

Alenka Erjavec Škerget^{1,*}

GENETIKA NAGLUŠNOSTI: vzpostavitev diagnostične laboratorijske genetske poti

POVZETEK

Na podlagi projektne dela smo v rutinsko delo Laboratorija za medicinsko genetiko UKC Maribor uspešno vpeljali diagnostično laboratorijsko pot pri obravnavi preiskovanca z naglušnostjo, ki je v skladu z evropskimi smernicami. Opravljene storitve se sedaj opravljajo v prostorih UKC Maribor in so ustrezno verificirane, validirane ter ekonomsko upravičene.

V okviru vpeljave in verifikacije opisane laboratorijske poti je bila testirana tudi skupina preiskovancev z diagnozo idiopatska simetrična sensorinevralna naglušnost ali gluhost.

Kot rezultat našega dela predlagamo postopno obravnavo preiskovanca: prvotno obdelavo vzorca z asPCR (alelno specifično verižno reakcijo s polimerazo), ki je najhitrejša in najcenejša metoda. Sledi obdelava vzorca z najbolj učinkovito, hitro in ekonomsko sprejemljivo metodo MLPA (hkratna hibridizacija od ligacije odvisnih sond). V zadnji stopnji testiranja predlagamo še Sanger sekvenciranje in šele nato sekvenciranje nove generacije, ki sledi po predhodnem pregledu pri kliničnem genetiku. Izdelana diagnostična laboratorijska pot je v skladu z evropskimi smernicami in potrjena s strani evropske genetske mreže za humano genetiko.

Ključne besede: naglušnost, gluhost, genetika, smernice diagnostike naglušnosti; 35delG mutacija

UVOD

Ocenjujejo, da so genetski vzroki okvare sluha prisotni pri 60% preiskovancev z naglušnostjo. Odkritje genetskega vzroka lahko pripomore pri nadaljnji diagnostiki pacienta in njegovih družinskih članov ter s tem povezano nadaljnjo specialistično obravnavo preiskovanca in njegove družine.

Opisanih in dobro poznanih je že več kot 200 znanih genov oz. variacij v genih, ki so dokazano v povezavi z okvaro sluha. Med najpogostejše mutacije sodijo tiste, ki se nahajajo v genih GJB2 in GJB6. V diagnostični rutinski postopek Laboratorija za medicinsko genetiko UKC Maribor smo želeli vpeljati diagnostično pot pri laboratorijskem delu za namene odkrivanja genetskih vzrokov naglušnosti.

Laboratorijska pot naj bi bila taka, da bi zagotavljala optimalno senzitivnost, specifičnost ter ekonomsko upravičenost pri obravnavi pacientov z naglušnostjo.

Namen internega projektne dela, ki je v te namene potekal v letih med 2017 in 2019, je bil vzpostavitev laboratorijskega protokola pri diagnostiki preiskovancev z diagnozo naglušnosti.

Želeli smo oceniti in ovrednotiti uporabo naslednjih metod v diagnostični laboratorij:

- alelno specifični PCR (as PCR) za odkrivanje najpogostejše mutacije: delecije 35delG v genu GJB2,
- hkratna hibridizacija z ligacijo in verižno reakcijo s polimerazo (MLPA) z naborom genetskih sond, ki so v povezavi z naglušnostjo (MLPA nabor sond P163, MRC Holland),
- genetska identifikacija določenih izbranih, ciljanih genetskih sprememb na osnovi RFLP

¹Univerzitetni klinični center Maribor, Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Laboratorij za medicinsko genetiko, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

*E-Mail: alenka.erjavec@guest.arnes.si

(restriction fragment length polymorphism) tehnologije (z restrikcijskimi encimi),

- sekvenciranje po Sangerju v genu GJB2 za odkrivanje sekvenčne genetske spremembe v eksonu ,
- sekvenciranje nove generacije (NGS) z naborom genov v povezavi z gluhostjo.

METODOLOGIJA Z REZULTATI DELA

Vpeljava in validacija novih tehnologij

Uspešno smo vpeljali tehniko na osnovi verižne reakcije s polimerazo (t. i. PCR (polimerase chain reaction), ki smo jo uporabili za odkrivanje najpogostejše genetske mutacije pri naglušnosti, *35delG* mutacije.

Uporabljali smo specifično izbrane začetne oligonukleotide (tabela 1), s katerimi smo pod specifičnimi laboratorijskimi pogoji izvedli PCR reakcije.

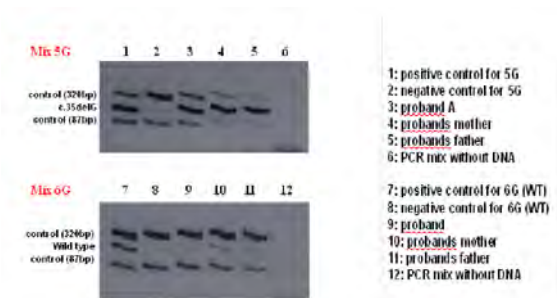
Tabela 1: Karakteristike uporabljenih začetnih oligonukleotidov za namen detekcije mutacije *35delG* v genu *GJB2*

Primer name	Primer sequence, 5' -3'	Size (bp)	Genomic position
5G: <i>GJB2</i> -5G-I-R	CGAGTCTTTCGTCACAGCCCTCA	202 bp	Chr 13:20187463- 20192975 (GrCh38/hg38) Band: 13q12.11 Genomic Size: 5513
<i>GJB2</i> -6G-O-F	GCGTTTCTCCAGCAWAGAT		
6G: <i>GJB2</i> -6G-I-F3	CGACAGGATCCTGGGREG	183bp	
<i>GJB2</i> -6G-O-R	TGGGAGA TGGGGAAGTAGTGA		

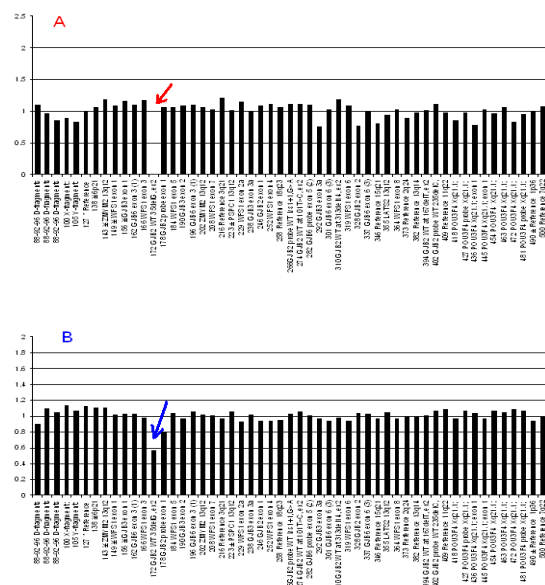
Na določeni skupini preiskovancev smo z namenom validacije metode opravili testiranje z as-PCR tehniko. Najdeno mutacijo smo potrdili s katero od drugih vpeljanih tehnologij. Specifičnost in senzitivnost vpeljane PCR tehnike za odkrivanje mutacije *35delG* v genu *GJB2* je po naših izkušnjah 100% (slika 1).

MLPA (multiplex ligation dependent probe amplification; hkratno pomnoževanje od ligacije odvisnih sond) je tehnologija, ki omogoča hkratno testiranje več genetskih mutacij oz. variacij, v primeru testiranja naglušnosti jih je to 51 (slika 2). Uporabili smo komplet sond proizvajalca MRC Holland z naborom P163. Testiranje smo opravili na določenem številu vzorcev in dosegli smo 100% specifičnost in

senzitivnost. Vse odkrite variacije smo potrdili z drugimi tehnikami, RFLP (restriction fragment length polymorphism) tehniko ali s Sanger sekvenciranjem.



Slika 1: Rezultat po agarozni gelski elektroforezi in verižni reakciji s polimerazo (PCR) z uporabo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za normalno variacijo (6G Mix) in mutacijsko variacijo (5G Mix) za detekcijo mutacije *35delG* v genu *GJB2*

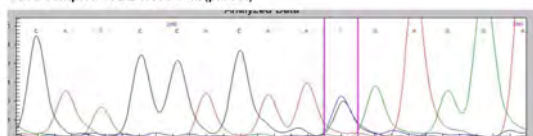


Slika 2: Rezultat po MLPA tehnologiji (hkratni hibridizaciji od ligacije odvisnih sond) z uporabo MLPA Kit P163 (MRC Holland) za detekcijo mutacij v genih *GJB2* in *GJB6*; primer A: popolni primanjkljaj *35delG* regije: homozigotno stanje; primer B: delni primanjkljaj *35delG* regije (50%): heterozigotno stanje

Sekvenciranje s Sangerjevo tehniko smo uporabljali za potrjevanje najdenih variacij s predhodnimi tehnikami. Metoda omogoča zaznavanje genetskih napak na nivoju velikosti enega nukleotida in na ta način tako še dodatno povečamo ločljivost v zaporedju genoma v območju gena

GJB2, eksona 2 (slika 3). Za namene validacije smo jo opravili na vzorcih, kjer smo ali predhodno vedeli rezultat ali je bilo z veliko verjetnostjo za pričakovati, da bomo odkrili genetsko spremembo. Potrdili smo vse predhodno najdene variante. Po uspešni identifikaciji in vpeljavi metode se sedaj Sanger tehnologija uporablja za preverjanje genoma v zadnji fazi laboratorijskega dela pri preiskovancih, pri katerih s predhodnimi tehnikami ne odkrijemo genetskega vzroka.

Case sample: GJB2 c.109G>A (p.V371)



Slika 3: Rezultat metodologije sekvenciranja po Sangerju na primeru preiskovanca z najdeno spremembo v genu *GJB2* c.109G>A (p.V371)

RFLP tehnologijo smo uporabili kot potrditveno metodo pri dveh preiskovancih, ki sta bila prepoznana kot sestavljena heterozigota.

Za genetsko analiziranje z metodo **sekvenciranja nove generacije (NGS)** smo izbrali 10 preiskovancev z nesindromsko obliko naglušnosti z namenom, da pregledamo ostala genetska območja (tabela 2), kjer so do sedaj že dokazali povezavo z naglušnostjo. Zaradi ekonomičnosti smo tovrstno analizo opravili pri preiskovancih, pri katerih smo po kliničnih podatkih ocenili, da obstaja velika verjetnost za genetski vzrok naglušnosti, ki pa ga po dosedanji metodologiji nismo odkrili.

Tabela 2: Nabor genov za testiranje genetsko pogojene naglušnosti z metodo NGS (Oto-GeneSGKit (Systemas Genomicos))

GJB3	WFS1	HGF	CDH23	GJB6	CLDN14	KCNE1	MITF
KCNQ4	GRXCR1	SLC26A5	USH1C	COCH	TMPRSS3	OTOG	OTOGL
BSND	MARVELD2	SLC26A4	LRTOMT	ESRRB	MYH9	TSPEAR	PNPT1
GPBM2	ADGRV1	GRHL2	MYO7A	CRYM	TRIOBP	CABP2	STRC
USH2A	DIAPH1	TJP2	RDX	MYO15A	SMPX	CIB2	OTOA
OTOF	POU4F3	TMC1	TECTA	USH1G	POU3F4	KCNJ10	ESPN
DFNB59	SERPINB6	DFNB31	MYO1A	ACTG1	TIMM8A	FOX11	
TMIE	COL11A2	TPRN	MSRB3	LOXHD1	PRPS1	PDZD7	
ILDR1	LHFPL5	GATA3	PTPRO	GIPC3	MIR96	DSPP	
CLRN1	MYO6	MYO3A	SLC17A8	CEACAM16	EYA4	DIABLO	
CCDC50	DFNA5	PCDH15	GJB2	MYH14	KCNQ1	CISD2	

RAZPRAVA Z ZAKLJUČKOM

Na podlagi projektne dela smo v rutinsko delo Laboratorija za medicinsko genetiko UKC Maribor uspešno vpeljali diagnostično laboratorijsko pot pri obravnavi preiskovanca z naglušnostjo. Zaradi narave dela, ekonomske učinkovitosti in organizacijskega vidika v smislu učinkovite genetske diagnostike v laboratoriju, smo se odločili za vpeljavo stopenjskega procesnega dela z različnimi tehnikami.

Predvideli in uporabili smo stopenjsko genetsko diagnostiko, kjer se lahko že z najenostavnejšo in najbolj robustno molekularno-genetsko tehniko (as-PCR) pojasni genetski vzrok pri določenem deležu preiskovancev z nesindromsko obliko naglušnosti, ki so homozigoti za 35delG mutacijo. Delež preiskovancev z odkrito tovrstno genetsko spremembo med različnimi populacijami se v svetu giblje 10–40 % .

Z MLPA tehnologijo, ki smo jo uporabili v nadaljevanju odkrivanja genetskih vzrokov naglušnosti, se delež odkritih sprememb nekoliko poveča, poleg tega se na ta način najdejo predvsem t. i. sestavljeni heterozigotni nosilci. Gre za odkrivanje dodatnih drugih mutacij v genih *GJB2* in *GJB6*, ki v eni kopiji sicer nimajo fenotipskega učinka, v kombinaciji z drugo genetsko spremembo pa vplivajo na fenotip in tako povzročijo naglušnost. Pri nosilcih dveh genetskih sprememb v preiskovanem genu se pri sestavljenih heterozigotih tako pojasni in potrdi genetski vzrok naglušnosti.

Pri preiskovancih, ki po predhodnem testiranju ostajajo nepojasneni, v zadnji stopnji testiranja po priporočilih evropskih smernic izvajamo še sekvenciranje po Sangerju. Metodologija je zadnja v kaskadi stopenjske diagnostične poti in omogoča najnatančnejši vpogled v genom na nivoju enega nukleotida. Delež novo odkritih sprememb s to metodologijo je sicer najnižji, a je del zahtev po evropskih priporočilih za izdajo popolnega genetskega izvida pri naglušnosti.

Tehnologijo NGS sekvenciranja nove generacije s ciljno usmerjenim izborom tarčnih lokusov za naglušnost smo izvedli in preverili na določeni izbrani skupini

preiskovancev. V okviru vpeljave diagnostične laboratorijske poti smo opravili vpeljavo in ocenitev smotrnosti testiranja v prihodnje rutinsko diagnostično delo laboratorija. Po načelih dobre laboratorijske prakse sedaj opravljamo genetsko diagnostiko po laboratorijskem algoritmu: če genetskega vzroka v predhodnih preiskavah do NGS ne odkrijemo, izdamo genetski izvid s priporočilom za obisk Ambulante za genetsko svetovanje UKC MB. Preiskovancem se pojasni potek in vrsta dosedanjih opravljenih preiskav, klinični genetik pa opravi klinični genetski pregled (pregled pridruženih fenotipskih znakov poleg izolirane naglušnosti).

Po pregledu in posvetu klinični genetik skupaj s preiskovancem odloči, ali se preiskovanca napoti še na testiranje z NGS, predvsem zaradi cenovnega vidika.

Uvedena diagnostična laboratorijska pot za naglušnost je v skladu z evropskimi genetskimi in laboratorijskimi smernicami EMQN. Kompletno laboratorijsko delo se odslej opravlja v UKC Maribor in je ustrezno verificirano, validirano ter urejeno tako, da je tudi ekonomsko upravičeno.

Kot uspešno vpeljan laboratorijski postopek smo pri rutinskem delu Laboratorija izdali standardni operativni postopek SOP MGL 219, ki omogoča izvedbo laboratorijskega dela in prenos znanja do vseh zaposlenih v LMG oz. za delo pooblaščenih oseb na področju laboratorijske genetske medicine.

V okviru preverjanja in sodelovanja v evropski mreži kvalitete EMQN smo navedeno stopenjsko diagnostiko uspešno testirali in tudi uporabili ter pridobili certifikat. Na tak način smo učinkovito znižali čas, stroške in druge ekonomske karakteristike, ki jih mora poleg laboratorijskih parametrov imeti učinkovit genetski diagnostični test. Leta 2018 smo z opisano metodologijo sodelovali v procesu preverjanja kvalitete našega dela v evropski shemi za preverjanje kakovosti EMQN in pridobili certifikat o uspešnem verificiranem izvajanju tovrstne diagnostike v Laboratoriju za medicinsko genetiko UKC Maribor. Uspešnost in verodostojnost genetskih rezultatov in informacij iz našega Laboratorija sedaj dokazujemo tudi v evropskem prostoru.

ZAHVALA

Avtorica prispevka se zahvaljuje kolektivu Laboratorija za medicinsko genetiko UKC Maribor, ki je kakorkoli pripomogel k uspešnemu delu, katerega rezultat je objava pričujočega prispevka.

REFERENCE

Duman D, Tekin M. Autosomal recessive nonsyndromic deafness genes: Review. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jun 1;17:2213-36. Review.

Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Function and expression pattern of nonsyndromic deafness genes. *Curr Mol Med*. 2009 Jun;9(5):546-64. Review.

Shearer AE, Hildebrand MS, Sloan CM, Smith RJ. Deafness in the genomics era. *Hear Res*. 2011 Dec;282(1-2):1-9. doi: 10.1016/j.heares.2011.10.001. Epub 2011 Oct 8. Review.

Shearer AE, Smith RJ. Genetics: advances in genetic testing for deafness. *Curr Opin Pediatr*. 2012 Dec;24(6):679-86. doi: 10.1097/MOP.0b013e3283588f5e. Review.

Song MH, Lee KY, Choi JY, Bok J, Kim UK. Nonsyndromic X-linked hearing loss. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 Jan 1;4:924-33. Review.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/> (GeneReviews Internet, zadnji pregled strani 27.7.2017); prevzeto na dan 17.07.2020;

Cunningham LL, Tucci DL. N. Hearing Loss in Adults. *N Engl J Med*. 2017 Dec 21;377(25):2465-2473.

Easson A, Walter S. Hearing-impaired young people - a physicians guide. *Clin Med (Lond)*. 2017 Dec;17(6):521-524.

McDermott JH, Molina-Ramírez LP, Bruce IA, et al. Diagnosing and Preventing Hearing Loss in the Genomic Age. *Trends Hear*. 2019 Jan-Dec;23:2331216519878983.

Liu XZ, Yuan H, Mittal R, Yan D. DFNX1 Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A, editors. *GeneReviews*[®] [Internet]. 2011 Aug 4 [updated 2018 Jul 19] Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2020. Hoefsloot HL, Roux AF, Bitner-Glindzic MB. EMQN Best Practice guidelines for diagnostic testing of mutations causing non-syndromic hearing impairment at the DFNB1 locus. *Eur J Hum Genet*. 2013 Nov; 21(11): 1325–1329. Published online 2013 May 22. doi: 10.1038/ejhg.2013.83 PMID: 23695287.