

# Преимплантационная генетическая диагностика дупликации в районе 17p11.2 при синдроме Шарко-Мари-Тута типа 1

Жикривецкая С.О.<sup>1</sup>, Орлова А.А.<sup>1,2</sup>, Мусатова Е.В.<sup>1,2</sup>, Софронова Я.В.<sup>1</sup>, Померанцева Е.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ЦГРМ «Генетико»

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»

Синдром Шарко-Мари-Тута (ШМТ) является одним из наиболее частых дегенеративных неврологических заболеваний с частотой встречаемости 1 на 2500. Примерно 70–80% всех случаев ШМТ составляет ШМТ1, вызванная дупликацией 1,5 млн п.н. в районе 17p11.2, включающей ген *PMP22*. Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) патогенного генетического варианта становится мощным инструментом для профилактики заболевания. Ранее была предложена тест-система для косвенной ПГД ШМТ1 с использованием 1–5 полиморфных локусов. Однако в условиях ПГД анализ по 1–5 маркерам с неполной информативностью не может считаться высокодостоверным. В статье представлен опыт проведения ПГД ШМТ1 с применением тест-системы из 27 полиморфных маркеров, позволяющей проводить косвенную диагностику указанной дупликации и точковых мутаций в гене *PMP22* с высокой точностью.

**Ключевые слова:** ПГД, моногенное заболевание, ШМТ1, ген *PMP22*, косвенная диагностика.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## Preimplantation genetic diagnosis for Charcot-Marie-Tooth disease 17p11.2 duplication

Zhikrivetskaya S.O.<sup>1</sup>, Orlova A.A.<sup>1,2</sup>, Musatova E.V.<sup>1,2</sup>, Sofronova Y.V.<sup>1</sup>, Pomerantseva E.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Center of Genetics and Reproductive Medicine GENETICO LLC, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, Russian Federation

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is one of the most frequent neurodegenerative disorder with a prevalence of 1 cases per 2500. CMT1 is the most common subtype of CMT, accounting for 70–80% of all cases. In the majority of cases CMT1A caused by 1.5 Mb duplication in the 17p11.2, including the peripheral myelin protein 22 (*PMP22*) gene. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for this pathogenic genetic variant is a powerful tool for disease prevention. Previously, a test system for PGD CMT1A was performed by 1–5 polymorphic loci. However, the analysis of 1–5 markers with incomplete informativity cannot be considered as highly reliable under PGD conditions. This paper reports on the PGD for CMT1A in three couples using a test system with 27 polymorphic markers. The presented test system provides accurate and reliable results in the PGD for the 17p11.2 duplication and point mutations in *PMP22* gene.

**Key words:** Preimplantation genetic diagnosis, PGD, CMT1A, *PMP22*, indirect diagnosis.

### Введение

Наследственная нейропатия Шарко-Мари-Тута типа 1 (ШМТ1) является демиелинизирующей периферической нейропатией, характеризующейся слабостью и атрофией дистальных мышц, потерей чувствительности, снижением скорости проводимости нервов. ШМТ является одним из наиболее частых дегенеративных неврологических заболеваний с частотой встречаемости 1 на 2500. Примерно 70–80% всех случаев ШМТ составляет ШМТ1, вызванная дупликацией 1,5 млн п.н. в районе 17p11.2, включающей ген *PMP22*. Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) выявленного в семье патогенного генетического варианта становится мощным инструментом для профилактики этой моногенной патологии.

Молекулярно-генетическая диагностика дупликации 1,5 млн п.н. в районе 17p11.2 может быть выполнена различными методами: количественная ПЦР, ПЦР длинных фрагментов, метод MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification MLPA), хромосомный микроматричный анализ (ХМА), анализ количества ал-

лелей полиморфных маркеров, высокопроизводительное секвенирование, ДНК-микрочипы. Некоторые из перечисленных методов технически не подходят для ПГД, другие требуют наличия дорогостоящих приборов и реагентов. Основной проблемой при генетической диагностике эмбрионов является малое исходное количество биоматериала, так как биоптат содержит от одной до трех клеток. В этом случае для повышения эффективности и точности анализа важно полностью исключить возможность контаминации и нивелировать возможный эффект неравномерной и/или неполной амплификации и деградации материала. Это требует разработки тест-системы с особыми характеристиками. Тест-система разрабатывается с учетом возможности использовать биоматериал разного типа — ДНК, выделенную из разных тканей, продукт полногеномной амплификации (WGA), единичные клетки. Сочетание универсальности по отношению к биоматериалу с поэтапной амплификацией целевых фрагментов позволяет достичь высокой точности и выявить ситуацию неполной амплификации или деградации образца.

Ранее была предложена тест-система для косвенной ПГД ШМТ1 с использованием 1—5 полиморфных маркеров [1, 2]. Группы сцепления определяли путем анализа наследования аллелей, на единичных сперматозоидах/полярных тельцах. В результате анализа полностью информативным для выявления носительства дубликации оказывались 1—3 маркера для каждой семьи. Подчеркивая особенности детекции мутации в условиях ПГД, описанные выше, важно отметить, что анализ по такому количеству маркеров не может считаться высокодостоверным. Необходимость проведения сегрегационного анализа в семье даже при наличии трех аллелей полиморфного маркера у носителя дубликации связана с особенностями диагностики в рамках ПГД. Так как вероятность контаминации, деградации биоматериала и неравномерной амплификации аллелей гораздо выше при ПГД по сравнению с диагностикой на большем количестве биоматериала, анализ групп сцепления является дополнительной возможностью оценить достоверность полученного результата. Учитывая протяженность дубликации, а также степень гетерозиготности каждого маркера и особенности ПГД, в универсальную тест-систему должно входить большее количество маркеров, находящихся как в районе дубликации, так и за ее пределами. В статье описан опыт проведения ПГД с тест-системой, удовлетворяющей вышеперечисленным требованиям. Важно отметить, что эта тест-система может быть использована также для косвенной диагностики в случае точковых мутаций в гене *PMP22*.

## Пациенты и методы

### Пациенты

В семье А супруг является носителем дубликации 17p11.2-p.12, содержащей ген *PMP22*, и имеет клинические проявления ШМТ1. С 2015 года было проведено 3 протокола ЭКО, в рамках которых выполняли ПГД моногенного заболевания вместе с ПГС (преимплантационным генетическим скринингом) хромосомных аномалий для эмбрионов, не унаследовавших мутацию. Ни один из пригодных по результатам ПГС хромосомных аномалий и ПГД моногенного заболевания эмбрионов не имплантировался. В 2015 году по результатам пренатальной диагностики ШМТ1 была прервана естественная, самостоятельно наступившая, беременность. Показанием к проведению ПГС являлись многократные неудачные попытки ЭКО.

В семье Б супруга (33 года на момент обращения) является носителем дубликации 17p11.2-p.12, содержащей ген *PMP22* и имеет клинические проявления ШМТ1. Диагноз был установлен в возрасте 7 лет. В первом браке родилась здоровая девочка, во втором браке 2 беременности замерли на раннем сроке (4—7 недель), третья беременность прервана по результатам пренатальной диагностики дубликации 17p11.2-p.12.

В семье В у супруга диагностирована наследственная нейропатия ШМТ1. Молекулярно-генетический анализ выявил миссенс мутацию с.235T>C (NM\_000304.3) в гене *PMP22*.

В семьях А, Б и В вероятность рождения ребенка с заболеванием ШМТ1 составляет 50%. Семьям было рекомендовано проведение ПГД моногенного заболевания ШМТ1 в цикле ЭКО для отбора эмбрионов, не унаследовавших соответствующую мутацию.

Все участники подписали информированное согласие на обработку данных и их использование в научно-исследовательских целях.

### Разработка тест-системы

Для диагностики дубликации были выбраны полиморфные локусы STR (single tandem repeat) с гетерозиготностью не менее 0,68 в районе дубликации и вне его. Для каждого из этих локусов были подобраны праймеры для амплификации по типу полугнездовой ПЦР. В разработку тест-системы были включены 27 STR локусов (табл. 1). Последовательности праймеров могут быть предоставлены по запросу. Также были подобраны внешние и внутренний праймеры для прямой детекции мутации с.235T>C методом ПЦР-ПДФ. Важно отметить, что при подборе праймеров соблюдали ряд особых требований: длина продукта с внешних праймеров не должна превышать 500 п.н. (для наработки ПЦР-продукта с фрагментов, получаемых при полногеномной амплификации), длина продукта с внутренних праймеров 120—300 п.н., разница температуры отжига не более 0,5°C.

### Отработка тест-системы для ПГД

На этапе отработки тест-системы проводился подбор условий амплификации, оптимальных для работы праймеров, анализ эффективности и специфичности ПЦР-амплификации, универсальности тест-системы для биообразцов различного типа. При отработке тест-системы были использованы образцы биопсии единичных клеток в лизирующем буфере (1 x PCRBuffer, 0,1% Tween-20, 0,1% TritonX-100, 1 мкг ProteinaseK), продукты полногеномной амплификации образцов биопсии эмбрионов (WGA), образцы ДНК.

В рамках полугнездовой ПЦР (seminal-PCR) амплификация проводилась в двух раундах. Первый раунд — мультиплексная ПЦР со всеми внешними праймерами для всех локусов, входящих в тест-систему, по протоколу: денатурация — 94°C 2 минуты, 30 циклов с понижением температуры отжига праймеров с 62 до 45°C в каждом, 72°C 10 минут. Во втором раунде проводилась индивидуальная амплификация каждого фрагмента с внутренними праймерами.

Фрагментный анализ продуктов амплификации проводился путем капиллярного электрофореза на приборе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). По результатам фрагментного анализа составле-

ны родословные и отмечены информативные маркеры для каждой семьи. При проведении ПГД эмбрионов использовались только информативные полиморфные маркеры.

#### ПГД моногенного заболевания

До проведения ПГД моногенного заболевания проводился анализ групп сцепления на биоматериале партнеров и их родственников. Для семей А и В проведен анализ полиморфных маркеров в единичных сперматозоидах носителя мутации. Для семьи Б группы сцепления были установлены в результате анализа наследования аллелей здоровым ребенком пациентки от первого брака.

У эмбрионов, полученных в цикле ЭКО, была взята биопсия на 5 день развития. Для эмбрионов, не унасле-

довавших мутацию, планировалось проведение преимплантационного генетического скрининга на хромосомные аномалии (ПГС), поэтому первым этапом прободготовки являлась полногеномная амплификация (WGA) с использованием набора Sureplex (BlueGnome, UK). Далее на материале WGA проводилась ПГД с помощью разработанной тест-системы.

## Результаты

### Отработка тест-системы

На этапе отработки тест-системы была проведена оценка специфичности и эффективности амплификации, применение тест-системы в рамках ПГД позволило также оценить частоту выпадения аллелей (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика полиморфных локусов, входящих в тест-систему

| Локус     | Последовательность мотива | Гетерозиготность | Положение относительно гена <i>PMP22</i> (Мб) | Эффективность амплификации | Частота выпадения аллеля* |
|-----------|---------------------------|------------------|---|----------------------------|---------------------------|
| D17S2216  | (CA) <sub>n</sub>         | 0,8554           | -0,9293                                       | 0,38 (6 из 16)             | NA                        |
| D17S2217  | (TG) <sub>n</sub>         | 0,7837           | -0,89919                                      | 0,91 (50 из 55)            | 0 (0 из 4)                |
| D17S2218  | (CA) <sub>n</sub>         | 0,8072           | -0,88025                                      | 0,91 (80 из 88)            | 0,08 (1 из 13)            |
| D17S921   | (CA) <sub>n</sub>         | 0,7683           | -0,87225                                      | 0,82 (40 из 49)            | 0,44 (4 из 9)             |
| D17S2219  | (TG) <sub>n</sub>         | 0,7563           | -0,83156                                      | 0,94 (46 из 49)            | 0,11 (1 из 9)             |
| D17S14.4  | AC                        | 0,7858           | -0,67832                                      | 0,94 (46 из 49)            | 0,11 (1 из 9)             |
| D17S839   | AC                        | 0,673            | -0,64772                                      | 0,88 (69 из 78)            | 0,22 (2 из 9)             |
| D17S2222  | (CA) <sub>n</sub>         | 0,7115           | -0,5973                                       | 0,89 (72 из 81)            | 0 (0 из 13)               |
| D17S2223  | (TG) <sub>n</sub>         | 0,8248           | -0,57791                                      | 0,63 (10 из 16)            | NA                        |
| D17S2224  | (TAGA) <sub>n</sub>       | 0,687            | -0,57622                                      | 0,58 (30 из 52)            | NA                        |
| D17S2225  | (CA) <sub>n</sub>         | 0,8086           | -0,56572                                      | 0,83 (43 из 52)            | NA                        |
| D17S2227  | (CAATA) <sub>n</sub>      | Нет данных       | -0,51743                                      | 0,95 (84 из 88)            | 0 (0 из 13)               |
| D17S14.7  | AC                        | 0,7062           | -0,3795                                       | 0,92 (81 из 88)            | 0,08 (1 из 13)            |
| D17S2229  | (CA) <sub>n</sub>         | 0,8388           | -0,07366                                      | 0,96 (47 из 49)            | 0 (0 из 9)                |
| D17S15.11 | AG                        | 0,7294           | -0,0152                                       | 0,94 (46 из 49)            | 0,11 (1 из 9)             |
| D17S15.12 | AC                        | 0,7177           | -0,01486                                      | 0,96 (47 из 49)            | 0 (0 из 9)                |
| D17S122   | (CA) <sub>n</sub>         | 0,8391           | 0,076352                                      | 0,65 (17 из 26)            | 0,25 (1 из 4)             |
| D17S261   | (CA) <sub>n</sub>         | 0,685            | 0,226817                                      | 0,95 (40 из 42)            | 0 (0 из 9)                |
| D17S16.2  | AC                        | 0,801            | 1,080544                                      | 0,91 (41 из 45)            | 0,15 (2 из 13)            |
| D17S16.4  | AC                        | 0,703            | 1,296675                                      | 0,94 (33 из 35)            | 0 (0 из 9)                |
| D17S16.9  | AC                        | 0,762            | 1,866562                                      | 1 (26 из 26)               | 0 (0 из 4)                |
| D17S17.2  | AC                        | 0,707            | 2,128601                                      | 0,89 (40 из 45)            | 0 (0 из 13)               |
| D17S17.3  | AC                        | 0,739            | 2,180633                                      | 0,9 (47 из 52)             | 0,23 (3 из 13)            |
| D17S17.56 | AC                        | 0,745            | 2,431485                                      | 1 (9 из 9)                 | NA                        |
| D17S17.57 | AC                        | 0,798            | 2,446724                                      | 0,91 (32 из 35)            | 0,11 (1 из 9)             |
| D17S17.58 | AC                        | 0,836            | 2,456829                                      | 0,95 (40 из 42)            | 0 (0 из 9)                |

Примечание. NA — не определено, так как не анализировались на эмбрионах; \* — параметр, позволяющий оценить разницу в эффективности амплификации для разных аллелей на биоматериале единичных клеток, рассчитывается как количество случаев с выявленной потерей аллеля, деленное на общее количество случаев амплификации локуса.

Установление группы сцепления мутации

Для семей А и В был получен биоматериал супругов и единичных сперматозоидов супруга. Было проанализировано 27 STR локусов. Из них для семьи А 15 оказались информативными для определения носительства дупликации и выявления случаев контаминации биоматериала, неравномерной амплификации, деградации биоматериала и выпадения аллеля; для семьи В — 14 локусов информативны для выявления носительства мутации с.235T>C в гене *PMP22*. Образцы биопсии эмбрионов тестировались только на информативные маркеры. При гаплотипировании семьи В также были проанализированы родственники супруга — родители и брат, однако мутации у них не обнаружено.

Для семьи Б был получен биоматериал супругов и здоровой дочери пациентки от первого брака. Из 27 ис-

следованных локусов, входящих в тест-систему, информативными для определения носительства дупликации оказались 16. При этом полностью информативным (без совпадения аллелей мутантного гаплотипа, нормального гаплотипа пациента и гаплотипа партнера) оказался только локус D17S17.3.

ПГД

В цикле ЭКО семьи А было получено 9 эмбрионов. Результаты анализа генотипов по информативным маркерам представлены в табл. 2.

По результатам диагностики у 6 эмбрионов носительство дупликации не выявлено; у 3 эмбрионов выявлен гаплотип, соответствующий наличию дупликации. При этом для одного эмбриона, признанного не унаследовавшим заболевание, из-за наблюдаемой рекомбина-

Таблица 2

Результаты ПГД моногенного заболевания ШМТ1 семьи А

| № образца | Полученные данные молекулярно-генетического анализа мутации и сцепленных маркеров |             |             |             |             |             |             |             |             |   |          |          |          |          | Результаты ПГД | Результаты ПГС                                  | Перенос эмбриона              |                 |
|-----------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---|----------|----------|----------|----------|----------------|---|-------------------------------|-----------------|
|           | Локусы внутри дуплицированного района   |             |             |             |             |             |             |             |             | Локусы снаружи от дуплицированного района |          |          |          |          |                |   |                               |                 |
|           | D17S2218  | D17S921     | D17S2219    | D17S14.4    | D17S839     | D17S14.7    | D17S2227    | D17S2229    | D17S15.11   | D17S261                                   | D17S16.2 | D17S16.4 | D17S17.2 | D17S17.3 |                |   |                               | D17S17.57       |
| T1        | 257/259   | 309/ADO     | 117/119     | ADO/191     | 342/ADO     | 209         | 199/195     | 261/259     | 141/142     | 143/141                                   | ADO/278  | 240/238  | 186/196  | 284      | 295/291        | Мутация не унаследована * достоверность снижена | mos seq(4)x1/(1-22)x2,(X,Y)x1 | Не рекомендован |
| T2        | 257/267   | 309/317     | 117/108     | 193/195     | 342/354     | 209/215     | 199/190     | 261/270     | 141/157     | 141/143                                   | 268/278  | 240/236  | 186      | 288/293  | 295/291        | Мутация не унаследована                         | seq(1-22,X)x2                 | Рекомендован    |
| T3        | 257/267   | 309/317     | 117/108     | 193/195     | 342/354     | 209/215     | 199/190     | 261/270     | 141/157     | 141/143                                   | 268/278  | 240/236  | 186      | ADO/293  | 295/291        | Мутация не унаследована                         | seq(1-22,X)x2                 | Рекомендован    |
| T4        | 255,262/267   | 309/317     | 108         | 193/195     | 342/354     | 203/215     | 204/190     | 255,259/270 | 141,162/157 | 139/143                                   | 278      | 238/236  | 196/186  | 286/293  | 289/291        | Унаследована мутация                            | Не проводилось                | Не рекомендован |
| T5        | 257/259   | 309/317     | 117/119     | 193/191     | 342/354     | 209         | 199/195     | 261/259     | 141/142     | 141                                       | 268/278  | 240/238  | 186/196  | 288/286  | 295/299        | Мутация не унаследована                         | seq(9)x1                      | Не рекомендован |
| T6        | 257/259   | 309/317     | 117/119     | 193/191     | 342/354     | 209         | 199/195     | 261/259     | 141/142     | 141                                       | 268/278  | 240/238  | 186/196  | 288/286  | 295/299        | Мутация не унаследована                         | seq(1-22,X)x2                 | Рекомендован    |
| T7        | 255,262/267   | 317         | 108         | 193,189/191 | 344,ADO/ADO | 203/215     | 204/190     | 255,259/270 | 141,162/157 | 139/143                                   | 278      | 238/236  | 196/186  | 290/293  | 289/291        | Унаследована мутация                            | Не проводилось                | Не рекомендован |
| T8        | 257/259   | 309/317     | 117/ADO     | 193/191     | 342/354     | 209         | 199/195     | 261/259     | 141/142     | 141                                       | 268/278  | 240/238  | 186/196  | ADO/286  | 295/ADO        | Мутация не унаследована                         | seq(1-22,X)x2                 | Рекомендован    |
| T9        | 255,262/259   | 317         | 108/119     | 193,189/191 | 342,344/354 | 203/209     | 190,204/195 | 255/259     | 141,162/142 | 139,143/141                               | 278      | 238      | 196      | 286      | 289/299        | Унаследована мутация                            | Не проводилось                | Не рекомендован |
|           | 255,262/257   | 317,317/309 | 108,108/117 | 193,189/193 | 342,344/342 | 203,203/209 | 190,204/199 | 255,259/261 | 141,162/141 | 139,143/141                               | 278/268  | 238/240  | 196/186  | 286/288  | 289/295        | Партнер, носитель дупликации 17p11.2-p.12       |                               |                 |
|           | 259/267   | 317/317     | 119/108     | 191/195     | 354/354     | 209/215     | 195/190     | 259/270     | 142/157     | 141/143                                   | 278/278  | 238/236  | 196/186  | 286/293  | 299/291        | Пациентка                                       |                               |                 |

Примечание. ADO — выпадение аллеля (allele drop out), полужирным шрифтом выделен мутантный гаплотип, курсивом отмечены не полностью информативные аллели (совпадающие), \* — рекомбинация в материнской хромосоме

ции в материнской хромосоме, а также выпадения аллеля по 4 локусам достоверность результата была снижена. С согласия родителей для эмбрионов, не унаследовавших мутации, провели ПГС хромосомных аномалий. По результатам всех проведенных анализов 4 эмбриона были рекомендованы к переносу.

В цикле ЭКО семьи Б было получено 7 эмбрионов. Результаты анализа генотипов по информативным маркерам представлены в табл. 3. По результатам ПГД моногенного заболевания у 4 эмбрионов выявлен нормальный гаплотип, свидетельствующий об отсутствии дупликации, у 3 эмбрионов выявлен гаплотип, соответствующий наличию дупликации. По желанию пациента ПГС проводился только для двух эмбрионов, не унаследовавших мутации. ПГС выявил у одного эмбриона сег-

ментарную дупликацию 1p36.3p35.3, поэтому к переносу был рекомендован 1 эмбрион.

В цикле ЭКО семьи В было получено 4 эмбриона. По результатам прямой и косвенной диагностики мутации с.235T>C у 2 эмбрионов носительство мутации не выявлено; у 2 эмбрионов выявлен гаплотип, соответствующий наличию мутации. ПГС выявил у одного из эмбрионов, не унаследовавших мутацию, повышенную вероятность мозаичной дупликации фрагмента короткого плеча хромосомы 4, поэтому этот эмбрион был рекомендован для переноса с информированного согласия семьи. В первую очередь к переносу был рекомендован 1 эмбрион, не унаследовавший мутации и без хромосомных аномалий по результатам ПГС.

Результаты ПГД моногенного заболевания ШМТ1 семьи Б

Таблица 3

| № образца | Полученные данные молекулярно-генетического анализа мутации и сцепленных маркеров |             |             |             |             |             |             |             |             |             |  |          |          | Результаты ПГД                              | Результаты ПГС             | Перенос эмбриона                |
|-----------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--|----------|----------|---|----------------------------|---------------------------------|
|           | Маркеры внутри дуплицированного локуса  |             |             |             |             |             |             |             |             |             | Маркеры снаружи от дуплицированного локуса |          |          |   |                            |                                 |
|           | D17S2218  | D17S921     | D17S2219    | D17S14.4    | D17S839     | D17S2225    | D17S14.7    | D17S2227    | D17S2229    | D17S15.11   | D17S15.12                                  | D17S16.9 | D17S17.3 |   |                            |                                 |
| B1        | 267/258   | 309/318     | 109/117     | 193/195     | 354/342     | 234/236     | 204/205     | 195/204     | 261/272     | 142         | 154  | 230/232  | 290/ADO  | Мутация не унаследована                     | seq(1-22,X)x2              | Рекомендован                    |
| B2        | 263/265,258   | 318/309,ADO | 109/119     | 189/191     | 340/354     | 236/240     | 213/204,208 | 195/190     | 270/261     | 141/157     | 154/167                                    | 230      | ADO/290  | Унаследована мутация                        | Не тестировался            | Не рекомендован                 |
| B3        | 263/258   | 318         | 109/117     | 189/195     | 340/342     | 236         | 213/205     | 195/204     | 270/272     | 141/142     | 154  | 230/232  | 286      | Мутация не унаследована                     | Не тестировался            | Рекомендован по результатам ПГД |
| B4        | 267/258   | 309/318     | 109/117     | 193/195     | 354/342     | 234/236     | 204/205     | 195/204     | 261/272     | 142         | 154  | 230/232  | 290/286  | Мутация не унаследована                     | mos seq dup(1)(p36.3p35.3) | Не рекомендован                 |
| B5        | 263/265,ADO   | ADO/314,ADO | 109/119     | 189/191     | 340/354     | 236/240     | 213/204,208 | 195/190     | 270/261     | 141/157     | 154/167                                    | 230      | 286/290  | Унаследована мутация                        | Не тестировался            | Не рекомендован                 |
| B6        | 267/265,258   | 309/314,ADO | 109/119     | 193/191     | 354         | 234/240     | 204/208,ADO | 195/190     | 261         | 142/157,ADO | 154/167,171                                | 230      | 290      | Унаследована мутация                        | Не тестировался            | Не рекомендован                 |
| B7        | 263/258   | 318         | 109/117     | 189/195     | 340/342     | 236         | 213/205     | 195/204     | 270/272     | 141/142     | 154  | 230/232  | 286      | Мутация не унаследована                     | Не тестировался            | Рекомендован по результатам ПГД |
|           | 267/263   | 309/318     | 109/109     | 193/189     | 354/340     | 234/236     | 204/213     | 195/195     | 261/270     | 142/141     | 154/154                                    | 230/230  | 290/286  | Партнер                                     |                            |                                 |
|           | 265,258/258   | 309,314/318 | 109,119/117 | 191,191/195 | 354,354/342 | 240,240/236 | 208,204/205 | 195,190/204 | 261,261/272 | 141,157/142 | 167/(154)                                  | 230/232  | 290/286  | Пациентка, носитель дупликации 17p11.2-p.12 |                            |                                 |
|           | 260/258   | 318/318     | 117/117     | 189/195     | 340/342     | 238/236     | 204/205     | 190/204     | 259/272     | 165/142     | 165/154                                    | 240/232  | 286/286  | Ребенок пациентки от первого брака          |                            |                                 |

Примечание. ADO — выпадение аллеля (allele drop out), полужирным шрифтом выделен мутантный гаплотип, курсивом отмечены не полностью информативные аллели (совпадающие), \* — рекомбинация в материнской хромосоме



### **Обсуждение**

Мультиплексная ПЦР с более чем 10 парами праймеров может быть нестабильна, однако ее использование в качестве 1 раунда полугнездовой ПЦР позволяет нарабатывать целевые фрагменты с высокой эффективностью в условиях критически малого количества доступного для анализа биоматериала. Из 27 маркеров только 14—16 оказывались информативными для детекции мутации в каждой семье, при этом расстояние между самыми дальними локусами составило более 3,5 млн п.н. Даже с таким количеством информативных маркеров и высокой эффективностью амплификации в рамках ПГД возникли сложности с идентификацией как нормального или мутантного гаплотипа из-за обнаруженной рекомбинации по материнской хромосоме.

Интересно отметить, что маркеры, ранее предложенные для ПГД ШМТ1 [1], в представленных семьях без информации по другим маркерам оказались бы неинформативными. Для семьи А маркер RM11 (D17S122) оказался совершенно неинформативен, а маркеры Mfd41 (D17S261) и AFM191 (D17S921) для T1 не позволили бы выявить рекомбинацию по материнской хромосоме, по эмбрионам T7 и T9 маркер AFM191 отдельно не позволил бы различить мутацию и норму, так же как маркер Mfd41 — для эмбрионов T2, T3, T5, T6, T8 из-за необходимости учитывать возможность выпадения ал-

леля [1]. Таким образом, в условиях ПГД необходимо использовать избыточное количество маркеров для наиболее точной детекции мутации, а также событий, которые могут привести к снижению достоверности результата.

### **Заключение**

Разработана тест-система для дупликации 17p11.2-p.12 в районе гена *PMP22* для использования в рамках ПГД моногенного заболевания ШМТ1. В рамках отработки тест-системы были показаны высокая специфичность и эффективность, а также универсальность в отношении биообразцов различного типа. С использованием разработанной тест-системы была проведена ПГД заболевания для семей с высоким генетическим риском и выявлены эмбрионы, не унаследовавшие мутацию.

### **Список литературы**

1. De Vos A, Sermon K, De Rijcke M et al. Preimplantation genetic diagnosis for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Mol Hum Reprod.* 2003;9(7):429-435.
2. Hyoung-Song Lee, Min Jee Kim, Duck Sung Ko et al. Preimplantation genetic diagnosis for Charcot-Marie-Tooth disease. *Clin Exp Reprod Med.* 2013;40(4):163-168.