

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-315

**СПЛАЙСИНГОВЫЕ ВАРИАНТЫ В ЭТИОЛОГИИ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ:  
ВАРИАНТЫ В ГЕНЕ *SLC26A4*, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПОТЕРЕЙ СЛУХА \*****SPLICING VARIANTS IN THE ETIOLOGY OF MONOGENIC DISEASES:  
VARIANTS IN THE *SLC26A4* GENE ASSOCIATED WITH HEARING LOSS**

В. Ю. Данильченко, Е. А. Панина, М. В. Зыцарь, Е. А. Маслова, К. Е. Орищенко, О. Л. Посух

*Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск  
Новосибирский государственный университет*

V. Yu. Danilchenko, E. A. Panina, M. V. Zytsar, E. A. Maslova, K. E. Orishchenko, O. L. Posukh

*Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk  
Novosibirsk State University*

✉ danilchenko\_valeri@mail.ru

**Аннотация**

Роль генетических вариантов, потенциально нарушающих сплайсинг, в развитии наследственных заболеваний пока недооценена. Функциональная оценка таких вариантов в системах *in vitro* является актуальной задачей для постановки правильного диагноза. Представлены первые результаты *in vitro* анализа функциональных эффектов новых вариантов гена *SLC26A4*, ассоциированных с потерей слуха, с использованием генетических конструкций-минигенов.

**Abstract**

The role of genetic variants that potentially disrupt splicing in the development of hereditary diseases is still underestimated. Functional assessment of such variants in *in vitro* systems is an important task for establishing a correct diagnosis. The first results of *in vitro* analysis of the functional effects of new variants in the *SLC26A4* gene associated with hearing loss using minigene splicing assay are presented in this study.

С развитием новейших методов секвенирования генома стремительно возрастает объем информации о возможных ассоциациях различных вариантов генов с моногенными заболеваниями. В связи с этим интерпретация обнаруженных вариантов в контексте их потенциальной роли в этиологии наследственных заболеваний и экспериментальная верификация их патогенного статуса является актуальной задачей для молекулярной диагностики. В настоящее время известно, что доля вариантов, негативно влияющих на нормальный процесс сплайсинга, составляет не менее 15 % от числа всех патогенных вариантов, но, вероятно, их роль в возникновении наследственных заболеваний является недооцененной [1]. Оценки *in silico* возможного влияния варианта на сплайсинг, полученные с помощью различных компьютерных предсказательных программ, часто противоречивы и недостаточны для клинических и диагностических целей. В связи с этим для подтверждения предсказанного функционального эффекта анализируемых вариантов необходимо проводить экспериментальные исследования *in vitro*. Одним из наиболее эффективных подходов к *in vitro* оценке функциональных эффектов вариантов, потенциально влияющих на процесс сплайсинга, является экспериментальный метод с использованием минигенов (minigene splicing assay). Суть этого метода заключается в том, что амплифицированный фрагмент анализируемого гена (экзон/экзоны вместе с фрагментами, фланкирующими их интронов) клонируется в специальную экспрессирующую плазмиду. Миниген-конструкция трансфицируется в клетки, где с нее экспрессируется мРНК, и анализ сплайсинга проводится методом ПЦР с обратной транскрипцией. Сравнение продуктов ПЦР (размер и нуклеотидная последовательность), полученных с использованием минигенов, содержащих фрагменты с диким типом или анализируемым вариантом, позволяет сделать вывод о его эффекте на процесс сплайсинга. Этот подход особенно эффективен при невозможности анализа РНК, выделенной из соответствующей ткани пациента, ввиду частой недоступности такого биологического материала.

Потеря слуха, вызываемая генетическими и средовыми причинами, является актуальной медико-социальной проблемой, поскольку затрагивает более 5 % населения мира и существенно снижает качество жизни боль-

\* Работа выполнена при поддержке РФ (проект № 24-75-00029).

© В. Ю. Данильченко, Е. А. Панина, М. В. Зыцарь, Е. А. Маслова, К. Е. Орищенко, О. Л. Посух, 2024

ных. Несиндромальная наследственная глухота, являясь моногенным заболеванием, характеризуется уникальной генетической гетерогенностью: патогенные варианты множества генов (идентифицировано не менее 140 «генов глухоты») приводят к различным типам потери слуха. Патогенные варианты в гене *SLC26A4* (solute carrier family 26, member 4, 7q22.3, OMIM 605646) являются одной из наиболее значимых причин возникновения глухоты во многих популяциях мира.

Ген *SLC26A4* (21 экзон), кодирующий трансмембранный транспортный белок пендрин (pendrin), экспрессируется в тканях внутреннего уха, щитовидной железы и почек. Во внутреннем ухе пендрин участвует в транспорте анионов, поддерживая ионный гомеостаз эндолимфы. Нарушение структуры и функций пендрина вследствие мутационных изменений в гене *SLC26A4* может приводить к частичной или полной потере слуха. Известно несколько сотен патогенных вариантов гена *SLC26A4*, ассоциированных с потерей слуха, среди которых существенную долю (не менее 25 %) составляют варианты (интронные и экзонные), по-видимому, приводящие к нарушению процесса сплайсинга. Но потенциальный повреждающий эффект на сплайсинг для многих из них был оценен только с помощью компьютерных предсказательных программ, а экспериментальные исследования таких вариантов все еще немногочисленны.

Целью данной работы является изучение потенциальных эффектов на сплайсинг вариантов гена *SLC26A4*, которые впервые были обнаружены в ходе исследований генетических форм потери слуха у коренного населения Республик Тыва и Алтай (Южная Сибирь) [2, 3]. В работе будут представлены первые результаты по созданию модельных систем *in vitro* с использованием генетических конструкций-минигенов для исследования функциональных эффектов ряда глубокоинтронных вариантов, локализованных вне канонических сайтов сплайсинга, а также варианта с.1545T>G, локализованного на экзон-интронной границе (1-я нуклеотидная позиция экзона 14), то есть в потенциально «чувствительной» для «правильного» сплайсинга позиции. В случае подтверждения патогенного статуса анализируемых *SLC26A4*-вариантов, они могут быть включены в тестовые панели для молекулярной диагностики наследуемых форм потери слуха.

#### Литература

1. Abramowicz A., Gos M. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation // J. Appl. Genet. 2018. Vol. 59(3). P. 253–268.
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.
3. 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.