

Подготовленные тезисы для участия в VI ежегодной Северо-Западной научно-практической конференции по муковисцидозу «Генетика, Диагностика, Осложнения, Реабилитация» (Санкт-Петербург, 15-16 мая 2015 г.)

АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА НА 50 ЧАСТЫХ ЕВРОПЕЙСКИХ МУТАЦИЙ ГЕНА *CFTR* ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ МУКОВИСЦИДОЗА В СЕМЬЯХ БОЛЬНЫХ СИБИРСКОГО РЕГИОНА

О.Н.Одинокова, А.А.Рудко, Л.П.Назаренко

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики», г.Томск, Россия

В последние годы молекулярная диагностика муковисцидоза в России существенно совершенствуется, однако до сих пор при тестировании даже достаточно обширного спектра мутаций, включающего 18-25 мутаций гена *CFTR*, ДНК-диагностика у больных муковисцидозом в России не всегда является информативной, около 20% мутантных генов остаются не идентифицированными. Для сравнения, в большинстве западно-европейских популяций у больных муковисцидозом выявляется не менее 95-98% патологических мутаций. В связи с этим одной из ключевых задач по оптимизации молекулярно-генетической диагностики муковисцидоза является расширение панели тестируемых мутаций, и при необходимости, в сложных диагностических случаях, использование прямого секвенирования нуклеотидной последовательности гена. В ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики», г. Томск при поддержке Благотворительного фонда «Острова» выполняется проект по расширенному поиску мутаций гена *CFTR* в семьях больных муковисцидозом сибирского региона. В рамках проекта осуществляется анализ более обширной панели из 50 частых европейских мутаций гена *CFTR* и проводится секвенирование кодирующих участков гена и регионов сплайсинга с целью поиска нарушений гена *CFTR*.

Целью настоящей работы является апробация набора на 50 частых европейских мутаций гена *CFTR* («Elucigene[®] CF-EU2v1», фирма «Gen-Probe») для поиска мутаций при ДНК-диагностике муковисцидоза в отягощённых семьях сибирского региона. В тестировании были использованы образцы ДНК (n=159) пациентов с муковисцидозом (n=104), у которых ранее были определены только по 1 мутантному варианту гена *CFTR*, либо не обследованные ранее пациенты, а также и их родственники (n=55).

В основе тестирования с набором - технология флуоресцентной ARMS (Amplification Refractory Mutation System) аллель специфической амплификации. С каждым образцом ДНК по протоколу фирмы ставилась мультиплексная аллель-специфическая амплификация в 2-х вариантах: «А» и «В» – с наборами праймеров, включающих меченые олигонуклеотидные последовательности, соответствующие мутантным (постановка «А») и нормальным (постановка «В») ДНК-последовательностям гена *CFTR*. Для проведения ПЦР использовался амплификатор «GeneAmp PCR System 9700». Анализ синтезированных фрагментов ДНК осуществлялся на приборе для проведения капиллярного электрофореза «3130xl Genetic

Analyzer» (фирмы «Applied Biosystems»); результаты разделения фрагментов анализировали в модуле «Фрагментный анализ».

Тестирование с помощью коммерческого кита «Elucigene CF-EU2v1» (в постановке «А») позволяет выявлять 50 частых европейских мутаций: F508del, I507del, 1677delTA, del 21 kb, R334W, R347P, R347H, G551D, R553X, G542X, 394delTT, N1303R, W1282X, E60X, P67L, G85E, 444delA, R117C, R117H, Y122X, 621+1G>T, 711+1G>T, L206W, 1078delT, A445E, R560T, 1811+1.6kbA>T, 1898+1G>A, 2143delT, 2184delA, 2347delG, W846X, 2789+5G>A, Q890X, 3120+1G>A, 3272-26A>G, R1066C, Y1092X(C>A), M1101K, D1152H, V520F, 1717-1G>A, S549R(T>G), S549N, R1158X, R1162X, 3659delC, 3849+10kbC>T, S1251N, 3905insT.

Кроме анализа 50 указанных мутаций набор позволяет исследовать варианты аллелей политимидинового тракта в 8-ом гена CFTR (IVS8-Tn: IVS8-5T, IVS8-7T, IVS8-9T), среди которых есть варианты, имеющие функциональную значимость и способные обусловить муковисцидоз при сочетании с другой (транс) мутацией гена CFTR. В нашей выборке неблагоприятные варианты IVS8-5T, нарушающие сплайсинг экзона 8 (или экзона 9 – как его нумерует современная номенклатура), зафиксированы в 9 образцах ДНК: у шести неродственных больных, а также у двух матерей и одного отца больных детей.

Ранее в нашем институте рутинно выполнялся анализ 21 частных мутаций гена CFTR (F508del, I507del, 1677delTA, CFTRdele2,3 (del 21 kb), R334W, R347P, G542X, G551D, R553X, 2143delT, 2184insA, 394delTT, 306delTAGA, 3821delT, L138ins, 2176insC, N1303K, 2183delAA, 2183AA→G, W1282X, 3944delGT). При исследовании расширенного спектра европейских мутаций, не выявлено противоречий с ранее полученными результатами, но помимо ранее определявшихся, выявлены прежде не детектируемые нами мутации: 3849+10kbC>T – в шести образцах ДНК (у 4 больных и 2 родителей); R1066C – в пяти образцах ДНК (у трёх больных и двух родителей); R1158X - у двух больных. Ещё в одной семье сибирского региона выявлена мутация 3659delC (у больного ребёнка и его матери). По одному случаю определены мутации новые для нашей практики: мутации R117C, 1898+1G>A, 2184delA, 2789+5G>A.

Вторая постановка тестирования в варианте «В» (с набором праймеров, включающих меченые олигонуклеотидные последовательности, соответствующие нормальным ДНК-последовательностям по всем диагностируемым 50 локализациям гена CFTR) позволяет определять статус (гомозиготный или гетерозиготный) выявленных в постановке «А» мутаций. А именно: фрагмент, соответствующий нормальной последовательности, определяется в меньшем количестве (в сравнении с нормальной контрольной ДНК) - если мутация имеется только в одной из двух копий гена (гетерозиготное состояние по мутации), либо отсутствует (в анализируемом спектре пятидесяти пиков) при наличии мутации в обеих копиях гена (гомозиготное состояние по мутации) CFTR.

Анализ «нормальных» пиков (в постановке «В») позволяет также дополнительно определять множество возможных мелких нуклеотидных делеций и инсерций в пределах анализируемых 50-ти внутригенных фрагментов ДНК. Это ещё существенно расширяет диагностические возможности выявления инсерционно-делеционных нарушений (не фиксируемых в варианте «А»), в частности, делает возможным выявление высоко

диагностически значимой для сибирского региона мутации 2184insA (не представленной в данной панели среди 50-ти мутаций), частота которой в сибирском регионе превышает 5%. Аналогично выявляется представленная у сибирских пациентов мутация 3944delGT. Также по изменениям пиков соответствующих фрагментов ДНК у двух ранее не обследованных больных муковисцидозом определена мутация L138ins (подтверждено секвенированием). Анализ спектра «нормальных» пиков (в постановке «В») позволил нам ещё в двух случаях определить регион поиска позднее выявленных секвенированием новых для нашей популяции мутаций: двух разных однонуклеотидных делеций в экзоне 24 (или в экзоне 21 - по исторической номенклатуре) гена *CFTR*. Таким образом, выявление каких либо существенных изменений в спектре анализируемых 50-ти внутригенных фрагментов гена, позволяет в ряде случаев определиться с регионом дальнейшего поиска патологической мутации методом секвенирования соответствующего экзона гена *CFTR*.

Помимо возможности определения множества возможных мелких нуклеотидных делеций и инсерций, анализ 50-ти «нормальных» пиков (в постановке «В») позволяет также дополнительно анализировать возможные крупные внутригенные делеции и дупликации, которые также встречаются при муковисцидозе, частота которых по мировым литературным данным составляет около 5% всех приводящих к муковисцидозу нарушений гена *CFTR*. Такие крупные генные дефекты (достаточно протяженные внутригенные делеции и дупликации) обычно не выявляются (в том числе методами секвенирования всей кодирующей последовательности гена) и остаются неидентифицируемыми. Нам удалось выявить протяжённую внутригенную делецию экзонов 4–11 (по современной нумерации 27 экзонов гена *CFTR*) в одной обследуемой семье у двоих больных муковисцидозом братьев (вторая патологическая мутация - R1162X). Это уже второй выявленный нами вариант крупной мутации, помимо распространенной в России мутации *CFTR*dele2,3 (del 21 kb). Так ранее у нас была выявлена внутригенная дупликация, включающая экзоны 6-10 (по исторической номенклатуре, или экзоны 6–11 – по современной).

Таким образом, показано существенное расширение диагностических возможностей при тестировании расширенного спектра частых европейских мутаций гена *CFTR*.

Результаты работы важны для внедрения более полной молекулярной диагностики заболевания, в том числе на ранних (и доклинических) стадиях болезни; для медико-генетического консультирования семей больных (определение и исключение носительства патологических мутаций у ближайших родственников, планирование семьи, в том числе оценка риска, возможная дородовая диагностика в отягощённых семьях). Точный молекулярный диагноз важен для возможных в последующем персонализированных рекомендаций по лечению пациентов в зависимости от выявляемых у них генных нарушений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Благотворительной программой «Я дышу!», реализуемой Благотворительным фондом «Острова». olga.odinokova@medgenetics.ru

