

A Connexin 26 protein mutációja következtében kialakuló nem szindrómás nagyothallás

Tóth Tímea dr.*, Markus Pfister dr.***, Sziklai István dr.*

ÖSSZEFOGLALÁS

A genetikai defektus miatt kialakuló nagyothallás megértését segítik elő azok a vizsgálatok, melyekkel a nagyothallásért felelős génmutációkat identifikáljuk. A nem szindrómás autoszomális recesszíven (AR) öröklődő nagyothallás egyike a leggyakoribb érzékszervi megbetegedéseknek a világon, 1000 születésre 1,3–2,3 hallássérült eset jut. A prelingualis eredetű szenzori-neurális típusú hallásvesztés több mint 60%-a genetikai defektus következménye. Ezekben az esetekben a különböző populációknál a nagyothallás genetikai okaként a Connexin 26 gén (Cx26, GJB2) mutációja a felelős. A Connexin 26 gén által kódolt Cx26 protein a cochleában a sejtek közötti gap junction képzésében vesz részt, melyen keresztül kis molekulák (pl. kálium) áramolhatnak a szomszédos sejtek között. Cx26 génben eddig 48 AR öröklődésű mutációt írtak le, melyek közül a 30delG mutáció a leggyakoribb. Ennél a mutációnál a 30-35-ös pozícióban a hatos guanin deléciója megy végbe, s így egy stop kodon képződéséhez vezet, melynek következtében a fehérje transzkripció megszakad és egy funkcióval nem rendelkező polipeptidlánc képződik. A protein genetikai defektusa miatt az említett sejtek közötti jelátvitel nem alakul ki, s prelingualis siketséghez vezet. DNS vizsgálat során molekuláris genetikai módszereket alkalmazva (PCR, BsiYI-emésztés) a nevezett mutáció kimutatható.

A DE OEC Fül-Orr-Gégeklinikáján történő kutatómunka során Magyarország észak-keleti régiójában végzünk genetikai szűrővizsgálatot a Connexin 26 protein 30delG mutációjára.

KULCSSZAVAK: Connexin 26, gap junction, molekuláris genetika, nem szindrómás nagyothallás, 30delG mutáció

SUMMARY

Hearing loss is the most frequent inherited sensory disorder in humans, affecting 1.3–2.3 per children. Inherited deafness can be classified as nonsyndromic or syndromic deafness. More than 60% of the cases of profound early-onset deafness are caused by genetic factors. Mutations in the Connexin 26 gene have been established as a major cause of inherited and sporadic non-syndromic deafness in different populations.

The CX26 gene encodes the gap junction protein Connexin 26 (GJB2), whose expression was shown in several tissues and in the cochlea. The 30delG mutation is the most frequent mutation in the Cx26 gene (about 70%), have been shown to underlie half of the cases of prelingual autosomal recessive forms of non-syndromic deafness. It represents a deletion of guanine from a series of six guanines in the coding region of the Cx26 cDNA. This leads to a frameshift and resulting in a premature stop codon. The mutation is predicted to result in the synthesis of a truncated, non-functional intracellular domain in the protein. The 30delG mutation can be detected at the molecular level using PCR followed by BsiYI digestion.

The subjects were of Northeast Hungarian origin. The patients were recruited from DE OEC Department of Otorhinolaryngology, University of Debrecen.

KEYWORDS: non-syndromic deafness, molecular genetics, Connexin 26, gap junction, 30delG mutation

Bevezetés

A hallásvesztés az egyik leggyakrabban előforduló érzékszervi megbetegedés a világon. Európában 1000 születésre 1,3–2,3 congenitalis halláskárosodás jut, melynek 60%-áért genetikai hiba, azon belül is leggyakrabban egyetlen gén okozta

Közlésre érkezett: 2000. 12. 11.

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Orvostudományi Kar, Fül-orr-gégeklinika
Cím: 4012 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.

Telefon: (52)414-763

E-mail: ttimi@jaguar.dote.hu

defektus a felelős (10). Az öröklődő nagyothalláson belül megkülönböztethetünk nem szindrómás és szindrómás kórképet, mely utóbbinál további klinikai tünetek is jelentkeznek.

Az öröklődő nagyothallás 70%-a a nem szindrómás kórképek közé tartozik. Ezen belül 75% autoszomális recesszív (AR), 15–20% autoszomális domináns (AD), míg 3–5% X nemi kromoszómához kötött, illetve mitokondriális öröklődést mutat (1). Az első lokusz azonosítását a 13q11 kromoszómán – DFNB1 (DFN: deafness, B: recesszív) – két vérrokon tunéziai család vizsgálatakor 1994-ben írták le (6). Azóta több országban történtek genetikai vizsgálatok, s ma már tudjuk, hogy az európai és az amerikai populációban előforduló öröklődő, nem szindrómás nagyothallás leggyakoribb oka a Cx26 proteint kódoló génben (Cx26 gén v. GJB2 – gap junction protein β 2-gén) történt mutációkkal magyarázható. A génmutáció nukleotid szinten történő azonosításáról 1997-ben jelent meg az első közlemény (30delG) (3). Ugyanebben az évben a GJB2 génben történt M34T mutáció azonosítása (34-es kodonban timin-citozin szubstitúció miatt methionin helyett threonin épül be) a DFNA (DFN: deafness, A: domináns) lokuszon (13q12) AD öröklésmentet mutatott (4). A DFNB lokuszon történt géndefektus 50%-áért a DFNB1 lokusz 30delG mutációja a felelős. Jelenleg AD forma közül 27 lokusz ismert (melyből 9 gént azonosítottak), 26 AR (6 gén ismert) és 5X kromoszómához kötött lokuszról van ismeretünk (1 gén ismert). Összességében feltehetően kb. 100 gént tartanak felelősnek a hallásért (8).

A halláskárosodás pontos genetikai defektusa és az érintett gének nagyrészt még ismeretlenek, viszont ezek pontos megismerése fontos szerepet játszhat a betegség patomechanizmusának megértésében, a diagnosztika és a terápia megvalósításában.

A Connexin 26 protein és mutációja

A Cx26 (GJB2) gén a sejtek közti intercelluláris csatorna (gap junction) képzéséért felelős fehérjét kódol. A kódolt Cx26 protein 9 fehérjeegységből (domain) áll (4 transzmembranális, 2 extracelluláris, citoplazmatikus, N terminális és C terminális). A fehérje szerkezeti stabilitásáért a domáinek közti diszulfid hidak a felelősek (9).

Hat connexin fehérje alkot egy connexont és két szomszédos sejt connexonja képez egy komplett intercelluláris csatornát (gap junction), melyen keresztül a két sejt között az extracelluláris tér kihagyásával 1000 daltonnál kisebb molekulású molekulák passzív áramlása történhet. A pH és kalciumion szint függő csatorna átmérője átlag 2 nm (7). Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal kimutatható a Cx26 protein kifejezett hálózata a cochleában (pl. limbus spiralis, Corti szerv, stria vascularis). A belső fül egyéb részein nem mutatható ki expresszálandó Cx26 protein.

A GJB2 gén a kis gének csoportjába tartozik, csupán egy kódoló exonja van. A 30delG mutáció során téves (missense) mutáció történik, azaz egy nukleotid deléciója miatt a transzkripció alatti kereteltolódás (frameshift) következtében a bázis triplet megváltozása miatt a szintetizálódó polipeptid-láncba új aminosav épül be, s ezáltal kóros protein képződik. A Connexin 26 protein eredetileg 226 aminosavból áll. 30delG mutáció következtében a kódoló szekvencia 30–35 pozíciójában a hatos nukleotid (guanin) deléciója miatt a guanin(G)-guanin(G)-timin(T) bázis triplett helyett G-T-G kódolódik, mely során glicin helyett valin épül be 12. aminosavként a polipeptid-láncba. A következő triplet T-G-adenin(A) egy stop kodont kódol, így az eredetileg 226 aminosavból álló protein helyett, csupán egy 12 aminosavat tartalmazó, működésképtelen polipeptid-lánc képződik, meggátolva ezzel a Corti szervben

1. táblázat

A betegek kizárásában figyelembe vett rizikófaktorok

1. Infekció a terhesség alatt (toxoplasma, rubeola, CMV, HSV, syphilis, HIV)
2. Neonatalis súly < 1500 gramm
3. Neonatalis Apgar-érték 1 percnél kevesebb mint 4 pont, 5 percnél kevesebb mint 6 pont
4. Neonatalis korban mechanikai ventiláció történt
5. Neonatalis transzfúzió követte hyperbilirubinémia
6. Ototoxikus gyógyszerek alkalmazása csecsemőkorban
7. Bakteriális meningitisz
8. Fejtrauma töréssel, eszméletvesztéssel
9. Neurodegeneratív kórképek

belül történő kálium cirkulációt (13). A mutáció familiáris eseteinek a gyakorisága meglehetősen magas az eddig vizsgált országokban: Olaszország 63% (13), Spanyolország 50% (13), mediterrán populáció 37% (5), Izrael 50% (13).

Beteganyag és módszer

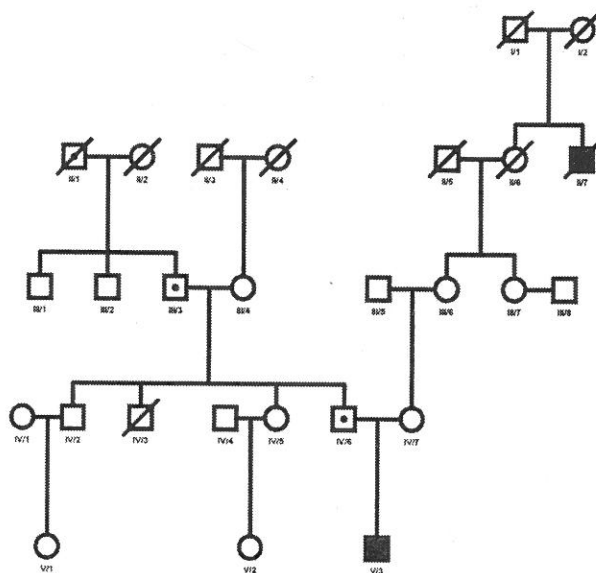
A DEOEC Fül-orr-gégeklinika 1999. októberben indult kutatómunka során 1999. október és 2000. szeptember között Magyarország északkeleti régiójában végzett adatgyűjtés kapcsán 48 esetben valószínűsíthettük a Connexin 26 protein mutációjának hordozását. A betegek további molekuláris genetikai vizsgálatokra történő kiválasztására abban az esetben került sor, ha a páciens prelingualis nagyothallása mindkét oldalt szimmetrikus volt, és halláscsökkenése minden frekvencián nagyobb volt, mint 40 dB, továbbá ép vesztibuláris funkció és normális tympanogram jellemezte, illetve ha az 1. táblázatban feltüntetett rizikó faktorok kizárhatók voltak. Az általános illetve fül-orr-gégészeti kivizsgálás és anamnézis felvétel mellett minden betegnél hallásvizsgálat (lég-, [125–8000 Hz] és csontvezetés [250–4000 Hz]), illetve tympanometria történt. A betegektől 9 ml EDTA-val kevert vért vettünk, s a levett mintákból PUREGENE Kit (GENTRA Systems, USA) alkalmazásával a leukocitákból DNS-t izoláltunk.

Speciális primerrel történő amplifikáció után, a PCR (polimeráz láncreakció) terméket BsiYI enzimmel emésztjük, s abban az esetben, ha az érintett személynél a 30delG mutáció fennáll, akkor a Cx26 génben az emésztés során restrikciós

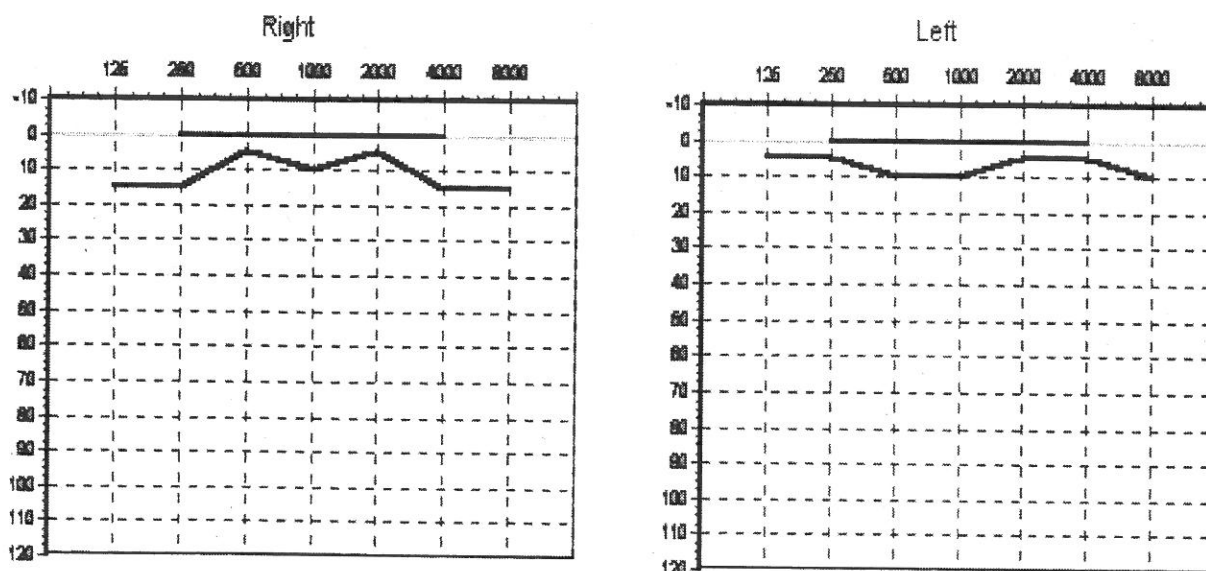
fragment képződik, amely egyébként a vad típusú személyekben, azaz amikor mindkét allél mutációmentes, nem fordul elő. Az általunk izolált DNS minták molekuláris genetikai módszerekkel történő feldolgozása GJB2 gén 30delG mutációjára folyamatban vannak.

Esetismertetés

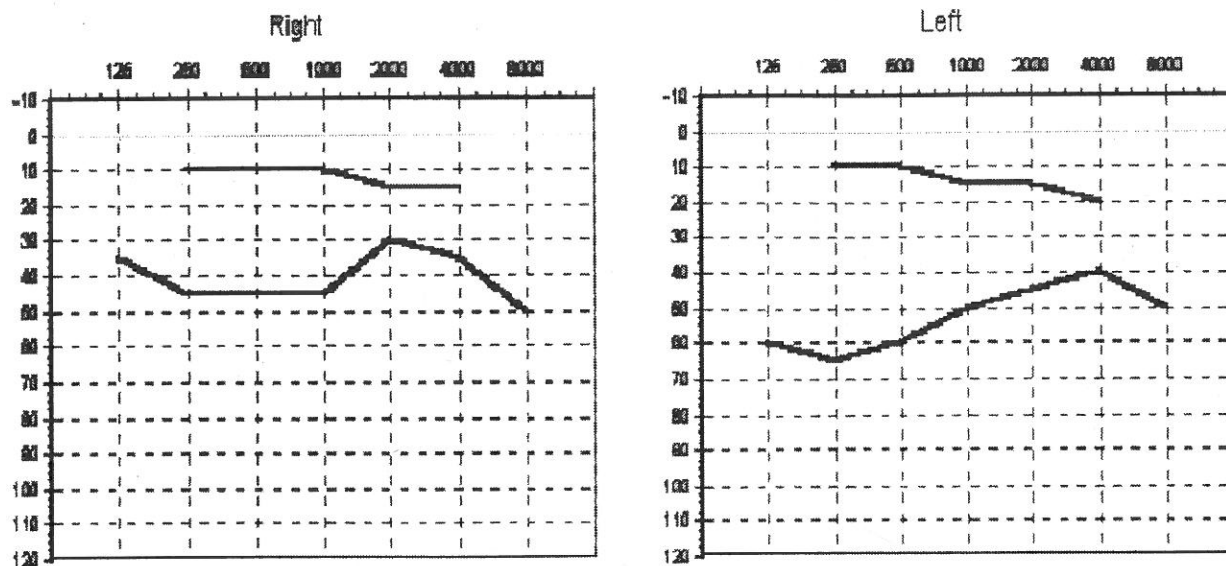
Mivel végleges adatokkal még nem rendelkezünk, így jelen közleményünkben csupán egy családot szeretnénk kiemelni, mely eset jól példáz



1. ábra. Az esetismertetésben részletezett személyek családfája. A négyzet a férfiakat, míg a kör a nőket jelöli. Ponttal jelezzük a nagyothallókat, fekete négyzet a siketek, áthúzott az elhunytak jele.



2. ábra. 30delG heterozigóta hordozó édesanya (IV/7) audiogramja



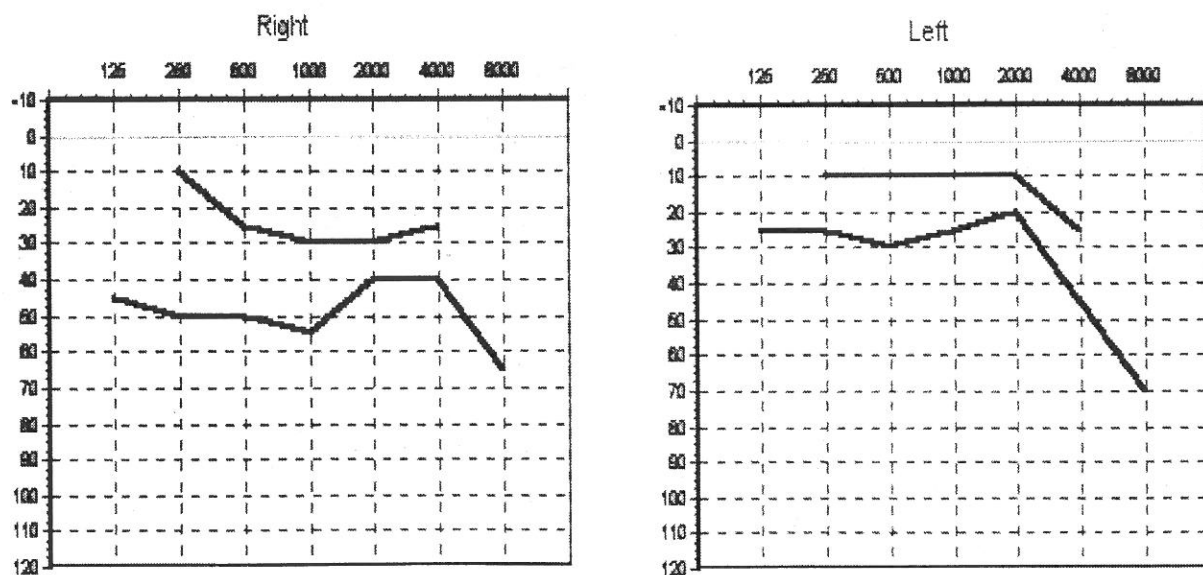
3. ábra. 30delG heterozigóta hordozó (IV/6) édesapa otoszklerózis műtét előtti audiogramja

za, hogy sokszor sporadikusnak hitt esetek hátterében is az öröklésmentet követhető.

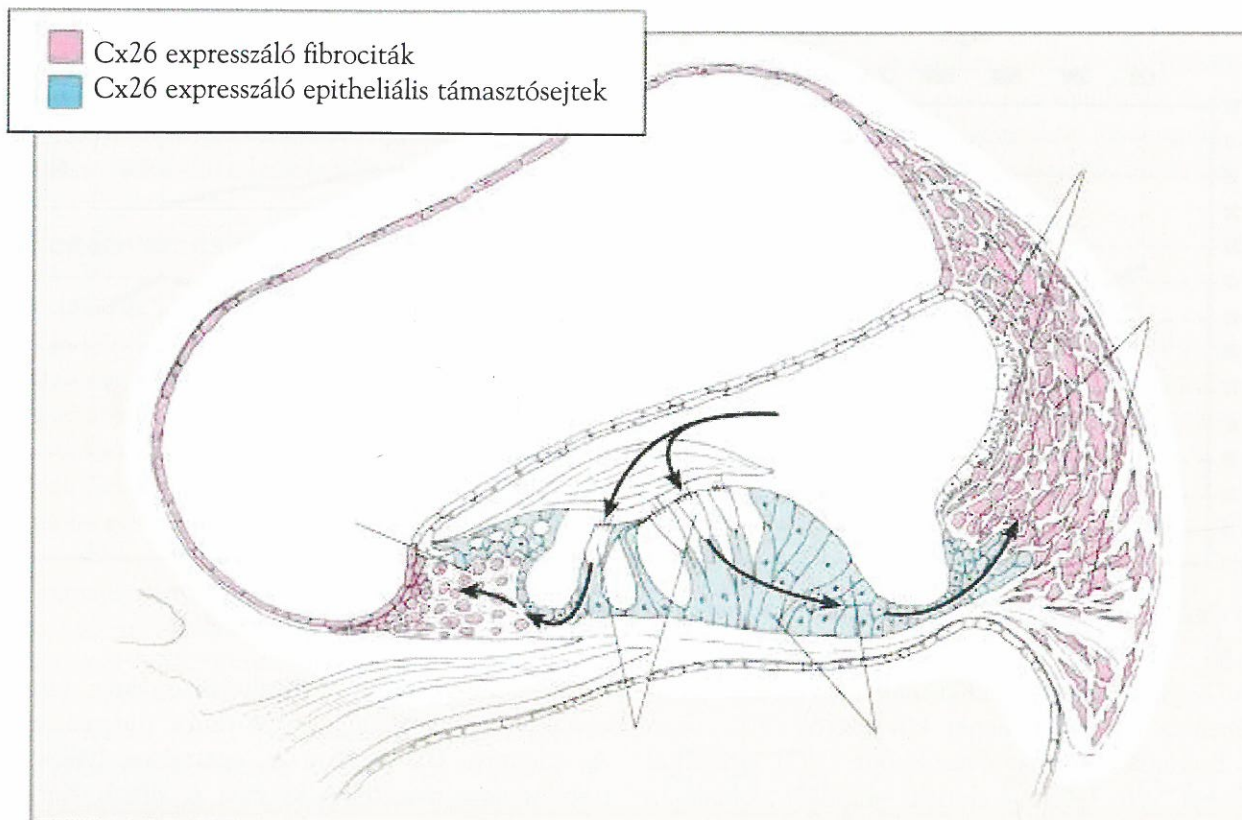
Esetünkben a hat éves kislányt (V/3) vizsgáltuk először (1. ábra), akinek mindkét oldalt a 125–8000 Hz frekvenciákon 90 dB-t meghaladó halláskárosodása van. A gyermek anamnézise egyebekben negatív: normál súllyal terminusban született, a szülés során és az azt követő időszakban komplikáció nem lépett fel, a csecsemő motilitási fejlődése ép volt, de a hangokra nem reagált. Egyéves korában diagnosztizáltak klinikánkon halláskárosodását. Jelenleg is hallókészüléket hord és a hallássérültek iskolájába jár. Szellemi fejlődése állapotához képest nem elmaradott, figyel, közösségbe illeszkedik, a kapott feladatot

hiánytalanul teljesíti. Motilitási zavara nincs, egyéb szervi megbetegedésről nincs tudomásunk. Az édesanya (IV/7) 28 éves, egészséges, halláskárosodás nem mutatható ki nála (2. ábra). Korábban nagyobb megbetegedése nem volt. Az édesapa (IV/6) 31 éves, egészséges, nagyobb megbetegedése korábban nem volt. Több évvel ezelőtt diagnosztizáltak otoszklerózisát, mely miatt ez év májusában stapedectomy történt (3. ábra). A családi anamnéziséből kiemelendő további a II/7 személy adata, aki siket volt, illetve a III/3 beteg adata, akinek kis-közepes fok határán lévő, kombinált típusú nagyothallása volt (4. ábra).

A fentebb részletezett molekuláris genetikai vizsgálat (Cx26, 30delG) a III/3, III/4, IV/5,



4. ábra. 30delG heterozigóta hordozó, III/3 személy audiogramja



5. ábra. Akusztikus inger hatására a szőrsejtek apikális felszínén beáramlott kálium ion a Cx26 proteinek által alkotott gap junctionokon keresztül recirkulálódik a stria vascularishoz

IV/6, IV/7, illetve V/3 személyek DNS-ével történt. A kapott eredmények alapján feltételezésünk igazolódott, mely szerint a kisfiú az adott mutációra nézve homozigóta beteg. A sporadikus esetet az igazolta, hogy mindkét szülő, illetve az édesapa lánytestvére és az apai nagypapa is az adott mutációra nézve heterozigóta, azaz egészséges hordozó. Csupán az apai nagymama volt homozigóta egészséges, azaz 30delG mutáció mentes. Így ebben a családban is tisztán követhető a 30delG mutáció autoszomális recesszív típusú öröklésmenete.

Megbeszélés

A Connexin 26 protein pontos funkciója a belső fülben még nem teljesen ismert, de úgy tűnik fontos szerepe van az endolymphában történő káliumion cirkulációban. Az elmélet lényege, hogy a káliumion a stria vascularisból az endolymphába áramolva akusztikus inger hatására a ciliák deflektálódása során a szőrsejtek apikális felszínén keresztül felvételre kerülnek. A káliumionok tovább haladva a sejt bazális része felé, a támasztősejteknek átadódnak, ahonnan passzív diffúzióval a gap junction hálózaton keresztül a

fibrociták érintésével a stria vascularishoz szállítódnak, majd a marginális sejtek a Na-K-ATP-áz felhasználásával visszaveszik őket (5. ábra) (12).

A betegek anamnézisében a veleszületett halláscsökkenés kiváltó oka ismeretlen. A 30delG mutációra homozigóta beteg klinikai megjelenésére a közepes fokútól a nagy fokúig terjedő (40 dB-t minden frekvencián meghaladó) bilaterális, mindkét oldalt azonos mértékű halláscsökkenés jellemző. A küszöbgörbe lefutása ereszkedő vagy lapos. A folyamat progressziót nem mutat. Progresszió esetén szekunder mutáció valószínűsíthető. Ugyanazon homozigóta családon belül az érintettek halláskárosodásának mértéke variábilis lehet, melynek oka még nem tisztázott. A vesztibuláris funkció minden esetben érintetlen, hisz Cx26 protein a vesztibuláris rendszerben nem expresszálódik (2).

Mivel a Cx26 proteint csupán egy exon kódolja, kiváló lehetőséget nyújt a mutációk szűrésének megvalósítására Kit-ek formájában a rutin medicinában. Terhelt családi anamnézis esetén genetikai tanácsadaskor lehetőségünk nyílna a leendő gyermek öröklődő halláskárosodás rizikójának pontos meghatározására. Bár a genotípus alapján megmondható a mutáció hordozása, az

egy családon belüli lehetséges heterogén fenotípus miatt a hallásvesztés mértéke nem ítélt meg. Mégis kiemelendő a pár hónapos korban történő pontos diagnosztizálás lehetősége, mert a 6 hónapos kor előtt elkezdett terápia során sokkal nagyobb esélyük van a gyermekeknek a normális beszédfejlődésre.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnénk köszönetet mondani a Debreceni Széchenyi utcai Általános Iskola, Óvoda, Diákotthon, Hallássérültek Korai Fejlesztő és Integrációt Segítő Központjának, Pásti Tibor igazgató úrnak az adatgyűjtésben nyújtott segítségért, illetve Harasztosi Erzsébet igazgató-helyettesnek a szervezésért, illetve a jeltolmácsolásért.

A szerzők köszönetet mondanak a Mediroll Orvostechikai Kft-nek (Debrecen) a betegvizsgálathoz szükséges szűrő audiométer készülék biztosításáért. A munka T25050 OTKA támogatás keretében készült.

Irodalom

1. Anil K. K., Caley M. C. Cracking the Auditory Genetic Code: Nonsyndromic Hereditary hearing Impairment. *Am. J. Otol.* 20, 115–132, 1999.
2. Cohn E. S., Kelley P. M. Clinical Phenotype and Mutations in Connexin 26 (DFNB1/GJB2), the most common cause of Childhood Hearing Loss. *Am. J. Med. Genet.* 89, 130–136, 1999.
3. Denoyelle F., Weil D., Maw M. A. et al Prelingual deafness: high prevalence of 35delG mutation in the Connexin 26 gene. *Hum. Mol. Genet.* 6, 2173–2177, 1997.
4. Denoyelle F., Lina-Granade G., Plauchu H. et al Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* 393, 319–320, 1998.
5. Estivill X., Fortina P., Surrey S. et al Connexin 26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351, 394–398, 1998.
6. Guilford P., Ben Arab S., Blanchard S., Levillier J., Weisenbach J. A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genet.* 6, 24–28, 1994.
7. Kikuchi T., Kimura R. S., Paul D. L. Gap junction in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat. Embryol.* 191, 101–118, 1995.
8. Kupka S., Mirghomizadeh F., Haug T. et al Mutationsanalyse des Connexin 26-Genes bei sporadischen Fällen mittelbis hochgradiger Schwerhörigkeit. *HNO* 48, 671–674, 2000.
9. Laird D. W. The life cycle of a connexin: gap junction formation removal and degradation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 28, 311–318, 1996.

10. Marazita M. L., Ploughman L. M., Rawlings B. et al Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the school-age population. *Am. J. Med. Genet.* 46, 486–491, 1993.
11. Pfister M. Neue molekulargenetische Erkenntnisse über die Entstehung hereditärer Schwerhörigkeiten. *HNO* 9, 782–783, 1998.
12. Steel K. P. A New Era in the Genetics of Deafness. *N. Engl. J. Med.* 339, 1545–1547, 1998.
13. Zelante L., Gasparini P., Estivill W., et al: Connexin 26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autor removal recessive deafness in Mediterraneans. *Hum. Molec. Genet.* 6, 1605–1609, 1997.

ZUSAMMENFASSUNG:

Zum Verständnis der durch einen genetischen Defekt entstandenen Schwerhörigkeit helfen Untersuchungen, die die für die Schwerhörigkeit verantwortlichen Genmutationen identifizieren. Die nicht-syndromale autosomal-rezessiv (AR) erbliche Schwerhörigkeit ist eine der weltweit häufigsten Erkrankungen der Sinnesorgane. Für diese Fälle gilt bei den unterschiedlichen Populationen die Mutation des Connexin 26-Gens (Cx26, GJB2) als verantwortlich. Das vom Gen Connexin 26 kodierte Protein Cx26 ist an der Entstehung der gap junction zwischen den Zellen beteiligt, durch die kleine Moleküle wie z.B. Kalium zwischen benachbarten Zellen wandern können. Bisher wurden 48 AR-vererbte Mutationen des Gens Cx26 beschrieben, unter denen die 30delG-Mutation die häufigste ist. Bei dieser Mutation geschieht die Deletion einer Guanin-Sechsergruppe in der Position 30–35, was zur Bildung eines Stop-Kodon führt, wodurch die Eiweißtranskription abbricht und eine Polypeptidkette ohne Funktion entsteht. Wegen des genetischen Proteindefekts kommt die Signalübergabe zwischen den betreffenden Zellen nicht zustande, das Resultat ist angeborene Taubheit. Unter Anwendung molekularer genetischer Verfahren (PCR, BsiYI-Abbau) können DNS-Untersuchungen diese Mutation nachweisen. Während der seit Oktober 1999 laufenden Forschungsarbeiten an der HNO-Klinik der Debrecener Universität entsprachen aufgrund der molekulargenetischen Untersuchung 48 Fälle aus der nordöstlichen Region Ungarns den Kriterien der Connexin 26-Proteinmutation.

SCHLÜSSELWÖRTER: nicht-syndromatische Schwerhörigkeit, Molekulargenetik, Connexin 26, gap junction, 30delG-Mutation