

**ШУБИНА-ОЛЕЙНИК О. А.¹, СИНЯВСКАЯ М. Г.¹, ЛЕВАЯ-СМОЛЯК А. М.²,
МЕРКУЛОВА Е. П.³, ДАНИЛЕНКО Н. Г.¹**¹ *Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,**Республика Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: Oleinik.Olga@yahoo.co.uk*² *Белорусский государственный медицинский университет,**Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83*³ *Белорусская медицинская академия последипломного образования,**Республика Беларусь, 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, e-mail: info@belmapo.by***СПЕКТР МУТАЦИЙ ЯДЕРНОГО ЛОКУСА DFNB1 У ПАЦИЕНТОВ
С НЕСИНДРОМАЛЬНОЙ СНТ, ЖИТЕЛЕЙ БЕЛАРУСИ**

Нарушение слуха (глухота) является этиологически гетерогенным заболеванием, причины возникновения которого можно разделить на две большие группы: генетически обусловленная и приобретенная. В настоящее время с наследственной патологией связывают более половины (50%) случаев врожденной СНТ (сенсоневральная тугоухость) [1]. Среди генетически обусловленной тугоухости в целом аутосомно-рецессивные варианты несиндромальной СНТ (DFNB) являются наиболее частыми и составляют более 70% всей наследственной несиндромальной патологии слуха [2–3].

Около 50% аутосомно-рецессивных форм наследственной несиндромальной тугоухости в различных популяциях связано с локусом DFNB1, картированным на длинном плече 13-й хромосомы (13q11-q12) [4]. Локус DFNB1 содержит два гена — GJB2 и GJB6, оба кодируют белки-коннексины [1]. Данные белки формируют межклеточные контакты между соседними клетками, образуя структуру из шести белковых субъединиц — коннексон. Коннексоны обеспечивают обмен ионов и малых молекул, в тканях улитки — прежде всего рециркуляцию ионов K⁺ [5, 6]. Основной пул мутаций локуса DFNB1 приходится на ген GJB2, кодирующий белок коннексин 26. В настоящее время в гене GJB2 уже описано более 150 патогенных мутаций, а также ряд полиморфных однонуклеотидных замен, роль которых в патогенезе потери слуха пока неясна [7]. Особенностью мутаций гена GJB2 является то, что их спектр и частота значительно варьируют в различных популяциях. Наиболее распространенной мутацией гена GJB2 среди европейцев (кавказоиды) является рецессивная делеция 35delG (делеция одного из пяти гуанинов в позиции с 30 по 35). По разным оценкам, её частота составляет до 70–90%

от всех патогенных мутаций в данном гене [8]. В гетерозиготном состоянии 35delG встречается у 0,5–4,5% нормально слышащих жителей различных стран Европы и европейского населения США и Канады. В результате такой высокой частоты носительства данной мутации вероятность браков между гетерозиготными нормально слышащими носителями достаточно велика. Показано, что почти 80% детей с врожденной патологией слуха имеют слышащих родителей. Кроме делеции 35delG, в различных европейских популяциях встречаются гораздо реже другие мутации GJB2: 167delT, 235delC, 313–314delAA, однако частота каждой из них не превышает 1–2% от всех выявляемых мутаций. В то же время, часть этих мутаций являются мажорными в неевропейских популяциях. Например, делеция 167delT является доминирующей среди евреев ашкенази, а мутация 235delC преобладает среди японских, китайских, монгольских и алтайских пациентов с несиндромальной СНТ.

Одной из проблем при диагностике генетически обусловленных нарушений слуха является тот факт, что 10–50% пациентов с СНТ — носители только одного мутантного аллеля в гене GJB2. В исследованиях, проведенных на выборках пациентов из различных этнических групп, было показано, что крупная делеция del (GJB6-D13S1830), приводящая к выпадению участка или всего гена GJB6, является причиной нарушения слуха у значительной части пациентов — гетерозигот по мутациям в GJB2 [9].

Распространение большинства мутаций локуса DFNB1, вызывающих нарушение слуха, имеет неоднородный популяционный характер. В связи с этим существует необходимость изучения молекулярно-генетических основ наследственного заболевания в конкретной

популяции и/или этнической группе. Такой подход способствует разработке оптимального для данного региона алгоритма диагностики генетических факторов, вызвавших раннюю потерю слуха. Значительная часть исследованных в связи с несиндромальной СНТ белок-кодирующих генов экспрессируется в клетках внутреннего уха, а выявленные в этих генах мутации приводят к периферической тугоухости. Поэтому для нарушений слуха, подтвержденных на молекулярном уровне, показана кохлеарная имплантация. Подобная манипуляция при своевременном проведении в раннем детстве позволяет ребенку приобрести речевые навыки и полноценно общаться с окружающими. Поэтому разработка эффективных методов молекулярной диагностики была и остается актуальной как в медицинском, так и в социальном отношении.

Целью нашего исследования являлось определение спектра мутации локуса DFNB1 у белорусских пациентов с диагнозом «несиндромальная СНТ» для разработки алгоритма молекулярно-генетической диагностики причин врожденной или ранней (долингвальной) потери слуха у жителей Беларуси.

Материалы и методы

Пациенты

Ядерные мутации, приводящие к тугоухости, определялись у 391-го ребенка с сенсоневральной СНТ II, III и IV степени по ВОЗ, подтвержденной методом тональной пороговой аудиометрии. Все дети — учащиеся специальных школ для детей с ослабленным слухом, жители трех регионов Беларуси: Запад (Гродно, Пинск), Восток (Бобруйск), Центр (Минск).

Поиск мутации в гене GJB2

Определение мутаций 35delG (GJB2), IVS1+1G>A (GJB2) проводили методом ПЦР-ПДРФ анализа [10]; определение крупной делеции 309 т.п.н. del (GJB6-D13S1830) в локусе DFNB1 осуществлялось методом мультиплексной ПЦР [10]. Результаты амплификаций оценивались в 2% агарозном геле, результаты ПДРФ анализа — в 7% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием гелей раствором бромистого этидия и регистрацией с помощью документирующей системы GelDoc (Bio-Rad, США) в УФ-излучения (длина волны 312 нм).

Для выявления изменений нуклеотидной последовательности гена GJB2 проводили

SSCP-анализ (метод оценки конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК): проводили ПЦР со специальными праймерами для получения фрагмента гена GJB2 размером 554 п.н., который исследовали на изменение подвижности в 20% полиакриламидном геле (ПААГ) в ходе SSCP анализа [11].

Для определения последовательности нуклеотидов в образцах ДНК с отличиями по SSCP осуществляли секвенирование по Сенгеру с применением набора реактивов ABI Dye Terminator, version 1 (Applied Biosystems) с последующим анализом на приборе 3500 ABI (Applied Biosystems, США). Полученные хроматограммы анализировали с помощью программы Chromas version 2 (Technelysium).

Результаты и обсуждение

Мутация 35delG гена GJB2

Первым этапом исследования являлся прицельный поиск у 391 пациента с СНТ наиболее частой для европейцев мутации — делеции 35delG в гене GJB2. В результате данная мутация выявлена в гомозиготном состоянии у 178 пациентов (46%), в гетерозиготном у 52 пациентов (13%). У 162-го пациента (41%) данная мутация не выявлена. Общая частота мутантного аллеля 35delG в исследованной группе пациентов составила 51,7%. Таким образом, у исследованных пациентов с СНТ мутация 35delG гена GJB2 является мажорной, т.е. представляет собой основную генетическую причину несиндромальной сенсоневральной тугоухости. Результат, полученный для пациентов, жителей Беларуси, согласуется с аналогичными данными, полученными для выборок пациентов как из европейских стран, так и для пациентов из США, Канады и Австралии европейского происхождения [12–14]. Во всех случаях основной причиной несиндромальной потери слуха является мутация 35delG гена GJB2.

Не смотря на то, что у значительной части больных с СНТ удалось установить причину потери слуха, для пациентов, у которых мажорной мутации выявлено не было (162 человека), а также для ее гетерозиготных носителей (51 человек), вопрос о причинах тугоухости все еще оставался невыясненным. Для данной группы пациентов был проведен SSCP анализ 2-го кодирующего экзона гена GJB2, с последующим секвенированием образцов с отличиями по

SSCP; поиск мутации IVS1+1G>A (1-й экзон гена GJB2) и протяжённой делеции del (GJB6-D13S1830) в локусе DFNB1.

Спектр мутаций гена GJB2

Секвенирование позволило установить спектр мутаций 2-го экзона гена GJB2 у пациентов с СНТ, жителей Беларуси. Среди 32 пациентов с генотипом 35delG/N вторая мутация выявлена для 28 человек; две мутации в гене GJB2 определены для четырех пациентов с СНТ с генотипом N/N. Всего определено 7 различных мутаций гена GJB2 (312del14 (7%), 235delC (1,3%), 167delT (1,5%), I82M (0,5%), V27I (0,5%), V37I (0,25%) и E114G (0,25%)). Мутация IVS1+1G>A выявлена у семи исследованных пациентов (1,8%). Частота делеции del (GJB6-D13S1830) в исследованной выборке белорусских пациентов составила 0,76% (3 пациента). Полученные результаты представлены в табл.

Второй по частоте патогенной мутации гена GJB2 в исследованной выборке белорусских пациентов с СНТ является делеция 312del14: она выявлена у 27 пациентов с СНТ различной степени тяжести. У двадцати пациентов данная делеция присутствовала в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией 35delG (35delG/312del14). Гомозиготный вариант мутации 312del14

выявлен у двух пациентов с тяжелой потерей слуха (IV степень). У 5 белорусских пациентов с СНТ делеция 312del14 была единственным выявленным мутантным аллелем гена GJB2 (N/312del14). Данная делеция 14 пар оснований в позиции 312–325 была ранее выявлена у жителей стран Восточной Европы, в том числе среди пациентов с СНТ, жителей России и Польши [15, 16].

Третьей по частоте в выявленном спектре мутаций гена GJB2 является однонуклеотидная замена IVS1 +1 G>A (1,8%). Данная замена часто обнаруживается у пациентов из стран Восточной Европы — носителей одного мутантного аллеля в гене GJB2 [15]. Кроме того, мутация IVS1+1G>A является основной причиной несиндромальной потери слуха у жителей Монголии и Якутии [17, 18]. Среди пациентов с СНТ, жителей Беларуси, выявлено семь пациентов с мутацией IVS1+1G>A.

У шести пациентов мутация IVS1+1G>A находилась в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией 35delG (IVS1+1G>N/35delG). Один из семи пациентов являлся носителем гетерозиготного варианта мутации 312del14 в гене GJB2. Степень потери слуха у носителей мутации IVS1+1G>A варьировала: от средней степени тяжести до полной потери слуха.

Таблица

Частоты мутаций локуса DFNB1 в выборке пациентов, жителей Беларуси с несиндромальной СНТ

Генотип	Количество пациентов с мутациями (% от общего числа пациентов)
Общее число пациентов: 391	
35delG/35delG	178/45,5 %
35delG/312del14	20/5,1 %
IVS1+1G>A/35delG	6/1,53 %
35delG/del (GJB6-D13S1830)	3/0,77 %
312del14/312del14	2/0,51 %
35delG/235delC	3/0,77 %
167delT/235delC	2/0,51 %
35delG/I82M	2/0,51 %
35delG/167delT	2/0,51 %
IVS1 +1 G> A/312del14	1/0,26 %
35delG/V27I+E114G	1/0,26 %
N/35del G	14/3,6 %
N / 312del14	4/1,02 %
N /167delT	2/0,51 %
N/V27I	1/0,26 %
N/V37I	1/0,26 %
Всего носителей GJB2 мутаций:	242/62 %

У белорусских пациентов также были выявлены мутации 235delC и 167delT, характерные для населения Алтая, Средней Азии и евреев ашкенази, соответственно. Доля остальных четырех нуклеотидных замен, выявленных в исследованной группе, не превышает 0,5%.

Спектр мутаций локуса DFNB1 в выборке пациентов с СНТ, проживающих на территории Беларуси, в целом сходен с таковым в соседних странах (Россия, Польша), однако характеризуется рядом особенностей, которые отражены в представленной работе.

Выводы

Проведенное нами комплексное исследование позволило выявить молекулярно-генетические дефекты в локусе DFNB1 и объяснить причину СНТ у 241 пациента из 391, что составило более 60% всей выборки. У остальных 150 человек причина потери слуха либо не связана с генетическими аномалиями, либо они могут быть носителями редких мутаций в других локусах, исследование которых требует

современных высокопроизводительных методов экзомного секвенирования, пока недоступного для повседневной практики. На основе полученных в работе результатов рекомендуется при проведении молекулярно-генетической диагностики причин несиндромальной потери слуха у жителей Беларуси начинать поиск с мутации 35delG (GJB2), затем определять у всех, кроме гомозигот по 35delG, две частые для пациентов с СНТ, жителей Беларуси, мутации в гене GJB2: делеции 312del14 и транзиции IVS1+1G>A. Если вышеперечисленные мутации у пациента отсутствуют или определены в гетерозиготном состоянии, рекомендуется проведение секвенирования 2-го экзона гена GJB2 и детекция делеции 309 т.п.н. del (GJB6-D13S1830) в локусе DFNB1.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ-БРФФИ «Сравнительный анализ вклада мутаций гена GJB2 в возникновение нейросенсорной тугоухости у жителей Беларуси и ряда регионов Сибири (Россия)» 2014–2016, договор № Б14Р-081.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith R. J.H., Shearer A.E., Michael S. H., Van Camp G. Deafness and hereditary hearing loss overview [Electronic resource].— GeneReviews. Seattle (WA), 1993–2014.— Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301607>.— Date of access: 26.02.2015.
2. Van Camp G. Willems P., Smith R. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity // *Am. J. Hum. Genet.*— 1997.— 60, N 4.— P. 758.
3. Morton N. E. Genetic epidemiology of hearing impairment // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1991.— 630, N 1.— P. 16–31.
4. Maw M. A., Allen-Powell D. R., Goodey R. J., Stewart I. A., Nancarrow D. J., Hayward N. K., Gardner R. J. The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population // *Am. J. Hum. Genet.*— 1995.— 57, N 3.— P. 629–635.
5. Maeda S., Nakagawa S., Suga M., Yamashita E., Oshima A., Fujiyoshi Y., Tsukihara T. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution // *Nature.*— 2009.— 458, N 7238.— P. 597–602.
6. Dermietzel R., Hwang K., Spray S. The gap junction family: structure, function and chemistry // *Anat. Embryol. (Berl.)*— 1990.— 182, N 6.— P. 517–528.
7. Hilgert N., Smith R., Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? // *Mutat Res.*— 2009.— 681, N 2.— P. 189–196.
8. Salvinelli F., Casale M., D'Ascanio L., Firrisi L., Greco F., Baldi A. Hearing loss associated with 35delG mutation in Connexin-26 (GJB2) gene: audiogram analysis // *J. Laryngol. Otol.*— 2004.— 118, N 01.— P. 8–11.
9. Del Castillo I., Moreno-Pelayo M. A., Del Castillo F. J., Brownstein Z., Marlin S., Adina Q., Cockburn D. J., Pandya A., Siemerling K. R., Chamberlin G. P., Ballana E., Wuyts W., Maciel-Guerra A. T., Alvarez A., Villamar M., Shohat M., Abeliovich D., Dahl H. H., Estivill X., Gasparini P., Hutchin T., Nance W. E., Sartorato E. L., Smith R. J., Van Camp G., Avraham K. B., Petit C., Moreno F. Prevalence and Evolutionary Origins of the del (GJB6-D13S1830) Mutation in the DFNB1 Locus in Hearing-Impaired Subjects: a Multicenter Study // *Am. J. Hum. Genet.*— 2003.— 73, N 6.— P. 1452–1458.
10. Tóth T., Kupka S., Esmer H., Zeissler U., Sziklai I., Zenner H. P., Blin N., Pfister M. GJB2 mutations in patients with non syndromic hearing loss from Northeastern Hungary // *Hum. Mutat.*— 2004.— 23, N 6.— P. 631–632.
11. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Sekya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 1989.— 86, N 8.— P. 2766–2770.

12. Wu B. L., Lindeman N., Lip V., Adams A., Amato R. S., Cox G., Irons M., Kenna M., Korf B., Raisen J., Platt O. Effectiveness of sequencing connexin 26 (GJB2) in cases of familial or sporadic childhood deafness referred for molecular diagnostic testing // *Genet. Med.* — 2002. — 4, N 4. — P. 279–288.
13. Huculak C., Bruyere H., Nelson T. N., Kozak F. K., Langlois S. V37I connexin 26 allele in patients with sensorineural hearing loss: evidence of its pathogenicity // *Am. J. Medical. Genet.* — 2006. — 140, N 22. — P. 2394–2400.
14. Dahl H. H., Tobin S. E., Poulakis Z., Rickards F. W., Xu X., Gillam L., Williams J., Saunders K., Cone-Wesson B., Wake M. The contribution of GJB2 mutations to slight or mild hearing loss in Australian elementary school children // *J. Med. Genet.* — 2006. — 43, N 11. — P. 850–855.
15. Блинец Е. А., Галкина В. А., Матющенко Г. Н., Кисина А. Г., Маркова Т. Г., Поляков А. В. Изменения в гене коннексина 26-GJB2 — при нарушениях слуха у российских пациентов: результаты многолетней молекулярной диагностики наследственной несиндромальной тугоухости // *Генетика.* — 2012. — 48, № 1. — С. 110–121.
16. Wiszniewska J., Wiszniewski W., Bal J. The principles of molecular diagnosis of recessive forms of prelingual non-syndromic hearing loss // *Med. Wieku. Rozwoj.* — 2002. — 6, N 4. — P. 309–318.
17. Tekin M., Xia X. J., Erdenetungalag R., Cengiz F. B., White T. W., Radnaabazar J., Dangaasuren B., Tastan H., Nance W. E., Pandya A. GJB2 mutations in Mongolia: complex alleles, low frequency, and reduced fitness of the deaf // *Ann. Hum. Genet.* — 2010. — 74, N 2. — P. 155–164.
18. Barashkov N. A., Dzhemileva L. U., Fedorova S. A., Teryutin F. M., Posukh O. L., Fedotova E. E., Lobov S. L., Khusnutdinova E. K. Autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Yakut population isolate in Eastern Siberia: extensive accumulation of the splice site mutation IVS1+1G>A in GJB2 gene as a result of founder effect // *J. Human. Genet.* — 2011. — 56, N 9. — P. 631–639.

SHUBINA-OLEINIK O.¹, SINIAUSKAYA M.¹, LEVAYA-SMALIAK A.², MERKULAVA E.³, DANILENKO N.¹

¹ *Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: Oleinik.Olga@yahoo.co.uk*

² *Belarusian State Medical University, Belarus, 220116, Minsk, Dzerzhinski ave., 83*

³ *Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, Belarus, 220013, Minsk, Brovki str., 3, e-mail: info@belmapo.by*

SPECTRUM OF DFNB1 LOCUS MUTATIONS AMONG BELARUS PATIENTS WITH NON-SYNDROMIC HEARING LOSS

Aims. The genetic nature of sensorineural hearing loss (SNHL) has so far been studied for many ethnic groups in various parts of the world. Among the different subtypes of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment, DFNB1 locus is remarkable for its high frequency in most populations. Here we present the results of study of DFNB1 mutations among 391 young patients with non-syndromic SNHL in order to develop an algorithm of molecular genetic diagnosis of hearing loss for people in Belarus. **Methods.** The PCR-RFLP method was used for detection of three mutations: 35delG and IVS1+1G>A both in GJB2 gene as well as deletion del (GJB6-D13S1830) in DFNB1 locus. For analysis of the GJB2 coding exon SSCP followed by sequencing was carried out. **Results.** We have found that 35delG GJB2 mutation is the main cause of hearing defects in 391 Belarusian patients with SNHL. This point deletion has been detected in 53% of the patients with SNHL. The 312del14 and IVS1+1G>A GJB2 were respectively the second and the third most frequent mutations in the Belarus patients cohort. **Conclusions.** Mutations in DFNB1 locus is the main reason of congenital non-syndromic hearing loss in Belarus: about 60% of all SNHL cases connected to them. Based on the results obtained the recommendations for molecular genetic testing of the causes of non-syndromic hearing loss in Belarus were suggested.

Keywords: Non-syndromic hearing loss, DFNB1 locus, GJB2 gene, mutation frequencies.