

STR-маркеры хромосом, несущих мутации F508del и CFTRdele2,3(21kb) гена *CFTR*

Маркова Е.В., Татару Д.А.

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

Мутация F508del является самой распространенной мутацией гена *CFTR* во всем мире и чаще других исследуется в пренатальной и преимплантационной диагностике муковисцидоза. CFTRdele2,3(21kb) — вторая по частоте мутация в России. Исследование STR-маркеров, сцепленных с геном *CFTR*, в сочетании с анализом мутации может повысить достоверность результата исследования эмбриона или плода, при этом необходимо принимать во внимание особенности гаплотипа мутантных хромосом. В работе проведен анализ STR-маркеров 151 образца ДНК у лиц из 17 семей с МВ и 14 семей без МВ; гаплотипированы 136 нормальных неродственных хромосом, 32 хромосомы с мутацией F508del и 7 хромосом с мутацией CFTRdele2,3(21kb); проанализировано 106 мейозов. Рекомбинаций или мутаций не отмечено. Установлено, что мутантные хромосомы мало полиморфны по внутригенным маркерам. Внегенные STR-маркеры позволяют лучше, чем внутригенные индивидуализировать мутантные хромосомы, в том числе, для выявления контаминации. Частота аллелей микросателлитных полиморфных локусов интронов 1, 6a, 8 и 17b соответствовала распределению для европеоидов. Получены новые данные по уровню гетерозиготности, аллельной структуре нормальных хромосом и хромосом с мутациями F508del и CFTRdele2,3(21kb) для маркеров D7S486, D7S655 и D7S677.

Ключевые слова: *CFTR*, муковисцидоз, F508del, CFTRdele2,3(21kb), STR-маркеры, IVS1, IVS6a, IVS8, IVS17b, D7S486, D7S655, D7S677.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

STR markers of chromosomes carrying F508del and CFTRdele2,3(21kb) mutations of *CFTR* gene

Markova E.V., Tataru D.A.

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

F508del is the major worldwide mutation of the *CFTR* gene and the main indication for prenatal and preimplantation diagnosis of cystic fibrosis (CF). The CFTRdele2,3(21kb) mutation is second frequent for the Russian Federation after F508del. STR markers linked with *CFTR* gene analysis in addition to the mutation detection can increase the accuracy of embryo and fetus evaluation results. Mutant chromosome haplotypes should be taken into account. We analyzed STR markers for 151 DNA samples from 17 CF families and 14 non CF families; haplotyped 136 normal unrelated chromosomes, 32 F508del-chromosomes and 7 CFTRdele2,3(21kb) chromosomes. There was no recombination or mutations for 106 meiosis. Our data revealed that mutant chromosome not enough polymorphic for intragenic markers. Extragenic STR markers allowed to individualize mutant chromosome better for contamination problem detection as well. Allele frequencies for polymorphic microsatellites of introns 1, 6a, 8 and 17b were consistent with Caucasian populations. We got new data for heterozygosity rate and allele structure of normal and F508del- and CFTRdele2,3(21kb)-chromosomes for D7S486, D7S655 and D7S677 markers.

Key words: *CFTR*, Cystic fibrosis, F508del, CFTRdele2,3(21kb), STR markers, IVS1, IVS6, IVS8, IVS17b, D7S486, D7S655, D7S677.

Введение

Муковисцидоз (МВ) — частое, тяжелое наследственное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования. Причиной заболевания служат мутации гена *CFTR* (трансмембранного регулятора муковисцидоза; 7q31.2). В структуре спектра мутаций гена *CFTR* во всем мире преобладает мутация F508del. В европейских популяциях ее частота варьирует от 24,5% в Турции до 88% в Дании [1]. В России частота мутации F508del составляет около 52% от общего числа мутантных аллелей в объединенной выборке больных МВ. Второй по частоте в России является мутация CFTRdele2,3(21kb) — 5,9% [2].

Мутация F508del представляет собой потерю трех нуклеотидов в экзоне 10 и, как следствие, утрату аминокислоты фенилаланина в положении 508 белкового продукта. По современной номенклатуре рекомендованное обозначение мутации p.Phe508del и c.1521_1523delCTT, а экзон 10 обозначается экзоном 11, однако традиционные обозначения пока остаются повсеместно используемыми в научной литературе [2—5]. Мутация CFTRdele2,3(21kb) (c.54-5940_273+10250del21080, p.Ser18Argfs*16) является делецией около 21 тысячи нуклеотидов с потерей экзонов 2 и 3 гена *CFTR* и сдвигом рамки считывания. Обе мутации являются «тяжелыми», поскольку полностью

блокируют функцию кодируемого белка, и в гомозиготном или компаундном состоянии с другой «тяжелой» мутацией служат причиной заболевания.

Для семей высокого риска важнейшим методом профилактики МВ служит дородовая диагностика. Как пренатальная, так и развивающаяся в настоящее время преимплантационная диагностика (ПГД), основаны на прямом анализе мутаций и косвенной диагностике — исследовании полиморфных внутригенных и внегенных маркеров. В локусе гена *CFTR* выявлены полиморфные последовательности, которые могут использоваться в качестве ДНК-маркеров мутантных и нормальных хромосом. Такими маркерами служат однонуклеотидные полиморфизмы — SNP (single nucleotide polymorphisms) или короткие тандемные повторы — STR (*short tandem repeats*), называемые также микросателлитами. Для клинического использования ДНК-маркеров желательно иметь сведения о числе встречающихся аллелей, их частоте, уровне гетерозиготности. Анализ STR-маркеров *CFTR* применяется также для исследования редких случаев МВ, обусловленных однородительской дисомией или крупными делециями локуса.

Внутригенные полиморфные STR-маркеры локализованы преимущественно в интронных областях гена. Наиболее хорошо изученными являются динуклеотидные микросателлитные полиморфизмы интронов 1 (IVS1), 8 (IVS8), 17b (IVS17b), а также тетрануклеотидный микросателлит интрона 6a (IVS6a) (рис. 1). Получены данные о частотах аллелей этих ДНК-маркеров для нормальных и мутантных хромосом, в том числе для российских популяций [6—8]. Реже применяются дополнительные полиморфные маркеры. Так, в некоторых ПГД-исследованиях используется полиморфный локус первого интрона D7S677 [4, 9], который может быть полезен и для других задач гаплотипирования.

В качестве внегенных маркеров для гаплотипирования и пренатальной диагностики часто применяются диаллельные маркеры (XV2c, KM19 и другие), полиморфизм которых ограничен. Для целей ПГД, в связи с необходимостью большего числа полиморфных маркеров, подобран ряд дополнительных внегенных STR-маркеров, среди которых D7S486 и D7S655, фланкирующие ген *CFTR* [4, 9]. Однако их аллельная структура изучена мало.

На основании исследований *CFTR*-сцепленных полиморфных маркеров установлена ассоциация мутантного хромосомом с определенными гаплотипами. Больше исследований посвящено гаплотипу хромосомом с мутацией F508del [1, 6, 7, 8, 10]. Найдены особенности микросателлитного гаплотипа хромосомом, несущих мутацию *CFTR*dele2,3(21kb) [8]. Набор внутригенных или внегенных маркеров, используемых разными авторами для гаплотипирования, варьирует.

На рис. 1 представлены специфические внутригенные микросателлитные гаплотипы хромосомом с мутациями F508del и *CFTR*dele2,3(21kb) по обобщенным данным литературы [8, 10]. Включены микросателлитные маркеры, для которых имеются сведения по обоим гаплотипам.

В пренатальной диагностике использование косвенных маркеров не ограничивается случаями не выявленных мутаций гена, но рекомендовано для выявления возможной материнской контаминации [11]. В отечественных родствах косвенная диагностика МВ рассматривается скорее как альтернатива прямому анализу мутаций в отсутствие идентифицируемых мутаций при наличии больного ребенка [2, 6]. В то же время, контаминация плодного материала материнскими клетками служит одним из основных источников ошибок пренатальной диагностики и применение микросателлитной идентификации образца позволяет обнаруживать такие ошибки [12, 13].

ПГД сопряжена с большими рисками контаминации не только материнским, но и отцовским, а также неродственным материалом. Применение полиморфных маркеров позволяет избежать ошибок, связанных с плохой амплификацией отдельных аллелей в связи с малым количеством образца, а также ошибок, связанных с рекомбинацией.

Косвенная диагностика в дополнение к прямому анализу мутаций рекомендована как стандарт ПГД, в том числе, ПГД МВ [4, 9, 14].

Целью настоящего исследования стал анализ особенностей внутри- и внегенных полиморфных STR-маркеров в хромосомах с мутациями F508del и *CFTR*dele2,3(21kb) и нормальных хромосомах, а также изучение возможностей STR-маркеров для выявления ошибок дородовой диагностики МВ.

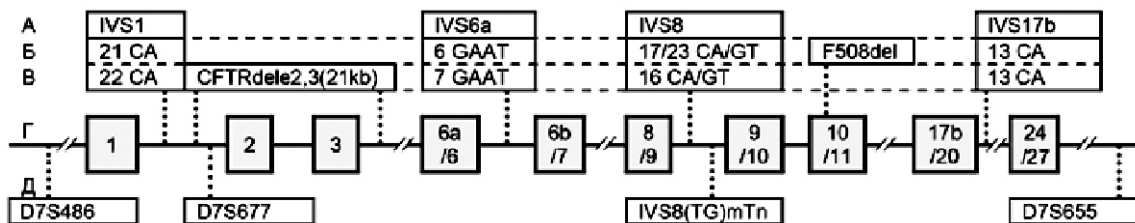


Рис. 1. Схема локализации STR-маркеров, мутаций F508del и *CFTR*dele2,3(21kb) в локусе гена *CFTR*. Расположение внутригенных маркеров (А) относительно экзонов гена *CFTR* (Г); номера экзонов по современной номенклатуре [5] после знака «/». Внутригенные гаплотипы, типичные для хромосомом с мутациями F508del (Б) и *CFTR*dele2,3(21kb) (В) по обобщенным данным литературы [8, 10]. Д: дополнительные STR-маркеры, включенные в настоящее исследование.

Материалы и методы

Для молекулярно-генетического исследования гена *CFTR* использовали геномную ДНК, выделенную из периферической крови, буккального эпителия, в случае пренатальной диагностики — из ворсин хориона и амниотической жидкости с использованием набора «АмплиПрайм ДНК-сорб В» (ранее «ДНК-сорб В»; НекстБио).

В исследование включены образцы ДНК 151 чел. из 32 неродственных ядерных семей, а также 5 больных МВ, гомозиготных по мутациям F508del или CFTRdele2,3(21kb). Состав обследованных членов семьи варьировал от 2 до 8 чел.; 17 семей имели больного ребенка (детей) с МВ (МВ-семьи) и обследовались в Красноярском центре репродуктивной медицины (КЦРМ) с 2004 по 2016 гг. в связи с диагностикой частых мутаций гена *CFTR*, пренатальной диагностикой (5 семей) или ПГД (4 семьи). МВ был обусловлен исключительно мутацией F508del в 9 семьях, только мутацией CFTRdele2,3(21kb) — в 2 семьях. В остальных МВ-семьях заболевание было связано с компаундным состоянием мутации F508del или CFTRdele2,3(21kb) с другой мутацией. Образцы ДНК 14 семей без МВ, обследовавшихся в КЦРМ в связи с другими наследственными заболеваниями, включены в исследование для дополнительного анализа нормальных хромосом (в отношении гена *CFTR*). Переданная от родителя к ребенку хромосома считалась одной и той же хромосомой (в отношении локуса *CFTR*). Хромосомы, несущие мутации отличные от F508del или CFTRdele2,3(21kb), исключались из настоящего анализа. Всего гаплотипированы 174 хромосомы. Большинство обследуемых являлись европеоидами и проживали в разных регионах Сибири. В исследование вошли также образцы из трех якутских семей. Для части семей национальность была неизвестна.

Во всех образцах ДНК, за исключением случаев, когда пациенты обратились с результатами более широкого анализа мутаций из другой лаборатории, проводилось тестирование мутаций гена *CFTR*, которое включало: CFTRdele2,3(21kb), F508del, I507del, 1677delTA, 2143delT, 2184insA, 394delTT, W1282X, N1303K, R117H, L138ins, G542X, G551D, R553X, R347P, R334W. Наличие мутаций F508del и CFTRdele2,3(21kb), выявленное в других лабораториях, было нами проверено. К нормальным хромосомам относили те, в которых не было выявлено частых мутаций МВ и которые не принадлежали больным с МВ.

Исследование STR-маркеров и мутаций проводили методом ПЦР с флуоресцентно-мечеными праймерами с детекцией методом фрагментного анализа. Мутацию F508del анализировали по методу F.G. de Araujo с соавт. (2005) [15], CFTRdele2,3(21kb) — по методу Т.Э. Ивашенко и В.С. Баранова (2002) [6]. Нашей модификацией методов анализа мутаций служило флуоресцентное мечение одного из праймеров для детекции методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе. Мутацию CFTRdele2,3(21kb) амплифицировали в мультиплексе с мутацией 394delTT для контроля амплификации, а так-

же гетеро- или гомозиготного состояния мутации. Для носителей мутации F508del проводили дополнительный гетеродуплексный анализ. Для анализа локусов D7S486 и D7S677 использовали последовательности праймеров из молекулярной базы «UniSTS» (UniSTS 1556 и 18390), которая в настоящее время не поддерживается. Для остальных STR-маркеров дизайн праймеров осуществляли самостоятельно. Поли-Т и TG-полиморфизм интрона 8 (9) — IVS8 (TG)mTn — исследовали также методом ПЦР и фрагментного анализа по ранее описанной схеме [16]. ПЦР проводили в объеме 20 мкл. Состав реакции включал 0,13 мМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 2 мМ MgCl₂, 6,6% ДМСО (диметилсульфоксида), SE-буфер для Hot Start Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим). На реакцию использовали по 1 пмоль каждого праймера, 1 ед. Hot Start Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим) и 1 мкл ДНК. ПЦР осуществляли на термоциклере «DNA Engine Dyad» (Bio-Rad Laboratories).

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) на полимере POP6 или POP7, соответственно, с размерным стандартом ROX350 (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific).

Во всех сериях применяли положительный и отрицательный контроли. В качестве контрольных образцов при фрагментном анализе STR-маркеров применяли ПЦР-фрагменты данного локуса с разными аллелями, таким образом, выравнивая фрагменты друг относительно друга. В рамках настоящего исследования все образцы были обследованы на все маркеры, независимо от объема первоначального обследования. Аллели STR-маркеров выражали в размерах амплифицируемых фрагментов (п.н.). Аллелям STR-маркеров интронов 1, 6a, 8 и 17b присваивали номера аллелей на основании данных литературы [8].

Для оценки статистической значимости различий использовали критерий χ^2 , в ряде случаев с поправкой Йетса ($5 \leq N < 10$) или критерий Фишера ($N < 5$). Расчеты частот аллелей проводили для неродственных хромосом, частот генотипов — для неродственных лиц.

Результаты

В ходе проведенного исследования гаплотипированы 174 неродственные хромосомы: 136 нормальных, 31 хромосома, несущая мутацию F508del и 7 хромосом с мутацией CFTRdele2,3(21kb). В семейный анализ были включены не только родители с детьми, но и сибсы, дедушки и бабушки. Это позволило максимально гаплотипировать хромосомы практически по всем локусам. Единичные не гаплотипированные аллели остались для случаев одинаковой гетерозиготности всех родственников. Для локуса IVS8(TG)mTn в таких случаях мы смогли применить наш способ молекулярного гаплотипирования [16]. Для 54/174

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

хромосом (31,0%) проанализированы две мейотические копии, для 20/174 (11,5%) — три и для 4/174 (2,3%) — четыре. В целом, исследовано 106 мейозов. Нарушений сцепления вследствие рекомбинации или мутаций для изученных STR-маркеров не было зафиксировано. При обследовании семей без МВ на носительство мутаций,

в одной из четырнадцати семей обнаружена хромосома с мутацией F508del, (бабушка, мать, ребенок), которая была включена в состав F508del-несущих хромосом.

Частоты аллелей исследованных внутригенных и внегенных STR-маркеров, сцепленных с геном CFTR, представлены в табл. 1.

Таблица 1

Частота аллелей внутригенных и внегенных STR-маркеров гена CFTR среди нормальных хромосом, и хромосом с мутациями F508del и CFTRdele2,3(21kb)

STR-маркер	Аллели, обозначение (bp)		Хромосомы						
			Нормальные (1)		F508del (2)		del21kb** (3)		
			N	%	N	%	N	%	
1	2		3	4	5	6	7	8	
Внутригенные маркеры									
IVS1 (CA) _n	18	(228)	3	2,2					
	19	(230)	1	0,7					
	20	(232)	3	2,2					
	21	(234)	31	23,1		31	100,0		
	22	(236)	55	41,0				7	100,0
	23	(238)	16	11,9					
	24	(240)	12	9,0					
	25	(242)	5	3,7					
	26	(244)	8	6,0					
Всего			134		31	*1, 3	7	*2	
D7S677		del	0					7	100,0
		(275)	1	0,7					
		(279)	63	46,3					
		(281)	10	7,4					
		(283)	4	2,9		1	3,2		
		(285)	22	16,2		29	93,6		
		(287)	4	2,9		1	3,2		
		(289)	14	10,3					
		(291)	12	8,8					
	(293)	6	4,4						
Всего			136		31	*1, 3	7	*1, 2	
IVS6a (GATT) _n	6	(203)	26	19,1		31	100,0		
	7	(207)	110	80,9				7	100,0
	Всего			136			31	*1, 3	7
IVS8 (GT) _n	14	(157)	2	1,5					
	15	(159)	4	3,0					
	16	(161)	81	60,9				7	100,0
	17	(163)	35	26,3		18	60,0		
	21	(171)	1	0,8					
	22	(173)	1	0,8					
	23	(175)	9	6,8		11	36,7		
	24	(177)	0	0		1	3,3		
Всего			133		30	*1, 3	7	*2	

Таблица 1 (продолжение)

1	2		3	4	5	6	7	8	
IVS8 (TG)n- polyT	5T-11TG		6	4,5					
	5T-12TG		1	0,7					
	7T-10TG		29	21,6	■				
	7T-11TG		63	47,0	■		7	100,0	
	7T-12TG		23	17,2	■				
	7T-13TG		1	0,7					
	9T-10TG		10	7,5	■	31	100,0		
	9T-11TG		1	0,7					
	Всего			134			31	*1, 3	7
IVS17b (CA)n	11	(147)	8	5,9					
	13	(151)	87	64,4	■	29	96,7	5	71,4
	14	(153)	2	1,5					
	16	(157)	1	0,7					
	17	(159)	33	24,4	■	1	3,3	2	28,6
	18	(161)	2	1,5					
	19	(163)	1	0,7					
	20	(169)	1	0,7					
	Всего			135			30	*3	7
Внегенные маркеры									
D7S486		(133)	1	0,8					
		(135)	26	19,5	■	1	3,2		
		(136)	1	0,8					
		(137)	11	8,3	■				
		(139)	15	11,3	■	2	6,5	1	14,3
		(140)	3	2,3		3	9,7		
		(141)	2	1,5		2	6,5	1	14,3
		(142)	37	27,8	■	11	35,5	1	14,3
		(143)	5	3,8	■	2	6,5	3	42,9
		(144)	11	8,3	■	1	3,2		
		(146)	11	8,3	■	8	25,8	1	14,3
		(148)	7	5,3	■	1	3,2		
		(149)	1	0,8					
		(150)	2	1,5					
	Всего			133			31	*1	7
D7S655		(155)	1	0,7					
		(159)	74	54,8	■	19	61,3	1	14,3
		(161)	2	1,5		1	3,2		
		(163)	1	0,7					
		(167)	1	0,7					
		(169)	12	8,9	■	3	9,7	6	85,7
		(173)	14	10,4	■	2	6,5		
		(175)	5	3,7		1	3,2		
		(177)	24	17,8	■	4	12,9		
	(181)	1	0,7		1	3,2			
Всего			135			31	*3	7	*1, 2

Примечание. * достоверные различий между группами хромосом; ** del21kb = CFTRdele2,3(21kb).

При исследовании локуса полиморфных динуклеотидных CA-повторов интрона 1 — IVS1(CA)_n, нами обнаружено 9 аллелей. Среди нормальных хромосом наиболее частым был аллель 22, частота которого составила 41,0%. Во всех хромосомах с мутацией F508del нами обнаружен исключительно аллель 21, являющийся вторым по частоте среди нормальных хромосом. Выборка F508del-хромосом отличалась от нормальных по распределению частот аллелей IVS1(CA)_n достоверно ($p < 0,001$). Для всех хромосом, несущих мутацию CFTRdele2,3(21kb) был характерен аллель 22; различие в распределении аллелей с нормальными хромосомами не было достоверным.

Для динуклеотидного GT-полиморфизма D7S677 интрона 1 нами выявлено 10 аллелей, включая «нулевой». Мы предположили вовлечение этого локуса в область делеции 21 т.п.н. Действительно, в случаях гомозигот по мутации CFTRdele2,3(21kb) мы фиксировали отсутствие фрагмента, а все гетерозиготы были гемизиготными по локусу D7S677. Среди исследованных нами нормальных хромосом, самый частый аллель 279 составил 46,3%; вторым по частоте был аллель 285 — 16,2%. С частотой более 5% выявлены еще три аллеля: 289 (10,3%), 291 (8,8%) и 281 (7,4%). Единственный аллель 275 обнаружен в европеоидной семье (дед, отец, сын) из г. Новосибирска. В хромосомах с мутацией F508del выявлен, преимущественно, аллель 285: 29/31 хромосом, что составило 93,6%. По одной хромосоме в этой группе найдены с аллелем 283 и 287 (по 3,2% соответственно). Различие в частотах аллелей D7S677 между нормальными и хромосомами с мутацией F508del достоверным ($p < 0,001$). Для хромосом с мутацией CFTRdele2,3(21kb) была характерна делеция локуса D7S677, что достоверно отличало их от нормальных ($p < 0,001$) и F508del-несущих хромосом ($p < 0,001$).

В локусе тетра nukлеотидного GATT-полиморфизма интрона 6 — IVS6a(GATT)_n выявлены два аллеля. Среди нормальных хромосом аллель 7 преобладал с частотой 80,9%. Частота аллеля 6 составила остальные 19,1%. Все исследованные нами хромосомы с мутацией F508del содержали аллель 6, что достоверно отличалось от распределения аллелей в нормальных хромосомах ($p < 0,001$) и хромосомах с мутацией CFTRdele2,3(21kb) ($p < 0,001$). Во всех хромосомах с мутацией CFTRdele2,3(21kb) присутствовал аллель 7; различие с нормальными хромосомами по частотам аллелей IVS6a(GATT)_n не было достоверным.

В наше исследование были включены два полиморфных локуса интрона 8 (9): первый блок GT/CA-повторов — IVS8(GT)_n и второй блок — (TG)_mT_n, состоящий из TG-повторов и последующего поли-T-полиморфизма на границе с экзоном 9 (10). Полученные нами данные свидетельствуют о преобладании аллелей 16 и 17 в локусе IVS8(GT)_n среди нормальных хромосом с частотой 60,9 и 26,3% соответственно. Третьим по частоте был аллель 23 с частотой 6,8%. Остальные аллели были

редкими. Исследованные нами мутантные хромосомы, содержащие мутацию F508del, различались по аллелям IVS8(GT)_n: в 60,0% найден аллель 17, в 36,7% — аллель 23. В одной F508del-хромосоме, принадлежащей ребенку с МВ, обнаружен материнский аллель 24, не встреченный нами в нормальных хромосомах. Распределение аллелей IVS8(GT)_n в хромосомах с мутацией F508del имело достоверное отличие от нормальных хромосом ($p < 0,001$) и хромосом с мутацией CFTRdele2,3(21kb) ($p < 0,001$). Во всех хромосомах с мутацией CFTRdele2,3(21kb) найден аллель 16, и такие мутантные хромосомы достоверно не отличались от нормальных хромосом по распределению аллелей IVS8(GT)_n.

Результаты исследования полиморфизма (TG)_mT_n IVS8 в нормальных хромосомах демонстрируют преобладание аллельного варианта 7T-11TG — 47,0%. Следующими по распространенности были 7T-10TG — 21,6% и 7T-12TG — 17,2%. Аллель 9T представлен, преимущественно, в комбинации с аллелем 10TG, а 5T — с 11TG. Во всех хромосомах с мутацией F508del найден исключительно аллельный вариант 9T-10TG, что достоверно отличалось от распределения аллелей в нормальных хромосомах ($p < 0,001$) и хромосомах с CFTRdele2,3(21kb) ($p < 0,001$). Все хромосомы с мутацией CFTRdele2,3(21kb) содержали вариант 7T-11TG, и достоверно не отличались от нормальных хромосом.

В интроне 17b (20) имеются два типа динуклеотидных повторов: TA и CA. Нами был исследован локус CA-повторов — IVS17b(CA)_n; в нем было обнаружено 8 аллелей. По частоте преобладали два аллеля: 13 — 64,4% и 17 — 24,4%. В 5,9% хромосом найден аллель 11, остальные минорные аллели выявлены в 1–2 случаях. Хромосомы с мутацией F508del несли аллель 13 в 29 случаях (96,7%). Одна хромосома (дед, отец, ребенок с МВ) содержала аллель 17 (3,3%). Отличие хромосом с мутацией F508del от нормальных по IVS17b(CA)_n не достигало порога достоверности. Изученные нами хромосомы с мутацией CFTRdele2,3(21kb), несли аллель 13 в 5/7 случаях (71,4%) и аллель 17 — в 2/7 (28,6%), что также не различалось достоверно с распределением аллелей IVS17b(CA)_n в нормальных хромосомах. Между собой группы с разными мутациями различались достоверно ($p < 0,05$).

В ходе анализа внегенного CA/GT-микросателлита D7S486 (табл. 1) мы обнаружили необычную изменчивость данного локуса. Выявлено 14 аллелей с разницей в 1 или 2 п.н. При сочетании в генотипе «четных» и «нечетных» аллелей форма пиков была хуже, чем в случае сочетания только «четных» или только «нечетных», особенно, при комбинации аллелей с разницей в 1 п.н. Генотипирование данного локуса потребовало больше всего повторностей. Гетерозиготные генотипы с разницей фрагментов в 1 п.н. необходимо интерпретировать с осторожностью. В двух семьях мы первоначально предполагали мутацию на 1 п.н. Однако проверочные повторные исследования показали, что имеет место изменение формы пика и сцепление не нарушается.

Среди нормальных хромосом в локусе D7S486 наиболее часто встречались два аллеля 142 (27,8%) и 135 (19,5%). С частотой 11,3% выявлен аллель 139, по 8,3% — аллели 137, 144, и 146. Три и более хромосомы найдены с аллелями 148 (5,3%), 143 (3,8%) и 140 (2,3%). Остальные аллели обнаружены в 1—2 случаях. Хромосомы, несущие мутацию F508del были достаточно полиморфны по данному маркеру. Среди них выявлено 9 аллелей. Распределение частот аллелей D7S486 среди хромосом с мутацией F508del было иным, чем среди нормальных хромосом ($p < 0,01$). Самым частым аллелем среди хромосом, несущих мутацию F508del, как и для нормальных хромосом был аллель 142 (35,5%), вторым по частоте — аллель 146 — 25,8%, который в норме составляет только 8,3%. Аллель 135, являющийся вторым по частоте для нормальных хромосом, зафиксирован только в одной F508del-хромосоме (3,2%).

Хромосомы, несущие мутацию CFTRdele2,3(21kb), также обнаружили полиморфизм локуса D7S486: для 7 хромосом обнаружено пять аллелей. Распределение аллелей D7S486 в хромосомах с мутацией CFTRdele2,3(21kb) имело достоверное различие с нормальными хромосомами ($p < 0,001$). Аллель 143 был характерен для трех хромосом с мутацией CFTRdele2,3(21kb), что составило 42,9%, в то время как для нормальных хромосом такой аллель найден только в 3,8%, а для F508del-хромосом — в 6,5%. Отличие F508del-хромосом от CFTRdele2,3(21kb)-хромосом не достигло статистической значимости.

При исследовании внегенного CA/GT-маркера D7S655 мы обнаружили 10 аллелей. В нормальных хромосомах по частоте доминировал аллель 159 — 54,8%.

Более 10 случаев обнаружено для аллелей 177 (17,8%), 173 (10,4%) и 169 (8,9%). Аллель 175 выявлен в 5 хромосомах (3,7%), остальные аллели найдены в единичных случаях. Хромосомы с мутацией F508del проявили широкий полиморфизм в локусе D7S655, однако распределение частот аллелей было сходным с нормальными хромосомами (различие не достоверно). Самыми частыми среди F508del-хромосом, как и в нормальных хромосомах, были аллели 159 и 177 (61,3 и 12,9%). Хромосомы с мутацией CFTRdele2,3(21kb) содержали аллель 169 в 6/7 случаев, что составило 85,7%, в то время как в нормальных хромосомах и F508del-хромосомах аллель 169 встретился только в 8,9 и 9,7% соответственно. Такое распределение аллелей D7S655 достоверно отличало хромосомы с мутацией CFTRdele2,3(21kb) от нормальных ($p < 0,001$) и F508del-несущих хромосом ($p < 0,01$).

Для всех исследованных STR-маркеров был рассчитан уровень гетерозиготности на основании числа гомозиготных неродственных лиц (табл. 2). Расчеты гетерозиготности производили для группы генотипов носителей мутации F508del или CFTRdele2,3(21kb), которую составили, преимущественно, родители больных МВ детей ($N = 24$); группы генотипов без мутаций ($N = 35$) и группы гомозигот по мутации F508del или CFTRdele2,3(21kb), которую составили больные МВ ($N = 15$).

Представленные в табл. 2 данные демонстрируют достаточно высокий уровень гетерозиготности по исследованным маркерам для лиц с нормальными хромосомами и гетерозигот по мутации. Максимальное значение гетерозиготности получено для внегенного маркера D7S486: 95,8% для носителей и 82,9% для нормы. Следующими

Таблица 2

Число аллелей и уровень гетерозиготности (%) для внутригенных и внегенных STR-маркеров в образцах с разным генотипом в отношении мутаций F508del и CFTRdele2,3(21kb)

STR-маркер	Число аллелей	Генотип по мутации		
		Норма (1), N = 35	Носители (2), N = 24	Гомозиготы (3), N = 15
Внутригенные маркеры				
IVS1(CA)n	9	77,1	75,03	0,0 ^{1,2}
D7S677	10	68,6	79,23	13,3 ^{1,2}
IVS6(GATT)n	2	28,6	66,71,3	0,0 ^{1,2}
IVS8(GT)n	8	51,4	79,23	40,02
IVS8(TG)m	4	57,1	41,73	0,0 ^{1,2}
IVS8 Tn	3	25,7	75,01,3	0,0 ^{1,2}
IVS17b(CA)n	8	42,9	29,2	13,3 ¹
Среднее		50,2	63,73	9,5 ^{1,2,*}
Внегенные маркеры				
D7S486	14	82,9	95,83	60,0 ²
D7S655	10	65,7	70,8	60,0
Среднее		74,3	83,3	60,0*

Примечание. Обозначения достоверных различий в таблице: ¹ — с группой «Норма», ² — с группой «Носители», ³ — с группой «Гомозиготы», * — между внутригенными и внегенными STR-маркерами внутри группы.

по уровню гетерозиготности были микросателлиты интрона 1: IVS1(CA)_n (75,0 и 77,1%) и D7S677 (79,2 и 68,6%). Значения гетерозиготности по некоторым STR-маркерам для носителей были выше, чем для нормальных хромосом. Однако достоверной такой закономерность была только для маркеров IVS6a(GATT)_n ($p < 0,01$) и поли-T-полиморфизма IVS8 ($p < 0,001$).

Гомозиготы по мутации F508del или CFTRdele2,3(21kb) демонстрируют высокий уровень сходства — конкордантности — мутантных хромосом практически по всем исследованным STR-маркерам. Конкордантность для мутантных хромосом по внутригенным маркерам составила в среднем 90,5%, а по четырем маркерам — 100%. Отличие мутантных гомозигот от нормальных хромосом и носителей по уровню гетерозиготности было достоверным практически по всем исследованным локусам, а также среднему значению гетерозиготности для всех изученных внутригенных маркеров ($p < 0,01$). Среди изученных внутригенных маркеров гетерозиготность выявлена для IVS8(GT)_n — 40% и, в меньшей степени, для IVS17b(CA)_n и D7S677 (по 13,3%).

По внегенным маркерам D7S486 и D7S655 частота гетерозиготности для гомозигот по мутации F508del или CFTRdele2,3(21kb) составила по 60,0%. Показатель гетерозиготности по локусу D7S486 для гомозигот по мутации был достоверно ниже, чем у носителей ($p < 0,01$).

Сравнение внутригенных и внегенных маркеров демонстрирует, что в группе гомозигот по мутации внутригенные маркеры достоверно отличались от внегенных по среднему значению гетерозиготности: 9,5% против 60,0% ($p < 0,01$).

Нами были проанализированы гаплотипы нормальных и мутантных хромосом. Наиболее частые — типичные — гаплотипы мутантных хромосом по внутригенным маркерам соответствовали данным, отраженным на рис. 1. Представленные на рис. 1 внутригенные гаплотипы могут быть дополнены специфическими аллелями локусов D7S677 и IVS8(TG)mTn.

Специфичный для хромосом с мутацией F508del гаплотип в локусе D7S677, содержал аллель 285, а в локусе IVS8(TG)mTn — 9T-10TG и был характерен для 27 из 30 хромосом (90,0%). В нормальных хромосомах F508del-типичный гаплотип с учетом всех изученных внутригенных локусов найден в 6/138 хромосом, что составило 4,3%. Все эти хромосомы принадлежали европеоидам, проживающим в Красноярском крае. При этом в локусе IVS8(GT)_n во всех нормальных хромосомах с F508del-специфичным гаплотипом был аллель 23, в то время как в мутантных хромосомах он составлял только 40%.

Типичный CFTRdele2,3(21kb)-гаплотип включал аллельный вариант 7T-11TG в локусе IVS8(TG)mTn и был характерен для всех исследованных CFTRdele2,3(21kb)-хромосом (100%). В нормальных хромосомах такой гаплотип найден в 28/138 хромосом — 20,3%. В локусе D7S677 нормальные хромосомы с CFTRdele2,3(21kb)-типичным гаплотипом содержали

аллель 279. В нашем исследовании обнаружено специфическое сцепление мутации CFTRdele2,3(21kb) с аллелем 169 внегенного локуса D7S655. Поэтому мы проанализировали число CFTRdele2,3(21kb)-типичных гаплотипов, содержащих аллель 169 локуса D7S655. Среди нормальных хромосом найдено две с таким гаплотипом, что составило 1,4% (обе принадлежали европеоидным семьям из г. Красноярска и г. Улан-Удэ).

Высокая степень сходства между мутантными хромосомами, обусловленная их принадлежностью к одному гаплотипу, имеет важное значение для дородовой диагностики. В табл. 3 представлены примеры двух случаев пренатальной диагностики МВ. В клинических случаях было использовано разное число STR-маркеров, но в ходе настоящего исследования были протестированы все локусы.

В первой семье генотип ребенка с МВ (F508del/F508del) демонстрирует гомозиготное состояние не только по мутации, но и по всем изученным внутригенным маркерам. Отцовская и материнская мутантные хромосомы (11.1 и 11.2) содержали типичный F508del-гаплотип по внутригенным маркерам. В образце плода выявлен гетерозиготный статус по мутации. Различить материнское или отцовское происхождение мутантной хромосомы по внутригенным маркерам было невозможно. Нормальная хромосома (11.4) унаследована от матери, о чем свидетельствуют внутригенные маркеры интронов 1, 8 (GT)_n и 17b. Если принять во внимание только внутригенные маркеры, результат тестирования плода может являться результатом контаминации гомозиготного по мутации плода (11.1/11.2) биоматериалом матери (11.2/11.4) и, соответственно, ошибочного заключения о гетерозиготном статусе плода. Внегенные маркеры D7S486 и D7S655 для данной семьи информативны не только в отношении мутации, но и показывают, что мутантная хромосома (11.1) именно отцовского происхождения.

Во второй семье МВ ребенка связан с гомозиготным генотипом по мутации CFTRdele2,3(21kb). Отцовская и материнская мутантные хромосомы (36.1 и 36.2) имеют типичный внутригенный гаплотип, характерный для CFTRdele2,3(21kb)-содержащих хромосом. По большинству внутригенных маркеров, этот гаплотип не только не позволяет различить материнское и отцовское происхождение мутантных хромосом, но и не дает возможности отличить мутантную хромосому от нормальной, иначе говоря, предопределяет неинформативность. В образце плода-носителя делеции только два внутригенных маркера позволяют судить о наличии нормальной хромосомы — D7S677 и IVS1(CA)_n. При этом IVS1(CA)_n свидетельствует об отцовском происхождении нормальной хромосомы (аллель 23). Внегенные маркеры вносят дополнительную информацию, подтверждающую наличие нормальной отцовской (аллель 159 в локусе D7S655) и мутантной материнской хромосомы (аллель 142 в локусе D7S486).

Обсуждение

В результате проведенного нами исследования проанализированы частоты аллелей полиморфных внутригенных и внегенных STR-маркеров гена *CFTR* нормальных и мутантных хромосом. Полученные нами частоты внутригенных маркеров для нормальных и мутантных хромосом сопоставимы с данными, полученными другими отечественными авторами по основному набору внутригенных маркеров [6, 7, 8].

Нормальные хромосомы, изученные в настоящем исследовании, были достаточно полиморфны по всем исследованным внутри- и внегенным маркерам. В нормальных хромосомах частота гетерозиготности по STR-маркерам варьировала от 25,7% (IVS8Tn) до 82,9%

(D7S486). Следует отметить, что использование термина «нормальные хромосомы» предполагает определенное допущение, поскольку, несмотря на отсутствие частых мутаций и принадлежность лицам без клинических признаков МВ, носительство в какой-либо хромосоме редкой мутации в семьях без МВ нельзя исключить. Тем не менее, эти хромосомы были альтернативны хромосомам, несущим мутации F508del и CFTRdele2,3(21kb).

Наши данные по частотам аллелей IVS1(CA)n, IVS8(GT)n, IVS6a(GATT)n и IVS17b(CA)n в нормальных хромосомах достаточно хорошо совпали с данными Н.В. Петровой (2006) для населения европейской части России [8], несмотря на меньший объем нашей выборки. Также мы сравнивали полученные нами частоты ал-

Таблица 3

Исследование STR-маркеров в дополнение к анализу мутаций в пренатальной диагностике МВ: семья с мутацией F508del (А) и семья с мутацией CFTRdele2,3(21kb) (В; мутация сокращения обозначена del21kb) с указанием кодов образцов ДНК и хромосом

А	Отец P5239		Мать P5240		Ребенок с МВ P5241		Плод P5242	
	11.1	11.3	11.2	11.4	11.1	11.2	11.1	11.4
D7S486	(146)	(144)	(142)	(135)	(146)	(142)	(146)	(135)
IVS1(CA)n	21	22	21	24	21	21	21	24
D7S677	(285)	(279)	(285)	(283)	(285)	(285)	(285)	(283)
IVS6a(GAAT)n	6	7	6	7	6	6	6	7
IVS8(GT)n	17	16	17	17	17	17	17	17
IVS8(TG)n	10	11	10	11	10	10	10	11
IVS8 Tn	9	7	9	7	9	9	9	7
Мутация F508del	m	N	m	N	m	m	m	N
IVS17b(CA)n	13	13	13	17	13	13	13	17
D7S655	(159)	(169)	(169)	(177)	(159)	(169)	(159)	(177)

В	Отец P9731		Мать P9732		Ребенок с МВ P9733		Плод P9734	
	36.1	36.3	36.2	36.4	36.1	36.2	36.3	36.2
D7S486	(139)	(142)	(142)	(142)	(139)	(142)	(142)	(142)
IVS1(CA)n	22	23	22	22	22	22	23	22
D7S677	del*	(279)	del*	(279)	del	del	(279)	del*
Мутация del21kb	m	N	m	N	m	m	N	m
IVS6a(GAAT)n	7	7	7	7	7	7	7	7
IVS8(GT)n	16	16	16	16	16	16	16	16
IVS8(TG)n	11	11	11	11	11	11	11	11
IVS8 Tn	7	7	7	7	7	7	7	7
IVS17b(CA)n	13	13	13	17	13	13	13	13
D7S655	(169)	(159)	(169)	(161)	(169)	(169)	(159)	(169)

Примечание. Серой заливкой отмечены внегенные маркеры; внутригенные — без заливки. Аллели мутантных хромосом обозначены красным цветом. Аллели, не позволяющие различить мутантную и нормальную хромосомы в генотипе, обозначены синим цветом. Аллели, позволяющие четко идентифицировать материнское или отцовское происхождение хромосомы, обозначены жирным шрифтом. * — делеция аллеля в мутантной хромосоме известна по генотипу ребенка. Аллели, представленные в размерах фрагментов (bp) обозначены в скобках.

лелей для локусов IVS1(CA)_n, IVS8(GT)_n и IVS17b(CA)_n с соответствующими данными, представленными в базе данных ALFRED (The ALlele FREquency Database) [17] и нашли соответствие европейским популяциям. В сравнении с исследованиями, выполненными на больших выборках, нами не обнаружены лишь редкие аллели. Так, для полиморфизма IVS1(CA)_n по данным Н.В. Петровой (2006) выявлено 11 аллелей, из которых аллели 17 и 27 найдены по одному разу среди 412 нормальных хромосом (0,2%) [8]. Согласно базе данных ALFRED в локусе IVS1(CA)_n представлено 17 аллелей. В то же время, присутствующие в базе данных ALFRED сведения о русских хромосомах несколько отличаются как от наших данных, так и от данных Н.В. Петровой (2006): частота аллеля 22 для российской популяции была меньше, чем частота аллеля 21 (27,3% и 34,1%).

В нашем исследовании использовано обозначение для одного из полиморфных локусов интрона 8, отличающееся от других авторов. Микросателлит IVS8 (GT)_n чаще обозначается как IVS8CA или IVS8CA/GT. Мы использовали обозначение GT в соответствии с последовательностью цепи ДНК, несущей дальнейший локус (TG)_mT_n. Полученное нами распределение частот IVS8(GT)_n в нормальных и мутантных хромосомах локуса согласуется с данными литературы по IVS8CA. Так, по данным Н.В. Петровой (2006) частота аллеля 16 IVS8CA среди нормальных хромосом составила 60,4%, 17 — 29,7%, 23 — 5,4% [8] (у нас: 60,9%, 26,3% и 6,8%).

Можно отметить некоторые особенности частот внутригенных микросателлитов в нашей выборке нормальных хромосом, в сравнении с литературными данными. Самый распространенный среди европеоидов аллель 22CA IVS1 встречался, по нашим данным, несколько чаще — 41,0%, чем по данным Н.В. Петровой (2006) — 36,9%. Вероятно, вошедшие в состав нашей выборки якутские хромосомы (15/138) внесли свой вклад в повышение частоты аллеля 22, которая составила 60%. В этой группе хромосом также можно отметить повышенную частоту аллельного варианта 7T-12TG интрона 8 — 33,3% и отсутствие 9T-аллелей. Тем не менее, по распределению полиморфизма (TG)_mT_n интрона 8 выборка нормальных хромосом в нашем настоящем исследовании (N = 136) достоверно не отличалась от изученной нами большей выборки в предыдущем исследовании (N = 584; p>0,05) [16]. С другой стороны, в клинической лабораторной практике данные о национальности пациентов не всегда доступны. Поэтому, несмотря на знания о популяционных особенностях распределения аллелей различных локусов STR гена *CFTR*, приходится ориентироваться, преимущественно, на усредненные частоты.

В отношении изученных нами STR-маркеров D7S677, D7S486 и D7S655 нам не удалось найти сведений о популяционных частотах аллелей в отечественной и зарубежной литературе. Полагаем, что полученные нами частоты этих STR-маркеров для нормальных и му-

тантных хромосом, являются новыми. По полиморфности и уровню гетерозиготности локусы D7S677 и D7S655 сопоставимы с хорошо изученным маркером IVS1(CA)_n. Локус D7S486 представляется наиболее полиморфным из всех *CFTR*-сцепленных локусов. Мы нашли 14 аллелей в данном локусе. Среди гетерозиготных носителей изученных мутаций единственный образец был гомозиготен по D7S486, таким образом, уровень гетерозиготности составил 95,8%. Необычная изменчивость этого дикуклеотидного микросателлита требует отдельного исследования. Возможно, на размер фрагмента могут влиять прилегающие к CA-повторам мини-участки TA- и поли-T-повторов. В объеме изученной выборки (106 мейозов) оба фланкирующих ген *CFTR* маркера D7S486 и D7S655 сегрегировали также как внутригенные, не нарушая сцепления. Несмотря на то, что рекомбинация для них относительно более вероятна, чем для внутригенных, наш опыт свидетельствует об их эффективном использовании для гаплотипирования. Более того, эти внегенные маркеры демонстрируют преимущество в сравнении с внутригенными в плане индивидуализации F508del- и CFTRdele2,3(21kb)-хромосом.

Изученные нами мутантные хромосомы имели F508del- и CFTRdele2,3(21kb)-специфичные гаплотипы, которые в области внутригенных маркеров также сопоставимы с результатами гаплотипирования таких хромосом, полученными другими авторами (рис. 1). В исследованиях с большим объемом выборки обнаружено больше редких аллельных вариантов отдельных STR-локусов в мутантных хромосомах [6, 8].

Полученные к настоящему времени в мире и в России важные знания об особенностях гаплотипа MB-хромосом, по нашему мнению, не в полной мере используются в клинической лабораторной практике диагностики MB. Набор аллелей хромосом с мутациями F508del и CFTRdele2,3(21kb) предсказуем вследствие сходства гаплотипа всех F508del-несущих и CFTRdele2,3(21kb)-хромосом в мире. Нами изучена относительно небольшая выборка неродственных мутантных F508del-хромосом (N = 32), однако эти хромосомы поступили к нам в разное время в течение 12 лет, начиная с первых молекулярно-генетических исследований MB в нашем крае [18]. Все эти хромосомы, включая последнюю, обнаруженную нами среди контрольных семей без MB в ходе настоящего исследования, были похожи между собой по аллелям STR-маркеров и отличались от нормальных хромосом. Еще меньшей выборка была для хромосом с мутацией CFTRdele2,3(21kb) (N = 7), однако с учетом популяционной частоты данной мутации, мы сочли эту выборку ценной и включили в исследование. Хромосомы, несущие мутацию CFTRdele2,3(21kb) также были похожи между собой и, по своему гаплотипу, составили альтернативу F508del-хромосомам.

Хромосомы с мутацией F508del, вошедшие в состав нашего исследования, были достаточно конкордантны по внутригенным STR-маркерам, что демонстрирует

низкий уровень гетерозиготности. Локусы IVS1(CA)_n и IVS6a(GATT)_n содержали аллели, которые по частоте были на втором месте среди нормальных хромосом. Полиморфные локусы интрона 8 хромосом с мутацией F508del имели разные особенности, несмотря на то, что они сцеплены друг с другом теснее, чем с мутацией F508del. В локусе IVS8 (GT)_n мутантные F508del-хромосомы существенно различались: аллели 17 и 23 составили по 60,0 и 36,7% соответственно, что сопоставимо с данными литературы [6]. Аллель 9T-10TG был консервативен для всех хромосом с мутацией F508del. Сцепление мутации F508del с аллелем 9T, наблюдаемое в настоящем исследовании, обнаружено и другими авторами [6]. STR-маркер IVS17b(CA)_n, в отличие от остальных маркеров, похож у F508del- и нормальных хромосом преобладанием аллеля 13. По внутригенным маркерам хромосомы, несущие мутацию F508del хорошо отличаются от нормальных, но плохо различимы между собой. Полиморфизм хромосом, несущих мутацию F508del, наблюдался, главным образом, только по IVS8(GT)_n (40,0% хромосом) и, дополнительно, по D7S677 и IVS17b(CA)_n (3–6% хромосом).

Мутация F508del фактически ассоциирована с одним маркерным гаплотипом и внутригенный полиморфизм мутантных хромосом, очевидно, возник уже после возникновения мутации [1]. Предполагается, что механизм образования разного числа tandemных повторов в области наиболее полиморфного внутригенного локуса IVS8(GT)_n обусловлен «проскальзыванием» ДНК-полимеразы в ходе репликации [19].

Распространенность F508del-специфичного гаплотипа (по разному набору полиморфных маркеров) изучалась рядом авторов. В работе E. Mateu с соавт. (2002) указывается на его редкость для европейских популяций, например, 1,6% среди финнов [10]. В нашей выборке нормальных хромосом частота F508del-специфичного гаплотипа составила 4,3%. Предполагается, что источником всех хромосом, несущих мутацию F508del, является единственная хромосома, в которой возникла мутация. Возраст мутации противоречив — от 3 тыс. до 40 тыс. лет [1, 10]. Несмотря на более высокую частоту мутации F508del в Европе, обсуждается ее не европейское происхождение. Предполагается, что «колыбелью» мутантной хромосомы является Ближний Восток, а именно провинция Белуджистан Пакистана [1].

В отличие от внутригенных локусов, по внегенным маркерам D7S486 и D7S655 хромосомы с мутацией F508del были достаточно полиморфны. Для F508del-хромосом распределение частот аллелей по локусу D7S655 было сходным с нормальными хромосомами. Преобладание аллеля 159 было выше, чем в нормальных хромосомах, но не достигало достоверности. По распределению аллелей D7S486 хромосомы, несущие мутацию F508del отличались достоверно от нормальных. Можно думать, что для данных локусов влияние

гаплотипа сохраняется. По данным литературы, известна принадлежность F508del-несущих хромосом к определенному гаплотипу по внегенным маркерам, в частности, XV2с и KM19 [6]. Выявленный нами полиморфизм хромосом с мутацией F508del по изученным внегенным локусам может эффективно использоваться для обнаружения разницы между мутантными хромосомами, в частности, в дородовой диагностике.

Хромосомы с мутацией CFTRdele2,3(21kb) по большинству изученных нами внутригенных маркеров достоверно не отличались от нормальных хромосом вследствие того, что несли аллели, соответствующие самым частым аллелям нормальных хромосом, а также из-за небольшой выборки. Соответственно, для дородовой диагностики сложнее подобрать информативные и индивидуализирующие материнскую и отцовскую хромосомы маркеры, а также труднее выявить контаминацию, поскольку велика вероятность обнаружить наиболее обычные для популяции аллели. Локус D7S677 оказался особенно полезным для анализа именно мутации CFTRdele2,3(21kb), при которой мы фиксировали «нулевой» аллель, поскольку в отличие от IVS1(CA)_n он входит в состав участка, утрачиваемого в ходе делеции. В локусе IVS8 (TG)_{mTn}, по нашим данным, хромосомы с делецией 21 т.п.н. ассоциированы с самым распространенным в общей популяции аллелем 7T-11TG. Таких данных мы не нашли у других авторов, однако такой результат закономерен в соответствии с особенностями других внутригенных локусов.

По внегенным локусам хромосомы с мутацией CFTRdele2,3(21kb), так же как и F508del-хромосомы, были полиморфны и достоверно различались от нормальных. Поэтому внегенные маркеры могут быть эффективно привлечены для поиска информативных маркеров CFTRdele2,3(21kb)-хромосом как в отношении мутации, так и родительской контаминации. Мутация CFTRdele2,3(21kb) носит название «славянской», благодаря своей распространенности среди славянского населения [6]. По результатам нашего исследования CFTRdele2,3(21kb)-подобного гаплотипа среди нормальных хромосом можно предположить, что мутантный вариант гаплотипа происходит от нормального, несущего аллель 279 в локусе D7S677 и аллель 169 в локусе D7S655.

При пренатальной диагностике МВ есть мнение врачей, что для семей с установленными мутациями, как то F508del и CFTRdele2,3(21kb), косвенная диагностика не требуется. При этом вероятность ошибки не достаточно принимается во внимание. В своей практике мы столкнулись со случаем, когда в ходе пренатальной диагностики (не МВ) анализ мутации показал носительство, но STR-маркеры выявили наличие только материнских маркеров у плода. Мы провели анализ дополнительных STR-маркеров, применяемых для идентификации личности, который подтвердил, что предоставленный в качестве ворсин хориона материал, не содержит отцовских

аллелей и полностью является материалом матери. После повторного забора материала плода (амниотическая жидкость) и был получен однозначный результат. Данное исследование проводилось не в отношении МВ, однако выявление неправильно забранного материала или контаминации материнским материалом чрезвычайно важно во избежание ошибок пренатальной диагностики. Если родители являются носителями одной и той же мутации, при контаминации материнским материалом, нормальный материнский аллель может привести к ошибочной интерпретации генотипа как гетерозиготного. В работе E.J. Winzor с соавт. (2010) приводятся сведения о случаях контаминации, выявленных путём типирования пSTR-маркеров. Материнская контаминация обнаружена в 4% (6/148) образцов ворсин хориона и 1% образцов амниотической жидкости (1/87); при этом в двух образцах ворсин хориона присутствовал только материнский материал [12].

Ввиду высокой ответственности за результат, во всех случаях пренатальной диагностики МВ мы стараемся использовать комбинированный подход, сочетающий анализ мутации и STR-маркеров как и для ПГД. Мы не можем до конца быть уверены насколько тщательно и правильно отобраны и отмыты ворсины хориона. Для выявления контаминации образца важное значение имеют аллели, позволяющие различить материнское и отцовское происхождение хромосом, а также обнаружить неродственную контаминацию.

Представленные нами примеры пренатальной диагностики иллюстрируют тот факт, что из-за специфических гаплогрупп, характерных для хромосом с мутациями F508del и CFTRdele2,3(21kb), различить материнское и отцовское происхождение мутантных хромосом затруднительно. А при CFTRdele2,3(21kb) по внутригенным маркерам еще и сложно отличить мутантную хромосому от нормальной или контаминации. Внутригенные маркеры, информативные в классическом смысле, имеют ограничения для детекции контаминации при гомозиготных по мутации генотипах. В то же время, результаты анализа STR-маркеров подтверждают заключение о генотипе эмбриона или плода. Принимая во внимание особенности внутригенного микросателлитного гаплотипа мутантных хромосом, проще подбирать информативные маркеры или использовать стандартную панель STR-маркеров для косвенной диагностики МВ. Включение в исследование внегенных маркеров повышает уверенность в правильности заключения и отсутствии контаминации или артефактов ПЦР (ложной гомозиготности вследствие плохой амплификации отдельных аллелей).

Таким образом, особенности гаплотипов мутантных хромосом необходимо учитывать при проведении дородовой диагностики. Новые данные, полученные для STR-маркеров D7S486, D7S655 и D7S677 могут быть использованы для различных целей гаплотипирования.

Список литературы

1. Saleheen D, Frossard PM. The cradle of the $\Delta F508$ mutation. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad*. 2008;20(4):157-160.
2. Петрова НВ, Кондратьева ЕИ, Красовский СА и др. Проект национального консенсуса «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии и терапия». Раздел «Генетика муковисцидоза». Молекулярно-генетическая диагностика при муковисцидозе». *Медицинская генетика*. 2016;15(11): 29-43.
3. Berwouts S, Morris M, Girodon E et al. Mutation Nomenclature in Practice: Findings and Recommendations from the Cystic Fibrosis External Quality Assessment Scheme. *Human Mutation*. 2011;0:1-7.
4. Girardet A, Viart V, Plaza S et al. The improvement of the best practice guidelines for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis: toward an international consensus. *European Journal of Human Genetics*. 2016;24:469-478.
5. Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://www.genet.sick-kids.on.ca/StatisticsPage.html>
6. Иващенко ТЭ, Баранов ВС. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. *Интермедика, Санкт-Петербург*. 2002:256.
7. Кoryтина Г.Ф., Викторова Т.В., Иващенко Т.Э. и др. Анализ внутригенных полиморфных маркеров гена CFTR у больных муковисцидозом и здоровых доноров из Башкортостана. *Генетика*. 2003;39(11):1542-1549.
8. Петрова НВ Анализ четырех полиморфизмов в гене CFTR в семьях больных муковисцидозом. *Медицинская генетика*. 2006;5: 27-32.
9. Rechitsky S, Verlinsky O, Kuliev A. PGD for cystic fibrosis patients and couples at risk of an additional genetic disorder combined with 24-chromosome aneuploidy testing. *Reproductive BioMedicine Online*. 2013;26:420-430.
10. Mateu E, Calafell F, Dolors Ramos M et al. Can a Place of Origin of the Main Cystic Fibrosis Mutations Be Identified? *American Journal of Human Genetics*. 2002;70:257-264.
11. 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.
12. Winsor EJ, Akoury H, Chitayat D et al. The role of molecular microsatellite identity testing to detect sampling errors in prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*. 2010;30(8):746-52.
13. Hadi Fredj S, Ouali F, Siala H et al. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: 10-years experience. *Pathologie Biologie*. 2015;63(3):126-129.
14. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F et al: ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Human Reproduction*. 2011;26:33-40.
15. de Araujo FG, Novaes FC, dos Santos NPC et al. Prevalence of $\Delta F508$, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005;38(1):11-15.
16. Маркова ЕВ, Татару ДА, Преда ОФ. Фрагментный анализ полиморфизма (TG)mTn интрона 8 гена CFTR. *Медицинская генетика*. 2017,16(1):11-19.
17. ALFRED. The ALlele FREquency Database. https://alfred.med.yale.edu/alfred/recordinfo.asp?condition=loci.locus_uid='LO0001940#sites
18. Маркова ЕВ, Серебренникова ОА, Зотова НВ и др. Анализ мутаций гена CFTR у больных с различной патологией. *Медицинская генетика*. 2006;5:39-42.
19. Morral N, Nunes V, Casals T, Estivill X. CA/GT microsatellite alleles within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene are not generated by unequal crossingover. *Genomics*. 1991;10(3):692-698.