



Оригинальная статья

Особенности спектра мутаций, выявленных при комплексном исследовании гена *CFTR* у российских больных муковисцидозом

Петрова Н.В.¹ • Марахонов А.Ю.¹ • Васильева Т.А.¹ • Каширская Н.Ю.¹ • Кондратьева Е.И.¹ • Жекайте Е.К.¹ • Воронкова А.Ю.¹ • Шерман В.Д.¹ • Галкина В.А.¹ • Гинтер Е.К.¹ • Куцев С.И.¹ • Зинченко Р.А.^{1,2}

Петрова Ника Валентиновна – д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории генетической эпидемиологии¹
✉ 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация. Тел.: +7 (499) 320 60 90.
E-mail: npetrova63@mail.ru

Марахонов Андрей Юрьевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генетической эпидемиологии¹

Васильева Татьяна Алексеевна – науч. сотр. лаборатории генетической эпидемиологии¹

Каширская Наталья Юрьевна – д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотр. лаборатории генетической эпидемиологии¹

Кондратьева Елена Ивановна – д-р мед. наук, профессор, заведующая научно-клиническим отделом муковисцидоза¹

Жекайте Елена Кястутисовна – науч. сотр. научно-клинического отдела муковисцидоза¹

Воронкова Анна Юрьевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. научно-клинического отдела муковисцидоза¹

Шерман Виктория Давидовна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. научно-клинического отдела муковисцидоза¹

Галкина Варвара Александровна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генетической эпидемиологии¹

Гинтер Евгений Константинович – д-р биол. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель¹

Куцев Сергей Иванович – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, директор¹

Зинченко Рена Абульфазовна – д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории генетической эпидемиологии¹; профессор курса клинической фармакологии кафедры организационно-правового обеспечения медицинской и фармацевтической деятельности факультета усовершенствования врачей²

Актуальность. Муковисцидоз (МВ; OMIM 219700) – частое наследственное заболевание, обусловленное мутациями в гене *CFTR* (OMIM 602421). Распределение и частота мутаций гена *CFTR* значительно различаются в зависимости от страны и этнической группы. К настоящему времени около 11% аллелей гена *CFTR* остаются не идентифицированными после проведения тестирования частых мутаций у российских пациентов. Полное определение спектра мутаций в гене *CFTR* необходимо для оптимизации медико-генетической помощи населению и внедрения достижений таргетной терапии при лечении больных МВ. **Материал и методы.** В группе 121 российского пациента с МВ, при тестировании которых на частые мутации не идентифицирован один (107 человек) или оба (14) мутантных аллеля, проведено исследование кодирующей последовательности гена *CFTR*, включая области экзон-интронных соединений, 5'- и 3'-нетранслируемых областей, методом секвенирования по Сэнгеру, а также поиск протяженных перестроек методом мультиплексной лигазо-зависимой амплификации проб (MLPA). **Результаты.** Дополнительно к выявленным ранее определено 88 вариантов, из них 28 – миссенс-мутации, 15 – нонсенс-мутации, 18 – мутации со сдвигом рамки (14 делеций, 4 инсерции), 14 – мутации, нарушающие сайты сплайсинга, 1 – инсерция без сдвига рамки, 1 – делеция без сдвига рамки, 1 – мутация in/del, 10 – обширные перестройки (7 – делеции, 3 – дупликации). При секвенировании 23 варианта описаны впервые. Выявлено 4 комплексных мутантных аллеля. Шестьдесят вариантов

обнаружены 1 раз. Идентифицированы 134 из 135 протестированных мутантных аллелей. **Заключение.** Последовательное использование методов секвенирования и MLPA позволило идентифицировать высокую долю тестируемых мутантных аллелей у больных МВ из России (134 из 135, >99%), выявить значительное разнообразие спектра мутаций гена *CFTR* (дополнительно 88 генетических вариантов, 32 из них впервые), ряд повторяющихся мутаций (с.2353С>Т, с.1240_1244delCAAAA, с.1766+1G>A и с.3929G>A), встретившихся у 5 и более неродственных пациентов, которые можно включить в панель рутинно анализируемых мутаций у российских пациентов с МВ; а также высокую долю протяженных перестроек гена *CFTR*.

Ключевые слова: муковисцидоз, ген *CFTR*, генетические варианты, мутации, обширные перестройки гена, комплексный аллель, российская популяция

Для цитирования: Петрова НВ, Марахонов АЮ, Васильева ТА, Каширская НЮ, Кондратьева ЕИ, Жекайте ЕК, Воронкова АЮ, Шерман ВД, Галкина ВА, Гинтер ЕК, Куцев СИ, Зинченко РА. Особенности спектра мутаций, выявленных при комплексном исследовании гена *CFTR* у российских больных муковисцидозом. Альманах клинической медицины. 2019;47(1):38–46. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-004.

Поступила 15.10.2018; принята к публикации 22.10.2018; опубликована 07.02.2019

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; 115522, г. Москва, ул. Москворечье, 1, Российская Федерация

² ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация



Муковисцидоз (МВ; OMIM 219700) – наследственное рецессивное заболевание, обусловленное патогенными вариантами гена *CFTR* (OMIM 602421), кодирующего белок, муковисцидозный трансмембранный регулятор. Заболевание характеризуется широкой вариабельностью клинических проявлений, в наибольшей степени обусловленных многообразием генетических вариантов гена *CFTR* [1]. Описано более 2200 вариантов последовательности гена *CFTR*, как патогенных, так и с неясной клинической значимостью, а также не имеющих клинических последствий [2, 3]. Спектр и частота мутаций гена *CFTR* значительно различаются в зависимости от страны и этнической группы, что предполагает необходимость расширенного поиска мутантных аллелей для разработки региональных протоколов диагностики и для внедрения достижений таргетной терапии при лечении больных МВ [4].

Исследования молекулярных причин МВ проводятся в лаборатории генетической эпидемиологии Медико-генетического научного центра начиная с 1989 г. К настоящему времени проанализированы данные более 2000 пациентов с МВ. Длительное изучение этой проблемы позволило определить спектр мутаций гена *CFTR*, рекомендуемых для генотипирования МВ на первом этапе в Российской Федерации: с.54-5940_273+10250del21kb (p.Ser18Arg*fsX16, CFTRdele2,3), с.254G>A (p.Gly85Glu, G85E), с.262_263delTT (p.Leu88IlefsX22, 394delTT), с.274G>A (p.Glu92Lys, E92K), с.287C>A (p.Ala96Glu, A96E), с.350G>A (p.Arg117His, R117H), с.411_412insCTA (p.Leu138dup; L138ins), с.472dupA (p.Ser158LysfsX5, 604insA), с.489+1G>T (621+1G>T), с.1000C>T (p.Arg334Trp, R334W), с.1040G>C (p.Arg347Pro, R347P), с.1397C>G (p.Ser466X, S466X), с.1519_1521delATC (p.Ile507del, I507del), с.1521_1523delCTT (p.Phe508del, F508del), с.1545_1546delTA (p.Tyr515X, 1677delTA), с.1585-1G>A (1717-1G>A), с.1624G>T (p.Gly542X, G542X), с.1652G>A (p.Gly551Asp, G551D), с.1657C>T (p.Arg553X, R553X), с.2012delT (p.Leu671X, 2143delT), с.2051_2052delAAinsG (p.Lys684SerfsX38, 2183AA>G), с.2052_2053insA (p.Gln685ThrfsX4, 2184insA), с.2657+5G>A (2789+5A>G), с.3140-16T>A (3272-16T>A), с.3476C>T (p.Ser1159Phe, S1159F), с.3475T>C (p.Ser1159Pro; S1159P), с.3535_3536insTCAA (p.Thr1179IlefsX17, 3667ins4), с.3587C>G (p.Ser1196X, S1196X), с.3691delT (p.Ser1231ProfsX4, 3821delT), с.3718-2477C>T (3849+10kbC-T), с.3816_3817delGT (p.Ser1273LeufsX28, 3944delGT),

с.3844T>C (p.Trp1282Arg, W1282R), с.3846G>A (p.Trp1282X, W1282X), с.3909C>G (p.Asn1303Lys, N1303K). Суммарная доля этих вариантов составляет 88,75% от всех мутантных аллелей [5].

Таким образом, около 11% аллелей гена *CFTR* остаются не идентифицированными после проведения тестирования частых мутаций у российских пациентов.

Полное определение спектра мутаций в гене *CFTR* представляется приоритетной задачей в России, поскольку в ряде случаев это позволит уточнить диагноз и усовершенствовать подходы пренатальной диагностики, а также будет способствовать повышению качества медико-генетического консультирования и лечения пациентов.

Целью данной работы было расширенное исследование молекулярных причин МВ у российских пациентов.

Материал и методы

В исследовании использованы образцы ДНК 121 больного МВ из неродственных семей, у которых идентифицирован только один или ни одного патогенного варианта в результате анализа на 34 рутинно тестируемые мутации в гене *CFTR* [5], а также ДНК их родителей для уточнения фазы сцепления выявленных мутаций. Диагноз МВ установлен в научно-клиническом отделении муковисцидоза ФГБНУ «МГНЦ». Сто четырнадцать (94%) пациентов проживали в европейской части Российской Федерации, в том числе 74 (61%) – в г. Москве и Московской области. Пациенты или их родители подписывали информированное согласие на проведение исследования. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» (протокол №17/2006 от 02.02.2006).

Методом прямого секвенирования по Сэнгеру осуществлен поиск мутаций в кодирующей области гена *CFTR*, включая области экзон-интронных соединений, 5'- и 3'-нетранслируемых областей. Методом мультиплексной лигазо-зависимой амплификации проб (multiplex ligation-dependent probe amplification – MLPA) проведен поиск протяженных перестроек гена *CFTR*.

Результаты и обсуждение

Для анализа выбран 121 пациент с МВ, в ДНК которых при анализе 34 мутаций не идентифицированы один (107) либо оба (14) мутантных аллеля с генотипами: с.[1521_1523delCTT];[?](F508del/n) – 64, с.[54-5940_273+10250del21kb];[?](CFTRdele2,3/n) – 15, с.[2012delT];[?](2143delT/n) – 3, с.[1624G>T];[?](G542X/n) – 4, с.[3846G>A];[?]

(W1282X/n) – 2, с.[2052_2053insA];[?] (2184insA/n) – 2, с.[3909C>G];[?] (N1303K/n) – 3, с.[1000C>T];[?] (R334W/n) – 2, с.[3718-2477C>T];[?] (3849+10kbC>T/n) – 1, с.[1397C>G];[?] (S466X/n) – 2, с.[1545_1546delTA];[?] (1677delTA/n) – 2, с.[411_412insCTA];[?] (L138ins/n) – 2, с.[3691delT];[?] (3821delT/n) – 1, с.[3844T>C];[?] (W1282R/n) – 1, с.[3475T>C];[?] (S1159P/n) – 1, с.[1657C>T];[?] (R553X/n) – 1, с.[489+1G>T];[?] (621+1G>T/n) – 1; с.[?];[?] (n/n) – 14. Всего 135 неидентифицированных мутантных аллелей гена *CFTR*. Методом секвенирования по Сэнгеру проанализированы экзоны и области экзон-интронных соединений, поиск протяженных перестроек (делеций/дупликаций) осуществлен методом MLPA.

В результате, дополнительно к 17 идентифицированным при тестировании частых мутаций, выявлены 88 патогенных (или предположительно патогенных) генетических вариантов в гене *CFTR* (таблица). Из них 28 – миссенс-мутации, 15 – нонсенс-мутации, 18 – мутации со сдвигом рамки (14 делеций, 4 инсерции), 14 – мутации, нарушающие сайты сплайсинга, 1 – инсерция без сдвига рамки, 1 – делеция без сдвига рамки, 1 – мутация in/del, 10 – обширные перестройки (7 – делеции, 3 – дупликации).

Из 79 генетических вариантов, выявленных при секвенировании, 23 идентифицированы впервые: их описание отсутствует в базах данных мутаций в гене *CFTR* [2, 3, 6]. Тринадцать из этих вариантов являются нонсенс-мутациями (с.252T>A, с.831G>A, с.1083G>A, с.3112C>T) или мутациями сдвига рамки (с.264-268delATATT, с.353delC, с.1219delG, с.1262delC, с.1608delA, с.1725delT, с.1795dupA, с.3083_3087delGTTGATG, с.3189delG), приводящими к образованию преждевременного стоп-кодона и синтезу укороченной молекулы белка (см. таблицу). Вариант с.490-1G>C нарушает акцепторный сайт сплайсинга 5-го экзона. Данные варианты относятся к категории «патогенный нулевой вариант последовательности» (PS1 null variants) согласно критериям классификации патогенности генетических вариантов [7, 8]. Вариант с.1792_1793insAAA приводит к вставке лизина в положение 598. Вариант последовательности с.3925_3936delCAGTGGAGTGAT – делеция без сдвига рамки считывания, приводит к потере четырех аминокислотных остатков 1310–1313. Клиническая значимость данных вариантов оценивается как «патогенные варианты» [7, 8]. Клиническая значимость миссенс-мутаций (с.358G>C, с.1382G>A, с.1513A>C, с.1522T>A, с.1525G>C, с.3902G>A) оценивается как «вероятно

патогенные», варианта с.4262T>A – как «возможно патогенный» [7, 8].

Мутации с.422C>A, с.2491G>T, с.227_228insT, с.1086T>A, с.1364C>A, с.2374C>T, с.2417A>G, с.2589_2599delAATTTGGTGCT и с.2909G>A, представленные в международных базах данных мутаций при МВ [2, 3, 6], у российских пациентов обнаружены впервые. Мутации с.227_228insT, с.1086T>A, с.2374C>T и с.2589_2599delAATTTGGTGCT относят к I классу мутаций, при которых синтез молекулы белка *CFTR* полностью нарушен.

Мутация с.422C>A (p.Ala141Asp; A141D) в компаунде с вариантом с.3909C>G (p.Asn1303Lys; N1303K) описана у одной алжирской 14-летней пациентки, диагноз которой установлен в 4 года, экзокринная функция поджелудочной железы относительно сохранена, выявлена колонизация легких *Pseudomonas aeruginosa*, хлориды пота повышены [9].

При мутации с.2491G>T (Glu831X; E831X) происходит не только образование преждевременного стоп-кодона, но и изменение структуры акцепторного сайта сплайсинга 16-го (14а) экзона, что ведет к инициации механизма альтернативного сплайсинга с частичным сохранением синтеза полноразмерных молекул белка *CFTR*. У пациентов, несущих мутацию с.2491G>T (Glu831X; E831X) в компаунде с другими патогенными мутациями МВ, наблюдается относительно легкое течение заболевания с сохранной экзокринной панкреатической функцией [10].

Мутацию с.2909G>A (p.Gly970Asp; G970D) до сих пор регистрировали только у китайских пациентов с МВ с частотой 16,1% [11, 12]. Исходя из локализации предполагается, что следствием мутации с.2909G>A (p.Gly970Asp; G970D) может быть нарушение проводимости хлоридов с сохранением частичной функции белка *CFTR*. Однако у 3 из 9 китайских пациентов, несущих мутацию с.2909G>A (p.Gly970Asp; G970D) в компаунде с другими патогенными вариантами гена *CFTR*, наблюдалось нарушение внешнесекреторной функции поджелудочной железы. Таким образом, мутацию с.2909G>A (p.Gly970Asp; G970D) следует рассматривать скорее как мутацию с варьируемыми клиническими последствиями [13]. У российского пациента, носителя варианта с.2909G>A (p.Gly970Asp; G970D) в компаунде с вариантом с.1657C>T (p.Arg553X; R553X), отмечается нарушение панкреатической функции и тяжелое течение МВ.

Мутация с.2417A>G (p.Asp806Gly; D806G) ранее обнаружена у одного итальянского пациента

Идентифицированные варианты последовательности гена *CFTR* в российской популяции больных муковисцидозом (n = 121)

№ п/п	Изменение в cDNA	Изменение в белке	Традиционное название	Экзон/интрон	Количество
1	c.43delC	p.Leu15PhefsX1	175delC	1э	1
2	c.53+1G>T		185+1G->T	1и	2
3	c.223C>T	p.Arg75X	R75X	3э	1
4	c.227_228insT	p.Trp79LeufsX32	359insT	3э	1
5	c.252T>A	p.Tyr84X		3э	2
6	c.264-268delATATT	p.Leu88PhefsX21		3э	1
7	c.349C>T	p.Arg117Cys	R117C	4э	2
8	c.353delC	p.Ser118LeufsX6		4э	1
9	c.358G>C	p.Ala120Pro		4э	1
10	c.422C>A	p.Ala141Asp	A141D	4э	1
11	c.490-1G>C			4и	1
12	c.532G>A	p.Gly178Arg	G178R	5э	1
13	c.580-1G>T		721-1G->T	5и	4
14	c.650A>G	p.Glu217Gly	E217G	6а э	1
15	c.831G>A	p.Trp277X		6в э	1
16	c.[1075C>A;1079C>A]	p.[Gln359Lys;Thr360Lys]	Q359K/T360K	7э	1
17	c.1083G>A	p.Trp361X		7э	1
18	c.1086T>A	p.Tyr362X	Y362X	7э	1
19	c.1116+1G>A		1248+1G->A	7и	1
20	c.1209G>C	p.Glu403Asp	E403D	8э	2
21	c.[1210–12[5];1210-34TG[12]]		5T;TG12	7и	2
22	c.1219delG	p.Glu407AsnfsX35		9э	1
23	c.1240_1244delCAAAA	p.Asn415X	1367del5	9э	5
24	c.1262delC	p.Thr421IlefsX21		9э	1
25	c.1364C>A	p.Ala455Glu	A455E	9э	1
26	c.1382G>A	p.Gly461Glu		9э	1
27	c.1513A>C	p.Asn505His		10э	1
28	c.1517T>C	p.Ile506Thr	I506T	10э	2 [†]
29	c.1522T>A	p.Phe508Ile		10э	1
30	c.1525G>C	p.Gly509Arg		10э	1



31	c.1608delA	p.Asp537ThrfsX3		11э	1
32	c.1646G>A	p.Ser549Asn	S549N	11э	1
33	c.1725delT	p.Phe575LeufsX4		12э	1
34	c.1705T>G	p.Tyr569Asp	Y569D	12э	1
35	c.1705T>C	p.Tyr569His	Y569H	12э	2
36	c.1735G>T	p.Asp579Tyr	D579Y	12э	1
37	c.1766+2T>C			12и	2
38	c.1766+1G>A		1898+1G>A	12и	5
39	c.1766+1G>C		1878+1G>C	12и	1
40	c.1792_1793insAAA	p.Lys598dup	K598ins	13э	1
41	c.1795dupA	p.Thr599AsnfsX2		13э	1
42	c.1911delG	p.Gln637HisfsX26	2043delG	13э	1
43	c.1986_1989delAACT	p.Thr663ArgfsX8	2118del4	13э	1
44	c.2125C>T	p.Arg709X	R709X	13э	1
45	c.2128A>T	p.Lys710X	K710X	13э	3
46	c.2290C>T	p.Arg764X	R764X	13э	1
47	c.2353C>T	p.Arg785X	R785X	13э	6
48	c.2374C>T	p.Arg792X	R792X	13э	1
49	c.2417A>G	p.Asp806Gly	D806G	13э	1
50	c.2491G>T	p.Glu831X	E831X	14а э	1
51	c.2589_2599delAATTTGGTGCT	p.Ile864SerfsX28	2721del11	14а э	2
52	c.2658-2A>G		2790-2A->G	14в и	1
53	c.2834C>T	p.Ser945Leu	S945L	15э	4
54	c.2909G>A	p.Gly970Asp	G970D	16э	1
55	c.3084_3088delinsATG	p.Met1028IlefsX18		17а э	2 [†]
56	c.3112C>T	p.Gln1038X		17а э	1
57	c.3189delG	p.Trp1063X		17в э	1
58	c.3196C>T	p.Arg1066Cys	R1066C	17в э	1
59	c.3209G>A	p.Arg1070Gln	R1070Q	17в э	2
60	c.3274T>C	p.Tyr1092His	Y1092H	17в э	2
61	c.3472C>T	p.Arg1158X	R1158X	19э	2



62	c.3484C>T	p.Arg1162X	R1162X	19э	2
63	c.3528delC	p.Lys1177SerfsX15	3659delC	19э	1
64	c.3717G>A		3849G->A	19э	1
65	c.3731G>A	p.Gly1244Glu	G1244E	20э	2 [†]
66	c.3763T>C	p.Ser1255Pro	S1255P	20э	1
67			4006-2A->G	20и	1
68	c.3883delA	p.Ile1295PhefsX33	4015delA	21э	2
69	c.3884_3885insT	p.Ser1297PhefsX5	4016insT	21э	3
70	c.3902G>A	p.Arg1301Lys		21э	1
71	c.3929G>A	p.Trp1310X	W1310X	21э	5
72	c.3925_3936delCAGTGGAGTGAT	p.Trp1310_Gln1313del		21э	1
73	c.3963+1G>T		4095+1G->T	21и	1
74	c.4004T>C	p.Leu1335Pro	L1335P	22э	4
75	c.4242+1G>A		4374G->A	23и	1
76	c.4262T>A	p.Val1421Glu		24э	1
77	c.4296_4297insGA	p.Ser1435GlyfsX14	4428insGA	24э	2
78	c.4364C>G	p.Ser1455X	S1455X	24э	2 [†]
79	c.(?-1)_(1584+1_1585-1)del		CFTRdele1-10 [†]		1
80	c.(273-1_274+1)_(869+1_870-1)del(1209-1_1210+1)_(1392+1_1393+1)del		CFTRdele4-7;dele9-10 [†]		1
81	c.(273+1_274-1)_(743+1_744-1)del		CFTRdele4-6a [†]		1
82	c.(489+1_490-1)_(1392+1_1393-1)del		CFTRdele5-10 [†]		1
83	c.(2988+1_2989-1)_(3468+1_3469-1)del		CFTRdele17a-18 [†]		1
84	c.(1679+1_1680-1)_(2490+1_2491-1)del(2908+1_2909-1)del		CFTRdele12,13;del16 [†]		2
85	c.(743+1_744-1)_(1584+1_1585-1)dup		Dup ex 6b-10 [†] (gIVS6a+415_IVS10+2987Dup26817bp)		2
86	c.(743-1_744+1)_(869+1_870-1)dup		CFTRdup6b,7 [†]		1
87	c.(4136+1_4137-1)_(?*1_?)dup		CFTRdup23,24 [†]		1
88	c.(53+1_54-1)_(869+1_870+1)del		CFTRdele2-7 [†]		1

[†]Нумерация экзонов согласно традиционной номенклатуре (legasy nomenclature)

[†]Вариант обнаружен у пациента в гомозиготном состоянии



24 лет, имеющего пограничные значения потового теста, страдающего рецидивирующим панкреатитом и несущего второй, комплексный аллель с.(1657C>T; 4389G>T) (p.(Arg553X;Gln1463His); R553X/Q1463H) гена *CFTR* [2].

Мутация с.1364C>A (p.Ala455Glu; A455E) с наибольшей частотой (8%) отмечена у канадцев французского происхождения [14]. Ее относят к V классу мутаций, при которых функция поджелудочной железы остается частично сохраненной.

Методом MLPA выявлены 10 обширных перестроек гена *CFTR*: 3 дупликации и 7 делеций (см. таблицу). Разработанная нами система тестирования позволила подтвердить, что обнаруженная у 2 российских пациентов дупликация региона, включающего экзоны 7–11 (6в–10), ранее описана в литературе [15]. Комплексная делеция, приводящая к потере 13–14-го (12–13) и 18-го (16) экзонов (с.(1679+1_1680-1)_(2490+1_2491-1)del(2908+1_2909-1)del; CFTRdele12,13;del16), ранее не описанная, встретилась у 2 пациентов из неродственных семей, проживающих в московском регионе.

Шестьдесят вариантов, идентифицированных в настоящей работе, выявлено на одной хромосоме, 20 – на двух хромосомах (см. таблицу). Но каждый из вариантов с.1517T>C, с.3731G>A, с.4364C>G, с.3084_3088delinsATG идентифицирован у одного пациента в гомозиготном состоянии, что подтверждено обследованием родителей либо MLPA анализом. Две мутации обнаружены у 3 пациентов, мутации с.580-1G>T, с.2834C>T и с.4004T>C – у 4, мутации с.1240_1244delCAAAA, с.1766+1G>A и с.3929G>A – у 5, с.2353C>T – у 6 неродственных пациентов (см. таблицу). Выявлено 4 комплексных аллеля гена *CFTR*: с.[1210–12[5];1210-34TG[12]] (5T;TG12) – у 2 пациентов; с.[1075C>A;1079C>A] (p.[Gln359Lys;Thr360Lys]; Q359K/T360K;

rs397508152) – у 1; с.[1397C>G;3209G>A] (p.[Ser466X;Arg1070Gln]; S466X(TGA)/R1070Q) – у 2 и с.[(2988+1_2989-1)_(3468+1_3469-1)del;1522T>A] (CFTRdele17a-18/F508I) – у 1. Обширные перестройки гена *CFTR* обнаружены у 12 неродственных пациентов, что составляет 8,69% от протестированных мутантных аллелей, а в пересчете на общую выборку должно составить около 1% всех мутантных аллелей у больных МВ в Российской Федерации.

Патогенные варианты идентифицированы в 134 из 135 протестированных мутантных аллелей. В одном образце не удалось идентифицировать второй мутантный аллель гена *CFTR*. Необнаружение второй патологической мутации в гене *CFTR* после проведения секвенирования кодирующей последовательности и поиска обширных перестроек может быть обусловлено расположением патогенного варианта либо во внутренних регионах интронов, либо в регуляторных областях гена *CFTR*, либо в регуляторных регионах вне гена *CFTR* [15].

Заключение

Последовательное использование методов секвенирования и MLPA позволило идентифицировать высокую долю тестируемых мутантных аллелей у больных МВ из России (134 из 135, >99%), выявить значительное разнообразие спектра мутаций гена *CFTR* (дополнительно 88 генетических вариантов, 32 из них впервые), ряд повторяющихся мутаций (с.2353C>T, с.1240_1244delCAAAA, с.1766+1G>A и с.3929G>A), встретившихся у 5 и более неродственных пациентов, которые можно включить в панель рутинно анализируемых мутаций у российских пациентов с МВ, что позволит увеличить информативность диагностики МВ в России на первом этапе до 90–92%; а также высокую долю протяженных перестроек гена *CFTR*. ☺

Дополнительная информация

Финансирование

Работа выполнена при финансировании из Российского научного фонда, грант № 17-15-01051.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Н.В. Петрова – концепция и дизайн исследования, сбор и первичная обработка материалов, проведение молекулярно-генетических исследований, анализ полученных данных, написание текста; А.Ю. Марахонов и Т.А. Васильева – проведение молекулярно-генетических исследований, анализ полученных данных, редактирование текста; Н.Ю. Каширская – концепция и дизайн исследования,

написание и редактирование текста; Е.И. Кондратьева – обеспечение посещения пациентов, предоставления письменного информированного согласия, проведение клинического обследования пациентов, редактирование текста; Е.К. Жекайте, А.Ю. Воронкова и В.Д. Шерман – обеспечение посещения пациентов, предоставления письменного информированного согласия, проведение клинического обследования пациентов, сбор образцов, редактирование текста; В.А. Галкина – анализ результатов клинического обследования пациентов, анализ полученных данных, медико-генетическое консультирование, редактирование текста; Е.К. Гинтер и С.И. Куцев – концепция и дизайн статьи, редактирование текста; Р.А. Зинченко – концепция и дизайн статьи, редактирование текста, утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.



Литература

1. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med.* 2007;28(2):279–88. doi: 10.1016/j.ccm.2007.02.011.
2. The Cystic Fibrosis Mutation Database [Internet]. Available from: <http://www.genet.sick-kids.on.ca>.
3. EXAC. The Exome Aggregation Consortium (Exac) Database [Internet]. Available from: <http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000001626>.
4. De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Med.* 2017;46(6 Pt 2):e97–e108. doi: 10.1016/j.lpm.2017.04.010.
5. Петрова НВ, Кондратьева ЕИ, Красовский СА, Поляков АВ, Иващенко ТЭ, Павлов АЕ, Зинченко РА, Гинтер ЕК, Куцев СИ, Одинокова ОН, Назаренко ЛП, Капранов НИ, Шерман ВД, Амелина ЕЛ, Ашеров ИК, Гембицкая ТЕ, Ильенкова НА, Каримова ИП, Мерзлова НБ, Намазова-Баранова ЛС, Неретина АФ, Никонова ВС, Орлов АВ, Протасова ТА, Семькин СЮ, Сергиенко ДФ, Симонова ОИ, Шабалова ЛА, Каширская НЮ. Проект национального консенсуса «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия». Раздел «Генетика муковисцидоза. Молекулярно-генетическая диагностика при муковисцидозе». *Медицинская генетика.* 2016;15(11):29–45.
6. Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) [Internet]. Available from: https://www.cftr2.org/mutations_history.
7. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
8. Рыжкова ОП, Кардымон ОЛ, Прохорчук ЕБ, Коновалов ФА, Масленников АВ, Степанов ВА, Афанасьев АА, Заклязьминская ЕВ, Костарева АА, Павлов АЕ, Голубенко МВ, Поляков АВ, Куцев СИ. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS). *Медицинская генетика.* 2017;16(7):4–17.
9. Gouya L, Pascaud O, Munck A, Elion J, Denamur E. Novel mutation (A141D) in exon 4 of the CFTR gene identified in an Algerian patient. *Hum Mutat.* 1997;10(1):86–7. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:1<86::AID-HUMU15>3.0.CO;2-W.
10. Hinzpeter A, Aissat A, Sondo E, Costa C, Arous N, Gameiro C, Martin N, Tarze A, Weiss L, de Becdelièvre A, Costes B, Goossens M, Galieta LJ, Girodon E, Fanen P. Alternative splicing at a NAGNAG acceptor site as a novel phenotype modifier. *PLoS Genet.* 2010;6(10). pii: e1001153. doi: 10.1371/journal.pgen.1001153.
11. Wagner JA, Vassilakis A, Yee K, Li M, Hurlock G, Krouse ME, Moss RB, Wine JJ. Two novel mutations in a cystic fibrosis patient of Chinese origin. *Hum Mutat.* 1997;10(1):86–7. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:1<86::AID-HUMU15>3.0.CO;2-W.
12. Tian X, Liu Y, Yang J, Wang H, Liu T, Xu W, Li X, Zhu Y, Xu KF, Zhang X. p.G970D is the most frequent CFTR mutation in Chinese patients with cystic fibrosis. *Hum Genome Var.* 2016;3:15063. doi: 10.1038/hgv.2015.63.
13. Rozen R, De Braekeleer M, Daigneault J, Ferreira-Rajabi L, Gerdes M, Lamoureux L, Aubin G, Simard F, Fujiwara TM, Morgan K. Cystic fibrosis mutations in French Canadians: three CFTR mutations are relatively frequent in a Quebec population with an elevated incidence of cystic fibrosis. *Am J Med Genet.* 1992;42(3):360–4. doi: 10.1002/ajmg.1320420322.
14. Hantash FM, Redman JB, Goos D, Kammesheidt A, McGinniss MJ, Sun W, Strom CM. Characterization of a recurrent novel large duplication in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Mol Diagn.* 2007;9(4):556–60. doi: 10.2353/jmol dx.2007.060141.
15. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetzis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.* 2008;7(3):179–96. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.009.
16. Hinzpeter A, Aissat A, Sondo E, Costa C, Arous N, Gameiro C, Martin N, Tarze A, Weiss L, de Becdelièvre A, Costes B, Goossens M, Galieta LJ, Girodon E, Fanen P. Alternative splicing at a NAGNAG acceptor site as a novel phenotype modifier. *PLoS Genet.* 2010;6(10). pii: e1001153. doi: 10.1371/journal.pgen.1001153.
17. Wagner JA, Vassilakis A, Yee K, Li M, Hurlock G, Krouse ME, Moss RB, Wine JJ. Two novel mutations in a cystic fibrosis patient of Chinese origin. *Hum Mutat.* 1999;10(6):511–5. doi: 10.1007/s004390050996.
18. Tian X, Liu Y, Yang J, Wang H, Liu T, Xu W, Li X, Zhu Y, Xu KF, Zhang X. p.G970D is the most frequent CFTR mutation in Chinese patients with cystic fibrosis. *Hum Genome Var.* 2016;3:15063. doi: 10.1038/hgv.2015.63.
19. Rozen R, De Braekeleer M, Daigneault J, Ferreira-Rajabi L, Gerdes M, Lamoureux L, Aubin G, Simard F, Fujiwara TM, Morgan K. Cystic fibrosis mutations in French Canadians: three CFTR mutations are relatively frequent in a Quebec population with an elevated incidence of cystic fibrosis. *Am J Med Genet.* 1992;42(3):360–4. doi: 10.1002/ajmg.1320420322.
20. Hantash FM, Redman JB, Goos D, Kammesheidt A, McGinniss MJ, Sun W, Strom CM. Characterization of a recurrent novel large duplication in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Mol Diagn.* 2007;9(4):556–60. doi: 10.2353/jmol dx.2007.060141.
21. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetzis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.* 2008;7(3):179–96. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.009.

References

1. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. *Clin Chest Med.* 2007;28(2):279–88. doi: 10.1016/j.ccm.2007.02.011.
2. The Cystic Fibrosis Mutation Database [Internet]. Available from: <http://www.genet.sick-kids.on.ca>.
3. EXAC. The Exome Aggregation Consortium (Exac) Database [Internet]. Available from: <http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000001626>.
4. De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Med.* 2017;46(6 Pt 2):e97–e108. doi: 10.1016/j.lpm.2017.04.010.
5. Petrova NV, Kondratyeva EI, Krasovskiy SA, Polyakov AV, Ivachshenko TE, Pavlov AE, Zinchenko RA, Ginter EK, Kutsev SI, Odinkova ON, Nazarenko LP, Kapranov NI, Sherman VD, Amelina EL, Asherova IK, Gembitskaya TE, Ilyenkova NA, Karimova IP, Merzlova NB, Namazova-Baranova LS, Neretina AF, Nikonova VS, Orlov AV, Protasova TA, Semykin SY, Sergienko DF, Simonova OI, Shabalova LA, Kashirskaya NY. National Consensus Project “Cystic fibrosis: definition, diagnostic criteria, treatment”. Section “Genetics of Cystic Fibrosis”. *Molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis*. *Medical Genetics.* 2016;15(11):29–45. Russian.
6. Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) [Internet]. Available from: https://www.cftr2.org/mutations_history.
7. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
8. Ryzhkova OP, Kardymon OL, Prohorchuk EB, Konovalov FA, Maslennikov AB, Stepanov VA, Afanasyev AA, Zaklyazminskaya EV, Kostareva AA, Pavlov AE, Golubenko MV, Polyakov AV, Kutsev SI. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants. *Medical Genetics.* 2017;16(7):4–17. Russian.
9. Gouya L, Pascaud O, Munck A, Elion J, Denamur E. Novel mutation (A141D) in exon 4 of the CFTR gene identified in an Algerian patient. *Hum Mutat.* 1997;10(1):86–7. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1997)10:1<86::AID-HUMU15>3.0.CO;2-W.
10. Hinzpeter A, Aissat A, Sondo E, Costa C, Arous N, Gameiro C, Martin N, Tarze A, Weiss L, de Becdelièvre A, Costes B, Goossens M, Galieta LJ, Girodon E, Fanen P. Alternative splicing at a NAGNAG acceptor site as a novel phenotype modifier. *PLoS Genet.* 2010;6(10). pii: e1001153. doi: 10.1371/journal.pgen.1001153.
11. Wagner JA, Vassilakis A, Yee K, Li M, Hurlock G, Krouse ME, Moss RB, Wine JJ. Two novel mutations in a cystic fibrosis patient of Chinese origin. *Hum Mutat.* 1999;10(6):511–5. doi: 10.1007/s004390050996.
12. Tian X, Liu Y, Yang J, Wang H, Liu T, Xu W, Li X, Zhu Y, Xu KF, Zhang X. p.G970D is the most frequent CFTR mutation in Chinese patients with cystic fibrosis. *Hum Genome Var.* 2016;3:15063. doi: 10.1038/hgv.2015.63.
13. Rozen R, De Braekeleer M, Daigneault J, Ferreira-Rajabi L, Gerdes M, Lamoureux L, Aubin G, Simard F, Fujiwara TM, Morgan K. Cystic fibrosis mutations in French Canadians: three CFTR mutations are relatively frequent in a Quebec population with an elevated incidence of cystic fibrosis. *Am J Med Genet.* 1992;42(3):360–4. doi: 10.1002/ajmg.1320420322.
14. Hantash FM, Redman JB, Goos D, Kammesheidt A, McGinniss MJ, Sun W, Strom CM. Characterization of a recurrent novel large duplication in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Mol Diagn.* 2007;9(4):556–60. doi: 10.2353/jmol dx.2007.060141.
15. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetzis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.* 2008;7(3):179–96. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.009.



J Med Genet. 1992;42(3):360–4. doi: 10.1002/ajmg.1320420322.

14. Hantash FM, Redman JB, Goos D, Kammesheidt A, McGinniss MJ, Sun W, Strom CM. Characterization of a recurrent novel large duplication in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. J Mol

Diagn. 2007;9(4):556–60. doi: 10.2353/jmoldx.2007.060141.

15. Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M,

Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J Cyst Fibros. 2008;7(3):179–96. doi: 10.1016/j.jcf.2008.03.009.

Characteristics of the mutation spectrum identified by comprehensive investigation of the *CFTR* gene in the Russian patients

N.V. Petrova¹ • A.Yu. Marakhonov¹ • T.A. Vasilyeva¹ •
N.Yu. Kashirskaya¹ • E.I. Kondratyeva¹ • E.K. Zhekayte¹ •
A.Yu. Voronkova¹ • V.D. Sherman¹ • V.A. Galkina¹ • E.K. Ginter¹ •
S.I. Kutsev¹ • R.A. Zinchenko^{1,2}

Rationale: Cystic fibrosis (CF; OMIM 219700) is a common hereditary disease caused by mutations in the *CFTR* gene (OMIM 602421). The distribution and frequencies of the *CFTR* gene mutations vary considerably between countries and ethnic groups. By now about 11% alleles of the *CFTR* gene remain unidentified after testing for frequent mutations in the Russian patients. A full determination of the mutation spectrum in the *CFTR* gene is necessary to optimize medical and genetic assistance to the population and to implement the achievements of targeted therapy in the treatment of CF patients. **Materials and methods:** The sample included 121 Russian CF patients, in whom testing for 34 routinely analyzed mutations did not identify one ($n=107$) or both ($n=14$) mutant alleles. Assessment of the coding sequence of the *CFTR* gene, including the regions of exon-intron junctions, 5'- and 3'-untranslated regions was performed by the Sanger sequencing method; in addition, the search for large rearrangements was conducted by the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) method. **Results:** In addition to the previously identified, 88 more variants were determined, including 28 missense mutations, 15 nonsense mutations, 18 frameshift mutations (14 deletions, 4 insertions), 14 splicing mutations, 1 in-frame insertion, 1 in-frame deletion, 1 in/del mutation, and 10 large rearrangements (7 deletions, 3 duplications). Twenty three (23) novel variants were

sequenced. Four (4) complex mutant alleles were found. Sixty (60) variants are found once each. One hundred and thirty four (134) of 135 tested mutant alleles were identified. **Conclusion:** Consequent use of the sequencing and MLPA methods has allowed for identification of a high proportion of the tested mutant alleles in CF patients from Russia (134/135, >99%), to detect a significant diversity of the *CFTR* mutation spectrum (88 additional variants, 32 of them novel), a number of repeated mutations (c.2353C>T, c.1240_1244delCAAAA, c.1766+1G>A and c.3929G>A) encountered in 5 or more unrelated patients, which could be included in the panel of routinely analyzed variants in the Russian CF patients; and a high proportion of large rearrangements of the *CFTR* gene.

Key words: cystic fibrosis, *CFTR* gene, gene variants, mutations, large genomic rearrangements, complex allele, Russian population

For citation: Petrova NV, Marakhonov AYu, Vasilyeva TA, Kashirskaya NYu, Kondratyeva EI, Zhekayte EK, Voronkova AYu, Sherman VD, Galkina VA, Ginter EK, Kutsev SI, Zinchenko RA. Characteristics of the mutation spectrum identified by comprehensive investigation of the *CFTR* gene in the Russian patients. Almanac of Clinical Medicine. 2019;47(1):38–46. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-004.

Received 15 October 2018; accepted 22 October 2018; published 07 February 2019

Nika V. Petrova – PhD, Doctor of Biol. Sci., Leading Research Fellow, Laboratory of Genetic Epidemiology¹
✉ 1 Moskvorech'e ul., Moscow, 115522, Russian Federation. Tel.: +7 (499) 320 60 90.
E-mail: npetrova63@mail.ru

Andrey Yu. Marakhonov – PhD (in Biol.), Senior Research Fellow, Laboratory of Genetic Epidemiology¹

Tatyana A. Vasilyeva – Research Fellow, Laboratory of Genetic Epidemiology¹

Nataliya Yu. Kashirskaya – MD, PhD, Professor, Chief Research Fellow, Laboratory of Genetic Epidemiology¹

Elena I. Kondratyeva – MD, PhD, Professor, Head of Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹

Elena K. Zhekayte – MD, Research Fellow, Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹

Anna Yu. Voronkova – MD, PhD, Senior Research Fellow, Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹

Viktoriya D. Sherman – MD, PhD, Senior Research Fellow, Clinical and Consulting Department of Cystic Fibrosis¹

Varvara A. Galkina – MD, PhD, Senior Research Fellow, Laboratory of Genetic Epidemiology¹

Eugeny K. Ginter – PhD, Doctor of Biol. Sci., Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Head¹

Sergey I. Kutsev – MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director¹

Rena A. Zinchenko – MD, PhD, Professor, Head of Laboratory of Genetic Epidemiology¹; Professor of Clinical Pharmacology Course of the Chair of Organizational and Legal Support of Medical and Pharmaceutical Activities, Postgraduate Training Faculty²

Funding

The study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 17-15-01051.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

¹ Medical Genetic Science Center; 1 Moskvorech'e ul., Moscow, 115522, Russian Federation

² Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation