

doi 10.18699/vjgb-26-81

Анализ влияния интронных вариантов с.940+3_940+6del, с.941-3C>G и с.2389+5G>A гена *LDLR* на сплайсинг пре-мРНК с использованием системы минигенов

В.Ю. Данильченко ^{1#} , Д.Е. Иваношук ^{1#}, О.В. Тимощенко ², Е.А. Панина ¹, П.С. Орлов ¹, Е.В. Шахтштейндер ¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 danilchenko_valeri@mail.ru

Аннотация. Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) – аутосомно-кодминантное заболевание, характеризующееся нарушением выведения липопротеинов низкой плотности из кровотока, выраженным повышением уровня общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности в крови и ранним развитием атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. СГХС является наиболее распространенным моногенным заболеванием у человека. Самые частые причины развития заболевания – мутации в трех генах: *LDLR* (OMIM: 143890), *APOB* (OMIM: 107730) и *PCSK9* (OMIM: 607786). Более 80 % случаев СГХС обусловлено патогенными вариантами гена *LDLR*, локализованного на хромосоме 19. У 25–75 % пациентов с фенотипом СГХС патогенный вариант в указанных генах не обнаруживается. Полноэкзомное и таргетное секвенирование генов *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1* было проведено у пациентов с фенотипом СГХС с последующим подтверждением выявленных вариантов секвенированием по методу Сэнгера. У трех неродственных пробандов обнаружены интронные варианты гена *LDLR*, для которых ранее не проводилась функциональная верификация. Целью работы стала функциональная оценка *in vitro* влияния трех интронных вариантов гена *LDLR* (NM_000527.5: с.940+3_940+6del, с.941-3C>G, с.2389+5G>A) на процесс сплайсинга с использованием генетических конструкций – минигенов. Для функциональной верификации *in vitro* были созданы минигены, включающие исследуемые экзоны с фланкирующими интронными областями. Анализ сплайсинга проводили в клеточных линиях HEK293 и HeLa. В результате анализа подтвержден патогенный эффект всех трех выявленных вариантов на сплайсинг пре-мРНК. Делеция четырех нуклеотидов с.940+3_940+6del приводила к образованию двух aberrантных транскриптов – включению шести нуклеотидов интрона 6, а также к полному удержанию интронной последовательности минигена. Вариант с.941-3C>G обуславливал потерю акцепторного сайта сплайсинга и активацию криптического, с включением нуклеотидов интрона 6. Замена с.2389+5G>A приводила к пропуску экзона 16. Функциональный анализ *in vitro* – ключевой инструмент молекулярной верификации интронных вариантов с неопределенной клинической значимостью и в совокупности с клиническими данными помогает в установлении окончательного диагноза.

Ключевые слова: семейная гиперхолестеринемия; ген *LDLR*; интронные варианты; минигены; функциональный анализ; NGS

Для цитирования: Данильченко В.Ю., Иваношук Д.Е., Тимощенко О.В., Панина Е.А., Орлов П.С., Шахтштейндер Е.В. Анализ влияния интронных вариантов с.940+3_940+6del, с.941-3C>G и с.2389+5G>A гена *LDLR* на сплайсинг пре-мРНК с использованием системы минигенов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(5):803-813. doi 10.18699/vjgb-26-81

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке бюджетного проекта № FWNR-2026-0027 Института цитологии и генетики СО РАН. Работы по геномной инженерии и с клеточными линиями выполнялись на базе ЦКП клеточных технологий Института цитологии и генетики СО РАН и финансировались в рамках проекта № FWNR-2026-0024.

In vitro analysis of the effects of intronic variants с.940+3_940+6del, с.941-3C>G, and с.2389+5G>A in the *LDLR* gene on pre-mRNA splicing using a minigene assay

V.Yu. Danilchenko ^{1#} , D.E. Ivanoshchuk ^{1#}, O.V. Timoshchenko ², E.A. Panina ¹, P.S. Orlov ¹, E.V. Shakhtshneider ¹

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 danilchenko_valeri@mail.ru

© Данильченко В.Ю., Иваношук Д.Е., Тимощенко О.В., Панина Е.А., Орлов П.С., Шахтштейндер Е.В., 2026

Авторы внесли равный вклад в эту работу.

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Abstract. Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal codominant disorder characterized by impaired clearance of low-density lipoproteins from the bloodstream, markedly elevated plasma total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol levels, and early onset of atherosclerosis and cardiovascular disease. FH is one of the most common monogenic disorders in humans. The majority of FH cases are caused by pathogenic variants in three genes: *LDLR* (OMIM: 143890), *APOB* (OMIM: 107730), and *PCSK9* (OMIM: 607786). More than 80 % of FH cases are associated with mutations in the *LDLR* gene, located on chromosome 19. In 25–75 % of patients with a clinical FH phenotype, no pathogenic variant is identified in these genes. Whole-exome sequencing and targeted gene panel sequencing of the *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, and *LDLRAP1* genes were performed in patients with an FH phenotype, followed by confirmation of the identified variants by Sanger sequencing. Three unrelated probands were found to carry intronic *LDLR* variants for which functional evidence was previously unavailable. The aim of this study was to functionally assess *in vitro* the effects of three intronic *LDLR* variants (NM_000527.5: c.940+3_940+6del, c.941-3C>G, and c.2389+5G>A) on pre-mRNA splicing using a minigene assay. Minigene constructs encompassing target exons with flanking intronic sequences were generated and transfected into the HEK293 and HeLa cell lines. The deleterious effect of all three variants on pre-mRNA splicing was confirmed. The four-nucleotide deletion c.940+3_940+6del resulted in two aberrant transcripts: inclusion of six nucleotides from intron 6 and complete retention of the minigene intronic sequence. The c.941-3C>G variant caused loss of the canonical acceptor splice site and activation of a cryptic site, with inclusion of intronic nucleotides from intron 6. The c.2389+5G>A variant resulted in exon 16 skipping. Functional *in vitro* analysis is a key tool for the molecular verification of intronic variants of uncertain clinical significance and, in conjunction with clinical data, supports the establishment of a definitive molecular diagnosis.

Key words: familial hypercholesterolemia; *LDLR* gene; intronic variants; minigenes; functional analysis; NGS

For citation: Danilchenko V.Yu., Ivanoshchuk D.E., Timoshchenko O.V., Panina E.A., Orlov P.S., Shakhtshneider E.V. *In vitro* analysis of the effects of intronic variants c.940+3_940+6del, c.941-3C>G, and c.2389+5G>A in the *LDLR* gene on pre-mRNA splicing using a minigene assay. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(5): 803-813. doi 10.18699/vjgb-26-81

Введение

Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) – наследственное заболевание, характеризующееся нарушением выведения липопротеинов низкой плотности из кровотока, выраженным повышением уровня общего холестерина в плазме крови и ранним развитием атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний (Austin et al., 2004; Nordestgaard et al., 2013). СГХС является моногенным заболеванием с преимущественно аутосомно-кодоминантным типом наследования, при котором количество патогенных аллелей определяет тяжесть клинических проявлений (Freiberger, 2026).

Распространенность гетерозиготной формы этого заболевания в общей популяции составляет приблизительно один случай на 311 человек, что делает СГХС одним из наиболее распространенных наследственных заболеваний человека (Hu et al., 2020). Длительная гиперхолестеринемия ведет к преждевременному атеросклерозу и ранним сердечно-сосудистым осложнениям. Своевременная молекулярно-генетическая диагностика помогает верифицировать диагноз и выбрать оптимальную терапию, что способствует снижению смертности от последствий атеросклероза (Ahmad et al., 2026).

Наиболее частые причины развития заболевания – мутации в трех генах: *LDLR* (рецептор липопротеинов низкой плотности, OMIM: 143890), *APOB* (аполипопротеин В, OMIM: 107730) и *PCSK9* (пропротеин-конвертаза субтилизин/кексин типа 9, OMIM: 607786). В 85–90 % молекулярно подтвержденных случаев СГХС причиной заболевания являются мутации в гене *LDLR*. Более 3000 патогенных вариантов этого гена описано у пациентов с нарушением липидного обмена (Ahmad et al., 2026). Ген *LDLR* (19p13.2) состоит из 18 экзонов и кодирует рецептор липопротеинов низкой плотности, состоящий из 860 аминокислот (Hobbs et al., 1990). Основная функция белка *LDLR* – удаление частиц липопротеинов низкой плотности посредством

связывания с аполипопротеином В-100 для обеспечения их лизосомальной деградации и поддержания гомеостаза холестерина в клетке и плазме крови (Brown, Goldstein, 1979; Südhof et al., 1985; Segrest et al., 2001).

У 25–75 % пациентов с фенотипом СГХС патогенный вариант в указанных генах не обнаруживается (Freiberger, 2026). Одной из причин является сложность клинической интерпретации вариантов, выходящих за пределы кодирующих последовательностей и канонических сайтов сплайсинга. Замены в позициях +1/+2 донорного и –1/–2 акцепторного сайтов нарушают сплайсинг пре-мРНК и, как правило, не вызывают затруднений при интерпретации. Варианты области сайта сплайсинга (splice region variant), а также синонимичные замены способны в различной степени нарушать распознавание донорных и акцепторных сайтов сплайсосома, активировать криптические сайты сплайсинга, вызывать пропуск экзона или удержание интрона, приводя к образованию aberrантных транскриптов и потере функции белка (Abramowicz, Gos, 2018). Результаты биоинформатических предсказаний для этих генетических вариантов нередко оказываются противоречивыми, а без функционального подтверждения большинство из них получает статус варианта неопределенной клинической значимости (Walker et al., 2023). Подобные варианты описаны в гене *LDLR* у пациентов с СГХС (Kulseth et al., 2010; Reeskamp et al., 2018, 2021), однако их функциональная верификация остается редкостью.

Для оценки влияния интронных вариантов на сплайсинг в генах со множественными экзонами часто применяется экспериментальный подход с использованием минигенных конструкций. Этот метод эффективен в условиях отсутствия доступной РНК пациентов и основан на анализе влияния варианта в клеточной культуре *in vitro* (Abramowicz, Gos, 2018).

Цель работы – функциональная оценка *in vitro* влияния трех интронных вариантов гена *LDLR* (c.940+3_940+6del,

с.941-3C>G, с.2389+5G>A), выявленных у пациентов с фенотипом семейной гиперхолестеринемии, на процесс сплайсинга с использованием генетических конструкций – минигенов.

Материалы и методы

Пациенты с семейной гиперхолестеринемией, включенные в исследование, были обследованы на базе клинко-диагностического отделения Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины – филиала Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН). Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом НИИТПМ (протокол № 68 от 4 июня 2019 г.). От каждого участника исследования либо от его родителя, или законного представителя получено письменное информированное согласие на обследование и участие в исследовании.

Диагноз семейной гиперхолестеринемии устанавливался с использованием клинко-лабораторных критериев Dutch Lipid Clinic Network (DLCN), представленных в табл. 1, и критериев Simon Broome Register (табл. 2). Сумма

баллов DLCN позволяет классифицировать пациента по категориям вероятности диагноза СГХС (см. табл. 1 и 2) (Ежов и др., 2019).

Диагноз устанавливается на основании суммы баллов, полученных в каждой группе. Внутри группы баллы не суммируются, учитывается только один признак, дающий максимальное количество баллов внутри каждой из групп.

Всем участникам проводили клиническое обследование, ультразвуковую диагностику, забор венозной крови для биохимического анализа (ОХС, ХС-ЛНП, ХС-ЛВП, ТГ, ИА, уровень глюкозы крови натощак) и молекулярно-генетическое исследование.

Геномная ДНК для последующего анализа была выделена из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook, Russell, 2006).

Секвенирование экзона выполняли на платформе FASTASeq 300 (GeneMind Biosciences, Китай). Подготовка библиотек осуществлялась с использованием набора SG GM Ultra-96 (cat. no. #SG_GM_plus-96) (Raissol Bio, Россия). Обогащение экзомных регионов выполнялось с помощью коммерческого набора VANTS Target Capture Core Exome Panel (cat. no. NC001-01, Vazyme, Китай) в

Таблица 1. Критерии DLCN (Dutch Lipid Clinic Network) для диагностики гетерозиготной СГХС у взрослых (18 лет и старше)

Критерий	Балл
Семейный анамнез	
Родственник первой степени родства с ранним (у мужчин < 55 лет; у женщин < 60 лет) сердечно-сосудистым заболеванием атеросклеротического генеза (ИБС, атеротромботический ишемический инсульт, транзиторная ишемическая атака, периферический атеросклероз с атеросклеротическими бляшками, стенозирующими просвет сосуда ≥ 50 %) или	1
Родственник первой степени родства с ХС-ЛНП > 95-го перцентиля	
Родственник первой степени родства с ксантомами сухожилий и/или липоидной дугой роговицы или	2
Дети моложе 18 лет с ХС-ЛНП > 95-го перцентиля	
Индивидуальный анамнез	
У пациента ранняя (у мужчин < 55 лет; у женщин < 60 лет) ИБС	2
У пациента раннее (у мужчин < 55 лет; у женщин < 60 лет) развитие атеротромботического ишемического инсульта, транзиторная ишемическая атака или периферический атеросклероз с атеросклеротическими бляшками, стенозирующими просвет сосуда ≥ 50 %	1
Физикальное обследование	
Сухожильные ксантомы	6
Липоидная дуга роговицы в возрасте < 45 лет	4
Уровень ХС-ЛНП, ммоль/л	
≥ 8.5	8
6.5–8.4	5
5.0–6.4	3
4.0–4.9	1
Анализ ДНК	
Наличие патогенного или вероятно патогенного варианта нуклеотидной последовательности генов <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> или <i>PCSK9</i>	8
Диагноз ставится на основании суммы баллов:	
определенная СГХС – > 8	
вероятная СГХС – 6–8	
возможная СГХС – 3–5	
маловероятная СГХС – ≤ 2	

Таблица 2. Критерии Саймона Брума (Simon Broome Registry)

Определенный диагноз «геСГХС»* ставится, если: ОХС > 6.7 ммоль/л или ХС-ЛНП > 4.0 ммоль/л у пациента младше 16 лет; или ОХС > 7.5 ммоль/л или ХС-ЛНП > 4.9 ммоль/л у пациента старше 16 лет плюс одно из нижеперечисленного: • наличие сухожильных ксантом у пациента или родственника 1-й степени родства (родители, дети, братья, сестры) или у родственника 2-й степени родства (дедушки, бабушки, дяди или тети) - и/или • позитивный тест ДНК-диагностики, подтверждающий наличие патогенного или вероятно патогенного варианта нуклеотидной последовательности в генах <i>LDLR</i>, <i>APOB</i> или <i>PCSK9</i>	Вероятный диагноз «геСГХС» ставится, если: ОХС > 6.7 ммоль/л или ХС-ЛНП > 4.0 ммоль/л у пациента младше 16 лет; или ОХС > 7.5 ммоль/л или ХС-ЛНП > 4.9 ммоль/л у пациента старше 16 лет, плюс одно из нижеперечисленного: • наличие инфаркта миокарда в анамнезе родственника 2-й степени родства до 50 лет, родственника 1-й степени родства до 60 лет - и/или • ОХС > 7.5 ммоль/л у пациента старше 16 лет 1-й или 2-й степени родства или повышение ОХС > 6.7 ммоль/л у пациента или родственника 1-й степени родства в возрасте менее 16 лет
---	---

* геСГХС – гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия.

соответствии с протоколом производителя. В используемый набор были включены последовательности экзонов (~33.9 Мб) с ограниченным покрытием прилегающих интронных областей. Качество библиотек оценивали на платформе Qsep1 (BiOptic, Тайвань), концентрацию определяли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Биоинформационную обработку данных проводили с применением программного обеспечения NGS Wizard (Genomenal, версия 2.11.0, <https://genomenal.ru/>). Картирование на эталонный геном GRCh38 достигало 99.99 % с правильным парным выравниванием 99.98 %; процент дубликатов составил 4.82. Среднее покрытие на нуклеотид было 129×. Нумерация нуклеотидов и экзонов была основана на последовательности GenBank NM_000527.4.

Для анализа вариантов использовали следующие фильтры: качество генотипа ≥ 30, глубина прочтения ≥ 10, частота редкого (minor) аллеля согласно базе данных gnomAD (версия 3.2.1 и версия 4.1.1) (<https://gnomad.broadinstitute.org>) менее 0.01 %. Верификацию выявленных вариантов проводили методом прямого секвенирования по Сэнгеру с использованием генетического анализатора ГТЗ G08 («Генные технологии здоровья», Россия/Китай). Для пациента P03 поиск вариантов выполнен методом таргетного секвенирования с обогащением библиотек на основе гибридизационного захвата с помощью кастомного набора зондов (Roche, Basel, Швейцария) по протоколу, рекомендуемому производителем. Дизайн панели охватывал все экзоны, интроны, предполагаемые промоторные зоны и 5'-нетранслируемые области (5'UTR) четырех генов: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* и *LDLRAP1*. Секвенирование выполняли на платформе GS Junior (Roche).

Для оценки потенциального влияния вариантов гена *LDLR* на сплайсинг был проведен анализ *in silico* с использованием предсказательных программ Human Splicing Finder (<https://genomnis.com/hsf/>), SpliceAI (<https://spliceailookup.broadinstitute.org/>) и MaxEntScan (Shamsani et al., 2019).

Патогенность выявленных вариантов оценивали с помощью рекомендаций ACMG и поправок ClinGen Familial

Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel (Richards et al., 2015; Chora et al., 2022).

Для создания минигенов были выбраны геномные участки гена *LDLR* (NG_009060.1), содержащие экзоны и фрагменты прилегающих интронных областей. В работе использован «вектор-ловушка» (exontrap) pET01 (MoBiTec GmbH, Германия). Для амплификации фрагментов гена *LDLR* с помощью программы Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>) были подобраны олигонуклеотиды (табл. 3). В качестве матрицы использованы образцы геномной ДНК пациентов с исследуемыми вариантами c.940+3_940+6del, c.941-3C>G, c.2389+5G>A.

Амплификацию проводили с применением подобранных праймеров и Q5 ДНК-полимеразы (New England Biolabs, США) с последующей реПЦР с праймерами, включающими сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции *BamHI*, *XbaI* на 5'-концах (см. табл. 3). ПЦР-продукты и вектор Exontrap pET01 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *BamHI*, *XbaI* (New England Biolabs). Полученные фрагменты были клонированы в вектор pET01 по соответствующим сайтам рестрикции с использованием ДНК-лигазы T4 («СибЭнзим», Россия). Затем проводили трансформацию генетических конструкций в *Escherichia coli*. Скрининг колоний, несущих генетические конструкции с исследуемыми вариантами и «диким типом», проводили с применением методов ПЦР со специфичными праймерами на плазмидную часть вектора pET01 (см. табл. 3), гель-электрофореза, секвенирования по методу Сэнгера. Плазмидную ДНК выделяли набором Plasmid Midiprep («Евроген», Россия). Полученные конструкции минигенов были секвенированы для проверки отсутствия дополнительных изменений последовательности.

Анализ влияния вариантов на сплайсинг проведен с использованием клеточной линии HEK293, а затем эксперимент повторили на клеточной линии HeLa. Клеточные линии культивировали в среде DMEM/F12 (Servicebio, Китай) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Cargicorn, Германия) и 2 мМ смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Cargicorn) при 37 °C в инкубаторе с 5 % CO₂. Трансфекцию клеточных линий

Таблица 3. Праймеры, используемые для амплификации фрагментов гена *LDLR*

Амплифицируемый фрагмент	Последовательность праймеров	Размер продукта, п. н.	Сайт рестрикции
Праймеры для амплификации фрагментов гена <i>LDLR</i>			
Экзон 6	F: 5'-TAATGAATCCATTGTCATGCGTTCT-3' R: 5'-GGGCAGAGTGGAGTTCCCAAAA-3'	335	–
Экзон 7	F: 5'-GATGGGTAGGGGCCCGAGA-3' R: 5'-AAACTGAGGCATGAGGGGTTTGG-3'	250	–
Экзон 16	F: 5'-CCCGTGTGGCCTCTCACAGA-3' R: 5'-ATTCCACAGCACGGGACCCA-3'	455	–
Праймеры для молекулярного клонирования			
Экзон 6	F: 5'-TAATGGATCCATTGTCATGCGTTCT-3' R: 5'-GGGCTCTAGAGAGTTCCCAAAA-3'	335	<i>Bam</i> HI <i>Xba</i> I
Экзон 7	F: 5'-GATGGGATCCGGGCCCGAGA-3' R: 5'-AAACTCTAGAATGAGGGGTTTGG-3'	250	<i>Bam</i> HI <i>Xba</i> I
Экзон 16	F: 5'-CCCGGGATCCCTCTCACAGA-3' R: 5'-ATTCTCTAGAACGGGACCCA-3'	455	<i>Bam</i> HI <i>Xba</i> I
Праймеры на последовательность вектора pET01			
кДНК	cDNA primer 1: 5'-GATCCACGATGC-3'	–	–
Экзоны pET01	F: 5'-GATGGATCCGCTTCTGCCCC-3' R: 5'-CTCCGGGCCACCTCCAGTGCC-3'	246	<i>Bam</i> HI <i>Sma</i> I

Примечание. 5'-концы, содержащие сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции, подчеркнуты.

минигенами с исследуемыми вариантами и соответствующими дикими типами проводили в 6-луночных планшетах (Eppendorf, Германия) с использованием Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя.

Через 48 ч из клеток выделяли общую РНК с помощью набора RNA solo («Евроген»). Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой RQ1 RNase-Free DNase (Promega, США) и затем синтезировали кДНК с использованием набора MMLV RT («Евроген») с праймером, специфичным для плазмидной области вектора pET01 (см. табл. 3). Далее с применением полученной кДНК в качестве матрицы проводили амплификацию фрагментов, соответствующих минигенам, с помощью праймеров, специфичных для экзонов вектора pET01 (см. табл. 3). Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 3 % агарозном геле. Нуклеотидная последовательность каждого фрагмента была подтверждена секвенированием по методу Сэнгера.

Создание, редактирование и аннотирование нуклеотидных и белковых последовательностей осуществляли с помощью программы Unipro UGENE 53.1 (Okonechnikov et al., 2012).

Результаты

В результате исследования у трех неродственных пробандов с клинической картиной СГХС идентифицированы варианты гена *LDLR*, предположительно влияющие на сплайсинг пре-мРНК (табл. 4): с.940+3_940+6del, затрагивающий донорный сайт сплайсинга интрона 6, с.941-3C>G, затрагивающий акцепторный сайт сплайсинга интрона 6, и с.2389+5G>A, локализованный в донорном сайте сплайсинга интрона 16. Функциональная верификация данных вариантов в доступной литературе не описана.

Пробанд P01, мужчина 1989 года рождения (36 лет на момент обследования) с выраженной гиперхолестеринемией: уровень общего холестерина (ОХС) составил 9.0 ммоль/л, холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) – 7.2 ммоль/л. Уровень триглицеридов (ТГ) – 1.1 ммоль/л, холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) – 1.3 ммоль/л, что соответствует типичному липидному профилю при семейной гиперхолестеринемии, характеризующемуся выраженным повышением уровня ОХС и ХС ЛНП (оптимальные значения ОХС менее 5.0 ммоль/л, ХС ЛНП – менее 3.0 ммоль/л у пациентов без дополнительных факторов риска) и нормальных значениях ТГ (менее 1.7 ммоль/л).

Семейный анамнез отягощен: у родной сестры пробанда (38 лет на момент обследования) зафиксирован значительно повышенный уровень общего холестерина – 10.0 ммоль/л. У отца также отмечалась гиперхолестеринемия, но данные его лабораторных обследований были недоступны. По шкале DLCN у пробанда 7 баллов, что соответствует «вероятной СГХС» – 6–8 баллов (Ежов и др., 2019). Проведенный молекулярно-генетический анализ выявил у пробанда ранее описанный вариант NM_000527.5: с.940+3_940+6del (GRCh38: chr19:11107514 GGTGA>G) в гене *LDLR*. Отец и сестра пробанда не были обследованы на наличие этого варианта из-за отсутствия их образцов ДНК. Вариант отсутствовал в общей популяции согласно базе данных gnomAD, но был ранее описан у пациентов с семейной гиперхолестеринемией (Rieck et al., 2020; Semenova et al., 2020; Miroshnikova et al., 2021; Nazarenko et al., 2023). На основе критериев ACMG/ClinGen вариант с.940+3_940+6del был классифицирован как вариант с неизвестной клинической значимостью (PM2, PP3, PP4).

Таблица 4. Результаты анализа *in silico* влияния вариантов гена *LDLR* на сплайсинг

Вариант (локализация в гене <i>LDLR</i>)	Геномная координата GRCh38.p14: NC_000019.10	Human Splicing Finder (HSF)	SpliceAI*	MaxEntScan**
c.940+3_940+6del (rs2077315885) интрон 6	19:11107514 GGTGA>G	Потеря донорного сайта сплайсинга: потенциальное изменение сплайсинга (HSF, MaxEnt) Новый донорный сайт сплайсинга: активация скрытого донорного сайта. Потенциальное изменение сплайсинга (HSF)	0.87 Потеря донорного сайта 0.45 Образование нового донорного сайта	Var/Wt < 0 (–0.63) Существенное ослабление донорного сайта
c.941-3C>G (rs2515989714) интрон 6	19:11110649 C>G	Потеря акцепторного сайта сплайсинга: потенциальное изменение сплайсинга (MaxEnt)	0.37 Потеря акцепторного сайта	Var/Wt < 0.0 (–1.18) Существенное ослабление акцепторного сайта
c.2389+5G>A (rs879255191) интрон 16	19:11128090 G>A	Потеря донорного сайта сплайсинга: потенциальное изменение сплайсинга (HSF, MaxEnt)	0.41 Потеря донорного сайта	Var/Wt = 0.50 Ослабление донорного сайта

* Значение дельта-оценки ≥ 0.80 соответствует высокой точности предсказания влияния варианта на сплайсинг; ** значение соотношения Var/Wt < 0.8 свидетельствует в пользу патогенности варианта, оценка ≥ 1.0 – в пользу доброкачественности варианта (Chora et al., 2022).

Вариант NM_000527.5: c.941-3C>G (GRCh38: chr19:11110649 C>G) интрона 6 гена *LDLR* был обнаружен у пробанда P02 и ее матери. Пробанд P02, женщина 2001 года рождения (22 года на момент обследования), максимальный уровень ОХС составил 7.8 ммоль/л, ХС ЛПНП – 5.5 ммоль/л, что превышает 95-й перцентиль референсных значений для женщин этой возрастной группы (Ежов и др., 2019). Семейный анамнез отягощен: у отца клиника ишемической болезни сердца (ИБС) с 45 лет, в 50 лет перенес острый инфаркт миокарда (ОИМ) и операцию коронарного шунтирования, у матери – повышение ОХС до 8 ммоль/л, принимает гиполипидемическую терапию, у родного брата – значительное повышение ОХС до 10 ммоль/л.

При ультразвуковом исследовании брахиоцефальных артерий и артерий нижних конечностей атеросклеротических изменений не выявлено. По критериям DLCN пробанд набрал 4 балла, что соответствует «возможной СГХС» (3–5 баллов). Вариант отсутствовал в общей популяции согласно базе данных gnomAD. Другие члены семьи не были доступны для обследования. Вариант ранее был описан у лиц с семейной гиперхолестеринемией в Испании (Martín-Campos et al., 2018) и России (Meshkov et al., 2021). На основе критериев ACMG/ClinGen вариант c.941-3C>G классифицирован как вариант с неизвестной клинической значимостью (PM2, PP3, PP1_Supporting).

У пробанда P03, 43 года на момент обследования, нами ранее был идентифицирован вариант, локализованный в донорном сайте сплайсинга NM_000527.5: c.2389+5G>A (GRCh38 19:11128090 G>A) интрона 16 гена *LDLR* (Шахтшнейдер и др., 2017). Пробанд с детства страдал артериальной гипертензией, а в 2011 г. перенес ОИМ. Лабораторные данные выявили повышение ОХС до 11.5 ммоль/л, ХС-ЛНП 10.12 ммоль/л, ХС-ЛВП 0.89 ммоль/л, ТГ 1.08 ммоль/л. Семейный анамнез отягощен по ранней ИБС: отец перенес ОИМ в 45 лет, трое братьев отца – ОИМ в возрасте 50–53 года, старший брат пробанда страдал гиперхолестеринемией и ИБС и был

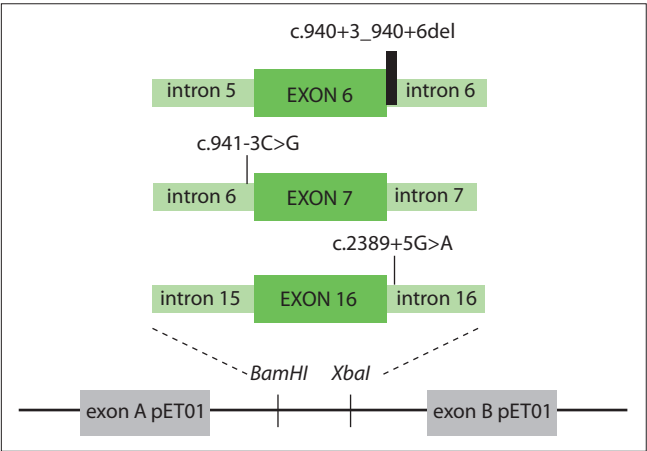


Рис. 1. Схематичное представление мини-генов с вариантами c.940+3_940+6del, c.941-3C>G, c.2389+5G>A.

Фрагменты вектора pET01 показаны серым цветом; фрагменты гена *LDLR* – зеленым. *Bam*HI и *Xba*I – сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции.

носителем такого же варианта. Диагноз: определенная семейная гиперхолестеринемия (по критериям DLCN 17 баллов). При каскадном скрининге вариант был обнаружен у двух из трех дочерей пробанда (7–8 лет), у которых также зафиксирована гиперхолестеринемия (ХС-ЛНП 4.28–4.69 ммоль/л). В популяционной базе gnomAD (версия 4.1.1) описан с частотой 0.0001239 %, гомозиготы не зарегистрированы. Вариант ранее был описан у лиц с семейной гиперхолестеринемией (Semenova et al., 2020). По критериям ACMG/ClinGen, вариант c.2389+5G>A был классифицирован как вариант с неизвестной клинической значимостью (PM2, PP1_Moderate, PP3, PP4).

На основании данных анализа *in silico* для вариантов гена *LDLR*: c.940+3_940+6del, c.941-3C>G, c.2389+5G>A (табл. 4) были созданы мини-гены, каждый из которых включал один экзон и фланкирующие его интронные области (рис. 1). Для мини-гена с вариантом c.940+3_940+6del

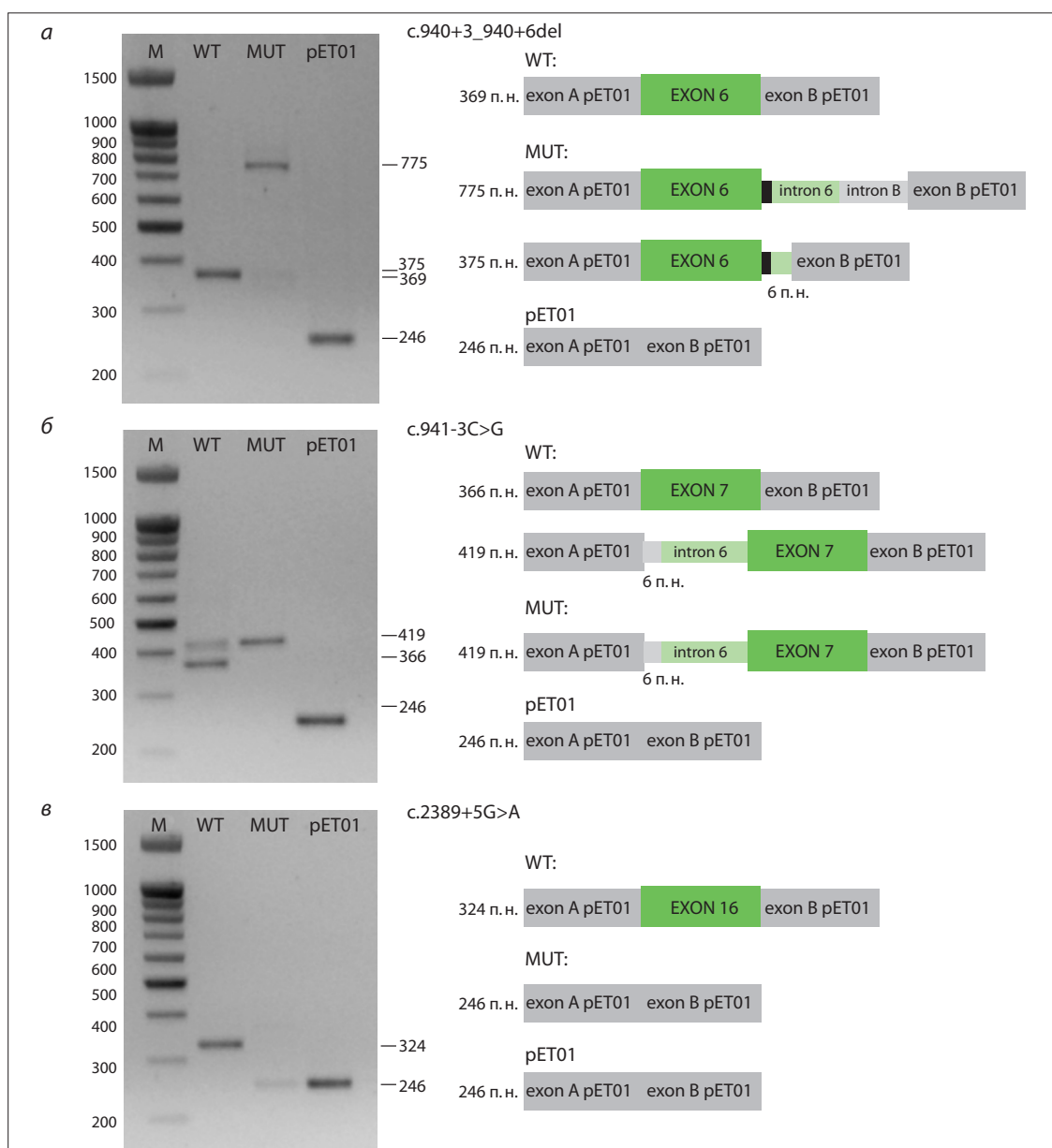


Рис. 2. Результаты анализа *in vitro* минигенов с вариантами с.940+3_940+6del, с.941-3C>G, с.2389+5G>A и соответствующих минигенов дикого типа (WT).

Визуализация фрагментов минигенов в 3 % агарозном геле и схематичное представление результатов сплайсинга. Фрагменты вектора pET01 показаны серым цветом, фрагменты гена *LDLR* – зеленым. *а* – минигены, несущие мутантный (MUT) вариант с.940+3_940+6del и WT; *б* – миниген MUT с.941-3C>G и WT; *в* – миниген MUT с.2389+5G>A и WT; pET01 – пустой вектор pET01; М – 100 + 1500 п.н. маркер. Получено на клеточной линии HEK293.

интронные области составили 116 и 96 п.н., а для варианта с.941-3C>G – всего 51 и 79 п.н., так как интроны гена *LDLR* на 65 % состоят из Alu-повторов (Amsellem et al., 2002).

Вариант с.940+3_940+6del является делецией четырех нуклеотидов с +1 до +4 позиции интрона 6 и, согласно анализу *in silico*, приводит к потере канонического донорного сайта и активации скрытого сайта сплайсинга (см. табл. 4). В результате проверки *in vitro* в минигене с «диким типом» детектирован один продукт размером 369 п.н., соответствующий «правильному» сплайсингу, а именно варианту мРНК, в котором полностью удалены интроны

и сохранен экзон 6. При анализе минигена с вариантом с.940+3_940+6del наблюдалось два основных продукта различной длины (775 и 375 п.н.). Фрагмент 775 п.н. характеризует потерю донорного сайта сплайсинга и включение в мРНК последовательности интрона 6 гена *LDLR* и интрона вектора pET01. При наличии фрагмента размером 375 п.н. происходит потеря канонического сайта и активация скрытого сайта сплайсинга, что приводит к включению шести нуклеотидов интронной области (интрон 6) (рис. 2, *а*). В результате анализа *in vitro* показан патогенный эффект варианта с.940+3_940+6del, приводящий к aberrantному сплайсингу.

Вариант c.941-3C>G локализуется в –3 позиции интрона 6 гена *LDLR*, и в результате анализа *in silico* этого варианта были получены неоднозначные предсказания (см. табл. 4). При анализе *in vitro* в минигене с «диким типом» выявлено два фрагмента, один из которых соответствует «правильному» сплайсингу (366 п.н.), а второй фрагмент содержит химерный интрон, состоящий из шести нуклеотидов интрона вектора pET01 и полностью сохранившегося интрона 6 гена *LDLR* (419 п.н.) (см. рис. 2, б). Сохранение интрона 6 в минигене «дикого типа» может быть обусловлено особенностью конструкции. В минигене с мутантным вариантом c.941-3C>G обнаружен один фрагмент, который также включал в себя химерный интрон (шесть нуклеотидов вектора pET01 и весь интрон 6 гена *LDLR*) (см. рис. 2, б). Таким образом, анализ *in vitro* подтвердил, что наличие варианта c.941-3C>G приводит к потере канонического акцепторного сайта сплайсинга и активации скрытого сайта сплайсинга.

Вариант c.2389+5G>A расположен за пределами канонического сайта сплайсинга в +5 позиции интрона 16. Проведение анализа *in vitro* подтвердило предсказанный эффект *in silico* варианта c.2389+5G>A на сплайсинг (см. табл. 4), а именно потерю канонического донорного сайта сплайсинга. При анализе минигена с вариантом c.2389+5G>A выявлен основной продукт размером 246 п.н., что соответствует пустому вектору pET01 (см. рис. 2, в). Анализ *in vitro* подтвердил патогенный эффект варианта c.2389+5G>A на сплайсинг.

С учетом возможной клеточной специфичности регуляции сплайсинга (Cooper, 2005) эксперимент был повторен на клеточной линии HeLa. Результаты, полученные на этой клеточной линии, полностью воспроизводили данные, полученные на клеточной линии HEK293.

Результаты анализа *in vitro* были использованы для реклассификации трех исследованных вариантов согласно критериям патогенности ACMG (Richards et al., 2015) и ClinGen Familial Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel (Chora et al., 2022). Данные анализа минигенов, несущих варианты c.940+3_940+6del, c.941-3C>G, c.2389+5G>A, подтвердили aberrантный сплайсинг и были использованы как вспомогательное доказательство патогенности (PS3_Supporting).

Варианты c.940+3_940+6del и c.941-3C>G описаны у пациентов с ГХХС в нескольких независимых исследованиях (Martín-Campos et al., 2018; Rieck et al., 2020; Semenova et al., 2020; Meshkov et al., 2021; Miroshnikova et al., 2021; Nazarenko et al., 2023). Тем не менее применение ген-специфических критериев ClinGen (Chora et al., 2022) показывает, что совокупность накопленных доказательств остается недостаточной для реклассификации в категорию вероятно патогенных. В соответствии с критериями ACMG/AMP варианты c.940+3_940+6del (PM2, PS3_Supporting, PP4) и c.941-3C>G (PM2, PS3_Supporting, PP1_Supporting) сохраняют статус вариантов неопределенной клинической значимости.

Вариант c.2389+5G>A был реклассифицирован из варианта неопределенной клинической значимости в веро-

ятно патогенный вариант на основании критериев PM2, PS3_Supporting, PP1_Moderate, PP4.

Обсуждение

В работе представлены результаты анализа *in vitro* влияния трех интронных вариантов гена *LDLR* (c.940+3_940+6del, c.941-3C>G, c.2389+5G>A) на сплайсинг с использованием вектора – «ловушки экзонов» (exon-trap).

Канонические сайты сплайсинга определяют экзон-интронные границы, являются эволюционно консервативными и распознаются сплайсосомой. Любые вариации в последовательностях канонических сайтов могут привести к изменениям взаимодействия между пре-мРНК и субъединицами сплайсосомы (Abramowicz, Gos, 2018). Распознавание 5'-конца сайта сплайсинга субъединицей U1 snRNP осуществляется путем спаривания 5'-конца U1 snRNA с последовательностью пре-мРНК в позициях от –3 до +6 относительно экзон-интронной границы (Malard et al., 2022). Сохранение канонического GT-динуклеотида само по себе не является надежным предиктором эффективности донорного сайта. Определяющим фактором служит термодинамика формирования дуплекса U1 snRNA:5'ss, в котором наличие определенного нуклеотида в позиции +3 и глубже вносит существенный вклад в стабильность дуплекса и силу донорного сайта (Malard et al., 2022).

Вариант c.940+3_940+6del приводит к делеции четырех нуклеотидов, затрагивающих канонический донорный сайт сплайсинга (delG₊₁T₊₂G₊₃A₊₄). В результате такого перераспределения нуклеотидов в интроне в позициях +1 и +2 сохраняется консенсусная последовательность GT, тогда как в позициях +3 и +4 формируется измененный мотив (G₊₁T₊₂C₊₃T₊₄). В результате анализа *in vitro* варианта c.940+3_940+6del подтверждено повреждающее влияние на сплайсинг пре-мРНК. Идентифицировано два aberrантных транскрипта. В первом случае происходило включение шести нуклеотидов интронной области гена *LDLR*, что, по данным анализа *in silico*, приводит к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона в 371 аминокислотной позиции.

Во втором варианте наблюдалось полное удержание интронной последовательности в транскрипте (интрон 6 гена *LDLR* и интрон вектора pET01), что, по всей видимости, приведет к синтезу белка с измененной аминокислотной последовательностью или его деградации. Для подтверждения предполагаемых последствий требуются дополнительные исследования на белковом уровне.

Подобные варианты в гене *LDLR* описаны ранее. Интронный вариант c.1358+3_1358+8del приводит к делеции шести нуклеотидов в позициях +1...+6 при сохраненном GT на +1 и +2 и описан у пробанда с фенотипом семейной гиперхолестеринемии. Несмотря на то что функциональные исследования не проводились, сегрегационные данные говорят о том, что вариант, вероятно, является патогенным (Marduel et al., 2010).

Варианты, локализованные в интронной позиции +5, при стандартном анализе нередко классифицируются как варианты неопределенной клинической значимости

(variant of uncertain significance). Однако позиция +5 донорного сайта участвует в связывании с 5'-концом U1 snRNA и является одной из детерминант силы донорного сайта. Замена в этой позиции может привести к снижению эффективности распознавания сайта сплайсинга сплайсосомай (Malard et al., 2022).

Ранее было исследовано влияние нескольких вариантов гена *LDLR*, локализованных в +5 интронной позиции, на процесс сплайсинга. Так, наличие варианта с.1186+5G>A (интрон 8) приводит к потере донорного сайта сплайсинга и включению интрона 8 в состав мРНК, что приводит к деградации мРНК по механизму нонсенс-опосредованного распада (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) (Etchebarria et al., 2012). При наличии вариантов с.1586+5G>A и с.2140+5G>A были обнаружены небольшие количества мутантных транскриптов и отсутствие влияния на активность белка (Bourbon et al., 2009; Holla et al., 2009). В нашем исследовании замена G на A (с.2389+5G>A) приводила к удалению экзона 16 из транскрипта, и дальнейший анализ *in silico* предсказал делецию аминокислотных остатков с 771-й по 796-ю позицию и образование белка усеченной длины.

Акцепторный сайт сплайсинга характеризуется высококонсервативными нуклеотидами в позициях –2, –1, которые распознаются малой субъединицей U2AF35, тогда как большая субъединица U2AF65 связывается с полипиримидиновым трактом, расположенным выше этих динуклеотидов. Вариабельные позиции вблизи сайта AG, включая –3, могут влиять на силу сайта, поскольку определяют аффинность связывания U2AF-гетеродимера с пре-мРНК (Jenkins et al., 2013; Voith von Voithenberg et al., 2016).

Интронная позиция –3 не является консервативной, однако ее функциональная значимость подтверждена экспериментально. Показано, что мутации в этой позиции составляют около 4 % от всех описанных нарушений в акцепторных сайтах в генах наследственных заболеваний и приводят к активации скрытых сайтов сплайсинга или же удержанию интрона *in vivo* (Vorechovsky, 2006). В нашем исследовании при наличии варианта с.941-3C>G происходит потеря канонического сайта и включение части нуклеотидов интрона 6. Замена цитозина на гуанин в позиции –3 нарушает пиримидиновый состав, характерный для области, прилегающей к акцепторному AG-динуклеотиду.

Поскольку U2AF65 распознает полипиримидиновый тракт выше AG, введение пуринового нуклеотида в непосредственной близости от сайта, вероятно, ослабляет эффективность связывания U2AF-гетеродимера и вызывает активацию криптического сайта сплайсинга. В зависимости от нуклеотидного окружения возможны различные нарушения. Показано, что наличие варианта с.2312-3C>A в интроне 15 у пациентов с СГХС приводит к разрушению 3'-акцепторного сайта сплайсинга и удалению экзона 16 из зрелой мРНК (Liguori et al., 2001). А. Benito-Vicente с коллегами показали (2015), что при наличии варианта с.818-3C>G в интроне 5 происходит включение двух нуклеотидов интрона 5 в мРНК, что, предположительно,

приводит к образованию преждевременного стоп-кодона в аминокислотной позиции 274. Полученные нами данные согласуются с этими наблюдениями.

По данным R. Chong с коллегами (2019), среди вариантов с повреждающим эффектом на сплайсинг (3.8 % от всех проанализированных замен в базе ExAC) 83 % локализовано вне канонических позиций ± 1.2 и равномерно распределено в экзонах и интронах. В работе Ø.L. Holla с коллегами (2009) функциональный анализ 18 интронных вариантов показал, что 14 из них (78 %) оказывают значимый эффект на сплайсинг. Эти данные в совокупности с нашими результатами по гену *LDLR* подчеркивают, что варианты, расположенные за пределами канонических динуклеотидов, нередко являются функционально значимыми, однако без подтверждения *in vitro* сохраняют статус вариантов неопределенной клинической значимости.

Функциональный анализ *in vitro* влияния вариантов на сплайсинг – необходимое, но не всегда достаточное условие для реклассификации варианта с неизвестной клинической значимостью в категорию вероятно патогенных или вероятно доброкачественных. Как показано в настоящей работе, функционально подтвержденный абберантный сплайсинг повышает доказательную базу патогенности, однако итоговая классификация определяется совокупностью критериев ACMG/AMP в рамках ген-специфических правил FH VCEP ClinGen (Chora et al., 2022). Таким образом, функциональный анализ с использованием минигенов является необходимым инструментом верификации патогенности интронных вариантов гена *LDLR*, расположенных вне канонических сайтов сплайсинга, в том числе для установления молекулярного диагноза у пациентов с фенотипом СГХС (Blakes et al., 2022).

Заключение

В настоящем исследовании продемонстрировано, что все три интронных варианта гена *LDLR*, с.940+3_940+6del, с.941-3C>G и с.2389+5G>A, оказывают выраженное повреждающее влияние на сплайсинг пре-мРНК в системе минигенов, приводя к потере канонических сайтов сплайсинга, активации криптических сайтов и формированию абберантных транскриптов. Полученные данные говорят о необходимости проведения функционального анализа для подтверждения патогенности вариантов, оценка которых *in silico* дает противоречивые результаты.

Список литературы / References

- Ежов М.В., Бажан С.С., Ершова А.И., Мешков А.Н., Соколов А.А., Кухарчук В.В., Гуревич В.С., ... Балахонова Т.В., Филиппов А.Е., Ахмеджанов Н.М., Александрова О.Ю., Липовецкий Б.М. Клинические рекомендации по семейной гиперхолестеринемии. *Атеросклероз*. 2019;15(1):58-98
[Ezhov M.V., Bazhan S.S., Ershova A.I., Meshkov A.N., Sokolov A.A., Kukharchuk V.V., Gurevich V.S., ... Balakhonova T.V., Filippov A.E., Akhmedjanov N.M., Aleksandrova O.Yu., Lipovetskiy B.M. Clinical guidelines for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2019;15(1):58-98 (in Russian)]
Шахтшнейдер Е.В., Иванощук Д.Е., Макаренкова К.В., Орлов П.С., Тимощенко О.В., Бажан С.С., Никитин Ю.П., Воевода М.И. Каскадный генетический скрининг в диагностике гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии: клинический случай.

- Российский кардиологический журнал. 2017;22(6):178-179. doi 10.15829/1560-4071-2017-6-178-179 [Shakhshneider E.V., Ivanoshchuk D.E., Makarenkova K.V., Orlov P.S., Timoshchenko O.V., Bazhan S.S., Nikitin Yu.P., Voevoda M.I. Cascade genetic screening in diagnostics of heterozygous familial hypercholesterolemia: clinical case. *Rossiiskii Kardiologicheskii Zhurnal = Russian Journal of Cardiology*. 2017;22(6):178-179. doi 10.15829/1560-4071-2017-6-178-179 (in Russian)]
- Abramowicz A., Gos M. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet*. 2018;59(3): 253-268. doi 10.1007/s13353-018-0444-7
- Ahmad Z., Agarwala A., Cuchel M., Barton Duell P., Hegele R.A., Hudgins L., Jamison A., ... Soffer D.E., Warden B.A., Weintraub W.S., Williams L., Goldberg A.C. Update on familial hypercholesterolemia: an expert clinical consensus from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol*. 2026;20(4):708-737. doi 10.1016/j.jacl.2026.01.011
- Amsellem S., Briffaut D., Carrié A., Rabès J.P., Girardet J.P., Fredenrich A., Moulin P., Krempf M., Reznik Y., Viallettes B., de Gennes J.L., Brukert E., Benlian P. Intronic mutations outside of *Alu*-repeat-rich domains of the *LDL* receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia. *Hum Genet*. 2002;111(6):501-510. doi 10.1007/s00439-002-0813-4
- Austin M.A., Hutter C.M., Zimmern R.L., Humphries S.E. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a HuGE prevalence review. *Am J Epidemiol*. 2004;160(5):407-420. doi 10.1093/aje/kwh236
- Benito-Vicente A., Alves A.C., Etxebarria A., Medeiros A.M., Martin C., Bourbon M. The importance of an integrated analysis of clinical, molecular, and functional data for the genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Genet Med*. 2015;17(12):980-988. doi 10.1038/gim.2015.14
- Blakes A.J.M., Wai H.A., Davies I., Moledina H.E., Ruiz A., Thomas T., Bunyan D., ... Douglas A.G.L.; Genomics England Research Consortium, Splicing and Disease Working Group; Whiffin N., Baralle D., Lord J. A systematic analysis of splicing variants identifies new diagnoses in the 100,000 Genomes Project. *Genome Med*. 2022;14(1):79. doi 10.1186/s13073-022-01087-x
- Bourbon M., Duarte M.A., Alves A.C., Medeiros A.M., Marques L., Soutar A.K. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia: the importance of functional analysis of potential splice-site mutations. *J Med Genet*. 2009;46(5):352-357. doi 10.1136/jmg.2007.057000
- Brown M.S., Goldstein J.L. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76(7):3330-3337. doi 10.1073/pnas.76.7.3330
- Chong R., Insigne K.D., Yao D., Burghard C.P., Wang J., Hsiao Y.E., Jones E.M., Goodman D.B., Xiao X., Kosuri S. A multiplexed assay for exon recognition reveals that an unappreciated fraction of rare genetic variants cause large-effect splicing disruptions. *Mol Cell*. 2019;73(1):183-194.e8. doi 10.1016/j.molcel.2018.10.037
- Chora J.R., Iacocca M.A., Tichý L., Wand H., Kurtz C.L., Zimmermann H., Leon A., ... Hegele R.A., Freiburger T., Knowles J.W., Bourbon M.; ClinGen Familial Hypercholesterolemia Expert Panel. The Clinical Genome Resource (ClinGen) Familial Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel consensus guidelines for *LDLR* variant classification. *Genet Med*. 2022;24(2):293-306. doi 10.1016/j.gim.2021.09.012
- Cooper T.A. Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods*. 2005;37(4):331-340. doi 10.1016/j.ymeth.2005.07.015
- Etxebarria A., Palacios L., Stef M., Tejedor D., Uribe K.B., Oleaga A., Irigoyen L., Torres B., Ostolaza H., Martin C. Functional characterization of splicing and ligand-binding domain variants in the *LDL* receptor. *Hum Mutat*. 2012;33(1):232-243. doi 10.1002/humu.21630
- Freiburger T. Update on genetics of familial hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol*. 2026;37(2):38-44. doi 10.1097/MOL.0000000000001027
- Hobbs H.H., Russell D.W., Brown M.S., Goldstein J.L. The *LDL* receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet*. 1990;24:133-170. doi 10.1146/annurev.ge.24.120190.001025
- Holla Ø.L., Nakken S., Mattingsdal M., Ranheim T., Berge K.E., Defesch J.C., Leren T.P. Effects of intronic mutations in the *LDLR* gene on pre-mRNA splicing: comparison of wet-lab and bioinformatics analyses. *Mol Genet Metab*. 2009;96(4):245-252. doi 10.1016/j.jymgme.2008.12.014
- Hu P., Dharmayat K.I., Stevens C.A.T., Sharabiani M.T.A., Jones R.S., Watts G.F., Genest J., Ray K.K., Vallejo-Vaz A.J. Prevalence of familial hypercholesterolemia among the general population and patients with atherosclerotic cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2020;141(22):1742-1759. doi 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044795
- Jenkins J.L., Agrawal A.A., Gupta A., Green M.R., Kielkopf C.L. U2AF65 adapts to diverse pre-mRNA splice sites through conformational selection of specific and promiscuous RNA recognition motifs. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(6):3859-3873. doi 10.1093/nar/gkt046
- Kulseth M.A., Berge K.E., Bogsrud M.P., Leren T.P. Analysis of *LDLR* mRNA in patients with familial hypercholesterolemia revealed a novel mutation in intron 14, which activates a cryptic splice site. *J Hum Genet*. 2010;55(10):676-680. doi 10.1038/jhg.2010.87
- Liguori R., Bianco A.M., Argiriou A., Paucillo P., Giannino A., Rubba P., De Simone V. *LDL* receptor cDNA sequence analysis in familial hypercholesterolemia patients: 5 novel mutations with high prevalence in families originating from southern Italy. *Hum Mutat*. 2001;17(5):433. doi 10.1002/humu.1122
- Malard F., Mackereth C.D., Campagne S. Principles and correction of 5'-splice site selection. *RNA Biol*. 2022;19(1):943-960. doi 10.1080/15476286.2022.2100971
- Marduel M., Carrié A., Sassolas A., Devillers M., Carreau V., Di Filippo M., Erlich D., ... Junien C.; French ADH Research Network; Boileau C., Varret M., Rabès J.P. Molecular spectrum of autosomal dominant hypercholesterolemia in France. *Hum Mutat*. 2010;31(11): E1811-E1824. doi 10.1002/humu.21348
- Martín-Campos J.M., Plana N., Figueras R., Ibarretxe D., Caixàs A., Esteve E., Pérez A., ... Pintó X., Masana L., Julve J., Blanco-Vaca F.; Xarxa d'Unitats de Lipids i Arteriosclerosi (XULA). Autosomal dominant hypercholesterolemia in Catalonia: correspondence between clinical-biochemical and genetic diagnostics in 967 patients studied in a multicenter clinical setting. *J Clin Lipidol*. 2018;12(6):1452-1462. doi 10.1016/j.jacl.2018.09.002
- Meshkov A., Ershova A., Kiseleva A., Zotova E., Sotnikova E., Petukhova A., Zharikova A., ... Makarov V., Kukharchuk V., Boytsov S., Yudin S., Drapkina O. The *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9* variants of index patients with familial hypercholesterolemia in Russia. *Genes (Basel)*. 2021;12(1):66. doi 10.3390/genes12010066
- Miroshnikova V.V., Romanova O.V., Ivanova O.N., Fedyakov M.A., Panteleeva A.A., Barbitoff Y.A., Muzalevskaya M.V., ... Guseva D.M., Pchelina S.N., Glotov A.S., Zakharova E.Y., Glotov O.S. Identification of novel variants in the *LDLR* gene in Russian patients with familial hypercholesterolemia using targeted sequencing. *Biomed Rep*. 2021;14(1):15. doi 10.3892/br.2020.1391
- Nazarenko M.S., Sleptcov A.A., Zarubin A.A., Salakhov R.R., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A., Elisaphenko E.A., Zubkova E.S., Zheltyshcheva N.V., Ezhov M.V., Kukharchuk V.V., Parfyonova Yu.V., Zakian S.M., Zakharova I.S. Calling and phasing of single-nucleotide and structural variants of the *LDLR* gene using Oxford Nanopore MinION. *Int J Mol Sci*. 2023;24(5):4471. doi 10.3390/ijms24054471
- Nordestgaard B.G., Chapman M.J., Humphries S.E., Ginsberg H.N., Masana L., Descamps O.S., Wiklund O., ... Stalenhoef A.F., Stroes E., Taskinen M.R., Tybjaerg-Hansen A.; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolemia is underdiagnosed and undertreated in the general population:

- guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2013;34(45):3478-3490. doi 10.1093/eurheartj/ehz273
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166-1167. doi 10.1093/bioinformatics/bts091
- Reeskamp L.F., Hartgers M.L., Peter J., Dallinga-Thie G.M., Zuurbier L., Defesche J.C., Grefhorst A., Hovingh G.K. A deep intronic variant in *LDLR* in familial hypercholesterolemia. *Circ Genom Precis Med*. 2018;11(12):e002385. doi 10.1161/CIRCGEN.118.002385
- Reeskamp L.F., Balvers M., Peter J., van de Kerkhof L., Klaaijsen L.N., Motazacker M.M., Grefhorst A., van Riel N.A.W., Hovingh G.K., Defesche J.C., Zuurbier L. Intronic variant screening with targeted next-generation sequencing reveals first pseudoexon in *LDLR* in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2021;321:14-20. doi 10.1016/j.atherosclerosis.2021.02.003
- Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L. 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):405-424. doi 10.1038/gim.2015.30
- Rieck L., Bardey F., Grenkowitz T., Bertram L., Helmuth J., Mischung C., Spranger J., Steinhagen-Thiessen E., Bobbert T., Kassner U., Demuth I. Mutation spectrum and polygenic score in German patients with familial hypercholesterolemia. *Clin Genet*. 2020; 98(5):457-467. doi 10.1111/cge.13826
- Sambrook J., Russell D.W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc*. 2006;2006(1):pdb.prot4455. doi 10.1101/pdb.prot4455
- Segrest J.P., Jones M.K., De Loof H., Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res*. 2001;42(9): 1346-1367. doi 10.1016/S0022-2275(20)30267-4
- Semenova A.E., Sergienko I.V., García-Giustiniani D., Monserrat L., Popova A.B., Nozadze D.N., Ezhov M.V. Verification of underlying genetic cause in a cohort of Russian patients with familial hypercholesterolemia using targeted next generation sequencing. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2020;7(2):16. doi 10.3390/jcdd7020016
- Shamsani J., Kazakoff S.H., Armean I.M., McLaren W., Parsons M.T., Thompson B.A., O'Mara T.A., Hunt S.E., Waddell N., Spurdle A.B. A plugin for the Ensembl Variant Effect Predictor that uses MaxEntScan to predict variant spliceogenicity. *Bioinformatics*. 2019;35(13):2315-2317. doi 10.1093/bioinformatics/bty960
- Südhof T.C., Goldstein J.L., Brown M.S., Russell D.W. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science*. 1985;228(4701):815-822. doi 10.1126/science.2988123
- Voith von Voithenberg L., Sánchez-Rico C., Kang H.S., Madl T., Zanier K., Barth A., Warner L.R., Sattler M., Lamb D.C. Recognition of the 3' splice site RNA by the U2AF heterodimer involves a dynamic population shift. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(46):E7169-E7175. doi 10.1073/pnas.1605873113
- Vorechovsky I. Aberrant 3' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(16): 4630-4641. doi 10.1093/nar/gkl535
- Walker L.C., de la Hoya M., Wiggins G.A.R., Lindy A., Vincent L.M., Parsons M.T., Canson D.M., ... Pesaran T., Karam R., Harrison S.M., Spurdle A.B.; ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group. Using the ACMG/AMP framework to capture evidence related to predicted and observed impact on splicing: recommendations from the ClinGen SVI Splicing Subgroup. *Am J Hum Genet*. 2023;110(7):1046-1067. doi 10.1016/j.ajhg.2023.06.002

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 22.05.2026. После доработки 22.06.2026. Принята к публикации 29.06.2026.