

A szenzorineurális halláscsökkenés genetikai hátterének vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Kecskeméti Nóra

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Gál Anikó, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Szirmai Ágnes, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Léránt István, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Németh Adrienne, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. L. Kiss Anna, Ph.D., egyetemi docens
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Borkó Rezső, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Arányi Zsuzsanna, Ph.D., med.habil.

Budapest
2019

1. Tartalomjegyzék

2. Rövidítések.....	5
3. Bevezetés.....	8
3.1. A genetikai eredetű halláscsökkenések	11
3.2. A nem-szindrómás hallásvesztés kialakulásában szerepet játszó gének	12
3.3. A connexin fehérjecsald.....	16
3.4. A connexinek szerepe a hallásban	19
3.5. A <i>GJB2</i> mutációi	21
3.6. Mitokondriális eredetű halláscsökkenések	23
3.6.1. A mitokondriális genom károsodása.....	23
3.6.2. Nukleáris genom károsodása	24
3.6.3. Aminoglikozid indukálta halláscsökkenés.....	24
3.7. Halláscsökkenések rehabilitációs lehetőségei	27
3.8. Génterápiás lehetőségek a halláscsökkenésekben	30
4. Célkitűzések	32
5. Módszerek	33
5.1. Beteg kiválasztás:	33
5.1.1. Cochlearis implantáción átesett betegcsoport.....	33
5.1.2. <i>GJB2</i> betegcsoport.....	33
5.1.3. A mitokondriális betegcsoport.....	34
5.2. Audiológiai vizsgáló módszerek	34
5.3. Genetikai vizsgálómódszerek	36
5.3.1. DNS-izolálás	36
5.3.2. A <i>GJB2</i> gén szekvenálása	36
5.3.3. Teljes exom szekvenálás.....	37
5.3.4. Mitokondriális mutációk kimutatása	38

5.4.	<i>In silico</i> és statisztikai vizsgálómódszerek	39
6.	Eredmények.....	41
6.1.	Cochlearis implantáción átesett betegcsoport.....	41
6.2.	A <i>GJB2</i> betegcsoport.....	43
6.2.1.	Audiológiai eredmények	43
6.2.2.	A <i>GJB2</i> gén mutációanalízise	44
6.2.3.	Genotípus-fenotípus korreláció.....	47
6.2.4.	A teljes exom szekvenálás eredményei.....	51
6.2.4.1.	<i>DIAPH3</i> gén mutációját hordozó család (1. család)	52
6.2.4.2.	<i>WFS1</i> gén mutációját hordozó család (2. család).....	54
6.2.4.3.	<i>TRIOBP</i> gén mutációját hordozó család (3. család).....	56
6.2.4.4.	4. család.....	58
6.2.4.5.	5. család.....	59
6.3.	Mitokondriális betegcsoport	59
7.	Megbeszélés	61
7.1.	Cochlearis implantáción átesett betegcsoportunk.....	61
7.2.	A <i>GJB2</i> génben előforduló mutációk	65
7.2.1.	A <i>GJB2</i> genetikai vizsgálata.....	65
7.2.2.	Genotípus- fenotípus korrelációs vizsgálat.....	68
7.2.3.	Audiológiai eredmények a <i>GJB2</i> betegcsoportban.....	70
7.3.	A teljes exom szekvenálás eredményei a kiválasztott családokban	71
7.4.	A mitokondriális mutációk	76
7.5.	A genetikai eredmények hatása a mindennapi klinikai gyakorlatra	80
8.	Következtetések	83
9.	Összefoglalás.....	85
10.	Summary.....	86

11.	Irodalomjegyzék	87
12.	Saját publikációk	99
13.	Köszönetnyilvánítás	100
14.	Kiegészítő táblázatok, ábrák, génlisták	102

2. Rövidítések

A – adenzin

AAV – adeno-asszociált vírusvektor

ACMG – American College of Medical Genetics/ Orvosi Genetika Amerikai Kollégiuma

AD – autoszomális domináns

AR – autoszomális recesszív

ASSR – auditory steady state response

ATP- adenzin-trifoszfát

BERA – Brainstem Evoked Response Audiometry/ agytörzsi kiváltott válasz audiometria

BWA szoftver - Burrow-Wheeler Aligner szoftver

C – citozin

cAMP – ciklikus adenzin-monofoszfát

cCMV – kongenitális cytomegalovirus-fertőzés

cGMP – ciklikus guanozin-monofoszfát

ClinVar – adatbázis

CMV – cytomegalovirus

Da – dalton

dB – decibel

DFNA – Deafness, Neurosensory, Autosomal Dominant/ szenzorieurális halláscsökkenést okozó autoszomális domináns gén

DFNB – Deafness, Neurosensory, Autosomal Recessive/ szenzorieurális halláscsökkenést okozó autoszomális recesszív gén

DVD – Deafness Variation Database/ halláscsökkenést okozó génvariánsok adatbázisa

ExAc – Exome Aggregation Consortium adatbázis/ Összesített exom konzorcium

G – guanin

GME - The Greater Middle East (GME) Variome Project/ A Közel-Kelet variom projektje

GnomAD – Genome Aggregation Database/ genom adatbázis

HCS – halláscsökkenés

hg38 – humán referenciagenom

HGMD – Human Genome Mutation Database/ Humán Genom Mutációs Adatbázis

Hz – Herz

IC – intracelluláris

Iranome – iráni populációra vonatkozó genom adatbázis

MAO-B – monoamin-oxidáz-B

MR – mágneses rezonancia

mtDNS – mitokondriális DNS

mV – milivolt

NGS – Next Generation Sequencing/ újgenerációs szekvenálás

nm – nanométer

OAE - otoakusztikus emisszió

P – páciens/proband

PCR – Polimerase Chain Reaction/ polimeráz-lánreakció

PIC – perinatális intenzív centrum

RFLP – restrikciós fragment hosszpolimorfizmus

PTA – Pure Tone Audiometry/ küszöbaudiometria

PTA4^(0,5-4kHz) – 0,5, 1, 2 és 4 kHz-en mért átlag decibel érték

T – timin

U - uracil

WES – Whole Exome Sequencing/ teljes exom szekvenálás

XL – X-hez kötött öröklődés

3. Bevezetés

A hallás az ember egyik legfontosabb kommunikációs eszköze. A hallás segítségével képesek vagyunk a külvilágból érkező hangingerek felfogására, feldolgozására, valamint a beszédre. Bármilyen eredetű károsodás a hallószervben nemcsak a hallásban, hanem a beszédben is zavart okoz, mely jelentősen akadályozhatja a mindennapi kommunikációt.

A hallás egy rendkívül összetett folyamat, melynek során a külvilágban keletkezett hangok a külső hallójáraton áthaladva megrezegtetik a dobhártyát és a hallócsontokat. A rezgésbe hozott hallócsontok az ovális ablakon keresztül adják át a hangenergiát a belsőfülnék. A cochlea 3 kompartmenttel rendelkezik: a *scala vestibuli*, *scala tympani* és a *scala media*, másnéven *ductus cochlearis*. Az első kettőt perilympa tölti ki és a helicotreman át közlekednek egymással, míg a *scala media* egy vakon végződő cső, mely endolympht tartalmaz, illetve itt helyezkedik el a Corti-szerv az érzékelő szőrsejtekkel. Az ovális ablakon átadott hangenergia hatására a belsőfül folyadékterében nyomáskülönbség lép fel, melynek hatására a membrana basilarison a Békésy-féle haladó hullám alakul ki, mely a csiga csúcsa felé terjed. A Corti-szervben helyet foglaló szőrsejtek apikális felszínükön sztereocíliumokat tartalmaznak, melyek frekvenciasepcifikusan, a haladó hullám legnagyobb kitérésénél elhajlanak és a rajtuk megnyíló mechanoszenzitív K^+ -csatornákon át beáramló K^+ hatására depolarizálódnak. A K^+ -áramlás hajtóereje az endolympa és a szőrsejt intracelluláris tere közti ~ 150 mV potenciálkülönbség, az endocochlearis potenciál. A depolarizáció hatására feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák nyílnak meg és Ca^{2+} indukálta exocitózissal a szőrsejt basalis felszínén neurotranszmitterek szabadulnak fel, melyek az itt elhelyezkedő ribbon-szinapszisok útján aktiválják a nervus cochlearis afferens rostjait. Az ingerület a VIII. agyidegen keresztül jut el az agytörzsbe, ahol átkapcsolás után a hallópályákon keresztül jut a magasabb központokba. Ezen bonyolult folyamat bármely pontjának károsodása esetén halláscsökkenés alakul ki.

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2018-as kimutatása szerint (World Health Organisation 2018) világszerte 466 millió ember érintett halláscsökkenésben, amelyből 32 millió gyermek. A 65 évesnél idősebb populációban a betegség előfordulása eléri a 33%-ot. A halláscsökkenésnek számos okát ismerjük, ezek közül kiemelendő a genetikai eredetű, infekció eredetű, zajártalom okozta, illetve gyógyszer indukálta halláscsökkenés.

A WHO adatai alapján a gyermekkori hallásvesztések 60%-a megelőzhető okok miatt alakul ki.

A halláscsökkenéseket több szempont alapján kategorizálhatjuk.

A halláscsökkenés típusa szerint vezetékes, szenzorineurális, illetve kevert típusú halláscsökkenést különböztetünk meg. Vezetékes halláscsökkenés esetén a hangvezető rendszerben (hallójárat, dobhártya, hallócsontok) van eltérés. A szenzorineurális halláscsökkenés esetében leggyakrabban a csigában az érzékelő szőrsejtek szintjén, ritkább esetben a n. cochlearis, illetve a hallópálya magasabb szintjein van a probléma. Disszertációmban a továbbiakban a belsőfül eredetű halláscsökkenést tárgyalom részletesebben.

A halláscsökkenéseket a kialakulásuk ideje szerint szintén három csoportba sorolhatjuk: prelingualis, perilingualis és postlingualis halláscsökkenést különböztethetünk meg. A három csoport alapja halláscsökkenés időbeli kialakulása a beszédfejlődéshez képest. A beszédfejlődés a születéskor kezdődik és 1,5 éves és 3 éves kor között intenzív, robbanásszerű fejlődés jellemzi, majd 6 éves kor körül a folyamat jelentősen lassul és beszűkül.

A *prelingualis halláscsökkenés* esetén a beszédfejlődés megindulása előtt következik be a károsodás. Időben való felismerés elmaradásakor, illetve a megfelelő rehabilitáció megkezdése nélkül enyhébb halláscsökkenés esetén ezeknél a gyermekeknél a hangingerek hiányában elmarad a hallópályák születés utáni érése, mely következménye, hogy a gyermek beszédtanulási, beszédértési és beszédprodukciós képessége gyengébbé válik, olvasási nehézségekkel küzd, absztrakciós képessége is elmarad a korban megegyező, egészséges gyerekekhez képest (Lazard és mtsai 2012). A mentális fejlődés lelassul, általában ezek a betegek érzelmi, magatartásbeli problémákkal küzdenek, jellemző az elszigetelődés. A súlyos fokú prelingualis halláscsökkenett gyermekek esetén beszédfejlődés egyáltalán nem indul meg, a gyermek megfelelő rehabilitáció nélkül verbális kommunikációra nem lesz képes, a gyermek életminősége jelentősen romlik, mely egész életére kihatással lesz.

A *perilingualis hallássérülés*kor a károsodás a beszédtanulás korai szakaszában következik be. A beszédképesség az addig elért nyelvi szinten stagnál, esetleg visszafejlődik.

A *postlingualis halláscsökkenés* esetén a károsodás a hallópályák érésének beszűkülését követően lép fel. Ez 5-6 éves kor körül következik be. Ezen betegek verbális képessége megmarad, azonban rehabilitáció nélkül artikulációjuk és beszédritmusuk, hangszínük megváltozhat az auditoros kontroll elvesztése következtében.

A halláscsökkenés etiológiája alapján is több csoport különböztethető meg, amelyet az 1. táblázatban foglalunk össze.

1. táblázat: A szenzorineurális halláscsökkenés okai

CMV=cytomegalovirus, SLE=szisztémás lupus erythematosus,

Prenatális	genetikai	szindrómás
		nem-szindrómás
	infektív	CMV-fertőzés
		rubeola
		mumpsz
		herpes zoster
toxoplazmózis		
Perinatális	magzati asphyxia	
	súlyos hyperbilirubinaemia	
	koraszülés	
	erythroblastosis foetalis	
Posztnatális	infekció	
	trauma	
	ototoxikus gyógyszerek	aminoglikozidok
		szalicilátok
kacsdiuretikumok		

		kemoterápiás szerek (ciszplatin, karboplatin)
	zajártalom	
	autoimmun betegségek	SLE poliarteritis nodosa Wegener-granulomatosis

A továbbiakban a genetikai eredetű halláscsökkenésekről lesz részletesen szó.

3.1. A genetikai eredetű halláscsökkenések

Veleszületett halláscsökkenés minden 1000 újszülöttről 1-3 esetben fordul elő (Prevention 2010). Ennek hátterében 50%-ban mutatható ki valamilyen genetikai eltérés. A genetikai eredetű halláscsökkenések harmada ún. szindrómás halláscsökkenés, mely azt jelenti, hogy a hallószerven kívül egyéb szervrendszerek érintettsége is előfordul. Szindrómás halláscsökkenések esetén megkülönböztetünk autoszomális domináns (AD), autoszomális recesszív (AR) és X-kromoszómához kötött (XL) öröklődésű, valamint a mitokondriális DNS mutációi következtében kialakuló multisisztémás mitokondriális kórképeket.

A genetikai eredetű veleszületett halláscsökkenések közel 70%-a nem-szindrómás halláscsökkenés (NSHL). Az újgenerációs szekvenálási technika megjelenésének köszönhetően jelenleg a nem-szindrómás halláscsökkenés hátterében 111 gén és 160 lókuszt ismert, mely szám fokozatosan növekszik (Van Camp G 2018). Az érintett gének mutációi, a hallás fiziológiájában leírt bonyolult élettani folyamatokból következően, érinthetik a citoskeleton, a sejtközötti adhéziós molekulákat, az intracelluláris transzportot, a neurotranszmitter-felszabadulást, valamint a szőrsejt-ionháztartását.

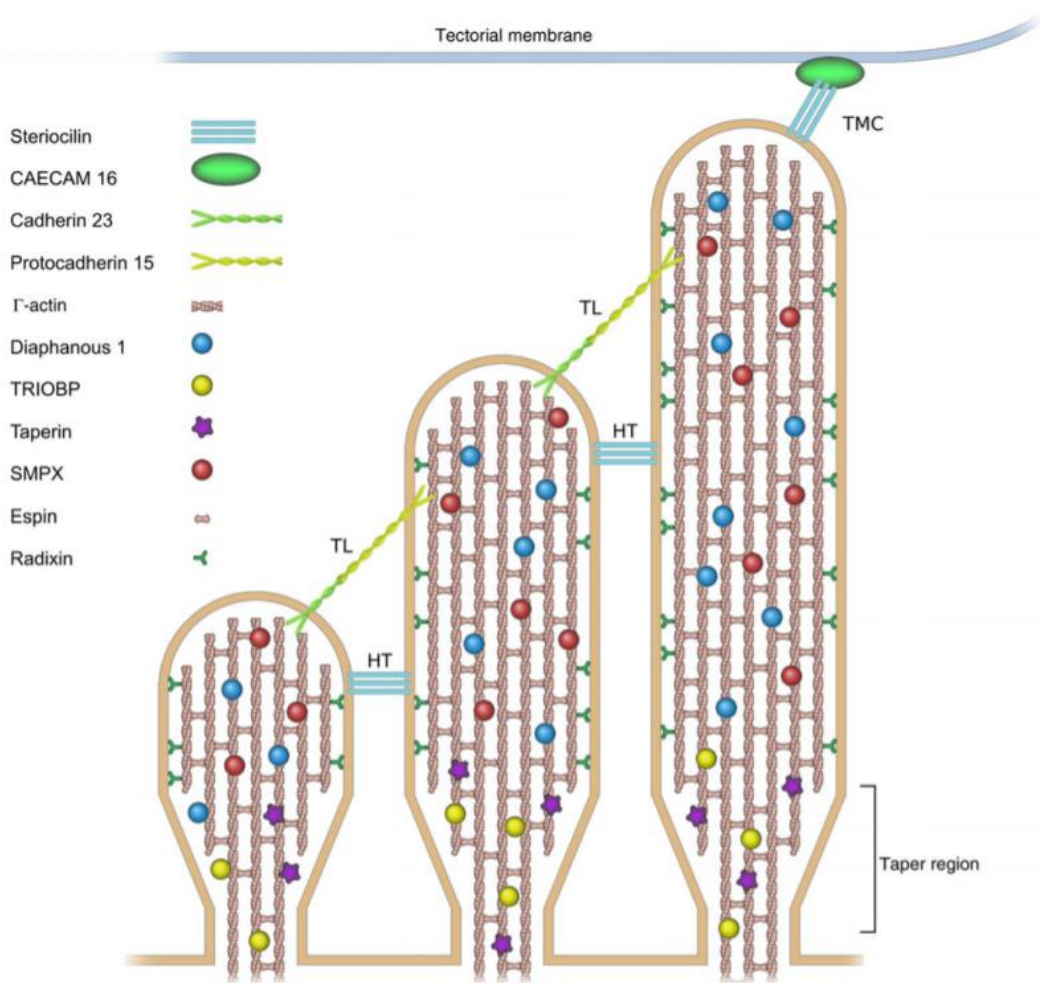
A nem-szindrómás halláscsökkenések 85%-a autoszomális recesszív (AR), 10-15%-a autoszomális domináns (AD), 1%-a X- kromoszómához kötött (XL) öröklődik és 1-2%-a mitokondriális öröklődésűt mutat (Lazar és mtsai 2010).

Az autoszomális recesszív eredetű NSHL legkevesebb 50%-áért a connexin 26 fehérjében bekövetkező változások felelősek (Erbe és mtsai 2004)

3.2.A nem-szindrómás hallásvesztés kialakulásában szerepet játszó gének

A hallás fiziológiájában fontos szerepe van annak, hogy a perilympa és az endolympa ionösszetétele jelentősen különbözik. A perilympa az extracelluláris mátrixhoz hasonlóan magas Na^+ - és alacsony K^+ -tartalmú, míg az endolympa magas K^+ - és alacsony Na^+ -tartalmú. Ezen ionösszetétel fenntartásában különböző ioncsatornáknak és sejtkapcsoló struktúráknak van szerepe. Az endolympa és a perilympa közti határt az ún. tight junction rendszer biztosítja, ez a kapcsolódó sejtek apikális felszínén hoz létre egy barriert, mely ionokra impermeabilis. Így a sejtek apikális felszíne endolympával, míg a basolateralis felszíne a perilymphához hasonló összetételű Corti-lymphával érintkezik. A tight junction kialakításában a claudin 14 (*CLDN14*) és a tricellulin (*MARVELD2*) fehérje játszik szerepet (Wilcox és mtsai 2001; Riazuddin és mtsai 2006). A *TJP2* gén által kódolt tight junction protein 2 az aktin filamentumokhoz köti a tight junction molekulákat. Az endocochlearis potenciál fenntartásában és a kálium-recirkulációban a connexin fehérjéknek (*GJB2*, *GJB6*) van szerepe, melyet részletesen a következő fejezet tárgyal.

A szőrsejtek apikális felszínén lévő microvillusokhoz hasonló sztereocíliumok kialakításában döntő szerepe van a citoskeletális fehérjéknek. A fehérjekötegek V-alakban helyezkednek el. A legjelentősebb fehérje a gamma-aktin, mely folyamatosan polimerizálódik a sztereocílium csúcsi, míg depolimerizálódik annak bazális részén. Az *ACTG1* gén mutációja ezen folyamatot akadályozza (Morell és mtsai 2000). A remodellingben a dyaphanous-1 fehérjének (*DIAPH-1*) van fontos szerepe (Lynch és mtsai 1997), míg a gamma-aktin kötését a sztereocílium bázisához a *TRIOBP* gén szabályozza. A *TRIOBP* génnek több izoformája is ismert, a belsőfülben a *TRIOBP-4* és *TRIOBP-5*-nek van szerepe (Shahin és mtsai 2006). Az aktin filamentumot a radixin (*RDX*) fehérje köti a plazmamembránhoz.



1. ábra: A halláscsökkenésben szerepet játszó, a szőrsejt sztereocíliumában elhelyezkedő főbb strukturális fehérjék.

[forrás: (Stelma és Bhutta 2014)] CAECAM 16= „carciogenic antigen-related cell adhesion molecule 16”; HT= horizontális összekötő molekula, SMPX= small muscle protein TL= tip link, TMC= „tectorial membrane attachment crown”, TRIOBP= trio-binding protein, Taper region= taper régió

A sztereocíliumok tip linkeken keresztül egymáshoz, illetve különböző adhéziós molekulákkal a membrana tectoriához kapcsolódnak. Amennyiben a sztereocíliumcsokor a legmagasabb cílium felé dől, a csúcsi összeköttetések megfeszülnek és a feszültségfüggő ioncsatornákon fokozódik az ionáramlás. A whirlin (*WHRN*) és harmonin (*USH1C*) speciális kötőhelyeikkel többszörös fehérjeaggregátumokat hoznak létre és az ún. ankle-link komplexben van fontos szerepük (Mburu és mtsai 2003; Ouyang

és mtsai 2002). A cadherin 23 (*CDH23*) alkotja a tip linket és a mechanotranszdukcióban van döntő szerepe (Bork és mtsai 2001). A stereocilin (*STRC*) pedig egy extracelluláris fehérje, mely a külső szőrsejt sztereocíliumát kapcsolja a membrana tectoriához. A külső szőrsejt frekvenciaspecifikus depolarizációjakor létrejövő elektromechanikai transzdukciót a prestin (*SLC26A5*) fehérje végzi, mely depolarizációkor összehúzza, míg hiperpolarizációkor megnyúzza a sejtet, ezáltal biztosítva a belsőfül frekvenciaspecificitását és finomhangolását (Liu és mtsai 2003). Mivel a külső szőrsejtek a támasztósejteken keresztül a membrana basilarishoz, a sztereocíliumokkal pedig a membrana tectoriához kapcsolódnak, aktív mozgásukkal pozitív visszacsatolást adnak a rendszernek, így teszik lehetővé az alacsonyabb intenzitású hangok érzékelését.

A sejten belüli transzportban a myosin molekuláknak van szerepe, melyek az aktin filamentumokhoz kötődve ATP felhasználásával képesek mozogni. A myosin karboxil-terminális végén vannak speciális kötőhelyek a transzportálandó fehérjemolekulák számára. A hallásban betöltött funkcióját a *MYO3A*, *MYO6*, *MYO7A*, *MYH14* és *MYO15A* géneknek igazolták (Liu és mtsai 1997; Bai és mtsai 2014; Ahmed és mtsai 2003; Weil és mtsai 1997).

A sejtek repolarizációjáért feszültségfüggő káliumcsatornák felelnek. A külső szőrsejtekben expresszálandó *KCNQ4* felel a repolarizációért és a sejt érzékenységét állítja a környezet hangosságának megfelelően (Kubisch és mtsai 1999). A sejtek apikális és bazolaterális felszínén egyaránt előforduló ATP-függő kalciumcsatorna (*PMCA2*), mely egyrészt a sztereocíliumon keresztül az endolymphába, másrészt a neurotranszmissziókor a bazolaterális membránon belépő kalcium kijuttatásában játszik szerepet. Emellett a sejt homeosztázisában a barrin fehérjének, mely egy kloridcsatorna (*BSND*) és az ioncserélő pendrin fehérjének (*SLC26A4*) van szerepe (Li és mtsai 1998).

A neurotranszmisszióban a neurotranszmittervezikulák és a plazmamembrán fúzióját az otoferlin (*OTOF*) végzi, a VGLUT3 (*SLC17A8*) a glutamát endo- és exocitózisát szabályozza (Yasunaga és mtsai 1999; Ruel és mtsai 2008). Az egyes gének és lókuszek jellemzőit összefoglalva a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: A nem-szindrómás halláscsökkenés hátterében ismert lokuszok és gének jellemzői és funkciója (AR=autoszomális recesszív, AD=autoszomális domináns, ER=endoplazmatikus retikulum, IC=intracelluláris)

Lókuszt	Kromoszóma	Gén	Fehérje	Öröklés menet	Funkció	Ref.
DFNB1A, DFNA3A	13q12	<i>GJB2</i>	Connexin 26	AR, AD	Gap junction	(Kellsell és mtsai 1997)
DFNB1B, DFNA3B	13q12	<i>GJB6</i>	Connexin 30	AR, AD	Gap junction	(del Castillo és mtsai 2002)
DFNB1B, DFNA3B, DFNB2	13q12	<i>GJB6</i> <i>MYO7A</i>	Connexin 30 Myosin VIIa	AR, AD AR, AD	Gap junction IC transzport	(Grifa és mtsai 1999)
	11q13.5					(Liu és mtsai 1997; Weil és mtsai 1997)
DFNA11	11q12.3-q21	<i>MYO7A</i> <i>MYO15A</i>	Myosin VIIa Myosin XVa	AR, AD AR	IC transzport IC transzport	(Weil és mtsai 1997; Liu és mtsai 1997)
DFNB3	17p11.2					
DFNB4	7q31	<i>SLC26A4</i>	Pendrin	AR	Endolympha sav-bázis egyensúly	(Li és mtsai 1998)
DFNB9	2p22-p23	<i>OTOF</i>	Otoferlin	AR	neurotranszmitter felszabadulás	(Yasunaga és mtsai 1999)
DFNB12	10q21-q22	<i>CDH23</i>	Cadherin 23	AR	tip link	(Bork és mtsai 2001)
DFNB18	11p14-15.1	<i>USH1C</i>	Harmonin	AR	ankle-link	(Ouyang és mtsai 2002)
DFNB24	11q23	<i>RDX</i>	Radixin	AR	aktin plazmamembránhoz kötése	(Khan és mtsai 2007)
DFNB28	22q13	<i>TRIOBP</i>	TRIO-binding protein	AR	aktin kötése a sztereocílium bázisához	(Shahin és mtsai 2006)
DFNB29	21q22	<i>CLDN14</i>	Claudin 14	AR	tight junction	(Wilcox és mtsai 2001)

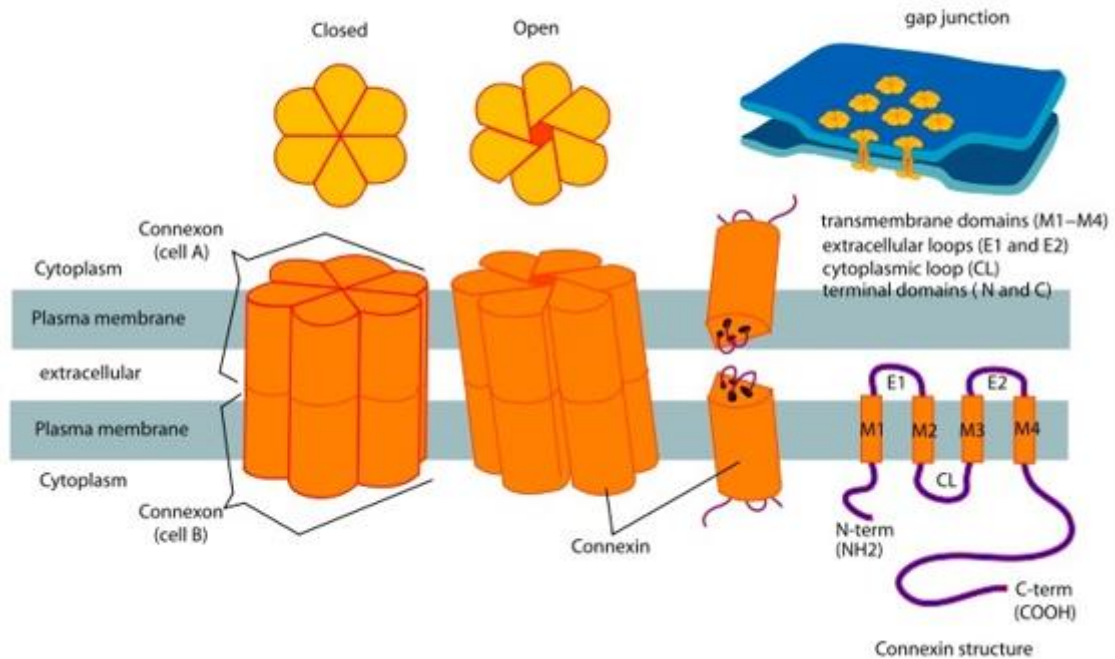
DFNB30	10p11.1	<i>MYO3A</i>	Myosin IIIa	AR	IC transzport	(Walsh és mtsai 2002)
DFNB31	9q32-q34	<i>WHRN</i>	Whirlin	AR	ankle-link	(Mburu és mtsai 2003)
DFNB37 DFNA22	6q13	<i>MYO6</i>	Myosin VI	AR	IC transzport	(Ahmed és mtsai 2003)
DFNB49	5q12.3-q14.1.	<i>MARVELD2</i>	Tricellulin	AR	tight junction	(Riazudin és mtsai 2006)
DFNB61	7q22.1	<i>SLC26A5</i>	Prestin	AR	elektromotilitás	(Liu és mtsai 2003)
DFNA1	5q31	<i>DIAPH1</i>	Diaphonous 1	AD	aktin polimerizáció	(Lynch és mtsai 1997)
DFNA2A	1p34	<i>KCNQ4</i>	KCNQ4	AD	feszültségfüggő K ⁺ -csatorna	(Kubisch és mtsai 1999)
DFNA4	19q13	<i>MYH14</i>	non-muscle myosin heavy chain XIV	AD	IC transzport	(Donaudy és mtsai 2004)
DFNA6/14/38	4p16.3	<i>WFS1</i>	Wolframin	AD	ER Ca ²⁺ homeosztázis	(Bespalova és mtsai 2001)
DFNA20	17q25	<i>ACTG1</i>	Actin	AD	sztereocílium	(Morell és mtsai 2000)
DFNA25	12q21-24	<i>SLC17A8</i>	V-GLUT3	AD	glutamát endo- és excitózis	(Ruel és mtsai 2008)

3.3.A connexin fehérjecsald

A connexin molekulák fehérjealegységek, melyek hexamert alkotva (connexon) hozzájárulnak az egyik legfontosabb intercelluláris kapcsolathoz, a gap junctionhoz. A connexin fehérjék a sejten belül az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi-féle készülékben épülnek fel connexonokká, majd a sejtmembránhoz transzportálódnak, ahová beépülnek. Két sejt között a kapcsolat akkor jön létre, ha mindkét sejtben egymással szembe fordított a fehérje (2. és 3. ábra). Ismert az intracelluláris tér és az extracelluláris tér

között olyan kapcsolat is, mely során csak egy hexamer vesz részt a kapcsolat kialakításában. A gap junction fehérjék ionokra és kis molekulákra, mint például szekunder messengerekre (cAMP, cGMP, ATP) vagy különböző metabolitokra (aminosavak, cukrok) permeábilisek. A permeabilitási határ 1000 Da nagyságrendű.

A connexin fehérjék egy homológ géncsaládhoz tartoznak, amelyet 21 gén alkot (Söhl és Willecke 2004). A fehérjék hasonló szerkezettel bírnak, rendelkeznek egy intracelluláris looppal, négy transzmembrán domainnel és két extracelluláris looppal. A connexin 26 fehérje szerkezetét a 2. és 3. ábra mutatja. Az extracelluláris és a transzmembrán egységek magasan konzervált részek, míg az egyes connexin fehérjék közti különbséget az intracelluláris loop és a karboxil-terminális régió variabilitása adja (Dbouk és mtsai 2009).



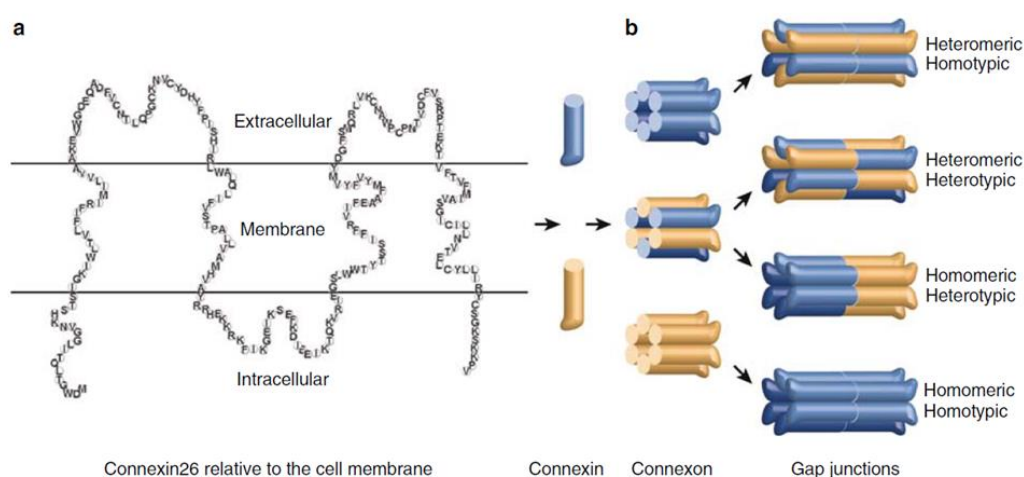
2. ábra: A connexin fehérjék felépítése és elhelyezkedése a plazmamembránban

[forrás: (Proteopedia 2018)]

A connexin fehérje 4 transzmembrán egységgel (transmembrane domain), két extracelluláris looppal és egy intracelluláris looppal rendelkezik (jobb lent). Hat connexin fehérje alkot egy connexont, két sejt között (cell A és cell B) két connexon hozza létre a réskapcsolatot (bal lent). A zárt (closed) és nyitott (open) konformáció biztosítja a kommunikációt (bal fent). Egy sejtben több connexon expresszálódik és alkotja a gap junctiont (jobb fent).

Angol magyarázat: cytoplasm=citoplazma, Plasma membrane= plazma membrán, extracellular= extracelluláris, N-term= N'-terminális, C-term= C'-terminális

A connexonok sokféleképpen kapcsolódhatnak egymáshoz: homomerekusan, heteromerekusan, homotípiásan vagy heterotípiásan. A homomerekus kapcsolódás esetén a connexont egyféle connexin fehérje, heteromerekus kapcsolódás esetén többféle connexin fehérje alkotja. Homotípiás kapcsolódás esetén a két kapcsolódó connexon megegyező, míg a heterotípiás kapcsolódás esetén a két kapcsolódó connexon eltérő szerkezetű (Meşe, Richard, és White 2007). A fentiek alapján a connexin proteinek ezen kapcsolódási módja rendkívül sok variációt eredményezhet, amely mind funkcionálisan mind a szabályozásban betöltött szerepükben széles spektrumot szolgáltat.



3.ábra: A connexin 26 fehérje szerkezete (a) és a gap junction felépítése (b)

[forrás: (Meşe, Richard, és White 2007)]

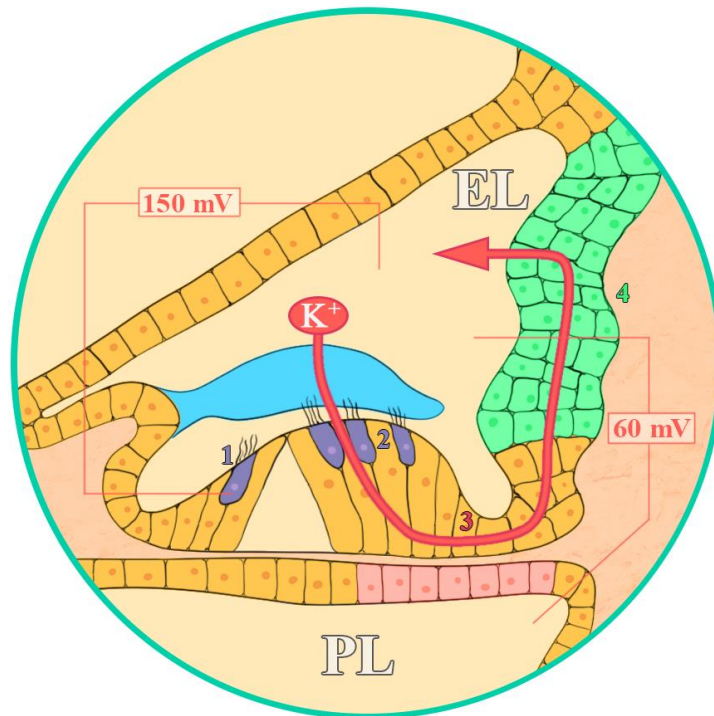
Angol magyarázat: heteromeric=heteromerikus, homomeric=homomerikus,
heterotypic=heterotípiás, homotypic=homotípiás

A connexin fehérjéket kódoló gének mutációi több betegség patomechanizmusában is központi szerepet játszanak. Így például a szindrómás halláscsökkenések közül a keratitis-ichtyosis-deafness szindrómában (KID) (Lee és White 2009), a Vohwinkel-szindrómában (Dippold és mtsai 2013), a nem-szindrómás halláscsökkenésekben, a congenitalis cataractában (Burdon és mtsai 2004), az oculodentodigitalis dysplasiában (Doshi és mtsai 2016; Orosz és mtsai 2018) vagy a Charcot-Marie-Tooth-betegségben (Bergoffen és mtsai 1993).

3.4. A connexinek szerepe a hallásban

Mint a hallás fiziológiájánál is utaltam rá, a mechanoelektromos transzdukcióban alapvető fontosságú a K^+ -ion. Az endocochlearis potenciál, mely az endolympha magas K^+ -koncentrációjából következik, az a hajtóerő, amely a szőrsejtek depolarizációjáért felelős. A szőrsejtek és az endolympha közötti közel 150 mV-os potenciálkülönbség hatására áramlanak a K^+ -ionok az endolymphából az intracelluláris tér irányába, amely a szőrsejtek depolarizációját idézi elő. Az utóbbi időben elfogadottá vált az álláspont, hogy az intracelluláris térből a K^+ -ion a perilympha irányába áramlik tovább, majd a perilymphából visszacirkulál az endolymphába (Martínez és mtsai 2009) (4. ábra). Ebben a folyamatban a cochlea laterális falának van döntő szerepe, mely két fontos syncytialis

kompartimentból áll. Az egyik a ligamentum spirale, mely az úgynevezett kötőszöveti gap junction hálózatot alkotja. Ez fibrocytákból és a stria vascularis epithelsejtjeiből áll. A másik az epithelialis gap junction hálózat, mely a membrana basilaris epithelialis és támasztósejtjeit tartalmazza. Ezen két gap junction rendszer alapvető fontosságú a K^+ -cirkulációban.



4. ábra: A kálium recirkulációja a Corti-szervben. (saját ábra)

A kálium az endolymphából a szőrsejteken (1, 2) át a perilympa irányába áramlik, majd az epithelialis gap junction (3) és a cochlea laterális falában elhelyezkedő gap junction (4) rendszeren jut vissza az endolymphába. A folyamat hajtóereje a közel 150 mV-os endocochlearis potenciál.

Mindkét syncitiumban különböző connexin fehérjék expresszálódnak. Többek között a connexin 26, connexin 30, connexin 31 és connexin 34. A K^+ -recirkuláció folyamata során a szőrsejtekből a repolarizáció során a bazális membrán feszültségfüggő K^+ -csatornáin, illetve Ca^{2+} -aktivált K^+ -csatornáin át távozik a K^+ a perilympa irányába. Itt a támasztósejtek veszik fel, majd az epithelialis gap junction hálózaton keresztül jut el a K^+ a kötőszöveti gap junction rendszerhez. Mivel a két syncitium független egymástól,

ezért először a K^+ ismét a perilymphába kerül, ahonnan a kötőszöveti gap junction hálózat fibrocytái aktív transzporttal veszik fel. A fibrocytákból a kötőszöveti gap junction hálózaton keresztül jut el a stria vascularis epithelsejtjeihez, ahonnan egy K^+ -csatornán keresztül ismét az endolymphába jut, ezzel biztosítva az endolymph magas K^+ -koncentrációját (Martínez és mtsai 2009).

Ezen folyamatból is látszik, hogy a gap junction rendszernek alapvető szerepe van az endolymph magas K^+ -koncentrációjának biztosításában. Amennyiben a recirkulációban bárhol probléma lép fel, az endolymph K^+ -koncentrációja csökken és ezzel egyidőben csökken az endocochlearis potenciál, ami hallásromlást eredményez. A halláscsökkenésben elsősorban a connexin 26 fehérjét kódoló *GJB2* génben bekövetkező mutációknak tulajdonítanak nagy jelentőséget.

3.5.A *GJB2* mutációi

A *GJB2* gén a 13-as kromoszóma hosszú karján a 13.11 kromoszomális régióban helyezkedik el (13q12.11). Mutációi az autoszomális recesszív öröklődésmentű halláscsökkenések mintegy 50%-áért felelnek (Angeli 2008; Castro és mtsai 2013). Néhány tanulmány feltételezi autoszomális domináns halláscsökkenés hátterében is ezen gén eltéréseit (Snoeckx és mtsai 2005; Tekin és mtsai 2001; Ballana E 2018).

Az európai populációban a leggyakrabban előforduló mutáció a c.35delG (p.G12Vfs). A normál populációban a c.35delG mutáció frekvenciája Keletről Nyugat felé csökken, emellett egy észak-déli növekedés is megfigyelhető. Míg Észak-Európában 1:78 (1,2%), úgy Dél-Európában 1:35 (2,8%) a mutáció előfordulási gyakorisága (Gasparini és mtsai 2000). Korábbi tanulmányok alapján Magyarországon 0,6% és 2,4% között van a c.35delG-karrierstátusz (Bors és mtsai 2004; Tóth és mtsai 2004).

A c.35delG a gén 35-ös pozíciójában egy guanin kiesése következtében okoz frameshift-mutációt. A kereteltolódás következtében a fehérjeszintézis translációs lépése során, a connexin 26 fehérje tizenkettedik aminosavjának olvasása közben lép fel a hiba, ami a fehérjelánc korai terminációját okozza (D'Andrea és mtsai 2002). A korai termináció következtében a makromolekula nem jelenik meg a sejtmembránban, így az intercelluláris kapcsolat nem jön létre. HeLa sejteken c.35delG mutációt tartalmazó

plazmid transzfekciót követően a connexin 26 protein sem a membránban sem a citoplazmában nem volt kimutatható (D'Andrea és mtsai 2002).

A c.35delG mutáció fenotípusos megjelenése attól függ, hogy az egyén homozigóta vagy a *GJB2* gén egyéb mutációval társulva compound heterozigóta formában hordozza-e a kérdéses allélt. A homozigóta esetek döntő többségében elmondható, hogy szimmetrikus, súlyos fokú halláscsökkenésben nyilvánul meg (Gasparini és mtsai 2000; Murgia és mtsai 1999). A compound heterozigóta esetekben, azaz amikor két allélen két eltérő patogén mutáció fordul elő, az ép hallásúak és a súlyos halláscsökkenés között mozog a spektrum, és a progresszió tekintetében sem lehet egyértelműen állást foglalni. A heterozigóta genotípus, tekintettel a nagyobb arányban autoszomális recesszív öröklésmentet igazoló tanulmányokra, halláscsökkenést nem okoz.

A *GJB2* egyéb mutációi közül a leggyakoribb eltérések jelentőségét részletezzük. A c.71G>A (p. W24X) nonsense mutációt szintén magas előfordulási gyakoriság jellemzi. Ez a mutáció a közép- és dél-európai populációban, valamint Indiában a leggyakoribb *GJB2* mutációk között szerepel (Lazar és mtsai 2010; Alvarez és mtsai 2005; Joseph és Rasool 2009; RamShankar és mtsai 2003). A magyar populációban 0,1%, míg a magyar roma populációban 0,8% a mutáció hordozási gyakorisága (Sipeky és mtsai 2014). A mutáció következménye a nukleotid szekvenciában egy stopkodon beépülése, amely a fehérje 24-es pozíciójában triptofán beépülése helyett a fehérje láncterminációját okozza.

A c.101T>C (p.M34T) mutáció, mely során egy metionin cserélődik treoninra, a fehérje egyik transzmembrán doménjét érinti, a következménye a csatorna permeabilitásának megváltozása (D'Andrea és mtsai 2002; Oshima és mtsai 2003; Bicego és mtsai 2006). A p.M34T mutációt főként autoszomális recesszív öröklődésmentettel, homozigóta és compound heterozigóta formában a kismértékű perceptoros halláscsökkenés hátterében írták le (Löppönen és mtsai 2012; Pollak és mtsai 2007; Houseman és mtsai 2001). A p.M34T mutáció az egészséges populációban 0,08%-ban, míg az egészséges európai populációban 1,15%-ban fordul elő (ExAc Database), így mivel a mutáció a népesség több mint 1%-át érinti, egyes közlemények polimorfizmusnak minősítik.

Hasonlóan az előzőhöz, a c.269T>C (p.L90P) mutáció is, egy leucin-prolin csere következtében, a transzmembrán doménben idéz elő változást, amely a csatorna teljes

funkcióvesztésével jár. Ezen mutációt kis-, illetve közepes fokú hallásvesztés háttérben írták le (Cama és mtsai 2009).

A c.109G>A (p.V37I) mutáció, mely egy valin-izoleucin csere. Ezt kezdetben szintén csak polimorfizmusként írták le, azonban több vizsgálat is bebizonyította, hogy homozigóta formában vagy más mutációval társulva compound heterozigóta formában patogén hatással rendelkezik (Cryns és mtsai 2004; Snoeckx és mtsai 2005; Sansović és mtsai 2009; Kim és mtsai 2013).

A p.W24X, p.L90P, p.V37I mutációk enyhétől súlyos fokig terjedő halláscsökkenést okozhatnak, attól függően, hogy azok homozigóta vagy compound heterozigóta formában fordulnak elő.

3.6. Mitokondriális eredetű halláscsökkenések

A mitokondrium az eukarióta sejtek legfontosabb energiatermelő egységei. Az endoszimbionta elmélet alapján, az evolúció során az ősi prokarióta bíborbaktérium fagocitózissal jutott be a sejtbe, majd az eukarióta sejt számára hasznos tulajdonságai miatt nem bontotta azt le, hanem szimbiózist alakítottak ki egymással (Margulis 1975). A mitokondrium egy kettős membránnal határolt sejtszervecske, mely legfontosabb feladata a sejt ATP-termelése. A prokarióta genomhoz hasonló cirkuláris DNS-sel rendelkezik, amely csupán 37 fehérjét kódol. A mitokondriális fehérjék egy jelentős része a nukleáris genomban kódolt. Ezek alapján belátható, hogy a mitokondriális eredetű halláscsökkenések vagy a mitokondriális genom vagy a nukleárisan kódolt mitokondriális fehérjék károsodása miatt alakulhatnak ki.

3.6.1. A mitokondriális genom károsodása

Az emberi sejtekben lévő mitokondriumok cirkuláris DNS-sel rendelkeznek, melyek egy nehéz és egy könnyű láncból állnak. A mitokondriális DNS (mtDNS) két rRNS-t, 13 fehérjét és 22 tRNS-t kódol. A kódolt fehérjék a respirációs komplexekben (komplex I, III, IV, V) helyezkednek el. Bármely gén károsodása az oxidatív foszforiláció valamely lépését gátolhatja. A mitokondriális genom jellemzője, hogy csak maternális úton öröklődik (Shoubridge 2000). Jellemzően szövetenként és sejtenként az mtDNS

mutációinak aránya változhat, így egy sejtben mutáns és normál DNS-tartalmú mitokondriumok is előfordulhatnak egyszerre (heteroplazmia), míg a sejtosztódás során szegregálódhatnak úgy, hogy egy sejtben belül vagy csak normál vagy csak mutáns mitokondriumok találhatók (homoplazmia) (Mishra és Chan 2014). A klinikai tünetek megjelenéséhez a mutáns mtDNS arányának egy küszöböt el kell érnie (küszöb hatás). Ennek eredményeképpen egy családon belül előforduló betegség klinikai megjelenése széles spektrumon mozoghat. A mitokondriális repair-mechanizmusok az eukarióta sejtéhez viszonyítva kevésbé aktívak, így kimutatták, hogy az élet előrehaladtával a mtDNS-ben bekövekező oxidatív károsodások által létrejött mutációk felhalmozódnak (Wallace és mtsai 1987). Ezen mutációk a kor előrehaladtával jelentős szerepet játszhatnak különböző betegségekben fellépő sejtpusztulásban, mint például a Parkinson-kór (Grünewald és mtsai 2016), az Alzheimer-kór (Sheng és mtsai 2012) vagy a Huntington-chorea (Kim és mtsai 2010) patogenezisében, illetve az atherosclerosis (Sazonova és mtsai 2017) kialakulásában.

3.6.2. Nukleáris genom károsodása

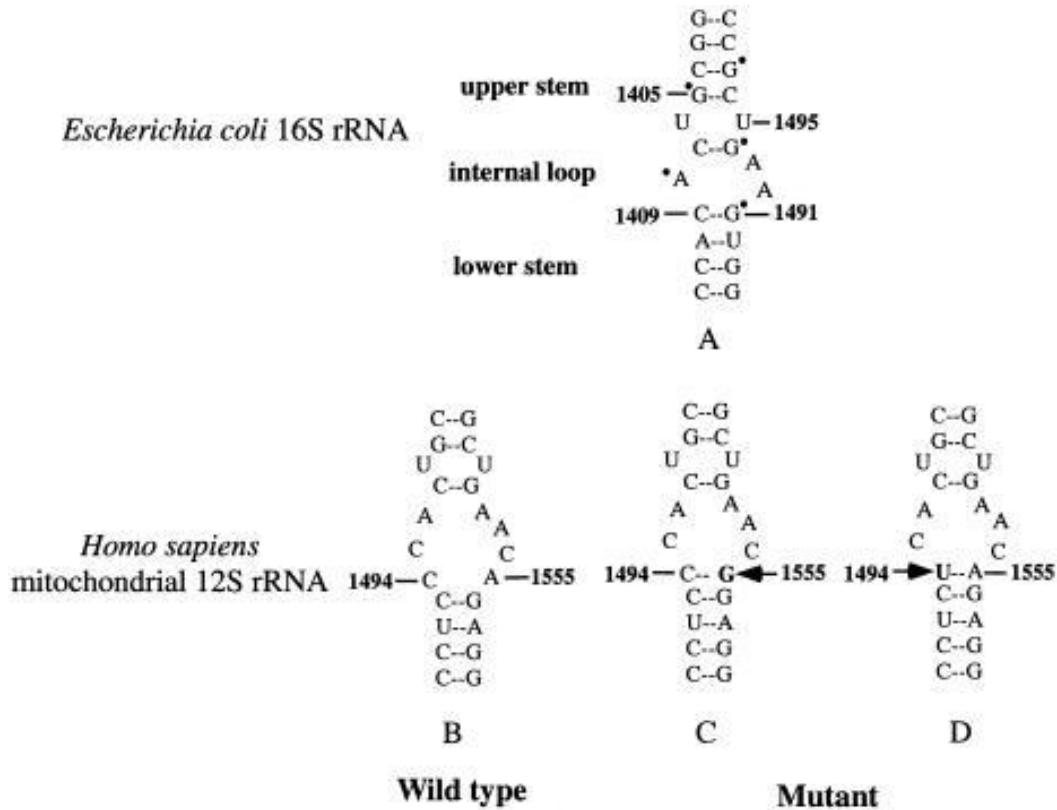
A mitokondrium működésében szerepet játszó fehérjék egy része a nukleáris genomban kódolt és megfelelő transzportmechanizmus útján jut el a mitokondriumba. Bár a nukleáris genom eredetű mitokondriális betegségek ritkák, mégis szerepet játszhatnak halláscsökkenés kialakulásában, elsősorban egyéb szervrendszerek érintettségével együttesen, szindrómás formákban. Így például az *OPA1* gén különböző mutációi halláscsökkenést, opticus neuropathiát, myopathiát okozhatnak (OMIM). A *GFER* gén mutációi myopathiát, fejlődési elmaradást, illetve congenitalis cataractát okozhatnak a halláscsökkenés mellett (OMIM).

3.6.3. Aminoglikozid indukálta halláscsökkenés

Az aminoglikozidokat 1944-ben fedezték fel Schatz és munkatársai, aki *Streptomyces grisei*-ből izolálta az első képviselőjét, a streptomycint (Schatz, Bugie, és Waksman 2005). Az aminoglikozidok baktericid hatású antibiotikumok, melyek a prokarióta sejtbe jutva a fehérjeszintézis során a 16S riboszómához kötődve a fehérje láncterminációját idézik elő. Szűk spektrumú antibiotikum lévén elsősorban a Gram-negatív *Pseudomonas*, *Salmonella* és *Enterobacter* törzsek által okozott fertőzésekben használatosak. Jó

hatásfokúak *Mycobacterium tuberculosis* esetén is (Richard H Drew 2017). Kiemelt fontosságú, hogy perinatális intenzív centrumokban szepszis megelőzésére rutinszerűen alkalmazott gyógyszerek. Mellékhatásaik közül kiemelendő súlyos vesekárosító, ototoxikus és vesztibulotoxikus hatásuk, melyek jelentősen korlátozzák mindennapi használatukat.

Ototoxikus hatásuk több mechanizmussal jön létre. Elsősorban az aminoglikozidok a külső szőrsejtek apikális felszínén elhelyezkedő tip linkek nem-specifikus kationcsatornáin keresztül jutnak a sejtbe (Marcotti, van Netten, és Kros 2005). A szőrsejtekben található mitokondriális 12S riboszómális RNS (rRNS) „A” (aminoacyl) kötőhelye egy konzervált nukleotidszakasz, mely egyéb prokariótákéval nagyon hasonló szekvenciát mutat. Kiemelt szereppel bír az *MT-RNR-1* gén 1555-ös pozíciójában elhelyezkedő adenin és 1494-es pozícióban elhelyezkedő citozin, mely bázisok egymással szemben foglalnak helyet, azonban kötés nem alakul ki közöttük (5. ábra, B). Prezant munkacsoportja kimutatta, hogy a 12S rRNS A régiójában bekövetkező 1555 A>G nukleotid szubsztitúció az aminoglikozid indukálta halláscsökkenésben jelentős szereppel bír (Prezant és mtsai 1993). Zhao és munkatársai az 1494 C>T szubsztitúció szerepét igazolta (Zhao és mtsai 2004). Ezen mutációk azt eredményezik, hogy az rRNS szekvenciájában új A-U illetve G-C kötés alakul ki ezen pozícióban és az rRNS konformációváltozáson megy keresztül (Qian és Guan 2009) (5. ábra, C és D). A mitokondriális rRNS a prokarióta *E. coli* 16S rRNS szekvenciájával megegyező lesz (5. ábra, A), mely az intracellularisan bejutott aminoglikozid molekula erősebb kötődését okozza, az rRNS zártabb struktúrát vesz fel, mely alapvetően befolyásolja a fehérjeszintézis translációs lépését és ún. „misreading” és „mistranslating” következik be (Hobbie és mtsai 2008). Tanulmányok kimutatták, hogy az A1555G mutációt hordozó betegek klinikai tünetei az ép hallástól a progresszív, közepes fokú halláscsökkenésen át a sükettségig terjedhetnek. Ennek hátterében mai napig nem teljesen tisztázott mechanizmusok állhatnak, de valószínűleg fontos szereppel bírnak a nukleáris genom reguláló faktorai (Salomão, Ayo, és Della-Rosa 2013).



5. ábra: Az *E. coli* 16S mtRNS (A) és a humán mitokondriális 12S RNS vad (B) és mutáns (C, D) szerkezete

[forrás: (Zhao és mtsai 2004)]

A humán vad típus esetén a 1494 és 1555 régió között kötés nem alakul ki (B), míg az A1555G (C) és a C1494U (D) esetén új kötés alakul ki ebben a pozícióban (nyíllal jelölve a beépült új bázis). Ezen pozíciókban kialakult kötések miatt a szerkezet az *E. coli* 16S RNS-éhez válik hasonlónak, mely lehetővé teszi az aminoglikozidok kötődését a humán riboszómális RNS-hez

rRNA=rRNS, Wild type=vad típus, Mutant=mutáns, Upper stem=felső törzs, Lower stem=alsó törzs, Internal loop=belső hajlat

Az aminoglikozidok kumulatív dózisától függően legelőször a bazálisan elhelyezkedő külső szőrsejtek károsodnak, a dózis emelkedésével a belső szőrsejtekben, majd az apikális külső szőrsejtekben is apoptózis indul meg (Forge és Schacht 2000). Emellett a belső szőrsejtek és az afferens idegrostok közti szinaptikus kapcsolat is (Dallos és Harris 1978; Oishi és mtsai 2015), valamint a spirális ganglion sejtjei is károsodnak (Kitahara, Li, és Balaban 2005). Ezen mechanizmusok együttesen járulnak hozzá a szenzorineurális

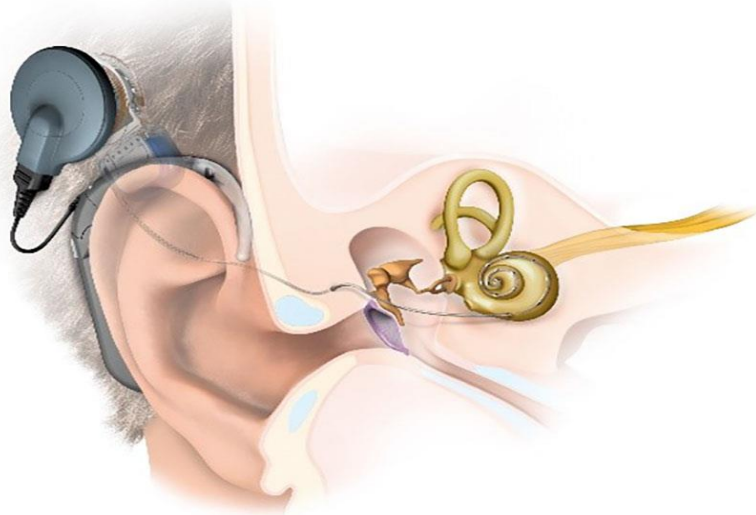
halláscsökkenés kialakulásához. Ahogy a patomechanizmusból logikusan következik, rövid ideig alkalmazott antibiózis a magas frekvenciákat érintő (elsősorban a 16-18 kHz tartományban) percepciós halláscsökkenést okoz. Az antibiotikummal kezelt betegek közel 20 %-ában alakul ki halláscsökkenés (Forge és Schacht 2000). Az A1555G nem-szindrómás halláscsökkenett betegek között a különböző populációkban eltérő gyakorisággal fordul elő. Ázsiában magasabb (2,3-5,4%), míg a kaukázusi populációban alacsonyabb rátával (0,8-2,5%).

3.7. Halláscsökkenések rehabilitációs lehetőségei

Halláscsökkenés rehabilitációjára a halláscsökkenés típusától és súlyossági fokától függően van lehetőségünk.

Vezetékes halláscsökkenés esetén gyógyszeres, műtéti, eszközös rehabilitációra, illetve ezek kombinációjára van lehetőség. Szenzorineurális halláscsökkenés esetén az eszközös és műtéti rehabilitáció áll előtérben. Hallókészülékkel történő ellátásra akkor van szükség, ha a küszöbaudiometriai vizsgálatokon a beszédfrekvenciák (500, 1000, 2000 és 4000 Hz) átlaga eléri, vagy meghaladja a 20 dB-t. Kisfokú halláscsökkenés (20-40 dB) esetén a beteg döntése, hogy a halláscsökkenés mennyire zavarja a kommunikációban, igényel-e hallókészülékes rehabilitációt. Legalább közepes fokú (40-60 dB) halláscsökkenés esetén a beteg hallókészülékes ellátása javasolható. A konvencionális hallókészülék alapja a hangerősítés. A technológia fejlődésével nagyon jó eredményeket lehet elérni a rehabilitáció tekintetében, azonban nagy-, illetve súlyos fokú percepciós halláscsökkenésben a hagyományos hallókészülék már nem mindig biztosítja a megfelelő beszédértést. Nagy-, illetve súlyos fokú halláscsökkenés esetén a legeredményesebb rehabilitációs eszköz a cochlearis implantátum (Ostojic és mtsai 2011).

A cochlearis implantátum egy műtéttel beültethető készülék, mely két egységből áll (6. ábra). A belső egység elektródája a belsőfül csiga részében helyezkedik el. Külső egysége a fül mögött a bőrön keresztül mágnessel rögzül a belső egységhez. A külső egység mikrofonnal fogja fel a külvilágból érkező hangokat, a beszédprocesszor részével azokat megfelelő rádiófrekvenciás jelekké alakítja át és a belső egységhez juttatja, ahol azok elektromos jelekké alakulnak. Az elektromos jelek a cochleába bevezetett elektródán keresztül a hallóideget közvetlenül ingerlik, így biztosítva a hallást.



6. ábra: A cochlearis implantátum felépítése.

A külső egység fülre akasztható részén helyezkedik el a beszédprocesszor és a mikrofon, a belső egységhez a bőrön keresztül mágnessel rögzül. A belső egység elektródája a csigába vezetve a n. cochlearis afferens rostjait közvetlenül ingerli. (Az ábrát a MedEl cég hozzájárulásával publikáljuk)

Az első cochlearis implantációt Prof. Dr. Ribári Ottó végezte Magyarországon a Semmelweis Egyetemen 1985-ben. Azóta a technika fejlődésével a készülékek is rohamos fejlődésen mentek keresztül. A kezdetben extracochlearisan, a promontoriumra helyezett elektródákat intracochlearis elektródák váltották fel, a külső egység fülre akasztható része szintén korszerűsödött és a piacon már megtalálhatóak a gomb formátumú külső egységek, melyek egy készülékben tartalmazzák a processzort, a mikrofont és a mágnest is. Az elektróda bevezetésének széles körben alkalmazott két útja a posterior tympanotomia és a suprameatalis behatolás (suprameatal approach, SMA). Klinikánkon mindkét műtéti technikát alkalmazzuk, az utóbbi módszert kisebb módosítással végezzük, melyet közleményben is ismertettünk (Répassy és mtsai 2018). Fontos megemlíteni az elterjedt ún. „soft surgery” technikát is, mely azt jelenti, hogy az elektróda bevezetését a lehető legnagyobb óvatossággal kell elvégezni, hogy a cochleában elhelyezkedő sejtek károsodását a minimumra csökkentsük és a beteg maradványhallása megmaradjon. Ez az esetleges jövőbeni génterápia szempontjából lehet fontos (ld. következő fejezet).

A cochlearis implantáció műtéti indikációs köre fokozatosan bővült. A készülék bevezetésekor csak a postlingualis eredetű halláscsökkenéssel rendelkező felnőtt betegek kaptak implantátumot, majd a prelingualis halláscsökkenett felnőtt betegek. Tekintettel arra, hogy a hallópályák ezekben az esetekben évtizedekig nem kaptak hangingert, nem alakultak ki a megfelelő neuronális kapcsolatok és csak hangokat tudtak beazonosítani a készülékkel, beszédértés azonban nem volt. Később elindult a prelingualis gyermekek implantációja is. Az eredmények azt igazolták, hogy prelingualis súlyos fokú halláscsökkenés esetén mihamarabbi életkorban szükséges az implantáció elvégzése. Teljes (re)habilitáció a 3 éves korig megtörtént implantációtól várható (Sharma és Campbell 2011). A hallópályák fejlődésének beszűkülését követően, mely kb. 6 éves korra tehető, a cochlearis implantátumtól beszédértés már nem várható, szurdopedagógiai rehabilitáció nélkül a gyermek maximum pár szavas szókinccsel fog rendelkezni. Amennyiben a halláscsökkenés postlingualisan alakult ki, úgy a beszédértés cochlearis implantációval visszaállítható (Ostojic és mtsai 2011).

Az indikációs kör bővülésének köszönhetően ma már prelingualis, postlingualis, egy- vagy kétoldali, nagy-, illetve súlyos fokú perceptoros halláscsökkenés esetén is alkalmazható az eljárás (MedScape 2016). A minél fiatalabb korban elvégzett implantáció, illetve az időskori teljes szenzorineurális hallásvesztés rehabilitációjának igénye két fokozott kockázatú betegcsoportot eredményezett.

A korai rehabilitációt zászlajára tűző fülbészek az akár 6-8 hónapos korban elvégzett bilaterális implantációt is javasolják. Ezeknél a műtéteknél a kis testsúly miatt az aneszteziológiai nehézségek előtérbe kerülnek, továbbá a posztoperatív szakban is jelentős megterhelés vár a betegekre. A közvetlen műtét utáni időszak szoros obszervációt igényel, egyes esetekben akár a gyermek intenzív osztályos megfigyelése is szükségessé válhat.

A postlingualis betegek esetén az implantáció sebészi szempontból biztonságos eljárásnak minősül (Cosetti and Lalwani 2015). Kontraindikációt jelenthet a magas aneszteziológiai kockázat. Válogatott esetekben, idős betegeken helyi érzéstelenítésben is elvégezhető a cochlearis implantáció, így biztosítva a beszédértést és a halláscsökkenésből származó szociális izoláció elkerülését (Kecskeméti és mtsai 2019).

3.8. Génterápiás lehetőségek a halláscsökkenésekben

A genetikai eredet feltérképezése nem csak a betegségek eredetének igazolása végett fontos, hanem az utóbbi időben rohamszerűen fejlődő génterápiás lehetőségek miatt a terápia szempontjából is döntő lehet a jövőben. Az eredményes génterápia feltétele, hogy a betegség monogénes öröklésmenetet kövessen. A transzgént vektor segítségével be kell juttatni a célsejtbe, ahol funkcionáló fehérjének kell expresszálnia róla, mely megakadályozza a betegség progresszióját vagy akár a betegség visszafordulását eredményezi. Fontos, hogy a célsejtbe bejuttatott DNS ne legyen toxikus, ne degradálódjon, lehetőség szerint a génállományba beépüljön és onnan tudjon folyamatosan expresszálni.

A génterápia több szempont miatt is ígéretes lehetőségként szerepel a halláscsökkenések jövőbeni kezelésében. Egyrészt a nem-szindrómás halláscsökkenések döntő többsége monogénes öröklésmenetet mutat. Másrészt viszonylag egyszerű állatmodelleken jól tanulmányozható a bevitt gének hallásra gyakorolt hatása, a kutatók elsősorban egérmodelleket alkalmaznak, de egyes kutatóközpontokban már főemlősökön is zajlanak vizsgálatok. A vektorok közül az adeno-asszociált vírusvektor (AAV) tűnik optimálisnak. Az AAV egy replikációban gátolt vírus, mely szubtypustól függően receptorokon jut be a szőrsejtbe vagy a neuronokba. A belső szőrsejt nagyobb mértékben veszik fel a külső szőrsejtkehez képest. Előnyös tulajdonsága, hogy a célsejt génállományába beépül, mely a transzgén tartós expresszióját eredményezi (Xia, Yin, és Wang 2012). Az AAV humán megbetegedésekben, illetve fertőzésekben nem játszik szerepet és ototoxikus mellékhatása sincs (Praetorius és mtsai 2009), mely miatt ideális vektor lehet a halláscsökkenések génterápiájában.

A vektor bejuttatására is több beviteli mód áll a rendelkezésre: a kerek ablak membránján át diffúzióval, kerek ablak membrán-injekció, illetve a cochleostoma, melynél a cochlea bazális kanyarulatán ejtünk egy nyílást és azon át injektáljuk be a vírusvektort. Ez utóbbi kettő tűnik a legeredményesebbnek (Kesser és Lalwani 2009).

Állatkísérletekben már több gén expresszióját sikerült igazolni, többek között a *GJB2*, a *VGLUT3*, az *USH1C* esetében. Ezek mellett a legnagyobb eredmény, hogy 2014-ben az Egyesült Államok „Food and Drug Administration” (FDA) engedélyével humán klinikai kísérlet indult az *ATOH-1* bejuttatására, mely szerzett halláscsökkenésben a szőrsejtke

regenerációját segítheti elő (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02132130>). Bár az út hosszú, de a halláscsökkenések kezelésében az első humán génterápiás próbálkozások megkezdődtek.

4. Célkitűzések

Célul tűztük ki a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikáján, valamint a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében megjelent betegek közül válogatott betegcsoportokban:

1) Felmérni a 18 év alatti, súlyos fokú percepciós halláscsökkenéssel rendelkező, cochlearis implantáción átesett betegek között a halláscsökkenést magyarázó etiológiai tényezők előfordulási gyakoriságát

2) Felmérni a *GJB2* gén mutációinak előfordulási gyakoriságát nem-szindrómás, szenzorineurális halláscsökkenett betegekben és egészséges, ép hallású kontroll csoportban

3) Vizsgálni az egyes *GJB2* génben előforduló mutációk és a halláscsökkenés mértéke és időbeli alakulása közti összefüggéseket, illetve választ kapni arra, hogy az egyszerű heterozigóta mutációk önmagukban okozhatnak-e percepciós halláscsökkenést

4) A *GJB2* egyszerű heterozigóta, valamint *GJB2* negatív, családi halmozódást mutató halláscsökkenésben szenvedő betegek további genetikai vizsgálata új generációs szekvenálással egyéb, patogén génmutációk feltérképezése céljából

5) Felmérni a mitokondriális 1555 A>G és 1494 C>T mutációk előfordulási gyakoriságát nem-szindrómás halláscsökkenett és neurológiai defícittel rendelkező, de ép hallású betegek körében

6) A továbbiakban iránymutatást adni, hogy mely betegcsoportokban érdemes a jelenleg elérhető genetikai vizsgálatokat elvégezni és vajon szükséges-e rutinszerűen a mitokondriális genom vizsgálata aminoglikozid antibiotikum adása előtt.

5. Módszerek

5.1. Betegkiválasztás:

Vizsgálataink a SE Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, valamint a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében 2012 és 2018 között megjelent betegein történtek. A molekuláris genetikai vizsgálatokat a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében végeztük, a szelektált családok újgenerációs szekvenálás vizsgálatait a Würzburgi Egyetem Institute of Human Genetics (Würzburg, Németország) intézetben kollaboráció keretei között zajlottak, a vizsgálatokat Barbara Vona végezte. Minden vizsgálatban résztvevő személy a kaukázusi betegpopulációba tartozott. A genetikai vizsgálatok részletes tájékoztatást követően, diagnosztikai cézzal, írásos beleegyezés mellett történtek.

5.1.1. Cochlearis implantáción átesett betegcsoport

A súlyos fokú percepcióss halláscsökkenés etiológiai tényezőinek előfordulását a műtét időpontjában 18 év alatti, a SE Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikán cochlearis implantáción átesett betegein vizsgáltuk. A vizsgálatba 2013 januárja és 2018 júniusa között egy- vagy kétoldali implantáción átesett gyermekeket vontunk be. Az adatokat retrospektív módon elemeztük. A betegcsoportba 89 beteget (44 fiú, 45 leány) vontunk be, átlagéletkoruk $5,03 \pm 3,41$ életév volt.

5.1.2. *GJB2* betegcsoport

A *GJB2* vizsgálatához olyan betegeket választottunk ki, akik sporadikus vagy familiáris, nem-szindrómás, uni- vagy bilaterális szenzineurális halláscsökkenésben (HCS) szenvedtek. A vizsgálatba 239 (146 nő, 93 férfi) halláscsökkenett beteget vontunk be (átlagéletkor $28,87 \pm 19,56$ életév [CI 95% 26,38-31,36 év]). A szindrómás halláscsökkenéssel illetve az esetleges egyéb, nem genetikai eredetű halláscsökkenéssel (pl. Ménière-betegség, zajártalom, gyógyszer indukálta HCS, fejlődési rendellenesség stb.) rendelkezőket a vizsgálatunkból kizártuk, ezzel biztosítva a betegcsoport homogenitását. Életkorbeli kikötést a vizsgálatba vonáskor ebben a betegcsoportban nem tettünk. A kontroll csoporthoz a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében

történt teljes exom szekvenáláson átesett egészséges kontroll és halláscsökkenéssel nem rendelkező betegeit vettük (160 beteg).

A vizsgálatok eredményétől függően a *GJB2* negatív, illetve egyszeres heterozigóta esetei közül azokat a betegeket, ahol családi halmozódás volt megfigyelhető, de a *GJB2* vizsgálat eredményével ez nem volt magyarázható, további genetikai vizsgálatoknak vetettük alá. Öt család esetében a családok index személyeit a würzburgi Institute of Human Genetics intézettel kooperációban újgenerációs szekvenálással (next generation sequencing=NGS) továbbvizsgáltuk.

5.1.3. A mitokondriális betegcsoport

A mitokondriális A1555G és C1494T génmutáció vizsgálatához 269 (156 nő, 113 férfi) nem-szindrómás percepció halláscsökkenésben szenvedő beteget választottunk ki. Kontrollcsoportnak 128 halláscsökkenéssel nem rendelkező, a Genomikai Medicina Intézetben egyéb neurológiai betegség miatt vizsgált személyt választottunk. A mitokondriális betegcsoportnál mind a halláscsökkenést, mind a kontroll csoportban külön hangsúlyt fektettünk az aminoglikozid-expozíció meglétére és regisztrálására. Az anamnézisben szerepelt aminoglikozid típusát, dózisát és az expozíció hosszát is rögzítettük.

5.2. Audiológiai vizsgáló módszerek

Az összes halláscsökkenéssel rendelkező betegünk részletes anamnéziszfelvételen esett át, különös hangsúlyt fektetve a halláscsökkenés kezdetére, időbeli alakulására, családi halmozódásra (egyenesági rokonság körében), illetve egyéb, esetleges szindrómás eredetet felvető társbetegségek meglétére (szív-érrendszeri, szemészeti, belgyógyászati betegségek). Gyermekkorai halláscsökkenés esetén a születéssel kapcsolatos események (gesztációs idő, perinatális betegségek, gyógyszeres kezelések) is regisztrálásra kerültek. Fül-orr-gégészeti fizikális vizsgálatot végeztünk. A hallásvizsgálatot minden esetben tympanometria előzte meg (GSI TympStar készülék). Amennyiben a tympanogram kóros volt, úgy a további kivizsgálás előtt konzervatív vagy műtéti úton rendeztük a dobüregi nyomásviszonyokat. Ép dobüregi nyomás esetén a halláscsökkenést tisztahang-küszöbaudiometriával (pure tone audiometry, PTA), illetve objektív hallásvizsgálati módszerekkel - agytörzsi kiváltott válasz vizsgálatok (BERA), Auditory Steady State

Response (ASSR), otoakusztikus emisszió (OAE), stapediusreflex-vizsgálat – igazoltuk. A beteg életkorától és kooperációs készségétől függően beszédaudiometriai vizsgálat is történt. A tympanometriát és a stapediusreflex-vizsgálatot a GSI TymStar készülékkel, a BERA és ASSR vizsgálatokat az Interacoustics Eclipse és GSI Audera, az OAE vizsgálatokat az Interacoustics Titan készülékkel végeztük.

Tisztahang küszöbaudiometriánál tiszta szinuszos hangot adtunk a 125-8000 Hz-es tartományban. Adott frekvencián 3 azonos jelzés esetén regisztráltuk a decibel (dB) értéket. Amennyiben adott frekvencián a beteg hallást nem jelzett, úgy az audiometer mérési határát figyelembe véve 120 dB-t regisztráltunk.

A BERA és ASSR vizsgálatokat zajmentes csendesszobában, fekvő testhelyzetben, felnőtteknél éber, de nyugodt állapotban, gyermekeknél spontán alvásban vagy rövid altatásban végeztük el. BERA vizsgálat során különböző hangerősséggel (max. 105 dB) vizsgáltuk a kiváltott válaszban az V-ös hullám megjelenését, az V-ös hullám latenciaidejét, illetve az interpeak latenciaidőket. Amennyiben a latenciaidő alapján retrocochlearis lézió felmerült, úgy koponya-MR vizsgálatot végeztünk annak kizárása céljából. A BERA eredményeket az ASSR vizsgálattal együtt értékeltük. Az ASSR során amennyiben kiváltott választ a gép nem mutatott ki, úgy 120 dB-t regisztráltunk.

A halláscsökkenés mértékét a módosított Goodman-klasszifikáció alapján állapítottuk meg (Clark 1981). A *GJB2* halláscsökkenett betegeket további 7 alcsoportra osztottuk az 500, 1000, 2000 és 4000 Hz-en mért küszöb értékek átlaga ($PTA_{400-4000}$) és a jobban halló fül alapján a következők szerint: kismértékű (25-40 dB), közepes fokú (41-55 dB), közepesen nagyfokú (56-70 dB), nagyfokú (71-90 dB) és súlyos fokú (> 90 dB), valamint egyoldali és aszimmetrikus csoportra. Aszimmetrikus halláscsökkenésről beszéltünk, ha a két fül közötti átlag 10 dB-nél vagy ha 2 frekvencián mért érték között 15 dB-nél nagyobb különbség adódott. Egyoldali halláscsökkenés esetén csak az egyik fül volt érintett.

5.3. Genetikai vizsgálómódszerek

5.3.1. DNS-izolálás

A vizsgálatokhoz a DNS-t vérből, izomszövetből és vizelet laphámsejtéből izoláltuk a QIAamp DNA blood kit és QIAGEN DNA Tissue kitek segítségével a gyártó (QIAGEN, Hilden, Németország) utasításai alapján. A DNS-koncentrációt UV spektrofotométer segítségével 260 nm abszorbanciánál mértük. A tisztasági fokot a 260 nm-es és a 280 nm-es abszorbancia értékek hányadosával határoztuk meg.

5.3.2. A *GJB2* gén szekvenálása

A *GJB2* teljes kódoló szakaszát Sanger-féle szekvenálással határoztuk meg. A DNS-szekvenálás során egy adott nukleotidszakasz nukleotidsorrendjét határozzuk meg. A Sanger-féle szekvenálás során a DNS-ben található normál deoxinukleotidok mellett dideoxinukleotidokat (ddNTP) használunk, melyek abban különböznek a normál nukleotidoktól (dNTP), hogy a 3' régióban hidroxilcsoport helyett egy hidrogénatom kapcsolódik. Ezen dideoxinukleotidok ugyan beépülnek a DNS szintézis során az adott szálba, azonban nem teszik lehetővé további nukleotidok beépülését, és így láncterminációt okoznak.

A szekvenálás során a vizsgálandó DNS-szakaszt arra specifikus primerekkel PCR technikával amplifikáltuk. A kapott termék tisztítását Sure Clean Plus kit (BIOLINE) segítségével végeztük el. A tisztított PCR-termékhez 1 unit 3.1. Big Dye Terminator enzimet adtunk (Life Technology), valamint ugyanennyi térfogat Big Dye puffert, amely a fluoreszcensen jelölt dideoxi-nukleotidokat is tartalmazta. A szekvenáló reakciót forward és reverz primerekkel bidirekcionálisan végeztük el (Kiegészítő táblázatok: 1. táblázat). A szekvenáló reakció programja a következő (3. táblázat):

3. táblázat: A GJB2 vizsgálat során az amplifikáció PCR programja

<i>Lépés</i>	<i>Hőfok</i>	<i>Idő</i>
1. denaturáció	95 °C	2 perc
2. denaturáció	95 °C	30 másodperc
3. anelláció	50 °C	15 másodperc
4. szintézis	60 °C	4 perc
Vissza a 2. lépésre, 25x ismétlés		
5. végső szintézis	72 °C	7 perc

A PCR elvégzése után a termékek tisztítását X-terminátor kit (Life Technology) segítségével végeztük el. A kérdéses régió szekvenálása ABI Prism 3500 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA) felhasználásával történt. A kapott szekvenciákat manuálisan elemeztük, majd az NCBI Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) segítségével a humán referenciagenom nukleotidsorrendjével (ENST00000382848.4; NM_004004) hasonlítottuk össze.

A kontroll csoportban a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében elvégzett teljes exom szekvenáláson átesett, halláscsökkenéssel nem rendelkező kontroll csoportot használtuk. A teljes exom szekvenálás két lépésben történt. A DNS-könyvtárat TruSeq® DNA Sample Prep Kit v2-Set A (Illumina) és NimbleGen SeqCap EZ Human Exome Library v3.0 capture kit (Roche) segítségével végeztük. A könyvtárat Q30 standard alapján szűrtük le. A 95 bázispár hosszú fragmenteket (reads) a humán referenciagenommal hasonlítottuk össze (hg38). A futásból származó fájlok feldolgozása a Burrow-Wheeler Aligner (BWA) szoftver felhasználásával történt. A variánsok kiválogatásánál csak a *GJB2* eltérésekre fókuszáltunk.

5.3.3. Teljes exom szekvenálás

Családi halmozódást mutató halláscsökkenetek esetén, amennyiben a *GJB2* szekvenanciaanalízise során homozigóta vagy compound heterozigóta genotípus nem igazolódott, de felmerült genetikai eredet lehetősége, kollaboráció keretein belül teljes

exom szekvenálásra (whole exome sequencing=WES) volt lehetőségünk. Amennyiben valamely vizsgált génben eltérés igazolódott, úgy Sanger-szekvenálással validálták a kapott eredményt, valamint az elsőfokú rokonok rendelkezésre álló DNS-mintájából szegregációvizsgálat történt a mutáció eredetének igazolása céljából. A WES vizsgálat során a szűrésre használt gének listáját, valamint a Sanger-féle szekvenálás során használt primereket és szekvenciájukat a „Kiegészítő táblázatok fejezetben” a 2. táblázat mutatja.

A könyvtárkészítés TruSeq Rapid Exome Kit és Nextera DNA Exome Kit felhasználásával történt a gyártó által előírt protokoll alapján (Illumina TruSeq Rapid Exome Library Prep, Illumina Nextera DNA Exome Library Prep). A szekvenálás Illumina NextSeq500 platformon történt. (Illumina 2017). A kapott szekvenciákat egy referencia szekvenciához hasonlítottuk (Genombild hg19/GRCh37), majd az adatokat Variant Calling program felhasználásával elemeztük ki, a referenciaszekvenciától eltérő bázissorrendet GensearchNGS valamint inHouse-Pipeline program segítségével analizáltuk.

A talált variánsok patogénitását Alamut® Visual program segítségével vizsgáltuk. Patogénnek ismertük el, amennyiben legalább kettő szoftver (SIFT, MutationTaster, PolyPhen-2) patogénnek mutatta, valamint ha a populációs allélfrekvencia alacsonynak mutatkozott. Emellett, ha autoszomális recesszív mutációnál a populációs adatbázisokban található homozigóta előfordulás, domináns eseteknél pedig a heterozigóta hordozás jelen volt, az a benignus eltérést támasztotta alá.

5.3.4. Mitokondriális mutációk kimutatása

A mitokondriális genomot vérből, vizeletből, illetve izomszövetből izoláltuk a 4.3.1. fejezetben leírt DNS-izolálási technikával megegyező módon.

A mitokondriális mutációk kimutatásához a restrikciós fragment hosszpolimorfizmus (PCR-RFLP) technikát alkalmaztuk. A vizsgálat lényege, hogy adott génszakaszt PCR technikával amplifikálunk, majd a kapott szakaszt restrikciós enzimekkel fragmentáljuk. A restrikciós enzimes család specifikus szekvenciákat felismerő fehérjék, melyek ha felismerik az adott bázissorrendet, annak mentén hasítják a DNS-szálat különböző hosszúságú DNS-fragmenteket eredményezve. A különböző nagyságú DNS-molekulákat gélelektroforézis segítségével tudjuk kimutatni.

A PCR reakciók során a program lépéseit a 4. táblázatban ismertetjük.

4.táblázat: A mitokondriális genom vizsgálata során alkalmazott PCR programja

<i>Lépés</i>	<i>Hőfok</i>	<i>Idő</i>
PCR		
1. denaturáció	94 °C	5 min
2. denaturáció	94 °C	30 sec
3. anelláció	60 °C	30 sec
4. szintézis	72 °C	30 sec
Vissza a 2. lépésre, 35x ismétlés		
5. végső szintézis	72 °C	7 min
RFLP		
6. emésztés	37 °C	3 óra

A PCR-terméket TAE pufferrel hígított 2%-os agaróz gélen futtattuk meg, majd etídium-bromiddal vizualizáltuk, a band-ek nagyságát és a heteroplazmiát Quantity One (BIO-RAD) és ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg.

Az általunk vizsgált mitokondriális mutációk kimutatására a PCR-terméket 3 órán keresztül 37 °C-on BslI restriktív, valamint BsmAI (A1555G) és HphI (C1494T) endonukleázzal emésztettük (1 unit/reakció). A restriktív mintázatot 4%-os agaróz gélen futtattuk és az előzőekben leírtakkal megegyezően értékeltük.

5.4. *In silico* és statisztikai vizsgálmódszerek

In silico analízishez a mutáció következtében fellépő fehérjeváltozást és evolúciós konzerváltságot predikációs szoftverek felhasználásával értékeltük [PolyPhen2 (Adzhubei és mtsai 2010), MutationTaster (Schwarz és mtsai 2014), SIFT (Kumar, Henikoff, és Ng 2009)].

A kapott score-okból a következőképp következtettünk a patogenitásra: PolyPhen2 esetén 1-hez közeli score érték, SIFT esetén 0-hoz közelítő score érték jelenti a mutáció patogén hatását. A MutationTaster esetében a „disease causing” (DC, „betegség okozó”) megjelölés jelenti a patogén hatást.

A talált mutációkat a Human Genome Mutation Database (HGMD) (Stenson és mtsai (2003)), a „The Connexin-deafness homepage” (Ballana E 2018), a „Hereditary Hearing Loss Homepage” (Van Camp G 2018), NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) (Exome Variant Server 02 2018), ClinVar (ClinVar 2019), dbGAP (dbGAP 2018), dbSNP (dbSNP 2018), Iranome (Iranome 2018), Deafness Variation Database (DVD 2019) adatbázisaival vetettük össze. A frekvencia analízishez az Exome Aggregation Consortium (ExAC) adatbázist (Exome Aggregation Consortium 2017), az 1000Genome program (1000Genome 2018) és a GenomID projektek adatait használtuk. A kapott variánsok kategorizálásánál az American College of Medical Genetics (ACMG) guideline alapján jártunk el (Richards és mtsai 2015).

Az adatok statisztikai elemzését normalitás vizsgálatokat követően Shapiro-Wilk teszttel, egyutas (egyszempontos – one way) ANOVA teszttel, illetve khi-négyzet-próbával végeztük. A szignifikanciaszintet 95%-nak választottuk, a p érték $<0,05$. A 95%-os konfidenciaintervallumot (CI 95%) standard formulával számoltuk.

6. Eredmények

6.1. Cochlearis implantáción átesett betegcsoport

2013. január és 2018. június között 89 (44 fiú, 45 leány), 18 év alatti beteget rehabilitáltunk cochlearis implantátummal. A gyermekek átlagéletkora a műtét időpontjában $5,05 \pm 3,28$ életév (CI95% 4,7-5,4 év) volt. Prelingualis veleszületett halláscsökkenés miatt 6 éves korig 71 gyermek részesült műtéti rehabilitációban, átlagéletkor $3,7 \pm 1,42$ életév (CI95% 3,6-4,04 év) volt. Postlingualis implantációt, azaz olyan esetben, amikor a halláscsökkenés a beszédtanulás után alakult ki, 18 gyermeknél végeztünk. A postlingualis cochlearis implantációt 6 gyermeknél progresszív halláscsökkenést, 2 gyermeknél akut halláscsökkenést követően végeztük el. Tíz veleszületett halláscsökkenésben szenvedő gyermeknél késői diagnózis miatt a 6. életév betöltése után történt az implantáció. A postlingualis implantáción átesett gyermekek átlagéletkora $10,38 \pm 3,1$ életév (CI95% 9,65-11,11 év) volt. A 89 betegből 13 gyermek volt koraszülött.

Ötvenhat esetben (62,9%) tudtuk kimutatni a halláscsökkenés okát (7.ábra). Legnagyobb arányban a genetikai eredetű halláscsökkenések igazolódtak. Ötvennyolc gyermeknél végeztük el a *GJB2* gén szekvenenciaanalízisét, mely során 27 gyermeknél (47,3%) igazolódtott a *GJB2* génben patogén mutáció. A *GJB2* c.35delG mutációja homozigóta formában 19 esetben volt jelen, 1 esetben W24X homozigóta, 3 betegnél [c.35delG/W24X] compound heterozigóta és 1 esetben [c.35delG/c.-23+1G>A] compound heterozigóta mutáció igazolódtott. Három betegnél a c.35delG heterozigóta mutációja mellé a *GJB2* egyéb patogén eltérése nem társult. A további 31 beteg esetében a *GJB2* szekvenenciaanalízise patogén mutációt nem talált. A c.35delG allélfrekvenciája 38,8% a vizsgált mintában.

Fejlődési rendellenesség 2 esetben fordult elő, mindkét betegnél a cochlea morfológiai rendellenessége magyarázta a halláscsökkenést.

Infekciós eredet 9 esetben valószínűsíthető. Három esetben meningoencephalitis kapcsán (1 gyermeknél varicella-zoster-vírus volt kimutatható) alakult ki halláscsökkenés. Négy esetben CMV-fertőzést igazoltak, valamint 1 gyermeknél feltételezhetően intrauterin

herpes simplex vírus-fertőzés kapcsán alakult ki a halláscsökkenés. Egy gyermeknél kanyaró elleni védőoltás után detektálták a halláscsökkenést.

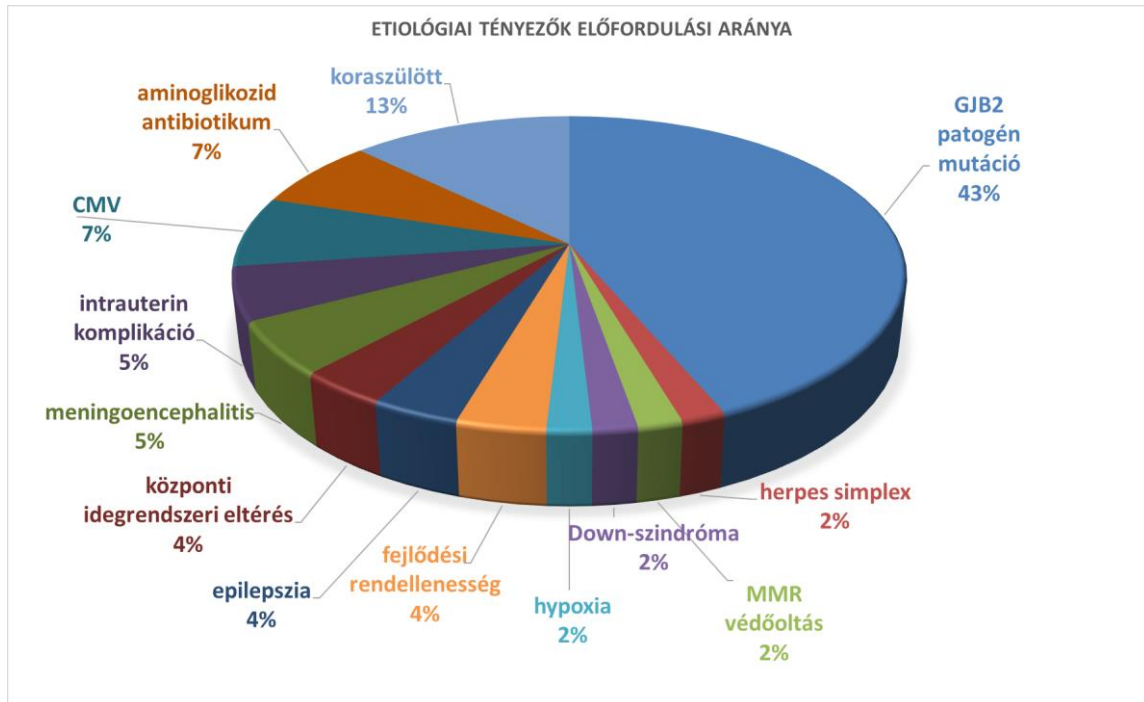
Ototoxikus antibiotikum adása kapcsán fellépő halláscsökkenés 4 gyermek esetében fordult elő. Újszülöttkori hypoxia 1 esetben, intrauterin komplikáció (foeto-foetalis transzfúzió, terhességi toxaemia) 3 esetben fordult elő. Két gyermeknél súlyos fokú epilepsziához, 1 gyermeknél Down-szindrómához társuló súlyos fokú halláscsökkenést diagnosztizáltunk.

A 13 koraszülött gyermekből 7 esetben önmagában a születés idejével magyarázható a halláscsökkenés. Négy koraszülött esetében multifaktoriális eredet igazolódott (5. táblázat).

5. táblázat: Multifaktoriális eredetű halláscsökkenéssel rendelkező koraszülött betegeink

Beteg	Etiológia	Gesztációs idő (hét)
1	foeto-foetalis transzfúzió	33.
2	ototoxikus antibiotikum	33.
3	ototoxikus antibiotikum	33.
4	ototoxikus antibiotikum	31.

Harminchárom betegnél a jelenleg elérhető vizsgálatokkal etiológiai tényezőt nem tudtunk azonosítani. Az etiológiai tényezők előfordulási arányát a 7. ábrán mutatjuk be.



7.ábra: Az etiológiai tényezők előfordulási aránya a beteganyagunkban.

(Kecskeméti és mtsai 2019)

Legnagyobb arányban a GJB2 gén patogén mutációi fordulnak elő. (Az idiopátiás eseteket nem ábráztuk) Rövidítések: CMV= cytomegalovirus fertőzés;

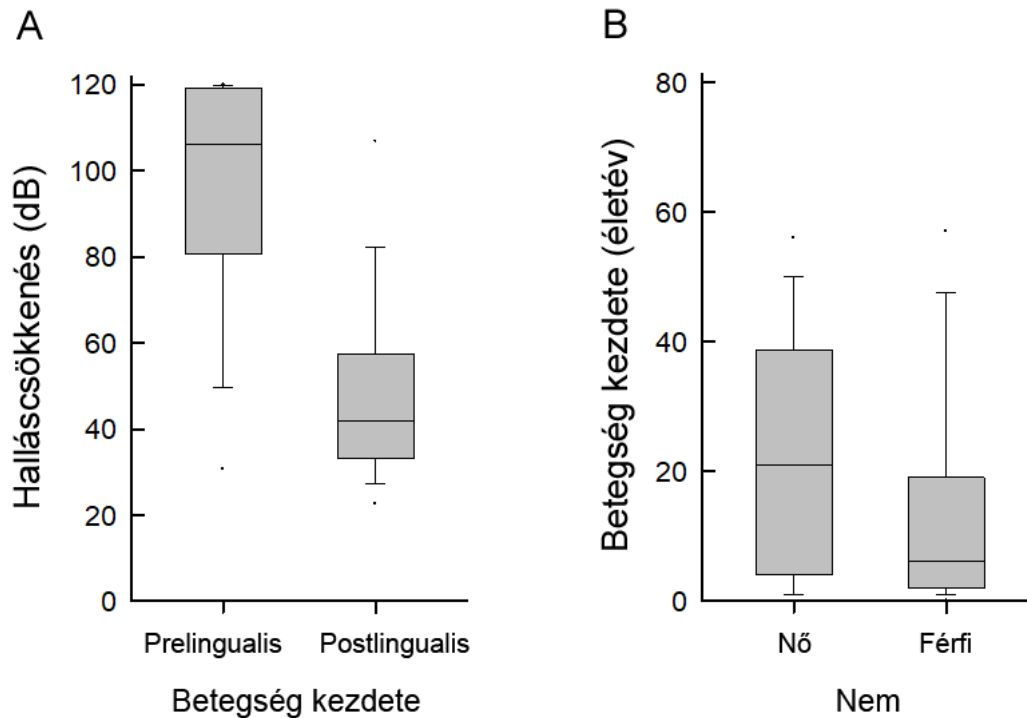
MMR= mumpsz-morbilli-rubeola

6.2. A GJB2 betegcsoport

6.2.1. Audiológiai eredmények

Az audiometriai eredményeink alapján 239 nem-szindrómás halláscsökkenett betegünk között 199 kétoldali és 40 egyoldali halláscsökkenésben szenvedett. Súlyossági fok alapján 46 kis-, 27 közepes, 15 közepesen nagy-, 5 nagy- és 63 súlyos fokú, valamint 43 aszimmetrikus halláscsökkenett beteget vizsgáltunk. A betegség újszülöttkor és 75 éves kor között lett diagnosztizálva (átlagos betegség kezdet $19,28 \pm 18,63$ életév (CI95% 16,91-21,66 év). Kilencvenhárom esetben (38,9%) prelingualis és 146 esetben (61,1%) postlingualis halláscsökkenés igazolódott. A halláscsökkenés mértékét tekintve szignifikánsan súlyosabb halláskárosodás igazolódott a prelingualis kezdetű esetekben

(Kruskal-Wallis one-way ANOVA, $p < 0,001$) (8A. ábra). Emellett a nemek között is szignifikáns különbség (Mann-Whitney-teszt, $p = 0,001$) igazolódott a halláscsökkenés kezdetét tekintve, a férfiakban minden genotípus-alcsoportban fiatalabb életkorban kezdődött a betegség (8B ábra).



8.ábra: A halláscsökkenés súlyossága a kialakulás idejének függvényében (A), valamint a kialakulás időpontja a nemek függvényében (B) (Kecskeméti és mtsai 2018).

A prelingualis halláscsökkenés szignifikánsan súlyosabb fokú (A), A férfiakban szignifikánsan fiatalabb életkorban kezdődik a betegség (B)

6.2.2. A *GJB2* gén mutációanalízise

Vizsgálataink során az NSHL csoportban a *GJB2* génben 53 betegnél (22,1%-a a betegeknek) 10 különböző patogén mutációt találtunk. A vizsgált betegeink között a *GJB2* patogén mutációs allélfrekvencia 16,12%, míg a kontroll csoportban 3,12%. A leggyakrabban előforduló eltérésnek a c.35delG (p.12Vfs) (rs80338939) mutáció igazolódott, amely 20 esetben homozigóta (8,3%), 7 esetben egyéb mutációkkal társulva

compound heterozigóta (2 [c.35delG/W24X], 2 [c.35delG/c.313del14], 1 [c.35delG/L90P], 1 [c.35delG/Q80P], 1 [c.35delG/ c.-23+1 G>A]) (2,9%) és 13 esetben egyszeres heterozigóta (5,4%) formában igazolódott. További 2 betegnél (0,8%) c.109G>A (p.V37I) (rs72474224) és c.139G>T (p.E47X) (rs104894398) mutációk compound heterozigóta formában, valamint 11 esetben (4,6%) a c.71G>A (p.W24X; rs104894396), c.269T>C (p.L90P; rs80338945), c.101T>C (p.M34T; rs35887622), c.439G>A (p.E147K; rs767178508), c.109G>A (p.V37I; rs72474224) mutációk egyszeres heterozigóta formában voltak jelen (6. és 7. táblázat). A c.35delG mutáció allélfrekvenciája 12,55% (Kecskeméti és mtsai 2018).

A kontroll csoportban 8 egyszeres heterozigóta c.35delG (p.G12Vfs) (rs80338939) és 2 egyszeres heterozigóta M34T (c.101T>C) (rs35887622) mutációt találtunk. A kontroll csoportban az allélfrekvenciák a következőképpen alakultak: a c.35delG 2,5%, míg az M34T 0,62%. A halláscsökkenést és a kontroll csoportot összevetve szignifikáns különbség adódott a c.35delG előfordulása tekintetében (khi-négyzet próba, $p < 0,05$), míg az M34T tekintetében szignifikáns különbség nem igazolódott (khi-négyzet próba, $p = 0,773$).

Az *in silico* analízisek során a kohortunkban igazolódott mutációk az ACMG guideline alapján a valószínű patogén („likely pathogenic”), illetve patogén („pathogenic”) csoportokba tartoznak (6. táblázat).

6. táblázat A beteganyagunkban előforduló GJB2 mutációk és azok predikciós értékei (Kecskeméti és mtsai 2018)

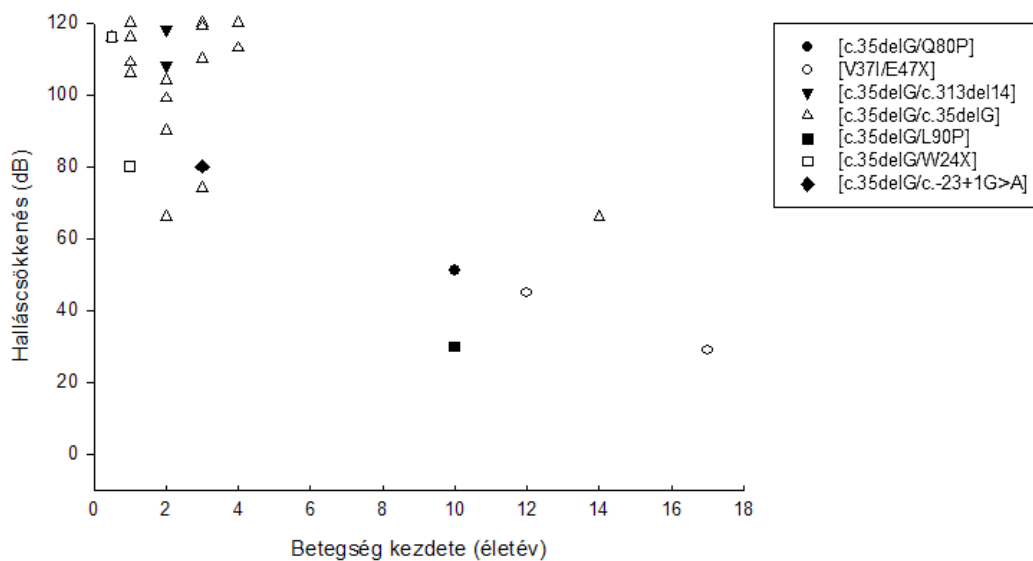
DC= kór okozó (disease causing), path=patogén, l.path= valószínű patogén („likely pathogenic”), Ho= homozigóta, He=heterozigóta,

rs=referencia

Nukleotid változás	Protein változás	In silico predikciós értékek				Kontroll		Referencia	
		Polyphen2	Mutation Taster	SIFT	ACMG	ExAc	Esetszám A.Fr. (%)		ok száma (A.Fr. %)
c.-23+1G>A			path			1 (0 Ho/1He) 0.21%	0.0	rs80338940	(Green és mtsai 1999)
c.35delG	p.G12Vfs		path	0.0060		40 (20 Ho/ 20 He) 12.55%	8 (0 Ho/ 8 He) 2.5%	rs80338939	(Zelante és mtsai 1997)
c.71G>A:	p.W24X	DC	path	0.00057	0	4 (0 Ho/4 He) 0.84%	0.0	rs104894396	(Kelsell és mtsai 1997)
c.101T>C	p.M34T	DC	path	0.012	0	4 (0 Ho/4 He) 0.84%	2 (0 Ho/2 He) 0.62%	rs35887622	(Feldmann és mtsai 2004)
c.109G>A	p.V37I	DC	1. path	0.0065	0.03	3 (0 Ho/3 He) 0.63%	0.0	rs72474224	(Kelley és mtsai 1998)
c.139G>T	p.E47X	DC	path	0.00018	0	2 (0 Ho/2 He) 0.42%	0.0	rs104894398	(Denoyelle és mtsai 1997)
c.239A>C	p.Q80P	DC	1. path	0.000008	0	1 (0 Ho/1 He) 0.21%	0.0	rs727504302	(Snoeckx és mtsai 2005)
c.269T>C	p.L90P	DC	path	0.0015	0	4 (0 Ho/4 He) 0.84%	0.0	rs80338945	(Murgia és mtsai 1999)
c.313-326del14	p.K105Gfs		path	0.0001		2 (0 Ho/2 He) 0.42%	0.0	rs111033253	(Kelley és mtsai 1998)
c.439G>A	p.E147K	DC	path	0.000008	0	1 (0 Ho/1 He) 0.21%	0.0	rs767178508	(Frei és mtsai 2004)

6.2.3. Genotípus-fenotípus korreláció

A nem-szindrómás halláscsökkenet betegcsoportban a c.35delG homozigóta mutációval rendelkező betegeink a többi genotípussal összehasonlítva szignifikánsan súlyosabb fokú és hamarabb kezdődő halláscsökkenésben szenvedtek (Kruskal-Wallis one-way ANOVA, $p < 0,01$). A c.35delG homozigóta betegeink döntő többsége a nagyfokú-súlyos fokú halláscsökkenet csoportba tartoztak és a halláscsökkenés 5 éves kor előtt kezdődött (9. ábra). Két betegünknek a halláscsökkenés prelingualis kezdetű, közepesen nagy-, illetve nagyfokúnak bizonyult, azonban később a betegség súlyos fokú, süketiséggel határos halláscsökkenésig fokozódott. Egy esetben találtunk postlingualis, közepesen nagyfokú halláscsökkenést, mely szintén progressziót mutatott, és évek alatt súlyos fokú halláscsökkenés alakult ki.

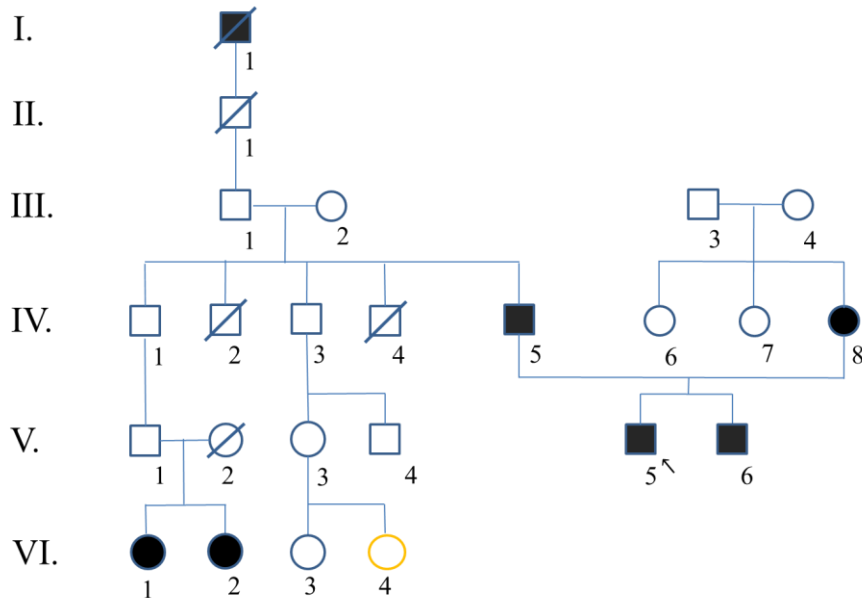


9.ábra: A homozigóta és compound heterozigóta genotípus hatása a betegség kezdetére és a halláscsökkenés mértékére (Kecskeméti és mtsai 2018)

A kilenc compound heterozigóta beteg közül 4 esetben (2 [c.35delG/W24X], 2 [c.35delG/c.313del14]) prelingualis kezdetű, súlyos fokú halláscsökkenés igazolódott. Míg 4 betegnél ([c.35delG/L90P], [c.35delG/Q80P], 2 [V37I/E47X]) postlingualis kezdetű kis-, illetve közepes fokú halláscsökkenés alakult ki (9. ábra). Utóbbi 4 esetben

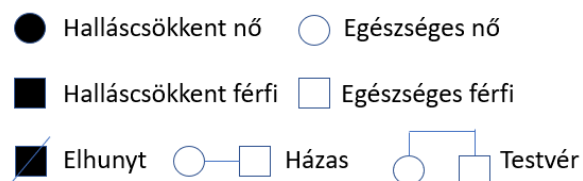
is a halláscsökkenés a 18. életév előtt kezdődött. Mindegyik compound heterozigóta betegünk autoszomális recesszív öröklésmenetet mutatott. A compound heterozigóta betegek szegregációs vizsgálata során a betegek szülei esetében a kérdéses mutációk egyszeres heterozigóta formában igazolódtak.

Egy betegnél a [c.35delG/c.-23+1 G>A] genotípust találtuk. Ezen beteg családjában halmozódó előfordulással nagy-, illetve súlyos fokú halláscsökkenést találtunk (10.ábra). A genetikai vizsgálatok P IV/5, P V/5 és P V/6, P VI/1 és P VI/2 esetében történtek. P VI/1 és P VI/2 c.35delG homozigóta genotípussal rendelkezik. P IV/6, P V/5 és P V/6 betegeknél a *GJB2* szekvenenciaanalízis során c.35delG heterozigóta genotípus igazolódott. P V/5 betegnél a *GJB2* vizsgálata során a c.-23+1 G>A (IVS1+1 G>A) mutáció igazolódott compound heterozigóta formában.

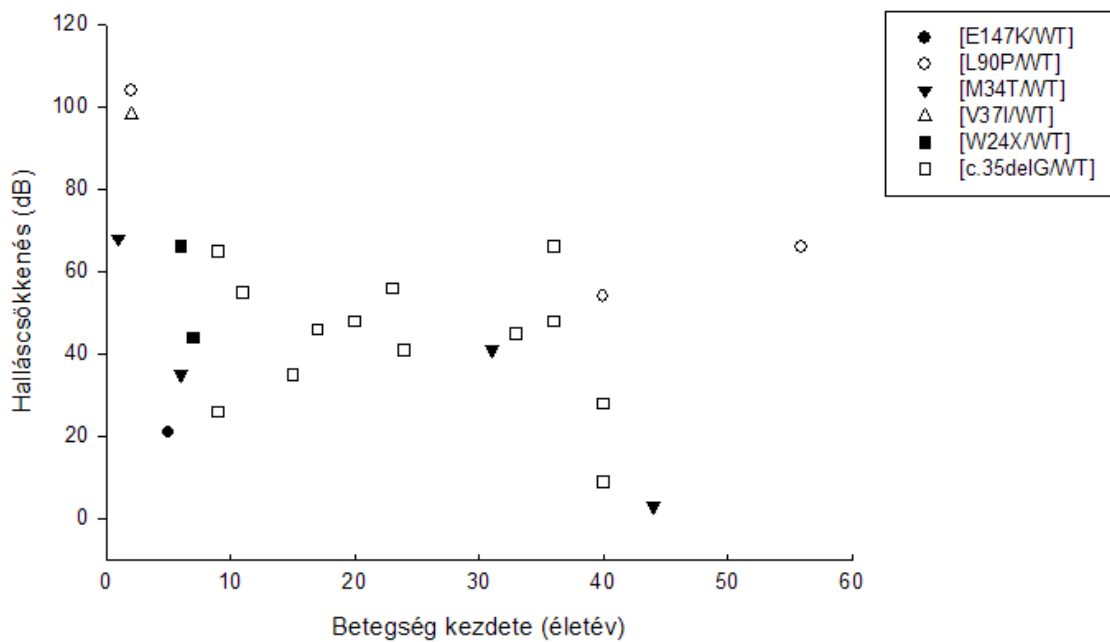


10. ábra: A GJB2 [c.35delG/c.-23+1 G>A] mutációval rendelkező beteg családfája
P I/1 esetében születés óta fennálló halláscsökkenés állt fenn. *P IV/2* és *P IV/4* az első életévben elhunytak. *P IV/5* születés óta fennálló kétoldali süketiséggel határos halláscsökkenésben szenved, rehabilitáció nem történt, a beteg jelnyelvvvel kommunikál. *P IV/8* születés óta fennálló, progresszív kétoldali nagy-súlyos fokú percepciósi halláscsökkenésben szenved, mely hallókészülékkel rehabilitált. *P V/2* malignus betegségben elhunyt. *P V/5* veleszületett, progresszív nagy-súlyos fokú halláscsökkenés miatt cochlearis implantátummal rehabilitált 17 éves korában – addig nagyteljesítményű hallókészüléket hordott. *P V/6* veleszületett nagyfokú halláscsökkenés miatt hallókészülékkel rehabilitált. *P VI/1* és *P VI/2* veleszületett, süketiséggel határos halláscsökkenés miatt cochlearis implantátummal rehabilitáltak. *P VI/4*. Down-szindrómás (sárgával jelölve).

Ábramagyarázat: P= beteg, I. =generáció száma, 1 = generáción belül hányadik személy



A 25 egyszeres heterozigóta betegünk tekintetében elmondható, hogy döntő többségük postlingualis kezdetű kis-, illetve közepes fokú halláscsökkenéssel rendelkezik (11. ábra). A *GJB2* heterozigóta és a *GJB2* mutációt nem hordozó betegek között szignifikáns különbséget sem a betegség kezdete (Mann-Whitney-teszt, $p=0,724$), sem pedig a halláscsökkenés súlyosságát illetően (Mann-Whitney-teszt, $p=0,559$) nem találtunk.



11. ábra: A heterozigóta genotípus hatása a betegség kezdetére és súlyossági fokára
(Kecskeméti és mtsai 2018)

Ezek mellett elmondható, hogy a patogén *GJB2* eltérések a kismértékű és az egyoldali halláscsökkenetek között szignifikánsan ritkábban fordulnak elő a többi halláscsökkenet csoportjához képest (khi-négyzet próba, $p<0,05$).

A genotípusokhoz tartozó halláscsökkenés fokát, valamint eloszlását a 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat: A vizsgálatunkban előforduló genotípusok és azok eloszlása a**halláscsökkenés súlyossága szerint**

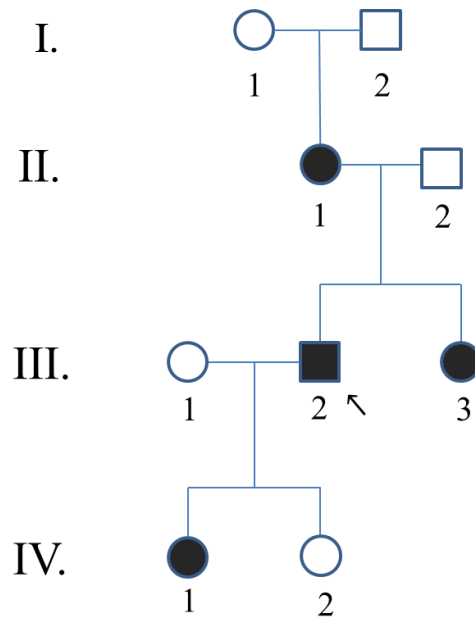
(*K=kisfokú, Kp=közepes fokú, KpN=közepesen nagyfokú, N= nagyfokú, S=súlyos fokú, Aszim=aszimmetrikus, Unilat=unilaterális, WT= vad típus (wild type)*)

Genotípus	Betegszám	Betegek százalékos eloszlása (%)	Halláscsökkenés súlyossága
Összes	239	100,00	
[c.35delG/c.35delG]	20	8,37	KpN: 2, N: 2, S: 15, Aszim:1
[c.35delG/WT]	13	5,44	K: 2, Kp: 4, KpN: 4, Aszim: 1, Unilat: 2
[c.35delG/W24X]	2	0,84	S: 1, Aszim: 1
[c.35delG/c.313-326del14]	2	0,84	S
[c.35delG/L90P]	1	0,42	K
[c.35delG/Q80P]	1	0,42	Aszim
[c.35delG/c.-23+1G>A]	1	0,42	S
[V37I/WT]	1	0,42	Aszim
[L90P/WT]	3	1,26	Kp: 1, S: 1, Aszim: 1
[V37I/E47X]	2	0,84	K: 1, Aszim: 1
[W24X/WT]	2	0,84	Kp: 1, KpN: 1
[M34T/WT]	4	1,67	Aszim: 3, Unilat: 1
[E147K/WT]	1	0,42	K
[WT/WT]	186	77,82	K-S

6.2.4. A teljes exom szekvenálás eredményei

A kutatásaink során öt családi halmazódást mutató, nem-szindrómás halláscsökkenésben szenvedő családot vontunk be az NGS vizsgálatainkba együttműködésben a Würzburgi Egyetem Humán Genetika Intézettel. Az 5 családból a WES vizsgálat 3 esetben igazolt szenzorineurális hallásvesztéssel összefüggésbe hozható genetikai eltérést.

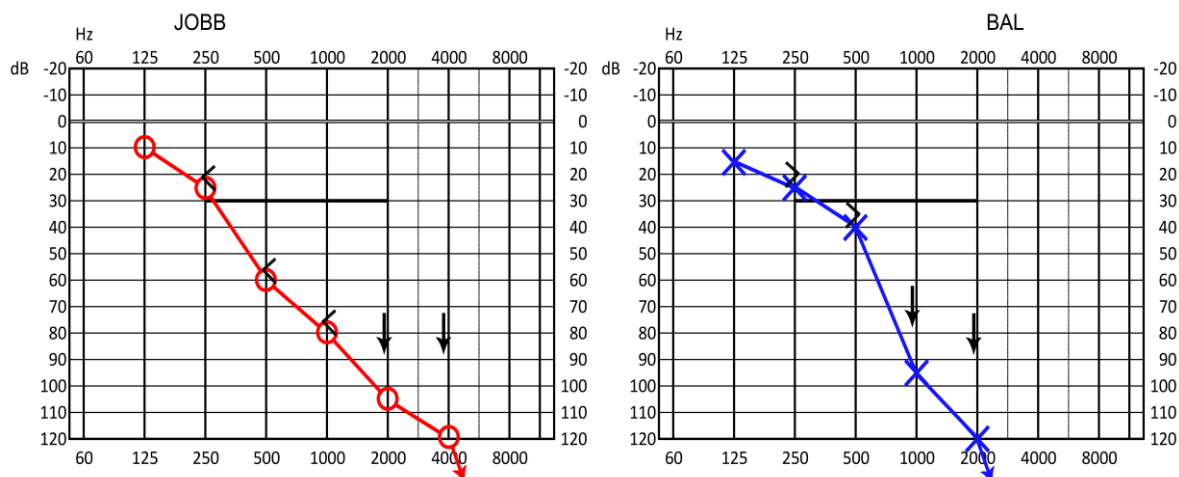
6.2.4.1. *DIAPH3* gén mutációját hordozó család (1. család)



12. ábra: Az első család családfája

(Jelmagyarázatot lásd 10. ábra)

Az első családban 3 generáción át autoszomális domináns öröklésmenttel követhető a halláscsökkenés, amely minden érintett családtagnál fiatal korban kezdődő, progresszív, magas frekvenciák felé fokozódó kis- közepes- nagyfokú és perцепиós jellegű (12. ábra). Az audiogramon jellegzetes sísáncgörbe 3 érintett családtagnál (P II/1, P III/2, P III/3.) is megfigyelhető (13. ábra). Az érintett betegeknél a *GJB2* génben eltérés nem igazolódott.



13. ábra: Az index személy (P III/2) tisztahang küszöbaudiometriai vizsgálatának eredménye.

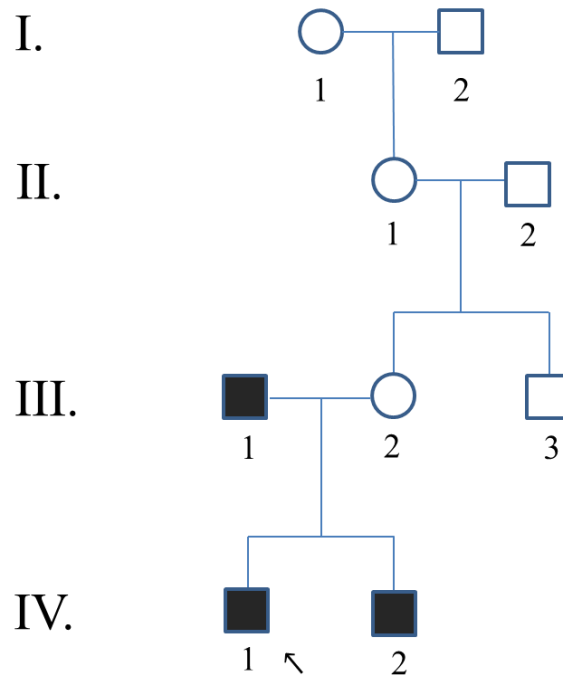
Jelmagyarázat: < / > = csontvezetéses küszöb, vonal= légvezetéses küszöb lefelé nyíl = csontvezetés méréshatárát meghaladó halláscsökkenés,

P III/2 beteg esetén WES vizsgálat történt, mely a *DIAPH3* génben heterozigóta formában a c.3125 G>A (p.R1042H) mutációt igazolta. A talált ritka eltérés az NCBI ClinVar adatbázisban ismeretlen jelentőségű variánsként szerepel. Az elvégzett *in silico* analízisek a variáns patogenitásának lehetőségét vetik fel (8. táblázat).

8. táblázat: A *DIAPH3*, Chr13: g.60384960C>T, c.3125G>A, p.R1042H (Exon 25) *in silico* vizsgálatok eredménye

Genom- és mutációs adatbázisok	HGMD	Halláscsökkenés; nem-szindrómás
	DVD	Ismeretlen hatás (Unknown Significance)
	ClinVar	Bizonytalan hatás (uncertain significance)
	ExAc	0 hom/ 29 het; Frekvencia: 0.0002435
	GnomAD	0 hom/ 60 het; Frekvencia: 0,0002169
<i>In silico</i> predikciós score	SIFT	Károsító (Deleterious) (score: 0)
	MutationTaster	Patogén (Disease Causing) (p-érték: 0,954)
	PolyPhen2	Valószínűleg patogén (Probably Damaging) (score: 0,998)

6.2.4.2. *WFS1* gén mutációját hordozó család (2. család)



14. ábra: A második család családfája

(Jelmagyarázatot lásd 10. ábra)

A második családban 2 generáción át öröklődő percepciós halláscsökkenést detektáltunk (14. ábra). P III/1 esetében gyermekkorban kezdődő, süketséggel határos halláscsökkenés alakult ki, majd felnőttkorban romló látás háttérében opticus neuropathia igazolódott. P IV/1. és P IV/2. születés óta fennálló kétoldali süketséggel határos percepciós halláscsökkenésben szenvedett. Mindkét gyermek bilaterális cochlearis implantátummal rehabilitált. A 3 érintett személynél a *GJB2* gén vizsgálata patogén mutációt nem igazolt. A látásromlás miatt felmerült Leber-féle opticus neuropathia, amelyet az elvégzett mtDNS hotspotok vizsgálata nem igazolt.

P IV/1. és P IV/2. esetén WES vizsgálat történt, mely során a *WFS1* génben heterozigóta formában a c.2390A>T (p.D797V) pontmutációt találtuk. Az eltérés az elérhető publikus adatbázisokban (HGMD, ClinVar, NCBI, dbSNP, ExAc, 1000Genom, GnomAD)

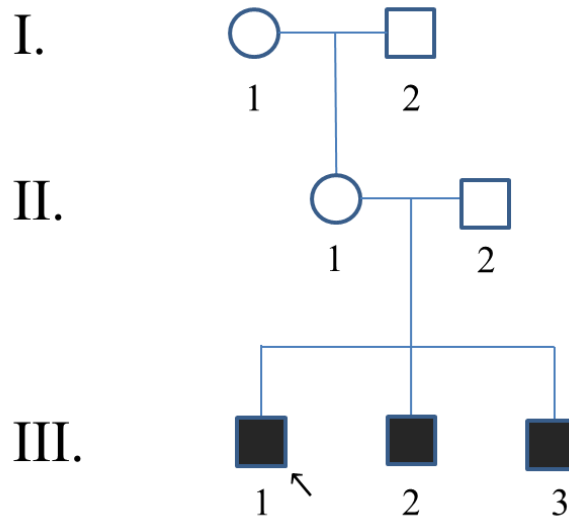
jelenleg nem szerepel (9. táblázat). Az elvégzett *in silico* predikciós vizsgálatok a variáns patogenitását feltételezik (9. táblázat).

A családtagok szegregáció-vizsgálata során a vizsgált testvérpár klinikailag tünetmentes édesanyjában (P III/2.) a kérdéses mutáció nem volt jelen, az édesapa (P III/1.) vizsgálatára nem volt lehetőségünk, mert a kiterjesztett genetikai vizsgálatokat megelőzően balesetben elhunyt.

9. táblázat: A WFS1 Chr4: g.6303912A>T, c.22390A>T, p.D797V (Exon 8) *in silico* vizsgálatok eredményei

Genom- és mutációs adatbázisok	HGMD	Wolfram- szindróma
	DVD	Patogén; Wolfram-szindróma
	ClinVar	Nem ismert
	ExAC	Nem ismert
	GnomAD	Nem ismert
<i>In silico</i> predikciós score	SIFT	Károsító (Deleterious (score: 0,01))
	MutationTaster	Kórokozó (Disease causing) (p-érték: 1)
	PolyPhen-2	Valószínűleg károsító (Possibly damaging) (score: 0,826)

6.2.4.3. *TRIOBP* gén mutációját hordozó család (3. család)



15. ábra: A harmadik család családfája

(Jelmagyarázatot lásd 10. ábra)

A harmadik családban a nem-szindrómás halláscsökkenés háttérében a családfa alapján recesszív öröklésment merült fel (15. ábra). P II/1 jobb oldali Ménière-betegségben szenvedett. P II/2 ép hallású. P III/1 és P III/2 születés óta fennálló nagyfokú perceptor halláscsökkenésben, míg P III/3 kisfokú perceptor halláscsökkenésben szenvedett. Mindhárom gyermek hallókészülékkel rehabilitált.

P II/2, P III/1 és P III/3 betegeknél a *GJB2* szekvencia analízise [p.L90P/WT] genotípust igazolt. P III/2 esetén a *GJB2* génben eltérést nem találtunk. A 3. generáció betegein elvégzett WES vizsgálat compound heterozigóta formában a *TRIOBP* gén c.2581C>T (p.R861X) és c.5014G>T (p.G1672X) mutációit igazolta. A mutációkat Sanger-szekvenálással validáltuk. A szülők szegregációs vizsgálata a mutációk biállélikus eredetét megerősítette.

Az elvégzett *in silico* vizsgálatok alapján a *TRIOBP* gén mutációit eddig az autoszomális recesszív öröklésmentű szenzorineurális halláscsökkenéssel hozták összefüggésbe, így a compound heterozigóta formában talált két mutáció magyarázhatja a betegek klinikai tüneteit (10. és 11. táblázat).

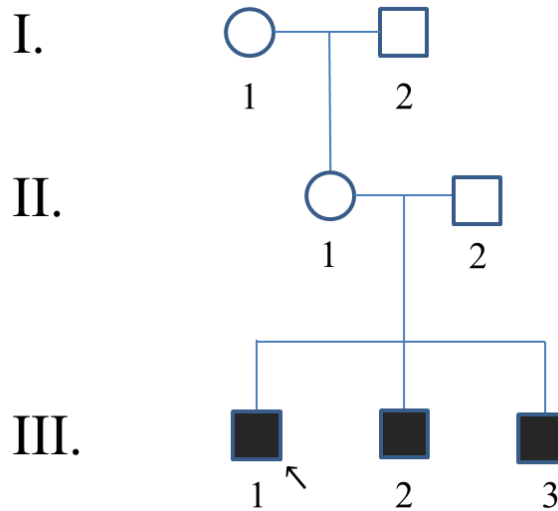
10. táblázat: A *TRIOBP* Chr22:g.38121144C>T, c.2581C>T, p.R861X (Exon 7) in silico vizsgálatok eredményei genom és mutációs adatbázisok alapján

HGMD	Halláscsökkenés, nem-szindrómás, autoszomális recesszív
DVD	Ismeretlen jelentőségű (Unknown significance)
ClinVar	ismeretlen jelentőségű
ExAC	0 hom / 1 het Frekvencia: 0,000008281
GnomAD	0 hom / 6 het Frekvencia: 0,00002165
Iranome	Nem ismert
GME	Nem ismert

11. táblázat: A *TRIOBP* Chr22: g.38131357G>T, c.5014G>T, p.G1672X (Exon 9) in silico vizsgálatok eredményei a genom és mutációs adatbázisok alapján

HGMD	Halláscsökkenés
DVD	Ismeretlen jelentőségű (Unknown significance)
ClinVar	Bizonytalan jelentőségű (uncertain significance)
ExAC	0 hom / 59 het Frekvencia: 0,0005713
GnomAD	0 hom / 131 het Frekvencia: 0,0004782
Iranome	Nem ismert
GME	Nem ismert

6.2.4.4. 4. család



16. ábra: A negyedik család családfája

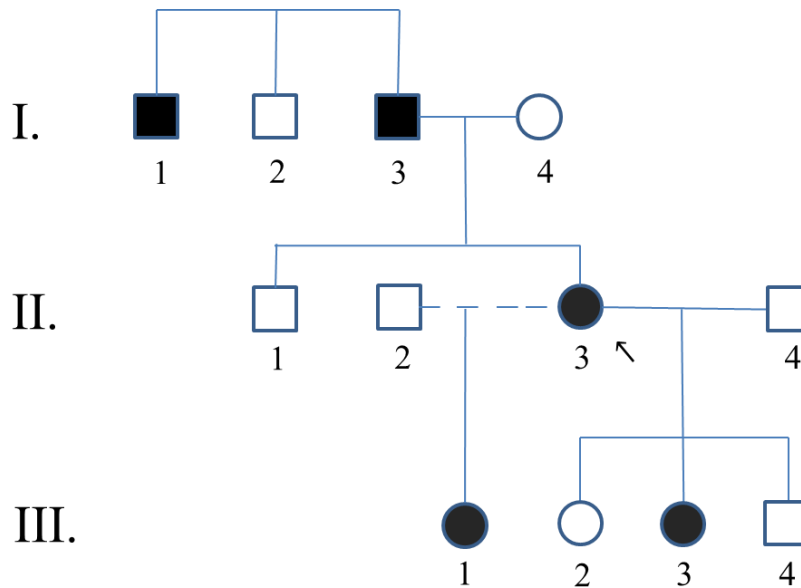
(Jelmagyarázatot lásd 10. ábra)

Az autoszomális recesszív öröklésmentet mutató negyedik családban 3 érintett beteg volt, akiknél a szindrómás eredet sem volt kizárható (16. ábra).

P III/1. veleszületett súlyos fokú halláscsökkenésben szenvedett, kétoldali cochlearis implantátummal rehabilitált, értelmi fogyatékos, Anamnézisében strabismus szerepel. P III/2 esetében születés óta fennálló nagyfokú halláscsökkenés, mely hallókészülékkel rehabilitált. Anamnézisében anisocoria szerepel. P III/3 esetében születés óta fennálló süketiséggel határos halláscsökkenés, mely kétoldali cochlearis implantátummal rehabilitált. Emellett kétoldali nervus abducens-gyengeség, kongenitális nystagmus és értelmi fogyatékoság szerepel kórtörténetében.

Az elvégzett *GJB2* szekvenenciaanalízis során patogén mutáció nem igazolódott, valamint a WES vizsgálat során a variáns hívásnál alkalmazott, szenzorineurális halláscsökkenésben szerepet játszó génekben mutációt egyik vizsgált személyben sem találtunk.

6.2.4.5. 5. család



17. ábra: Az ötödik család családfája

(Jelmagyarázatot lásd 10. ábra)

Az ötödik családban 3 generáción át követhető nem-szindrómás halláscsökkenés (17. ábra). A 2. és 3. generációban érintett halláscsökkenett betegeknél 2-3 éves korban kezdődő, progresszív, közepes fokú percepciós halláscsökkenés igazolódott. P II/3, P III/1 és P III/3 esetén a *GJB2* analízis során mutáció nem volt kimutatható. P II/3 betegnél WES vizsgálat történt, mely a vizsgált génekben sem igazolt patogén eltérést.

6.3. Mitokondriális betegcsoport

2012 és 2017 között 397 beteget vizsgáltunk meg az A1555G és C1494T mutációra. A vizsgálatokban 269 enyhétől súlyos fokig terjedő nem-szindrómás halláscsökkenett beteg (1. csoport) és 128 neurológiai betegséggel rendelkező, ép hallású beteg vett részt (2.csoport). Az 1. csoportban az átlagéletkor $32,1 \pm 19,7$ év [CI95% 29,9-34,4]), a 2. csoportban az átlagéletkor $42,2 \pm 22,5$ év [CI95% 38,3-46,1]. A vizsgálatba 161 férfi és 236 nő került beválogatásra.

A teljes vizsgált cohortban az anamnéziszfelvétel során 6 esetben találtunk regisztrált aminoglikozid-expozíciót, ebből 5 esetben gentamicin adása történt, és 1 esetben

streptomycin. A hat betegből öt az 1. csoportba, míg egy a 2. csoportba tartozott. A halláscsökkenés kezdete és az aminoglikozid expozíció között egyértelmű összefüggés egy esetben sem volt bizonyítható.

A mitokondriális vizsgálatok során egy esetben 1555 A>G mutáció igazolódott homoplazmikus formában. A 1494 C>T mutáció nem fordult elő egyik csoportban sem.

Az egy pozitív betegünkénél progresszív kétoldali aszimmetrikus halláscsökkenést regisztráltunk. A jobb oldalon 1 év alatt súlyos fokú percepciós halláscsökkenés, míg a bal oldalon a mély frekvenciákat érintő kismértékű percepciós halláscsökkenés alakult ki. A betegnél aminoglikozid-expozíció az anamnézisben nem szerepel.

Ezek alapján az 1555 A>G mutáció allélfrekvenciája 0,37% a nem-szindrómás halláscsökkenéssel rendelkezőkben és 0% a kontrollcsoportunkban. A 1494 C>T 0%-os allélfrekvenciát mutat a teljes vizsgált kohortban.

7. Megbeszélés

7.1. Cochlearis implantáción átesett betegcsoportunk

A gyermekkori halláscsökkenések esetén döntő fontosságú a halláscsökkenés idejének kialakulása. Ép hallás és tipikus nyelvfejlődés esetén, a beszédfejlődés intenzív időszaka 1,5 és 3 éves kor között történik, két éves kor körül bekövetkezik a szókinccs robbanás, majd a hallópályák érése 6 éves korban jelentősen beszűkül. A rehabilitáció sikerességét alapvetően meghatározza, hogy prelingualis halláscsökkenés esetén még a hallópályák érésének beszűkülése előtt megtörténjen a rehabilitáció (Sharma és Campbell 2011). Amennyiben a gyermek a 3 éves kort eléri és előtte nem kapott hatékony rehabilitációt megfelelően erősített hallókészülékkel és speciális szurdopedagógiai fejlesztéssel, úgy a cochlearis implantációtól teljeskörű beszédértés már nem várható, 6 éves kor után bekövetkező implantáció esetén pedig a gyermek csak pár szavas szókinccsel fog rendelkezni. Azokban az esetekben, amikor a súlyos fokú halláscsökkenést közvetlenül születés után vagy a születés utáni néhány hónapban diagnosztizáljuk, nagy teljesítményű, hallásmaradványra adható hallókészülékkel kell megkezdeni a gyermek ellátását és korai fejlesztésben kell részesíteni. A nemzetközi gyakorlat szerint kb. 6 hónap alatt, a gyermek fejlődésének nyomonkövetése által, már biztosan látni lehet, hogy hogyan használja a hallássérült gyermek a hallókészülékét, és elég lesz-e ez az erősítés a beszédhangok meghallásához, beszédértéshez. Ha látható, hogy a beszéd tartományokon nem megfelelő az erősítés, a gyermek érdekében a cochlearis implantáció irányába kell fordulni. A tapasztalatok azt mutatják, hogy a hallókészülék műtétet megelőző szerepe igen jelentős abban is, hogy a gyermek már rendelkezik hallásélménnyel, így a környezet hangjaira való felfigyelés a műtétet követően már természetes lesz számára, és a beszédhangok megismerésére is érzékenyebbé válik. A hallási emlékezet és az előzetes hallási tapasztalatok a műtét után mindenképpen segítők, és a gyermeknél megrövidül az implantátumhoz való szoktatási folyamat is. A korai, 2-3 éves korig elvégzett cochlearis implantáció a súlyos fokú perceptív halláscsökkenéssel rendelkező gyermekek számára, akiknél egyéb rendellenesség nem áll fenn, egy tanulási folyamat eredményeként a halló gyermekekéhez hasonló típusos beszédfejlődést biztosít. Ezek a gyermekek már többségi óvodákban, majd integrált oktatásban vehetnek részt, idegen

nyelvet tudnak elsajátítani, megtanulhatnak akár hangszeren is játszani (Stordahl 2002). Azoknál a gyermekeknél, akik részesültek megfelelő hallókészülékes fejlesztésben, de a beszédértés és a beszédprodukciónak a halláscsökkenés súlyossága miatt nem kielégítő, még későbbi életkorban is javasolt az implantáció. A tapasztalatok alapján a prelingualis halláscsökkenést szenvedő gyermekek késői implantációja esetén megfelelő speciális fejlesztéssel kiegészítve a hallást lehet javítani, a cochlearis implantátum szájról olvasás kiegészítéseként segítheti a kommunikációt (Teoh, Pisoni, és Miyamoto 2004). A gyermekek esetében a családi, szociális háttérnek és a számukra elérhető vagy hátrányos helyzetük miatt éppen elérhetetlen szurdopedagógiai fejlesztésnek döntő jelentősége van.

Cochlearis implantáción átesett 18 év alatti beteganyagunkból kiemelendő, hogy legnagyobb arányban - 71 esetben - prelingualis halláscsökkenetek kerültek implantációra. Elmondhatjuk, hogy 79 betegnél kezdtük meg időben a megfelelő műtéti rehabilitációt. Emellett azt is fontos hangsúlyoznunk, hogy az eredményes újszülöttkori hallásszűrés ellenére is nap mint nap találkozunk olyan veleszületett siket gyermekekkel, akik különböző okok miatt csak 3 éves koruk után kerülnek a megfelelő ellátóhelyre. Gyermekek beteganyagunkban 10 (11,2%) veleszületett súlyos fokú halláscsökkenéssel rendelkező beteg csak 6 éves kora után került implantációra, a prelingualis implantáltjaink között 40 beteg (44,9%) 4-6 éves kor között lett implantálva (Kecskeméti és mtsai 2019). Ezen arányok nagyon magasak, ezért fontos kiemelni, hogy veleszületett halláscsökkenés gyanúja esetén mihamarabb a megfelelő centrumba szükséges irányítani a betegeket. A késői diagnózis hátterében 2015 előtti nagy számban el nem végzett hallásszűrés áll. Habár 2015 előtt az ajánlások szerint az újszülött hallását otoakusztikus emisszióval kellett vizsgálni, az előírások ellenére sokszor nem történtek meg az objektív módszerekkel végzett szűrővizsgálatok, vagy az OAE nem kiválthatóságának ellenére a gyermekeket nem utalták tovább a megfelelő ellátóhelyre. Emellett bár ritka eltérés, de amennyiben a halláscsökkenés oka retrocochlearis, ún. auditoros neuropathia vagy hallóideg aplázia volt, akkor az otoakusztikus emisszió kiválthatósága ellenére a gyermek mégsem hallott. Ezért szükséges az objektív, szűrő BERA-val történő hallásszűrés. A 2015 májusában bevezetett 0-18 éves korra vonatkozó hallásszűrés szakmai irányelve részletesen taglalja a gyermekkori hallásszűrések időpontját, helyszínét és továbbutalás esetén az ellátó intézményeket (Emberi Erőforrások Minisztériuma – Egészségügyért Felelős Államtitkárság 2015). Az új protokolltól elvárhatóan, és 2015 óta érzékelhetően

a gyermekek fiatalabb életkorban kerülnek a megfelelő centrumba, így azt várhatjuk, hogy a 3 éves kor előtti implantációk aránya növekedni fog és még több gyermek tud megfelelő időben a megfelelő rehabilitációban részesülni.

62,9%-ban tudtuk kimutatni a vizsgált betegpopulációban a súlyos fokú halláscsökkenés okát. Eredményeink rávilágítanak a genetikai vizsgálatok fontosságára. A szakirodalom alapján a nem-szindrómás halláscsökkenések 70%-ában genetikai eredet igazolható. Jelenleg a halláscsökkenések diagnosztikájában a *GJB2* gén szekvenenciaanalízise terjedt el, mert ez a gén áll leggyakrabban a nem-szindrómás halláscsökkenések háttérében. Beteganyagunkat vizsgálva elmondhatjuk, hogy 46,5%-ban igazolódott a *GJB2* génben patogén eltérés. A leggyakoribb mutáció a c.35delG mutáció, mely a vizsgált gyermekeknél 38,8%-os allélfrekvenciát jelent (Kecskeméti és mtsai 2019). Ez a mutáció Európában a leggyakoribb patogén eltérés, homozigóta formában súlyos fokú halláscsökkenés, míg compound heterozigóta formában a halláscsökkenés széles spektruma alakulhat ki (Marlin és mtsai 2005). Jelen vizsgálatunk rámutat, hogy a súlyos fokú halláscsökkenetek között nagy találati eredményt kapunk, így ezen genetikai vizsgálatot ebben a betegcsoportban feltétlen érdemes elvégezni. A 38,8%-os c.35delG allélfrekvencia a környező európai országokhoz képest hasonló előfordulást jelent (Popova és mtsai 2012; Seeman és mtsai 2004; Lazar és mtsai 2010; Danilenko és mtsai 2012) (ld. még 12. táblázat).

Genetikai eredet mellett 10,1%-ban igazolódott infekciós eredet a halláscsökkenés háttérében. Kritikus jelentősége a meningitis kapcsán kialakult halláscsökkenésnek van. Három gyermeknél lépett fel meningoencephalitist követően sükettség. Jellemzően bakteriális fertőzés, *Pneumococcus*, *Meningococcus*, *H. influenzae* - meningitis kapcsán alakul ki leggyakrabban a kórkép, de egyéb kórokozók is szerepet játszhatnak. Jelentősége abban áll, hogy az *aqueductus cochlearison* keresztül a subarachnoidalis tér és a belsőfül folyadéktere közlekedik egymással, a gyulladás a belsőfülbe tud terjedni. Ennek kapcsán kezdetben fibrózis, majd osszifikáció léphet fel, a csigában stenosis alakul ki. A fibrózis már 4 héttel a meningitist követően kimutatható, és progressziója bizonytalan gyorsaságú, azonban elmondható, hogy az esetek döntő többségében kétoldali szűkület jelentkezik (Durisin és mtsai 2010). A stenosis kimutatásában belsőfül-HRCT és T2 súlyozású célzott belsőfül-MR vizsgálat segíthet. A kialakult szűkület a későbbiekben az elektróda bevezetését akadályozhatja, így fontos, hogy ezen gyermekek

– és felnőttek is! - a meningitist követően mihamarabb, de legkésőbb fél évvel a betegség kialakulását követően lehetőség szerint bilaterális implantációra kerüljenek. Ezt meghaladó időintervallum esetén a cochlearis implantáció elvégzése nehézségbe ütközhet, a beteg rehabilitációját pedig más módszerrel elvégezni nem lehet.

Eredményeinkből továbbá fontos kiemelni a humán cytomegalovirus (CMV)-fertőzöttség arányát. Négy esetben találtunk igazolt intrauterin vagy perinatalis korban bekövetkező fertőzést (Kecskeméti és mtsai 2019). Három gyermeknél egyértelműen liquorból igazolt CMV-fertőzés volt kimutatható, mindhárom gyermeknél MR-vizsgálat során egyéb intracranialis elváltozások (subependimalis ciszták, temporális fehérállományi elváltozások) is alátámasztották a diagnózist. Egy gyermek esetében MR-vizsgálat nem történt, vagy tekintettel a retrospektív vizsgálatra, ez nem lett regisztrálva. Magyarországi becslő adatok alapján az újszülöttek 1-2%-a érintett kongenitális CMV-fertőzésben (cCMV) és 10-15%-uknál jelentkezik a fertőzés tünetes formában (Országos Epidemiológiai Központ Epiinfo 2012). Kongenitális CMV esetén 12,6%-ban alakul ki későbbiekben halláscsökkenés, mely a szimptomás betegeknél 1:3 arányt jelent és döntően kétoldali nagy-, illetve súlyos fokú halláscsökkenést, míg az aszimptomás betegeknél 1:10 arányban alakul ki és inkább progresszív, uni- vagy bilaterális nagy-súlyos fokú halláscsökkenést okoz (Goderis és mtsai 2014). Fontos kiemelni, hogy kongenitális CMV-fertőzést a születést követő 3. hétig az újszülöttől vett nyál- vagy vizeletmintából lehet kimutatni. Amennyiben a minta 3 hetes kor után kerül levételre, úgy a kongenitális és a szerzett CMV-fertőzést már nem lehet megkülönböztetni, melynek jelentősége a terápia szempontjából lehet. Konzervatív kezelésként szóba jön a ganciclovir vagy valganciclovir adása. Tanulmányok alapján az 1 hónapos korig megkezdett antivirális terápia esetén jelentős javulás érhető el a halláscsökkenés kialakulása szempontjából (Shin, Keamy, és Steinberg 2011). A cochlearis implantáció kimeneteléről elmondható, hogy szimptomás cCMV esetén általában lassabb beszédfejlődéssel kell számolni, melynek oka egyelőre ismeretlen, többek között a CMV okozta egyéb neurológiai deficit következménye lehet (Shin, Keamy, és Steinberg 2011).

7.2.A *GJB2* génben előforduló mutációk

7.2.1. A *GJB2* genetikai vizsgálata

A *GJB2* gén mutációit, mint a nem-szindrómás veleszületett halláscsökkenések leggyakoribb okát világszerte több populációban is vizsgálták. A különböző populációkban eltérő mutációs allélfrekvenciát figyeltek meg a különböző variánsok tekintetében. Jelen tanulmányban a *GJB2* gén eltéréseit vizsgáltuk a magyar populációban. A vizsgált *GJB2* betegcsoportban a *GJB2* homozigóta és compound heterozigóta eltérései a betegek 11,72%-ában igazolódtak. A cochlearis implantáción átesett gyermek betegcsoportunkban ez az arány sokkal magasabb (47,3%) volt.

A leggyakoribb patogén eltérésnek a c.35delG mutáció igazolódott. Egy több mint 23 000 főn vizsgált metaanalízis alapján az átlagos karrierfrekvencia Európában 1,89%, Amerikában 1,52%, Ázsiában 0,64%, Afrikában 0,64%, Óceániában pedig 1% (Dzhemileva és mtsai 2010). Az európai populációban északról délre növekvő, míg Ázsiában nyugatról keletre csökkenő tendenciát mutat (Mahdieh and Rabbani 2009). Észak-Európában 1:78 (1,2%), Dél-Európában 1:35 (2,8%) a karrierfrekvencia az egészséges populációban, Görögországban (3,5%), Olaszországban (4,5%) és Franciaországban (3,4%) a legmagasabbak az arányok (Lucotte 2007). Korábbi vizsgálatok alapján Magyarországon a c.35delG mutáció frekvenciája 0,6 – 2,4% (Bors és mtsai 2004), (Tóth és mtsai 2004). Az általunk végzett vizsgálatban a c.35delG 2,5%-os frekvenciával van jelen az egészséges kontrollcsoportban. A jellegzetes, földrajzi elhelyezkedést követő frekvenciaváltozás miatt felmerült, hogy a c.35delG egy régióban keletkezett és a népvándorlások útján terjedt el világszerte (alapító hatás). Több vizsgálat is felvetette a mutáció Dél-Európából, elsősorban Görögországból, illetve a Közel-Keletről származó eredetét. Magyarország történelmét figyelembe véve érdemes a fókuszot az Urál menti finnugor népcsoportokon végzett vizsgálatokra helyezni. Dzhemileva és munkatársai kimutatták, hogy a finnugor népcsoportban magas hordozás fordul elő (Mordva 6,2%, udumurt 3,7%), valamint a finnugor eredetű észteknél is az európai átlaghoz képest magas a karrierfrekvencia (4,4%), míg a tatároknál ez az érték csupán 1% (Dzhemileva és mtsai 2010). A magyar nép vándorlási útvonalának és történelmének ismeretében felmerül, hogy az urál-menti származás miatt esetlegesen

kezdetben magasabb c.35delG mutációs frekvenciát a tatárjárás, valamint egyéb megszállások és népcsoportokkal való keveredés jelentősen befolyásolhatta.

A *GJB2* betegcsoportban a patogén eltérést mutató betegek 72,2%-ában igazolódott c.35delG mutáció, mely 12,55%-os allélfrekvenciát jelent. Ez az allélfrekvencia más európai populációkban végzett vizsgálatokkal összevetve relatív alacsony értéket jelent (12. táblázat). Ennek háttérében több magyarázat is állhat. Elsősorban a bevásztási kritériumokban látható különbség. Ha összehasonlítjuk az egyéb országokban végzett vizsgálatokat, feltűnő, hogy döntően a prelingualis kezdetű, nagy-, illetve súlyos fokú halláscsökkenet betegeket vizsgálták. Ezzel szemben a mi vizsgálatunk egy sokkal szélesebb betegpopulációt ölelt fel, amely keretében nem csak korai kezdetű, súlyos betegséggel rendelkezőket, hanem az enyhébb klinikai megjelenésű és postlingualisan kezdődött halláscsökkeneteket is vizsgáltuk. Célunk volt ugyanis meghatározni, hogy vajon ténylegesen melyik betegcsoportot érdemes *GJB2* génre vizsgálni. A bevásztási kritériumokat teoretikusan szűkítve, amennyiben csak a prelingualis kezdetű, nagy-, illetve súlyos fokú halláscsökkenet betegeket vizsgáljuk, úgy 30,8%-os c.35delG allélfrekvenciát találunk. A cochlearis implantáción átesett gyermek beteganyagunkban 38,8%-os c.35delG allélfrekvenciát igazoltunk. Ez a környező országok allélfrekvenciájához lényegesen közelebb áll. Általánosságban elmondható, hogy minél súlyosabb fokú a halláscsökkenés és minél fiatalabb életkorban alakul ki, annál nagyobb valószínűséggel áll a háttérben a *GJB2* gén patogén eltérése.

12. táblázat A c.35delG előfordulása halláscsökkenéssel rendelkező európai betegcsoportokban

Ország	Betegszám	c.35delG hordozó betegek száma		Allélfrekvencia (%)	Referencia
		Homozigóta	Heterozigóta/ Compound heterozigóta		
Magyarország	239	20	20	12.6	(Kecskeméti és mtsai 2018)
Németország	228	18	32	14.9	(Zoll és mtsai 2002)
Szlovákia	273	43	36	22.3	(Minárik és mtsai 2012)
Horvátország	63	16	5	29.3	(Medica és mtsai 2005)
Románia	75	19	10	33.3	(Lazar és mtsai 2010)
Csehország	156	45	23	35.6	(Seeman és mtsai 2004)
Bulgária	51	20	5	44.1	(Popova és mtsai 2012)
Fehéroroszország	391	178	51	52.04	(Danilenko és mtsai 2012)

A *GJB2* betegcsoportban sem a kisfokú halláscsökkenéssel rendelkező betegek, sem az unilaterális halláscsökkenet csoportban lényegében nem fordult elő sem a c.35delG, sem egyéb patogén mutáció. Ennek alapján ebben a beteg-alcsoportban a *GJB2* gén vizsgálatát nem tartjuk indokoltnak. A másik kilenc vizsgálatunkban előforduló mutáció előfordulási arányát a 7. táblázat mutatja. Tanulmányunkban a p.W24X, a p.L90P és a p.M34T mutáció fordult elő nagyobb arányban (0,84%) a halláscsökkenet betegeink között. Az p.M34T a kontrollpopulációban 0,64%-os allélfrekvenciát mutatott, a beteg és a kontroll csoport között nem adódott szignifikáns eltérés az előfordulási gyakoriságot tekintve, mely alapján a patogenitás megkérdőjelezhető. Habár funkcionális vizsgálatok igazolják a connexin csatorna csökkent működését ezen mutáció meglétekor, a p.M34T mutációt hordozó NSHL betegeink különböző fokú halláscsökkenésben szenvednek. Így felmerül, hogy ezen beteginknél a halláscsökkenés hátterében más eredet áll.

7.2.2. Genotípus- fenotípus korrelációs vizsgálat

A különböző genotípus-fenotípus korrelációs vizsgálatok alapján kimutatták, hogy a c.35delG homozigóta genotípus leggyakrabban prelingualis, súlyos fokú percepciósi halláscsökkenésben nyilvánul meg, míg egyéb mutációk önmagukban vagy a c.35delG-vel kombinálódva compound heterozigóta formában a halláscsökkenés széles spektrumát okozzák. A kohortunkban végzett vizsgálatok alapján elmondhatjuk, hogy a homozigóta c.35delG genotípus legnagyobb számban a nagy-, illetve súlyos fokú halláscsökkenetek között, míg a *GJB2* c.35delG heterozigóta, valamint a *GJB2* egyéb heterozigóta genotípus a közepes fokú halláscsökkenetek közt fordul elő nagyobb arányban. Statisztikai analízis során megállapítottuk, hogy szignifikánsan fiatalabb életkorban és súlyosabb fenotípusos megjelenést okoz a c.35delG homozigóta mutáció, mely az eddigi irodalomban leírtakat alátámasztja.

Kiváncsiak voltunk, hogy a compound heterozigóta haplotípus vajon milyen befolyással van a klinikai megjelenésre. Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a [c.35delG/p.W24X], a [c.35delG/c.313.del14] és [c.35delG/ c.-23+1 G>A] prelingualisan kezdődő súlyos fokú halláscsökkenést okozott, míg a [c.35delG/p.L90P] enyhe, a [p.V37I/p.E47X] közepes és a [c.35delG/p.Q80P] közepesen nagyfokú halláscsökkenésben manifesztálódott. Mindhárom utóbb említett genotípus esetén a halláscsökkenés postlingualisan kezdődött, és kiemelendő, hogy az összes compound heterozigóta betegünkönél a 18. életév előtt

kezdődött a halláscsökkenés. A különböző klinikai megjelenést az egyes mutációk eltérő patogén hatása magyarázhatja. Cryns és munkatársai két csoportra osztották a mutációkat, attól függően, hogy a keletkező fehérjében milyen funkcionális változást idéz elő az adott mutációtípus. Ez alapján a splice site mutáció, a nonsense mutáció, az inzerció, a duplikáció és a 3 bázisnál kevesebbet érintő deléció inaktíváló mutációként szerepel, azaz a fehérje vagy nem szintetizálódik meg, vagy a fehérjeszintézis után inaktíválódik. Emellett a missense és a 3 bázist érintő deléció a nem-inaktíváló mutációk közé tartozik, mely következtében a fehérje funkcionál, de az eredeti konformációhoz képest alacsonyabb szinten (Cryns és mtsai 2004). Ezek alapján a vizsgálatainkban előforduló mutációk közül a c.35delG, a p.W24X, a c.313del14, c.-23+1 G>A és az p.E47X inaktíváló, a p.L90P, p.V37I, p.M34T, p.Q80P, valamint az p.E147K nem-inaktíváló mutációk közé tartozik. Egy inaktíváló/inaktíváló genotípus, mint esetünkben a [c.35delG/p.W24X], [c.35delG/c.313.del14], [c.35delG/ c.-23+1 G>A] azt eredményezi, hogy funkcionális fehérje egyik allélról sem tud átíródni, klinikailag súlyos fokú, prelingualis halláscsökkenés alakul ki. Ezen genotípussal rendelkező betegeinknél ez kivétel nélkül megfigyelhető volt. Abban az esetben, ha a beteg inaktíváló/nem-inaktíváló genotípust hordoz, mint a [c.35delG/p.L90P], [p.V37I/p.E47X], [c.35delG/p.Q80P] úgy az enyhébb mutációt hordozó allélról alacsonyabban funkcionáló fehérje át tud íródni, mely biztosítja, hogy bár kialakul halláscsökkenés, de az enyhébb fokú lesz. Ez a beteg és a klinikus szempontjából is nagyon lényeges megfigyelés. Ha egy beteg genetikai vizsgálata során compound heterozigóta *GJB2* mutáció igazolódik, a mutációk típusait elemezve a várható klinikai kép és kórlefolyás is megjósolható. A sikeres diagnosztika alapvető fontosságú az effektív, időben elindított hallásrehabilitáció szempontjából.

Külön említést érdemel a c.-23+1G>A mutáció (IVS1+1G>A), mely a *GJB2* nem kódoló splice site régiójában helyezkedik el és az mRNS képzés splicing lépését károsítja, ezáltal a fehérjeszintézis kezdeti lépését gátolja (Seeman and Sakmaryová 2006). Ezt a mutációt már több populációban is vizsgálták és patogén szerepét igazolták (Green és mtsai 1999; Kupka, Braun, és mtsai 2002). Betegeinknél az igazolt [c.35delG/c.-23+1G>A] compound heterozigóta genotípus magyarázza a súlyos fokú, süketséggel határos halláscsökkenést.

Néhány korábbi publikáció felvetette a *GJB2* autoszomális domináns öklésmentének lehetőségét is (Ballana E 2018; Tekin és mtsai 2001; Tekin, Duman, Boğoçlu, Incesulu,

és mtsai 2003). Amennyiben autoszomális domináns öröklődésmenet állna fenn, úgy a heterozigóta betegeknél súlyosabb klinikai kép lépne fel a mutációval nem rendelkező személyekhez képest. Ezen két betegcsoportot összehasonlítva azonban nem találtunk szignifikáns különbséget sem a halláscsökkenés súlyosságát, sem pedig az időbeli kezdetét tekintve, mely alapján kutatásunk az autoszomális recesszív öröklődésmenetet támasztja alá.

7.2.3. Audiológiai eredmények a *GJB2* betegcsoportban

Pittman és munkatársai kimutatták, hogy a gyerekkorban kezdődő halláscsökkenések súlyosabb fokúak a felnőttkorban kezdődőknél (Pittman és Stelmachowicz 2003). Hasonló eredményeket találtunk mi is a vizsgált kohortunkban. Megfigyeltük, hogy függetlenül a genotípustól a prelingualisan kezdődő halláscsökkenés szignifikánsan súlyosabb klinikai megjelenést okoz a postlingualis esetekhez képest (8. ábra). Ennek hátterében több magyarázat is állhat. Egyike ismételtén a *GJB2* betegcsoportunk beválasztási kritériumai között keresendő. A postlingualis nagy-, illetve súlyos fokú halláscsökkenés leggyakoribb okai között ugyanis a vaszkuláris eredet, a Ménière-betegség vagy különböző környezeti faktorok (pl. vírusinfekció, ototoxikus gyógyszerek, zajártalom stb.) szerepelnek, melyek kizáró tényezők voltak a betegszelekciónk során. Így előfordulhat, hogy mérési eredményeink ebben az esetben torzítanak. Bár az irodalomban is leírják a prelingualis kezdetű halláscsökkenések súlyosabb mivoltát, ezen megállapítást egy átfogó, etiológiától függetlenül beválasztott halláscsökkenett betegcsoporton végzett kutatással érdemes lenne bizonyítani.

Progresszív halláscsökkenésű betegeink tekintetében kiemelendő a rendszeres audiológiai kontrollvizsgálat. Egy esetben a c.35delG homozigóta genotípus postlingualis közepes fokú halláscsökkenésben manifesztálódott, azonban későbbiekben súlyos fokú, süketiséggel határos halláscsökkenés alakult ki. Ezen eset rávilágít arra, hogy a homozigóta genotípus prediktív értékkel bírhat. Ezeknek a betegeknek a szoros követése és megfelelő hallásrehabilitációja rendkívül fontos. Amennyiben hallókészülékkel nincs kielégítő beszédértés, úgy a cochlearis implantáció elvégzése javasolt.

Érdekes megállapítást tehetünk a nemek közti különbségről. Tanulmányunkban minden genotípus-alcsoportban szignifikánsan korábbi betegségkezdetet találtunk a férfiak

között. Korábbi vizsgálatok már felvetették, hogy a férfi nem jelentős rizikótényezőt jelent a halláscsökkenés kialakulásában (Homans és mtsai 2017; Hoffman és mtsai 2017), és ennek hátterét elsősorban szocioökonómiai különbségekkel magyarázták. Kimutatták, hogy a zajexpozíció a férfiaknál sokkal magasabb, mint a nőknél, mely magyarázhatja a nemek közti különbség előfordulását. Tekintettel arra, hogy a zajártalom kizárási kritérium volt betegeinknél, így inkább valamilyen genetikai eredetet valószínűsítünk a háttérben, elsősorban X-inaktivációt vagy epigenetikai reguláló tényezőket. Azonban ezen felvetés igazolása további vizsgálatokat tenne szükségessé.

Tekintettel a közepes fokú halláscsökkenett betegeink között előforduló nagyszámú *GJB2* mutációk heterozigóta előfordulására, felmerül a kérdés, hogy a halláscsökkenés háttérében egyéb, a *GJB2* mutációval szinergista hatású géntérés áll. Ezen betegek további, más géneket érintő kiterjesztett genetikai vizsgálata újgenerációs szekvenálással feltétlen javasolt.

7.3. A teljes exom szekvenálás eredményei a kiválasztott családokban

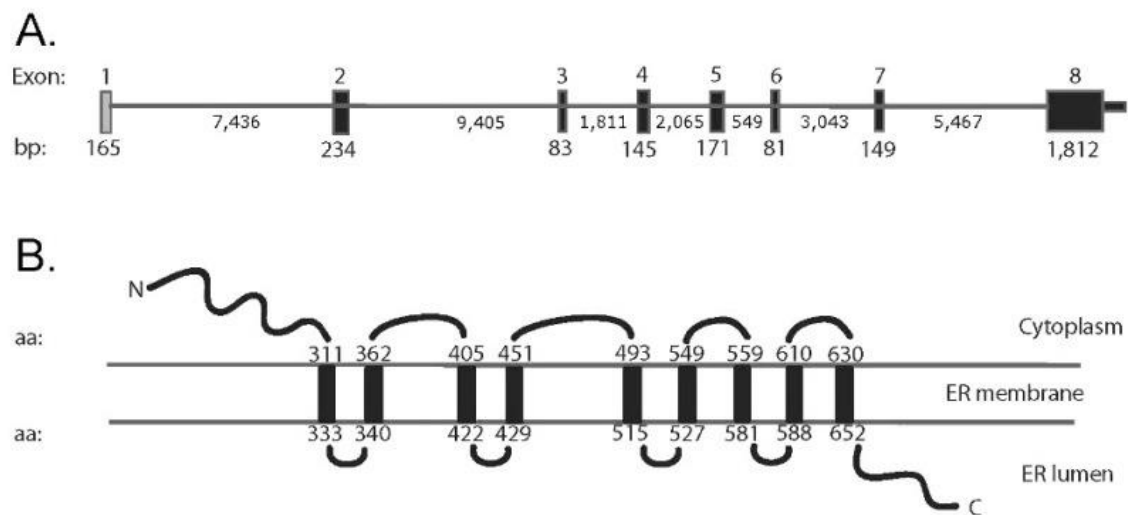
Az elvégzett *GJB2* WES vizsgálatok alapján 5 család közül háromnál találtunk eltérést más, halláscsökkenésben szerepet játszó génben. Habár az esetszám kicsi, mégis rávilágít a vizsgálatok elvégzésének fontosságra megfelelően szelektált betegek esetén.

Az első családnál a családfa alapján felmerült az autoszomális domináns öröklődésmenet, tekintettel arra, hogy 3 generáción keresztül követhető a halláscsökkenés, melynek súlyossága - az audiogramon látott jellegzetes sísánc görbe - 3 érintett személynél is hasonlóképpen megfigyelhető volt. A WES vizsgálat a *DIAPH3* génben a c.3125G>A (p. R1042H) (rs200189161) pontmutációt talált. A *DIAPH3* gén (Diaphanous homolog 3), melyet először 2004-ben Kim és munkatársai írtak le (Kim és mtsai 2004), egy olyan fehérjét kódol, mely az aktinfilamentumok szervezésében játszik fontos szerepet. A *DIAPH3* gén c.-172G>A 5'UTR mutációját autoszomális domináns öröklésmenettel az auditoros neuropathia háttérében írták le (Schoen és mtsai 2010), amely klinikai megjelenését tekintve progresszív, fiatalkorban kezdődő halláscsökkenésben nyilvánul meg. Emellett a *DIAPH3* gén mutációi az autizmus spektrumbetegség rizikófaktoraként (Vorstman és mtsai 2011), valamint a hepatocelluláris karcinóma metasztázisképzésében (Dong és mtsai 2018) is szerepet játszhat.

Molekuláris biológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a gén mutációjának hatására a fehérje expressziója emelkedik, így ezek *gain-of-function* (funkciónyeréses) mutációknak tekintendők. Amennyiben az expresszió a normál sejt expressziójának másfélszeresét eléri, úgy halláscsökkenés alakul ki. Elsősorban a neuronok dendritjeiben van patogén szerepe. Tekintettel arra, hogy az afferens neuronok 95%-a a belső szőrsejteket, míg csak 5%-a a külső szőrsejteket idegzi be, elsősorban a belső szőrsejtek szinaptikus kapcsolatai károsodnak (Schoen és mtsai 2010).

Az AD jelleg ebben a családban is megfigyelhető volt, az auditoros neuropathiát azonban nem sikerült igazolunk sem az audiológiai sem az elvégzett képalkotó vizsgálatokkal. Habár célzott belsőfül-MR vizsgálattal a sejt szintű szinapszis elváltozásokat nem tudjuk kimutatni, a betegnél az OAE nem volt kiváltható. Az auditoros neuropátia során a betegség progressziója kapcsán leírták a belső és külső szőrsejtek károsodását is (Rajput és mtsai 2019), így elképzelhető, hogy betegünknel, aki felnőttkorban került részletes kivizsgálásra intézményünkben, már előrehaladott állapotban történt a pontos diagnosztika. A családban neurológiai, illetve tumoros megbetegedés nem fordult elő. A család klinikai képét jellemző percepció hallásvesztés és a *DIAPH3* gén kapcsolata még nem bizonyított, ennek további vizsgálatára a *DIAPH3* gén és az általa kódolt protein expressziós és funkcionális analízisére lenne szükség.

A második családban két generáción át autoszomális dominánsan öröklődő, súlyos fokú percepció halláscsökkenés volt követhető. P III/1 beteg esetében felnőttkori opticus neuropathia alakult ki. Az elvégzett WES vizsgálat alapján a *WFS1* gén c.2390A>T (p.D797V) pontmutáció igazolódott. A *WFS1* gén a 4-es kromoszóma rövid karján (4p16) helyezkedik el és a wolframin fehérjét kódolja. Ezen fehérje egy 890 aminosavból álló transzmembrán protein, mely 9 transzmembrán egységgel, egy extracitoplazmikus N'-, és egy intracitoplazmikus C'-terminálissal rendelkezik (Strom és mtsai 1998). Az endoplazmatikus retikulumban helyezkedik el, és Ca^{2+} -csatornaként funkcionálva az intracelluláris kalciumhomeosztázisért felelős (18. ábra).



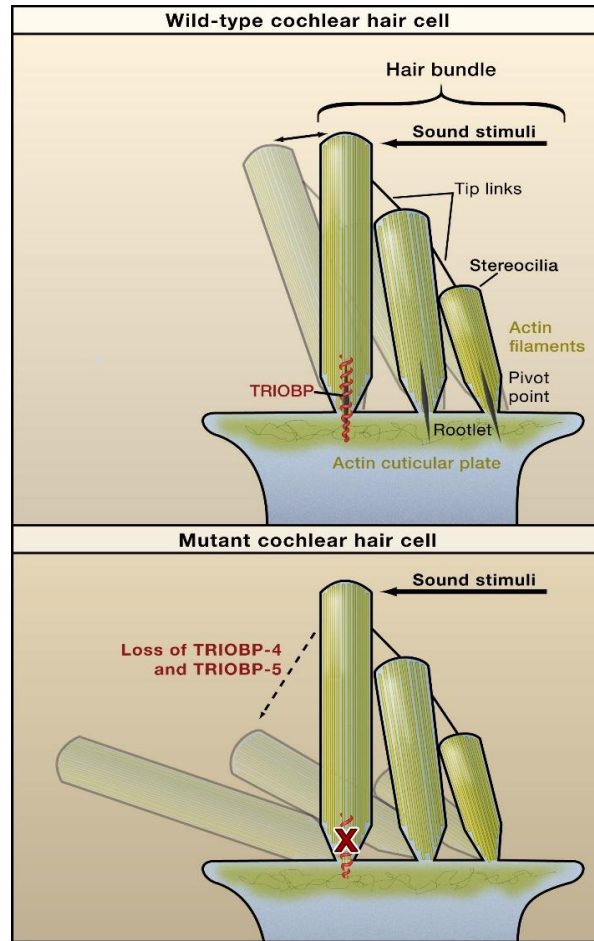
18. ábra: A *WFS1* gén felépítése (A) és a wolframin fehérje sematikus ábrázolása, elhelyezkedése az endoplazmatikus retikulumban (B)

[forrás: (GeneReviews® és Adam MP 1993-2018.) bp= bázispár,

A wolframin mutációit elsősorban az autoszomális recesszív Wolfram-szindrómával hozták összefüggésbe, melyre jellemző a diabetes insipidus, diabetes mellitus, opticus neuropathia, szenzorineurális halláscsökkenés és neurodegeneratív elváltozások. Emellett a *WFS1* mutációit leírták dominánsan öröklődő nem-szindrómás halláscsökkenésekben is, mely döntően a mély frekvenciákat érinti (Cryns és mtsai 2002; Fukuoka és mtsai 2007; Kasakura-Kimura és mtsai 2017). Több kutatócsoport is kimutatta, hogy az autoszomális domináns módon öröklődő Wolfram-like szindrómában is a *WFS1* gén különböző mutációi állnak. Ebben a betegségben az általában veleszületett, súlyos fokú halláscsökkenés mellett opticus neuropathiában vagy diabetes mellitusban szenvednek a betegek (Eiberg és mtsai 2006; Hogewind és mtsai 2010; Rendtorff és mtsai 2011). A c.2389 helyen bekövetkező pontmutáció egy aszpartát-valin cserét eredményez a fehérje 797-es pozíciójában és AD öröklődésmentet mutató halláscsökkenéssel hozták összefüggésbe (Bai és mtsai 2014). A második család vizsgálata során talált c.2390A>T pontmutáció ugyanezen aminosavcserét eredményezi, amely a vizsgált betegeinknél tapasztalt autoszomális domináns öröklésmentet alátámasztja. Az édesapa későbbi életkorban manifesztálódott szemészeti betegsége a Wolfram-like-szindróma meglétét valószínűsíti. Fontos megjegyezni, hogy az index személyekben egyelőre csak súlyos

fokú perцепciós halláscsökkenés mutatható ki, esetükben szoros szemészeti és diabetológiai követés feltétlen javasolt.

A harmadik családnál típusos autoszomális recesszív öröklődésmentet mutató nem-szindrómás halláscsökkenés igazolódott. Egészséges, halló szülőknek 3 halláscsökkenett gyermeke született. Mind a szülőknél, mind a gyermekeknél elvégeztük a *GJB2* szekvencaanalízisét. Két halláscsökkenett gyermeknél (P III/1, P III/3) és az ép hallású édesapánál (P II/2) is a *GJB2* génben a p.L90P mutációt találtuk heterozigóta formában. A genotípus és fenotípus nem egyértelmű összefüggése miatt WES vizsgálat történt, mely a *TRIOBP* génben compound heterozigóta formában a c.2581C>T (p.R861X) (Exon7) és a c.5014G>T (p.G1672X) (Exon 9) mutációt találta. A szülők szegregációs vizsgálata igazolta a biallélikus eredetet. A *TRIOBP* (DFNB28) autoszomális recesszív öröklésmentetű halláscsökkenésért felelős. A gén a 22-es kromoszóma hosszú karján helyezkedik el (22q13.1) és az általa kódolt fehérje a „TRIO and F-actin binding protein”, ami 7 izoformával rendelkezik. A *TRIOBP-1* ubiquiter megjelenésű, míg a *TRIOBP-4* és *TRIOBP-5* a szemben és a cochleában expresszálódik. Általános feladata a sejten belüli aktinfilamentumok szervezése. A szőrsejtekben a sztereocíliumokban lévő aktinfilamentumok szerveződéséért és kötegekbe rendezéséért felelős (19. ábra). A három kódolt fehérje különböző hosszúságú, attól függően, hogy a gén hány exonja íródik át. A *TRIOBP-1* a 11-24-es exonokat, a *TRIOBP-4* az 1-6 exonokat és a *TRIOBP-5* az 1-24 exonokat tartalmazza.



19. ábra: A *TRIOBP* szerepe egészséges cochlea esetén (fent) és mutáció esetén (alul).

[forrás: (Boutet de Monvel és Petit 2010)]

Hang hatására a sztereocíliumok elmozdulnak, a *TRIOBP* biztosítja a sztereocílium újrarendeződését (fent). Amennyiben funkcióját elveszti, a sztereocíliumok rigiddéválnak, a mozgásuk megszűnik (lent), mely halláscsökkenést okoz

A c.2581C>T az Exon7-ben helyezkedik el és a protein 861-es pozíciójában, míg a c.5014G>T az Exon9-ben helyezkedik el és a fehérje 1672-es pozíciójában okoz stopkodon-beépülést (p.R861X, p.G1672X). Mindkét exon az előbbiekből következően csak a *TRIOBP*-5-ben helyezkedik el. Az eddigi *TRIOBP* gén által okozott halláscsökkenésekben leírt mutációk az Exon6-ban helyezkedtek el. Az általunk talált mutációk a szakirodalomban eddig nem szerepelnek, az *in silico* vizsgálatok ismeretlen patogenitást igazoltak. P III/1 és P III/3 esetén a *GJB2* gén p.L90P heterozigóta mutáció mellett mindkét *TRIOBP* mutáció megtalálható. Feltételezhetnénk, hogy ezen két gén

mutációinak együttes előfordulása a tünetek súlyosbodásához vezethet. Azonban azon betegek, akik mindhárom mutációt hordozzák (P III/1, P III/2) eltérő súlyosságú halláscsökkenésben szenvednek, valamint az édesapa, aki a *GJB2* génre és a *TRIOBP* génre is heterozigótának igazolódott, ép hallású (P II/2). Így arra következtethetünk, hogy a *TRIOBP* és a *GJB2* gén fenti mutációi nem állnak kölcsönhatásban egymással, valamint arra, hogy a *TRIOBP* génben bekövetkező [c.2581C>T/c.5014G>T] compound heterozigóta mutáció halláscsökkenést okozhat önmagában is. Az, hogy a TRIO-binding protein mutációi pontosan milyen patomechanizmust indítanak el, további funkcionális fehérjevizsgálatokat tenne szükségessé.

7.4. A mitokondriális mutációk

Az aminoglikozid antibiotikumokat elsősorban az intenzív osztályokon és perinatális intenzív centrumokban használják. Előnyeik között szerepel, hogy baktericid hatásúak és súlyos fertőzéseket okozó Gram-negatív kórokozók ellen hatásos szerek. Egyre inkább előtérbe kerül multirezisztens, illetve extrém rezisztens tuberculosis kezelésében is (Richard H Drew 2017). Perinatális intenzív centrumokban (PIC) a szepszis megelőzésében alkalmazott szerek. Koraszülöttek esetén a születést követő 72 órán belül adott egyszeri dózis a szepszis kialakulásának esélyét jelentősen csökkenti. Amennyiben ennek ellenére a fertőzés kialakul, úgy a PIC osztályokon további 10-14 napig alkalmazott szer (Jiang, Karasawa, és Steyger 2017). Ezen hosszú alkalmazást követően figyeltek meg toxikus károsodásokat. Vizsgálatok kimutatták, hogy szerkezeti különbségeik miatt az egyes hatóanyagok különböző fokban károsítják a szerveket. Bár minden szernek van ototoxikus és vesztibulotoxikus hatása is, a gentamicin és tobramycin inkább vesztibulotoxikus, míg az amikacin, neomycin és kanamycin inkább ototoxikus mellékhatásokkal bír (Jiang, Karasawa, és Steyger 2017).

A legismertebb patomechanizmus szerint a mitokondriális genom A1555 és C1494 pozíciója játszik döntő szerepet az aminoglikozid indukálta ototoxicitásban (Zhao és mtsai 2004; Prezant és mtsai 1993). Az itt kialakuló pontmutációk az aminoglikozidok erőteljesebb kötődését idézik elő és a fehérjeszintézis transzlációs fázisát befolyásolják a mitokondriumban. Erre irányuló vizsgálatok szerint aminoglikozid adását követően a betegek 10-20%-ában alakul ki halláscsökkenés (Forge and Schacht 2000). Ezen okok és az ismert mellékhatások miatt felvetődött a kérdés, hogy érdemes-e rutinszerűen szűrni

ezeket a betegeket az aminoglikozid adása előtt. A 1555 A>G mutáció előfordulását több populációban is vizsgálták (13. táblázat). Európában a vizsgálatok alapján a nem-szindrómás halláscsökkenéssel rendelkező beteg körében az előfordulás 0,8-2,6 % közötti (Jacobs és mtsai 2005; ØStergaard és mtsai 2002; Tekin, Duman, Boğoçlu, İncesulu, és mtsai 2003; Kupka, Tóth, és mtsai 2002), míg ez az arány az ázsiai populációkban magasabb (2,9- 5,4%) (Li és mtsai 2005; Malik és mtsai 2003; Usami és mtsai 2000).

**13.táblázat: A 1555 A>G előfordulása és allélfrekvenciája különböző populációkban,
nem-szindrómás halláscsökkenetek és egészséges kontroll csoportokban**

(A tanulmányokat melyekben kontrollcsoport nem szerepelt „-”, -vel jelöltük)

Ország	Esetszám		1555A>G betegek száma		1555A>G Allélfrekvencia (%)		Referencia
	NSHL	Kontroll	NSHL	Kontroll	NSHL	Kontroll	
Finnország	227	-	0	-	0	-	(Jacobs és mtsai 2005)
Görögország	418	-	2	-	0,4	-	(Kokotas és mtsai 2009)
Németország	139	160	1	0	0,7	0,60	(Kupka, Tóth, és mtsai 2002)
Spanyolország	219	-	2	-	0,9	-	(Morales Angulo és mtsai 2011)
Olaszország	128	-	2	-	1,5	-	(Jacobs és mtsai 2005) Jacobs
Magyarország	56	224	0	0	1,8	0,44	(Kupka, Tóth, és mtsai 2002)
Törökország	168	-	3	-	1,8	-	(Tekin, Duman, Boğoçlu, İncesulu, és mtsai 2003)
Dánia	85	-	2	-	2,4	-	(Østergaard és mtsai 2002)
Lengyelország	125	89	3	0	2,4	1,1	(Kupka, Tóth, és mtsai 2002)
Egyesült Királyság	80	-	2	-	2,5	-	(Bademci és mtsai 2016)
Kína	68	354	2	0	2,9	0	(Li és mtsai 2005)
Korea	281	-	9	-	3,2	-	(Bae és mtsai 2012)
Japán	319	-	11	-	3,4	-	(Usami és mtsai 2000)
Indonézia	75	100	4	0	5,3	0	(Malik és mtsai 2003)
Argentína	-	1042	-	0	-	0	(Gravina és mtsai 2007)
Magyarország	269	128	1	0	0,37	0	*jelen vizsgálat

Jelen vizsgálatunk alapján 1 esetben tudtunk 1555 A>G mutációt kimutatni, mely 0,37%-os allélfrekvenciát jelent a nem-szindrómás halláscsökkenet betegek körében, míg a mutáció a kontroll csoportban nem fordult elő. A korábbi, magyar populációt célzó vizsgálatnál valamint az egyéb országokhoz képest is jelentősen alacsonyabb frekvenciát találtunk (Kupka, Tóth, és mtsai 2002) (13. táblázat). Emellett kiemelendő, hogy a bizonyítottan aminoglikozid-expozíción átesett NSHL betegeink között egyik általunk vizsgált mitokondriális mutáció sem fordult elő. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a 1555 A>G és a 1494 C>T mitokondriális mutációk vizsgálata a magyar népesség körében tapasztalt alacsony mutációs rátája miatt aminoglikozid antibiotikum adását megelőzően rutinszerűen nem szükséges. A halláscsökkenés hátterében feltehetőleg egyéb patomechanizmusok játszhatnak szerepet, így elsősorban a prevencióra kell fektetni a hangsúlyt. Primer prevenció részeként lehetőleg az aminoglikozidok adását el kell kerülni. Ha a fertőzés ezt mégis indokolja, úgy a legkevésbé ototoxikus szer a választandó, a lehető legrövidebb ideig, emellett a hallás monitorozására hangsúlyt kell fektetni a halláscsökkenés mihamarabbi felismerése céljából (szekunder prevenció). Szekunder prevenció részeként felmerült otoprotektív szerek adásának lehetősége is. *In vivo* állatmodelleken végzett kísérletek alapján a jövőben a MAO-B-gátló rasagilin jó hatásfokú lehet az aminoglikozid indukálta ototoxicitás csökkentésében (Polony és mtsai 2014). Amennyiben a halláscsökkenés kialakult, úgy a rehabilitációra kell fektetni a hangsúlyt és ezen betegek hallókészülékkel, illetve cochlearis implantátummal történő ellátása javasolt.

7.5. A genetikai eredmények hatása a mindennapi klinikai gyakorlatra

Kutatásunkat egy széles betegpopuláción és kontroll csoporton végeztük. Dolgozatunknak emellett, hogy molekuláris biológiai eredményeket prezentál, mindenképpen célja volt, hogy egy átfogó képet adjon és segítséget nyújtson a klinikusoknak a mindennapi gyakorlatban.

Fontos tudni, hogy ezen genetikai vizsgálatok a dolgozat megírásakor minden beteg számára elérhetőek. Azonban mégis kiknél érdemes elvégezni? Mit tudunk meg az eredményekből és mit mutat meg az orvosnak és a betegnek?

Eredményeink alapján elmondható, hogy elsősorban a bilaterális közepes-, illetve annál súlyosabb fokú halláscsökkenet betegek körében érdemes a *GJB2* vizsgálatokat elvégezni. Sem az egyoldali, sem a kétoldali, kisfokú halláscsökkenésben nem fordul elő nagy számban patogén allél. Felnőttkorban kialakult egyoldali vagy kisfokú halláscsökkenés esetén a *GJB2* vizsgálat elvégzése megfontolandó, a betegnek felajánlható, de rutinszerűen elvégezni jelen kutatásunk eredményei alapján nem szükséges. Gyermekkorban kialakult kisfokú halláscsökkenés esetén a feltételezhető progresszió miatt a *GJB2* vizsgálata továbbra is javasolt. Amennyiben a *GJB2* génben patogén eltérés igazolódott, fontos annak tisztázása, hogy a beteg homozigóta vagy heterozigóta az adott eltérésre. A magyar és európai populációban a c.35delG a leggyakoribb mutáció. Ezen eltérés homozigóta formában az esetek döntő többségében prelingualis kezdetű, súlyos fokú halláscsökkenésben manifesztálódik. Progresszív halláscsökkenést mutató, postlingualis c.35delG homozigóta esetünk rávilágít arra, hogy ezen haplotípus hordozása előbb vagy utóbb, de súlyos fokú halláscsökkenést eredményez. A postlingualisan kezdődő c.35delG homozigóta betegek szoros audiológiai kontrollja feltétlen javasolt, mely előfeltétele az eredményes hallásrehabilitációnak.

A *GJB2* gén patogén mutációinak compound heterozigóta eltérése esetén mindenképpen fontos a mutációk típusát, nem-inaktiváló vagy inaktiváló voltát, meghatározni. Ha inaktiváló/inaktiváló a genotípus, úgy számítani lehet a prelingualis, súlyos fokú halláscsökkenésre, míg inaktiváló/nem-inaktiváló vagy nem-inaktiváló/nem-inaktiváló kombináció esetén enyhébb formára számíthatunk. Eredményeink azt mutatták, hogy minden compound heterozigóta betegnél a 18. életév előtt alakul ki a halláscsökkenés.

Minden beteg esetében nagyon fontos a pontos anamnéziszfelvétel, mely a családi halmozódásra is terjedjen ki. Ha egy beteg családjában halmozottan fordul elő halláscsökkenés és emellett a *GJB2* szekvenciaanalízise során mutáció nem igazolódott, vagy csak heterozigóta formában, úgy javasolt az újgenerációs szekvenálás elvégzése. Tanulmányunkban is látott 60%-os sikerráta alátámasztja, hogy ezen vizsgálatokat megfelelően szelektált családokban érdemes elvégezni. Kiemelendő azonban, hogy a relatív új, még sok tapasztalatot igénylő technológia miatt a vizsgálati eredmények nagyon gondos és óvatos, a meglévő klinikai adatokkal együttes értékelése szükséges.

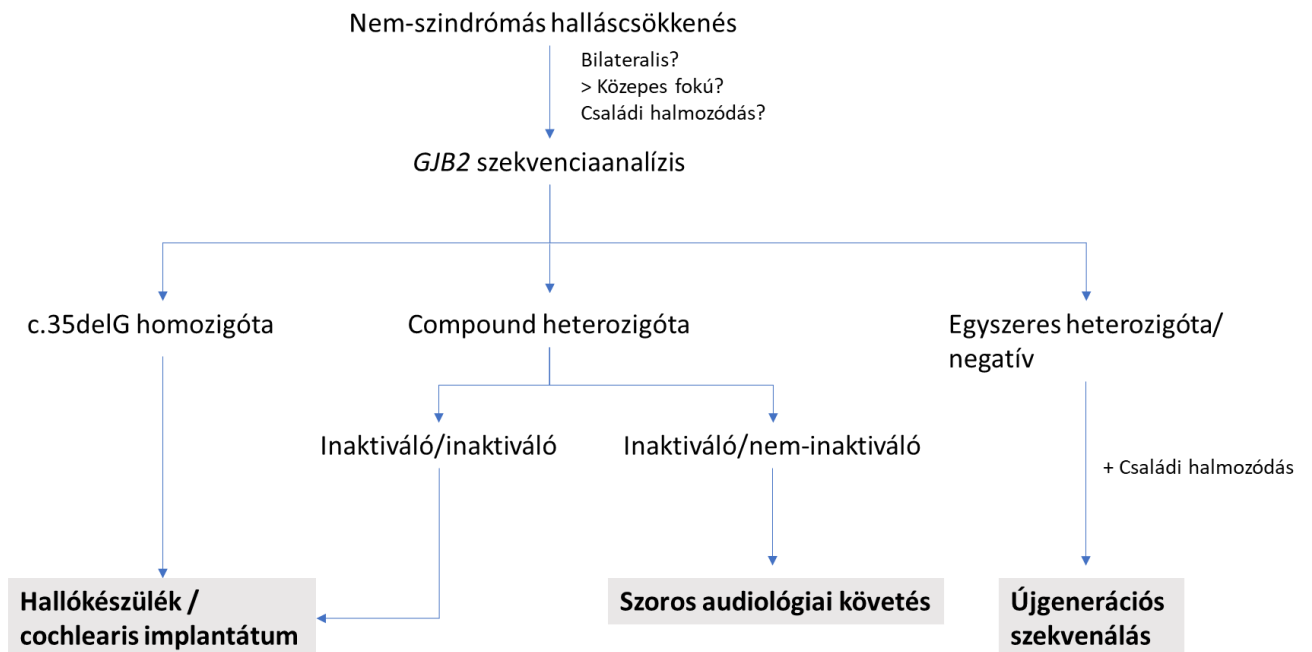
Eredményeink alapján felállítottunk egy folyamatábrát, mely a klinikusok munkáját nagyban segítheti a genetikai vizsgálatok útvesztőjében való tájékozódásban (20. ábra). Az ábra bemutatja, hogy mikor érdemes genetikai vizsgálatot kérni, valamint, hogy annak eredményével milyen terápia, audiológiai utánkövetés, illetve szükség esetén kiterjesztett genetikai vizsgálat javasolt.

A mitokondriális 1555 A>G és 1494 C>T mutációk tekintetében elmondható, hogy az aminoglikozid indukálta halláscsökkenésben valószínűleg kevésbé van szerepük a magyar populációban. Úgy gondoljuk, hogy aminoglikozid adását megelőzően rutinszerűen nem érdemes a genetikai vizsgálatot elvégezni. Abban az esetben, ha a családban több halláscsökkenett személy is van, vagy anyai ágon felmerül mitokondriális halláscsökkenés lehetősége, úgy a vizsgálat elvégzése mérlegelendő. Az aminoglikozidok esetében azonban a hangsúly még mindig elsősorban a prevencióra helyezendő (primer, szekunder prevenció).

18 év alatti betegek között előforduló etiológiai tényezők alapján is több szempont kiemelendő. Fontos kiemelnünk, hogy veleszületett halláscsökkenés gyanúja esetén a gyermeket ellátó orvoskollégák időben a megfelelő centrumba irányítsák ezeket a betegeket. A 2015 májusában életbe lépő hallásszűrés-protokoll részletesen taglalja a gyermekkori hallásszűrések időpontját és az ellátó intézményeket (Emberi Erőforrások Minisztériuma – Egészségügyért Felelős Államtitkárság 2015). Az új protokolltól azt várhatjuk, hogy még több halláscsökkenett gyermek kerül kiszűrésre és jut el a rehabilitáció szempontjából megfelelő időben az adott centrumokba.

Elmondhatjuk, hogy az esetek 62,9%-ában tudtuk kimutatni a vizsgált gyermek betegpopulációban a súlyos fokú halláscsökkenés okát. Legnagyobb arányban a *GJB2*

gén eltérései igazolódtak. A genetikai vizsgálatok eredménye és a klinikai kép együttes értékelése azt támasztja alá, hogy a genetikai eredetű halláscsökkenéses betegek rendszeres fül-orr-gégészeti és audiológiai kontrollja mindenképp javasolt. Amennyiben a halláscsökkenés prelingualis eredetű, úgy hallókészülékkel, illetve adott esetben cochlearis implantátummal való rehabilitáció biztosítja a gyermek megfelelő beszédfejlődését és integrálódását a társadalomba. A cochlearis implantáció mind a prelingualis, mind a postlingualis súlyos fokú halláscsökkenésben, fiatal és idős betegekben egyaránt jó eredményt ad mind a hallás, mind a beszédértés javításában. Prelingualis betegeket 3 éves kor előtt, de legkésőbb 6 éves korig szükséges cochlearis implantátummal ellátni, ugyanis a hallópályák plaszticitása 6 éves kor körül jelentősen beszűkül. Az időben megkezdett rehabilitáció a gyermek egész életére kihat, cochlearis implantációval a süket gyermekek halláshoz köthető életminőségét a normál hallókéhoz hasonlóra lehet javítani, mely az egyén és a társadalom működése szempontjából is alapvető fontosságú.



20. ábra: A nem-szindrómás halláscsökkenett beteg genetikai és audiológiai diagnosztikai és terápiás lépéseit bemutató folyamatábra

8. Következtetések

PhD munkám során a szenzorineurális halláscsökkenéssel rendelkező betegek között vizsgáltuk a *GJB2* génben előforduló mutációkat, a mitokondriális 1555 A>G és 1494 C>T mutációk előfordulási gyakoriságát, valamint ezen mutációk klinikai megjelenésre gyakorolt hatását. Továbbá vizsgálatunk célja volt, hogy további halláscsökkenést okozó géneket térképezzünk fel, melyek családi halmozódást mutató *GJB2* negatív, valamint egyszeres heterozigóta betegeknél a halláscsökkenést magyarázhatják.

Kutatásaink kapcsán az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

- 1) Megállapítottuk, hogy a 18 év alatti cochlearis implantáción átesett betegcsoportban a leggyakoribb etiológiai tényező a *GJB2* gén patogén eltérése. Emellett az infekciós eredet és az aminoglikozid antibiotikum szerepelt nagy százalékban. Az esetek 62,9%-ában tudtuk meghatározni a halláscsökkenés eredetét.
- 2) Kimutattuk, hogy a *GJB2* génben leggyakrabban előforduló mutáció a c.35delG mutáció, mely 12,55%-os allélfrekvenciát mutat a nem-szindrómás halláscsökkenett betegeink között. A súlyos fokú, prelingualis halláscsökkenett 18 év alatti betegeink között a c.35delG 38,8%-os előfordulást mutat. A c.35delG mutáció mellett további 9 patogén eltérést azonosítottunk.
- 3) Megállapítottuk, hogy a c.35delG homozigóta betegek prelingualis, súlyos fokú halláscsökkenésben, míg a compound heterozigóta betegeink a mutáció fehérjeszintézisre gyakorolt hatásától függően különböző fokú halláscsökkenésben szenvednek.
- 4) A mutációk klinikai megjelenésben betöltött szerepe elsősorban a bilaterális, közepes fokú vagy annál súlyosabb halláscsökkenetek között jelentős. Felnőttkorban kialakult egyoldali, valamint kismértékű halláscsökkenéssel rendelkezőknél – egyes kivételes eseteket leszámítva – a *GJB2* vizsgálata nem szükséges. A gyermekkori halláscsökkenés esetén súlyossági foktól függetlenül javasolt a *GJB2* gén vizsgálata.
- 5) A *GJB2* negatív, valamint *GJB2* egyszeres heterozigóta, családi halmozódást mutató betegeink között újgenerációs szekvenálással három, a halláscsökkenésben már korábban leírt gén patogén szerepét találtuk. A géneknél talált négy mutációból három, a szakirodalomban eddig nem leírt új, feltételezhetően patogén mutációt találtunk. Ez

rámutat arra, hogy ezen betegek kiterjesztett genetikai vizsgálata feltétlen javasolt az etiológia tisztázása és a progresszió megjósolhatóságának céljából.

6) Kimutattuk, hogy a mitokondriális mutációk alacsony előfordulást mutatnak mind a halláscsökkenés, mind a kontroll csoportunkban. A 1555 A>G mutáció 0,37%-os allélfrekvenciát mutatott, míg a 1494 C>T mutáció nem fordult elő kohortunkban. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy ezen mutációk aminoglikozid antibiotikum adása előtti vizsgálatát rutinszerűen nem tartjuk indokoltnak. Az előfordulás alacsony mivolta elsősorban más patomechanizmusok jelenlétét feltételezi az aminoglikozid indukálta halláscsökkenés kialakulásában.

7) Felállítottunk egy diagnosztikára és terápiás javaslatra vonatkozó folyamatábrát, mely minden klinikus számára segítséget nyújthat a genetikai vizsgálatok kérésében és értékelésében, valamint a terápiás döntések meghozatalában. A genetikai eredménnyel együttesen megjósolható a klinikai kép alakulása, mely alapvető fontosságú az időben megkezdett hallásrehabilitáció szempontjából.

9. Összefoglalás

A veleszületett nem-szindrómás halláscsökkenések háttérében eddig több mint 100 gén azonosítottak, és az esetek 50%-ában a *GJB2* gén eltérései felelősek a megbetegedésért. Továbbá nagy arányban fordul elő aminoglikozid indukálta halláscsökkenés, mely háttérében mitokondriális DNS mutációk állnak.

Vizsgálatunk során 18 év alatti súlyos fokú halláscsökkenett, cochlearis implantáción átesett betegcsoportban vizsgáltuk a halláscsökkenést okozó etiológiai faktorok előfordulási gyakoriságát. Emellett nem-szindrómás szenzorineurális halláscsökkenéssel rendelkező betegekben és ép hallású kontrollcsoportban vizsgáltuk a *GJB2* gén, valamint a mitokondriális 1555 A>G és 1494 C>T mutációk előfordulását és klinikai megjelenésre kifejtett hatását. Családi halmazódást mutató halláscsökkenett betegeink körében egyéb, patogén szereppel bíró gének feltérképezése történt újgenerációs szekvenálással.

Eredményeinkből kiemelendő, hogy a 18 év alatti betegcsoportunkban 62,9%-ban állapítottuk meg a halláscsökkenés okát, a leggyakoribb oknak a *GJB2* génben a c.35delG mutáció igazolódott. A *GJB2* c.35delG mutáció allélfrekvenciája a cochlearis implantált betegcsoportban 38,8%, a nem-szindrómás halláscsökkenett csoportban 12,55%. A *GJB2* génben további 9 patogén mutációt találtunk. Klinikai megjelenést tekintve a c.35delG homozigóta betegek súlyos fokú halláscsökkenéssel, a compound heterozigóta betegek a mutáció típusától függően közepesfokútól súlyos fokúig terjedő halláscsökkenéssel rendelkeztek. A compound heterozigóta betegek esetén a betegség a 18. életév előtt kezdődött. A mitokondriális mutációkra fókuszáló vizsgálataink kimutatták, hogy a 1555 A>G alacsony előfordulást mutat (0,37%), a 1494 C>T mutáció pedig nem fordult elő betegeink között. Vizsgálataink a *GJB2* autoszomális recesszív öröklésmenetét igazolták.

A *GJB2* heterozigóta, illetve *GJB2* negatív családokban elvégzett újgenerációs szekvenálási vizsgálatok további három ismert gén (*DIAPH3*, *WFS1*, *TRIOBP*) egy ismert és három eddig nem leírt, új mutáció patogén szerepét vetették fel.

Mindezen eredményeink alapján elmondható, hogy halláscsökkenett betegeink genetikai kivizsgálása hozzájárul a korai diagnózishoz és segíti a minél korábbi minél szélesebb körű rehabilitációt, tehát a megfelelő szempontok szerint szelektált betegcsoportokban a genetikai vizsgálatoknak fontos szerep jut a mindennapi gyakorlatban.

10. Summary

Seventy percent of the congenital non-syndromic hearing loss has genetical origins and caused by mutations of the *GJB2* gene. The aminoglycosid-induced hearing loss is an increasing problem with the probable origin being different mutations of the mitochondrial genom.

In this study we analyzed the etiological factors of the profound sensorineural hearing loss in a patient group who underwent cochlear implantation before the age of 18 years. We analyzed the mutations of the *GJB2* gene and the mitochondrial *MT-RNR-1* A1555G and C1494T mutations in a non-syndromic hearing loss group and a control group as well. In patients with familiar aggregation of hearing loss whole exome sequencing were used to identify other genes, which could be correlated with the hearing impairment.

Our results show that the etiology of the hearing loss was described in 62.9% of the cochlear implant group. The most common origin was the c.35delG mutation of the *GJB2* gene. The c.35delG allele frequency is 38.8% in the cochlear implant group, 12.55% in the NSHL group. Nine other pathogen mutations were found in the *GJB2*. c.35delG homozygous patients had profound hearing loss, the compound heterozygous patients belonged to the moderate to profound range depending on the effect of the mutation type on the synthesis of the protein. The A1555G showed low frequency in the NSHL group (0.34%), the C1494T was detected in none of the patient groups. The study proves the autosomal recessive inheritance of the *GJB2* gene.

The whole exome sequencing in selected patients with heterozygous mutation or with no mutation in the *GJB2* found in 3 other already described genes (*DIAPH3*, *WFS1*, *TRIOBP*) one known and 3 new, probably pathogenic mutations in the background of the hearing impairment.

Based on our results we can tell, that the genetical examination of the NSHL patients helps in the early diagnosis and the prognosis as well to provide the early and sufficient hearing rehabilitation for these patients. The genetical tests in well selected patient groups have an important role in the everyday medical practice.

11. Irodalomjegyzék

- Adzhubei I A, Schmidt s, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7: 248-249.
- Ahmed ZM, Morell RJ, Riazuddin S, Gropman A, Shaukat S, Ahmad MM, Mohiddin SA, Fananapazir L, Caruso RC, Husnain T, Khan SN, Griffith AJ, Friedman TB, Wilcox ER. (2003) Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37. *Am J Hum Genet*, 72: 1315-1322.
- Alvarez A, del Castillo I, Villamar M, Aguirre LA, González-Neira A, López-Nevot A, Moreno-Pelayo MA, Moreno F. (2005) High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet A*, 137A: 255-258.
- Angeli S I. (2008) Phenotype/genotype correlations in a DFNB1 cohort with ethnical diversity. *Laryngoscope*, 118: 2014-2023.
- Bademci G, Foster J, Mahdieh N, Bonyadi M, Duman D, Cengiz FB, Menendez I, Diaz-Horta O, Shirkavand A, Zeinali S, Subasioglu A, Tokgoz-Yilmaz S, Huesca-Hernandez F, Arenas-Sordo MD, Dominguez-Aburto J, Hernandez-Zamora E, Montenegro P, Paredes R, Moreta G, Vinueza R, Villegas F, Mendoza-Benitez S, Guo S, Bozan N, Tos T, Incesulu A, Sennaroglu G, Blanton SH, Ozturkmen-Akay H, Yildirim-Baylan M, Tekin M. (2016) Comprehensive analysis via exome sequencing uncovers genetic etiology in autosomal recessive nonsyndromic deafness in a large multiethnic cohort. *Genetics in Medicine*, 18: 364-371.
- Bae JW, Kim DB, Choi JY, Park HJ, Lee JD, Hur DG, Bae SH, Jung DJ, Lee SH, Kim UK, Lee KY. (2012) Molecular and clinical characterization of the variable phenotype in Korean families with hearing loss associated with the mitochondrial A1555G mutation. *PLoS One*, 7: e42463.
- Bai X, Lv H, Zhang F, Liu J, Fan Z, Xu L, Han Y, Chai R, Li J, Wang H. (2014) Identification of a novel missense mutation in the WFS1 gene as a cause of autosomal dominant nonsyndromic sensorineural hearing loss in all-frequencies. *Am J Med Genet A*, 164A: 3052-3060.
- Ballana E, Ventayol M, Rabionet R, Gasparini P, Estivill X. (2018) Connexins and deafness Homepage, Accessed Oct 2018. <http://davinci.crg.es/deafness/>.
- Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH. (1993) Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262:2039-2042.
- Bespalova IN, Van Camp G, Bom SJ, Brown DJ, Cryns K, DeWan AT, Erson AE, Flothmann K, Kunst HP, Kurnool P, Sivakumaran TA, Cremers CW, Lea SML, Burmeister M, Lesperance MM. (2001) Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet*, 10: 2501-2508.
- Bicego M, Beltramello M, Melchionda S, Carella M, Piazza V, Zelante L, Bukauskas FF, Arslan E, Cama E, Pantano S, Bruzzone R, D'Andrea P, Mammano F. (2006) Pathogenetic role of the deafness-related M34T mutation of Cx26. *Hum Mol Genet*, 15: 2569-2587.

- Bork J M, Peters LM, Riazuddin S, Bernstein SL, Ahmed ZM, Ness SL, Polomeno R, Ramesh A, Schloss M, Srisailpathy CR, Wayne S, Bellman S, Desmukh D, Ahmed Z, Khan SN, Kaloustian VM, Li XC, Lalwani A, Bitner-Glindzicz M, Nance WE, Liu XZ, Wistow G, Smith, Griffith, Wilcox, Friedman TB, Morell RJ. (2001) Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am J Hum Genet*, 68: 26-37.
- Bors A , Andrikovics H, Kalmar L, Erdei N, Galambos S, Losonczy A, Furedi S, Balogh I, Szalai CS, Tordai A. (2004) Frequencies of two common mutations (c.35delG and c.167delT) of the connexin 26 gene in different populations of Hungary, *Int J Mol Med*, 14: 1105-1108.
- Boutet de Monvel J, Petit C. (2010) Wrapping up stereocilia rootlets. *Cell*, 141: 748-750.
- Burdon K P, Wirth MG, Mackey DA, Russell-Eggitt IM, Craig JE, Elder JE, Dickinson JL, Sale MM. (2004) A novel mutation in the Connexin 46 gene causes autosomal dominant congenital cataract with incomplete penetrance *J Med Genet*, 41: e106.
- Cama E, Melchionda S, Palladino T, Carella M, Santarelli R, Genovese E, Benettazzo F, Zelante L, Arslan E. (2009) Hearing loss features in GJB2 biallelic mutations and GJB2/GJB6 digenic inheritance in a large Italian cohort. *Int J Audiol*, 48: 12-17.
- Castro LS, Marinho AN, Rodrigues EM, Marques GC, Carvalho TA, Silva LC, dos Santos SE. (2013) A study of GJB2 and delGJB6-D13S1830 mutations in Brazilian non-syndromic deaf children from the Amazon region. *Braz J Otorhinolaryngol*, 79: 95-99.
- Clark JG. (1981) Uses and abuses of hearing loss classification. *ASHA*, 23: 493-500.
- ClinVar. (2019) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
- Cosetti MK., Lalwani AK. (2015) Is cochlear implantation safe and effective in the elderly? *Laryngoscope*, 125: 1279-1281.
- Cryns K, Orzan E, Murgia A, Huygen PL, Moreno F, del Castillo I, Chamberlin GP, Azaiez H, Prasad S, Cucci RA, Leonardi E, Snoeckx RL, Govaerts PJ, Van de Heyning PH, Van de Heyning CM, Smith RJ, Van Camp G. (2004) A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. *J Med Genet*, 41: 147-154.
- Cryns K., Pfister M, Pennings RJ, Bom SJ, Flothmann K, Caethoven G, Kremer H., Schatteman I, Köln KA, Tóth T, Kupka S, Blin N, Nürnberg P, Thiele H, van de Heyning PH, Reardon W, Stephens D, Cremers CW, Smith RJ, . Van Camp G. (2002) Mutations in the WFS1 gene that cause low-frequency sensorineural hearing loss are small non-inactivating mutations. *Hum Genet*, 110: 389-394.
- D'Andrea P, Veronesi V, Bicego M, Melchionda S, Zelante L, Di Iorio E, Bruzzone R, Gasparini P. 2002. 'Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin26 alleles', *Biochem Biophys Res Commun*, 296: 685-91.
- Dallos P., Harris D. (1978) Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol*, 41: 365-383.
- Danilenko N., Elena Merkulava Nina Danilenko1*, E., M. Olejnik Siniauskaya, O., A. Levaya-Smaliak, A. Alena Kushniarevich, A. Shymkevich, A. Davydenko. (2012) Spectrum of Genetic Changes in Patients with Non-Syndromic Hearing Impairment and Extremely High Carrier Frequency of 35delG GJB2 mutations in Belarus. *PLoS One*, 7: e36354.
- dbGAP. (2019) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap/>

- Dbouk HA., Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. (2009) Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Commun Signal*, 7: 4.
- dbSNP. (2018) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
- DVD. (2019) Deafness Variation Database. <http://deafnessvariationdatabase.org>
- del Castillo, I., Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Tellería D, Menéndez I, Moreno F. (2002) 'A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment', *N Engl J Med*, 346: 243-9.
- Denoyelle F., Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl HH, Middleton A, Houseman MJ, Dodé C, Marlin S, Boulila-ElGaïed A, Grati M, Ayadi H, BenArab S, Bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M., Loiselet J, El-Zir E, Auboïs A, Joannard A, Levilliers J., Garabédian EN, Mueller RF, GardnerRJ, Petit C. (1997) Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet*, 6: 2173-2177.
- Dippold S., Butsch F, Schopf R, Keilmann A. (2013) Vohwinkel syndrome. Hearing loss and keratoderma on the hands and feet. *HNO*, 61: 617-619.
- Donaudy F., Snoeckx R, Pfister M, Zenner HP, Blin N., Di Stazio M, Ferrara A, Lanzara C, Ficarella R, Declau F, Pusch CM, Nürnberg P, Melchionda S, Zelante L, Ballana E, Estivill X, Van Camp G, Gasparini P, Savoia A. (2004) Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4). *Am J Hum Genet*, 74: 770-776.
- Dong L, Li Z, Xue L, Li G, Zhang C, Cai Z, Li H, Guo R. (2018) DIAPH3 promoted the growth, migration and metastasis of hepatocellular carcinoma cells by activating beta-catenin/TCF signaling, *Mol Cell Biochem*, 438: 183-190.
- Doshi D C, Limdi PK, Parekh NV, Gohil NR. (2016) Oculodentodigital dysplasia, *Indian J Ophthalmol*, 64: 227-230.
- Durisin M, Bartling S, Arnoldner C, Ende M, Prokein J, Lesinski-Schiedat A, Lanfermann H, Lenarz T, Stöver T. (2010) Cochlear osteoneogenesis after meningitis in cochlear implant patients: a retrospective analysis. *Otol Neurotol*, 31: 1072-1078.
- Dzhemileva L U, Barashkov NA, Posukh OL, Khusainova RI, Akhmetova VL, Kutuev IA, Gilyazova IR, Tadinova VN, Fedorova SA, Khidiyatova IM, Lobov SL, Khusnutdinova EK. (2010) Carrier frequency of GJB2 gene mutations c.35delG, c.235delC and c.167delT among the populations of Eurasia. *J Hum Genet*, 55: 749-754.
- Eiberg H, Hansen L, Kjer B, Hansen T, Pedersen O, Bille M, Rosenberg T, Tranebjaerg L. (2006) Autosomal dominant optic atrophy associated with hearing impairment and impaired glucose regulation caused by a missense mutation in the WFS1 gene. *J Med Genet*, 43: 435-440.
- Emberi Erőforrások Minisztériuma – Egészségügyért Felelős Államtitkárság. (2015) "Az Emberi Erőforrások Minisztériuma szakmai irányelve a 0–18 éves korú gyermekek teljes körű, életkorhoz kötött hallásszűréséről és a kiszűrt gyermekek gondozásba, rehabilitációba vételéről." In.
- Erbe CB, Harris KC, Runge-Samuelson CL, Flanary VA, Wackym PA. (2004) Connexin 26 and connexin 30 mutations in children with nonsyndromic hearing loss. *Laryngoscope*, 114: 607-611.
- Exome Aggregation Consortium. (2017) (<http://exac.broadinstitute.org>).

- Exome Variant Server. (02 2018) NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP). <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
- Feldmann D, Denoyelle F, Loundon N, Weil D, Garabedian EN, Couderc R, Joannard A, Schmerber S, Delobel B, Leman J, Journal H, Catros H, Ferrec C, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Moati L, Petit C, Marlin S. (2004) Clinical evidence of the nonpathogenic nature of the M34T variant in the connexin 26 gene. *Eur J Hum Genet*, 12: 279-284.
- Forge A, Schacht J. (2000) Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurootol*, 5: 3-22.
- Frei K, Lucas T, Ramsebner R, Schöfer C, Baumgartner WD, Weipoltshammer K, Erginel-Unaltuna N, Wachtler FJ, Kirschhofer K. (2004) A novel connexin 26 mutation associated with autosomal recessive sensorineural deafness. *Audiol Neurootol*, 9: 47-50.
- Fukuoka H, Kanda Y, Ohta S, Usami S. (2007) Mutations in the WFS1 gene are a frequent cause of autosomal dominant nonsyndromic low-frequency hearing loss in Japanese. *J Hum Genet*, 52: 510-515.
- Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brøndum-Nielsen K, Metspalu A, Oitmaa E, Pisano M, Fortina P, Zelante L, Estivill X. (2000) High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet*, 8: 19-23.
- GeneReviews®, Ardinger HH, Adam MP, Pagon RA, eds, mtsai, editors. 1993-2018. *WFS1-Related Disorders* (Seattle (WA): University of Washington, Seattle;).
- Goderis J, De Leenheer E, Smets K, Van Hoecke H, Keymeulen A, Dhooge I. (2014) Hearing loss and congenital CMV infection: a systematic review, *Pediatrics*, 134: 972-982.
- Gravina LP, Foncuberta ME, Estrada RC, Barreiro C, Chertkoff L. (2007) Carrier frequency of the 35delG and A1555G deafness mutations in the Argentinean population. Impact on the newborn hearing screening. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 71: 639-643.
- Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJ. (1999) Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *JAMA*, 281: 2211-2216.
- Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, Melchionda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N, Rabionet R, Arbones M, Monica MD, Estivill X, Zelante L, Lang F, Gasparini P. (1999) Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet*, 23: 16-18.
- Grünewald A, Rygiel KA, Hepplewhite PD, Morris CM, Picard M, Turnbull DM. (2016) Mitochondrial DNA Depletion in Respiratory Chain-Deficient Parkinson Disease Neurons. *Ann Neurol*, 79: 366-378.
- Hobbie SN, Bruell CM, Akshay S, Kalapala SK, Shcherbakov D, Böttger EC. (2008) Mitochondrial deafness alleles confer misreading of the genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 3244-3249.
- Hoffman H J, Dobie RA, Losonczy KG, Themann CL, Flamme GA. (2017) Declining Prevalence of Hearing Loss in US Adults Aged 20 to 69 Years. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 143: 274-285.
- Hogewind BF, Pennings RJ, Hol FA, Kunst HP, Hoefsloot HE, Cruysberg JR, Cremers CW. (2010) Autosomal dominant optic neuropathy and sensorineural hearing loss associated with a novel mutation of WFS1. *Mol Vis*, 16: 26-35.

- Homans N C, Metselaar RM, Dingemans JG, van der Schroeff MP, Brocaar MP, Wieringa MH, Baatenburg de Jong RJ, Hofman A, Goedegebure A. (2017) Prevalence of age-related hearing loss, including sex differences, in older adults in a large cohort study. *Laryngoscope*, 127: 725-730.
- Houseman M J, Ellis LA, Pagnamenta A, Di WL, Rickard S, Osborn AH, Dahl HH, Taylor GR, Bitner-Glindzicz M, Reardon W, Mueller RF, Kelsell DP. (2001) Genetic analysis of the connexin-26 M34T variant: identification of genotype M34T/M34T segregating with mild-moderate non-syndromic sensorineural hearing loss. *J Med Genet*, 38: 20-25.
- <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02132130>.
- Illumina. (2017) An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. In: Illumina Inc.
- Iranome (2019) www.iranome.ir
- Jacobs H T, Hutchin TP, Käppi T, Gillies G, Minkkinen K, Walker J, Thompson K, Rovio AT, Carella M, Melchionda S, Zelante L, Gasparini P, Pyykkö I, Shah ZH, Zeviani M, Mueller RF. (2005) Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment. *Eur J Hum Genet*, 13: 26-33.
- Jiang M, Karasawa T, Steyger PS. (2017) Aminoglycoside-Induced Cochleotoxicity: A Review. *Front Cell Neurosci*, 11: 308.
- Joseph A Y, Rasool TJ. (2009) High frequency of connexin26 (GJB2) mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the population of Kerala, India. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 73: 437-443.
- Kasakura-Kimura N, Masuda M, Mutai H, Masuda S, Morimoto N, Ogahara N, Misawa H, Sakamoto H, Saito K, Matsunaga T. (2017) WFS1 and GJB2 mutations in patients with bilateral low-frequency sensorineural hearing loss *Laryngoscope*, 127: E324-E329.
- Kecskeméti N, Szönyi M, Gáborján A, Küstel M, Milley GM, Süveges A, Illés A, Kékesi A, Tamás L, Molnár MJ, Szirmai Á, Gál A. (2018) Analysis of GJB2 mutations and the clinical manifestation in a large Hungarian cohort. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 275:2441-2448.
- Kecskeméti N, Szönyi M, Küstel M, Gáborján A, Tamás L, Répássy G. (2019) Cochlear implantation under local anesthesia: a possible alternative for elderly patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 276: 1643-1647.
- Kecskeméti N, Gáborján A, Szönyi M, Küstel M, Baranyi I, Molnár MJ, Tamás L, Gál A, Szirmai Á, (2019) Halláscsökkenést okozó etiológiai tényezők cochlearis implantáción átesett gyerekeknél. *160*: 822-829.
- Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ. (1998) Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet*, 62: 792-799.
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM. (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387: 80-83.
- Kesser BW, Lalwani AK. (2009) Gene therapy and stem cell transplantation: strategies for hearing restoration. *Adv Otorhinolaryngol*, 66: 64-86.
- Khan SY, Ahmed ZM, Shabbir MI, Kitajiri S, Kalsoom S, Tasneem S, Shaiq S, Ramesh A, Srisailpathy S, Khan SN, Smith RJ, Riazuddin S, Friedman TB. (2007) Mutations of the RDX gene cause nonsyndromic hearing loss at the DFNB24 locus. *Hum Mutat*, 28: 417-423.

- Kim J, Moody JP, Edgerly CK, Bordiuk OL, Cormier K, Smith K, Beal MF, Ferrante RJ. (2010) Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 19: 3919-3935.
- Kim SY, Park G, Han KH, Kim A, Koo JW, Chang SO, Oh SH, Park WY, Choi BY. (2013) Prevalence of p.V37I variant of GJB2 in mild or moderate hearing loss in a pediatric population and the interpretation of its pathogenicity *PLoS One*, 8: e61592.
- Kim T B, Isaacson B, Sivakumaran TA, Starr A, Keats BJ, Lesperance MM. (2004) A gene responsible for autosomal dominant auditory neuropathy (AUNA1) maps to 13q14-21. *J Med Genet*, 41: 872-876.
- Kitahara T, Li HS, Balaban CD. (2005) Changes in transient receptor potential cation channel superfamily V (TRPV) mRNA expression in the mouse inner ear ganglia after kanamycin challenge *Hear Res*, 201: 132-144.
- Kokotas H, Grigoriadou M, Korres GS, Ferekidou E, Papadopoulou E, Neou P, Giannoulia-Karantana A, Kandiloros D, Korres S, Petersen MB. (2009) The A1555G mitochondrial DNA mutation in Greek patients with non-syndromic, sensorineural hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun*, 390: 755-757.
- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lütjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ. (1999) KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell*, 96: 437-446.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm, *Nat Protoc*, 4: 1073-1081.
- Kupka S, Braun S, Aberle S, Haack B, Ebauer M, Zeissler U, Zenner HP, Blin N, Pfister M. (2002) Frequencies of GJB2 mutations in German control individuals and patients showing sporadic non-syndromic hearing impairment. *Hum Mutat*, 20: 77-78.
- Kupka S, Tóth T, Wróbel M, Zeissler U, Szyfter W, Szyfter K, Niedzielska G, Bal J, Zenner HP, Sziklai I, Blin N, Pfister M. (2002) Mutation A1555G in the 12S rRNA gene and its epidemiological importance in German, Hungarian, and Polish patients. *Hum Mutat*, 19: 308-309.
- Lazar C, Popp R, Trifa A, Mocanu C, Mihut G, Al-Khzouz C, Tomescu E, Figan I, Grigorescu-Sido P. (2010) Prevalence of the c.35delG and p.W24X mutations in the GJB2 gene in patients with nonsyndromic hearing loss from North-West Romania. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 74: 351-355.
- Lazard D S, Giraud AL, Gnansia D, Meyer B, Sterkers O. (2012) Understanding the deafened brain: implications for cochlear implant rehabilitation. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 129: 98-103.
- Lee JR, White TW. (2009) Connexin-26 mutations in deafness and skin disease. *Expert Rev Mol Med*, 11: e35.
- Li XC, Everett LA, Lalwani AK, Desmukh D, Friedman TB, Green ED, Wilcox ER. (1998) A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet*, 18: 215-217.
- Li Z, Li R, Chen J, Liao Z, Zhu Y, Qian Y, Xiong S, Heman-Ackah S, Wu J, Choo DI, Guan MX. (2005) Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Hum Genet*, 117: 9-15.
- Liu XZ, Ouyang XM, Xia XJ, Zheng J, Pandya A, Li F, Du LL, Welch KO, Petit C, Smith RJ, Webb BT, Yan D, Arnos KS, Corey D, Dallos P, Nance WE, Chen

- ZY. (2003) Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss *Hum Mol Genet*, 12: 1155-1162.
- Liu XZ, Walsh J, Mburu P, Kendrick-Jones J, Cope MJ, Steel KP, Brown SD. (1997) Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet*, 16: 188-90.
- Löppönen T, Dietz A, Väisänen ML, Valtonen H, Kosunen A, Hyvärinen A, Ignatius J, Löppönen H. (2012) Homozygous M34T mutation of the GJB2 gene associates with an autosomal recessive nonsyndromic sensorineural hearing impairment in Finnish families. *Acta Otolaryngol*, 132: 862-873.
- Lucotte G. (2007) High prevalences of carriers of the 35delG mutation of connexin 26 in the Mediterranean area. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 71: 741-746.
- Lynch E D, Lee MK, Morrow JE, Welcsh PL, León PE, King MC. (1997) Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the Drosophila gene diaphanous. *Science*, 278: 1315-1318.
- Mahdieh N, Rabbani B. (2009) Statistical study of 35delG mutation of GJB2 gene: a meta-analysis of carrier frequency. *Int J Audiol*, 48: 363-370.
- Malik SG, Pieter N, Sudoyo H, Kadir A, Marzuki S. (2003) Prevalence of the mitochondrial DNA A1555G mutation in sensorineural deafness patients in island Southeast Asia. *J Hum Genet*, 48: 480-483.
- Marcotti W, van Netten SM, Kros CJ. (2005) The aminoglycoside antibiotic dihydrostreptomycin rapidly enters mouse outer hair cells through the mechano-electrical transducer channels. *J Physiol*, 567: 505-521.
- Margulis L. (1975) Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*: 21-38.
- Marlin S, Feldmann D, Blons H, Loundon N, Rouillon I, Albert S, Chauvin P, Garabédian EN, Couderc R, Odent S, Joannard A, Schmerber S, Delobel B, Leman J, Journel H, Catros H, Lemarechal C, Dollfus H, Eliot MM, Delaunoy JL, David A, Calais C, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Goizet C, Duriez F, Fellmann F, Hélias J, Vigneron J, Montaut B, Matin-Coignard D, Faivre L, Baumann C, Lewin P, Petit C, Denoyelle F. (2005) GJB2 and GJB6 mutations: genotypic and phenotypic correlations in a large cohort of hearing-impaired patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 131: 481-487.
- Martínez AD, Acuña R, Figueroa V, Maripillan J, Nicholson B. (2009) Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss. *Antioxid Redox Signal*, 11: 309-322.
- Mburu P, Mustapha M, Varela A, Weil D, El-Amraoui A, Holme RH, Rump A, Hardisty RE, Blanchard S, Coimbra RS, Perfettini I, Parkinson N, Mallon AM, Glenister P, Rogers MJ, Paige AJ, Moir L, Clay J, Rosenthal A, Liu XZ, Blanco G, Steel KP, Petit C, Brown SD. (2003) Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause deafness in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat Genet*, 34: 421-428.
- Medica I, Rudolf G, Balaban M, Peterlin B. (2005) C.35delG/ GJB2 and del(GJB6-D13S1830) mutations in Croats with prelingual non-syndromic hearing impairment. *BMC Ear Nose Throat Disord*, 5: 11.
- MedScape. 2016. Indication for Cochlear Implantation
- Meşe G, Richard G, White TW. (2007) Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127: 2516-2524.

- Minárik G, Tretinárová D, Szemes T, Kádasi L. (2012) Prevalence of DFNB1 mutations in Slovak patients with non-syndromic hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 76: 400-403.
- Mishra P, Chan DC. (2014) Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 634-646.
- Morales Angulo C, Gallo-Terán J, Señaris B, Fontalva A, González-Aguado R, Fernández-Luna JL. (2011) Prevalence of the A1555G MTDNA mutation in sporadic hearing-impaired patients without known history of aminoglycoside treatment. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 62: 83-86.
- Morell RJ, Friderici KH, Wei S, Elfenbein JL, Friedman TB, Fisher RA. (2000) A new locus for late-onset, progressive, hereditary hearing loss DFNA20 maps to 17q25. *Genomics*, 63: 1-6.
- Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, Arslan E, Zacchello F. (1999) Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet*, 36: 829-832.
- Oishi N, Duscha S, Boukari H, Meyer M, Xie J, Wei G, Schrepfer T, Roschitzki B, Boettger EC, Schacht J. (2015) XBP1 mitigates aminoglycoside-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal cell death. *Cell Death Dis*, 6: e1763.
- OMIM. (2018) GFER gene. In: <https://www.omim.org/entry/600924>.
- Orosz O, Fodor M, Balogh I, Losonczy G. (2018) Relative anterior microphthalmos in oculodentodigital dysplasia. *Indian J Ophthalmol*, 66: 334-336.
- Országos Epidemiológiai Központ. Epiinfo 2012. "Az országos epidemiológiai központ tájékoztatása a várandósok mikrobiológiai szűrővizsgálatairól." In, 585-591.
- Oshima A, Doi T, Mitsuoka K, Maeda S, Fujiyoshi Y. (2003) Roles of Met-34, Cys-64, and Arg-75 in the assembly of human connexin 26. Implication for key amino acid residues for channel formation and function. *J Biol Chem*, 278: 1807-1816.
- ØStergaard E, Montserrat-Sentis B, Grønskov K, Brøndum-Nielsen K. (2002) The A1555G mtDNA mutation in Danish hearing-impaired patients: frequency and clinical signs. *Clin Genet*, 62: 303-305.
- Ostojić S, Djoković S, Dimić N, Mikić B. (2011) Cochlear implant--speech and language development in deaf and hard of hearing children following implantation. *Vojnosanit Pregl*, 68: 349-352.
- Ouyang XM, Xia XJ, Verpy E, Du LL, Pandya A, Petit C, Balkany T, Nance WE, Liu XZ. (2002) Mutations in the alternatively spliced exons of USH1C cause non-syndromic recessive deafness. *Hum Genet*, 111: 26-30.
- Pittman AL, Stelmachowicz PG. (2003) Hearing loss in children and adults: audiometric configuration, asymmetry, and progression. *Ear Hear*, 24: 198-205.
- Pollak A, Skórka A, Mueller-Malesińska M, Kostrzewa G, Kisiel B, Waligóra J, Krajewski P, Oldak M, Korniszewski L, Skarzyński H, Płoski R. (2007) M34T and V37I mutations in GJB2 associated hearing impairment: evidence for pathogenicity and reduced penetrance. *Am J Med Genet A*, 143A: 2534-2543.
- Polony G, Humli V, Andó R, Aller M, Horváth T, Harnos A, Tamás L, Vizi ES, Zelles T. (2014) Protective effect of rasagiline in aminoglycoside ototoxicity. *Neuroscience*, 265: 263-273.
- Popova DP, Kaneva R, Varbanova S, Popov TM. (2012) Prevalence of GJB2 mutations in patients with severe to profound congenital nonsyndromic sensorineural hearing loss in Bulgarian population. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 269: 1589-1592.

- Praetorius M, Brough DE, Hsu C, Plinkert PK, Pfannenstiel SC, Staecker H. (2009) Adenoviral vectors for improved gene delivery to the inner ear. *Hear Res*, 248: 31-38.
- Prevention Centers for Disease Control (2010) Identifying infants with hearing loss - United States, 1999-2007', *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 59: 220-223.
- Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JL. (1993) Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet*, 4: 289-294.
- Proteopedia. 2018.
- Qian Y, Guan MX. (2009) Interaction of aminoglycosides with human mitochondrial 12S rRNA carrying the deafness-associated mutation. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 4612-4618.
- Rajput K, Saeed M, Ahmed J, Chung M, Munro C, Patel S, Leal C, Jiang D, Nash R. (2019) Findings from aetiological investigation of Auditory Neuropathy Spectrum Disorder in children referred to cochlear implant programs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 116: 79-83.
- RamShankar M, Girirajan S, Dagan O, Ravi Shankar HM, Jalvi R, Rangasayee R, Avraham KB, Anand A. (2003) Contribution of connexin26 (GJB2) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India. *J Med Genet*, 40: e68.
- Rendtorff ND, Lodahl M, Boulahbel H, Johansen IR, Pandya A, Welch KO, Norris VW, Arnos KS, Bitner-Glindzicz M, Emery SB, Mets MB, Fagerheim T, Eriksson K, Hansen L, Bruhn H, Möller C, Lindholm S, Ensgaard S, Lesperance MM, Tranebjaerg L. (2011) Identification of p.A684V missense mutation in the WFS1 gene as a frequent cause of autosomal dominant optic atrophy and hearing impairment. *Am J Med Genet A*, 155A: 1298-1313.
- Répassy G, Küstel M, Szónyi M, Enreiter Á, Birtalan E, Tamás L. (2018) Cochlear implantation using posterior suprameatal approach. *Ear Nose Throat J*, 97: E4-E7.
- Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Friedman TB. (2006) Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet*, 79: 1040-1051.
- Richard H Drew, PharmD, MS, FCCP, FIDP. Aminoglycosides. Accessed Jan 26, 2018. <https://www.uptodate.com/contents/aminoglycosides>.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. 17: 405-24.
- Ruel J, Emery S, Nouvian R, Bersot T, Amilhon B, Van Rybroek JM, Rebillard G, Lenoir M, Eybalin M, Delprat B, Sivakumaran TA, Giros B, El Mestikawy S, Moser T, Smith RJ, Lesperance MM, Puel JL. (2008) Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *Am J Hum Genet*, 83: 278-292.
- Salomão K B, Ayo CM, Della-Rosa VA. (2013) Investigation of the A1555G mutation in mitochondrial DNA (MT-RNR1) in groups of Brazilian individuals with nonsyndromic deafness and normal-hearing. *Indian J Hum Genet*, 19: 54-57.

- Sansović I, Knezević J, Musani V, Seeman P, Barisić I, Pavelić J. (2009) GJB2 mutations in patients with nonsyndromic hearing loss from Croatia. *Genet Test Mol Biomarkers*, 13: 693-699.
- Sazonova MA, Sinyov VV, Ryzhkova AI, Galitsyna EV, Khasanova ZB, Postnov AY, Yarygina EL, Orekhov AN, Sobenin IA. (2017) Role of Mitochondrial Genome Mutations in Pathogenesis of Carotid Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 6934394.
- Schatz A, Bugie E, Waksman SA. (2005) Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944. *Clin Orthop Relat Res*: 3-6.
- Schoen C J, Emery SB, Thorne MC, Ammana HR, Sliwerska E, Arnett J, Hortsch M, Hannan F, Burmeister M, Lesperance MM. (2010) Increased activity of Diaphanous homolog 3 (DIAPH3)/diaphanous causes hearing defects in humans with auditory neuropathy and in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 13396-13401.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*, 11: 361-362.
- Seeman P, Malíková M, Rasková D, Bendová O, Groh D, Kubálková M, Sakmaryová I, Seemanová E, Kabelka Z. (2004) Spectrum and frequencies of mutations in the GJB2 (Cx26) gene among 156 Czech patients with pre-lingual deafness. *Clin Genet*, 66: 152-157.
- Seeman P, Sakmaryová I. (2006) High prevalence of the IVS 1 + 1 G to A/GJB2 mutation among Czech hearing impaired patients with monoallelic mutation in the coding region of GJB2. *Clin Genet*, 69: 410-413.
- Shahin H, Walsh T, Sobe T, Abu Sa'ed J, Abu Rayan A, Lynch ED, Lee MK, Avraham B, King MC, Kanaan M. (2006) Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet*, 78: 144-152.
- Sharma A, Campbell J. (2011) A sensitive period for cochlear implantation in deaf children. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 24 Suppl 1: 151-153.
- Sheng B, Wang X, Su B, Lee HG, Casadesus G, Perry G, Zhu X. (2012) Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 120: 419-429.
- Shin J J, Keamy DG, Steinberg EA. (2011) Medical and surgical interventions for hearing loss associated with congenital cytomegalovirus: a systematic review. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 144: 662-675.
- Shoubridge EA. (2000) Mitochondrial DNA segregation in the developing embryo. *Hum Reprod*, 15 Suppl 2: 229-234.
- Sipeky C, Matyas P, Melegh M, Janicsek I, Szalai R, Szabo I, Varnai R, Tarlos G, Ganczer A, Melegh B. (2014) Lower carrier rate of GJB2 W24X ancestral Indian mutation in Roma samples from Hungary: implication for public health intervention. *Mol Biol Rep*, 41: 6105-6110.
- Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, Mueller-Malesinska M, Pollak A, Ploski R, Murgia A, Orzan E, Castorina P, Ambrosetti U, Nowakowska-Szyrwinska E, Bal J, Wiszniewski W, Janecke AR, Nekahm-Heis D, Seeman P, Bendova O, Kenna MA, Frangulov A, Rehm AL, Tekin M, Incesulu A, Dahl HH, du Sart D, Jenkins L, Lucas D, Bitner-Glindzicz M, Avraham KB, Brownstein Z, del Castillo I, Moreno F, Blin N, Pfister M, Sziklai I, Toth T, Kelley PM, Cohn ES, Van Maldergem L, Hilbert P, Roux AF, Mondain

- M, Hoefsloot LH, Cremers CW, Löppönen T, Löppönen H, Parving A, Gronskov K, Schrijver I, Roberson J, Gualandi F, Martini A, Lina-Granade G, Pallares-Ruiz N, Correia C, Fialho G, Cryns K, Hilgert N, Van de Heyning P, Nishimura CJ, Smith RJ, Van Camp G. (2005) GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet*, 77: 945-957.
- Söhl G, Willecke K. (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res*, 62: 228-232.
- Stelma F, Bhutta MF. (2014) Non-syndromic hereditary sensorineural hearing loss: review of the genes involved. *J Laryngol Otol*, 128: 13-21.
- Stenson et al (2003). The Human Gene Mutation Database (HGMD®). *Hum Mutat*: 21:577-581.
- Stordahl J. (2002) Song recognition and appraisal: a comparison of children who use cochlear implants and normally hearing children. *J Music Ther*, 39: 2-19.
- Strom TM, Hörtnagel K, Hofmann S, Gekeler F, Scharfe C, Rabl W, Gerbitz KD, Meitinger T. (1998) Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet*, 7: 2021-2028.
- Tekin M., Arnos KS, Xia XJ, Oelrich MK, Liu XZ, Nance WE, . Pandya A. (2001) W44C mutation in the connexin 26 gene associated with dominant non-syndromic deafness. *Clin Genet*, 59: 269-273.
- Tekin M, Duman T, Boğoçlu G, Incesulu A, Cin S, Akar N. (2003) Moderate hearing loss and pseudodominant inheritance due to L90P/35delG mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Genet Couns*, 14: 379-386.
- Tekin M, Duman T, Boğoçlu, İncesulu A, Çomak E, Fitoz S, Yılmaz E, İlhan I, Akar N. (2003) Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey. *Eur J Pediatr*, 162: 154-158.
- Teoh sh, Pisoni DB, Miyamoto RT. (2004) Cochlear implantation in adults with prelingual deafness. Part II. Underlying constraints that affect audiological outcomes. *Laryngoscope*, 114: 1714-1719.
- Tóth T, Kupka S, Haack B, Riemann K, Braun S, Fazakas F, Zenner HP, Muszbek L, Blin N, Pfister M, Sziklai I. (2004) GJB2 mutations in patients with non-syndromic hearing loss from Northeastern Hungary. *Hum Mutat*, 23: 631-632.
- Usami S, Abe S, Akita J, Namba A, Shinkawa H, Ishii M, Iwasaki S, Hoshino T, Ito J, Doi K, Kubo T, Nakagawa T, Komiyama S, Tono T, Komune S. (2000) Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. *J Med Genet*, 37: 38-40.
- Van Camp G, Smith RJH. (2018) Hereditary Hearing Loss Homepage In.
- Vorstman J A, van Daalen E, Jalali GR, Schmidt ER, Pasterkamp RJ, de Jonge M, Hennekam EA, Janson E, Staal WG, van der Zwaag B, Burbach JP, Kahn RS, Emanuel BS, van Engeland H, Ophoff RA. (2011) A double hit implicates DIAPH3 as an autism risk gene. *Mol Psychiatry*, 16: 442-451.
- Wallace DC, Ye JH, Neckelmann SN, Singh G, Webster KA, Greenberg BD. (1987) Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr Genet*, 12: 81-90.
- Walsh T, Walsh V, Vreugde S, Hertzano R, Shahin H, Haika S, Lee MK, Kanaan M, King MC, Avraham KB. (2002) From flies' eyes to our ears: mutations in a human

- class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 7518-7523.
- Weil D, Küssel P, Blanchard S, Lévy G, Levi-Acobas F, Drira M, Ayadi H, Petit C. (1997) The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet*, 16: 191-193.
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Friedman TB. (2001) Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell*, 104: 165-172.
- World Health Organisation. 2018. Accessed October 2018. <http://www.who.int/en/>.
- Xia L, Yin S, Wang J. (2012) Inner ear gene transfection in neonatal mice using adeno-associated viral vector: a comparison of two approaches. *PLoS One*, 7: e43218.
- Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir E, Loiselet J, Petit C. (1999) A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet*, 21: 363-369.
- Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Milá M, Monica MD, Lutfi J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S, Fortina P. (1997) Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet*, 6: 1605-1609.
- Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng JH, Han D, Bai Y, Young WY, Guan MX. (2004) Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet*, 74: 139-152.
- Zoll B, Petersen L, Lange K, Gabriel P, Kiese-Himmel C, Rausch P, Berger J, Pasche B, Meins M, Gross M, Berger R, Kruse E, Kunz J, Sperling K, Laccone F. (2002) Evaluation of Cx26/GJB2 in German Hearing Impaired Persons: Mutation Spectrum and Detection of Disequilibrium Between M34T (c.101T>C) and -493del10. *Human Mutation* 21:98.
- 1000Genome. (2018) www.internationalgenome.org

12. Saját publikációk

Kecskeméti, N., Szőnyi, M., Gáborján, A., Küstel, M., Milley, G. M., Süveges, A., Illés, A., Kékesi, A., Tamás, L., Molnár MJ., Szirmai, Á., Gál, A. (2018). Analysis of *GJB2* mutations and the clinical manifestation in a large Hungarian cohort. *European Archives of Otorhinolaryngology*. 275: 10 pp. 2441-2448.

Kecskeméti N., Gáborján A., Szőnyi M., Küstel M., Baranyi I., Molnár MJ., Tamás L., Gál A., Szirmai Á. (2019) Halláscsökkenést okozó etiológiai tényezők cochlearis implantáción átesett gyerekeknél. *Orvosi Hetilap*. 160: 21 pp. 822-828.

Kecskeméti N., Szőnyi M., Küstel M., Gáborján A., Tamás L., Répássy G. (2019) Cochlear implantation under local anesthesia: a possible alternative for elderly patients. *European Archives of Otorhinolaryngology*. 276: 6 pp. 1643-1647.

13. Köszönetnyilvánítás

A PhD fokozathoz vezető úton rengeteg kihívással, nehézséggel szembesültem és örömmel, valamint tudással és tapasztalattal gazdagodtam. Amíg haladtam ezen a néhol rögzesebb úton, rengeteg segítséget, biztatást kaptam.

Szeretném megköszönni Prof. Tamás Lászlónak a tudományos és klinikai munkámba vetett bizalmát, a két Intézet Igazgatójának, Prof. Molnár Mária Juditnak és Prof. Tamás Lászlónak, a projekt létrejöttét és az ebben nyújtott támogatást.

Leghálásabb köszönettel tartozom Dr. Szőnyi Magdolnának, aki mindvégig magas szakmai hozzáértéssel és baráti jótanácsokkal is segítette munkámat, aki nélkül ezen az úton nem indultam volna el és valószínűleg nem is értem volna célba.

Köszönet illeti két témavezetőmet: Dr. Gál Anikónak a genetikai vizsgálatokban és azok kiértékelésében való segítségnyújtásáért, a szakmai vezetésért, támogatásáért. Dr. Szirmai Ágnesnek a fül-orr-gégészeti részekben nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Gáborján Anitának az audiológiai ismereteim fejlesztésében nyújtott szakmai segítségét, a közös munkát és abban való támogatását és a bátorító beszélgetéseket.

Köszönöm Prof. Répássy Gábornak és Dr. Küstel Mariannának a cochlearis implantációs teamben való közös munkát.

Köszönöm Dr. Milley Györgynek és Kékesi Annának a genetikai vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségét, Illés Anettnek, Süveges Annának a kontrollcsoportok elemzésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Barbara Vonának és Michaela Hofrichternek a würzburgi kollaborációs projekt létrejöttében, és az újgenerációs szekvenálásokban nyújtott segítségükért.

Köszönöm Baranyi Ildikónak, aki széleskörű szurdopedagógiai tudásával gazdagította ismereteimet.

Köszönöm az audiológiai labor minden szakasszisztensének, Csontos Fatimének, Kasparek Zsuzsának, Monostori Évának, Vigné Suszterics Bernadettnek az audiológiai

vizsgálatokban nyújtott segítségüket, Porpáczy Gabriellának a vérvételek elvégzését, valamint a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetből Báthori Györgyinek, Kovács Margitnak és Szosznyák Tündének a genetikai vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Polony Gábornak, tutoromnak a sok bátorítást és a bizalmat felém, Dr. Birtalan Edének és Dr. Molnár Viktóriának a baráti támogatást.

Köszönöm minden Kollégámnak, akik a mindennapi munkában helyettesítettek, hogy ezen kutatást véghez tudjuk vinni.

Emellett szívből köszönöm családomnak és barátaimnak, akik mindvégig támogattak, mellettem voltak, segítettek, akik türelme és bátorítása nélkül biztosan nem értem volna célba. Külön köszönetemet fejezem ki Perlaki Andrásnak, aki a biztatáson és támogatáson túl az informatikai segítségét is nyújtotta a projekt elkészüléséhez.

14. Kiegészítő táblázatok, ábrák, génlisták

1. kiegészítő táblázat: A *GJB2* gén Sanger-féle szekvenáláshoz használt primerszekvenciái

<i>Primer</i>	<i>Szekvencia</i>
Forward primer	5'– TGCTTGCTTACCCAGACTCA–3'
Reverz primer	5'– ATGCTGCTTGTGTAGGTCCA–3'

2. kiegészítő táblázat: A WES vizsgálat során pozitívnak bizonyult gének primerei és szekvenciájuk

Primer	Forward szekvencia	Reverz szekvencia
<i>DLAPH3</i> Exon25	5'-CAAGGGTTTCTG TGCATACC-3'	5'-TGGAATGAAGAC ACTACACTACTCG-3'
<i>TRIOBP</i> Ex7/2 homz	5'-AGCCTCCTCTCC CATCAGA-3'	5'-GAGGATGTCTGA GGCCTGTC-3'
<i>TRIOBP</i> Ex9	5'-ACAAACGATGTC CCTGAGC-3'	5'-TGACTTTCTGGC TACCCTTGG-3'
<i>WFS1</i> Exon8	5'-GCTCAGAGGGCA TGAAGGTC-3'	5'-GCCATGCAGTTG AGGCAGCT-3'

3. Kiegészítés a WES vizsgálat során vizsgált génekről

ACTG1, ADCY1, AIFM1, BDP1, BSND, CABP2, CCDC50, CD164, CDH23, CEACAM16, CIB2, CLDN14, CLIC5, COCH, COL11A2, COL4A6, CRYM, DCDC2, DFNA5, DFNB31, DFNB59, DIABLO, DIAPH1, DIAPH3, ELMOD3, EPS8, EPS8L2, ESPN, ESRRB, EYA4, FAM65B, GIPC3, GJB2, GJB3, GJB6, GPSM2, GRHL2, GRXCR1, GRXCR2, HGF, HOMER2, ILDR1, KARS, KCNQ4, LHFPL5, LOXHD1, LRTOMT,

MARVELD2, MCM2, MET, MIR96, MSRB3, MYH14, MYH9, MYO15A, MYO3A, MYO6, MYO7A, NARS2, OSBPL2, OTOA, OTOF, OTOG, OTOGL, P2RX2, PCDH15, PDZD7, PNPT1, POU3F4, POU4F3, PRPS1, PTPRQ, RDX, S1PR2, SERPINB6, SIX1, SLC17A8, SLC26A4, SLC26A5, SMPX, STRC, SYNE4, TBC1D24, TECTA, TJP2, TMC1, TMEM132E, TMIE, TMPRSS3, TNC, TPRN, TRIOBP, TSPEAR, USH1C, USH1G, WFS1, USH2A, GPR98, CLRN1, HARS, ABHD12, KITLG, PAX3, MITF, SOX10, EDNRB, SNAI2, EDN3, PSIP1, SLITRK6, MT-RNR1, MT-TS1, ATP2B2, CDC14A, SLC22A4, ROR1, RAI1, SERPINF1, TMTC2

4. Kiegészítő ábra: Családfa elemzés egységes jelképrendszere

A családfaelemzés egységes jelképrendszere

