

ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *GJB2* И *GALT*, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ НЕЙРОСЕНСОРНОЙ ТУГОУХОСТИ И ГАЛАКТОЗЕМИИ

Д. Д. Абрамов¹✉, М. В. Белоусова², В. В. Кадочникова², А. А. Рагимов³, Д. Ю. Трофимов¹

¹ ООО «НПФ ДНК-Технология», Москва

² ГНЦ Институт иммунологии, Москва

³ Центр крови,

Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва

Статья продолжает цикл работ, посвященных определению частоты носительства в российской популяции мутаций, ассоциированных с развитием распространенных моногенных заболеваний. Целью исследования было установление частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *GJB2* и *GALT* у доноров первичной кроводачи. При генотипировании 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации, обнаружены 37 носителей мутаций в гене *GJB2*, ассоциированных с развитием нейросенсорной тугоухости (частота в выборке составила 3,7 %, или 1 : 27), и 6 носителей мутаций в гене *GALT*, ассоциированных с развитием галактоземии (частота в выборке — 0,6 %, или 1 : 167). Выявлен 1 случай сочетанного носительства мутаций, и, таким образом, всего обнаружены 42 носителя мутаций в генах *GJB2* и *GALT* (частота в выборке — 4,2 %, или 1 : 24).

Ключевые слова: тугоухость, *GJB2*, галактоземия, *GALT*, генотипирование, российская популяция

✉ **Для корреспонденции:** Абрамов Дмитрий Дмитриевич
Каширское ш., д. 24, корп. 2, г. Москва, 115478; d.d.abramov@mail.ru

Статья получена: 06.12.2016 Статья принята в печать: 12.12.2016

CARRIER FREQUENCY OF *GJB2* AND *GALT* MUTATIONS ASSOCIATED WITH SENSORINEURAL HEARING LOSS AND GALACTOSEMIA IN THE RUSSIAN POPULATION

Abramov DD¹✉, Belousova MV², Kadochnikova VV², Ragimov AA³, Trofimov DY¹

¹ DNA-Technology LLC, Moscow, Russia

² National Research Center — Institute of Immunology, Moscow, Russia

³ Blood Center,

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

This article continues a series of works estimating carrier frequencies of mutations associated with the development of common monogenic disorders in the Russian population. The study aimed to establish the frequency of *GJB2* and *GALT* mutations in first-time blood donors. Genotyping of 1000 first-time blood donors who identify themselves as Russians and permanently reside in the Russian Federation detected 37 carriers of *GJB2* mutations associated with sensorineural hearing loss (carrier frequency in the sample was 3.7 %, or 1 : 27) and 6 carriers of *GALT* mutations associated with galactosemia (carrier frequency in the sample was 0.6 %, or 1 : 167). In one carrier, concurrent mutations were detected; thus, in total 42 carriers of *GJB2* and *GALT* mutations were detected (carrier frequency in the sample was 4.2 %, or 1 : 24).

Keywords: sensorineural hearing loss, *GJB2*, galactosemia, *GALT*, genotyping, Russian population

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry Abramov
Kashirskoe sh., d. 24, korp. 2, Moscow, Russia, 115478; d.d.abramov@mail.ru

Received: 06.12.2016 Accepted: 12.12.2016

Нейросенсорная несиндромальная тугоухость — наследственное заболевание (OMIM #220290), связанное с врожденным нарушением слуховой функции. Среди наследственных нарушений слуха в развитых странах чаще всего встречается аутосомно-рецессивная несиндромальная тугоухость, связанная с мутацией в гене *GJB*, кодирующем белок коннексин 26. Известно более 90 мутаций гена *GJB2*, ассоциированных с тугоухостью, однако для популяций России и Европы наиболее значимой является мутация 35delG, приводящая к появлению преждевременного стоп-кодона. Частота носительства мутации *GJB2*:35delG

может варьировать от 1 : 100 до 1 : 30 для европейских популяций и от 1 : 50 до 1 : 25 для некоторых российских популяций [1–5].

Галактоземия — наследственное заболевание, обусловленное пониженной активностью ферментов, участвующих в превращении галактозы в глюкозу. Галактоза поступает в организм с пищей в составе дисахарида лактозы (молочный сахар). Считают, что патологические повреждения обусловлены накоплением в клетках больных больших количеств галактозо-1-фосфата, что приводит к нарушению клеточного метаболизма. Наибольшие изменения

возникают в печени, почках, хрусталике глаза, мозге. Без лечения больные погибают в первые месяцы жизни от инфекций, сепсиса или печеночной недостаточности, у всех больных развивается умственная отсталость с характерными нарушениями речи (хаотичная речь). При раннем назначении диеты дети могут развиваться нормально. В основе патогенеза болезни — снижение активности фермента галактозо-1-фосфат уридилтрансферазы, обусловленное мутациями в гене *GALT*. В норме фермент катализирует продукцию глюкозо-1-фосфата и уридилдифосфат-галактозы из галактозо-1-фосфата и уридилдифосфат-глюкозы. Галактоземия наследуется по аутосомно-рецессивному типу, в российской популяции встречается в среднем у 1 на 20 000 новорожденных. Наиболее значимыми для российской популяции являются мутации Q188R, K285N, M142K, L358P, IVS3-2A>C [6, 7].

Целью данного исследования было установление частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах *GJB2* и *GALT* у доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала для настоящего исследования использовали коллекцию периферической крови 1000 здоровых индивидов (доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских).

Выделение ДНК проводили из 0,1 мл периферической крови при помощи набора реагентов «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» («ДНК-Технология», Россия). Методика выделения основана на лизисе биоматериала с последующими сорбцией ДНК на носителе, отмывке примесей, элюцией ДНК с сорбента. Полученные образцы ДНК сразу использовали для генотипирования либо хранили при -20°C . Концентрация ДНК, определенная на специализированном флуориметре Qubit (Invitrogen, США), составляла в среднем 50–100 мкг/мл.

Определение замен одиночных нуклеотидов проводили с использованием комплекта реагентов «Скрининг моногенных заболеваний» («ДНК-Технология», Россия). Принцип их действия основан на применении метода примыкающих проб (adjacent probes, kissing probes) [8, 9]. Комплект реагентов позволяет выявлять 5 мутаций в гене *GJB2*, ассоциированных с развитием несиндромальной нейросенсорной тугоухости, а также 1 мутацию в гене *GALT*, ассоциированную с развитием галактоземии.

В каждый из комплектов реагентов входят амплификационные смеси для определения конкретной мутации. Каждая из смесей содержит праймеры, общие для дикого и мутантного вариантов нуклеотидной последовательности, один общий олигонуклеотид с гасителем флуоресценции и два сиквенс-специфичных олигонуклеотида (пробы), несущих различные флуорофоры. Олигонуклеотидные пробы, соответствующие тому или иному варианту последовательности, мечены различными флуорофорами, что позволяет определять оба варианта в одной пробирке.

При идентификации замен одиночных нуклеотидов проводили ПЦР, затем понижали температуру реакционной смеси для гибридизации полученной матрицы с олигонуклеотидными пробами. Определение генотипа выполняли после ПЦР и гибридизации путем измерения уровня флуоресценции в ходе температурной денатурации дуплексов олигонуклеотидов и полученных матриц. Данное

измерение проходило в режиме «реального времени», в результате были получены кривые плавления (рисунок). Если анализируемый образец содержал только один вариант нуклеотидной последовательности гена, т. е. был гомозиготен по данному полиморфизму, температура плавления для пробы, образующей совершенный дуплекс, была существенно выше, нежели для пробы, образующей несовершенный дуплекс. Если же анализировали гетерозиготный образец, содержащий оба варианта нуклеотидной последовательности, оба варианта проб могли образовать совершенный дуплекс, поэтому температуры их плавления были практически одинаковы.

Применяемый подход выгодно отличается от большинства молекулярно-генетических методов определения полиморфизмов одиночных нуклеотидов, в т. ч. использующих технологию TaqMan. Определение генотипа происходит дважды, независимо по двум каналам флуоресценции, что существенно повышает надежность генотипирования и практически нереализуемо другими способами.

Полимеразную цепную реакцию и определение температуры плавления олигонуклеотидных проб проводили с помощью детектирующего амплификатора DTprime («ДНК-Технология», Россия). Использовали следующий температурный режим амплификации: 94°C — 10 с, 64°C — 30 с в течение 50 циклов. По завершении реакции амплификации реакционную смесь остужали до 25°C со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{с}$. Кривые плавления получали следующим образом: температуру реакционной смеси повышали с 25°C до 75°C с шагом в 1°C , измеряя уровень флуоресценции на каждом шаге. В ходе выполнения работы применяли комплекс отечественного оборудования для автоматизирования основных этапов проведения исследований, что позволило проводить генотипирование до 100 образцов по 40 мутациям в день.

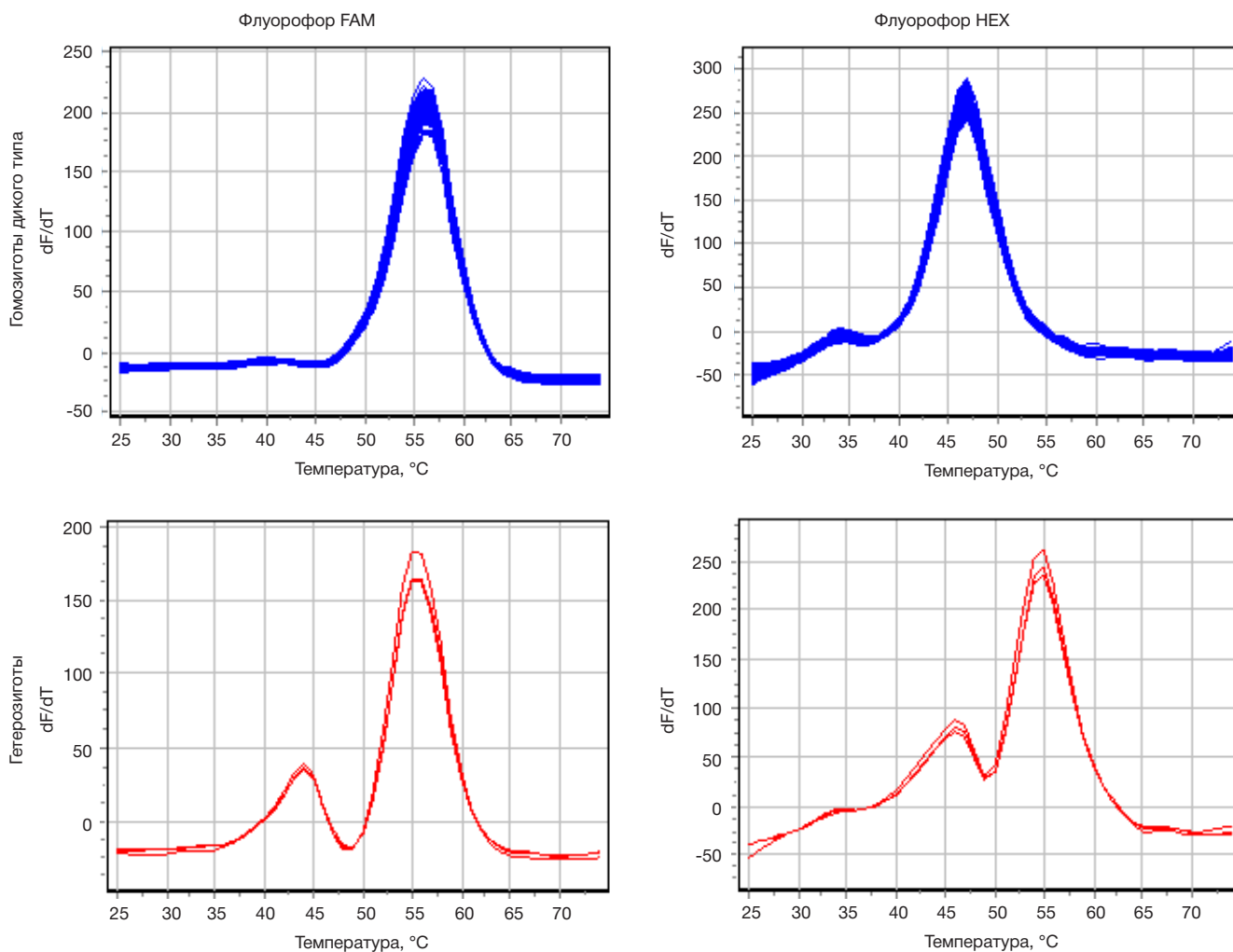
В качестве подтверждающего метода проводили выборочное автоматическое секвенирование ДНК по Сэнгеру с применением автоматического секвенатора ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), использовали реактивы и рекомендации производителя. Во всех случаях были получены идентичные результаты генотипирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные результаты по частотам встречаемости мутаций в генах *GJB2* и *GALT* у 1000 здоровых индивидов (доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских и постоянно проживающих на территории Российской Федерации) представлены в таблице. При генотипировании 1000 доноров первичной кроводачи были обнаружены 37 носителей мутаций в гене *GJB2*, ассоциированных с развитием нейросенсорной тугоухости (частота в выборке составила 3,7 %, или 1 : 27) и 6 носителей мутаций в гене *GALT*, ассоциированных с развитием галактоземии (частота в выборке — 0,6 %, или 1 : 167). Выявлен 1 случай сочетанного носительства мутаций. Всего обнаружены 42 носителя мутаций в генах *GJB2* и *GALT* (частота в выборке — 4,2 %, или 1 : 24).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Всего обнаружены 42 носителя мутаций в генах *GJB2* и *GALT* (частота в выборке — 4,2 %, или 1 : 24), при этом



Кривые плавления для различных вариантов генотипа, полученные при определении мутации Q188R в гене GALT

в нашем исследовании выявлен 1 случай сочетанного носительства мутаций. Результаты настоящего исследования в целом согласуются с опубликованными данными для российской популяции [1, 3–5], но нами была получена несколько более высокая, чем в среднем для европейских популяций, частота носительства мутации GJB2:35delG — единственной из обнаруженных в данном исследовании мутаций, ассоциированных с несиндромальной тугоухостью.

Выводы

В результате исследования были установлены частоты распространенных в российской популяции мутаций в генах GJB2 и GALT у здоровых индивидов. Всего обнаружены 42 носителя мутаций (частота в выборке — 4,2 %, или 1 : 24). Подобная достаточно высокая частота распространения носительства наследственных заболеваний позволяет сделать предположение о необходимости проведения не только неонатального скрининга, но и молекулярно-генетической диагностики в составе комплекса мероприятий при планировании беременности, в том числе при решении вопроса о применении вспомогательных репродуктивных технологий для преодоления бесплодия.

Наиболее подходящей платформой для таких исследований является ПЦР «в реальном времени». Данный подход открывает принципиально новые возможности для массового высокопропускного генотипирования, позволяет роботизировать работу лаборатории при высокой надежности получаемых результатов.

Выявленные гетерозиготы по мутациям в генах GJB2, GALT, а также случаи сочетанного носительства мутаций у 1000 доноров первичной кроводачи, идентифицирующих себя как русских

Мутация	Выявлено гетерозигот
В гене GJB2	
35delG	37
167delT	0
235delC	0
313_326del14	0
358_360delGAG	0
В гене GALT	
Q188R	6
Сочетание мутаций	
GJB2:35delG + GALT:Q188R	1

Литература

1. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brøndum-Nielsen K, et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG*. *Eur J Hum Genet*. 2000 Jan; 8 (1): 19–23.
2. Некрасова Н. Ю., Шагина И. А., Петрин А. Н., Поляков А. В. Частота мутации 35delG в гене коннексина 26 у детей страдающих ранней детской нейросенсорной тугоухостью. *Мед. ген.* 2002; 1 (6): 290–4.
3. Anichkina A, Kulenich T, Zinchenko S, Shagina I, Polyakov A, Ginter E, et al. On the origin and frequency of the 35delG allele in GJB2-linked deafness in Europe. *Eur J Hum Genet*. 2001 Feb; 9 (2): 151.
4. Джемилева Л. У., Посух О. Л., Барашков Н. А., Федорова С. А., Терютин Ф. М., Ахметова В. Л. и др. Оценка гаплотипического разнообразия и реконструкция предкового гаплотипа, ассоциированного с мутацией с.35delG гена GJB2 (Cx26), в популяциях Волго-Уральского региона. *Acta Naturae*. 2011; 3 (10): 54–65.
5. Джемилева Л. У., Барашков Н. А., Посух О. Л., Хусаинова

6. Яблонская М. И., Новиков П. В., Боровик Т. Э., Бушуева Т. В., Захарова Е. Ю., Денисенкова Е. В. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению галактоземии. М.: Минздрав России; 2013. 20 с.
7. Матулевич С. А. Массовый скрининг новорожденных на наследственные болезни обмена как часть системы медико-генетической помощи населению [автореф. диссертации]. М.: Медико-генетический научный центр РАМН; 2009. 44 с.
8. Кофиади И. А., Ребриков Д. В. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. *Генетика*. 2006; 42 (1): 22–32.
9. Сергеев И. В., Хайтов М. Р., Трофимов Д. Ю., Абрамов Д. Д., Груданова Е. Г., Гончарова Е. В. и др. Разработка методов для проведения широкомасштабных исследований полиморфизма генов, регулирующих различные компоненты иммунного ответа. *Физиол. и патол. иммун. системы*. 2009; 13 (4): 21–6.

References

1. Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brøndum-Nielsen K, et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG*. *Eur J Hum Genet*. 2000 Jan; 8 (1): 19–23.
2. Nekrasova NYu, Shagina IA, Petrin AN, Polyakov AV. Chastota mutatsii 35delG v gene konneksina 26 u detei stradayushchikh rannei detskoj neirosensornoj tugoukhost'yu. *Meditinskaya genetika*. 2002; 1 (6): 290–4. Russian.
3. Anichkina A, Kulenich T, Zinchenko S, Shagina I, Polyakov A, Ginter E, et al. On the origin and frequency of the 35delG allele in GJB2-linked deafness in Europe. *Eur J Hum Genet*. 2001 Feb; 9 (2): 151.
4. Dzhemileva LU, Posukh OL, Barashkov NA, Fedorova SA, Teryutin FM, Akhmetova VL, et al. 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; 3 (10): 52–63.
5. Dzhemileva LU, Barashkov NA, Posukh OL, Khusainova RI, Akhmetova VL, Kutuev IA, et al. Analiz geterozigotnogo nositel'stva mutatsii 35delG, 235delC, i 167delT v gene GJB2 v

- populyatsiyakh Evrazii. *Meditinskaya genetika*. 2009; 8: 20–8. Russian.
6. Yablonskaya MI, Novikov PV, Borovik TE, Bushueva TV, Zakharova EYu, Denisenkova EV. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu galaktozemii. Moscow: Ministry of Healthcare of the Russian Federation; 2013. 20 p. Russian.
7. Matulevich SA. Massovyi skринing novorozhdennykh na nasledstvennye bolezni obmena kak chast' sistemy mediko-geneticheskoi pomoshchi naseleniyu [abstract of dissertation]. Moscow: Mediko-geneticheskii nauchnyi tsentr RAMN; 2009. 44 p. Russian.
8. Kofiadi IA, Rebrikov DV. Methods for detecting single nucleotide polymorphisms: Allele-specific PCR and hybridization with oligonucleotide probe. *Russ J Genet*. 2006; 42 (1): 16–26.
9. Sergeev IV, Khaitov MR, Trofimov DYU, Abramov DD, Grudakova EG, Goncharova EV, et al. Razrabotka metodov dlya provedeniya shirokomasshtabnykh issledovaniy polimorfizma genov, reguliruyushchikh razlichnye komponenty immunnogo otveta. *Fiziologiya i patologiya immunnoi sistemy*. 2009; 13 (4): 21–6. Russian.