

*На правах рукописи*

Зыцарь Марина Вячеславовна

**АЛЛЕЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНА *GJB2* У НАСЕЛЕНИЯ  
РЯДА РЕГИОНОВ СИБИРИ**

03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Новосибирск - 2020

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики человека Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

**Научный руководитель:** **Посух Ольга Леонидовна**  
к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики человека, ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»

**Официальные оппоненты:** **Щербаков Дмитрий Юрьевич**  
д.б.н., заведующий лабораторией геносистематики, ФГБНУ «Лимнологический институт СО РАН», г. Иркутск

**Бабушкина Надежда Петровна,**  
к.б.н., научный сотрудник лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики, ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (Томский НИМЦ), г. Томск

**Ведущее учреждение:** ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева 10

тел: +7(383) 363-49-06 (1321); факс: +7(383) 333-12-78 e-mail: [dissov@bionet.nsc.ru](mailto:dissov@bionet.nsc.ru).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: [www.bionet.nsc.ru](http://www.bionet.nsc.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
д.б.н.

Т.М. Хлебодарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Распространенность врожденной тугоухости / глухоты составляет 1 на 1000 новорожденных и примерно половина всех случаев имеет наследственную этиологию. Наследственные формы глухоты характеризуются высокой генетической гетерогенностью: картировано около 170 локусов и выявлено более 100 генов, отвечающих за нарушение слуха [Hereditary Hearing Loss Homepage. <https://hereditaryhearingloss.org>], причём наибольшее значение имеет ген *GJB2* (13q12.11, GRCh38: 13:20.187.462-20.192.974, MIM121011), который экспрессируется в тканях внутреннего уха и кодирует трансмембранный белок коннексин 26 (Cx26). Молекулы Cx26 образуют межклеточные каналы, которые обеспечивают необходимый для процесса звуковосприятия ионный обмен между соседними клетками в тканях внутреннего уха. При дефектах Cx26 ионный состав эндолимфы не восстанавливается, что приводит к необратимым нарушениям звуковосприятия. У глухих больных европейского происхождения до 50% случаев причиной потери слуха являются мутации гена *GJB2*, несколько реже они обнаруживаются у глухих людей в других регионах мира. Уже описано около 400 вариаций последовательности гена *GJB2* (рецессивные и доминантные мутации, полиморфные и пока не классифицированные варианты) [The Human Gene Mutation Database: Stenson et al., 2017]. Известно несколько мажорных мутаций этого гена, преобладающих в ряде популяций, другие мутации могут обнаруживаться только в отдельных семьях. Многие регионы мира характеризуются специфическим набором полиморфных вариантов гена *GJB2*. В распространенности ряда мажорных рецессивных *GJB2*-мутаций предполагается ключевая роль эффекта основателя. Удалось показать происхождение некоторых мутаций гена *GJB2* от предковых хромосом-основателей, получить грубые оценки их «возраста» и определить регионы их возникновения. Но, несмотря на уже имеющиеся данные, механизмы, определяющие этническую и географическую стратификацию мутационного спектра гена *GJB2* во многих регионах мира, пока неясны. Выявление частоты мутаций и полиморфных вариантов гена *GJB2* в популяциях различного этнического происхождения и изучение закономерностей их накопления в том или ином регионе является актуальным не только для медико-генетических исследований, но позволяет также охарактеризовать эволюционно-исторические особенности генофондов различных популяций.

## **Цель и задачи работы**

**Цель работы:** Изучение аллельного разнообразия гена *GJB2* в популяциях ряда регионов Сибири и анализ гаплотипов хромосомы 13, несущих мажорные *GJB2*-мутации (с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC - у алтайцев и тувинцев и с.35delG - у русских, проживающих в Сибири), для проверки гипотезы о роли эффекта основателя в их происхождении и распространенности на территории Сибири.

### **Задачи:**

1. Гаплотипирование участка хромосомы 13, включающего ген *GJB2*, выявление общих предковых гаплотипов и ориентировочная оценка возраста и центров происхождения мажорных *GJB2*-мутаций: с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC (у тувинцев и алтайцев) и с.35delG (у русских, проживающих в Сибири);
2. Детальное изучение вариантов полной последовательности гена *GJB2* у больных с потерей слуха, имеющих одну рецессивную *GJB2*-мутацию;
3. Изучение ассоциации вариантов с.79G>A (р.V27I, rs2274084) и с.341A>G (р.E114G, rs2274083) гена *GJB2* с потерей слуха;
4. Сравнительная оценка аллельного разнообразия гена *GJB2* в ряде популяций коренного населения Сибири и популяций из мировых баз геномных данных.

**Научная новизна исследования.** Впервые получены оценки спектра и частоты аллелей STR- и SNP-маркёров в выборках глухих индивидуумов, гомозиготных по мажорным рецессивным *GJB2*-мутациям - с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC (у тувинцев и алтайцев) и с.35delG (у русских, проживающих на территории Сибири), и в контрольных выборках тувинцев, алтайцев и русских. Реконструированы предковые гаплотипы участков хромосомы 13, специфичные для каждой из анализируемых мутаций гена *GJB2* у тувинцев и алтайцев, подтверждающие гипотезу о роли эффекта основателя в распространённости этих мутаций на территории Южной Сибири.

Впервые оценена частота гетерозиготного носительства рецессивной мутации с.35delG у здоровых индивидуумов (преимущественно русских) из Новосибирской области, которая составила 4.1%. Эти данные дополняют имеющиеся сведения о распространенности мутации с.35delG в российских популяциях. Реконструкция гаплотипов хромосомы 13, содержащих с.35delG, впервые проведенная на территории Сибири, и сравнительный анализ с ранее опубликованными данными свидетельствуют в пользу

общности происхождения мутации с.35delG на территории России и в Восточной Европе.

Получены грубые оценки «возраста» мутаций с.-23+1G>A и с.35delG, не противоречащие ранее опубликованным данным по другим популяциям; оценка времени возникновения мутации с.516G>C проведена впервые.

Детальное изучение вариантов полной последовательности гена *GJB2* у тувинских больных с потерей слуха, имеющих одну рецессивную *GJB2*-мутацию, показало, что потеря слуха у этих пациентов не связана с геном *GJB2*, а обусловлена другими (генетическими или негенетическими) причинами, и эти больные являются случайными носителями моноаллельной мутации гена *GJB2*.

Впервые проведена верификация *cis*-положения вариантов с.79G>A и с.341A>G гена *GJB2* (аллель с.[79G>A;341A>G]) и получены свидетельства отсутствия ассоциации этого *GJB2*-аллеля с глухотой.

Впервые выполнен сравнительный анализ аллельного разнообразия гена *GJB2* в выборках глухих и здоровых индивидуумов из Тувы и Алтая в сравнении с мировыми популяциями из проекта «1000 геномов» (<http://www.internationalgenome.org>).

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Определение частот патогенетических и полиморфных вариантов гена *GJB2* на территории Сибири и сравнение их с популяциями из мировых баз геномных данных позволяют изучить закономерности их распространенности, а также охарактеризовать эволюционно-исторические особенности генофондов различных популяций. Общность гаплотипов-основателей, выявленная для каждой из мажорных рецессивных мутаций гена *GJB2* (с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC, с.35delG), подтверждает гипотезу о существенном вкладе эффекта основателя в их распространении и накоплении на территории Сибири. Использование метода «молекулярных часов», сравнение с ранее опубликованными данными по различным популяциям и изучение исторических особенностей формирования этнических групп Сибири позволили оценить ориентировочный «возраст» изучаемых мутаций гена *GJB2* и предположить регионы их возникновения. Данные об аллельном разнообразии гена *GJB2* в популяциях коренного населения ряда регионов Сибири вносят существенный вклад в характеристику их генетической структуры. Информация о накоплении определенных мутаций гена *GJB2* у коренного населения Сибири актуальна для разработки специфичной ДНК-диагностики наследуемой глухоты в этом регионе.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Общность гаплотипов, выявленных для каждой из исследованных мажорных мутаций гена *GJB2* (с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC, с.35delG), доказывает существенную роль эффекта основателя в распространенности этих мутаций на территории Сибири.
2. Ген *GJB2* не ассоциирован с потерей слуха у глухих больных с моноаллельными рецессивными *GJB2*-мутациями из Республики Тыва.
3. Варианты с.79G>A и с.341A>G гена *GJB2*, находящиеся в *cis*-положении (аллель с.[79G>A;341A>G]) не ассоциированы с потерей слуха.
4. Особенности разнообразия полиморфных вариантов гена *GJB2* в популяциях Евразии позволяют отнести коренных жителей Тувы и Алтая к восточно-азиатскому кластеру популяций.

**Апробация результатов.** Результаты, полученные в ходе выполнения научно-исследовательской работы, были представлены на: международной научной студенческой конференции (Новосибирск, 2015г.); 7-ом Съезде Российского общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург, 2015г.); 20-ой международной Пущинской школе молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пущино, 2016г.); 9-ой международной школе молодых учёных «Системная биология и биоинформатика», SBV-2017 (Ялта, 2017г.); международной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева (Беляевские чтения) (Новосибирск, 2017г.); 52-ой международной конференции европейского общества генетиков человека (ESHG) (Милан, 2018); 11-ой международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (BGRS) (Новосибирск, 2018г.); международном конгрессе «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (Санкт-Петербург, 2019).

**Объём и структура диссертации.** Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы (121 источник). Общий объём составляет 110 страниц, в том числе 13 таблиц, 22 рисунка и 10 приложений.

**Публикации.** По материалам работы были опубликованы 6 статей в журналах из Перечня ВАК, одна статья подготовлена к печати, а также 10 тезисов конференций.

**Личный вклад автора.** Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Выборки.** Общая выборка больных с потерей слуха составляет 163 человека из Республики Алтай и 228 человек из Республики Тыва. Контрольные выборки индивидуумов, не связанных родством и не имеющих проблемы со слухом, включают 157 тувинцев и 218 алтайцев.

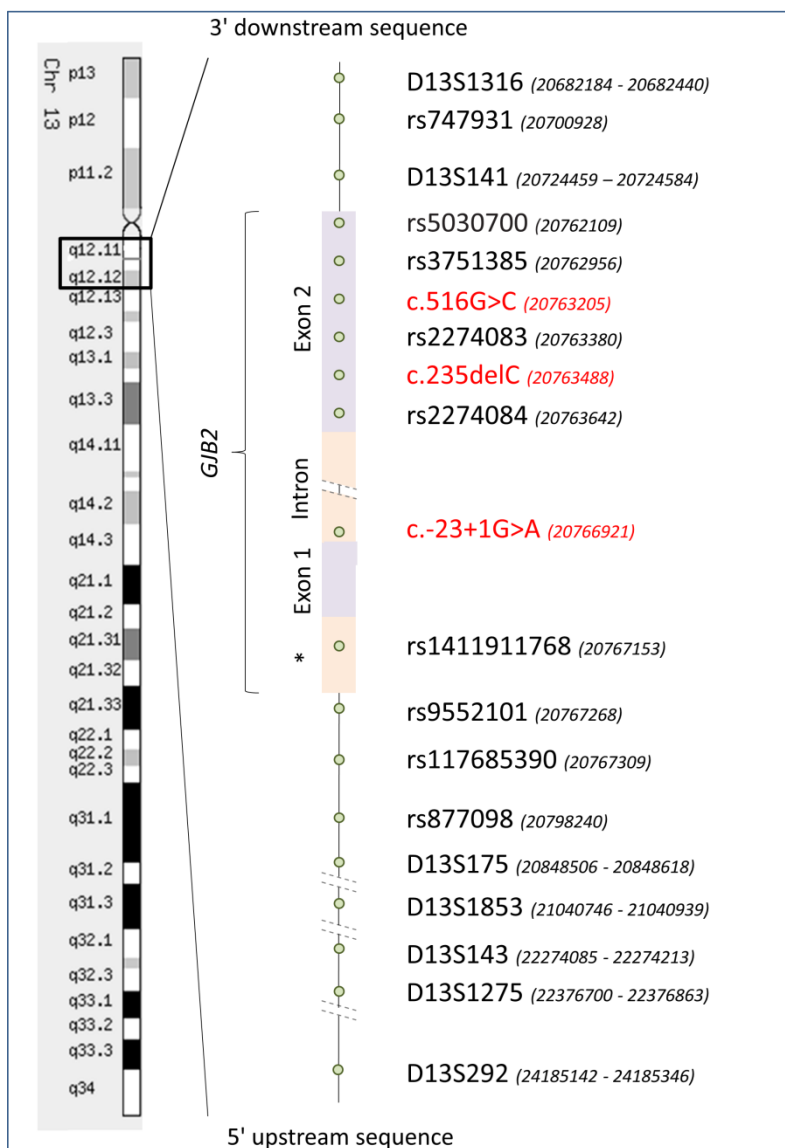
Скрининг мутации с.35delG проводили в образцах ДНК здоровых индивидуумов (преимущественно русских, n=122), проживающих в Новосибирской области, любезно предоставленных В.Н. Максимовым (ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск).

Реконструкция гаплотипов участка хромосомы 13, включающего ген *GJB2*, проведена на выборках больных с потерей слуха, гомозиготных по мутациям с.516G>C (n=18, из них 17 тувинцев и 1 алтаец), с.-23+1G>A (6 тувинцев), с.235delC (4 алтайца) и с.35delG (24 русских), и в контрольных выборках здоровых индивидуумов, не имеющих исследуемые мутации: тувинцы (n=62), алтайцы (n=55) и русские (n=67).

Верификацию *cis*-конфигурации аллелей вариантов с.79G>A (rs2274084) и с.341A>G (rs2274083) гена *GJB2* проводили у индивидуумов, гетерозиготных по этим вариантам (n=64).

**Генотипирование STR- и SNP-маркёров.** Генотипирование STR-маркёров (D13S1316, D13S141, D13S175, D13S1853, D13S143, D13S1275, D13S292) проводили с помощью фрагментного анализа (GeneScan). Генотипирование SNP-маркёров (rs747931, rs5030700, rs3751385, rs2274083, rs2274084, rs1411911768, rs9552101, rs117685390, rs877098) проводили с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа и секвенирования по Сэнгеру. Расположение изученных STR- и SNP-маркёров показано на рисунке 1.

**Верификацию *cis*-конфигурации аллелей вариантов с.79G>A (rs2274084) и с.341A>G (rs2274083)** выполняли с помощью анализа родословных пациентов с потерей слуха, имеющих оба варианта, и молекулярного клонирования с использованием набора CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя. Трансформацию компетентных клеток *E.coli* Mach-1 выполняли методом теплового шока. Проверка конфигурации исследуемых вариантов осуществлялась секвенированием по Сэнгеру.



**Рисунок 1.** Схема расположения анализируемых STR- и SNP-маркёров и гена *GJB2* на хромосоме 13. Мутации гена *GJB2* выделены красным цветом. \* - базальный промотор (128 пн) гена *GJB2*. Позиции (согласно GRCh37.p13) генетических маркёров показаны в скобках.

**Реконструкция STR- и SNP-гаплотипов** была выполнена с использованием пакета программ Arlequin 3.5.2.2 (EM, Expectation-Maximization алгоритм). Границы гаплотипов определяли мерой неравновесия по сцеплению между аллелями маркёров и каждой мутацией:  $\delta = (Pd - Pn)/(1 - Pn)$ , где  $\delta$  – мера неравновесия по сцеплению,  $Pd$  – частота ассоциированного аллеля среди хромосом с мутацией,  $Pn$  – частота этого же аллеля среди хромосом без мутации [Bengtsson, Thomson, 1981].

**Оценка возраста мутаций.** Возраст мутаций рассчитывали по формуле  $g = \log[1 - Q/(1 - Pn)]/\log(1 - \Theta)$ , где  $g$  – число поколений с момента появления мутации в популяции,  $Q$  – доля мутантных хромосом без аллеля гаплотипа-основателя,  $Pn$  – частота аллеля гаплотипа-основателя в популяции,  $\Theta$  - рекомбинационная фракция (1 cM = 1000 тпн). Продолжительность одного поколения считали равной 25 годам [Rich et al., 1995].



**Генетическая дифференциация популяций.** Сравнительную оценку генетического разнообразия гена *GJB2* в выборках коренных жителей Тувы и Алтая (глухие и слышащие индивидуумы) и в популяциях Евразии из проекта «1000 геномов» проводили на основе распределения частот 69 SNPs с использованием метода многомерного шкалирования.

**Статистические методы.** Для статистического анализа результатов использовали точный метод Фишера. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что у коренного населения Южной Сибири (алтайцы, Республика Алтай и тувинцы, Республика Тыва) преобладают три рецессивные мутации гена *GJB2*: с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC; у якутов (Республика Саха/Якутия, Северо-Восточная Сибирь) - мутация с.-23+1G>A; у русского населения этих регионов – мутация с.35delG [Бады-Хоо и др., 2014; Varashkov et al., 2016; Posukh et al., 2005, 2019]. Предполагается, что в наблюдаемой специфике мутационного спектра гена *GJB2*, выявленного в регионах Сибири, существенную роль играет эффект основателя. Для проверки этой гипотезы, с использованием полиморфных генетических маркеров (фланкирующих ген *GJB2* и внутригенных), проведена реконструкция гаплотипов, несущих каждую из анализируемых мутаций гена *GJB2*.

### **Реконструкция гаплотипов для мутаций с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC**

На основе данных о распределении частот аллелей семи STR- и девяти SNP-маркёров у пациентов, гомозиготных по трём мажорным рецессивным *GJB2*-мутациям с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC, и в контрольных выборках тувинцев и алтайцев без этих мутаций были реконструированы общие (предковые) гаплотипы для каждой из этих трёх мутаций, частота которых в выборках гомозиготных индивидуумов, статистически значимо отличалась от контрольных выборок (таблица 1 и таблица 2).

**Таблица 1.** Частота STR-гаплотипов, обнаруженных на хромосомах, несущих мутации с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC, в сравнении хромосомами без мутаций.

Гаплотипы *	Частоты гаплотипов		X <sup>2</sup>	p
	Мутантные хромосомы	Нормальные хромосомы		
<b>Гаплотипы для с.516G&gt;C: D13S1316-D13S141-D13S175-D13S1853-D13S143</b> (~ 1.6 Mb)				
<b>269-124-105-204-125</b>	0.6786	0.0161	79	< 10 <sup>-14</sup>
267-124-105-204-125	0.2857	0.2979	0.0093	0.5462
269-124-105-204-129	0.0357	0	0.67	0.1842
другие гаплотипы	0	0.6860	-	-
<b>Гаплотипы для с.-23+1G&gt;A: D13S141-D13S175-D13S1853-D13S143-D13S1275-D13S292</b> (~ 3.5 Mb)				
<b>124-105-204-125-208-209</b>	0.8333	0.0538	53	< 10 <sup>-8</sup>
124-105-204-125-202-211	0.0833	0.0108	0.66	0.1695
124-105-204-125-210-209	0.0833	0.0472	0.011	0.4586
другие гаплотипы	0	0.8882	-	-
<b>Гаплотипы для с.235delC: D13S1316-D13S141-D13S175-D13S1853-D13S143-D13S1275</b> (~ 1.7 Mb)				
<b>267-124-105-204-125-210</b>	1.0	0	103	< 10 <sup>-11</sup>
другие гаплотипы	0	1.0	-	-

\* - жирным шрифтом выделены наиболее распространённые STR-гаплотипы.

**Таблица 2.** Частота SNP-гаплотипов, обнаруженных на хромосомах, несущих мутации с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC, в сравнении с хромосомами без мутаций.

Гаплотипы *	Частоты гаплотипов		X <sup>2</sup>	p
	Мутантные хромосомы	Нормальные хромосомы		
<b>Гаплотипы для с.516G&gt;C: rs747931-rs5030700-rs3751385-rs2274083-rs2274084-rs1411911768-rs9552101-rs117685390-rs877098</b>				
<b>Т-С-С-А-Г-Т-Г-Т-С</b>	1	0.0217	120	< 10 <sup>-26</sup>
другие гаплотипы	0	0.9783	-	-
<b>Гаплотипы для с.-23+1G&gt;A: rs747931-rs5030700-rs3751385-rs2274083-rs2274084-rs1411911768-rs9552101-rs117685390-rs877098</b>				
<b>С-С-С-А-Г-С-Г-Т-С</b>	0.9167	0.0532	64	< 10 <sup>-10</sup>
С-С-С-А-Г-С-Г-Т-Т	0.0833	0.1540	0.047	0.4488
другие гаплотипы	0	0.7928	-	-
<b>Гаплотипы для с.235delC: rs747931-rs5030700-rs3751385-rs2274083-rs2274084-rs1411911768-rs9552101-rs117685390-rs877098</b>				
<b>Т-С-С-А-Г-С-Г-Т-Т</b>	1	0.1587	26	1
другие гаплотипы	0	0.8413	-	-

\* - жирным шрифтом выделены наиболее распространённые SNP-гаплотипы.

**STR-гаплотипы.** Данные генотипирования семи STR-маркёров были использованы для реконструкции STR-гаплотипов, границы которых определялись с помощью неравновесия по сцеплению между аллелями STR-маркёров и каждой мутацией.

Для мутации с.516G>C было выявлено три гаплотипа (таблица 1) размером ~ 1.6 Mb, в состав которых входило пять STR-маркёров (D13S1316, D13S141, D13S175, D13S1853, D13S143). Гаплотип 269-124-105-204-125 оказался наиболее распространённым (67.9%) среди хромосом, несущих мутацию с.516G>C, в то время как на хромосомах без мутации его частота составила 1.6% ( $p < 10^{-14}$ ).

Для мутации с.-23+1G>A было обнаружено значительное неравновесие по сцеплению с аллелями шести STR-маркёров (D13S141, D13S175, D13S1853, D13S143, D13S1275, D13S292) и выявлено три гаплотипа размером ~ 3.5 Mb (таблица 1). Частота гаплотипа 124-105-204-125-208-209 была существенно выше ( $p < 10^{-8}$ ) у пациентов (83.3%) по сравнению с контрольной выборкой (5.4%).

На всех хромосомах с мутацией с.235delC (100%) был обнаружен только один гаплотип 267-124-105-204-125-210 (D13S1316-D13S141-D13S175-D13S1853-D13S143-D13S1275) размером ~ 1.7 Mb, отсутствующий на хромосомах без мутации ( $p < 10^{-11}$ ) (таблица 1).

**SNP-гаплотипы.** Высокие показатели неравновесия по сцеплению были получены между всеми мутациями (с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC) и аллелями девяти SNP-маркёров, как внутригенных (rs5030700, rs3751385, rs2274083, rs2274084, rs1411911768), так и фланкирующих ген *GJB2* (rs747931, rs877098, rs9552101, rs117685390).

У больных, гомозиготных по мутации с.516G>C, был обнаружен только один гаплотип T-C-C-A-G-T-G-T-C (100%), частота которого в контрольной выборке составляет 2.1% ( $p < 10^{-26}$ ) (Таблица 2).

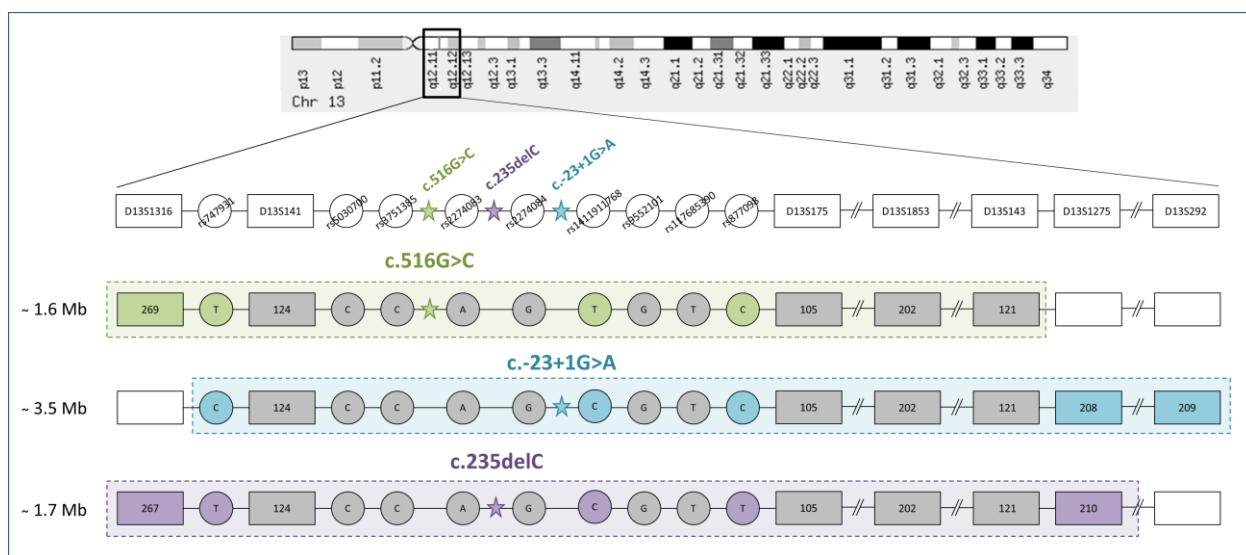
У больных, гомозиготных по мутации с.-23+1G>A, найдено два SNP-гаплотипа (Таблица 2). Гаплотип C-C-C-A-G-C-G-T-C значительно чаще встречается ( $p < 10^{-10}$ ) в выборке пациентов (91.7%) по сравнению с контрольной выборкой (5.9%).

Различия в частоте гаплотипа T-C-C-A-G-C-G-T-T (100%), выявленного у гомозигот по с.235delC, и в контрольной выборке (16.1%), не являются статистически значимыми (Таблица 2).

Сравнительный анализ аллелей SNP-маркёров, входящих в SNP-гаплотипы, выявил три SNP-маркёра (rs747931, rs1411911768, rs877098) со специфичными аллелями, отчетливо дифференцирующие наиболее общие

гаплотипы для каждой из трёх анализируемых мутаций с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC (рисунок 2).

Общность гаплотипов, реконструированных для каждой мажорной мутации гена *GJB2* (с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC), характерных для коренного населения Тувы и Алтая, свидетельствует о существенной роли эффекта основателя в распространённости этих мутаций в изучаемых регионах Сибири.



**Рисунок 2.** Схематическое представление выявленных гаплотипов-основателей для каждой из трех анализируемых мутаций: с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC. Гаплотипы, общие для каждой мутации, ограничены пунктирной линией. Аллели маркёров, входящие в состав гаплотипов-основателей, обозначены серым цветом. Аллели маркёров, являющиеся отличительной особенностью гаплотипа для той или иной мутации (с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC), выделены цветом соответствующей мутации. STR-маркёры обозначены прямоугольниками, SNP-маркёры – кругами.

### **Возраст экспансии гаплотипов-основателей с мутациями с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC**

Используя подход «молекулярных часов», мы оценили «возраст» гаплотипа-основателя с мутацией с.516G>C в гене *GJB2* в ~ 700 лет. Регион распространения мутации с.516G>C ограничен Тувой, Алтаем и Монголией [Бады-Хоо и др., 2014; Posukh et al., 2005, 2019; Tekin et al., 2010]. Существенное накопление мутации с.516G>C на территории Тувы предполагает, что этот регион мог быть местом её возникновения. «Возраст» мутации с.-23+1G>A на территории Тувы был оценен нами в ~ 4800-2200 лет. Ранее была получена оценка «возраста» экспансии мутации с.-23+1G>A в Якутии (~ 800 лет) [Barashkov et al., 2011]. Полученные нами данные соответствует гипотезе о привнесении мутации с.-23+1G>A миграционными потоками тюркоязычных народов из южных регионов Сибири в Якутию.

Оценить возраст мутации с.235delC на Алтае и в Туве в настоящее время пока не удалось.

### Частота гетерозиготного носительства мутации с.35delG на территории России

Частота гетерозиготного носительства характерной для европейских популяций мутации с.35delG у здоровых индивидуумов (преимущественно русских), проживающих в Новосибирской области (Западная Сибирь), составила 4.1%. Эти данные дополнили сводку о частоте гетерозиготного носительства с.35delG на территории России и прилежащих регионов. На территории России распределение частоты гетерозиготного носительства с.35delG имеет выраженную этно-географическую специфику. Для европеоидного населения России характерны высокие значения этого показателя (в среднем, около 4-5%) с тенденцией снижения с запада на восток, а территория Сибири, вероятно, является восточной «конечной точкой» распространенности мутации с.35delG в Евразии (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** Частота гетерозиготного носительства мутации с.35delG (*GJB2*) на территории Российской Федерации и в некоторых странах бывшего Советского Союза. Визуализация частот осуществлена с использованием программы Surfer v9.9.785.

Частоты гетерозиготного носительства с.35delG получены из литературных данных, опубликованных по 2017 г. включительно. Цифрами от 1 до 36 обозначены анализируемые выборки (регион исследования или этническая принадлежность обследованных, указанные в оригинальном исследовании). 1-4 – Северная и Восточная Европа: 1 – Эстония (4.4-4.5%), 2 – Литва (1.0%), 3 – Беларусь (3.4-6.2%), 4 – Украина (3.3-4.1%); 5-8 – Северо-Западная часть России: 5 – жители Калининграда и

Калининградской области (7.5%), 6 – жители Пскова и Псковской области (2.0-4.7%), 7 – жители Санкт-Петербурга и Ленинградской области (3.3-5.9%), 8 – жители Архангельска и Архангельской области (5.0%); 9-10 – Центральная (Европейская) часть России: 9 – жители различных регионов России (3.8-5.1%); 10 – русские (Кировская область) (3.8%); 11-19 – Волго-Уральский регион России: 11 – коми (Волго-Уральский регион России) (0%), 12 – марийцы (Республика Мари-Эл) (2.0-2.6%), 13 – удмурты (Республика Удмуртия) (0.5-3.7%), 14 – мордвины (Республика Мордовия) (5.7-6.2%), 15 – чувашаи (Чувашская Республика) (0-2.6%), 16 – русские (Волго-Уральский регион России) (5.0%), 17 – татары (Республика Татарстан) (1.0-2.6%), 18 – башкиры (Республика Башкортостан) (0-3.6%), 19 – русские (Екатеринбург) (2.2%); 20-25 – Сибирь: 20 – жители Новосибирска, Западная Сибирь (преимущественно русские) (4.1%), 21 – алтайцы (Республика Алтай, Южная Сибирь) (0%), 22 – тувинцы (Республика Тыва, Южная Сибирь) (0%), 23 – буряты (Республика Бурятия, Юго-Восточная Сибирь) (0%), 24 – якуты (Республика Саха/Якутия, Восточная Сибирь) (0.4-1.0%), 25 – русские (Республика Саха/Якутия, Восточная Сибирь) (2.5%); 26-31 – Юго-Западная часть России (включая Северный Кавказ): 26 – жители Ростовской области (русские) (2.9%), 27 – черкесы (Карачаево-Черкесская Республика, Северный Кавказ) (1.3-2.0%), 28 – карачаевцы (Карачаево-Черкесская Республика, Северный Кавказ) (0.3%), 29 – ингуши (Республика Ингушетия, Северный Кавказ) (0-2.0%), 30 – чеченцы (Республика Ингушетия и Чеченская Республика, Северный Кавказ) (0-0.7%), 31 – авары (Республика Дагестан, Северный Кавказ) (0%); 32-33 – Южный Кавказ: 32 – абхазы (Абхазия) (3.8%), 33 – армяне (Армения) (3.7%); 34-36 – Центральная Азия: 34 – узбеки (Узбекистан) (0%), 35 – казахи (Казахстан) (0.8%), 36 – уйгуры (Казахстан) (0.9%).

### **Реконструкция гаплотипов для мутации с.35delG**

Рецессивная мутация с.35delG гена *GJB2* широко распространена в европейских популяциях. Исследования, проведенные на Алтае, в Туве и Якутии, показали, что у европеоидного населения этих регионов преобладает мутация с.35delG [Бады-Хоо и др., 2014; Varashkov et al., 2016; Posukh et al., 2005].

Для проверки гипотезы о единстве происхождения мутации с.35delG, на основе данных генотипирования STR-локусов D13S141, D13S175, D13S1853, фланкирующих ген *GJB2*, и внутригенного SNP (rs3751385), нами были реконструированы гаплотипы, несущие с.35delG, у проживающих на территории Сибири глухих пациентов, гомозиготных по этой мутации. Общая доля двух наиболее частых гаплотипов D13S141-с.35delG-D13S175-D13S1853 (размером ~ 316 kb) (126-T-с.35delG-105-202 и 124-T-с.35delG-105-202) составила 52.5%.

Сравнительный анализ обнаруженных гаплотипов с мутацией с.35delG, проведенный в географически удаленных друг от друга регионах Евразии: в Сибири, Волго-Уральском регионе (Россия) и Республике Беларусь (Восточная Европа), выявил их консервативность, что свидетельствует об общности происхождения мутации с.35delG. Современное европеоидное население Сибири сформировалось в результате многократных миграционных потоков из европейской части России. Грубая датировка

экспансии мутации с.35delG на территории Сибири (~ 8100-4800 лет) является, вероятно, отражением сложных процессов раннего формирования современного населения Европы (включая европейскую часть России). Совокупность полученных нами данных не противоречит ранее выдвинутой гипотезе о возникновении с.35delG на территории Ближнего Востока и Средиземноморья ~ 10000-14000 лет назад и ее распространении с миграционными потоками по территории Европы.

### **Глухие индивидуумы с одной рецессивной мутацией в гене *GJB2***

Определенной проблемой молекулярной диагностики потери слуха является выявление у пациентов с нарушениями слуха только одного мутантного рецессивного аллеля в гене *GJB2*. Рутинный мутационный скрининг гена *GJB2* обычно фокусируется на кодирующей области (экзон 2) и сайте сплайсинга, расположенного рядом с некодирующим экзоном 1, и не затрагивает upstream-район гена *GJB2*, а также важной для транскрипции области базального промотора (128 пн), включающего два GC-бокса и ТАТА-бокс. В Республике Тыва выявлено 18 пациентов, у которых была обнаружена только одна рецессивная *GJB2*-мутация в сочетании либо с нормальным аллелем, либо с полиморфными вариантами гена *GJB2*. Чтобы найти дополнительные (возможно, пропущенные при рутинном анализе гена *GJB2*) варианты в потенциально регуляторной области *GJB2*, мы просеквенировали upstream-район гена *GJB2*, включающий в себя базальный промотор, проанализировали область *GJB2*, где расположен акцепторный сайт сплайсинга, и не обнаружили описанных патогенетических вариантов. Кроме того, в этой группе пациентов не было выявлено наиболее распространенной крупной делеции *GJB6-D13S1830* [del Castillo et al., 2002].

При сравнении общей частоты рецессивных *GJB2*-мутаций в группе пациентов с моноаллельными *GJB2*-мутациями и неимеющих мутаций в гене *GJB2* (0.0479) и в контрольной выборке тувинцев (0.0478) не было найдено статистически значимых различий, что свидетельствует о том, что потеря слуха у пациентов обусловлена другими, чем ген *GJB2*, причинами (генетическими или негенетическими).

### **Изучение ассоциации вариантов с.79G>A (p.V27I, rs2274084) и с.341A>G (p.E114G, rs2274083) гена *GJB2* с потерей слуха**

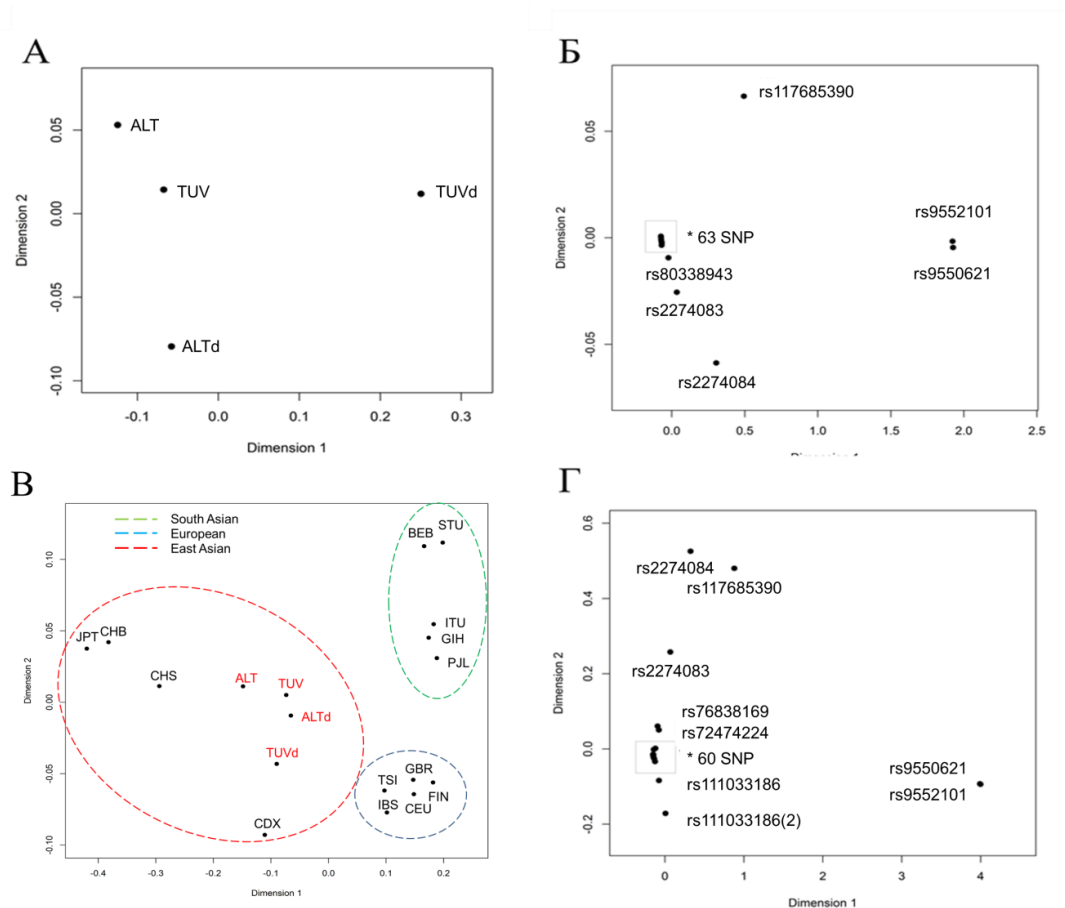
У тувинцев и алтайцев (как у глухих пациентов, так и в контрольных выборках) с относительно высокой частотой были выявлены варианты с.79G>A и с.341A>G гена *GJB2*. В настоящее время нет однозначного мнения об ассоциации этих специфичных для азиатских популяций вариантов с потерей слуха. Однако, существует предположение, что одновременное

присутствие двух этих вариантов у индивидуума может приводить к потере слуха [Choi et al., 2011; Pandya et al., 2003 и др.]. Для анализа ассоциации вариантов с.79G>A и с.341A>G с потерей слуха мы с использованием анализа родословных и молекулярного клонирования верифицировали их *cis*-конфигурацию (аллель с.[79G>A;341A>G]) и проанализировали частоту аллеля с.[79G>A;341A>G] в изучаемых выборках. Частота с.[79G>A;341A>G] в контрольных выборках (4.78% и 8.68%, соответственно для тувинского и алтайского контроля) превышает его частоту в выборках больных соответствующей этнической принадлежности (3.93% и 4.73%, соответственно для тувинских и алтайских пациентов). Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о вероятном отсутствии ассоциации вариантов с.79G>A и с.341A>G с потерей слуха.

### **Генетическая дифференциация популяций Евразии на основе вариаций в последовательности гена *GJB2***

Для сравнительной оценки генетического разнообразия гена *GJB2* в выборках коренных жителей Тувы и Алтая (глухие и слышащие индивидуумы) и популяций Евразии из проекта «1000 геномов» (<http://www.internationalgenome.org>) было выбрано 69 SNPs, локализованных в кодирующем и некодирующем районах гена. Для визуализации дифференциации популяций был использован метод многомерного шкалирования. Несмотря на относительно небольшое количество анализируемых маркёров (ограниченное геном *GJB2*), наблюдалась выраженная дифференциация между популяциями Европы, Южной и Восточной Азии. Исследуемые выборки тувинцев и алтайцев (глухие пациенты и контроль) располагаются в восточно-азиатском кластере популяций. Наибольший вклад в дифференциацию популяций внесли девять маркёров (rs9552101, rs9550621, rs117685390, rs2274084, rs2274083, rs76838169, rs72474224, rs111033196, rs111033186), пять из которых (rs9552101, rs9550621, rs117685390, rs2274084, rs2274083) являются определяющими в дифференциации выборок тувинцев и алтайцев (рисунок 4).





**Рисунок 4.** Дифференциация изучаемых популяций на основе варибельности 69 SNPs. **А** – генетическая дифференциация четырёх выборок из Тувы и Алтая (Южная Сибирь): алтайские глухие пациенты (ALTd), алтайская контрольная выборка (ALT), тувинские глухие пациенты (TUVd), тувинская контрольная выборка (TUV); **Б** – распределение 69 SNPs в 4 выборках из Южной Сибири; **В** – дифференциация 19 популяций Евразии: 4 выборки из Тувы и Алтая (ALTd, ALT, TUVd, TUV) и 15 популяций из проекта «1000 геномов» (CHB - Han Chinese, JPT – Japanese, CDX - Dai Chinese, CHS - Southern Han Chinese, CEU - CEPH, GIH - Gujarati, STU - Sri Lankan, BEB - Bengali, ITU - Indian, FIN - Finnish, GBR - British, TSI - Tuscan, PJI – Punjabi, IBS - Spanish). **Г** – распределение 69 SNPs среди 19 популяций.

## ВЫВОДЫ

1) Впервые получены оценки спектра и частоты аллелей генетических маркеров (семь STRs и девять SNPs, фланкирующих ген *GJB2* и внутригенных), в популяциях алтайцев и тувинцев, отражающие особенности генетического разнообразия коренного населения Алтая и Тувы.

2) Реконструированы специфичные гаплотипы, несущие каждую из мажорных мутаций гена *GJB2* (с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC), выявленных у коренного населения Тувы и Алтая. Общность гаплотипов, соответствующих каждой из мажорных *GJB2*-мутаций, свидетельствует о существенной роли эффекта основателя в распространенности этих мутаций в изучаемых регионах Сибири.

3) Получены грубые оценки «возраста» гаплотипа-основателя с мутацией с.516G>C (~ 700 лет), регион распространения которой ограничен Тувой, Алтаем и Монголией. Существенное накопление мутации с.516G>C на территории Тувы предполагает этот регион местом её возникновения. Данные об оценке «возраста» мутации с.-23+1G>A на территории Тувы (~ 4800-2200 лет) соответствуют выдвинутой ранее гипотезе о привнесении этой мутации на территорию Якутии ~ 800 лет назад миграционными потоками тюркоязычных народов из южных регионов Сибири.

4) Скрининг рецессивной *GJB2*-мутации с.35delG, характерной для европейских популяций, у здоровых индивидуумов (преимущественно русских), проживающих в Новосибирской области, выявил высокую частоту гетерозиготного носительства с.35delG (4.1%).

5) Обнаружено сходство двух наиболее частых гаплотипов, реконструированных у носителей мутации с.35delG в Сибири, с с.35delG-гаплотипами на территории Волго-Уральского региона России и Беларуси, что свидетельствует в пользу общего происхождения с.35delG в этих географически отдаленных регионах. Грубая датировка «возраста» с.35delG на территории Сибири (~ 8100-4800 лет) соответствует известной гипотезе об общем происхождении этой мутации на Ближнем Востоке или в Средиземноморье ~ 10000-14000 лет назад и ее распространении по Европе с неолитическими миграциями.

6) Детальное изучение вариантов полной последовательности гена *GJB2* (включая некодирующие области) у глухих больных с моноаллельными рецессивными *GJB2*-мутациями, показало отсутствие ассоциации гена *GJB2* с потерей слуха у этих пациентов.

7) Показано отсутствие ассоциации вариантов с.79G>A и с.341A>G последовательности гена *GJB2*, находящихся в *cis*-положении (аллель с.[79G>A;341A>G]), с потерей слуха в изученных выборках пациентов из Республик Тыва и Алтай.

8) Анализ аллельного разнообразия гена *GJB2* (69 внутригенных SNP-маркёров) у коренных жителей Тувы и Алтая (глухие пациенты и контроль), проведенный в сравнении с мировыми геномными данными (1000 Genomes Project, dbSNP, HarMap Project), показал, что тувинцы и алтайцы относятся к восточно-азиатскому кластеру популяций. Наибольший вклад в дифференциацию популяций внесли девять маркёров (rs9552101, rs9550621, rs117685390, rs2274084, rs2274083, rs76838169, rs72474224, rs111033196, rs111033186), пять из которых (rs9552101, rs9550621, rs117685390, rs2274084, rs2274083) определяют дифференциацию выборок тувинцев и алтайцев.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Posukh O.L., **Zytsar M.V.**, Bady-Khoo M.S., Danilchenko V.Yu., Maslova E.A., Barashkov N.A., Bondar A.A., Morozov I.V., Maximov V.N., Voevoda M.I. Unique Mutational Spectrum of the *GJB2* Gene and its Pathogenic Contribution to Deafness in Tuvinians (Southern Siberia, Russia): A High Prevalence of Rare Variant c.516G>C (p.Trp172Cys) // *Genes*. – 2019. – Vol. 10. – 429. <https://doi.org/10.3390/genes10060429>
2. **Zytsar M.V.**, Barashkov N.A., Bady-Khoo M.S., Shubina-Olejnik O.A., Danilenko N.G., Bondar A.A., Morozov I.V., Solovyev A.V., Danilchenko V.Yu., Maximov V.N., Posukh O.L. Updated carrier rates for c.35delG (*GJB2*) associated with hearing loss in Russia and common c.35delG haplotypes in Siberia // *BMC Med Genet*. – 2018. - Aug 7;19(1):138. doi: 10.1186/s12881-018-0650-5
3. Solovyev A.V., Barashkov N.A., Bady-Khoo M.S., **Zytsar M.V.**, Posukh O.L., Romanov G.P., Rafailov A.M., Sazonov N.N., Alexeev A.N. Dzhemileva L.U., Khusnutdinova E.K., Fedorova S.A. Reconstruction of SNP Haplotypes with Mutation c.-23+1G>A in Human Gene *GJB2* (Chromosome 13) in Some Populations of Eurasia // *Russian Journal of Genetics*. - 2017. - Vol. 53. - No. 8. - P. 988–994.
4. Посух О.Л., Бады-Хоо М.С., **Зыцарь М.В.**, Михальская В.Ю., Лашин С.А., Барашков Н.А., Романов Г.П. Роль социально-демографической структуры сообществ глухих людей в распространенности наследуемых форм потери слуха // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2016. - Т. 20. - № 1. – С. 7-15. DOI 10.18699/VJ16/098.
5. Бады-Хоо М.С., Посух О.Л., Зоркольева И.В., Скиданова О.В., Барашков Н.А., Омзар О.С., Монгуш Р.Ш., Бамба О.М., Тукар В.М., **Зыцарь М.В.**, Михальская В.Ю. Изучение наследственных форм тугоухости / глухоты в Республике Тыва. Сообщение I. Эпидемиология нарушений слуха в Республике Тыва // *Медицинская генетика*. - 2014. - Т. 13. - №1. - С.17-26.
6. Бады-Хоо М.С., Бондарь А.А., Морозов И.В., **Зыцарь М.В.**, Михальская В.Ю., Скиданова О.В., Барашков Н.А., Монгуш Р.Ш., Омзар О.С., Тукар В.М., Посух О.Л. Изучение наследственных форм тугоухости / глухоты в Республике Тыва. Сообщение II. Оценка спектра мутаций гена *GJB2* (Сх26) и их вклада в этиологию потери слуха // *Медицинская генетика*. - 2014. - № 11. - С.23-33.