

Diagnostyka preimplantacyjna w kierunku niedosłuchu wrodzonego z mutacją 35delG w genie *GJB2* – doniesienie wstępne

Preimplantation genetic diagnosis of hearing loss with 35delG mutation in *GJB2* gene – preliminary report

Joanna Liss¹, Agata Mirecka¹, Kamila Kitowska¹, Krzysztof Łukaszuk^{1,2}

SUMMARY

Introduction: 35delG mutation in *GJB2* gene is the most frequent mutation in genetic hearing loss. The carrier screening for 35delG mutation to identify affected newborns is at the moment relatively inexpensive method for deafness diagnosis. The casual treatment of DFNB1 is impossible. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is a method allowing transfer mutation free embryos and successful pregnancies. It's an established procedure allowing genetic research of the oocyte before fertilization or embryo before implantation to the uterus.

Aim: The aim of the present work was to perform PGD for *GJB2* 35delG mutation in a couple who had already a child affected with genetic hearing loss.

Materials and Methods: The patient underwent a standard IVF procedure associated with intracytoplasmic sperm injection. 6–8 cell embryos were biopsied on day 3. Single cell nested PCR-RFLP protocol and sequence analysis for PGD was used for the detection of *GJB2* 35delG mutation.

Results: In the course of IVF-PGD procedures, from 6 analyzed embryos 3 were predicted to be free of *GJB2* 35delG mutation in both alleles. Two embryos were heterozygous and one was affected for this mutation as homozygous mutation in both alleles. Of these, one healthy embryo was transferred, resulting in an unaffected singleton pregnancy.

Conclusions: Preimplantation genetic diagnosis (PGD) of monogenic disorders is a very efficient method, especially for patients whose previous child is homozygous for genetic disorders. It offers new possibilities for the treatment for genetic disease carriers.

Hasła indeksowe: diagnostyka preimplantacyjna, choroby genetyczne, głuchota, gen *GJB2*, choroby autosomalne recesywne

Key words: preimplantation genetic diagnosis, genetic disease, deafness, *GJB2* gene, recessive autosomal disorders

©by Polskie Towarzystwo Otolaryngologów – Chirurgów Głowy i Szyi

PRACA ZGŁOSZONA DO DRUKU
PRZEZ ELEKTRONICZNY SYSTEM – EES

Otrzymano/Received:
02.06.2011

Zaakceptowano do druku/Accepted:
24.08.2011

¹ Invicta, Kliniki i Laboratoria Medyczne, Gdańsk
² Klinika Położnictwa, Gdański Uniwersytet Medyczny,

Kierownik: K. Łukaszuk

Wkład pracy autorów/Authors contribution:
Wg kolejności

Konflikt interesu/Conflicts of interest:

Autorzy pracy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Adres do korespondencji/

Address for correspondence:

imię i nazwisko: Joanna Liss

adres pocztowy:

INVICTA

Klinika Leczenia Niepłodności

ul. Rajska 10

80-850 Gdańsk

tel. 58 763 50 50

e-mail Joanna.Liss@invicta.pl

Otolaryngol Pol 2011;
65 (6): 443-446

Wstęp

Niedosłuch jest jedną z najczęstszych chorób narządów ludzkich zmysłów. Problem ten dotyczy ok. 10% społeczeństwa. W krajach rozwiniętych około 1–3:1000 dzieci dotkniętych jest ciężkim niedosłuchem już w chwili przyjścia na świat lub we wczesnym dzieciństwie, jeszcze przed rozwojem mowy. Kolejne 1:1000 dzieci traci słuch przed osiągnięciem dorosłości [1].

Niedosłuch może być spowodowany przez czynniki zewnętrzne: infekcje, substancje toksyczne, narażenie na hałas. Jednak przyczyną znacznej ilości przypadków niedosłuchu są aspekty genetyczne. Dotyczy to w około 60% przypadków niedosłuchu tzw. prelingwalnego, gdzie utrata słuchu ma miejsce do 2. roku życia dziecka [2].

Niedosłuch o podłożu genetycznym może być spowodowany pojedynczą mutacją w jednym genie lub wynikać z kombinacji mutacji różnych genów i czynników środowiskowych. W genetyce niedosłuchu wyróżnia się

dwie postaci: związane z zespołami dysmorficznymi – ok. 30% przypadków głuchoty dziedzicznej, gdzie niedosłuch jest jednym z elementów składających się na obraz zespołu wad oraz niedosłuch samoistny (izolowany) – 70% przypadków głuchoty dziedzicznej, w którym utracie słuchu nie towarzyszą inne wady [3, 4].

W chwili obecnej znanych jest około 100 loci w genomie człowieka odpowiedzialnych za genetyczny efekt niedosłuchu [5].

W postaci izolowanej niedosłuchu dziedziczenie wady może mieć różne podłoże. W około 85% przypadków jest to dziedziczenie autosomalne recesywne, w około 15% autosomalne dominujące, 1–3% przypadków sprzężonych jest z chromosomem X. Opisywane są też przypadki niedosłuchu izolowanego dziedziczonego mitochondrialnie. Jednak odsetek takich przypadków wynosi <1% [6].

Najważniejszym z dotychczas poznanych genów odpowiedzialnych za powstawanie niedosłuchu izolowanego jest gen *GJB2*, kodujący białko koneksynę 26, znajdujący się na chromosomie 13q12 [7]. Gen *GJB2* złożony jest z dwóch eksonów, z których pierwszy pełni funkcję w regulacji ekspresji genu, drugi niesie pełną sekwencję białka [8].

Białko koneksyna 26 należy do dużej rodziny białek odpowiedzialnych za tworzenie połączeń synaptycznych typu *gap junction*, mających charakter kanałów międzykomórkowych. Dzięki nim możliwy jest przepływ jonów i metabolitów między komórkami. Tego typu połączenia towarzyszą również w przewodzeniu impulsów w tkankach pobudliwych. Patofizjologia utraty słuchu w DFNB1 (*autosomal recessive deafness*) nie jest do końca znana. Brak ekspresji białka koneksyny 26 na skutek mutacji genu *GJB2* zaburza obieg potasu w uchu wewnętrznym (prowadzi do zatrucia narządu Cortiego), co w końcowym efekcie prowadzi do utraty słuchu [8–10].

Aktualnie w obrębie genu *GJB2* zidentyfikowano 47 mutacji. Do najczęstszych należy delecja G w pozycji 35 (35delG). W Europie mutacja ta jest obecna w 70–85% zmutowanych alleli genu *GJB2* i stanowi około 40% wszystkich mutacji wykrywanych u chorych z genetycznie uwarunkowaną postacią niedosłuchu [7].

Na podstawie badań przeprowadzonych przez zespół prof. Mazurczaka w Zakładzie Genetyki Medycznej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie, częstość występowania nosicielstwa mutacji 35delG stwierdzono w 1:50 polskiej populacji głuchych [7].

Obecnie nie jest możliwe leczenie przyczynowe głuchoty DFNB1. Prowadzone są jedynie badania przesiewowe w kierunku mutacji 35delG u wszystkich noworodków wykazujących odchylenia w prowadzonych na oddziałach noworodkowych badaniach przesiewowych pomiaru otoemisji akustycznej [7]. Wczesne rozpoznanie głuchoty skutkuje wczesnym aparaturowaniem, rehabilitacją mowy, a także w ostatnich latach leczeniem za pomocą implantów ślimakowych.

Jedyną aktualnie metodą pozwalającą wyeliminować ryzyko ujawnienia się danej jednostki chorobowej genetycznie uwarunkowanej jest diagnostyka preimplantacyjna, możliwa do przeprowadzenia tylko w przebiegu procedur wspomaganego rozrodu IVF-ET (*in vitro fertilization – embryo transfer*). Umożliwia ona badanie genetyczne komórki jajowej przed jej zapłodnieniem lub zarodka przed wprowadzeniem go do macicy.

Cel pracy

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody diagnostycznej pozwalającej na wykrycie obecności mutacji 35delG w genie *GJB2* w zarodkach pacjentów z pozytywnym wywiadem genetycznym w kierunku niedosłuchu wrodzonego, uwarunkowanego obecnością tej mutacji w układzie homozygotycznym.

Materiał i metody

W 2009 roku do Kliniki Leczenia Niepłodności INVICTA w Warszawie zgłosiła się para z pozytywnym wywiadem genetycznym w kierunku niedosłuchu genetycznie uwarunkowanego. U dziecka płci męskiej w wieku 9 miesięcy stwierdzono obecność mutacji 35delG w genie *GJB2* w układzie homozygotycznym. Rodzice dziecka po przeprowadzeniu badań genetycznych w kierunku tej mutacji okazali się być jej nosicielami w układzie heterozygotycznym. Para nie wymagała dodatkowego leczenia w kierunku leczenia niepłodności i została zakwalifikowana do zabiegu zapłodnienia pozaustrojowego z diagnostyką preimplantacyjną ze względu na ryzyko urodzenia kolejnego dziecka z wadą genetyczną.

Stymulację hormonalną do zabiegu zapłodnienia pozaustrojowego przeprowadzano z wykorzystaniem długiego protokołu. Ocenę ultrasonograficzną wzrostu pęcherzyków i poziomu estradiolu w surowicy krwi przeprowadzano w 8. i 11. dniu stymulacji. Zabieg pobrania komórek jajowych wykonywano po 36 godzinach od podania 5000 IU hCG. Komórki jajowe zapładniano, stosując metodę docyt oplazmatycznego podania plemnika do komórki jajowej – ICSI (*intracytoplazmic sperm injection*). Po 18 godzinach od ICSI oceniano zapłodnienia komórek jajowych. Biopsję blastomerów przeprowadzono w 3. dobie hodowli, do biopsji kwalifikowano zarodki 6–8-komórkowe. Transfer zarodków nie obciążonych genetycznie przeprowadzono w 5. dobie hodowli.

Analiza mutacji 35delG genu *GJB2*

Do identyfikacji mutacji 35delG w obrębie genu *GJB2* zastosowano reakcję PCR-nested (*polymerase chain reaction*) z analizą RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) oraz analizę sekwencji amplifikowanego fragmentu. W celu namnożenia ilości badanego DNA do amplifikacji zastosowano metodę namnożenia genomowego DNA, pochodzącego z pojedynczej komórki zarodka (*whole genome amplification*; WGA) [11].

Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Niemcy), stosując następujący profil temperaturowy: wstępna denaturacja – 95°C, 5 min, następnie 30 cykli: 95°C – 40 s, 60°C – 30 s, 72°C – 30 s oraz 72°C – 7 min – końcowe wydłużanie. Kolejny PCR prowadzono przez 45 cykli, stosując następujący profil: wstępna denaturacja – 95°C, 5 min, 95°C – 60 s, 63°C – 35 s, 72°C – 35 s oraz 72°C – 5 min – końcowe wydłużanie. W pracy wykorzystano następujące sekwencje starterów: Cx124F/Cx929R – 5' CTCCTGTCTCTGTCTAGCT 3'; 5' CTCATCCCTCTCATGCTGTC 3' – 806 bp (*basic pair*) oraz Cx26EcoRII/Cx26Ddel/Cx26-P1-5'GCTGGTGGAGTGTGTTGTTTCACACCCG3'; 5' GCTGTGGGAGTGTGTTGTTTCACACCCCTC 3'; 5' TCTTTTCCAGAGCAAACCGC 3' – 89 bp [3, 12].

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3171168>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3171168>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)