

Изучение функциональной значимости варианта c.516G>C (p.Trp172Cys) гена GJB2, ассоциированного с потерей слуха у коренного населения Южной Сибири

Маслова Е.А.^{1,2}, Зыцарь М.В.², Данильченко В.Ю.², Орищенко К.Е.^{1,2}, Посух О.Л.^{1,2}

1 — Новосибирский национальный исследовательский государственный университет
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 1

2 — ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д.10

В работе приводятся результаты комплексной оценки патогенетической значимости нового варианта c.516G>C (p.Trp172Cys) гена GJB2, выявленного с высокой частотой у больных с потерей слуха из Республик Тыва и Алтай (Южная Сибирь). Совокупность полученных данных свидетельствует в пользу ассоциации этого варианта с наследственной глухотой вследствие его повреждающего эффекта на структуру и функционирование белка коннексина 26 (Cx26).

Ключевые слова: наследственная глухота, GJB2, Cx26, функциональный анализ

Для цитирования: Маслова Е.А., Зыцарь М.В., Данильченко В.Ю., Орищенко К.Е., Посух О.Л. Изучение функциональной значимости варианта c.516G>C (p.Trp172Cys) гена GJB2, ассоциированного с потерей слуха у коренного населения Южной Сибири. *Медицинская генетика* 2020; 19(7): 51-53.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.07.51-53

Автор для корреспонденции: Маслова Екатерина Александровна; **e-mail:** maslova@bionet.nsc.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН №0324-2019-0041-С-01 при финансовой поддержке гранта РФФИ №17-29-06016_офи-м (молекулярно-генетические исследования) и гранта Министерства Образования и Науки РФ №ЦКП-2019-0546 (лаборатория структурно-функциональной организации генома) (клеточная инженерия).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020

Complex assessment of the pathogenetic significance of variant c.516G>C (p.Trp172Cys) in the GJB2 gene which is associated with hereditary hearing loss in indigenous population of Southern Siberia

Maslova E.A.^{1,2}, Zytzar M.V.¹, Danilchenko V.Yu.¹, Orishchenko K.E.^{1,2}, Posukh O.L.^{1,2}

1 — Novosibirsk State University
Pirogova Str., 1, Novosibirsk, 630090, Russia

2 — Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
Prospect Lavrentyeva, 10, Novosibirsk, 630090, Russia

We present the results of a complex assessment of the pathogenetic significance of novel variant c.516G>C (p.Trp172Cys) of the GJB2 gene found with high frequency in deaf patients from the Tyva and Altai Republics. Several lines of evidences support pathogenicity of this variant due to its damaging effect on the structure and functioning of connexin 26 (Cx26).

Key words: hereditary deafness, GJB2, Cx26, functional analysis

For citation: Maslova E.A., Zytzar M.V., Danilchenko V.Yu., Orishchenko K.E., Posukh O.L. Complex assessment of the pathogenetic significance of variant c.516G>C (p.Trp172Cys) in the GJB2 gene which is associated with hereditary hearing loss in indigenous population of Southern Siberia. *Medical genetics*. 2020; 19(7): 51-53. (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.07.51-53

Corresponding author: Maslova Ekaterina Alexandrovna; **e-mail:** maslova@bionet.nsc.ru

Funding. Study was supported by the Budget Project of Institute of Cytology and Genetics SB RAS #0324-2019-0041-C-01, by the RFBR grant #17-29-06016_ofi-m (molecular genetic studies) by the Ministry of Education and Science of Russian Federation, grant #2019-0546 (FSUS-2020-0040) (cell engineering).

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflict of interests.

Accepted: 20.05.2020

Оценка функциональной значимости новых несинонимичных вариантов в нуклеотидной последовательности генов, ассоциированных с моногенными заболеваниями, является важнейшей фундаментальной задачей медицинской генетики. Для подтверждения патогенетической значимости таких вариантов должны выполняться следующие условия: косегрегация варианта с патологией; существенное превышение его частоты в выборках пациентов по сравнению с контролем; низкая частота встречаемости в мировых базах данных; *in silico* оценка, базирующаяся на эволюционной консервативности и локализации аминокислоты в функционально важном участке белковой молекулы, и, наконец, подтверждение патогенетического эффекта *in vitro* [1]. Мутации в гене *GJB2* (*gap junction protein, beta-2*, MIM 121011, 13q12.11), кодирующем трансмембранный белок коннексин 26 (Cx26), являются наиболее частой причиной потери слуха. Молекулы Cx26 образуют межклеточные каналы, которые в тканях внутреннего уха обеспечивают необходимый для процесса звуковосприятия ионный обмен между соседними клетками. При дефектах Cx26 ионный состав эндолимфы не восстанавливается, что приводит к необратимым нарушениям звуковосприятия. В настоящее время в последовательности гена *GJB2* описано около 400 патогенных (рецессивные и доминантные мутации) и пока не классифицированных вариантов, функциональная значимость которых трактуется неоднозначно (Human Gene Mutation Database: www.hgmd.cf.ac.uk). При изучении наследственной глухоты в Республиках Тыва и Алтай у больных с потерей слуха с высокой частотой был обнаружен новый несинонимичный вариант с.516G>C (p.Trp172Cys) гена *GJB2* [2, 3].

Целью работы является комплексная (с использованием генетического анализа, *in silico* и *in vitro* подходов) оценка патогенетической значимости нового варианта с.516G>C (p.Trp172Cys) гена *GJB2*.

Материалы и методы

Для сравнительного анализа частоты с.516G>C в обследованных выборках тувинских (n=182) и алтайских (n=74) больных и в контрольных выборках (157 тувинцев, 218 алтайцев) применялся точный метод Фишера. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Анализ эффекта замены p.Trp172Cys на структуру и функционирование белка Cx26 *in silico* проведен с использованием ряда предсказательных программ (PolyPhen2, SIFT, MutationTaster и др.). Линия HeLa с нокаутом по гену

GJB2 получена с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 на основе плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene plasmid #42230). Для сравнительного анализа в системе *in vitro* на основе плазмиды pSBbi-GP (Addgene plasmid #60511) созданы генетические конструкции, несущие варианты: с.516G>C (p.Trp172Cys), с.35delG (p.Gly12Valfs), с.235delC (p.Leu79Cysfs), с.224G>A (p.Arg75Gln), с.313_326del14 (p.Lys105Glyfs), с.[79G>A;341A>G] (p.[Val27Ile;Glu114Gly]), а также «дикий тип» (wt). Для получения трансгенных линий с постоянной экспрессией изучаемых *GJB2*-вариантов на основе линии HeLa с нокаутом использовали систему Sleeping Beauty. Для оценки внутриклеточной локализации различных форм белка Cx26 использовали метод иммуноцитохимического окрашивания (ICC) первичными антителами против С-конца белка Cx26 (#51-2800, Thermo Fisher Scientific) и вторичными, конъюгированными с Alexa Fluor Plus 555 (#A32732, Thermo Fisher Scientific). Для оценки проницаемости Cx26-каналов использовали флуоресцентный краситель PI [4].

Результаты и обсуждение

При анализе родословных глухих пациентов установлена косегрегация гомозиготного или компаунд-гетерозиготного варианта с.516G>C (p.Trp172Cys) с патологией слуха. Частота с.516G>C в выборке больных статистически значимо ($p < 0,05$) превышала его частоту в контроле. В мировых базах геномных данных человека (ClinVar, dbSNP138, ESP, ExAC, 1000 Genomes Project) вариант с.516G>C не обнаружен. *In silico* анализ показал вероятный повреждающий эффект p.Trp172Cys на структуру Cx26. Для сравнительного анализа функциональной значимости варианта p.Trp172Cys в условиях *in vitro* на основе клеточной линии HeLa с нокаутом по гену *GJB2* получены трансгенные линии, несущие вариант p.Trp172Cys и другие мутантные *GJB2*-варианты, а также «дикий тип» (wt). Анализ внутриклеточной локализации методом ICC показал преимущественно цитоплазматическую локализацию белка Cx26-p.Trp172Cys, в то время как Cx26-wt и мутантные формы Cx26-p.Arg75Gln, Cx26-p.[Val27Ile;Glu114Gly] образовывали четкие конгломераты на плазматической мембране, что согласуется с литературными данными [4, 5]. Анализ проницаемости Cx26-каналов с использованием PI в трансгенных линиях HeLa показал снижение пропускной способности каналов, образованных Cx26-p.Trp172Cys, по сравнению с Cx26-wt-каналами, в то время как для мутантных вариантов Cx26 с известным патоген-

ным эффектом (Cx26-p.Arg75Gln, Cx26-p.Gly12Valfs, Cx26-p.Leu79Cysfs, Cx26-p.Lys105Glyfs) было показано практически полное отсутствие клеток с накоплением PI.

Совокупность полученных данных свидетельствует в пользу повреждающего эффекта варианта c.516G>C (p.Trp172Cys) гена *GJB2* и подтверждает его ассоциацию с потерей слуха.

Литература/References

1. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S. Gastier-Foster J., Grody, W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 2015; 17(5):405–424.
2. 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 Medical Genetics* 2005; (6):1–7.
3. 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 Tuvinians (Southern Siberia, Russia): A High Prevalence of Rare Variant c.516G>C (p.Trp172Cys). *Genes* 2019; 10(6):E429.
4. Choi S-Y, Lee K.Y., Kim H-J., Kim H-K., Chang Q., Park H-J., Jeon C-J., Lin X., Bok J., U-K. Kim. Functional evaluation of *GJB2* variants in nonsyndromic hearing loss. *Molecular Medicine* 2011; 17(5-6):550–556.
5. Yum S.W., Zhang J., Steven S.S. Dominant connexin26 mutants associated with human hearing loss have trans-dominant effects on connexin30. *Neurobiology of Disease* 2010; 38(2):226–236.