

## Фрагментный анализ полиморфизма $(TG)_mT_n$ интрона 8 гена *CFTR*

Маркова Е.В., Татару Д.А., Преда О.Г.

Красноярский центр репродуктивной медицины, Красноярск, 660037, ул. Коломенская, д.26, e-mail: genlab.kcrm@mail.ru

Полиморфный политимидиновый локус ( $T_n$ ), локализованный в области сайта сплайсинга интрона 8 гена трансмембранного регулятора муковисцидоза (*CFTR*) ассоциирован с различной эффективностью сплайсинга экзона 9. Гены, несущие 5T-аллель, имеют наибольший уровень потери экзона 9 в мРНК.  $TG$ -повторы —  $(TG)_m$ , непосредственно предшествующие  $T_n$ , также модулируют сплайсинг и могут являться причиной неполной пенетрантности аллеля 5T. Анализ полиморфизма  $(TG)_mT_n$  интрона 8 важен для диагностики врожденной аплазии семявыносящих протоков, а также для изучения полиморфного фона гена *CFTR*. В нашем исследовании предложен метод двухраундной ПЦР и фрагментного анализа для генотипирования поли-Т-последовательности,  $TG$ -тракта и молекулярного гаплотипирования  $(TG)_mT_n$ -локуса. Метод был применен для поли-Т-генотипирования 2261 образца (без частых мутаций гена), и  $(TG)_mT_n$ -гаплотипирования 292 из них. Частоты аллелей 5T, 7T и 9T соответствовали данным для европеоидных популяций. Наиболее распространенным  $TG$ -аллелем был 11TG (59,0%), гаплотипом — 7T-11TG (52,3%). Аллель 9T был преимущественно сцеплен с 10TG (71,9%). Среди хромосом, несущих аллель 5T, гаплотип 5T-12TG обнаружен в 18,0%, 5T-13TG — в 1,1%.

**Ключевые слова:** *CFTR*, муковисцидоз, аплазия семявыносящих протоков, *IVS8 CFTR*, 5T-аллель, *IVS8-TG*, фрагментный анализ.

## *CFTR* fragment analysis of intron 8 $(TG)_mT_n$ polymorphism

Markova E.V., Tataru D.A., Preda O.G.

Krasnoyarsk Center for Reproductive Medicine, 660037, Kolomenskaya st., 26, Krasnoyarsk, Russia, e-mail: genlab.kcrm@mail.ru

A polymorphic polythymidine ( $T_n$ ) locus located within splice site of *IVS8* of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene is associated with variable efficiency of exon 9 splicing. Genes that carry 5T allele have the highest levels of exon 9 skipping.  $(TG)_m$  tract located immediately upstream of the  $T_n$  can also modulate exon 9 skipping and may account for the partial penetrance of the 5T allele. Analysis of  $(TG)_mT_n$  polymorphism is important for the diagnosis of congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) and for investigation of polymorphic backgrounds of the *CFTR* gene. To detect poly-T-alleles,  $TG$ -repeats and molecular haplotyping  $(TG)_mT_n$  we developed nested PCR and fragment analysis. Allele frequencies of the 5T, 7T and 9T (N=2261) were consistent with the distribution for Caucasians.  $TG$ -repeats and  $(TG)_mT_n$  haplotypes were analyzed for 292 individuals. The major allele was 11TG (59.0%) and the major haplotypes — 7T-11TG (52.3%). 9T allele was mainly linked with 10TG (71.9%). 5T-12TG and 5T-13TG haplotypes were found in 18.0% and 1.1% of 5T chromosomes.

**Key words:** *CFTR*, cystic fibrosis, CBAVD, intron 8 poly-T locus, 5T allele, *IVS8-TG*, *IVS8* polymorphism, fragment analysis.

### Введение

Анализ гена трансмембранного регулятора муковисцидоза (*CFTR*; 7q31.2) важен для диагностики муковисцидоза (МВ), врожденной аплазии семявыносящих протоков и других *CFTR*-ассоциированных заболеваний [1–3]. В зависимости от назначения исследования, в диагностику включают анализ «тяжелых» и «мягких» мутаций, сцепленных полиморфных маркеров. В структуре гена выявлены полиморфные участки, занимающие по своему значению промежуточное положение между полиморфизмом и «мягкой» мутацией. К таким полиморфным локусам может быть отнесен интрон 8 (*IVS8*) гена *CFTR*. На 3'-конце интрона имеется по-

ли-Т-последовательность ( $T_n$ ), в составе которой число тимидинов может быть 5, 7 или 9. Соответствующие аллели называют аллелями 5T, 7T и 9T [4].

Полиморфный политимидиновый локус ассоциирован с различной эффективностью сплайсинга интрона 8, в ходе которого может происходить потеря 9-го экзона. Было обнаружено, что матричная РНК (мРНК) без экзона 9 выявляется в эпителиальных клетках здоровых лиц в разной пропорции — от 9 до 66%. Наибольший процент такой абберантной мРНК обнаруживается при наличии аллеля 5T в генотипе. В отсутствие экзона 9 формируется белковый продукт с утратой 60 аминокислот NBF1-домена. Такая изоформа белка *CFTR* функционально неполноценна, поскольку нарушается

цикло-АМФ-регулируемая проводимость для ионов хлора. Предполагается, что более короткая поли-Т-последовательность нарушает акцепторный сайт сплайсинга 8-го интрона и аллель 5T в наибольшей степени ответствен за аномальный сплайсинг. В то же время показано, что даже небольшая фракция функционально полноценного белка CFTR достаточна для формирования нормального фенотипа. Проявление аллеля 5T определяется комбинацией с другими мутациями в генотипе, а также уровнем тканеспецифичной экспрессии. В транс-комбинации со второй мутацией гена CFTR, в частности, F508del или R117H, 5T-аллель является частой причиной аплазии семявыносящих протоков [3–5].

5T-аллель IVS8 относят к «мягким» мутациям с неполной пенетрантностью. В ходе исследования варьирующей пенетрантности аллеля, было обнаружено, что на процесс аномального сплайсинга оказывает влияние еще один генетический элемент, расположенный в цис-положении с аллелем 5T. Непосредственно поли-Т-тракту предшествует другой полиморфизм, представляющий собой TG-повторы. Число таких повторов —  $(TG)_m$  — варьирует от 10 до 13. Установлено, что большее число TG-повторов, а именно аллели 12TG и 13TG, ассоциированы с нарушением сплайсинга и утратой экзона 9. Считается, что именно TG-локус модулирует эффект аллеля 5T и обуславливает его частичную пенетрантность [4–6].

В литературе предложены разные подходы к исследованию полиморфизма интрона 8. Поиск эффективного метода анализа аллеля 5T гена CFTR для нас был связан с исследованием генетических факторов при мужском бесплодии. Из числа опробованных технологий нам не удалось подобрать достаточно простого, приемлемого для широкого клинического использования и, в то же время, хорошо воспроизводимого метода. В настоящей работе описан метод анализа  $(TG)_m T_n$ -полиморфизма интрона 8, который был разработан нами на основе модификации нескольких методов разных авторов.

### Материалы и методы

Для анализа полиморфизма интрона 8 гена CFTR использовали геномную ДНК, выделенную из периферической крови с использованием набора «АмплиПрайм ДНК-сорб В» (ранее «ДНК-сорб В»; НекстБио). Поли-Т и TG-полиморфизм исследовали методом двухраундной ПЦР с флуоресцентно-мечеными праймерами и фрагментного анализа по комбинированному методу в собственной модификации, описанному в разделе результатов настоящей статьи. Анализ поли-Т-полиморфизма проведен на 2261 образце ДНК; дополнительный анализ TG-полиморфизма — на 292 образцах. В исследование включены образцы ДНК неродственных лиц (в возрасте от 1 мес. до 65 лет), у которых не были выявлены частые мутации гена CFTR из числа 16: CFTRdele2,3(21kb),

F508del, I507del, 1677delTA, 2143delT, 2184insA, 394delTT, W1282X, N1303K, R117H, L138ins, G542X, G551D, R553X, R347P, R334W. Исследование на носительство частых мутаций гена CFTR проводилось в Красноярском центре репродуктивной медицины (КЦРМ) с 2004 по 2016 гг. по разным показаниям, в том числе в целях обследования семей с МВ, пациентов с мужским бесплодием, доноров гамет, супружеских пар при планировании беременности. Среди обследованных преобладали лица мужского пола (88%) в связи с принятым алгоритмом обследования супружеской пары на носительство данного рецессивного заболевания. Анализ гаплотипов  $(TG)_m T_n$  дополнительно проведен на образцах ДНК 16 ядерных семей (69 чел.) с МВ.

Для ПЦР поли-Т и TG-полиморфизма IVS8 синтез олигонуклеотидных праймеров заказывали в фирмах «Бигль» или «Синтол». ПЦР проводили в объеме 20 мкл. Состав реакции включал 0,13 мМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата, 2 мМ  $MgCl_2$ , 6,6% ДМСО (диметилсульфоксида), SE-буфер для Hot Start Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим) и по 1 пмоль каждого праймера на реакцию. Для всех реакций применяли 1 ед. стандартной Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим), и только для второго раунда ПЦР поли-Т-полиморфизма — 1,5 ед. Hot Start Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим). Для первого раунда ПЦР использовали 1,5 мкл ДНК, для вторых — 1,5 мкл ПЦР-продукта первого раунда. Во всех сериях ПЦР применяли положительный и отрицательный контроли.

ПЦР осуществляли в термоциклере «DNA Engine Dyad» (Bio-Rad Laboratories, США). Для определения степени разведения ПЦР-продуктов для генетического анализатора проводили предварительный полиакриламидный гель-электрофорез (7%, 10 см). Фрагментный анализ выполняли на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3130xl или Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, США) с использованием полимера POP6 или POP7 соответственно, с размерным стандартом ROX350 (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, США).

Для верификации аллелей использовали тест-системы: «Cystic Fibrosis Genotyping Assay» (Abbott Molecular, США) для аллелей 5T, 7T и 9T и «Devzyer CFTR Core» (Devzyer, Швеция) для аллелей TG-повторов, сцепленных с 5T; анализ проводили с учетом рекомендаций фирм-производителей. Для оценки достоверности различий использовали критерий  $\chi^2$ .

### Результаты

Общая схема расположения праймеров для ПЦР и структуры анализируемого локуса представлена на рис. 1. Схема исследования локуса сформирована нами постепенно с использованием нескольких источников литературы, собственных модификаций и оптимизаций. Последовательность праймеров для ПЦР-реакций представлена в табл. 1.

Первоначально нашей задачей являлась разработка метода анализа поли-Т-полиморфизма интрона 8. Для амплификации поли-Т-последовательности мы применили олигонуклеотидные праймеры, предложенные J.Tuerlings с соавт. (1998) [8]. Праймер IVS8-F перекрывается с участком на границе поли-Т-последовательности, содержит четыре тимидина и длина ПЦР-продукта зависит соответственно от длины поли-Т-участка (рис. 1). Для улучшения амплификации был применен вариант двухраундной ПЦР с использованием для первого раунда олигонуклеотидных праймеров 9i5 и 9i3 по С.Gelfi с соавт. (1998) [7] с амплификацией большего фрагмента интрона 8 и экзона 9 (табл. 1 и рис. 1). Для первого раунда (ПЦР 1) использовали температуру отжига 60°C, для второго раунда — программу амплификации, предложенную J.Tuerlings с соавт. (1998) [8]. Для повышения разрешения вместо детекции в полиакриламидном геле мы применили флуоресцентное мечение праймера IVS8-R и фрагментный анализ на генетическом анализаторе.

Амплификация в два раунда (9i5+9i3/IVS8-F+IVS8-R-FAM) с последующей детекцией на генетическом анализаторе позволила получить хорошо воспроизводимый и автоматизированный вариант анализа поли-Т-последовательности *IVS8*. Для удобства анализа в программе «Gene Mapper» мы создали панель с бинами, соответствующими аллелям 5T, 7T и 9T. Размер фрагментов во фрагментном анализе относителен и зависит от используемого флуорохрома, полимера и других факторов, а также отличается от истинного размера ПЦР-фрагмента. При анализе на генетическом анализаторе 3500 с использованием полимера POP7 фрагмент 52 п.н. соответствовал аллелю 5T, 54 п.н. — 7T, 56 п.н. — 9T. На рис. 2 представлены фрагменты, соответствующие разным генотипам. В связи с относительностью размера фрагментов и различием всего на 2 п.н., считаем необходимым использование контрольных образцов при каждом исследовании. Относительно друг друга размер фрагментов всегда постоянен. Для каждой серии исследований мы использовали два положительных контроля с генотипами 5T/7T и 7T/9T, по которым при необходимости корректировали бины.

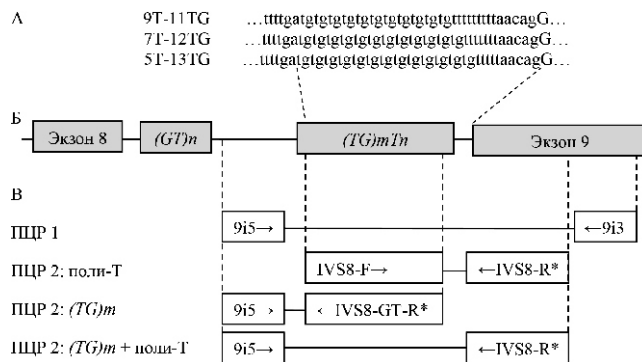


Рис. 1. Структура локуса, содержащего полиморфные последовательности *IVS8* гена *CFTR* и расположение праймеров для анализа: А: примеры вариантов последовательности участка интрона 8, содержащей поли-Т-последовательность и примыкающие к ней *TG*-повторы на границе с экзоном 9 (по Claustres, 2005 [4] с модификациями); Б: схема локуса; В: взаимное расположение праймеров (\* — флуоресцентная метка) для первого и вторых раундов ПЦР исследуемых полиморфизмов (ПЦР1 и ПЦР2).

Модифицированная нами технология генотипирования поли-Т-последовательности *IVS8* была проверена с использованием тест-системы «Cystic Fibrosis Genotyping Assay» (Abbott Molecular, Celera, США). Данная система предназначена для анализа 32 МВ-мутаций, позволяет генотипировать поли-Т-полиморфизм *IVS8* в повторном ПЦР-олигонуклеотид лигазном тесте после анализа всех мутаций и не предусматривает анализа прилегающих *TG*-повторов. Параллельный анализ 10 образцов (с генотипами 5T/7T — 3, 5T/9T — 1, 7T/7T — 2, 7T/9T — 4) предложенным нами методом и «Cystic Fibrosis Genotyping Assay» полностью подтвердил правильность определения аллелей 5T, 7T, 9T и генотипов соответственно.

Для анализа числа *TG*-повторов, непосредственно прилегающих к поли-Т-последовательности, нами был разработан дополнительный этап анализа полиморфизма интрона 8. Для амплификации *TG*-фрагмента мы применили дизайн последовательности праймера (IVS8-GT-R-TAMRA), обратно комплементарного IVS8-F (рис. 1, табл. 1). Его использование в комбинации с 9i5 позволило амплифицировать фрагмент интро-

Последовательности праймеров для анализа *(TG)mTn*-полиморфизма *IVS8* гена *CFTR*

| Название                                                          | Последовательность, 5' → 3' | Источник литературы                            |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|
| 9i5                                                               | taatggatcatgggccatgt        | Gelfi et al., 1998; Zielenski et al., 1991 [7] |
| 9i3                                                               | acagcttgaatgctgctgca        |                                                |
| IVS8-F                                                            | tgtgtgtgtgtgtgtttt          | Tuerlings et al., 1998 [8]                     |
| IVS8-R-FAM                                                        | FAM-gttttgtttgtcttctc       |                                                |
| IVS8-TG-R-TAMRA                                                   | TAMRA-aaaacacacacacaca      | *                                              |
| Примечание. * — обратно комплементарная последовательность IVS8-F |                             |                                                |

на 8, размер которого зависит только от числа *TG*-повторов. В ходе оптимизации добиться качественной ПЦР удалось в двухраундной системе с использованием для первого раунда той же реакции ПЦР1 (9i5+9i3), что и для поли-Т. В ходе первого раунда интересующий нас полиморфизм отделяется от соседнего микросателлитного участка *GT*-повторов, локализованного также в интроне 8 на расстоянии около 200 п.н. от (*TG*)*mTn*-локуса (рис. 1). Для второго раунда амплификации использовали температуру отжига 55°C.

Таким образом, двухраундная амплификация (9i5+9i3/9i5+IVS8-GT-R-TAMRA) с последующим фрагментным анализом позволила эффективно генотипировать повторы (*TG*)*m*. Размеры амплифицируемых во втором раунде фрагментов различаются на два нуклеотида (*TG*) и для генетического анализатора 3500 соответствовали: 117 п.н. — аллелю из 10 *TG*-повторов,

119 п.н. — аллелю 11*TG*, 121 п.н. — аллелю 12*TG*. Иллюстрация генотипирования *TG*-повторов с использованием фрагментного анализа представлена на рис. 3.

При гетерозиготности по поли-Т и *TG*-повторам *IVS8* возникает необходимость выяснения характера их сцепления. В связи с непосредственной близостью анализируемых полиморфных участков, размер ПЦР-фрагмента, охватывающий оба локуса, должен пропорционально зависеть от размера поли-Т и *TG*-последовательностей. И действительно, используя амплификацию фрагмента с праймерами 9i5 и IVS8-R-FAM (рис. 1), после оптимизации условий реакции (температура отжига 51°C), удалось достичь гаплотипирования локуса (*TG*)*mTn* *IVS8* путем анализа размера третьего фрагмента. Размеры фрагментов (*TG*)*m*+поли-Т (п.н.) при разных вариантах сцепления *TG* и поли-Т *IVS8* представлены в табл. 2.

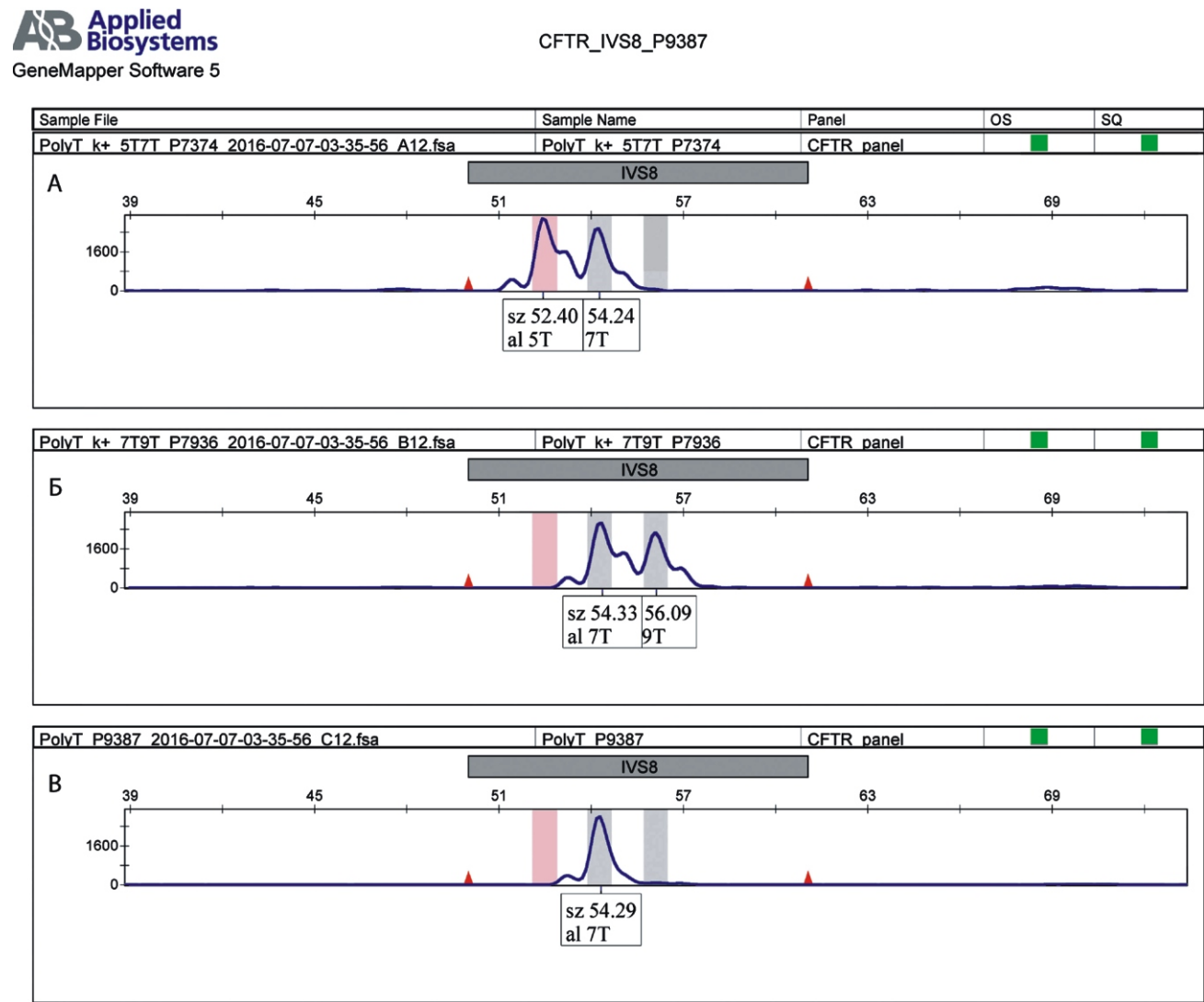


Рис. 2. Фрагментный анализ поли-Т-последовательности интрона 8: образцы с генотипами 5Т/7Т (А), 7Т/9Т (Б) и 7Т/7Т (В).

Мы не встретили фрагментов с размерами 155 п.н. для *5T* и 163 п.н., 165 п.н. для *9T*, обозначенных в табл. 2 курсивом. Возможно, что таких комбинаций не существует или они встречаются крайне редко ввиду распространенности определенных гаплотипов. Примеры двойных гетерозигот, для которых сцепление поли-*T* и *TG*-аллелей установлено анализом длины третьего фрагмента (*TG*)*m*+поли-*T*, представлены на рис. 3.

Верификация гаплогрупп *5T-11TG* и *5T-12TG* была проведена с использованием тест-системы «Devzyer CFTR Core» (Devzyer, Швеция).

Данная тест-система основана на аллельспецифичной ПЦР с детекцией фрагментным анализом на генетическом анализаторе и позволяет выявлять 32 мутации и определять только *TG*-аллели, сцепленные с *5T*.

**AB Applied Biosystems**  
GeneMapper Software 5

CFTR\_IVS8\_TG\_Samples\_11.07.2016

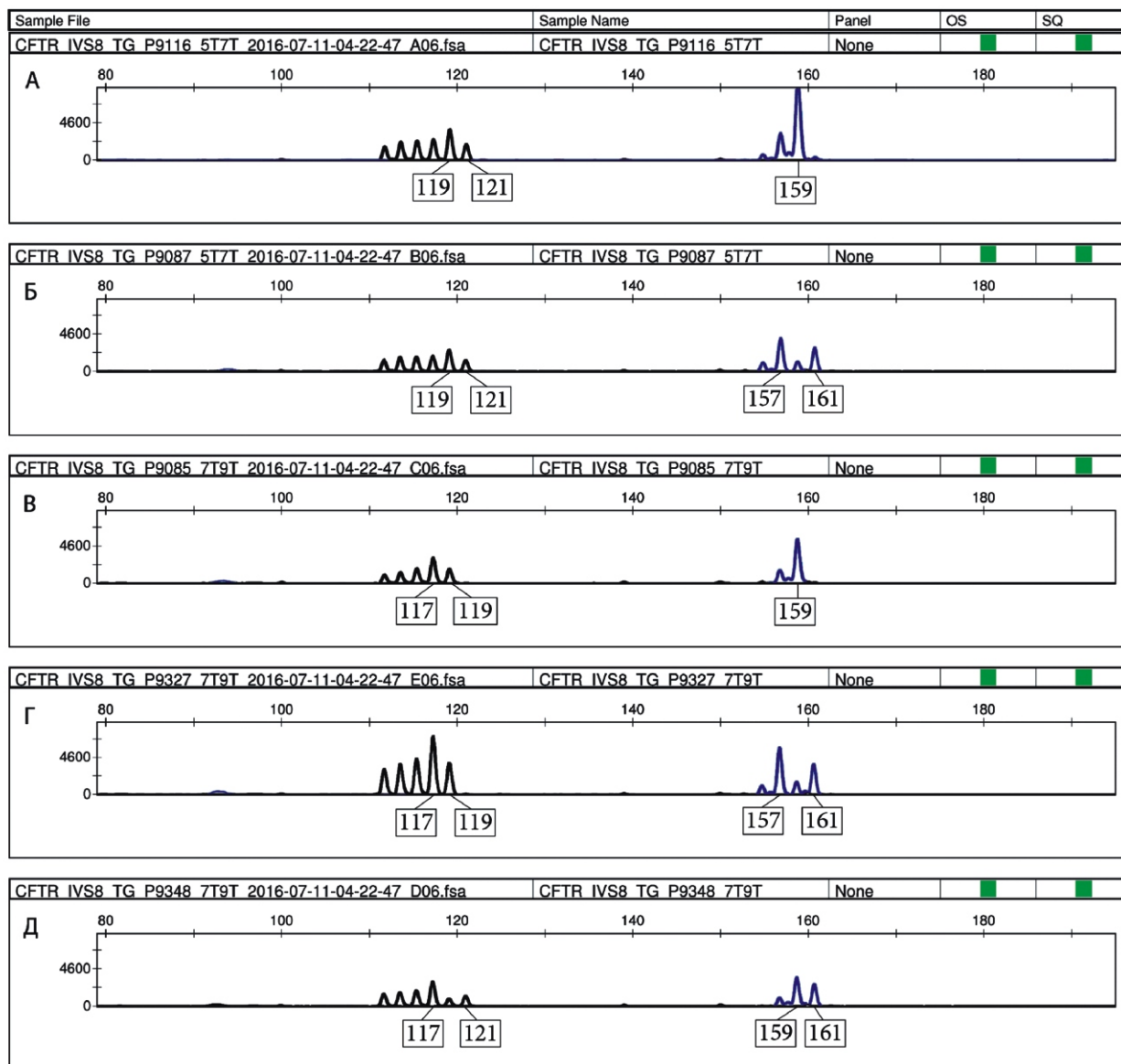


Рис. 3. Фрагментный анализ *TG*-повторов интрона 8 (TAMRA — черные пики) и (*TG*)*m*(*T*)*n*-гаплотипов по третьему фрагменту (FAM — синие пики). Образцы А и Б двойные гетерозиготы *5T/7T* и *11TG/12TG* (119/121 п.н.): по длине третьего фрагмента сцепление можно определить как *5T-12TG* и *7T-11TG* для образца А (159 п.н.), *5T-11TG* и *7T-12TG* для образца Б (157 п.н. и 161 п.н.). Образцы В и Г двойные гетерозиготы *7T/9T* и *10TG/11TG* (117/119 п.н.): сцепление *7T-11TG* и *9T-10TG* для образца В (159 п.н.); *7T-10TG* и *9T-11TG* для образца Г (157 п.н. и 161 п.н.). Образец Д гетерозигота *7T/9T* и *10TG/12TG*: сцепление *7T-12TG* и *9T-10TG* по данным третьего фрагмента (159/161 п.н.). Размеры фрагментов подписаны вручную.

При гомозиготности по поли-Т или *TG*-аллелю сцепление очевидно, однако оно было проверено нами на 50 образцах, и полностью подтвердилось размером третьего фрагмента. Кроме того, наш способ молекулярного гаплотипирования по трем фрагментам мы проверили стандартным семейным анализом для образцов ДНК 16 семей (69 чел.), в которых в 37,5% случаев кроме родителей и детей были обследованы бабушки и дедушки, и во всех случаях сцепление подтвердилось.

При оптимизации вторых раундов ПЦР поли-Т и *(TG)m* + поли-Т мы сталкивались с проблемой слабой и/или неспецифической амплификации (предпики выше основных, неспецифические фрагменты). Необходимо отметить, что наиболее «привередливой» реакцией была ПЦР2 для поли-Т-последовательности, для которой мы применяем исключительно Hot start ДНК-полимеразу.

Результаты исследования полиморфизма интрона 8 гена *CFTR* с использованием разработанного нами подхода представлены в табл. 3.

На основании генотипирования 2261 образца по поли-Т-полиморфизму *IVS8* было установлено, что частота наиболее распространенного генотипа *7T/7T* составила 72,58%, наименее распространенного *5T/5T* — 0,09%. Распределение генотипов не отклонялось от соотношения Харди—Вайнберга. Частота аллелей составила 85,38% — *7T*, 9,89% — *9T* и 4,73% — *5T*. Гетерозиготность по поли-Т-полиморфизму составила 26,6%.

Для анализа *TG*-повторов были выбраны образцы с разными генотипами в отношении поли-Т-полиморфизма: 2 — *5T/5T*, 78 — *5T/7T*, 7 — *5T/9T*, 87 — *7T/7T*, 113 — *7T/9T*, 5 — *9T/9T*). Частота гаплотипов рассчитана на группу *5T*, *7T* и *9T*, а также на все образцы с учетом частот *5T*, *7T* и *9T*-аллелей. Три группы хромосом, несущих аллели *5T*, *7T* и *9T*, достоверно различались между собой по частоте гаплотипов ( $p < 0,001$ ).

Среди хромосом, несущих аллель *7T*, преобладал гаплотип *7T-11TG* (61,31%), преобладающий в общей группе — 52,34%. Следующий по частоте гаплотип *7T-10TG* обнаружен в 21,80% среди *7T*-хромосом и в 18,61% в общей группе. Частота гаплотипа *7T-12TG* составила 16,62% в группе *7T* и 14,19% в общей группе.

Для гаплотипов, содержащих аллель *5T*, самым частым явился *5T-11TG* (80,90%), вторым по частоте — *5T-12TG* (17,98%), что составило 3,83% и 0,85% в общей группе. Выявлен один гаплотип *5T-13TG*, что составило 1,12% среди *5T*-хромосом. Не обнаружено ни одного случая сцепления *5T* с *10TG*.

Для аллеля *9T* не было выявлено ни одного случая сцепления с *12TG* или *13TG*. Большая часть аллелей *9T* была сцеплена с аллелем *10TG* (71,88%), что составило 7,11% от всех изученных хромосом; для другой части *9T*-аллелей обнаружено сцепление с *11TG* (28,13% в группе *9T* и 2,78% среди всех гаплотипов).

Размер третьего фрагмента *(TG)m*+поли Т (bp) *IVS8* при разных вариантах сцепления

Таблица 2

| Аллель | 5T  | 7T  | 9T  |
|--------|-----|-----|-----|
| 10TG   | 155 | 157 | 159 |
| 11TG   | 157 | 159 | 161 |
| 12TG   | 159 | 161 | 163 |
| 13TG   | 161 | 163 | 165 |

Частота генотипов, аллелей и гаплотипов *(TG)mTn* интрона 8 гена *CFTR*

Таблица 3

| Генотип | 5T/5T              | 5T/7T          | 5T/9T              | 7T/7T          | 7T/9T              | 9T/9T          | Всего             |
|---------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|-------------------|
| N       | 2                  | 188            | 22                 | 1641           | 391                | 17             | 2261              |
| %       | 0,09               | 8,31           | 0,97               | 72,58          | 17,29              | 0,75           | $\chi^2 = 0,20^*$ |
| Аллель  | 5T                 |                | 7T                 |                | 9T                 |                | Всего             |
|         | 214 (4,73%)        |                | 3861 (85,38%)      |                | 447 (9,89%)        |                | 4522              |
|         | N (%) <sup>1</sup> | % <sup>2</sup> | N (%) <sup>1</sup> | % <sup>2</sup> | N (%) <sup>1</sup> | % <sup>2</sup> | % <sup>2</sup>    |
| 10 TG   | 0                  | 0,00%          | 80 (21,80%)        | 18,61%         | 92 (71,88%)        | 7,11%          | 25,72%            |
| 11 TG   | 72 (80,90%)        | 3,83%          | 225 (61,31%)       | 52,34%         | 36 (28,13%)        | 2,78%          | 58,95%            |
| 12 TG   | 16 (17,98%)        | 0,85%          | 61 (16,62%)        | 14,19%         | 0                  | 0,00%          | 15,04%            |
| 13 TG   | 1 (1,12%)          | 0,05%          | 1 (0,27%)          | 0,23%          | 0                  | 0,00%          | 0,29%             |
| Всего   | 89                 |                | 367                |                | 128                |                | 584               |

Примечание. \* В сравнении с соотношением Харди—Вайнберга; %<sup>1</sup> — частота в группе *5T*, *7T* или *9T*, %<sup>2</sup> — частота гаплотипа в общей группе с учетом частот аллелей *5T*, *7T* или *9T*.

Расчет частот *TG*-аллелей, произведенный на основании частот гаплотипов и частот аллелей *5T*, *7T* и *9T*, показывает наибольшую распространенность в исследованной группе аллеля *11TG* — 59,95%. Частота *10TG* составила 25,72%, *12TG* — 15,04%. Аллель *13TG* обнаружен в 2 случаях (0,29%) в сцеплении с *5T* и *7T*-аллелями. Гетерозиготность по *TG*-повторам выявлена в 166 случаях из 292, что составило 56,8%.

### Обсуждение

В работе изложены этапы анализа  $(TG)_mT_n$ -полиморфизма интрона 8, которые иллюстрируют только те наши исследования, которые позволили выработать эффективный подход к комплексному анализу исследуемого локуса из всех оптимизаций, проведенных с 2010 г. Большое число методов, предложенных для анализа данного локуса в литературе, отражает, в том числе, сложность локуса для рутинного исследования. Нам представляется, что фрагментный анализ является хорошим инструментом изучения такого полиморфизма.

Предложенная нами технология анализа предполагает двухэтапную ПЦР. На первом этапе амплифицируется фрагмент, охватывающий оба полиморфизма. На втором этапе ПЦР образуются флуоресцентно-меченные фрагменты для каждого полиморфизма в отдельности. Для определения характера сцепления в случае двойной гетерозиготы используется дополнительная ПЦР-реакция. Анализ полученных фрагментов проводится на генетическом анализаторе.

Второй этап ПЦР выполняется в зависимости от задач исследования. Так, в случае исследования гена *CFTR* при мужском бесплодии, клиническое значение имеет только выявление *5T*-аллеля и дальнейший анализ сцепленных с ним *TG*-повторов. При обнаружении двойной гетерозиготности проводится ПЦР и фрагментный анализ третьего фрагмента, что позволяет определить сцепление аллеля *5T* с 11, 12 или 13 *TG*-повторами. Такой алгоритм исследования наряду с анализом мутаций рекомендован при обследовании пациентов с СБАВД [1].

Выявление *5T*-аллеля без дополнительного анализа примыкающих *TG*-повторов может создавать сложность в интерпретации и консультировании. Ввиду варьирующей пенетрантности аллеля возникает проблема «серой зоны», не позволяющей однозначно классифицировать данный генетический вариант как аномальный. Применение тест-системы «Cystic Fibrosis Genotyping Assay» (Abbott Molecular, США) позволило нам убедиться в правильности нашего метода определения поли-Т-аллелей. Однако данная тест-система не предусматривает анализ *TG*-повторов. Созданный нами подход к анализу *TG*-повторов позволил нам дифференцировать *5T*-аллели. В нашем исследовании варианты *5T-12TG* и *5T-13TG*, относящиеся к патогенным, составили 18,0% и 1,1% соответственно. Для верификации *TG*-аллелей

использовали тест-систему «Devzyer CFTR Core» (Devzyer, Швеция). Применение вышеуказанных коммерческих тест систем исключительно для анализа полиморфизма интрона 8 может быть ограничено их высокой стоимостью, особенно для масштабных исследований. Кроме того, одна из систем позволяет только генотипировать поли-Т-полиморфизм, а вторая — гаплотипировать только *5T*-варианты. Наша технология может быть использована как для анализа каждого полиморфизма интрона 8 в отдельности, так и для  $(TG)_mT_n$ -гаплотипирования.

Исследование поли-Т-полиморфизма интрона 8 в разных популяциях, по данным литературы, демонстрирует наибольшую распространенность аллеля *7T*. Его частота для европеоидов составляет 84%. Второй по частоте аллель *9T*, который, как и *7T*, относят к вариантам нормы, встречается в 11% случаев. Частота аллеля *5T* составляет около 5% [4]. Подобные частоты выявлены для Северо-Западного региона России: *7T* — 85%, *9T* — 9%, *5T* — 6% [9]. В нашем исследовании получены сходные данные: *7T* — 85,4%, *9T* — 9,9%, *5T* — 4,7%. Хотя из нашего исследования были исключены лица с выявленными частыми мутациями гена *CFTR* (кроме *IVS8 5T*), обследованную нами группу нельзя считать соответствующей контрольной или репрезентативной в отношении популяции в целом. В составе обследованной нами группы преобладали лица мужского пола из супружеских пар с репродуктивными нарушениями. Тем не менее, распределение генотипов в нашем исследовании не отклонялось от соотношения Харди—Вайнберга. У обследованных нами лиц не выяснялась национальность, но большинство были европеоидами. Можно полагать, что ввиду большой выборки (4522 хромосом), полученные нами частоты в отношении поли-Т-полиморфизма, могут служить определенным ориентиром в отношении региональных частот аллелей. Для анализа распределения *5T-TG*-гаплогрупп в разных группах пациентов, необходимо детальный анализ клинических данных, который мы планируем провести в дальнейшем.

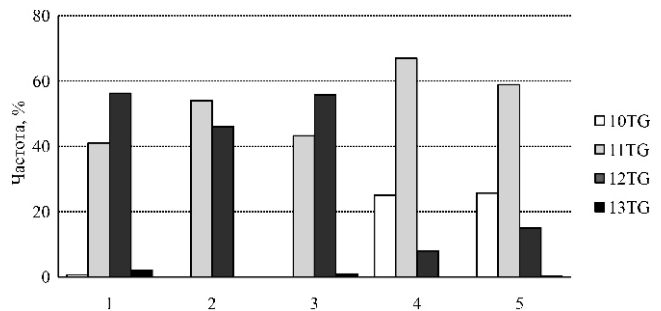


Рис. 4. Частота аллелей *TG*-повторов, предшествующих поли-Т-последовательности интрона 8 гена *CFTR* в разных популяциях, по данным литературы и нашим данным: 1 — вьетнамцы [12], 2 — японцы [12], 3 — китайцы [11], 4 — европейцы [12], 5 — европейцы (русские) — наши данные.

В литературе описано отличие восточноазиатских популяций от европейских по частоте аллеля *9T*. Так, у жителей Китая аллель *9T* редок и выявляется в 0,5–1,0% [10, 11].

*TG*-повторы, предшествующие поли-*T*-тракту, также характеризуются разницей в частотах аллелей и генотипов между европеоидами и популяциями Восточной Азии [11, 12]. Наши результаты, как и в случае поли-*T* полиморфизма, согласуются с данными для европеоидов (рис. 4). В нашей выборке частота наиболее распространенного аллеля *11TG* составила 59,9%. Вторым по частоте был аллель *10TG* — 25,7% и третьим *12TG* — 15,0%. В отношении данного полиморфизма мы не смогли найти других отечественных данных. Вероятно, полученные нами данные по частоте *TG*-аллелей, а также частоте  $(TG)_mT_n$ -гаплотипов локуса *IVS8 CFTR* являются новыми для российской популяции. В Китае, Вьетнаме и Японии доминируют по частоте и распределены более равномерно аллели *11TG* и *12TG*, в то время как аллель *10TG* редок [10–12].

Исследованный нами локус достаточно полиморфен и может иметь самостоятельное значение в качестве маркера для косвенной диагностики или изучения полиморфного «фона» локуса *CFTR* в популяционных исследованиях. Для трехаллельного поли-*T*-локуса (*5/7/9T*) гетерозиготность не слишком высока и составляет, по нашим данным, 26,6%, что несколько ограничивает его значение как полиморфного маркера. В литературе описаны редкие разновидности поли-*T*-последовательности, состоящие из 3 или 6 тимидинов [4, 10]. Аллель *3T*, вероятно, не удастся выявить нашим методом ввиду специфики праймера *IVS8-F*. *TG*-повторы исследованного локуса более полиморфны. В нашем исследовании найдены три наиболее частых аллельных варианта — *10/11/12TG* и более редкий *13TG*. По нашим данным, гетерозиготность для *TG*-повторов составила 56,8%. По данным литературы, для данного локуса возможен аллельный вариант *9TG* [4]. В интроне 8 имеется другой полиморфный микросателлит *GT/CA*, который не был предметом нашего исследования. Он достаточно полиморфен и применяется для косвенной диагностики *MB* [9].

Для анализа сцепления поли-*T* и *TG*-полиморфизма мы применяли молекулярное гаплотипирование, которое позволило определить гаплотипы для всех обследованных без привлечения образцов родственников. Такой подход дает определенное преимущество в сравнении со стандартным сегрегационным анализом, однако возможен только для тесно сцепленных локусов. Для гаплотипирования  $(TG)_mT_n$  *IVS8* может применяться прямое секвенирование [10, 11]. В работе А. Millson с соавт. (2005) предложен метод молекулярного гаплотипирования данного локуса с использованием анализа кривых плавления продуктов гибридизации [13]. Наш подход, отраженный на рис. 1, основан на сравнительном анализе длин ПЦР-продуктов для каждого из полимор-

физмов и общего фрагмента. Аллели находятся в максимально тесном сцеплении и могут быть охвачены общим ПЦР-продуктом. Поскольку аллельные варианты к настоящему времени известны и различие между аллелями, преимущественно, кратно двум нуклеотидам, варианты сцепления могут быть предсказаны. Из всех исследованных образцов нам не встретилось ни одного с отклоняющимися от схемы размерами фрагментов. Дополнительно наш способ был проверен стандартным семейным анализом сцепления (69 чел. из 16 семей), а также анализом 50 гомозиготных по одному или двум аллелям образцов, не требующих отдельного этапа гаплотипирования.

Обозначение гаплотипа  $(TG)_mT_n$  варьирует у разных авторов, например, *11TG-9T* или *TG11-T9* или *9T-11TG* [4, 6, 10, 12]. В нашей работе мы использовали запись сначала поли-*T*, затем *TG* (*9T-11TG*), которая более удобна при последующей клинической интерпретации результата.

Распределение гаплотипов, полученное в нашем исследовании, демонстрирует, что *5T*, *7T* и *9T* аллели имеют преимущественное сцепление с определенным числом *TG*-повторов. Так, обнаружилось преимущественное сцепление аллеля *9T* с 10-ю *TG* (71,9%), в то время как для *7T*-хромосом сцепление с *10TG* найдено только в 21,8%, а для *5T*-хромосом не обнаружено ни одного случая. Для *9T* группы не выявлено вариантов сцепления с *12TG*, аллель *12TG* выявлялся в сцеплении с *7T* в 16,6% и с *5T* в 19,0%.

Низкая частота *10TG*-аллеля в восточноазиатских популяциях согласуется с редкостью *9T*-аллеля, очевидно, из-за неслучайного распределения ввиду сцепления. Известно, что в азиатских популяциях встречаемость *MB* и частота мутации *F508del* существенно ниже, чем в европейских [12]. Установлено сцепление *F508del* с *9T*-аллелем *IVS8* и другими полиморфными вариантами локуса *CFTR* [9]. Данные о распространенности гаплотипа *9T-10TG* дополняют представления о полиморфном популяционном «фоне» *MB*.

Наши данные по распределению гаплотипов  $(TG)_mT_n$  в обследованной группе в целом сопоставимы с данными S. Gallati (2009) для контрольной группы (*N* = 96) [14]. Частота наиболее распространенного гаплотипа *7T-11TG*, по данным S. Gallati (2009), составила 56,4% для женщин и 57,1% для мужчин. В нашем исследовании гаплотип *7T-11TG* обнаружен в 52,3%. Можно отметить некоторое различие в частоте *7T-12TG*, которая, по нашим данным, составила 16,6%, а по данным S. Gallati (2009), 5,32% для женщин и 10,3% для мужчин [14].

В литературе можно найти больше данных в отношении распределения *5T*-несущих хромосом. В исследовании J.D. Groman с соавт. (2004) приводятся данные по частоте *5T-TG*-комбинаций в общей популяции для четырех разных стран Европы и США [6]. По обобщенным данным, для 1269 обследованных выявлено 83 слу-

чая *5T-11TG*, что составило 77% от *5T*-содержащих хромосом, 23 случая *5T-12TG* — 21% и 2 случая *5T-13TG* — 2% [6]. По нашим данным, среди 89 *5T*-хромосом обнаружены сопоставимые частоты гаплотипов: 80,9% были *5T-11TG*, 18,0% — *5T-12TG* и 1,1% — *5T-13TG*.

Для применения предложенной нами технологии анализа полиморфизма интрона 8, описанной в настоящей статье, важное значение имеют контрольные образцы. Размер фрагментов при использовании фрагментного анализа определяется относительно. В то же время для данного типа полиморфизма и метода анализа разница между фрагментами составляет 2 п.н. Данные о наиболее распространенных генотипах и гаплотипах могут служить ориентиром при отработке метода в отсутствие контрольных образцов или возможности верификации другой тест-системой. Так, примерно в 73% (по нашим данным) случаев можно ожидать гомозиготу *7T/7T*. Можно отметить, что образец с мутацией *F508del* может выступить в качестве контрольного в отношении аллеля *9T*. В свою очередь, аллель *10TG* наиболее часто сцеплен с *9T*.

Предложенная нами технология фрагментного анализа локуса  $(TG)_mT_n$ , интрона 8, позволяющая проводить генотипирование по каждому полиморфизму и анализ сцепления, приемлема как для клинических, так и для научных исследований. Она может применяться для выявления наиболее клинически значимого *5T*-аллеля и числа сцепленных с ним *TG*-повторов в случае исследования гена *CFTR* при мужском бесплодии. Кроме того, данная технология может быть полезна для исследования других *CFTR*-ассоциированных заболеваний, косвенной диагностики и популяционных исследований локуса *CFTR*.

### Список литературы

1. Dequeker E, Stuhmann M, Morris M et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders — updated European recommendations. *European Journal of Human Genetics*. 2008;1-15.
2. Ferec C, Cutting GR Assessing the Disease-Liability of Mutations in CFTR. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012;1-13.
3. Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 2012;27(1):25-35.
4. Claustres M. Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*. 2005;10(1):14-41.
5. Radpour R, Gourabi H, Gilani MAS, Dizaj AV. Molecular Study of (TG)<sub>m</sub>(T)<sub>n</sub> Polymorphisms in Iranian Males With Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens. *Journal of Andrology*. 2007;28(4):541-547.
6. Groman, JD, Hefferon TW, Casals T et al. Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *American Journal of Human Genetics*. 2004;74:176-179.
7. Gelfi C, Perego M, Righetti PG et al. Rapid capillary zone electrophoresis in isoelectric histidine buffer: high resolution of poly-T tract allelic variants in intron 8 of the CFTR gene. *Clinical Chemistry*. 1998;44(5):906-913.
8. Tuerlings J, Mol B, Kremer J et al. Mutation frequency of cystic fibrosis transmembrane regulator is not increased in oligozoospermic male candidates for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*. 1998;69(5):899-903.
9. Иващенко ТЭ, Баранов ВС. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. *Интермедика, Санкт-Петербург*. 2002:256.
10. Huang Q, Ding W, Wei MX. Comparative analysis of common CFTR polymorphisms poly-T, TG-repeats and M470V in a healthy Chinese population. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(12):1925-1930.
11. Du Q, Li Z, Pan Y et al. The CFTR M470V, Intron 8 Poly-T, and 8 TG-Repeats Detection in Chinese Males with Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens. *BioMed Research International*. 2014:1-7.
12. Nam MH, Hijikata M, Tuan LA et al. Variations of the CFTR Gene in the Hanoi-Vietnamese. *American Journal of Medical Genetics*. 2005;136A:249-253.
13. Millson A, Pont-Kingdon G, Page S, Lyon E. Direct Molecular Haplotyping of the IVS-8 Poly(TG) and PolyT Repeat Tracts in the Cystic Fibrosis Gene by Melting Curve Analysis of Hybridization Probes. *Clinical Chemistry*. 2005;51(9):1619-1623.
14. Gallati S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations in azoospermic and oligospermic men and their partners. *Reproductive BioMedicine Online*. 2009;19(5):685-694.