

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2024.07.42-50>

Оптимизированный способ идентификации вариаций числа копий (CNV) в локусе *STRC*

Пшенникова В.Г.¹, Чердонова А.М.², Борисова Т.В.², Терютин Ф.М.¹, Барашков Н.А.¹, Федорова С.А.²

1 – ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем»
677000, г. Якутск, ул. Ярославского, д. 6/3

2 – ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова»
677013, г. Якутск, ул. Белинского, д. 58

Мутационные изменения гена *STRC* обуславливают аутосомно-рецессивную форму потери слуха 16 типа (DFNB16), которая в большинстве случаев характеризуется непрогрессирующим течением, легкой или умеренной степенью тяжести. Одной из проблем детекции вариантов гена *STRC* является наличие высокомолекулярного псевдогена *STRCP1* (99,6% идентичности). В связи с этим, при ДНК-тестировании гена *STRC* используют комбинированный подход, поскольку ни один из методов в отдельности не обнаруживает все типы мутаций. В настоящей работе на выборке из 124 *GJB2*-негативных пациентов с потерей слуха из Якутии был применен оптимизированный способ идентификации вариаций числа копий (CNV) в локусе *STRC*. Способ позволяет детектировать гомозиготные случаи протяженных делеций методом стандартной ПЦР с последующей прямой детекцией амплифицированных фрагментов в 8% полиакриламидном геле. Этим способом гомозиготные случаи протяженных делеций были обнаружены у трех пациентов, что составило 2,41% (3/124). Выявленные CNV были верифицированы с использованием аллель-специфической ПЦР с оценкой приблизительных границ делетированных фрагментов, для определения которых была разработана специальная система праймеров. В результате установлено, что у одного пациента протяженная делеция охватывала только ген *STRC*, у другого – два гена *STRC* и *CATSPER2*, а у третьего пациента делетированными оказались ген *SKMT1A* и псевдоген *STRCP1*. С учетом пораженных индивидов, несущих однозначно каузативные протяженные делеции, захватывающие область гена *STRC*, в гомозиготном состоянии, вклад DFNB16 у *GJB2*-негативных пациентов в Якутии составил не менее 1,6% (2/124). Таким образом, оптимизированный способ поиска гомозиготных протяженных делеций методом стандартной ПЦР и разработанная система праймеров для оценки границ выявленных CNV могут быть применимы в качестве основных или альтернативных тестов первой линии для скрининга/верификации протяженных делеций в локусе *STRC*.

Ключевые слова: ПЦР-анализ, вариации числа копий (CNV), ген *STRC*, псевдоген *STRCP1*, DFNB16, Якутия.

Для цитирования: Пшенникова В.Г., Чердонова А.М., Борисова Т.В., Терютин Ф.М., Барашков Н.А., Федорова С.А. Оптимизированный способ идентификации вариаций числа копий (CNV) в локусе *STRC*. *Медицинская генетика* 2024; 23(7): 42-50.

Автор для корреспонденции: Пшенникова Вера Геннадиевна; e-mail: psennikovavera@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FSRG-2023-0003) и НИР ЯНЦ КМП «Изучение генетической структуры и груза наследственной патологии в популяциях Республики Саха (Якутия)».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 15.07.2024

The optimized method for identifying copy number variation (CNV) at the *STRC* locus

Pshennikova V.G.¹, Cherdonova A.M.², Borisova T.V.², Teryutin F.M.¹, Barashkov N.A.¹, Fedorova S.A.²

1 – Yakut Scientific Center for Complex Medical Problems
6/3 Yaroslavsky st., Yakutsk, 677000, Russian Federation

2 – M.K. Ammosov North-Eastern Federal University
58 Belinsky st., Yakutsk, 677013, Russian Federation

Mutational changes in the *STRC* gene cause an autosomal recessive form of hearing loss (HL) type 16 (DFNB16, OMIM 603720), which in most cases is characterized by non-progressive, mild or moderate HL. One of the troubles of the testing *STRC* gene variants is the presence of the *STRCP1* pseudogene (99.6% identity). In this regard, to detect and confirm various types of *STRC* mutations, a combined approach is used, since no single method detects all types of mutations. In this work, on a sample of 124 *GJB2*-negative patients with HL in Yakutia, we used optimized method for identifying copy number variations (CNVs) in the *STRC* locus, which allows us to detect homozygous cases of extended deletions using standard PCR, followed by direct detection of amplified fragments in 8% polyacrylamide gel. Using this method, homozygous cases of large deletions were detected in three patients, accounting for 2.41% (3/124). The identified CNV cases were verified using allele-specific PCR with an assessment of the approximate boundaries of the deleted fragments, to determine which we developed a primer system covering the analyzed chromosomal region. As a result, it was established that in one patient the large deletion covered only a copy of the *STRC* gene, in another – a copy of two genes *STRC* and *CATSPER2*, and in the

third patient copies of the *CKMT1A* gene and the *STRCP1* pseudogene were deleted. Taking into account affected individuals carrying causative homozygous deletions in the *STRC* gene region, the contribution of DFNB16 among *GJB2*-negative patients in Yakutia is at least 1.6% (2/124). Thus, the optimized method for searching for homozygous large deletions using standard PCR and the developed primer system for assessing the boundaries of the identified CNVs can be used as primary or alternative first-line tests for screening/verification of large deletions in the *STRC* locus.

Keywords: PCR analysis, copy number variation (CNV), *STRC* gene, *STRCP1* pseudogene, DFNB16, Yakutia.

For citation: Pshennikova V.G., Cherdonova A.M., Borisova T.V., Teryutin F.M., Barashkov N.A., Fedorova S.A. The optimized method for identifying copy number variation (CNV) at the *STRC* locus. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(7): 42-50. (In Russian)

Corresponding author: Vera G. Pshennikova; **e-mail:** psennikovavera@mail.ru

Funding. YSC CMP "Study of the genetic structure and burden of hereditary pathology of the populations of the Republic of Sakha (Yakutia)", Ministry of Science and Education of the Russian Federation (FSRG-2023-0003).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 15.07.2024

Введение

Биаллельные патогенные варианты гена *STRC* обуславливают аутосомно-рецессивную форму потери слуха 16 типа (DFNB16, OMIM 603720), которая в большинстве случаев характеризуется непрогрессирующим течением, легкой или умеренной степенью тяжести. [1]. Каузативные варианты гена *STRC* в некоторых выборках пациентов с нарушениями слуха находятся на втором месте по частоте встречаемости после вариантов гена *GJB2*, вызывающих аутосомно-рецессивную форму глухоты 1A типа (DFNB1A, OMIM 220290) [2-6]. Ген *STRC* кодирует белок стереоцилин, который способствует подвижности ресничек наружных волосковых клеток во внутреннем ухе. Стероцилин необходим для формирования верхних соединений, поддерживающих продольную жесткость соединений во время механической трансдукции [7]. Кроме того, протяженные делеции смежных генов *STRC-CATSPER2* приводят к синдрому DIS (Deafness-infertility syndrome, OMIM 611102), при котором потеря слуха сочетается с мужским бесплодием, поскольку для подвижности сперматозоидов необходим белок CATSPER2 [8].

Одной из проблем диагностического тестирования вариантов гена *STRC*, является наличие высокомолекулярного псевдогена *STRCP1* (99,6% идентичности с кодирующей последовательностью), расположенного на 77 т.п.н. ниже кодирующей последовательности в хромосомном регионе 15q15.3. Данный регион включает сегментную дупликацию генов *PPIP5K1*, *CATSPER2*, *STRC*, *CKMT1B* и *PDIA3* и непроцессированных псевдогенов *PPIP5K1P1*, *CATSPER2P1*, *STRCP1* и *PDIA3P1*, кроме функционально активного гена *CKMT1A*, являющегося гомологом *CKMT1B* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gdv/browser/gene/?id=161497>) [9]. Считается,

что данный хромосомный регион подвержен накоплению различных типов мутаций, таких как комбинации вариаций числа копий (CNV), небольшие вставки/делеции (инделлы), конверсии [10]. В базе данных ClinVar анонсировано около 100 патогенных/вероятно патогенных вариантов, ассоциированных с DFNB16, среди которых CNV доминируют над однонуклеотидными вариантами (SNV) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?LinkName=gene_clinvar&from_uid=161497).

В настоящее время, для обнаружения и подтверждения различных типов мутаций гена *STRC*, используют комбинированный или ансамблевый подход, поскольку ни один из методов в отдельности не обнаруживает все типы мутаций с высокой специфичностью и чувствительностью [10-13]. Как правило, поиск каузативных вариантов гена *STRC* начинают с обнаружения гомозиготных/гетерозиготных CNV (первая линия тестирования). На этом этапе чаще используют методы MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) или qPCR (quantitative polymerase chain reaction) [6, 10-13]. Для обнаружения других типов мутаций, преимущественно SNV вариантов, исследователи чаще применяют высокотехнологические инструменты, такие как NGS (next generation sequencing) или методы секвенирования по Сэнгеру на основе long-range/nested polymerase chain reaction (вторая линия тестирования) [6, 10-14]. Каждый метод характеризуется определенными преимуществами и недостатками, и выбор конкретного из них в значительной степени зависит от области применения, разрешающей способности используемого оборудования, рабочей нагрузки и стоимости анализа [6, 13, 15].

В связи с этим, целью данной работы является разработка оптимизированного способа идентификации CNV в локусе *STRC*, позволяющего детектировать гомозиготные случаи протяженных делеций методом классической ПЦР с последующей прямой детекцией амплифицированных фрагментов в 8% полиакриламидном геле (ПААГ).

Методы

Выборка исследования

В исследование были включены образцы геномной ДНК 124 пациентов якутов с нарушениями слуха без биаллельных патогенных вариантов в гене *GJB2* (*GJB2*-негативные) [16, 18].

Молекулярно-генетический анализ

Образцы геномной ДНК были выделены из венозной крови с использованием стандартного фенольно-хлороформного метода экстракции. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих хромосомный регион 15q15.3 (содержащий исследуемые локусы), представлены в **табл. 1**. Последовательности праймеров были получены из литературы или разработаны нами с использованием программного обеспечения Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). Аннотация последовательностей генов соответствует референсным последовательностям (RefSeq), представленным в **табл. 1**.

Оптимизация поиска протяженных делеций в локусе *STRC*

Поиск CNV в локусе *STRC* был проведен с использованием последовательности олигонуклеотидных праймеров, разработанных для количественной флуоресцентной ПЦР (QF-PCR, quantitative fluorescent-polymerase chain reaction) [19]. Особенностью данных праймеров является то, что они охватывают гомологичные фрагменты интрона 26 обеих копий — гена *STRC* и псевдогена *STRCP1*, различающихся инсерцией двух нуклеотидов в псевдогене *STRCP1* [19]. Мы оптимизировали метод и провели амплификацию аллель-специфичной классической ПЦР (AS-PCR, allele specific polymerase chain reaction) с последующей прямой детекцией амплифицированных фрагментов в 8% ПААГ без флуоресцентного красителя (FAM) для QF-PCR как описано [19]. В результате на электрофореграммах можно детектировать фрагменты гена *STRC* размером 104 п.н. и псевдогена *STRCP1* размером 106 п.н.

Разработка системы праймеров охватывающей хромосомный регион 15q15.3

Дополнительно для верификации обнаруженных CNV, а также для определения приблизительных размеров/границ обнаруженных делеций нами были выбраны фрагменты для амплификации участков соседних (расположенных в 15q15.3), проксимальных и дистальных генов (расположенных в 15q15.2 и 15q21.1). Для детекции данных участков нами была разработана система аллель-специфичных праймеров, способных дифференцировать участки генов от псевдогенов, представленных в **табл. 1**. Для разработки универсальных праймеров были использованы референсные последовательности из базы данных Genome Data Viewer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gdv/browser/gene/?id=161497>). Анализ продуктов AS-PCR проводили электрофорезом в 1,5% агарозном геле.

Этический контроль

Обследования, предусмотренные рамками данной работы, проводились после информированного письменного согласия участников. Работа одобрена локальным комитетом по биомедицинской этике при ЯНЦ КМП в 2019 г. (г. Якутск, протокол №7 от 27 августа 2019 г.).

Результаты

В результате применения оптимизированного нами способа при скрининге *GJB2*-негативных пациентов (n=124) протяженные делеции в гомозиготном состоянии были обнаружены в трех случаях, что составило 2,41% (3/124). В двух случаях, была обнаружена делеция копии гена *STRC* (1,61%, 2/124), а в одном случае делеция затрагивала копию псевдогена *STRCP1* (0,8%, 1/124). Оптимизированный способ детекции протяженных делеций в локусе *STRC*, представлен на **рис. 1**.

Далее нами была проведена верификация обнаруженных CNV и определен приблизительный размер обнаруженных делеций. В результате было установлено, что у одного пациента протяженная делеция охватывала только ген *STRC*, у другого — два гена *STRC* и *CATSPER2*, а у третьего пациента делетированными оказались ген *CKMT1A* и псевдоген *STRCP1*. Верификация протяженных делеций и определение их приблизительных границ в хромосомном регионе 15q15.3 представлены на **рис. 2**.

В **табл. 2** представлена краткая характеристика пациентов с гомозиготными протяженными делециями в хромосомном регионе 15q15.3. Протяжен-

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров для детекции протяженных делеций в регионе 15q15.3 (NC_000015.10)

Table 1. Oligonucleotide primers for detection of extended deletions in the 15q15.3 region (NC_000015.10)

№	Ген/ псевдоген	Экзон/ интрон	Локализация (chr15)	Транскрипт	Последовательности праймеров (5'-3')	Размер (п.н.)	Прямая детекция амплифика- ции в геле	Ссылка
Праймеры для оптимизированного способа поиска протяженных делеций в локусе <i>STRC</i>								
1	<i>STRC/ STRCP1</i>	Интрон 26	43600382- 43600485/ 43700198- 43700303	NM_153700.2/ NR_146078.1	F: ATGGGTGGACTGGATGGAAG R: GCCCTATCATAGACCTTCCCC	104/ 106	ПААГ 8%	[19]
Праймеры для верификации протяженных делеций в локусе <i>STRC</i>								
1	<i>TTBK2</i>	Экзон 1	42920794- 42920937	NM_173500.4	F: GACCCGACGTTATTCTCCCC R: AGGCAATGGGACTAGCCAAC	144	Агароза 1,5%	Данная работа
2	<i>TMEM62</i>	Интрон 10 - Экзон 11	43169291- 43169596	NM_0249256.4	F: TCCAAAAGGGGCTTGTTAT- GAA R: GGGCCTGCAGGGAAATAGAT	306	Агароза 1,5%	Данная работа
3	<i>PPIP5K1</i>	Интрон 27	43541776- 43542114	NM_014659.6	F: TTTGCAGAAGGTCATGTCCCA R: GCCAGTTGATGGTG- GAGAACT	339	Агароза 1,5%	Данная работа
4	<i>CKMT1B</i>	Интрон 6	43596897- 43597036	NM_020990.5	F: GGGAGAGGTTGCTGTGTTCA R: CTCCCCAGTCTCTCTCCGA	140	Агароза 1,5%	Данная работа
5	<i>STRC</i>	Экзон 20- 21	43604223- 43605025	NM_153700.2	F: CTTTCTGCCTGCTCCTATCT- GGG R: CAAAGTCCTGTCTCTGTTTG- CAGTC	803	Агароза 1,5%	[20]
6	<i>CATSPER2</i>	Экзон 12	43632108- 43632532	NM_172095.4	F: GCCCTCTTTGCTCGTTGTAA R: TGCCAGAATAGTGGACACCC	425	Агароза 1,5%	Данная работа
7	<i>PDIA3P2</i>	Экзон 1	43649264- 43649339	-	F: GGGTTTTTCGCCCCCTGAT- GACG R: GTTCCCCGCGCCCTCG	90	Агароза 1,5%	Данная работа
8	<i>PPIP5K1P1- CATSPER2</i>	Интрон 23	43672181- 43672441	NR_146339.1	F: CAGTAGGAACCTCCTGGAT- GCTC R: GAGACCCAGGATGCACAATG	261	Агароза 1,5%	Данная работа
9	<i>CKMT1A</i>	Интрон 6	43696838- 43697065	NM_001015001.2	F: TCAGAGGGGAGACTGGG- GAAG R: CTCAGAATCTAAAAGAG- GAGCTC	228	Агароза 1,5%	Данная работа
10	<i>STRCP1</i>	Экзон 20- 21	43703703- 73704505	NR_146078.1	F: CTTTCTGCCTGCTCCTATCT- GGT R: CAAAGTCCTGTCTCTGTTTC- GCAGTA	803	Агароза 1,5%	Данная работа
11	<i>CATSPER2P1</i>	Экзон 4	43746311- 43746469	NR_002318.2	F: CACTCGGCGGTAACGAGTTG R: ACCACTAACCCGCTGCTTG	159	Агароза 1,5%	Данная работа
12	<i>PDIA3</i>	Экзон 13	43770988- 43771294	NM_005313.5	F: GGGCAGTATATGTGGCTGCT R: GGGTCCTAGTCCTCCCAAT	307	Агароза 1,5%	Данная работа
13	<i>CTDSPL2</i>	Экзон 9-10	44514623- 44514954	NM_016396.3	F: TCAGGGAATTCCTGGAACGA R: CCATTCAACACATATGCAGCCA	332	Агароза 1,5%	Данная работа
14	<i>SORD</i>	Интрон 1	45027631- 45027816	NM_003104.6	F: GTGGGCCCAGGCAATAATCT R: CACCCCAACCAACAAACATA	186	Агароза 1,5%	Данная работа

Примечание: Геномные данные, были получены из базы данных Genome Data Viewer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gdv/browser/gene/?id=161497>); ПААГ – полиакриламидный гель.

ная делеция в гомозиготном состоянии, затрагивающая только ген *STRC*, была обнаружена у мужчины 26 лет с сенсоневральной тугоухостью I степени. Гомозиготная протяженная делеция, затрагивающая гены *STRC* и *CATSPER2*, была обнаружена у годовалой девочки с сенсоневральной тугоухостью. Отметим, что ген *CATSPER2* участвует в контроле сперматогенеза и может оказывать влияние на фенотип бесплодия у мужчин, соответствующего синдрому DIS (OMIM 611102)

[8]. Протяженная делеция в гомозиготном состоянии, затрагивающая ген *CKMT1A* и псевдоген *STRCP1*, была обнаружена у пациентки 40 лет с сенсоневральной тугоухостью II-III степени (табл. 2).

Обсуждение

В настоящей работе при поиске CNV в локусе *STRC* был использован способ, предложенный в ра-

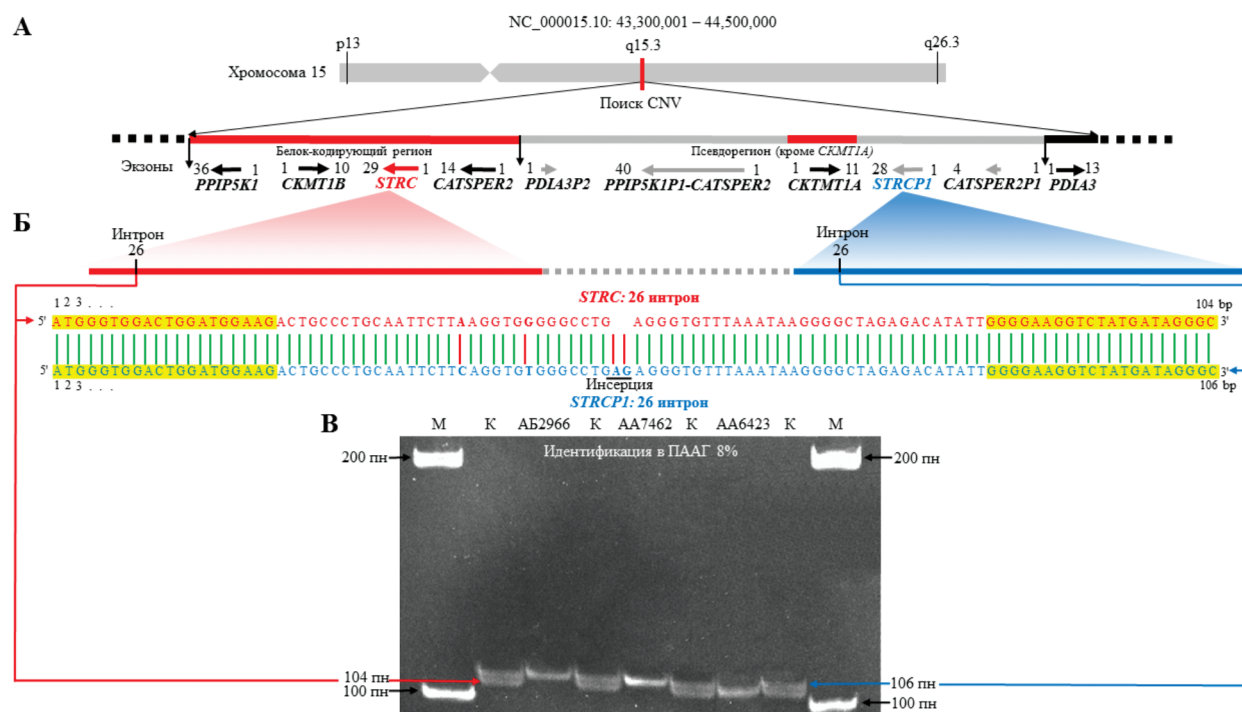


Рис. 1. Оптимизированный способ детекции протяженных делеций в локусе *STRC*. **А.** Схематическое изображение расположения гена *STRC* и псевдогена *STRCP1* в хромосомном регионе 15q15.3. **Б.** Нуклеотидная последовательность гомологичного фрагмента интрона 26 гена *STRC* и псевдогена *STRCP1*, отличающаяся инсерцией двух нуклеотидов в *STRCP1*. Размер продуктов ПЦР составляет – 104 п.н. для гена *STRC* и 106 п.н. для псевдогена *STRCP1*. Желтым цветом выделены гомологичные последовательности олигонуклеотидных праймеров. **В.** Электрофореграмма фрагмента интрона 26 гена *STRC* и псевдогена *STRCP1* (8% ПААГ). Дорожки: М – маркер молекулярного веса STEP-100; К – контрольные образцы ДНК, в которых в норме (wt/wt) визуализируются два участка *STRCP1* – 106 п.н. и *STRC* – 104 п.н., что указывает на сохранность обеих копий в локусе *STRC*. АБ2966 и АА7462 – визуализация одного участка размером 106 п.н. (*STRCP1*), что указывает на отсутствие нативного участка гена *STRC*; АА6423 – визуализация одного участка размером 104 п.н. (*STRC*), что указывает на отсутствие нативного участка псевдогена *STRCP1*.

Fig. 1. Optimized method for detecting extended deletions in the *STRC* locus. **A.** Scheme of the location of the *STRC* gene and the *STRCP1* pseudogene in the chromosomal region 15q15.3. **B.** Nucleotide sequence of the homologous fragment of intron 26 of the *STRC* gene and the *STRCP1* pseudogene, differing in the insertion of two nucleotides into *STRCP1*. The size of the PCR products is 104 bp for the *STRC* gene and 106 bp for the *STRCP1* pseudogene. Homologous sequences of oligonucleotide primers are highlighted in yellow. **B.** Fragment of intron 26 of the *STRC* gene and the *STRCP1* pseudogene electropherogram. Lanes: M – molecular weight marker STEP-100; K – control DNA samples in which two regions of *STRCP1* – 106 bp and *STRC* – 104 bp are normally visualized (wt/wt), indicating the preservation of both copies in the *STRC* locus. AB2966 and AA7462 – visualization of one region of 106 bp (*STRCP1*), indicating the absence of the native region of the *STRC* gene; AA6423 – visualization of one region of 104 bp (*STRC*), indicating the absence of the native region of the *STRCP1* pseudogene.

боте Marková с соавт. [19], точнее только праймеры, амплифицирующие гомологичные последовательности интрона 26 гена *STRC* (104 п.н.) и псевдогена *STRCP1* (106 п.н.), различающиеся в этом фрагменте inser-

цией двух нуклеотидов — аденина и гуанина в псевдогене *STRCP1*. Мы оптимизировали подход и провели амплификацию классической ПЦР с последующим электрофорезом в 8% ПААГ (рис. 1) без примене-

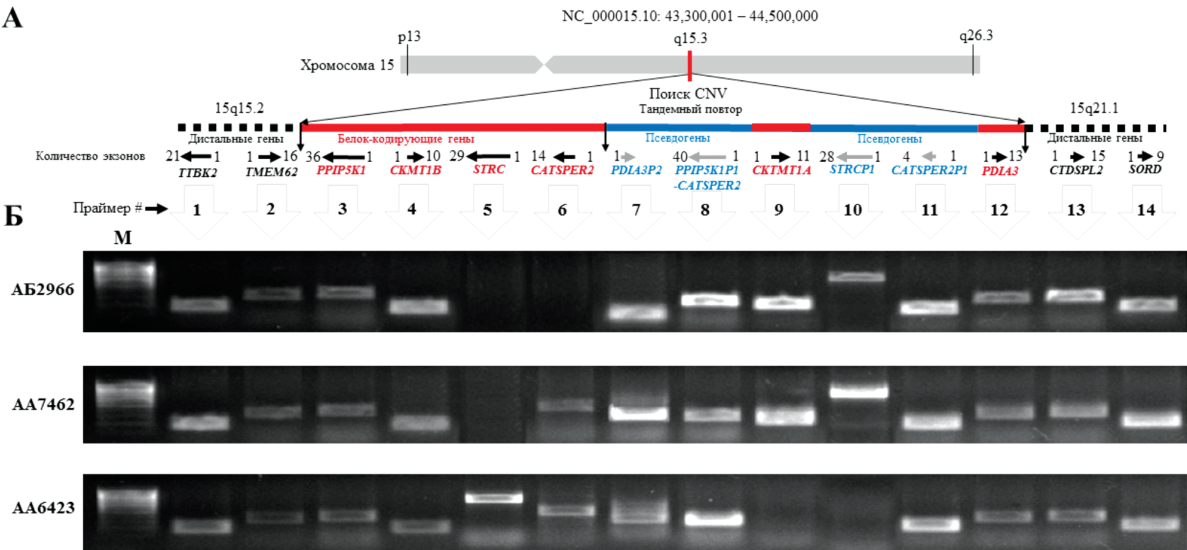


Рис. 2. Верификация протяженных делеций и определение их границ в хромосомном регионе 15q15.3. А. Схема региона 15q15.3. Визуализация геномных данных получена из базы данных Genome Data Viewer (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gdv/browser/gene/?id=161497>, дата посещения: 09.04.2024). Пунктирной линией указаны участки исследованных генов, расположенных дистальнее анализируемого региона (15q15.2: *TTBK2*, *TMEM62* и 15q21.1: *CTDSPL2*, *SORD*). Цифрами указаны номера праймеров, представленных в таблице 1. Б. Электрофореграммы результатов AS-PCR: AB2966: del/del *STRC*, del/del *CATSPER2*; AA7462: del/del *STRC*; AA6423: del/del *CKMT1A*, del/del *STRCP1*.

Fig. 2. Verification of extended deletions and determination of their boundaries in the chromosomal region 15q15.3. A. Scheme of the 15q15.3 region. Visualization of genomic data was obtained from the Genome Data Viewer database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gdv/browser/gene/?id=161497>, accessed 09.04.2024). The dotted line indicates the regions of the studied genes located distal to the analyzed region (15q15.2: *TTBK2*, *TMEM62* and 15q21.1: *CTDSPL2*, *SORD*). The numbers correspond to the primer numbers presented in Table 1. B. Electropherograms of AS-PCR results: AB2966: del/del *STRC*, del/del *CATSPER2*; AA7462: del/del *STRC*; AA6423: del/del *CKMT1A*, del/del *STRCP1*.

Таблица 2. Характеристика пациентов с гомозиготными протяженными делециями в хромосомном регионе 15q15.3

Table 2. Patients with homozygous large deletions in the chromosomal region 15q15.3 characteristics

Делеция гена / псевдогена	Шифр ДНК	Пол	Возраст (на момент исследования)	Этническая принадлежность	Место рождения	Отягощенный наследственный анамнез	Возраст манифестации потери слуха	Степень потери слуха
del/del <i>STRC</i> - <i>CATSPER2</i>	AB2966	Ж	1	Якут	Якутия, Сунтарский р-н, с. Сунтар	-	-	Тугоухость
del/del <i>STRC</i>	AA7462	М	29	Якут	Якутия, Ленский р-н, г. Ленск	-	-	Тугоухость I ст.
del/del <i>CKMT1A</i> - <i>STRCP1</i>	AA6423	Ж	40	Якут	Якутия, Намский р-н	-	-	Тугоухость II-III ст.

ния флуоресцентного красителя (FAM) для QF-PCR, как описано в [19]. В результате гомозиготные протяженные делеции в транс-положении, были обнаружены у 3 из 124 пациентов с нарушениями слуха, что составило 2,41% (3/124). Учитывая возможное выпадение смежных и/или других клинически значимых генов в дуплицированной области [8], выявленные нами случаи были верифицированы методом AS-PCR с использованием разработанной системы праймеров для оценки приблизительных границ выявленных делеций (табл. 1, рис. 2). В результате установлено, что у одного пациента протяженная делеция охватывала только ген *STRC*, у другого – два смежных гена *STRC* и *CATSPER2*, а у третьего пациента делетированными оказались ген *CKMT1A* и псевдоген *STRCP1* (рис. 2).

Примененный в настоящей работе способ позволяет однозначно идентифицировать гомозиготные случаи протяженных делеций в локусе *STRC*. С точки зрения технологического процесса в сравнении с другими методами поиска первой линии (MLPA, qPCR) [6, 10–13] оптимизированный способ является максимально простым, быстрым и надежным. Однако одним из его недостатков является сложность выявления протяженных делеций в гетерозиготном состоянии. Этот недостаток компенсируется тем, что он позволяет проще всех остальных способов выявить львиную долю всех каузативных вариантов, описанных в данном локусе, поскольку по данным мета-анализа частота только гомозиготных протяженных делеций, захватывающих ген *STRC* в среднем составляет 70,85% (95% ДИ: 0,5824–0,8213) от всех патогенных/вероятно-патогенных *STRC*-вариантов [1].

Более того, одним из преимуществ использования данного подхода является его способность дифференцировать протяженные делеции гена *STRC* от псевдогена *STRCP1*. В нашем исследовании этим способом был выявлен гомозиготный случай делеции псевдогена *STRCP1* при сохранном гене *STRC*. В дальнейшем, с применением системы праймеров, фланкирующих близлежащие хромосомные области (табл. 1, рис. 2), в данном образце было обнаружено выпадение соседнего гена *CKMT1A*. Выявленный нами случай делеции смежных генов *CKMT1A-STRCP1* в псевдорегионе описывается впервые. В литературе мы нашли упоминания только о восьми случаях, протяженных делеций, затрагивающих район псевдогена *STRCP1*. Впервые об этом сообщено в работе Shearer с соавт., где в одном случае у пациента с тугоухостью протяженная делеция охватывала только *CATSPER2* и *STRCP1*, но не сам ген *STRC*, а в четырех случаях потери слуха делеция затрагивала

STRC-STRCP1-CATSPER2 [21]. В другом исследовании описываются два случая гомозиготной и гетерозиготной делеции псевдогена *STRCP1* у пациентов с нарушениями слуха [19]. При этом ни один из авторов не дает развернутого обсуждения, касающегося клинического значения выпадения псевдогена *STRCP1* у индивидов с нарушениями слуха [19, 21]. По аналогии со спинальной мышечной атрофией, при которой делеция теломерной копии (*SMN2*) не приводит к заболеванию [22], можно сделать предположение о незначительном клиническом эффекте гомозиготных делеций в области псевдогена *STRCP1*. Однако в базе данных NCBI было анонсировано, что псевдоген *STRCP1* предположительно участвует в адгезии клеток матрикса. Считается, что псевдоген *STRCP1*, находясь во внеклеточной области, функционально активен на клеточной поверхности киноцилия и на кончике стереоцилий (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=STRCP1>, дата посещения: 14.03.2024). В связи с этим остается вероятность того, что делеция копии псевдогена может влиять на слуховой фенотип. Мы надеемся, что последующие исследования позволят оценить клиническую значимость выпадения копии псевдогена *STRCP1* при нарушениях слуха.

В целом, с учетом пораженных индивидов, несущих однозначно каузативные протяженные делеции, захватывающие область гена *STRC* в гомозиготном состоянии, вклад аутосомно-рецессивной формы потери слуха 16 типа (DFNB16) в группе *GJB2*-негативных пациентов в Якутии, по нашим оценкам, составляет не менее 1,6% (2 из 124).

Заключение

Таким образом, оптимизированный нами способ поиска гомозиготных протяженных делеций методом стандартной ПЦР и разработанная система праймеров для оценки границ выявленных CNV могут быть использованы в качестве основных или альтернативных тестов первой линии для скрининга/верификации протяженных делеций в локусе *STRC*.

Литература

1. Han S., Zhang D., Guo Y. et al. Prevalence and Characteristics of *STRC* Gene Mutations (DFNB16): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Genet.* 2021 Sep 21;12:707845. doi: 10.3389/fgene.2021.707845.
2. Sloan-Heggen C.M., Bierer A.O., Shearer A.E. et al. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Hum Genet.* 2016 Apr;135(4):441–450. doi: 10.1007/s00439-016-1648-8.

3. Plevova P., Paprskarova M., Tvrda P. et al. STRC Deletion is a Frequent Cause of Slight to Moderate Congenital Hearing Impairment in the Czech Republic. *Otol Neurotol.* 2017 Dec;38(10):e393-e400. doi: 10.1097/MAO.0000000000001571.
4. Back D., Shehata-Dieler W., Vona B. et al. Phenotypic Characterization of DFNB16-associated Hearing Loss. *Otol Neurotol.* 2019 Jan;40(1):e48-e55. doi: 10.1097/MAO.0000000000002059.
5. Čada Z., Šafka Brožková D., Balatková Z. et al. Moderate sensorineural hearing loss is typical for DFNB16 caused by various types of mutations affecting the STRC gene. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2019 Dec;276(12):3353-3358. doi: 10.1007/s00405-019-05649-5.
6. Shatokhina O., Galeeva N., Stepanova A., Markova T. et al. Spectrum of Genes for Non-GJB2-Related Non-Syndromic Hearing Loss in the Russian Population Revealed by a Targeted Deafness Gene Panel. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 15748. <https://doi.org/10.3390/ijms232415748>
7. Verpy E., Masmoudi S., Zwaenepoel I. et al. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nature Genet.* 2001 29: 345-349.
8. Hildebrand M.S., Avenarius M.R., Smith R.J.H. CATSPER-Related Male Infertility – RETIRED CHAPTER, FOR HISTORICAL REFERENCE ONLY. 2009 Dec 3 [updated 2017 Mar 23]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024.
9. Francey L.J., Conlin L.K., Kadesch H.E. et al. Genome-wide SNP genotyping identifies the Stereocilin (STRC) gene as a major contributor to pediatric bilateral sensorineural hearing impairment. *Am J Med Genet A.* 2012 Feb;158A(2):298-308. doi: 10.1002/ajmg.a.34391.
10. Abbasi W., French C.E., Rockowitz S. et al. Evaluation of copy number variants for genetic hearing loss: a review of current approaches and recent findings. *Hum Genet.* 2022 Apr;141(3-4):387-400. doi: 10.1007/s00439-021-02365-1.
11. Butz M., McDonald A., Lundquist P.A. et al. Development and Validation of a Next-Generation Sequencing Panel for Syndromic and Nonsyndromic Hearing Loss. *J Appl Lab Med.* 2020 May 1;5(3):467-479. doi: 10.1093/jalm/jfaa021.
12. Gabriellaite M., Torp M.H., Rasmussen M.S. et al. A Comparison of Tools for Copy-Number Variation Detection in Germline Whole Exome and Whole Genome Sequencing Data. *Cancers (Basel).* 2021 Dec 14;13(24):6283. doi: 10.3390/cancers13246283.
13. Rentas S., Abou Tayoun A. Utility of droplet digital PCR and NGS-based CNV clinical assays in hearing loss diagnostics: current status and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn.* 2021 Feb;21(2):213-221. doi: 10.1080/14737159.2021.1887731.
14. Vona B., Hofrichter M.A., Neuner C. et al. DFNB16 is a frequent cause of congenital hearing impairment: implementation of STRC mutation analysis in routine diagnostics. *Clin Genet.* 2015;87(1):49-55. doi: 10.1111/cge.12332.
15. D'haene B., Vandesompele J., Hellemans J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods.* 2010 Apr;50(4):262-70. doi: 10.1016/j.ymeth.2009.12.007.
16. Barashkov N.A., Pshennikova V.G., Posukh O.L. et al. Spectrum and Frequency of the GJB2 Gene Pathogenic Variants in a Large Cohort of Patients with Hearing Impairment Living in a Subarctic Region of Russia (the Sakha Republic). *PLoS One.* 2016 May 25;11(5):e0156300. doi: 10.1371/journal.pone.0156300.
17. Пшенникова В.Г., Барашков Н.А., Соловьев А.В. и др. Поиск мутаций в генах *GJB6* (Cx30) и *GJB3* (Cx31) у глухих пациентов с моноаллельными мутациями гена *GJB2* (Cx26) в Якутии. *Генетика.* 2017;53(6):705-715. DOI 10.7868/S0016675817030109.
18. Романов Г.П., Барашков Н.А., Терютин Ф.М. и др. Брачная структура, репродуктивные параметры и мутации гена *GJB2* (Cx26) у глухих людей в Якутии. *Генетика.* 2018;54(5):547-555. DOI 10.7868/S0016675818050053.
19. Marková S.P., Brožková D.Š., Lašuthová P. et al. STRC Gene Mutations, Mainly Large Deletions, are a Very Important Cause of Early-Onset Hereditary Hearing Loss in the Czech Population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2018 Feb;22(2):127-134. doi: 10.1089/gtmb.2017.0155.
20. Миронович О.Л. Генетическая гетерогенность несиндромальной и имитирующей ее синдромальной тугоухости: специальность 03.02.07 «Генетика»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук. 2019:141.
21. Shearer A.E., Kolbe D.L., Azaiez H. et al. Copy number variants are a common cause of non-syndromic hearing loss. *Genome Med.* 2014 May 22;6(5):37. doi: 10.1186/gm554.
22. Monani U.R., Lorson C.L., Parsons D.W. et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet.* 1999 Jul;8(7):1177-83. doi: 10.1093/hmg/8.7.1177.

References

1. Han S., Zhang D., Guo Y. et al. Prevalence and Characteristics of STRC Gene Mutations (DFNB16): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Genet.* 2021 Sep 21;12:707845. doi: 10.3389/fgene.2021.707845.
2. Sloan-Heggen C.M., Bierer A.O., Shearer A.E. et al. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Hum Genet.* 2016 Apr;135(4):441-450. doi: 10.1007/s00439-016-1648-8.
3. Plevova P., Paprskarova M., Tvrda P. et al. STRC Deletion is a Frequent Cause of Slight to Moderate Congenital Hearing Impairment in the Czech Republic. *Otol Neurotol.* 2017 Dec;38(10):e393-e400. doi: 10.1097/MAO.0000000000001571.
4. Back D., Shehata-Dieler W., Vona B. et al. Phenotypic Characterization of DFNB16-associated Hearing Loss. *Otol Neurotol.* 2019 Jan;40(1):e48-e55. doi: 10.1097/MAO.0000000000002059.
5. Čada Z., Šafka Brožková D., Balatková Z. et al. Moderate sensorineural hearing loss is typical for DFNB16 caused by various types of mutations affecting the STRC gene. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2019 Dec;276(12):3353-3358. doi: 10.1007/s00405-019-05649-5.
6. Shatokhina O., Galeeva N., Stepanova A., Markova T. et al. Spectrum of Genes for Non-GJB2-Related Non-Syndromic Hearing Loss in the Russian Population Revealed by a Targeted Deafness Gene Panel. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 15748. <https://doi.org/10.3390/ijms232415748>
7. Verpy E., Masmoudi S., Zwaenepoel I. et al. Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nature Genet.* 2001 29: 345-349.
8. Hildebrand M.S., Avenarius M.R., Smith R.J.H. CATSPER-Related Male Infertility – RETIRED CHAPTER, FOR HISTORICAL REFERENCE ONLY. 2009 Dec 3 [updated 2017 Mar 23]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024.

9. Francey L.J., Conlin L.K., Kadesch H.E. et al. Genome-wide SNP genotyping identifies the Stereocilin (STRC) gene as a major contributor to pediatric bilateral sensorineural hearing impairment. *Am J Med Genet A*. 2012 Feb;158A(2):298-308. doi: 10.1002/ajmg.a.34391.
10. Abbasi W., French C.E., Rockowitz S. et al. Evaluation of copy number variants for genetic hearing loss: a review of current approaches and recent findings. *Hum Genet*. 2022 Apr;141(3-4):387-400. doi: 10.1007/s00439-021-02365-1.
11. Butz M., McDonald A., Lundquist P.A. et al. Development and Validation of a Next-Generation Sequencing Panel for Syndromic and Nonsyndromic Hearing Loss. *J Appl Lab Med*. 2020 May 1;5(3):467-479. doi: 10.1093/jalm/jfaa021.
12. Gabrielaite M., Torp M.H., Rasmussen M.S. et al. A Comparison of Tools for Copy-Number Variation Detection in Germline Whole Exome and Whole Genome Sequencing Data. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 14;13(24):6283. doi: 10.3390/cancers13246283.
13. Rentas S., Abou Tayoun A. Utility of droplet digital PCR and NGS-based CNV clinical assays in hearing loss diagnostics: current status and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn*. 2021 Feb;21(2):213-221. doi: 10.1080/14737159.2021.1887731.
14. Vona B., Hofrichter M.A., Neuner C. et al. DFNB16 is a frequent cause of congenital hearing impairment: implementation of STRC mutation analysis in routine diagnostics. *Clin Genet*. 2015;87(1):49-55. doi: 10.1111/cge.12332.
15. D'haene B., Vandesompele J., Hellemans J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods*. 2010 Apr;50(4):262-70. doi: 10.1016/j.ymeth.2009.12.007.
16. Barashkov N.A., Pshennikova V.G., Posukh O.L. et al. Spectrum and Frequency of the GJB2 Gene Pathogenic Variants in a Large Cohort of Patients with Hearing Impairment Living in a Subarctic Region of Russia (the Sakha Republic). *PLoS One*. 2016 May 25;11(5):e0156300. doi: 10.1371/journal.pone.0156300.
17. Pshennikova V.G., Barashkov N.A., Solovyev A.V. et al. Analysis of GJB6 (Cx30) and GJB3 (Cx31) genes in deaf patients with monoallelic mutations in GJB2 (Cx26) gene in the Sakha Republic (Yakutia). *Russ J Genet*. 2017; 53: 688–697. Doi: 10.1134/S1022795417030103.
18. Romanov G.P., Barashkov N.A., Teryutin F.M. et al. Marital Structure, Genetic Fitness, and the GJB2 Gene Mutations among Deaf People in Yakutia (Eastern Siberia, Russia). *Russ J Genet*. 2018; 54: 554–561. Doi:10.1134/S1022795418050071.
19. Marková S.P., Brožková D.Š., Lašuthová P. et al. STRC Gene Mutations, Mainly Large Deletions, are a Very Important Cause of Early-Onset Hereditary Hearing Loss in the Czech Population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018 Feb;22(2):127-134. doi: 10.1089/gtmb.2017.0155.
20. Mironovich O.L. Geneticheskaya heterogennost' nesindromal'noj i imitiruyushchej ee sindromal'noj tugouhosti: special'nost' 03.02.07 «Genetika»: dissertaciya na soiskanie uchenoj stepeni kandidata medicinskih nauk [Genetic heterogeneity of non-syndromic and syndromic hearing loss imitating it: specialty 03.02.07 "Genetics": dissertation for the degree of candidate of medical sciences]. 2019:141. (In Russ.)
21. Shearer A.E., Kolbe D.L., Azaiez H. et al. Copy number variants are a common cause of non-syndromic hearing loss. *Genome Med*. 2014 May 22;6(5):37. doi: 10.1186/gm554.
22. Monani U.R., Lorson C.L., Parsons D.W. et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet*. 1999 Jul;8(7):1177-83. doi: 10.1093/hmg/8.7.1177.