

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

на правах рукописи

ДАНИЛЬЧЕНКО ВАЛЕРИЯ ЮРЬЕВНА

**АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПОТЕРИ СЛУХА В ПОПУЛЯЦИЯХ
РЯДА РЕГИОНОВ СИБИРИ**

1.5.7. генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

НОВОСИБИРСК – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Гетерогенность генетического контроля наследуемых форм потери слуха	14
1.2. Методы секвенирования нового поколения (NGS) для выявления генетических причин моногенных заболеваний	16
1.3. Разнообразие генов, ассоциированных с потерей слуха	19
1.4. Мутации-основатели (founder mutations) в распространенности различных форм наследуемой потери слуха	28
1.5 Изучение наследуемых форм потери слуха в популяциях Сибири	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Характеристика анализируемых выборок	37
2.1.1. Общая выборка больных с потерей слуха	37
2.1.2. Выборка больных с потерей слуха невыясненной этиологии	37
2.1.3. Контрольные выборки	38
2.1.4. Выборки, используемые для анализа гаплотипов с мутацией с.919-2A>G гена <i>SLC26A4</i>	38
2.2 Экспериментальные методы	38
2.2.1. Экстракция геномной ДНК	38
2.2.2. Амплификация фрагментов генов <i>SLC26A4</i> , <i>RAI1</i> и <i>OTOF</i>	38
2.2.3 Секвенирование по Сэнгеру	39
2.2.4 Полноэкзомное секвенирование	39
2.2.5 Выявление мутаций в гене <i>SLC26A4</i>	40
2.2.5.1 Стратегия поиска мутаций в гене <i>SLC26A4</i> в выборке больных с потерей слуха невыясненной этиологии	40
2.2.5.2 Подбор праймеров и условий ПЦР для поиска мутаций в гене <i>SLC26A4</i>	41
2.2.5.3 Скрининг мутаций с.170C>A, с.919-2A>G, с.1545T>G и с.2168A>G гена <i>SLC26A4</i> методом ПЦР-ПДРФ	43
2.2.5.4 Биоинформатический анализ нового варианта с.1545T>G (p.Phe515Leu) в гене <i>SLC26A4</i>	46
2.2.6 Выявление мутаций в гене <i>RAI1</i>	46
2.2.7 Выявление мутаций в гене <i>OTOF</i>	48
2.2.8 Скрининг мутации m.1555A>G (<i>MT-RNR1</i>) митохондриальной ДНК у тувинских и алтайских больных	49
2.2.9 Генотипирование STR- и SNP-маркёров	50
2.2 Статистические методы	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	53
3.1 Мутации гена <i>SLC26A4</i> в этиологии потери слуха	53

3.1.1 Стратегия поиска мутаций в гене <i>SLC26A4</i>	53
3.1.2 Ген <i>SLC26A4</i> в этиологии потери слуха у коренного населения Республики Тыва и Республики Алтай	59
3.1.2.1 Генотипы по гену <i>SLC26A4</i> , выявленные у тувинских и алтайских пациентов	60
3.1.2.2 Мутационный спектр гена <i>SLC26A4</i> у коренного населения Тувы и Алтая	63
3.1.2.3 Частота гетерозиготного носительства рецессивных мутаций гена <i>SLC26A4</i> у коренного населения Тувы и Алтая	73
3.1.2.4 Территориальное распределение мутантных аллелей с.919-2A>G, с.2027T>A и с.1545T>G гена <i>SLC26A4</i> в Республике Тыва	73
3.1.2.5 Распространенность мутации с.919-2A>G гена <i>SLC26A4</i> на территории Евразии (анализ литературных данных)	75
3.1.2.6 Выявление и анализ гаплотипов, несущих мутацию с.919-2A>G	77
3.2 Выявление генов, ответственных за развитие патологии слуха, методом полноэкзомного секвенирования у пациентов из Республики Алтай	84
3.2.1. Мутация с.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене <i>RAI1</i> у алтайских больных с потерей слуха	85
3.2.2 Мутация с.1111G>C в гене <i>OTOF</i> у алтайских больных с потерей слуха	92
3.2.3. Территориальное распределение мутаций с.5254G>A (ген <i>RAI1</i>), с.1111G>C (ген <i>OTOF</i>) в Республике Алтай	95
3.3. Скрининг мутации m.1555A>G (<i>MT-RNR1</i>) митохондриальной ДНК у тувинских и алтайских больных	97
3.4 Сравнительный анализ генетической компоненты в этиологии слуха у тувинцев и алтайцев	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	102
ВЫВОДЫ	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	135
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	139
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	140
ПРИЛОЖЕНИЕ 4	144

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- GJB2** (Gap junction $\beta 2$) – ген, кодирующий коннексин 26 (connexin 26)
- OTOF** – ген, кодирующий трансмембранный белок отоферлин (otoferlin)
- RAI1** (Retinoic acid induced 1) – ген, кодирующий белок 1, индуцированный ретиноевой кислотой
- SLC26A4** (Solute carrier family 26 (anion exchanger)) – ген, кодирующий трансмембранный белок пендрин (pendrin)
- MT-RNR1** (Mitochondrially encoded 12S RNA) – ген митохондриальной ДНК, кодирующий 12S РНК)
- DFNA** – аутосомно-доминантный тип наследования несиндромальной глухоты
- DFNB** – аутосомно-рецессивный тип наследования несиндромальной глухоты
- DFNX** – X-сцепленный тип наследования несиндромальной глухоты
- DFNM** – локус с генами-модификаторами
- AUNA** – локус слуховой нейропатии
- EVA** (enlarged vestibular aqueduct) – расширенный акведук преддверия внутреннего уха
- STR** – Short Tandem Repeats, микросателлиты, высокополиморфные генетические маркеры
- SNP** – Single Nucleotide Polymorphism, однонуклеотидные замены
- NGS** (Next Generation Sequencing) – технологии секвенирования ДНК следующего поколения
- WES** (Whole Exome Sequencing) – экзомное (полноэкзомное) секвенирование
- WGS** (Whole Genome Sequencing) – полногеномное секвенирование
- а.к.** – аминокислота
- НТ/Г** – нейросенсорная тугоухость / глухота
- Cx26–негативные больные** – больные, не имеющие мутаций гена *GJB2* (Cx26)
- ПДРФ** – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
- пн (bp)** – пары нуклеотидов (base pairs)
- kb** – kilobase (1000 пар нуклеотидов)
- Mb** – megabase (1000000 пар нуклеотидов)
- ПЦР** – полимеразная цепная реакция
- тув.** – тувинец
- рус.** – русский
- укр.** – украинец
- чел.** – человек
- DVD** – база данных Deafness Variation Database
- B** – benign / нейтральный вариант
- LB** – likely benign / вероятно нейтральный вариант
- LP** – likely pathogenic / вероятно патогенетический вариант
- P** – pathogenic / патогенетический вариант
- VUS** – variant of unknown significance / вариант неизвестной значимости

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Актуальной медико-социальной проблемой является потеря слуха, вызываемая как средовыми, так и генетическими факторами, которыми обусловлено около половины всех случаев врожденной (или раннего проявления) глухоты. Несиндромальная (изолированная) наследственная глухота, являясь моногенным заболеванием, характеризуется уникальной генетической гетерогенностью: уже картировано около 160 локусов и идентифицировано не менее 120 генов, ассоциированных с потерей слуха (Hereditary Hearing Loss Homepage: <https://hereditaryhearingloss.org/>).

Известна широкая этногеографическая вариабельность в распространенности различных форм наследуемой глухоты. Мутации в гене *GJB2* (*Gap junction protein beta-2*, 13q12.11, MIM 121011) вносят наиболее значимый патогенетический вклад в этиологию потери слуха во многих популяциях мира (до 50% случаев в Европе). Вторым по значимости, по крайней мере, для ряда азиатских популяций, является ген *SLC26A4* (*Solute carrier family 26, member 4 / pendrin*, 7q22.3, MIM 605646). Этот ген кодирует трансмембранный транспортный белок пендрин (*pendrin*), который экспрессируется в тканях внутреннего уха, щитовидной железы и почек и участвует в транспорте различных ионов. Мутации в гене *SLC26A4* приводят к несиндромальной рецессивно наследуемой потере слуха (DFNB4) и некоторым формам синдрома Пендреда (Pendred Syndrome) – заболевания, определяемого потерей слуха и развитием зоба. У пациентов с *SLC26A4*-мутациями часто наблюдается аномалия костного лабиринта внутреннего уха - расширенный водопровод преддверия (EVA, Enlarged vestibular aqueduct).

Существенно меньше данных о распространенности генетических форм потери слуха, определяемых мутациями других генов, и для многих регионов мира такие сведения полностью отсутствуют. Важной и актуальной задачей для медицинской генетики является молекулярно-генетический анализ случаев наследуемой глухоты, этиология которой после тестирования наиболее значимых «генов глухоты» остается неясной. В последнее время для решения этой проблемы применяются новейшие методы геномных исследований (NGS, Next Generation Sequencing), в частности, полноэкзомное секвенирование (WES, Whole Exome Sequencing).

Экстремальная генетическая гетерогенность наследуемой нейросенсорной тугоухости значительно затрудняет разработку универсальной молекулярной диагностики для этой патологии. Диагностические панели генов должны быть адаптированы к специфике наследуемых форм потери слуха в различных регионах. Кроме того, пока относительно мало известно о распространенности патогенетических вариантов многих «генов глухоты» в той или иной популяции. Выявление наиболее частых (мажорных) мутаций в генах, вовлеченных в потерю слуха, является актуальной задачей как для оценки генетического риска и медико-генетического консультированияотягощенных семей, так и для разработки наиболее эффективных методов молекулярной диагностики этой патологии.

Ранее нашей группой было установлено, что мутации гена *GJB2* являются причиной глухоты у 15.1% больных с потерей слуха на Алтае (алтайцы) и у 22.3% больных в Туве (тувинцы), но для большей части пациентов причины потери слуха остались неизвестными. Таким образом, для выяснения причин потери слуха у больных с глухотой невыясненной этиологии, относящихся к коренному населению Республик Тыва и Алтай, необходимо осуществить поиск мутаций в других «генах глухоты», прежде всего, в гене *SLC26A4*, мутации в котором являются второй по значимости (по крайней мере, для ряда азиатских популяций), причиной потери слуха.

Цель: Выявление молекулярно-генетических причин наследственных форм потери слуха и анализ их распространенности у коренного населения Республик Тыва и Алтай.

Задачи:

1. Оценка патогенетического вклада мутаций гена *SLC26A4* в выборке больных с потерей слуха невыясненной этиологии в Республиках Тыва и Алтай.
2. Выявление особенностей распространенности мутаций гена *SLC26A4* на территории Тувы и Алтая.
3. Поиск генов, ассоциированных с потерей слуха, с применением метода полноэкзомного секвенирования, в семьях с глухотой невыясненной этиологии.
4. Сравнительный анализ мутационного спектра генов *GJB2*, *SLC26A4*, *OTOF*, *RAI1*, *MT-RNR1*, ассоциированных с потерей слуха, и их патогенетического

вклада в этиологию нарушений слуха в популяциях коренного населения Республик Тыва и Алтай.

Научная новизна исследования. На основе проведенного молекулярно-генетического анализа гена *SLC26A4* у пациентов с потерей слуха неустановленной этиологии из Республик Тыва и Алтай впервые охарактеризовано аллельное разнообразие этого гена у тувинцев и алтайцев. Выявлены уже известные патогенетические варианты с.170C>A (p.Ser57*), с.919-2A>G, с.2027T>A (p.Leu676Gln), с.2034+1G>A, с.2168A>G (p.His723Arg), новый вариант с.1545T>G (p.Phe515Leu), а также ряд уже известных и новых полиморфных (нейтральных) вариантов. Обнаружены существенные различия патогенетического вклада мутаций гена *SLC26A4* в этиологию потери слуха: 28.2% – для тувинцев и 4.3% – для алтайцев. Наиболее распространенной у тувинцев является мутация с.919-2A>G (ее частота у больных с потерей слуха – 69.3%, частота гетерозиготного носительства в контрольной выборке – 5.1%). Впервые показано, что генетическое окружение (гаплотипы) участка хромосомы 7, включающего эту мутацию, характеризуется высокой специфичностью и сходством, что подтверждает гипотезу о ведущей роли эффекта основателя в широкой распространенности с.919-2A>G в изучаемом регионе. У алтайских пациентов с потерей слуха неясной этиологии, методом полноэкзомного секвенирования, впервые в России примененного для поиска генетических причин глухоты, был идентифицирован новый вариант с.1111G>C (p.Gly371Arg) в гене *OTOF*, ранее уже известного в ассоциации с потерей слуха, и новый вариант с.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAI1*, ассоциация которого с потерей слуха установлена впервые. Впервые, на основе молекулярно-генетического анализа генов *GJB2*, *SLC26A4*, *OTOF*, *RAI1*, *MT-RNR1*, получены суммарные сравнительные оценки генетической компоненты в этиологии потери слуха у коренного населения Республик Тыва и Алтай (50.5% – у тувинцев и 34.5% – у алтайцев) и выявлены мутации, наиболее значимые для создания регион-специфичной ДНК-диагностики потери слуха в изучаемых регионах.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Детальные данные о спектре патогенетических и полиморфных вариантов гена *SLC26A4* и их частотах в популяциях коренного населения Тувы и Алтая, полученные в результате настоящего исследования, дополняют мировые данные об аллельном разнообразии

этого гена. Данные о специфике распространенности патогенетических вариантов в исследованных генах *GJB2*, *SLC26A4*, *OTOF*, *RAI1* в популяциях коренного населения Тувы и Алтай вносят существенный вклад в характеристику их генетической структуры. На основе полученных данных, молекулярно-генетический диагноз можно установить для существенной доли обследуемых пациентов с потерей слуха (50.5% – для тувинцев и 34.5% – для алтайцев). Полученные данные могут быть использованы для медико-генетического консультирования семей,отягощенных патологией слуха. Информация о спектре и патогенетическом вкладе мутаций генов *GJB2*, *SLC26A4*, *OTOF*, *RAI1*, *MT-RNR1* у тувинцев и алтайцев актуальна для разработки специфичной ДНК-диагностики наследуемой глухоты для коренного населения Республик Тыва и Алтай.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Патогенетический вклад гена *SLC26A4* в этиологию потери слуха и спектр мутаций существенно различаются для коренных жителей Республик Тыва (28.2%) и Алтай (4.3%).
2. Патогенетический вклад мутаций с.1111G>C (ген *OTOF*) и с.5254G>A (ген *RAI1*), обнаруженных при помощи экзомного секвенирования у алтайских пациентов, составляет 4.3% и 10.8%, соответственно.
3. Молекулярно-генетический диагноз установлен для существенной доли обследуемых пациентов с потерей слуха: 50.5% – для тувинцев и 34.5% – для алтайцев.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты являются достоверными, поскольку получены на большом объеме исследованных выборок (пациенты с потерей слуха и этнически стратифицированные контрольные выборки) с применением адекватных молекулярно-генетических методов исследования и статистической обработки полученных данных. Результаты, полученные в ходе выполнения научно-исследовательской работы, были представлены на: 9-ой международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии / Международный симпозиум «Генетика человека» (BGRS-2014, Новосибирск, 2014г.); международной студенческой конференции (МНСК-2015, Новосибирск, 2015г.); 7-ом Съезде Российского общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург, 2015г.); 20-й международной Пуцинской школе

молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2016г.); 10-й международной школе молодых ученых «Системная биология и биоинформатика» (SBB-2018, Новосибирск, 2018г.); международном конгрессе «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (Санкт-Петербург, 2019г.); международной конференции The European Human Genetics Virtual Conference ESHG 2020.2 - Live in Your Living Room (2020г.); 12-й международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (BGRS -2020, Новосибирск, 2020г.).

Объем и структура диссертации

Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы (284 источника). Общий объем составляет 145 страниц, в том числе 15 таблиц, 21 рисунок и 4 приложения.

Публикации

По материалам работы были опубликованы 7 статей в журналах из перечня ВАК, 1 глава в монографии, а также 11 тезисов конференций.

Личный вклад автора

Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

По материалам работы опубликованы 7 статей в журналах из перечня ВАК, 1 глава в монографии, а также 11 тезисов конференций.

Статьи:

1. **Danilchenko V.Yu.**, Zytsar M.V., Maslova E.A., Bady-Khoo M.S., Barashkov N.A., Morozov I.V., Bondar A.A., Posukh O.L. Different Rates of the *SLC26A4*-Related Hearing Loss in Two Indigenous Peoples of Southern Siberia (Russia) // *Diagnostics*. – 2021. – Vol. 11. – P. 2378. DOI: 10.3390/diagnostics11122378
2. **Данильченко В.Ю.**, Зыцарь М.В., Маслова Е.А., Бады-Хоо М.С., Морозов И.В., Бондарь А.А., Посух О.Л. Анализ мутационного спектра гена *SLC26A4* и его вклада в этиологию наследуемой потери слуха у коренного населения

Южной Сибири // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19. – №7(216). – С. 43-45.
DOI: 10.25557/2073-7998.2020.07.43-45

3. Zytsar M.V., Bady-Khoo M.S., **Danilchenko V.Yu.**, Maslova E.A., Barashkov N.A., Morozov I.V., Bondar A.A., Posukh O.L. High rates of three common *GJB2* mutations c.516G>C, c.-23+1G>A, c.235delC in deaf patients from Southern Siberia are due to the founder effect // *Genes*. – 2020. – Vol. 11. – P. 833-850. DOI: 10.3390/genes11070833
4. 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. – P. 429. DOI: 10.3390/genes10060429
5. Churbanov A.Y., Karafet T.M., Morozov I.V., **Mikhalskaia V.Yu. (Danilchenko V.Yu.)**, Zytsar M.V., Bondar A.A., Posukh O.L. 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). – P: e0153841. DOI: 10.1371/journal.pone.0153841
6. Бады-Хоо М.С., Бондарь А.А., Морозов И.В., Зыцарь М.В., **Михальская В.Ю. (Данильченко 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.
7. 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. (Данильченко 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.

Глава в монографии

8. **Danilchenko V.Yu.**, Zytsar, M.V., Maslova E.A., Bady-Khoo M.S., Barashkov N.A., Morozov I.V., Bondar A.A., Posukh O.L. Different rates of the *SLC26A4*-related hearing loss in two indigenous peoples of Southern Siberia (Russia) / в монографии «Genetic testing for rare diseases» (под ред. Millán J.). Изд-ство: MDPI (Switzerland). – 2022. – С. 13-28. ISBN 978-3-0365-3728-3 (Hbk) / ISBN 978-3-0365-3727-6 (PDF).

Конференции:

1. **Danilchenko V.Yu.**, Zytsar M.V., Bady-Khoo M.S., Maslova E.A., Posukh O.L. Mutational spectrum of the *SLC26A4* gene and its contribution to the etiology of hearing loss in the indigenous peoples of Southern Siberia (Russia). The 12th International Multiconference «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology», Novosibirsk, Russia, July 6–10, 2020. P.418.
2. **Danilchenko V.Yu.**, Zytsar M.V., Bady-Khoo M.S., Maslova E.A., Bondar A.A., Morozov I.V., Barashkov N.A., Posukh O.L. Mutational spectrum of the *SLC26A4* gene and its contribution to the etiology of hearing loss in the indigenous peoples of Southern Siberia (Russia). The European Human Genetics Virtual Conference ESHG 2020.2 - Live in Your Living Room June 6–9, 2020. P.810.
3. **Данильченко В.Ю.**, Зыцарь М.В., Маслова Е.А., Бады-Хоо М.С., Морозов И.В., Бондарь А.А., Посух О.Л. Существенный вклад мутаций гена *SLC26A4* в этиологию наследуемой потери слуха у коренного населения Республики Тыва. / Международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы», Санкт – Петербург, 18-22 июня 2019, С.740.
4. Посух О.Л., Барашков Н.А., Зыцарь М.В., Бады-Хоо М.С., **Данильченко В.Ю.**, Маслова Е.А., Пшенникова В.Г., Романов Г.П., Соловьёв А.В., Кларов Л.А., Федорова С.А., Терютин Ф.М., Лашин С.А., Орищенко К.Е., Морозов И.В., Бондарь А.А. Итоги многолетних исследований наследственной глухоты у коренного населения Сибири: от эпидемиологии до молекулярной генетики, клеточной биологии и компьютерного моделирования. / Международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров,

посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы», Санкт – Петербург, 18-22 июня 2019, С.813.

5. **Danilchenko V.Yu.**, Zytsar M.V., Posukh O.L. 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.
6. Posukh O.L., Bady-Khoo M.S., Zytsar M.V., **Mikhalskaia V.Yu. (Danilchenko V.Yu.)**, Barashkov N.A., Morozov I.V., Bondar A.A. Founder effect in Siberian indigenous populations through the prism of hereditary deafness. The International Symposium Systems Biology and Biomedicine (SBioMed-2016) / 10th anniversary International Multiconference «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure \Systems Biology» BGRS\SB-2016. Novosibirsk, Russia, 29 August – 2 September 2016. P.82.
7. **Михальская В.Ю. (Данильченко В.Ю.)**, Бады-Хоо М.С., Зыцарь М.В., Бондарь А.А., Морозов И.В., Посух О.Л. Вклад мутаций генов *OTOF*, *RAI1* и *SLC26A4* в этиологию наследственной потери слуха на Алтае и в Туве. 20-я Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ-НАУКА XXI ВЕКА». Пушкино, 18-22 апреля, 2016. Сборник тезисов. С.138.
8. Posukh O.L., Bady-Khoo M.S., Barashkov N.A., Bondar A.A., **Mikhalskaya V.Yu. (Danilchenko V.Yu.)**, Morozov I.V., Tadinova V.N., Zytsar M.V. Different *GJB2* gene contribution to deafness in ethnically matched patients from two regions of South Siberia. J18.19. The European Human Genetics Conference June 6-9, 2015, Glasgow, Scotland, United Kingdom / Eur J Hum Genet. V.23 Suppl. 1. P.470-471.
9. **Михальская В.Ю. (Данильченко В.Ю.)**, Бады-Хоо М.С., Зыцарь М.В., Бондарь А.А., Морозов И.В., Посух О.Л. Вклад мутаций генов *OTOF*, *RAI1* и *SLC26A4* в этиологию наследственной потери слуха на Алтае и в Туве. / Материалы VII Съезда Российского общества медицинских генетиков. Санкт-Петербург, 19-23 мая 2015г. Медицинская генетика. 2015. Т.14. №3(153). С.45-46.

10. **Михальская В.Ю. (Данильченко В.Ю.).** Вклад мутаций генов *OTOF*, *RAI1* и *SLC26A4* в этиологию наследственной потери слуха в популяциях Сибири (Алтай и Тува). Международная научная студенческая конференция, г. Новосибирск, 11-17 апреля, 2015 г. С. 120.
11. Posukh O.L., Churbanov A.Y., Karafet T.M., Bondar A.A., Morozov I.V., **Mikhalskaya V.Yu. (Danilchenko V.Yu.),** Zytsar M.V. 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». Novosibirsk, Russia, 23-28 June, 2014. P.48.

Благодарности автора

Автор выражает искреннюю благодарность и признательность научному руководителю Ольге Леонидовне Посух. Автор также выражает искреннюю признательность Марите Сергеевне Бады-Хоо за предоставленные родословные пациентов с потерей слуха, своим коллегам, своим коллегам, Марине Зыцарь и Екатерине Масловой, за всестороннюю помощь на различных этапах выполнения диссертационной работы, Александру Анатольевичу Бондарю и Игорю Владимировичу Морозову – за ценные рекомендации по проведению молекулярно-генетических работ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Гетерогенность генетического контроля наследуемых форм потери слуха

В настоящее время более 5% населения мира (World Health Organization, <https://www.who.int/ru>) имеют тяжелую или полную потерю слуха, которая может быть обусловлена средовыми или генетическими причинами. Кондуктивный тип потери слуха обусловлен повреждением, дисфункцией или недоразвитием звукопроводящих структур органа слуха (наружное и среднее ухо). Нейросенсорная тугоухость развивается вследствие нарушения механизмов восприятия звука во внутреннем отделе органа слуха или слухового нерва. Подавляющее число генетических форм потери слуха относится к нейросенсорному типу. При смешанном типе – выявляются нарушения в звукопроводящих и звуковоспринимающих отделах органа.

Частота генетических форм глухоты (1 из 1500-2000 новорожденных) превышает частоты многих моногенных заболеваний [Marazita et al., 1993]. Наследственная потеря слуха характеризуется клиническим разнообразием и высокой генетической гетерогенностью. Существует около 400 синдромов, одним из клинических признаков которых является потеря слуха, но на долю синдромальной потери слуха приходится около 30%, а большая часть (~ 70%) – это изолированная (несиндромальная) потеря слуха, без каких-либо других видимых симптомов. Существует несколько форм наследования данной патологии: в 70-80% случаях несиндромальная потеря слуха наследуется аутосомно-рецессивно, в 20% – аутосомно-доминантно, около 1% сцеплено с X-хромосомой и ~ 1-2% – определяется мутациями в митохондриальной ДНК.

Наследуемые формы изолированной нейросенсорной тугоухости/глухоты (НТ/Г) характеризуются уникальной генетической гетерогенностью. К настоящему времени картировано 160 генетических локусов, название которых происходит от DeaFNess (глухота): DFNA – аутосомно-доминантное наследование (63 локуса), DFNB – аутосомно-рецессивное наследование (88 локусов), DFNX – сцепленное с X-хромосомой (6 локусов), DFNM – локус с генами-модификаторами (2 локуса), AUNA – локус слуховой нейропатии (1 локус). В этих локусах на настоящий момент идентифицировано 124 гена, продукты которых участвуют в тщательно скоординированных процессах звуковосприятия: DFNA (51 ген), DFNB (78 генов), DFNX (5 генов), DFNM (1 ген) (Hereditary Hearing Loss Homepage

<https://hereditaryhearingloss.org/>) (**рисунок 1**). В некоторых локусах находятся гены, имеющие как доминантные, так и рецессивные мутации, так, например, в генах *GJB2*, *GJB6*, *MYO7A*, *TMC1*, *TECTA*, *MYO3A*, *MYO6*, *COL11A2*, *PTPRQ*, *TBC1D24*, *CEACAM16* разные мутации приводят к развитию как аутосомно-доминантных, так и аутосомно-рецессивных форм потери слуха.

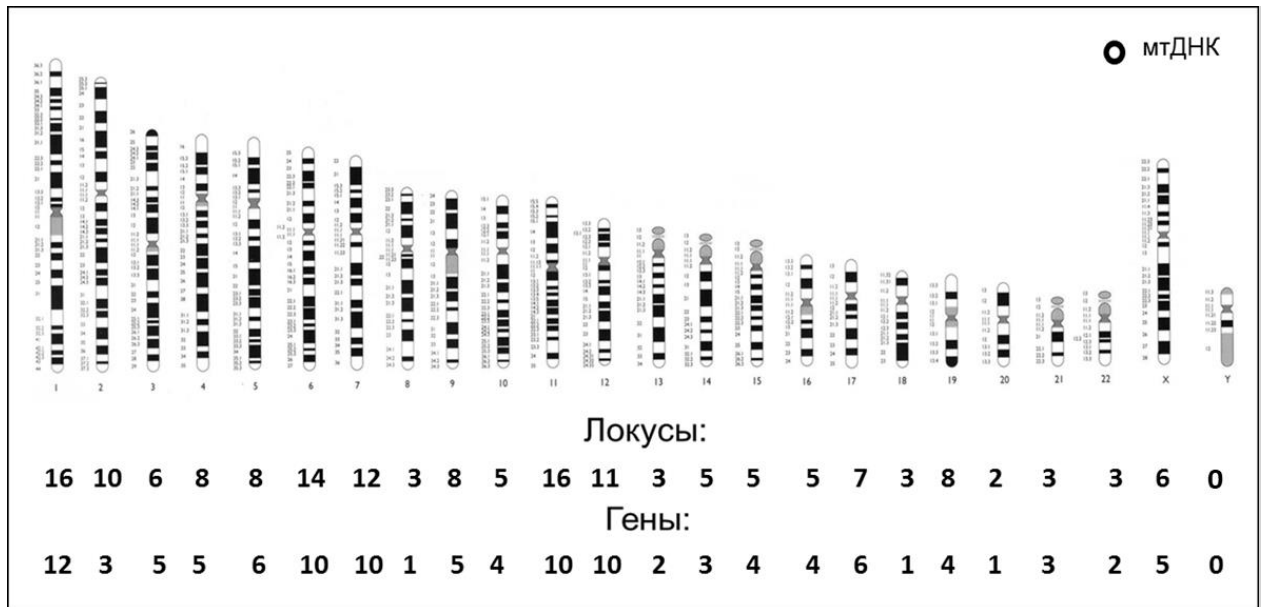


Рисунок 1. Локусы и гены, ассоциированные с потерей слуха (Hereditary Hearing Loss Homepage <https://hereditaryhearingloss.org/>).

Анализ структуры и функции белков, кодируемых генами, известными на настоящий момент в ассоциации с несиндромальной потерей слуха (Hereditary Hearing Loss Homepage <https://hereditaryhearingloss.org/>), с использованием базы данных Human Protein Reference Database (HPRD) (<http://www.hprd.org>), показал, что можно выделить не менее 15 групп, различающихся по структуре и функциям белков, задействованных в этиологии несиндромальной потери слуха (**рисунок 2**). Наиболее распространенными являются ферменты (11%), транскрипционные факторы и белки, регулирующие транскрипцию (9%), белки внеклеточного матрикса (9%), структурные белки (6%), транспортные белки (5%). Около одной четверти всех белков (21%) пока не классифицировано вследствие недостатка информации о их структуре и функции.

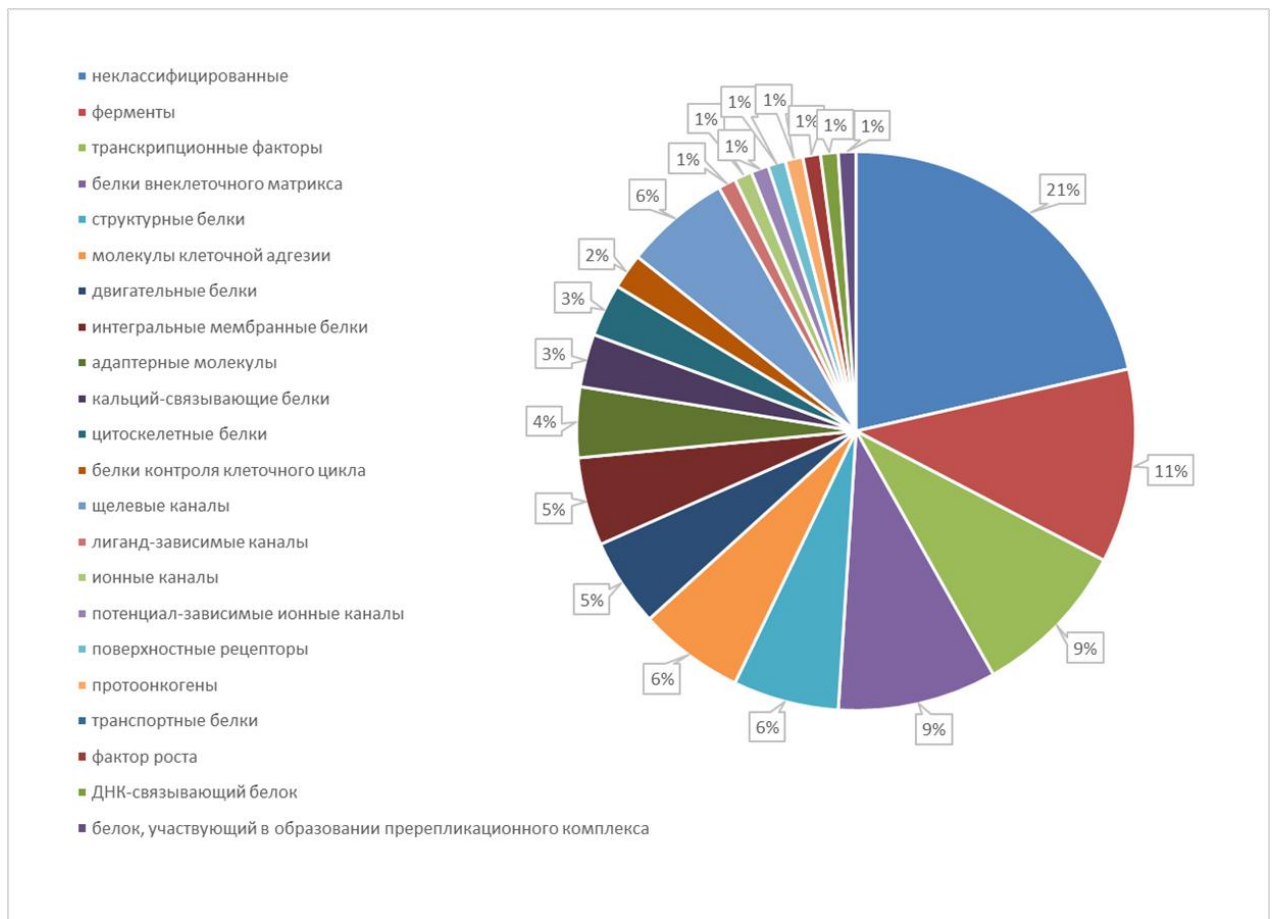


Рисунок 2. Группы белков, ассоциированных с потерей слуха (Hereditary Hearing Loss Homepage <https://hereditaryhearingloss.org/>; Human Protein Reference Database (HPRD), <http://www.hprd.org/>].

1.2. Методы секвенирования нового поколения (NGS) для выявления генетических причин моногенных заболеваний

Развитие в последнее время новейших технологий секвенирования ДНК (NGS) явилось предпосылкой нового этапа в диагностике как моногенных (особенно с высокогетерогенным генетическим контролем), так и сложных заболеваний. Данные технологии дают возможность успешного поиска еще неизвестных патологических вариантов в генах, выявления потенциальных генов-кандидатов, а также определения мутаций *de novo*. Термин NGS объединяет группу подходов, основанных на одновременном параллельном секвенировании миллионов коротких фрагментов ДНК с последующей «сборкой» генома. В связи с этим, выделяется несколько видов NGS: полногеномное секвенирование (WGS, Whole Genome Sequencing), которое дает возможность одномоментного анализа всей последовательности генома; экзомное (полноэкзомное) секвенирование (WES, Whole Exome Sequencing), которое позволяет получить информацию обо всех

кодирующих районах генома – экзонах; таргетное секвенирование – вариант экзомного секвенирования, который основан на выборочной расшифровке кодирующих последовательностей ограниченного числа произвольно выбранных генов. Применение полногеномного секвенирования (WGS) для диагностических целей пока ограничено высокой стоимостью экспериментальных работ и сложностью биоинформатической обработки большого объема полученных данных. В этом смысле, экзомное секвенирование, при котором анализируется только кодирующие районы (около 1–2%) всего генома, что, во многих случаях, является достаточным для детекции подавляющего большинства патогенетических мутаций, имеет хорошие перспективы для скорейшего внедрения в качестве перспективного диагностического метода, по крайней мере, для моногенных заболеваний, характеризующихся генетической гетерогенностью.

Для успешной идентификации мутаций генов, ответственных за возникновение моногенных заболеваний, с помощью экзомного секвенирования разработаны определенные подходы (стратегии) [Gilissen et al., 2012], выбор которых (или их комбинация) определяется характером наследования патологии в семье и доступностью ее членов для обследования. Кроме того, выбор стратегии последующего биоинформатического анализа, при котором с помощью серии фильтров проводится поиск потенциально патогенетических вариантов, также имеет важное значение в контексте возможных ложно-положительных результатов.

Стратегии идентификации генов при экзомном секвенировании (по [Gilissen et al., 2012]):

- **Linkage strategy** – стратегия, основанная на поиске патогенетических вариантов, общих для больных членов семьи с моногенным заболеванием. В данном случае анализируются больные и здоровые члены семьи, исключаются варианты, не являющихся патогенетическими (т.е. присутствующие у больных и здоровых индивидуумов), тем самым, происходит «сужение» списка генов-кандидатов, вовлеченных в развитие патологии.
- **Homozygosity strategy** – стратегия, реализуемая в близкородственных семьях с редкой, рецессивно наследуемой, патологией, и основанная на предположении о гомозиготности идентичных по происхождению хромосомных районов, включающих патогенетический вариант, у больных потомков в таких семьях. Поиск

патогенетических вариантов осуществляется в этих гомозиготных участках. В данном случае анализ здоровых членов семьи не является необходимым.

- **Double-hit strategy** – стратегия, применяемая в случаях, когда только один из членов семьи доступен для анализа и заболевание наследуется рецессивно. После проведения полноэкзомного секвенирования, и в качестве кандидатных генов выбираются те, в которых обнаруживаются гомозиготные и компаунд-гетерозиготные варианты, редко встречающиеся или отсутствующие в общей популяции.

- **Overlap strategy** – стратегия, применяемая (в предположении отсутствия генетической гетерогенности) для поиска патогенетических вариантов у нескольких неродственных пациентов с одинаковым фенотипом, определяемым редким моногенным заболеванием. Это стратегия важна для идентификации генов болезней с доминантным типом наследования, поскольку в данном случае у больных будет выявляться существенно больше редких гетерозиготных несинонимичных (предположительно патогенетических) вариантов, чем редких вариантов в гомозиготном состоянии. Чем больше будет обследовано таких пациентов, тем меньше будет число генов-кандидатов с вариантами, перекрывающимися у всех обследованных больных.

- **De novo strategy** – стратегия, используемая для диагностики спорадических случаев заболеваний (как моногенных, так и сложных) и основанная на экзомном секвенировании семейного трио – больного и его родителей. Используемый подход состоит в биоинформатической фильтрации всех наследуемых вариантов, выявлении *de novo* вариантов и последующего анализа их возможного патогенетического эффекта.

- **Candidate strategy** – стратегия, применяемая в случаях, когда для анализа доступен только единичный больной с доминантным заболеванием. В данном случае основное внимание уделяется выявлению и анализу вариантов с наиболее вероятным патогенетическим эффектом на структуру и функции белков (стоп-мутации, мутации сдвига рамки считывания, сплайсинговые мутации). Для миссенс-мутаций используется совокупность биоинформатических методов, позволяющих предсказать их влияние на структуру и функции белка и оценить степень консервативности данной замены.

Потенциально патогенетические варианты, выявленные в результате экзомного секвенирования, должны быть подтверждены секвенированием по Сэнгеру, и, в тех случаях, когда это возможно, проанализирована их сегрегация с патологическим фенотипом.

1.3. Разнообразие генов, ассоциированных с потерей слуха

Ранее, картирование локусов и идентификация генов, ассоциированных с потерей слуха, в основном, осуществлялось при анализе близкородственных семей с многочисленными глухими индивидуумами из изолированных эндогамных популяций (Пакистан, Палестина, Тунис, Иран, Турция, Индия). В зависимости от «информативности» семей, использовались различные методологические стратегии (позиционное и гомозиготное картирование, поиск генов-кандидатов) [Ahmed et al., 2003; Delmaghani et al., 2003; Tariq et al., 2006; Kalay et al., 2007; Khan et al., 2007 и др.]. Некоторые «гены глухоты» были идентифицированы только в единичных семьях. В самое последнее время опубликовано значительное число работ по идентификации генетических факторов, приводящих к потере слуха, с использованием разных экспериментальных подходов, включая различные стратегии экзомного секвенирования. Были выявлены как новые, так и уже известные мутации в генах, ассоциированных с потерей слуха; либо патогенетические мутации в генах, ранее не описанных в связи с глухотой [Sirmaci et al., 2010; Walsh et al., 2010; Brownstein et al., 2011; Schraders et al., 2011; Diaz-Horta et al., 2012; Khateb et al., 2012; Sirmaci et al., 2012; Choi et al., 2013; Girotto et al., 2013; Kim et al., 2013; Zhao et al., 2013; Bademci et al., 2014; Gu et al., 2015; Sakuma et al., 2016; Yan et al., 2017; Cabanillas et al., 2018; Lerat et al., 2019; Zou et al., 2020; Vona et al., 2021 и др.]. Таким образом, для несиндромальной (изолированной) наследственной потери слуха к настоящему времени уже картировано около 160 локусов и идентифицировано не менее 120 генов (Hereditary Hearing Loss Homepage: <https://hereditaryhearingloss.org/>).

Несмотря на такое большое многообразие генов, связанных с потерей слуха, наибольший патогенетический вклад в развитие нейросенсорной тугоухости во многих популяциях мира имеет ген **GJB2** (*Gap junction protein beta-2*, Cx26, 13q12.11, MIM 121011) [Denoyelle et al., 1999; Kenneson et al., 2002; Morton, Nance, 2006 и др.]. Ген **GJB2** кодирует трансмембранный белок коннексин 26 (Cx26),

который экспрессируется в тканях внутреннего уха и участвует в образовании коннексонов – структур, состоящих из шести белковых субъединиц Cx26. Коннексоны соседних клеток формируют межклеточные каналы, по которым происходит ионный обмен, необходимый для ионного гомеостаза эндолимфы в тканях внутреннего уха, что обеспечивает нормальный процесс звуковосприятия [Maeda et al., 2009]. При дефектах Cx26, вызванных мутациями гена *GJB2*, не происходит восстановления ионного гомеостаза эндолимфы, что приводит к необратимой потере слуха. В большинстве европейских стран мутации гена *GJB2* определяются у 50-60% больных с наследуемой потерей слуха, в азиатских популяциях – у 10-20% больных.

Мутации в гене ***SLC26A4*** (*Solute carrier family 26, member 4 / pendrin*, MIM 605646, 7q22.3) являются второй по значимости генетической причиной потери слуха. Среди всех генетических случаев потери слуха, мутации этого гена обнаруживаются у 2–3.5% глухих пациентов европейского происхождения и у 5.5–12.6% глухих пациентов из некоторых стран Юго-Восточной Азии (Япония, Южная Корея, Китай) [Tsukamoto et al., 2003; Wang et al., 2007; Lee et al., 2008; Du et al., 2013 и др.]. Ген *SLC26A4* относится к семейству SLC26, которое включает 10 генов (*SLC26A1-A11*, *A10* - псевдоген), кодирующих анионные транспортеры, которые способны переносить широкий спектр одновалентных и двухвалентных анионов, включающих сульфат (SO_4^{2-}), хлорид (Cl^-), йодид (I^-), формиат (HCOO^-), оксалат ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$), гидроксид ион (OH^-), бикарбонат (HCO_3^-). Отдельные паралоги существенно отличаются по анионной специфичности, например, *SLC26A6* способен переносить все вышеперечисленные одновалентные анионы, в то время как *SLC26A4* переносит одновалентные анионы, такие как Cl^- , I^- , HCO_3^- , HCOO^- , но не двухвалентные анионы, такие как SO_4^{2-} и $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ [Mount, Romero, 2004]. Первоначально предполагалось, что белки семейства SLC26 содержат 12 трансмембранных доменов с N- и C-концами, расположенными в цитозоле [Alper et al., 2013; Cordant et al., 2014], но в работе [Gorbunov et al., 2014] впервые были получены экспериментальные доказательства в пользу 14-ти-доменной организации белка prestin (*SLC26A5*) и его паралога pendrin (*SLC26A4*). С-концевой цитоплазматический домен всех десяти белков семейства SLC26 включает в себя STAS-домен (sulfate transporter and antisigma factor antagonist), физиологические или

механистические роли которого пока точно неизвестны, однако наличие мутаций в этом домене, связанных с различными заболеваниями, подчеркивает его потенциальную важность [Aravind, Koonin, 2000].

Было показано, что мутации, по крайней мере, в пяти генах (*SLC26A2*, *A3*, *A4*, *A5*, *A8*) семейства *SLC26* могут приводить к различным генетическим заболеваниям человека: дисплазиям, связанным с нарушением процесса формирования хрящевой и костной тканей (ген *SLC26A2*, *Solute carrier family 26 / DTDST, member 2*, MIM 606718, 5q32), врожденной хлоридной диарее (ген *SLC26A3*, *Solute carrier family 26 / DRA, member 3*, MIM 126650, 7q22.3-q31.1), сперматогенной недостаточности 3 (ген *SLC26A8*, *Solute carrier family 26, member 8 / TAT1*, MIM 608480, 6p21.31), а мутации в двух генах, *SLC26A5* и *SLC26A4* - к нарушениям слуховой функции. Мутации в гене *SLC26A5* (*Solute carrier family 26, member 5 / prestin*, MIM 604943, 7q22.1) приводят к несиндромальной рецессивно наследуемой потере слуха (DFNB61, MIM 613865). Prestin является трансмембранным двигательным белком наружных волосковых клеток внутреннего уха, который экспрессируется в их плазматической мембране и играет существенную роль в соматической электрической подвижности этих клеток [Lieberman et al., 2002; Dallos et al., 2008].

Ген *SLC26A4* кодирует трансмембранный транспортный белок пендрин (pendrin), который экспрессируется в основном, в тканях внутреннего уха, щитовидной железы и почек и участвует в транспорте различных ионов [Mount, Romero, 2004]. Во внутреннем ухе пендрин поддерживает анионный состав эндолимфы, опосредуя обмен $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ [Everett et al., 1999; Wangemann et al., 2007]. Нарушение структуры белка pendrin приводит к значительному увеличению объема эндолимфы, что вызывает дегенерацию сенсорных клеток внутреннего уха и необратимую потерю слуха [Everett et al., 2001]. Белок pendrin состоит из 780 аминокислот, но его структура пока недостаточно изучена: в различных исследованиях выделяют от 9 до 15 топологических доменов, с N- и C-концевыми последовательностями, выходящими в цитозоль, и представления о количестве топологических доменов пендрина остаются противоречивыми [Dossana et al., 2009; Bassot et al., 2017]. Как и другие члены семейства *SLC26*, pendrin содержит STAS-домен, состоящий из 195 аминокислот, кодируемыми экзонами 14 – 19. Мутации в гене *SLC26A4* приводят к несиндромальной рецессивно наследуемой потере слуха

(DFNB4) и некоторым формам синдрома Пендреда (Pendred Syndrome, PS, MIM 274600) – заболевания, определяемого потерей слуха и развитием зоба [Everett et al., 1997; Usami et al., 1999; Prasad et al., 2004; Chen et al., 2011]. У пациентов с *SLC26A4*-мутациями часто наблюдается аномалия костного лабиринта внутреннего уха - расширенный водопровод преддверия (EVA, Enlarged vestibular aqueduct, MIM 603545), которая может быть выявлена с помощью компьютерной томографии (КТ) височных костей [Everett et al., 1997; Prasad et al., 2004; Chen et al., 2011].

Кроме генов *GJB2* и *SLC26A4*, для первостепенной диагностики также выделяют ряд генов, мутации которых приводят к аутосомно-рецессивным формам потери слуха (*MYO15A*, *OTOF*, *CDH23*), к аутосомно-доминантным формам (*WFS1*, *KCNQ4*, *COCH*), а также гены *MYO7A*, *TMC1* и *COL11A2*, мутации в которых приводят к развитию как аутосомно-доминантных, так и аутосомно-рецессивных форм потери слуха, и некоторые мутации митохондриальной ДНК [Bitner-Glindzicz et al., 2002; Finsterer et al., 2005; Hilgert et al., 2009a; Chang et al., 2015].

Ген *MYO7A* (*Myosin VIIA*, MIM 276903; 11q13.5, 49 экзонов) кодирует белок миозина 7-го типа, который экспрессируется в эпителии улитки и вестибулярного аппарата, а также в клетках сетчатки [Petersen, 2002]. Мутации в гене *MYO7A* приводят как к несиндромальной аутосомно-рецессивной (DFNB2, MIM 600060), так и к аутосомно-доминантной (DFNA11, MIM 601317) потере слуха, а также к синдрому Ушера типа 1Б (MIM 276900), который характеризуется врождённой нейросенсорной потерей слуха, нарушением речи и прогрессирующей потерей зрения (пигментная дегенерация) [Weil et al., 1995; Liu et al., 1997; Riazuddin et al., 2008]. Вероятно, потеря слуха обусловленная мутациями в гене *MYO7A*, может быть результатом дефектного морфогенеза стереоцилий с нарушением механических свойств, которые являются критическими для процесса механотрансдукции [Petersen, 2002].

Ген *TMC1* (*Transmembrane channel-like protein 1*, MIM 606706, 9q21.13, 24 экзона) кодирует интегральный мембранный белок с 6-ю трансмембранными доменами, который включен в процессы механотрансдукции в волосковых клетках внутреннего уха [Pan et al., 2013]. Мутации в гене *TMC1* приводят как к несиндромальной аутосомно-рецессивной форме (DFNB7, MIM 606705), так и к аутосомно-доминантной форме (DFNA36, MIM 600974) потери слуха. Впервые

мутации в гене *TMC1* были обнаружены в одной семье с DFNA36 и в 11 семьях с DFNB7 [Kurima et al., 2002].

Ген *COL11A2* (*Collagen, type XI, alpha-2*, MIM 120290; 6p21.32, 62 экзона) кодирует коллаген 11-го типа класса альфа-2. Впервые гетерозиготные мутации в этом гене, были обнаружены в двух семьях (американской и голландской) с прогрессивной прелингвальной аутосомно-доминантной потерей слуха (DFNA13, MIM 601868) [McGuirt et al., 1999; Petersen 2002; De Leenheer et al., 2004]. Данные, полученные на животных моделях, показали, что эти мутации приводят к нарушению правильной организации (loss of organization) коллагеновых фибрилл с последующими аномалиями текториальной мембраны в среднем отделе улитки [McGuirt et al., 1999]. Кроме того, мутации в гене *COL11A2* приводят к несиндромальной аутосомно-рецессивной потере слуха (DFNB53, MIM 609706), что впервые было обнаружено у 5 пациентов из иранской семьи [Chen et al., 2005]. В настоящее время описан ряд мутаций в гене *COL11A2*, которые приводят к отоспондиломегаэпифизарной дисплазии (OSMED, MIM 184840, 215150), а также к синдрому Стиклера (OSMEDA, MIM 184840), одним из симптомов данных синдромов является потеря слуха [Brunner et al., 1994; Vikkula et al., 1995; Melkonieni et al., 2000].

Ген *MYO15A* (*Myosin XVA*, MIM 602666, 17p11.2, 66 экзонов) кодирует белок миозин типа 15A. Мутации в этом гене приводят к несиндромальной аутосомно-рецессивной потере слуха (DFNB3, MIM 600316). Впервые мутации в гене *MYO15A* были обнаружены в близкородственных семьях из Индонезии [Wang et al., 1998].

Ген *OTOF* (*Otoferlin*, MIM 603681 2p23.3, 48 экзонов) кодирует трансмембранный белок отоферлин, участвующий в связывании кальция, который играет главную роль в процессе высвобождения нейромедиаторов посредством Ca^{2+} -зависимого взаимодействия с окружающими белками в синапсах ленточного типа между внутренними волосковыми клетками и волокнами слухового нерва [Roux et al., 2006; Pangršič et al., 2012]. *OTOF* экспрессируется в головном мозге и в клетках внутреннего уха. Мутации гена *OTOF*, в среднем, обнаруживаются у 2-3% больных с рецессивно наследуемой тяжелой нейросенсорной потерей слуха и нейропатией слухового нерва (DFNB9, MIM 601071) [Yasunaga et al., 1999; Migliosi et al., 2002; Tekin et al., 2005; Rodríguez-Ballesteros et al., 2008; Choi et al., 2009;

Mahdieh et al., 2012; Matsunaga et al., 2012; Iwasa et al., 2013]. В некоторых популяциях описан уникальный «температурно-чувствительный» фенотип нейропатии слухового нерва, определяемый мутациями гена *OTOF* [Varga et al., 2003; Marlin et al., 2010; Wang et al., 2010a; Matsunaga et al., 2012].

Ген *CDH23* (*Cadherin 23*, MIM 605516, 10q22.1, 69 экзонов) является членом семейства кадхеринов, которые кодируют кальций-зависимые гликопротеиды, обеспечивающие межклеточную адгезию [Zhang et al., 2017]. Во внутреннем ухе ген *CDH23* экспрессируется в наружных и внутренних волосковых клетках, где кадхерин 23 играет важную роль в правильном формировании стереоцилий [Söllner et al., 2004]. Мутации в гене *CDH23* приводят к несиндромальной аутосомно-рецессивной потере слуха (DFNB12, MIM 601386) [Bork et al., 2001; Schultz et al., 2005], а также к синдрому Ушера типа 1Д (USH1D, MIM 601067), который характеризуется потерей слуха, а также сильно варьирующей дегенерацией сетчатки [Bolz et al., 2001]. Только миссенс-варианты гена *CDH23* были обнаружены в семьях с несиндромальной потерей слуха, в то время как нонсенс-варианты, мутации сдвига рамки считывания, мутации в сайтах сплайсинга и миссенс-варианты были выявлены у пациентов с синдромом Ушера типа 1Д [Astuto et al., 2002].

Ген *WFS1* (*Wolframin ER transmembrane glycoprotein*, MIM 606201, 4p16.1, 8 экзонов) кодирует белок wolframin - интегральный белок, имеющий девять трансмембранных спиральных сегментов, локализующихся преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме [Cryns et al., 2003; Tanizawa, 2003]. Вероятно, такая локализация этого белка играет важную роль в регуляции гомеостаза кальция в эндоплазматическом ретикулуме. Мутации в гене *WFS1* приводят к несиндромальной аутосомно-доминантной потере слуха (DFNA6/14/38, MIM 600965), а также к синдрому Вольфрама (WFS1, MIM 222300), который характеризуется наличием диабета, атрофией зрительного нерва и потерей слуха [Strom et al., 1998; Hardy et al., 1999; Khamis et al., 2001; Zalloua et al., 2008 и др.]. У пациентов с мутациями в DFNA6/14/38 наблюдается умеренная (<1000-4000 Гц) двухсторонняя потеря слуха.

Ген *KCNQ4* (*Potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 4*, MIM 603537, 1p34.2, 15 экзонов) экспрессируется в наружных волосковых клетках и кодирует белок, формирующий потенциал-зависимые калиевые каналы, которые

играют важную роль в регуляции возбудимости нейронов [Kharkovets et al., 2000]. Мутации в гене *KCNQ4* приводят к несиндромальной аутосомно-доминантной потере слуха (DFNA2A, MIM 600101). Было показано, что возникновение мутаций в этом гене оказывает сильное негативно-отрицательное воздействие на активность канала [Coucke et al., 1994, 1999; Kubisch et al., 1999; Talebizadeh et al., 1999; Mencia et al., 2008].

Ген *COCH* (*Cochlin*, MIM 603196, 14q12, 13 экзонов) кодирует белок кохлин, который экспрессируется в спиральном лимбе (*spiral limbus*) и спиральной связке (*spiral ligament*) внутреннего уха, а также является основным компонентом внеклеточного матрикса [Robertson et al., 1997; Grabski et al., 2003]. Миссенс-мутации в гене *COCH* приводят к несиндромальной прогрессирующей аутосомно-доминантной потере слуха (DFNA9, MIM 601369), а также к болезни Меньера (MIM 156000), для которой характерно увеличение объема эндолимфы, в результате чего могут возникать головокружения, чувство неустойчивости в темноте или на неровной поверхности, при ходьбе по ступенькам, а также возникновение прогрессирующей глухоты [De Kok et al., 1999; Fransen et al., 1999; Merchant et al., 2000]. В большинстве случаев прогрессирующая нейросенсорная потеря слуха наблюдается в возрасте 40-60 лет, очень редко в 20-40 лет [Robertson et al., 1998; Kamarinos et al., 2001].

Мутации митохондриальной ДНК. Различные мутации в митохондриальной ДНК (мтДНК) могут вызывать прогрессирующую, несиндромальную потерю слуха. Мутации в мтДНК, связанные с наследственной потерей слуха, наиболее часто обнаруживаются в генах, кодирующих 12S рРНК (*MT-RNR1*) и митохондриальные тРНК [Hutchin et al., 2000; Guan, 2004; MITOMAP: <https://www.mitomap.org/MITOMAP>]. Мутация m.1555A>G в гене *MT-RNR1* ассоциирована с потерей слуха, возникающей после лечения аминогликозидами, поскольку митохондриальная 12S рРНК с измененной в результате мутации m.1555A>G структурой является мишенью для токсического действия аминогликозидов [Hutchin et al., 1993]. Эта мутация обнаруживается у пациентов с потерей слуха во многих регионах мира: с частотой 0.5-2.5% - у пациентов из европейских стран, несколько чаще в азиатских странах - 2.9% в Китае, 3% в Японии, 5.3% в Индонезии [Pandya et al., 1999; Usami et al., 2000; Kupka et al., 2002; Malik et

al., 2003; Tekin et al., 2003; Li et al., 2005]. Обычно мутация m.1555A>G выявляется в состоянии гомоплазмии, более редко - с разной степенью гетероплазмии. Нарушение слуховой функции у носителей мутации m.1555A>G характеризуется различным возрастом начала заболевания, варьирующей степенью потери слуха и прогрессией. Мутационные изменения, возникающие в гене, кодирующем тРНК^{Ser(UCN)}, обычно ассоциированы с несиндромальной потерей слуха, в то время как мутации в генах, кодирующих тРНК^{Leu(UUR)}, тРНК^{Lys} и тРНК^{Glu}, приводят к возникновению различных синдромов, где одним из симптомов является потеря слуха [Fischel-Ghodsian et al., 1995; Van den Ouweland et al., 1995; Van Camp et al., 2000; Chinnery et al., 2000; Ishikawa et al., 2002; Crimi et al., 2003 и др.].

В настоящее время существует большое количество работ, посвященных поиску мутаций в ряде генов, ассоциированных с потерей слуха, но, к сожалению, пока нет обобщающих обзоров, в которых была бы рассмотрена географическая распространенность различных форм генетической потери слуха, определяемых множеством генов, в мировом масштабе. Тем не менее, существует ряд работ, анализирующих патогенетический вклад некоторых «генов глухоты» в выборках пациентов различной этнической принадлежности в отдельных регионах мира. Как правило, в таких исследованиях применяется метод экзомного секвенирования.

Например, методом полноэкзомного секвенирования был выполнен поиск мутаций в генах, ассоциированных с потерей слуха, в мультиэтнической выборке *GJB2*-негативных пациентов, которая включала семьи из Турции, Ирана, Мексики, Эквадора и Пуэрто-Рико. Доля выявленных мутаций в генах составила: *MYO15A* (13%), *MYO7A* (11%), *SLC26A4* (10%), *TMPRSS3* (9%), *TMC1* (8%), *ILDR1* (6%), *CDH23* (4%), *OTOF* (4%), *PCDH15* (3%), *TMIE* (3%) [Bademci et al., 2016].

В исследовании Sloan-Heggen et al. (2015), было показано, что доля мутаций в генах *SLC26A4*, *MYO15A*, *MYO7A*, *CDH23*, *COL11A2*, являющихся причиной потери слуха у иранских *GJB2*-негативных пациентов составляет 12.3%, 9.6%, 5.0%, 4.6%, 0.7%, соответственно [Sloan-Heggen et al., 2015]. В исследовании [Sloan-Heggen et al. 2016] был проведен поиск вариантов, связанных с потерей слуха в мультиэтнической выборке пациентов, которая включала европеоидов, латиноамериканцев, афроамериканцев, азиатов, евреев ашкенази и пациентов неизвестной этнической принадлежности. В результате было обнаружено 49 генов, ассоциированных с

потерей слуха, но почти три четверти всех диагнозов (72%) были связаны с 10-ю генами: *GJB2* (22%), *STRC* (16%), *SLC26A4*, (7%), *TECTA* (5%), *MYO15A* (5%), *MYO7A* (4%), *USH2A* (4%), *CDH23* (4%), *GPR9* (3%), *TMC1* (2%).

В странах Европы распространены мутации в различных генах глухоты. Например, в Нидерландах наиболее частой причиной потери слуха являются мутации в генах *COCH* (36.8%), *KCNQ4* (15.4%) и *GJB2* (7.2%), а также обнаружен ряд вариантов в генах *COL11A1*, *DFNA5*, *EYA1*, *MYO7A*, *NDP*, *OTOF*, *SLC26A4*, *WFS1* [Zazo Seco et al., 2017]. Нонсенс-мутация (p.Gln829*) в гене *OTOF* составляет 3% от всех случаев рецессивной потери слуха в Испании [Migliosi et al., 2002; Rodriguez-Ballesteros et al., 2003].

У пациентов с потерей слуха из Алжира были обнаружены мутации с.699C>T (p.Arg237*), с.2122C>T (p.Arg708*) в гене *OTOF*, с.5336T>C (p.Leu1779Pro) в гене *MYO15A*, с.1334T>G (p.Leu445Trp) в гене *SLC26A4*, которая ранее была обнаружена у пациентов из Туниса и из Нидерландов [Van Hauwe et al., 1998; Masmoudi et al., 2000; Ammar-Khodja et al., 2015].

В двух исследованиях в турецких семьях частота мутаций в гене *TMC1* составила 4.3% [Kalay et al., 2005] и 8.1%, где были выявлены уже известные мутации с.1330G>A (p.Gly444Arg), с.1333C>T (p.Arg445Cys), с.2030T>C (p.Ile677Tre) [Sirmaci et al., 2009a]. В Тунисе была обнаружена мутация с.100C>T (p.Arg34*) в гене *TMC1* с частотой 5.6% [Ben Said et al., 2010]. В ряде североамериканских европеоидных семей были обнаружены два доминантных варианта p.Asp572Asn и p.Asp572His, которые приводят к разным заменам в одной нуклеотидной позиции 1714 гена *TMC1* [Hilgert et al., 2009b].

В Китае, наиболее частой причиной слуха являются мутации в генах *GJB2* и *SLC26A4*, но в ряде исследований, с относительно высокой частотой, были обнаружены мутации в других генах: в гене *MYO15A* (6.1%) – мутации с.3833A>C (p.Gln1278Pro), с.9876G>T (p.Trp3292Cys), с. 4351G>A (p.Asp1451Asn), с.6461G>A (p.Cys2154Tyr) а также новые варианты с.3833A>C (p.Gln1278Pro), с.6461G>A, (p.Cys2154Tyr) и с.9876G>T (p.Trp3292Cys); в гене *TMC1* (3%) – мутации с.150delT (p.Asn50fs), с.1224+2T>C; в гене *OTOF* (3%) - мутации с.5713-2A>G, с.5197G>A (p.Glu1733Lys) [Sang et al., 2019]. В другом исследовании в Китае было выделено

пять генов в которых мутации встречались с высокой частотой: *SLC26A4* (29%), *GJB2* (24%), *PCDH15* (6%), *MTRNR1* (5%) и *TECTA* (5%) [Chen et al., 2016].

1.4 Мутации-основатели (founder mutations) в распространенности различных форм наследуемой потери слуха

Многочисленные данные о распространенности мутаций генов, ассоциированных с потерей слуха, в различных популяциях мира свидетельствуют о том, что для некоторых форм наследственной потери слуха, как и для многих других моногенных заболеваний, их «накопление» в той или иной популяции может определяться такими факторами как этнический состав населения, изоляция, доля близкородственных браков, эффекты основателя и «бутылочного горлышка», случайный инбридинг при малой эффективной численности популяции [Scott et al., 1995; Winata et al., 1995; Ben Arab et al., 2004; Zlotogora et al., 2007; Chong et al., 2012 и др.]. Особенно отчетливо эти эффекты наблюдаются в малочисленных изолированных популяциях. Кроме того, в распространенности наследственных форм глухоты важную роль, вероятно, играли и определенные социальные факторы: долговременная традиция заключения ассортативных браков между глухими людьми, в сочетании с ростом их социальной адаптации и биологической приспособленности (genetic fitness) [Nance et al., 2000; Nance, Kearsey, 2004; Blanton et al., 2010].

Для многих «генов глухоты» известны мажорные мутации, преобладающие в ряде регионов, в то время как другие мутации могут обнаруживаться только в локальных популяциях, или в отдельных семьях. Высокая частота некоторых мутаций 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 мутаций-основателей может быть подтверждена общностью гаплотипов участков хромосом, включающих эти мутации, выявленной на основе анализа высокополиморфных генетических маркеров: STRs (Short Tandem Repeats, микросателлиты) и SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). С помощью подхода «молекулярных часов» при анализе гаплотипов, несущих ту или иную мутацию, могут быть также получены оценки ее «возраста» (время возникновения) и определены потенциальные регионы ее происхождения.

Так, например, различные наборы STR- и SNP-маркёров широко использовались для реконструкции гаплотипов, включающих мажорные мутации наиболее значимого в этиологии потери слуха гена *GJB2*, в разных популяциях мира. В ряде случаев анализ генетического окружения этих мутаций позволил выяснить их примерный возраст и предполагаемый регион происхождения. Ключевая роль эффекта основателя в распространенности мутации c.35delG, частой в популяциях европейского происхождения, была установлена в многочисленных исследованиях путем анализа гаплотипов, несущих эту мутацию: предполагается, что впервые c.35delG появилась примерно 10000-14000 лет назад на Ближнем Востоке и/или в Средиземноморье и затем распространились в результате неолитических миграций в Европе и по всему миру [Van Laer et al., 2001; Tekin et al., 2001; Shahin et al., 2002; Belguith et al., 2005; Kokotas et al., 2010; Dzhemileva et al., 2011; Zytsar et al., 2018].

Общность гаплотипов, несущих мутацию c.167delT, обнаруженной у евреев-ашкенази, предполагает единое происхождение этой мутации, которая начала распространяться после «бутылочного горлышка» в популяции ашкенази [Sobe et al., 1999]. Анализ гаплотипов с мутацией c.71G>A (p.Trp24*) показал, что высокая частота этой мутации, характерной для индийцев, скорее всего, связана с эффектом основателя, а возраст этой мутации c.71G>A (p.Trp24*) оценивается примерно в 7880 лет [RamShankar et al., 2003]. Роль эффекта основателя в чрезвычайно высокой частоте мутации c.-23+1G>A у якутов (Восточная Сибирь, Россия) подтвержден анализом c.-23+1G>A-гаплотипов, возраст этой мутации в Якутии - примерно 800 лет, и, вероятно, эта мутация была привнесена миграциями тюркоязычных предков якутов из южных регионов Сибири [Barashkov et al., 2011].

Общий гаплотип был установлен для мутации c.131G>A (p.Trp44*), обнаруженной у пациентов из Гватемалы, что свидетельствует о едином родоначальнике из предкового населения майя [Carranza et al., 2016]. Роль эффекта основателя также обоснована в высокой распространенности мутации c.235delC у жителей Восточной Азии (Китай, Япония, Корея), монголов (Монголия) и алтайцев (Южная Сибирь, Россия) [Liu et al., 2002; Ohtsuka et al., 2003; Yan et al., 2003; Erdenechuluun et al., 2018; Shinagawa et al., 2020; Zytsar et al., 2020]. Предполагается, что c.235delC возникла ~ 11500 лет назад в регионе озера Байкал, откуда она с миграционными потоками распространилась по территории Азии [Yan et al., 2003]. Эффект основателя был подтвержден в

происхождении шести мутаций гена *GJB2* (с.235delC, p.Val37Ile, p.[Gly45Glu;Tyr136*], p.Arg143Trp, с.176_191del, с.299_300delAT), часто наблюдаемых у японских пациентов с потерей слуха, и был оценен возраст каждой из этих мутаций [Shinagawa et al., 2020]. В нашем недавнем исследовании мы показали, что высокая распространенность мутаций с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC у коренного населения Южной Сибири обусловлена эффектом основателя [Zytsar et al., 2020].

Роль эффекта основателя была также подтверждена при изучении распространенности мажорных мутаций ряда других «генов глухоты»: для мутации с.6377delC в гена *MYO7A*, приводящей к синдрому Ушера, в Южной Африке [Roberts et al., 2015]; для мутации p.P240L в гене *CDH23*, приводящей к аутосомно-рецессивной глухоте (тип DFNB12), у корейских пациентов [Kim et al., 2015]; для новой дупликации с.1171_1177dupGCCATCT в гене *MYO15A* (тип DFNB3) у пациентов в Омане [Palombo et al., 2017]; для p.R34X в гене *TMC1* в мультиэтнической выборке пациентов с потерей слуха [Ben Saïd et al., 2010]; для p.R1939Q в гене *OTOF* у японских пациентов [Matsunaga et al., 2012]; для p.R84W в гене *TMIE* (DFNB6) у пациентов из Турции [Sirmaci et al., 2009b]; для с.488C>T в гене *CLDN14* (DFNB29) у пациентов из Канады (провинция Ньюфаундленд) [Pater et al., 2017]. Показано также, что накопление специфических мутаций в гене *SLC26A4* в определенных популяциях может быть результатом эффекта основателя [Borck et al., 2003; Park et al., 2003; Wu et al., 2005; Pera et al., 2008; Anwar et al., 2009; Mohseni et al., 2014].

Выявление наиболее частых мутаций в генах, вовлеченных в потерю слуха, является актуальной задачей как для оценки генетического риска и медико-генетического консультированияотягощенных семей, так и для разработки наиболее эффективных методов молекулярной диагностики этой патологии.

1.5 Изучение наследуемых форм потери слуха в популяциях Сибири

В генетической структуре современных популяций коренных народов Сибири отражено совокупное влияние суровых климатических условий проживания, отбора, изоляции, дрейфа генов, ассимиляции, особенностей брачной структуры и репродукции, что, безусловно, проявилось и в специфике разнообразия генов, контролирующих орфанные заболевания, в том числе и генетические формы потери слуха. Многие популяции коренного населения Сибири и в настоящее время

являются эндогамными изолятами с традиционно большим размером семьи, относительно низкой миграционной активностью и незначительным потоком генов извне. При применении современных методов геномного анализа в таких популяциях возможно обнаружение новых генов, ответственных за потерю слуха.

В Сибири, работы по оценке доли генетической компоненты в этиологии различных форм потери слуха и их распространенности выполняются только научными группами из Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) и Якутского научного центра комплексных медицинских проблем (г. Якутск). Регионами исследований являются Республики Тыва, Алтай, Саха/Якутия. За годы исследований были созданы информационные базы данных и уникальные коллекции образцов ДНК индивидуумов с потерей слуха, членов их семей, а также представителей коренного населения этих регионов (репрезентативные популяционные выборки), что является основой для углубленного изучения молекулярных механизмов генетического контроля наследуемой потери слуха. Детальная общая и клиническая информация о больных с потерей слуха, занесенная в базы данных, в большинстве случаев сопровождается расширенными родословными, что позволяет анализировать тип наследования патологии слуха.

Важнейшими результатами исследований являются эпидемиологические данные о распространенности различных типов и степеней потери слуха у населения изучаемых регионов и оценки доли генетической компоненты в этиологии наследственной глухоты, определяемой мутациями гена *GJB2*, наиболее значимого в этиологии наследуемой глухоты. Секвенирование всей кодирующей области и района сайта сплайсинга гена *GJB2* позволило детально охарактеризовать его мутационный спектр, выявить мажорные мутации и специфические полиморфные варианты, оценить частоту гетерозиготного носительства рецессивных *GJB2*-мутаций у населения изучаемых регионов.

Доля случаев потери слуха, обусловленных мутациями гена *GJB2*, в обследованных группах больных, представляющих тюркоязычное население Сибири, составляет: у алтайцев – 15.1%, у казахов, проживающих в Республике Алтай – 23.1%, у тувинцев – 22.3%, у якутов достигает 53.0%, что является максимально высоким значением среди всех ранее обследованных популяций Азии; у русских пациентов из Южной Сибири (Алтай и Тува) – 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): у коренного тюркоязычного населения Южной Сибири (алтайцы и тувинцы) преобладают три рецессивные мутации гена *GJB2*: с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC (p.Leu79Cysfs*3); у якутов (Северо-Восточная Сибирь) – мутация с.-23+1G>A; у казахов, проживающих в Республике Алтай, и у русского населения этих регионов (Алтай, Тува, Якутия) – мутация с.35delG. В контрольных (нормально слышащие, не связанные родством индивидуумы) выборках населения Сибири (алтайцы, тувинцы, якуты и русские), были оценены частоты гетерозиготного носительства мажорных мутаций гена *GJB2*, и их суммарная частота составила: у алтайцев - 5.5% (с.235delC – 3.7%, с.-23+1G>A – 0.9%, с.516G>C – 0.5%, с.101T>C – 0.5%); у тувинцев – 9.5% (с.516G>C – 3.8%, с.-23+1G>A – 3.8%, с.109G>A – 1.9%); у якутов – 14.9% (с.-23+1G>A – 11.2%, с.109G>A – 2.8%, 101T>C - 0.9%); у русских из Якутии – 2.5% (обнаружена только мутация с.35delG), а у русских из Новосибирской области – 4.1% (с.35delG) [Бады-Хоо и др., 2014а,б; Пшенникова и др., 2015; Бады-Хоо, 2016; Зыцарь, 2020; Barashkov et al., 2011, 2016; Posukh et al., 2005, 2019; Zytsar et al., 2018; 2020 и др.]. Сравнительный анализ аллельного разнообразия гена *GJB2* в выборках представителей коренного населения Тувы и Алтая и в этнических популяциях Евразии («1000 Genomes Project») показал значительную роль вариаций последовательности этого гена в дифференциации популяций Евразии [Зыцарь, 2020].

Важным направлением исследований явилось изучение факторов, приведших к формированию специфики мутационного спектра гена *GJB2* у коренного населения Сибири. Было установлено, что ведущим фактором в высокой распространенности мажорных мутаций этого гена явился эффект основателя. В работах [Барашков и др., 2012; Соловьев и др., 2017; Barashkov et al., 2011] было показано, что территория Якутии является самым крупным мировым кластером накопления мутации с.-23+1G>A, широкая распространенность которой у якутов, коренного населения Якутии, определяется эффектом основателя. В работах [Зыцарь, 2020; Posukh et al., 2019] получены убедительные свидетельства общности происхождения мажорных мутаций с.516G>C, с.-23+1G>A, с.235delC у тувинцев и

алтайцев, оценено ориентировочное время их возникновения на территории Южной Сибири. В исследованиях [Зыцарь, 2020; Zytsar et al., 2018] впервые было показано сходство наиболее частых гаплотипов, несущих характерную для европейских популяций *GJB2*-мутацию с.35delG, реконструированных у глухих пациентов в Сибири (русские), в Волго-Уральском регионе России [Джемилева и др., 2011] и Беларуси, что свидетельствует в пользу общего происхождения с.35delG в этих регионах. Полученные результаты свидетельствуют о существенной дифференциации мутационного спектра и патогенетического вклада гена *GJB2* в зависимости от этнической принадлежности пациентов из различных регионов Сибири и основным фактором, определяющим распространенность мажорных *GJB2*-мутаций в регионах Сибири, является эффект основателя.

Таким образом, детальный анализ наиболее значимого гена *GJB2* позволил выявить долю больных с потерей слуха, определяемую присутствием мутаций этого гена, варьирующую в различных этнических группах населения Сибири. Однако для существенного числа пациентов с потерей слуха, включая семейные случаи, генетическая причина патологии оставалась невыясненной, что напрямую свидетельствует о существовании других генов, мутации которых ответственны за потерю слуха в таких семьях. В связи с этим, были проведены исследования (преимущественно в Якутии), направленные на выяснение генетических причин, вызывающих потерю слуха у индивидуумов из отдельных семей, у которых анализ гена *GJB2* не выявил патогенетических вариантов этого гена (*GJB2*-негативные пациенты).

Следует отметить, что ДНК-диагностику, обусловленную присутствием биаллельных рецессивных мутаций в гене *GJB2* (Cx26), осложняют случаи, когда у глухих пациентов обнаруживаются только моноаллельные (гетерозиготные) рецессивные мутации в этом гене. Такие пациенты могут быть как «случайными» гетерозиготными носителями *GJB2*-мутаций, так и иметь мутантный аллель в *cis*-регуляторной области гена *GJB2* или в генах других коннексинов *GJB6* (Cx30) или *GJB3* (Cx31). Изучение такой группы пациентов в Туве и Якутии показало, что у тувинских пациентов отсутствуют какие-либо мутационные изменения в гене *GJB3* (Cx31), вероятно не имеющие клинического значения, и две несинонимичные замены с.301G>A (p.Glu101Lys) (*GJB6*) и с.580G>A (p.Ala194Thr) (*GJB3*),

патогенетическая значимость которых нуждается в дополнительных экспериментальных доказательствах, и у одного пациента была выявлена делеция c.del(GJB6-D13S1830) в сочетании с рецессивной мутацией c.35delG (*GJB2*) [Пшенникова и др., 2017]. В целом, полученные данные свидетельствуют о низком вкладе мутаций генов *GJB6* (Cx30) и *GJB3* (Cx31) в этиологию потери слуха в популяциях Сибири.

В одной якутской семье с предположительно X-сцепленной глухотой, у индивидуумов мужского пола была обнаружена новая гемизиготная транзигция c.975G>A (p.Trp325*) в гене *POU3F4* (Xq21.1, MIM 300039), мутации в котором приводят к X-сцепленной глухоте 2-ого типа (DFNX2, MIM 304400). Данные комплексного клинического обследования, проведенного у членов этой семьи, дополняют имеющуюся клиническую информацию как для мужчин с DFNX2, так и для женских носителей патогенетических вариантов в гене *POU3F4* [Барашков и др., 2015; Barashkov et al., 2018].

Синдром Ваарденбурга – редкое генетическое заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, характеризующееся различной степенью потери слуха, сопровождающейся нарушениями пигментации кожи, волос и радужной оболочки. В настоящее время описаны четыре типа этого синдрома, отличающиеся фенотипическими характеристиками. У пациента из якутской семьи с синдромом Ваарденбурга, проживающей в Республике Саха, было выполнено секвенирование по Сэнгеру кодирующих областей генов *PAX3*, *MITF*, *SOX10* и *SNAI2*, известных как кандидатные гены для этого заболевания. В кодирующих областях генов *PAX3*, *SOX10* и *SNAI2* не было обнаружено изменений, в то время как в экзоне 8 гена *MITF* (3p13, MIM 156845) у пациента была обнаружена уже известная гетерозиготная замена c.772C>T (p.Arg259*). Результаты молекулярно-генетического анализа в совокупности с клиническими характеристиками (врожденная односторонняя потеря слуха, односторонняя гетерохромия радужных оболочек, отсутствие депигментации кожи / волос и dystopia canthorum (боковое смещение внутренних углов глаз)) позволили определить редкий вариант синдрома Ваарденбурга 2-го типа (WS2A, MIM 193510) у этого пациента [Терютин и др., 2018; Barashkov et al., 2019].

В результате поиска молекулярно-генетических основ потери слуха у *GJB2*-негативных пациентов в Якутии, у которых причина заболевания осталась

неустановленной, была выявлена семья с 5 пораженными индивидами с ювенильной потерей слуха (дебют заболевания варьировал от 0 до 8 лет) неизвестной этиологии. В результате полноэкзомного анализа (WES), проведенного у одного из пораженных членов семьи, была выявлена ранее не описанная гомозиготная замена с.1121G>A в 6-ом экзоне гена *CLIC5* (6p21.1, MIM 607293), приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона (p.Trp374*), терминирующего синтез полипептидной цепи белка CLIC5 (NP_001107558.1). В гене *CLIC5* ранее была известна только одна гомозиготная замена с.96T>A (p.Cys32*), найденная в инбредной турецкой семье с постлингвальной прогрессирующей аутосомно-рецессивной глухотой (DFNB103, MIM 616042). В Якутии гомозиготный вариант с.1121G>A (p.Trp374*) был выявлен у 26 из 238 *GJB2*-негативных пациентов (10.9%). Распространенность DFNB103, обусловленной гомозиготным вариантом с.1121G>A (p.Trp374*) гена *CLIC5*, в Якутии составила в среднем 0.27 ± 0.05 на 10000 человек с максимальным накоплением в Эвено-Бытантайском национальном районе (31.39 ± 10.46 на 10000 человек), который относится к арктической группе улусов, где большинство населения составляют эвены (53%) [Пшенникова и др., 2018; 2019].

Мутации в гене *SLC26A4* являются важной генетической причиной потери слуха в азиатских странах. Исследования патогенетического вклада гена *SLC26A4* в этиологию потери слуха в популяциях Сибири до настоящего времени не проводилось, таким образом, детальное изучение мутационного спектра гена *SLC26A4* у коренного населения Южной Сибири является актуальной задачей.

* * *

Проблема «много генов – один фенотип» определяет актуальность дальнейшего изучения молекулярно-генетического контроля нейросенсорной тугоухости. Получение общей оценки генетической компоненты в этиологии тугоухости / глухоты у населения и выявление региональных особенностей распространенности различных форм «генетической глухоты» являются актуальными для решения фундаментальных задач медицинской генетики и разработки оптимальных методов молекулярной диагностики этой патологии в региональном масштабе. Таким образом, в настоящее время мировые исследования в области изучения наследственной потери слуха сфокусированы на нескольких основных направлениях: 1. оценка патогенетического вклада уже известных «генов

глухоты» и анализ распространенности мутаций этих генов в различных популяциях мира; 2. поиск новых локусов (генов), ассоциированных с потерей слуха, с привлечением методов секвенирования нового поколения; 3. биоинформатические и функциональные исследования патогенетической значимости мутационных изменений генов, вовлеченных в развитие заболевания; 4. разработка эффективных методов молекулярной диагностики различных форм наследуемой потери слуха.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика анализируемых выборок

2.1.1. Общая выборка больных с потерей слуха

В результате многолетних исследований наследуемой потери слуха в Республиках Алтай и Тыва, выполняемых нашей группой (Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск), сформированы масштабные выборки больных с потерей слуха, их родственников и контрольные выборки, стратифицированные по этническому признаку.

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 врожденной (или возникшей в раннем детском возрасте) нейросенсорной тугоухостью III-IV степени и/или глухотой. Для каждого больного имеется сурдологический диагноз, поставленный на основании отологического осмотра и пороговой тональной аудиометрии, и специальная информационная карта, содержащая сведения о поле, возрасте, этнической принадлежности (преимущественно до третьего поколения), месте рождения и проживания, а также составлена родословная, позволяющая уточнить родственные связи пробандов. Кроме того, у 27 больных, у которых были обнаружены мутации гена *SLC26A4*, для выявления аномалий строения структур внутреннего уха была проведена компьютерная томография (КТ) височных костей (Рентген-диагностическое отделение ГБУЗ РТ «Республиканская больница №1», г. Кызыл, Республика Тыва).

2.1.2 Выборка больных с потерей слуха невыясненной этиологии

Ранее, в общей выборке больных из Республик Тыва и Алтай был оценен патогенетический вклад мутаций гена *GJB2* в этиологию потери слуха, который составил у тувинцев 22.3% и у алтайцев - 15.1% [Posukh et al., 2005; Бады-Хоо и др.,

2014б; Posukh et al., 2019]. Причины потери слуха у других больных остались невыясненными.

Для поиска генетических факторов, определяющих потерю слуха, была сформирована выборка больных из Республик Тыва и Алтай с нарушениями слуха невыясненной этиологии, у которых не было выявлено мутаций в гене *GJB2* (*GJB2*-негативные пациенты). В эту выборку было включено 250 больных (171 – тувинцы, 79 – алтайцы).

У всех участников исследования после письменного информированного согласия на обследование (у детей - после письменного информированного согласия родителей или опекунов) был осуществлен забор венозной крови из локтевой вены для выделения образцов ДНК. Исследование одобрено комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

2.1.3. Контрольные выборки

Контрольные выборки включали в себя несвязанных родством индивидуумов из Республики Тыва (157 тувинцев) и Республики Алтай (141 алтаец), не состоящих на учёте у сурдолога и без признаков снижения слуха.

2.1.4 Выборки, используемые для анализа гаплотипов с мутацией с.919-2A>G гена *SLC26A4*

Генотипирование генетических маркеров для анализа гаплотипов было проведено на выборке из 23 несвязанных родством тувинских больных с потерей слуха, гомозиготных по мутации с.919-2A>G гена *SLC26A4*. а также в 63 образцах ДНК из контрольной выборки тувинцев, не имеющих мутации с.919-2A>G.

2.2 Экспериментальные методы

2.2.1 Экстракция геномной ДНК

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

2.2.2 Амплификация фрагментов генов *SLC26A4*, *RAI1* и *OTOF*

Амплификацию фрагментов генов *SLC26A4*, *RAI1* и *OTOF* проводили с помощью ПЦР на амплификаторах «Mastercycler gradient» («Eppendorf», Германия), Veriti® Thermal Cycler («Life Technologies / Applied Biosystems», Германия), T100

Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Для амплификации фрагментов были использованы полимеразы: TAQ полимераза («Биосан», Новосибирск, Россия), Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase («Thermo Fisher Scientific», США) и Q5 High-Fidelity DNA Polymerase («New England Biolabs», Англия).

2.2.3 Секвенирование по Сэнгеру

Перед секвенирующей реакцией осуществляли очистку ПЦР-продуктов на магнитных частицах Agencourt® AMPure® XP («Bekman Coulter», США) или CleanMag DNA («Евроген», Россия) согласно протоколам производителей. Нуклеотидную последовательность амплифицированных фрагментов анализируемых генов определяли секвенированием по Сэнгеру при помощи набора BigDye Terminator v3.1 («Applied Biosystems / Life Technologies», США). Реакционная смесь: ДНК-матрица (50-150 ng), 1 µl 10 mM праймера, 1 µl BigDye Terminator v3.1, 4 µl 5X буфера для секвенирования и вода до общего объема в 40 µl. Температурный профиль: денатурация при 95°C - 2 min; затем 40 циклов: плавление при 95°C – 25 sec, отжиг праймеров при 50°C – 20 sec и элонгация при 60°C – 4 min.

Продукты реакции Сэнгера очищали от солей гельфильтрацией с использованием Sephadex G-50 Fine DNA Grade («GE Healthcare», США). Фильтрат с продуктами реакции Сэнгера высушивали на вакуумном концентраторе «Concentrator plus» («Eppendorf», Германия) и анализировали на автоматическом капиллярном секвенаторе 3130XL («Applied Biosystems», США) в ЦКП СО РАН «Геномика» (Новосибирск, Россия).

Нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программ SnapGene 3.2.1, Chromas 2.5.1, сопоставляя с соответствующими референсными последовательностями из GenBank (*SLC26A4*: NC_000007.13, NC_000007.14; *RAII*: NC_000017.10, NC_000017.11; *OTOF*: NC_000002.11, NC_000002.12).

2.2.4 Полноэкзомное секвенирование

Геномную ДНК для полноэкзомного секвенирования выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. Образцы геномной ДНК секвенировали на Illumina HiSeq 2000 с использованием набора Agilent SureSelect Human All Exon V4 51Mb enrichment kit («Agilent Technologies», США). Считанные последовательности, полученные из библиотек (риды), были отфильтрованы для

проверки качества, выровнены и сопоставлены с референсным геномом человека hg19 с помощью программы gsNAP [Wu, Nacu, 2010]. Анализ вариантов (the variant calling process) как для инделей (вставки/делеции), так и для однонуклеотидных вариантов, был выполнен с использованием the Genome Analysis Toolkit (GATK, <http://www.broadinstitute.org/gatk>). Для функциональной аннотации вариантов использовались программы ANNOVAR [Wang et al., 2010b] и PolyPhen-2 (версия 2.2.2) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) [Adzhubei et al., 2010]. Исходя из предположения, что потеря слуха в анализируемых семьях наследуется по рецессивному типу, анализ экспериментальных данных был сфокусирован на поиске гомозиготных или компаунд-гетерозиготных вариантов, общих для больных потомков в каждой из семей. Дополнительным критерием для фильтрации вариантов была частота аллелей $< 5\%$. Все общие варианты, предсказанные PolyPhen-2 как «возможно повреждающие» или «вероятно повреждающие», были затем проанализированы на зиготность в контексте списка генов-кандидатов для несиндромальной потери слуха с известными паттернами аутосомно-рецессивного наследования (Hereditary Hearing Loss Homepage: <http://hereditaryhearingloss.org>). Чтобы расширить список генов-кандидатов, был также проведен поиск в OMIM (<http://www.omim.org/>) с использованием терминов «hearing loss» и «deafness» («потеря слуха», «глухота»). Редкость вариантов была оценена на основе частоты альтернативных аллелей согласно dbSNP138 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/>), Exome Sequencing Project (ESP, 6500 exomes, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) и Exome Aggregation Consortium (ExAC, Cambridge, MA, <http://exac.broadinstitute.org>).

2.2.5 Выявление мутаций в гене *SLC26A4*

2.2.5.1 Стратегия поиска мутаций в гене *SLC26A4* в выборке больных с потерей слуха невыясненной этиологии

Для поиска мутаций во всех экзонах (21 экзон) гена *SLC26A4* была сформирована первичная выборка, состоящая из несвязанных родством *GJB2*-негативных больных из семей с очевидно наследственной потерей слуха (два и более глухих членов семьи) и с указанием в анамнезе на зоб ($n=23$), предварительный анализ которой с наибольшей вероятностью позволит выявить спектр

специфических *SLC26A4*-мутаций для последующего целенаправленного анализа соответствующих фрагментов последовательности гена *SLC26A4* в общей выборке *GJB2*-негативных больных.

2.2.5.2 Подбор праймеров и условий ПЦР для поиска мутаций в гене *SLC26A4*

Амплификация фрагментов гена *SLC26A4* проводилась с использованием специфических праймеров, подобранных с помощью программы Primer Premier 5. Праймеры *SLC26A4_Ex6R*, *PDS_Ex7-8_F*, *PDS_Ex7-8_R*, *SLC26A4_EX18F* были взяты из статьи [Everett et al., 1997], праймеры *SLC26A4_Ex21F*, *SLC26A4_Ex21R* - из статьи [Prasad et al., 2004]. Все олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Биоссет» (Новосибирск, Россия). Используемые в работе праймеры представлены в **таблице 1**.

ПЦР фрагментов, включающих экзоны 4 и 17, проводили в 40 μ l реакционной смеси: 1X Buffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM каждого праймера, 2.0 mM $MgCl_2$, 30 u/ml TAQ полимеразы («Биосан», Новосибирск, Россия), 2-20 ng ДНК-матрицы. Температурный профиль: начальная денатурация – 1 min (98°C); 38 циклов: денатурация – 10 sec (98°C), отжиг праймеров – 15 sec (при T°C, приведенной в **таблице 1**), элонгация – 72°C (время указано в **таблице 1**); финальная элонгация – 10 sec (72°C).

ПЦР других фрагментов (кроме экзонов 4 и 17) гена *SLC26A4*, проводили в 40 μ l реакционной смеси: 1X Q5 Reaction Buffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM каждого праймера, 10 u/ml Q5 High-Fidelity DNA полимеразы («New England Biolabs», Англия), 2-20 ng ДНК-матрицы. Температурный профиль: начальная денатурация – 1 min (98°C); 38 циклов: денатурация – 10 sec (98°C), отжиг праймеров – 15 sec (при T°C, приведенной в **таблице 1**), элонгация – 72°C (время указано в **таблице 1**); финальная элонгация – 10 sec (72°C).

ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле (буфер 1xTAE, 6 V/cm) и детектировали с помощью системы гель-документации Molecular Imager Gel Doc XR System («BioRad», США) в УФ-свете.

Таблица 1. Панель праймеров, температура отжига и время элонгации для всех амплифицируемых фрагментов гена *SLC26A4*.

Экзон	Название и структура праймеров	Длина фрагмента, п.н.	Температура отжига праймеров, °C	Время элонгации, sec
Праймеры для секвенирования				
Экзон 1	PDS_Ex1-3_F: ACTCATTCACTTCTCAGGAAAACG	1208	66	60
	sqPDS_Ex1R: CTCGTCCTGTTTTCCGAGCA			
Экзоны 2-3	sqPDS_Ex2F: TCGTCCTCGCTTACCGCGTGT	1932	66	60
	sqPDS_Ex3R: CCATCTGTCAACAGACCTATGGTAGCT			
Экзон 4	sqPDS_Ex4F: AGGCTATCCTACCTGAAATGTGCT	608	62	60
	sqPDS_Ex4R: GAAATCCCATTTCCTGACAACA			
Экзоны 5-6	sqPDS_Ex5F: CTATGCAGACACATTGAACATTTGT	1050	66	60
	SLC26A4_Ex6R: ATTGTTTCTGGAATGAACAGTGACC			
Экзоны 7-8	PDS_Ex7-8_F: CATGGTTTTTCATGTGGGAAGATTC	636	66	40
	PDS_Ex7-8_R: CAAATGGCTTGACGTTTATCTACACAC			
Экзоны 9-10	sqPDS_Ex9F: GAGCAGATATAGCATTTGATGAGATG	1343	63	90
	sqPDS_Ex10R: CTCGGTGCGAGCCTTCCT			
Экзоны 11-12	sqPDS_Ex11F: CGAAGTGTTATCAGAGTTGCTATTATAG	1119	66	90
	sqPDS_Ex12R: GCATTGTTTTGTATGTTGTTGTCC			
Экзон 13	sqPDS_Ex13F: CGGGTTTGGTGGTATGTACTTGT	696	66	90
	sqPDS_Ex13R: ACAGCAGTAGAGGACATGAGTAGGTAC			
Экзон 14	sqPDS_Ex14F: TCCAGGCCTTTTCTCACTTCTC	1286	66	90
	sqPDS_Ex14R: TCTTTGTTTCCCCTAGTCACCACT			
Экзоны15-16	sqPDS_Ex15F: AGTTGAGTGCTGCTACCCAGC	1408	66	90
	sqPDS_Ex16R: CCACTCCCCTTGCCTATAAG			
Экзон 17	sqPDS_Ex17F: GCAAAGTTCCACAATCATCCAGA	544	60	60
	sqPDS_Ex17R: TGTTGCAATACTGGACAACCCA			
Экзон 18	SLC26A4_EX18F: GCTGGATGTTGCCATCTCTTGAG	835	66	60
	sqPDS_Ex18R: CTAAGCTCCCGCACTAGACGA			
Экзон 19	sqPDS_Ex19F: TCGTCCACAAGGTTGACTACGAC	811	63	60
	sqPDS_Ex19R: GGCATTATAGCTAATGCCCACT			
Экзон 20	sqPDS_Ex20F: GAATAACCAACTTGGTCCATAGACA	1010	66	60
	sqPDS_Ex20R: AGAATCAGTCTAGGGTGGGGAGA			
Экзон 21	SLC26A4_Ex21F: CTGGGCAACAGTGAGTGAGA	296	60	30
	SLC26A4_Ex21R: GCATTGAGGAAGTTTTGTCTTG			
Праймеры для ПЦР-ПДРФ-анализа				
Экзон 3	170C>A-F: ACTTCAGGGTTATTATTTCCA	234	57	30
	170C>A R: AGCCATTCTTGA CTGGT			
Экзоны 7-8	919-2A-F: TGGAGTTTTTAACATCTTTTGT TTTTATTC	354	57	30
	919-2A-R: TGCCATGTTTTAAGAAGAAAATGAAGAA			
Экзон 19	Ex19_F: CGTGATCGTCCACAAG	754	62	30
	Ex19 R: GGGTACTACCAGGTAATTT			

2.2.5.3 Скрининг мутаций с.170C>A, с.919-2A>G, с.1545T>G и с.2168A>G гена *SLC26A4* методом ПЦР-ПДРФ

Скрининг мутаций с.170C>A (экзон 3), с.919-2A>G (интронный участок между экзонами 7 и 8), с.1545T>G (экзон 14) и с.2168A>G (экзон 19) в контрольных выборках проводили с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа, с использованием эндонуклеаз рестрикции *Tru9 I*, *Hpa II*, *Pce I* и *Rsr2 I* («СибЭнзим», Новосибирск, Россия), соответственно (таблица 2).

Таблица 2. ПДРФ-анализ мутаций с.170C>A, с.919-2A>G, с.1545T>G и с.2168A>G гена *SLC26A4*.

Мутация	Эндонуклеаза рестрикции	Сайт рестрикции	Условия реакции	Продукты гидролиза		
				Генотип	Число фрагментов	Размер фрагментов, п.н.
с.170C>A (экзон 3)	<i>Tru9 I</i>	T↑TAA AAT↓T	1 час, T= 65°C	с.[wt];[wt] (норма)	1	234
				с.[170C>A];[170C>A] (гомозигота)	2	151, 83
				с.[170C>A];[wt] (гетерозигота)	3	234, 151, 83
с.919-2A>G (экзоны 7-8)	<i>Hpa II</i>	C↑CGG GGC↓C	1 час, T= 37°C с деактивацией фермента (20 мин при T=80°C)	с.[wt];[wt] (норма)	1	354
				с.[919-2A>G];[919-2A>G] (гомозигота)	2	325, 29
				с.[919-2A>G];[wt] (гетерозигота)	3	354, 325, 29
с.1545T>G (14 экзон)	<i>Pce I</i>	AGG↑CCT TCC↓GGA	1 час, T= 50°C с деактивацией фермента (20 мин при T=80°C)	с.[wt];[wt] (норма)	1	1286
				с.[1545T>G];[wt] (гетерозигота)	3	1286, 893, 393
с.2168A>G (экзон 19)	<i>Rsr2 I</i>	CG↑GWCCG GCCWG↓GC	1 час, T= 37°C с деактивацией фермента (10 мин при T=65°C)	с.[wt];[wt] (норма)	1	754
				с.[2168A>G];[2168A>G] (гомозигота)	2	456, 298
				с.[2168A>G];[wt] (гетерозигота)	3	754, 456, 298

Амплификацию фрагментов проводили с помощью ПЦР с соответствующими праймерами (таблица 1). Праймер 919-2A-F модифицирован согласно [Dai et al.,

2008], что приводит к образованию сайта рестрикции C \uparrow CGG для эндонуклеазы рестрикции *Hpa II* (рисунок 3).

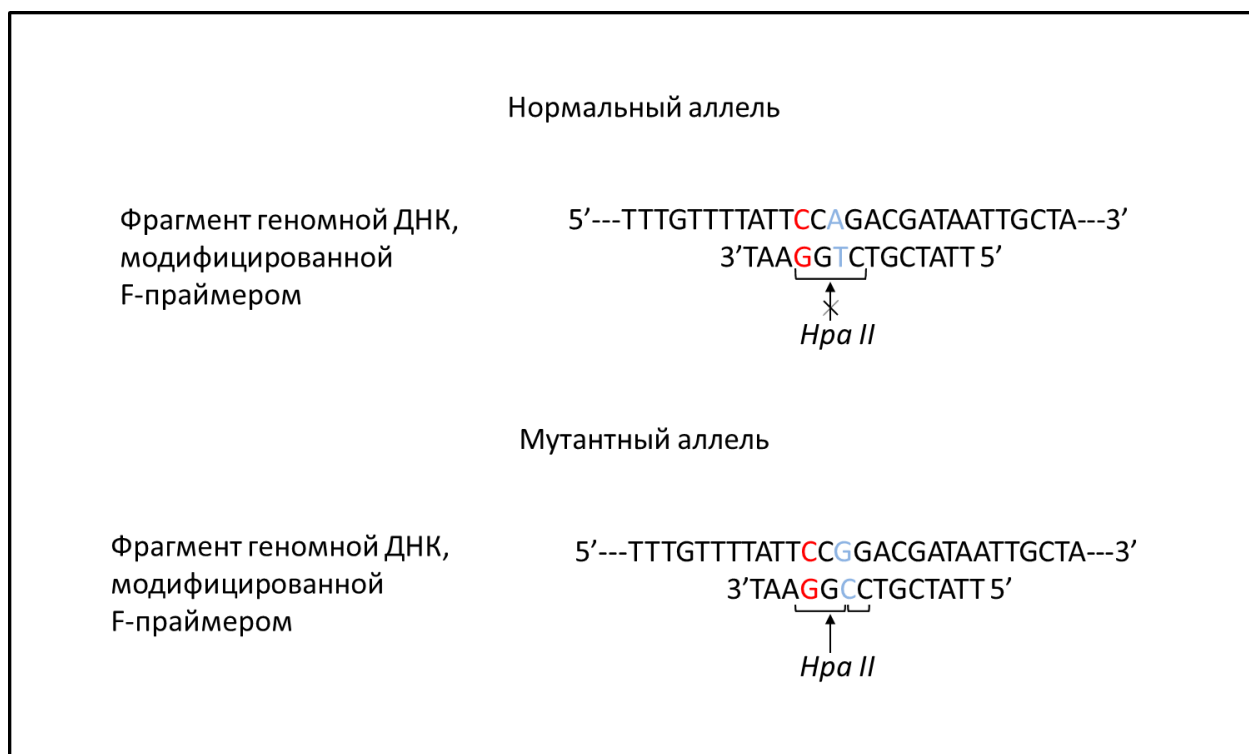


Рисунок 3. Схема ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза (PSDM, PCR-mediated site-directed mutagenesis) для выявления мутации с.919-2A>G в интронном участке между экзонами 7 и 8 гена *SLC26A4*. Модифицированные нуклеотиды выделены красным цветом, А (аденин) в нормальном аллеле и G (гуанин) в мутантном аллеле выделены синим цветом.

ПЦР фрагментов проводили в 40 µl реакционной смеси: 1X Buffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM каждого праймера, 2.0 mM MgCl₂ (экзон 3 и фрагмент, включающий экзоны 7 и 8) и 2.5 mM MgCl₂ (экзон 19), 30 u/ml TAQ полимеразы («Биосан», Новосибирск, Россия), 2-20 ng ДНК-матрицы. Температурный профиль: начальная денатурация – 1 min 30 sec (95°C); 38 циклов: денатурация – 10 sec (95°C), отжиг праймеров – 15 sec (57°C для экзонов 3 и 7-8) и 15 sec (62°C для экзона 19), элонгация – 30 sec (72°C), финальная элонгация – 10 min (72°C). Амплификацию фрагмента с мутацией с.1545T>G проводили при условиях, описанных в пункте 2.2.5.2. ПДРФ-анализ проводили на полученных ПЦР-фрагментах с использованием эндонуклеаз рестрикции *Tru9 I*, *Hpa II*, *Pce I* и *Rsr2 I* (таблица 2). Фрагменты разделяли электрофорезом в 2-4% агарозном геле (рисунок 4).

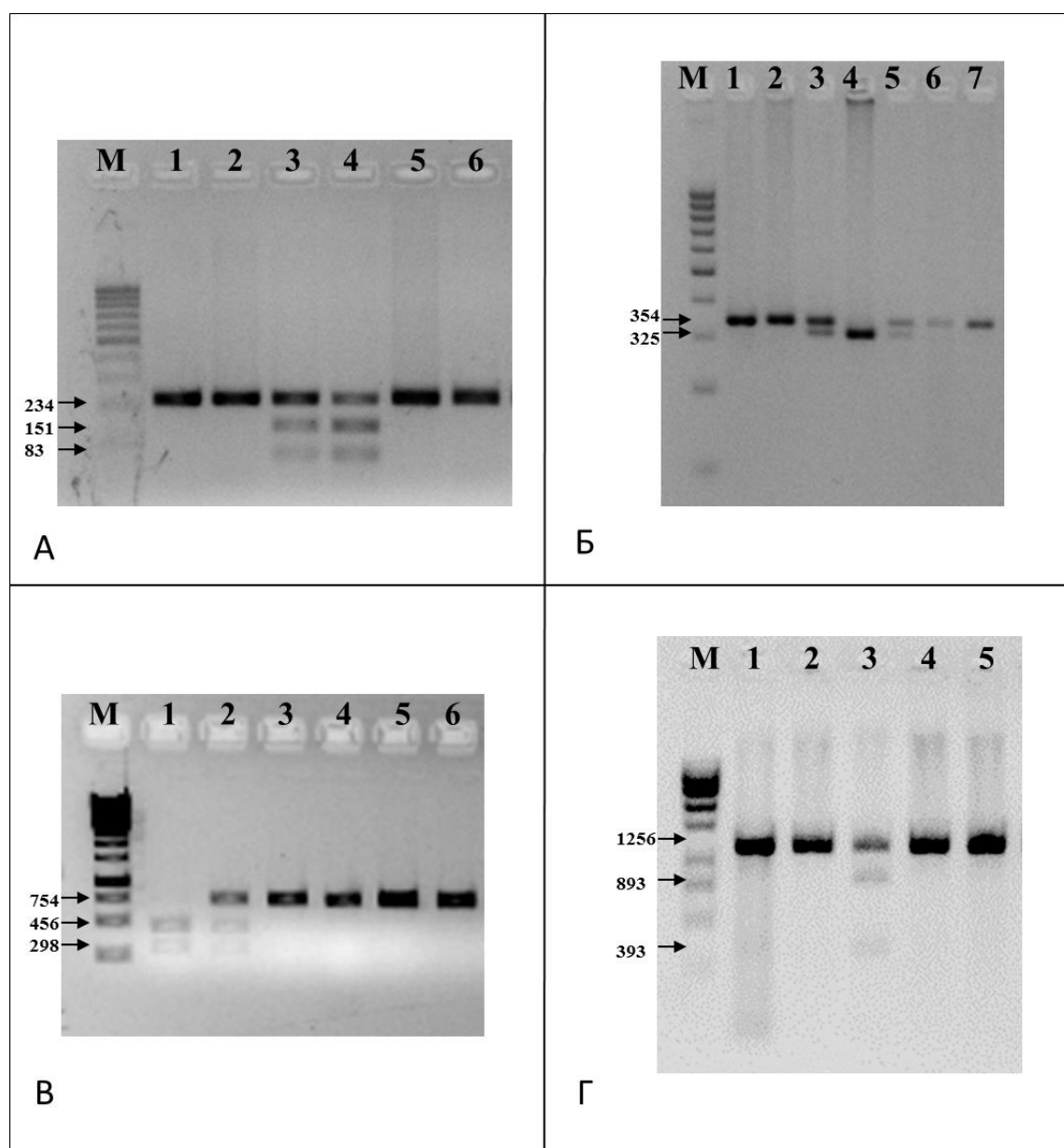


Рисунок 4. Детекция мутаций гена *SLC26A4*. (А) Детекция мутации с.170С>А. М – маркёр с фрагментами от 100 п.н. до 1000 п.н. (шаг 100 п.н.). Дорожка 1 – образец, не обработанный эндонуклеазой рестрикции *Tru9 I*, дорожки 2, 5, 6 – образцы без мутации с.170С>А (генотип с.[wt];[wt]), дорожки 3 и 4 – гетерозиготы по мутации с.170С>А (генотип с.[170С>А];[wt]). (Б) Детекция мутации с.919-2А>G. М – маркёр с фрагментами от 100 п.н. до 1000 п.н. (шаг 100 п.н.). Дорожка 1 – образец, не обработанный эндонуклеазой рестрикции *Hpa II*, дорожки 2, 6, 7 – образцы без мутации с.919-2А>G (с.[wt];[wt]), дорожки 3 и 5 – гетерозиготы по мутации с.919-2А>G (генотип с.[919-2А>G];[wt]), дорожка 3 – гомозигота по мутации с.919-2А>G (генотип с.[919-2А>G];[919-2А>G]). Фрагмент размером в 29 п.н. на электрофореграмме не виден. (В) Детекция мутации с.2168А>G. М – маркер с фрагментами от 250 и до 3000 (шаг 250 п.н.). Дорожка 1 – гомозигота по мутации с.2168А>G (генотип с.[2168А>G][2168А>G]), дорожка 2 – гетерозигота по мутации с.2168А>G (генотип с.[2168А>G];[wt]), дорожка 4 – образец, не обработанный эндонуклеазой рестрикции *Rsr2 I*, дорожки 3, 5, 6 – образцы без мутации с.2168А>G (генотип с.[wt];[wt]). (Г) Детекция мутации с.1545Т>G. М – маркёр с фрагментами от 250 и до 3000 (шаг 250 п.н.). Дорожка 1 – образец, не обработанный эндонуклеазой рестрикции *Pse I*, дорожки 2, 4, 5 – образцы без мутации с.1545Т>G (генотип с.[wt];[wt]), дорожка 3 – гетерозигота по мутации с.1545Т>G (генотип с.[1545Т>G];[wt]).

2.2.5.4 Биоинформатический анализ нового варианта с.1545T>G (p.Phe515Leu) в гене *SLC26A4*

Биоинформатический анализ потенциальной клинической значимости нового варианта с.1545T>G (p.Phe515Leu) в гене *SLC26A4*, проводился с использованием предсказательных программ: PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) [Adzhubei et al., 2010], PROVEAN (<http://provean.jcvi.org>) [Choi et al., 2012; 2015], MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>) [Schwarz et al., 2014], FATHMM (<http://fathmm.biocompute.org.uk/>) [Shihab et al., 2013], MutationAssessor (<http://mutationassessor.org/>) [Reva et al., 2007; 2010], Align-GVGD (<http://agvgd.hci.utah.edu/>) [Tavtigian et al., 2005; Mathe et al., 2006], MutPred2 (<http://mutpred.mutdb.org/>) [Li et al., 2009], Condel (<https://bbglab.irbbarcelona.org/fannsdbs/>) [González-Pérez et al., 2011], SNPs&GO (<https://snps-and-go.biocomp.uni-bo.it/snps-and-go/>) [Calabrese et al., 2009], SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) [Sim et al., 2012].

2.2.6 Выявление мутаций в гене *RAII*

Амплификацию фрагментов гена *RAII* проводили с использованием специфических праймеров («Биоссет», Новосибирск, Россия), подобранных с помощью программы Primer Premier 5 (таблица 3).

ПЦР фрагмента, для детекции мутации с.5254G>A в гене *RAII*, проводили в 40 µl реакционной смеси: 1X Buffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM каждого праймера, 1.2 mM MgCl₂, 30 u/ml TAQ полимеразы («Биосан», Новосибирск, Россия), 50 ng ДНК-матрицы. Температурный профиль: начальная денатурация – 1 min 30 sec (95°C); 40 циклов: денатурация – 10 sec (95°C), отжиг праймеров – 15 sec (при T°C, приведенной в таблице 3), элонгация - 72°C (время указано в таблице 3); финальная элонгация – 30 sec (72°C).

ПЦР всех фрагментов гена *RAII* (1-9) для последующего секвенирования по Сэнгеру полной последовательности гена проводили в 40 µl реакционной смеси: 1X Phusion® GC Buffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM каждого праймера, 1.2 mM MgCl₂, 14 u/ml Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase, 50 ng ДНК-матрицы. Для фрагментов 3, 6, 9 в реакционную смесь добавляли 5%-ный глицерин. Температурный профиль: начальная денатурация – 2 min (98°C); 40 циклов: денатурация – 15 sec (98°C), отжиг праймеров – 15 sec (при T°C, приведенной в

таблице 3), элонгация - 72°C (время указано в **таблице 3)**; финальная элонгация – 10 sec (72°C).

ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле (буфер 1xTAE, 6 V/cm) и детектировали с помощью системы гель-документации Molecular Imager Gel Doc XR System («BioRad», США) в УФ-свете.

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

Фрагмент	Название и структура праймеров	длина фрагмен та, п.н.	Температур а отжига праймеров, °C	Время элонгации, sec	Праймеры, используем ые для секвениров ания
Праймеры для для амплификации фрагментов гена <i>RAII</i>					
Детекция с.5254G>A	RAI-U: TCCTTGCCCCCTCTCCTCCAC	446	69	30	RAI-U
	RAI-L: GCCTCCTTGCTGCACTCATGTTT				
1	SHE_323F: TCTGAGGCAAAAAGGAAGTGG	1816	62	45	SHE_666R, SHE_506R, SHE_507R
	SHE_508R: CATGTCGTCAGGAGAGGTCA				
2	SHE_327F: TGTCAAGAACCTCGTGTCCA	1434	60	45	SHE_328R, SHE_329F
	SHE_330R: AACCAGCTCTGGACCTTTGA				
3	SHE_329F: TCTCGCTGGAGAACCACAG	1765	66	60	SHE_331F
	SHE_332R: ATGAAGGCCGACTTCCTTTT				
4	SHE_513F: GCTCCAAGACCAAGGAGACA	910	62	45	SHE_514R
	SHE_514R: GCCTCGGTTTTGAAACAGTCA				
5	SHE_515F: GGCCTCTCCTGGTAATCCTC	1010	64	45	SHE_515F
	SHE_516R: GCAGCAAACAAGGCAAGAGGT				
6	SHE_335F: AAACCGAGGCCTTCACATC	1490	66	60	SHE_336F, SHE_669R
	SHE_669R: GTGTGACCTGCCTTAGCCAGAT				
7	SHE_527F: CCAGCCTGTAAAGCTTGAGG	362	62	15	SHE_527F
	SHE_528R: GGAATGCCTCATTTCCATGT				
8	RA_46F: GGAGTGGAGTGGAGTGTGGAGG	310	64	15	RA_46F
	RA_45R: GGAAGTGTGAAGGAGGTGCGAGG				
9	SHE_345F: ACTGTGAAGTCCGAGGTCGT	313	60	15	SHE_664R
	SHE_664R: TGGGCAAGAACGCCCT				
Структура праймеров, используемых для секвенирования					
SHE_666R	TGCAGGCCTTGCTGTGT				
SHE_506R	TGGTAATGGAGGGTTTCCTG				
SHE_507R	GGTCCAGAATCTTCATGCCTA				
SHE_328R	GGGAAACAGTCAAAAGCTGC				
SHE_331F	CACTCATCTGCACCAAGGAG				
SHE_336R	CACACTCGGGACCTTTGAGT				

2.2.7 Выявление мутаций в гене *OTOF*

Детекцию мутации с.1111G>C в гене *OTOF* проводили с помощью амплификации с использованием специфических праймеров («Биоссет», Новосибирск, Россия), выбранных с помощью программы Primer Premier 5:

OTOF-U: 5'-CGGAAGAGTGGGGCTGCTTG-3'

OTOF-L: 5'-CTCTAGGGACCAAGACAGCATTT-3'.

ПЦР фрагмента для детекции мутации с.1111G>C в гене *OTOF* проводили в 40 µl реакционной смеси: 1X Buffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM каждого праймера, 2.0 mM MgCl₂, 15% глицерина, 30 u/ml TAQ полимеразы («Биосан», Новосибирск, Россия), 50 ng ДНК-матрицы. Температурный профиль: начальная денатурация – 1 min 30 sec (95°C); 40 циклов: денатурация – 10 sec (95°C), отжиг праймеров – 15 sec (60°C), элонгация – 72°C (30 sec); финальная элонгация – 30 sec (72°C).

Скрининг мутации с.1111G>C (ген *OTOF*) проводили при помощи ПЦР-ПДРФ-анализа с использованием эндонуклеазы рестрикции *Bst*HH I («СибЭнзим», Новосибирск, Россия) (таблица 4) и подтверждающим секвенированием по Сэнгеру с использованием праймера OTOF-L (рисунок 5B).

Анализ продуктов рестрикции фрагмента ПЦР проводили на приборе Microchip Electrophoresis system for DNA/RNA Analysis MCE-202/MultiNA («Shimadzu corporation», Япония). Был использован буфер Separation Buffer for MultiNA DNA-500, маркеры Marker solution for MultiNA DNA-500 (Low and Up Marker) и Ladder 25bp (рисунок 5A, Б).

Таблица 4. Рестрикционный анализ мутации с.1111G>C в гене *OTOF*

Мутация	Фермент рестрикции	Сайт рестрикции	Условия реакции	Продукты гидролиза		
				Генотип	Число фрагментов	Размер фрагментов, п.н.
с.1111G>C (<i>OTOF</i>)	<i>Bst</i> HH I	GCG↑C C↓GCG	1 час, T=50°C	с.[wt];[wt] (норма)	1	417
				с.[1111G>C]; [1111G>C] (гомозигота)	2	238, 179
				с.[1111G>C];[wt] (гетерозигота)	3	417, 238, 179

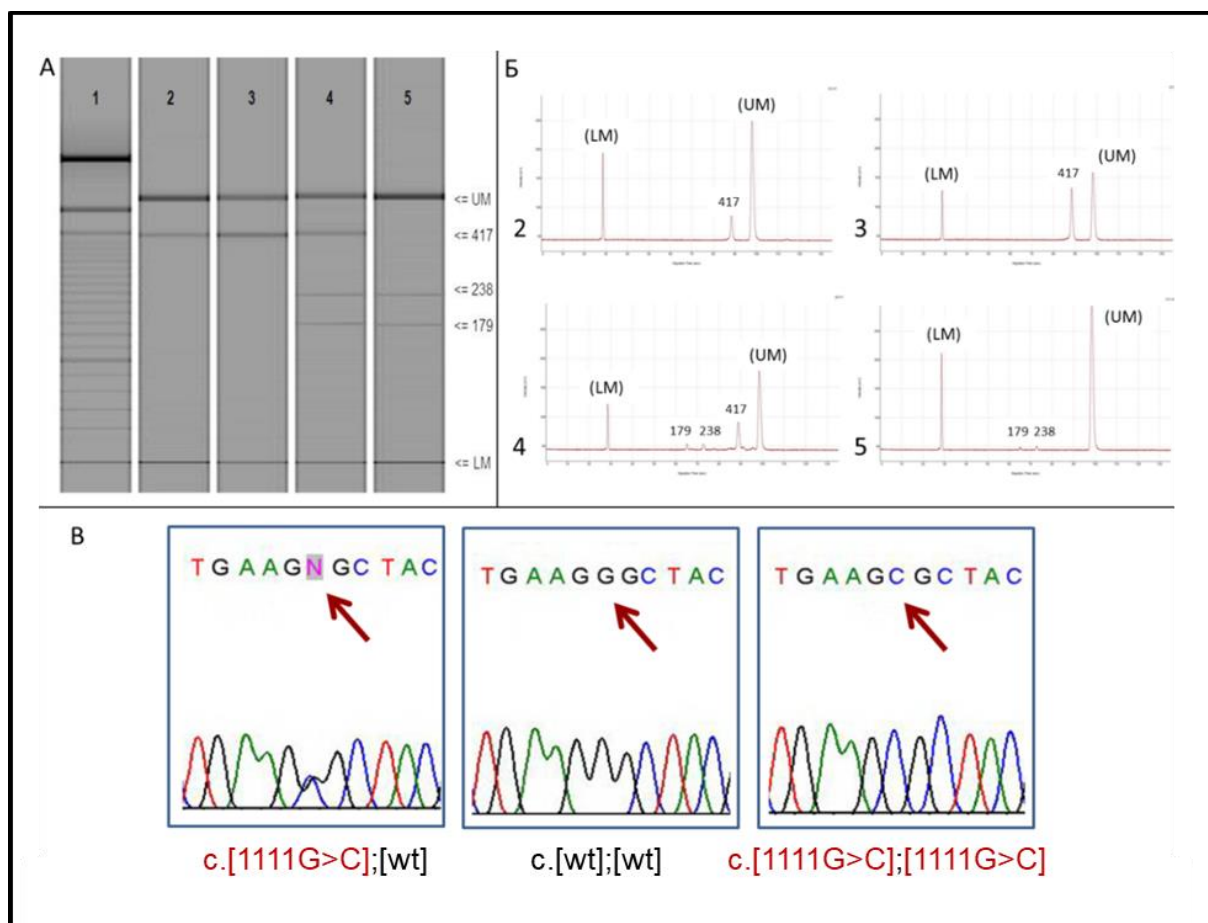


Рисунок 5. Скрининг мутации c.1111G>C в гене *OTOF*. (А), (Б) Электрофореграмма ДНК-фрагментов, полученных при детекции мутации c.1111G>C в гене *OTOF* на приборе Microchip Electrophoresis system for DNA/RNA Analysis MCE-202/MultiNA с помощью гидролиза эндонуклеазой рестрикции *BstH1*. Дорожка 1 – маркер (Ladder 25bp), 2 – образец без обработки *BstH1* – размер фрагмента 417 п.н., 3-5 – образцы после обработки *BstH1*: 3 – нормальный генотип c.[wt];[wt] – размер фрагмента 417 п.н., 4 – гетерозигота c.[1111G>C];[wt] – размеры фрагментов 179 п.н., 238 п.н., 417 п.н., 5 – гомозигота c.[1111G>C];[c.1111G>C] – размеры фрагментов 179 п.н., 238 п.н.; LM – low marker, UM – up marker. (В) Результаты секвенирования по Сэнгеру.

2.2.8 Скрининг мутации m.1555A>G (*MT-RNR1*) митохондриальной ДНК у тувинских и алтайских больных

Скрининг мутации m.1555A>G (*MT-RNR1*) проводили при помощи ПЦР-ПДРФ-анализа с использованием эндонуклеазы рестрикции *Hae III* («СибЭнзим», Новосибирск, Россия) (таблица 5). Для амплификации использовались праймеры («Биоссет», Новосибирск, Россия), которые были взяты из статьи [Estivill et al., 1998]:

12Ss-F: 5'-GCTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAA-3'

12Sa-R: 5'-TTCCAGTACACTTACCATGTTACGACTGG-3'

ПЦР фрагмента (длина 339 п.н) для детекции мутации m.1555A>G проводили в 40 µл реакционной смеси, которая содержала 1X Buffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM каждого праймера, 2.0 mM MgCl₂, 30 u/ml TAQ полимеразы («Биосан», Новосибирск, Россия), 50 ng ДНК-матрицы. ПЦР проводили при следующем термoproфиле: начальная денатурация – 1 min 30 sec (95°C); 38 циклов: денатурация – 10 sec (95°C), отжиг праймеров – 15 sec (60°C), элонгация – 72°C (40 sec); финальная элонгация – 2 min (72°C).

Таблица 5. Рестрикционный анализ мутации m.1555A>G в гене *MT-RNR1*

Мутация	Фермент рестрикции	Сайт рестрикции	Условия реакции	Продукты гидролиза		
				Генотип	Число фрагментов	Размер фрагментов, п.н.
m.1555A>G	<i>Hae III</i>	GG↑CC CC↓GG	1 час 30 минут, T=37°C с деактивацией фермента (20 мин при T=80°C)	норма	2	216, 123
				мутантный генотип	3	216, 93, 30

2.2.9 Генотипирование STR- и SNP-маркёров

Генотипирование STR-маркёров. Для гаплотипирования участка хромосомы 7, включающего ген *SLC26A4*, у тувинских больных, гомозиготных по мутации c.919-2A>G, и в контрольной выборке тувинцев было выбрано 5 STR-маркёров с CA-повторами, фланкирующих на разном физическом расстоянии ген *SLC26A4*: D7S496 (~ 0.17 kb), D7S2459 (~ 7.6 kb), D7S2456 (~ 0.36 kb), D7S799 (~ 1.29 Mb), D7S525 (~ 2.32 Mb) (таблица 6). Для амплификации фрагментов, включающих STR-маркёры, использовали стандартные пары праймеров геномного браузера Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Прямой праймер из каждой пары мечен флуоресцентным красителем (Applied Biosystems 5' Labeled Primers) («Thermo Fisher Scientific», США).

ПЦР фрагментов проводили в 20 µл реакционной смеси: 1X Buffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 mM каждого праймера, 30 u/ml TAQ полимеразы («Биосан», Новосибирск, Россия), 2-20 ng ДНК-матрицы, количество MgCl₂ варьировало для каждого фрагмента (таблица 6). Температурный профиль: начальная денатурация – 1 min (95°C); 35 циклов: денатурация – 10 sec (95°C), отжиг праймеров – 10 sec (при T°C,

приведенной в **таблице 6**), элонгация – 72°C (время указано в **таблице 6**); финальная элонгация – 10 sec (72°C).

Таблица 6. Панель праймеров, температура отжига и время элонгации для амплификации STR-маркеров.

STR	Структура праймеров	Флуоресцентный краситель	Ожидаемый размер продукта (п.н.)	Mg2+, mM	Температура отжига праймеров, °C
D7S496	F: 5'-AACAACAGTCAACCCACAAT-3' R: 5'-GCTATAACCTCATAANAAACCAAAA-3'	VIC	129-141	3,0	56
D7S2459	F: 5'-AAGAAGTGCATTGAGACTCC-3' R: 5'-CCGCCTTAGTAAAACCC-3'	PET	140-152	3,5	59
D7S2456	F: 5'-CTGGAAATTGACCTGAAACCTT-3' R: 5'-ACAGGGGTCTCTCACACATATTA-3'	VIC	238-252	2,0	56
D7S799	F: 5'-CTTTTAAATTGTGATGAGCC-3' R: 5'-GTGTCTGTAATGTAGTATTTCC-3'	NED	103-133	2,0	53
D7S525	F: 5'-GTAGCCGAGATTGCCC-3' R: 5'-CTTGCTGTTAAGTACCACAAGTTC-3'	NED	219-235	3,0	56

Генотипирование STR-маркёров проводилось с помощью фрагментного анализа на автоматическом капиллярном секвенаторе 3130XL («Applied Biosystems», США) в ЦКП СО РАН «Геномика» (г. Новосибирск). Полученные данные анализировали с помощью программы Peak Scanner Software v1.0 («Applied Biosystems», США) для установления аллелей STR-маркёров.

Генотипирование SNP-маркёров. В выборке тувинцев, гомозиготных по мутации с.919-2A>G, и в контрольной выборке было проанализировано 7 SNPs, фланкирующих на различном физическом расстоянии мутацию с.919-2A>G у тувинских больных, гомозиготных по мутации с.919-2A>G, и в контрольной выборке тувинцев: rs2248464,rs2248465,rs2395911,rs2072063,rs2072064,rs2072065,rs2301634. Анализ проводили при помощи секвенирования по Сэнгеру с использованием праймеров и условий ПЦР, описанных в 2.2.5.2.

2.3 Статистические методы

Для статистического анализа различий в числе мутантных аллелей между группами применяли односторонний точный метод Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Неравновесие по сцеплению между аллелями SNP- и STR-маркёров хромосомы 7 и мутацией с.919-2A>G рассчитывали, как:

$$\delta = (P_d - P_n) / (1 - P_n)$$

где δ – мера неравновесия по сцеплению, P_d – частота ассоциированного аллеля среди хромосом с мутацией c.919-2A>G в выборке больных, гомозиготных по этой мутации, P_n – частота этого же аллеля среди хромосом без мутации c.919-2A>G в контрольной выборке [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].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате многолетних исследований наследуемой потери слуха у коренного населения Республик Тыва и Алтай, выполняемых нашей группой (Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск), было установлено, что мутации гена *GJB2* являются причиной глухоты у 15.1% больных на Алтае (алтайцы) и у 22.3% больных в Тыве (тувинцы) [Posukh et al., 2005; 2019]. Тем не менее, у существенной части больных (n=250, из них тувинцы – 171 чел., алтайцы – 79 чел.), причина потери слуха остается невыясненной. Значительное число семейных «*GJB2*-негативных» (не выявлено мутаций в гене *GJB2*) случаев потери слуха напрямую свидетельствует об участии других генов, ответственных за развитие патологии слуховой функции у коренного населения Республик Тыва и Алтай. Таким образом, для выяснения причин потери слуха у больных с потерей слуха неясной этиологии, относящихся к коренному населению Республик Тыва и Алтай, был осуществлен, прежде всего, поиск мутаций в гене *SLC26A4*.

3.1 Мутации гена *SLC26A4* в этиологии потери слуха

3.1.1 Стратегия поиска мутаций в гене *SLC26A4*

Многие мировые исследования направлены на оценку вклада патогенетических вариантов гена *SLC26A4* в этиологию потери слуха и изучению корреляций «генотип-фенотип», опосредованных наличием различных мутаций гена *SLC26A4* у пациентов. Скрининг патогенетических вариантов гена *SLC26A4*, которые являются одной из частых причин наследственной потери слуха во многих регионах мира, является важной частью молекулярно-генетического тестирования у пациентов с тугоухостью/глухотой. Последовательный мутационный анализ гена *SLC26A4* у конкретного пациента, в связи с рецессивным типом наследования *SLC26A4*-связанной потери слуха, продолжают до обнаружения двух рецессивных патогенетических *SLC26A4*-вариантов и, следовательно, постановки диагноза.

Ген *SLC26A4*, расположенный на хромосоме 7 (7:107,660,828-107,717,809; GRCh38) - относительно большой ген (около 57 тыс. п.н.). Канонический транскрипт ENST00000644269.2 (ENSEMBL: <https://www.ensembl.org>), длиной 4737 п.н., в составе кДНК (2343 п.н.), включает 21 экзон, один из них (экзон 1) является

некодирующим. Общее количество вариаций, идентифицированных в последовательности гена *SLC26A4*, превышает 22 тыс. (dbSNP: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=SLC26A4>, февраль 2022г.). Среди них известно несколько сотен различных вариантов, ассоциированных с различными фенотипами нарушения слуха (the Deafness Variation Database: <https://deafnessvariationdatabase.org/gene/SLC26A4>, февраль 2022г.; ClinVar: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=SLC26A4>, февраль 2022г.; the Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>, февраль 2022г.). Специфика спектра и распространенности мутаций *SLC26A4* в регионах мира может быть обусловлена неоднородностью по размеру и фенотипическим характеристикам обследованных когорт пациентов в разных исследованиях, этнической принадлежностью пациентов, историей популяции, к которой они принадлежат, а также различной чувствительностью методов диагностики, применяемых в той или иной группе пациентов.

Из-за большого размера *SLC26A4* (20 кодирующих экзонов) существуют определенные трудности в его полномасштабном мутационном анализе. В настоящее время используются различные стратегии молекулярной диагностики, включая таргетный поиск отдельных, уже известных, патогенетических вариантов *SLC26A4*, различные многоступенчатые иерархические скрининги и/или методы NGS. Все эти диагностические подходы имеют определенные ограничения, которые связаны как с возможным «пропуском» других патогенетических вариантов *SLC26A4* при проведении таргетного скрининга, так и с большими финансовыми, временными и трудовыми затратами на NGS-анализ в больших выборках пациентов. В любом случае, секвенирование по Сэнгеру, как золотой стандарт для выявления мутаций, считается необходимым для подтверждения предполагаемых патогенетических *SLC26A4*-вариантов, которые так или иначе были выявлены у пациентов. Таким образом, первичное секвенирование по Сэнгеру всех кодирующих *SLC26A4* экзонов и прилегающих сайтов сплайсинга может быть успешным одношаговым методом для выявления всех вариаций последовательности этого гена, в том числе и новых, которые могут быть признаны патогенетическими после всесторонней оценки их влияния на структуру и функцию белка.

Биоинформатический анализ последовательности гена *SLC26A4* для оптимизации диагностического тестирования этого гена. Предварительный выбор участков гена *SLC26A4*, имеющих потенциально высокую диагностическую значимость, является актуальным для оптимизации тестирования патогенетических вариантов *SLC26A4*. Для решения этой задачи мы провели биоинформатический анализ вариаций последовательности *SLC26A4* на основе данных из the Deafness Variation Database (DVD: <https://deafnessvariationdatabase.org/gene/SLC26A4>) [Azaiez et al., 2018]. Эта специализированная база данных, объединяющая все доступные генетические, геномные и клинические данные обо всех известных (на февраль 2022г.) генетических вариантах в 224 генах, ассоциированных с глухотой (включая *SLC26A4*), является важным ресурсом с открытым доступом, широко используемым научными и клиническими сообществами во всем мире. Каждый вариант классифицируется как нейтральный (B, benign), вероятно нейтральный (LB, likely benign), вероятно патогенетический (LP, likely pathogenic), патогенетический (P, pathogenic) и вариант неизвестной значимости (VUS, variant of unknown significance). Для категоризации вариантов используется информация из ClinVar и/или опубликованные данные (PubMed); оценка функциональной значимости и консервативности миссенс-вариантов шестью вычислительными методами (PhyloP, SIFT, LRT, MutationTaster, PolyPhen HDIV, GERP); данные о MAF (minor allele frequency).

В настоящее время в DVD представлено 8647 различных (P, LP, VUS, LB, B) вариантов в последовательности гена *SLC26A4*, из которых 605 (7.0%) являются или патогенетическими (P) или вероятно патогенетическими (LP). Мы выбрали все PLP-варианты (P + LP) в пределах кодирующей и интронных областей гена *SLC26A4* (n=603, так как исключено два варианта в upstream / 5'-UTR районах) и проанализировали их распределение по последовательности *SLC26A4*.

В кодирующей области *SLC26A4* (20 экзонов) PLP-варианты составляют значительную часть всех вариаций (32.4%, n=512). Число PLP-вариантов в экзонах существенно варьирует, как и физический размер экзонов (**рисунок 6**).

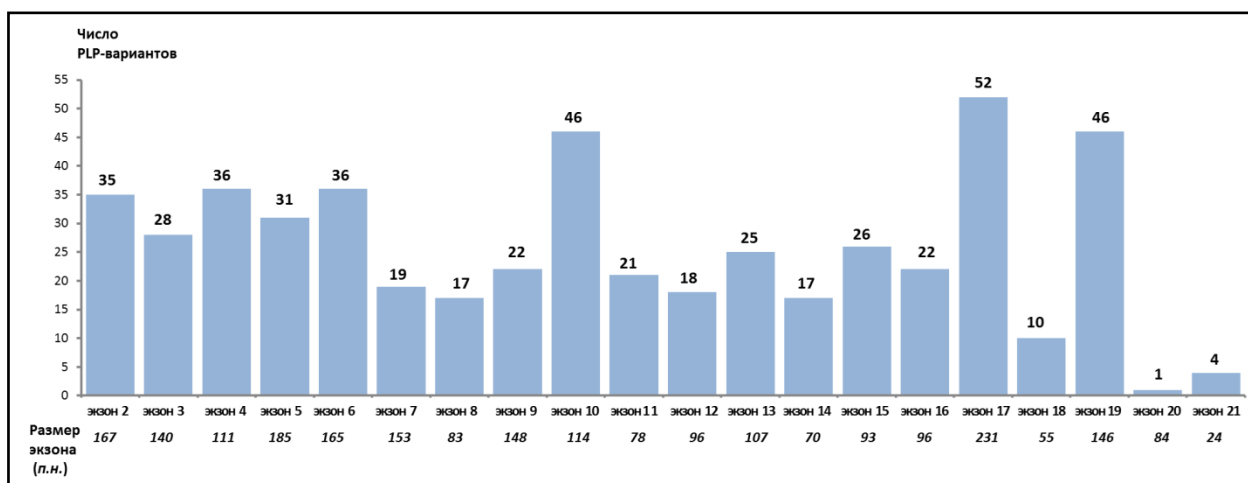


Рисунок 6. Распределение PLP-вариантов по кодирующим экзонам *SLC26A4*.

Чтобы идентифицировать экзоны с наибольшей «нагрузкой» PLP-вариантами, мы оценили так называемую «плотность» («variation rate»), то есть число PLP-вариантов в каждом экзоне, нормализованное на физическую длину экзона (п.н.) (рисунок 7). В 10 экзонах (4, 6, 10, 11, 13-17, 19) «variation rate» PLP-вариантов превышала пороговое значение (медиана = 21.39), рассчитанного для всей кодирующей области *SLC26A4* (рисунок 7). Эти так называемые «горячие» экзоны включали в себя 63.9% всех PLP-вариантов в кодирующей области *SLC26A4*.

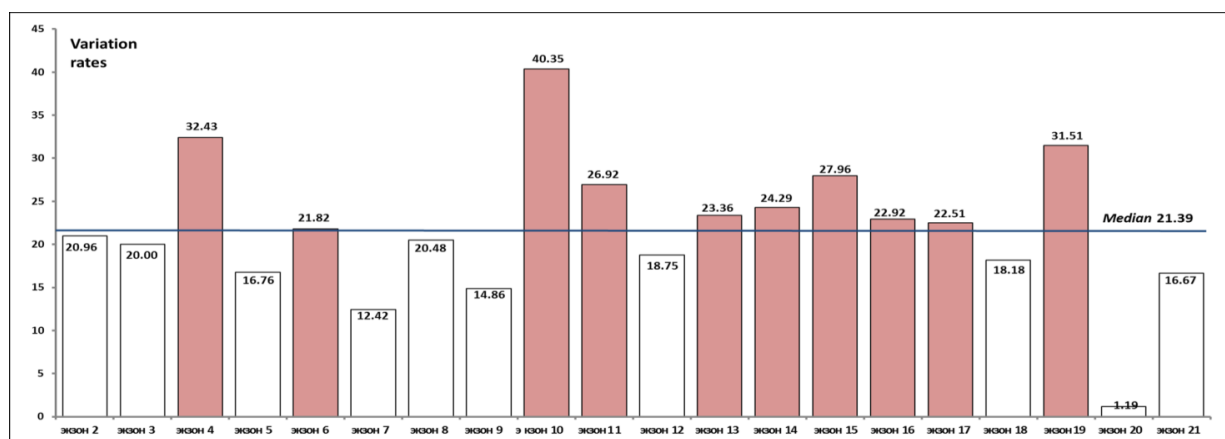


Рисунок 7. «Плотность» («variation rate») в кодирующих экзонах *SLC26A4*. «Горячие» экзоны (variation rate выше порогового значения (медиана = 21.39)), выделены цветом.

Следует отметить, что число уже известных PLP-вариантов в каждом экзоне, не всегда коррелирует с их «плотностью» в экзоне. Так, например, в экзоне 17 отмечено наибольшее количество PLP-вариантов (52 варианта), но «variation rate»

PLP-вариантов в этом экзоне = 22.51, в то время как в экзоне 10 большое число PLP-вариантов (46 вариантов) соответствует высокому значению «variation rate» (40.35).

Можно предположить, что эти так называемые «горячие» экзоны гена *SLC26A4* кодируют наиболее функционально-значимые домены белка pendrin. Однако, точная структура этого белка в настоящее время пока неизвестна, хотя уже было предложено несколько топологических моделей с различным числом (от 11 до 15) трансмембранных белковых сегментов [Dossena et al., 2009; Bassot et al., 2017; Rapp et al., 2017]. Пендрин принадлежит к SLC26-семейству белков-переносчиков анионов. Первоначально было предсказано, что SLC26-белки содержат ~ 12 трансмембранных (TM) сегментов с цитоплазматическими N- и C-концами, и C-концу предшествует STAS (Sulfate Transporter and AntiSigma factor antagonist)-домен [Aravind, Koonin, 2000; Sharma et al., 2011; Rapp et al., 2017]. Наличие вызывающих заболевание мутаций в STAS-доменах других SLC26-белков свидетельствует о структурной важности этой функциональной области пендрина [Aravind, Koonin, 2000; Sharma et al., 2011]. Точная роль STAS-домена не выяснена, но он может играть роль в связывании нуклеотидов и/или взаимодействиях с другими белками, включая другие транспортеры, с каркасом цитоскелета и с ферментами, метаболизирующими транспортируемые анионные субстраты [Dossena et al., 2009; Sharma et al., 2011; Benvenga, Guarneri, 2018]. STAS-домен пендрина состоит из 195 аминокислотных остатков (с 535 по 728 позиции аминокислот), кодируемых экзонами 14–19 (UniProt: <https://www.uniprot.org/uniprot/O43511>). Около трети всех PLP-вариантов расположены в этой области последовательности гена *SLC26A4*, что подчеркивает ее диагностическую ценность.

PLP-варианты в интронных областях *SLC26A4* (n=91, 1.4% от всех вариаций в интронах) затрагивают сайты сплайсинга. Хорошо известная мутация c.919-2A>G, распространенная в азиатских популяциях, находится в акцепторном сайте сплайсинга в интроне 7.

Мы объединили данные о распределении и «плотности» («variation rate») PLP-вариантов, расположенных в кодирующих и прилегающих интронных районах гена *SLC26A4*, и выявили десять областей этого гена с потенциально высокой диагностической значимостью, включающие экзоны 4, 6, 10, 11, 13-17, 19 с фланкирующими интронными участками с сайтами сплайсинга (**рисунок 8**).

Секвенирование этих областей последовательности *SLC26A4* имеет высокую диагностическую информативность, поскольку может обеспечить одноэтапное выявление 61.9% (373/603) всех известных в настоящее время PLP-вариантов в последовательности гена *SLC26A4*.

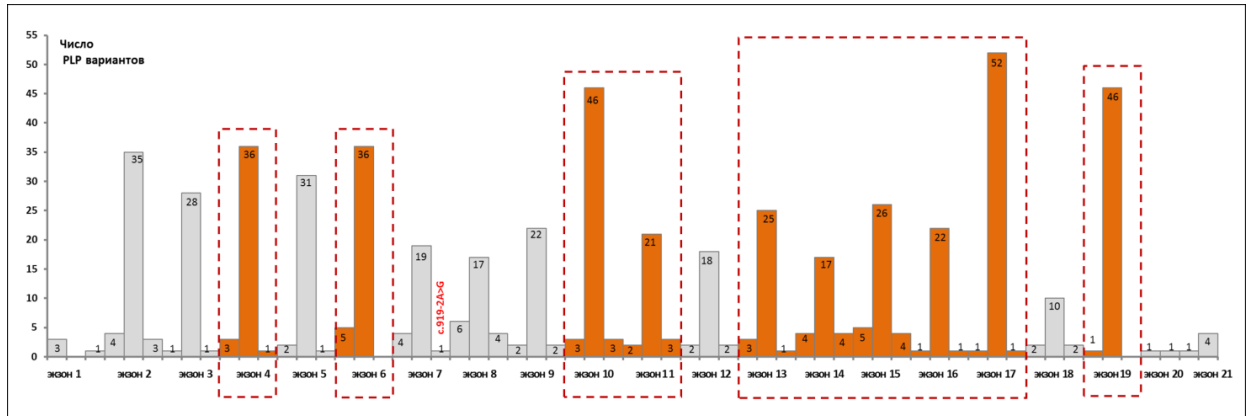


Рисунок 8. Области последовательности гена *SLC26A4* с наибольшей диагностической значимостью. «Горячие» экзоны с прилегающими интронными областями отмечены оранжевым цветом и выделены пунктиром. Мутация с.919-2А>G, широко распространенная в популяциях Восточной Азии, показана красным цветом.

Немаловажным критерием выбора участков гена *SLC26A4* для первоочередного анализа является этническую принадлежность обследуемых пациентов с потерей слуха. Так, для азиатских популяций (Китай, Япония, Корея, Монголия) наиболее частыми мутациями являются с.919-2А>G (сайт сплайсинга) и с.2168А>G (экзон 19) [Park et al., 2003; Wu et al., 2005; Wu et al., 2009; Yuan et al., 2012; Erdenechuluun et al., 2018 и др.]. На территории Ирана наиболее распространены мутации с.1226G>А (экзон 10) и с.1334Т>G (экзон 11) [Kahrizi et al., 2009; Koohiyan et al., 2019]. В европейских популяциях наблюдается определенный спектр *SLC26A4*-мутаций, встречающихся с достаточно высокой частотой. Так, например, мутация с.1001+G>А часто встречается у европеоидного населения в различных регионах Европы [Coyle et al., 1998; Albert et al., 2006; Pera et al., 2008; Rendtorff et al., 2013 и др.]; мутация с.412G>С (экзон 4) встречается у европеоидного населения в Германии с частотой 66.7%, в Чешской Республике - 18.0%, в Дании - 17.3% [Borck et al., 2003; Pourova et al., 2010; Rendtorff et al., 2013]; мутации с.626G>Т (экзон 6), с.707Т>С (экзон 6) и с.1246А>С (экзон 10) были обнаружены с достаточно высокой частотой во Франции (14.3%), Великобритании (23.1%), Дании (20.0%) и с умеренной частотой в других странах Европы и в США [Coyle et al., 1998; Campbell

et al., 2001; Borck et al., 2003; Rendtorff et al., 2013]. Большинство мутаций, обнаруженных в европейских популяциях, не были выявлены в странах Азии. Тем не менее, некоторые *SLC26A4*-мутации распространены повсеместно, например, мутация с.1229C>T (экзон 10), встречается как в Европе, так и в Азии. Накопление специфических *SLC26A4*-мутаций в определенных популяциях может быть результатом эффекта основателя, что показано для с.2168A>G (p.His723Arg) у японцев и корейцев и с.919-2A>G - у китайцев [Park et al., 2003; Wu et al., 2005; Tsukada et al., 2015], а также для некоторых других мутаций в локальных популяциях [Borck et al., 2003; Pera et al., 2008; Anwar et al., 2009; Mohseni et al., 2014].

Основываясь на полученных данных, мы предполагаем, что первоочередное тестирование десяти областей гена *SLC26A4* (экзоны 4, 6, 10, 11, 13-17, 19 с фланкирующими интронными сайтами сплайсинга) может существенно повысить эффективность поиска патогенных вариаций в протяженной нуклеотидной последовательности гена *SLC26A4*, поскольку может обеспечить одноэтапное выявление 61.9% (373/603) всех известных в настоящее время PLP-вариантов в последовательности этого гена. Этот подход может быть использован в качестве начального эффективного диагностического тестирования в выборках пациентов неизвестной этнической принадлежности или в качестве последующего шага после таргетного тестирования уже известных этно- или регион-специфичных патогенетических вариантов гена *SLC26A4*.

3.1.2 Ген *SLC26A4* в этиологии потери слуха у коренного населения Республики Тыва и Республики Алтай

Для решения сложной задачи поиска мутаций в гене *SLC26A4* в масштабной выборке больных с потерей слуха невыясненной этиологии, относящихся к коренному населению Тувы и Алтая, с учетом большого размера гена (21 экзон) и существенного объема выборки больных, предварительно была разработана стратегия анализа этого гена. Во-первых, последовательность проведения анализа участков гена *SLC26A4* планировалось на основе результатов проведенного нами биоинформатического анализа (см. раздел 3.1.1). Во-вторых, было проведено пилотное исследование первичной выборки больных с потерей слуха неустановленной этиологии (23 неродственных индивидуума из семей с двумя и

более больными с потерей слуха), что позволило уточнить участки гена *SLC26A4*, приоритетные для данных выборок пациентов.

3.1.2.1 Генотипы по гену *SLC26A4*, выявленные у тувинских и алтайских пациентов

В результате пилотного исследования первичной выборки больных с потерей слуха неустановленной этиологии ($n = 23$) были выявлены ориентировочный спектр патогенетических вариантов гена *SLC26A4*. Основываясь на этих результатах, в общей выборке *GJB2*-негативных больных был проведен молекулярный анализ (секвенирование по Сэнгеру) последовательности гена *SLC26A4*. Анализ участков гена *SLC26A4* у конкретного больного выполнялся до момента выявления у него двух рецессивных патогенетических вариантов этого гена. Были выявлены уже известные патогенетические варианты, неоднократно обнаруженные ранее у пациентов с потерей слуха в различных регионах мира: с.170C>A (p.Ser57*, rs111033200, экзон 3), с.919-2A>G (rs111033313, сплайсинговая мутация между экзонами 7 и 8), с.2027T>A (p.Leu676Gln, rs111033318, экзон 17), с.2034+1G>A (rs759683649, сплайсинговая мутация между экзонами 17 и 18), с.2168A>G (p.His723Arg, rs121908362, экзон 19) (**рисунк 9**), а также новый, еще не описанный, вариант с.1545T>G (p.Phe515Leu, экзон 14).

В **таблице 7** приведены данные о *SLC26A4*-генотипах больных. Для пациентов, у которых были выявлены патогенетические *SLC26A4*-варианты в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии ($n=66$, из них 62 - тувинцы и 4 - алтайцы), может быть установлен молекулярно-генетический диагноз «Потеря слуха, обусловленная присутствием двух рецессивных мутаций в гене *SLC26A4*».

Расширенные родословные некоторых семей с мутациями гена *SLC26A4* представлены в **Приложении 1**. Интересно отметить, что в ряде родословных одновременно присутствуют различные *SLC26A4*-мутации, определяющие компаунд-гетерозиготность больных членов семей, а также мутации гена *GJB2*.

У 14 пациентов (13 тувинцев и 1 алтаец) выявлена только одна какая-либо рецессивная *SLC26A4*-мутация (**таблица 7**). Нельзя исключить, что у таких пациентов может быть нарушения в регуляторных участках / промоторе гена *SLC26A4*, которые не были включены в молекулярно-генетический анализ. Кроме того, такие пациенты могут быть только случайными носителями мутации в гене

SLC26A4, а причинами потери слуха у них является наличие патогенетических вариантов в других генах, ассоциированных с потерей слуха, или влияние средовых факторов.

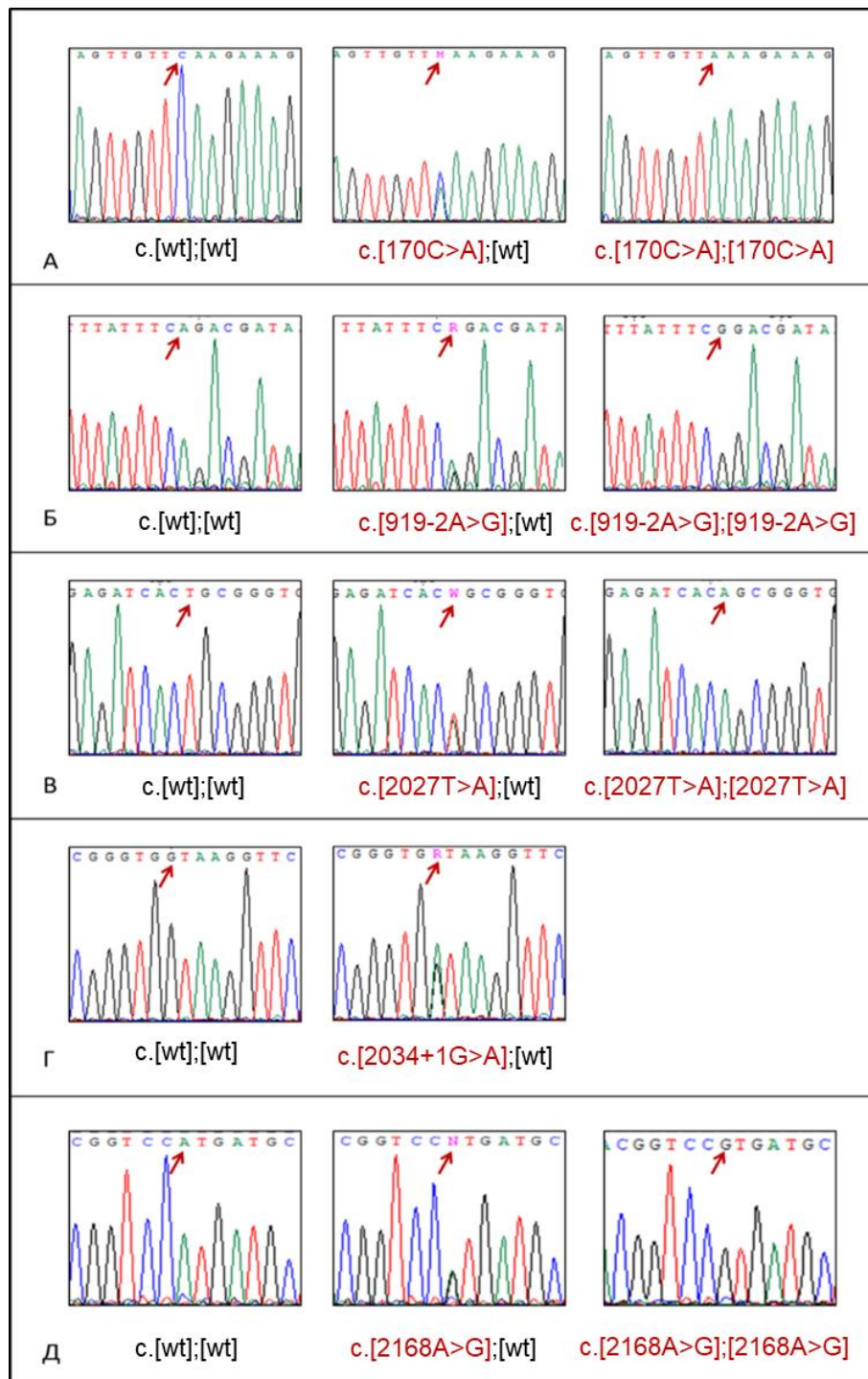


Рисунок 9. Секвенограммы, демонстрирующие мутации гена *SLC26A4*, выявленные у *GJB2*-негативных больных с потерей слуха из Республик Тыва и Алтай. (А) Мутация c.170C>A. (Б) Мутация c.919-2A>G. (Б) Мутация c.2027T>A. (Г) Мутация c.2034+1G>A. (Д) Мутация c.2168A>G. wt – дикий тип.

Таблица 7. Генотипы больных с потерей слуха, установленные на основе анализа экзонов гена *SLC26A4*.

<i>SLC26A4</i> генотипы больных		Тувинские пациенты (n=220)	Алтайские Пациенты (n=93)
ГОМОЗИГОТЫ:			
с.[919-2A>G];[919-2A>G]	интрон 7	30	-
с.[2027T>A];[2027T>A]	экзон 17	4	-
с.[2168A>G];[2168A>G]	экзон 19	-	2
с.[170C>A];[170C>A]	экзон 3	1	-
Всего		35	2
КОМПАУНД-ГЕТЕРОЗИГОТЫ:			
с.[919-2A>G];[2027T>A]	интрон 7, экзон 17	14	2
с.[919-2A>G];[1545T>G]*	интрон 7, экзон 14	8	-
с.[170C>A];[919-2A>G]	экзон 3, интрон 7	3	-
с.[919-2A>G];[2034+1G>A]	интрон 7, экзон 17	1	-
с.[1545T>G]*;[2027T>A]	экзон 14, экзон 17	1	-
Всего		27	2
Установленный диагноз по гену <i>SLC26A4</i>		62(28.2%)	4(4.3%)
ГЕТЕРОЗИГОТЫ:			
с.[919-2A>G];[?]	интрон 7	9	-
с.[170C>A];[?]	экзон 3	1	-
с.[1545T>G]*;[?]	экзон 14	2	-
с.[2027T>A];[?]	экзон 17	1	1
Всего		13 (5.9%)	1 (1.1%)

* - генотипы с новым вариантом с.1545T>G.

Несмотря на географическую близость Тувы и Алтая, наблюдаются контрастные различия в размере вклада *SLC26A4*-мутаций в этиологию нарушения слуха у коренных жителей этих регионов: 28.2% (62/220) - для тувинцев и 4.3% (4/93) – для алтайцев. Ранее нашим коллективом было установлено, что причиной потери слуха у 22.3% больных в Тувe (тувинцы) и 15.1% больных на Алтае (алтайцы) являются мутации гена *GJB2* [Posukh et al., 2005; 2019]. Таким образом, можно заключить, что у тувинских больных патогенетический вклад мутаций гена *SLC26A4* в этиологию потери слуха превышает вклад, определяемый мутациями гена *GJB2*.

Компьютерная томография височных костей у больных с потерей слуха с мутациями в гене *SLC26A4*. Для выявления возможных аномалий развития структур внутреннего уха, часто обнаруживаемых у пациентов с мутациями гена *SLC26A4*, у 27 тувинских пациентов, гомозиготных или компаунд-гетерозиготных по мутациям гена *SLC26A4*, была проведена компьютерная томография (КТ) височных костей. Результаты КТ представлены в **Приложении 2**. У 24 из 27 обследованных пациентов было выявлено двухстороннее расширение (≥ 1.5 мм) водопровода преддверия (EVA) с вариацией от 1.5 мм до 5.1 мм; у одного пациента – КТ-картина была без патологии (водопровод преддверия до 1.5 мм на обоих ушах); у двух пациентов наблюдалось одностороннее расширение водопровода преддверия. Полученные результаты свидетельствуют о том, что степень EVA может различаться на разных ушах у одного и того же пациента и характеризуется как внутрисемейной, так и межсемейной вариабельностью. У 6 из 27 пациентов в анамнезе ранее была отмечена дисфункция щитовидной железы (диффузный зоб различной степени), для других пациентов таких данных нет.

3.1.2.2 Мутационный спектр гена *SLC26A4* у коренного населения Тувы и Алтай

На **рисунке 10** представлены мутации гена *SLC26A4*, выявленные у *GJB2*-негативных больных с потерей слуха из Республик Тыва и Алтай, наряду с наиболее распространенными (по литературным данным) мутациями этого гена.

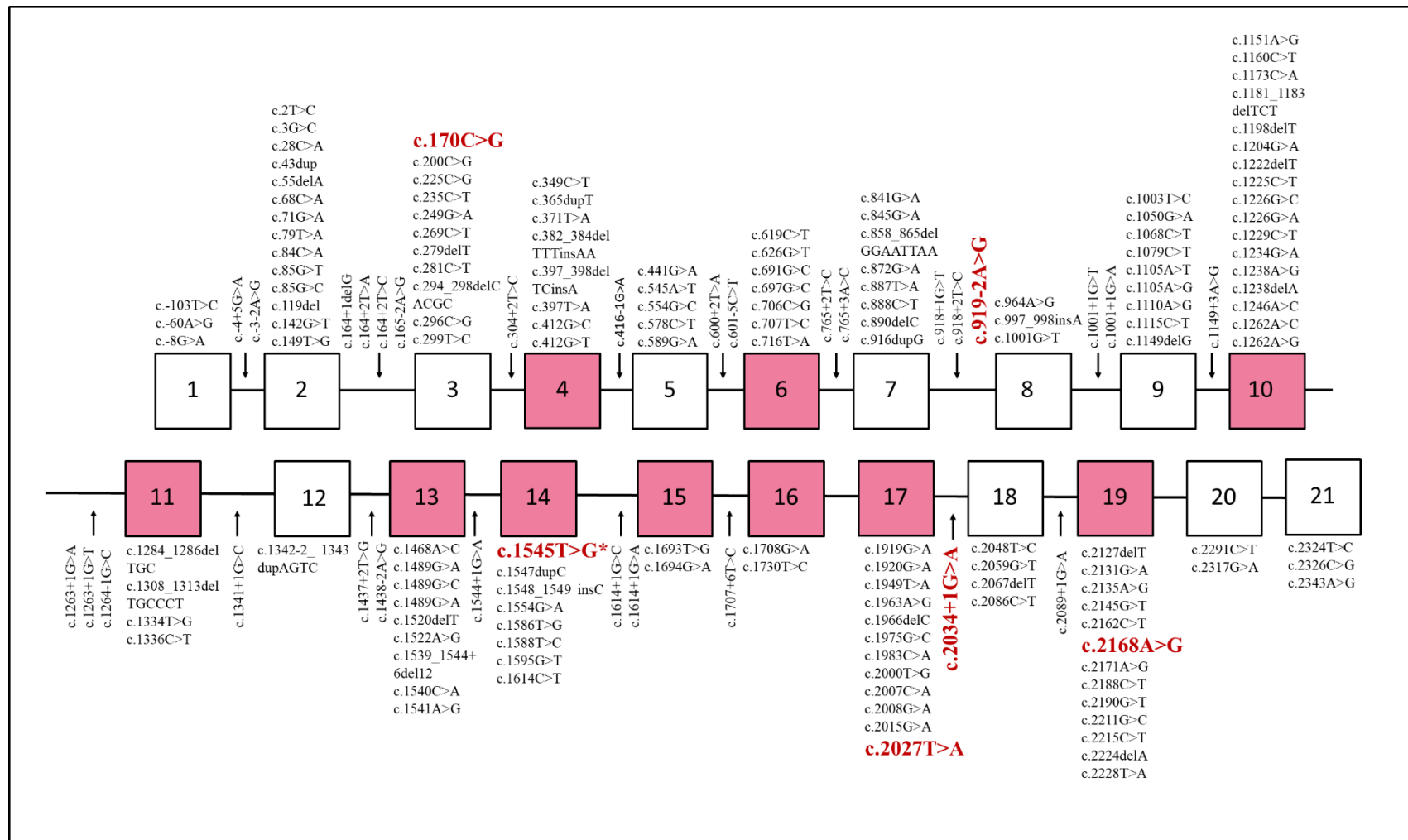


Рисунок 10. Схематичное изображение гена *SLC26A4* с наиболее распространенными мутациями. Красным шрифтом показаны мутации, обнаруженные у тувинских и алтайских пациентов, розовым цветом - «горячие» экзоны. * - новый вариант.

Патогенетические варианты в гене *SLC26A4* у тувинцев и алтайцев. Доля мутации **c.919-2A>G** (rs111033313) среди всех мутантных *SLC26A4*-аллелей, выявленных у тувинских больных, составляет 69.3%, в то время как эта мутация была обнаружена только у двух алтайских пациентов в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией с. 2027T>A. Мутация c.919-2A>G находится в сайте сплайсинга, в интронной области между экзонами 7 и 8 и приводит к пропуску экзона 8, с образованием стоп-кодона в аминокислотной позиции 311, и укороченной форме белковой молекулы пендрина [Yang et al., 2005]. Мутация c.919-2A>G была впервые обнаружена в турецкой семье [Coucke et al., 1999], в дальнейшем было показано, что эта мутация широко распространена в популяциях юго-восточной Азии, но не была обнаружена у пациентов из европейских популяций, включая глухих пациентов, живущих в США [Campbell et al., 2001; Park et al., 2003, Blons et al., 2004; Wang et al., 2007].

Мутации **c.2027T>A** (rs111033318, p.Leu676Gln), обнаруженная у тувинских и алтайских пациентов, и **c.2168A>G** (rs121908362, p.His723Arg), выявленная только у алтайских пациентов, расположены в высококонсервативной области STAS-домена в СООН-концевой части белковой молекулы пендрина. Мутации c.2027T>A и c.2168A>G наиболее часто встречаются в восточноазиатских популяциях. Высокая частота c.2168A>G в Японии и Корее, вероятно, обусловлена эффектом основателя [Park et al., 2003].

Мутация **c.170C>A** (rs111033200, p.Ser57*), выявленная только у тувинских пациентов, приводит к образованию стоп-кодона в аминокислотной позиции 57 (p.Ser57*) белка пендрин. Терминация происходит на NH₂-концевой части белковой молекулы пендрина, и предполагается, что в таком мутантном белке отсутствует большинство важных доменов [Khan et.al., 2013]. Мутация c.170C>A ранее была обнаружена только у глухих больных из Пакистана и Индии [Park et al. 2003; Anwar et al. 2009].

Мутация **c.2034+1G>A** (rs759683649), обнаруженная у одного тувинского пациента в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией c.919-2A>G - мутация сайта сплайсинга в интронной области между экзонами 17 и 18, которая изменяет структуру донорного сайта сплайсинга, тем самым нарушая структуру белкового продукта [Jiang et al., 2015; Sloan-Heggen et al., 2015].

Вариант **c.1545T>G** (p.Phe515Leu) - новый, неописанный ранее, миссенс-вариант в экзоне 14, который приводит к замене фенилаланина на лейцин в 515-ой аминокислотной позиции белка пендрин (p.Phe515Leu) (**рисунок 11**). Следует отметить, что ранее были описаны две другие замены в аминокислотной позиции 515, а именно p.Phe515Ser (c.1544T>C) и p.Phe515Cys (c.1544T>G), которые являются патогенетическими [Zhao et al., 2014; Lee et al., 2019]. Вариант c.1545T>G был обнаружен нами у 11 тувинских пациентов, происходящих из 8 несвязанных родством семей: у 9 пациентов - в компаунд-гетерозиготном состоянии с уже известными мутациями гена *SLC26A4* и у двух пациентов - в гетерозиготном состоянии. Анализ родословной одной из таких семей показал сегрегацию варианта c.1545T>G с потерей слуха (**рисунок 12**).

Частота c.1545T>G была оценена в группе тувинских больных и в контрольной выборке тувинцев (см. **таблицу 9** в разделе 3.1.6). Для сравнительного анализа, чтобы исключить возможное смещение оценки частоты c.1545T>G в выборке пациентов, тестированных на наличие c.1545T>G (140 чел.) за счет присутствия в ней некоторого числа родственных индивидов, использовали выборку неродственных пациентов, сформированную на основе анализа родословных (121 чел., 242 аллелей). Частота c.1545T>G в выборке тувинских больных (0.037, 9/242 аллелей) значительно превышает частоту этого варианта в тувинской контрольной выборке (0.010, 3/296 аллелей) ($p=0.03391$).

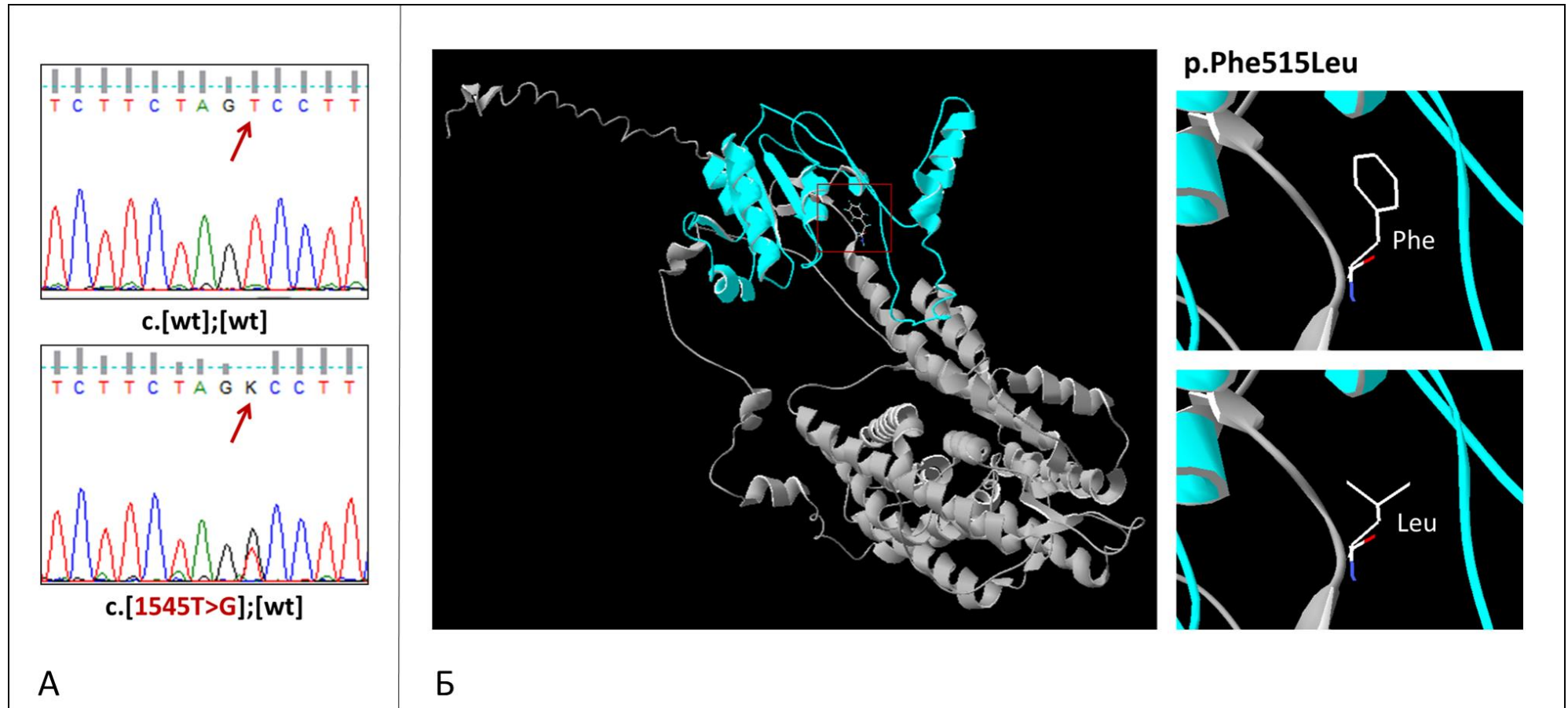


Рисунок 11. Новый вариант $c.1545T>G$ (p.Phe515Leu) в гене *SLC26A4*. (А) Фрагменты секвенограмм экзона 14 гена *SLC26A4*. (Б) 3D-структура белка pendrin с локализацией варианта $c.1545T>G$ (p.Phe515Leu) (I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) и Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>))

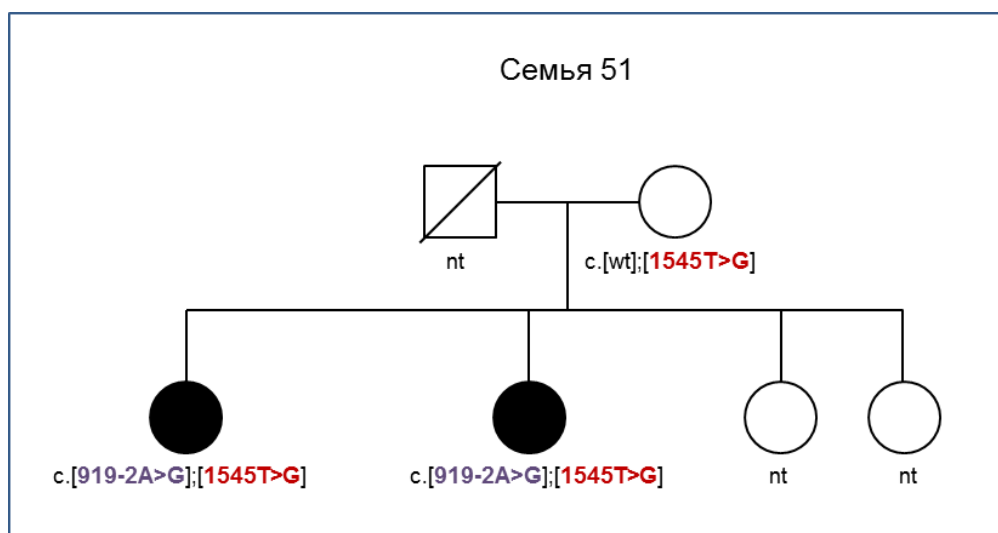


Рисунок 12. Родословная тувинской семьи с *SLC26A4*-генотипами, включающими новый миссенс-вариант c.1545T>G. Черным цветом помечены индивидуумы с выраженной (тугоухость III-IV степени) и полной (глухота) потерей слуха. wt – норма («дикий» тип).

Биоинформатический анализ функциональной значимости варианта c.1545T>G. Мы провели биоинформатическую оценку функциональной значимости нового варианта c.1545T>G с использованием 10 биоинформатических предсказательных программ, которые основываются на разных алгоритмах, учитывающих эволюционную консервативность, структуру и функции белка, сходство между последовательностью, в которой располагается вариант, и последовательностью гомологичных белков (**таблица 8**). Для варианта c.1545T>G, пять из десяти используемых программ предсказали, что данный миссенс-вариант является «повреждающим» («damaging», «disease causing», «disease-related polymorphism»), две оценивают его как «возможно повреждающий» («possibly damaging») и три - как «вероятно нейтральный» («low») (**таблица 8**).

На **рисунке 11Б** представлена 3D-структура белка pendrin с локализацией варианта c.1545T>G (p.Phe515Leu), приводящего к аминокислотной замене в структуре белка, построенная с использованием программ I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) [Roy et al., 2010; Yang et al., 2015a,b] и Swiss-PdbViewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>) [Guex, Peitsch 1997]. Вариант c.1545T>G (p.Phe515Leu) находится вблизи STAS-домена.

Таблица 8. Биоинформатическая оценка функциональной значимости миссенс-варианта с.1545T>G (p.Phe515Leu) в гене *SLC26A4* с использованием предсказательных программ.

Предсказательная программа	Вариант с.1545T>G (p.Phe515Leu)
FATHM	«Damaging» (повреждающий)
Mutation Taster	«Disease Causing» (повреждающий)
PROVEAN	«Damaging» (повреждающий)
SNPs&GO	«Disease-related Polymorphism» (повреждающий)
PolyPhen-2	«Possibly damaging» (возможно повреждающий)
MutPred	«Possibly damaging» (возможно повреждающий)
Align-GVGD	«Low» (возможно нейтральный)
MutationAssessor.org	«Low» (возможно нейтральный)
SIFT	«Tolerated» (возможно нейтральный)
Condel	«Damaging» (повреждающий)

Таким образом, получены свидетельства (данные биоинформатических предсказательных программ, сегрегация варианта с потерей слуха, значимое превышение частоты варианта в выборке больных по сравнению с контрольной выборкой) в пользу патогенетической значимости нового варианта с.1545T>G в гене *SLC26A4*.

Полиморфные (нейтральные) варианты в гене *SLC26A4* у тувинцев и алтайцев. Анализ нуклеотидной последовательности гена *SLC26A4* у коренного населения Тувы и Алтая выявил спектр не только патогенетических вариантов, но и ряд нейтральных, полиморфных, вариантов (уже известных и новых) этого гена (таблица 9).

В таблице 9, частоты уже известных полиморфных вариантов, обнаруженных у тувинцев и алтайцев, представлены в сравнении с данными для ряда популяций из базы данных the DEAFNESS VARIATION DATABASE (<http://www.deafnessvariationdatabase.org/>). Для сравнения были взяты максимальные значения среди всех популяций (MAF Max), для европеоидных популяций (за исключением финнов) (MAF NFE), для популяций Восточной (MAF EAS) и Южной Азии (MAF SAS). Частоты вариантов rs547061031 (3.57%), rs774077886 (0.40%),

rs2072064 (80.26%) у тувинцев и rs187447337 (12.0%), rs770844637 (0.68%), rs190583482 (0.76%) у алтайцев значительно превышают максимальные значения общемировых частот (<0.04%, 0.24%, 36.37%, 0.09%, 0.01% и 0.24%, соответственно). Частоты вариантов rs3817613 (53.36%), rs2712228 (36.84%), обнаруженных у тувинцев, и rs55638457 (2.27%) у алтайцев сопоставимы со значениями для азиатских популяций (61.35%, 44.67% и 2.81%, соответственно). Полученные данные существенно дополняют имеющуюся информацию об аллельном разнообразии гена *SLC26A4* в различных регионах мира.

Таблица 9. Полиморфные варианты в гене *SLC26A4*, обнаруженные у тувинских и алтайских пациентов с потерей слуха.

Вариант	Хромосомная позиция (GRCh38.p7)	dbSNP	Локализация в гене <i>SLC26A4</i>	Частота (%) Тувинцы	Частота (%) Алтайцы	Max MAF % (DADB)	MAF NFE % (DADB)	MAF EAS % (DADB)	MAF SAS % (DADB)
g.4261A>C	107659895	rs2712228	UTR	36.84	n.t	70.0	70.0	44.67	no data
g.4617G>T	107660251	rs73191605	UTR	0.57	0	5.25	5.25	0.06	no data
g.4655G>C	107660289	rs73191606	UTR	0.49	0	5.3	5.3	0.06	no data
c.165-626T>A	107662670	rs73191610	Интрон 2	0.91	0.59	5.32	5.32	<0.01	no data
c.165-546T>C	107662750	rs774077886	Интрон 2	0.40	0	0.24	<0.01	0.00	0.00
c.165-119A>T	107663177	rs2248464	Интрон 2	53.23	75.0	80.63	72.39	66.32	no data
c.165-113C>T	107663183	rs2248465	Интрон 2	37.09	62.50	71.96	71.96	64.58	no data
c.225C>G (p.Leu75=)	107663356	rs187447337	Экзон 3	0	12.0	0.09	0.02	0.09	<0.01
c.601-266T>G	107674679	rs3817613	Интрон 5	53.36	n.t	92.88	64.61	61.35	no data
c.1001+131G>T	107683668	rs2395911	Интрон 8	49.21	65.30	85.07	73.55	62.31	no data
c.1150-135C>T	107689989	rs2072063	Интрон 9	2.70	n.t	6.95	6.95	5.39	no data
c.1264-335T>A	107694068	rs2072064	Интрон 10	80.26	n.t	36.37	26.73	36.37	no data
c.1264-187C>T	107694216	rs2072065	Интрон 10	17.35	n.t	62.42	44.29	62.42	no data
c.1341+47T>C	107694527	rs17154326	Интрон 11	3.57	n.t	11.17	0.02	11.17	0.12
c.1545-85G>C	107697957	rs770844637	Интрон 13	0	0.68	0.01	no data	no data	no data
c.1707+398T>C	107700573	rs190583482	Интрон 15	0	0.76	0.24	0.03	0.00	no data
c.1708-18T>A	107701083	rs55701254	Интрон 15	0.45	0	3.36	3.36	0.00	0.83
c.1790T>C (p.Leu597Ser)	107701183	rs55638457	Экзон 16	0.90	2.27	2.81	0.75	0.01	2.81
c.2319+243T>C	107712865	rs547061031	Интрон 20	3.57	n.t	0.04	no data	no data	no data

Новые варианты									
A>T	107662833	-	Инtron 2	0	0.59	-	-	-	-
A>T	107663118	-	Инtron 2	0	0.69	-	-	-	-
C>T	107663208	-	Инtron 2	0	0.69	-	-	-	-
c.942A>G (p.Ser314=)	107683478	-	Экзон 8	0.26	0	-	-	-	-
A>G	107697874	-	Инtron 13	0	0.68	-	-	-	-
T>C	107700976	-	Инtron 15	0.45	0	-	-	-	-
C>T	107701796	-	Инtron 16	0.34	0	-	-	-	-

MAF - Minor Allele Frequency, NFE – European (Non-Finnish), EAS – East Asian, SAS – South Asian. Данные о MAF из the Deafness Variation Database (<http://www.deafnessvariationdatabase.org/>, февраль 2022г.) и the Genome Aggregation Database (gnomAD, version 2.1.1, <https://gnomad.broadinstitute.org/>, февраль 2022г). n.t. – не тестировано; no data – нет данных.

3.1.2.3 Частота гетерозиготного носительства рецессивных мутаций гена *SLC26A4* у коренного населения Тувы и Алтай

Базируясь на данных молекулярно-генетического анализа гена *SLC26A4* больных с потерей слуха (таблица 7), мы провели скрининг наиболее частых рецессивных *SLC26A4*-мутаций в контрольных выборках несвязанных родством коренных жителей Тувы и Алтай для определения частоты их гетерозиготного носительства (таблица 10). В алтайской контрольной выборке носители рецессивных мутаций гена *SLC26A4* не обнаружены, в то время как в тувинской контрольной выборке частота гетерозиготного носительства мутации с.919-2A>G составила 5.1% (8/157), а мутации с.1545T>G - 2.0% (3/148).

Таблица 10. Частота гетерозиготного носительства рецессивных мутаций гена *SLC26A4* в контрольных выборках тувинцев и алтайцев.

Мутации гена <i>SLC26A4</i>	Тувинцы	Алтайцы
с.919-2A>G	5.1% (8/157)	0% (0/130)
с.1545T>G	2.0% (3/148)	nt
с.170C>A	0% (0/100)	nt
с.2027T>A	0% (0/157)	0% (0/123)
с.2034+1G>A	0% (0/157)	0% (0/123)
с.2168A>G	nt	0% (0/141)

nt – не тестировано.

3.1.2.4 Территориальное распределение мутантных аллелей с с.919-2A>G, с.2027T>A и с.1545T>G гена *SLC26A4* в Республике Тыва

Основываясь на полученных результатах о высокой частоте трех патогенетических вариантов с.919-2A>G, с.2027T>A и с.1545T>G гена *SLC26A4* у тувинцев, мы проанализировали территориальное распределение мутантных аллелей с этими вариантами в Республике Тыва. Для анализа использовались данные о месте рождения всех индивидуумов, имеющих эти варианты (тувинские пациенты, их родственники и гетерозиготные носители из контрольной выборки тувинцев) (рисунок 13А). Территория Республики Тыва подразделена на 17 административных районов (кожуунов), отдельно выделяется город Кызыл, столица республики. Сопоставление данных о месте рождения индивидуумов, включенных

в выборку пациентов и контрольную выборку, приведено в **рисунке 13Б**. В целом, в обеих выборках из Тувы (пациенты с потерей слуха и контрольная выборка) представлены индивидуумы из всех районов Республики Тыва, за исключением отдаленного Тери-Хольского района (только пациенты с потерей слуха). Можно заметить, что аллели с мутациями с.919-2A>G, с.2027T>A и с.1545T>G достаточно широко распространены в центральных районах Республики Тыва, с видимым накоплением в Чаа-Хольском и Улуг-Хемском районах (**рисунк 13А, В**).

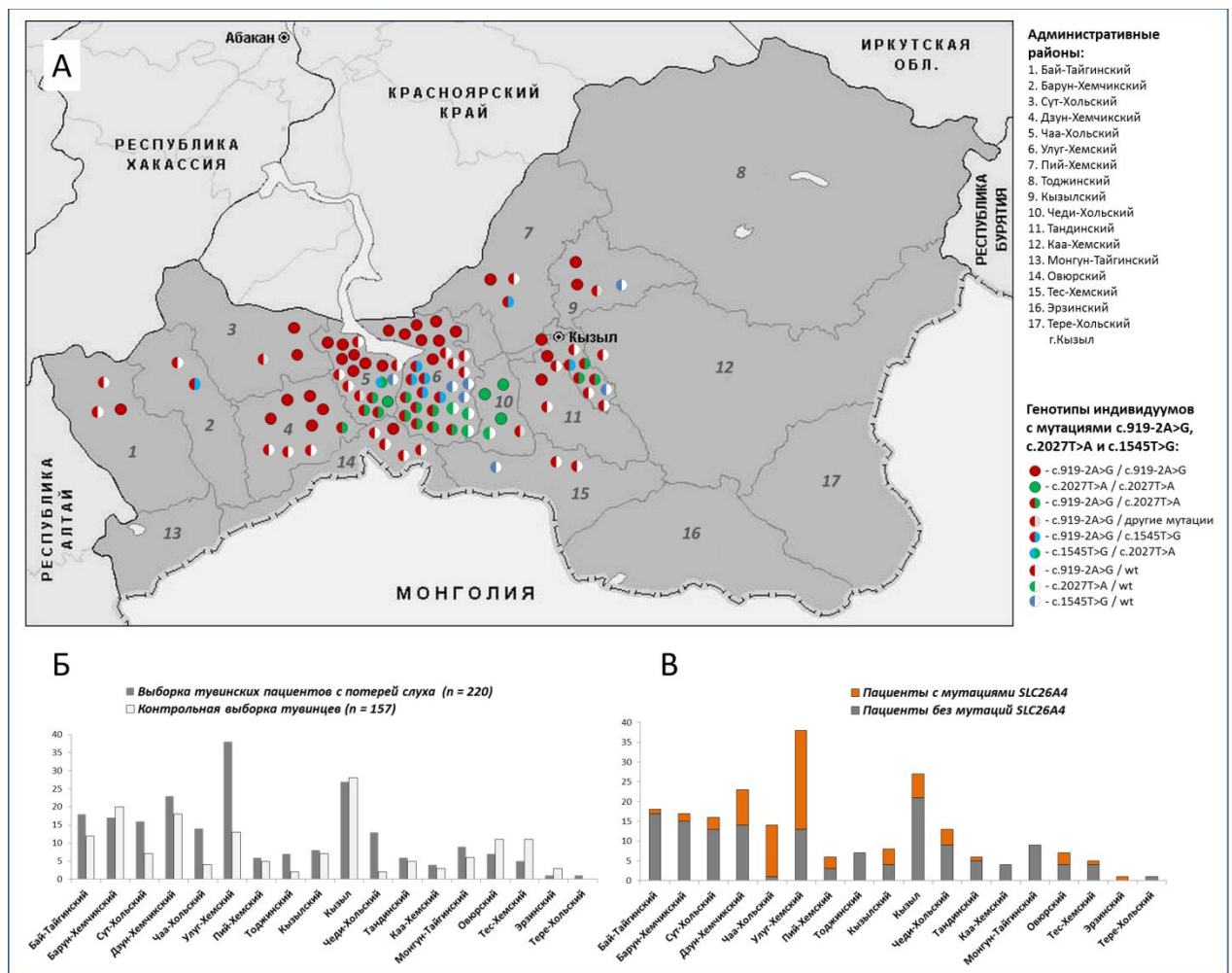


Рисунок 13. (А) Территориальное распределение мутантных аллелей с с.919-2A>G, с.2027T>A и с.1545T>G гена *SLC26A4* в Республике Тыва. (Б) Распределение тувинских пациентов с потерей слуха и индивидуумов из контрольной выборки тувинцев по месту рождения на территории Республики Тыва. (В) Распределение доли пациентов, имеющих мутации гена *SLC26A4*, по районам Республики Тыва.

3.1.2.5 Распространенность мутации с.919-2A>G гена *SLC26A4* на территории Евразии (анализ литературных данных)

Наибольшую частоту у тувинских больных с потерей слуха имеет мутация с.919-2A>G, характерная для юго-восточных азиатских популяций – ее доля среди всех мутантных *SLC26A4*-аллелей, выявленных у тувинских больных, составляет 69.3%. Кроме того, в контрольной выборке тувинцев выявлена высокая частота гетерозиготного носительства этой мутации – 5.1%. Мы предприняли попытки сопоставить полученную информацию с общемировыми данными. Следует отметить, что в настоящее время ни одна база данных не содержит суммарную унифицированную информацию о частоте с.919-2A>G в выборках пациентов с потерей слуха в разных регионах мира. Такую информацию частично можно найти только в нескольких обзорных статьях [Du et al., 2013; Lu et al., 2015; Tsukada et al., 2015; Koohiyan et al., 2019] или можно экстрагировать из многочисленных работ по изучению гена *SLC26A4* у пациентов с потерей слуха.

Мы провели анализ литературных данных (статьи из PubMed с 1997 по 2021 гг), используя ключевые слова «*SLC26A4*» / «*pendrin*», что позволило выявить 1883 публикации. Дальнейший отбор статей проводился по следующим критериям: публикация на английском языке; доступность полнотекстовой версии статьи; методология анализа гена: секвенирование всех кодирующих *SLC26A4*-экзонов с фланкирующими областями; исследование проводилось в выборках пациентов с потерей слуха; обязательное указание на территориальную и/или этническую принадлежность пациентов; в статье должно было быть исследовано более 2-х неродственных семей; данные о наличии или отсутствии мутации с.919-2A>G в гене *SLC26A4*. В конечном итоге, для анализа было отобрано 57 статей (список статей в **Приложении 3**). Если необходимая информация отсутствовала в литературном источнике, мы рассчитывали частоту с.919-2A>G как долю аллелей, несущих с.919-2A>G, среди всех мутантных *SLC26A4*-аллелей, выявленных у пациентов. Графическое представление данных о частоте мутации с.919-2A>G в гене *SLC26A4* на территории Евразии (другие регионы мира были исключены в связи с неинформативностью данных, необходимых для нашего анализа) показано в **рисунке 14**.

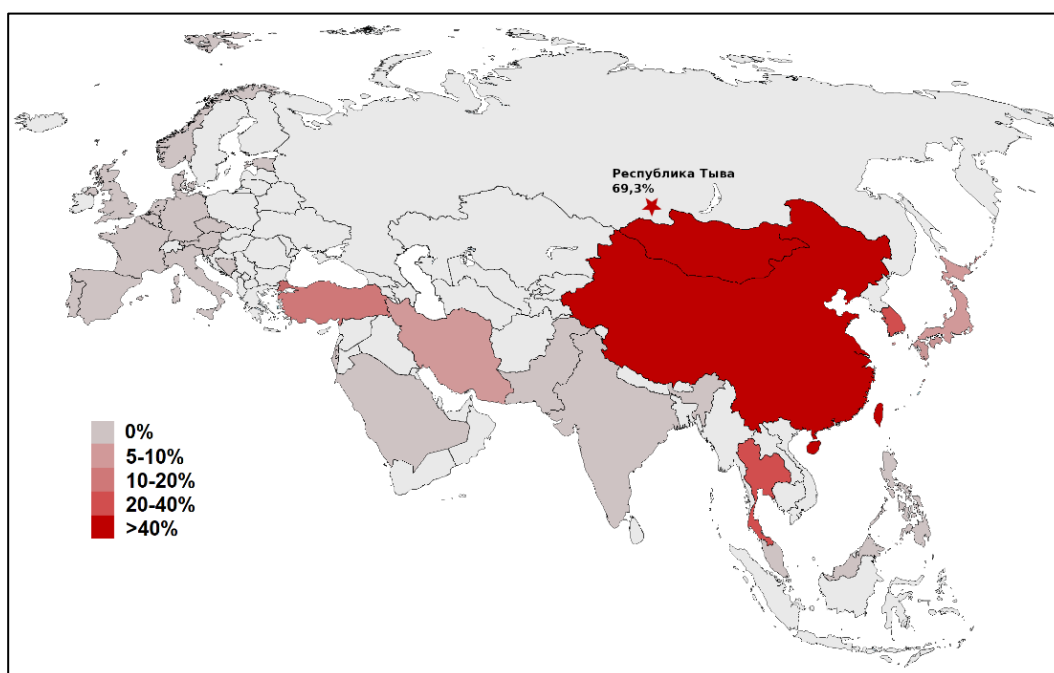


Рисунок 14. Распространенность мутации с.919-2A>G в гене *SLC26A4* на территории Евразии.

Наибольшая частота с.919-2A>G наблюдается в странах Азии. На территории Китая и Монголии частота с.919-2A>G у пациентов превышает 40%, достигая 70% в некоторых провинциях Китая. Высокая частота с.919-2A>G у пациентов из Тайваня, возможно, обусловлена эффектом основателя [Wu et al., 2005]. В Южной Корее и Таиланде частота с.919-2A>G находится в диапазоне 20-40%. Следует отметить, что в Таиланде и Южной Корее распространены две *SLC26A4*-мутации - с.919-2A>G и с.2168A>G, причем высокая частота с.2168A>G в Южной Корее, вероятно, обусловлена эффектом основателя [Park et al., 2003; Snabboon et al., 2007]. В нескольких семьях из Турции мутация с.919-2A>G обнаружена с частотой около 13%, что может свидетельствовать о наличии общих предков из Азии, так как исторически турки мигрировали из Центральной Азии в Анатолию [Cengiz et al., 2017]. Частота с.919-2A>G на территории Японии и Ирана варьирует от 5% до 10%. Работы по исследованию мутационного спектра гена *SLC26A4* у пациентов из России немногочисленны и ограничены ее европейской частью: мутация с.919-2A>G была обнаружена у одного пациента из татарской семьи в Республике Башкортостан, а также у нескольких пациентов из европейской части России [Лобов и др., 2011; Лобов, 2013; Маркова и др., 2016; Миронович и др., 2017; Миронович,

2019]. Для Сибири данные о частоте с.919-2A>G доступны только из нашего исследования [Danilchenko et al., 2021].

Мы предположили, что в основе широкой распространенности мутации с.919-2A>G (69.3%) у тувинцев лежит эффект основателя. Эта гипотеза может быть подтверждена общностью генетического окружения (гаплотипов) для этой мутации у тувинцев.

3.1.2.6 Выявление и анализ гаплотипов, несущих мутацию с.919-2A>G

Для проверки гипотезы о ведущей роли эффекта основателя в широкой распространенности мутации с.919-2A>G (*SLC26A4*) у тувинцев необходимо проанализировать генетическое окружение (гаплотипы) этой мутации. В этих целях проведена реконструкция гаплотипов участка хромосомы 7, включающего ген *SLC26A4*, с использованием STR- и SNP-маркёров, фланкирующих на разном расстоянии мутацию с.919-2A>G гена *SLC26A4*.

Подбор панели STR- и SNP-маркёров для генотипирования. Для реконструкции гаплотипов, несущих мутацию с.919-2A>G, мы выбрали панель генетических маркеров для генотипирования участка хромосомы 7, включающую 5 STR-маркёров, фланкирующих на разном физическом расстоянии мутацию с.919-2A>G (*SLC26A4*): *центромера*- // - D7S496 (~ 0.17 Mb) --- **с.919-2A>G** --- D7S2459 (~ 7.6 kb) - D7S2456 (~ 0.36 Mb) - D7S799 (~ 1.29 Mb) - D7S525 (~ 2.32 Mb) - // - *теломера* (размер фланкируемого региона составил ~ 2.5 Mb), и 7 внутригенных SNP-маркёров, находящихся на различном расстоянии от мутации с.919-2A>G: *центромера*- // - rs2248464 (20.276 kb) - rs2248465 (20.270 kb) --- **с.919-2A>G** --- rs2395911 (0.215 kb) - rs2072063 (6.536 kb) - rs2072064 (10.615 kb) - rs2072065 (10.763 kb) - rs2301634 (29.061 kb) - // - *теломера* (рисунок 15).

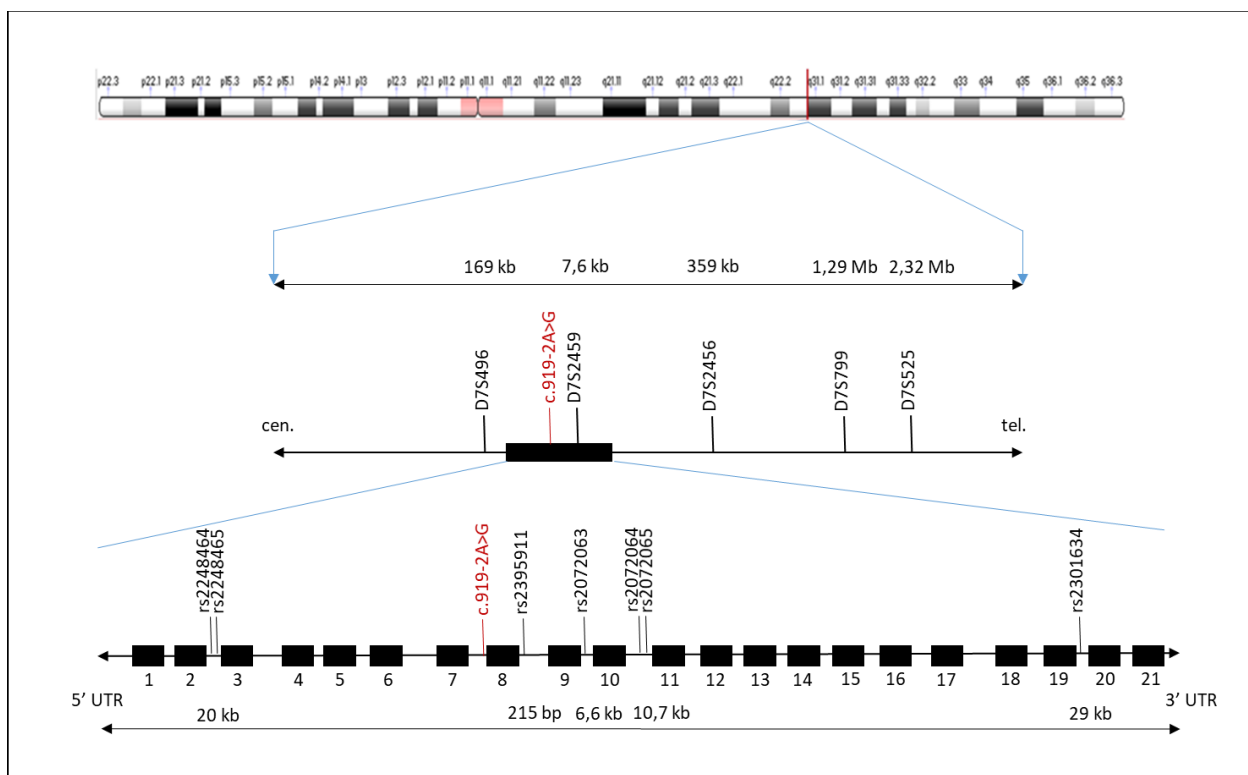


Рисунок 15. Схема расположения STR- и SNP-маркёров на хромосоме 7.

При выборе маркёров учитывалась их информативность (полиморфизм), хромосомная позиция и возможность сопоставления с соответствующими литературными данными. Выбранные STR-маркеры ранее использовались как для анализа сцепления и картирования локуса гена *SLC26A4*, так и для гаплотипирования участка хромосомы 7, включающего отдельные мутации этого гена [Van Hauwe et al., 1998; López-Bigas et al., 1999; Borck et al., 2003; Park et al., 2003; Wu et al., 2005; Yang et al., 2005; Walsh et al., 2006; Anwar et al., 2009; Wu et al., 2010; Mojtabavi Naeini et al., 2014; Muskett et al., 2014; Pang et al., 2015; Azadegan-Dehkordi et al., 2018; Nonose et al., 2018]. 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>), 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/>). Следует отметить, что в большинстве работ по гаплотипированию гена *SLC26A4*, в основном, использовались либо STR-маркеры, либо SNP-маркеры, в то время как в нашем исследовании использовано оба типа генетических маркеров (STRs и SNPs).

Генотипирование генетических маркеров проведено на выборке неродственных больных, гомозиготных по мутации c.919-2A>G (n=23), которая

была сформирована на основе результатов поиска мутаций гена *SLC26A4* в общей выборке тувинских больных с потерей слуха, и в контрольной выборке тувинцев ($n=63$), не имеющих мутации $c.919-2A>G$.

Разнообразие аллелей изученных STR- и SNP-маркёров. В таблице 11 представлены частоты аллелей STR-маркёров у пациентов, гомозиготных по мутации $c.919-2A>G$, и в контрольной выборке. У $c.919-2A>G$ -гомозигот, все STR-маркёры, за исключением D7S525 (4 аллеля), оказались мономорфными (1 аллель) в отличие от контрольной выборки, где все STR-маркёры, кроме D7S799 (1 аллель), были высокополиморфными: D7S496 (10 аллелей), D7S2459 (7 аллелей), D7S2456 (5 аллелей), D7S525 (8 аллелей). В таблице 12 представлены частоты аллелей изученных SNP-маркёров у $c.919-2A>G$ -гомозигот и в контрольной выборке. Все SNP-маркёры у $c.919-2A>G$ -гомозигот, оказались мономорфными, тогда как в контрольной выборке все изученные SNP-маркёры, кроме rs2072063 и rs2301634, были полиморфными. Сравнительный анализ выборки $c.919-2A>G$ -гомозигот и контрольной выборки выявил статистически значимые различия в частотах ряда аллелей проанализированных STR- и SNP-маркёров (таблицы 11 и 12).

Таблица 11. Частоты STR-аллелей у пациентов, гомозиготных по мутации с.919-2A>G, и в контрольной выборке.

STR (расстояние от мутации с.919-2A>G)	Аллель (н.п.)	Гомозиготы (n=23)		Контрольная выборка (n=55-63)		<i>p</i>	δ
		Число аллелей	Частота аллеля	Число аллелей	Частота аллеля		
D7S496 (~ 0.17 Mb)	118	0	0.0	23	0.1825	0.4274 x 10⁻⁰³	-0.2233
	120	46	1.0	3	0.0238	0.1127 x 10⁻³⁷	1.0000
	126	0	0.0	1	0.0079	0.7326	-0.0080
	128	0	0.0	4	0.0317	0.2843	-0.0328
	130	0	0.0	14	0.1111	0.0104	-0.1250
	132	0	0.0	13	0.1032	0.0147	-0.1150
	134	0	0.0	61	0.4841	0.2375 x 10⁻¹⁰	-0.9385
	136	0	0.0	3	0.0238	0.3906	-0.0244
	138	0	0.0	3	0.0238	0.3906	-0.0244
	144	0	0.0	1	0.0079	0.7326	-0.0080
	Всего	46	1.0	126	1.0		
D7S2459 (~ 7.6 kb)	139	0	0.0	5	0.0455	0.1696	-0.0476
	141	0	0.0	8	0.0727	0.0565	-0.0784
	143	0	0.0	3	0.0273	0.3477	-0.0280
	145	0	0.0	56	0.5091	0.8595 x 10⁻¹¹	-1.0370
	147	46	1.0	24	0.2182	0.4128 x 10⁻²¹	1.0000
	149	0	0.0	13	0.1182	0.8518 x 10⁻⁰²	-0.1340
	151	0	0.0	1	0.0091	0.7051	-0.0092
	Всего	46	1.0	110	1.0		
D7S2456 (~ 0.36 Mb)	244	46	1.0	73	0.5794	1.0000	1.0000
	246	0	0.0	36	0.2857	0.2737 x 10⁻⁰⁵	-0.4000
	248	0	0.0	2	0.0159	0.5355	-0.0161
	250	0	0.0	14	0.1111	0.0104	-0.1250
	252	0	0.0	1	0.0079	0.7326	-0.0080
	Всего	46	0.0	126	1.0		
D7S799 (~ 1.29 Mb)	131	46	1.0	126	1.0	1.4340	-
	Всего	46	1.0	126	1.0		
D7S525 (~ 2.32 Mb)	209	0	0.0	2	0.0169	0.5165	-0.0172
	219	0	0.0	2	0.0169	0.5165	-0.0172
	221	1	0.0217	35	0.2966	0.2422 x 10⁻⁰⁴	-0.3908
	223	0	0.0	5	0.0424	0.1882	-0.0442
	225	1	0.0217	2	0.0169	0.6322	0.0049
	227	42	0.9130	46	0.3898	0.2561 x 10⁻⁰⁹	0.8575
	229	2	0.0435	18	0.1525	0.0419	-0.1287
	231	0	0.0	8	0.0678	0.0670	-0.0727
	Всего	46	1.0	118	1.0		

δ – мера неравновесия по сцеплению. Жирным шрифтом выделены значимые показатели неравновесия по сцеплению ($\delta > 0.5$) и статистически значимые ($p < 0.05$) различия между выборкой гомозигот по мутации с.919-2A>G и контрольной выборкой.

Таблица 12. Частоты SNP-аллелей у пациентов, гомозиготных по мутации с.919-2A>G, и в контрольной выборке.

SNP (расстояние от мутации с.919-2A>G)	Аллель (н.п.)	Гомозиготы (n=23)		Контрольная выборка (n=53-63)		<i>p</i>	δ
		Число аллелей	Частота аллеля	Число аллелей	Частота аллеля		
rs2248464 (20276 kb)	A	46	1.0	26	0.2063	0.1697×10^{-22}	1.0000
	T	0	0.0	100	0.7937	0.1687×10^{-22}	-3.8462
	всего	46	1.0	126	1.0		
rs2248465 (20270 kb)	C	46	1.0	40	0.3175	0.3332×10^{-17}	1.0000
	T	0	0.0	86	0.6825	0.3300×10^{-17}	-2.1500
	всего	46	1.0	126	1.0		
rs2395911 (215 kb)	G	46	1.0	44	0.3492	0.6282×10^{-16}	1.0000
	T	0	0.0	82	0.6508	0.6211×10^{-16}	-1.8636
	всего	46	1.0	126	1.0		
rs2072063 (6536 kb)	C	46	1.0	126	1.0	1.4340	-
	T	0	0.0	0	0.0	1.0000	
	всего	46	1.0	126	1.0		
rs2072064 (10615 kb)	T	0	0.0	75	0.5952	0.6892×10^{-14}	1.4706
	A	46	1.0	51	0.4048	1.0000	1.0000
	всего	46	1.0	126	1.0		
rs2072065 (10763 kb)	C	46	1.0	64	0.5079	1.0000	1.0000
	T	0	0.0	62	0.4921	0.1391×10^{-10}	-0.9688
	всего	46	1.0	126	1.0		
rs2301634 (29061 kb)	T	46	1.0	106	1.0	1.5330	-
	A	0	0.0	0	0.0	1.0000	
	всего	46	1.0	106	1.0		

δ – мера неравновесия по сцеплению. Жирным шрифтом выделены значимые показатели неравновесия по сцеплению ($\delta > 0.5$) и статистически значимые ($p < 0.05$) различия между выборкой гомозигот по мутации с.919-2A>G и контрольной выборкой.

Реконструкция STR-гаплотипов. Для гомозигот по мутации с.919-2A>G были получены высокие значения показателя неравновесия по сцеплению для специфических аллелей всех пяти STR-маркёров (D7S496, D7S2459, D7S2456, D7S799, D7S525) (таблица 11). Таким образом, границы предполагаемых гаплотипов, несущих мутацию с.919-2A>G, на момент исследования, могут определяться дистальными маркёрами D7S496 и D7S525 (~ 2.5 Mb). В результате реконструкции STR-гаплотипов, проведенной с использованием EM-алгоритма пакета программ Arlequin, в контрольной выборке было выявлено 50 из 200 теоретически возможных гаплотипов. Наиболее частыми оказались гаплотипы 134-145-244-131-221 (14.5%), 134-145-244-131-227 (7.4%) и 134-145-246-131-227 (5.9%),

а остальные гаплотипы обнаруживались с частотой менее 5%. У с.919-2A>G-гомозигот были обнаружены четыре гаплотипа (120-147-244-131-227 - с частотой 91.3%, 120-147-244-131-229 – 4.3%, а также 120-147-244-131-221 и 120-147-244-131-225 - с частотой 2.2% каждый), которые отсутствовали в контрольной выборке (**Приложение 4, таблица 1**). Таким образом, можно заключить, что гаплотип 120-147-244-131-227 (91.3%), определяемый STR-маркёрами (D7S496---с.919-2A>G---D7S2459-D7S2456-D7S799-D7S525), размером ~ 2.5 Mb, является высокоспецифичным для мутации с.919-2A>G.

Реконструкция SNP-гаплотипов. На основе данных генотипирования 6 SNP-маркёров rs2248464, rs2248465, rs2395911, rs2072063, rs2072064, rs2072065 были реконструированы SNP-гаплотипы у индивидуумов, гомозиготных по мутации с.919-2A>G, и в контрольной выборке без этой мутации (**Приложение 4, таблица 2**). Мономорфный в обеих выборках, дистально расположенный маркер rs2301634 исключен из анализа. Анализ неравновесия по сцеплению показал полное сцепление всех исследованных SNP-маркёров с мутацией с.919-2A>G (**таблицы 12 и таблица 2 в Приложении 4**) и у с.919-2A>G-гомозигот был обнаружен единственный SNP-гаплотип А-С-Г-С-А-С (100%). В контрольной выборке найдено 12 из 32 теоретически возможных гаплотипов, среди которых наиболее частыми были два гаплотипа: Т-Т-Т-С-Т-Т (36.2%) и Т-Т-Г-С-А-С (25.5%), а остальные встречались с частотами менее 8%. Частота единственного SNP-гаплотипа (А-С-Г-С-А-С, 100%), обнаруженного у пациентов, гомозиготных по мутации с.919-2A>G, статистически значимо ($p < 10^{-32}$) превышала его частоту в контрольной выборке (А-С-Г-С-А-С, 6.6%). Таким образом, можно заключить, что внутригенный SNP-гаплотип А-С-Г-С-А-С (rs2248464-rs2248465 ---с.919-2A>G--- rs2395911-rs2072063-rs2072064-rs2072065) является высокоспецифичным для мутации с.919-2A>G.

Совокупность полученных результатов свидетельствует о высокой специфичности и сходстве генетического окружения участка хромосомы 7, включающего мутацию с.919-2A>G (*SLC26A4*), у носителей этой мутации, относящихся к коренному населению Республики Тыва, что предполагает общность ее происхождения. Полученные данные подтверждают гипотезу о ведущей роли эффекта основателя в широкой распространенности с.919-2A>G в изучаемом регионе. Полученные нами данные соответствуют результатам исследований,

демонстрирующим общность гаплотипов, несущих с.919-2A>G, в популяциях юго-восточной Азии [Park et al., 2003; Wu et al., 2005]. На последующих этапах работы планируется уточнить границы гаплотипов, несущих с.919-2A>G, для выяснения ориентировочного «возраста» (времени возникновения) этой мутации у коренного населения Республики Тыва.

3.2 Выявление генов, ответственных за развитие патологии слуха, методом полноэкзомного секвенирования у пациентов из Республики Алтай

Большая часть генов, ассоциированных с тем или иным редким моногенным заболеванием, была ранее идентифицирована в эндогамных изолированных группах, в больших семьях с многочисленными больными индивидами, позволяющими провести детальный генетический анализ. Наследуемая потеря слуха характеризуется уникально высокой гетерогенностью генетического контроля. Успешному поиску генов, ассоциированных с этой патологией, методами секвенирования нового поколения (NGS, next generation sequencing), включая полноэкзомное секвенирование (WES, whole exome sequencing), способствует специфика популяций коренного населения Сибири, которые и в настоящее время зачастую являются эндогамными изолятами с традиционно большим размером семьи, относительно низкой миграционной активностью и незначительным потоком генов извне.

В данном разделе представлены результаты поиска генов, ответственных за потерю слуха, проведенного методом полноэкзомного секвенирования (WES) в трех больших алтайских семьях (более двух пораженных потомков в каждой семье) с рецессивным наследованием глухоты неясной этиологии из Республики Алтай, у членов которых не было обнаружено мутаций в гене *GJB2* (*GJB2*-негативные семьи). Для проведения WES было отобрано по два глухих sibса из каждой семьи. Последующий биоинформатический анализ полученных экспериментальных данных проводился в предположении, что патология слуха у обоих глухих потомков из каждой анализируемой семьи определяется гомозиготностью каких-либо вариантов в генах из списка уже известных в ассоциации с рецессивной глухотой (Hereditary Hearing Loss Homepage: <http://hereditaryhearingloss.org>), либо в генах, ассоциация которых с потерей слуха пока еще необоснована (новые гены-кандидаты). В последнем случае использовался массивный поиск релевантных литературных данных (text mining) в базах медико-генетических данных (PubMed, OMIM), оценка частоты встречаемости найденных вариантов в мировых базах данных (dbSNP138, ClinVar, 1000 Genomes Project, Exome Sequencing Project, Exome Aggregation Consortium) и оценка их возможной «патогенности» с помощью ряда предсказательных программ (PolyPhen2, HumVar, SIFT, Mutation Taster, LRT, PhyloP).

3.2.1. Мутация c.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAI1* у алтайских больных с потерей слуха

В результате WES у четырех индивидуумов из двух *GJB2*-негативных алтайских семей 38 и 40 с рецессивно наследуемой потерей слуха неясной этиологии, была обнаружена новая мутация c.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAI1* в гомозиготном состоянии (рисунок 16А).

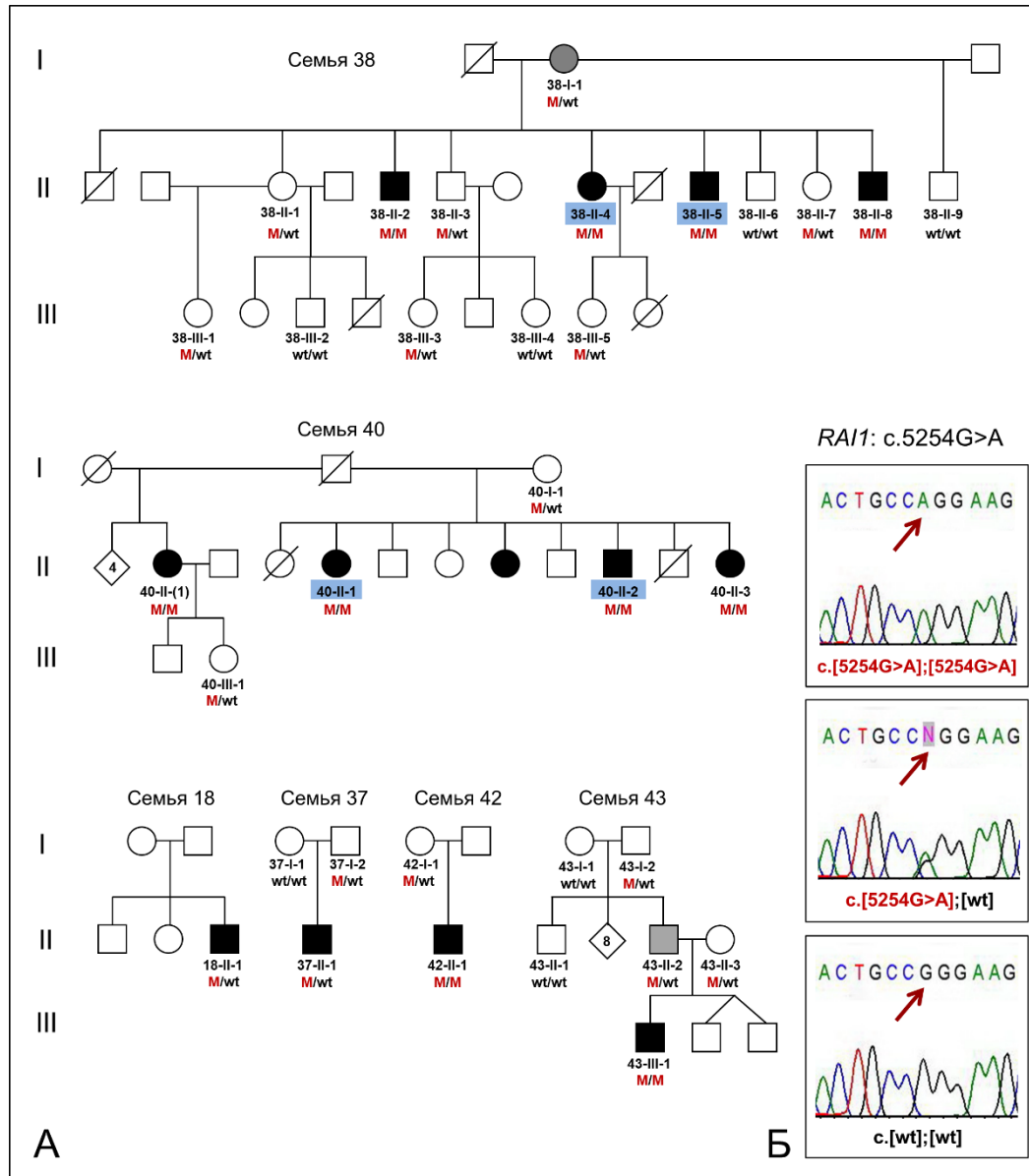


Рисунок 16. (А) Родословные алтайских семей с мутацией c.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAI1*: 38, 40 («WES-семьи») и 18, 37, 42, 43. Черным цветом помечены индивидуумы с выраженной (тугоухость III-IV степени) и полной (глухота) потерей слуха, серым – с умеренной потерей слуха. Полноэкзомное секвенирование было выполнено на образцах геномной ДНК индивидуумов с шифрами, выделенными голубым цветом. М – мутация c.5254G>A (p.Gly1752Arg); wt – норма («дикий» тип). **(Б)** Результаты секвенирования по Сэнгеру, демонстрирующие мутацию c.5254G>A в гене *RAI1*. Локализация мутации показана стрелками.

Больные из семей 38 и 40 с диагнозом «врожденная нейросенсорная тугоухость III-IV степени/глухота» впервые были обследованы в 2002г., в рамках проводимых работ по оценке вклада мутаций гена *GJB2* (Cx26) в этиологию потери слуха у населения Республики Алтай [Posukh et al., 2005]. После выявления методом полноэкзомного секвенирования гомозиготной мутации с.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAII* у больных из семей 38 и 40, в 2013г. было проведено их детальное медико-генетическое обследование и дополнительно получены образцы крови у родственников. Последующее секвенирование по Сэнгеру, проведенное у других членов этих семей, выявило косегрегацию гомозиготности мутации с.5254G>A (p.Gly1752Arg) с потерей слуха (**рисунок 16Б**).

Скрининг мутации с.5254G>A (p.Gly1752Arg) был также проведен в группе других *GJB2*-негативных алтайских больных с преимущественно врожденной или раннего проявления тяжелой потерей слуха, в результате которого было выявлено 5 индивидуумов из четырех других неродственных алтайских семей (18, 37, 42, 43), имеющих эту мутацию в гомозиготном (42-II-1 и 43-II-1) или гетерозиготном состоянии (18-II-1, 37-II-1, 43-II-2) (**рисунок 16А**).

Таким образом, общее число больных с мутацией с.5254G>A (p.Gly1752Arg) составило 14 человек, из которых 10 являлись гомозиготами (генотип с.[5254G>A];[5254G>A]) и 4 - гетерозиготами (генотип с.[5254G>A];[wt]) по этой мутации. Все больные, гомозиготные по с.5254G>A, имели врожденную (или выявленную в раннем детском возрасте) тяжелую потерю слуха (тугоухость III-IV степени и/или глухоту) без каких-либо других клинических симптомов, а у больных, гетерозиготных по с.5254G>A, начало заболевания и степень потери слуха варьировали. Так, у больного 18-II-1 (семья 18) с нейросенсорной глухотой в анамнезе отмечается перенесенное в 8-месячном возрасте заболевание, после которого он, предположительно, потерял слух. У больного 37-II-1 (семья 37) с тугоухостью II-III степени в анамнезе отмечается асфиксия новорожденного (обвитие пуповины) и ряд инфекционных заболеваний, перенесенных в раннем детском возрасте. Односторонняя (слева) тугоухость III степени у больного 43-II-2 (семья 43) возникла во взрослом состоянии, вероятно, как следствие хронического среднего отита. При медицинском обследовании, проведенном в 2013 г., выяснилось, что у матери (38-I-1) глухих sibсов из семьи 38, гетерозиготной по

мутации с.5254G>A (генотип с.[5254G>A];[wt]), имеющей нормальный слух на момент первичного обследования (2002 г.), наблюдалось существенное снижение слуха, которое она связывает с развитием гипертонической болезни и возрастом (1937 г.р.). От аудиологического обследования она отказалась, поэтому точная степень снижения слуха не была установлена.

Скрининг мутации с.5254G>A был также проведен в контрольной группе алтайцев (n=120) и было выявлено 4 гетерозиготных носителя этой мутации (генотип с.[5254G>A];[wt]), таким образом, частота гетерозиготного носительства с.5254G>A в популяции алтайцев составила 3.3% (4/120) (**Таблица 13**).

Частота мутации с.5254G>A (p.Gly1752Arg) в группе алтайских больных была сопоставлена с ее частотой в контрольной выборке алтайцев (**таблица 13**).

Таблица 13. Частота мутации с.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAI1* у алтайских пациентов и в контрольной выборке алтайцев.

	Неродственные алтайские пациенты (n=74, 148 аллелей)	Контрольная выборка алтайцев (n=120, 240 аллелей)
Частота мутации с.5254G>A	12/148 0.081	4/240 0.017
p-value	p=0.0026	

Для исключения возможного смещения оценки частоты с.5254G>A в выборке пациентов за счет присутствия в ней некоторого числа родственных индивидов, мы сформировали (на основе анализа родословных) выборку неродственных пациентов (74 чел., 148 аллелей) и оценили частоту мутации с.5254G>A в этой выборке алтайских пациентов. Частота мутации с.5254G>A в выборке алтайских больных статистически значимо превышала ее частоту в контрольной группе (**таблица 13**).

Ген *RAI1* (*retinoic acid induced gene 1*, 17p11.2, MIM 607642, 6 экзонов) кодирует retinoic acid-induced protein 1 (RAI1, 1906 а.к.), функциональная роль которого еще мало изучена. Известно, что делеции протяженного района 17-ой хромосомы (от 1.5 до 9 Мб; наиболее распространенные ~ 3.7 Мб), включающего ген *RAI1*, и дупликация этого района приводит к двум различным синдромам. При делеции района 17p11.2 возникает синдром Смита-Магениса (Smith-Magenis

Syndrome, SMS, MIM 182290), который является сложным врожденным заболеванием с различными аномалиями черепа и лица, задержкой психического развития, нарушениями когнитивных функций и циркадного ритма, а также поведенческими расстройствами (саморазрушительное и/или агрессивное поведение), у некоторой части больных с SMS наблюдается патология слуха, которая может варьировать от легкой до выраженной тугоухости и глухоты [Smith et al., 1998; Allanson et al., 1999; Potocki et al., 2000; Di Cicco et al., 2001; Liburd et al., 2001; Girirajan et al., 2006; Edelman et al., 2007; Elsea, Girirajan, 2008]. Частота SMS – 1:25000 новорожденных. Более 90% случаев возникновения SMS связаны с различными делециями, включающих ген *RAI1*. Приблизительно у 10% SMS пациентов были обнаружены гетерозиготные мутации в этом гене [Slager et al., 2003; Bi et al., 2004, 2006; Girirajan et al., 2005, 2006; Elsea, Girirajan, 2008; Truong et al., 2010; Vilboux et al., 2011; Vieira et al., 2012; Adams et al., 2014; Dubourg et al., 2014]. Дупликация в локусе 17p11.2 приводит к возникновению синдрома Потоцки-Лупски (Potocki–Lupski Syndrome, PTLs, MIM 610883), который характеризуется множественными врожденными аномалиями и легким слабоумием, аутизмом [Potocki et al., 2007; Treadwell-Deering et al., 2010]. Частота PTLs – 1:20000 новорожденных.

Было установлено, что белок RAI1 может проявлять транскрипционную активность [Slager et al., 2003; Bi et al., 2004, Carmona-Mora et al., 2010, 2012; Carmona-Mora, Walz, 2010; Darvekar et al., 2013]. N-концевая половина белка (1-1034 а.к.) обладает транскрипционной активностью, а С-концевая половина (1035-1906 а.к.) отвечает за его ядерную локализацию. Фенотип пациентов с синдромом Смита-Магениса, у которого мутации находятся в N-концевой части, существенно не отличался от фенотипа пациентов с мутациями в С-концевой части [Carmona-Mora et al., 2010, 2012]. Новая миссенс-мутация с.5254G>А в гене *RAI1* впервые обнаружена у алтайских пациентов с изолированной потерей слуха. Мутация с.5254G>А локализуется в экзоне 3 гена *RAI1* и приводит к замене глицина на аргинин в аминокислотной позиции 1752 (p.Gly1752Arg) белка RAI1 (**рисунок 17**). Подавляющее большинство всех известных на сегодняшний день мутаций в гене *RAI1*, обнаруженных у SMS пациентов, также локализовано в экзоне 3, который содержит более 90% кодирующей последовательности *RAI1* [Slager et al., 2003; Bi et

al., 2004, 2006; Girirajan et al., 2005, Carmona-Mora et al, 2010; Truong et al., 2010; Vieira et al, 2011; Adams et al., 2014; Dubourg et al., 2014].

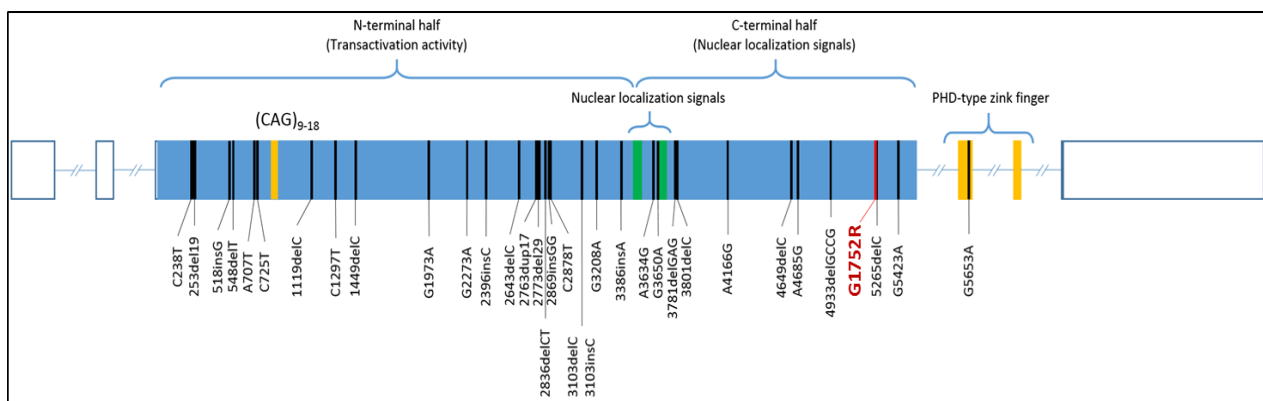


Рисунок 17. Схематическое представление гена *RAI1* со спектром мутаций, описанных у пациентов с SMS. PHD-type zink finger – домен типа «цинковый палец», Nuclear localization signals - сигналы ядерной локализации. (CAG)₉₋₁₈ - глутаминовые повторы. Голубым цветом обозначен экзон 3, красным отмечена мутация p.G1752R (p.Gly1752Arg, с.5254G>A), обнаруженная у алтайских пациентов.

Гомозиготность по мутации с.5254G>A (генотип с.[5254G>A];[5254G>A]), вероятно, приводит к возникновению поврежденных копий белка RAI1, что может повлиять на его способность, как транскрипционного фактора, связываться с потенциальными мишенями. Снижение слуха у некоторых индивидуумов, гетерозиготных по мутации с.5254G>A, вероятно, обусловлено воздействием внешних средовых факторов (асфиксия новорожденного, перенесенные заболевания, преклонный возраст) и не связано с носительством мутации с.5254G>A или же средовые факторы могли оказать определенный модулирующий эффект на снижение слуха у гетерозиготных носителей с.5254G>A.

Гаплотипы с мутацией с.5254G>A в гене *RAI1*. Для поиска возможных дополнительных патогенетических вариантов в сочетании с мутацией с.5254G>A у гетерозиготных по этой мутации пациентов с потерей слуха и проверки возможной общности аллелей с с.5254G>A, был проведен анализ всей кодирующей области гена *RAI1*, охватывающей экзоны 3, 4, 5 и часть 6 экзона, у 13 пациентов, гомозиготных или гетерозиготных по с.5254G>A, при помощи секвенирования по Сэнгеру. Были отобраны 4 неродственных пациента с потерей слуха, гомозиготных по с.5254G>A (38-II-5, 40-II-1, 42-II-1, 43-III-1), 4 индивидуума, гетерозиготных по с.5254G>A (18-II-1, 37-II-1, 38-I-1, 43-II-2) и 5 нормально слышащих с.5254G>A-гетерозигот,

включая трех родственников (37-I-2, 43-II-3, 38-II-1) (**рисунок 17**) и двух носителей с.5254G>A из алтайского контроля, чьи ДНК были доступны (Alt-1, Alt-2). Результаты секвенирования приведены в **таблице 14**.

В результате секвенирования гена *RAII* у с.5254G>A-гетерозигот с потерей слуха (18-II-1, 37-II-1, 38-I-1, и 43-II-2) не было выявлено дополнительных патогенных вариантов в анализированных фрагментах гена, но у исследуемых индивидуумов были обнаружены уже известные полиморфные варианты: rs3803763, rs11649804, rs8067439, rs110783980, а также вариации в числе глутаминовых повторов (CAG) в экзоне 3 гена *RAII*. На основании полученных данных были реконструированы гаплотипы с мутацией с.5254G>A (**таблица 14**). У всех гомозигот по с.5254G>A наблюдался один и тот же гаплотип - Аллель_{мут}: C-A-Q₁₃[CAG CAA (CAG)₁₀ del(CAG) CAA]-G-A, что указывает на общее происхождение мутации с.5254G>A у алтайцев. Для гетерозигот гаплотипы были реконструированы с помощью выделения Аллель_{мут} и присвоением соответствующих остаточных нуклеотидов ко второму аллелю. Таким образом, было реконструировано 5 различных гаплотипов (**таблица 14**).

Патогенетический вклад гена *RAII* в этиологию потери слуха у алтайцев. Скрининг мутации с.5254G>A в гене *RAII* у *GJB2*-негативных пациентов разного этнического происхождения в Республике Алтай выявил эту мутацию только у представителей коренного населения – алтайцев. Патогенетический вклад гена *RAII* в этиологию потери слуха у алтайцев, оцениваемый как доля больных, гомозиготных по мутации с.5254G>A гена *RAII*, составляет 10.8% (10/93). В популяционной выборке алтайцев частота гетерозиготного носительства мутации с.5254G>A гена *RAII* составила 3.3% (4/120).

У *GJB2*-негативных тувинских больных с потерей слуха (Республика Тыва) мутация с.5254G>A в гене *RAII* не была обнаружена, несмотря на географическую близость Алтая и Тувы и родственное происхождение коренного населения этих регионов.

Таблица 14. *RAII* генотипы с аллельным разнообразием у пациентов, гомозиготных и гетерозиготных по с.5254G>A.

Шифр	Генотипы					Аллели
	rs3803763 с.269G>C p.Gly90Ala	rs11649804 с.493C>A p.Pro165Thr	Вариации (CAG) повторов	rs8067439 с.1992G>A p.Pro664Pro	Мутация с.5254G>A p.Gly1752Arg	
Пациенты с потерей слуха гомозиготные по с.5254G>A						
38-II-5	C/C	A/A	Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA] / Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]	G/G	A/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
40-II-1	C/C	A/A	Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA] / Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]	G/G	A/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
42-II-1	C/C	A/A	Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA] / Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]	G/G	A/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
43-III-1	C/C	A/A	Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA] / Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]	G/G	A/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
Пациенты с потерей слуха гетерозиготные по с.5254G>A						
18-II-1	G/C	C/A	Q13 [CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA] / Q14 [CAGCAG (CAG)11 CAA]	G/A	G/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллель1: G-C-Q14[CAGCAG (CAG)11 CAA]-A-G
37-II-1	G/C	C/A	Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA] / Q13[CAGCAG (CAG)10 del(CAG) CAA]	G/A	G/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллель2: G-C-Q13[CAGCAG (CAG)10 del(CAG) CAA]-A-G
38-I-1	C/C	A/A	Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA] / Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]	G/G	G/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллель3: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-G
43-II-2	C/C	A/A	Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA / Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]	G/G	G/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллель3: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-G
Пациенты с нормальным слухом гетерозиготные по с.5254G>A						
37-I-2	C/C	A/A	Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA] / Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]	G/G	G/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллель3: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-G
43-II-3	C/C	A/A	Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA] / Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]	G/G	G/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллель3: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-G
38-II-1	C/C	A/A	Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA] / Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]	G/G	G/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллель3: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-G
Alt-1	C/C	A/A	Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA] / Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]	G/G	G/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллель3: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-G
Alt-2	C/C	C/A	Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA] / Q11[CAGCAG (CAG)8 del(CAG)3 CAA]	G/A	G/A	Аллельмут: C-A-Q13[CAGCAA (CAG)10 del(CAG) CAA]-G-A
						Аллель4: C-C-Q11[CAGCAG (CAG)8 del(CAG)3 CAA]-A-G

NM_030665 ref seq.: (CAG)₁₃ CAA=Q₁₄; вариации (CAG)-повторов (начиная с 832 нуклеотидной позиции) включают rs11078398: с.837G>A (caG/caA) p.Gln279Gln; кодоны: del(CAG) и del(CAG)₃. Общий для с.5254G>A гаплотип (Аллель_{мут}) выделен желтым цветом; Аллель₁, Аллель₂, Аллель₃ и Аллель₄ выделены серым, голубым, розовым и зеленым, соответственно. Нуклеотидные замены, формирующие общий для с.5254G>A (Аллель_{мут}) гаплотип, выделены красным цветом.

3.2.2 Мутация с.1111G>C в гене *OTOF* у алтайских больных с потерей слуха

В результате WES у двух индивидуумов из *GJB2*-негативной алтайской семьи 54 с рецессивно наследуемой глухотой неясной этиологии была выявлена новая гомозиготная мутация с.1111G>C (p.Gly371Arg) в гене *OTOF* (otoferlin, 2p23.3, MIM 603681, 48 экзонов). Последующее секвенирование по Сэнгеру выявило эту мутацию у 8 членов семьи 54 в гомо- (54-II-2, 54-II-3, 54-II-5, 54-II-6) и гетерозиготном (54-I-1, 54-II-4, 54-II-7, 54-III-1) состоянии (**рисунок 18**). Анализ родословной семьи 54 выявил косегрегацию гомозиготности мутации с.1111G>C с потерей слуха в этой семье: все индивидуумы с потерей слуха в семье 54 имели генотип с.[1111G>C];[1111G>C], а нормально слышащие члены этой семьи – генотип с.[1111G>C];[wt] (54-I-1, 54-II-4, 54-II-7, 54-III-1) или с.[wt];[wt] (54-II-1) (**рисунок 18**).

Скрининг мутации с.1111G>C (p.Gly371Arg) был также проведен в группе других *GJB2*-негативных алтайских больных и в семье 24, связанной родством с семьей 54. Мутация с.1111G>C (p.Gly371Arg) была обнаружена в гетерозиготном состоянии у трех индивидуумов: 24-I-2, 24-II-2, 24-II-3 (**рисунок 18**). Анализ родословной семьи 24, медицинской информации и полученных генотипов по гену *OTOF* для членов этой семьи, показал отсутствие сегрегации носительства одной копии мутации с.1111G>C с патологией слуха (как и в родственной семье 54). Так, больная 24-I с врожденной глухотой, больная 24-II-1 с умеренной потерей слуха (тугоухость II-III степени) и обследованные здоровые члены семьи 24 (24-2, 24-I-1) имеют генотип с.[wt];[wt]; больной 24-II-2 с врожденной тугоухостью III-IV степени и здоровые индивидуумы 24-I-2 и 24-II-3 - гетерозиготны по мутации с.1111G>C (генотип с.[1111G>C];[wt]) (**рисунок 18**). Можно заключить, что вероятной причиной потери слуха в семье 24 могут быть другие, не проанализированные в настоящей работе, гены, либо факторы среды.

Таким образом, потеря слуха у четырех алтайских больных (54-II-2, 54-II-3, 54-II-5, 54-II-6) обусловлена гомозиготностью по мутации с.1111G>C в гене *OTOF* (p.Gly371Arg).

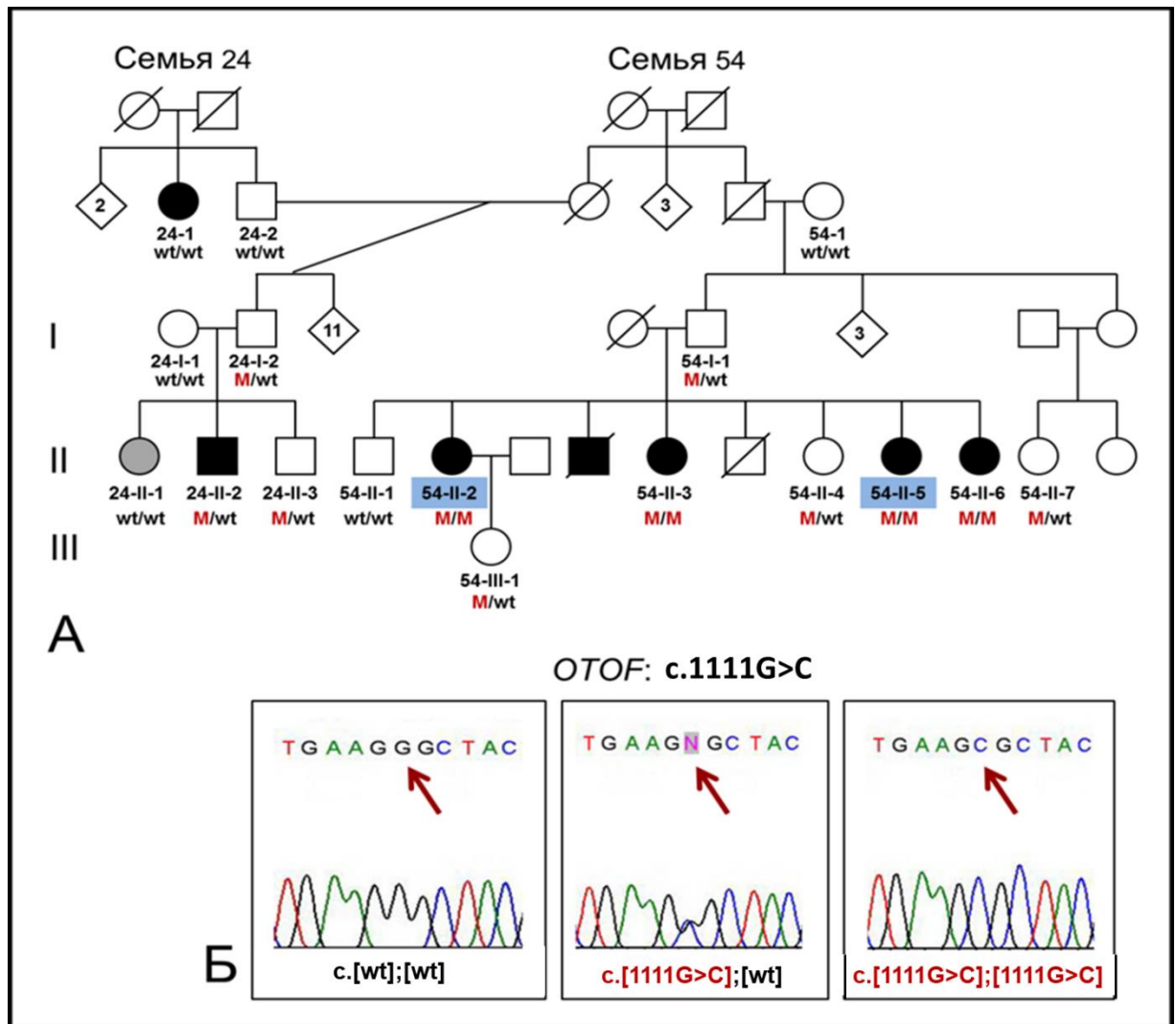


Рисунок 18. (А) Расширенная родословная «WES-семьи» 54 и семьи 24 с мутацией c.1111G>C (p.Gly371Arg) в гене *OTOF*. М - мутация c.1111G>C (p.Gly371Arg). Полноэкзомное секвенирование было выполнено на образцах геномной ДНК индивидуумов с шифрами, выделенными голубым цветом. (Б) Результаты секвенирования по Сэнгеру, демонстрирующие мутацию c.1111G>C в гене *OTOF*. Локализация мутации показана стрелками.

Выявленная новая миссенс-мутация c.1111G>C в экзоне 12 гена *OTOF* (otoferlin / отоферлин) приводит к замене глицина на аргинин в аминокислотной позиции 371 (p.Gly371Arg) между доменами C2В и C2С белка ОТОФ (рисунок 19).

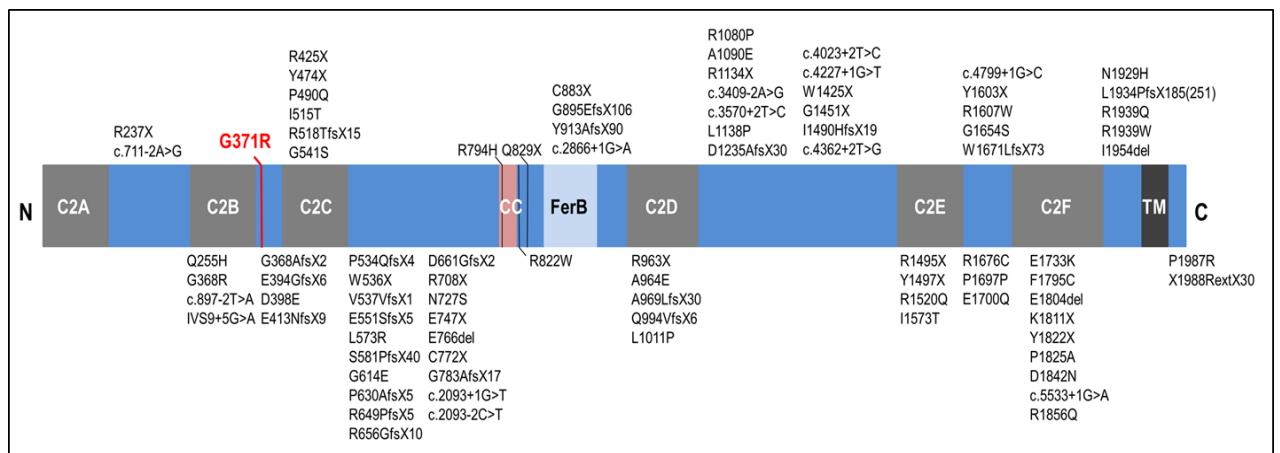


Рисунок 19. Схематичное представление доменной структуры белка OTOF со спектром мутаций, приводящих к потере слуха. Красным отмечена мутация G371R (p.Gly371Arg, c.1111G>C), которая была обнаружена у алтайских больных с изолированной потерей слуха. C2A–C2F – C2-домены OTOF: C2A (1-97 а.к.), C2B (254-352 а.к.), C2C (417-528 а.к.), C2D (960-1067 а.к.), C2E (1493-1592 а.к.), C2F (1733-1863 а.к.), TM – трансмембранный домен, FerB – Ferlin-специфичный мотив, CC – coiled coil domain (суперспираль). N - N-концевая часть белка, C – C-концевая часть белка. Синим цветом показаны междоменные участки белка.

Трансмембранный белок отоферлин, кодируемый геном *OTOF*, имеет несколько C2 доменов, которые участвуют в связывании кальция, и один трансмембранный домен около COOH-концевой части белковой молекулы. На данный момент известно около 90 мутаций (интронные, нонсенс- и миссенс-мутации, мутации сдвига рамки считывания, микроделеции, протяженные делеции) гена *OTOF*, которые приводят к потере слуха [Mahdiah et al., 2012] (**рисунок 19**). Биаллельные мутации гена *OTOF* являются причиной потери слуха, в среднем, у 2-3% больных с рецессивно наследуемой нейросенсорной потерей слуха и нейропатией слухового нерва (DFNB9, MIM 601071) [Yasunaga et al., 1999; Migliosi et al., 2002; Tekin et al., 2005; Rodríguez-Ballesteros et al., 2008; Choi et al., 2009; Mahdiah et al., 2012; Matsunaga et al., 2012; Iwasa et al., 2013]. Ранее, в регионе между C2B и C2C доменами, где локализуется выявленная нами новая мутация p.Gly371Arg (c.1111G>C), были обнаружены четыре мутации: c.1103_1104delinsC (p.Gly368AfsX2), c.1180dupG (p.Glu394GfsX6), c.1236delC (p.Glu413NfsX90), и c.1194T>A (p.Asp398Glu) у пациентов с выраженной тугоухостью и глухотой из Пакистана [Choi et al., 2009], Испании [Rodriguez-Ballesteros et al., 2008] и Китая [Wang et al., 2010a].

Патогенетический вклад гена *OTOF* в этиологию потери слуха у алтайцев. Скрининг мутации с.1111G>C в гене *OTOF* у *GJB2*-негативных пациентов разного этнического происхождения в Республике Алтай выявил эту мутацию только у представителей коренного населения – алтайцев. Патогенетический вклад гена *OTOF* в этиологию потери слуха у алтайцев, оцениваемый как доля больных, гомозиготных по мутации с.1111G>C гена *OTOF*, составляет 4.3% (4/93).

Скрининг мутации с.1111G>C не выявил эту мутацию в контрольной выборке алтайцев (n=120) и у тувинских больных с потерей слуха.

3.2.3. Территориальное распределение мутаций с.5254G>A (*RAII*), с.1111G>C (*OTOF*) в Республике Алтай

Анализ мест рождения всех индивидуумов с мутациями с.5254G>A (*RAII*) и с.1111G>C (*OTOF*) (больные, их родственники и гетерозиготные носители мутации в контрольной выборке алтайцев) позволил графически представить распространенность этих мутаций по территории Республики Алтай (**рисунок 20**). Территория Республики Алтай подразделена на 10 административных районов, примерно соответствующих определенным родовым территориям алтайцев в прошлом [Потапов, 1969]. Можно заметить, что аллели с мутацией с.5254G>A (ген *RAII*), в основном, аккумулируются на территории двух смежных районов – Усть-Канском и Онгудайском (**рисунок 20**), что, вероятно, определяется эффектом основателя и сохраняющейся до настоящего времени ограниченностью миграций алтайцев за пределы своих родовых территорий [Лузина, 1987; Осипова и др., 1997; Посух и др., 1998]. Та же тенденция прослеживается и в распространенности мутации с.1111G>C в гене *OTOF*, которая была найдена только в Кош-Агачском районе Республики Алтай.

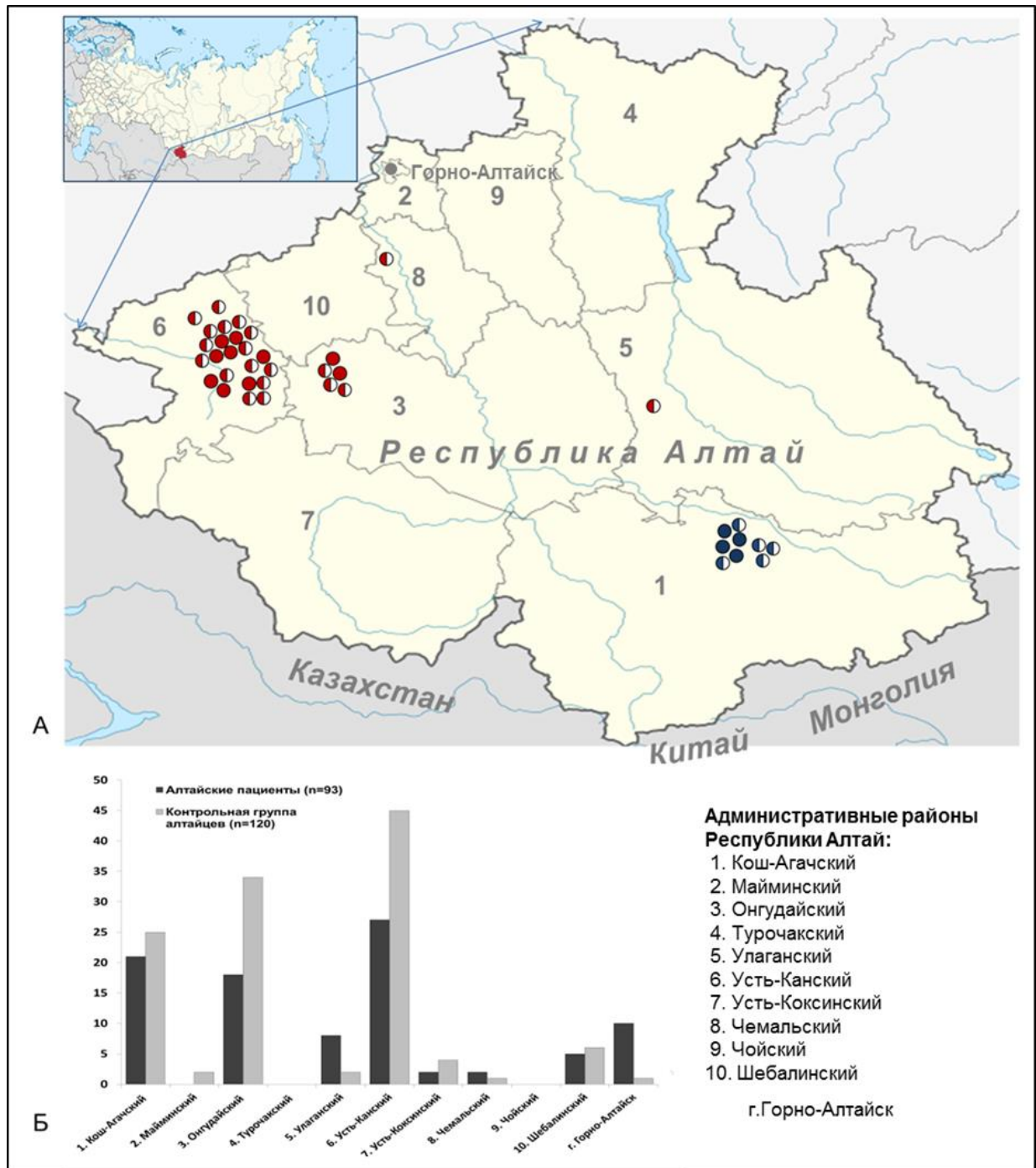


Рисунок 20. (А) Распространенность аллелей с мутациями с.5254G>A (*RAII*) и с.1111G>C (*OTOF*) по территории Республики Алтай (получено на основе данных о месте рождения, в отдельных случаях, месте проживания, всех индивидуумов, имеющих данные мутации: больные, их родственники и гетерозиготные носители из контрольной выборки алтайцев. (Б) Распределение алтайских пациентов с потерей слуха и индивидуумов из контрольной выборки алтайцев по месту рождения (в отдельных случаях, месту проживания) по территории Республики Алтай.

●, ● - мутация с.5254G>A (*RAII*) в гомо- и гетерозиготном состоянии;
●, ● - мутация с.1111G>C (*OTOF*) в гомо- и гетерозиготном состоянии.

3.3. Скрининг мутации m.1555A>G (*MT-RNR1*) митохондриальной ДНК у тувинских и алтайских больных

Мутация m.1555A>G в гене *MT-RNR1* (12S рРНК) является наиболее частой среди всех вариаций мтДНК, ассоциированных с несиндромальной потерей слуха. В результате ранее проведенного скрининга этой мутации, наряду с другими мутациями мтДНК, в выборке алтайских пациентов с потерей слуха и в контрольной выборке алтайцев, мутация m.1555A>G не была обнаружена [Джемилева и др., 2009]. Мы провели поиск мутации m.1555A>G в выборке тувинских пациентов с потерей слуха неясной этиологии методом ПЦР-ПДРФ, в результате которого эта мутация также не была обнаружена (рисунок 21).

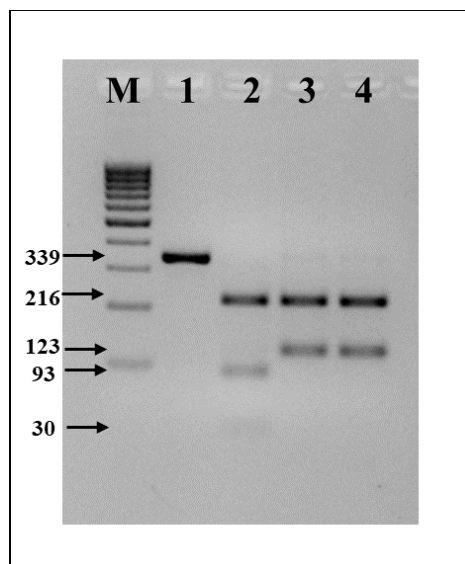


Рисунок 21. Детекция мутации m.1555A>G. М – маркёр с фрагментами от 100 п.н. до 1000 п.н. (шаг 100 п.н.). Дорожка 1 – образец, необработанный эндонуклеазой рестрикции *Hae III*, дорожка 2 – образец с мутацией m.1555A>G, дорожки 3,4 – образцы без мутации m.1555A>G. В качестве контроля (образец с мутацией m.1555A>G) использовался образец ДНК пациентки (русской по этнической принадлежности из Республики Алтай) с умеренной потерей слуха, возникшей во взрослом возрасте после лечения антибиотиками.

3.4 Сравнительный анализ генетической компоненты в этиологии слуха у тувинцев и алтайцев

В таблице 15 приведены суммарные результаты поиска молекулярно-генетических причин потери слуха у коренного населения Республик Тыва и Алтай (тувинцев и алтайцев) на основе секвенирования кодирующих областей (с фланкирующими участками) последовательности генов *GJB2* и *SLC26A4* и скрининга отдельных точечных мутаций в генах *RAI1*, *OTOF* и *MT-RNR1* (мтДНК).

Таблица 15. Структура генетической компоненты в этиологии слуха у тувинских и алтайских пациентов.

Ген	Патогенетический вклад в этиологию потери слуха * и мутационный спектр (доля мутации среди всех выявленных мутантных аллелей, %)			
	Тувинские пациенты (n=220)		Алтайские пациенты (n=93)	
<i>GJB2</i>	22.3% (49/220)	c.516G>C (p.Trp172Cys) (62.9%) c.-23+1G>A (27.6%) c.235delC (5.2%) c.299_300delAT (2.6%) c.109G>A (p.Val37Ile) (1.7%)	15.1% (14/93)	c.235delC (51.9%) c.516G>C (p.Trp172Cys) (29.6%) c.-23+1G>A (14.8%) c.224G>A (p.Arg75Gln) (3.7%)
<i>SLC26A4</i>	28.2% (62/220)	c.919-2A>G (69.3%) c.2027T>A (p.Leu676Gln) (17.5%) c.1545T>G (p.Phe515Leu) (8.0%) c.170C>A (p.Ser57*) (4.4%) c.2034+1G>A (0.7%)	4.3% (4/93)	c.2168A>G (p.His723Arg) (44.5%) c.2027T>A (p.Leu676Gln) (33.3%) c.919-2A>G (22.2%)
<i>RAI1</i> (c.5254G>A)	0%	-	10.8% (10/93)	c.5254G>A (p.Gly1752Arg)
<i>OTOF</i> (c.1111G>C)	0%	-	4.3% (4/93)	c.1111G>C (p.Gly371Arg)
<i>MT-RNR1</i> (m.1555A>G)	0%	-	0%	-
Суммарно	50.5% (111/220)		34.5% (32/93)	

* - Патогенетический вклад гена в этиологию потери слуха определяется долей больных, имеющих биаллельные рецессивные мутации генов *GJB2* (включая одного алтайского пациента с доминантной мутацией c.224G>A), *SLC26A4*, *RAI1*, или *OTOF*. Доминантная мутация c.224G>A (p.Arg75Gln) гена *GJB2* выделена жирным шрифтом. Результаты анализа гена *GJB2* и скрининга мутации m.1555A>G (*MT-RNR1*, мтДНК) у алтайских пациентов получены ранее [Posukh et al., 2005; Джемилева и др. 2009].

В выборке тувинских пациентов, молекулярно-генетический диагноз, обусловленный наличием мутаций в генах *GJB2* и *SLC26A4*, может быть установлен для 111 человек, что составляет более половины (50.5%) анализируемой выборки (n = 220). В выборке алтайских пациентов (n = 93) мутации в генах *GJB2*, *SLC26A4*, *RAI1*, *OTOF* являются причиной потери слуха у 32 больных (34.5%). Скрининг мутации m.1555A>G (*MT-RNR1*) митохондриальной ДНК не выявил ее как у тувинских, так и алтайских пациентов.

Ген *GJB2*. Ранее нашей группой был проведен детальный анализ аллельного разнообразия гена *GJB2* у коренного населения Республик Тыва и Алтай: был

охарактеризован его мутационный спектр, выявлены мажорные мутации и специфические полиморфные варианты, оценена частота гетерозиготного носительства рецессивных *GJB2*-мутаций у населения изучаемых регионов [Бады-Хоо и др., 2014а,б; Бады-Хоо, 2016; Зыцарь, 2020; Posukh et al., 2005, 2019; Zytsar et al., 2018; 2020]. Выявлено сходство мутационного спектра гена *GJB2* у тувинцев и алтайцев: в обеих выборках пациентов преобладают три рецессивные мутации этого гена - с.516G>C (p.Trp172Cys), с.-23+1G>A и с.235delC. В работах [Зыцарь, 2020; Posukh et al., 2019] получены убедительные свидетельства общности происхождения этих мутаций и существенной роли эффекта основателя в их распространенности у тувинцев и алтайцев, а также оценено ориентировочное время возникновения этих мутаций на территории Южной Сибири. Суммарная доля мутаций с.516G>C, с.-23+1G>A и с.235delC составляет 95.7% у тувинцев и 96.3% у алтайцев (**таблица 15**). Таким образом, хотя соотношение их частот различается в анализируемых выборках больных - у тувинцев преобладает мутация с.516G>C, а у алтайцев – мутация с.235delC (**таблица 15**), скрининг этих трех мутаций гена *GJB2* у коренного населения Тувы и Алтая обладает высокой диагностической информативностью при выяснении молекулярно-генетических причин потери слуха у тувинских и алтайских пациентов.

Ген *SLC26A4*. Результаты, полученные при секвенировании по Сэнгеру кодирующей области (с фланкирующими участками) гена *SLC26A4* у тувинских и алтайских пациентов демонстрируют существенные различия в размере патогенетического вклада мутаций этого гена в этиологию потери слуха у представителей коренного населения Тувы и Алтая - тувинцев (28.2%) и алтайцев (4.3%) (**таблица 15**). Широко распространенная в азиатских популяциях мутация с.919-2A>G обнаружена в обеих выборках пациентов, в то время как другая, также характерная для азиатских популяций, мутация с.2168A>G (p.His723Arg) выявлена только у алтайских пациентов. Стоит отметить, что мутация с.2027T>A (p.Leu676Gln), являясь второй по встречаемости в обеих выборках тувинских и алтайских пациентов (**таблица 15**), редко встречается в других азиатских популяциях. Редкой в других популяциях является мутация с.2034+1G>A (у тувинских пациентов). Интересным результатом является обнаружение нового *SLC26A4*-варианта с.1545T>G (p.Phe515Leu) у тувинских пациентов. Совокупность

полученных данных (сегрегация этого варианта с потерей слуха в родословной пациентов, значимое превышение его частоты в выборке больных по сравнению с контрольной выборкой, результаты предсказательных программ) свидетельствует в пользу патогенетической значимости варианта с.1545T>G.

Для регион-специфичной ДНК-диагностики потери слуха у коренного населения Тувы, основываясь на полученных данных, приоритетным является скрининг мутации с.919-2A>G, которая в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии является причиной потери слуха у подавляющего большинства (56 из 62) обследованных тувинских пациентов, имеющих биаллельные рецессивные мутации гена *SLC26A4*. Скрининг мутации с.2168A>G (p.His723Arg) у коренного населения Алтая может быть применен при ДНК-диагностике потери слуха, хотя, учитывая данные о незначительном патогенетическом вкладе мутаций гена *SLC26A4* (4.3%) в этиологию потери слуха у алтайских пациентов, такой скрининг не является приоритетным.

Гены *RAI1* и *OTOF*. В результате полноэкзомного секвенирования (WES) в нескольких алтайских семьях с рецессивным наследованием глухоты неясной этиологии были выявлены мутации с.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAI1* и с.1111G>C (p.Gly371Arg) в гене *OTOF*, ассоциированные с потерей слуха. И, если *OTOF* является уже известным «геном глухоты», то ассоциация гена *RAI1* с изолированной потерей слуха была показана впервые. Последующий скрининг этих мутаций выявил их и у других алтайских пациентов, в то время как они не были обнаружены у тувинских пациентов, несмотря на географическую близость Алтая и Тувы и общие этапы этногенеза коренного населения этих регионов. Мы показали, что относительно высокая региональная распространенность мутации с.5254G>A в гене *RAI1* у алтайцев определяется эффектом основателя (см. раздел 3.2.3). Учитывая существенный вклад мутации с.5254G>A (*RAI1*), целесообразно включить скрининг этой мутации в ДНК-диагностику потери слуха у коренного населения Республики Алтай.

Таким образом, на основе полученных результатов и с учетом предыдущих молекулярно-генетических исследований наследственной глухоты у коренного населения Тувы и Алтая была определена доля «генетических случаев» потери слуха в выборках тувинских и алтайских пациентов – 50.5% и 34.5%, соответственно. В

выборках тувинских и алтайских больных с потерей слуха невыясненной этиологии, наряду со спорадическими случаями, которые, возможно, обусловлены негенетическими причинами, присутствуют пациенты из семей с двумя и более глухими индивидами, что с большой вероятностью указывает на наследственный характер патологии слуха в таких семьях. Таким образом, мы полагаем, что доля больных с генетическими формами потери слуха может быть выше. В дальнейшем, мы планируем продолжить поиск причин потери слуха в семейных случаях с применением метода полноэкзомного секвенирования (WES).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несиндромальная наследственная глухота характеризуется уникальной генетической гетерогенностью: картировано около 160 локусов и идентифицировано не менее 120 генов, ассоциированных с потерей слуха. Известна широкая этногеографическая вариабельность в распространенности различных форм наследуемой глухоты. Наиболее частой причиной потери слуха являются мутации в гене *GJB2*. Ранее нашей группой было установлено, что мутации гена *GJB2* являются причиной глухоты у 15.1% больных на Алтае (алтайцы) и у 22.3% больных в Туве (тувинцы), но для большей части пациентов причины потери слуха не были установлены. Вторым по значимости для ряда популяций является ген *SLC26A4*. Следует отметить, что вследствие большого размера гена *SLC26A4* (21 экзон) существуют трудности в его полномасштабном мутационном анализе, особенно на больших выборках обследуемых. В связи с этим, для создания оптимального алгоритма поиска патогенетических вариантов в гене *SLC26A4* предварительно был проведен биоинформатический анализ последовательности этого гена. В результате мы показали, что первоочередное тестирование десяти областей гена *SLC26A4* (экзоны 4, 6, 10, 11, 13-17, 19 с фланкирующими интронными сайтами сплайсинга) может обеспечить одноэтапное выявление 61.9% (373/603) всех известных в настоящее время патогенетических и вероятно патогенетических вариантов этого гена.

На основе разработанного нами диагностического алгоритма, впервые на территории Сибири, был проведен молекулярно-генетический анализ последовательности гена *SLC26A4* в масштабных выборках тувинцев и алтайцев с потерей слуха неустановленной этиологии. Было показано, что, несмотря на географическую близость Алтая и Тувы и общность происхождения их коренных народов, имеются значительные различия в размере патогенетического вклада гена *SLC26A4*, поскольку биаллельные *SLC26A4*-мутации были выявлены у 28.2% обследованных тувинских пациентов и только у 4.3% алтайских пациентов. У пациентов с *SLC26A4*-мутациями часто наблюдается аномалия костного лабиринта внутреннего уха – расширенный водопровод преддверия (EVA). Обследование с помощью компьютерной томографии (КТ) височных костей, проведенного у 27 тувинских пациентов, гомозиготных или компаунд-гетерозиготных по мутациям

гена *SLC26A4*, выявило EVA у большинства (24 из 27) обследованных пациентов. Выраженность EVA может различаться на разных ушах у одного и того же пациента с мутациями гена *SLC26A4* и характеризуется как внутрисемейной, так и межсемейной двухстороннее расширение водопровода преддверия.

Был выявлен специфический спектр вариаций последовательности гена *SLC26A4*: известные патогенетические варианты – c.170C>A (p.Ser57*), c.919-2A>G, c.2027T>A (p.Leu676Gln), c.2034+1G>A, c.2168A>G (p.His723Arg), новый, неописанный ранее, вариант c.1545T>G (p.Phe515Leu), а также ряд полиморфных вариантов этого гена (как уже известных, так и новых). В пользу патогенетической значимости нового варианта c.1545T>G был получен ряд свидетельств: результаты биоинформатических предсказательных программ, сегрегация этого варианта с потерей слуха в родословной пациентов, статистически значимое превышение его частоты в выборке больных по сравнению с контрольной выборкой.

Наиболее распространенной у тувинцев является мутация c.919-2A>G (частота у больных – 69.3%, частота гетерозиготного носительства в контрольной выборке – 5.1%), таким образом, скрининг c.919-2A>G является приоритетным для регион-специфичной ДНК-диагностики потери слуха у коренного населения Тувы. Мы предположили, что в основе широкой распространенности мутации c.919-2A>G у тувинцев лежит эффект основателя. Анализ генетического окружения (гаплотипы) участка хромосомы 7 с помощью генотипирования генетических маркеров (STRs и SNPs) выявил высокую специфичность и сходство STR- и SNP-гаплотипов, включающих мутацию c.919-2A>G, что предполагает общность ее происхождения и соответствует гипотезе о ведущей роли эффекта основателя в широкой распространенности этой мутации на территории Республики Тыва.

Для поиска генетических факторов, приводящих к потере слуха, был применен метод полноэкзомного секвенирования в нескольких алтайских семьях (Республика Алтай) с рецессивным наследованием глухоты неясной этиологии и были выявлены новые мутации в генах *RAI1* (c.5254G>A) и *OTOF* (c.1111G>C), ассоциированные с потерей слуха в этих семьях. Ген *OTOF* является уже известным «геном глухоты» (Hereditary Hearing Loss Homepage. <https://hereditaryhearingloss.org>), а ассоциация гена *RAI1* с изолированной потерей слуха показана впервые. Патогенетический вклад генов *RAI1* и *OTOF* в этиологию

потери слуха у алтайцев составил 10.8% и 4.3%, соответственно, в то время как у тувинских пациентов мутаций этих генов не было выявлено. Частота гетерозиготного носительства мутации с.5254G>A (*RAII*) в контрольной выборке алтайцев составила 3.3%. Установлено единство гаплотипа с мутацией с.5254G>A (*RAII*), что свидетельствует в пользу общности ее происхождения. Выявлено локальное распределение мутаций с.5254G>A (*RAII*) и с.1111G>C (*OTOF*) на территории Республики Алтай, что, вероятно, определяется эффектом основателя и сохраняющейся до настоящего времени ограниченностью миграций алтайцев за пределы своих родовых территорий.

Скрининг наиболее частой мутации m.1555A>G в гене *MT-RNR1* (мтДНК), ассоциированной с несиндромальной потерей слуха, не выявил ее у тувинских и алтайских пациентов.

На основе полученных результатов и с учетом предыдущих молекулярно-генетических исследований наследственной глухоты у коренного населения Тувы и Алтая, можно заключить, что генетическая компонента в этиологии потери слуха составляет 50.5% у тувинцев (мутации в генах *GJB2* и *SLC26A4*) и 34.5% у алтайцев (мутации в генах *GJB2*, *SLC26A4*, *RAII*, *OTOF*). В результате исследования были выявлены мутации анализируемых генов, наиболее значимые для тестирования при разработке регион-специфической ДНК-диагностики потери слуха.

ВЫВОДЫ

1. В результате молекулярно-генетического анализа гена *SLC26A4* у тувинских и алтайских пациентов с потерей слуха невыясненной этиологии было установлено:

- Доля пациентов с потерей слуха, определяемой мутациями гена *SLC26A4*, существенно различается: 28.2% (62/220) – у тувинцев и 4.3% (4/93) – у алтайцев;
- Выявлен специфический спектр мутаций: широко распространённые в азиатских популяциях мутации с.919-2A>G и с.2168A>G, редкие в других популяциях патогенетические варианты с.170C>A, с.2027T>A, с.2034+1G>A, и новый вариант с.1545T>G, для которого получены свидетельства его патогенетической значимости.

2. Среди всех мутантных аллелей гена *SLC26A4*, выявленных у тувинцев, наибольшую частоту имеет мутация с.919-2A>G: у больных с потерей слуха – 69.3%, а частота ее гетерозиготного носительства в контрольной выборке – 5.1%. Анализ STR- и SNP-гаплотипов, фланкирующих мутацию с.919-2A>G, выявил высокую специфичность и сходство ее генетического окружения, что соответствует гипотезе о ведущей роли эффекта основателя в широкой распространенности с.919-2A>G в Республике Тыва.

3. Методом полноэкзомного секвенирования у алтайских пациентов с аутосомно-рецессивным типом наследования потери слуха идентифицированы новые патогенетические варианты: с.1111G>C (p.Gly371Arg) в гене *OTOF* и с.5254G>A (p.Gly1752Arg) в гене *RAI1*, ассоциация которого с потерей слуха установлена впервые. Доля алтайских пациентов, гомозиготных по с.5254G>A (*RAI1*) или по с.1111G>C (*OTOF*), составила 10.8% (10/93) и 4.3% (4/93), соответственно, в то время как у тувинских пациентов эти мутации не были обнаружены. Частота гетерозиготного носительства с.5254G>A (*RAI1*) в популяции алтайцев составила 3.3%. У всех носителей мутации с.5254G>A выявлен единый гаплотип участка хромосомы 17, что свидетельствует об общем происхождении этой мутации.

4. Доля выявленных генетических форм потери слуха в выборках исследуемых пациентов составила 28.2% – у тувинцев (ген *SLC26A4*) и 19.4% – у алтайцев (гены *SLC26A4*, *RAI1*, *OTOF*). Суммарно, с учетом полученных ранее

данных (вклад мутаций гена *GJB2* у тувинцев – 22.3% и у алтайцев – 15.1%), молекулярно-генетический диагноз может быть установлен для существенной доли обследуемых пациентов с глухотой (50.5% – для тувинцев и 34.5% – для алтайцев). Были выявлены мутации, наиболее значимые для регион-специфичной ДНК-диагностики потери слуха.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. – 2014а. – Т.13. №1. – С.17-26.

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.

Бады-Хоо М.С. Изучение молекулярных механизмов и распространенности наследственной глухоты в Республике Тыва: Автореф. Дис. канд. биол. наук. Н. 2016. - 17с.

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. №4. Т.40. - С.101-104.

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., Васиљева 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. – 2015. – №8. – С.25-36.

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 tRNA^{Ser}(UCN) мтДНК у больных несиндромальной сенсоневральной тугоухостью/глухотой, из различных регионов России // Генетика. – 2009. – Т.45. №7. – С.982-991.

Джемилева Л.У., Посух О.Л., Барашков Н.А., Федорова С.А., Терютин Ф.М., Ахметова В.Л., Хидиятова И.М., Хусаинова Р.И., Лобов С.Л., Хуснутдинова Э.К. Оценка гаплотипического разнообразия и реконструкция предкового гаплотипа, ассоциированного с мутацией с.35delG гена *GJB2* (Cx26), в популяциях Волго-Уральского региона // Acta Naturae. - 2011. - Т.3. №3(10). - С.54-65.

Зыцарь М.В. Аллельное разнообразие гена *GJB2* у населения ряда регионов Сибири. Автореф. Дис. канд. биол. наук. Н. 2020.-17 с.

Лобов С. Л., Джемилева Л. У., Хуснутдинова Э. К. Молекулярно-генетический анализ генов *GJB2*, *SLC26A4* и *SLC26A5* у больных с наследственными нарушениями слуха из республики Башкортостан // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13, № 5(3). – С. 251-255.

Лобов С. Л. Структурные особенности генов пендрина (*SLC26A4*) и престина (*SLC26A5*) у больных наследственной несиндромальной сенсоневральной глухотой. Автореферат УФА – 2013

Лузина Ф.А. Наследственный полиморфизм и генетические процессы в коренном населении Горного Алтая // Автореф. дис канд. биол. наук. – М.: МГУ, 1987. – 17с.

Маркова Т. Г., Гептнер Е.Н., Лалаянц М. Р., Зеликович Е. И., Чугунова Т. И., Миронович О., Л., Близнец Е. А., Поляков А. В., Таварткиладзе Г. А. Синдром Пендреда (обзор литературы и клинические наблюдения). // Вестник оториноларингологии. – 2016. – Т. 6. – С. 25-31.

Миронович О., Л., Близнец Е. А., Маркова Т. Г., Гептнер Е.Н., Лалаянц М. Р., Зеликович Е. И., Таварткиладзе Г. А., Поляков А. В. Результаты молекулярно-генетического исследования российских пациентов с синдромом Пендреда и аллельными заболеваниями. // Генетика. – 2017. – Т. 53 № 1. – С. 88-99.

Миронович О.Л. Генетическая гетерогенность несиндромальной и имитирующей ее синдромальной тугоухости. Автореф. Дис. канд. биол. наук. М. – 2019.

Осипова Л.П., Кашинская Ю.О., Посух О.Л., Ивакин Е.А., Крюков Ю.А. Генетико-демографический анализ популяции алтайцев пос. Мендур-Соккон (Республика Алтай) // Генетика. 1997. 33(11):1559-1564.

Посух О.Л., Осипова Л.П., Кашинская Ю.О., Ивакин Е.А., Крюков Ю.А., Карафет Т.М., Казаковцева М.А., Скобельцина Л.М., Кроуфорд М.Г., Лефранк, Лефранк Ж. Генетический анализ структуры популяции южных алтайцев пос. Мендур-Соккон (Республика Алтай) // Генетика. 1998. 34(1):106-113.

Потапов Л.П. Этнический состав и происхождение алтайцев // Л.: Наука, 1969 – 196с.

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. – Т.14. №6. – С.10-21.

Пшенникова В.Г., Барашков Н.А., Терютин Ф.М., Федотова Э.Е., Соловьев А.В., Романов Г.П., Дьяконов Е.Е., Морозов И.В., Бондарь А.А., Сазонов Н.Н.,

Алексеев А.Н., Посух О.Л., Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К., Томский М.И., Федорова С.А. Поиск мутаций в генах *GJB6* (Cx30) и *GJB3* (Cx31) у глухих пациентов с моноаллельными мутациями гена *GJB2* (Cx26) в Якутию // Генетика. – 2017. – Т.53. №6. – С.705-715.

Пшенникова В.Г., Терютин Ф.М., Барашков Н.А., Готовцев Н.Н., Никанорова А.А., Соловьев А.В., Романов Г.П., Посух О.Л., Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А. Постлингвальная глухота в Эвено-Бытангайском районе Якутии: аудиологический и клинко-генеалогический анализ // Якутский медицинский журнал. – 2018. – Т. 4. – С.47-52.

Пшенникова В.Г., Романов Г.П., Николаева Т.М., Терютин Ф.М., Борисова Т.В., Комарьков И.Ф., Антонец А.В., Соловьев А.В., Кларов Л.А., Бондарь А.А., Морозов И.В., Посух О.Л., Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А., Барашков Н.А. Новая нонсенс-мутация с.1121G>A (p.Trp374*) гена *CLIC5* – основная причина ювенильной аутосомно-рецессивной формы глухоты (DFNB103), очаги накопления которой обнаружены в арктических районах Якутии // Медицинская генетика. – 2019. – Т.18(10). – С. 36-48.

Соловьев А.В., Барашков Н.А., Бады-Хоо М.С., Зыцарь М.В., Посух О.Л., Пшенникова В.Г., Терютин Ф.М., Романов Г.П., Рафаилов А.М., Сазонов Н.Н., Алексеев А.Н., Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К., Федорова С.А. Реконструкция SNP-гаплотипов с мутацией с.-23+1G>A гена *GJB2* (хромосома 13) в некоторых популяциях Евразии // Генетика. – 2017. – Т.53. № 8, – С.988-993.

Терютин Ф.М., Пшенникова В.Г., Борисова У.П., Барашков Н.А., Романов Г.П., Соловьев А.В., Бондарь А.А., Морозов И.В., Джемилева Л.У., Хуснутдинова Э.К., Томский М.И., Посух О.Л., Федорова С.А. Поиск мутаций в генах *PAX3*, *MITF*, *SOX10* и *SNAI2* при синдроме Ваарденбурга в Якутии // Медицинская генетика. – 2018. – Т.17. №12. – С.25-29.

Adams D.R., Yuan H., Holyoak T., Aaraj K.H., Hakimi P., Markello T.C., Wolfe L.A., Vilboux T., Burton B.K., Fajardo K.F., Grahame G., Holloman C., Sincan M., Smith A.C., Wells G.A., Huang Y., Vega H., Snyder J.P., Golas G.A., Tiffet C.J., Boerkoel C.F., Hanson R.W., Traynelis S.F., Kerr D.S., Gahl W.A. Three rare diseases in one Sib pair: *RAI1*, *PCK1*, *GRIN2B* mutations associated with Smith-Magenis Syndrome, cytosolic PEPCCK deficiency and NMDA receptor glutamate insensitivity // Mol Genet Metab. – 2014. – Vol. 113(3). – P. 161-170.

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.

Ahmed Z.M., Morell R.J., Riazuddin S., Gropman A., Shaukat S., Ahmad M.M., Mohiddin S.A., Fananapazir L., Caruso R.C., Husnain T., Khan S.N., Riazuddin S., Griffith A.J., Friedman T.B., Wilcox E.R. Mutations of *MYO6* are associated with recessive deafness, DFNB37 // Am J Hum Genet. – 2003. – Vol. 72(5). – P. 1315-1322.

Albert S., Blons H., Jonard L., Feldmann D., Chauvin P., Loundon N., Sergent-Allaoui A., Houang M., Joannard A., Schmerber S., Delobel B., Leman J., Journal H., Catros H., Dollfus H., Eliot M.M., David A., Calais C., Drouin-Garraud V., Obstoy M.F., Tran Ba Huy P., Lacombe D., Duriez F., Francannet C., Bitoun P., Petit C., Garabédian E.N., Couderc R., Marlin S., Denoyelle F. *SLC26A4* gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations // *Eur J Hum Genet.* – 2006. – Vol. 14. – P. 773-779.

Allanson J.E., Greenberg F., Smith A.C. The face of Smith-Magenis syndrome: a subjective and objective study // *J Med Genet.* – 1999. – Vol. 36(5). – P. 394-397.

Alper S.L., Sharma A.K. The *SLC26* gene family of anion transporters and channels // *Mol Aspects Med.* – 2013. – Vol. 34(2-3). – P.494-515.

Ammar-Khodja F., Bonnet C., Dahmani M., Ouhab S., Lefèvre G.M., Ibrahim H., Hardelin J.P., Weil D., Louha M., Petit C. Diversity of the causal genes in hearing impaired Algerian individuals identified by whole exome sequencing // *Mol Genet Genomic Med.* – 2015. – Vol. 3(3). – P. 189-196.

Anwar S., Riazuddin S., Ahmed Z.M., Tasneem S., Ateeq-ul-Jaleel, Khan S.Y., Griffith A.J., Friedman T.B., Riazuddin S. *SLC26A4* mutation spectrum associated with DFNB4 deafness and Pendred's syndrome in Pakistanis // *J Hum Genet.* – 2009. – Vol. 54(5). – P. 266-270.

Aravind L., Koonin E.V. The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists // *Curr Biol.* 2000. – Vol. 10(2). – P. R53-55.

Astuto L.M., Bork J.M., Weston M.D., Askew J.W., Fields R.R., Orten D.J., Ohliger S.J., Riazuddin S., Morell R.J., Khan S., Riazuddin S., Kremer H., van Hauwe P., Moller C.G., Cremers C.W., Ayuso C., Heckenlively J.R., Rohrschneider K., Spandau U., Greenberg J., Ramesar R., Reardon W., Bitoun P., Millan J., Legge R., Friedman T.B., Kimberling W.J. *CDH23* mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with Usher syndrome and nonsyndromic deafness // *Am J Hum Genet.* – 2002. – Vol. 71(2). – P. 262-275.

Azadegan-Dehkordi F., Ahmadi R., Bahrami T., Yazdanpanahi N., Farrokhi E., Tabatabaiefar M.A., Hashemzadeh-Chaleshtori M. A novel variant of *SLC26A4* and first report of the c.716T>A variant in Iranian pedigrees with non-syndromic sensorineural hearing loss // *Am J Otolaryngol.* – 2018. – Vol. 39(6). – P.719-725.

Azaiez H., Booth K.T., Ephraim S.S., Crone B., Black-Ziegelbein E.A., Marini R.J., Shearer A.E., Sloan-Heggen C.M., Kolbe D., Casavant T., Schnieders M.J., Nishimura C., Braun T., Smith R.J.H.. Genomic Landscape and Mutational Signatures of Deafness-Associated Genes // *Am J Hum Genet.* – 2018. – Vol. 103(4). – P. 484-497.

Bademci G., Diaz-Horta O., Guo S., Duman D., Van Booven D., Foster J. 2nd, Cengiz F.B., Blanton S., Tekin M. Identification of copy number variants through whole-exome

sequencing in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss // *Genet Test Mol Biomarkers*. – 2014. – Vol. 18(9). – P.658-661.

Bademci G., Foster J. 2nd, Mahdiah N., Bonyadi M., Duman D., Cengiz F.B., Menendez I., Diaz-Horta O., Shirkavand A., Zeinali S., Subasioglu A., Tokgoz-Yilmaz S., Huesca-Hernandez F., de la Luz Arenas-Sordo M., Dominguez-Aburto J., Hernandez-Zamora E., Montenegro P., Paredes R., Moreta G., Vinueza R., Villegas F., Mendoza-Benitez S., Guo S., Bozan N., Tos T., Incesulu A., Sennaroglu G., Blanton S.H., Ozturkmen-Akay H., Yildirim-Baylan M., Tekin M. Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive nonsyndromic deafness in a large multiethnic cohort // *Genet Med*. – 2016. – Vol. 18(4). – P. 364-371. Erratum in: *Genet Med*. – 2016. – Vol. 18(8). – P. 859.

Barashkov N.A., Dzhemileva L.U., Fedorova S.A., Teryutin F.M., Posukh O.L., Fedotova E.E., Lobov S.L., Khusnutdinova E.K. Autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Yakut population isolate in Eastern Siberia: extensive accumulation of the splice site mutation IVS1+1G>A in *GJB2* gene as a result of founder effect // *J Hum Genet*. – 2011. – Vol. 56. – P. 631-639.

Barashkov NA, Pshennikova VG, Posukh OL, Teryutin FM, Solovyev AV, Klarov LA, Romanov GP, Gotovtsev NN, Kozhevnikov AA, Kirillina EV, Sidorova OG, Vasilyeva LM, Fedotova EE, Morozov IV, Bondar AA, Solovyeva NA, Kononova SK, Rafailov AM, Sazonov NN, Alekseev AN, Tomsky MI, Dzhemileva LU, Khusnutdinova EK, Fedorova SA. 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.

Barashkov N.A., Klarov L.A., Teryutin F.M., Solovyev A.V., Pshennikova V.G., Konnikova E.E., Romanov G.P., Tobokhov A.V., Morozov I.V., Bondar A.A., Posukh O.L., Dzhemileva L.U., Tomsky M.I., Khusnutdinova E.K., Fedorova S.A. A novel pathogenic variant c.975G>A (p.Trp325*) in the *POU3F4* gene in Yakut family (Eastern Siberia, Russia) with the X-linked deafness-2 (DFNX2) // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. – 2018. – Vol. 104. – P. 94–97.

Barashkov NA, Romanov GP, Borisova UP, Solovyev AV, Pshennikova VG, Teryutin FM, Bondar AA, Morozov IV, Khusnutdinova EK, Posukh OL, Burtseva TE, Odland JO, Fedorova SA. A rare case of Waardenburg syndrome with unilateral hearing loss caused by nonsense variant c.772C>T (p.Arg259*) in the *MITF* gene in Yakut patient from the Eastern Siberia (Sakha Republic, Russia) // *Int J Circumpolar Health*. – 2019. 78(1). – P. 1630219.

Bassot C, Minervini G, Leonardi E, Tosatto SC. Mapping pathogenic mutations suggests an innovative structural model for the pendrin (*SLC26A4*) transmembrane domain // *Biochimie*. – 2017. – Vol. 132. – P. 109-120.

Belguith H., Hajji S., Salem N., Charfeddine I., Lahmar I., Amor M.B., Ouldim K, Chouery E, Driss N, Drira M, Mégarbané 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. – 68(2). – 188-189.

Ben Arab S., Masmoudi S., Beltaief N., Hachicha S., Ayadi H. Consanguinity and endogamy in Northern Tunisia and its impact on non-syndromic deafness // Genet Epidemiol. – 2004. – Vol. 27(1). – P. 74-9.

Ben Said M., Hmani-Aifa M., Amar I., Baig S.M., Mustapha M., Delmaghani S., Tlili A., Ghorbel A., Ayadi H., Van Camp G., Smith R.J., Tekin M., Masmoudi S. High frequency of the p.R34X mutation in the *TMCI* gene associated with nonsyndromic hearing loss is due to founder effects // Genet Test Mol Biomarkers. – 2010. – Vol. 14. – P. 307–311.

Bengtsson B.O., Thomson G. Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases // Tissue Antigens. – 1981. – Vol. – 18. – P. 356-363.

Benvenga S., Guarneri F.. Homology of pendrin, sodium-iodide symporter and apical iodide transporter // Front Biosci (Landmark Ed). – 2018. – Vol. 3(10). – P. 1864-1873.

Bi W., Saifi G.M., Shaw C.J., Walz K., Fonseca P., Wilson M., Potocki L., Lupski J.R. Mutations of *RAI1*, a PHD-containing protein, in nondeletion patients with Smith-Magenis syndrome // Hum Genet. – 2004. – Vol. 115(6). – P. 515-524.

Bi W., Saifi G.M., Girirajan S., Shi X., Szomju B., Firth H., Magenis R.E., Potocki L., Elsea S.H., Lupski J.R. *RAI1* point mutations, CAG repeat variation, and SNP analysis in non-deletion Smith-Magenis syndrome // Am J Med Genet A. – 2006. – Vol. 140(22). – P. 2454-2463.

Bitner-Glindzicz. Hereditary deafness and phenotyping in humans // Br Med Bull. – 2002 – Vol. 63. – P. 73-94.

Blanton S.H., Nance W.E., Norris V.W., Welch K.O., Burt A., Pandya A., Arnos K.S. Fitness among individuals with early childhood deafness: Studies in alumni families from Gallaudet University // Ann Hum Genet. – 2010. – 74(1). – P. 27-33.

Blons H, Feldmann D, Duval V, Messaz O, Denoyelle F, Loundon N, Sergout-Allaoui A, Houang M, Duriez F, Lacombe D, Delobel B, Leman J, Catros H, Journal H, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Toutain A, Oden S, Toubanc JE, Couderc R, Petit C, Garabédian EN, Marlin S. Screening of *SLC26A4* (*PDS*) gene in Pendred's syndrome: a large spectrum of mutations in France and phenotypic heterogeneity // Clin Genet. – 2004. – Vol. 66(4). – P. 333-340.

Bolz H., von Brederlow B., Ramirez A., Bryda E. C., Kutsche K., Nothwang H. G., Seeliger M., Cabrera M. C.-S., Vila M. C., Molina O. P., Gal A., Kubisch C. Mutation of *CDH23*, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D // Nature Genet. – 2001. – Vol. 27. – P. 108-112.

Borck G., Roth C., Martiné U., Wildhardt G., Pohlenz J. Mutations in the *PDS* gene in German families with Pendred's syndrome: V138F is a founder mutation // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2003. – Vol. 88(6). – P. 2916-2921.

Bork J.M., Peters L.M., Riazuddin S., Bernstein S.L., Ahmed Z.M., Ness S.L., Polomeno R., Ramesh A., Schloss M., Srisailpathy C.R., Wayne S., Bellman S., Desmukh D., Ahmed Z., Khan S.N., Kaloustian V.M., Li X.C., Lalwani A., Riazuddin S., Bitner-Glindzicz M., Nance W.E., Liu X.Z., Wistow G., Smith R.J., Griffith A.J., Wilcox E.R., Friedman T.B., Morell R.J. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene *CDH23* // *Am J Hum Genet.* – 2001. – Vol. 68(1). – P. 26-37.

Brownstein Z., Friedman L.M., Shahin H., Oron-Karni V., Kol N., Abu Rayyan A., Parzefall T., Lev D., Shalev S., Frydman M., Davidov B., Shohat M., Rahile M., Lieberman S., Levy-Lahad E., Lee M.K., Shomron N., King M.C., Walsh T., Kanaan M., Avraham K.B. Targeted genomic capture and massively parallel sequencing to identify genes for hereditary hearing loss in middle eastern families // *Genome Biol.* – 2011. – Vol. 12(9) – P. 89.

Brunner H. G., van Beersum S. E. C., Warman M. L., Olsen B. R., Ropers H.-H., Mariman E. C. M. A Stickler syndrome gene is linked to chromosome 6 near the *COL11A2* gene // *Hum. Molec. Genet.* – 1994. – Vol. 3. – P. 1561-1564.

Cabanillas R., Diñeiro M., Cifuentes G.A., Castillo D., Pruneda P.C., Álvarez R., Sánchez-Durán N., Capín R., Plasencia A., Viejo-Díaz M., García-González N., Hernando I., Llorente J.L., Repáraz-Andrade A., Torreira-Banzas C., Rosell J., Govea N., Gómez-Martínez J.R., Núñez-Batalla F., Garrote J.A., Mazón-Gutiérrez Á., Costales M., Isidoro-García M., García-Berrocal B., Ordóñez G.R., Cadiñanos J. Comprehensive genomic diagnosis of non-syndromic and syndromic hereditary hearing loss in Spanish patients // *BMC Med Genomics.* – 2018. – Vol. 11(1). – P. 58.

Calabrese R., Capriotti E., Fariselli P., Martelli P.L., Casadio R. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins // *Hum Mutat.* – 2009. – Vol. 30. – P. 1237-1244.

Campbell C., Cucci R.A., Prasad S., Green G.E., Edeal J.B., Galer C.E., Karniski L.P., Sheffield V.C., Smith R.J. Pendred syndrome, DFNB4, and *PDS/SLC26A4* identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations // *Hum Mutat.* – 2001. – Vol. 17. – P. 403-411.

Carmona-Mora P., Encina C.A., Canales C.P., Cao L., Molina J., Kairath P., Young J.I., Walz K. Functional and cellular characterization of human Retinoic Acid Induced 1 (RAI1) mutations associated with Smith-Magenis Syndrome // *BMC Mol Biol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 63.

Carmona-Mora P., Walz K. Retinoic Acid Induced 1, *RAI1*: A Dosage Sensitive Gene Related to Neurobehavioral Alterations Including Autistic Behavior // *Curr Genomics*. – 2010. – Vol. 11(8). – P.607-617.

Carmona-Mora P., Canales C.P., Cao L., Perez I.C., Srivastava A.K., Young I., Walz K. *RAI1* Transcription Factor Activity Is Impaired in Mutants Associated with Smith-Magenis Syndrome // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(9). – P. e45155.

Carranza C., Menendez I., Herrera M., Castellanos P., Amado C., Maldonado F., Rosales L., Escobar N., Guerra M., Alvarez D., Foster J. 2nd, Guo S., Blanton S.H., Bademci G., Tekin M. A Mayan founder mutation is a common cause of deafness in Guatemala // *Clin Genet*. – 2016. – Vol. 89(4). – P. 461-465.

Cengiz F.B., Yilmazer R., Olgun L., Sennaroglu L., Kirazli T., Alper H., Olgun Y., Incesulu A., Atik T., Huesca-Hernandez F., Domínguez-Aburto J., González-Rosado G., Hernandez-Zamora E., Arenas-Sordo M.L., Menendez I., Orhan K.S., Avci H., Mahdieh N., Bonyadi M., Foster J. 2nd, Duman D., Ozkinay F., Blanton S.H., Bademci G., Tekin M. Novel pathogenic variants underlie *SLC26A4*-related hearing loss in a multiethnic cohort // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. – 2017. – Vol.101. – P. 167-171.

Chang K.W. Genetics of Hearing Loss--Nonsyndromic. // *Otolaryngol Clin North Am*. – 2015. – Vol. 48(6). – P. 1063-1072.

Chen N., Tranebjærg L., Rendtorff N.D., Schrijver I. Mutation analysis of *SLC26A4* for Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss by high-resolution melting // *J Mol Diagn*. – 2011. – Vol. 13(4) – P. 416-426.

Chen S., Dong C., Wang Q., Zhong Z., Qi Y., Ke X., Liu Y. Targeted Next-Generation Sequencing Successfully Detects Causative Genes in Chinese Patients with Hereditary Hearing Loss // *Genet Test Mol Biomarkers*. – 2016. – Vol. 20(11). – P. 660-665.

Chen W., Kahrizi K., Meyer N. C., Riazalhosseini Y., Van Camp G., Najmabadi H., Smith R. J. H. Mutation of *COL11A2* causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the DFNB53 locus // *J Med Genet*. – 2005. – Vol. 42. – P. e61.

Chinnery P. F., Elliott C., Green G. R., Rees A., Coulthard A., Turnbull D. M., & Griffiths T. D. The spectrum of hearing loss due to mitochondrial DNA defects // *Brain: a journal of neurology*. – 2000. – Vol. 123 (Pt 1). – P. 82–92.

Choi B.Y., Ahmed Z.M., Riazuddin S., Bhinder M.A., Shahzad M., Husnain T., Griffith A.J., Friedman T.B. Identities and frequencies of mutations of the otoferlin gene (*OTOF*) causing DFNB9 deafness in Pakistan // *Clin Genet*. – 2009. – Vol. 75(3). – P. 237–243.

Choi B.Y., Park G., Gim J., Kim A.R., Kim B.J., Kim H.S., Park J.H., Park T., Oh S.H., Han K.H., Park W.Y. Diagnostic application of targeted resequencing for familial nonsyndromic hearing loss // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(8). – P. e68692.

Choi Y., Sims G.E., Murphy S., Miller J.R., Chan A.P. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels // PLoS One. – 2012. – Vol. 7(10). – P. e46688.

Choi Y., Chan A.P. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels // Bioinformatics. – 2015 – Vol. 31(16) – P. 2745-2747.

Chong J.X., Ouwenga R., Anderson R.L., Waggoner D.J., Ober C. A population-based study of autosomal-recessive disease-causing mutations in a founder population // Am J Hum Genet. – 2012. – Vol. 91(4). – P. 608-620.

Cordat E., Reithmeier R.A. Structure, function, and trafficking of SLC4 and SLC26 anion transporters // Curr Top Membr. – 2014. – Vol. 73. – P. 1-67.

Coucke P., Van Camp G., Djoyodiharjo B., Smith S. D., Frants R. R., Padberg G. W., Darby J. K., Huizing E. H., Cremers C. W., Kimberling W. J., Oostra B. A., Van de Heyning P. H., Willems P. J. Linkage of autosomal dominant hearing loss to the short arm of chromosome 1 in two families // New Eng. J Med. – 1994. – Vol. 331. – P. 425-431.

Coucke P.J., Van Hauwe P., Kelley P.M., Kunst H., Schatteman I., Van Velzen D., Meyers J., Ensink R.J., Verstreken M., Declau F., Marres H., Kastury K., Bhasin S., McGuirt W.T., Smith R. J.H., Cremers C.W.R.J., Van de Heyning P., Willems P. J., Smith S.D., Van Camp G. Mutations in the *KCNQ4* gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families // Hum Molec Genet. – 1999. – Vol.8. – P. 1321-1328.

Coyle B., Reardon W., Herbrick J.A., Tsui L.C., Gausden E., Lee J., Coffey R., Grueters A., Grossman A., Phelps P.D., Luxon L., Kendall-Taylor P., Scherer S.W., Trembath R.C. Molecular analysis of the *PDS* gene in Pendred syndrome // Hum Mol Genet. – 1998. – Vol. 7. – P. 1105-1112.

Crimi M., Galbiati S., Perini M. P., Bordoni A., Malferrari G., Sciacco M., Biunno I., Strazzer S., Moggio M., Bresolin N., Comi, G. P. A mitochondrial tRNA(His) gene mutation causing pigmentary retinopathy and neurosensorial deafness // Neurology. – 2003. – Vol. 60(7). – P. 1200–1203.

Cryns K., Sivakumaran T.A., Van den Ouweland J.M., Pennings R.J., Cremers C.W., Flothmann K., Young T.L., Smith R.J., Lesperance M.M., Van Camp G. Mutational spectrum of the *WFS1* gene in Wolfram syndrome, nonsyndromic hearing impairment, diabetes mellitus, and psychiatric disease // Hum Mutat. – 2003. – Vol. 22(4). – P. 275-287.

Dai P., Li Q., Huang D., Yuan Y., Kang D., Miller D.T., Shao H., Zhu Q., He J., Yu F., Liu X., Han B., Yuan H., Platt O.S., Han D., Wu B.-L. *SLC26A4* c.919-2A>G varies among Chinese ethnic groups as a cause of hearing loss // Genet Med. – 2008. – Vol. 10(8). – P. 586-592.

Dallos P., Wu X., Cheatham M.A., Gao J., Zheng J., Anderson C.T., Jia S., Wang X., Cheng W.H.Y., Sengupta S., He D.Z., Zuo J. Prestin-based outer hair cell motility is

necessary for mammalian cochlear amplification // *Neuron*. – 2008. – Vol. 58. – P. 333–339.

Danilchenko V.Y., Zytsar M.V., Maslova E.A., Bady-Khoo M.S., Barashkov N.A., Morozov I.V., Bondar A.A., Posukh O.L. Different Rates of the *SLC26A4*-Related Hearing Loss in Two Indigenous Peoples of Southern Siberia (Russia) // *Diagnostics (Basel)*. – 2021. – Vol. 11(12). – P. 2378.

Darvekar S., Rekdal C., Johansen T., Sjøttem E. A phylogenetic study of SPBP and RAI1: evolutionary conservation of chromatin binding modules // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(10). – P. e78907.

De Kok Y.J., Bom S.J., Brunt T.M., Kemperman M.H., van Beusekom E., van der Velde-Visser S.D., Robertson N.G., Morton C.C., Huygen P.L., Verhagen W.I., Brunner H.G., Cremers C.W., Cremers F.P. A Pro51Ser mutation in the *COCH* gene is associated with late onset autosomal dominant progressive sensorineural hearing loss with vestibular defects // *Hum Mol Genet*. – 1999. – Vol. 8(2). – P. 361-366.

De Leenheer E.M., Bosman A.J., Kunst H.P., Huygen P.L., Cremers C.W. Audiological characteristics of some affected members of a Dutch DFNA13/COL11A2 family // *Ann Otol Rhinol Laryngol*. – 2004. – Vol. 113(11). – P. 922-929.

Delmaghani S., Aghaie A., Compain-Nouaille S., Ataie A., Lemainque A., Zeinali S., Lathrop M., Weil D., Petit C. DFNB40, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 22q11.21-12.1 // *Eur J Hum Genet*. – 2003. – Vol. 11(10). – P. 816-818.

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.

Di Cicco M., Padoan R., Felisati G., Dilani D., Moretti E., Guernerì S., Selicorni A. Otorhinolaryngologic manifestation of Smith-Magenis syndrome // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. – 2001. – Vol. 59(2). – P.147-150.

Diaz-Horta O., Duman D., Foster J., Sırmacı A., Gonzalez M., Mahdieh N., Fotouhi N., Bonyadi M., Cengiz F.B., Menendez I., Ulloa R.H., Edwards Y.J., Züchner S., Blanton S., Tekin M. Whole-exome sequencing efficiently detects rare mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(11). – P. e50628.

Dossena S., Rodighiero S., Vezzoli V., Nofziger C., Salvioni E., Boccazzi M., Grabmayer E., Bottà G., Meyer G., Fugazzola L., Beck-Peccoz P., Paulmichl M. Functional characterization of wild-type and mutated pendrin (*SLC26A4*), the anion transporter involved in Pendred syndrome // *J Mol Endocrinol*. – 2009. – Vol. 43(3). – P. 93-103.

Du W., Guo Y., Wang C., Wang Y., Liu X. A systematic review and meta-analysis of common mutations of *SLC26A4* gene in Asian populations // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* – 2013. – Vol. 77(10). – P. 1670-1676.

Dubourg C., Bonnet-Brilhault F., Toutain A., Mignot C., Jacquette A., Dieux A., Gérard M., Beaumont-Epinette M.P., Julia S., Isidor B., Rossi M., Odent S., Bendavid C., Barthélémy C., Verloes A., David V. Identification of nine new *RAI1*-truncating mutations in Smith-Magenis Syndrome patients without 17p11.2 deletions // *Mol Syndromol.* – 2014. – Vol. 5(2). – P. 57-64.

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.

Edelman E.A., Girirajan S., Finucane B., Patel P.I., Lupski J.R., Smith A.C., Elsea S.H. Gender, genotype, and phenotype differences in Smith-Magenis syndrome: a meta-analysis of 105 cases // *Clin Genet.* – 2007. – Vol. 71. – P. 540–550.

Elsea S.H., Girirajan S. Smith-Magenis syndrome // *Eur J Hum Genet.* – 2008. – Vol. 16. – P. 412–421.

Erdenechuluun J., Lin Y.H., Ganbat K., Bataakhuu D., Makhbal Z., Tsai C.Y., Lin Y.H., Chan Y.H., Hsu C.J., Hsu W.C., Chen P.L., Wu C.C. Unique spectra of deafness-associated mutations in Mongolians provide insights into the genetic relationships among Eurasian populations // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13(12). – P. e0209797.

Estivill X., Govea N., Barcelo E et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides // *Am J Hum Genet.* – 1998. – Vol. 62(1) – P. 27-35.

Everett L.A., Glaser B., Beck J.C., Idol J.R., Buchs A., Heyman M., Adawi F., Hazani E., Nassir E., Baxevanis A.D., Sheffield V.C., Green E.D. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (*PDS*) // *Nat Genet.* – 1997. – Vol. 17(4). – P. 411-422.

Everett L.A., Morsli H., Wu D.K., Green E.D. Expression pattern of the mouse ortholog of the Pendred's syndrome gene (*Pds*) suggests a key role for pendrin in the inner ear // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1999. – Vol. 96(17). – P. 9727-9732.

Everett L.A., Belyantseva I.A., Noben-Trauth K., Cantos R., Chen A., Thakkar S.I., Hoogstraten-Miller S.L., Kachar B., Wu D.K., Green E.D. Targeted disruption of mouse *Pds* provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome // *Human molecular genetics.* – 2001. – Vol. 10(2). – P.153-161.

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.

Finsterer J., Fellingner J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. – 2005. – Vol. 69(5) – P. 621-647.

Fischel-Ghodsian N., Prezant T.R., Fournier P., Stewart I.A., Maw M. Mitochondrial mutation associated with nonsyndromic deafness // *Am J Otolaryngol*. – 1995. – Vol. 16(6). – P. 403-408.

Fransen E., Verstreken M., Verhagen W.I., Wuyts F.L., Huygen P.L., D'Haese P., Robertson N.G., Morton C.C., McGuirt W.T., Smith R.J., Declau F., Van de Heyning P.H., Van Camp G. High prevalence of symptoms of Menière's disease in three families with a mutation in the *COCH* gene // *Hum Mol Genet*. – 1999. – Vol. 8(8). – P. 1425-1429.

Gilissen C., Hoischen A., Brunner H.G., Veltman J.A. Disease gene identification strategies for exome sequencing // *Eur J Hum Genet*. – 2012. – Vol. 20(5). – P. 490-497.

Girirajan S., Elsas L.J. 2nd, Devriendt K.H., Elsea S.H. RAI1 variations in Smith-Magenis syndrome patients without 17p11.2 deletions // *J Med Genet*. – 2005. – Vol. 42. – P. 820–828.

Girirajan S., Vlangos C.N., Szomju B.B., Edelman E., Trevors C.D., Dupuis L., Nezarati M., Bunyan D.J., Elsea S.H. Genotype-phenotype correlation in Smith-Magenis syndrome: evidence that multiple genes in 17p11.2 contribute to the clinical spectrum // *Genet Med*. – 2006. – Vol. 8. – P. 417–427.

Giroto G., Abdulhadi K., Buniello A., Vozzi D., Licastro D., d'Eustacchio A., Vuckovic D., Alkowari M.K., Steel K.P., Badii R., Gasparini P. Linkage study and exome sequencing identify a BDP1 mutation associated with hereditary hearing loss // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(12). – P. e80323.

González-Pérez A., López-Bigas N. Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel // *Am J Hum Genet*. – 2011. – Vol. 88(4). – P. 440-449.

Gorbunov D., Sturlese M., Nies F., Kluge M., Bellanda M., Battistutta R., Oliver D. Molecular architecture and the structural basis for anion interaction in prestin and SLC26 transporters // *Nat Commun*. – 2014. – Vol. 5. – P. 3622.

Grabski R., Szul T., Sasaki T., Timpl R., Mayne R., Hicks B., Sztul E. Mutations in *COCH* that result in non-syndromic autosomal dominant deafness (DFNA9) affect matrix deposition of cochlin // *Hum Genet*. – 2003. – Vol. 113(5). – P. 406-416.

Gu X., Guo L., Ji H., Sun S., Chai R., Wang L., Li H. Genetic testing for sporadic hearing loss using targeted massively parallel sequencing identifies 10 novel mutations // *Clin Genet*. – 2015. – Vol. 87(6). – P.588-593.

Guan M.X. Molecular pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness // *Ann N Y Acad Sci.* – 2004. – Vol. 1011. – P. 259-271.

Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis.* – 1997. – Vol. 18(15). – P. 2714-2723.

Hardy C., Khanim F., Torres R., Scott-Brown M., Seller A., Poulton J., Collier D., Kirk J., Polymeropoulos M., Latif F., Barrett T. Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in *WFS1* // *Am J Hum Genet.* – 1999. – Vol. 65. – P. 1279-1290.

Hilgert N., Smith R.J., Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? // *Mutat Res.* – 2009a. – Vol. 681(2-3). – P. 189-196.

Hilgert N., Monahan K., Kurima K., Li C., Friedman R. A., Griffith A. J., Van Camp G. Amino acid 572 in TMC1: hot spot or critical functional residue for dominant mutations causing hearing impairment // *J. Hum. Genet.* – 2009b. – Vol. 54. – P. 188-190.

Hutchin T., Haworth I., Higashi K., Fischel-Ghodsian N., Stoneking M., Saha N., Arnos C., Cortopassi G. A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – Vol. 21. – P. 4174-4179.

Hutchin T.P., Cortopassi G.A. Mitochondrial defects and hearing loss // *Cell Mol Life Sci.* – 2000. – Vol. 57(13-14). – P. 1927-1937.

Ishikawa K., Tamagawa Y., Takahashi K., Kimura H., Kusakari J., Hara A., Ichimura K. Nonsyndromic hearing loss caused by a mitochondrial T7511C mutation // *Laryngoscope.* – 2002. – Vol. 112(8 Pt 1). – P. 1494-1499.

Iwasa Y., Nishio S.Y., Yoshimura H., Kanda Y., Kumakawa K., Abe S., Naito Y., Nagai K., Usami S. *OTOF* mutation screening in Japanese severe to profound recessive hearing loss patients // *BMC Med Genet.* – 2013. – Vol. 14. – P. 95.

Jiang H., Liu Q., Chen L. Screening and analysis of mutation hot-spots in deafness-associated genes among adolescents with hearing loss // *Mol Med Rep.* – 2015. – Vol. 12(6). – P. 8179-84.

Kahrizi K., Mohseni M., Nishimura C., Bazazzadegan N., Fischer S.M., Dehghani A., Sayfati M., Taghdiri M., Jamali P., Smith R.J., Azizi F., Najmabadi H. Identification of *SLC26A4* gene mutations in Iranian families with hereditary hearing impairment // *Eur J Pediatr.* – 2009. – Vol. 168(6). – P. 651-653.

Kalay E., Karaguzel A., Caylan R., Heister A., Cremers F.P., Cremers C.W., Brunner H.G., de Brouwer A.P., Kremer H. Four novel TMC1 (DFNB7/DFNB11) mutations in Turkish patients with congenital autosomal recessive nonsyndromic hearing loss // *Hum Mutat.* – 2005. – Vol. 26(6). – P. 591.

Kalay E., Caylan R., Kiroglu A.F., Yasar T., Collin R.W., Heister J.G., Oostrik J., Cremers C.W., Brunner H.G., Karaguzel A., Kremer H. A novel locus for autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment, DFNB63, maps to chromosome 11q13.2-q13.4 // *J Mol Med (Berl)*. – 2007. – Vol. 85(4). – P. 397-404.

Kamarinos M., McGill J., Lynch M., Dahl H. Identification of a novel COCH mutation, I109N, highlights the similar clinical features observed in DFNA9 families // *Hum Mutat*. – 2001. – Vol. 17. – P. 351.

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.

Khan M.R., Bashir R., Naz S. SLC26A4 mutations in patients with moderate to severe hearing loss // *Biochem Genet*. – 2013. – Vol. 51(7-8). – P.514-523.

Khan S.Y., Riazuddin S., Tariq M., Anwar S., Shabbir M.I., Riazuddin S.A., Khan S.N., Husnain T., Ahmed Z.M., Friedman T.B., Riazuddin S. Autosomal recessive nonsyndromic deafness locus DFNB63 at chromosome 11q13.2-q13.3 // *Hum Genet*. – 2007. – Vol. 120(6). – P. 789-93.

Khanim F., Kirk J., Latif F., Barrett T. G. WFS1/Wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases // *Hum. Mutat*. – 2001. – Vol. 17. – P. 357-367.

Kharkovets T., Hardelin J.-P., Safieddine S., Schweizer M., El-Amraoui A., Petit C., Jentsch T. J. KCNQ4, a K(+) channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway // *Proc. Nat. Acad. Sci*. – 2000. – Vol. 97. – P. 4333-4338.

Khateb S., Zelinger L., Ben-Yosef T., Merin S., Crystal-Shalit O., Gross M., Banin E., Sharon D. Exome sequencing identifies a founder frameshift mutation in an alternative exon of USH1C as the cause of autosomal recessive retinitis pigmentosa with late-onset hearing loss // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7(12). – P. e51566.

Kim H.J., Won H.H., Park K.J., Hong S.H., Ki C.S., Cho S.S., Venselaar H., Vriend G., Kim J.W. SNP linkage analysis and whole exome sequencing identify a novel POU4F3 mutation in autosomal dominant late-onset nonsyndromic hearing loss (DFNA15) // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(11). – P. e79063.

Kim S.Y., Kim A.R., Kim N.K., Kim M.Y., Jeon E.H., Kim B.J., Han Y.E., Chang M.Y., Park W.Y., Choi B.Y. Strong founder effect of p.P240L in *CDH23* in Koreans and its significant contribution to severe-to-profound nonsyndromic hearing loss in a Korean pediatric population // *J Transl Med*. – 2015. – Vol. 13. – P. 263.

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. – Vol. 14(2). 183-187.

Koohiyan M. A systematic review of *SLC26A4* mutations causing hearing loss in the Iranian population // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* – 2019. – Vol.125. – P. 1-5.

Kubisch C., Schroeder B. C., Friedrich T., Lutjohann B., El-Amraoui A., Marlin S., Petit C., Jentsch T. J. *KCNQ4*, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness // *Cell.* – 1999. – Vol. 96. – P. 437-446.

Kupka S., Tóth T., Wróbel M., Zeissler U., Szyfter W., Szyfter K., Niedzielska G., Bal J., Zenner H.P., Sziklai I., Blin N., Pfister M. Mutation A1555G in the 12S rRNA gene and its epidemiological importance in German, Hungarian, and Polish patients // *Hum Mutat.* – 2002. – Vol. 19. – P. 308-309.

Kurima K., Peters L.M., Yang Y., Riazuddin S., Ahmed Z.M., Naz S., Arnaud D., Drury S., Mo J., Makishima T., Ghosh M., Menon P.S., Deshmukh D., Oddoux C., Ostrer H., Khan S., Riazuddin S., Deininger P.L., Hampton L.L., Sullivan S.L., Battey J.F. J.r., Keats B.J., Wilcox E.R., Friedman T.B., Griffith A.J. Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, *TMC1*, required for cochlear hair-cell function // *Nat Genet.* – 2002. – Vol. 30(3). – P. 277-284.

Lee B., Kim Y.R., Kim S.J., Goh S.H., Kim J.H., Oh S.K., Baek J.I., Kim U.K., Lee K.Y. Modified U1 snRNA and antisense oligonucleotides rescue splice mutations in *SLC26A4* that cause hereditary hearing loss // *Hum Mutat.* – 2019. – Vol. 40(8):1172-1180.

Lee K.Y., Choi S.Y., Bae J.W., Kim S., Chung K.W., Drayna D., Kim U.K., Lee S.H. Molecular analysis of the *GJB2*, *GJB6* and *SLC26A4* genes in Korean deafness patients // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* – 2008. – Vol. 72(9). – P. 1301-1309.

Lerat J., Magdelaine C., Roux A.F., Darnaud L., Beauvais-Dzogan H., Naud S., Richard L., Derouault P., Ghorab K., Magy L., Vallat J.M., Cintas P., Bieth E., Arne-Bes M.C., Goizet C., Espil-Taris C., Journel H., Toutain A., Urtizberea J.A., Boespflug-Tanguy O., Laffargue F., Corcia P., Pasquier L., Fradin M., Napuri S., Ciron J., Boulesteix J.M., Sturtz F., Lia AS. Hearing loss in inherited peripheral neuropathies: Molecular diagnosis by NGS in a French series // *Mol Genet Genomic Med.* – 2019. – Vol. 7(9). – P.e839.

Li B., Krishnan V.G., Mort M.E., Xin F., Kamati K.K., Cooper D.N., Mooney S.D., Radivojac P. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions // *Bioinformatics.* – 2009. – Vol. 25(21). – P. 2744-2750.

Lieberman M.C., Gao J., He D.Z., Wu X., Jia S., Zuo J. Prestin is required forelectromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier // *Nature.* – 2002. – Vol. 419. – P.300–304.

Liburd N., Ghosh M., Riazuddin S., Naz S., Khan S., Ahmed Z., Riazuddin S., Liang Y., Menon P.S., Smith T., Smith A.C., Chen K.S., Lupski J.R., Wilcox E.R., Potocki L., Friedman T.B. Novel mutations of *MYO15A* associated with profound deafness in consanguineous families and moderately severe hearing loss in a patient with Smith-Magenis syndrome // *Hum Genet.* – 2001. – Vol. 109(5). – P. 535-541.

Liu X.Z., Walsh J., Tamagawa Y., Kitamura K., Nishizawa M., Steel K. P., Brown S. D. M. Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. (Letter) // *Nature Genet.* – 1997. – Vol. 17. – P. 268-269.

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(4-5). – P. 394-397.

López-Bigas N., Rabionet R., de Cid R., Govea N., Gasparini P., Zelante L., Arbonés M.L., Estivill X. Splice-site mutation in the PDS gene may result in intrafamilial variability for deafness in Pendred syndrome // *Hum Mutat.* – 1999. – Vol. 14(6). – P. 520-526.

Lu J., Li Z., Zhu Y., Yang A., Li R., Zheng J., Cai Q., Peng G., Zheng W., Tang X., Chen B., Chen J., Liao Z., Yang L., Li Y., You J., Ding Y., Yu H., Wang J., Sun D., Zhao J., Xue L., Wang J., Guan M.X. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and nonsyndromic hearing loss // *Hum Genet.* – 2005. – Vol. 117. – P. 9–15.

Lu Y.J., Yao J., Wei Q.J., Xing G.Q., Cao X. Diagnostic Value of *SLC26A4* Mutation Status in Hereditary Hearing Loss With EVA: A PRISMA-Compliant Meta-Analysis // *Medicine (Baltimore).* – 2015. – Vol. 94(50). – P. e2248.

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.

Mahdieh N., Shirkavand A., Rabbani B., Tekin M., Akbari B., Akbari M.T., Zeinali S. Screening of OTOF mutations in Iran: a novel mutation and review // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* – 2012. – Vol. 76(11). – P. 1610–1615.

Malik S., Sudoyo H., Sasmono T., Winata S., Arhya I.N., Pramoonjago P., Sudana W., Marzuki S. Nonsyndromic sensorineural deafness associated with the A1555G mutation in the mitochondrial small subunit ribosomal RNA in a Balinese family // *J Hum Genet.* – 2003. – Vol. 48. – P. 119-124.

Marazita M.L., Ploughman L.M., Rawlings B., Remington E., Arnos K.S., Nance W.E. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population // *Am J Med Genet.* – 1993. – Vol. 46(5). – P. 486-491.

Marlin S., Feldmann D., Nguyen Y., Rouillon I., Loundon N., Jonard L., Bonnet C., Couderc R., Garabedian E.N., Petit C., Denoyelle F. Temperature-sensitive auditory neuropathy associated with an otoferlin mutation: Deafening fever! // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2010. – Vol. 394(3). – P. 737-742.

Masmoudi S.I., Charfedine M., Hmani M., Grati A. M., Ghorbel A., Elgaied-Boulila, Drira M., Hardelin J.P., Ayadi H. Pendred syndrome: phenotypic variability in two families carrying the same PDS missense mutation // *Am J Med Genet.* – 2000. – Vol. 90. – P. 38–44.

Mathe E., Olivier M., Kato S., Ishioka C., Hainaut P., Tavtigian S.V. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – Vol. 34(5). – P. 1317-1325.

Matsunaga T., Mutai H., Kunishima S., Namba K., Morimoto N., Shinjo Y., Arimoto Y., Kataoka Y., Shintani T., Morita N., Sugiuchi T., Masuda S., Nakano A., Taiji H., Kaga K. A prevalent founder mutation and genotype-phenotype correlations of *OTOF* in Japanese patients with auditory neuropathy // *Clin Genet.* – 2012. – Vol. 82(5). – P. 425-432.

McGuirt W. T., Prasad S. D., Griffith A. J., Kunst H. P. M., Green G. E., Shpargel K. B., Runge C., Huybrechts C., Mueller R. F., Lynch E., King M.-C., Brunner H. G., Cremers C. W. R. J., Takanosu M., Li S.-W., Arita M., Mayne R., Prockop D. J., Van Camp G., Smith R. J. H. Mutations in *COL11A2* cause non-syndromic hearing loss (DFNA13) // *Nature Genet.* – 1999. – Vol. 23. – P. 413-419.

Melkonien M., Brunner H. G., Manouvrier S., Hennekam R., Superti-Furga A., Kaariainen H., Pauli R. M., van Essen T., Warman M. L., Bonaventure J., Miny P., Ala-Kokko L. Autosomal recessive disorder otospondylomegaepiphyseal dysplasia is associated with loss-of-function mutations in the *COL11A2* gene // *Am. J. Hum. Genet.* – 2000. – Vol. 66. – P. 368-377.

Mencia A., Gonzalez-Nieto D., Modamio-Hoybjor S., Etxeberria A., Aranguéz G., Salvador N., del Castillo I., Villarroel A., Moreno F., Barrio L., Moreno-Pelayo M. A. A novel *KCNQ4* pore-region mutation (p.G296S) causes deafness by impairing cell-surface channel expression // *Hum. Genet.* – 2008. – Vol. 123. – P. 41-53.

Merchant S.N., Linthicum F.H., Nadol J.B. Histopathology of the inner ear in DFNA9 // *Adv Otorhinolaryngol.* – 2000. – Vol. 56. – P. 212–217.

Migliosi V., Modamio-Hoybjor S., Moreno-Pelayo M.A., Rodríguez-Ballesteros M., Villamar M., Tellería D., Menéndez I., Moreno F., Del Castillo I. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (*OTOF*), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss // *J Med Genet.* – 2002. – Vol. 39(7). – P. 502-506.

Mohseni M., Honarpour A., Mozafari R., Davarnia B., Najmabadi H., Kahrizi K. Identification of a founder mutation for Pendred syndrome in families from northwest Iran // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* – 2014. – Vol. 78(11). – P. 1828-32.

Mojtabavi N.M., Mesrian T.H., Hashemzadeh C.M., Vallian S. Genotyping data and novel haplotype diversity of STR markers in the *SLC26A4* gene region in five ethnic groups of the Iranian population // *Genet Test Mol Biomarkers.* – 2014. – Vol. 18(12). – P. 820-855.

Morton C.C., Nance W.E. Newborn hearing screening--a silent revolution // *N Engl J Med.* – 2006. – Vol. 354. – № 20. – P. 2151-2164.

Mount D.B., Romero M.F. The *SLC26A4* gene family of multifunctional anion exchangers // *Pflugers Arch.* – 2004. – Vol. 447(5). – P. 710-721.

Muskett J.A., Chattaraj P., Heneghan J.F., Reimold F.R., Shmukler B.E., Brewer C.C., King K.A., Zalewski C.K., Shawker T.H., Butman J.A., Kenna M.A., Chien W.W., Alper S.L., Griffith A.J. Atypical patterns of segregation of familial enlargement of the vestibular aqueduct // *Laryngoscope.* – 2016. – Vol. 126(7). – P. E240- E247.

Nance W.E., Liu X.Z., Pandya A. Relation between choice of partner and high frequency of connexin-26 deafness // *Lancet.* – 2000. – Vol. 356(9228). – P. 500-501.

Nance W.E., Kearsey M.J. Relevance of connexin deafness (DFNB1) to human evolution // *Am J Hum Genet.* – 2004. – Vol. 74(6). – P. 1081-1087.

Nonose R.W., Lezirovitz K., de Mello Auricchio M.T.B., Batissoco A.C., Yamamoto G.L., Mingroni-Netto R.C. Mutation analysis of *SLC26A4* (Pendrin) gene in a Brazilian sample of hearing-impaired subjects // *BMC Med Genet.* – 2018. – Vol. 19(1). – P. 73.

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. – 112(4). – P. 329-33.

Palombo F., Al-Wardy N., Ruscone G.A., Oppo M., Kindi M.N., Angius A., Al Lamki K., Girotto G., Giangregorio T., Benelli M., Magi A., Seri M., Gasparini P., Cucca F., Sazzini M., Al Khabori M., Pippucci T., Romeo G. A novel founder *MYO15A* frameshift duplication is the major cause of genetic hearing loss in Oman // *J Hum Genet.* – 2017. – Vol. 62(2). – P. 59-264.

Pan B., Geleoc G. S., Asai Y., Horwitz G. C., Kurima K., Ishikawa K., Kawashima Y., Griffith A. J., Holt J. R. TMC1 and TMC2 are components of the mechanotransduction channel in hair cells of the mammalian inner ear // *Neuron.* – 2013. – Vol. 79. – P. 504-515.

Pandya A., Xia X.J., Erdenetungalag R., Amendola M., Landa B., Radnaabazar J., Dangaasuren B., Van Tuyle G., Nance W.E. Heterogenous point mutations in the mitochondrial tRNA Ser(UCN) precursor coexisting with the A1555G mutation in deaf students from Mongolia // *Am J Hum Genet.* – 1999. – V. 65.(6). – P. 1803-1806.

Pang X., Chai Y., He L., Chen P., Wang X., Li L., Jia H., Wu H., Yang T. A 7666-bp genomic deletion is frequent in Chinese Han deaf patients with non-syndromic enlarged vestibular aqueduct but without bi-allelic *SLC26A4* mutations // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* – 2015. – Vol. 79(12). – P.2248-2252.

Pangršič T., Reisinger E., Moser T. Otoferlin: a multi-C2 domain protein essential for hearing // *Trends Neurosci.* – 2012. – Vol. 35(11). – P. 671-680.

Park H.J., Shaukat S., Liu X.Z., Hahn S.H., Naz S., Ghosh M., Kim H.N., Moon S.K., Abe S., Tukamoto K., Riazuddin S., Kabra M., Erdenetungalag R., Radnaabazar J., Khan S., Pandya A., Usami S.I., Nance W.E., Wilcox E.R., Riazuddin S., Griffith A.J. Origins

and frequencies of *SLC26A4* (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness // *J Med Genet* – 2003 – Vol. 40. – P. 242–248.

Pater J.A., Benteau T., Griffin A., Penney C., Stanton S.G., Predham S., Kielley B., Squires J., Zhou J., Li Q., Abdelfatah N., O'Rielly D.D., Young T.L. A common variant in *CLDN14* causes precipitous, prelingual sensorineural hearing loss in multiple families due to founder effect // *Hum Genet.* – 2017. – Vol. 136(1). – P. 107-118.

Pera A., Villamar M., Viñuela A., Gandía M., Medà C., Moreno F., Hernández-Chico C. A mutational analysis of the *SLC26A4* gene in Spanish hearing-impaired families provides new insights into the genetic causes of Pendred syndrome and DFNB4 hearing loss // *Eur J Hum Genet.* – 2008. – Vol. 16. – P. 888-896

Petersen M.B. Non-syndromic autosomal-dominant deafness // *Clin Genet.* – 2002. – Vol. 62(1). – P. 1-13.

Posukh O., Pallares-Ruiz N., Tadinova V., Osipova L., Claustres M., Roux A.F. First molecular screening of deafness in the Altai Republic population // *BMC Med. Genet.* – 2005. – Vol. 6. – P. 12.

Posukh O.L., Zytsar M.V., Bady-Khoo M.S., Danilchenko V.Y., 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 Tuvians (Southern Siberia, Russia): A High Prevalence of Rare Variant c.516G>C (p.Trp172Cys) // *Genes.* – 2019. – Vol. 10(6). – P: E429.

Potocki L., Glaze D., Tan D.X., Park S.S., Kashork C.D., Shaffer L.G., Reiter R.J., Lupski J.R. Circadian rhythm abnormalities of melatonin in Smith-Magenis syndrome // *J Med Genet.* – 2000. – Vol. 37(6). – P. 428-433.

Potocki L., Bi W., Treadwell-Deering D., Carvalho C.M., Eifert A., Friedman E.M., Glaze D., Krull K., Lee J.A., Lewis R.A., Mendoza-Londono R., Robbins-Furman P., Shaw C., Shi X., Weissenberger G., Withers M., Yatsenko S.A., Zackai E.H., Stankiewicz P., Lupski J.R. Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype // *Am J Hum Genet.* – 2007. – Vol. 80(4). – P. 633-649.

Pourová R., Janousek P., Jurovcík M., Dvoráková M., Malíková M., Rasková D., Bendová O., Leonardi E., Murgia A., Kabelka Z., Astl J., Seeman P. Spectrum and frequency of *SLC26A4* mutations among Czech patients with early hearing loss with and without enlarged vestibular aqueduct (EVA) // *Ann Hum Genet.* – 2010. – Vol. 74. – P. 299-307.

Prasad S., Kölln K.A., Cucci R.A., Trembath R.C., Van Camp G., Smith R.J. Pendred syndrome and DFNB4-mutation screening of *SLC26A4* by denaturing high-performance liquid chromatography and the identification of eleven novel mutations // *Am J Med Genet A.* – 2004. – Vol. 124A(1). – P. 1-9.

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. 40(5). – P. e68.

Rapp C., Bai X., Reithmeier R.A.F. Molecular analysis of human solute carrier SLC26 anion transporter disease-causing mutations using 3-dimensional homology modeling // *Biochim Biophys Acta Biomembr.* – 2017. – Vol. 1859(12). – P. 2420-2434.

Reva B.A., Antipin Y.A., Sander C. Determinants of protein function revealed by combinatorial entropy optimization // *Genome Biol.* – 2007. – Vol. 8(11). – P. R232.

Reva B.A., Antipin Y.A., Sander C. Predicting the Functional Impact of Protein Mutations: Application to Cancer Genomics // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – Vol. 39(17). – P. e118.

Rendtorff N.D., Schrijver I., Lodahl M., Rodriguez-Paris J., Johnsen T., Hansén E.C., Nickelsen L.A., Tümer Z., Fagerheim T., Wetke R., Tranebjaerg L. *SLC26A4* mutation frequency and spectrum in 109 Danish Pendred syndrome/DFNB4 probands and a report of nine novel mutations // *Clin Genet.* – 2013. – Vol. 84(4). – P.388-391.

Riazuddin S., Nazli S., Ahmed Z. M., Yang Y., Zulfiqar F., Shaikh R. S., Zafar A. U., Khan S. N., Sabar F., Javid F. T., Wilcox E. R., Tsilou E., Boger E. T., Sellers J. R., Belyantseva I. A., Riazuddin S., Friedman T. B. Mutation spectrum of *MYO7A* and evaluation of a novel nonsyndromic deafness DFNB2 allele with residual function // *Hum. Mutat.* – 2008. – Vol. 29. – P. 502-511.

Roberts L., George S., Greenberg J., Ramesar R.S. A Founder Mutation in *MYO7A* Underlies a Significant Proportion of Usher Syndrome in Indigenous South Africans: Implications for the African Diaspora // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2015. – Vol. 56(11). – P. 6671-6678.

Robertson N. G., Skvorak A. B., Yin Y., Weremowicz S., Johnson K. R., Kovatch K. A., Battey J. F., Bieber F. R., Morton C. C. Mapping and characterization of a novel cochlear gene in human and in mouse: a positional candidate gene for a deafness disorder, DFNA9 // *Genomics.* – 1997. – Vol. 46. – P. 345-354.

Robertson N.G., Lu L., Heller S., Merchant S.N., Eavey R.D., McKenna M., Nadol J.B. Jr., Miyamoto R.T., Linthicum F.H. Jr, Lubianca Neto J.F., Hudspeth A.J., Seidman C.E., Morton C.C., Seidman J.G. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction // *Nat Genet.* – 1998. – Vol. 20(3). – P. 299-303.

Rodriguez-Ballesteros M. F. J., del Castillo Y. Martin, M. A. Moreno-Pelayo C. Morera F. Prieto, Marco J., Morant A., Gallo-Terán J., Morales-Angulo C., Navas C., Trinidad G., Tapia M.C., Moreno F., del Castillo I. Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (*OTOF*) // *Hum. Mutat.* – 2003. – Vol. 22. – P. 451–456.

Rodríguez-Ballesteros M., Reynoso R., Olarte M., Villamar M., Morera C., Santarelli R., Arslan E., Medá C., Curet C., Völter C., Sainz-Quevedo M., Castorina P., Ambrosetti U., Berrettini S., Frei K., Tedín S., Smith J., Cruz Tapia M., Cavallé L., Gelvez N., Primignani P., Gómez-Rosas E., Martín M., Moreno-Pelayo M.A., Tamayo M., Moreno-Barral J., Moreno F., del Castillo I. A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlingene (*OTOF*) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy // *Hum Mutat.* – 2008. – Vol. 29(6). – P. 823-831.

Roux I., Safieddine S., Nouvian R., Grati M., Simmler M.C., Bahloul A., Perfettini I., Le Gall M., Rostaing P., Hamard G., Triller A., Avan P., Moser T., Petit C. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse // *Cell.* – 2006. – Vol. 127(2). – P. 277-289.

Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction // *Nat Protoc.* – 2010. – Vol. 5(4). – P.725-738.

Sakuma N., Moteki H., Takahashi M., Nishio S.Y., Arai Y., Yamashita Y., Oridate N., Usami S. An effective screening strategy for deafness in combination with a next-generation sequencing platform: a consecutive analysis // *J Hum Genet.* – 2016. – Vol. 61(3). – P. 253-261.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor laboratory press. – 1989.

Sang S., Ling J., Liu X., Mei L., Cai X., Li T., Li W., Li M., Wen J., Liu X., Liu J., Liu Y., Chen H., He C., Feng Y. Proband Whole-Exome Sequencing Identified Genes Responsible for Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss in 33 Chinese Nuclear Families // *Front Genet.* – 2019. – Vol. 10. – P. 639.

Schraders M., Haas S.A., Weegerink N.J., Oostrik J., Hu H., Hoefsloot L.H., Kannan S., Huygen P.L., Pennings R.J., Admiraal R.J., Kalscheuer V.M., Kunst H.P., Kremer H. Next-generation sequencing identifies mutations of *SMPX*, which encodes the small muscle protein, X-linked, as a cause of progressive hearing impairment // *Am J Hum Genet.* – 2011. – Vol. 88(5). – P. 628-634.

Schultz J. M., Yang Y., Caride A. J., Filoteo A. G., Penheiter A. R., Lagziel A., Morell R. J., Mohiddin S. A., Fananapazir L., Madeo A. C., Penniston J. T., Griffith A. J. Modification of human hearing loss by plasma-membrane calcium pump PMCA2 // *New Eng. J. Med.* – 2005. – Vol. 352. – P. 1557-1564.

Schwarz J.M., Cooper D.N., Schuelke M., Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age // *Nat Methods.* – 2014. – Vol. 11(4). – P. 361-362.

Scott D.A., Carmi R., Elbedour K., Duyk G.M., Stone E.M., Sheffield V.C. Nonsyndromic autosomal recessive deafness is linked to the *DFNB1* locus in a large inbred Bedouin family from Israel // *Am J Hum Genet.* – 1995. – Vol. 57(4). – P. 965-968.

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.

Sharma A.K., Rigby A.C., Alper S.L. STAS domain structure and function // *Cell Physiol Biochem.* – 2011. – Vol. 28(3). – P. 407-22.

Shihab H.A., Gough J., Cooper D.N., Stenson P.D., Barker G.L., Edwards K.J., Day I.N., Gaunt T.R. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models // *Hum Mutat.* – 2013. – Vol. 34(1). – P. 57-65.

Shinagawa J., Moteki H., Nishio S.Y., Noguchi Y., Usami S.I. Haplotype Analysis of *GJB2* Mutations: Founder Effect or Mutational Hot Spot? // *Genes.* – 2020. – Vol. 11(3). – P. 250.

Sim N.L., Kumar P., Hu J., Henikoff S., Schneider G., Ng P.C. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol 40 (Web Server issue). – P. W452–W457.

Sirmaci A., Duman D., Ozturkmen-Akay H., Erbek S., Incesulu A., Ozturk-Hismi B., Tokgöz-Yilmaz S., Cengiz F.B., Aslan I., Yildirim M., Hasanefendioğlu-Bayrak A., Ayçiçek A., Yilmaz I., Fitoz S., Altin F., Ozdağ H., Tekin M. Mutations in *TMC1* contribute significantly to nonsyndromic autosomal recessive sensorineural hearing loss: a report of five novel mutations // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* – 2009a. – Vol. 73(5). – P. 699–705.

Sirmaci A., Oztürkmen-Akay H., Erbek S., Incesulu A., Duman D., Taşir-Yilmaz S., Ozdağ H., Tekin M. A founder *TMIE* mutation is a frequent cause of hearing loss in southeastern Anatolia // *Clin Genet.* – 2009b – Vol. 75(6). – P. 562-567.

Sirmaci A., Walsh T., Akay H., Spiliopoulos M., Sakalar Y.B., Hasanefendioğlu-Bayrak A., Duman D., Farooq A., King M.C., Tekin M. *MASPI* mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes // *Am J Hum Genet.* – 2010. – Vol. 87. – P. 679–686.

Sirmaci A., Edwards Y.J., Akay H., Tekin M. Challenges in whole exome sequencing: an example from hereditary deafness // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(2). – P. e32000.

Slager R.E., Newton T.L., Vlangos C.N., Finucane B., Elsea S.H. Mutations in *RAI1* associated with Smith-Magenis syndrome // *Nat Genet.* – 2003. – Vol. 33. – P. 466–468.

Sloan-Heggen C.M., Babanejad M., Beheshtian M., Simpson A.C., Booth K.T., Ardalani F., Frees K.L., Mohseni M., Mozafari R., Mehrjoo Z., Jamali L., Vaziri S., Akhtarkhavari T., Bazazzadegan N., Nikzat N., Arzhangi S., Sabbagh F., Otukesh H., Seifati S.M., Khodaei H., Taghdiri M., Meyer N.C., Daneshi A., Farhadi M., Kahrizi K., Smith R.J., Azaiez H., Najmabadi H. Characterising the spectrum of autosomal recessive hereditary hearing loss in Iran // *J Med Genet.* – 2015. – Vol. 52(12). – P. 823-829.

Sloan-Heggen C.M., Bierer A.O., Shearer A.E., Kolbe D.L., Nishimura C.J., Frees K.L., Ephraim S.S., Shibata S.B., Booth K.T., Campbell C.A., Ranum P.T., Weaver A.E., Black-Ziegelbein E.A., Wang D., Azaiez H., Smith R.J.H. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss // *Hum Genet.* 2016. – Vol. 135(4). – P. 441-450.

Smith A.C., Dykens E., Greenberg F. Behavioral phenotype of Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2) // *Am J Med Genet.* – 1998. – Vol. 81(2). – P. 179-185.

Snabboon T., Plengpanich W., Saengpanich S., Sirisalipoch S., Keelawat S., Sunthornyothin S., Khovidhunkit W., Suwanwalaikorn S., Sridama V., Shotelersuk V. Two common and three novel *PDS* mutations in Thai patients with Pendred syndrome // *J Endocrinol Invest.* – 2007. – Vol. 30(11). – P. 907-913.

Sobe T., Erlich P., Berry A., Korostichevsky M., Vreugde S., Avraham K.B., Bonn  -Tamir B., Shohat M. High frequency of the deafness-associated 167delT mutation in the connexin 26 (*GJB2*) gene in Israeli Ashkenazim // *Am J Med Genet.* – 1999. – Vol. 86(5). – P. 499-500.

S  llner C., Rauch G.J., Siemens J., Geisler R., Schuster S.C., M  ller U., Nicolson T.; Tübingen 2000 Screen Consortium. Mutations in cadherin 23 affect tip links in zebrafish sensory hair cells // *Nature.* – 2004. – Vol. 428(6986). – P. 955-959.

Strom T. M., Hortnagel K., Hofmann S., Gekeler F., Scharfe C., Rabl W., Gerbitz K. D., Meitinger T. Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein // *Hum. Molec. Genet.* – 1998. – Vol. 7. – P. 2021-2028.

Talebizadeh Z., Kelley P. M., Askew J. W., Beisel K. W., Smith S. D. Novel mutation in the *KCNQ4* gene in a large kindred with dominant progressive hearing loss // *Hum. Mutat.* – 1999. – Vol. 14. – P. 493-501.

Tanizawa Y. Genetic diagnosis of diabetes mellitus: Wolfram syndrome--from positional cloning to DNA diagnosis // *Rinsho Byori.* – 2003. – Vol. 51(6). – P. 544-549.

Tariq A, Santos RL, Khan MN, Lee K, Hassan MJ, Ahmad W, Leal SM. Localization of a novel autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment locus DFNB65 to chromosome 20q13.2-q13.32 // *J Mol Med (Berl).* – 2006. – Vol. 84(6). – P. 484-490.

Targovnik H.M., Scheps K.G., Rivolta C.M. Defects in protein folding in congenital hypothyroidism // *Mol Cell Endocrinol.* – 2020. – Vol. 501. – P. 110638.

Tavtigian S.V., Deffenbaugh A.M., Yin L., Judkins T., Scholl T., Samollow P.B., de Silva D., Zharkikh A., Thomas A. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral // *J Med Genet.* – 2005. – Vol. 43(4). – P. 295-305.

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.

Tekin M., Duman T., Boğoçlu G., İncesulu A., Çomak E., Fitoz S., Yılmaz E., İlhan I., Akar N. Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey // *Eur J Pediatr.* – 2003. – Vol. 162.(3). – P. 154-158.

Tekin M., Akcayoz D., Incesulu A. A novel missense mutation in a C2 domain of OTOF results in autosomal recessive auditory neuropathy // *Am. J. Med. Genet.* – 2005. – Vol. 138A. – P. 6-10.

Treadwell-Deering D.E., Powell M.P., Potocki L. Cognitive and behavioral characterization of the Potocki-Lupski syndrome (duplication 17p11.2) // *J Dev Behav Pediatr.* – 2010. – Vol. 31(2). – P. 137-143.

Truong H.T., Dudding T., Blanchard C.L., Elsea S.H. Frameshift mutation hotspot identified in Smith-Magenis syndrome: case report and review of literature // *BMC Med Genet.* – 2010. – Vol. 11. – P. 142.

Tsukada K., Nishio S.Y., Hattori M., Usami S. Ethnic-specific spectrum of *GJB2* and *SLC26A4* mutations: their origin and a literature review // *Ann Otol Rhinol Laryngol.* – 2015. – Vol. 124 Suppl 1. – P. 61S-76S.

Tsukamoto K., Suzuki H., Harada D., Namba A., Abe S., Usami S. Distribution and frequencies of PDS (*SLC26A4*) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese // *Eur.J.Hum.Genet.* – 2003. – Vol. 11. – P. 916–922.

Usami, S., Abe, S., Weston, M. D., Shinkawa, H., Van Camp, G., Kimberling, W. J. Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations // *Hum. Genet.* – 1999. – Vol. 104. – P. 188-192.

Usami S., Abe S., Akita J., Namba A., Shinkawa H., Ishii M., Iwasaki S., Hoshino T., Ito J., Doi K., Kubo T., Nakagawa T., Komiyama S., Tono T., Komune S. Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients // *J Med Genet.* – 2000. – Vol. 37. – P. 38-40.

Van Camp G, Smith RJ. Maternally inherited hearing impairment // *Clin Genet.* – 2000. – Vol. 57(6). – P. 409-414.

Van den Ouweland J.M., Lemkes H.H., Gerbitz K.D., Maassen J.A. Maternally inherited diabetes and deafness (MIDD): a distinct subtype of diabetes associated with a mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene point mutation // *Muscle Nerve Suppl.* – 1995. – Vol. 3. – P. S124-S130.

Van Hauwe P., Everett L.A., Coucke P., Scott D.A., Kraft M.L., Ris-Stalpers C., Bolder C., Otten B., de Vijlder J.J., Dietrich N.L., Ramesh A., Srisailapathy S.C., Parving A., Cremers C.W., Willems P.J., Smith R.J., Green E.D., Van Camp G. Two frequent

missense mutations in Pendred syndrome // *Hum Mol Genet.* – 1998. – Vol. 7(7). – P. 1099-1104.

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(8). – P. 515-518.

Varga R., Kelley P. M., Keats B. J., Starr A., Leal S. M., Cohn E., Kimberling W. J. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (*OTOF*) gene. (Letter) // *J. Med. Genet.* – 2003. – Vol. 40. – P. 45-50.

Vieira G.H., Rodriguez J.D., Carmona-Mora P., Cao L., Gamba B.F., Carvalho D.R., de Rezende Duarte A., Santos S.R., de Souza D.H., DuPont B.R., Walz K., Moretti-Ferreira D., Srivastava A.K. Detection of classical 17p11.2 deletions, an atypical deletion and *RAI1* alterations in patients with features suggestive of Smith-Magenis syndrome // *Eur J Hum Genet.* – 2012. – Vol. 20(2). – P. 148-154.

Vikkula M., Mariman E. C. M., Lui V. C. H., Zhidkova N. I., Tiller G. E., Goldring M. B., van Beersum S. E. C., de Waal Malefijt M. C., van den Hoogen F. H. J., Ropers H.-H., Mayne R., Cheah K. S. E., Olsen B. R., Warman M. L., Brunner H. G. Autosomal dominant and recessive osteochondrodysplasias associated with the *COL11A2* locus // *Cell.* – 1995. – Vol. 80. – P. 431-437.

Vilboux T., Ciccone C., Blancato J.K., Cox G.F., Deshpande C., Introne W.J., Gahl W.A., Smith A.C., Huizing M. Molecular analysis of the Retinoic Acid Induced 1 gene (*RAI1*) in patients with suspected Smith-Magenis syndrome without the 17p11.2 deletion // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6(8). – P. e22861.

Vona B., Mazaheri N., Lin S.J., Dunbar L.A., Maroofian R., Azaiez H., Booth K.T., Vitry S., Rad A., Rüschenhoff F., Varshney P., Fowler B., Beetz C., Alagramam K.N., Murphy D., Shariati G., Sedaghat A., Houlden H., Petree C., VijayKumar S., Smith R.J.H., Haaf T., El-Amraoui A., Bowl M.R., Varshney G.K., Galehdari H. A biallelic variant in *CLRN2* causes non-syndromic hearing loss in humans // *Hum Genet.* – 2021. – Vol. 140(6). – P. 915-931.

Walsh T., Shahin H., Elkan-Miller T., Lee M.K., Thornton A.M., Roeb W., Abu Rayyan A., Lousus S., Avraham K.B., King M.C., Kanaan M. Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein *GPSM2* as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB82 // *Am J Hum Genet.* – 2010. – Vol. 87. – P. 90-94.

Wang A., Liang Y., Fridell R. A., Probst F. J., Wilcox E. R., Touchman J. W., Morton C. C., Morell R. J., Noben-Trauth K., Camper S. A., Friedman T. B. Association of unconventional myosin *MYO15* mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3 // *Science.* – 1998. – Vol. 280. – P. 1447-1451.

Wang D.Y., Wang Y.C., Weil D., Zhao Y.L., Rao S.Q., Zong L., Ji Y.B., Liu Q., Li J.Q., Yang H.M., Shen Y., Benedict-Alderfer C., Zheng Q.Y., Petit C., Wang Q.J. Screening mutations of *OTOF* gene in Chinese patients with auditory neuropathy, including a familial case of temperature-sensitive auditory neuropathy // *BMC Med Genet.* – 2010a. – Vol. 11. – P. 79.

Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data // *Nucleic Acids Res.* – 2010b. – Vol. 38(16):e164.

Wang Q.J., Zhao Y.L., Rao S.Q., Guo Y.F., Yuan H., Zong L., Guan J., Xu B.C., Wang D.Y., Han M.K., Lan L. A distinct spectrum of *SLC26A4* mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct in China // *Clinical genetics.* – 2007 – Vol. 72(3). – P. 245-54.

Wangemann P., Nakaya K., Wu T., Maganti R.J., Itza E.M., Sanneman J.D., Harbidge D.G., Billings S., Marcus D.C. Loss of cochlear HCO₃⁻ secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca²⁺ reabsorption in a Pendred syndrome mouse model // *American Journal of Physiology-Renal Physiology* – 2007. – Vol. 292(5). – P. F1345-F1353.

Weil D., Blanchard S., Kaplan J., Guilford P., Gibson F., Walsh J., Mburu P., Varela A., Levilliers J., Weston M. D., Kelley P. M., Kimberling W. J., Wagenaar M., Levi-Acobas F., Larget-Piet D., Munnich A., Steel K. P., Brown S. D. M., Petit C. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B // *Nature.* – 1995. – Vol. 374. – P. 60-61.

Winata S., Arhya I.N., Moeljopawiro S., Hinnant J.T., Liang Y., Friedman T.B., Asher J.H. Jr. Congenital non-syndromal autosomal recessive deafness in Bengkala, an isolated Balinese village // *J Med Genet.* – 1995. – Vol. 32(5). – P. 336-43.

Wu C.C., Yeh T.H., Chen P.J., Hsu C.J. Prevalent *SLC26A4* mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct and/or Mondini dysplasia: a unique spectrum of mutations in Taiwan, including a frequent founder mutation // *Laryngoscope.* – 2005. – Vol. 115(6). – P.1060-1064.

Wu C.C., Lu Y.C., Chen P.J., Liu A.Y., Hwu W.L., Hsu C.J. Application of SNaPshot multiplex assays for simultaneous multigene mutation screening in patients with idiopathic sensorineural hearing impairment // *Laryngoscope.* – 2009. – Vol. 119(12). – P. 2411-2416.

Wu C.C., Lu Y.C., Chen P.J., Yeh P.L., Su Y.N., Hwu W.L., Hsu C.J. Phenotypic analyses and mutation screening of the *SLC26A4* and *FOXII* genes in 101 Taiwanese families with bilateral nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct (DFNB4) or Pendred syndrome // *Audiol Neurotol.* – 2010. – Vol. 15(1). – P.57-66.

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(1). – P. 44-50.

Yan D., Xiang G., Chai X., Qing J., Shang H., Zou B., Mittal R., Shen J., Smith R.J., Fan Y.S., Blanton S.H., Tekin M., Morton C., Xing W., Cheng J., Liu X.Z. Screening of deafness-causing DNA variants that are common in patients of European ancestry using a microarray-based approach // PLoS One. – 2017. – Vol. 12(3). – P. e0169219.

Yang J.J., Tsai C.C., Hsu H.M., Shiao J.Y., Su C.C., Li S.Y. Hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct and Mondini dysplasia is caused by splice-site mutation in the PDS gene // Hear Res. – 2005. – Vol. 199(1-2). – P. 22-30.

Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction // Nat Methods. – 2015a. – Vol. 12(1). – P. 7-8.

Yang J., Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions // Nucleic Acids Res. – 2015b. – Vol. 43(W1). – P. W174-W181.

Yasunaga S., Grati M., Cohen-Salmon M., El-Amraoui A., Mustapha M., Salem N., El-Zir E., Loiselet J., Petit C. A mutation in *OTOF*, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness // Nat Genet. – 1999. – Vol. 21(4). – P. 363-369.

Yuan Y., Guo W., Tang J., Zhang G., Wang G., Han M., Zhang X., Yang S., He D.Z., Dai P. Molecular epidemiology and functional assessment of novel allelic variants of *SLC26A4* in non-syndromic hearing loss patients with enlarged vestibular aqueduct in China // PLoS One. – 2012. – Vol. 7(11). – P. e49984.

Zalloua P. A., Azar S. T., Delepine M., Makhoul N. J., Blanc H., Sanyoura M., Lavergne A., Stankov K., Lemainque A., Baz P., Julier C. *WFS1* mutations are frequent monogenic causes of juvenile-onset diabetes mellitus in Lebanon // Hum Molec Genet. – 2008. – Vol. 17. – P. 4012-4021.

Zazo Seco C., Wesdorp M., Feenstra I., Pfundt R., Hehir-Kwa J.Y., Lelieveld S.H., Castelein S., Gilissen C., de Wijs I.J., Admiraal R.J., Pennings R.J., Kunst H.P., van de Kamp J.M., Tamminga S., Houweling A.C., Plomp A.S., Maas S.M., de Koning Gans P.A., Kant S.G., de Geus C.M., Frints S.G., Vanhoutte E.K., van Dooren M.F., van den Boogaard M.H., Scheffer H., Nelen M., Kremer H., Hoefsloot L., Schraders M., Yntema H.G. The diagnostic yield of whole-exome sequencing targeting a gene panel for hearing impairment in The Netherlands // Eur J Hum Genet. – 2017. – Vol. 25(3). – P. 308-314.

Zhao J., Yuan Y., Huang S., Huang B., Cheng J., Kang D., Wang G., Han D., Dai P. *KCNJ10* may not be a contributor to nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (NSEVA) in Chinese subjects // PLoS One. – 2014. – Vol. 9(11). – P. e108134.

Zhao Y., Zhao F., Zong L., Zhang P., Guan L., Zhang J., Wang D., Wang J., Chai W., Lan L., Li Q., Han B., Yang L., Jin X., Yang W., Hu X., Wang X., Li N., Li Y., Petit C., Wang J., Wang H.Y., Wang Q. Exome sequencing and linkage analysis identified tenascin-C (TNC) as a novel causative gene in nonsyndromic hearing loss // PLoS One. – 2013. – Vol. 8 (7). – P. e69549.

Zhang Q., Peng C., Song J., Zhang Y., Chen J., Song Z., Shou X., Ma Z., Peng H., Jian X., He W., Ye Z., Li Z., Wang Y., Ye H., Zhang Z., Shen M., Tang F., Chen H., Shi Z., Chen C., Chen Z., Shen Y., Wang Y., Lu S., Zhang J., Li Y., Li S., Mao Y., Zhou L., Yan H., Shi Y., Huang C., Zhao Y. Germline Mutations in *CDH23*, Encoding Cadherin-Related 23, Are Associated with Both Familial and Sporadic Pituitary Adenomas // *Am J Hum Genet.* – 2017. – Vol. 100(5). – P. 817-823.

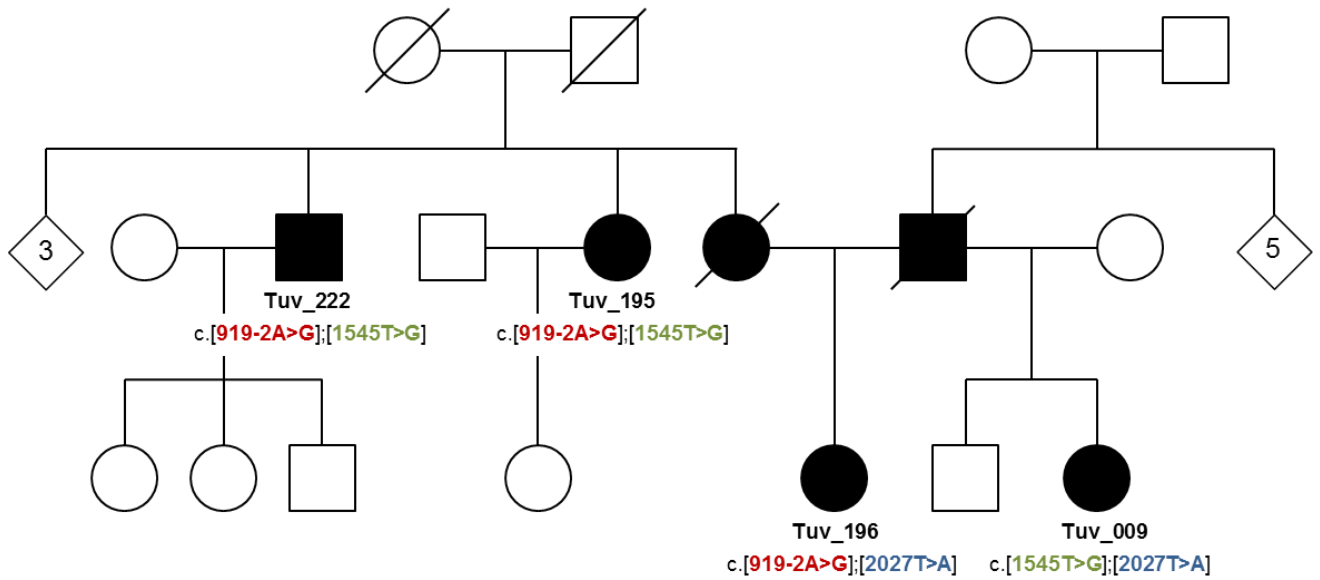
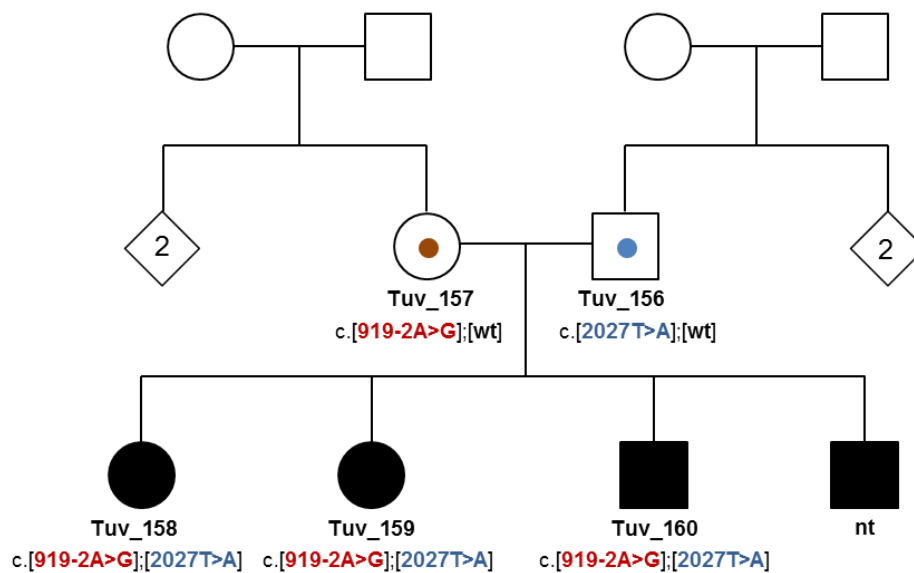
Zlotogora J. Multiple mutations responsible for frequent genetic diseases in isolated populations // *Eur J Hum Genet.* – 2007. – Vol. 15(3). – P. 272-278.

Zou S., Mei X., Yang W., Zhu R., Yang T., Hu H. Whole-exome sequencing identifies rare pathogenic and candidate variants in sporadic Chinese Han deaf patients // *Clin Genet.* – 2020. – Vol. 97(2). – P.352-356.

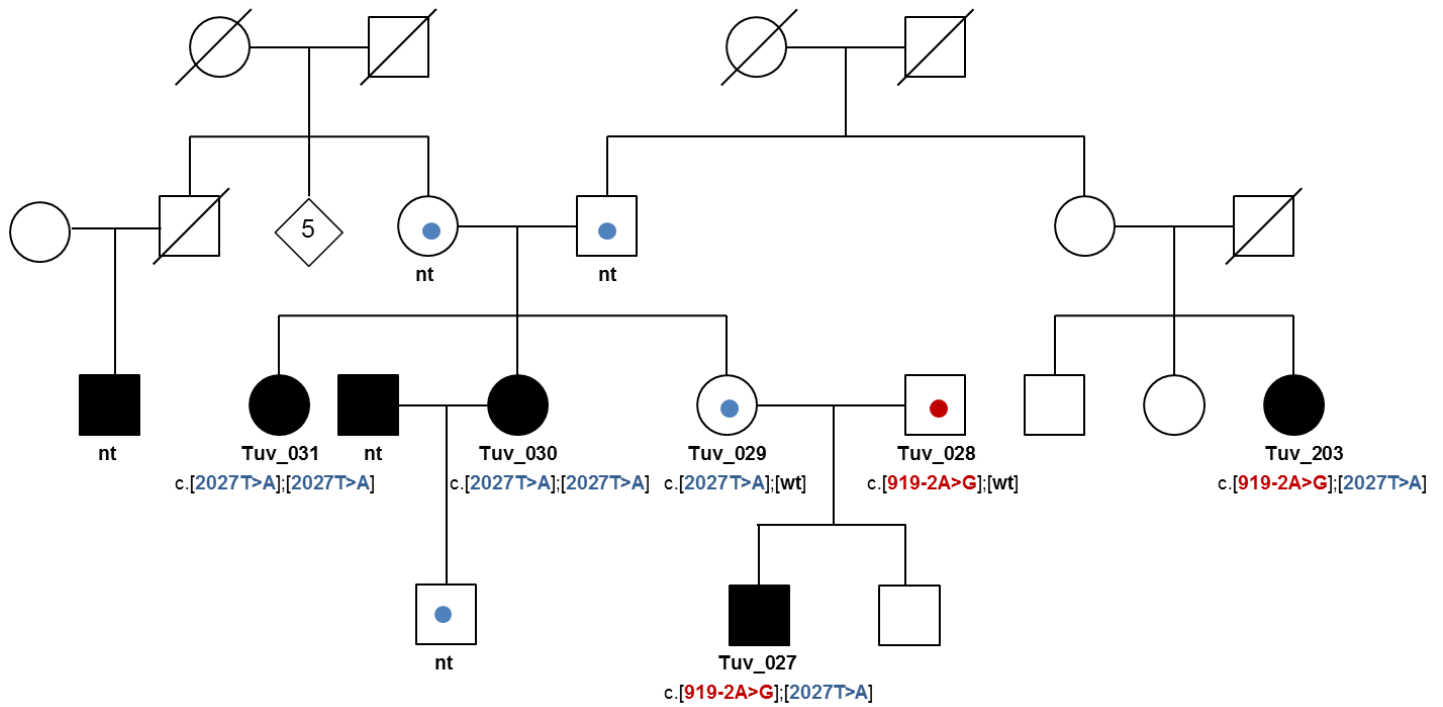
Zytsar M.V., Barashkov N.A., Bady-Khoo M.S., Shubina-Olejnik O.A., Danilenko N.G., Bondar A.A., Morozov I.V., Solovyev A.V., Danilchenko V.Yu., Maximov V.N., Posukh O.L. Updated carrier rates for c.35delG (*GJB2*) associated with hearing loss in Russia and common c.35delG haplotypes in Siberia // *BMC Med Genet.* – 2018 – Vol. 19(1). – P. 138.

Zytsar M.V., Bady-Khoo M.S., Danilchenko V.Y., Maslova E.A., Barashkov N.A., Morozov I.V., Bondar A.A., Posukh O.L. High rates of three common *GJB2* mutations c.516G>C, c.-23+1G>A, c.235delC in deaf patients from Southern Siberia are due to the founder effect // *Genes.* – 2020. – Vol. 11. – P. 833-850.

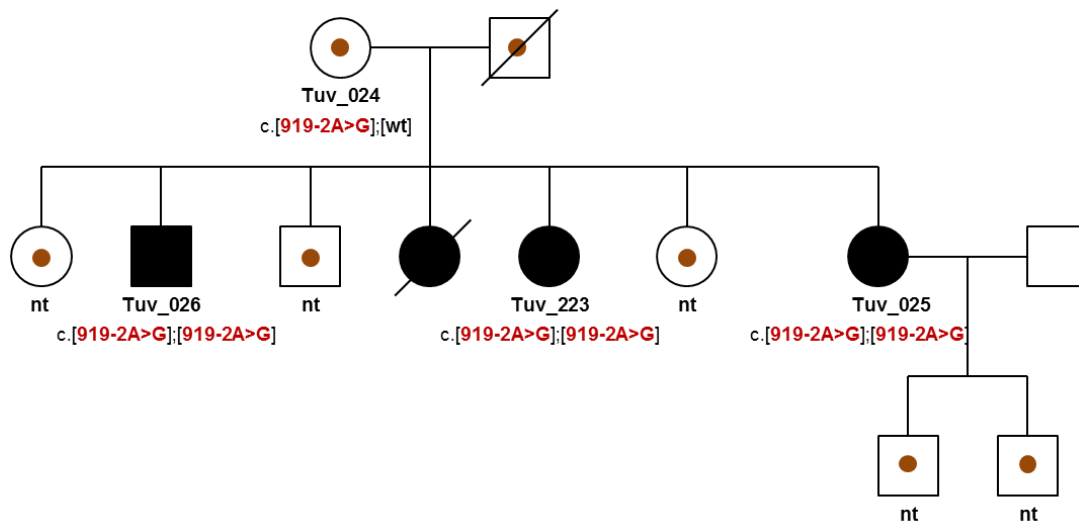
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Родословные семей с мутациями гена *SLC26A4*

СЕМЬЯ 66/06

СЕМЬЯ 10


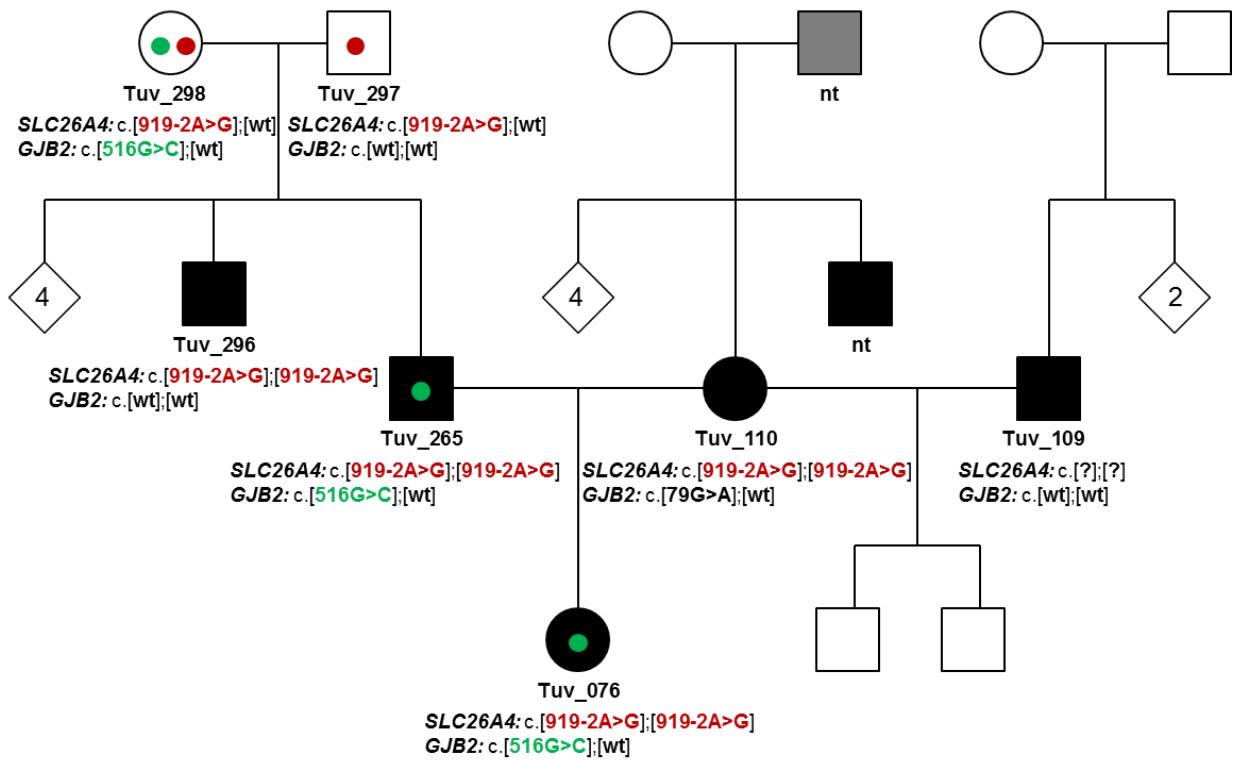
СЕМЬЯ 15/72



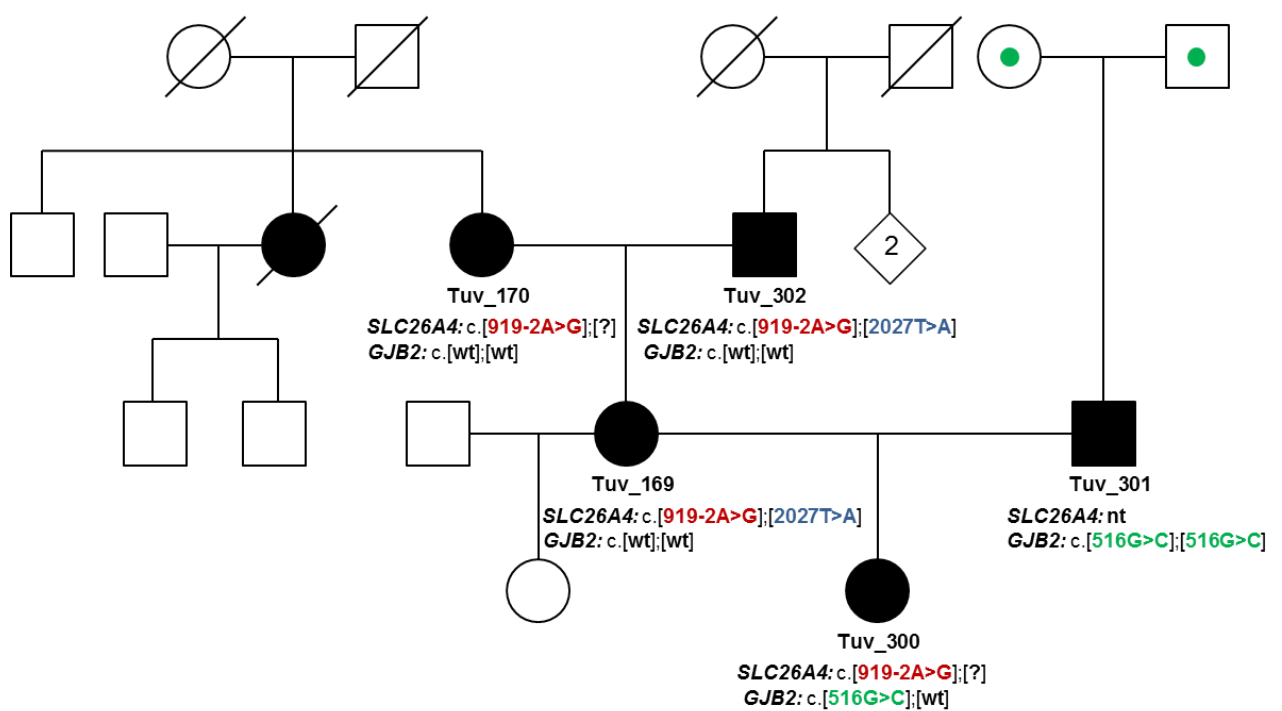
СЕМЬЯ 14



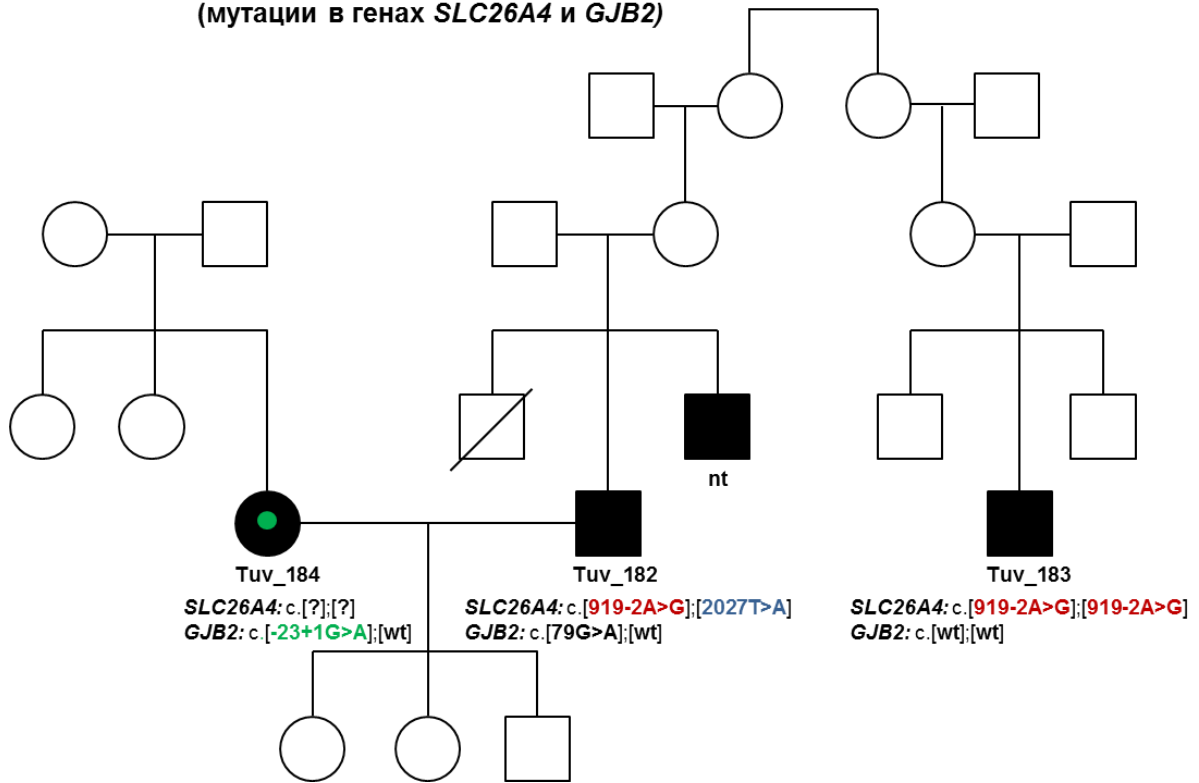
СЕМЬЯ 17

(мутации в генах *SLC26A4* и *GJB2*)

СЕМЬЯ 52

(мутации в генах *SLC26A4* и *GJB2*)

СЕМЬЯ 59

(мутации в генах *SLC26A4* и *GJB2*)

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Результаты компьютерной томографии (КТ) височных костей у пациентов, гомозиготных или компаунд-гетерозиготных по мутациям гена *SLC26A4*.

	Шифр	Пол	Генотип по гену <i>SLC26A4</i>	Расширение водопровода преддверия (мм)		Заключение по КТ
				Правое ухо	Левое ухо	
1	Tuv_011	м	c.919-2A>G / c.919-2A>G	до 1,5	до 1,5	КТ -картина без патологии
2	Tuv_012	ж	c.919-2A>G / c.919-2A>G	3,5	2,5	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон. Двухсторонний хронический мезотимпанит
3	Tuv_013	ж	c.919-2A>G / c.919-2A>G	3,5	3,0	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон.
4	Tuv_025	ж	c.919-2A>G / c.919-2A>G	2,5	1,9	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон.
5	Tuv_054	ж	c.170C>A / c.170C>A	5,0	3,9	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон.
6	Tuv_060	м	c.919-2A>G / c.919-2A>G	3,1	2,8	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон. Полипы верхнечелюстных пазух.
7	Tuv_061	ж	c.919-2A>G / c.919-2A>G	2,0	1,7	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон. Полипы верхнечелюстных пазух.
8	Tuv_076	ж	c.919-2A>G / c.919-2A>G	2,4	5,1	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон. Перегородка в водопроводе улитки справа.
9	Tuv_110	ж	c.919-2A>G / c.919-2A>G	3,1	2,9	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон. Хронический полисинусит.
10	Tuv_183	м	c.919-2A>G / c.919-2A>G	2,5	1,3	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон. Кисты верхнечелюстных пазух.
11	Tuv_196	ж	c.919-2A>G / c.2027T>A	3,2	2,7	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон. Хронический мезотимпанит слева.
12	Tuv_265	м	c.919-2A>G / c.919-2A>G	1,8	1,9	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон. Полипы верхнечелюстных пазух.
13	Tuv_195	ж	c.919-2A>G / 107698042 T>G	3,8	3,2	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон.
14	Tuv_035	ж	c.919-2A>G / c.2027T>A	3,1	2,4	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон.
15	Tuv_031	ж	c.2027T>A / c.2027T>A	2,0	1,9	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон. Двухсторонний хронический мезотимпанит, слева обострение. Перфорация левой барабанной перегородки.
16	Tuv_048	м	c.919-2A>G / c.919-2A>G	2,0	0,9	КТ -картина расширенного водопровода преддверия справа. Склеротический тип строения сосцевидных отростков.
17	Tuv_096	м	c.919-2A>G / c.919-2A>G	2,6	1,7	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон.
18	Tuv_099	ж	c.919-2A>G / c.919-2A>G	3,1	2,0	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон.
19	Tuv_158	ж	c.919-2A>G / c.2027T>A	2,3	2,8	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон.
20	Tuv_159	ж	c.919-2A>G / c.2027T>A	2,4	2,0	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон.
21	Tuv_160	м	c.919-2A>G / c.2027T>A	2,0	2,3	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон.
22	Tuv_021	м	c.919-2A>G / c.2034+1G>A	2,9	1,5	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон.
23	Tuv_107	м	c.919-2A>G / c.2027T>A	3,5	3,2	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон.
24	Tuv_203	ж	c.919-2A>G / c.2027T>A	2,3	1,9	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон. Двухсторонний хронический мезотимпанит вне обострения.
25	Tuv_229	ж	c.919-2A>G / c.919-2A>G	3,1	1,5	КТ -картина расширенного водопровода преддверия. Эксудативный гайморит справа.
26	Tuv_140	м	c.919-2A>G / c.919-2A>G	2,8	1,5	КТ -картина расширенного водопровода преддверия.
27	Tuv_120	м	c.170C>A / c.919-2A>G	3,1	2,1	КТ -картина расширенного водопровода преддверия с обеих сторон. Состояние после кохлеарной имплантации слева. Хронический полисинусит. Полипы в верхнечелюстной пазухе.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Список статей, отобранных для анализа распространенности мутации с.919-2A>G в гене *SLC26A4* на территории Евразии.

1. Bademci G, Foster J 2nd, Mahdih N, Bonyadi M, Duman D, Cengiz FB, Menendez I, Diaz-Horta O, Shirkavand A, Zeinali S, Subasioglu A, Tokgoz-Yilmaz S, Huesca-Hernandez F, de la Luz Arenas-Sordo M, Dominguez-Aburto J, Hernandez-Zamora E, Montenegro P, Paredes R, Moreta G, Vinueza R, Villegas F, Mendoza-Benitez S, Guo S, Bozan N, Tos T, Incesulu A, Sennaroglu G, Blanton SH, Ozturkmen-Akay H, Yildirim-Baylan M, Tekin M. Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive nonsyndromic deafness in a large multiethnic cohort. *Genet Med*. 2016 Apr;18(4):364-71. Erratum in: *Genet Med*. 2016 Aug;18(8):859.
2. Cengiz FB, Yilmazer R, Olgun L, Sennaroglu L, Kirazli T, Alper H, Olgun Y, Incesulu A, Atik T, Huesca-Hernandez F, Domínguez-Aburto J, González-Rosado G, Hernandez-Zamora E, Arenas-Sordo ML, Menendez I, Orhan KS, Avci H, Mahdih N, Bonyadi M, Foster J 2nd, Duman D, Ozkinay F, Blanton SH, Bademci G, Tekin M. Novel pathogenic variants underlie *SLC26A4*-related hearing loss in a multiethnic cohort. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2017 Oct;101:167-171.
3. Chai Y, Huang Z, Tao Z, Li X, Li L, Li Y, Wu H, Yang T. Molecular etiology of hearing impairment associated with nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct in East China. *Am J Med Genet A*. 2013 Sep;161A(9):2226-33.
4. Chai Y, Pang X, Chai Y, Pang X, Chen D, Li L, Chen Y, Sun L, Wang X, Wu H, Yang T. Molecular etiology of non-dominant, non-syndromic, mild-to-moderate childhood hearing impairment in Chinese Hans. *Am J Med Genet A*. 2014 Dec;164A(12):3115-9.
5. Choi BY, Stewart AK, Nishimura KK, Cha WJ, Seong MW, Park SS, Kim SW, Chun YS, Chung JW, Park SN, Chang SO, Kim CS, Alper SL, Griffith AJ, Oh SH. Efficient molecular genetic diagnosis of enlarged vestibular aqueducts in East Asians. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009 Oct;13(5):679-87.
6. Dai P, Yuan Y, Huang D, Zhu X, Yu F, Kang D, Yuan H, Wu B, Han D, Wong LJ. Molecular etiology of hearing impairment in Inner Mongolia: mutations in *SLC26A4* gene and relevant phenotype analysis. *J Transl Med*. 2008 Nov 30;6:74.
7. Du W, Wang Q, Zhu Y, Wang Y, Guo Y. Associations between *GJB2*, mitochondrial 12S rRNA, *SLC26A4* mutations, and hearing loss among three ethnicities. *Biomed Res Int*. 2014;2014:746838.
8. Duan SH, Zhu YM, Wang YL, Guo YF. Common molecular etiology of nonsyndromic hearing loss in 484 patients of 3 ethnicities in northwest China. *Acta Otolaryngol*. 2015 Jun;135(6):586-91.
9. Hu X, Liang F, Zhao M, Gong A, Berry ER, Shi Y, Wang Y, Chen Y, Liu A, Qu C. Mutational analysis of the *SLC26A4* gene in Chinese sporadic nonsyndromic hearing-impaired children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2012 Oct;76(10):1474-80.
10. Huang B, Han M, Wang G, Huang S, Zeng J, Yuan Y, Dai P. Genetic mutations in non-syndromic deafness patients in Hainan Province have a different mutational spectrum compared to patients from Mainland China. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2018 May;108:49-54.
11. Huang S, Han D, Yuan Y, Wang G, Kang D, Zhang X, Yan X, Meng X, Dong M, Dai P. Extremely discrepant mutation spectrum of *SLC26A4* between Chinese patients with isolated Mondini deformity and enlarged vestibular aqueduct. *J Transl Med*. 2011 Sep 30;9:167.
12. Iwasaki S, Tsukamoto K, Usami S, Misawa K, Mizuta K, Mineta H. Association of *SLC26A4* mutations with clinical features and thyroid function in deaf infants with enlarged vestibular aqueduct. *J Hum Genet*. 2006;51(9):805-10.
13. Jiang Y, Huang S, Deng T, Wu L, Chen J, Kang D, Xu X, Li R, Han D, Dai P. Mutation Spectrum of Common Deafness-Causing Genes in Patients with Non-Syndromic Deafness in the Xiamen Area, China. *PLoS One*. 2015 Aug 7;10(8):e0135088.
14. Jung J, Seo YW, Choi JY, Kim SH. Vestibular function is associated with residual low-frequency hearing loss in patients with bi-allelic mutations in the *SLC26A4* gene. *Hear Res*. 2016 May;335:33-39.

15. Jung J, Lee JS, Cho KJ, Yu S, Yoon JH, Yung Gee H, Choi JY. Genetic Predisposition to Sporadic Congenital Hearing Loss in a Pediatric Population. *Sci Rep*. 2017 Apr 6;7:45973.
16. Kim BG, Shin JW, Park HJ, Kim JM, Kim UK, Choi JY. Limitations of hearing screening in newborns with PDS mutations. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2013 May;77(5):833-7.
17. Koohiyan M. A systematic review of *SLC26A4* mutations causing hearing loss in the Iranian population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2019;125:1-5.
18. Lai CC, Chiu CY, Shiao AS, Tso YC, Wu YC, Tu TY, Jap TS. Analysis of the *SLC26A4* gene in patients with Pendred syndrome in Taiwan. *Metabolism*. 2007 Sep;56(9):1279-84.
19. Lai R, Hu P, Zhu F, Zhu G, Vivero R, Peng A, Wu W, Xiao Z, Liu X, Xie D. Genetic diagnosis and cochlear implantation for patients with nonsyndromic hearing loss and enlarged vestibular aqueduct. *J Laryngol Otol*. 2012 Apr;126(4):349-55.
20. Lee HJ, Jung J, Shin JW, Song MH, Kim SH, Lee JH, Lee KA, Shin S, Kim UK, Bok J, Lee KY, Choi JY, Park HJ. Correlation between genotype and phenotype in patients with bi-allelic *SLC26A4* mutations. *Clin Genet*. 2014 Sep;86(3):270-5.
21. Li H, Wang B, Liu D, Wang T, Li Q, Wang W, Li H. SNPscan as a high-performance screening tool for mutation hotspots of hearing loss-associated genes. *Genomics*. 2015 Aug;106(2):83-7.
22. Lin PH, Hsu CJ, Lin YH, Lin YH, Lee HY, Wu CC, Liu TC. Etiologic and Audiologic Characteristics of Patients With Pediatric-Onset Unilateral and Asymmetric Sensorineural Hearing Loss. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2017 Sep 1;143(9):912-919.
23. Liu Y, Wang L, Feng Y, He C, Liu D, Cai X, Jiang L, Chen H, Liu C, Wu H, Mei L. A New Genetic Diagnostic for Enlarged Vestibular Aqueduct Based on Next-Generation Sequencing. *PLoS One*. 2016 Dec 20;11(12):e0168508.
24. Miyagawa M, Nishio SY, Usami S; Deafness Gene Study Consortium. Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation of hearing loss patients caused by *SLC26A4* mutations in the Japanese: a large cohort study. *J Hum Genet*. 2014;59(5):262-268.
25. Nishio SY, Usami S. Deafness gene variations in a 1120 nonsyndromic hearing loss cohort: molecular epidemiology and deafness mutation spectrum of patients in Japan. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015 May;124 Suppl 1:49S-60S.
26. Oh SH, Choi BY, Son KR, Lee KJ, Chang SO, Kim CS. Can magnetic resonance imaging provide clues to the inner ear functional status of enlarged vestibular aqueduct subjects with PDS mutation? *Otol Neurotol*. 2008 Aug;29(5):593-600.
27. Okamoto Y, Mutai H, Nakano A, Arimoto Y, Sugiuchi T, Masuda S, Morimoto N, Sakamoto H, Ogahara N, Takagi A, Taiji H, Kaga K, Ogawa K, Matsunaga T. Subgroups of enlarged vestibular aqueduct in relation to *SLC26A4* mutations and hearing loss. *Laryngoscope*. 2014 Apr;124(4):E134-40.
28. Pang X, Chai Y, Chen P, He L, Wang X, Wu H, Yang T. Mono-allelic mutations of *SLC26A4* is over-presented in deaf patients with non-syndromic enlarged vestibular aqueduct. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2015 Aug;79(8):1351-3.
29. Park HJ, Shaukat S, Liu XZ, Hahn SH, Naz S, Ghosh M, Kim HN, Moon SK, Abe S, Tukamoto K, Riazuddin S, Kabra M, Erdenetungalag R, Radnaabazar J, Khan S, Pandya A, Usami SI, Nance WE, Wilcox ER, Riazuddin S, Griffith AJ. Origins and frequencies of *SLC26A4* (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J Med Genet*. 2003 Apr;40(4):242-8.
30. Park HJ, Lee SJ, Jin HS, Lee JO, Go SH, Jang HS, Moon SK, Lee SC, Chun YM, Lee HK, Choi JY, Jung SC, Griffith AJ, Koo SK. Genetic basis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueducts in Koreans. *Clin Genet*. 2005 Feb;67(2):160-5.
31. Park JH, Kim NK, Kim AR, Rhee J, Oh SH, Koo JW, Nam JY, Park WY, Choi BY. Exploration of molecular genetic etiology for Korean cochlear implantees with severe to profound hearing loss and its implication. *Orphanet J Rare Dis*. 2014 Nov 6;9:167.
32. Rah YC, Kim AR, Koo JW, Lee JH, Oh SH, Choi BY. Audiologic presentation of enlargement of the vestibular aqueduct according to the *SLC26A4* genotypes. *Laryngoscope*. 2015 Jun;125(6):E216-22.

33. Reyes S, Wang G, Ouyang X, Han B, Du LL, Yuan HJ, Yan D, Dai P, Liu XZ. Mutation analysis of *SLC26A4* in mainland Chinese patients with enlarged vestibular aqueduct. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009 Oct;141(4):502-8.
34. Roh KJ, Park S, Jung JS, Moon IS, Kim SH, Bang MY, Choi JY. Hearing Preservation During Cochlear Implantation and Electroacoustic Stimulation in Patients With *SLC26A4* Mutations. *Otol Neurotol*. 2017 Oct;38(9):1262-1267.
35. Shin JW, Lee SC, Lee HK, Park HJ. Genetic Screening of *GJB2* and *SLC26A4* in Korean Cochlear Implantees: Experience of Soree Ear Clinic. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2012;5 Suppl 1:S10–S13.
36. Snabboon T, Plengpanich W, Saengpanich S, Sirisalipoch S, Keelawat S, Sunthornyothin S, Khovidhunkit W, Suwanwalaikorn S, Sridama V, Shotelersuk V. Two common and three novel *PDS* mutations in Thai patients with Pendred syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2007 Dec;30(11):907-13.
37. Song MH, Shin JW, Park HJ, Lee KA, Kim Y, Kim UK, Jeon JH, Choi JY. Intrafamilial phenotypic variability in families with biallelic *SLC26A4* mutations. *Laryngoscope*. 2014 May;124(5):E194-202.
38. Suzuki H, Oshima A, Tsukamoto K, Abe S, Kumakawa K, Nagai K, Satoh H, Kanda Y, Iwasaki S, Usami S. Clinical characteristics and genotype-phenotype correlation of hearing loss patients with *SLC26A4* mutations. *Acta Otolaryngol*. 2007 Dec;127(12):1292-7.
39. Tsukamoto K, Suzuki H, Harada D, Namba A, Abe S, Usami S. Distribution and frequencies of *PDS* (*SLC26A4*) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. *Eur J Hum Genet*. 2003;11(12):916-922.
40. Usami S, Nishio SY, Nagano M, Abe S, Yamaguchi T; Deafness Gene Study Consortium. Simultaneous screening of multiple mutations by invader assay improves molecular diagnosis of hereditary hearing loss: a multicenter study. *PLoS One*. 2012;7(2):e31276.
41. Xin F, Yuan Y, Deng X, Han M, Wang G, Zhao J, Gao X, Liu J, Yu F, Han D, Dai P. Genetic mutations in nonsyndromic deafness patients of Chinese minority and Han ethnicities in Yunnan, China. *J Transl Med*. 2013 Dec 17;11:312.
42. Yan YJ, Li Y, Yang T, Huang Q, Wu H. The effect of *GJB2* and *SLC26A4* gene mutations on rehabilitative outcomes in pediatric cochlear implant patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013 Nov;270(11):2865-70.
43. Yao G, Chen D, Wang H, Li S, Zhang J, Feng Z, Guo L, Yang Z, Yang S, Sun C, Zhang X, Ma D. Novel mutations of *SLC26A4* in Chinese patients with nonsyndromic hearing loss. *Acta Otolaryngol*. 2013 Aug;133(8):833-41.
44. Yang JJ, Tsai CC, Hsu HM, Shiao JY, Su CC, Li SY. Hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct and Mondini dysplasia is caused by splice-site mutation in the *PDS* gene. *Hear Res*. 2005 Jan;199(1-2):22-30.
45. Yuan Y, You Y, Huang D, Cui J, Wang Y, Wang Q, Yu F, Kang D, Yuan H, Han D, Dai P. Comprehensive molecular etiology analysis of nonsyndromic hearing impairment from typical areas in China. *J Transl Med*. 2009 Sep 10;7:79.
46. Yuan Y, Guo W, Tang J, Zhang G, Wang G, Han M, Zhang X, Yang S, He DZ, Dai P. Molecular epidemiology and functional assessment of novel allelic variants of *SLC26A4* in non-syndromic hearing loss patients with enlarged vestibular aqueduct in China. *PLoS One*. 2012;7(11):e49984.
47. Wang QJ, Zhao YL, Rao SQ, Guo YF, Yuan H, Zong L, Guan J, Xu BC, Wang DY, Han MK, Lan L, Zhai SQ, Shan Y. A distinct spectrum of *SLC26A4* mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct in China. *Clin Genet*. 2007 Sep;72(3):245-54.
48. Wu CC, Chen PJ, Hsu CJ. Specificity of *SLC26A4* mutations in the pathogenesis of inner ear malformations. *Audiol Neurotol*. 2005 Jul-Aug;10(4):234-42.
49. Wu CC, Yeh TH, Chen PJ, Hsu CJ. Prevalent *SLC26A4* mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct and/or Mondini dysplasia: a unique spectrum of mutations in Taiwan, including a frequent founder mutation. *Laryngoscope*. 2005 Jun;115(6):1060-4.

50. Wu CC, Chen PJ, Chiu YH, Lu YC, Wu MC, Hsu CJ. Prospective mutation screening of three common deafness genes in a large Taiwanese Cohort with idiopathic bilateral sensorineural hearing impairment reveals a difference in the results between families from hospitals and those from rehabilitation facilities. *Audiol Neurotol*. 2008;13(3):172-81.
51. Wu CC, Lee YC, Chen PJ, Hsu CJ. Predominance of genetic diagnosis and imaging results as predictors in determining the speech perception performance outcome after cochlear implantation in children. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2008 Mar;162(3):269-76.
52. Wu CC, Lu YC, Chen PJ, Yeh PL, Su YN, Hwu WL, Hsu CJ. Phenotypic analyses and mutation screening of the *SLC26A4* and *FOXI1* genes in 101 Taiwanese families with bilateral nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct (DFNB4) or Pendred syndrome. *Audiol Neurotol*. 2010;15(1):57-66.
53. Wu CC, Liu TC, Wang SH, Hsu CJ, Wu CM. Genetic characteristics in children with cochlear implants and the corresponding auditory performance. *Laryngoscope*. 2011 Jun;121(6):1287-93.
54. Wu CM, Ko HC, Tsou YT, Lin YH, Lin JL, Chen CK, Chen PL, Wu CC. Long-Term Cochlear Implant Outcomes in Children with *GJB2* and *SLC26A4* Mutations. *PLoS One*. 2015 Sep 23;10(9):e0138575.
55. Wu L, Liu Y, Wu J, Chen S, Tang S, Jiang Y, Dai P. Study on the relationship between the pathogenic mutations of *SLC26A4* and CT phenotypes of inner ear in patient with sensorineural hearing loss. *Biosci Rep*. 2019 Mar 22;39(3). pii: BSR20182241.
56. Zhao FF, Lan L, Wang DY, Han B, Qi Y, Zhao Y, Zong L, Li Q, Wang QJ. Correlation analysis of genotypes, auditory function, and vestibular size in Chinese children with enlarged vestibular aqueduct syndrome. *Acta Otolaryngol*. 2013 Dec;133(12):1242-9.
57. Zhao J, Yuan Y, Huang S, Huang B, Cheng J, Kang D, Wang G, Han D, Dai P. *KCNJ10* may not be a contributor to nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (NSEVA) in Chinese subjects. *PLoS One*. 2014 Nov 5;9(11):e108134.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Таблица 1. STR-гаплотипы с мутацией с.919-2A>G гена *SLC26A4*.

Шифр пациента	D7S496	с.919-2A>G	D7S2459	D7S2456	D7S799	D7S525
Tuv_011	120	M	147	244	131	227
Tuv_012	120	M	147	244	131	227
Tuv_025	120	M	147	244	131	227
Tuv_048	120	M	147	244	131	227
Tuv_059	120	M	147	244	131	227
Tuv_060	120	M	147	244	131	227
Tuv_064	120	M	147	244	131	227
Tuv_075	120	M	147	244	131	227
Tuv_092	120	M	147	244	131	227
Tuv_096	120	M	147	244	131	227
Tuv_099	120	M	147	244	131	227
Tuv_122	120	M	147	244	131	227
Tuv_154	120	M	147	244	131	227
Tuv_183	120	M	147	244	131	227
Tuv_221	120	M	147	244	131	227
Tuv_223	120	M	147	244	131	227
Tuv_231	120	M	147	244	131	227
Tuv_247	120	M	147	244	131	227
Tuv_296	120	M	147	244	131	227
Tuv_110	120	M	147	244	131	225/227
Tuv_140	120	M	147	244	131	221/227
Tuv_205	120	M	147	244	131	227/229
Tuv_229	120	M	147	244	131	227/229
Расстояние от мутации (центромера - М - теломера)	~ 0.17 Mb	0	~ 7.6 kb	~ 0.36 Mb	~ 1.29 Mb	~ 2.32 Mb
Наиболее частый аллель у пациентов с с.919-2A>G	120	с.919-2A>G	147	244	131	227
Частота этого аллеля на хромосомах с с.919-2A>G	100%	100%	100%	100%	100%	91.3%
Частота этого аллеля на хромосомах без с.919-2A>G	2.38%	0	21.82%	57.94%	100%	38.98%
<i>p</i>	0.1127×10^{-37}	-	0.4128×10^{-21}	1	1.4340	0.2561×10^{-09}
δ	1.0000	-	1.0000	1.0000	-	0.8575

Примечание. Цветом выделена предполагаемая область гаплотипа-основателя для мутации с.919-2A>G гена *SLC26A4*. М - мутация с.919-2A>G.

Таблица 2. SNP-гаплотипы с мутацией с.919-2A>G гена *SLC26A4*.

Шифр пациента	rs2248464	rs2248465	с.919-2A>G	rs2395911	rs2072063	rs2072064	rs2072065
Tuv_011	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_012	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_025	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_048	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_059	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_060	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_064	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_075	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_092	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_096	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_099	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_122	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_154	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_183	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_221	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_223	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_231	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_247	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_296	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_110	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_140	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_205	A	C	M	G	C	A	C
Tuv_229	A	C	M	G	C	A	C
Расстояние от мутации (центромера -М- теломера)	20.276 kb	20.270 kb	0	0.215 kb	6.536 kb	10.615 kb	10.763 kb
Наиболее частый аллель у пациентов с с.919-2A>G	A	C	с.919-2A>G	G	C	A	C
Частота этого аллеля на хромосомах с с.919-2A>G	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Частота этого аллеля на хромосомах без с.919-2A>G	20.63%	31.75%	0%	34.92%	100%	40.48%	50.79%
<i>p</i>	0.1697×10^{-22}	0.3332×10^{-17}	-	0.6282×10^{-16}	1.434	1	1
δ	1.0000	1.0000	-	1.0000	-	1.0000	1.0000

Примечание. Цветом выделена предполагаемая область гаплотипа-основателя А-С-Г-С-А-С для мутации с.919-2A>G гена *SLC26A4*. М - мутация с.919-2A>G.