

А.В. Соловьев, Н.А. Барашков, К.Е. Саввинова,
Н.Н. Готовцев, Ф.М. Терютин, В.Г. Пшенникова, Г.П. Романов,
А.М. Рафаилов, Н.Н. Сазонов, Л.У. Джемилева, О.Л. Посух,
Э.К. Хуснутдинова, С.А. Федорова

АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ ГЕТЕРОЗИГОТ- НЫХ НОСИТЕЛЕЙ МУТАЦИИ С.-23+1G>A ГЕНА *GJB2* К ДИАРЕЕ

DOI 10.25789/YMJ.2018.63.04

УДК 575.89

В настоящей работе представлены результаты анализа устойчивости гетерозиготных носителей мутации с.-23+1G>A гена *GJB2* к диарее в Якутии. Было показано, что у индивидов с мутацией с.-23+1G>A в гетерозиготном состоянии достоверно реже ($p < 0,05$) регистрировались случаи диареи за последний год, нежели у индивидов без мутации. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гетерозиготные носители мутации с.-23+1G>A гена *GJB2* могут иметь повышенную устойчивость к желудочно-кишечным инфекциям, в частности к диарее.

Ключевые слова: ген *GJB2*, диарея, мутация с.-23+1G>A, гетерозиготное носительство.

In this paper, we present the results of an analysis of the resistance of heterozygous carriers of the с.-23+1G>A mutation in *GJB2* gene to diarrhea in Yakutia. It was shown that in individuals with с.-23 + 1G> A mutation in the heterozygous state, cases of diarrhea for the last year were registered less frequently ($p < 0.05$) than in individuals without mutation. The research results support evidence that heterozygous carriers of *GJB2* gene mutations may have increased resistance to gastrointestinal diseases, in particular to diarrhea.

Keywords: *GJB2* gene, diarrhea, с.-23+1G>A mutation, heterozygous carriers.

Введение. Результаты ранее проведенных исследований свидетельствуют о локальном накоплении мутации сайта сплайсинга с.-23+1G>A гена *GJB2*, кодирующего белок коннексин 26, и характеризуют регион Восточной Сибири как эндемичный очаг распространения с.-23+1G>A, наиболее крупный в мире. При этом частота гетерозиготного носительства данной мутации в 6 исследованных популяциях Восточной Сибири (якуты, долганы, эвенки, эвены, юкагиры и русские) оказалась одной из самых высоких в мире (4,7%) и в популяции якутов со-

ставляла локальный максимум – 11,7% [3]. Позднее на более масштабной выборке якутов ($n=350$) крайне высокая частота гетерозиготного носительства подтвердилась и составила 10,3%, что оказалось сопоставимо с частотой гетерозиготного носительства серповидно-клеточной анемии в Африке [6].

Результаты исследований свидетельствуют о том, что крайне высокая частота мутации с.-23+1G>A в Якутии может объясняться не только стохастическими факторами популяционной динамики и выраженным эффектом основателя, характерным для популяции якутов [2], но и действием отбора. Учитывая, что экспрессия генов коннексинов (в том числе коннексина 26) была показана не только в улитке, но и в эпидермисе [7], образование крупного сибирского очага накопления мутации сайта сплайсинга гена *GJB2*, вероятно, можно объяснить повышенной выживаемостью гетерозиготных носителей мутации сайта сплайсинга с.-23+1G>A. В настоящее время известно, что носители мутации p.Arg143Trp гена *GJB2* в некоторых африканских странах (Гана) демонстрируют утолщенный слой эпидермиса по сравнению с носителями аллелей дикого типа, что, возможно, связано с более выраженной барьерной функцией кожи у лиц с мутацией p.Arg143Trp. Авторы полагают, что утолщенный эпидермис может защищать от укусов насекомых, травм и ограничивать клеточную инвазию некоторых бактериальных инфекций [8]. В 2009 г. были опубликованы

результаты ультразвукового исследования толщины эпидермиса у гетерозиготных носителей мутации с.35delG гена *GJB2* в Италии, где также были подтверждены данные о более толстом слое эпидермиса [5]. При интерпретации полученных результатов авторы опирались на экспериментальные исследования клеточных линий in vitro, в которых было показано, что Sx26-мутантные клетки более устойчивы к инфекционному возбудителю кишечной дизентерии *Shigella flexneri* [1]. В последующем этой же группой авторов данные были подтверждены при исследовании частоты случаев диареи у гетерозиготных носителей мутации с.35delG, где у гетерозигот по данной мутации случаи диареи встречались достоверно реже, чем у лиц с нормальным *GJB2*-генотипом [4].

Целью данной работы является анализ устойчивости гетерозиготных носителей мутаций сайта сплайсинга с.-23+1G>A гена *GJB2* к диарее в Якутии.

Материалы и методы исследования. Для исследования устойчивости гетерозиготных носителей мутации с.-23+1G>A к диарее были обследованы условно здоровые индивиды, у которых было проведено анкетирование, включающее выяснение краткого анамнеза жизни, жалоб, этнической принадлежности, сведений о заболеваниях, травмах и факторах внешней среды. В анкетах, согласно Бристольской шкале, участники исследования самостоятельно заполняли информа-

ИЕН СВФУ им. М.К. Аммосова: СОЛОВЬЕВ Айсен Васильевич – м.н.с., nelloann@mail.ru, САВВИНОВА Кунэй Егоровна – студент, potapova.kyuna@mail.ru, РОМАНОВ Георгий Прокопьевич – инженер, gromanov@gmail.com, РАФАИЛОВ Адюм Михайлович – к.б.н., доцент, archinay@mail.ru, САЗОНОВ Николай Никитич – д.б.н., проф., saznikol@mail.ru, ФЕДОРОВА Сардана Аркадьевна – д.б.н., зав. науч.-иссл. лаб., sardanaafedorova@mail.ru; ЯНЦ КМП: БАРАШКОВ Николай Алексеевич – к.б.н., руковод. лаб., barashkov2004@mail.ru, ГОТОВЦЕВ Ньургун Наумович – н.с., Donzcrew@mail.ru, ТЕРЮТИН Федор Михайлович – к.м.н., н.с., rest26@mail.ru, ПШЕННИКОВА Вера Геннадиевна – к.б.н., руковод. лаб., psennikovavera@mail.ru; Институт биохимии и генетики Уфимского науч. центра РАН: ДЖЕМИЛЕВА Лилия Усеиновна – д.м.н., с.н.с., dzhemilev@mail.ru, ХУСНУТДИНОВА Эльза Камильевна – д.б.н., проф., директор, elkh@anrb.ru; ПОСУХ Ольга Леонидовна – к.б.н., с.н.с. Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск), posukh@bionet.nsc.ru.

цию о наиболее характерной форме стула (рис. 1, А) и количестве случаев диареи за год (никогда – 0, редко – 1-5, часто – 6-10, больше 10 раз в год) (рис. 1, Б). В выборке отсутствовали лица с установленным диагнозом болезни Крона и другими заболеваниями толстого кишечника. Кроме того, из выборки обследуемых были исключены 3 индивида с хроническим холециститом. Все обследованные были якутами по этнической принадлежности, из исследования также были исключены 64 индивида другой этнической принадлежности (русские, буряты, азербайджанцы, эвенки, эвены, юкагиры и потомки от межэтнических браков).

Таким образом, исследуемую выборку составили 272 индивида из популяции якутов, возрастной ранг составил от 18 до 30 лет (средний возраст составил 20,3 лет $\pm$ 2,04 года), из них 170 (62,4%) женщин и 102 (37,5%) мужчин.

Далее нами был проведен молекулярно-генетический анализ детекции мутации сайта сплайсинга с.-23+1G>A путем амплификации фрагмента гена *GJB2*, включающего экзон 1 с помощью ПЦР, с использованием праймеров: 5'-CCGGGAAGCTCTGAGGAC-3', 5'-GCAACCGCTCTGGGTCTC-3' [9]. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) проводили с помощью специфической эндонуклеазы рестрикции *HphI* по протоколу, рекомендованному производителем («New England Biolabs Inc», England). Продукты гидролиза подвергались электрофоретическому разделению в 3%-ном агарозном геле. Идентификацию фрагментов ДНК, содержащих полиморфный сайт рестрикции, осуществляли в УФ-свете, с помощью системы гель-видео документации «Bio-Rad» (США) (рис. 2). После генотипирования 272 индивидов данная выборка была подразделена на две группы: 1-я группа – лица без мутации с.-23+1G>A в гене *GJB2* (n=238), 2-я группа – лица с мутацией с.-23+1G>A гена *GJB2* в гетерозиготном состоянии (n=34).

Статистические расчеты проводились с помощью компьютерных программ MedStat, Biostat (McGraw-Hill, Inc. Version 3,03) и Sampling (любезно предоставлено V. Macaulay и адаптировано M. Metspalu). Для сравнения частот *GJB2*-генотипов в исследуемых выборках использовали критерий χ^2 . Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Обследования, предусмотренные

А Бристольская шкала стула

	Тип 1. Отдельные твердые комки, как орехи
	Тип 2. В форме колбаски, комковатый
	Тип 3. В форме колбаски, с ребристой поверхностью
	Тип 4. В форме колбаски или змеи, гладкий и мягкий
	Тип 5. Мягкие маленькие шарики с ровными краями
	Тип 6. Рыхлые частицы с неровными краями, кашицеобразный
	Тип 7. Водянистый, без твердых частиц

Б Случаи диареи

Постоянно	>10
Часто	6-10
Редко	1-5
Никогда	0

Рис.1. Форма анкеты, в которой участники исследования самостоятельно выбирали один из предложенных вариантов: А – Бристольская шкала стула, Б – частота случаев диареи за последний год

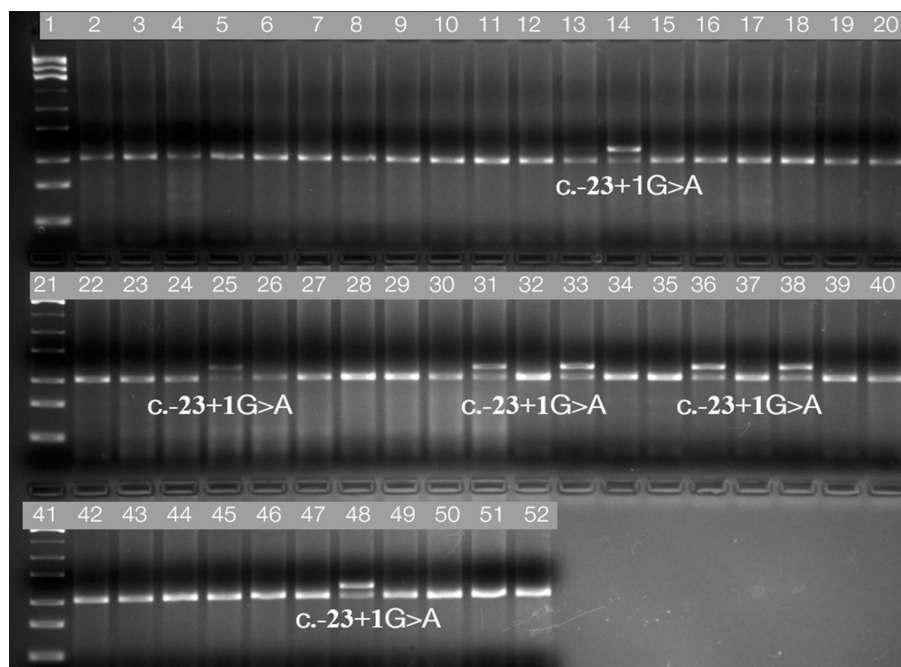


Рис.2. Электрофореграмма детекции мутации с.-23+1G>A гена *GJB2* в 3%-ном агарозном геле с применением ПЦР-ПДРФ анализа (гидролиз с помощью эндонуклеазы рестрикции *HphI*): дорожки 1, 21, 41 – маркер, 2-13, 15-24, 26-30, 32, 34, 35, 37, 39-47, 49-52 – гомозиготы по норме (wt/wt), 14, 25, 31, 33, 36, 38, 48 – гетерозиготы по мутации с.-23+1G>A

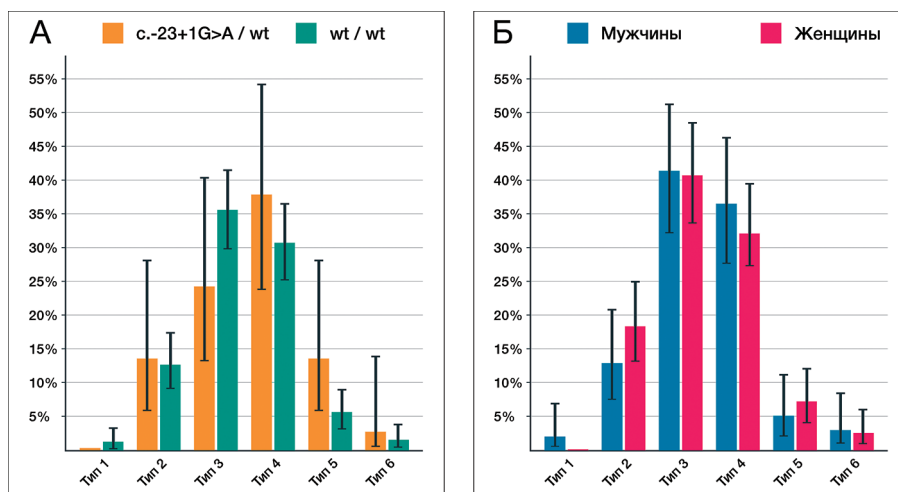


Рис.3. Распределение по типам стула между *GJB2*-генотипами и по полу: А – распределение выборки по типам стула между *GJB2*-генотипами (желтым цветом выделены гетерозиготные носители мутации с.-23+1G>A, зеленым – индивиды без мутации с.-23+1G>A); Б – распределение выборки по типам стула между мужчинами и женщинами (синим цветом выделены мужчины, розовым – женщины)

Количество случаев диареи за последний год у гетерозиготных носителей и неносителей мутации с.-23+1G>A гена *GJB2*

Количество случаев диареи за последний год	Общая выборка (n=272)				Женщины (n=170)				Мужчины (n=102)			
	с.-23+1G>A/wt (n=34)	wt/wt (n=238)	χ^2	p	с.-23+1G>A/wt (n=23)	wt/wt (n=147)	χ^2	p	с.-23+1G>A/wt (n=11)	wt/wt (n=91)	χ^2	p
0 (никогда)	8 (23,5%)	12 (5,0%)	14,93	<0,05	5 (21,7%)	7 (4,7%)	8,74	<0,01	3 (27,2%)	5 (5,4%)	6,44	<0,05
1-5 (редко)	14 (41,1%)	127 (53,3%)	1,77	>0,05	10 (43,4%)	83 (56,4%)	1,35	>0,05	4 (36,3%)	44 (48,3%)	0,57	>0,05
6-10 (часто)	8 (23,5%)	56 (23,5%)	0,00	>0,05	5 (21,7%)	36 (24,4%)	0,08	>0,05	3 (27,2%)	20 (21,9%)	0,16	>0,05
>10 (постоянно)	4 (11,7%)	43 (18,0%)	0,83	>0,05	3 (13,0%)	21 (14,2%)	0,03	>0,05	1 (9,0%)	22 (24,1%)	1,28	>0,05

Примечание: с.-23+1G>A/wt – гетерозиготные носители мутации сайта сплайсинга гена *GJB2*, wt/wt – лица без мутации с.-23+1G>A в гене *GJB2*. Жирным выделены статистически значимые отличия, уровень статистической значимости $p < 0,05$.

рамками научно-исследовательской работы, проводились с информированного письменного согласия участников или их родителей. Данная научно-исследовательская работа одобрена локальным комитетом по биомедицинской этике при ФГБУ «ЯНЦ КМП» (г. Якутск, протокол №16 от 16 апреля 2009 г.).

Результаты и обсуждение. Согласно Бристольской шкале стула более чем у 75% обследованных индивидов наблюдалась нормальная форма кала (тип 3 – 39%, тип 4 – 36%), и лишь у небольшого числа обследованных регистрировалась склонность к запору (тип 1 – 1%, тип 2 – 15%) или диарее (тип 5 – 7%, тип 6 – 2%). При распределении общей выборки индивидов по *GJB2* генотипу на гетерозиготных носителей мутации с.-23+1G>A (n=34) и неносителей (n=238) наблюдалась схожая тенденция – большинство имели 3-й и 4-й типы стула.

Гистограмма распределения по типам стула у гетерозиготных носителей мутации с.-23+1G>A (n=34) и неносителей (n=238) представлена на рис.3.А. Распределение по полу и *GJB2*-генотипу не выявило статистически значимых отличий по типам стула ($p > 0,05$) (рис. 3.Б).

За последний год у гетерозиготных носителей мутации с.-23+1G>A случаи диареи не были зарегистрированы (0 – никогда) у 8 индивидов из 34 (23%). У лиц без мутации с.-23+1G>A за последний год случаи диареи не были зарегистрированы у 12 чел. из 238 прогенотипированных (5%) (таблица). При сравнении данных групп были получены достоверные отличия, которые свидетельствуют о том, что у гетерозиготных носителей мутации с.-23+1G>A случаи диареи регистрировались за последний год достоверно реже ($p < 0,05$), чем у неносителей данной мутации. При распределении общей выборки по полу также были выявлены статистически значимые отличия в частоте случаев диареи

(респонденты чаще отвечали: 0 – «никогда») как у мужчин ($p < 0,05$), так и у женщин ($p < 0,01$) (таблица).

Полученные результаты согласуются с исследованиями, проведенными в Италии с участием 203 индивидов (63% женщин и 37% мужчин) в возрасте от 19 до 65 лет [4]. Из них 170 индивидов не имели мутаций в гене *GJB2*, а у 33 индивидов были обнаружены мутации в гене *GJB2* (чаще в гетерозиготном состоянии) [4]. С применением линейной регрессии была обнаружена значительная корреляция частоты диареи в зависимости от *GJB2*-генотипа ($p = 0,017$). Было показано, что у гетерозиготных носителей мутации с.35delG гена *GJB2* частота случаев диареи была достоверно ниже, чем у неносителей *GJB2* мутаций [4].

Заключение. Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают ранее полученные данные о том, что гетерозиготные носители мутаций гена *GJB2* могут иметь повышенную устойчивость к желудочно-кишечным заболеваниям, в частности к диарее. Полученные результаты свидетельствуют в пользу гипотезы о селективном преимуществе гетерозиготных носителей мутантных аллелей гена *GJB2*, что может объяснить обнаруженную ранее крайне высокую частоту гетерозиготного носительства мутации с.-23+1G>A гена *GJB2* (10,3%) в популяции якутов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства образования и науки РФ №6.1766.2017 ПЧ, проекта СВФУ им. М.К. Аммосова: «Генетические особенности населения Якутии: структура генофонда, адаптация к холоду, психогенетические характеристики, распространенность некоторых наследственных и инфекционных заболеваний», НИР ЯНЦ КМП «Изучение генетической структуры и груза наследственной патологии популяций Республики Саха (Якутия)», программы биоресурсных коллекций ФАНО

России УНУ «Геном Якутии» ЯНЦ КМП (БРК: 0556-2017-0003) и грантов РФФИ №17-29-06016-офи-м, №18-54-16004_НЦНИЛ_а, №18-015-00212_А, №18-013-00738_А, №18-05-60035_Арктика.

Литература

1. A deafness-associated mutant human connexin 26 improves the epithelial barrier in vitro / Y.K. Man, C. Trollove, D. Tattersall [et al.] // J. Membr. Biol. – 2007. – Vol. 218(1-3). – P. 29-37. DOI:10.1007/s00232-007-9025-0
2. Autosomal and uniparental portraits of the native populations of Sakha (Yakutia): implications for the peopling of Northeast Eurasia / S.A. Fedorova, M. Reidla, E. Metspalu [et al.] // BMC Evol. Biol. – 2013. – Vol. 13(127). DOI: 10.1186/1471-2148-13-127
3. 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 / N.A. Barashkov, L.U. Dzhemileva, S.A. Fedorova [et al.] // Journal of Human Genetics. – 2011. – V. 56(8). – P.631-639.
4. Connexin 26 variant carriers have a better gastrointestinal health: is this the heterozygote advantage? / D. Vuckovic, B. Dallapiccola, A. Franze [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. – 2015. – Vol. 23. – P. 563-564.
5. Does epidermal thickening explain *GJB2* high carrier frequency and heterozygote advantage? / P. D'Adamo, V.I. Guerci, A. Fabretto [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. – 2009. – Vol. 17(3). – P. 284-286. DOI:10.1038/ejhg.2008.225
6. Extremely High Carrier Frequency of the *GJB2* Splice Site IVS1+1G>A Mutation in Eastern Siberia is Comparable to the Carrier Frequency of the Sick Cell Anemia in Africa / N.A. Barashkov, A.V. Solovyev, F.M. Teryutin [et al.] // J. Genet. Genome Res. 2014. 1:1.
7. Krawczak M. A role for overdominant selection in phenylketonuria? Evidence from molecular data / M. Krawczak, J. Zschocke // Hum. Mutat. – 2003. – Vol. 21(4). – P. 394-397. DOI:10.1002/humu.10205
8. Selection for deafness / C.G. Meyer, G.K. Amedofu, J.M. Brandner [et al.] // Nat. Med. – 2002. – Vol. 8(12). – P. 1332-1333. DOI:10.1038/nm1202-1332
9. Sirmaci A. The c. C.-23+1G>A mutation in the *GJB2* gene is prevalent and large deletions involving the *GJB6* gene are not present in the Turkish population / A. Sirmaci, D. Akcayoz-Duman, M. Tekin // J. Genet. – 2006. – Vol. 85(3). – P. 213-6.