М., Иванова М.А., Гаджимурадов М.Н., Алиева С.Н. Клинические и эпидемиологические особенности врожденного буллезного эпидермолиза в Республике Дагестан. Лечащий Врач. 2022;2(25):54–63. [Gadzhimuradova KM, Ivanova MA, Gadzhimuradov MN, Alieva SN. Clinical and epidemiological features of congenital epidermolysis bullosa in the Republic of Dagestan. Lechaschi Vrach. 2022; 2(25)54-63 (In Russ.)] doi: 10.51793/OS.2022.25.2.009

### Контактная информация

Автор, ответственный за переписку:

\*Чикин Вадим Викторович — д.м.н., доцент; адрес: Россия, 107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9688-2727>; eLibrary SPIN: 3385-4723; e-mail: [chikin@cnikvi.ru](mailto:chikin@cnikvi.ru)

Vadim V. Chikin — MD, Dr. Sci. (Med.); address: 3 bldg 6 Korolenko street, 107076, Moscow, Russia; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-9688-2727>; eLibrary SPIN: 3385-4723; e-mail: [chikin@cnikvi.ru](mailto:chikin@cnikvi.ru)

Кубанов Алексей Алексеевич — д.м.н., профессор, академик РАН; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7625-0503>; eLibrary SPIN: 8771-4990; e-mail: [alex@cnikvi.ru](mailto:alex@cnikvi.ru)

Alexey A. Kubanov — MD, Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences;

| Вестник дерматологии и венерологии. 2022.InPress.doi: <https://doi.org/10.25208/vdv1391>

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7625-0503>; eLibrary SPIN: 8771-4990; e-mail: alex@cnikvi.ru

Карамова Арфеня Эдуардовна — к.м.н., доцент; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-3805-8489>; eLibrary SPIN: 3604-6491; e-mail: [karamova@cnikvi.ru](mailto:karamova@cnikvi.ru)

Arfenya E. Karamova — MD, Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-3805-8489>; eLibrary SPIN: 3604-6491; e-mail: [karamova@cnikvi.ru](mailto:karamova@cnikvi.ru)

Мончаковская Екатерина Сергеевна — младший научный сотрудник; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6402-0962>; eLibrary SPIN-код: 9859-1912; e-mail: [monchakovskaya@cnikvi.ru](mailto:monchakovskaya@cnikvi.ru)

Ekaterina S. Monchakovskaya — junior research associate; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6402-0962>; eLibrary SPIN-код: 9859-1912; e-mail: [monchakovskaya@cnikvi.ru](mailto:monchakovskaya@cnikvi.ru)

Ahead of Print