

Nowa metoda diagnostyki molekularnej niedosłuchu uwarunkowanego genetycznie

New diagnostic method for analysis of hearing impairment with genetic background

Agnieszka Pollak¹, Agata Skórka^{1,2}, Małgorzata Mueller-Malesińska¹, Jarosław Waligóra^{1,2},
Lech Korniszewski^{1,2}, Henryk Skarżyński¹, Rafał Płoski^{1,2}

¹ Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu

² Akademia Medyczna w Warszawie

Streszczenie

U podłoża niedosłuchu uwarunkowanego genetycznie najczęściej leżą recesywne mutacje genu *GJB2*, a wśród nich delecja guaniny w pozycji 35 (35delG), która stanowi przyczynę co najmniej 20% wszystkich niedosłuchów z tej grupy. Poza 35delG w różnych populacjach opisano wiele innych mutacji zlokalizowanych w tym samym genie. Ponieważ wykrywanie tych mutacji wiąże się z pracochłonnym i kosztownym sekwencjonowaniem DNA, jest celowe opracowanie i wdrożenie metody pozwalającej na przesiewowe wykrywanie 35delG oraz najczęstszych po niej mutacji będących przyczyną niedosłuchu w populacji polskiej.

Słowa kluczowe: *GJB2*, niedosłuch uwarunkowany genetycznie, 35delG.

Summary

The autosomal recessive nonsyndromic prelingual deafness is often caused by recessive mutations in the *GJB2* gene. The most frequent *GJB2* mutation among Caucasians is 35delG, although, with frequencies varying according to population, other mutations also occur. The comprehensive typing for all the pathogenic mutations in *GJB2* is costly because it has to rely on DNA sequencing. The purpose of our study was to develop and validate a method allowing to screen for the presence of 35delG and other *GJB2* mutations being most frequent among Polish patients with hearing loss.

Key words: *GJB2*, genetic hearing impairment, 35delG.

Wprowadzenie

Niedosłuch to jeden z najczęstszych defektów dotyczących ludzkich zmysłów. Statystyki szacują, iż w krajach rozwiniętych około 1–3/1000 dzieci cierpi na ciężki wrodzony lub prelingwalny niedosłuch, podczas gdy kolejne 1/300 dzieci rodzi się z niedosłuchem łżejszego stopnia [Cohen 1995; Nance 2000; Morton 2000]. Przyczyny utraty słuchu są złożone i najczęściej stanowią kombinację czynników genetycznych i środowiskowych. Czynniki środowiskowe odpowiedzialne za uszkodzenie narządu słuchu to najczęściej: leki ototoksyczne, infekcje okołoporodowe, urazy ucha wewnętrznego i mózgu oraz narażenie na hałas [Nadol 1993].

Przyczyną znacznej części przypadków niedosłuchu wrodzonego są czynniki genetyczne. Niedosłuch genetycznie uwarunkowany to zarówno niedosłuch występujący w zespołach (wspólnie z innymi objawami) jak i izolowany. Niedosłuch izolowany stanowi ok. 70% wszystkich przypadków niedosłuchu genetycznie uwarunkowanego [Marazita 1993], z czego 80% przypadków to niedosłuch dziedziczny w sposób autosomalny recesywny. Za 50% przypadków z tej grupy odpowiedzialne są mutacje w genie *GJB2*. Gen *GJB2* kodujący białko – koneksynę 26 (po raz pierwszy opisany

w 1994) zlokalizowany jest na chromosomie 13. Koduje on białko budujące tzw. połączenia typu *gap-junctions*, które tworzą kanały pozwalające na przepływ niskocząsteczkowych związków pomiędzy komórkami.

Każdy z takich kanałów jest złożony z 2 części (koneksonów) zakotwiczonych w błonach komórkowych sąsiadujących komórek i utworzonych przez 6 częściłek Cx 26. W ślimaku koneksyna 26 występuje w komórkach rąbka blaszki spiralnej, bruzdy wewnętrznej i zewnętrznej, komórkach wspomagających, nabłonku czuciowym (I grupa) oraz komórkach rąbka blaszki spiralnej, więzadła spiralnego i prążka naczyniowego (II grupa) [Kikuchi 1995]. Obecność koneksyny 26 w tych komórkach warunkuje fizjologiczne krążenie jonów potasu oraz metabolitów o małej masie cząsteczkowej (poniżej 1000 Da) pomiędzy przestrzeniami płynowymi ucha wewnętrznego. Brak lub nieprawidłowa ekspresja cx26 w uchu środkowym zaburza obieg potasu w układzie: synapsy – komórki rzęsaty – komórki podporowe – endolimfa, co prowadzi do miejscowego zatrucia narządu Cortiego przez potas, upośledzając znacznie proces słyszenia [Johnstone 1989; Oesterle i Dallos, 1990].

Dla populacji kaukaskiej najczęstszą, choć nie jedyną przyczyną niedosłuchu autosomalnego recesywnego jest mutacja 35delG [Gasparini 2000; Kupka 2002]. Pomimo wysokiej częstości występowania 35delG opisano wiele innych mutacji lokalizujących się w tym samym genie, które razem stanowią istotną przyczynę niedosłuchu uwarunkowanego genetycznie. Do tej pory w Polsce analizowano tylko region kodujący genu *GJB2*, skupiając się przede wszystkim na poszukiwaniu mutacji 35delG [Mueller-Malesińska 2001] choć pojedyncze doniesienie wskazywało na możliwość obecności w naszej populacji swoistego profilu innych patogennych mutacji w *GJB2* [Wiszniewski 2001].

Celem pracy była identyfikacja najczęstszych po 35delG patogennych mutacji w *GJB2* występujących w populacji Polski oraz opracowanie i wdrożenie przesiewowej metody pozwalającej na ich wykrywanie.

Metoda

Opracowana metoda polega na multipleksowej amplifikacji metodą PCR regionów: 12–72bp. oraz 306–464bp, II egzonu genu *GJB2* z użyciem primerów wyznakowanych barwnikami JOE (zielony) dla regionu 12–72, oraz 6-FAM dla regionu 306–464bp (niebieski), a następnie analizie w żelu denaturującym z użyciem aparatu ABI 377 w obecności standardu wewnętrznego GeneScan-500 (Rox). Delecja guaniny w pozycji 35 objawia się w postaci zielonego produktu PCR o względnej długości 102 bp., natomiast brak jej powstaniem produktu o długości 103bp. (osoby o genotypie heterozygotycznym posiadają oba prążki).

Warunki reakcji PCR: 95°C 5 min.; 94°C 30sek; 54,5°C 35sek; 72°C 40 sek – 26cykli; 70°C 10min; 60°C 45min; 4°C.

Sekwencje primerów stosowanych do testu multiplex PCR były następujące:

- Camp5 5'GGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGG 3' wyznakowane NED na 5'końcu
- Camp3 5'CTGGTGAGTGTGTTGTTCCAC 3'
- CxdelG F 5'AGAGTAGAAGATGGATTGGGG 3' wyznakowane JOE na 5'końcu
- CxdelG R 5'AAAAATGAAGAGGACGGTGAG 3'
- Cx314F 5'GCCTACCGGAGACATGAGAA 3' wyznakowane 6-FAM na 5'końcu
- Cx314R 5'AGAAGCCGTCGTACATGACA 3'
- Cx 167T F 5'ACTCCACCAGCATTGGAAAGA 3' wyznakowane 6-FAM na 5'końcu
- Cx 167T R 5'TGGGAGAGTGGGAAGTAGTG 3'

Na potwierdzenie mutacji 35delG dodatkowo stosowany jest tradycyjny test (PCR-RFLP) zmodyfikowany poprzez użycie fluorescencyjnych primerów – pozwala on na wizualizację wyników na aparacie ABI 377, a w ten sposób omija dosyć niewygodny, pracochłonny etap żelu SSCP.

W wypadku występowania delecji AA w pozycji 333 obserwuje się powstanie niebieskiego produktu o długości 197 bp, a brak jej powstaniem produktu o długości 199 bp. Mutacja delGAG360 charakteryzuje się prążkiem o wielkości 196 bp. Delecja 14 nukleotydów w pozycji 313 owocuje powstaniem niebieskiego produktu o długości 185bp, a brak jej produktem o długości 199 bp (identycznym jak w przypadku braku delAA333 oraz delGAG360). Mutacja 167delT (najczęściej występująca w populacji Żydów aszkenazyjskich [Morell 1998, Sobe 2000] wykrywana jest w wypadku obec-

ności prążka o długości 172 pz. Brak jej, natomiast pojawienie się prążka o długości 173 pz.

Metodę poddano walidacji, analizując 100 próbek o przebadanym wcześniej genie *GJB2* pod kontem występowania 35delG, oraz próbek z mutacjami delAA333 i 313del14 potwierdzonych podczas sekwencjonowania.

Sekwencjonowanie II exonu kodującego wykonywano z użyciem czterech par primerów:

- Cx Ext 1 5' TCTTTTCCAGAGCAAACCGCC 3'
- Cx Ext 2 5' TGAGCACGGGTTGCCTCATC 3'
- Cx Int 1 5' GACACGAAGATCAGCTGCAG 3'
- Cx Int 2 5' CCAGGCTGCAAGAACGTGTG 3'

Znakowanie przeprowadzano w standardowych warunkach zalecanych przez producenta kitu do sekwencjonowania (Perkin Elmer). Rozdział produktów prowadzono w żelu poliakrylamidowym z użyciem aparatu Abi 377. Otrzymane sekwencje porównywano z sekwencjami wzorcowymi pobranymi z bazy sekwencji PubMed.

Wyniki

966 niespokrewnionych pacjentów Instytutu Fizjologii i Patologii Słuchu z niedosłuchem poddano testom wykrywającym obecność mutacji 35delG. Mutacje na obu chromosomach wykryto u 14% pacjentów (wykrycie mutacji w formie homozygotycznej u pacjenta pozwala uznać diagnostykę molekularną za zakończoną, umożliwia precyzyjne udzielenie porady genetycznej oraz pozwala na zaplanowanie ewentualnych testów na nosicielstwo wśród rodziny pacjenta). U 16% pacjentów wykryto mutacje 35delG na jednym chromosomie – stan heterozygotyczny, nie wyjaśniający przyczyny niedosłuchu. Wśród pozostałej grupy 70% pacjentów mutacji nie znaleziono.

Wśród grupy 100 niespokrewnionych pacjentów z niedosłuchem, o genotypie 35delG/wt (heterozygoty) wykonano analizę sekwencji regionu kodującego genu *GJB2* (II exon). U 44 pacjentów wykryto dodatkowe mutacje zestawione w tab. 1.

Tab. 1. Zestawienie mutacji wykrytych podczas sekwencjonowania II exonu genu *GJB2*

Mutacja	Liczba pacjentów
313del14	15
167delT	6
L90P	5
M34T	4
V37I	4
DelGAG360	3
R184P	3
DelAA333	2
V153I	1
R32H	1

Na podstawie wyników sekwencjonowania zaprojektowano primery amplifikujące obszar w którym lokuje się mutacja najczęściej znajdowana wśród sekwencjonowanych pacjentów – 313del14, oraz dwie inne delecje – delAA333 i delGAG360. Dodatkowo zaprojektowano primery amplifikujące specyficzne region drugiej co do częstości występowania wykrywanej mutacji – 167delT. Zaprojektowano warunki PCR tak, aby możliwa była jednoczasowa amplifikacja z użyciem trzech par primerów (trzecia para primerów amplifikuje region występowania 35delG). Analiza pacjentów nowym,

multiplexowym testem wykazała obecność innych niż 35delG mutacji u 3,7% pacjentów

Dyskusja

Znajomość panelu najczęstszych mutacji patogennych pozwala na zaprojektowanie odpowiednich testów diagnostycznych uwzględniających te mutacje, a co za tym idzie, wydatnie zwiększenie liczby wykrywanych mutacji. Zastosowanie proponowanego prostego i stosunkowo mało kosztownego testu multiplex-PCR w rutynowej diagnostyce molekularnej pacjentów z niedosłuchem zwiększa liczbę w pełni zdiagnozowanych pacjentów o 3,7%. Opisany test pozwala również na obniżenie kosztów diagnostycznego badania jednostkowego poprzez zmniejszenie liczby pacjentów kwalifikowanych do sekwencjonowania (które nadal jest metodą stosunkowo kosztowną, pracochłonną i czasochłonną). Wyniki tego typu badań mają również bezpośredni wpływ na liczbę precyzyjnie udzielanych porad genetycznych.

Istotnym zagadnieniem jest wykrywanie innych stosunkowo często występujących w naszej populacji mutacji wywołujących niedosłuch, a zwłaszcza kontrowersyjnej mutacji M34T powiązanej ze zdecydowanie lżejszym niedosłuchem niż 35delG, 313del14 czy 167delT. Proponowany test, opierający się na porównywaniu długości fragmentów PCR, wykrywa jedynie mutacje typu delecja bądź insercja. Biorąc pod uwagę stosunkowo wysoką częstość występowania mutacji typu missens (w szczególności L90P, M34T oraz V37I) u pacjentów niezdiagnozowanych za pomocą opisywanego testu należałoby wykonywać dodatkowo analizy w/w mutacji lub sekwencjonować cały region kodujący genu *GJB2*.

Bibliografia

- Cohen M., Gorlin R., Cohen M. [1995]. Epidemiology, etiology and genetic patterns. W: Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford University Press, 9–21.
- Denoyelle F., Weil D., Maw M. A., Wilcox S. A., Lench N. J., Allen-Powell D. R., Osborn A. H., Dahl H. H., Middleton A., Houseman M. J., Dode C., Marlin S., Boulila-ElGaid A., Grati M., Ayadi H., BenArab S., Bitoun P., Lina-Granade G., Godet., Mustapha M., Loiselet J., El-Zir E., Audois A., Joannard A., Petit C., et al. [1997]. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. „Human Molecular Genetics” 6(12), 2173–2177.
- Estivill X., Fortina P., Surrey S., Rabionet R., Melchionda S., D'Agruma L., Mansfield E., Rappaport E., Govea N., Mila M., Zelante L., Gasparini P. [1998]. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. „Lancet” 351 (9100), 394–398.
- Gasparini P., Rabionet G., Barbuiani G. et al. [2000]. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. „European Journal of Human Genetics” 8, 19–23.
- Johnstone B. M., Patuzzi R., Syka J., Sykova E. [1989]. Stimulus-related potassium changes in the organ of Corti of guinea pig. „Journal of Physiology” 408, 77–92.
- Kelley P. M., Harris D. J., Comer B. C., Askew J. W., Fowler T., Smith S. D., Kimberling W. J. F. [1998]. Novel mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. „American Journal of Human Genetics” 62, 792–789.
- Kelsell D. P., Dunlop J., Stevens H. P. et al. [1997]. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. „Nature” 387, 80–83.
- Kikuchi T., Kimura R. S., Paul D. L., Adams J. C. [1995]. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. „Anatomy and Embryology”, 191(2), 101–118.
- Kupka S., Braun Aberle S., Haak B., et al. [2002]. Frequencies of *GJB2* mutations in German control individuals and patients showing sporadic non-syndromic hearing impairment. „Human Mutations” 20 (1), 77–78.
- Marazita M. L., Ploughman L. M., Rawlings B., Remington E., Arnos K. S., Nance W. E. [1993]. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. „American Journal of Medical Genetics” 46(5), 486–491.
- Morell R. J., Kim H. J., Hood L. J., Goforth L., Friderici K., Fisher R., Van Camp G., Berlin C. I., Oddoux C., Ostrer H., Keats B., Friedman T. B. [1998]. Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. „The New England Journal of Medicine” 339(21), 1500–1505.
- Morton N. E. [1991]. Genetic epidemiology of hearing impairment. „Annals of the New York Academy of Science” 630, 16–31.
- Mueller-Malesińska M., Nowak M., Skarżyński H., Płoski R., Waligóra J., Korniszewski L. [2001]. Epidemiology of 35delG mutation in *GJB2* gene in a Polish population. „Journal of Audiological Medicine” 10(2), 136–141.
- Nadol J. B. Jr. [1993]. Hearing loss. „New England Journal of Medicine” 329, 1092–1102.
- Nance W. E. The Newborn Hearing Subcommittee of the Public Health Genetics Committee. [2000]. Statement of the American College of Medical Genetics on universal newborn hearing screening. „Genetic Medicine” 2 (2), 149–150.
- Oesterle E. C., Dallos P. [1990]. Intracellular recordings from supporting cells in the guinea pig cochlea: DC potentials. „Journal of Neurophysiology” 64(2), 617–636.
- Rabionet R., Gasparini P., Estivill X. [2000]. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. „Human Mutations” 16, 190–202.
- Scott D. A., Kraft M. L., Carmi R. et al. [1998]. Identification of mutations in the connexin 26 gene that causes autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. „Human Mutations” 11, 387–394.
- Seeman P., Malikova M., Raskova D., Bendova O., Groh D., Kubalkova M., Sakmaryova I., Seemanova E., Kabelka Z. [2004]. Spectrum and frequencies of mutations in the *GJB2* (Cx26) gene among 156 Czech patients with pre-lingual deafness. „Clinical Genetics” 66, 152–157.
- Sobe T., Vreugde S., Shahin H. et al. [2000]. The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. „Human Genetics” 106, 50–57.
- Wiszniewski W., Sobieszczanska-Radoszewska L., Nowakowska-Szyrwińska E., Obersztyn E., Bal J. [2001]. High frequency of *GJB2* gene mutations in Polish patients with prelingual nonsyndromic deafness. „Genetic Testing” 5, 147–148.
- Zelante L., Gasparini P., Estivill X., Melchionda S., D'Agruma L., Govea N., Mila M., Monica M. D., Lutfi J., Shohat M., Mansfield E., Delgrosso K., Rappaport E., Surrey S., Fortina P. [1997]. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. „Human Molecular Genetics” 6(9), 1605–1609.

Adres do korespondencji

Agnieszka Pollak
Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu
ul. Pstrowskiego 1
01-943 Warszawa
e-mail: a.pollak@ifps.org.pl

