

Analýza génov *GJB2* a *GJB6* u slovenských pacientov s obojstrannou senzorineurálnou poruchou sluchu.

Mgr. Zuzana Slobodová^{1,2}
(otorinolaryngológia)

Spoluautori: Lukáš Varga^{1,2}, Silvia Borecká², Miroslava Hučková², Martina Škopková², Lenka Radičová³, Daniela Gašperíková², Milan Profant¹

Školiteľ: prof. MUDr. Milan Profant, CSc.¹

¹Klinika otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LFUK a UNB, Bratislava

²Laboratórium Diabgene ÚEE, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

³Detská otorinolaryngologická klinika LFUK a NÚDCH, Bratislava

Úvod

Strata sluchu je zmyslovou poruchou s celosvetovou incidenciou vrodenej formy okolo 1,33 na 1000 novorodencov (1) a celkovo postihuje približne 10 % svetovej populácie (2). Približne za polovicu prípadov trvalej poruchy sluchu v detstve môžu genetické príčiny (3). Pri dedičných poruchách sluchu rozlišujeme nesyndrómové a syndrómové formy. Nesyndrómové formy predstavujú majoritnú časť (70 %) všetkých prípadov a pacienti majú prítomnú len poruchu sluchu. S takýmito poruchami sluchu sa spája veľké množstvo génov (až 116) (4).

Podľa toho, v ktorom období vývinu rečových schopností sa poškodenie sluchu objaví, rozlišujeme prelingválnu (do 2 rokov), perilingválnu (od 2 do 5 rokov) a postlingválnu (od 5 rokov) poruchu sluchu. Pri stanovení diagnózy je potrebné určiť aj stupeň poruchy sluchu (ľahký, stredný, stredne ťažký, ťažký, hluchota). Typ a závažnosť poruchy sluchu posudzuje ORL lekár alebo foniatier. Najčastejšie sa na meranie sluchu starších detí a dospelých používa tónová audiometria (0,25 - 6 kHz). Vďaka nej je možné určiť stupeň poruchy sluchu, zistiť, či ide o senzorineurálnu alebo prevodovú poruchu sluchu (meraním kostného a vzdušného vedenia) a určiť tvar audiometrickej krivky (bazokochleárny, mediokochleárny, pankochleárny, apikokochleárny, ski slope atď.) (3).

Typy dedičnosti asociované s poruchami sluchu sú tiež rôznorodé. Medzi nesyndrómovými formami poruchy sluchu má najväčšie zastúpenie autozomálne recesívny typ dedičnosti (80 %), v menšej miere autozomálne dominantný (15-20 %) a minoritne sa vyskytujú mitochondriálne poruchy sluchu (1 %), či poruchy sluchu viazané na X chromozóm (4). Celosvetovo sa vo veľkej miere (až do 50 % všetkých hereditárnych prípadov) vyskytujú autozomálne recesívne mutácie na lokuse DFNB1, ktorý nesie dva gény, *GJB2* a *GJB6*, potrebné na tvorbu transmembránových gap junctions, ktoré zabezpečujú recirkuláciu draslíkových iónov späť do endolymfy a tým udržiavajú homeostázu v kochley (5). Mutácie v týchto génoch sa považujú za najvýznamnejšiu príčinu prelingválnej poruchy sluchu.

V tejto štúdii sme sa zamerali na probandov s obojstrannou senzorineurálnou poruchou sluchu dosiahnutou pred 60. rokom života, u ktorých sme Sangerovým sekvenovaním analyzovali gén *GJB2* a multiplexnou PCR analýzou gén *GJB6*. Následne sme porovnali frekvenciu výskytu identifikovaných variantov v kaukazoidnej a rómskej populácii u *GJB2* a *GJB6* pozitívnych probandov a zisťovali vek nástupu poruchy sluchu.

Pacienti

Pacientov s obojstrannou senzorineurálnou poruchou sluchu sme vyhľadávali v spolupráci s Klinikou otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LFUK a UNB v Bratislave, Detskou otorinolaryngologickou klinikou LFUK v Bratislave, NÚDCH a Biomedicínskym centrom

SAV v Bratislave. Zároveň sme uskutočnili terénne výjazdy do rómskych komunít s vysokým výskytom poruchy sluchu. V laboratóriu Diabgene Biomedicínskeho centra BMC SAV tak bolo od roku 2010 do 2/2020 evidovaných 1 351 jedincov z 870 nepríbuzných rodín, ktorým bola odobraná krv alebo vykonaný ster z bukálnej sliznice na izoláciu DNA.

Metódy

Sekvenovanie podľa Sanger

Sekvenovanie podľa Sanger je zlatým štandardom DNA analýz (6). Táto metóda umožňuje zistiť priame poradie nukleotidových báz (A, C, G, T) v krátkych sekvenciách DNA, a preto sme ju použili pri analýze génu *GJB2* (NM_004004.5), ktorý obsahuje dva kódujúce exóny (exón 1 a exón 2). Primery sme dizajnovali pre každý exón samostatne. Skúmaný genomický región sme amplifikovali pomocou PCR a prítomnosť produktu sme overili pomocou elektroforézy na 1,5 % agarózovom géli. PCR produkt sme následne prečistili s použitím enzýmov *Exo I* a *FastAP*. Sekvenačné reakcie prečistených PCR produktov sme realizovali pomocou súpravy *Big-Dye Terminator v3.1* a separovali na platforme ABI 3500 v súlade s inštrukciami výrobcu. Získané dáta sme analyzovali pomocou softvéru SeqScape v 2.1.1 (Applied Biosystems, USA).

Multiplexná PCR analýza

Na detekciu veľkých delécií del(GJB6-D13S1854) a del(GJB6-D13S1830) v géne *GJB6* (NM_006783.4) sme zvolili špecificky dizajnovanú multiplexnú PCR podľa del Castilla et al. (7). V tejto PCR reakcii boli použité 3 páry primerov. Primery pre detekciu mutácie del(GJB6-D13S1854): *GJB-1R*, *BKR-1*, primery pre detekciu mutácie del(GJB6-D13S1830): *DelBK1*, *DelBK2*, primery pre syntézu exónu 1: *CX30Ex1A*, *CX30Ex1B*. Prítomnosť a rozloženie PCR produktov na 2 % agarózovom géli po elektroforéze sme vyhodnotili pod UV svetlom.

Výsledky

Vzhľadom na to, že mutácie v géne *GJB2* sú najčastejšou geneticky podmienenou príčinou poruchy sluchu, DNA analýzu génu *GJB2* sme uskutočnili ako prvú. Príčinu poruchy sluchu na podklade génu *GJB2* sme stanovili u 249 probandov, z toho 246 sú nositeľmi recesívnych mutácií (bialelických mutácií) a 3 probandi sú nositeľmi dominantnej mutácie (z toho jeden proband je nositeľom dominantnej a jednej recesívnej mutácie). Nositeľov recesívnych mutácií je možné z hľadiska genotypu rozdeliť na 162 homozygotov a 84 zložených heterozygotov (Tab.1). Recesívne mutácie v géne *GJB2* spôsobujú zvyčajne ťažkú poruchu sluchu až hluchotu. V tomto prípade proband zdedí poškodenú alelu od obidvoch rodičov, ktorí majú mutáciu na jednej alele a sú tak počujúcimi prenášači. Príčinu poruchy sluchu sme uvedenými analýzami nezistili u 613 probandov, avšak 71 probandov z tejto skupiny malo detegovanú mutáciu na jednej alele (prenášači) a u zvyšných 542 probandov mutácia v géne *GJB2* nebola vôbec detegovaná. U 8 probandov sme analýzu DNA nevykonali z dôvodu nedostatku DNA. Celkovo sme sekvenovaním podľa Sanger detegovali 25 rôznych mutácií. Vďaka DNA analýze génu *GJB2* sme tak u 28,62 % rodín odhalili genetickú etiológiu poruchy sluchu.

Najčastejšie detegované varianty v géne *GJB2* boli delécie c.35delG a c.71G>A. Prvú z uvedených má v homozygotnom tvare 127 (92,03 %) probandov kaukazoidného etnika a 2 probandi rómskeho etnika. Mutáciu c.71G>A má v homozygotnom tvare má len jeden proband kaukazoidného etnika a až 22 (95,65 %) probandov rómskeho etnika.

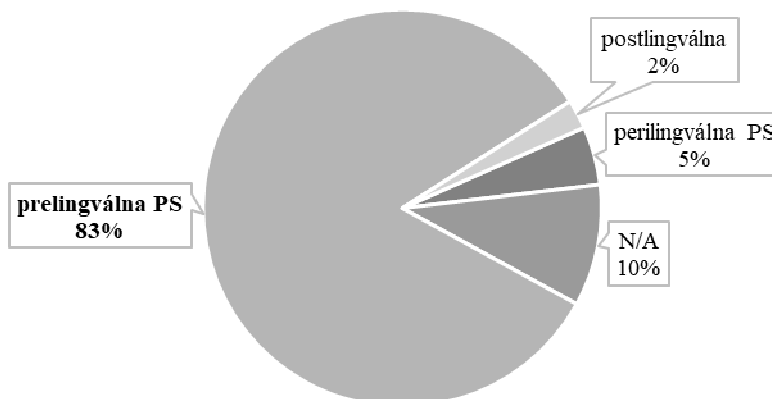
	genotyp	počet <i>GJB2</i> pozitívnych probandov
homozygot	c.[35delG];c.[35delG]	138
	c.[71G>A];c.[71G>A]	23
	c.[-23+1G>A];c.[-23+1G>A]	1
zložený heterozygot	c.[35delG];c.[313_326del14]	17
	c.[35delG];c.[71G>A]	16
	c.[-23+1G>A];c.[35delG]	15
	c.[35delG];c.[109G>A]	5
	c.[35delG];c.[167delT]	3
	c.[35delG];c.[269T>C]	3
	c.[-23+1G>A];c.[167delT]	2
	c.[35delG];c.[101T>C]	2
	c.[35delG];c.[229T>C]	2
	c.[35delG];c.[333_334delAA]	2
	c.[35delG];c.[358_360delGAG]	2
	c.[101T>C];c.[109G>A]	2
	c.[-23+1G>T];c.[35delG]	1
	c.[-23+1G>A];c.[313_326del14]	1
	c.[31_68del];c.[35delG]	1
	c.[35delG];c.[94C>T]	1
	c.[35delG];c.[127G>A]	1
	c.[35delG];c.[139G>T]	1
	c.[35delG];c.[250G>A]	1
	c.[71G>A];c.[109G>A]	1
	c.[71G>A];c.[269T>C]	1
	c.[176_191del16];c.[235delC]	1
	c.[101T>C];c.[663G>C]	1
	c.[109G>A];c.[269T>C]	1
	c.[109G>A];c.[358_360delGAG]	1
	c.[35delG];c.[224G>A]	1
heterozygot (dominantná mutácia)	c.[223C>T];[=]	1
	c.[551G>A];[=]	1
spolu		249

Tab.1: Prehľad detegovaných mutácií a genotypov v súbore 249 probandov s potvrdenou geneticky podmienenou poruchou sluchu na podklade génu *GJB2*.

U 613 probandov, u ktorých sme doposiaľ nezistili genetickú etiológiu poruchy sluchu, sme analyzovali aj gén *GJB6*. Mutáciu del(*GJB6*-D13S1830) sme detegovali len u 3 probandov s prelingválou poruchou sluchu, u ktorých sme v predchádzajúcej analýze detegovali mutáciu c.35delG heterozygotnom stave.

Na záver sme u *GJB2* a *GJB6* pozitívnych probandov zisťovali vek nástupu poruchy sluchu. Prelingválnu stratu sluchu má až 209 probandov, perilingválnu 12 probandov, postlingválnu 6 probandi a u 25 probandov sme nemali dostupné informácie (Obr.1). Túto poslednú podskupinu tvorili najmä pacienti z rómskych osád a internátnych škôl pre nepočujúcich.

252 *GJB2* a *GJB6* pozitívnych probandov



Obr.1 Mutácie v génoch *GJB2* a *GJB6* až u 83 % pozitívnych jedincov spôsobujú prelingválnu poruchu sluchu.

Diskusia

V našom súbore sme analýzou DNA identifikovali genetickú príčinu straty sluchu u 252 probandov (z 870 probandov; 28,97 %) spôsobenej mutáciami v génoch *GJB2* a *GJB6*.

Mutácie v géne *GJB2* môžu byť etnicky špecifické. V géne *GJB2* sa najčastejšie vyskytuje mutácia c.35delG u kaukazoidného etnika a c.71G>A u rómskeho etnika (8). V našom súbore máme taktiež jednu probandku ázijského etnika, u ktorej sme identifikovali 2 mutácie, ktoré patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce v čínskej populácii (9). Okrem týchto dvoch mutácií sme detegovali aj 23 ďalších. Prednostné analyzovanie génu *GJB2* u pacientov s obojstrannou senzorineurálnou poruchou sluchu je pre tak široké spektrum mutácií vhodné.

Po objavení mutácie del(GJB6-D13S1830) začali rôzne krajiny analyzovať gén *GJB6* u *GJB2* pozitívnych monoalelických heterozygotov na túto deléciu. Jej najčastejší výskyt je zaznamenaný v Izraeli, Francúzsku a Španielsku. Mutácia del(GJB6-D13S1830) bola taktiež detegovaná v Nemecku (10). V géne *GJB6* sme u troch probandov (všetci *GJB2* heterozygoti) s prelingválnou poruchou sluchu ako druhú mutáciu identifikovali mutáciu del(GJB6-D13S1830). Táto 309 bp delécia pravdepodobne zahŕňa aj regulačný element génu *GJB2*. Nízky záchyt pacientov s deléciou v géne *GJB6* na Slovensku je porovnateľný s výskytom tejto delécie v okolitých krajinách (11). Práce z Rakúska, Turecka, Jordánska, Číny neidentifikovali deléciu del(GJB6-D13S1830) u pacientov so senzorineurálnou poruchou sluchu (12). Z toho vyplýva, že mutácia del(GJB6-D13S1830) je obmedzená na určité populácie.

Mutácie v génoch *GJB2* a *GJB6* sú zodpovedné za autozomálne recesívne (lokus DFNB1) a v menšej miere aj dominantné (lokus DFNA3) dedičné poruchy sluchu (4). Až 206 *GJB2* a *GJB6* pozitívnych pacientov v našom súbore má prelingválnu poruchu sluchu, a teda poruchy uvedených génov sa typicky vyznačujú poruchou sluchu so skorým nástupom (0-2 roky). Vo väčšine prípadov ich možno identifikovať už pri neonatálnom skríningu sluchu.

Farmakologická liečba týchto pacientov v súčasnosti nie je možná. Strata sluchu sa podľa jej závažnosti kompenzuje načúvacími prístrojmi alebo kochleárnym implantátom (3). Diagnóza konexínovej hluchoty je z pohľadu funkčných výsledkov po kochleárnej implantácii priaznivá a možno ju označiť za pozitívny prognostický faktor (13). Je pravdepodobné, že aj z ostávajúcich 71,03 % probandov v našej kohorte má väčšina genetickú príčinu ochorenia, ale na podklade iných génov. V súčasnosti je známych viac 226 génov asociovaných so senzorineurálnou poruchou sluchu, čo znamená, že sa jedná o extrémne heterogénne genetické ochorenie (14). Genetická heterogenita senzorineurálnej poruchy sluchu je teda

hlavnou prekážkou v detegovaní nových mutácií a presnej identifikácii etiológie u mnohých pacientov. Metódy sekvenovania novej generácie dávajú nádej pre odhalenie genetickej podstaty straty sluchu práve u tých pacientov, u ktorých sa nenašli mutácie v génoch najčastejšie asociovaných s týmto ochorením. Naše prvé výsledky naznačujú, že takýmto prístupom možno identifikovať kauzálny gén aspoň v 40 % zostávajúcich prípadov.

Podporené Grantom Univerzity Komenského (UK/278/2018), VEGA 1/0214/16 a APVV 15-067

Zoznam použitej literatúry

1. Marková S, Brožková D, Mészárosová A. a kol.: Mutations in eight small DFNB genes are not a frequent cause of non-syndromic hereditary hearing loss in Czech patients. 2016, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 86, 27–33s.
2. Oishi N, Schacht J: Emerging treatments for noise-induced hearing loss. 2011, *Expert opinion on emerging drugs*. 16 (2): 235–45. doi:10.1517/14728214.2011.552427. PMC 3102156. PMID 21247358.
3. Kabátová Z, Profant M a kol.: *Audiológia*. 2012, Mesto: Bratislava, 362s. ISBN 978-80-8090-003-8.
4. van Camp G, Willems P, Smith R: Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. 1997, *American Journal of Human Genetics*, 758-764s. PMID: PMC1712474.
5. Kenneson A, Braun K, Boyle C: GJB6 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: A HuGE review. 2002, *Genetic in Medicine*. 258–274s.
6. Sanger F and Nicklen S: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
7. del Castillo I, Moreno-Pelayo M, del Castillo F a kol.: Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. 2003, doi: 10.1086/380205.
8. Varga L, Mašindová I, Hučková M a kol.: Prevalence of DFNB1 mutations among cochlear implant users in Slovakia and its clinical implications. 2014, *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 271(6), 1401–1407s.
9. Yanping Z, Ju W, Lina L, Yurui S, Bo F: Three common GJB2 mutations causing nonsyndromic hearing loss in Chinese populations are retained in the endoplasmic reticulum. 2010, *Acta Oto-Laryngologica*, 130:7, 799-803, DOI: 10.3109/00016480903443191
10. Bolz H, Schade G, Ehmer S a kol.: Phenotypic variability of non-syndromic hearing loss in patients heterozygous for both c.35delG of GJB2 and the 342-kb deletion involving GJB6. 2004, *Hear Res* 2004 Feb; 1-2(188):42-6.
11. Minárik G, Tretinárová D, Szemes T, Kádaši E: Prevalence of DFNB1 mutations in Slovak patients with non-syndromic hearing loss. 2012, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 76(3), 400–403s. doi:10.1097/00125817-200207000-00004.
12. Yuan Y, Huang D, Dai P a kol.: GJB6 gene mutation analysis in Chinese nonsyndromic deaf population. 2017, PMID: 1738853.
13. Varga L, Kabátová Z, Mašindová I, Nechojdomová D, Gašperíková D, Klimeš I, Profant M: Is deafness etiology important for prediction of functional outcomes in pediatric cochlear implantation?, 2014, *Acta Oto-Laryngologica*, 134:6, 571-578, DOI: 10.3109/00016489.2014.894253
14. Li W, Sun J, Ling J a kol.: ELMOD3, a novel causative gene, associated with human autosomal dominant nonsyndromic and progressive hearing loss. 2018, *Hum Genet*. 2018 Apr; 137(4):329-342.