

HIPOACUZIA DE CAUZĂ GENETICĂ VARIABILITATEA EXPRESIEI CLINICE A MUTAȚIEI 35DELG ÎN CONEXINA 26 – PREZENTARE DE CAZ

Asist. Univ. Dr. Cristian Răzvan Strugaru¹, Prof. Dr. Romeo Călărașu³,
Dr. Adela Branzan², Dr. Laurențiu Camil Bohaltea¹, Daniela Popescu²,
Alma Kosa (Tudor)²

¹Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila“, București

²Centrul de Diagnostic și Tratament „Dr. Victor Babeș“, București

³Institutul de Fono-Audiologie și Chirurgie Funcțională O.R.L.
„Prof. Dr. Dorin Hociotă“, București

REZUMAT

Hipoacuzia neurosenzorială (SNHL) este o afecțiune complexă cu implicații profunde din punct de vedere medical și social. Aproximativ 1 din 1000 de copii se nasc cu hipoacuzie moderată până la profundă, iar în particular, în familiile în care nu există antecedente de surditate, diagnosticul are un impact major. Am investigat membrii unei familii cu diverse grade de hipoacuzie. Cazul primar a fost cel al unui copil de 1 an și 6 luni, diagnosticat cu hipoacuzie neurosenzorială bilaterală severă. Membrii familiei, pe parcursul a 3 generații, au fost investigați din punct de vedere genetic pentru mutații în gena GJB2 (conexina 26). Mutația 35delG a fost identificată la 5 membri ai familiei; la 4 sub forma heterozigot și cazul primar sub formă homozigot. Variabilitatea gradului de hipoacuzie este explicată atât printr-un rol funcțional diferit al fiecărei alele mutante și posibila sa activitate reziduală, cât și prin interacțiunea dintre factorii genetici și de mediu.

Cuvinte cheie: surditate, 35 delG, conexina 26

INTRODUCERE

Copil în vârstă de 1 an și 6 luni, sex masculin, fiind diagnosticat cu surditate bilaterală severă neurosenzorială, este trimis pentru consult genetic din serviciul pediatrie ORL. Diagnosticul a fost stabilit în urma efectuării OAE (otoemisii acustice) și ABR/AEP (potențiale evocate auditive precoce).

Din istoric rezultă un copil născut la termen, fără suferință la naștere, cu dezvoltare somatică normală pe etape de vârstă, fără antecedente patologice semnificative, la care au fost excluse alte cauze posibile de hipoacuzie (neurologice, traumatisme, malformații, sindromice, infecțioase, medicamentoase).

Antecedentele heredocolaterale evidențiază un frate în vârstă de 5 ani, cu dezvoltare psihosomatică normală, care în urma investigațiilor audiologice

efectuate prezintă surditate neurosenzorială bilaterală moderată. De menționat că diagnosticul fratelui mai mare a fost stabilit ulterior investigării fratelui mai mic, părinții neobservând vreo deficiență de auz.

Părinții prezintă investigații audiologice normale. Bunica pe linie paternă prezintă hipoacuzie progresivă bilaterală, protezată. La pacienții investigați nu se evidențiază alte cauze etiologice.

Examenul clinic al copilului cu hipoacuzie severă nu evidențiază elemente patologice semnificative cu excepția unei întârzieri psihice ușoare, și lipsa achiziției limbajului.

În urma examenului clinic, anchetei familiale, consulturilor interdisciplinare (ORL, pediatrie) și investigațiilor efectuate (imagistice, și de laborator) se ridică suspiciunea unei surdități de cauză genetică.

Adresa de corespondență:

Asist. Univ. Dr. Cristian Răzvan Strugaru, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila“, București

INVESTIGAȚII GENETICE

Având în vedere acest fapt, s-au efectuat teste de genetică moleculară (screeningul mutațional pentru gena conexinei 26) la toți membrii familiei.

Aceste teste au fost disponibile și puse în practică la catedra de genetică a Facultății de Medicină „Carol Davila“, București, de către Asistent Univ. Dr. Strugaru Cristian Răzvan în cadrul lucrării de doctorat cu titlul „**Implicații genetice în surditatea congenitală: sindromică și non-sindromică**“, având ca și conducător științific pe Prof. Dr. Călărășu Romeo.

MATERIAL ȘI METODĂ

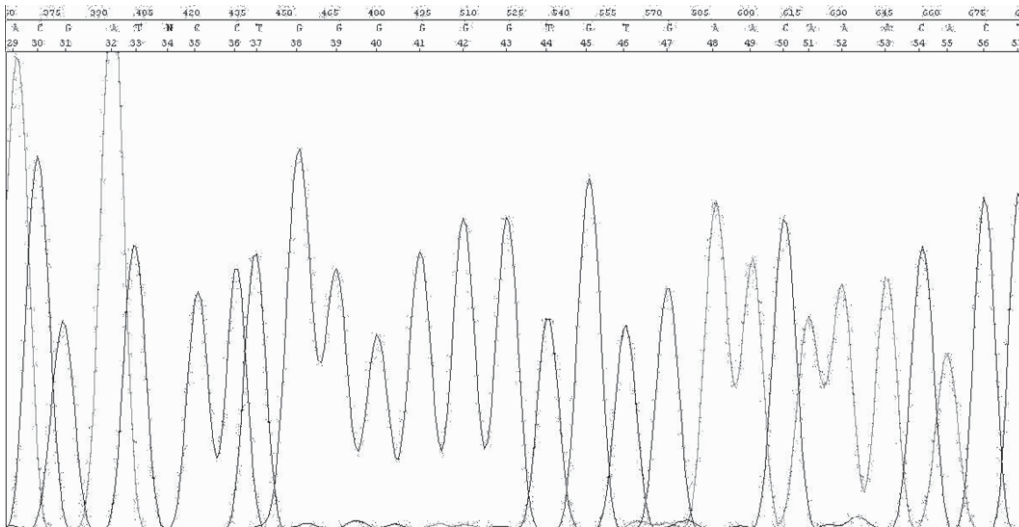
S-au recoltat 4 ml sânge venos de la fiecare pacient. Pentru extragerea ADN-ului am folosit kitul QIAamp DNA Blood (QIAGEN), conform protocolului elaborat de producător.

ADN-ul astfel izolat a fost amplificat prin tehnica PCR folosind primerii:

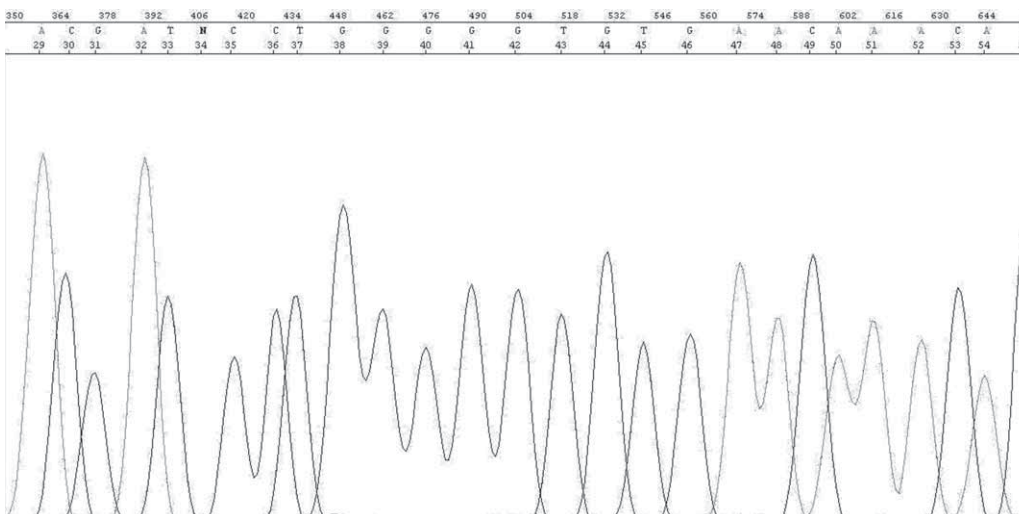
- forward primer: 5'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC -3';
- reverse primer, 5'-GGGCAATGCGTTAAACTGGC -3'

conform protocolului elaborat de Scott și colab. (1). Ampliconii PCR au fost secvențiați folosind primerul forward și ABI BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc, Foster City, California, USA). Ciclurile de secvențiere au fost efectuate astfel: 25 cicluri de 96°C timp de 10 secunde; 50°C timp de 5 secunde; și, 60°C timp de 4 minute. Produșii de secvențiere au fost purificați folosind DyeExSpin Kit (QIAGEN), iar secvența a fost analizată pe ABI Prism 310 Genetic Analyzer conform specificațiilor producătorului pentru POP4 polymer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

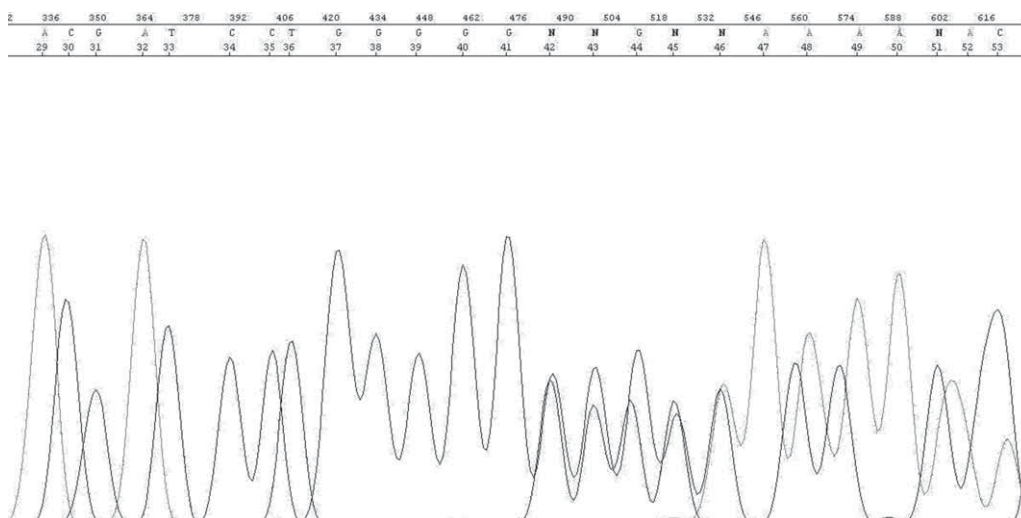
Rezultatele obținute au fost:



Pacient normal

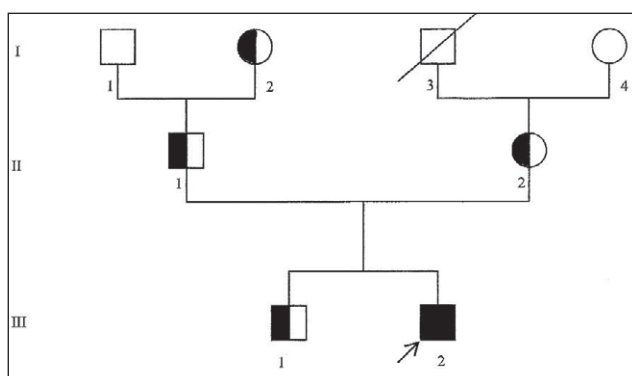


Pacient homozigot cu mutația 35delG



Pacient heterozigot cu mutația 35delG

În urma consultului și investigațiilor genetice s-a efectuat arborele genealogic.



- (III 2) copil în vârstă de 1an și 6 luni homozigot pentru mutația 35delG
- (III 1) copil în vârstă de 5 ani heterozigot pentru mutația 35delG
- (II 2) mama heterozigot pentru mutația 35delG
- (II 1) tata heterozigot pentru mutația 35delG
- (I 1) bunicul patern fără mutații, (I 2) bunica paternă heterozigot pentru mutația 35delG
- (I 4) bunica maternă fără mutații, (I 3) bunicul matern nu a fost investigat fiind decedat

În urma examenului clinic, anchetei genetice și investigațiilor moleculare s-a stabilit diagnosticul de surditate nonsindromică de cauză genetică forma homozigotă cu transmitere autosomal recesivă determinată de mutația 35delG.

Tratamentul în acest caz este de protezare auditivă, acest copil fiind propus pentru implant cochlear.

DISCUȚII

Datele din literatura de specialitate plasează mutațiile în gena GJB2, responsabilă de sinteza

conexinei 26, ca fiind responsabile pentru peste 60% dintre cazurile genetice de hipoacuzie congenitală (1-5). Proteina codificată Cx26 este larg distribuită în cohlee, participând la formarea unor joncțiuni gap, implicate în reglarea balanței osmotice a ionilor de K⁺ necesară activității celulelor ciliate (6-8). Dintre mutațiile mai frecvent întâlnite, deleția unei guanine în poziția 35 (35delG), este cea mai frecventă mutație întâlnită la rasa caucaziană, în timp ce mutații ca 167delT sau 235delC sunt frecvent întâlnite la evreii Ashkenazi sau în populația coreană și Japonia (9-14).

...CTGGGGGGTGTGAACAAACAC... Normal
 √
 ...CTGGGGGTGTGAACAAACAC... Hipoacuzie

Nașterea unui copil cu surditate, cu părinți sănătoși, poate avea un impact major. Diagnosticarea timpurie înainte ca și copilul să atingă 6 luni și luarea unei atitudini terapeutice adecvate pot duce la o dezvoltare aproximativ normală, în timp ce diagnosticul tardiv poate avea implicații devastatoare asupra achiziției limbajului, dezvoltării modalităților de comunicare și a abilităților sociale (15-20). Brunger și colab (21) au găsit că un procent de 96% dintre părinții cu auz normal, care au unul sau mai mulți copii cu hipoacuzie, au o atitudine pozitivă față de investigațiile genetice.

CONCLUZII

Din punctul de vedere al descendenței genetice și al modului de manifestare fenotipică (clinică), se observă o transmitere autozomal recesivă. Referitor la cazul primar (III 2), severitatea hipoacuziei a fost determinată de prezența mutației 35delG în forma homozigot. La pacienta (I 2), prezența

hipoacuziei nu a putut fi corelată mutația, putând fi asociată și cu un grad de presbiacuzie datorată vârstei. Ca particularitate a cazului, menționăm prezența părinților aparent normali, la care gradul de exprimare a mutației 35delG a fost extrem de

reduc. Datorită modului de transmitere mutația a devenit manifestă în generația următoare. Acest lucru evidențiază un risc crescut ca și viitorii descendenți să manifeste surditate, și impune efectuarea de diagnostic genetic prenatal.

Hearing loss due to genetic. Variability of clinical expression of the mutation 35delG in 26 connexin – case report

**Cristian Razvan Strugaru¹, Romeo Calarasu³, Adela Branzan²,
Laurentiu Camil Bohaltea¹, Daniela Popescu², Alma Kosa (Tudor)²**

¹*Department of Genetics “Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy, Bucharest*

²*Department of Pediatrics “Dr. Victor Babes” Diagnostic & Treatment Center, Bucharest*

³*Department of Otorhinolaryngology - “Prof. Dr. Dorin Hociota”*

Phonoaudiology and Laryngology Hospital, Bucharest

ABSTRACT

Sensorineural hearing loss (SNHL) is a complex disease with profound medical and social implications. About 1 in 1000 children are born with moderate to profound hearing impairment, and particularly on families that have no previous history of deafness, the diagnosis has a major impact.

We investigated the family members with different degrees of deafness. The primary case was that of a child of 1 year and 6 months, diagnosed with severe bilateral sensorineural hearing loss. The family members, over three generations, have been investigated in terms of genetic mutations in the GJB2 gene (connexin26). 35delG mutation was identified in five family members, four as heterozygous form and primary case as homozygous form. The variability of the degree of hearing loss can be explained either by a different functional role of each mutated allele and its possible residual activity or by the possible interaction of environmental and genetic factors.

Key words: sensorineural hearing loss, 35delG, connexin 26

INTRODUCTION

Child aged 1 year and 6 months, male, diagnosed with severe bilateral sensorineural hearing loss, is sent for genetic consultation from the Pediatric Otorhinolaryngology service. The diagnosis was established after performing OAE (otoacoustic emissions) and ABR/AEP (Auditory Brainstem Response).

From anamnesis the child was born at term, without suffering at delivery, with normal somatic development stage of his age, no history of pathological significance, which have excluded other possible causes of hearing loss (neurological, trauma, malformations, congenital syndromes, infectious, drugs).

Family history reveals a 5-year-old brother with normal psychosomatic development, that was also audiological investigated and moderate bilateral sensorineural deafness was found. The diagnosis of elder brother was subsequently established in the

context of the younger brother problem, parents never suspecting any hearing deficiency.

Audiological investigation of the parents was normal but the paternal grandmother shows bilateral progressive hearing loss, prosthetic. The investigated patients reveal no other etiological causes.

Clinical examination of the child with severe hearing loss do not show significant pathological features except for a mild mental delay, and poor language acquisition. After clinical examination, family investigation, interdisciplinary appointments (ENT, pediatrics) and conducted investigations (imaging, and laboratory) genetic cause of deafness was incriminated.

GENETIC TESTS

For the investigation of the possible genetic cause, molecular genetic testing (screening for gene mutations connectin 26) were performed to all family members.

These tests were available and applied at genetics department of the Faculty of Medicine “Carol Davila”, Bucharest, by Assistant Professor. Dr. Cristian Razvan Strugaru in the doctoral thesis with the title “**Implications of genetic congenital deafness: syndromic and non-syndromic**”, scientific coordinated by Prof. Dr. Calarasu Romeo.

METHODS

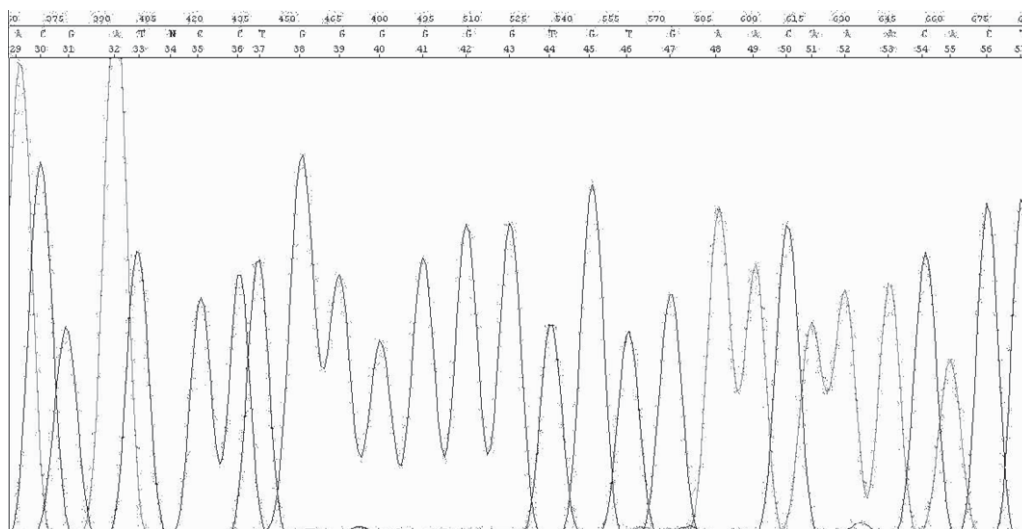
4 ml venous blood was collected from each patient. For DNA extraction we used the QIAamp DNA Blood kit (Qiagen), according to the protocol developed by the manufacturer.

DNA isolated as was amplified by PCR technique using primers.

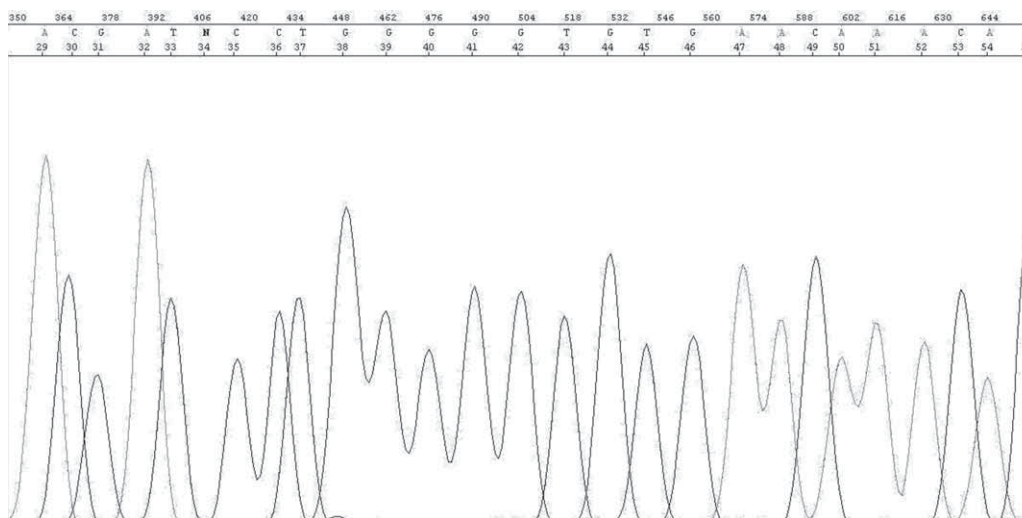
- forward primer: 5’- TCTTTTCCAGAGCAAACCGC -3 ‘,

- and reverse primer, 5’- GGGCAATGCGTTAAACTGGC -3’ according to the protocol developed by Scott et al. (1). PCR amplicons were sequenced using forward primer and ABI BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, California, USA). Sequencing cycles were performed as follows: 25 cycles of 96° C for 10 seconds, 50° C for 5 seconds, and 60° C for 4 minutes. Sequencing products were purified using DyeExSpin Kit (Qiagen), and the sequence was analyzed on the ABI Prism 310 Genetic Analyzer according to the producer for POP4 polymer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

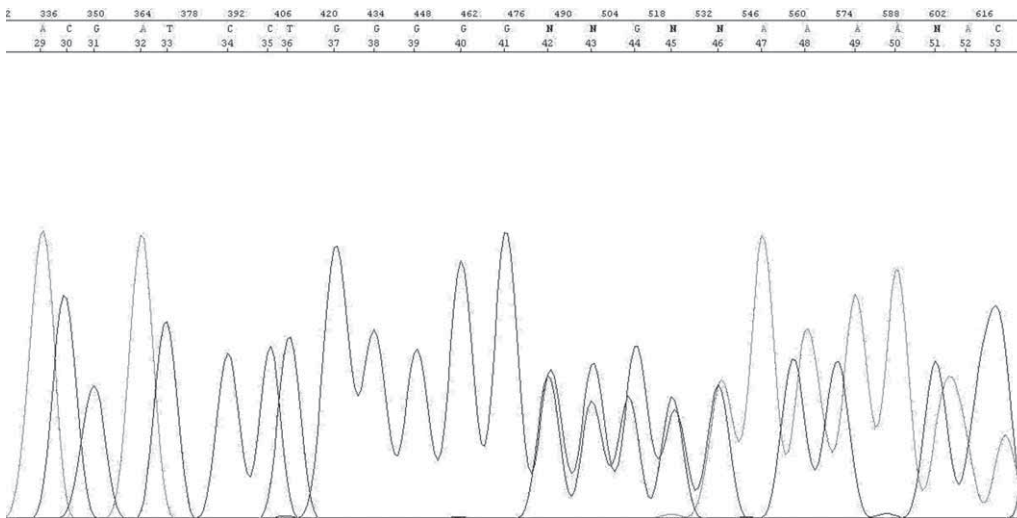
The results were



Normal patient

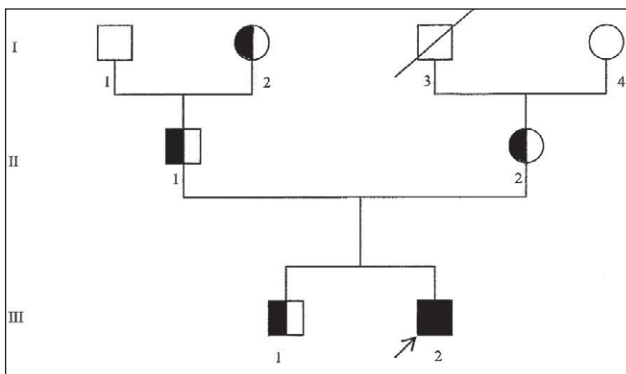


Patient with homozygous 35delG mutation



Patient heterozygous with 35delG mutation

Following consultation and investigations, a genetic family tree (pedigree) was conducted.



- (III 2) child aged 1 year and 6 months homozygous for the 35delG mutation
- (III 1) child aged five years heterozygous for the 35delG mutation
- (II 2) mother heterozygous for the 35delG mutation
- (II 1) father heterozygous for the 35delG mutation
- (I 1) paternal grandfather without mutations (I 2) paternal grandmother heterozygous for the 35delG mutation
- (I 4) maternal grandmother without mutations, (I 3) maternal grandfather has not been investigated, deceased.

After clinical examination, genetic and molecular investigations, the child was diagnosed with non-syndromic genetic deafness, homozygous, caused by autosomal recessive 35delG mutation.

Treatment in this case is auditory prosthesis, this child was proposed for cochlear implant.

DISCUSSION

Data from the literature places GJB2 mutations in the gene responsible for the synthesis connexin 26, as

being responsible for more than 60% of genetic congenital deafness (1-5). Encoded protein Cx26 is widely distributed in the cochlea, participating in the formation of gap junctions, involved in regulating the osmotic balance of K⁺ ions needed for the function of hair cells (6-8). Among the most common mutations, deletion of a guanine in position 35 (35delG), is the most common mutation found in Caucasian, while mutations that 167delT or 235delC are common in Ashkenazi Jews and Japanese or Korean population (9-14)

...CTGGGGG**G**TGTGAACAAACAC... Normal
 √
 ...CTGGGGGTGTGAACAAACAC... Hearing loss

The birth of a child with deafness from healthy parents can have a major impact on the family. Early diagnosis – before child reaches six months and making appropriate therapeutic attitudes can lead to an almost normal development, while late diagnosis may have devastating implications on language acquisition, communication development and social skill (15-20). Brunger et al (21) have found that a 96% of parents with normal hearing who have one or more children with hearing loss have a positive attitude towards genetic investigations.

CONCLUSIONS

Regarding genetic descendance and phenotypic (clinical) expression, the transmission is autosomal recessive. Regarding the primary case (III 2), severity of hearing loss was caused by present 35delG mutation in homozygous form. In the case of I 2 patient the hearing loss could not be correlated with mutation because of the associated degree of

age related hearing loss (presbycusis). As a feature of the case, we mention the seemingly normal parents, that expressed the mutation 35delG in extremely low degree. Because of its mode of

transmission of the mutation become manifest in the next generation. This highlights a risk of the future offspring to exhibit deafness, and genetic prenatal diagnosis is required.

REFERENCES

1. Scott DA, Kraft ML, Stone EM, Sheffield VC, Smith RJ – Connexin mutations and hearing loss. *Nature* 1998; 391:32.
2. Steel KP, Kros CJ – A genetic approach to understanding auditory function. *Nat Genet* 2001; 27:143–149.
3. Cohn ES, Kelley PM, Fowler TW, Gorga MP, Lefkowitz DM, Kuehn HJ, Schaefer GB, Gobar LS, Hahn FJ, Harris DJ, Kimberling WJ – Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene. *Pediatrics* 1999;103:546–550.
4. Sobe T, Vreugde S, Shahin H, Berlin M, Davis N, Kanaan M, Yaron Y, Orr-Urtreger A, Frydman M, Shohat M, Avraham KB – The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet* 2000; 106:50–57.
5. Gasparini P, Rabionet R, Barbuji G, Melchionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen K, Metspalu A, Oitmaa E, Pisano M, Fortina P, Zelante L, Estivill X – High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet* 2000; 8:19–23.
6. Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, Arbones ML, Gasparini P, Estivill X – Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet* 2000; 106:40–44.
7. Kikuchi T, Adams JC, Paul DL, Kimura RS – Gap junction systems in the rat vestibular labyrinth: Immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Acta Otolaryngol Stockh* 1994;114:520–528.
8. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC – Gap junctions in the rat cochlea: Immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol Berl* 1995;191:101–118.
9. Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ – Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 1998; 62:792–799.
10. Lench N, Houseman M, Newton V, Van Camp G, Mueller R – Connexin-26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness. *Lancet* 1998; 351: 415.
11. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB – Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 1998; 339:1500–1505.
12. Lerer I, Sagi M, Malamud E, Levi H, Raas-Rothschild A, Abeliovich D – Contribution of connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT. *Am J Med Genet* 2000; 95:53–56.
13. Park HJ, Hahn SH, Young-Myoung C, Park K, Kim HN – Connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss. *Laryngoscope* 2000;110:1535–1538.
14. Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ – Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet* 2000; 37:41–43.
15. Downs PM, Yoshinaga-Itano C – The efficacy of early identification and intervention for children with hearing impairment. *Pediatr Clin North Am* 1999; 46:79–87.
16. Moeller MP – Early intervention and language development in children who are deaf and hard of hearing. *Pediatrics* 2000; 106:E43.
17. Yoshinaga-Itano C, Coulter D, Thomson V – The Colorado newborn hearing screening project: effects on speech and language development for children with hearing loss. *J Perinatol* 2000; 20:S132–137.
18. <http://www.rnid.org.uk/index.htm>.
19. Department of Health – Piloting the introduction of universal neonatal hearing screening in England. www.doh.gov.uk/uhsnpilots/index.htm.
20. Fortnum HM, Summerfield AQ, Marshall DH, Davis AC, Bamford JM – Prevalence of permanent childhood hearing impairment in the United Kingdom and implications for universal neonatal hearing screening: questionnaire based ascertainment study. *Br Med J* 2001; 323:1–6.
21. Brunger JW, Murray GS, O'Riordan M, Matthews AL, Smith RJH, Robin N – Parental attitudes toward genetic testing for pediatric deafness. *Am J Hum Genet* 2000; 67:1621–1625.