

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

на правах рукописи

ЗЫЦАРЬ МАРИНА ВЯЧЕСЛАВОВНА

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

03.02.07. генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
к.б.н., с.н.с. О.Л. Посух

НОВОСИБИРСК - 2020

Оглавление

Список сокращений	4
Глава 1. ВВЕДЕНИЕ	5
1.1. Актуальность проблемы	5
1.2. Цель и задачи работы	6
1.3. Научная новизна исследования	6
1.4. Теоретическая и практическая значимость работы	7
1.5. Основные положения, выносимые на защиту	8
1.6. Аprobация результатов	8
1.7. Объём и структура диссертации	9
1.8. Публикации	9
1.9. Личный вклад автора	9
1.10. Список работ, опубликованных по теме диссертации	9
Глава 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
2.1. Ген <i>GJB2</i> (Сх26)	13
2.2. Аллельное разнообразие гена <i>GJB2</i> и распространённость мажорных мутаций гена <i>GJB2</i>	14
2.3. Использование STR- и SNP-маркеров в генетических исследованиях	17
2.4. Патогенетический вклад мутаций гена <i>GJB2</i> в этиологию потери слуха	18
2.5. Спектр мутаций гена <i>GJB2</i> и их патогенетический вклад в этиологию потери слуха у населения ряда регионов Сибири	20
Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
3.1. Характеристика анализируемых выборок	23
3.1.1. Общая выборка	23
3.1.2. Выборка больных, гомозиготных по мажорным мутациям гена <i>GJB2</i>	23
3.1.3. Контрольные выборки для генотипирования STR- и SNP-маркеров	24
3.1.4. Выборка для верификации <i>cis</i> -конфигурации аллелей с.79G>A (rs2274084) и с.341A>G (rs2274083)	25
3.2. Экспериментальные методы	25
3.2.1. Выделение ДНК	25
3.2.2. Детекция мутаций гена <i>GJB2</i>	25
3.2.3. Детекция делеции <i>GJB6-D13S1830</i>	25
3.2.4. Очистка амплифицированных фрагментов ДНК от компонентов реакционной смеси ПЦР	25
3.2.5. Секвенирование по Сэнгеру	27
3.2.6. Скрининг мутации с.35delG в контрольной выборке русских	27

3.2.7. Генотипирование STR- и SNP-маркёров	29
3.2.8. Молекулярное клонирование вариантов с.79G>A (rs2274084) и с.341A>G (rs2274083)	32
3.3. Статистические методы	36
Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	38
4.1. Формирование выборки больных, гомозиготных по с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC	38
4.2. Генотипирование STR- и SNP-маркёров	41
4.2.1. Подбор панели STR- и SNP-маркёров (13-ая хромосома)	41
4.2.2. Разнообразие аллелей изученных STR-маркёров	43
4.2.3. Разнообразие аллелей изучённых SNP-маркёров	44
4.3. Реконструкция гаплотипов хромосомы 13 у больных, гомозиготных по мутациям с.-23+1G>A, с.516G>C, с.235delC	45
4.3.1. STR-гаплотипы	46
4.3.2. SNP-гаплотипы	52
4.4. Мутация с.35delG гена <i>GJB2</i> на территории Сибири и анализ частоты гетерозиготного носительства с.35delG в России	55
4.5. Сравнительный анализ STR-гаплотипов с мутацией с.35delG	58
4.6. Оценка возраста мутаций с.-23+1G>A, с.516G>C, с.235delC, с.35delG гена <i>GJB2</i> в Сибири	62
4.7. Глухие индивидуумы с одной рецессивной мутацией в гене <i>GJB2</i>	64
4.8. Верификация <i>cis</i> -положения вариантов с.79G>A (p.V27I, rs2274084) и с.341A>G (p.E114G, rs2274083) гена <i>GJB2</i> и изучение их ассоциации с потерей слуха	68
4.9. Генетическая дифференциация популяций Евразии на основе SNPs в последовательности гена <i>GJB2</i>	70
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	72
ВЫВОДЫ	75
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	77
ПРИЛОЖЕНИЯ	94
Приложение 1	94
Приложение 2	96
Приложение 3	98
Приложение 4	99
Приложение 5	100
Приложение 6	102
Приложение 7	103
Приложение 8	104
Приложение 9	105
Приложение 10	106

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

GJB2 (gap junction beta 2) - ген коннексина 26

Cx26 (connexin 26) – трансмембранный белок коннексин 26

DFNB1A – аутосомно-рецессивная глухота 1-ого типа

пн (bp) – пары нуклеотидов (base pairs)

kb – kilobase (1000 пар нуклеотидов)

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПДРФ - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

НТ/Г – несиндромальная тугоухость / глухота

nX – кратность раствора

R – обратный праймер

F – прямой праймер

SLC26A4 (solute carrier family 26, member 4) – ген, кодирующий трансмембранный белок пендрин (pendrin)

STR - Short Tandem Repeats, микросателлиты, высокополиморфные генетические маркёры

SNP - Single Nucleotide Polymorphism, однонуклеотидные замены

тув. – тувинец

рус. – русский

укр. – украинец

чел. – человек

Глава 1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность проблемы

Распространенность врождённой тугоухости / глухоты составляет 1 на 1000 новорождённых 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, MIM 121011), 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.

1.2. 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 (p.V27I, rs2274084) и с.341A>G (p.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.

1.3. 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 c.35delG у здоровых индивидуумов (преимущественно русских) из Новосибирской области, которая составила 4.1%. Эти данные дополняют имеющиеся сведения о распространенности мутации c.35delG в российских популяциях. Реконструкция гаплотипов хромосомы 13, содержащих c.35delG, впервые проведенная на территории Сибири, и сравнительный анализ с ранее опубликованными данными свидетельствуют в пользу общности происхождения мутации c.35delG на территории России и в Восточной Европе.

Получены грубые оценки «возраста» мутаций c.-23+1G>A и c.35delG, не противоречащие ранее опубликованным данным по другим популяциям; оценка времени возникновения мутации c.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*, обусловлена другими (генетическими или негенетическими) причинами, и эти больные являются случайными носителями моноаллельной мутации гена *GJB2*.

Впервые проведена верификация *cis*-положения вариантов c.79G>A и c.341A>G гена *GJB2* (аллель c.[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>).

1.4. 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* (c.516G>C, c.-23+1G>A, c.235delC, c.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.

1.5. Основные положения, выносимые на защиту:

1. Для каждой из мажорных мутаций гена *GJB2*: с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC, характерных для коренного населения Тувы и Алтая, и с.35delG, преобладающей у русских пациентов, выявлены общие гаплотипы, что свидетельствует в пользу гипотезы о существенной роли 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.
3. Варианты с.79G>A и с.341A>G, находящиеся в *cis*-положении (аллель с.[79G>A;341A>G]), обнаруженные в Туве и на Алтае, не ассоциированы с потерей слуха.
4. Аллельное разнообразие гена *GJB2* вносит существенный вклад в дифференциацию популяций Евразии. Сравнительный анализ популяций коренных жителей Тувы и Алтая с мировыми геномными данными (69 внутригенных SNP-маркёров) показал, что тувинцы и алтайцы относятся к восточно-азиатскому кластеру популяций.

1.6. 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», SBB-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, 2018г.); 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, 2019г.).

1.7. Объем 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 объем составляет 110 страниц, в том числе 13 таблиц, 22 рисунка и 10 приложений.

1.8. Публикации.

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

1.9. Личный вклад автора

Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно.

1.10. Список работ, опубликованных по теме диссертации

По материалам работы были опубликованы 6 статей в журналах из Перечня ВАК, а также 10 тезисов конференций.

Статьи:

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* (Cx26) и их вклада в этиологию потери слуха // *Медицинская генетика.* - 2014. - № 11. - С.23-33.

Конференции:

1. **Зыцарь М.В.**, Бады-Хоо М.С., Данильченко В.Ю., Бондарь А.А., Морозов И.В., Барашков Н.А., Соловьёв А.В., Максимов В.Н., Посух О.Л. Распространённость мутации c.35delG (ген *GJB2*), ассоциированной с потерей слуха, у населения России и реконструкция предковых гаплотипов, включающих c.35delG, в регионах Сибири. VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы. 18-22 июня 2019г, Санкт-Петербург. С.743.
2. Danilchenko V., **Zytsar M.**, Posukh O. Founder effect in prevalence of hereditary hearing loss in indigenous Siberian populations. The Tenth International Young Scientists School Systems Biology and Bioinformatics (SBB-2018). Abstracts: p.11. Novosibirsk, Russia, 27–31 August, 2018.

3. **Zytsar M.**, Bady-Khoo M., Maslova E., Danilchenko V., Barashkov N., Morozov I., Bondar A., Posukh O. Allelic diversity of the *GJB2* gene in deaf patients and ethnically matched populations from South Siberia. 11th International Multiconference «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\ Systems Biology», Symposium Biodiversity: genomics and evolution (BioGenEvo-2018). Abstracts: p.58. Novosibirsk, Russia, 20 - 25 August 2018.
4. Posukh O.L., Bady-Khoo M.S., Romanov G.P., Barashkov N.A., Smirnova A.A., **Zytsar M.V.**, Maslova E.A., Danilchenko V.Y., Posukh O.V., Lashin S.A. E-P18.14. Insight into genetic and social aspects of modern communities of deaf people in Siberia for forecasting the prevalence of hereditary deafness. (The European Human Genetics Conference in conjunction with the European Meeting on Psychosocial Aspects of Genetics, June 16–19, 2018, Milan, Italy) *European Journal of Human Genetics* (2019) 27:894-895.
5. **Zytsar M.V.**, Bady-Khoo M.S., Maslova E.A., Danilchenko V.Y., Barashkov N.A., Morozov I.V., Bondar A.A., Posukh O.L. E-P02.11. Allelic diversity of the *GJB2* gene in deaf patients and ethnically matched controls from Turkic-speaking populations of South Siberia. (The European Human Genetics Conference in conjunction with the European Meeting on Psychosocial Aspects of Genetics, June 16–19, 2018, Milan, Italy) *European Journal of Human Genetics* (2019) 27:1038.
6. **Зыцарь М.В.**, Бады-Хоо М.С., Данильченко В.Ю., Бондарь А.А., Морозов И.В., Барашков Н.А., Посух О.Л. Эффект основателя в распространенности наследственной глухоты, обусловленной мутациями гена *GJB2*, в популяциях Сибири. Международная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева «Беляевские чтения». Новосибирск, 7-10 августа, 2017.
7. **Zytsar M.V.**, Bady-Khoo M.S., Barashkov N.A., Danilchenko V.Yu., Posukh O.L. Founder effect in prevalence of hereditary deafness caused by mutations in gene *GJB2* (13q11-q12) among Siberian populations: common ancestral haplotypes for major *GJB2* mutations and estimation of their age. The 9th International Young Scientists School SBB-2017. Yalta, Republic of the Crimea, Russia, 25-30 June, 2017.
8. **Зыцарь М.В.**, Бады-Хоо М.С., Михальская В.Ю., Бондарь А.А., Морозов И.В., Барашков Н.А., Посух О.Л. Анализ гаплотипов хромосом с мажорными мутациями (с.516G>C, IVS1+1G>A, с.235delC) гена *GJB2* у коренного населения Южной Сибири (тувинцы и алтайцы). 20-ая Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ-НАУКА XXI ВЕКА». Пушкино, 18-22 апреля, 2016.
9. **Зыцарь М.В.**, Бады-Хоо М.С., Михальская В.Ю., Бондарь А.А., Морозов И.В., Барашков Н.А., Посух О.Л. Реконструкция гаплотипов хромосом с мажорными мутациями (с.516G>C, IVS1+1G>A, с.235delC) гена *GJB2* у коренного

населения южной Сибири (тувинцы и алтайцы) / Материалы VII Съезда Российского общества медицинских генетиков. Санкт-Петербург, 19-23 мая 2015г. Медицинская генетика. 2015. Т.14. №2(153). С.65.

10. **Зыцарь М.В.** Реконструкция гаплотипов хромосом с мажорными мутациями (с.516G>C, с.IVS1+1G>A И с.235delC) гена *GJB2* у коренного населения южной Сибири (тувинцы и алтайцы). Международная научная студенческая конференция, г. Новосибирск, 11-17 апреля, 2015 г. С. 117.

Глава 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Потеря слуха является одним из наиболее частых моногенных заболеваний. Распространенность врожденной тугоухости / глухоты составляет 1 на 1000 новорожденных [Morton, 1991; Morton, Nance, 2006]. Выделяют несколько типов тугоухости / глухоты: кондуктивная, нейросенсорная и смешанная. При кондуктивной тугоухости нарушается проведение звуковых волн из наружного и среднего уха во внутренние отделы (звуковые волны блокируются, не достигнув сенсорно-эпителиальных волосковых клеток кортиева органа). При нейросенсорном типе потери слуха нарушаются механизмы звуковосприятия во внутреннем отделе слухового органа. При смешанной тугоухости могут наблюдаться признаки как кондуктивной, так и нейросенсорной тугоухости. Врожденная тугоухость / глухота может быть обусловлена как средовыми факторами, так и генетическими причинами. Примерно половина случаев врожденной тугоухости / глухоты имеет наследственную этиологию. Генетическая потеря слуха может быть синдромальной (с другими клиническими симптомами) – около 30%, или же наиболее частой (~ 70%) изолированной (несиндромальной), с различными формами наследования: ~ 70-80% - аутосомно-рецессивное наследование, ~ 20% - аутосомно-доминантное наследование и ~ 1-5% - сцепленное с X-хромосомой или определяемое мутациями в митохондриальной ДНК [Hereditary Hearing Loss Homepage. <http://hereditaryhearingloss.org>].

Наследственные несиндромальные нейросенсорные формы потери слуха характеризуются очень высокой генетической гетерогенностью. В настоящий момент в ядерном геноме картировано около 170 локусов и идентифицировано более 100 генов, отвечающих за нарушение слуха [Hereditary Hearing Loss Homepage. <http://hereditaryhearingloss.org>], тем не менее, ген *GJB2* (13q12.11, GRCh38: 13:20.187.462-20.192.974) имеет наибольший патогенетический вклад: мутации гена *GJB2* определяются у ~ 50% больных с наследуемой потерей слуха в большинстве европейских стран, у ~ 10-20% больных - в азиатских популяциях.

2.1. Ген *GJB2*

У человека ген *GJB2* (*gap junction protein, beta 2*), размером около 5000 пн, находится на хромосоме 13 в локусе DFNB1A (13q12.11, GRCh38: 13:20.187.460-

20.192.938). Ген *GJB2* кодирует коннексин 26 (Cx26, 26 kDa, 226 аминокислот), относящийся к семейству трансмембранных белков [Kiang et al., 1997]. Шесть молекул Cx26 образуют коннексоны, формирующие щелевые каналы, по которым осуществляется ионный обмен между соседними клетками. Тем самым, в тканях внутреннего уха обеспечивается стабильный ионный состав эндолимфы, необходимый для процесса звуковосприятия. Тонкая структура каналов, образованных коннексином 26, была изучена в работе [Maeda et al., 2009] (рисунок 1). Мутации в гене *GJB2* нарушают структуру коннексина 26, что приводит к необратимой потере слуха.

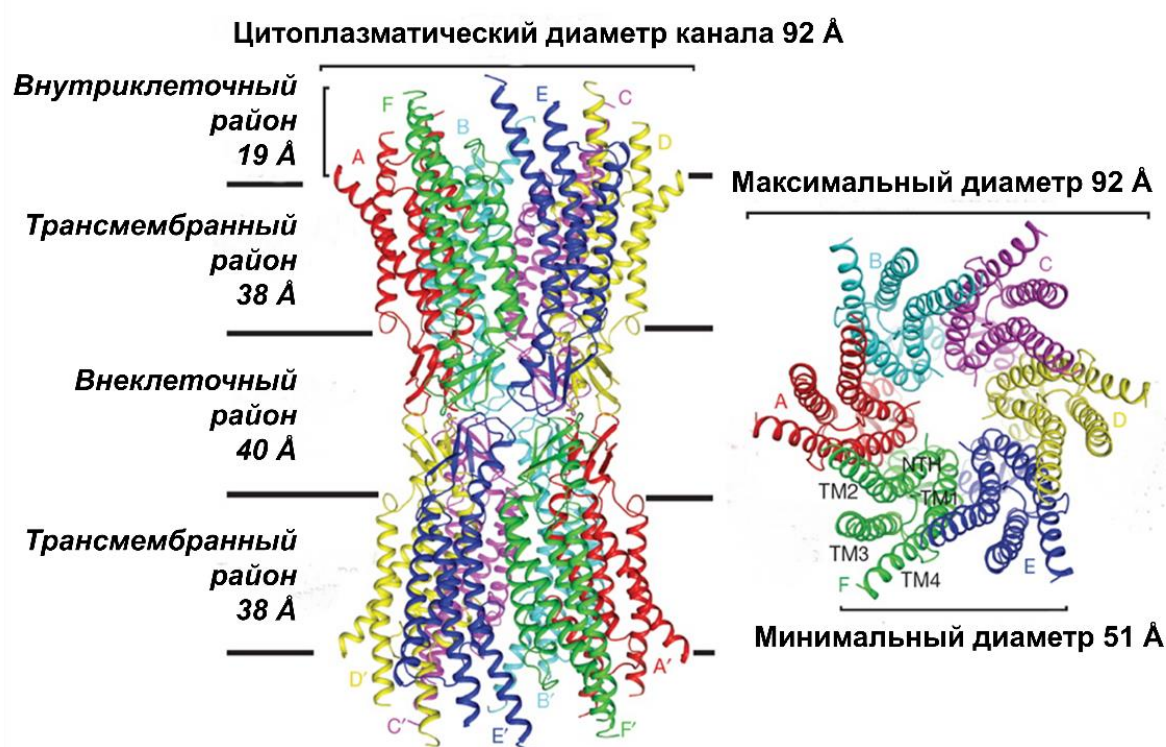


Рисунок 1. Структура щелевого канала, образованного молекулами Cx26. А, В, С, D, F, Е, А', В', С', D', F', Е' – отдельные молекулы коннексина 26; ТМ 1-4 – трансмембранные участки Cx26; NTH – N-концевая спираль Cx26. *Адаптировано из [Maeda et al., 2009].*

2.2. Аллельное разнообразие гена *GJB2* и распространённость мажорных - мутаций этого гена

В базу данных dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) на сегодняшний момент занесено около 1500 SNPs в последовательности гена *GJB2* (GRCh37.p13, NC_000013.10: 20.761.602-20.768.605). В базе данных Human Gene Mutation Database

(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) описано около 400 мутаций (большой частью рецессивных), полиморфных и пока неклассифицированных изменений последовательности гена *GJB2*, обнаруженных у пациентов [Stenson et al., 2017] (рисунок 2).

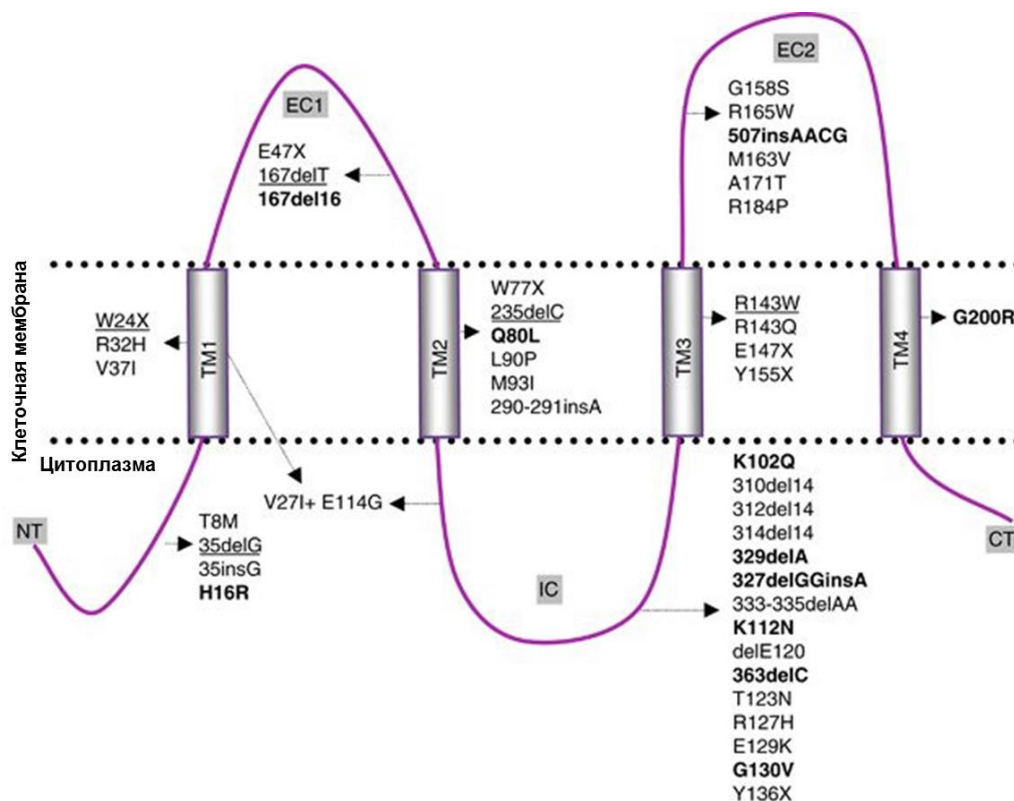


Рисунок 2. Структура коннексина 26 (Cx26) с наиболее распространёнными мутациями гена *GJB2*. NT, CT – концевые спирали. IC – внутриклеточный домен. EC1, EC2 – внеклеточные домены. TM 1-4 – трансмембранные участки белка. *Адаптировано из [Mahdieh et al., 2010].*

Мутационный спектр и распространённость отдельных мутаций гена *GJB2* характеризуются этнической и территориальной специфичностью в различных популяциях мира. Известно несколько мажорных мутаций этого гена, преобладающих в ряде популяций, другие мутации могут обнаруживаться в отдельных семьях.

Известно, что мутация с.35delG (p.Gly12Valfs*2) имеет высокую частоту в Европе [Gasparini et al., 2000], с.235delC (p.Leu79Cysfs*3) – во многих странах Азии [Liu et al., 2002; Ohtsuka et al., 2003], с.167delT (p.Leu56Argfs*26) характерна для группы евреев ашкенази [Morell et al., 1998], с.427C>T (p.R143W) превалирует в Западной Африке [Hamelmann et al., 2001], с.109G>A (p.V37I) имеет большую распространённость в Южной Азии [Wattanasirichaigoon et al., 2004], а

сплайсинговая мутация с.-23+1G>A (IVS1+1G>A) - у якутов [Barashkov et al., 2011; Barashkov et al., 2016].

Высокая частота некоторых мутаций гена *GJB2* в отдельных регионах мира может свидетельствовать либо об их независимом возникновении (mutational «hot spot») или быть следствием эффекта основателя (founder mutation).

Роль эффекта основателя в распространенности мутации с.35delG у европеоидного населения была впервые подтверждена общностью с.35delG-гаплотипов, выявленных на основе анализа STR- и SNP-маркеров участка хромосомы 13 [Van Laer et al., 2001]. Мутация с.35delG крайне редка или отсутствует в других этнических группах, что исключает роль мутационных «горячих точек» («hot spot») в распространенности с.35delG, хотя нельзя исключить, что эта мутация возникала неоднократно [Van Laer et al., 2001]. В настоящее время предполагается, что мутация с.35delG, впервые возникнув на Ближнем Востоке или в Средиземноморье 10000-14000 лет назад, широко распространилась по территории Европы в ходе неолитических миграций человека [Kokotas et al., 2008; Kokotas et al., 2010; Najmabadi et al., 2002; Van Laer et al., 2001].

С помощью анализа гаплотипов, несущих мутацию с.235delC, был также подтвержден эффект основателя в ее происхождении и распространенности на территории Восточной Азии (Япония, Корея, Китай и Монголия). Предполагается также, что с.235delC возникла ~ 11500 лет назад в регионе озера Байкал, откуда она с миграционными потоками распространилась по территории Азии [Yan et al., 2003].

Были также получены оценки «возраста» (~ 7880 лет) широко распространенной в Индии мутации с.71G>A (p.W24X) [Ramshankar et al., 2003].

Роль эффекта основателя была также показана в распространении мутации сайта сплайсинга с.-23+1G>A (IVS1+1G>A) у коренного населения Республики Саха (Якутия). Предполагается, что с.-23+1G>A возникла в Якутии около 800 лет назад и, вероятно, была привнесена миграциями тюркоязычных предков якутов из южных регионов Сибири [Barashkov et al., 2011].

2.3. Использование STR- и SNP-маркеров в генетических исследованиях

STR-маркёры (Short Tandem Repeats, микросателлиты) являются высокополиморфными генетическими маркёрами, которые активно используются при анализе ассоциаций, сцепления и при картировании генов, в непрямой диагностике наследственных заболеваний, при идентификации образцов ДНК в криминалистике и судебно-медицинской экспертизе, а также для оценки разнообразия в популяционно-генетических и эволюционных исследованиях, в том числе и для анализа древних образцов [Животовский, 2006]. Микросателлиты могут содержать до сотни и более tandemно повторяющихся мотивов, состоящих из 2-6 пн простых повторов, например, [CA]₁₀, либо сложных, состоящих из двух и более типов повторов, например, [TGT]₅[CAC]₁₄. STR-маркёры распределены по всему геному у всех эукариотических организмов. В геноме человека на сегодняшний момент известно несколько десятков тысяч микросателлитных локусов.

Полиморфизм микросателлитов обеспечивается высокой мутационной скоростью в районах их локализации. Мутации в локусах микросателлитов, как правило, возникают за счёт ошибок репликации (slippage, «проскальзывание» ДНК-полимеразы на число нуклеотидов, кратное длине повтора). Мутационная скорость изменения числа повторов может составлять от 10^{-6} до 10^{-2} на локус на поколение [Schlötterer, 2000].

Средняя частота возникновения микросателлитов оценивается как 6.2×10^{-4} на локус на поколение [Dib et al., 1996]. В STR-маркёрах с 3 и более повторами темпы возникновения мутаций ниже [Chakraborty et al., 1997]. Высокая скорость мутирования STR-локусов приводят к возникновению популяционно-специфических различий, что используется для анализа популяционной структуры.

При подборе панелей STR-маркёров для различных исследований учитываются их селективная нейтральность (не влияют на приспособленность особей) - для получения несмещенных оценок времени дивергенции и построения филогенетических деревьев, потенциальное количество аллельных вариантов – для оценки разнообразия в различных популяциях.

SNP-маркёры (Single Nucleotide Polymorphism) – это однонуклеотидные замены с частотой редкого варианта $\geq 1\%$, широко распространённые в геноме

человека. Темпы мутирования SNP-маркёров в ядерном геноме у человека - 10^{-8} на нуклеотид на поколение [Животовский, 2006]. SNP-маркёры используют в различного рода генетических исследованиях либо в сочетании с STR-маркёрами, либо как альтернативу микросателлитам, однако для получения схожей информативности, оцениваемой по степени полиморфизма, SNP-маркёров требуется гораздо больше, чем STR-маркёров.

Различные наборы STR- и SNP-маркёров широко использовались для реконструкции гаплотипов, включающих мажорные мутации гена *GJB2*, в разных популяциях мира. Так, с использованием специфических панелей STR- и SNP-маркёров проводилось определение гаплотипа-основателя для мутации c.35delG, широко распространённой среди европеоидного населения [Dzhemileva et al., 2011; Abidi et al., 2008; Balci et al., 2005; Belguith et al., 2005; Kokotas et al., 2008; Kokotas et al., 2010; Minarik et al., 2005; Najmabadi et al., 2002; Norouzi et al., 2011; Rezaei, Vallian, 2011; Rothrock et al., 2003; Shahin et al., 2002; Sobe et al., 2000; Tekin et al., 2001, 2005; Van Laer et al., 2001]. Генотипирование различных STRs в сочетании с SNPs проводилось для реконструкции гаплотипов, включающих и другие мажорные *GJB2*-мутации: c.235delC, c.-23+1G>A (IVS1+1G>A), c.167delT, p.W24X [Barashkov et al., 2011; Cheng et al., 2009; Liu et al., 2002; Matos et al., 2011; Morell et al., 1998; Ohtsuka et al., 2003; Ramshankar et al., 2003; Sobe et al., 1999; Tekin et al., 2010; Yan et al., 2003].

2.4. Патогенетический вклад мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха

Генетически обусловленные формы глухоты в настоящее время не поддаются лечению. Тем не менее, точный молекулярно-генетический диагноз необходим для своевременной соответствующей реабилитации (слухопротезирование, коррекционное обучение), оценки генетического риска и медико-генетического консультирования отягощённых семей. Молекулярно-генетический диагноз «наследственная глухота» ставится тогда, когда у пациента в гене *GJB2* присутствует два рецессивных мутантных аллеля в гомозиготном или в компаунд-гетерозиготном состоянии и/или, в отдельных случаях, одна доминантная *GJB2*-мутация.

Ранее проведенные многочисленные исследования показали, что патогенетический вклад гена *GJB2* в возникновение потери слуха существенно варьирует в популяциях мира [см. обзор Chan, Chang, 2014] (рисунок 3).

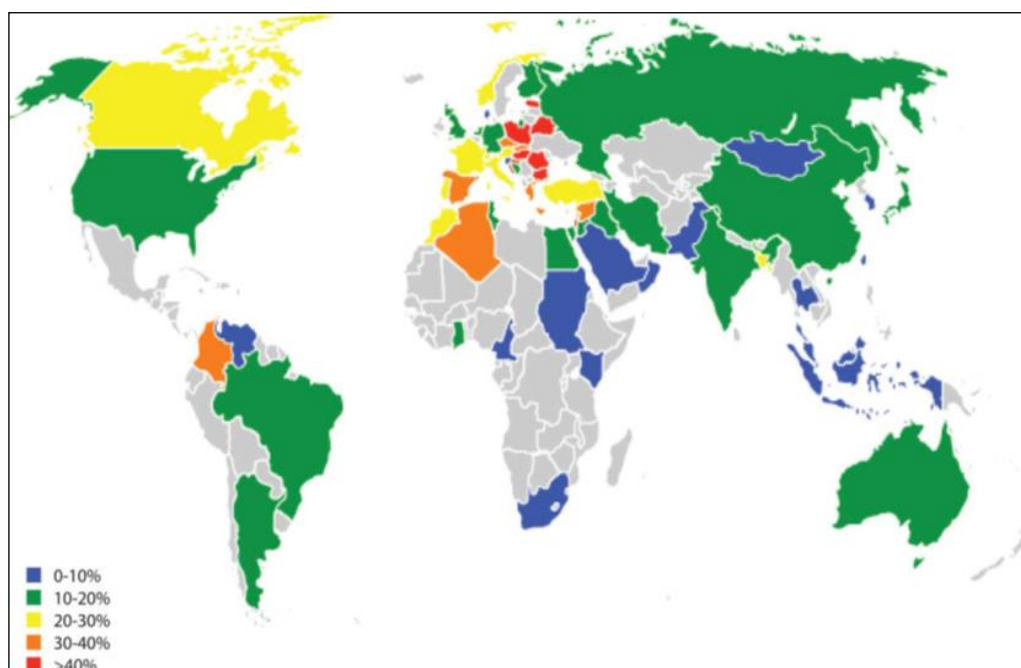


Рисунок 3. Мировое распределение доли индивидуумов с потерей слуха, имеющих биаллельные мутации гена *GJB2*. Рисунок взят из [Chan et al., 2014].

Примечание: на рисунке не нанесены новые данные по российским популяциям.

В ряде европейских стран доля больных с потерей слуха, определяемой мутациями гена *GJB2*, может достигать 50% [Danilenko et al., 2012; Denoyelle et al., 1999; Kenneson et al., 2002; Morton, Nance, 2006 и др.]. В странах азиатского региона распространенность глухоты, обусловленной мутациями гена *GJB2* в среднем несколько ниже: 4.5% в Монголии [Tekin et al., 2010] и 14.9% - 21.1% в Китае и Индии, соответственно [Dai et al., 2009, Mani et al., 2009]. Тем не менее, исследования, недавно проведенные в Якутии (Восточная Сибирь), показали, что у якутов доля больных с потерей слуха, обусловленной мутациями гена *GJB2*, составляет 53% и наиболее частой является мутация с.-23+1G>A (IVS1+1G>A), широкая распространенность которой в этом регионе обусловлена эффектом основателя [Пшенникова и др., 2015; Varashkov et al., 2014, 2016].

В России до недавнего времени молекулярная диагностика нарушений слуха ограничивалась только скринингом мутации с.35delG, распространенной в европейских странах [Журавский и др., 2009; Зинченко и др., 2003; Маркова и др., 2002; Маркова и др., 2008; Некрасова и др., 2002; Хидиятова и др., 2002; Шаронова

и др., 2009; Шокарев и др., 2005]. Использование метода секвенирования ДНК позволило выявлять более широкий мутационный спектр гена *GJB2* [Божкова и др., 2011; Близнец и др., 2012; Джемилева, 2011; Осетрова и др., 2010; Пшенникова и др., 2015; Posukh et al., 2005, 2019].

Определенной проблемой диагностики является выявление у пациента с нарушениями слуха только одного мутантного рецессивного аллеля в гене *GJB2*. Существует ряд предположений о причинах потери слуха у таких больных: (1) наличие каких-либо патогенетических вариантов в некодирующей последовательности гена *GJB2*, не подвергавшейся анализу при рутинной диагностике; (2) наличие мутаций в регуляторной области, расположенной вне гена *GJB2*; (3) определенная часть больных с одной *GJB2*-мутацией, возможно, являются только случайными носителями такой мутации, и потеря слуха у таких больных определяется какими-либо другими (генетическими или негенетическими) причинами.

2.5. Спектр мутаций гена *GJB2* и их патогенетический вклад в этиологию потери слуха у населения ряда регионов Сибири

Регионы Сибири до недавнего времени являлись «белым пятном» в мировых данных по оценке доли генетической компоненты в этиологии наследуемой глухоты и ее распространенности. Но за последние несколько лет, научным группам из ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) и Якутского научного центра комплексных медицинских проблем (г. Якутск) удалось получить значительные, не уступающие мировому уровню, результаты в этой области исследований. Получены эпидемиологические и молекулярно-генетические данные, характеризующие территориальную распространенность нарушений слуха, спектр и частоту мутаций гена *GJB2* у населения ряда регионов Сибири [Бады-Хоо и др., 2014а,б, 2016; Барашков и др., 2012, 2015а,б; Джемилева и др., 2009а,б, 2011; Посух и др., 2008, 2015; Пшенникова и др., 2015; Barashkov et al, 2011, 2014, 2016; Churbanov et al., 2016; Dzhemileva et al., 2010; Posukh et al., 2005, 2006, 2010, 2013, 2014, 2019 и др.]. В популяционно-генетической структуре коренных народов Сибири отражено совокупное влияние суровых климатических условий проживания, изоляции, дрейфа генов, эффектов основателя, отбора, ассимиляции, особенностей брачной структуры и репродукции, что, безусловно, проявилось и в специфике

генетического контроля и распространенности орфанных (редких) заболеваний (в том числе и генетических форм потери слуха).

На протяжении последних нескольких лет в Республиках Алтай, Тыва и Якутия нашей группой (ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск) и коллегами из Якутии (Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск) выполняются исследования, направленные на оценку спектра и частоты мутаций гена *GJB2* у населения этих регионов. Доля случаев потери слуха, обусловленных мутациями гена *GJB2*, в обследованных группах больных, представляющих тюркоязычное население Южной Сибири, составляет: у алтайцев - 15.1%, у казахов, проживающих в Республике Алтай - 23.1%, у тувинцев – 22.3% [Бады-Хоо и др., 2014; Posukh et al., 2005, 2019].

Этот показатель у якутов, коренного тюркоязычного населения Республики Саха/Якутия (Северо-Восточная Сибирь), составляет 53% и является максимально высоким среди всех ранее обследованных популяций Азии [Пшенникова и др., 2015; Varashkov et al., 2016]. В обследованной выборке русских пациентов из Южной Сибири (Алтай и Тува) доля «Сх26-позитивных» пациентов составляет 50.0%, а у русских, проживающих на территории Якутии - 33.3%.

Получены также детальные данные о мутационном спектре гена *GJB2* в основных этнических группах обследованных больных (алтайцы, казахи, тувинцы, якуты, русские). Интересным результатом, полученным в Республике Тыва, явилось обнаружение у тувинских пациентов высокой частоты мутации с.516G>C (p.W172C), специфичной для тувинцев [Бады-Хоо и др., 2014, 2016; Bady-Khoo et al., 2012; Posukh et al., 2019]. Позднее, эта мутация в компаунд-гетерозиготном состоянии была найдена у одного глухого пациента из Монголии [Tekin et al., 2010]. Эта мутация была также выявлена и у алтайцев [Posukh et al., 2005]. Другие сведения о мутации с.516G>C на сегодняшний момент в литературе отсутствуют. Второй по частоте встречаемости в Туве является сплайсинговая мутация с.-23+1G>A, выявленная с экстремально высокой частотой в популяции якутов [Пшенникова и др., 2015; Varashkov et al., 2014, 2016] и спорадически встречающаяся в ряде других популяций. В Республике Алтай у алтайцев с потерей слуха преобладает характерная «азиатская» мутация с.235delC.

Кроме того, были оценены частоты гетерозиготного носительства мутаций гена *GJB2* в контрольных (нормально слышащие, не связанные родством индивидуумы) выборках населения Сибири: алтайцев, тувинцев, якутов и русских, проживающих в Якутии. Суммарная частота гетерозиготного носительства *GJB2*-мутаций у алтайцев составила 5.51% (из них с.235delC – 3.67%, с.-23+1G>A – 0.92%, р.W172C – 0.46%, р.М34Т – 0.46%), у тувинцев – 9.52% (из них р.W172C – 3.80%, с.-23+1G>A – 3.80%, р.V37I – 1.92%), у якутов – 14.94% (из них, с.-23+1G>A – 11.21%, V37I – 2.80%, р.М34Т - 0.93%), у русских из Якутии – 2.5% (обнаружена только мутация с.35delG) [Бады-Хоо и др., 2014; Varashkov et al., 2016; Posukh et al., 2005, 2019].

Таким образом, исследования, проведенные в Туве и на Алтае, показали, что у коренного тюркоязычного населения Южной Сибири (алтайцы и тувинцы) преобладают три рецессивные мутации гена *GJB2*: с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC; у якутов (Якутия, Северо-Восточная Сибирь) - мутация с.-23+1G>A; у русского населения этих регионов (Алтай, Тува, Якутия) – мутация с.35delG [Бады-Хоо и др., 2014; Varashkov et al., 2016; Posukh et al., 2005, 2019].

Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Характеристика анализируемых выборок

3.1.1. Общая выборка

В результате многолетних исследований наследуемой потери слуха в Республиках Алтай, Тыва, выполняемых в лаборатории молекулярной генетики человека (ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск), сформированы обширные выборки больных с потерей слуха, их родственников и контрольные выборки, стратифицированные по этническому признаку.

Выборки больных с потерей слуха: Общая выборка больных с потерей слуха в Республике Алтай составляет 163 чел. (88 женского и 75 мужского пола). Этнический состав выборки больных: алтайцы – 93 чел., русские – 33 чел., казахи – 13 чел., смешанной этнической принадлежности (алтайцы / казахи / русские) – 24 чел. Общая выборка больных в Республике Тыва составляет 228 чел. (114 женского и 114 мужского пола). Этнический состав выборки больных: тувинцы - 220 чел., русские - 6 чел., смешанную этническую принадлежность имеют 2 чел. (тув./рус., тув./укр.). В обследуемых выборках больных преимущественно представлены индивидуумы с нейросенсорной тугоухостью III-IV степени или глухотой, врожденной или возникшей в раннем детском возрасте. Сурдологический диагноз был поставлен на основании отологического осмотра и пороговой тональной аудиометрии. Для каждого пациента была сформирована специальная карта с информацией о поле, возрасте, месте рождения / проживания, этнической принадлежности (в основном, до третьего поколения) и построена родословная.

Контрольная выборка: Общая выборка не связанных родством индивидуумов из Тувы и Алтая, не состоящих на учёте у сурдолога и без признаков снижения слуха, включает 157 тувинцев и 218 алтайцев.

3.1.2. Выборка больных, гомозиготных по мажорным мутациям гена *GJB2*

Выборка больных, гомозиготных по мажорным мутациям гена *GJB2*, была сформирована на основе результатов поиска мутаций гена *GJB2* в общей выборке больных с потерей слуха из Республик Тыва и Алтай. Кроме того, в исследовании были использованы образцы ДНК русских пациентов с несиндромальной потерей

слуха из Республики Саха (Якутия), любезно предоставленные Н.А. Барашковым (Якутский научный центр комплексных медицинских проблем, г. Якутск). В выборку включено 18 больных (17 тувинцев и один алтаец), гомозиготных по рецессивной миссенс-мутации с.516G>C (р. Trp172Cys), шесть больных (тувинцы), гомозиготных по рецессивной мутации сайта сплайсинга с.-23+1G>A, четверо больных (алтайцы), гомозиготных по рецессивной мутации с.235delC (р.Leu79Cysfs*3), и 24 русских пациента - восемь из Республики Алтай, два - из Республики Тыва и 14 - из Якутии, гомозиготных по рецессивной мутации с.35delG (р.Gly12Valfs*2) гена *GJB2*.

3.1.3. Контрольные выборки для генотипирования STR- и SNP-маркеров

Контрольные выборки алтайцев и тувинцев. Генотипирование семи STR- и девяти SNP-маркёров проводили на 62 образцах ДНК несвязанных родством тувинцев и на 55 образцах ДНК несвязанных родством алтайцев, не состоящих на учёте сурдолога, без признаков снижения слуха и не имеющих *GJB2*-мутаций с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC.

Контрольная выборка русских. Скрининг рецессивной мутации с.35delG гена *GJB2* был проведен на 122 образцах ДНК несвязанных родством индивидуумов преимущественно русских по этнической принадлежности, проживающих в г. Новосибирске, любезно предоставленных В.Н. Максимовым (ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск). Генотипирование STR- и SNP-маркёров проводилось на 67 образцах ДНК индивидуумов, не имеющих жалоб на снижение слуха, не состоящих на сурдологическом учете и не являющихся носителями мутации с.35delG гена *GJB2*.

Сбор образцов венозной крови для экстракции ДНК у обследованных индивидуумов был осуществлён после их (у детей – родителей или опекунов) письменного информированного согласия. Исследование было одобрено комиссией по биоэтике ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

3.1.4. Выборка для верификации *cis*-конфигурации аллелей с.79G>A (rs2274084) и с.341A>G (rs2274083)

Определение *cis*-конфигурации аллелей *GJB2*-вариантов с.79G>A (rs2274084) и с.341A>G (rs2274083) проводилось на 64 образцах, включающих глухих пациентов, их родственников и индивидуумов из контрольной выборки, гетерозиготных по исследуемым вариантам.

3.2. Экспериментальные методы

3.2.1. Выделение ДНК

Геномную ДНК выделяли стандартным фенол-хлороформным методом [Sambrook et al., 1989] из лимфоцитов периферической крови.

3.2.2. Детекция мутаций гена *GJB2*

Для детекции мутаций гена *GJB2* в белок-кодирующем районе (экзон 2), экзон-1-интронной области и фланкирующих последовательностей гена был применён метод секвенирования по Сэнгеру.

Наработку фрагментов последовательности гена *GJB2* проводили методом ПЦР на термоциклере “Mastercycler gradient” («Eppendorf», Germany) с использованием праймеров, представленных в **таблице 1**. ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 1-2% агарозном геле (буфер 1xTAE, 6 В/см) и детектировали с использованием системы Molecular Imager Gel Doc XR System («BioRad», USA) в УФ-свете.

3.2.3. Детекция делеции *GJB6-D13S1830*

Скрининг крупной делеции *GJB6-D13S1830* был проведён в выборке больных, имеющих одну моноаллельную мутацию гена *GJB2*, согласно протоколу, опубликованному ранее [Brown, Rehm, 2012; del Castillo et al., 2002].

3.2.4. Очистка амплифицированных фрагментов ДНК от компонентов реакционной смеси ПЦР

Для очистки продуктов ПЦР использовались магнитные частицы Angencourt AMPure XP («Bekman Coulter», USA) согласно протоколу производителя.

Таблица 1. Используемые праймеры.

<i>GJB2</i>			
Фрагмент гена <i>GJB2</i>	Название и структура праймеров	Ссылки	
Кодирующий район (экзон 2) гена <i>GJB2</i> . SNPs: rs2274083, rs2274084	835-F: 5'-TGCTTGCTTACCCAGACTCA-3' 835-R: 5'-CCTCATCCCTCTCATGCTGT-3' либо CX26-F: 5'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC-3' CX26-R: 5'-CTGGGCAATGCGTTAAACTGG-3'	[Бады-Хоо и др., 2014] [Kelsell et al., 1997; Kelley et al., 1998]	
Кодирующий район (экзон 2) гена <i>GJB2</i> : скрининг мутации с.35delG	F: 5'-GGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGG-3' R: 5'-CTGGTGGAGTGTGTTGTTCC*CAC-3'	[Storm et al., 1999]	
Экзон 1-интронная область гена <i>GJB2</i> . SNPs: rs1411911768, rs9552101, rs117685390	Ex1-F: 5'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC-3' Ex1-R: 5'-CTGGGCAATGCGTTAAACTGG-3' либо Ex1-792-F: 5'-GCGTTCGTTCCGGATTGGT-3' Ex1-2239-R: 5'-CGGAAACAGACCCTCGTGAAGT-3'	[Sirmaci et al., 2006] [Бады-Хоо и др., 2014]	
Экзон 1-интронная область гена <i>GJB2</i> и промоторный регион	PF2: 5'- CGTTCGTTCCGGATTGGTGAG -3' PF1: 5'- GGCTCAAAGGAACTAGGAGATCG -3' PR1: 5'- CAGAAACGCCCGCTCCAGAA -3'	[Matos et al., 2011]	
STR-маркёры			
STR (Probe; UniSTS)	Структура праймеров	Флуорес- центный краситель / меченый праймер	Ожидаемый размер продукта (пн)
D13S1316	F: 5'-CTACTGGGGAGGCTGG-3' R: 5'-CATGTCTCTGAATCGCTTTT-3'	NED / R	221-265
D13S141	F: 5'-GTCCTCCCGGCCTAGTCTTA-3' R: 5'-ACCACGGAGCAAAGAACAGA-3'	6-FAM / F	115-126
D13S175	F: 5'-TATTGGATACTTGAATCTGCTG-3' R: 5'-TGCATCACCTCACATAGGTTA-3'	PET / F	101-113
D13S1853	F: 5'-TGTACATCTCTTCTTACATTCATGT-3' R: 5'-CAGACTGGCACAACCTTAACTG-3'	6-FAM / F	194-202
D13S143	F: 5'-CTCATGGGCAGTAACAACAAAA-3' R: 5'-CTTATTTCTCTAGGGGCCAGCT-3'	VIC / F	125-129
D13S1275	F: 5'-ATCACTTGAATAAGAAGCCATTTG-3' R: 5'-CCAGCATGACCTTTACCAG-3'	VIC / F	180-214
D13S292	F: 5'-TAATGGCGGACCATGC-3' R: 5'-TTTGACACTTTCCAAGTTGC-3'	PET / R	201-207
SNP-маркёры			
SNP	Структура праймеров	Ожидаемый размер продукта (пн)	Метод детекции
rs747931	F: 5'- TCGGCACCCCTACCTCCT-3' R: 5'- TCAGACGACCAACCACCTAA-3'	739	ПДРФ (<i>PstI</i>)
rs5030700 rs3751385	F: 5'-GGCTGGTGAAGTGCAACG-3' R: 5'-GTAAGCAAACAACTTTTGAAGTAG-3'	1305	ПДРФ (<i>NheI</i>) и секвенирование
rs877098	F: 5'-ATGAGTATGGCAGATGATGTTATT -3' R: 5'-CAAAAGTGGGCAAAGGTTTA-3'	856	ПДРФ (<i>EcoRI</i>)

3.2.5. Секвенирование по Сэнгеру

Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов ДНК, содержащих ген *GJB2* или STR-маркёры, проводили секвенированием по Сэнгеру с использованием BigDye Terminator v3.1 («Applied Biosystems / Life Technologies», USA) (*GJB2*) и dGTP BigDye Terminator v3.0 («Applied Biosystems / Life Technologies», USA) (STR-маркёры) с предварительной очисткой ПЦР-продукта на магнитных частицах. Реакционная смесь для секвенирования по Сэнгеру включала в себя: ДНК-матрицу (50-150 нг), 1 мкл BigDye, 1 мкл 10 мМ соответствующего праймера, 4 мкл 5X буфера для секвенирования и воду (MilliQ) до 20 мкл общего объема.

Температурные профили секвенирующей реакции:

1. для фрагментов последовательности гена *GJB2*: денатурация (95°C, 2 мин.); 40 циклов: плавление (95°C, 25 сек.), отжиг праймеров (50°C, 10 сек.) и элонгация (60°C, 4 мин.).
2. для STR-маркёров: денатурация (95°C, 2 мин.); 50 циклов: плавление (95°C, 25 сек.), отжиг праймеров (50°C, 10 сек.) и элонгация (60°C, 4 мин.).

Очистка продуктов реакции Сэнгера от солей осуществлялась гельфильтрацией с использованием Sephadex G-50 Fine DNA Grade («GE Healthcare», USA) Фильтрат с продуктами реакции Сэнгера высушивали и анализировали в ЦКП СО РАН "Геномика" (г. Новосибирск) на автоматическом капиллярном секвенаторе 3130XL («Applied Biosystems», USA).

Анализ нуклеотидных последовательностей проводился с помощью программ FinchTV 1.4.0, Chromas 2.5.1, сопоставляя с соответствующими референсными последовательностями из GenBank (NC_000013.10, NC_000013.11).

3.2.6. Скрининг мутации с.35delG в контрольной выборке русских

Поиск мутации с.35delG проводили на 122 образцах ДНК русских из контрольной выборки. Для скрининга мутации с.35delG использовался метод ПЦР-ПДРФ. Амплификацию соответствующего фрагмента гена *GJB2* проводили с помощью ПЦР с модифицированными праймерами (таблица 1). Модификация в праймере R приводит к образованию сайта рестрикции CCN₅↓N2GG для рестриктазы *Bsc4 I* (рисунок 4).

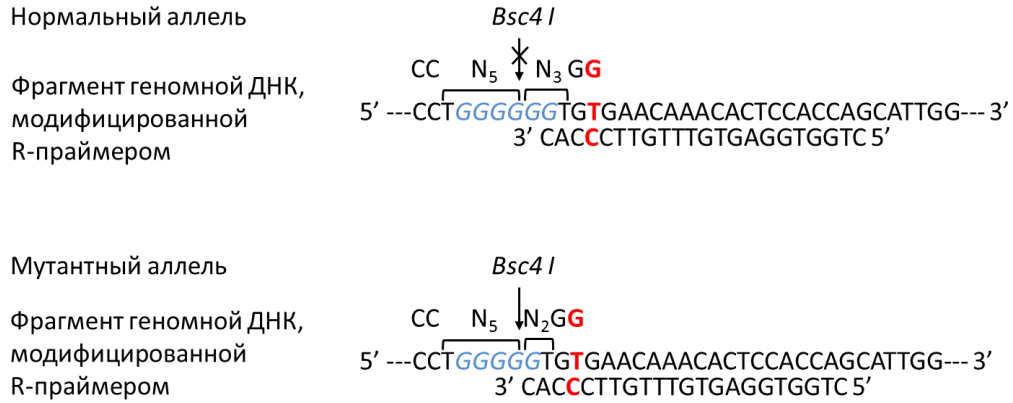


Рисунок 4. Схема ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза (PSDM, PCR-mediated site-directed mutagenesis) для выявления мутации с.35delG в гене *GJB2*. Модифицированные нуклеотиды выделены красным цветом, шесть G (гуанозин) в нормальном аллеле и пять G в мутантном аллеле выделены курсивом и синим цветом.

ПДРФ анализ для детекции мутации с.35delG гена *GJB2* проводили на полученных ПЦР-фрагментах (207 пн) с использованием рестриктазы *Bsc4 I* («Сибэнзим», Новосибирск). При отсутствии мутации с.35delG ПЦР-фрагмент (207 пн) не разрезается рестриктазой, при наличии мутации с.35delG в гомозиготном состоянии образуются два фрагмента (181 пн и 26 пн), в гетерозиготном состоянии - три фрагмента (207 пн, 182 пн и 26 пн). Фрагменты разделяли электрофорезом в 3-4% агарозном геле (**Рисунок 5**).

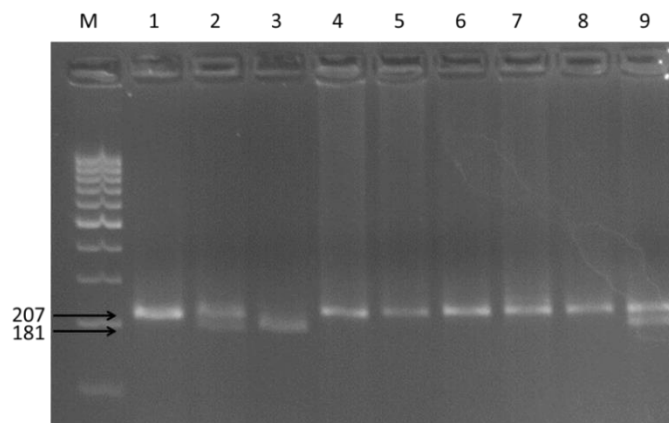


Рисунок 5. Детекция мутации с.35delG гена *GJB2*. М – маркер с фрагментами от 100 пн до 1000 пн (шаг 100 пн); дорожки 1, 4-8 – образцы без мутации с.35delG; дорожки 2, 9 – образцы, гетерозиготные по мутации с.35delG; дорожка 3 – образец, гомозиготный по мутации с.35delG. Фрагмент 26 пн на электрофореграмме не виден.

3.2.7. Генотипирование STR- и SNP-маркёров

Генотипирование STR-маркёров. Для гаплотипирования участка хромосомы 13, включающего ген *GJB2*, у тувинцев и алтайцев было использовано 7 STR-маркёров с CA-повторами, находящихся на разном расстоянии от гена *GJB2*: D13S1316, D13S141, D13S175, D13S1853, D13S143, D13S1275, D13S292 (**таблица 1**). Для гаплотипирования гена *GJB2* в выборках русских, проживающих на территории Сибири, были генотипированы три STR-маркёра: D13S141, D13S175 и D13S1853.

Генотипирование STR-маркёров проводили помощью фрагментного анализа (GeneScan). Для амплификации фрагментов, включающих STR-маркёры, использовали стандартные пары праймеров из базы данных Probe (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe>) и геномного браузера Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Один из пары праймеров был мечен флуоресцентным красителем (**таблица 1**). Праймеры синтезированы в фирме «Applied Biosystems / Life Technologies», USA.

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, которые содержали: 1X Buffer, 0,2 mM каждого dNTP, 0,2 мкМ каждого праймера, 30 е.а./мл ТАQ полимеразы (ИХБФМ СО РАН, Россия), 2-20 нг ДНК-матрицы, количество используемых Mg^{2+} и глицерина представлены в **таблице 2**. ПЦР проводили при следующем термопрофиле: начальная денатурация (95°C, 1 мин. 30 сек.); 40 циклов: денатурация (95°C, 10 сек.), отжиг праймеров (Т°C приведена в **таблице 2**, 15 сек.) и элонгация (72°C, 30 сек.); финальная элонгация (72°C, 10 мин.).

Полученные ПЦР-фрагменты, содержащие микросателлиты, очищали центрифугированием через колонку/планшет с SephadexTM G-50 Fine DNA Grade (GE Healthcare). Очищенные продукты высушивали и разделяли с использованием автоматического капиллярного (36 см) электрофореза в полимере POP-7 в ЦКП СО РАН "Геномика" (г. Новосибирск) на секвенаторе 3130XL («Applied Biosystems», USA). Полученные данные анализировали с помощью программы Peak Scanner Software v1.0 («Applied Biosystems», USA) для установления аллелей STR-маркёров (**рисунок 6, 7**).

Таблица 2. Варьирующие условия ПЦР и температура отжига для фрагментов, содержащих STR-маркёры.

STR-маркёр	Mg ²⁺ , mM	Глицерин, %	Температура отжига праймеров, °C
D13S1316	5,0	10	56
D13S141	2,0	-	60
D13S175	2,0	-	53
D13S1853	3,0	-	56
D13S143	2,0	-	60
D13S1275	3,0	-	56
D13S292	2,0	-	60

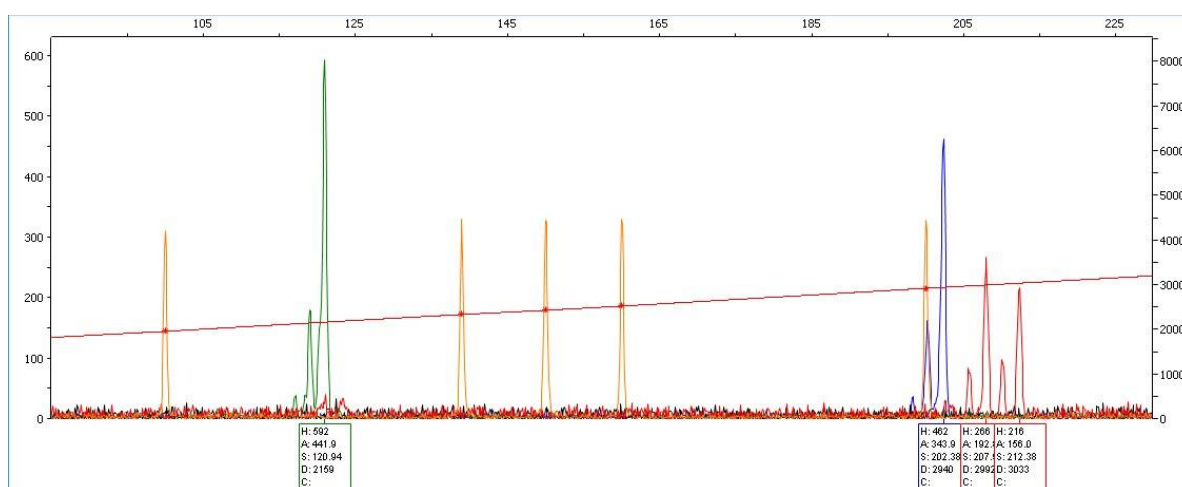


Рисунок 6. Результат генотипирования STR-маркёров (D13S143 - зелёные пики, D13S1853 – синие пики, D13S292 – красные пики, маркёр 500LIZ – оранжевые пики) в программе PeakScanner Software v1.0.

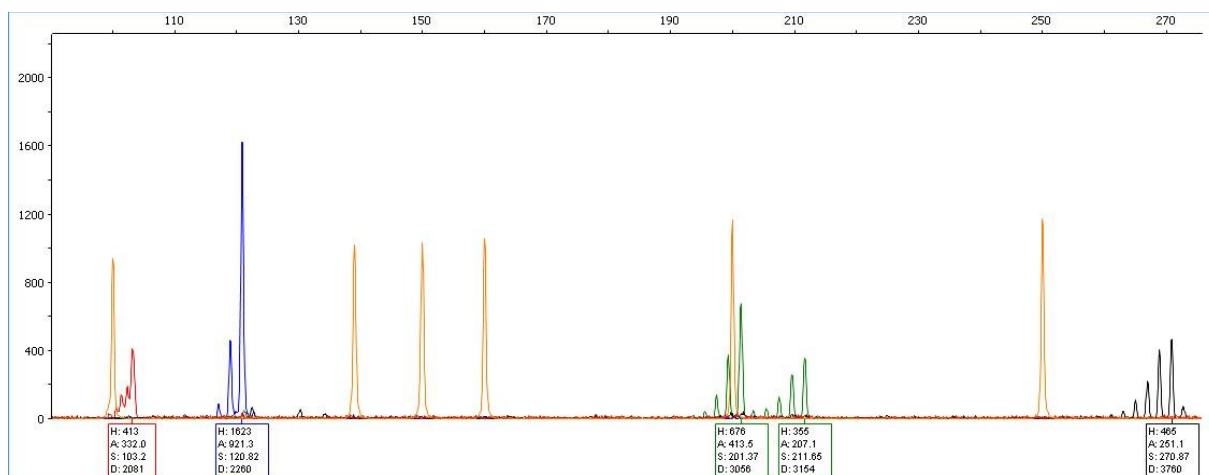


Рисунок 7. Результат генотипирования STR-маркёров (D13S175 – красные пики, D13S141 – синие пики, D13S1275 - зелёные пики, D13S1316 – чёрные пики, маркёр 500LIZ – оранжевые пики) в программе PeakScanner Software v1.0.

Определение числа повторов STR-маркёров (D13S141, D13S175) проводили секвенированием по Сэнгеру, используя те же праймеры (**таблица 1**), что и для фрагментного анализа, но без флуоресцентной метки.

Генотипирование SNP-маркёров. В выборках алтайских и тувинских больных, гомозиготных по мажорным мутациям гена *GJB2*, и у индивидуумов из соответствующих контрольных выборок, не имеющих исследуемые мутации, было проанализировано девять SNP-маркёров - rs747931, rs5030700, rs3751385, rs2274083, rs2274084, rs1411911768, rs9552101, rs117685390, rs877098. В выборках русских индивидуумов, проживающих на территории Сибири, как гомозиготных по *GJB2*-мутации с.35delG, так и из контрольной выборки, было выполнено генотипирование одного SNP-маркёра - rs3751385.

Для амплификации фрагментов, содержащих SNP-маркёры rs747931, rs5030700, rs3751385, rs877098, были подобраны пары праймеров в программе Primer Premier 5 (**таблица 1**). Праймеры синтезированы в фирме ООО «Биоссет» (г. Новосибирск).

ПЦР для rs877098 и rs747931 проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей: 1X реакционный буфер, 0,2 мМ каждого dNTP, 0,2 мкМ каждого праймера, 30 е.а./мл Taq-полимеразы (ИХБФМ СО РАН, Россия), 2-20 нг ДНК-матрицы. Для амплификации фрагментов, содержащих rs5030700 и rs3751385, в реакционную смесь дополнительно добавляли бетаин («SIGMA», USA) до концентрации 2%. Термопрофили для амплификации фрагментов SNP-маркёров представлены в **таблице 3**. Для генотипирования остальных SNP-маркёров (rs2274083, rs2274084, rs1411911768, rs9552101, rs117685390) использовались праймеры, подобранные для генотипирования фрагментов гена *GJB2* (**таблица 1**).

Генотипирование rs877098, rs3751385 и rs747931 осуществлялось гидролизом ПЦР-фрагмента эндонуклеазами рестрикции *EcoRI*, *NheI*, *PstI* («Сибэнзим», г. Новосибирск), соответственно (**рисунок 8**). Детекцию остальных SNP-маркёров проводили секвенированием по Сэнгеру.

Таблица 3. Температурный режим амплификации SNP-маркёров (40 циклов).

Количество циклов	Стадия ПЦР	Наименование SNP маркера и температурные параметры		
		rs747931	rs5030700, rs3751385	rs877098
1	Плавление	95°C / 1'30"		
40	Денатурация	95°C / 10"		
	Отжиг	62°C / 15"	59°C / 15"	56°C / 15"
	Элонгация	72°C / 15"		

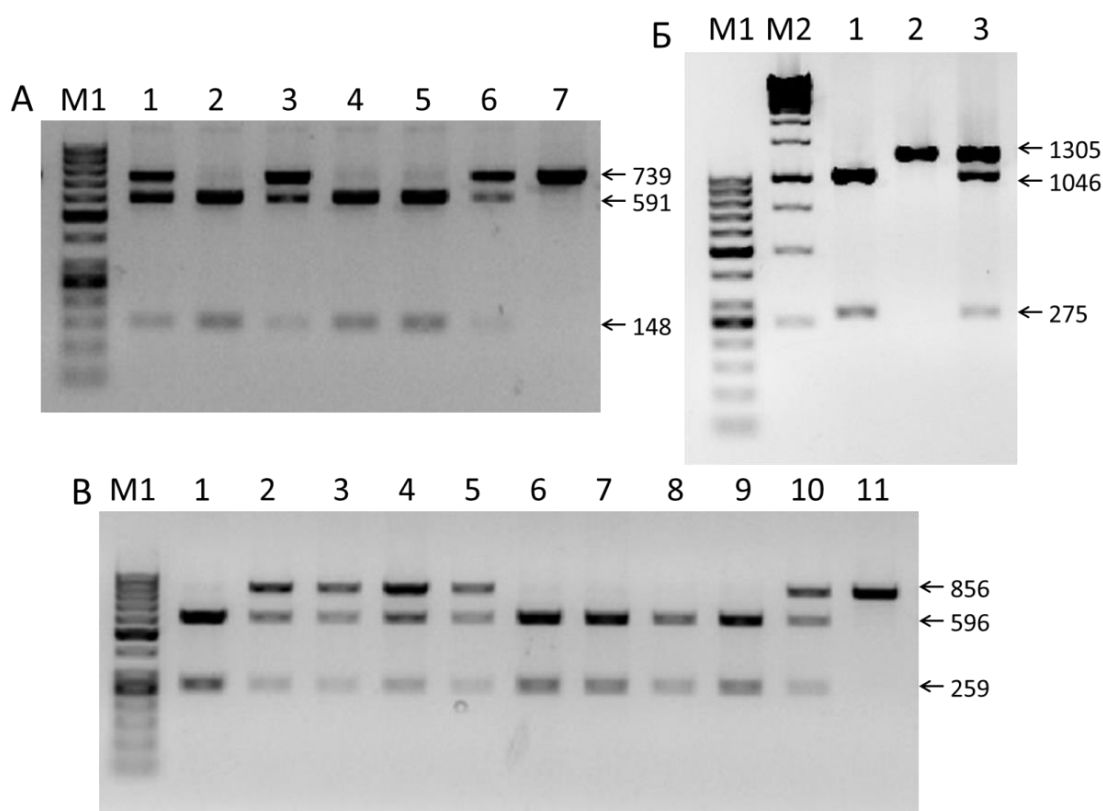


Рисунок 8. Электрофореграммы рестриционных фрагментов: **А** – rs747931 (*PstI* - CTGCA↓G *): 1, 3, 6 – гетерозигота T/C; 2, 4, 5 – гомозигота C/C; 7 – гомозигота T/T. **Б** – rs3751385 (*NheI* - G↓CTAGC *): 1 – гомозигота T/T; 2 – гомозигота C/C; 3 – гетерозигота C/T. **В** – rs877098 (*EcoRI* - (G↓AATTC *): 1, 6-9 – гомозигота C/C; 2-5, 10 – гетерозигота C/T; 11 – гомозигота T/T. M1 – маркер длин ДНК “Gene ruler 50 bp DNA Ladder” (Fermentas, Литва); M2 – маркер длин ДНК “Gene ruler 1Kb DNA Ladder” (Fermentas, Литва). * - подчёркнут нуклеотид, соответствующий локализации того или иного SNP.

3.2.8. Молекулярное клонирование вариантов с.79G>A (rs2274084) и с.341A>G (rs2274083)

В выборках алтайских и тувинских пациентов, их родственников и здоровых индивидуумов, гетерозиготных по вариантам с.79G>A (p.V27I, rs2274084) и с.341A>G (p.E114G, rs2274083), было проведено молекулярное клонирование для

верификации *cis*-конфигурации этих *GJB2*-вариантов, включающее следующие этапы:

1. Нарботка фрагментов экзона 2 гена *GJB2*, содержащего варианты с.79G>A (rs2274084) и с.341A>G (rs2274083), с использованием праймеров 835F/835R (**таблица 1**). ПЦР проводили с использованием полимеразы Phusion® Hot Start II Polymerase («Thermo Fisher Scientific», USA) и HF буфера. ПЦР проводили в 40 мкл реакционной смеси, которая содержала: 1X HF Buffer, 0,2 mM dNTP, 0,2 мкМ каждого праймера, 12 е.а./мл Phusion® Hot Start II Polymerase, 4-40 нг ДНК-матрицы и 2 mM Mg²⁺. Размер амплифицируемого фрагмента составлял 837 пн.
2. Очистка полученного ПЦР-продукта с использованием магнитных частиц Angencourt AMPure XP («Bekman Coulter», USA).
3. Встройка очищенного ПЦР-продукта в вектор pJET1.2/blunt (**рисунок 9**) с использованием набора CloneJET™ PCR Cloning Kit («Thermo Fisher Scientific», USA) согласно протоколу производителя.
4. Трансформация компетентных клеток *E.coli* Mach-1 методом теплового шока. Все манипуляции с компетентными клетками проводили строго на льду. Культуру клеток *E.coli* (50 мкл) с добавленными к ней 2 мкл 625мМ β-меркаптоэтанолом и полученной лигазной смесью (4 мкл) помещали на водяную баню (30-40 секунд), разогретую до 42°C, и переносили в лёд (1-2 минуты).
5. Для восстановления клеток после трансформации добавляли среду SOC (Super Optimal broth with Catabolic repressor), 100 мл которой содержало: 2 г триптона, 0,55 г дрожжевого экстракта, 0,2 мл 5M NaCl, 1 мл 1M KCl, 1 мл 1M MgCl₂, 1 мл 1M MgSO₄, 1 мл 2M глюкозы, и инкубировали при 37°C в течение 45-60 минут на качалке.
6. Трансформированные клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB (Lysogeny Broth) с добавлением антибиотика (ампициллин) до рабочей концентрации 100 мкг антибиотика на 1 мл среды. Чашки инкубировали при 37°C в течение 12-16 часов.

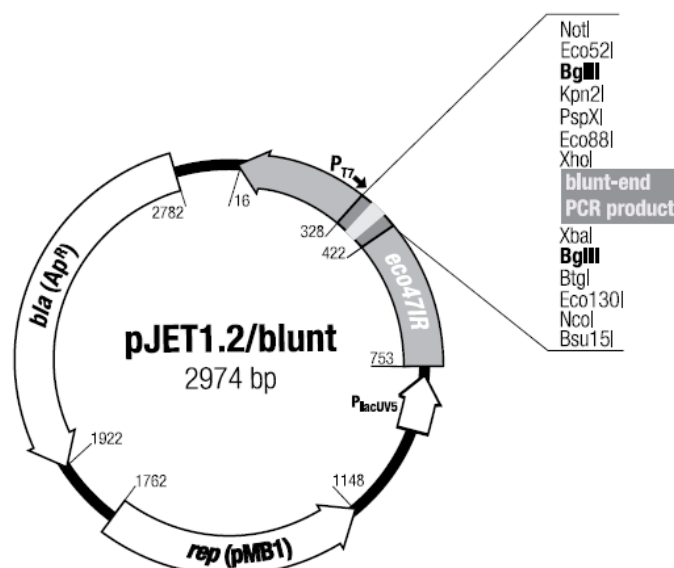


Рисунок 9. Карта вектора pJET1.2/blunt (взято из протокола производителя набора CloneJET™ PCR Cloning Kit, «Thermo Fisher Scientific», USA).

7. Для проверки встройки исследуемого фрагмента гена *GJB2* проводили ПЦР-скрининг колоний с помощью вектор-специфичных праймеров (**рисунок 10**) согласно протоколу производителя набора CloneJET PCR Cloning Kit («Thermo Fisher Scientific», USA) с небольшими модификациями:
 1. Количество реагентов пересчитывали на объём реакционной смеси - 40 мкл.
 2. Температурный профиль – начальная денатурация 95°C (3 мин.), далее 35 циклов – денатурация 95°C (10 сек.), отжиг праймеров 60°C (15 сек.), элонгация 72°C (1 мин.), затем финальная элонгация 72°C (5 мин.). Фрагменты со встройкой имели длину 955 пн (фрагмент гена *GJB2* - 837 пн и последовательность вектора - 62 пн и 57 пн) (**рисунок 11**).

8. Проверка *cis*-конфигурации вариантов с.79G>A (rs2274084) и с.341A>G (rs2274083) гена *GJB2* секвенированием по Сэнгеру с предварительной очисткой полученных ПЦР-фрагментов на магнитных частицах (**рисунок 12**).

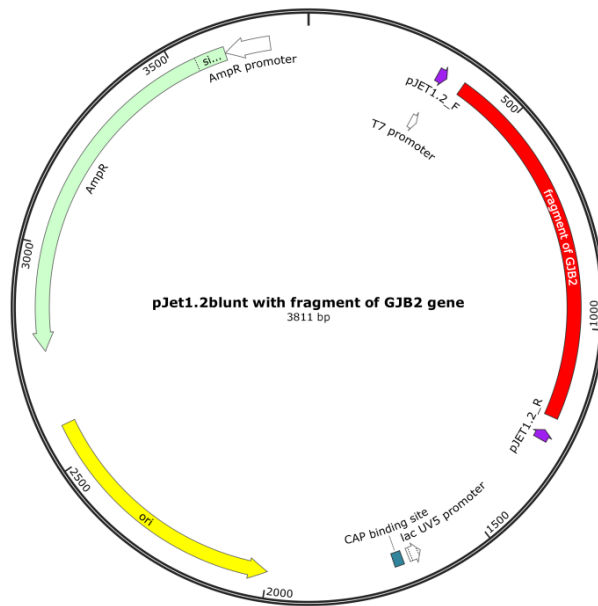


Рисунок 10. Карта вектора pJET1.2/blunt со встроенным фрагментом гена *GJB2*, содержащие варианты с.79G>A и с.341A>G. Фрагмент гена *GJB2* выделен красным. Вектор-специфичные праймеры pJET1.2_F/pJET1.2_R обозначены фиолетовым.

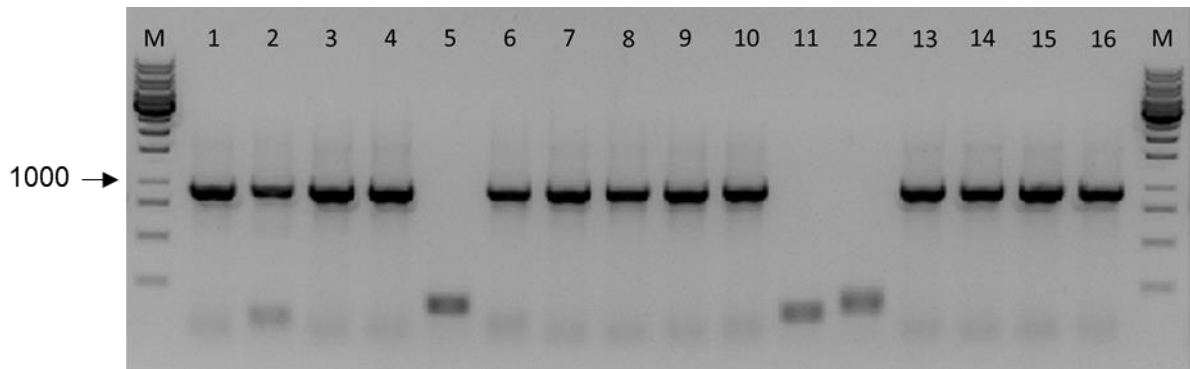


Рисунок 11. Проверка колоний на наличие встройки фрагмента гена *GJB2*. 1-4, 6-10, 13-16 – амплифицированные фрагменты со встройкой 837 пн гена *GJB2*. 5, 11-12 – фрагменты ПЦР без встройки. М – маркер 1 kb.

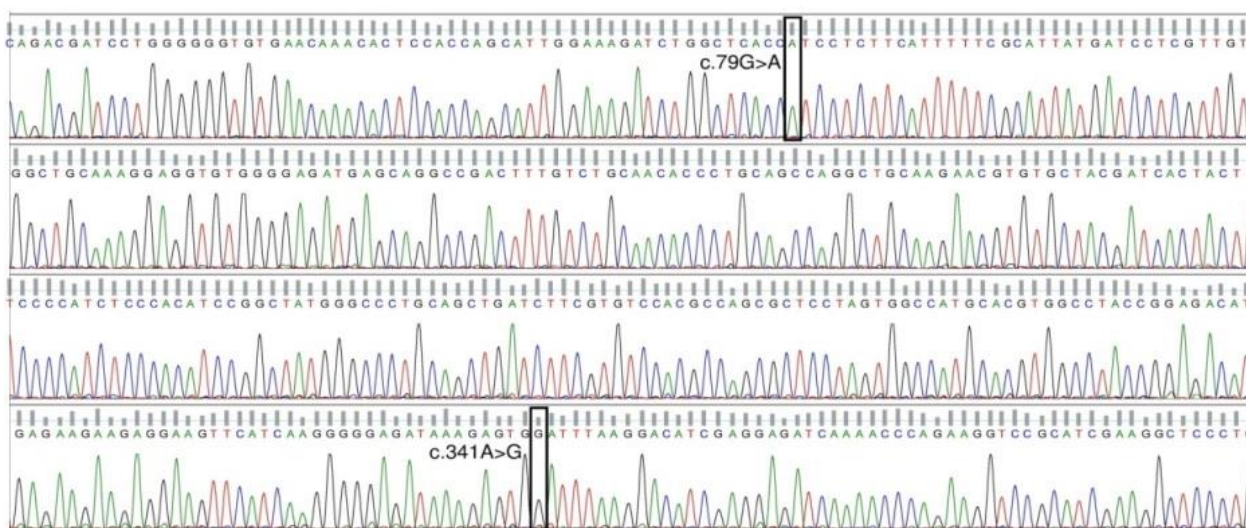


Рисунок 12: Секвенограмма, демонстрирующая *cis*-положение *GJB2*-вариантов с.79G>A (p.V27I, rs2274084) и с.341A>G (p.E114G, rs2274083).

3.3. Статистические методы

Для статистического анализа различий между частотами аллелей маркеров на хромосомах, несущих мутации с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC, с.35delG (выборка больных, гомозиготных по этим мутациям), и хромосомах без этих мутаций (контрольные выборки тувинцев, алтайцев и русских) применяли точный метод Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Неравновесие по сцеплению между аллелями локусов SNP- и STR-маркёров хромосомы 13 рассчитывали, как:

$$\delta = \frac{Pd - Pn}{1 - Pn}$$

где δ – мера неравновесия по сцеплению, Pd – частота ассоциированного аллеля среди хромосом с мутацией, Pn – частота этого же аллеля среди хромосом без мутации [Bengtsson, Thomson, 1981].

Реконструкция гаплотипов на основе обнаруженных аллелей SNP- и STR-маркёров и их частотное распределение в изучаемых выборках были выполнены с использованием пакета программ «Arlequin» v.3.5.1.2. (EM, Expectation-Maximization алгоритм) [Excoffier, Lischer, 2010].

Возраст мутаций с.516G>C, с.-23+1G>A и с.35delG рассчитывали по формуле [Rich et al., 1995]:

$$g = \log[1 - Q/(1 - Pn)] / \log(1 - \Theta),$$

где g – число поколений с момента появления мутации в популяции, Q – доля мутантных хромосом без аллеля гаплотипа-основателя, P_n – частота аллеля гаплотипа-основателя в популяции, Θ – рекомбинационная фракция. Θ рассчитывалась согласно физическому расстоянию маркёров от изучаемой мутации, предполагая, что $1 \text{ cM} = 1000 \text{ тпн}$. Продолжительность одного поколения считали равной 25 годам [Rich et al., 1995].

Генетическую дифференциацию популяций (изученные в данной работе выборки глухих и здоровых индивидуумов в сравнении с мировыми популяциями из проекта «1000 геномов») оценивали на основе частот 69 SNP-маркёров с использованием метода многомерного шкалирования. Матрица дистанций представлена евклидовыми расстояниями.

Глава 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Формирование выборки больных, гомозиготных по мутациям с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC

Первые результаты по оценке патогенетического вклада мутаций гена *GJB2* (Сх26) в потерю слуха у населения Республик Тыва и Алтай опубликованы ранее [Бады-Хоо и др., 2014а,б; Бады-Хоо, 2016; Posukh et al., 2005]. В настоящее время выборка тувинских больных существенно увеличена и результаты опубликованы в работе [Posukh et al., 2019].

Республика Тыва. В общей выборке обследованных тувинских больных рецессивные мутации гена *GJB2* (в гомозиготном, компаунд-гетерозиготном или единичном состояниях) были обнаружены у 67 пациентов (30.5% обследованных): у 49 (22.3%) - биаллельные рецессивные *GJB2*-мутации, у 18 (8.2%) - только одна рецессивная мутация гена *GJB2*. Таким образом, патогенетический вклад гена *GJB2* (доля больных с биаллельными рецессивными мутациями) в возникновение потери слуха у тувинских больных составляет 22.3%. У тувинских пациентов обнаружено пять рецессивных мутаций гена *GJB2* - с.516G>C (p.W172C), с.-23+1G>A, с.235delC, с.109G>A (p.V37I) и с.299_300delAT. Суммарная доля трех мутаций с.516G>C, 23+1G>A и с.235delC среди всех мутантных хромосом, выявленных у обследованных тувинских пациентов, составила 95.7% (62.9%, 27.6% и 5.2%, соответственно), тогда как общая частота двух других мутаций (с.109G>A и с.299_300delAT) не превышает 5%. Суммарная частота гетерозиготного носительства мажорных мутаций с.516G>C и с.-23+1G>A (с.235delC не обнаружена) в контрольной выборке тувинцев (n=157) оказалась равной 5.6%.

Республика Алтай. Мутационный спектр гена *GJB2* у алтайцев – представителей коренного населения Республики Алтай – представлен рецессивными мутациями с.235delC, с.516G>C, с.-23+1G>A и доминантной мутацией с.224G>A (p.R75Q). Патогенетический вклад гена *GJB2* в возникновение потери слуха у алтайских больных равен 15.1%. Самой частой мутацией для алтайцев является с.235delC (51.9%), второй по частоте - с.516G>C (29.6%) и затем с.-23+1G>A (14.8%) (суммарно 96.3%). Частота гетерозиготного носительства

c.235delC в контрольной выборке алтайцев (n=218) составляет 3.7%, с.-23+1G>A – 0.9%, с.516G>C – 0.5% (суммарно 5.1%).

Таким образом, анализ *GJB2*-генотипов тувинских и алтайских больных с потерей слуха и частоты гетерозиготного носительства *GJB2*-мутаций в выборках, представляющих коренное население Тувы и Алтая (тувинцы и алтайцы), выявил основные, мажорные, мутации этого гена: с.516G>C, с.-23+1G>A и 235delC (рисунок 13).

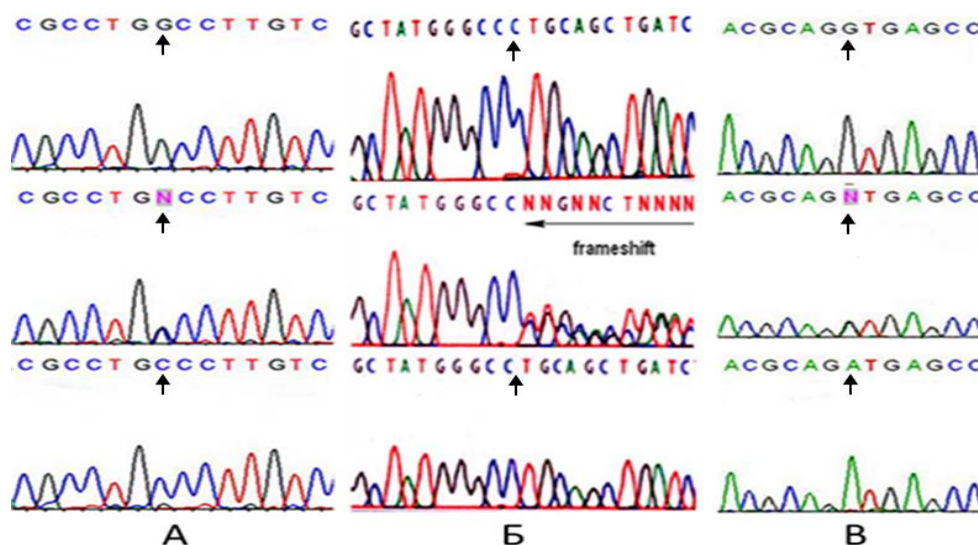


Рисунок 13. Результаты ресеквенирования фрагментов последовательности гена *GJB2*, включающих мутации: **А.** с.516G>C; **Б.** с.235delC; **В.** с.-23+1G>A. По горизонтали сверху вниз приведены секвенограммы вариантов: гомозигота по нормальным аллелям, гетерозигота и гомозигота по мутантным аллелям, соответственно.

Широкая распространенность мутаций с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC у тюркоязычного коренного населения территориально близких Тувы и Алтая, имеющего в прошлом общие моменты этногенеза, позволяет выдвинуть гипотезу о роли эффекта основателя в происхождении и распространённости этих мажорных мутаций гена *GJB2* в изучаемых регионах. Для проверки этой гипотезы необходимо провести реконструкцию гаплотипов участка хромосомы 13, несущих мажорные мутации с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC.

Для решения этой задачи были сформированы выборки неродственных тувинских и алтайских больных, гомозиготных по мутациям с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC (таблица 4), и выборки индивидуумов из контрольных выборок тувинцев (n=62) и алтайцев (n=55), в которых эти мутации не были выявлены.

Таблица 4. Пациенты, гомозиготные по мажорным мутациям гена *GJB2*.

Шифр пациента	Диагноз	Этническая принадлежность	Пол	Место рождения
<i>GJB2</i>-генотип р.[W172C];[W172C]				
Alt_91-1	нс.гл.	алт.	жен.	Чемальский р-он, Республика Алтай
Tuv_02-1	нс.тгх. IV ст.	тув.	жен.	Бай-Тайгинский р-он, Республика Тыва
Tuv_05-1	нс.тгх. IV ст.	тув.	жен.	Бай-Тайгинский р-он, Республика Тыва
Tuv_05-2	нс.гл.	тув.	муж.	Бай-Тайгинский р-он, Республика Тыва
Tuv_05-3	нс.тгх. IV ст.	тув.	муж.	г. Кызыл, Республика Тыва
Tuv_05-4	нс.тгх. IV ст.	тув.	жен.	Бай-Тайгинский р-он, Республика Тыва
Tuv_09-1	нс.гл.	тув.	жен.	Монгун-Тайгинский р-он, Республика Тыва
Tuv_09-2	нс.гл.	тув.	муж.	Монгун-Тайгинский р-он, Республика Тыва
Tuv_09-3	нс.гл.	тув.	муж.	Монгун-Тайгинский р-он, Республика Тыва
Tuv_13-1	нс.тгх. IV ст.	тув.	жен.	Каа-Хемский р-он, Республика Тыва
Tuv_13-2	нс.гл.	тув.	жен.	Каа-Хемский р-он, Республика Тыва
Tuv_27-1	нс.тгх. IV ст.	тув.	муж.	Монгун-Тайгинский р-он, Республика Тыва
Tuv_48-1	нс.тгх. IV ст.	тув.	муж.	Тандинский р-он, Республика Тыва
Tuv_53-2	нс.гл.	тув.	муж.	Тоджинский р-он, Республика Тыва
Tuv_54-1	нс.тгх. III-IV ст.	тув.	жен.	Тоджинский р-он, Республика Тыва
Tuv_68-1	нс.гл.	тув.	жен.	Чеди-Хольский р-он, Республика Тыва
Tuv_94-1	нс.гл.	тув.	муж.	Бай-Тайгинский р-он, Республика Тыва
Tuv_12 б/ш	нс.тгх. IV ст.	тув.	муж.	Монгун-Тайгинский р-он, Республика Тыва
Всего: 18 чел. (14 – неродственных)				
<i>GJB2</i>-генотип с.[-23+1G>A];[-23+1G>A]				
Tuv_36-1	нс.гл.	тув.	муж.	Кызылский р-он, Республика Тыва
Tuv_40 б/ш	нс.тгх. IVст	тув.	жен.	г. Кызыл, Республика Тыва
Tuv_35 б/ш	нс.тгх. IVст	тув.	муж.	Сут-Хольский р-он, Республика Тыва
Tuv_19 б/ш	нс.тгх. IV ст.	тув.	муж.	Барун-Хемчикский р-он, Республика Тыва
Tuv_74-2	нс.гл.	тув.	муж.	Дзун-Хемчикский р-он, Республика Тыва
Tuv_90-1	нс.гл.	тув.	муж.	Сут-Хольский р-он, Республика Тыва
Всего: 6 чел.				
<i>GJB2</i>-генотип с.[235delC];[235delC]				
21-1	нс.гл.	алт.	жен.	Усть-Канский р-он, Республика Алтай
76-1	нс.гл.	алт.	муж.	Шебалинский р-он, Республика Алтай
82-1	нс.тгх. III-IV ст.	алт.	жен.	г. Горно-Алтайск, Республика Алтай
92-1	нс.гл.	алт.	муж.	Шебалинский р-он, Республика Алтай
Всего: 4 чел.				

Примечание: жирным шрифтом выделены неродственные индивиды; нс.тгх. – нейросенсорная тугоухость; нс.гл. – нейросенсорная глухота; алт. – алтаец / алтайка, тув. – тувинец / тувинка.

4.2. Генотипирование STR- и SNP-маркеров

4.2.1. Подбор панели STR- и SNP-маркёров (хромосома 13)

Для проведения генотипирования участка хромосомы 13 мы выбрали информативную панель, включающую в себя семь специфичных STR-маркёров, фланкирующих на разном расстоянии ген *GJB2*, и восемь SNP-маркёров, внутригенных (находящихся на различном расстоянии от локализации мутаций с.-23+1G>A, с.235delC, с.516G>C) и фланкирующих ген *GJB2*. На **рисунке 14** и в **таблице 5** представлены локализация маркёров и генетические расстояния между ними. Размер фланкируемого региона составил ~ 3.5 млн пн

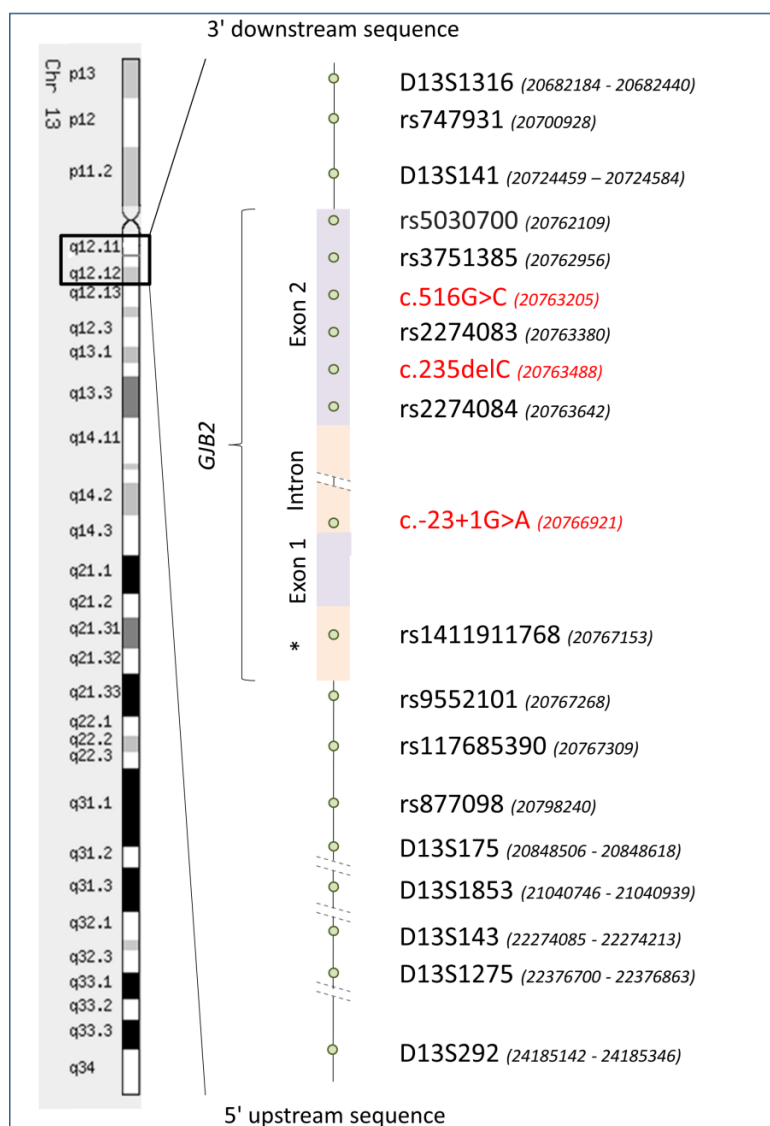


Рисунок 14. Схема расположения анализируемых STR- и SNP-маркёров и гена *GJB2* на хромосоме 13. Мутации гена *GJB2* выделены красным цветом. * - базальный промотор (128 пн) гена *GJB2*. Позиции (согласно GRCh37.p13) генетических маркёров показаны в скобках.

Таблица 5. Панель используемых SNP-маркёров.

SNP (dbSNP) (CM000675.2, NM_004004.5)	Расстояние от мутации с.-23+1G>A (пн)	Расстояние от мутации с.235delC (пн)	Расстояние от мутации р.W172C (пн)
rs747931 (g.20126789A>G, T>C)	-65993	-62558	-62277
rs5030700 (g.20187970G>A, с.931C>T)	-4812	-1377	-1096
rs3751385 (g.20188817A>G, с.84T>C)	-3965	-530	-249
c.516G>C (rs1302739538, p.W172C)	-3716	-281	0
rs2274083 (g.20189241T>C, с.341A>G)	-3541	-106	175
c.235delC (rs80338943, g.20189347delG)	-3435	0	281
rs2274084 (g.20189503C>T, с.79G>A)	-3279	156	437
c.-23+1G>A (rs80338940, g.20192782C>T)	0	3435	3716
rs1411911768 (g.20193014G>A, с.-254C>T)	232	3667	3948
rs9552101 (g.20193129T>C или T>G, с.-369A>G или A>C)	347	3782	4063
rs117685390 (g.20193170A>G, с.-410T>C)	388	3823	4104
rs877098 (g.20224101A>G, T>C)	31319	34754	35035

При выборе маркёров учитывалась их информативность (полиморфизм), хромосомная позиция и возможность сопоставления с уже опубликованными данными для других популяций. Для подбора SNP-маркёров и оценки их информативности (вариабельности) были использованы имеющиеся литературные данные и сведения из dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), HarMap Project (<http://harmap.ncbi.nlm.nih.gov/>), 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/>).

Следует отметить, что по числу STR- и SNP-маркёров панель, использованная в настоящей работе, является максимальной по сравнению с применяемыми в аналогичных исследованиях [Barashkov et al., 2011; Cheng et al., 2009; Davarnia et al., 2012; Dzhemileva et al., 2011; Kokotas et al., 2008; Kokotas et al.,

2010; Van Laer et al., 2001; Matos et al., 2011; Norouzi et al., 2011; Ohtsuka et al., 2003; Rothrock et al., 2003; Tekin et al., 2005; Tekin et al., 2010; Yan et al., 2003].

4.2.2. Разнообразие аллелей изученных STR-маркёров

В **Приложениях 1 и 2** представлены частоты аллелей STR-маркёров у тувинских и алтайских больных, гомозиготных по мутациям с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC, и в контрольных выборках тувинцев и алтайцев. Все изучаемые STR-маркёры оказались полиморфными, за исключением D13S143, у которого в алтайской популяции был выявлен только один аллель 125. В контрольных выборках тувинцев и алтайцев наблюдается большое разнообразие аллельных спектров всех STR-маркёров. Для STR-маркёров в алтайском контроле характерно присутствие от 2 до 8 аллелей (D13S1316 - 5, D13S141 - 2, D13S175 - 7, D13S1853 - 5, D13S1275 - 8, D13S292 - 4), в тувинском контроле наблюдается 4-8 аллелей (D13S1316 - 5, D13S141 - 4, D13S175 - 7, D13S1853 - 5, D13S143 - 5, D13S1275 - 8, D13S292 - 4). Спектр аллелей у гомозигот по мутациям с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC оказался значительно сужен (до 1-3 аллелей) по сравнению с контрольными выборками. У индивидуумов, гомозиготных по мутации с.516G>C, у маркёров D13S141, D13S175 и D13S1853 обнаруживается только один аллель, у D13S1316 и D13S143 - два аллеля, у D13S1275 и D13S292 - три аллеля. У гомозигот по мутации с.-23+1G>A у маркёров D13S141, D13S175, D13S1853 и D13S143 найден один аллель, у D13S1275 и D13S292 - два аллеля, у D13S1316 - три аллеля. У больных, гомозиготных по с.235delC, все STR-маркёры имеют только один аллель, кроме D13S292, у которого было выявлено два аллеля.

Сравнение контрольных выборок тувинцев и алтайцев выявило статистически значимые различия в частотах аллелей 5 из 7 анализированных STR-локусов (D13S1316, D13S141, D13S1853, D13S143, D13S1275) (данные не приведены). Кроме того, разнообразие аллелей у алтайцев по трем STR-локусам оказалось ниже, чем у тувинцев: D13S141 - 4 аллеля у тувинцев и 2 - у алтайцев; D13S1853 - 6 аллелей у тувинцев и 5 - у алтайцев; D13S143 - 5 аллелей у тувинцев, а у алтайцев этот STR-локус оказался мономорфным и представлен только аллелем 125. По локусу D13S1275 у тувинцев наиболее частым является аллель 202, а у алтайцев - 208 (**Приложения 1 и 2**).

4.2.3. Разнообразие аллелей изученных SNP-маркёров

В Приложениях 3 и 4 представлены частоты аллелей изученных SNP-маркёров (rs747931, rs5030700, rs3751385, rs2274083, rs2274084, rs1411911768, rs9552101, rs117685390, rs877098) у тувинских и алтайских больных, гомозиготных по мутациям с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC, и в контрольных выборках тувинцев и алтайцев.

rs747931. В выборке больных, гомозиготных по мутации с.-23+1G>A, у маркёра rs747931 на всех 12 хромосомах был выявлен аллельный вариант Т, у гомозигот по с.516G>C или с.235delC присутствовал только аллель С. В контрольных выборках алтайцев и тувинцев аллель Т был преобладающим.

rs5030700. В тувинской контрольной выборке и у гомозигот по мутациям с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC у маркёра rs5030700 присутствует только аллель С, а аллель Т выявлен с низкой частотой в контрольной выборке алтайцев.

rs3751385. У индивидуумов, гомозиготных по мутациям с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC, обнаружен только аллель С, тогда как в контрольных выборках тувинцев и алтайцев присутствует оба варианта аллеля (Т и С).

rs2274083 (с.341A>G) и rs2274084 (с.79G>A). Варианты с.341A>G, с.79G>A часто встречаются в азиатских регионах [Dai et al., 2009; Liu et al., 2002; Ohtsuka et al., 2003; Park et al., 2000]. У гомозигот по мутациям с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC выявлены только аллели А (rs2274083) и G (rs2274084). Аллель А (rs2274083) и аллель G (rs2274084) присутствовали у подавляющего большинства индивидуумов из контрольных выборок тувинцев и алтайцев.

rs1411911768. На момент исследования замена с.-254C>Т была обнаружена нами впервые у коренных жителей Тувы (тувинцы) и не была зарегистрирована в dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), HapMap Project (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>), 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/>). На настоящий момент она представлена в dbSNP как rs1411911768. У больных, гомозиготных по мутациям с.-23+1G>A и с.235delC, выявляется только один аллель С (rs1411911768), который преобладает в тувинской и алтайской контрольных выборках. Однако, на всех хромосомах с мутацией с.516G>C обнаруживается только аллельный вариант Т, который в

контрольных выборках тувинцев и алтайцев встречается крайне редко и только в гетерозиготном состоянии.

rs9552101. Маркёр rs9552101 в исследованных выборках гомозигот по с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC, а также в контрольной выборке алтайцев, оказался мономорфным (аллель G), а аллель A присутствует с низкой частотой только в контрольной выборке тувинцев.

rs117685390. У индивидуумов, гомозиготных по трём мажорным мутациям, был выявлен только аллель T, который также преобладает в контрольных выборках тувинцев и алтайцев.

rs877098. Аллель T маркера rs877098 был обнаружен у всех индивидуумов, гомозиготных по мутации с.235delC, а также на одной из 12 хромосом у гомозигот по с.-23+1G>A (на других 11 хромосомах – аллель C). У больных, гомозиготных по с.516G>C, выявлен только аллель C. В контрольных выборках алтайцев и тувинцев присутствует оба варианта аллелей (T и C), но аллель C является преобладающим.

Таким образом, в каждой из изученных контрольных выборок (тувинцы и алтайцы) восемь из анализируемых девяти SNP-маркёров оказались полиморфными (встречаются два разных аллеля локуса), тогда как у гомозигот по с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC выявлялся только один аллель каждого SNP-локуса. Сравнение контрольных выборок тувинцев и алтайцев выявило статистически значимые различия в частотах аллелей только по 2 из 9 анализированных SNP-локусов (rs747931 и rs117685390) ($p=0.02786$ и $p=0.03531$, соответственно). Индивидуумы, гомозиготные по мутациям с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC, хорошо дифференцируются по трем SNP-маркерам (rs747931, rs1411911768 и rs877098) (Приложения 3, 4).

4.3. Реконструкция гаплотипов участка хромосомы 13, прилегающего к гену у больных, гомозиготных по мутациям с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC

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 гаплотипы.

Для STR- и SNP-маркёров (без учета мономорфных локусов) был определен показатель неравновесия по сцеплению (см. «Материалы и методы»), на основе

которого определялись физические «границы» гаплотипов (**приложения 1-4**) (**таблицы 6-8**).

4.3.1. STR-гаплотипы

STR-гаплотипы с мутацией с.-23+1G>A. Для гомозигот по мутации с.-23+1G>A (тувинцы) были получены высокие значения показателя неравновесия по сцеплению для специфических аллелей шести STR-маркёров (D13S141, D13S175, D13S1853, D13S143, D13S1275, D13S292), таким образом, границы предполагаемых гаплотипов с с.-23+1G>A определяются дистальными маркерами D13S141 и D13S292 (~ 3.5 Mb) (**таблица 6**). В результате реконструкции гаплотипов по этим шести STR-маркёром, проведенной с использованием EM-алгоритма пакета программ Arlequin (см. «Материалы и методы»), в тувинском контроле было выявлено 68 из 247 теоретически возможных гаплотипов (**Приложение 5**) (**рисунок 15**). Наиболее частыми оказались гаплотипы 124-103-204-125-202-211 (11.5%), 124-105-204-125-202-205 (7.3%) и 124-105-204-125-208-209 (5.1%). Остальные гаплотипы обнаруживались с частотой менее 5%. У гомозигот по мутации с.-23+1G>A (тувинцы), было обнаружено три гаплотипа: 124-105-204-125-208-209 - с частотой 83.3%, 124-105-204-125-202-211 и 124-105-204-125-210-209 - с частотой 8.3% каждый, тогда как в контрольной выборке тувинцев частоты этих гаплотипов составили - 5.1%, 1.1% и 4.7%, соответственно (**рисунок 15**). Частота гаплотипа 124-105-204-125-208-209 у гомозигот по с.-23+1G>A (83.3%) статистически значимо ($p < 10^{-8}$) выше по сравнению с контрольной выборкой тувинцев (5.4%) (**таблица 9**).

STR-гаплотипы с мутацией с.516G>C. Гаплотипы у гомозигот по с.516G>C включают пять STR-маркёров (D13S1316-D13S141-D13S175-D13S1853-D13S143) и их «границы» определяются дистальными маркёрами D13S1316 и D13S143 (~ 1.6 Mb) (**таблица 7**). В тувинской контрольной выборке по пяти STR-маркёром (D13S1316-D13S141-D13S175-D13S1853-D13S143) было обнаружено 39 из 65 теоретически возможных гаплотипов (**Приложение 6**). Наиболее частыми являются два гаплотипа: 267-124-105-204-125 – 29.8% и 267-124-103-204-125 – 23.4%, а остальные гаплотипы присутствуют с частотой менее 5%. У гомозигот по с.516G>C обнаружено 3 гаплотипа: 269-124-105-204-125 (67.9%), 267-124-105-204-125 (28.6%) и 269-124-105-204-129 (3.6%) (**рисунок 15**). Частота гаплотипа 269-124-105-204-125 статистически значимо ($p < 10^{-14}$) выше, чем в контрольной выборке тувинцев (1.6%). Второй по частоте гаплотип 267-124-105-204-125 у гомозигот по с.516G>C является самым частым в тувинской контрольной выборке (29.8%), а гаплотип 269-124-105-204-129 в контрольной выборке тувинцев не обнаружен (**таблица 9**).

Таблица 6. STR-гаплотипы с мутацией с.-23+1G>A гена *GJB2*.

Шифр пациента	D13S1316	D13S141	<i>GJB2</i>	D13S175	D13S1853	D13S143	D13S1275	D13S292
Tuv_118	263/267	124	с.-23+1G>A	105	204	125	208	209
Tuv_138	259/263	124	с.-23+1G>A	105	204	125	208	209
Tuv_206	263/267	124	с.-23+1G>A	105	204	125	208	209
Tuv_119	267	124	с.-23+1G>A	105	204	125	208	209
Tuv_232	267	124	с.-23+1G>A	105	204	125	208	209
Tuv_90	267	124	с.-23+1G>A	105	204	125	202/210	209/211
Расстояние от мутации (центромера – М - теломера)	84.5 kb	42.3 kb	0	81.6 kb	273.8 kb	1.5 Mb	2.2 Mb	3.4 Mb
Наиболее частый аллель у пациентов с с.-23+1G>A	267	124	с.-23+1G>A	105	202	121	208	209
Частота этого аллеля на хромосомах с с.-23+1G>A (%)	66.67	100	100	100	100	100	83.33	91.67
Частота этого аллеля на хромосомах без с.-23+1G>A (%)	83.06	88.71	-	44.35	86.29	89.52	28.23	27.42
χ^2	1	0.54	-	11	0.84	0.44	13	18
P	0.155	1	-	1	1	1	0.0028	$<10^{-4}$
δ	-0.9683	1	-	1	1	1	0.7678	0.8852

Примечание. Цветом выделена предполагаемая область гаплотипа-основателя. М – мутация с.-23+1G>A гена *GJB2*.

Таблица 7. STR-гаплотипы с мутацией с.516G>C гена *GJB2*.

Шифр пациента	D13S1316	D13S141	<i>GJB2</i>	D13S175	D13S1853	D13S143	D13S1275	D13S292
Tuv_2	269	124	с.516G>C	105	204	125	208	205
Tuv_16	269	124	с.516G>C	105	204	125	208	205
Tuv_134	269	124	с.516G>C	105	204	125	208	205
Tuv_198	269	124	с.516G>C	105	204	125	208	205
Tuv_238	269	124	с.516G>C	105	204	125	206	209
Tuv_22	269	124	с.516G>C	105	204	125	206	209/211
Tuv_106	269	124	с.516G>C	105	204	125	212	205/211
Tuv_146	269	124	с.516G>C	105	204	125	202	209/211
Tuv_207	269	124	с.516G>C	105	204	125	208/212	205/211
Tuv_6	269	124	с.516G>C	105	204	125/129	200/208	205/211
Alt_466	267	124	с.516G>C	105	204	125	208	205
Tuv_172	267	124	с.516G>C	105	204	125	208	205/211
Tuv_81	267	124	с.516G>C	105	204	125	202/208	205/209
Tuv_174	267	124	с.516G>C	105	204	125	202/208	205/209
Расстояние от мутации (центромера – М - теломера)	80.8 kb	35.6 kb	0	85.3 kb	277.5 kb	1.5 Mb	2.2 Mb	3.4 Mb
Наиболее частый аллель у гомозигот по с.516G>C	269	124	с.516G>C	105	202	121	208	205
Частота этого аллеля на хромосомах с с.516G>C (%)	71.43	100	100	100	100	96.43	57.14	57.14
Частота этого аллеля на хромосомах без с.516G>C (%)	4.03	88.71	-	44.35	86.29	89.52	28.23	17.74
χ^2	71	2.3	-	26	0.31	0.61	12	23
p	$<10^{-7}$	0.01	-	1	1	0.2267	$<10^{-3}$	$<10^{-6}$
δ	0.7023	1	-	1	1	0.6593	0.4029	0.479

Примечание. Цветом выделена предполагаемая область гаплотипа-основателя. М – мутация с.516G>C гена *GJB2*.

Таблица 8. STR-гаплотипы с мутацией с.235delC гена *GJB2*.

Шифр пациента	D13S1316	D13S141	<i>GJB2</i>	D13S175	D13S1853	D13S143	D13S1275	D13S292
Alt_21-1	267	124	с.235delG	105	204	125	210	211
Alt_435	267	124	с.235delG	105	204	125	210	211
Alt_485	267	124	с.235delG	105	204	125	210	209
Alt_449	267	124	с.235delG	105	204	125	210	209/211
Расстояние от мутации (центромера – М - теломера)	81 kb	38.9 kb	0	85 kb	277.3 kb	1.5 Mb	2.2 Mb	3.4 Mb
Наиболее частый аллель у пациентов с с.235delC	267	124	с.235delC	105	202	121	210	211
Частота этого аллеля на хромосомах с с.235delC (%)	100	100	100	100	100	100	100	62.5
Частота этого аллеля на хромосомах без с.235delC (%)	86.36	99.09	-	46.36	73.64	100	6.36	38.64
χ^2	0.32	0.88	-	6.6	1.6	100	51	0.88
P	1	0.1462	-	1	1	-	$<10^{-7}$	0.1734
δ	1	1	-	1	1	-	1	0.3889

Примечание. Цветом выделена предполагаемая область гаплотипа-основателя. М – мутация с.235delC гена *GJB2*.

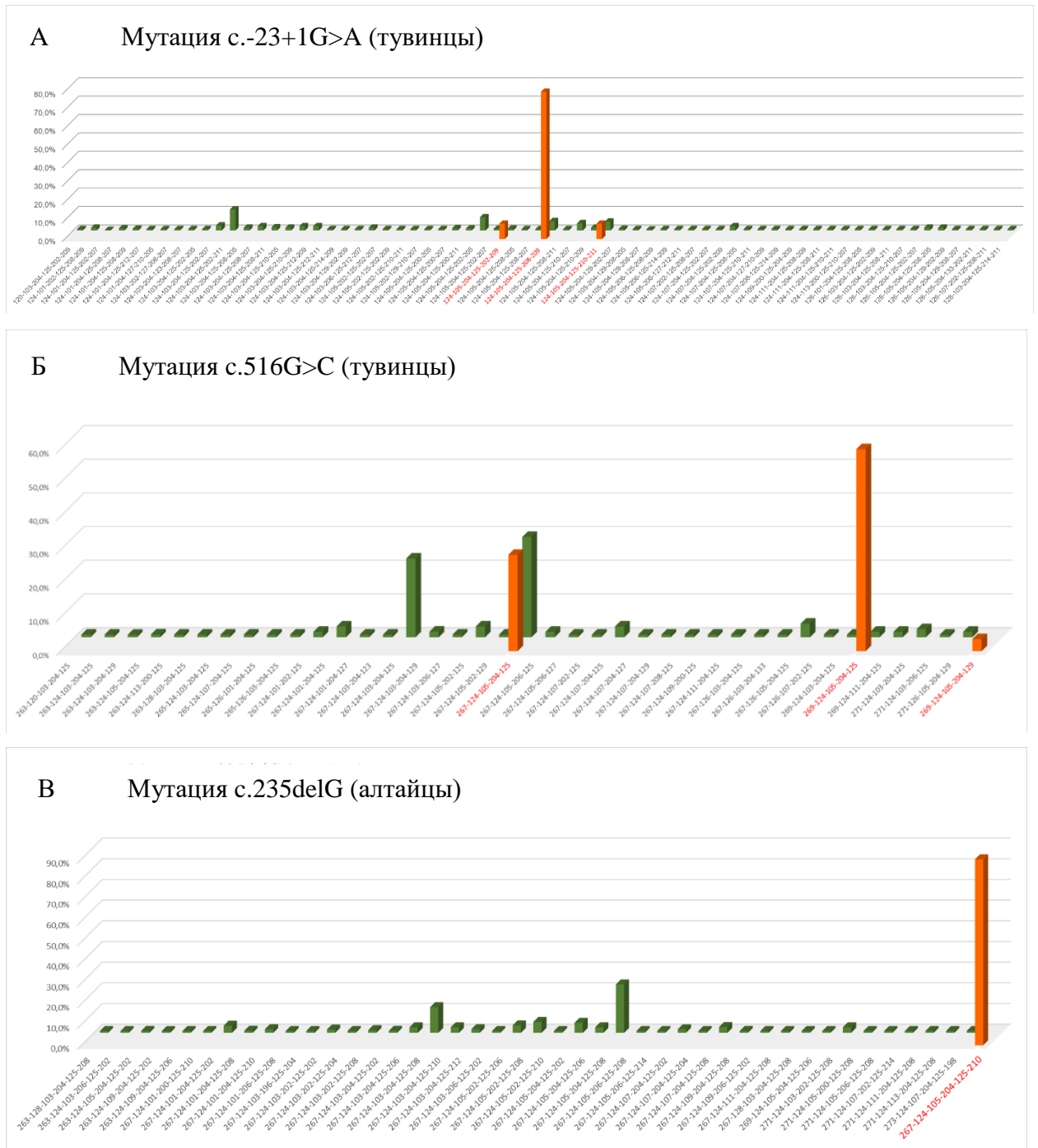


Рисунок 15. Распределение STR-гаплотипов у индивидуумов, гомозиготных по мутациям с.-23+1G>A, с.516G>C, с.235delC, и в контрольных выборках тувинцев и алтайцев. **А** – гаплотипы с мутацией с.-23+1G>A; **Б** – гаплотипы с мутацией с.516G>C; **В** - гаплотипы с мутацией с.235delC. Зелёным цветом обозначены гаплотипы в соответствующих контрольных выборках, оранжевым – у индивидуумов, гомозиготных по мажорным мутациям *GJB2*.

Таблица 9. Частота STR-гаплотипов, обнаруженных на хромосомах, несущих мутации с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC, в сравнении с хромосомами без мутаций.

Гаплотипы *	Частоты гаплотипов		χ^2	P
	Мутантные хромосомы	Нормальные хромосомы		
Гаплотипы для с.516G>C: D13S1316-D13S141-D13S175-D13S1853-D13S143				
(~ 1.6 Mb)				
269-124-105-204-125	0.6786	0.0161	79	$< 10^{-14}$
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	-	-
Гаплотипы для с.-23+1G>A: D13S141-D13S175-D13S1853-D13S143-D13S1275-D13S292				
(~ 3.5 Mb)				
124-105-204-125-208-209	0.8333	0.0538	53	$< 10^{-8}$
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	-	-
Гаплотипы для с.235delC: D13S1316-D13S141-D13S175-D13S1853-D13S143-D13S1275				
(~ 1.7 Mb)				
267-124-105-204-125-210	1.0	0	103	$< 10^{-11}$
другие гаплотипы	0	1.0	-	-

* - жирным шрифтом выделены наиболее распространённые STR-гаплотипы.

STR-гаплотипы с мутацией с.235delC. Гаплотипы у гомозигот по с.235delC (алтайцы) включают шесть STR-маркёров (D13S1316-D13S141-D13S175-D13S1853-D13S143-D13S1275) (~ 1.7 Mb) (таблица 8). В контрольной выборке алтайцев по этим шести STR-маркёрам было обнаружено 43 из 89 теоретически возможных гаплотипов (Приложение 7), из которых 3 гаплотипа встречаются с частотой, превышающей 5%: 267-124-105-204-125-208 (23.4%), 267-124-103-204-125-208 (12.4%), 267-124-105-202-125-208 (5.3%) (рисунок 15). У больных, гомозиготных по с.235delC, был выявлен только один гаплотип 267-124-105-204-125-210 (100%), который отсутствует в контрольной выборке алтайцев ($p < 10^{-11}$) (таблица 9).

4.3.2. SNP-гаплотипы

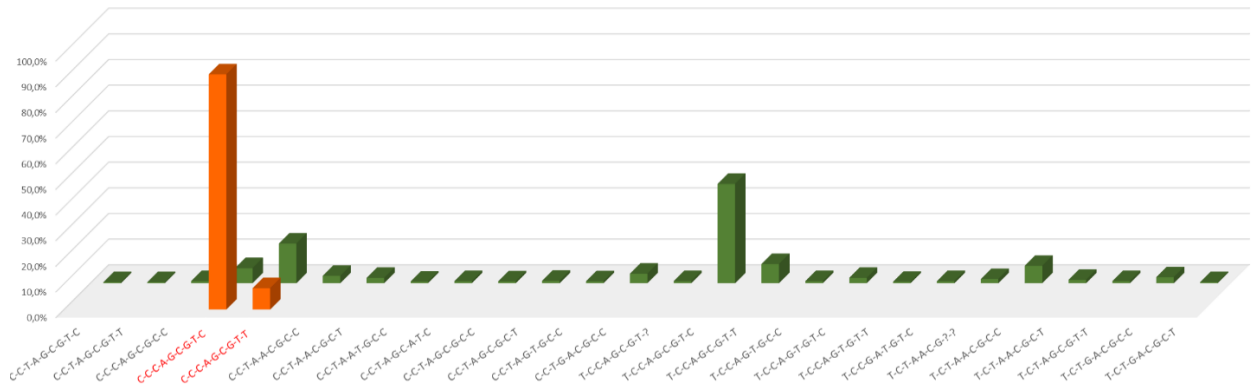
На основе данных, полученных при генотипировании девяти SNP-маркёров в изучаемых выборках (**Приложение 3 и 4**), с использованием EM-алгоритма пакета программ Arlequin (см. «Материалы и методы»), были реконструированы SNP-гаплотипы у больных, гомозиготных по мутациям с.-23+1G>A, с.516G>C, с.235delC, и в контрольных выборках тувинцев и алтайцев (**рисунок 16**). Анализ неравновесия по сцеплению показал, что все девять изученных SNP-маркёров оказались тесно сцепленными с мутациями с.-23+1G>A, с.516G>C и с.235delC.

SNP-гаплотипы с мутацией с.-23+1G>A. У больных, гомозиготных по с.-23+1G>A найдено два SNP-гаплотипа: 1) C-C-C-A-G-C-G-T-C (91.7%) и 2) C-C-C-A-G-C-G-T-T (8.3%) (**рисунок 16**). В тувинской контрольной выборке обнаруживаются 26 из 90 теоретически возможных SNP-гаплотипов (**Приложение 8**). Наиболее часто встречаются два гаплотипа: T-C-C-A-G-C-G-T-C с частотой 38.7% и C-C-C-A-G-C-G-T-T – 15.5%. Остальные гаплотипы обнаружены с частотами менее чем 10%. Частота 1-ого гаплотипа C-C-C-A-G-C-G-T-C у гомозигот по с.-23+1G>A (91.7%) статистически значимо ($p < 10^{-10}$) выше его частоты в контрольной тувинской выборке (5.3%) (**таблица 10**).

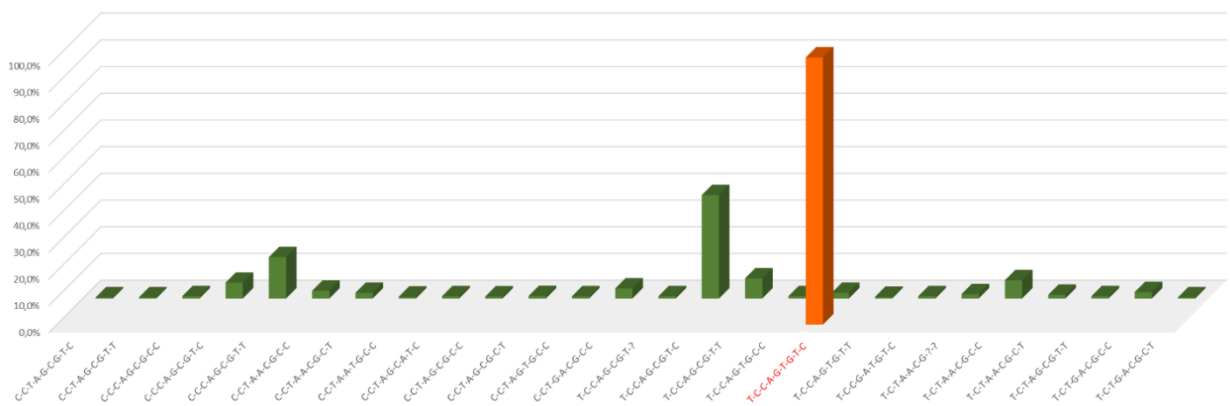
SNP-гаплотипы с мутацией с.516G>C. У индивидуумов, гомозиготных по с.516G>C, был обнаружен только один гаплотип T-C-C-A-G-T-G-T-C (100%) (**рисунок 16**), частота которого в тувинской контрольной выборке составляет 2.2% (**таблица 10**).

SNP-гаплотипы с мутацией с.235delC. У индивидуумов, гомозиготных по с.235delC, был обнаружен единственный гаплотип T-C-C-A-G-C-G-T-T (100%) (**рисунок 16**). В алтайской контрольной выборке найдено 22 из 98 теоретически возможных гаплотипов (**Приложение 9**). Наиболее частыми являются два гаплотипа: T-C-C-A-G-C-G-T-C (28.1%) и T-C-C-A-G-C-G-T-T (16.1%), последний является единственным SNP-гаплотипом, выявленным у гомозигот по с.235delC, остальные гаплотипы встречаются с частотой менее 10%. Различия в частоте гаплотипа T-C-C-A-G-C-G-T-T (100%), выявленного у гомозигот по с.235delC, и в алтайской контрольной выборке (15.9%), не являются статистически значимыми (**таблица 10**).

А Мутация с.-23+1G>A (тувинцы)



Б Мутация с.516G>C (тувинцы)



В Мутация с.235delG (алтайцы)

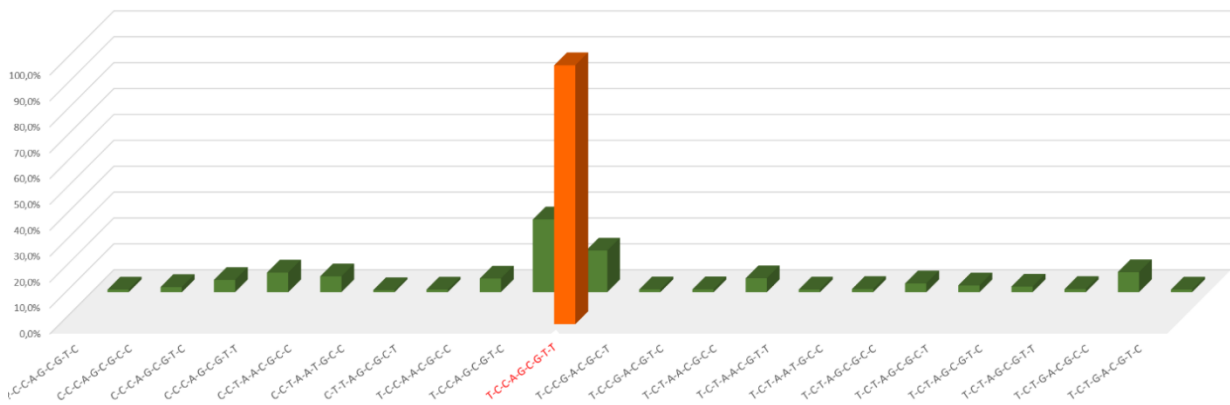


Рисунок 16. Распределение SNP-гаплотипов у индивидуумов, гомозиготных по мутациям с.-23+1G>A, p.W172C, с.235delC, и в контрольных выборках тувинцев и алтайцев. **А** – гаплотипы с мутацией с.-23+1G>A; **Б** – гаплотипы с мутацией p.W172C; **В** - гаплотипы с мутацией p.W172C. Зелёным цветом обозначены гаплотипы в соответствующих контрольных выборках, оранжевым – у индивидуумов, гомозиготных по мажорным мутациям *GJB2*.

Таблица 10. 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		χ^2	P
	Мутантные хромосомы	Нормальные хромосомы		
Гаплотипы для с.516G>C: rs747931-rs5030700-rs3751385-rs2274083-rs2274084-rs1411911768-rs9552101-rs117685390-rs877098				
Т-С-С-А-Г-Т-Г-Т-С	1	0.0217	120	< 10 ⁻²⁶
другие гаплотипы	0	0.9783	-	-
Гаплотипы для с.-23+1G>A: rs747931-rs5030700-rs3751385-rs2274083-rs2274084-rs1411911768-rs9552101-rs117685390-rs877098				
С-С-С-А-Г-С-Г-Т-С	0.9167	0.0532	64	< 10 ⁻¹⁰
С-С-С-А-Г-С-Г-Т-Т	0.0833	0.1540	0.047	0.4488
другие гаплотипы	0	0.7928	-	-
Гаплотипы для с.235delC: rs747931-rs5030700-rs3751385-rs2274083-rs2274084-rs1411911768-rs9552101-rs117685390-rs877098				
Т-С-С-А-Г-С-Г-Т-Т	1	0.1587	26	1
другие гаплотипы	0	0.8413	-	-

* - жирным шрифтом выделены наиболее распространённые SNP-гаплотипы.

Сравнительный анализ аллелей SNP-маркёров, входящих в SNP-гаплотипы, выявил три SNP-маркёра (rs747931, rs1411911768, rs877098) со специфичными аллелями, которые отчетливо дифференцируют наиболее общие гаплотипы для каждой из трёх анализируемых мутаций с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC (рисунок 17).

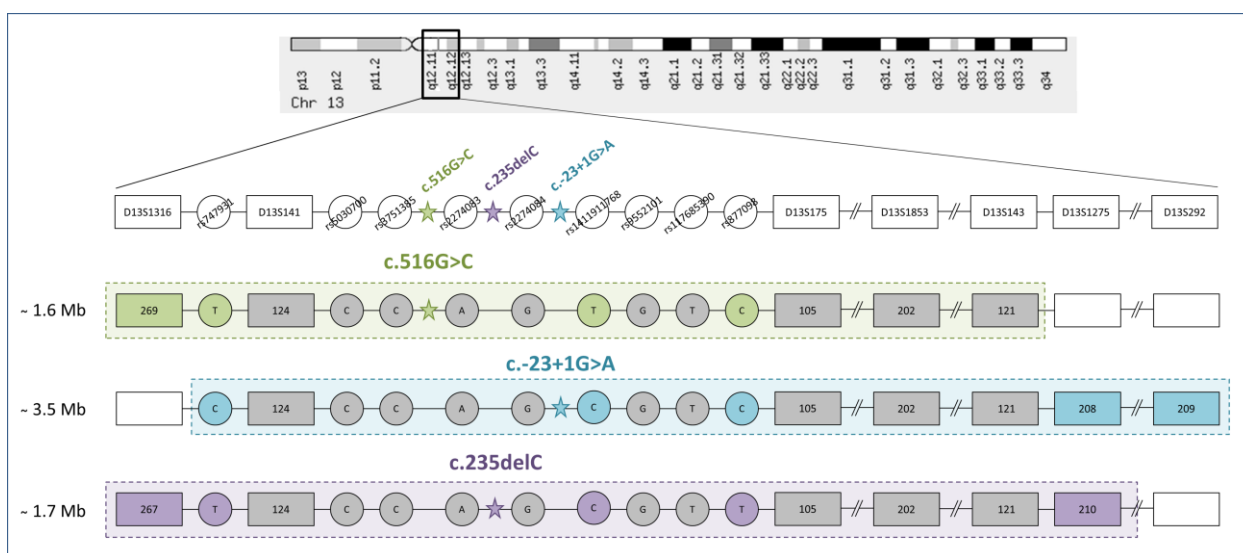


Рисунок 17. Схематическое представление выявленных гаплотипов-основателей для каждой из трех анализируемых мутаций: *c.516G>C*, *c.-23+1G>A*, *c.235delC*. Гаплотипы, общие для каждой мутации, ограничены пунктирной линией. Аллели маркёров, входящие в состав гаплотипов-основателей, обозначены серым цветом. Аллели маркёров, являющиеся отличительной особенностью гаплотипа для той или иной мутации (*c.516G>C*, *c.-23+1G>A*, *c.235delC*), выделены цветом соответствующей мутации. STR-маркёры обозначены прямоугольниками, SNP-маркёры – кругами.

4.4. Мутация *c.35delG* гена *GJB2* на территории Сибири и анализ частоты гетерозиготного носительства *c.35delG* в России

Рецессивная мутация *c.35delG* гена *GJB2* является характерной для европейских популяций и данные о ее распространенности уже известны для большинства регионов мира [Chan et al., 2014; Denoyelle et al., 1999; Gasparini et al., 2000; Danilenko et al., 2012; Kenneson et al., 2002; Morton, Nance, 2006 и др.]. На территории России соответствующие данные для популяций европеоидного происхождения (русские) получены в основном только для центральных регионов страны, тогда как на территории Сибири до недавнего времени сведения о распространенности *c.35delG* были представлены только для русского населения Республики Саха (Якутия, Восточная Сибирь) [Barashkov et al., 2016].

Скрининг мутации *c.35delG*, впервые проведенный в этой работе в выборке несвязанных родством здоровых индивидуумов (преимущественно русских), проживающих в г. Новосибирске (Западная Сибирь) ($n=122$), показал, что частота гетерозиготного носительства *c.35delG* составляет 4.1%. Полученные данные

дополняют имеющиеся сведения о распространенности мутации с.35delG в российских популяциях (**рисунок 18** и **Приложение 10**).

Мы проанализировали все имеющиеся литературные данные (опубликованные по 2017г. включительно) о частоте гетерозиготного носительства мутации с.35delG гена *GJB2* в популяциях России, а также в ряде стран, ранее входивших в состав бывшего СССР (**рисунок 18** и **Приложение 10**). Такой набор данных представляется нам оправданным с точки зрения формирования современного этнически гетерогенного населения Российской Федерации. Частота гетерозиготного носительства с.35delG варьирует в широких пределах - от 0% до 7.5%. Наиболее высокие показатели характерны для популяций европеоидного населения северо-западной части России (до 7.5% в Калининградской области и 5.9% – в Ленинградской области). Современное население Калининградской области, представленное, в основном, русскими (около 80%), было сформировано в результате масштабной послевоенной (после 1945 г.) миграции из европейских регионов бывшего СССР. Высокая частота гетерозиготного носительства с.35delG, выявленная в сельских районах Ленинградской области (5.9%), возможно, обусловлена своеобразием населения этого региона: здесь издавна проживали вепсы – представители финно-угорской лингвистической группы, а ранее в некоторых других финно-угорских группах была выявлена высокая частота гетерозиготного носительства с.35delG: 4.4%-4.5% - у эстонцев, 5.7-6.2% - у мордвинков. Мутация с.35delG обнаруживается с более низкими значениями или отсутствует у тюркоязычных народов Волго-Уральского региона России (татары, башкиры, чуваша), Сибири (алтайцы, тувинцы, якуты) и Средней Азии (казахи, уйгуры, узбеки), а также у монголоязычных бурят (Республика Бурятия). На Кавказе наиболее высокие значения частоты гетерозиготного носительства с.35delG отмечаются у абхазов (3.8%) и армян (3.7%).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что 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 18. 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.

Примечание к рисунку 19

Частоты гетерозиготного носительства с.35delG получены из литературных данных, опубликованных по 2017 г. включительно (см. подробнее **Приложение 10**). Цифрами от 1 до 36 обозначены анализируемые выборки (регион исследования или этническая принадлежность обследованных, указанные в оригинальном исследовании). В некоторых случаях частота гетерозиготного носительства с.35delG рассчитана нами на основании данных, приведенных в оригинальных публикациях. При наличии нескольких наборов данных из разных литературных источников на карте обозначали максимальное значение частоты гетерозиготного носительства с.35delG в обследуемой выборке. **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** – чувашы (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%).

4.5. Сравнительный анализ STR-гаплотипов с мутацией с.35delG

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 (**таблица 11**).

Общая доля двух наиболее частых гаплотипов D13S141-с.35delG-D13S175-D13S1853 (размером ~ 316 kb) у 24 индивидуумов, гомозиготных по с.35delG, (126-Т-с.35delG-105-202 и 124-Т-с.35delG-105-202), составила 52.5%. При ограничении размера гаплотипа до ~ 125 kb (по теломерному маркеру D13S175, наиболее часто используемому в подобного рода работах), суммарная доля гаплотипов 126-Т-

с.35delG-105 (56.3%) и 124-T-с.35delG-105 (29.2%) достигает 85.5%. Аллель Т маркера rs3751385 (~ 0.73 kb от с.35delG) в образцах ДНК из Сибири находится в полном сцеплении с мутацией с.35delG.

Таблица 11. Гаплотипы хромосом с мутацией с.35delG гена *GJB2*.

Шифр / № образца	D13S141	<i>GJB2</i>		D13S175	D13S1853
		rs3751385	с.35delG		
A_254	126	T	с.35delG	105	202
A_477	126	T	с.35delG	105	202
T_209	126	T	с.35delG	105	202
T_88	126	T	с.35delG	105	202
Y_15	126	T	с.35delG	105	202
Y_20	126	T	с.35delG	105	202
A_05-3	126	T	с.35delG	105	204
A_275	126	T	с.35delG	105	204
Y_7	126	T	с.35delG	105	202/206
Y_8	126	T	с.35delG	105	202/206
Y_12	126	T	с.35delG	105	200/206
Y_16	126	T	с.35delG	105	202/206
A_460	126	-	с.35delG	103	204
Y_13	126	T	с.35delG	105/113	202
Y_14	126	T	с.35delG	105/109	202
Y_19	126	T	с.35delG	105/109	202
A_09-1	124	T	с.35delG	105	202
Y_9	124	T	с.35delG	105	202
Y_10	124	T	с.35delG	105	202
Y_11	124	T	с.35delG	105	202
Y_17	124	T	с.35delG	105	202
A_34-2	124	T	с.35delG	105	202/206
Y_18	124	T	с.35delG	105/109	202
A_458	124	T	с.35delG	105/109	204
Расстояние от мутации (центромера – М - теломера)	39.2 kb	730 bp	0	84.8 kb	277 kb
Частый аллель у пациентов с с.35delG	126	T	с.35delG	105	202
Частота этого аллеля на хромосомах с с.35delG (%)	66.67	100	100	85.42	70.83
Частота этого аллеля на хромосомах без с.35delG (%)	38.06	16.22	-	39.55	29.85
X ²	11	76	-	28	23
p	0.0006	<10 ⁻²¹	-	<10 ⁻⁷	<10 ⁻⁶
δ	0.4618	1.0000	-	0.7588	0.5842

Примечание: Цветом выделена предполагаемая область гаплотипа-основателя. М – мутация с.35delG гена *GJB2*.

Большой интерес представляет сопоставление STR-гаплотипов с мутацией с.35delG, выявленных в Сибири, с соответствующими данными для других популяций. Такое сопоставление оказалось возможным по двум маркерам D13S141 и D13S175, соответствующие аллели которых входили в состав гаплотипов с мутацией с.35delG в других ранее изученных популяциях [Шубина-Олейник, 2015; Abidi et al., 2008; Balci et al., 2005; Dzhemileva et al., 2011; Kokotas et al., 2008; 2010; Shahin et al., 2002; Tekin et al., 2005]. В **таблице 12** обобщены имеющиеся литературные сведения о наиболее частых гаплотипах D13S141-с.35delG-D13S175 в разных популяциях (частоты гаплотипов рассчитаны на основании данных, приведенных в оригинальных источниках). Можно заметить, что аллель 105 маркера D13S175 присутствует в составе специфичных гаплотипов D13S141-с.35delG-D13S175 в большинстве исследованных популяций. Что же касается маркера D13S141, то для классификации обнаруженных аллелей этого маркера в разных исследованиях использовалось либо простое цифровое обозначение, либо аллель обозначался в соответствии с размером амплифицируемого фрагмента (пн), получаемого различными методами генотипирования. Таким образом, без унифицированной классификации аллелей D13S141 сложно сделать вывод об идентичности того или иного гаплотипа с мутацией с.35delG, включающего аллели D13S141. Так, например, было показано, что в состав самых частых выявленных гаплотипов D13S141-с.35delG-D13S175 входят близкие по длине амплифицируемого фрагмента D13S141-аллели 127 и 125: гаплотип 127-35delG-105 - в популяциях Турции, Греции, Испании, Республики Беларусь [Шубина-Олейник, 2015; Kokotas et al., 2008, 2010; Tekin et al., 2005], гаплотип 125-с.35delG-105 - в популяциях Марокко и Волго-Уральского региона России [Abidi et al., 2008; Dzhemileva et al., 2011]. С одной стороны, нельзя исключить, что аллели 125 и 127 идентичны и разница обусловлена методическими различиями при генотипировании D13S141 в разных исследованиях, а с другой стороны, наиболее частые гаплотипы с с.35delG, выявленные в различных популяциях, действительно могут включать различные аллели D13S141.

С помощью секвенирования по Сэнгеру мы провели сравнительный анализ образцов ДНК из Сибири с наиболее частыми D13S141-аллелями 126 и 124, образцов ДНК с D13S141-аллелями 127 и 125 из Республики Беларусь [Шубина-

Олейник, 2015] и образцов ДНК с D13S141-аллелями 125 и 123 из Волго-Уральского региона России, любезно предоставленными Л. Джемилевой [Dzhemileva et al., 2011]. При попарном сравнении в анализируемых образцах было обнаружено 14 (CA₁₄) и 13 (CA₁₄) динуклеотидных повторов СА, соответственно. Таким образом, идентифицированные нами в сибирских образцах наиболее частые D13S141-аллели 126 (CA₁₄) и 124 (CA₁₃), D13S141-аллели 127 (CA₁₄) и 125 (CA₁₃) в Республике Беларусь [Шубина-Олейник, 2015], и D13S141-аллели 125 (CA₁₄) и 123 (CA₁₃) - в популяциях Волго-Уральского региона [Dzhemileva et al., 2011], входящие в состав общих предковых гаплотипов с мутацией с.35delG, оказались идентичными (**таблица 12**). К сожалению, в работах других авторов не приводятся сведения о соответствии числа повторов СА идентифицированным аллелям D13S141, поэтому их детальное сопоставление в настоящее время не представляется возможным.

Таблица 12. Наиболее частые гаплотипы D13S141-с.35delG-D13S175, включающие мутацию с.35delG, в различных популяциях.

Гаплотипы D13S141-с.35delG-D13S175 (%)	Регион (этническая принадлежность)	Ссылки
126*-105 (56.3%), 124**-105 (29.2%)	Республики Алтай, Тыва, Якутия (Сибирь, Россия) (преимущественно русские)	наши данные
125*-105 (67.9%), 123**-105 (12.5%)	Волго-Уральский регион России (преимущественно русские и татары)	[Dzhemileva et al., 2011]
127*-105 (71.8%), 125**-105 (18.2%)	Республика Беларусь	[Шубина-Олейник, 2015]
3-4 (90%)*** 3-4 (100%)***	Палестина Израиль	[Shahin et al., 2002]
2-6 (34.5%)***, 3-5 (26.9%)*** 2-5 (42.9%)***, 3-5 (33.3%)***	Восточный Черноморский регион, Турция Другие регионы Турции	[Balci et al., 2005]
5 (127)-4 (105) (43%), 5 (127)-4 (105) / 4 (125)-4 (105) (18%)	Анатолия, Турция	[Tekin et al., 2005]
125-105 (83.3%)***, 123-105 (10.0%)***	Марокко (северная Африка)	[Abidi et al., 2008]
127-105 (61.5%)***, 125-105 (15.6%)*** 127-105 (60.3%)***, 125-105 (26.8%)***	Испания Греция	[Kokotas et al., 2010]

* - аллель включает 14 динуклеотидных повторов СА (CA₁₄); ** - аллель включает 13 динуклеотидных повторов СА (CA₁₃); *** - частоты гаплотипов рассчитаны нами на основании данных, приведенных в оригинальных источниках [Shahin et al., 2002; Balci et al., 2005; Abidi et al., 2008; Kokotas et al., 2010].

4.6. Оценка возраста мутаций с.-23+1G>A, с.516G>C, с.235delC, с.35delG гена *GJB2* в Сибири

Наиболее часто для оценки возраста (времени, прошедшего с момента их появления) мутаций, ассоциированных с заболеваниями, используют подход «молекулярных часов», оценивая количество поколений (g), прошедших со времени возникновения мутации в популяции до настоящего момента с использованием полиморфных генетических маркеров (STRs и SNPs). Выбор маркера основывается на анализе частот его аллелей на хромосомах с мутацией и аллелей на хромосомах, не несущих мутацию, и неравновесию по сцеплению его аллелей с мутацией. Для некоторых мажорных мутаций гена *GJB2* уже получены приблизительные оценки их возраста и определены возможные регионы их возникновения. Следует отметить, что существует много факторов (например, скорость рекомбинационных событий отличается на разных участках генома), которые могут исказить получаемые оценки возраста мутаций.

Для оценки возраста *GJB2*-мутаций мы использовали данные о генотипировании нескольких SNP- и STR-маркеров, фланкирующих ген *GJB2*. Критериями для выбора маркёров, используемых для оценки возраста мутаций, были: значения неравновесия по сцеплению аллелей маркера с мутацией; достоверные различия в частоте аллелей маркера между гомозиготами по мутациям и выборками индивидуумов без мутаций; учитывалось также расстояние, на котором располагается маркёр от изучаемой мутации (обычно используют самый дальний, «дистальный», маркёр), а также возможность сопоставления полученных результатов с литературными данными по другим популяциям.

Для мутации с.516G>C возраст оценивали по дистальному «теломерному» маркёру D13S143. По грубой оценке, возраст мутации с.516G>C составил ~ 700 лет (или ~ 27.4 поколений).

Для расчёта возраста мутации с.-23+1G>A мы взяли данные о наиболее дистально расположенном «центромерном» SNP-маркёре rs747931 и микросателлитном локусе D13S143, который уже использовали ранее для оценки времени возникновения с.-23+1G>A в Якутии [Barashkov et al., 2014]. При подсчёте возраста с.-23+1G>A на территории Тувы было выявлено, что она возникла в интервале 192.3 (rs747931) – 87.2 (D13S143) поколений (~ 4800 - 2200 лет) назад.

Для мутации с.235delC пока не удалось оценить возраст её появления на территории Южной Сибири, так как все гомозиготы по этой мутации имели идентичные STR- и SNP-гаплотипы, соответственно, для используемых маркёров не было обнаружено рекомбинационных событий. Для установления возраста этой мутации необходим дополнительный анализ других, более дистально расположенных, полиморфных локусов, фланкирующих ген *GJB2*.

Возраст мутации с.35delG оценивали с помощью двух STR-маркёров (D13S175 и D13S1853). Маркёр D13S175 широко использовался для датировки этой мутации в других популяциях. В Сибири возраст мутации, оцененный по этому маркёру, составил ~ 4800 лет. Однако, наиболее «удачным» маркёром для оценки времени возникновения мутации с.35delG на территории Сибири оказался D13S1853, находящийся на более далеком расстоянии от мутации с.35delG и сохраняющий с ней сцепление. Оценка возраста с использованием D13S1853 составила ~ 8100 лет. Таким образом, грубая оценка возраста с.35delG в Сибири находится в диапазоне от ~ 8100 лет до ~ 4800 лет.

Совокупность полученных нами данных свидетельствует в пользу общности происхождения мутации с.35delG в Восточной Европе и на территории России, что 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 Европе [Abidi et al., 2008; Balci et al., 2005; Belguith et al., 2005; Kokotas et al., 2008, 2010; Lucotte, Diéterlen et al., 2005; Norouzi et al., 2011; Rothrock et al., 2003; Shahin et al., 2002; Tekin et al., 2001, 2005; Van Laer et al., 2001;]. Заселение Сибири русскими началось сравнительно недавно, в конце XVI века [Окладников А.П. «История Сибири с древнейших времен до наших дней, 1968»] и современное европеоидное население Сибири сформировалось в результате многократных миграционных потоков из европейской части России. Таким образом, 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). Однако, с учетом современных данных о древних компонентах в происхождении современных европейцев [Lazaridis et al., 2014], можно предположить, что мутация с.35delG, возникнув на Ближнем Востоке

или в Средиземноморье, могла также независимо возникнуть и у представителей древнего населения Северо-Западной Европы. Детальное изучение гаплотипов, ассоциированных с мутацией c.35delG, у населения различных регионов Европы могло бы пролить свет на регионы происхождения и возраст этой мутации.

4.7. 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*. Существует ряд предположений о причинах потери слуха у таких больных: (1) наличие каких-либо патогенетических вариантов в некодирующей последовательности гена *GJB2*, не подвергавшейся анализу при рутинной диагностике; (2) наличие мутаций в регуляторной области, расположенной вне гена *GJB2*; (3) определенная часть больных, имеющих одну рецессивную *GJB2*-мутацию, возможно, являются случайными носителями такой мутации, и отсутствие слуха у них определяется какими-либо другими (генетическими или негенетическими) причинами.

Рутинный мутационный скрининг гена *GJB2* обычно фокусируется на кодирующей области (экзон 2) и сайте сплайсинга, расположенного рядом с некодирующим экзоном 1. Лишь в нескольких исследованиях сообщалось, что некоторые варианты гена *GJB2* в upstream-районе и важной для транскрипции гена области базального промотора (128 пн), включающего два GC-боксов и ТАТА-боксов [Tu, Kiang, 1998] (**рисунок 19**), а также в акцепторном сайте сплайсинга, могут быть ассоциированы с потерей слуха [Gandía et al., 2013; Mani et al., 2009; Matos et al., 2007, 2011]. Известно также несколько редких крупных делеций, которые элиминируют гипотетический *cis*-регуляторный элемент, расположенный в удаленном от *GJB2* upstream-районе [Bliznetz et al., 2014, 2017; del Castillo et al., 2002, 2005; Feldmann et al., 2009; Tayoun et al., 2016; Wilch et al., 2010].

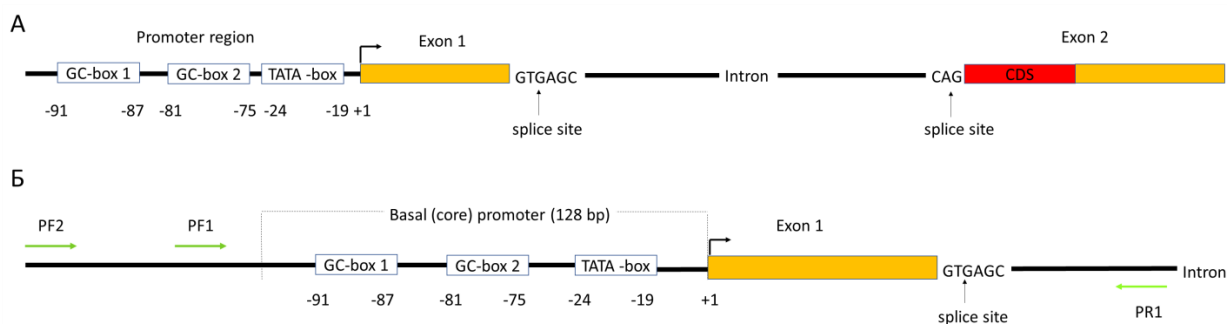


Рисунок 19. Структура гена *GJB2*. PF2, PF1 и PR1 - праймеры для секвенирования промоторной области гена *GJB2*.

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*: 10 пациентов были гетерозиготны по мутации с.516G>C (p.W172C), 6 пациентов – по мутации с.-23+1G>A, 1 пациент – по с.235delC и 1 пациент – по с.109G>A (p.V37I) (таблица 13).

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 и охватывающей 1009 пн (согласно [Matos et al., 2007]) в 18 образцах ДНК пациентов с моноаллельными *GJB2*-мутациями. Мы также проанализировали область *GJB2*, где расположен акцепторный сайт сплайсинга [Gandía et al., 2013]. Вариации, обнаруженные в этих анализируемых регионах, представлены в таблице 13 и среди них не было найдено известных патогенетических вариантов [Gandía et al., 2013; Mani et al., 2009; Matos et al., 2007, 2011]. Интересно, что полное сцепление варианта Т в rs1411911768 (с.-254C>T) с мутацией с.516G>C (p.W172C), выявленное у гомозигот по этой мутации (см. раздел 4.2.3.), наблюдалась и у p.W172C-гетерозигот: у всех был выявлен генотип C/T (rs1411911768) (Таблица 13). Кроме того, в группе пациентов с моноаллельными *GJB2*-мутациями не было выявлено наиболее распространенной крупной делеции *GJB6-D13S1830* [del Castillo et al., 2002].

Недавно наша группа приступила к тестированию гена *SLC26A4* (MIM 605646, 7q22.3, GRCh38: 7:107.660,634-107.717.808) как потенциального гена-кандидата для выяснения причин потери слуха у *GJB2*-негативных пациентов, включая 18 *GJB2*-гетерозиготных пациентов (данные в процессе и не показаны).

Известно, что рецессивные мутации гена *SLC26A4* являются второй по значимости (после мутаций гена *GJB2*) молекулярно-генетической причиной потери слуха в азиатских популяциях. Мы обнаружили, что потеря слуха, по крайней мере, у 4 из 18 (22%) пациентов с одной *GJB2*-мутацией обусловлена наличием биаллельных патогенетических рецессивных вариантов в гене *SLC26A4* (Таблица 13) и, следовательно, эти пациенты определенно являются лишь случайными носителями моноаллельной мутации гена *GJB2*. Если предположить, что потеря слуха у пациентов с *GJB2*-моноаллельными мутациями не связана с геном *GJB2*, то частота *GJB2*-мутаций в выборке *GJB2*-негативных пациентов (то есть без группы пациентов с биаллельными *GJB2*-мутациями) должна соответствовать их частоте в контрольной выборке. Чтобы проверить это предположение, мы рассчитали общую частоту рецессивных *GJB2*-мутаций у *GJB2*-негативных тувинских пациентов (0.0479) и сопоставили ее с таковой в контрольной выборке тувинцев (0.0478). Отсутствие статистически значимых различий свидетельствует о том, что потеря слуха у пациентов с моноаллельными *GJB2*-мутациями обусловлена другими, чем ген *GJB2*, причинами (генетическими или негенетическими).

Таблица 13. Генотипы пациентов с одной *GJB2*-рецессивной мутацией.

dbSNP		rs9550621	rs117685390	rs9552101	rs1417111166	rs1411911768	rs574815423	rs786204734	rs9578260	rs201895089		
NM_004004.5:		c.-484T>C	c.-410T>C	c.-369A>G	c.-259C>T	c.-254C>T	c.-216T>G	c.-23G>T	c.-22-12C>T	c.-22-2A>C		
Расположение		<i>GJB2</i> promotor region						<i>GJB2</i> exon 1	<i>GJB2</i> splice acceptor site			
ClinVar		NA	NA	NA	NA	N/A	Likely benign	Likely pathogenic	Benign / Uncertain-significance	Pathogenic		
Ссылка		[Matos et al., 2011]	[Matos et al., 2011]	[Matos et al., 2011]	[Matos et al., 2007]	-	[Matos et al., 2011]	[Mani et al., 2009]	[Matos et al., 2011]	[Gandía et al., 2013]		
Пациенты		Клинически значимый <i>GJB2</i> -генотип	Варианты в некодирующей области гена <i>GJB2</i>									Результат тестирования гена <i>SLC26A4</i> *
1	Tuv_008	c.[516G>C];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/T	T/T	G/G	C/C	A/A	патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты не выявлены
2	Tuv_011	c.[-23+1G>A];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/C	T/T	nt	C/C	A/A	биаллельные патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты
3	Tuv_033	c.[-23+1G>A];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/C	T/T	G/G	C/C	A/A	патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты не выявлены
4	Tuv_076	c.[516G>C];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/T	T/T	G/G	nt	nt	биаллельные патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты
5	Tuv_078	c.[516G>C];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/T	T/T	G/G	C/C	A/A	1 патогенетический <i>SLC26A4</i> -вариант
6	Tuv_080	c.[-23+1G>A];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/C	T/T	G/G	C/C	A/A	патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты не выявлены
7	Tuv_093	c.[516G>C];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/T	T/T	G/G	C/C	A/A	патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты не выявлены
8	Tuv_128	c.[79G>A];[516G>C]	C/C	T/C	G/G	C/C	C/T	T/T	G/G	C/C	A/A	патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты не выявлены
9	Tuv_153	c.[-23+1G>A];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/C	T/T	G/G	C/C	A/A	патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты не выявлены
10	Tuv_184	c.[-23+1G>A];[79G>A]	C/C	T/C	G/G	C/C	C/C	T/T	G/G	C/C	A/A	патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты не выявлены
11	Tuv_185	c.[235delC];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/C	T/T	G/G	C/C	A/A	патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты не выявлены
12	Tuv_190	c.[109G>A];[wt]	C/C	nt	G/G	C/C	C/C	T/T	G/G	C/C	A/A	патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты не выявлены
13	Tuv_231	c.[516G>C];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/T	T/T	G/G	C/C	A/A	биаллельные патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты
14	Tuv_233	c.[-23+1G>A];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/C	T/T	G/G	C/C	A/A	патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты не выявлены
15	Tuv_246	c.[516G>C];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/T	T/T	G/G	C/C	A/A	патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты не выявлены
16	Tuv_250	c.[516G>C];[wt]	C/C	nt	nt	C/C	C/T	T/T	G/G	C/C	A/A	патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты не выявлены
17	Tuv_265	c.[516G>C];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/T	T/T	G/G	C/C	A/A	биаллельные патогенетические <i>SLC26A4</i> -варианты
18	Tuv_300	c.[516G>C];[wt]	C/C	T/T	G/G	C/C	C/T	T/T	G/G	C/C	A/A	1 патогенетический <i>SLC26A4</i> -вариант

Патогенетические рецессивные варианты в гене *GJB2* выделены жирным шрифтом. * - присутствие биаллельных патогенетических вариантов в гене *SLC26A4* является причиной потери слуха у пациента.

4.8. Верификация *cis*-положения вариантов с.79G>A (p.V27I, rs2274084) и с.341A>G (p.E114G, rs2274083) гена *GJB2* и изучение их ассоциации с потерей слуха

Варианты последовательности гена *GJB2* с.79G>A (p.V27I, rs2274084) и с.341A>G (p.E114G, rs2274083) (**рисунок 20**) широко распространены в азиатских популяциях и их частота может достигать ~ 30% и ~ 10-15%, соответственно [Chen et al., 2016; Cheng et al., 2009; Choi et al., 2011; Han et al., 2008; Hernández-Juárez et al., 2014; Kim et al., 2010; Kudo et al., 2000; Pandya et al., 2003; Park et al., 2000; Posukh et al., 2005; Putcha et al., 2007; Garcia Sanchez et al., 2014; Tang et al., 2006; Tekin et al., 2010].

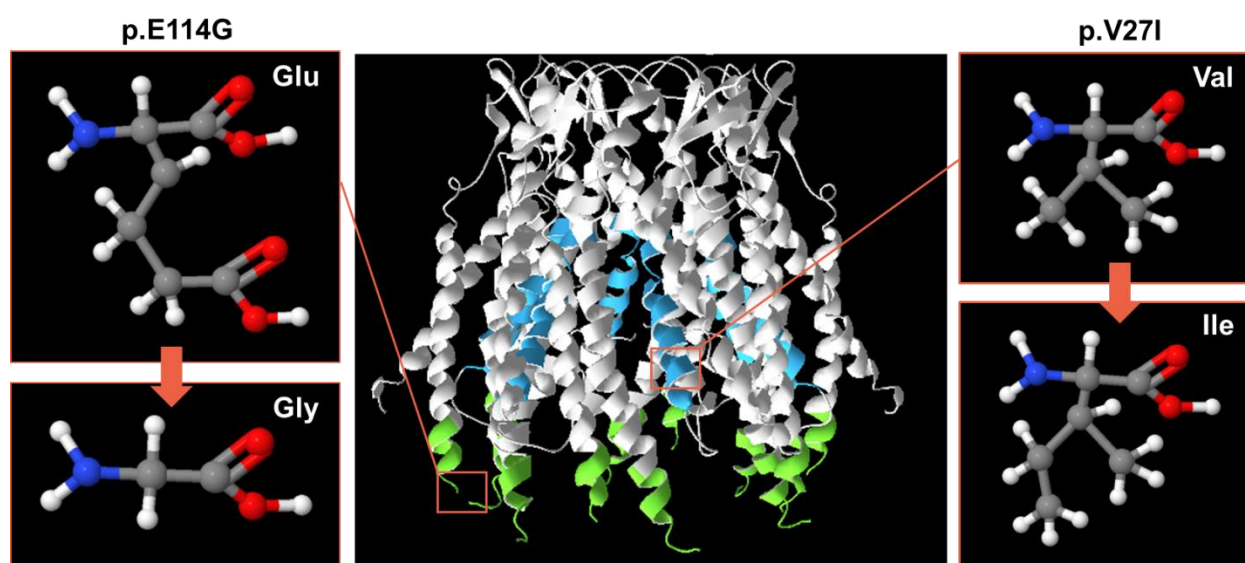


Рисунок 20. Локализация вариантов p.E114G (p.Glu114Gly) и p.V27I (p.Val27Ile) в структуре белка Cx26 (PDB ID 2ZW3). Трансмембранный домен (аминокислоты в позиции 21-40) белка коннексина 26 выделен голубым цветом, внутриклеточный район (аминокислоты в позиции 99-131) – зелёным цветом. Визуализация 3D структуры Cx26 проведена с использованием программ DeepView / Swiss-PdbViewer v.4.1.0 (<http://www.expasy.org/spdbv/>) [Guex, Peitsch, 1997] и PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) [Adzhubei et al., 2010].

У тувинцев и алтайцев (как у глухих пациентов, так и в контрольных выборках) также были выявлены оба этих варианта. В базе данных ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) варианты с.79G>A и с.341A>G классифицируются как «benign» (нейтральные) варианты. Вариант с.79G>A может встречаться отдельно или в сочетании с с.341A>G, тогда как с.341A>G в подавляющем большинстве случаев выявляется только вместе с с.79G>A [Choi et al., 2011; Pandya et al., 2003; Posukh et al., 2005; Tekin et al., 2003]. Однако, по данным работ [Choi et al., 2011; Pandya et al., 2003], есть предположение, что

одновременное присутствие двух этих вариантов у индивидуума может приводить к потере слуха. Функциональный анализ с.79G>A и с.341A>G в системе *in vitro* показал, что пропускная способность коннексонов нарушается при одиночной замене с.341A>G и при единовременном присутствии с.79G>A и с.341A>G, но степень нарушения коннексона менее выражена при наличии двух замен [Choi et al., 2011]. Таким образом, данные об ассоциации вариантов с.79G>A и с.341A>G с потерей слуха в настоящее время противоречивы.

Мы предположили, что варианты с.79G>A и с.341A>G находятся в *cis*-положении относительно друг друга (аллель с.[79G>A;341A>G]) и подтвердили эту гипотезу с помощью (1) анализа родословных пациентов с потерей слуха (тувинцев и алтайцев), имеющих оба варианта (сочетанное наследование с.79G>A и с.341A>G) (**рисунок 21**), и (2) методом молекулярного клонирования (с использованием набора CloneJET PCR Cloning Kit) в тех случаях, когда семейный анализ был невозможен (см. **рисунок 12** в разделе 3.2.7. главы «Материалы и методы»). Мы показали, что частота аллеля с.[79G>A;341A>G] в контрольных выборках (4.78% и 8.68%, соответственно для тувинского и алтайского контроля) превышает (статистически значимо, $p=0.0237$, для алтайцев) 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.

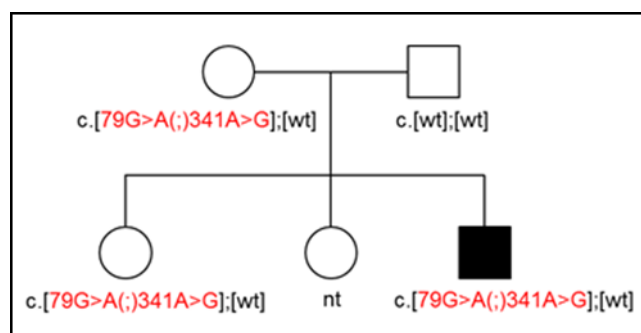


Рисунок 21. Верификация *cis*-положения (в составе одного аллеля) вариантов с.79G>A и с.341A>G с помощью семейного анализа.

4.9. Генетическая дифференциация популяций Евразии на основе SNPs 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 уже известных SNPs, локализованных в значимых областях гена (промоторная область, экзон 1, сайты сплайсинга и кодирующая область второго экзона) (**рисунок 19**).

Для визуализации дифференциации популяций был использован метод многомерного шкалирования, по результатам которого была выявлена отчётливая дифференциация между тувинскими и алтайскими пациентами, а также между группами глухих и здоровых индивидуумов из Тувы и Алтая (**рисунок 22А**). Наибольший вклад в генетические различия между этими выборками внесли пять SNP-маркёров: rs9552101, rs9550621, rs117685390, rs2274084, rs2274083 (**рисунок 22Б**). На **рисунке 22В** приведены результаты сравнительного анализа (на основе распределения частот 69 SNPs) выборок глухих и здоровых коренных жителей Тувы и Алтая и 15 популяций Евразии из проекта «1000 геномов».

Несмотря на относительно небольшое количество анализируемых маркёров (ограниченное геном *GJB2*), наблюдается 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 (выделены подчёркиванием) идентичны SNPs, внёсшими наибольший вклад в различия между выборками тувинцев и алтайцев (**рисунок 22Г**).

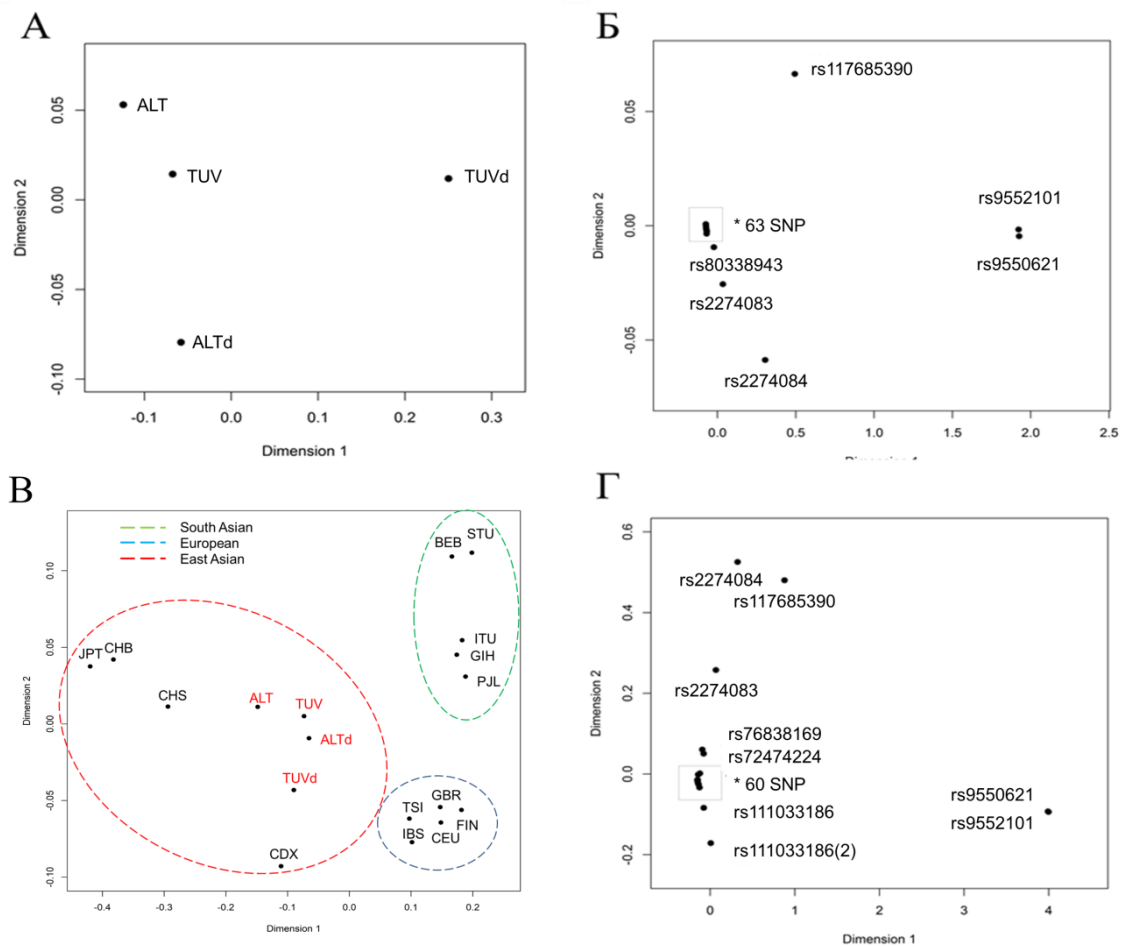


Рисунок 22. Дифференциация изучаемых популяций на основе варибельности 69 SNPs. **А** – генетическая дифференциация четырёх выборок из Тувы и Алтая (Южная Сибирь): алтайские глухие пациенты (ALTd), алтайская контрольная выборка (ALT), тувинские глухие пациенты (TUVd), тувинская контрольная выборка (TUV); **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, PJJ - Punjabi, IBS - Spanish). **Г** – распределение 69 SNPs среди 19 популяций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наследуемые формы потери слуха характеризуются уникально высокой генетической гетерогенностью (картировано около 170 локусов и выявлено более 100 генов). Важной прикладной медико-генетической задачей является точная молекулярно-генетическая диагностика нарушения слуха у человека, что позволяет своевременно предпринять соответствующие реабилитационные меры (слухопротезирование, коррекционное обучение), оценить генетический риск и провести медико-генетическое консультирование отягощенных семей. В региональном масштабе, важными задачами являются оценка доли генетической компоненты в этиологии глухоты у населения региона и выявление региональных особенностей распространенности различных форм «генетической глухоты».

Мутации гена *GJB2* (13q12.11), экспрессирующегося в тканях внутреннего уха и кодирующего трансмембранный белок коннексин 26, являются наиболее значимой причиной потери слуха в большинстве популяций человека. Спектр мутаций и полиморфных вариантов этого гена и их частоты существенно варьируют в различных регионах мира.

Ранее было показано, что у коренного населения Южной Сибири (алтайцы и тувинцы) преобладают три рецессивные мутации гена *GJB2*: с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC; у якутов (Якутия, Северо-Восточная Сибирь) - мутация с.-23+1G>A; у русского населения этих регионов (Алтай, Тува, Якутия) – 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.

Основной целью работы являлась проверка гипотезы о преобладающей роли эффекта основателя в происхождении и распространенности мажорных *GJB2*-мутаций на территории Сибири, а также получение новых данных об аллельном разнообразии гена *GJB2* в популяциях ряда регионов Сибири.

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, что подтвердило гипотезу о существенной роли эффекта основателя в распространении и накоплении этих мутаций на территориях Тувы и Алтая.

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 в ~ 4800-2200 лет. Ранее была получена оценка возраста экспансии с.-23+1G>A в Якутии (~ 800 лет) [Varashkov 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 характерной для европейских популяций мутации с.35delG у здоровых индивидуумов (преимущественно русских), проживающих в г. Новосибирске (Западная Сибирь), составила 4.1%. Эти данные дополнили сводку о частоте гетерозиготного носительства с.35delG на территории России и прилежащих регионов.

Была выявлена общность гаплотипов с с.35delG у гомозиготных по этой мутации глухих пациентов, проживающих на территории Сибири. Сравнительный анализ наиболее частых гаплотипов, включающих с.35delG, обнаружил их консервативность в географически удаленных друг от друга регионах Евразии: в Сибири, Волго-Уральском регионе (Россия) и Республике Беларусь (Восточная Европа), 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.

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

В настоящее время нет однозначного мнения об ассоциации специфичных для азиатских популяций вариантов с.79G>A (p.V27I, rs2274084) и с.341A>G (p.E114G, rs2274083) (в случае их одновременного присутствия). В данной работе, с использованием анализа родословных и молекулярного клонирования, было подтверждено, что оба варианта находятся в *cis*-конфигурации (аллель с.[79G>A;341A>G]), а сравнительный анализ частоты аллеля с.[79G>A;341A>G] у глухих пациентов и в контрольных выборках показал отсутствие ассоциации с.[79G>A;341A>G] с потерей слуха.

Сравнительный анализ аллельного разнообразия гена *GJB2*, впервые проведенный на основе 69 SNP-маркёров, локализованных в белок-кодирующем и некодирующем районах гена *GJB2*, в выборках представителей коренного населения Тувы и Алтая и в 15 этнических популяциях Евразии («1000 Genomes Project»), показал значительную роль вариаций последовательности этого гена в дифференциации популяций Евразии. 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.

Таким образом, были выявлены особенности мутационного спектра гена *GJB2* в различных этнических группах Сибири, что позволяет разработать наиболее оптимальную молекулярную диагностику случаев потери слуха у населения изученных регионов. Кроме того, анализ аллельного разнообразия гена *GJB2* и закономерностей накопления мажорных мутаций этого гена позволяет охарактеризовать эволюционно-исторические особенности популяций Сибири.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бады-Хоо М.С., Посух О.Л., Зорколыцева 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. – 2014а. - Т. 13. - № 1. - С. 17-26.
2. 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* (Cx26) и их вклада в этиологию потери слуха // Медицинская генетика. – 2014б. - Т. 13. - № 11. - С. 30-40.
3. Бады-Хоо М.С. Изучение молекулярных механизмов и распространенности наследственной глухоты в республике Тыва: Автореф. Дис. ... канд. биол. наук. Н. 2016.-17с.
4. Барашков Н.А., Джемилева Л.У., Посух О.Л., Терютин Ф.М., Соловьев А.В., Пшенникова В.Г., Соловьева Н.А., Федотова Э.Е., Алексеев А.Н., Федорова С.А., Хуснутдинова Э.К. Аутосомно-рецессивная глухота 1А типа: идентификация «эндемичного очага» накопления мутации сайта сплайсинга IVS1+1G>A гена *GJB2* на территории Восточной Сибири // Якутский медицинский журнал. - 2012. - Т. 40. - № 4. - С. 101-104.
5. Барашков Н.А., Джемилева Л.У., Посух О.Л., Терютин Ф.М., Соловьев А.В., Пшенникова В.Г., Кларов Л.А., Романов Г.П., Готовцев Н.Н., Кононова С.К., Федотова Э.Е., Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А. Глава 3. Аутосомно-рецессивная глухота А1 типа в Якутии: молекулярно-генетические причины / монография «Генетическая история народов Якутии и наследственно обусловленные болезни» (под ред. С.А. Федоровой, Э.К. Хуснутдиновой). - Новосибирск: Наука, 2015а. ISBN 978-5-02-038663-1. С. 85-123.
6. Барашков Н.А., Кларов Л.А., Терютин Ф.М., Соловьев А.В., Пшенникова В.Г., Конникова Э.Э., Николаева К.Ю., Романов Г.П., Готовцев Н.Н., Саввинова К.Е., Кожевников А.А., Васильева Л.М., Федотова Э.Е., Пак М.В., Леханова

- С.Н., Лугинов Н.В., Морозов И.В., Бондарь А.А., Соловьева Н.А., Рафаилов А.М., Сазонов Н.Н., Алексеев А.Н., Посух О.Л., Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А. Новая нонсенс-мутация p.Trp325Ter (с.977G>A) гена POU3F4 в якутской семье с синдромом Gusher (DFNX2) // Медицинская генетика. - 2015б. - № 8. - С. 25-36.
7. Близнец 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. - Т. 48. - № 1. - С. 112-124.
 8. Близнец Е.А., Макиенко О.Н., Окунева Е.Г., Маркова Т.Г., Поляков А.В. Новая повторяющаяся протяженная делеция, включающая гены *GJB2* и *GJB6*, приводит к изолированному сенсоневральному нарушению слуха с аутосомно-рецессивным типом наследования // Генетика. - 2014. - Т. 50. - № 4. - С. 474-480.
 9. Божкова В.П., Хашаев З.Х., Магомедов Ш.М. Изучение наследственных нарушений слуха у детей Северного Кавказа // Фундаментальные исследования. - 2011. - № 5. - С. 23-27.
 10. Джемилева Л.У., Посух О.Л., Тазетдинов А.М., Барашков Н.А., Журавский С.Г., Пониделко С.Н., Маркова Т.Г., Тадинова В.Н., Федорова С.А., Хуснутдинова Э.К. Анализ генов 12S rRNA и tRNASer(UCN) мтДНК у больных несиндромальной сенсоневральной тугоухостью/глухотой, из различных регионов России // Генетика. - 2009а. - Т. 45. - № 7. - С. 982-991.
 11. Джемилева Л.У., Барашков Н.А., Посух О.Л., Хусаинова Р.И., Ахметова В.Л., Кутуев И.А., Тадинова В.Н., Федорова С.А., Хидиятова И.М., Хуснутдинова Э.К. Анализ гетерозиготного носительства мутаций 35delG, 235delC и 167delT в гене *GJB2* в популяциях Евразии // Медицинская генетика. - 2009б. - № 8. - С. 20-28.
 12. Джемилева Л.А. Молекулярно-генетический анализ наследственной несиндромальной сенсоневральной тугоухости. Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М., 2011. 48с.

13. Животовский Л.А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения // Вестник ВОГиС. - 2006. - Т. 10. - № 1. - С. 74-96.
14. Журавский С.Г., Иванов С.А., Тараскина А.Е., Гринчик О.В., Курусь А.А. Распространение «глухой» мутации 35delG гена *GJB2* среди здорового населения Северо-Западного региона России // Медицинский академический журнал. - 2009. - Т. 9. - С. 41-45.
15. Зинченко (Мамедова) Р.А., Галкина В.А., Ельчинова Г.И., Нурбаев С.Д., Поляков А.В., Некрасова Н.Ю., Гинтер Е.К. Распространенность и молекулярно-генетическое типирование несиндромальной нейросенсорной тугоухости в Республике Чувашия // Генетика. - 2003. - Т. 39. - № 9. - С. 1275-1284.
16. История Сибири. С древнейших времён до наших дней. В пяти томах / Под ред. А.П. Окладников, В. И. Шунков, - Л.: Наука, 1968. – Т. 5. – С. 25-61.
17. Маркова Т.Г., Мегрелишвили С.М., Зайцева Н.Г., Поляков А.В. ДНК-диагностика при врожденной и ранней детской тугоухости/глухоте // Вестник оториноларингологии. - 2002. - № 6. - С. 12-15.
18. Маркова Т.Г., Поляков А.В., Кунельская Н.Л. Клиника нарушений слуха, обусловленных изменениями в гене коннексина 26 // Вестник оториноларингологии. - 2008. - № 2. - С. 4-9.
19. Некрасова Н.Ю., Шагина И.А., Петрин А.Н., Поляков А.В. Частота мутации 35delG в гене коннексина 26 у детей, страдающих ранней детской нейросенсорной тугоухостью // Медицинская генетика. - 2002. - Т. 1. - № 6. - С. 290-294.
20. Осетрова А.А., Шаронова Е.И., Россинская Т.Г., Галкина В.А., Зинченко Р.А. Изучение генетических причин врожденной и ранней детской тугоухости в специализированных школах для детей с нарушением слуха в Кировской области // Медицинская генетика. - 2010. - № 9. - С. 30-40.
21. Посух О.Л., Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К. Митохондриальные мутации в этиологии наследственной глухоты // Медицинская генетика. - 2008. - № 1. - С. 12-20.

22. Посух О.Л. Экзомное секвенирование для молекулярной диагностики наследственной потери слуха / Материалы VII Съезда Российского общества медицинских генетиков. - Санкт-Петербург. 19-23 мая 2015г. - С. 70.
23. Пшенникова В.Г., Барашков Н.А., Терютин Ф.М., Соловьев А.В., Кларов Л.А., Романов Г.П., Готовцев Н.Н., Саввинова К.Е., Кожевников А.А., Сидорова О.Г., Васильева Л.М., Федотова Э.Е., Морозов И.В., Бондарь А.А., Соловьева Н.А., Кононова С.К., Рафаилов А.М., Сазонов Н.Н., Алексеев А.Н., Посух О.Л., Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А. Анализ спектра и частоты *GJB2*-мутаций у пациентов с врожденными нарушениями слуха в Республике Саха (Якутия) // Медицинская генетика. - 2015. - № 6. - С. 10-21.
24. Хидиятова И.М., Джемилева Л.У., Хабибуллин Р.М., Хуснутдинова Э.К. Анализ частоты мутации 35delG в гене коннексина 26(*GJB2*) у больных с несиндромальной аутосомно-рецессивной глухотой из Башкортостана и в популяциях народов Волго-Уральского региона // Молекулярная биология. - 2002. - Т. 36. - № 3. - С. 438-441.
25. Шаронова Е.И., Осетрова А.А., Зинченко Р.А. Наследственные нарушения слуха в Кировской области // Якутский медицинский журнал. - 2009. - № 2 (29). - С. 28-31.
26. Шокарев Р.А., Амелина С.С., Кривенцова Н.В., Хлебникова О.В., Близнец Е.А., Поляков А.В., Зинченко Р.А. Генетико-эпидемиологическое и молекулярно-генетическое исследование наследственной тугоухости в Ростовской области // Медицинская генетика. - 2005. - Т.4. - № 12. - С. 556-567.
27. Шубина-Олейник О.А. Генетическая природа несиндромальной сенсоневральной тугоухости у жителей Беларуси: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Минск, 2015. - 23с.
28. Abidi O., Boulouiz R., Nahili H., Imken L., Rouba H., chafik A., Barakat A. The analysis of three markers flanking *GJB2* gene suggests a single origin of the most common 35delG mutation in the Moroccan population // Biochem. Biophys. Res. commun. - 2008. - Vol. 377. - № 3. - P. 971-974.

29. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. A method and server for predicting damaging missense mutations // *Nat Methods*. - 2010 – Vol. 7. - № 4. – P. 248-249.
30. Bady-Khoo M.S., Barashkov N.A., Morozov I.V., Duvak E.V., Posukh O.L. Analysis of the *GJB2* coding region in Tuvinian deaf patients (the Tuva Republic, Southern Siberia) // *Euro J Hum Genet*. - 2012. - Vol. 20. - Suppl.1. - P. 411.
31. Balci B., Gerceker F.O., Aksoy S., Sennaroplu G., Kalay E., Sennaroplu L., Dinzer P. Identification of an ancestral haplotype of the 35delG mutation in the *GJB2* (connexin 26) gene responsible for autosomal recessive non-syndromic hearing loss in families from the Eastern Black Sea Region in Turkey // *Turk. J. Pediatr*. - 2005. - Vol. 47. - № 3. - P. 213–221.
32. Barashkov N., 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. Hum. Genet*. - 2011. - Vol. 56. - № 9. - P. 631–639.
33. Barashkov N.A., Teryutin F.M., Pshennikova V.G., Solovyev A.V., Klarov L.A., Solovyeva N.A., Kozhevnikov A.A., Vasilyeva L.M., Fedotova E.E., Pak M.V., Lekhanova S.N., Zakharova E.V., Savvinova K.E., Gotovtsev N.N., Rafailov A.M., Luginov N.V., Alexeev A.N., Posukh O.L., Dzhemileva L.U., Khusnutdinova E.K., Fedorova S.A. Age-related hearing impairment (ARHI) associated with *GJB2* single mutation IVS1+1G>A in the Yakut population isolate in Eastern Siberia // *PLoS One*. - 2014. - Vol. 9 - № 6. - P. e100848.
34. Barashkov N.A., Pshennikova V.G., Posukh O.L., Teryutin F.M., Solovyev A.V., Klarov L.A., Romanov G.P., Gotovtsev N.N., Kozhevnikov A.A., Kirillina E.V., Sidorova O.G., Vasilyeva L.M., Fedotova E.E., Morozov I.V., Bondar A.A., Solovyeva N.A., Kononova S.K., Rafailov A.M., Sazonov N.N., Alekseev A.N., Tomsky M.I., Dzhemileva L.U., Khusnutdinova E.K., Fedorova S.A. Spectrum and Frequency of the *GJB2* Gene Pathogenic Variants in a Large cohort of Patients with Hearing Impairment Living in a Subarctic Region of Russia (the Sakha Republic) // *PLoS One*. - 2016. - Vol. 11. - № 5. - P. e0156300.

35. Belguith H., Hajji S., Salem N., charfeddine I., Lahmar I., Amor M.B., Ouldim K., chouery E., Driss N., Drira M., Мйгарбанй A., Rebai A., Sefiani A., Masmoudi S., Ayadi H. Analysis of *GJB2* mutation: evidence for a Mediterranean ancestor for the 35delG mutation // *clin. Genet.* - 2005. - Vol. 68. - № 2. - P. 188–189.
36. Bengtsson B.O., Thomson G. Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases // *Tissue Antigens.* - 1981. - Vol. - 18. - P. 356-363.
37. Bliznetz E.A., Makienko O.N., Okuneva E.G., Markova T.G., Polyakov A.V. New recurrent large deletion, encompassing both *GJB2* and *GJB6* genes, results in isolated sensorineural hearing impairment with autosomal recessive mode of inheritance // *Russ J Genet.* - 2014. – Vol. 50. - № 4. – P. 415–420.
38. Bliznetz EA, Lalayants MR, Markova TG, Balanovsky OP, Balanovska EV, Skhalyakho RA, Pocheshkhova EA, Nikitina NV, Voronin SV, Kudryashova EK, Glotov OS, Polyakov AV. Update of the *GJB2/DFNB1* mutation spectrum in Russia: a founder Ingush mutation del(*GJB2-D13S175*) is the most frequent among other large deletions // *J Hum Genet.* – 2017. – Vol. 62. - № 8.- P. 789-795.
39. Brown K. K., Rehm H. L. Molecular diagnosis of hearing loss //current protocols in human genetics. – 2012. – Vol. 72. – № 1. – chapter 9. – Unit 9.16.
40. chakraborty R., Kimmel M., Stivers D.N., Davison L.J., Deka R. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1997. - Vol. 94. - P. 1041–1046.
41. chan D.K., chang K.W. *GJB2*-associated hearing loss: systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype // *Laryngoscope.* - 2014. - Vol. 124. - № 2. - P. E34-E53.
42. choi S.Y., Lee K.Y., Kim H.J., Kim H.K., chang Q., Park H.J., Jeon c.J., Lin X., Bok J., Kim U.K. Functional evaluation of *GJB2* variants in nonsyndromic hearing loss // *Molecular Medicine.* – 2011. – Vol. 17. – №. 5-6. – P. 550.
43. chen W.X., Huang Y., Yang X.L., Duan B., Lu P., Wang Y., Xu Z.M. The homozygote p. V27I/p. E114G variant of *GJB2* is a putative indicator of nonsyndromic hearing loss in chinese infants // *International journal of pediatric otorhinolaryngology.* – 2016. – Vol. 84. – P. 48-51.

44. cheng H.B., chen Z.B., Wei Q.J., Lu Y.J., Xing G.Q. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes analysis of DFNB1 locus in chinese sporadic hearing impairment population. *GJB2* mutations in Mongolia: complex alleles, low frequency, and reduced fitness of the deaf // chin Med J. - 2009. - Vol. 122. - № 13. - P. 1549–1553.
45. churbanov A.Y., Karafet T.M., Morozov I.V., Mikhalskaia V.Y., Zytsar M.V., Bondar A.A., Posukh OL. Whole Exome Sequencing Reveals Homozygous Mutations in *RAI1*, *OTOF*, and *SLC26A4* Genes Associated with Nonsyndromic Hearing Loss in Altaian Families (South Siberia) // PLoS One. - 2016. - Vol. 11. - № 4:e0153841.
46. Dai P., Yu F., Han B., Liu X., Wang G., Li Q., Yuan Y., Liu X., Huang D., Kang D., Zhang X., Yuan H., Yao K., Hao J., He J., He Y., Wang Y., Ye Q., Yu Y., Lin H., Liu L., Deng W., Zhu X., You Y., cui J., Hou N., Xu X., Zhang J., Tang L., Song R., Lin Y., Sun S., Zhang R., Wu H., Ma Y., Zhu S., Wu B.L., Han D., Wong L.J. *GJB2* mutation spectrum in 2,063 chinese patients with nonsyndromic hearing impairment // J Transl Med. - 2009. - Vol. 7. - P. 26.
47. Danilenko N., Merkulava E., Siniauskaya M., Olejnik O., Levaya-Smaliak A., Kushniarevich A., Shymkevich A., Davydenko O. Spectrum of genetic changes in patients with non-syndromic hearing impairment and extremely high carrier frequency of 35delG *GJB2* mutation in Belarus // PLoS One. - 2012. - Vol. 7. - № 5. - P. e36354.
48. Davarnia B., Babanejad M., Fattahi Z., Nikzat N., Bazazzadegan N., Pirzade A., Farajollahi R., Nishimura c., Jalalvand K., Arzhangi S., Kahrizi K., Smith R.J., Najmabadi H. Spectrum of *GJB2* (cx26) gene mutations in Iranian Azeri patients with nonsyndromic autosomal recessive hearing loss // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. - 2012. - Vol. 76. - № 2. - P. 268–271.
49. del castillo I., Villamar M., Moreno-Pelayo M.A., del castillo F.J., Alvarez A., Tellería D., Menéndez I., Moreno F. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment // N Engl J Med. – 2002. – Vol. 346. - № 4. – P. 243-249.

50. del castillo F.J., Rodríguez-Ballesteros M., Alvarez A., Hutchin T., Leonardi E., de Oliveira c.A., Azaiez H., Brownstein Z., Avenarius M.R., Marlin S., Pandya A., Shahin H., Siemering K.R., Weil D., Wuyts W., Aguirre L.A., Martín Y., Moreno-Pelayo M.A., Villamar M., Avraham K.B., Dahl H.H., Kanaan M., Nance W.E., Petit c., Smith R.J., Van camp G., Sartorato E.L., Murgia A., Moreno F., del castillo I. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(*GJB6*-d13s1854), found in trans with mutations in the *GJB2* gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment // *J Med Genet.* – 2005. – Vol. 42. - № 7. – P. 588-594.
51. Denoyelle F., Marlin S., Weil D., Moatti L., chauvin P., Garabédian E.N., Petit c. clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling // *Lancet.* - 1999. - Vol. 353. - P. 1298-1303.
52. Dib c., Fauriř S., Fizames c., Samson D., Drouot N., Vignal A., Millasseau P., Marc S., Hazan J., Seboun E., Lathrop M., Gyapay G., Morissette J., Weissenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites // *Nature.* - 1996. - Vol. 380. - P. 152–154.
53. Dzhemileva L.U., Barashkov N.A., Posukh O.L., Khusainova R.I., Akhmetova V.L., Kutuev I.A., Gilyazova I.R., Tadinova V.N., Fedorova S.A., Khidiyatova I.M., Lobov S.L., Khusnutdinova E.K. carrier frequency of *GJB2* gene mutations c.35delG, c.235delc and c.167delT among the populations of Eurasia // *J Hum Genet.* - 2010. - Vol. 55. - № 11. - P. 749-754
54. Dzhemileva L.U., Posukh O.L., Barashkov N.A., Fedorova S.A., Teryutin F.M., Akhmetova V.L., Khidiyatova I.M., Khusainova R.I., Lobov S.L., Khusnutdinova E.K. Haplotype diversity and reconstruction of ancestral haplotype associated with the c.35delG mutation in the *GJB2* (cx26) gene among the Volgo-Ural Populations of Russia // *Acta Naturae.* – 2011. – Vol. 3 - № 3. – P. 52-63.
55. Excoffier, L. and H.E. L. Lischer. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Molecular Ecology Resources.* – 2010. – Vol. 10. - P: 564-567.

56. Feldmann D., Le Maréchal c., Jonard L., Thierry P., czajka c., couderc R., Ferec c., Denoyelle F., Marlin S., Fellmann F. A new large deletion in the DFNB1 locus causes nonsyndromic hearing loss // *Eur J Med Genet.* – 2009. – Vol. 52. - № 4. – P. 195-200.
57. Gandía M., Del castillo F.J., Rodríguez-Álvarez F.J., Garrido G., Villamar M., calderón M., Moreno-Pelayo M.A., Moreno F., del castillo I. A novel splice-site mutation in the *GJB2* gene causing mild postlingual hearing impairment // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. - № 9. P. e73566.
58. Gasparini P., Rabionet R., Barbujani G., Melzhionda S., Petersen M., Brøndum-Nielsen K., Metspalu A., Oitmaa E., Pisano M., Fortina P., Zelante L., Estivill X. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic analysis consortium of *GJB2* 35delG // *Eur. J. Hum. Genet.* - 2000. - Vol. 8. - P. 19–23.
59. García Sánchez G., Alfaro-Rodríguez A., Poblano A. Evidence for central Asian origin of the p.Val27Ile variant in the *GJB2* gene // *International Journal of Medical Genetics.* – 2014. – Vol. 2014.
60. Han S.H., Park H.J., Kang E.J., Ryu J.S., Lee A., Yang Y.H., Lee K.R. carrier frequency of *GJB2* (connexin-26) mutations causing inherited deafness in the Korean population // *Journal of human genetics.* – 2008. – Vol. 53. – №. 11-12. – P. 1022.
61. Hamelmann c., Amedofu G.K., Albrecht K., Muntau B., Gelhaus A., Brobby G.W., Horstmann R.D. Pattern of connexin 26 (*GJB2*) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana // *Hum. Mutat.* - 2001. - Vol. 18. - P. 84–85.
62. Hernández-Juárez A.A., Lugo-Trampe Jde.J., campos-Acevedo L.D., Lugo-Trampe A., Treviño-González J.L., de-la-cruz-Ávila I., Martínez-de-Villarreal L.E. *GJB2* and *GJB6* mutations are an infrequent cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing loss in residents of Mexico // *International journal of pediatric otorhinolaryngology.* – 2014. – Vol. 78. – № 12. – P. 2107-2112.
63. Kelley P.M., Harris D.J., comer B.c., Askew J.W., Fowler T., Smith S.D., Kimberling W.J. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause

- autosomal recessive (DFNB1) hearing loss // *Am. J. Hum. Genet.* - 1998. - Vol. 62. - P. 792–799.
64. Kelsell D.P., Dunlop J., Stevens H.P., Lench N.J., Liang J.N., Parry G., Mueller R.F., Leigh I.M. connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness // *Nature.* - 1997. - Vol. 387. - № 6628. - P. 80–83.
65. Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle c. *GJB2* (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review // *Genet. Med.* - 2002. - Vol. 4. - P. 258-274.
66. Kiang D.T., Jin N., Tu Z.J., Lin H.H. Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene // *Gene.* - 1997. - Vol. 199. - № 1-2. - P. 165–171.
67. Kim H.J., Park c.H., Kim H.J., Lee K.O., Won H.H., Ko M.H., chu H., cho Y.S., chung W.H., Kim J.W., Hong S.H. Sequence variations and haplotypes of the *GJB2* gene revealed by resequencing of 192 chromosomes from the general population in Korea // *clinical and experimental otorhinolaryngology.* – 2010. – Vol. 3. – №. 2. – P. 65.
68. Kokotas H., Van Laer L., Grigoriadou M., Iliadou V., Economides J., Pomoni S., Pampanos A., Eleftheriades N., Ferekidou E., Korres S., Giannoulia-Karantana A., Van camp G., Petersen M.B. Strong linkage disequilibrium for the frequent *GJB2* 35delG mutation in the Greek population // *Am. J. Med. Genet. A.* - 2008. - Vol. 146A. - P. 2879–2884.
69. Kokotas H., Grigoriadou M., Villamar M., Giannoulia-Karantana A., del castillo I., Petersen M.B. Hypothesizing an ancient Greek origin of the *GJB2* 35delG mutation: can science meet history? // *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* - 2010. - V. 14. - P. 183–187.
70. Kudo T., Ikeda K., Kure S., Matsubara Y., Oshima T., Watanabe K., Kawase T., Narisawa K., Takasaka T. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) responsible for childhood deafness in the Japanese population // *Am. J. Med. Genet.* - 2000. - Vol. 90. - P. 141-145.

71. Lazaridis I., Patterson N., Mittnik A. et al. Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans // *Nature*. – 2014. – Vol. 513. – P. 409-413.
72. Liu X.Z., Xia X.J., Ke X.M., Ouyang X.M., Du L.L., Liu Y.H., Angeli S., Telischi F.F., Nance W.E., Balkany T., Xu L.R. The prevalence of connexin 26 (*GJB2*) mutations in the chinese population // *Hum. Genet.* - 2002. - Vol. 111. - P. 394–397.
73. Lucotte G., Mercier G. Meta-analysis of *GJB2* mutation 35delG frequencies in Europe // *Genet Test.* – 2001. – Vol. 5 - № 2. – P. 149-152.
74. Lucotte G, Diéterlen F. The 35delG mutation in the connexin 26 gene (*GJB2*) associated with congenital deafness: European carrier frequencies and evidence for its origin in ancient Greece // *Genet Test.* – 2005. – Vol. 9 -№ 1. – P. 20-25.
75. 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. - Vol. 458. - № 7238. - P. 597–602.
76. Matos T.D., Simxes-Teixeira H., caria H., cascro R., Rosa H., O'Neill A., Dias O., Andrea M.E., Kelsell D.P., Fialho G. Assessing Noncoding Sequence Variants of *GJB2* for Hearing Loss Association // *Genet. Res. Int.* - 2011. - Vol. 2011. - P. 827469.
77. Mani R.S., Ganapathy A., Jalvi R., Srikumari Srisailapathy c.R., Malhotra V., chadha S., Agarwal A., Ramesh A., Rangasayee R.R., Anand A. Functional consequences of novel connexin 26 mutations associated with hereditary hearing loss // *Eur J Hum Genet.* – 2009. – Vol. 17. - № 4. – P. 502-509.
78. Mani R.S., Ganapathy A., Jalvi R., Srikumari Srisailapathy c.R., Malhotra V., chadha S., Agarwal A., Ramesh A., Rangasayee R.R., Anand A. Functional consequences of novel connexin 26 mutations associated with hereditary hearing loss // *Eur J Hum Genet.* - 2009. - Vol. 17. - № 4. - P. 502-509.
79. Mahdieh N., Rabbani B., Wiley S., Akbari M.T., Zeinali S. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss in Iran in comparison with other populations // *Journal of human genetics.* – 2010. Vol. 55. № 10. – P. 639.

80. Minarik G., Ferakova E., Ficek A., Polakova H., Kadasi L. *GJB2* gene mutations in Slovak hearing-impaired patients of caucasian origin: spectrum, frequencies and SNP analysis // *clin. Genet.* - 2005. - Vol. 68. - № 6. - P. 554–557.
81. Morell R.J., Kim H.J., Hood L.J., Goforth L., Friderici K., Fisher R., Van camp G., Berlin c.I., Oddoux c., Ostrer H., Keats B., Friedman TB. Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness // *N. Engl. J. Med.* - 1998. Vol. - 339. - P. 1500–1505.
82. Morton N. E. Genetic epidemiology of hearing impairment // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1991. – Vol. 630. – №. 1. – P. 16-31.
83. Morton c.c., Nance W.E. Newborn hearing screening--a silent revolution // *N Engl J Med.* - 2006. - Vol. 354. - № 20. - P. 2151-2164.
84. Najmabadi H., cucci R.A., Sahebjam S., Kouchakian N., Farhadi M., Kahrizi K., Arzhangi S., Daneshmandan N., Javan K., Smith R.J. *GJB2* mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss // *Hum. Mutat.* - 2002. - Vol. 19. - P. 572.
85. Norouzi V., Azizi H., Fattahi Z., Esteghamat F., Bazazzadegan N., Nishimura c., Nikzat N., Jalalvand K., Kahrizi K., Smith R.J. Najmabadi H. Did the *GJB2* 35delG mutation originate in Iran? // *Am. J. Med. Genet. A.* - 2011. - Vol. 155A. - № 10. - P. 2453–2458.
86. Ohtsuka A., Yuge I., Kimura S., Namba A., Abe S., Van Laer L., Van camp G., Usami S. *GJB2* deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation // *Hum. Genet.* - 2003. - Vol. 112. - P. 329–333.
87. Pandya A., Arnos K.S., Xia X.J., Welch K.O., Blanton S.H., Friedman T.B., Garcia Sanchez G., Liu MD X.Z., Morell R., Nance W.E. Frequency and distribution of *GJB2* (connexin 26) and *GJB6* (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands // *Genetics in Medicine.* – 2003. – Vol. 5. – №. 4. – P. 295.

88. Park H.J., Hahn S.H., chun Y.M., Park K., Kim H.N. connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss // *Laryngoscope*. - 2000. - Vol. 110. - P. 1535-1538.
89. Posukh O., Pallares-Ruiz N., Tadinova V., Osipova L., clautres M., Roux A.F. First molecular screening of deafness in the Altai Republic population // *BMc Med. Genet.* - 2005. - Vol. 6. - P. 12.
90. Posukh O., Pallares-Ruiz N., Tadinova V., clautres M., Roux A.F. The *GJB2* R75Q (c.224G>A) mutation is associated with variable phenotype and spread among different genetic backgrounds // *Eur J Hum Genet.* - 2006. - Vol. 14. - Suppl. 1. - P. 246-247.
91. Posukh O.L., Volodko N.V. Additional evidence for the absence of pathogenic significance of mutation T1095c (mitochondrial 12S rRNA) in deafness // *Eur J Hum Genet.* - 2010. - Vol. 18. Suppl. 1. - P. 264.
92. Posukh O.L., Bady-Khoo M.S., Posukh O.V., Morozov I.V., Barashkov N.A., Skidanova O.V. Genetic epidemiology of hearing loss in the Republic of Tuva (Southern Siberia) // *Euro J Hum Genet.* - 2013. - Vol. 21. - Suppl.2. - P. 384.
93. Posukh O., churbanov A., Karafet T., Bondar A., Morozov I., Mikhalskaya V., Zytsar M. Whole exome sequencing in Altaian families (the Altai Republic, Southern Siberia) with congenital hearing loss // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology — BGRS\SB-2014/International Symposium “Human Genetics”*. - June 23-28. 2014. Novosibirsk. P. 48.
94. 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>
95. Putcha G.V., Bejjani B.A., Bleoo S., Booker J.K., carey J.c., carson N., Das S., Dempsey M.A., Gastier-Foster J.M., Greinwald J.H. Jr., Hoffmann M.L., Jeng L.J., Kenna M.A., Khababa I., Lilley M., Mao R., Muralidharan K., Otani I.M., Rehm

- H.L., Schaefer F., Seltzer W.K., Spector E.B., Springer M.A., Weck K.E., Wenstrup R.J., Withrow S., Wu B.L., Zariwala M.A., Schrijver I. A multicenter study of the frequency and distribution of *GJB2* and *GJB6* mutations in a large North American cohort // *Genetics in Medicine*. – 2007. – Vol. 9. – №. 7. – P. 413.
96. Ramshankar M., Girirajan S., Dagan O., Ravi Shankar H.M., Jalvi R., Rangasayee R., Avraham K.B., Anand A. contribution of connexin26 (*GJB2*) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India // *J Med Genet*. - 2003. - Vol. 26. - P. 1–6.
97. Rezaei H., Vallian S. BanI / D13S141 / D13S175 represents a novel informative haplotype at the *GJB2* gene region in the Iranian population // *cell. Mol. Neurobiol*. - 2011. - Vol. 31. - № 5. - P. 749–754.
98. Rich N., de Leon D., Ozelius L., Kramer P., Almasy L., Singer B., Fahn S., Breakefiels X., Bressman S. Genetic analysis of idiopathic torsion dystonia in Ashkenazi Jews and their recent descent from a small founder population // *Nat. Genet*. - 1995. - Vol. 9. - P. 152-159.
99. Rothrock c.R., Murgia A., Sartorato E.L., Leonardi E., Wei S., Lebeis S.L., Yu L.E., Elfenbein J.L., Fisher R.A., Friderici K.H. connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot // *Hum. Genet*. - 2003. - Vol. 113. - № 1. - P. 18–23.
100. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. cold Spring Harbor laboratory press. - 1989.
101. Shahin H., Walsh T., Sobe T., Lynch E., King M.c., Avraham K.B., Kanaan M. Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East // *Hum. Genet*.- 2002. - Vol. 110. - № 3. - P. 284–289.
102. Schlötterer c. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA // *chromosoma*. - 2000. - Vol. 109. - P. 365–371. [Erratum in: *chromosoma*. - 2001. - Vol. 109. - P. 571]
103. Sirmaci A., Akcayoz-Duman D., Tekin M. The IVS1+1G>A mutation in the *GJB2* gene is prevalent and large deletions involving the *GJB6* gene are not present in the Turkish population // *J. Genet*. - 2006. - Vol. 85. - № 3. - P. 213–216.

104. Sobe T., Vreugde S., Shahin H., Berlin M., Davis N., Kanaan M., Yaron Y., Orr-Urtreger A., Frydman M., Shohat M., Avraham K.B. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population // *Hum. Genet.* - 2000. - Vol. 106. - № 1. - P. 50–57.
105. Stenson P.D., Mort M., Ball E.V., Evans K., Hayden M., Heywood S., Hussain M., Phillips A.D., Cooper D.N. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies // *Hum Genet.* – 2017. – Vol. 136 - № 6. – P. 665-677.
106. Storm K., Willocx S., Flothmann K., Van camp G. Determination of the carrier frequency of the common *GJB2* (connexin-26) 35delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method // *Hum Mutat.* – 1999. – Vol. 14(3). – P. 263-266.
107. Sobe T., Erlich P., Berry A., Korostichevsky M., Vreugde S., Karen B. Avraham atsheva B.-T. Letter to the Editor High Frequency of the Deafness-Associated 167delT Mutation in the connexin 26 (*GJB2*) Gene in To the Editor // *Am. J. Med. Genet. Part A.* - 1999. - Vol. 500. - № May. - P. 499–500.
108. Tang H.Y., Fang P., Ward P.A., Schmitt E., Darilek S., Manolidis S., Oghalai J.S., Roa B.B., Alford R.L. DNA sequence analysis of *GJB2*, encoding connexin 26: observations from a population of hearing impaired cases and variable carrier rates, complex genotypes, and ethnic stratification of alleles among controls // *American Journal of Medical Genetics Part A.* – 2006. – Vol. 140. – №. 22. – c. 2401-2415.
109. Tayoun A.N., Mason-Suares H., Frisella A.L., Bowser M., Duffy E., Mahanta L., Funke B., Rehm H.L., Amr S.S. Targeted droplet-digital PCR as a tool for novel deletion discovery at the *DFNB1* locus // *Hum Mutat.* – 2016. – Vol. 37. - № 1. – P. 119-126.
110. Tekin M., Akar N., cin S., Blanton S.H., Xia X.J., Liu X.Z., Nance W.E., Pandya A. connexin 26 (*GJB2*) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in caucasians // *Hum. Genet.* - 2001. - Vol. 108. - № 5. - P. 385–389.

111. Tekin M., Duman T., Boğoçlu G., Incesulu A., comak E., Ilhan I., Akar N. Spectrum of *GJB2* mutations in Turkey comprises both caucasian and Oriental variants: roles of parental consanguinity and assortative mating // Hum Mutat. – 2003 -Vol. 21(5). – P. 552-553.
112. Tekin M., Bopoclu G., Arican S.T., Orman M.N., Tastan H., Elsobky E., Elsayed S., Akar N. Evidence for single origins of 35delG and delE120 mutations in the *GJB2* gene in Anatolia // clin. Genet. - 2005. - Vol. 67. - № 1. - P. 31–37.
113. Tekin M., Xia XJ., 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. - Vol. 74. - № 2. - P. 155–164.
114. Tsukada K., Nishio S., Usami S.; Deafness Gene Study consortium. A large cohort study of *GJB2* mutations in Japanese hearing loss patients. // clin Genet. - 2010. - Vol. 78. - № 5. - P. 464-470.
115. Tu Z.J., Kiang D.T. Mapping and characterization of the basal promoter of the human connexin26 gene // Biochim Biophys Acta. – 1998. – Vol. 1443(1-2). – P. 169-181.
116. Van camp G., Smith R.J.H. Hereditary Hearing Loss Homepage. URL: <http://hereditaryhearingloss.org>, last update: January 7th, 2014.
117. Van Laer L., coucke P., Mueller R.F., caethoven G., Flothmann K., Prasad S.D., chamberlin G.P., Houseman M., Taylor G.R., Van de Heyning c.M., Fransen E., Rowland J., cucci R.A., Smith R.J., Van camp G. A common founder for the 35delG *GJB2* gene mutation in connexin 26 hearing impairment // J. Med. Genet. - 2001. - Vol. 38. - P. 515–518.
118. Wattanasirichaigoon D., Limwongse c., Jariengprasert c., Yenchitsomanus P.T., Tocharoenthanaphol c., Thongnoppakhun W., Thawil c., charoenpipop D., Pho-iam T., Thongpradit S., Duggal P. High prevalence of V37I genetic variant in the connexin-26 (*GJB2*) gene among non-syndromic hearing-impaired and control Thai individuals // clin. Genet. - 2004. - Vol. 66. - № 5. - P. 452–460.

119. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer c., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – Vol. 46. - № W1. – P. W296-W303.
120. Wilch E., Azaiez H., Fisher R.A., Elfenbein J., Murgia A., Birkenhäger R., Bolz H., Da Silva-costa S.M., Del castillo I., Haaf T., Hoefsloot L., Kremer H., Kubisch c., Le Marechal c., Pandya A., Sartorato E.L., Schneider E., Van camp G., Wuyts W., Smith R.J., Friderici K.H. A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant *cis*-regulatory region that controls *GJB2* and *GJB6* expression // *clin Genet.* – 2010. - Vol. 78. - № 3. – P. 267-274.
121. Yan D., Park H.J., Ouyang X.M., Pandya A., Doi K., Erdenetungalag R., Du L.L., Matsushiro N., Nance W.E., Griffith A.J., Liu X.Z. Evidence of a founder effect for the 235delc mutation of *GJB2* (connexin 26) in east Asians // *Hum. Genet.* - 2003. - Vol. 114. - P. 44–50.

Приложение 1. Частоты аллелей микросателлитных маркеров у тувинских пациентов, гомозиготных по мутациям p.W172c и c.-23+1G>A, и в контрольной выборке тувинцев.

STR	Аллель (н.п.)	Группа тувинских пациентов (n=14), гомозиготных по мутации p.W172c					Группа тувинских пациентов (n=6), гомозиготных по мутации c.-23+1G>A					Контрольная группа тувинцев (N=62)	
		Число аллелей	Частота аллеля	X ²	p	δ	Число аллелей	Частота аллеля	X ²	p	δ	Число аллелей	Частота аллеля
D13S1316	259	0	0.0000	-	-	0.0000	1	0.0833	2.1	0.0882	0.0833	0	0.0000
	263	0	0.0000	0.42	0.2881	-0.0508	3	0.2500	4.3	0.0329	0.2119	6	0.0484
	265	0	0.0000	0.096	0.4389	-0.0333	0	0.0000	0.069	0.6881	-0.0333	4	0.0323
	267	8	0.2857	32.00	<10 ⁻⁶	-3.2177	8	0.6667	1	0.1550	-0.9683	103	0.8306
	269	20	0.7143	71.00	<10 ⁻⁷	0.7023	0	0.0000	0.0089	0.6255	-0.0420	5	0.0403
	271	0	0.0000	0.42	0.2881	-0.0508	0	0.0000	0.0019	0.5682	-0.0508	6	0.0484
	273	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	Всего	28	1.0000				12	1.0000				124	1.0000
D13S141	120	0	0.0000	0.67	0.8158	-0.0081	0	0.0000	2.1	0.9118	-0.0081	1	0.0081
	124	28	1.0000	2.30	0.0100	1.0000	12	1.0000	0.54	1.0000	1.0000	110	0.8871
	126	0	0.0000	1.80	0.0781	-0.1071	0	0.0000	0.35	0.3140	-0.1071	12	0.0968
	128	0	0.0000	0.67	0.8158	-0.0081	0	0.0000	2.1	0.9118	-0.0081	1	0.0081
	Всего	28	1.0000				12	1.0000				124	1.0000
D13S175	101	0	0.0000	0.83	0.1879	-0.0690	0	0.0000	0.070	0.4678	-0.0690	8	0.0645
	103	0	0.0000	13.00	<10 ⁻⁴	-0.5897	0	0.0000	5.2	0.0054	-0.5897	46	0.3710
	105	28	1.0000	26.00	1.0000	1.0000	12	1.0000	11	1.0000	1.0000	55	0.4435
	107	0	0.0000	1.30	0.1217	-0.0877	0	0.0000	0.20	0.3839	-0.0877	10	0.0806
	109	0	0.0000	0.67	0.8158	-0.0081	0	0.0000	2.1	0.9118	-0.0081	1	0.0081
	111	0	0.0000	0.01	0.5405	-0.0248	0	0.0000	0.23	0.7573	-0.0248	3	0.0242
	113	0	0.0000	0.67	0.8158	-0.0081	0	0.0000	2.1	0.9118	-0.0081	1	0.0081
	Всего	28	1.0000				12	1.0000				124	1.0000
D13S1853	196	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	200	0	0.0000	0.06	0.6645	-0.0164	0	0.0000	0.66	0.8307	-0.0164	2	0.0161
	202	0	0.0000	11.00	0.1513	-0.0783	0	0.0000	0.13	0.4239	-0.0783	9	0.0726
	204	28	1.0000	0.31	1.0000	1.0000	12	1.0000	0.84	1.0000	1.0000	107	0.8629
	206	0	0.0000	0.24	0.3559	-0.0420	0	0.0000	0.0089	0.6255	-0.0420	5	0.0403
	208	0	0.0000	0.67	0.8158	-0.0081	0	0.0000	2.1	0.9118	-0.0081	1	0.0081
	Всего	28	1.0000				12	1.0000				124	1.0000

Приложение 1. (продолжение)

STR	Аллель (н.п.)	Группа тувинских пациентов (n=14), гомозиготных по мутации p.W172c					Группа тувинских пациентов (n=6), гомозиготных по мутации с.-23+1G>A					Контрольная группа тувинцев (N=62)	
		Число аллелей	Частота аллеля	X ²	p	δ	Число аллелей	Частота аллеля	X ²	p	δ	Число аллелей	Частота аллеля
D13S143	123	0	0.0000	0.67	0.8158	-0.0081	0	0.0000	2.1	0.9118	-0.0081	1	0.0081
	125	27	0.9643	0.61	0.2267	0.6593	12	1.0000	0.44	1.0000	1.0000	111	0.8952
	127	0	0.0000	0.09	0.4389	-0.0333	0	0.0000	0.069	0.6881	-0.0333	4	0.0323
	129	1	0.0357	0.01	0.5476	-0.0220	0	0.0000	0.026	0.5158	-0.0598	7	0.0565
	133	0	0.0000	0.67	0.8158	-0.0081	0	0.0000	2.1	0.9118	-0.0081	1	0.0081
	Всего	28					12	1.0000				124	1.0000
D13S1275	198	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	200	1	0.0357	0.24	0.6441	0.0036	0	0.0000	0.069	0.6881	-0.0333	4	0.0323
	202	4	0.1429	4.10	0.0177	-0.3454	1	0.0833	2.7	0.0431	-0.4388	45	0.3629
	204	0	0.0000	0.67	0.8158	-0.0081	0	0.0000	2.1	0.9118	-0.0081	1	0.0081
	206	4	0.1429	9.20	0.0042	0.1359	0	0.0000	2.1	0.9118	-0.0081	1	0.0081
	208	16	0.5714	12.00	<10⁻³	0.4029	10	0.8333	13	0.0028	0.7678	35	0.2823
	210	0	0.0000	5.70	0.0028	-0.2653	1	0.0833	0.45	0.2661	-0.1599	26	0.2097
	212	3	0.1071	0.15	0.3284	0.0456	0	0.0000	0.070	0.4678	-0.0690	8	0.0645
	214	0	0.0000	0.096	0.4389	-0.0333	0	0.0000	0.069	0.6881	-0.0333	4	0.0323
Всего	28					12	1.0000				124	1.0000	
D13S292	205	16	0.5714	23.00	<10⁻⁶	0.4790	0	0.0000	1.4	0.1089	-0.2157	22	0.1774
	207	0	0.0000	8.00	<10⁻⁵	-0.3626	0	0.0000	2.9	0.0302	-0.3626	33	0.2661
	209	6	0.2143	0.17	0.3478	-0.0825	11	0.9167	18	<10⁻⁴	0.8852	34	0.2742
	211	6	0.2143	0.25	0.3166	-0.0947	1	0.0833	1.3	0.1212	-0.2772	35	0.2823
Всего	28	1.0000				12	1.0000				124	1.0000	

Жирным шрифтом выделены значимые показатели неравновесия по сцеплению ($\delta > 0,5$) и статистически значимые ($p < 0.05$) различия между выборками гомозигот по мутациям p.W172c и с.-23+1G>A, и контрольной выборкой тувинцев.

Приложение 2. Частоты аллелей микросателлитных маркеров у алтайских пациентов, гомозиготных по мутации с.235delc, и в контрольной выборке алтайцев.

STR	Аллель (н.п.)	Группа алтайских пациентов (n=4), гомозиготных по мутации с.235delc					Контрольная группа алтайцев (N=55)	
		Число аллелей	Частота аллеля	X ²	p	δ	Число аллелей	Частота аллеля
D13S1316	259	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	263	0	0.0000	0.086	0.6995	-0.0476	5	0.0455
	265	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	267	8	1.0000	0.32	1.0000	1.0000	95	0.8636
	269	0	0.0000	3	0.9322	-0.0092	1	0.0091
	271	0	0.0000	0.0038	0.5601	-0.0784	8	0.0727
	273	0	0.0000	3	0.9322	-0.0092	1	0.0091
	Всего	8	1.0000				110	1.0000
D13S141	120	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	124	8	1.0000	0.88	0.1462	1.0000	109	0.9909
	126	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	128	0	0.0000	0.88	0.1462	-0.0092	1	0.0091
	Всего	8	1.0000				110	1.0000
D13S175	101	0	0.0000	0.023	0.5193	-0.0891	9	0.0818
	103	0	0.0000	2.3	0.0539	-0.4667	35	0.3182
	105	8	1.0000	6.6	1.0000	1.0000	51	0.4636
	107	0	0.0000	0.0038	0.5601	-0.0784	8	0.0727
	109	0	0.0000	0.21	0.7523	-0.0377	4	0.0364
	111	0	0.0000	1.1	0.8685	-0.0185	2	0.0182
	113	0	0.0000	3	0.9322	-0.0092	1	0.0091
	Всего	8	1.0000				110	1.0000
D13S1853	196	0	0.0000	3	0.9322	-0.0092	1	0.0091
	200	0	0.0000	3	0.9322	-0.0092	1	0.0091
	202	0	0.0000	0.70	0.2151	-0.2222	20	0.1818
	204	8	1.0000	1.6	1.0000	1.0000	81	0.7364
	206	0	0.0000	0.0016	0.6036	-0.0680	7	0.0636
	208	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	Всего	8	1.0000				110	1.0000

Приложение 2. (продолжение)

STR	Аллель (н.п.)	Группа алтайских пациентов (n=4), гомозиготных по мутации с.235delc					Контрольная группа алтайцев (N=55)	
		Число аллелей	Частота аллеля	X ²	p	δ	Число аллелей	Частота аллеля
D13S143	123	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	125	8	1.0000	100	-	-	110	1.0000
	127	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	129	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	133	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	Всего	8	1.0000				110	1.0000
D13S1275	198	0	0.0000	3	0.9322	-0.0092	1	0.0091
	200	0	0.0000	-	-	0.0000	0	0.0000
	202	0	0.0000	0.62	0.2340	-0.2088	19	0.1727
	204	0	0.0000	0.48	0.8086	-0.0280	3	0.0273
	206	0	0.0000	0.14	0.4123	-0.1224	12	0.1091
	208	0	0.0000	8	0.0014	-1.3913	64	0.5818
	210	8	1.0000	51	<10⁻⁷	1.0000	7	0.0636
	212	0	0.0000	1.1	0.8685	-0.0185	2	0.0182
	214	0	0.0000	1.1	0.8685	-0.0185	2	0.0182
Всего	8	1.0000				110	1.0000	
D13S292	205	0	0.0000	0.31	0.3288	-0.1579	12	0.1364
	207	0	0.0000	1.4	0.1137	-0.3333	22	0.2500
	209	3	0.3750	0.25	0.2912	0.1912	20	0.2273
	211	5	0.6250	0.88	0.1734	0.3889	34	0.3864
	Всего	8	1.0000				88	1.0000

Жирным шрифтом выделены значимые показатели неравновесия по сцеплению ($\delta > 0,5$) и статистически значимые ($p < 0.05$) различия между выборками гомозигот по мутации с.235delc и контрольной выборкой алтайцев.

Приложение 3. Частоты аллелей SNP-маркеров у тувинских пациентов, гомозиготных по мутациям p.W172c и c.-23+1G>A, и в контрольной выборке тувинцев.

SNP	Аллель	Группа тувинских пациентов (n=14), гомозиготных по мутации p.W172c					Группа тувинских пациентов (n=6), гомозиготных по мутации c.-23+1G>A					Контрольная группа тувинцев (N=62)	
		Число аллелей	Частота аллелей	X ²	p	δ	Число аллелей	Частота аллелей	X ²	p	δ	Число аллелей	Частота аллелей
rs747931	c	0	0.0000	12	<10 ⁻⁴	-0.5500	12	1.0000	16	1.0000	1.0000	44	0.3548
	T	28	1.0000	12	1.0000	1.0000	0	0.0000	16	<10 ⁻⁴	-1.8182	80	0.6452
	Всего	28	1.0000				12	1.0000				124	1.0000
rs5030700	c	28	1.0000	-	-	-	12	1.0000	-	-	-	124	1.0000
	T	0	0.0000	-	-	-	0	0.0000	-	-	-	0	0.0000
	Всего	28	1.0000				12	1.0000				124	1.0000
rs3751385	c	28	1.0000	7.8	1.0000	1.0000	12	1.0000	2.8	1.0000	1.0000	90	0.7377
	T	0	0.0000	7.8	<10 ⁻³	-0.3556	0	0.0000	2.8	0.0321	-0.3556	32	0.2623
	Всего	28	1.0000				12	12.0000				122	1.0000
rs2274083	A	28	1.0000	1.1	1.0000	1.0000	12	1.0000	0.13	1.0000	1.0000	115	0.9274
	G	0	0.0000	1.1	0.1513	-0.0783	0	0.0000	0.13	0.4239	-0.0783	9	0.0726
	Всего	28	1.0000				12	1.0000				124	1.0000
rs2274084	A	0	0.0000	6.3	0.0017	-0.2917	0	0.0000	2.2	0.0550	-0.2917	28	0.2258
	G	28	1.0000	6.3	1.0000	1.0000	12	1.0000	2.2	1.0000	1.0000	96	0.7742
	Всего	28	1.0000				12	1.0000				124	1.0000
rs1411911768	c	0	0.0000	110	<10 ⁻²³	-16.7143	12	1.0000	0.026	1.0000	1.0000	117	0.9435
	T	28	1.0000	110	<10 ⁻²³	1.0000	0	0.0000	0.026	0.5158	-0.0598	7	0.0565
	Всего	28	1.0000				12	1.0000				124	1.0000
rs9552101	G	28	1.0000	0.67	1.0000	1.0000	12	1.0000	2.1	1.0000	1.0000	123	0.9919
	A	0	0.0000	0.67	0.8158	-0.0081	0	0.0000	2.1	0.9118	-0.0081	1	0.0081
	Всего	28	1.0000				12	1.0000				124	1.0000
rs117685390	T	28	1.0000	7.1	1.0000	1.0000	6	1.0000	0.80	1.0000	1.0000	92	0.7541
	c	0	0.0000	7.1	<10 ⁻⁴	-0.3261	0	0.0000	0.80	0.1941	-0.3261	30	0.2459
	Всего	28	1.0000				6	1.0000				122	1.0000
rs877098	c	28	1.0000	9.5	1.0000	1.0000	11	0.9167	1.6	0.0985	0.7222	84	0.7000
	T	0	0.0000	9.5	<10 ⁻⁴	-0.4286	1	0.0833	1.6	0.0985	-0.3095	36	0.3000
	Всего	28	1.0000				12	1.0000				120	1.0000

Жирным шрифтом выделены значимые показатели неравновесия по сцеплению ($\delta > 0,5$) и статистически значимые ($p < 0,05$) различия между выборками гомозигот по мутациям p.W172c и c.-23+1G>A, и контрольной выборкой тувинцев.

Приложение 4. Частоты аллелей SNP-маркеров у алтайских пациентов, гомозиготных по мутации с.235delc, и в контрольной выборке алтайцев.

SNP	Аллель	Группа алтайских пациентов (n=4), гомозиготных по мутации с.235delc					Контрольная группа алтайцев (N=55)	
		Число аллелей	Частота аллелей	X ²	p	δ	Число аллелей	Частота аллелей
rs747931	c	0	0.0000	1.2	0.1338	-0.3012	25	0.2315
	T	8	1.0000	1.2	1.0000	1.0000	83	0.7685
	Всего	8	1.0000				108	1.0000
rs5030700	c	8	1.0000	3	1.0000	1.0000	109	0.9909
	T	0	0.0000	3	0.9322	-0.0092	1	0.0091
	Всего	8	1.0000				110	1.0000
rs3751385	c	8	1.0000	2.6	1.0000	1.0000	72	0.6545
	T	0	0.0000	2.6	0.0396	-0.5278	38	0.3455
	Всего	8	1.0000				110	1.0000
rs2274083	A	8	1.0000	0.096	1.0000	1.0000	99	0.9000
	G	0	0.0000	0.096	0.4456	-0.1111	11	0.1000
	Всего	8	1.0000				110	1.0000
rs2274084	A	0	0.0000	2	0.0658	-0.4286	33	0.3000
	G	8	1.0000	2	1.0000	1.0000	77	0.7000
	Всего	8	1.0000				110	1.0000
rs1411911768	c	8	1.0000	1.1	1.0000	1.0000	108	0.9818
	T	0	0.0000	1.1	0.8685	-0.0185	2	0.0182
	Всего	8	1.0000				110	1.0000
rs9552101	G	8	1.0000	-	-	-	110	1.0000
	A	0	0.0000	-	-	-	0	0.0000
	Всего	8	1.0000				110	1.0000
rs117685390	T	8	1.0000	2.9	1.0000	1.0000	70	0.6364
	c	0	0.0000	2.9	0.0321	-0.5714	40	0.3636
	Всего	8	1.0000				110	1.0000
rs877098	c	0	0.0000	12	<10 ⁻³	-2.0556	74	0.6727
	T	8	1.0000	12	1.0000	1.0000	36	0.3273
	Всего	8	1.0000				110	1.0000

Приложение 5. Гаплотипы, реконструированные на основе 6 STR-маркёров, в контрольной выборке тувинцев.

№	Частота гаплотипа	D13S141	GJB2	D13S175	D13S1853	D13S143	D13S1275	D13S292
1	0.008065	120	GJB2	103	204	125	202	209
2	0.016129	124		101	202	125	208	209
3	0.003904	124		101	204	125	202	207
4	0.010278	124		101	204	125	208	207
5	0.010011	124		101	204	125	208	209
6	0.008065	124		101	204	125	212	207
7	0.008065	124		101	204	127	210	205
8	0.008065	124		103	202	127	206	207
9	0.008065	124		103	204	123	208	207
10	0.008065	124		103	204	125	202	205
11	0.027852	124		103	204	125	202	207
12	0.114954	124		103	204	125	202	211
13	0.016129	124		103	204	125	208	205
14	0.024194	124		103	204	125	208	207
15	0.018484	124		103	204	125	208	211
16	0.016129	124		103	204	125	210	205
17	0.024194	124		103	204	125	210	209
18	0.024194	124		103	204	125	212	209
19	0.008065	124		103	204	125	212	211
20	0.008065	124		103	204	125	214	209
21	0.008065	124		103	204	129	202	209
22	0.016129	124		103	206	125	212	207
23	0.008065	124		105	202	125	202	207
24	0.008065	124		105	202	125	202	209
25	0.008065	124		105	202	125	210	211
26	0.008065	124		105	202	129	210	207
27	0.008065	124		105	204	125	200	205
28	0.012670	124		105	204	125	200	207
29	0.011524	124		105	204	125	200	211
30	0.072581	124		105	204	125	202	205
31	0.010011	124		105	204	125	202	207
32	0.011088	124		105	204	125	202	209
33	0.008065	124		105	204	125	208	205
34	0.008065	124		105	204	125	208	207
35	0.051481	124		105	204	125	208	209
36	0.008065	124		105	204	125	208	211
37	0.040123	124		105	204	125	210	207
38	0.016129	124		105	204	125	210	209
39	0.048587	124		105	204	125	210	211
40	0.009610	124		105	204	129	202	207
41	0.008065	124		105	204	129	208	205
42	0.006519	124		105	204	129	208	207
43	0.008065	124		105	206	125	208	209
44	0.008065	124		105	206	125	214	209
45	0.008065	124		105	206	127	212	211
46	0.008065	124		107	202	125	208	207
47	0.008065	124		107	204	125	202	207
48	0.024194	124		107	204	125	202	209
49	0.008065	124		107	204	125	208	205
50	0.008065	124		107	204	125	210	211
51	0.008065	124		107	204	127	210	209
52	0.008065	124		107	208	125	214	209
53	0.008065	124		109	200	125	204	209

Приложение 5. (продолжение)

№	Частота гаплотипа	D13S141	GJB2	D13S175	D13S1853	D13S143	D13S1275	D13S292
54	0.008065	124	GJB2	111	204	125	208	209
55	0.008065	124		111	204	125	208	211
56	0.008065	124		111	204	125	210	211
57	0.008065	124		113	200	125	210	207
58	0.008065	126		101	204	125	208	205
59	0.008065	126		103	204	125	202	209
60	0.008065	126		103	204	125	208	211
61	0.008065	126		103	204	125	210	207
62	0.016129	126		105	204	125	202	207
63	0.016129	126		105	204	125	208	205
64	0.008065	126		105	204	129	202	209
65	0.008065	126		105	204	129	208	207
66	0.008065	126		105	204	133	202	211
67	0.008065	126		107	202	125	208	211
68	0.008065	128		103	204	125	214	211

Приложение 6. Гаплотипы, реконструированные на основе 5 STR-маркёров, в контрольной выборке тувинцев.

№	Частота гаплотипа	D13S1316	D13S141	<i>GJB2</i>	D13S175	D13S1853	D13S143
1	0.008065	263	120	<i>GJB2</i>	103	204	125
2	0.008065	263	124		103	204	125
3	0.007588	263	124		103	204	129
4	0.008541	263	124		105	204	125
5	0.008065	263	124		113	200	125
6	0.008065	263	128		103	204	125
7	0.008065	265	124		103	204	125
8	0.008065	265	124		107	204	125
9	0.008065	265	126		101	204	125
10	0.008065	265	126		103	204	125
11	0.016129	267	124		101	202	125
12	0.032258	267	124		101	204	125
13	0.008065	267	124		101	204	127
14	0.008064	267	124		103	204	123
15	0.233871	267	124		103	204	125
16	0.016605	267	124		103	204	129
17	0.008065	267	124		103	206	127
18	0.032258	267	124		105	202	125
19	0.008065	267	124		105	202	129
20	0.297911	267	124		105	204	125
21	0.016129	267	124		105	206	125
22	0.008065	267	124		105	206	127
23	0.008065	267	124		107	202	125
24	0.032258	267	124		107	204	125
25	0.008065	267	124		107	204	127
26	0.008065	267	124		107	204	129
27	0.008065	267	124		107	208	125
28	0.008065	267	124		109	200	125
29	0.008065	267	124		111	204	125
30	0.008065	267	126		103	204	125
31	0.008065	267	126		103	204	133
32	0.040323	267	126		105	204	125
33	0.008065	267	126		107	202	125
34	0.008065	269	124		103	204	125
35	0.016129	269	124		105	204	125
36	0.016129	269	124		111	204	125
37	0.024194	271	124		103	204	125
38	0.008065	271	124		103	206	125
39	0.016129	271	126		105	204	129

Приложение 7. Гаплотипы, реконструированные на основе 6 STR-маркёров, в контрольной выборке алтайцев.

№	Частота гаплотипа	D13S1316	D13S141	<i>GJB2</i>	D13S175	D13S1853	D13S143	D13S1275
1	0,009091	263	128	<i>GJB2</i>	103	204	125	208
2	0,009091	263	124		103	206	125	202
3	0,009474	263	124		105	204	125	202
4	0,008708	263	124		109	204	125	202
5	0,009091	263	124		109	204	125	206
6	0,009091	267	124		101	200	125	210
7	0,034947	267	124		101	204	125	202
8	0,010508	267	124		101	204	125	208
9	0,018182	267	124		101	204	125	210
10	0,009091	267	124		101	206	125	208
11	0,009091	267	124		103	196	125	204
12	0,016013	267	124		103	202	125	202
13	0,009091	267	124		103	202	125	204
14	0,013203	267	124		103	202	125	208
15	0,010067	267	124		103	204	125	202
16	0,027273	267	124		103	204	125	206
17	0,124353	267	124		103	204	125	208
18	0,027273	267	124		103	204	125	210
19	0,018182	267	124		103	204	125	212
20	0,009091	267	124		103	206	125	202
21	0,036364	267	124		105	202	125	206
22	0,052602	267	124		105	202	125	208
23	0,009091	267	124		105	202	125	210
24	0,048954	267	124		105	204	125	202
25	0,027272	267	124		105	204	125	206
26	0,234425	267	124		105	204	125	208
27	0,009091	267	124		105	206	125	208
28	0,009091	267	124		105	206	125	214
29	0,017291	267	124		107	204	125	202
30	0,009091	267	124		107	204	125	204
31	0,028163	267	124		107	204	125	208
32	0,009474	267	124		109	204	125	208
33	0,009091	267	124		109	206	125	202
34	0,009091	267	124		111	204	125	208
35	0,009091	267	128		103	204	125	208
36	0,009091	269	124		105	204	125	206
37	0,027273	271	124		103	202	125	208
38	0,009091	271	124		105	200	125	208
39	0,009091	271	124		105	206	125	208
40	0,009091	271	124		107	202	125	214
41	0,009091	271	124		111	204	125	208
42	0,009091	271	124		113	204	125	208
43	0,009091	273	124		107	204	125	198

Приложение 8. Гаплотипы, реконструированные на основе 9 SNP-маркёров, в контрольной выборке тувинцев.

№	Частота гаплотипа	rs747931	rs5030700	rs3751385	p.W172c	rs2274083 (p.E114G)	c.235delc	rs2274084 (p.V27I)	c.-23+1G>A	rs1411911768	rs9552101	rs117685390	rs877098
1	0,004033	c	c	T	-	A	-	G	-	c	G	T	c
2	0,004033	c	c	T	-	A	-	G	-	c	G	T	T
3	0,0082	c	c	c	-	A	-	G	-	c	G	c	c
4	0,05872	c	c	c	-	A	-	G	-	c	G	T	c
5	0,15463	c	c	c	-	A	-	G	-	c	G	T	T
6	0,02883	c	c	T	-	A	-	A	-	c	G	c	c
7	0,02071	c	c	T	-	A	-	A	-	c	G	c	T
8	0,00652	c	c	T	-	A	-	A	-	T	G	c	c
9	0,00807	c	c	T	-	A	-	G	-	c	A	T	c
10	0,00724	c	c	T	-	A	-	G	-	c	G	c	c
11	0,00914	c	c	T	-	A	-	G	-	c	G	c	T
12	0,00768	c	c	T	-	A	-	G	-	T	G	c	c
13	0,03703	c	c	T	-	G	-	A	-	c	G	c	c
14	0,00807	T	c	c	-	A	-	G	-	c	G	T	nt
15	0,38704	T	c	c	-	A	-	G	-	c	G	T	c
16	0,07497	T	c	c	-	A	-	G	-	c	G	T	T
17	0,00807	T	c	c	-	A	-	G	-	T	G	c	c
18	0,02068	T	c	c	-	A	-	G	-	T	G	T	c
19	0,00544	T	c	c	-	A	-	G	-	T	G	T	T
20	0,00807	T	c	c	-	G	-	A	-	T	G	T	c
21	0,01613	T	c	T	-	A	-	A	-	c	G	nt	nt
22	0,0678	T	c	T	-	A	-	A	-	c	G	c	c
23	0,01323	T	c	T	-	A	-	A	-	c	G	c	T
24	0,0082	T	c	T	-	A	-	G	-	c	G	T	T
25	0,02348	T	c	T	-	G	-	A	-	c	G	c	c
26	0,00401	T	c	T	-	G	-	A	-	c	G	c	T

Приложение 9. Гаплотипы, реконструированные на основе 9 SNP-маркёров, в контрольной выборке алтайцев.

№	Частота гаплотипа	rs747931	rs5030700	rs3751385	p.W172c	rs2274083 (p.E114G)	c.235delc	rs2274084 (p.V27I)	c.-23+1G>A	rs1411911768	rs9552101	rs117685390	rs877098
1	0,009804	?	c	c	-	A	-	G	-	c	G	T	c
2	0,019751	c	c	c	-	A	-	G	-	c	G	c	c
3	0,046978	c	c	c	-	A	-	G	-	c	G	T	c
4	0,075525	c	c	c	-	A	-	G	-	c	G	T	T
5	0,060696	c	c	T	-	A	-	A	-	c	G	c	c
6	0,007834	c	c	T	-	A	-	A	-	T	G	c	c
7	0,009804	c	T	T	-	A	-	G	-	c	G	c	T
8	0,052439	T	c	c	-	A	-	A	-	c	G	c	c
9	0,280723	T	c	c	-	A	-	G	-	c	G	T	c
10	0,160508	T	c	c	-	A	-	G	-	c	G	T	T
11	0,010327	T	c	c	-	G	-	A	-	c	G	c	T
12	0,010612	T	c	c	-	G	-	A	-	c	G	T	c
13	0,053389	T	c	T	-	A	-	A	-	c	G	c	c
14	0,009948	T	c	T	-	A	-	A	-	c	G	T	T
15	0,011774	T	c	T	-	A	-	A	-	T	G	c	c
16	0,033672	T	c	T	-	A	-	G	-	c	G	c	c
17	0,02596	T	c	T	-	A	-	G	-	c	G	c	T
18	0,021502	T	c	T	-	A	-	G	-	c	G	T	c
19	0,011851	T	c	T	-	A	-	G	-	c	G	T	T
20	0,077101	T	c	T	-	G	-	A	-	c	G	c	c
21	0,009804	T	c	T	-	G	-	A	-	c	G	T	c

Приложение 10. Частота гетерозиготного носительства мутации c.35delG на территории Российской Федерации и некоторых стран из бывшего СССР

Шифр	Регионы	Характеристика выборок	Количество гетерозигот по c.35delG / размер выборок	Частота гетерозиготного носительства c.35delG (%)	ссылки
СЕВЕРНАЯ И ВОСТОЧНАЯ ЕВРОПА (1-4)					
1	Эстония	эстонцы	5/113	4.4	[11]
	Эстония	новорожденные из Эстонии	45/996	4.5	[18]
2	Литва	литовцы	1/98	1.0	[13]
3	Беларусь	белорусы	6/97	6.2	[10]
	Беларусь	коренные жители Беларуси	43/757	5.7	[9]
	Беларусь (Гродненская область)	новорождённые из Гродненской области	8/234	3.4	[7]
4	Украина	украинцы	3/90	3.3	[10]
	Украина (Днепропетровская и Запорожская области)	новорождённые из Днепропетровской и Запорожской областей	8/193	4.1	[19]
РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ (5-31)					
северо-Западная часть России (5-8)					
5	Калининград и Калининградская область	жители Калининграда и Калининградской области	15/200	7.5	[24]
6	Псков и Псковская область	жители Пскова и Псковской области	5/107	4.7	[24]
	Псковская область	русские	2/102	2.0	[16]
7	санкт-Петербург	жители санкт-Петербурга	17/308	5.5	[24]
	Ленинградская область (Подпорожский район)	жители Ленинградской области (Подпорожский район)	13/218	5.9	[24]
	Ленинградская область (Иван-город)	жители Ленинградской области (Иван-город)	4/120	3.3	[24]
8	Архангельск и Архангельская область	жители Архангельска и Архангельской области	10/200	5.0	[24]
Центральная часть России (9-10)					
9	Различные регионы центральной части России	жители различных регионов центральной части России	20/391	5.1	[5]
	Различные регионы центральной части России	доноры крови (русские)	38/1000	3.8	[1]
10	Кировская область	русские	8/206	3.8	[16]

Приложение 10 (продолжение)

Волго-Уральский регион России (11-19)					
11	Волго-Уральский регион России	коми	0/51	0	[2]
	Волго-Уральский регион России	коми	0/76	0	[12]
	Волго-Уральский регион России	коми	0/80	0	[10]
12	Россия	марийцы	5/194	2.6	[2]
	Волго-Уральский регион России	марийцы	1/49	2.0	[12]
	Республика Мири-Эл	марийцы	8/402	2.0	[16, 20-23]
13	Волго-Уральский регион России	удмурты	2/61	3.3	[12]
	Республика Удмуртия	удмурты	2/434	0.7	[20]
	Республика Удмуртия	удмурты	3/592	0.5	[16, 20, 22, 23]
	Республика Удмуртия	удмурты	3/80	3.7	[10]
14	Республика Мордовия	мордва	4/70	5.7	[12]
	Республика Мордовия	мордва	5/80	6.2	[10]
15	Чувашская Республика	чуваши	4/154	2.6	[2]
	Волго-Уральский регион России	чуваши	0/42	0	[12]
	Чувашская Республика	чуваши	3/400	1.5	[21]
	Чувашская Республика	чуваши	5/520	1.0	[16, 20, 22, 23]
	Чувашская Республика	чуваши	0/100	0	[10]
16	Волго-Уральский регион России	русские	2/40	5.0	[12]
17	Волго-Уральский регион России	татары	1/85	1.2	[12]
	Республика Татарстан	татары	1/96	1.0	[10]
	Республика Татарстан	татары	6/252	2.6	[23]
18	Республика Башкортостан	башкиры	2/55	3.6	[2]
	Республика Башкортостан	башкиры	1/400	0.3	[10]
	Республика Башкортостан	башкиры	0/208	0	[12]
	Республика Башкортостан	башкиры	2/396	0.5	[16, 20, 22]
19	Екатеринбург	русские	2/92	2.2	[10]

Приложение 10 (продолжение)

сибирь (20-25)					
20	Новосибирск, Западная сибирь	жители Новосибирска (русские)	5/122	4.1	this study
21	Республика Алтай, Южная сибирь	алтайцы	0/130	0	[15]
	Республика Алтай, Южная сибирь	алтайцы	0/230	0	[10]
22	Республика Тыва, Южная сибирь	тувинцы	0/121	0	[3]
23	Республика Бурятия, Южно-Восточная сибирь	буряты	0/261	0	[14]
24	Республика саха (Якутия), Восточная сибирь	якуты	1/106	1.0	[2]
	Республика саха (Якутия), Восточная сибирь	якуты	1/247	0.4	[4, 10]
25	Республика саха (Якутия), Восточная сибирь	русские	2/80	2.5	[4]
Юго-Западная часть России (26-31)					
26	Ростовская область	жители Ростовской области (русские)	19/660	2.9	[16, 17, 20-22]
27	Карачаево-Черкесская Республика, северный Кавказ	черкесы	1/80	1.3	[10]
27	Карачаево-Черкесская Республика, северный Кавказ	черкесы	2/102	2.0	[14]
28	Карачаево-Черкесская Республика, северный Кавказ	карачаевцы	1/370	0.3	[14]
29	Республика Ингушетия, северный Кавказ	ингуши	0/80	0	[10]
	Республика Ингушетия, северный Кавказ	ингуши	3/151	2.0	[8]
30	Республика Ингушетия, северный Кавказ	чеченцы	0/90	0	[8]
	Чеченская Республика, северный Кавказ	чеченцы	1/147	0.7	[8]
31	Республика Дагестан, северный Кавказ	авары	0/60	0	[10]
ЮЖНЫЙ КАВКАЗ (32-33)					
32	Абхазия	абхазы	3/80	3.8	[10]
33	Армения	армяне	8/219	3.7	[6]
ЦЕНТРАЛЬНАЯ АЗИЯ (34-36)					
34	Узбекистан	узбеки	0/60	0	[10]
35	Казахстан	казахи	2/240	0.8	[10]
36	Казахстан	уйгуры	1/116	0.9	[10]

список литературы к Приложению 10

1. Абрамов Д.Д., Белоусова М.В., Кадочникова В.В., Рагимов А.А., Трофимов Д.Ю. Частота носительства в российской популяции мутаций в генах *GJB2* и *GALT*, ассоциированных с развитием нейросенсорной тугоухости и галактоземии // Вестник РГМУ. - 2016. - № 6. - С. 20-24.
2. Anichkina A., Kulenich T., Zinchenko S., et al. On the origin and frequency of the 35delG allele in *GJB2*-linked deafness in Europe // Eur J Hum Genet. – 2001. – Vol. 9. – P. 151-151.
3. 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. - Т.13 - №11. - С.30-40.
4. Barashkov NA, Pshennikova VG, Posukh OL, et al. Spectrum and Frequency of the *GJB2* gene pathogenic variants in a large cohort of patients with hearing impairment living in a subarctic region of Russia (the Sakha Republic) // PLoS One 2016. – Vol. 11 - № 5. - P. e0156300.
5. Близнец 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. - 2012а. - Т. 48 - № 1. - С.101-112.
6. Близнец Е.А., саркисян Т.Ф., Манукян Т.А., Бахшинян В.В., Поляков А.В. Тугоухость у армян, обусловленная мутациями в гене коннексина 26 — *GJB2* // Медицинская генетика. - 2012б. - № 5(119). - С. 23-28.
7. Близнец Е.А., Марцуль Д.Н., Хоров О.Г., Маркова Т.Г., Поляков А.В. спектр мутаций в гене *GJB2* у белорусских пациентов с тугоухостью. Результаты пилотного генетического скрининга нарушения слуха у новорожденных // Генетика. - 2014. - Т. 50 - № 2. - С. 214–221.
8. Bliznetz EA, Lalayants MR, Markova TG, et al. Update of the *GJB2/DFNB1* mutation spectrum in Russia: a founder Ingush mutation del(*GJB2*-D13S175) is the most frequent among other large deletions // J Hum Genet. – 2017. – Vol. 62. – P. 789-795.
9. Danilenko N, Merkulava E, Siniauskaya M, et al. Spectrum of genetic changes in patients with non-syndromic hearing impairment and extremely high carrier frequency of 35delG *GJB2* mutation in Belarus // PLoS One. – 2012. – Vol. 7 - № 5. – P. e36354.
10. Dzhemileva LU, Barashkov NA, Posukh OL, et al. Carrier frequency of *GJB2* gene mutations c.35delG, c.235delc and c.167delT among the populations of Eurasia // J Hum Genet. – 2010. – Vol. 55. – P. 749-754.

11. Gasparini P, Rabionet R, Barbuiani G, et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis consortium of *GJB2* 35delG // *Eur J Hum Genet.* - 2000. – Vol. 8. - P. 19-23.
12. Хидиятова И.М, Джемелева Л.У., Хабибуллин Р.М., Хуснутдинова Э.К. Анализ частоты мутации 35delG в гене коннексина 26 (*GJB2*) у больных с несиндромальной аутосомно-рецессивной глухотой из Башкортостана и в популяциях народов Волго-Уральского региона // *Молекулярная биология.* – 2002. - Т. 36 - № 3. - С. 438-441.
13. Mikstiene V, Jakaitiene A, Vyckova J, et al. The high frequency of *GJB2* gene mutation c.313_326del14 suggests its possible origin in ancestors of Lithuanian population // *BMC Genet.* - 2016. – Vol. 17. – P. 45.
14. Петрина Н.Е., Близнец Е.А., Зинченко Р.А., Макаов А.Х.-М., Петрова Н.В., Васильева Т.А., Чудакова Л.В., Петрин А.Н., Поляков А.В., Гинтер Е.К. Частота мутаций гена *GJB2* у больных наследственной несиндромальной нейросенсорной тугоухостью в девяти популяциях Карачаево-Черкесской Республики // *Медицинская генетика.* - 2017. - Т. 16 - № 2. - С. 19-25.
15. Posukh O, Pallares-Ruiz N, Tadinova V, Osipova L, clautres M, Roux AF. First molecular screening of deafness in the Altai Republic population // *BMC Med Genet.* – 2005. – Vol. 6. – P. 12.
16. Шаронова, Е. И., Осетрова А.А., Зинченко Р.А. Генетические основы наследственных нарушений слуха // *Медицинская генетика.* - 2008. - Т. 7 - № 12. - С. 25-38.
17. Шокарев Р.А., Амелина С.С., Кривенцова Н.В., Ельчинова Г.И., Хлебникова О.В., Близнец Е.А., Тверская С.М., Поляков А.В.2, Зинченко Р.А. Генетико-эпидемиологическое и молекулярно-генетическое исследование наследственной тугоухости в Ростовской области // *Медицинская генетика.* - 2005. - Т. 4 - № 12. - С. 556-565.
18. Teek R, Kruustük K, Zordania R, et al. Prevalence of c.35delG and p.M34T mutations in the *GJB2* gene in Estonia // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* – 2010. – Vol. 74. – P. 1007-1012.
19. Veropotvelyan NP, Pogulyai YuS, Zhuravleva SA, Shutenko TV. Determination of total carrier frequency of mutation of 35delG gene in the connexin-26 gene among newborns of Dnipropetrovsk and Zaporizhzhia regions // *Sovremennaya Pediatriya.* – 2015. – Vol. 1. – P. 130-134.
20. Зинченко С.П., Кириллов А.Г., Аbruкова А.В., Сорокина Т.В., Шаронова Е.И., Хидиятова И.М., Джемилева Л.У., Шокарев Р.А., Близнец Е.А., Хуснутдинова Э.К., Зинченко Р.А., Гинтер Е.К. Генетико-эпидемиологическое исследование наследственных (изолированных и синдромальных) нарушений слуха в Республике Чувашия // *Медицинская генетика.* - 2007а. - Т. 6 - № 5(59). - С. 18-28.

21. Зинченко Р.А., Ельчинова Г.И., Галкина В.А., Кириллов А.Г., Абрикова А.В., Петрова Н.В., Тимковская Е.Е., Зинченко С.П., Амелина С.С., Шокарев Р.А., Морозова А.А., Близнец Е.А., Вассерман Н.Н., Степанова А.А., Поляков А.В., Гинтер Е.К. Дифференциация этнических групп России по генам наследственных болезней // Медицинская генетика. - 2007б. - Т.6 - №2(56). - С.29-37.

22. Зинченко Р.А., Мурзабаева с.Ш., Гринберг Я.И., Галкина В.А., Хлебникова О.В., Дадали Е.Л., Федотов В.П., Хидиятова И.М., Хуснутдинова Э.К., Гинтер Е.К. Генетико-эпидемиологическое изучение населения Республики Башкортостан. Разнообразие моногенной наследственной патологии в пяти районах республики // Генетика. - 2009. - Т. 45 - № 5. - С. 677-690.

23. Зинченко Р.А., Галкина В.А., Бессонова Л.А., Дадали Е.Л., Хлебникова О.В., Михайлова Л.К., Кадышев В.В., Петрин А.Н., Шаронова Е.И., Вафина З.И., Эльканова Л.А., Гаврилина с.Г., Болотов В.А., Поляков А.В., Стрельников В.В., Залетаев Д.В., Захарова Е.Ю., Гинтер Е.К. Медико-генетическое изучение населения Республики Татарстан. сообщение II. Разнообразие моногенной наследственной патологии в трех районах проживания казанских татар // Медицинская генетика. -2012. - № 9. - С. 31-40.

24. Журавский с.Г., Иванов с.А., Тараскина А.Е., Гринчик О.В., Курусь А.А. Распространение «глухой» мутации 35delG гена *GJB2* среди здорового населения северо-Западного региона России // Медицинский академический журнал. - 2009. - Т. 9 - № 2. - С. 41-45.