

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program:
Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



MUDr. Radka Pourová

Molekulárně genetická vyšetření u českých pacientů a rodin s vrozenou ztrátou
sluchu a bez mutací v *GJB2* genu

*Molecular genetic examination of Czech patients and families with hereditary
hearing loss and with excluded mutations in GJB2 gene*

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Prof. MUDr. Pavel Seeman, PhD.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 2.5.2014

MUDr. Radka Pourová

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala za podporu a pomoc zejména svým rodičům a partnerovi, ale také všem kolegům a přátelům, kteří do mého života pozitivně zasáhli v průběhu mé práce na tomto projektu. Můj dík patří všem kolegyním z DNA laboratoře Kliniky dětské neurologie 2. LF UK a FN Motol, z genetické ambulance a molekulárně genetické laboratoře Kliniky Gennet a z Laboratorio Diagnosi e Studio Malattie Rare při Clinica Pediatrica v Padově, kolegyním a kolegům z Humangenetisches Institutu při Universitätsklinikum Erlangen, kolegům z Kliniky ušní, nosní, krční 2.LF UK a FNM Motol a v neposlední řadě také kolegyním a kolegům z genetické ambulance a dalších oddělení Ústavu biologie a lékařské genetiky 2.LF UK, kterým všem náleží větší či menší podíl zásluh vzniku této disertační práce.

Rovněž děkuji vedení Ústavu biologie a lékařské genetiky 2.LF UK a FN Motol, jmenovitě prim. MUDr. Markétě Havlovicové, prof. MUDr. Milanu Mackovi, DrSc. a prof. Ing. Zdeňku Sedláčkovi, DrSc., vedení Kliniky dětské neurologie 2.LF UK a FN Motol, jmenovitě prof. MUDr. Vladimíru Komárkovi, CSc. a vedení 2.LF UK za umožnění realizace mého projektu a podporu, které se mi dostalo z jejich strany.

Děkuji nadačnímu fondu Míša Konta Bariéry a grantovým agenturám UK a MZČR za finanční podporu mého výzkumu.

In memoriam bych ráda složila dík doc. MUDr. Zdeňku Kabelkovi, PhD. za jeho lví podíl na převodu výsledků mé práce do praxe a za jeho nasazení ve vztahu k pacientům.

Na čestném místě bych ráda poděkovala prof. MUDr. Jaromíru Astlovi, CSc. nejen za odbornou pomoc, ale také za jeho neúnavnou podporu, udržování entuziasmu a víry ve vědeckou práci, a zejména svému školiteli prof. MUDr. Pavlu Seemanovi, PhD. za veškerou energii a čas, které mi věnoval.

Identifikační záznam:

Pourová, Radka. Molekulárně genetická vyšetření u českých pacientů a rodin s vrozenou ztrátou sluchu a bez mutací v GJB2 genu. [*Molecular genetic examination of Czech patients and families with hereditary hearing loss and with excluded mutations in GJB2 gene*]. Praha, 2014. 135s. Disertační práce (Ph.D). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, DNA laboratoř Kliniky dětské neurologie. Vedoucí práce/Školitel Seeman, Pavel.

Klíčová slova:

Vrozená ztráta sluchu, Pendredův syndrom, struma, DFNB4, SLC26A4

Hereditary hearing loss, Pendred syndrome, goitre, DFNB4, SLC26A4

Seznam použitých zkratek

ACS	Apertův syndrom
AD	Autozomálně dominantní
AD NSHL	Autosomálně dominantně dědičná nesyndromová ztráta sluchu
AMK	Aminokyselina
AR	Autozomálně recesivní
AR NSHL	Autosomálně recesivně dědičná nesyndromová ztráta sluchu
bil.	bilaterální
BOR	Branchio-oto-renální syndrom
BOS	Branchio-otický syndrom
BPS	Bart-Pumphreyův syndrom
BWS2	Baraitser-Winterův syndrom typu 2
CMD1J	Hluchota provázená dilatační kardiomyopatií typu 1J
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CMV	Cytomegavirus
CNS	Centrální nervový systém
Cx26	Connexin 26
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphisms database
DFN1-6	X-vázaná vrozená nesyndromová ztráta sluchu typ 1-6 (staré názvosloví)
DFNA1-64	Autosomálně dominantně dědičná nesyndromová ztráta sluchu typ 1-64
DFNB1-96	Autosomálně recesivně dědičná nesyndromová ztráta sluchu typ 1-96
DFNX1-5	X-vázaná vrozená nesyndromová ztráta sluchu typ 1-5
DIDMOAD	Diabetes insipidus, diabetes mellitus, atrofie optiku a hluchota
DM	Damaging mutation
DM?	Varianta se spornou patogenitou
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EAA	EA Allele Count
EKG	Elektrokardiogram
EKVP	ErythroKeratoderma Variabilis et Progressiva
EpS	Epsteinův syndrom
EVA	Enlarged vestibular aqueduct
EVS	Exome Variant Server
FTNS	Fechtnerův syndrom
GERP	Genomic Evolutionary Rate Profiling
HED	Hidrotickoá ektodermální dysplázie Cloustonova typu
HFM	Hemifacial
HGMD	The Human Gene Mutation Database
HID	Hystrix-like-Ichthyosis-Deafness syndrom
HRCT	High Resolution Computed Tomography
HSV	Herpes simplex virus
JLN	Jervell and Lange-Nielsen syndrom
KID	Keratitis-Ichthyosis-Deafness syndrom
KMP	kardiomyopatie
LHON	Leberova hereditární optická atrofie
LVAS	Large Vestibular Aqueduct syndrome
MAF	Minor Allele Frequency
MCT	makrotrombocytopenie spojená se ztrátou sluchu
MD	Mondiniho dysplázie
MELAS	Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes

MERRFMyoclonic Epilepsy associated with Ragged-Red Fibers
MHA.....May-Heglinův syndrom
MIDDMaternally Inherited Diabetes and Deafness syndrome
ML.....Mondini-like anomálie
MLPA.....Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MRIMagnetic Resonance Imaging
n/anot available
NCBINational Center for Biotechnology Information
NF1Neurofibromatóza typ 1
NF2.....Neurofibromatóza typ 2
NSEVA.....nesyndromová ztráta sluchu sdružená s rozšířením vestibulárního akveduktu
NSHLNesyndromová ztráta sluchu (Non-syndromic hearing loss)
NTH.....transientní novorozenecké hypotyreóza
pacpacient
PLDDPraktický lékař pro děti a dorost
PPK.....Palmoplantární keratoderma
PSPendredův syndrom
RArodinná anamnéza
SBS.....Sebastianův syndrom
SIFT.....Scale-invariant feature transform
SMSSmithův-Magenisův syndrom
SNP.....single nucleotide polymorphism
STLS.....Sticklerův syndrom
STR.....Short Tandem Repeat
ŠŽštítná žláza
TORCHToxoplazmóza, ostatní infekce, rubeolla, cytomegalovirus, herpes simplex
uniEVA.....unilaterální rozšíření vestibulárního akveduktu
USH.....Usherův syndrom
UZ.....ultrazvuk
VS.....Vohwinkelův syndrom
WESWhole Exome Sequencing
WFLSWolfram-like syndrom
WFS.....Wolframův syndrom (DIDMOAD)
WHOWorld Health Organization
wt.....wild type

Tabulky

Tabulka 1 – Usherův syndrom a jeho alelické choroby	18
Tabulka 2 – Sticklerův syndrom a jeho alelické choroby	19
Tabulka 3 – Příčiny a frekvence AR dědičné nesyndromové ztráty sluchu.....	21
Tabulka 4 – Příčiny a frekvence AD dědičné nesyndromové ztráty sluchu	31
Tabulka 5 – Tabulka shrnuje příčiny a frekvence XL dědičné nesyndromové ztráty sluchu ..	38
Tabulka 6 – Mutace mtDNA a jejich klinické projevy	41
Tabulka 7 – Primery použité při PCR a přímém sekvenování dle Sangera	54
Tabulka 8 – Program pro PCR amplifikaci v cycleru ABI 2700	55
Tabulka 9 – Frekvence výskytu patogenních mutací u pacientů v jednotlivých skupinách	58
Tabulka 10 – Frekvence výskytu patogenních mutací v genu SLC26A4 u pacientů se sporadickým vs. familiárním výskytem nesyndromové ztráty sluchu a Pendredova syndromu	59
Tabulka 11 – Fenotypy a genotypy pacientů ze skupiny A	61
Tabulka 12 – Fenotyp a genotyp pacientů ze skupiny B s alespoň 1 mutací v SLC26A4 genu	62
Tabulka 13 – Fenotypy a genotypy pacientů ze skupiny B s pouze jednou prokázanou mutací (monoalelickou) v SLC26A4 po doplnění klinických dat	64
Tabulka 14 – Fenotyp a genotyp pacientů ze skupiny C s alespoň jednou mutací v SLC26A4 genu	65
Tabulka 15 – Polymorfismy a jejich frekvence.....	66
Tabulka 16 – Fenotypy a genotypy 10 pacientů vybraných dle diagnostických kritérií.....	70
Tabulka 17 – Spektrum všech dosud nalezených SLC26A4 mutací u českých pacientů	72
Tabulka 18 – Výskyt mutací nalezených v české populaci v genetických databázích a predikce jejich patogenity pomocí predikčních programů.....	74
Tabulka 19 – Spektrum a relativní podíl všech dosud nalezených SLC26A4 patogenních mutací u českých neslyšících pacientů.....	81
Tabulka 20 – Fenotypy a genotypy pacientů s oběma prokázanými mutacemi v genu SLC26A4.....	83
Tabulka 21 – Fenotypy a genotypy pacientů s pouze jednou prokázanou patogenní mutací (monoalelickou) v SLC26A4	84
Tabulka 22 – Výsledky vyšetření SSEP (odhadovaný audiogram) nebo audiogramu u pacientů s bi-alelickými mutacemi nebo monoalelickou mutací a EVA/MD v korelaci s typem mutace	85
Tabulka 23 – Fenotypy a genotypy pacientů s bilaterální EVA vyšetřených v rámci studie ..	87
Tabulka 24 – Fenotypy a genotypy uživatelů CI s prokázanými mutacemi v genu SLC26A4	89
Tabulka 25 – Fenotypy a genotypy pacientů s klinicky diagnostikovaným Pendredovým syndromem.....	90
Tabulka 26 – Pacienti s familiárním výskytem hluchoty a zachycenými patogenními mutacemi v genu SLC26A4	91

Obrázky

Obrázek 1 – Rozdělení vrozené ztráty sluchu podle příčiny (zkratky vysvětleny v textu).....	12
Obrázek 2 – EVA a MD na HRCT pyramid	45
Obrázek 3 – Radiologické nálezy.....	57

Obsah

1. ÚVOD	11
1.1. Genetika vrozené ztráty sluchu	11
1.1.1. Syndromová ztráta sluchu	12
1.1.2. Nesyndromová ztráta sluchu (NSHL)	16
1.1.3. Mitochondriální ztráta sluchu	40
1.2. Pendredův syndrom a NSEVA	42
1.2.1 Historická fakta	43
1.2.2. Klinický obraz Pendredova syndromu a NSEVA	44
1.2.3. Incidence a prevalence Pendredova syndromu a NSEVA	46
1.2.4. Molekulární genetika	47
2. VÝCHODISKA A CÍLE PRÁCE	50
2.1. Východiska práce	50
2.2. Cíle práce	50
3. PACIENTI A METODY	52
3.1. Pacienti	52
3.1.1. Soubor 303 českých neslyšících pacientů – studie frekvence mutací	52
3.1.2. Pacienti vybraní dle diagnostických kritérií k doplnění spektra mutací a evaluaci kritérií	53
3.1.3. Pacienti vyšetření pomocí haplotypové analýzy	53
3.2. Analýza HRCT a MRI snímků	53
3.3. Metody molekulárně genetické analýzy	53
3.3.1. Izolace DNA	53
3.3.2. Sekvenční analýza	53
3.3.3. Vyšetření pomocí restričních enzymů	55
3.3.4. Multiplex Ligase-dependent Probe Analysis (MLPA)	55
3.3.5. Haplotypová analýza	55
3.4. Analýza patogenity nalezených mutací	56
4. VÝSLEDKY	57
4.1. Klinické a radiologické nálezy v souboru 303 českých neslyšících pacientů	57
4.2. Frekvence <i>SLC26A4</i> mutací v souboru 303 českých neslyšících pacientů	57
4.3. Spektrum mutací v souboru 303 českých neslyšících pacientů	59
4.4. Fenotypy a genotypy pacientů v jednotlivých skupinách	59
4.4.1. Fenotypy a genotypy pacientů ve skupině A	59
4.4.3. Fenotypy a genotypy pacientů ve skupině B po doplnění klinických dat u pacientů s monalelickými mutacemi	62
4.4.4. Fenotypy a genotypy pacientů ve skupině C	64
4.5. Stanovení heterozygotních frekvencí nejčastějších mutací v populaci	65
4.6. Vedlejší nálezy - polymorfismy	65
4.6.1. Polymorfismy nekódujících oblastí	66
4.6.2. Polymorfismy kódujících oblastí	66
4.6.3. Kumulace odchylek v genech způsobujících poruchu sluchu	67
4.7. MLPA	68
4.8. Vyšetření genu <i>FOX11</i>	68
4.9. Haplotypová analýza sourozeneckých dvojic	68
4.10. Předběžná kritéria pro vyšetření <i>SLC26A4</i> genu	69

4.11. Fenotypy a genotypy 10 českých neslyšících pacientů vybraných k vyšetření <i>SLC26A4</i> genu na základě diagnostických kritérií	69
4.12. Spektrum všech mutací nalezených u 315 českých neslyšících pacientů	70
4.13. Patogenita všech nalezených mutací a kódujících variant	73
4.13.1. Patogenita již popsaných mutací	75
4.13.2. Patogenita předpokládaných polymorfismů	77
4.13.3. Patogenita nových mutací	78
4.14. Frekvence a spektrum mutací v české populaci po zohlednění míry jejich patogenity	79
4.14.1. Spektrum patogenních mutací v souboru 315 českých neslyšících pacientů	79
4.14.2. Frekvence <i>SLC26A4</i> mutací v souboru 303 českých neslyšících pacientů po zohlednění jejich patogenity	81
4.15. Korelace genotypu s fenotypem	82
4.15.1. Korelace mezi typem mutace a fenotypem	82
4.15.2. Fenotypy a genotypy pacientů s bilaterální EVA	86
4.15.3. Fenotypy a genotypy uživatelů kochleárních implantátů s alespoň jednou prokázanou mutací v <i>SLC26A4</i> genu	88
4.15.4. Fenotypy pacientů s Pendredovým syndromem	89
4.15.5. Fenotypy a genotypy familiárních případů výskytu mutací v genu <i>SLC26A4</i> - intrafamiliární variabilita	90
4.16. Stanovení finálních kritérií pro vyšetření <i>SLC26A4</i> genu	93
4.17. Algoritmus a metodické doporučení pro péči o pacienty s PS/DFNB4	93
5. DISKUZE	94
5.1. Spektrum a patogenní charakter mutací v <i>SLC26A4</i> v české populaci neslyšících s vyloučenými mutacemi v <i>GJB2</i> genu	94
5.2. Frekvence mutací v souboru 303 českých neslyšících pacientů	98
5.3. Frekvence heterozygotů pro <i>SLC26A4</i> mutace v české slyšící populaci	101
5.4. Korelace genotyp fenotyp	102
5.5. Klinické dopady studie	103
6. ZÁVĚR	105
7. SOUHRN	106
8. SUMMARY	107
9. POUŽITÁ LITERATURA	108

1. Úvod

1.1. Genetika vrozené ztráty sluchu

Poruchy sluchu jsou nejčastější smyslovou vadou u lidí. Podle WHO je úplná hluchota považována za druhé nejtěžší postižení hned za mentálním. Porucha či ztráta sluchu vznikající v raném dětství před rozvojem a fixací řeči (tzv. prelingvální a paralingvální hluchota) podmiňuje poruchu vývoje řeči a kognitivních schopností dítěte.

Výskyt vrozených vad sluchu byl dlouhodobě podceňován, a to na základě empirického stanovení frekvence na 1 : 1000 novorozenců (Morton, 1991). Až zavedení celoplošného screeningu sluchu novorozenců a následného sledování ve většině vyspělých zemí odhalilo, že incidence je více než 3× vyšší: 1 ze 300 novorozenců se narodí s naprostou ztrátou sluchu, 1 ze 300 má lehčí vadu sluchu a další 1 z 300 dětí postihne porucha sluchu před 18. rokem věku (Schrijver, 2004).

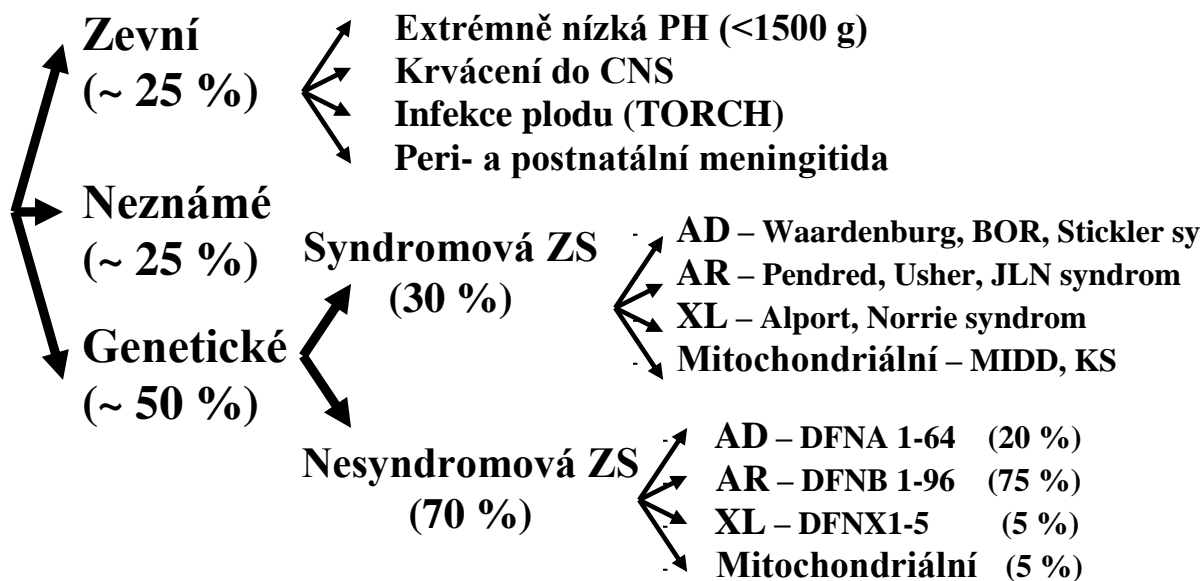
Přibližně čtvrtina poruch sluchu je způsobena zevními faktory, kterými jsou zejména perinatální rizika jako nedonošenost a s ní spojená nízká porodní hmotnost (pod 1500 g), perinatální poranění s krvácením do CNS, neléčená infekce matky některou z agens TORCH (Toxoplasma, Rubella, CMV, HSV, Parvovirus B19 a další) v kritickém období těhotenství, perinatálně či postnatálně prodělaná meningitida, užívání aminoglykosidových antibiotik a další (Smith and Van Camp, 1999).

Více než polovina časných poruch sluchu je podmíněná geneticky (Schrijver, 2004) a relativní podíl geneticky podmíněných poruch sluchu v důsledku zlepšující se perinatální a obecně zdravotní péče stoupá.

Zbylá čtvrtina je považována dosud za idiopatickou, s dalším rozvojem molekulárně genetických vyšetřovacích metod se však předpokládá, že bude z velké části také přičtena do skupiny způsobené genetickými faktory.

Vrozená ztráta sluchu se může pojít s dalšími příznaky a být tak součástí syndromu, pak je označována jako syndromová, nebo se porucha sluchu vyskytuje izolovaně, což je nejčastější případ a pak hovoříme o tzv. „nesyndromové ztrátě sluchu“ (non-syndromic hearing loss – NSHL).

Syndromová i nesyndromová ztráta sluchu se může dědit všemi typy mendelovské dědičnosti, ale i mitochondriálně – viz Obrázek 1. Zdaleka nejčastějším typem dědičnosti je autosomálně recesivní typ (AR), mnohem vzácnější je autosomálně dominantní dědičnost (AD), a jen vzácně se objevuje dědičnost vázaná na X chromosom (XL) a mitochondriální dědičnost,



Obrázek 1 – Rozdělení vrozené ztráty sluchu podle příčiny (zkratky vysvětleny v textu) jejíž význam podle recentních studií roste, zejména s používáním aminoglykosidových antibiotik (Estivill et al., 1998).

1.1.1. Syndromová ztráta sluchu

Syndromová ztráta sluchu (spojení ztráty sluchu s dalšími symptomy) se vyskytuje přibližně ve 30 % případů. Nejčastěji je ztráta sluchu spojena s poruchami zraku, malformacemi orofaciální oblasti či mozku, ale může se také pojít s vrozenými vadami vnitřních orgánů bez jakékoliv zřejmé stigmatizace či poruchy fyzického a mentálního vývoje. Syndromů spojených se ztrátou sluchu jsou známy stovky.

Nejčastějšími syndromy spojenými se ztrátou sluchu jsou následující:

1.1.1.1. Pendredův syndrom (PS)

PS má odhadovanou prevalenci 75 : 100 000 obyvatel, je tedy zřejmě nejčastějším typem syndromové ztráty sluchu a podrobněji je popsán v následující kapitole.

1.1.1.2. Goldenharův syndrom (hemifaciální mikrosomie, HFM)

HFM má prevalenci 17 : 100 000 obyvatel a je typický asymetrií obličeje způsobenou unilaterální hypoplázií střední etáže obličeje, malformacemi zevního a středního ucha, oka a jeho adnex, vrozenými vývojovými vadami (VVV) mozku, srdce a jiných vnitřních orgánů.

Jeho výskyt je převážně sporadický, pouze 1–2 % se dědí AD či AR (Gorlin, J. J. et al., 2001).

1.1.1.3. Sticklerův syndrom (STLS)

STLS se vyznačuje spojením ztráty sluchu, rozštěpů obličeje, progredující krátkozrakostí, kataraktou, degenerativními záněty kloubů a v polovině případů mitrálním prolapsem, jeho součástí může být i Pierre-Robinova sekvence (Stickler et al., 1965). Je způsoben mutacemi v genech *COL2A1*, *COL11A1*, *COL11A2* a dědičnost je AD (Ahmad et al., 1991). Jeho prevalence je 10–13 : 100 000 (Acke et al., 2012). Dostupnost molekulárně genetického vyšetření některých genů je i v ČR. Viz také odstavec Alelické choroby a tabulka 2.

1.1.1.4. CHARGE syndrom

CHARGE je akronymem pro anglické názvy následujících postižení: kolobom oka, VVV srdce, atrézie choan, psychomotorická retardace (PMR) a porucha růstu, genitoureterální abnormality, malformace zevního, středního či vnitřního ucha. Syndrom má prevalenci 8 : 100 000 obyvatel (Källén et al., 1999). Dědičnost je AD a příčinou jsou mutace v genech *CHD7* (Lalani et al., 2006) nebo *SEMA3E* (Lalani et al., 2004) event. mikrolece či mikroduplikace v oblastech 7q21.11 a 8q12.1–2, kde tyto geny leží (Vissers et al., 2004). Přibližně u 5 % pacientů je příčinou postižení mikrolece 22q11.2 (Corsten-Janssen et al., 2013, p. 11). Molekulárně genetická diagnostika mutací v genu *CHD7* a molekulárně cytogenetická diagnostika všech tří mikroleceí je k dispozici i v ČR.

1.1.1.5. Waardenburgův syndrom (WS)

WS s prevalencí 5–6 : 100 000 obyvatel (asi 5 % neslyšících) (Silan et al., 2004; Tamayo et al., 2008) je provázen kromě ztráty sluchu také poruchou pigmentace, projevující se bílým pruhem ve vlasech nebo předčasným šedivěním vlasů, častou heterochromií duhovek a typickou stigmatizací – dystopia canthorum, hypertelorismus, epikanty a hypopoplastická alae nasi (Read and Newton, 1997). Jsou známy 4 typy, které se dále dělí na celkem 10 podtypů, které se liší přítomností typického znaku dystopia canthorum, anomálií horních končetin a Hirsprungovy choroby. Dědičnost je AD (Pardono et al., 2003) a příčinou jsou mutace v genech *PAX3*, *MITF*, *SNAI2*, *SOX10*, *TYR*, *EDN3* a dalších (Pingault et al., 2010). Vyšetření těchto genů se provádí na několika pracovištích v Evropě, zejména v Německu, Nizozemí a Španělsku.

1.1.1.6. Usherův syndrom (USH)

USH s prevalencí 3,5-5 : 100 000 obyvatel (Boughman et al., 1983; Grøndahl, 1987) je nejčastější genetickou příčinou hluchoslepoty (až 50 % hluchoslepých, 18 % všech postižených slepotou typu retinitis pigmentosa a 3-6 % neslyšících). Je rozdělen do tří typů a celkem 12 podtypů podle závažnosti a průběhu onemocnění: nejčastější a nejzávažnější je typ 1, kde se k prelingvální ztrátě sluchu a prepubertálně začínající progresivní ztrátě zraku připojuje ještě vestibulární porucha. Nejčastějším typem je USH1B (Weil et al., 1997). Z genů zodpovědných za Usherův syndrom byly dosud identifikovány *MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *SANS*, *USH2A*, *GPR98*, *WHRN* a *CLRN1* (Ahmed et al., 2008; Becirovic et al., 2008; Bork et al., 2002; Hmani et al., 1999; Weil et al., 1997). Dědičnost je AR. Mutace ve většině z těchto genů mohou kromě Usherova syndromu způsobovat i nesyndromovou ztrátu sluchu – viz dále „Alelické choroby“. Diagnostika je v Evropě dostupná na více než 40 pracovištích.

1.1.1.7. Branchio-oto-renální syndrom (BOR)

Poměrně distinktivním syndromem je také BOR s prevalencí 2,5 : 100 000 obyvatel (Fraser et al., 1980), který se může projevit převodní, sensorineurální nebo smíšenou ztrátou sluchu spojenou s malformacemi vnitřního ucha nacházenými na HRCT (stenóza či atrézie semicirkulárních kanálků nebo hlemýždě, rozšíření vestibulárního akveduktu (podobně jako u Pendredova syndromu) viz další kapitola, event. hrubší malformace až chybění části vnitřního ucha), výrůstky před tragem, jamkami až fistulami v místě branchiálních oblouků na krku, stenózami ductus lacrimalis a anomáliemi ledvin (Fraser et al., 1978). Dědičnost je AD a příčinou jsou mutace v genech *EYA1* a *SIX5* (Abdelhak et al., 1997; Hoskins et al., 2007, p. 5). Do spektra BOR patří také branchiootický syndrom (BOS), který je způsoben mutacemi v genu *EYA1* a *SIX1* (Ito et al., 2006, p. 1; Vincent et al., 1997). Diagnostika je dostupná ve více než 25 centrech v celé Evropě.

1.1.1.8. Treacher-Collins syndrom (TCS)

TCS je provázen nápadnou a typickou faciální stigmatizací, a proto je většinou dobře klinicky diagnostikovatelný a diagnostikovaný, pokud se nejedná o oligosymptomatickou formu. Převodní či smíšená ztráta sluchu je provázena malformacemi středního, vnitřního i zevního ucha (typicky malformované či pouze rudimentární boltce) a zejména typickými změnami v obličeji – kolobom dolního víčka, mikrocie, hypertelorismus, antimongologidní sklon očních štěrbin, mikrognácie, hypoplázie zygomatického oblouku s rozštěpem (Dixon et al., 1992). Dědičnost je AD a příčinou jsou mutace v genu *TCOF1* (Dixon, 1996). Prevalence je 1–

2,5 : 100 000 obyvatel (Jahrsdoerfer and Jacobson, 1995). Diagnostika tohoto genu je v ČR dostupná.

1.1.1.9. Neurofibromatosa 2. typu (NF2)

NF2 byla dříve nazývaná centrální neurofibromatosa, jde o AD dědičný syndrom mnohočetných neoplázií s prevalencí 1,6 : 100 000 obyvatel (Evans, 2009), který je typický nádory sluchového nervu (neurinomy akustiku), které jsou obvykle oboustranné a způsobují sensorineurální poruchu sluchu, meningeomy mozku a schwannomy zadních míšních kořenů (Asthagiri et al., 2009). Mezi méně obvyklé příznaky patří juvenilní kortikální katarakta, tinnitus, poruchy rovnováhy a retinální abnormality (Parry et al., 1994). Příčinou jsou mutace v genu NF2 (Rouleau et al., 1993), jehož molekulárně genetická diagnostika se provádí i v ČR.

1.1.1.10. Apertův syndrom (ACS)

Další klinicky dobře diagnostikovatelnou jednotkou je ACS, který je typický kraniosynostózou s plochým profilem obličeje a hypoplastickou střední etáží, rozštěpy, převodní ztrátou sluchu, abnormalitami semicirkulárních kanálků, vrozenou srdeční vadou, anomální chrupavkou trachey, genitouretrálními anomáliemi, malformacemi mozku a symetrickými syndaktyliemi na rukou (Blank, 1960). U pacientů je často přítomna mentální retardace (Patton et al., 1988). Příčinou syndromu jsou mutace v genu *FGFR2* s AD dědičností, a téměř vždy v důsledku mutací *de novo* (Wilkie et al., 1995), které jsou často spojovány s vyšším věkem otců (Moloney et al., 1996). Prevalence je 1,5 : 100 000 obyvatel (Cohen et al., 1992). Diagnostika je dostupná v ČR.

1.1.1.11. Jervell and Lange-Nielsen syndrom (JLNS)

Zřejmě nejvíce život ohrožujícím syndromem spojeným se ztrátou sluchu je JLNS, jehož anglickým synonymem je „Prolonged QT interval in ECG and sudden death“. Tento syndrom je spojením sensorineurální ztráty sluchu a prodlouženého QT intervalu na EKG (Jervell and Lange-Nielsen, 1957). Syndrom je možnou příčinou náhlých kolapsů v období puberty, ale také jednou z příčin syndromu náhlého úmrtí novorozence. Účinnou prevencí náhlé tachykardie s fatálními následky je implantace kardiostimulátoru (Mirowski et al., 1980). Prevalence JLNS je do 1 : 100 000 obyvatel (Fraser et al., 1964). Je způsoben mutacemi v genech *KCNQ1* a *KCNE1* (Neyroud et al., 1997; Schulze-Bahr et al., 1997) s AR dědičností, tedy s bialelickými mutacemi v těchto genech, přičemž heterozygotní mutace ve stejných

genech způsobují syndrom Romano-Ward tj. izolované prodloužení QT intervalu bez přítomnosti ztráty sluchu (Romano, 1965). I tyto geny jsou vyšetřovány v ČR.

1.1.1.12. Alportův syndrom (ATS)

ATS s prevalencí 0,5 na 100 000 obyvatel, sdružuje poruchu sluchu, která je progresivní, asymetrická a postlingvální s nástupem od 2. dekády života, s onemocněním ledvin (Alport, 1927). Nejčastěji je X-vázaná (asi 85 % – geny *COL4A5* a *COL4A6*), méně často se vyskytuje AR (asi 15 % – geny *COL4A3*, *COL4A4*) a velmi vzácně AD forma, která se také označuje jako Alport-like syndrom a spadá do *MYH9*-vázaných poruch (viz dále DFNA17) (Kashtan, 1999). Geny *COL4A5* a *MYH9* jsou vyšetřovány v ČR, diagnostika ostatních genů je dostupná v Evropě.

1.1.1.13. Další syndromy prokázané u českých pacientů

Z velmi vzácných syndromů byl dále v ČR u dvou pacientů prokázán Wolframův syndrom („DIDMOAD“ syndrom – diabetes insipidus, diabetes mellitus, atrofie optiku a hluchota – osobní komunikace s doc. Průhovou, Pediatrická klinika FNM, ze dne 2. 3. 2011) a z mitochondriálních syndromů (MELAS – 32 pacientů, z nichž 75 % mělo poruchu sluchu a MERFF – 3 pacienti osobní komunikace s doc. Honzíkem, Laboratoř Mitochondriálních Poruch, KDDL VFN, ze dne 25.4.2014) – viz dále 1.1.3.

1.1.2. Nesyndromová ztráta sluchu (NSHL)

Nesyndromová ztráta sluchu je výrazně častější než syndromová a je zdaleka nejčastěji AR dědičná (Morton, 1991). Vzhledem k vysoké prevalenci v populaci je společensky velmi závažná. Neslyšící děti rodící se slyšícím rodičům i slyšící děti narozené neslyšícím rodičům si do života nesou velký společenský handicap. I přesto, že postižení u dětí s vrozenou poruchou sluchu je v tomto případě izolované a nijak neovlivňuje výchozí úroveň intelektu dítěte, v případě pozdního zjištění nebo neadekvátní péče může být příčinou izolace od vjemů z okolí a zejména vlastní rodiny a vést k nerovnoměrnému vývoji, opoždění řeči a narušení či nenavázání sociální interakce. Velmi důležitým faktorem je zde proto časná diagnostika, zejména zavedení celoplošného novorozeneckého screeningu sluchu a následné genetické vyšetření zachycených pacientů. Je však třeba pamatovat i na možnost falešné negativity novorozeneckého screeningu sluchu a pozdějšího nástupu ztráty sluchu, proto je nutné sluch u dětí kontrolovat v případě podezření rodičů opakovaně a vyhnout se možné bagatelizaci problému (Norris et al., 2006).

Nesyndromová ztráta sluchu je geneticky značně heterogenní. Seznam genů a lokusů zodpovědných za nesyndromovou ztrátu sluchu je velmi dlouhý a zahrnuje k dnešnímu dni 42 lokusů (26 genů) způsobujících AD ztrátu sluchu, 74 lokusů (40 genů) zodpovědných za AR ztrátu sluchu a 5 lokusů (3 geny) zodpovědných za X-vázanou ztrátu sluchu (“Hereditary Hearing Loss - Hereditary Hearing loss Homepage,” n.d., “OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man,” n.d.). Nedávno byl dokonce identifikován lokus pro Y-vázanou ztrátu sluchu (Vozzi D et al., 2013).

U nesyndromové ztráty sluchu obecně platí dávno známé pravidlo, že AR ztráty sluchu jsou typicky časně (prelingvální) a těžké, zatímco AD dědičné typy jsou pozdní (v dospělosti), mírnější a obvykle progresivní (Smith and Van Camp, 1999). I toto pravidlo má však své výjimky, viz dále.

Jednotlivé nozologické jednotky byly postupně popisovány a vazebnou analýzou lokalizovány do jednotlivých lokusů na různých chromozomech. Tyto lokusy byly označeny zkratkou „DFN“ (z anglického DeaFNess) a označením dědičnosti – „DFNA“ pro AD dědičné typy, „DFNB“ pro AR dědičné typy a X-vázané jednotky byly původně bez koncovky („DFN“), nově však nomenklatura uvádí tyto jednotky jako „DFNX“ s odlišným číslováním než u původních „DFN“.

Lokusy byly číslovány historicky dle pořadí jejich identifikace. Některá čísla lokusů byla zarezervována, k publikaci daného typu poruchy sluchu však ne vždy došlo, u poslední identifikované DFNB je tedy dnes označení DFNB 96, ačkoliv popsanych lokusů s jasně definovanou jednotkou je pouze 70. Jednotlivé typy NSHL jsou označovány názvem lokusu (např. DFNB1), v některých případech je dokonce stejné označení používáno i pro kauzální gen (např. DFNA5).

Během procesu identifikace genu je také často zjištěno, že několik dříve pojmenovaných jednotek je ve skutečnosti způsobeno mutacemi ve stejném genu, pojmenování pak slučuje všechna čísla původně popsanych lokusů (např. DFNA6/14/38, DFNA8/12, DFNB8/10, DFNB7/11). Naopak v jiných případech je zjištěno působení více genů podílejících se na vzniku stejné jednotky (např. DFNB1, DFNB4, DFNA2, DFNA3, DFNA4), pak se užívá odlišení písmeny (např. DFNA2A, DFNA2B). V některých případech mohou geny působit i v součinnosti – tzv. digennické působení (např. DFNB1). V převážné většině případů se jedná o geny nacházející se ve stejném již pojmenovaném lokusu, výjimku tvoří DFNB4, kde se tři geny (*SLC26A4*, *FOXI1* a *KCNJ10*) podílející se na společném fenotypu digenním působením nachází na různých chromosomech a DFNB12, kde byla popsána role modifikujícího efektu druhého genu (*ATP2B2*).

Alelické choroby

Vysoká genetická heterogenita NSHL je dále komplikována výskytem tzv. alelických chorob. Alelické choroby jsou různé nosologické jednotky způsobené mutacemi ve stejném genu. Stejný gen tedy může být zodpovědný zároveň za výskyt syndromu s poruchou sluchu i nesyndromové ztráty sluchu (typicky u Usherova syndromu, Sticklerova či Pendredova syndromu a dalších), ale také syndromu, který ztrátu sluchu nezahrnuje (epifyzeální dysplázie, palmoplantární keratóza, erytrokeratodermie apod).

Alelické mohou být i jednotky s různým typem dědičnosti. Velmi často určité mutace v genu způsobujícím AR-NSHL mohou způsobit i AD-NSHL (typicky u DFNB1 a DFNA3, DFNB7/11 a DFNA36, DFNB37 a DFNA22, dále viz tabulky 3 a 4).

V Tabulka 1 je na příkladu Usherova syndromu ukázána jednak široká genetická heterogenita u jediného syndromu (celkem 9 různých genů a 3 lokusy, jejichž poruchy jsou zodpovědné za 12 typů Usherova syndromu, které se navzájem fenotypicky liší tíží projevů) a jednak značný počet alelických chorob k danému syndromu, zejména nesyndromových poruch sluchu a to nejen AR, ale i AD dědičných. Dědičnost u všech typů Usherova syndromu je AR.

Tabulka 1 – Usherův syndrom a jeho alelické choroby

Usher typ	Gen / lokus	AR hluchota	AD hluchota
1A	14q32		
1B	<i>MYO7A</i>	DFNB 2	DFNA 11
1C	<i>USH1C</i>	DFNB 18	
1D	<i>CDH23</i>	DFNB 12	
1E	21q21		
1F	<i>PCDH15</i>	DFNB 23	
1G	<i>SANS</i>		
2A	<i>USH2A</i>		
2B	3p23		
2C	<i>GPR98</i>		
2D	<i>WHRN</i>	DFNB 31	
3	<i>CLRN1</i>		

Dalším podobným příkladem je AD dědičný Sticklerův syndrom, kde kromě DFNA13 a DFNB53 alelických k Sticklerovu syndromu typu 3, jsou k dalším typům tohoto syndromu alelické choroby postihující převážně pohybový systém a růst kostí – viz tabulka 2.

Tabulka 2 – Sticklerův syndrom a jeho alelické choroby

Stickler	Gen / lokus	AD hluchota	AR hluchota	Jednotky bez ztráty sluchu
Typ 1	<i>COL2A1</i>			
Typ 2	<i>COL11A1</i>	Marshall sy		Fibrochondrogenesis typ 1
Typ 3	<i>COL11A2</i>	DFNA13, Weissenbacher- Zweymuller sy.*	DFNB53, OSMED	Fibrochondrogenesis typ 2*
Typ 4	<i>COL9A1</i>			Epiphyseal dysplasia, multiple, typ 6
Typ 5	<i>COL9A1</i>			Epiphyseal dysplasia, multiple, typ 2

Hvězdičkou jsou označeny jednotky, u kterých byla popsána jak AD, tak AR forma dědičnosti. OSMED – Otospondylomegaepiphyseal dysplasia – porucha sluchu, stigmatizace, epifyzeální dysplázie, anomálie obratlů, zkrácení dlouhých kostí končetin.

1.1.2.1. Autosomálně recesivně dědičná NSHL (AR-NSHL)

Tato skupina onemocnění je, jak již bylo uvedeno, značně geneticky heterogenní, avšak až 50 % případů spadajících do této kategorie je způsobeno mutacemi v jediném genu – *GJB2* v lokusu DFNB1. Ze zbylých 50 % jsou dále nacházeny, avšak s mnohem nižší prevalencí jednotky DFNB4, DFNB2, DFNB3, DFNB9, DFNB8/10, DFNB 7/11, DFNB12 a DFNB21, další AR-NSHL byly nalezeny pouze raritně, u méně než 10 rodin a jejich přehled je shrnut v tabulce 3. Některé jednotky jsou častější v určitých etnických skupinách, zatímco v jiných se téměř nevyskytují (DFNB6, DFNB22, DFNB49, DFNB63, DFNB77).

V současné době jsou k dispozici pouze dvě studie, které mohou poskytnout orientační náhled na výskyt méně častých AR-NSHL jednotek, a to jednak Hutchinsonova britská studie z roku 2005 zahrnující 80 párů sourozenců, u kterých byla provedena vazebná studie lokusů DFNB1–29 a následně sekvenace vybraných genů (Hutchin et al., 2005), a jednak americká studie Diaz-Horta z roku 2012, která vyšetřila 20 rodin s AR-NSHL, převážně blízkovýchodního původu, za pomoci celogexomovou sekvenování (whole exome sequencing, WES) (Diaz-Horta et al., 2012).

Současné diagnostické možnosti AR-NSHL zahrnují v ČR vyšetření genu *GJB2* na devíti pracovištích (dle Databáze genetických pracovišť SLG ČLS JEP – <http://www.slg.cz/pracoviste/vysetreni/>), vyšetření některých dalších genů jsou dostupná v různých evropských laboratořích. Dvě komerční společnosti (CGC Genetics, Porto, Portugalsko a Asper Biotech Ltd, Tartu, Estonsko) nabízejí cílené vyšetření mutací ve

vybraných genech pro AD i AR NSHL. CGC Genetics nabízí vyšetření 309 mutací v 31 genech, Asper Biotech vyšetřuje 249 mutací v 10 genech. Oba panely se zcela nepřekrývají.

V následujících odstavcích bude pojednáno o jednotkách, které byly prokázány u více než 10 rodin, a to v různých částech světa.

Tabulka 3 – Příčiny a frekvence AR dědičné nesyndromové ztráty sluchu

AR-NSHL	Gen / lokus	AD	Alelický AR sy	#
DFNB1	<i>GJB2/6</i>	DFNA3, KID		>100 (50 % NSHL)/5/>10
DFNB2	<i>MYO7A</i>	DFNA11	USH 1B	8 / 7 / >100
DFNB3	<i>MYO15A</i>			>10 ¹⁾
DFNB4	<i>SLC26A4</i>		Pendred	>100 (>5 % NSHL) / >100
DFNB5	14q12			1
DFNB6	<i>TMIE</i>			8 ²⁾
DFNB7/11	<i>TMC1</i>	DFNA36		>10 / 2
DFNB8/10	<i>TMPRSS3</i>			> 10 ³⁾
DFNB9	<i>OTOF</i>			>10 ⁴⁾
DFNB12	<i>CDH23</i>		USH 1D	>10 ⁵⁾
DFNB13	7q34-q36			2
DFNB14/17	7q31			1+1
DFNB15/72/95	<i>GIPC3</i>			6
DFNB16	<i>STRC</i>			4
DFNB18A	<i>USH1C</i>		USH 1C	5
DFNB18B	<i>OTOG</i>			2
DFNB19/46	18p11			1+1
DFNB20	11q25-qter			1
DFNB21	<i>TECTA</i>	DFNA8/12		> 10 / 9
DFNB22	<i>OTOA</i>			2
DFNB23	<i>PCDH15</i>		USH 1F	5 / 3
DFNB24	<i>RDX</i>			3
DFNB25	<i>GRXCRI</i>			4
DFNB26	4q31			1
DFNB27	2q23-q31			1
DFNB28	<i>TRIOBP</i>			12
DFNB29	<i>CLDN14</i>			3
DFNB30	<i>MYO6</i>			1
DFNB31	<i>WHRN</i>		USH 2D	1
DFNB32	1p22.1-p13.3			1
DFNB33	10p11.23-q21.1			1
DFNB34	3p22.1			1
DFNB35	<i>ESRRB</i>			8
DFNB36	<i>ESPN</i>			4
DFNB37	<i>MYO6</i>	DFNA22	hKMP	3 / 41
DFNB38	6q26-q27			1
DFNB39	<i>HGF</i>			40
DFNB40	22q11.21-q12.1			1
DFNB42	<i>ILDR1</i>			12
DFNB44	7p14.1-q11.22			1
DFNB45	1q43-q44			1
DFNB47	2p25.1-p24.3			1
DFNB48	15q23-q25.1			1
DFNB49	<i>MARVELD2</i>			>10 ⁶⁾
DFNB50	12q23-qter			1
DFNB51	11p13-p12			2
DFNB53	<i>COL11A2</i>		viz tabulka 2	2 / 2 / >10
DFNB55	4q12-q13.2			1
DFNB57	10q23.1-q26.11			1
DFNB58	2q14.2-q14.3			1
DFNB59	<i>PJVK</i>			9
DFNB60	5q22-q31			1
DFNB61	<i>SLC26A5</i>			0,9%
DFNB62	12p13.2-p11.23			1
DFNB63	<i>LRTOMT</i>			> 10 ⁷⁾
DFNB65	20q13.2-q13.32			1
DFNB66	6p22.3-p21.2			1
DFNB67	<i>LHFPL5</i>			3
DFNB68	19p13.2			2
DFNB71	8p22-p21.3			1
DFNB73	<i>BSND</i>		Bartter 4A,B	5 / >10
DFNB74	<i>MSRB3</i>			5
DFNB77	<i>LOXHD1</i>			3 ⁸⁾
DFNB79	<i>TPRN</i>			6
DFNB81	19p13			1
DFNB82	<i>GPSM2</i>		CMCS	1
DFNB83	9p23-p21.2			1
DFNB84	<i>PTRPQ</i>			2
DFNB85	17p12-q11.2			1
DFNB86	16p13.3			1
DFNB89	16q21-q23.2			2
DFNB90	7p22.1-p15.3			1
DFNB91	<i>SERPIN6</i>			1
DFNB96	1p36.31-p36.13			1

Tučně vyznačené jednotky jsou rozebrány v textu úvodu, frekvence v populacích jsou uvedeny dále.

AD – Alelická AD NSHL/syndrom; **#** – Počet rodin s AR-NSHL / s alelickými chorobami; **USH** – Usherův syndrom; **hKMP** – ztráta sluchu spojená s hypertrofickou kardiomyopatií;

¹⁾ 5% Blízký Východ; ²⁾ 3,1% Turecko; ³⁾ 1,8% Pákistán; ⁴⁾ 3% Španělsko; ⁵⁾ 5% Japonsko; ⁶⁾ 15% ČR Romové; ⁷⁾ 8,7% Maroko; ⁸⁾ 5% Aškenázi Židé

1.1.2.1.1. DFNB1

Gen *GJB2* kódující protein Connexin 26 (Cx26) a jeho vztah k vrozené ztrátě sluchu byl objeven v roce 1997 (Kelsell et al., 1997), nejprve jako příčina AD ztráty sluchu a v zápětí i jako nejčastější příčina AR ztráty sluchu (Zelante et al., 1997). Gen byl mapován do lokusu DFNB1 (13q12.11), který byl jako první lokus vázaný k AR ztrátě sluchu identifikován již o 3 roky dříve (Guilford et al., 1994).

Mutace v genu *GJB2* jsou zodpovědné celosvětově až za 50 % vrozené nesyndromové hereditární ztráty sluchu (Schrijver, 2004), v České republice byly bialelické mutace v *GJB2* zjištěny jako příčina vrozené ztráty sluchu u 43 % pacientů (Seeman and Sakmaryová, 2006; Seeman et al., 2005, 2004). Nejčastější mutací v tomto genu v evropské – kavkazské populaci je c.35delG (v ČR 82,8 % všech patogenních mutací), druhou nejčastější v ČR je p.Trp24Stop (9,7 %, typická pro romskou populaci), častějšími mutacemi jsou dále IVS 1+1 G>A (4 %) a c.313del14 (3,7 %) (Seeman and Sakmaryová, 2006; Seeman et al., 2004).

V lokusu DFNB1 se dále nachází gen *GJB6*, jehož produkt Connexin 30 (Cx30) se podílí spolu s Cx26 na tvorbě konexonů spojujících epitelové buňky ve vnitřním uchu. Právě deficit komunikace buněk hlemýždě způsobuje ztrátu sluchu spojenou s mutacemi v genu *GJB2*. Spolupůsobení heterozygotních mutací v genech *GJB2* a *GJB6* v trans bylo považováno za první popsanou digenicky způsobenou příčinou ztráty sluchu, nejčastěji kombinaci rozsáhlé delece genu *GJB6* a jedné mutace v genu *GJB2*. Později se však ukázalo, že pravděpodobně nejde o digenický typ, ale že delece *GJB6* je asi spíše delecí regulační oblasti pro *GJB2* gen. Rozsáhlá 304 kb delece postihující i gen *GJB6* je druhou nejčastější mutací hereditární ztráty sluchu ve středomořské oblasti, kdy byli zachyceni i homozygoti pro tuto delecí (del Castillo, 2002), v populaci v ČR je však tato mutace velmi vzácná (Seeman et al., 2005).

K rozlišení DFNB1 způsobené mutacemi v genu *GJB2* a *GJB6* se používá označení DFNB1A resp. DFNB1B. Bodové mutace v *GJB6* jsou však velmi vzácné.

Specifické mutace v obou genech mohou být také příčinou DFNA3 a několika syndromů spojených s kožními symptomy – viz dále.

1.1.2.1.2. DFNB2

Nesyndromová AR dědičná ztráta sluchu typu 2 je způsobena mutacemi v genu *MYO7A* a je alelická k DFNA11 a Usherovu syndromu typu 1B. Ztráta sluchu je u DFNB2 prelingvální a může být provázena vestibulárními poruchami. Lokus DFNB2 byl stejně jako DFNB1 poprvé identifikován u pacientů z Tuniska, avšak na rozdíl od DFNB1 se nepodařilo najít další

tuniskou rodinu s vazbou k tomuto lokusu (Guilford et al., 1994). Byly však nalezeny dvě čínské rodiny s DFNB2, u kterých byl identifikován jako zodpovědný gen *MYO7A* (Liu et al., 1997). O existenci jednotky DFNB2 byly již vyjádřeny pochybnosti, někteří autoři ji považují pouze za neúplně vyjádřený Usherův syndrom 1B (Zina et al., 2001), který je oproti DFNB2 nepoměrně častěji diagnostikován – USH1B tvoří až 75 % všech USH, které mají prevalenci 3–4,4/100 000 obyvatel v různých populacích (Boughman et al., 1983; Hallgren, 1959; Weil et al., 1997). Tato otázka nebyla dosud uspokojivě zodpovězena zejména vzhledem k možnému poddiagnostikování jednotky DFNB2, která na rozdíl od Usherova syndromu nemá jasná diagnostická kritéria, která by jí odlišila od ostatních DFNB. Ve zmíněné Hutchinově studii sourozeneckých dvojic byly v genu *MYO7A* zachyceny pouze 3 nepatogenní polymorfismy (Hutchin et al., 2005), naopak v loňské americké studii 20 rodin vyšetřených pomocí WES byla u jedné ze tří konsangvinních iránských rodin zachycena patogenní mutace v homozygotní formě (Diaz-Horta et al., 2012). Mutace v genu *MYO7A* jsou součástí detekčního microarray kitu společnosti CGC Genetics.

1.1.2.1.3. DFNB3

V případě DFNB3 se jedná o těžkou vrozenou ztrátu sluchu bez dalších poruch, která je způsobena mutacemi v genu *MYO15A*. Lokus byl identifikován v roce 1995 vazebnou analýzou mezi obyvateli izolované vesnice na Bali, kde 2,2 % obyvatel trpěla vrozenou ztrátou sluchu (Friedman et al., 1995). Jeho pozice na 17p11.2 je v těsné blízkosti genu *PMP22*, jehož mutace může také způsobit ztrátu sluchu, spojenou s periferní neuropatií *CMT1A* (Valentijn et al., 1992). Stejná oblast může být také deletována v případě Smithova-Magenisova syndromu (SMS) (Smith et al., 1986) nebo nejčastější dědičné neuropatie, tzv. tomakulózní neuropatie (HNPP) a delece jedné alely genu *MYO15A* je považována za příčinu mírné ztráty sluchu u některých pacientů se SMS (Liburd et al., 2001; Probst et al., 1999). Mutace v genu *MYO15A* byly dále zjištěny u pacientů v Pákistánu (až u 5 % rodin s AR-NSHL (Friedman et al., 2002)), Turecku (6,2 % AR-NSHL (Cengiz et al., 2010; Duman et al., 2011)), Íránu (5,7 % AR-NSHL (Fattahi et al., 2012; Mahdieh et al., 2010)), dále u jednotlivců v Indii (Liburd et al., 2001), Tunisku (Belguith et al., 2009), Koreji (Woo et al., 2013) a u jedné rozsáhlé konsangvinní rodiny v Brazílii (Lezirovitz et al., 2008).

Gen *MYO15A* je velmi rozsáhlý – má 66 exonů a je celkově delší než 12 kb (Liang et al., 1999), není proto vhodným kandidátem pro testování sporadických případů v evropské populaci, kde není možná vazebná analýza, naopak se nabízí jako vhodná alternativa pro testování familiárního výskytu vrozené ztráty sluchu – např. sourozeneckých dvojic. V rámci

Hutchinovy studie byla konkordance v lokusu DFNB3 zjištěna u více než 22 % sourozenských párů s AR-NSHL (druhé nejvyšší procento po DFNB1, spolu s DFNB24), gen *MYO15A* však nebyl, vzhledem k jeho velikosti u těchto pacientů sekvenován. V rámci americké Diaz-Hortovy studie (2012) byly u 3 tureckých rodin ze 17 nalezeny patogenní mutace v homozygotní formě – největší záchyt ve studii. *MYO15A* je jediným genem, který má ve svém čipu zařazen Asper Biotech, avšak CGC Genetics nikoliv.

1.1.2.1.4. DFNB4 – NSEVA

Nesyndromová ztráta sluchu typu 4 je typicky spojena s rozšířením vestibulárního akveduktu (EVA, Enlarged Vestibular Aqueduct), nebo dalšími malformacemi středouší, nejčastěji Mondiniho dysplázií (MD), což je aplázie posledního závitů kochley (Phelps et al., 1998; Reardon et al., 1999). Podle některých autorů je DFNB4 pouze neúplným vyjádřením Pendredova syndromu (Reardon et al., 2000), se kterým je alelickou chorobou – obě jednotky jsou způsobeny mutacemi v genu *SLC26A4*, který je lokalizován na 7q31 (Baldwin et al., 1995).

DFNB4 mohou také způsobovat mutace v genu *FOXI1* (5q35.1) a *KCNJ10* (1q23.2) nejčastěji v kombinaci s jednou mutací v genu *SLC26A4* v rámci digenické dědičnosti (Yang et al., 2009, 2007).

DFNB4 je dle odhadů druhou nejčastější příčinou AR-NSHL po DFNB1. Blíže o jednotce pojednává kapitola 1.2.

1.1.2.1.5. DFNB6

Jako DFNB6 byla původně popsána AR-NSHL způsobená mutacemi v genu pro otoferlin (*OTOF*, 2p23.1), která je nyní označena DFNB9 (Chaib et al., 1996). Dle současné nomenklatury se DFNB6 rozumí AR-NSHL způsobená genem *TMIE* (Transmembrane inner ear expressed gene) v lokusu 3p21.31 (Fukushima et al., 1995; Naz et al., 2002). Produkt genu *TMIE* má 176 aminokyselin a nevykazuje homologii s žádným jiným lidským proteinem (Naz et al., 2002). Jeho funkce není dosud zcela objasněna. Nejčastější mutací v genu *TMIE* je p.Arg84Trp, která je v turecké populaci zodpovědná až za 3,1 % pacientů s AR-NSHL a již vyloučenými mutacemi v *GJB2*, v jihovýchodní Anatolii je to až 12,2 % (Sirmaci et al., 2009) (Sirmaci, 2009). Další mutace v tomto genu byly nalezeny u 2 indických (Fukushima et al., 1995; Naz et al., 2002) a 3 pákistánských rodin (Naz et al., 2002), v Evropě nebyly popsány.

Do lokusu 3p21.31 je mapován také Usherův syndrom 2B, u kterého dosud nebyl identifikován gen. Je zvažována možnost, že je také způsoben mutacemi v genu *TMIE* (Naz et

al., 2002). V Hutchinově studii nebyl tento gen analyzován. Ve studii WES nebyly detekovány žádné mutace. Diagnostika není nabízena.

1.1.2.1.6. DFNB7/11

Lokus DFNB7 na 9q21.13 byl prokázán vazebnou analýzou jako kauzální u dvou konsangvinních rodin (Jain et al., 1995), o rok později byl do stejné oblasti lokalizován i lokus DFNB11 nalezený u dvou beduínských rodin (Scott et al., 1996), následujícího roku však bylo dokázáno, že se jedná o totožné jednotky a proto byly sloučeny do jednoho názvu. DFNB7/11, která je současně alelickou chorobou DFNA36 (Van Camp et al., 1997). V roce 2002 byl identifikován jako kauzální gen *TMCI* u jedenácti DFNB7/11 a u dvou DFNA36 rodin (Kurima et al., 2002).

Mutace v genu *TMCI* byly prokázány v Súdánu (Meyer et al., 2005), Turecku (N Hilgert et al., 2008; Kalay et al., 2005), Pákistánu (3,4 % AR-NSHL (Kitajiri et al., 2007)), Íránu (Hildebrand et al., 2010b), Tunisku (3,3 % AR-NSHL (Tili et al., 2008)) a nedávno i u jedné holandské rodiny (de Heer et al., 2011). V Hutchinově studii nebyl gen sekvenován, v Diaz-Hortově studii byla zachycena homozygotní mutace u jedné z tureckých rodin. Mutace v tomto genu jsou zařazeny do microarray setů pro indentifikaci příčin NSHL u firmy CGC Genetics i Asper Biotech.

1.1.2.1.7. DFNB8/10

U DFNB8 a DFNB10 v lokusu 21q22.3 jde spíše než o sloučení názvu, které je popsáno výše, o dvě alelické choroby. DFNB8 je zvláštní jednotkou, protože jako jediná AR-NSHL má zcela atypicky postlingvální nástup ztráty sluchu v průběhu dětského věku (Veske et al., 1996). DFNB10 je naopak charakterizována naprosto typickou vrozenou těžkou ztrátou sluchu (Bonné-Tamir et al., 1996).

Obě jednotky jsou způsobeny mutacemi v genu *TMPRSS3* (Scott et al., 2001). Mutace v tomto genu byly zachyceny u pacientů v Pákistánu (1,8 % neslyšících s AR-NSHL a již vyloučenými mutacemi v *GJB2*, (Ahmed et al., 2004)), Palestině (Bonné-Tamir et al., 1996), Tunisku (Masmoudi et al., 2001)), Turecku (3 z 25 rodin (Wattenhofer et al., 2005)), u 1 rodiny v Německu (Elbracht et al., 2007)), ve dvou studiích provedených na euroamerické populaci neslyšících však byl výskyt těchto mutací velmi malý (2/448 resp. 0/64 AR-NSHL rodin) (Guipponi et al., 2008; Wattenhofer et al., 2005). V recentní studii však (Weegerink et al., 2011) uvádí záchyt *TMPRSS3* mutací u 8 holandských rodin, odpovídající cca 2,5 % vyšetřených neslyšících pacientů, ve dvou rodinách se jednalo o DFNB10 (prelingvální nástup ztráty sluchu) a v ostatních rodinách byl nástup ztráty sluchu od 5 do 33 let.

V Hutchinově studii britských neslyšících sourozenců byla homozygotní forma mutace v genu *TMPRSS3* zachycena u jedné rodiny a složení heterozygoti u dvou dalších rodin (Hutchin et al., 2005). V americké studii Diaz-Horty (2012) byla také zachycena homozygotní mutace u jedné rodiny tureckého původu. Přesto tento gen není zařazen do NSHL panelu ani jedné z firem nabízejících microarray čipy. V obou studiích je zmiňován vysoký počet nepatogenních polymorfismů nacházejících se v tomto genu.

DFNB8 je pro svou unikátnost – jediná AR-NSHL s postlingválním nástupem a pro relativně malý rozsah kauzálního genu (13 exonů) vhodným kandidátem pro další výzkum v evropské populaci.

1.1.2.1.8. DFNB9

Další z mála fenotypově odlišitelných jednotek je DFNB9 v lokusu 2p23.1. Tato jednotka byla původně pojmenována jako DFNB6 a identifikována v Libanonu (Chaïb et al., 1996), o 3 roky později byl identifikován kauzálním gen *OTOF* kódujícím protein otoferlin (Yasunaga et al., 1999) a byl přidělen nový název DFNB9 (“OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man,” n.d.).

Typickým znakem této jednotky je zachytitelnost otoakustických emisí (OAE), avšak nepřítomnost kmenových evokovaných potenciálů (ABR). Tento stav je způsoben poruchou funkce kochleární porce sluchového nervu (VIII. hlavového nervu) a je nazýván „Auditory neuropathy“ (AUN) (Starr et al., 1996). AR dědičná nesyndromová auditory neuropathy 1. typu (AUNB1) je také synonymem DFNB9. Auditory neuropathy se do češtiny nepřekládá (Lejska M and Havlík R, 2008) a kromě nesyndromových AUN jednotek se také vyskytuje u dětí extrémně nedonošených, nebo u pacientů s jinou neuropatií (např. CMT).

Mutace v genu *OTOF* jsou časté zejména ve španělské populaci, kde jsou zodpovědné až 3 % vrozených ztrát sluchu (Migliosi et al., 2002), ale byly prokázány i v dalších populacích, zejména na Blízkém východě (Adato et al., 2000; Leal et al., 1998; Yasunaga et al., 1999), ale i v USA (Varga et al., 2006). V Latinské Americe provedené studie prokázaly významně nižší výskyt mutací v tomto genu než v pevninském Španělsku (de Oliveira et al., 2007; Rodríguez-Ballesteros et al., 2003).

V Hutchinově sourozenecké studii však pouze 1 pár nesl homozygotní mutace v genu *OTOF* a v americké studii nebyly nalezeny žádné mutace. Hutchin uzavírá, že *OTOF* je tedy nejspíše méně častou příčinou ztráty sluchu v dalších evropských populacích kromě Španělska. Je však také možné, že vzhledem k odlišnému nálezu u DFNB9/AUNB1 byli již

pacienti cíleně vyšetřeni pro tento gen a nebyli do studií zařazeni. *OTOF* je součástí CGC Genetics čipu, ale ne čipu Asper Biotech.

1.1.2.1.9. DFNB12

Dalším z příkladů alelických chorob je DFNB12 v lokusu 10q22.1 (Chaib et al., 1996), která je způsobena bíalelickými mutacemi v genu *CDH23* pro protein cadherin (Bork et al., 2001). Mutace v tomto genu mohou způsobovat také Usherův syndrom 1D, ale také presbykusi (Bork et al., 2001).

Právě u presbykusi byl jako u jednoho z prvních genů spojovaných se ztrátou sluchu popsán efekt modifikujícího genu – *ATP2B2* pro Ca(2+)-ATPázu v lokusu 3p25.3 (Schultz et al., 2005). Mutace p.Val586Met v tomto genu je pokládána za faktor způsobující těžší ztrátu sluchu u pacientů s homozygotní mutací v genu *CDH23* (Schultz et al., 2005).

Zároveň byla i u této jednotky popsána digenická příčina ztráty sluchu – mutace v genu *CDH15* spolu s mutací v genu *CDH23* může způsobit Usherův syndrom 1D (Yan et al., 2010), byl také popsán případ digenického působení *CDH23* a *GJB2*, které vedlo k fenotypu podobnému DFNB12 (de Brouwer et al., 2003).

(Wagatsuma et al., 2007) usuzuje, že mutace v genu *CDH23* jsou zodpovědné až za 5 % NSHL v japonské populaci neslyšících. Mutace v tomto genu byly opakovaně popsány i v evropské populaci (Jaijo et al., 2012; Schultz et al., 2011), frekvence jejich výskytu však dosud nebyla stanovena. V Hutchinově ani Diaz-Hortově studii nebyly mutace v tomto genu zachyceny, ač byl sekvenován, mutace v tomto genu jsou součástí analýzy u CGC Genetics, ale ne u Asper Biotech. Diagnostiku nabízí dvě laboratoře v Německu a Španělsku (“Orphanet,” n.d.).

Gen *CDH23* má 47 kódujících exonů (Bork et al., 2001) a není tedy vhodným kandidátem ke screeningu neslyšících pacientů bez vazebné analýzy, lze však uvažovat o jeho analýze u pacientů s pouze jednou patogenní mutací v *GJB2*, kde byly již všechny možnosti diagnostiky vyčerpány a fenotyp je mírnějšího charakteru.

1.1.2.1.10. DFNB21

Středně těžkou až těžkou ztrátou sluchu s typickou křivkou audiogramu ve tvaru písmene U se vyznačuje DFNB21. Je způsobena mutacemi v genu *TECTA*, který je lokalizován v oblasti 11q23.3 a má 23 exonů, stejně jako její alelická choroba DFNA8/12 (Mustapha et al., 1999). Mutace v *TECTA* genu byly původně nalezeny u více než 10 DFNB21 rodin z Blízkého východu (Meyer et al., 2007; Mustapha et al., 1999; Naz et al., 2003), recesivní mutace byly

však již prokázány i v Evropě (Moreno-Pelayo et al., 2008), ačkoliv v evropské populaci převažují spíše mutace dominantní (Hildebrand et al., 2011).

V Hutchinově i Diaz-Hortově studii byla nalezena vždy jedna rodina s homozygotní mutací *TECTA*, v sourozenské studii byla dále nalezena jedna mutace u dvou sourozenců v heterozygotní formě. Mutace v tomto genu vyšetřuje CGC Genetics, ne však Asper Biotech. Testování cílené na tento gen nabízí několik laboratoří ve Španělsku, Francii, Nizozemí a Německu.

1.1.2.1.11. DFNB23

Mutace v genu *PCDH15* pro protocadherin (lokus 10q21.1) jsou příčinou jednak DFNB23 (Ahmed et al., 2008) a jednak Usherova syndromu 1F, byly prokázány i jako příčina digenické formy DFNB12 (Yan et al., 2010; Zheng et al., 2005) a hrají zřejmě roli v predispozici ke hlukem vyvolané ztrátě sluchu a presbyakusii (Sakaguchi et al., 2009). DFNB23 byla dosud popsána u 5 rodin – USA, Kanada (Doucette, 2009) a Pákistán (Ahmed et al., 2008). V Hutchinově studii byl gen sekvenován, byly nalezeny dva nepatogenní polymorfismy a nová mutace c.4323-4328delTCCGCC v heterozygotní formě pouze u jedné sourozenské dvojice. Ačkoliv nebyla tato mutace přítomna u 165 kontrol, autoři nejsou přesvědčeni o její patogenitě. V Diaz-Hortově studii nebyly *PCDH15* mutace nalezeny u žádného pacienta.

1.1.2.1.12. DFNB28

V Pákistánu, Indii a Palestině byly prokázány homozygotní mutace v genu *TRIOBP* jako příčina nesyndromové ztráty sluchu DFNB28 (Riazuddin et al., 2006). Tato forma NSHL má prelingvální nástup a jedná se o těžkou ztrátu sluchu. V evropské populaci dosud nebyla identifikována, v Hutchinově studii nebyl gen analyzován, v Diaz-Hortově studii se však u jedné rodiny tureckého původu našla nová mutace v genu *TRIOBP* v homozygotní formě.

1.1.2.1.13. DFNB35

Příčina jednotky DFNB35 byla zmapována do lokusu 14q24.3 (Ansar et al., 2003) a posléze identifikována jako gen *ESRRB* (Collin et al., 2008b). Kromě turecké rodiny (Collin et al., 2008b) a 5 pákistánských rodin (Ansar et al., 2003; Collin et al., 2008b; Lee et al., 2011) byla identifikována jedna rodina v Tunisku (Ben Saïd et al., 2011) a jako u osmé rodiny na světě byla nalezena homozygotní mutace p.Arg291Leu i u jedné české konsangvinní rodiny (Dana Šafka Brožková et al., 2012).

1.1.2.1.14. DFNB49

Homozygotní mutace v genu *MARVELD2* (jiným názvem *TRIC*) jsou příčinou ztráty sluchu u cca 1 % pákistánské populace, nejčastěji prokázanou mutací je c.1331+2 T>C (IVS4 + 2 T>C) (Ramzan et al., 2005). Tato mutace byla prokázána i v populaci českých Romů, jako příčina ztráty sluchu u tří z 20 vyšetřených romských rodin, v běžné české populaci neslyšících však mutace v tomto genu nebyly prokázány (D Šafka Brožková et al., 2012). V romské populaci se tedy zdá být DFNB49 druhou nejčastější příčinou ztráty sluchu a je tedy vhodné ji vyšetřit po vyloučení *GJB2* mutací. Toto zjištění potvrzují i nálezy (dosud nepublikované) stejné mutace u neslyšících Romů na Slovensku (osobní komunikace, prof.P.Seeman). Lokus DFNB49 byl identifikován až po vydání výsledků Hutchinovy studie, nemohl tedy do ní být zahrnut, v Diaz-Hortově studii *MARVELD2* zařazen byl, nebyly však nalezeny homozygotní mutace v tomto genu.

1.1.2.1.15. DFNB63

Šedesátý třetí lokus pro NSHL byl objeven v roce 2006 a lokalizován do oblasti 11q13.3q13.4 (Tlili et al., 2007), o dva roky později byl identifikován kauzální gen – *LRTOMT* (Ahmed et al. 2008). DFNB63 byla prokázána u tuniské (Tlili et al., 2007), íránské (Du et al., 2008), turecké (Duman et al., 2011) a pákistánské populace (Khan et al., 2007). V roce 2012 byla mutace c.242G>A v genu *LRTOMT* zjištěna u 8,75 % marocké neslyšící populace a u cca 4 % celkové populace bylo prokázáno heterozygotní nosičství. DFNB63 je tak zřejmě druhou nejčastější příčinou ztráty sluchu v Maroku (Charif et al., 2012). V Diaz-Hortově studii nebyly mutace v genu *LRTOMT* nalezeny.

1.1.2.1.16. DFNB77

V Diaz-Hortově studii byly pouze u dvou genů zachyceny mutace u více než jedné rodiny, kromě *MYO15A* (DFNB3), to bylo právě v genu *LOXHD1*, jehož mutace jsou příčinou DFNB77 (Diaz-Horta et al., 2012). Lokus byl původně identifikován v íránské rodině (Grillet et al., 2009), ve studii Diaz-Horty však nebyl gen identifikován u íránských, ale u tureckých pacientů, a to ve dvou rodinách, u kterých byly nalezeny homozygotní mutace v kauzálním genu. Později byla mutace p.Arg1572Stop prokázána v populaci aškenázských Židů, kde může být příčinou ztráty sluchu až u 5 % neslyšících (Edvardson et al., 2011).

Kromě výše zmíněných nálezů byly v Diaz-Hortově studii prokázány homozygotní mutace v genech *ILDRI* (DFNB42 – v literatuře 11 rodin: Írán a Pákistán) a *GIPC3* (DFNB15/72/95 – 5 rodin: Pákistán, Indie, Holandsko).

1.1.2.2. Autosomálně dominantně dědičná NSHL (AD-NSHL)

Autosomálně dominantně dědičná porucha sluchu je typicky postlingvální, mírnější a progresivní, je zde však více výjimek než u AR-NSHL, která je typicky prelingvální a stacionární (prelingvální nástup má DFNA3, DFNA8/12, DFNA23 a DFNA24). Některé AD-NSHL jednotky jsou typické ztrátami sluchu v konkrétních frekvencích, jsou pak někdy označovány i alternativními zkratkami, například jako LFHL – Low Frequency Hearing Loss jsou označovány DFNA1 (někdy také LFHL1) a DFNA6/14/38.

V současné době je identifikováno 42 lokusů, 26 genů a jedna mikroduplikace, které jsou zodpovědné za AD-NSHL (“OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man,” n.d.). Pouze 9 jednotek bylo identifikováno u 5 a více rodin. Přehled všech jednotek, genů a lokusů je shrnut v tabulce 4. V dalším textu jsou popsány pouze jednotky, u kterých bylo popsáno 5 a více rodin, nebo jsou klinicky odlišitelné od ostatních AD-NSHL (prelingvální nástup, specifický audiogram a pod.), event. mají alelickou chorobu s vyšší frekvencí výskytu.

Obecně jsou nové AD-NSHL lokusy identifikovány u evropské populace častěji než AR-NSHL, což je pochopitelné vzhledem ke kulturním rozdílům mezi oblastí Středomoří, Blízkého východu a jihovýchodní Asie s rozsáhlými často konsangvinními rodinami s mnoha potomky a evropskou populací s převážně malými rodinami s minimálním podílem konsangvinity a větší dostupností lékařské péče, která častěji rozkryje genetickou příčinu ztráty sluchu u těchto rodin.

Zatím byla publikována pouze jedna studie identifikující příčinu ztráty sluchu u AD-NSHL rodin příliš malých pro vazebnou analýzu (Baek et al., 2012), byla provedena u 8 korejských rodin. U 7 z nich byla nalezena varianta segregující se ztrátou sluchu v rodině, avšak pouze ve 4 případech byly mutace shledány patogenními.

Tabulka 4 – Příčiny a frekvence AD dědičné nesyndromové ztráty sluchu

AD-NSHL	Gen / lokus	AR	Alelický AD sy	#
DFNA1	<i>DIAPH1</i>			5
DFNA2A	<i>KCNQ4</i>			14
DFNA2B	<i>GJB3</i>	DFNB1, EKVP	EKVP	12 / 1 / 8
DFNA3A	<i>GJB2</i>	DFNB1A	PPKD, BPS, KID, HID, VS	>10 / >100 / >10
DFNA3B	<i>GJB6</i>	DFNB1B	HED	4
DFNA4A	<i>MYH14</i>		PNMHH	6
DFNA4B	<i>CEACAM16</i>			1
DFNA5	<i>DFNA5</i>			5
DFNA6/14/38	<i>WFS1</i>	WFS	WFLS	11 / 1% HL
DFNA7	1q21-q23			1
DFNA8/12	<i>TECTA</i>	DFNB21		9 / >10
DFNA9	<i>COCH</i>			>100
DFNA10	<i>EYA4</i>		CMD1J	4
DFNA11	<i>MYO7A</i>	DFNB2	USH1B	7
DFNA13	<i>COL11A2</i>	viz tabulka 2		2
DFNA15	<i>POU4F3</i>			5
DFNA16	2q23-q24.3			1
DFNA17	<i>MYH9</i>		EpS, FTNS, MHA, SBS, MCT	2 / 15 v ČR
DFNA18	3q22			1

DFNA20/26	<i>ACTG1</i>		BWS2	12
DFNA21	6p24.1-p22.3			1
DFNA22	<i>MYO6</i>	DFNB37	DFNA22 + hKMP	5
DFNA23	<i>SIX1</i>		BOR	1
DFNA24	4q35-qter			1
DFNA25	<i>SLC17A8</i>			1
DFNA27	4q12-q13.1			1
DFNA28	<i>GRHL2</i>			1
DFNA30	15q25-q26			1
DFNA31	6p21.3			1
DFNA33	13q34			1
DFNA36	<i>TMC1</i>	DFNB7/11		2 / 20
DFNA41	12q24.32-qter			1
DFNA43	2p12			1
DFNA44	<i>CCDC50</i>			1
DFNA47	9p22-p21	DFNB83		1
DFNA48	<i>MYO1A</i>			1
DFNA50	<i>MIR96</i>			2
DFNA51	<u>DUP9q21.11</u>			1
DFNA52	4q28			1
DFNA53	14q11.2-q12			1
DFNA59	11p14.2-q12.3			1
DFNA64	<i>DIABLO</i>			1

Tučně vyznačené jednotky jsou rozebrány v následujícím textu úvodu

AR – Alelická AR NSHL/syndrom,

– Počet rodin s AD-NSHL / s alelickými chorobami,

EKVP – ErythroKeratoderma Variabilis et Progressiva

PPK – Palmoplantar-Keratoderma-Deafness syndrom

BPS – Bart-Pumphreyův syndrom

VS – Vohwinkelův syndrom

KID – Keratitis-Ichthyosis-Deafness syndrom

HID – Hystrix-like-Ichthyosis-Deafness syndrom

HED – Hidrotickoá ektodermální dysplázie Cloustonova typu

WFS – Wolframův syndrom (DIDMOAD)

WFLS – Wolfram-like syndrom

CMD1J – hluchota provázená dilatační kardiomyopatií typu 1J

USH – Usherův syndrom

EpS – Epsteinův syndrom

FTNS – Fechtnerův syndrom

MHA – May-Heglinův syndrom

SBS – Sebastianův syndrom

MCT – makrotrombocytopenie spojená se ztrátou sluchu

BOR – Branchio-oto-renální syndrom

1.1.2.2.1. DFNA1

Autosomálně dominantní familiární NSHL vyznačující se maximem ztráty sluchu v nízkých frekvencích (LFHL1) byla popsána Koenigsmarkem v roce 1971 u 3 rodin z východního pobřeží USA (Konigsmark et al., 1971). Později byla publikována studie rozsáhlé rodiny z Kostariky, ve které byl v roce 1992 vazebnou analýzou identifikován lokus 5q31.3 jako

první lokus zodpovědný za AD-NSHL a pojmenován DFNA1 (Leon and Lalwani, 2002). Přechnodně byla tato jednotka také nazývána Koenigsmarkův syndrom, který byl definován jako AD dědičná sensorineurální porucha sluchu s kompletní penetrancí (Parving, 1984). Porucha sluchu začíná typicky v 10 letech jako lehká a ve 30 letech progreduje do hluboké ztráty sluchu. V kostarické rodině byl v roce 1997 potvrzen jako kauzální gen *DIAPH1* (Lynch et al., 1997). Dosud byla popsána pouze jediná další rodina s patogenní mutací v *DIAPH1* genu, a to v rámci Baekovy studie (Baek et al., 2012).

1.1.2.2.2. DFNA2

Podobně jako DFNB1 mohou jednotku DFNA2 způsobit mutace ve dvou různých genech, které jsou oba lokalizovány v jednom lokusu, a to 1p34.2. Příčinou DFNA2A je mutace v genu *KCNQ4* (Kubisch et al., 1999) a DFNA2B v genu *GJB3*. U obou jednotek je popsán rekurentní výskyt v rodinách s AD-NSHL.

DFNB2A začíná ve věku 5 až 15 let jako ztráta sluchu ve vysokých frekvencích, postupně progreduje do všech frekvencí a úplné ztráty sluchu ve věku 30 let (Coucke et al., 1994). Nekonstantním znakem je tinnitus, vestibulární obtíže nebyly pozorovány (Kubisch et al., 1999). Gen *KCNQ4* kóduje stejnojmenný protein, jehož tetramery tvoří draslíkové kanály ve vnějších vláskových buňkách (Kharkovets et al., 2000). V tomto genu bylo dosud popsáno devět různých, převážně missense, mutací u 14 rodin z Asie (Coucke et al., 1994; Kamada et al., 2006), USA (Coucke et al., 1999) i Evropy (Benelux, Španělsko, Švédsko, Francie) (Balciuniene et al., 1998; Kubisch et al., 1999; Marres et al., 1997; Mencía et al., 2008; Van Camp et al., 1997).

Produktem genu *GJB3* je protein Connexin 31, který je spolu s příbuznými proteiny Cx26, Cx30, Cx32 a Cx45 součástí konexonů umožňujících mezibuněčnou komunikaci (Richard et al., 1998, p. 3). Dominantní mutace tohoto genu jsou kromě DFNA2B zodpovědné také za jednotku zvanou ErythroKeratoderma Variabilis et Progressiva (EKVP), která nezahrnuje ztrátu sluchu, a za hluchotu provázenou periferní neuropatií (Richard et al., 1998, p. 3). Recesivní mutace v genu *GJB3* mohou být zodpovědné za recesivní formu EVKP, ale i AR-NSHL (DFNB1), a to buď jako mutace na dvou alelách genu *GJB3* (Liu et al., 2000) nebo jedna mutace v tomto genu spolupůsobí digenickým mechanismem s jednou mutací v genu *GJB2* (Liu et al., 2009). Bylo popsáno 11 různých mutací způsobujících AD EKVP, jedna mutace zodpovědná v homozygotní formě za AR EKVP, dvě mutace pro DFNA3B, tři pro DFNB1 a jedna mutace zodpovědná za AD ztrátu sluchu a periferní neuropatii (López-Bigas et al., 2001).

1.1.2.2.3. DFNA3

Dominantní mutace v genu *GJB2*, jehož recesivní mutace jsou nejčastější příčinou AR-NSHL (DFNB1A) (viz výše), jsou zodpovědné za DFNA3A (Chaïb et al., 1994) a podobně mutace v genu *GJB6* jsou příčinou jak DFNB1B, tak DFNA3B. Kromě DFNA3, která je sama o sobě velmi vzácná, způsobují dominantní mutace v obou genech také několik syndromů kombinujících AD ztrátu sluchu a různé kožní problémy - Bart-Pumphreyův syndrom (BPS) (Richard et al., 2004), Vohwinkelův syndrom (VwS), Hystrix-like-Ichthyosis-Deafness syndrom (HID) (van Geel et al., 2002), Keratitis-Ichthyosis-Deafness syndrom (KID) (Richard et al., 2002) a Palmoplantar-Keratoderma-Deafness syndrom (PPKD) (Maestrini et al., 1999). Connexin deafness homepage (“...::: The Connexin-deafness homepage :::...,” n.d.) uvádí 8 různých mutací v genu *GJB2* zodpovědných za AD syndromy, 9 mutací způsobujících DFNA3A a více než 80 mutací pro DFNB1. V genu *GJB6* jsou uváděny dvě různé mutace pro DFNA3A a dvě mutace pro Hidrotickou ektodermální dysplázii Cloustonova typu (HED).

1.1.2.2.4. DFNA4

Čtvrtým definovaným lokusem pro AD-NSHL byl v roce 1995 DFNA4 zmapovaný do oblasti 19q13.3 u rozsáhlé americké rodiny (Chen et al., 1995). Následovala identifikace genu *MYH14* (dřívějším názvem *KIAA2034*), jehož mutace byly prokázány v různých populacích včetně evropské (Německo, Itálie, Belgie), celkem u 6 rodin (Donaudy et al., 2004), byly však vyloučeny v původní americké rodině (Yang et al., 2005). Bylo tedy zjištěno, že v daném lokusu se nachází ještě jeden gen způsobující AD-NSHL, a to *CEACAM16*, jehož mutace byla potvrzena v původní americké rodině (Zheng et al., 2011) avšak dosud nebyly u žádné další rodiny nalezeny. AD-NSHL způsobená mutacemi v genu *MYH14* je označována DFNA4A a v genu *CEACAM16* jako DFNA4B. Nedávno bylo vysloveno podezření na přítomnost třetího genu v lokusu DFNA4 v rámci vazebné studie rozsáhlé čínské rodiny s vyloučenými mutacemi v *MYH14* i *CEACAM16* (Zong et al., 2012). Mutace v genu *MYH14* mohou kromě DFNA4A způsobovat také poruchu sluchu provázenou periferní neuropatií, myopatií a chrapotem, tato jednotka byla prokázána u jedné korejské rodiny (Choi et al., 2011).

1.1.2.2.5. DFNA5

Lokus DFNA5 je unikátní v několika směrech – z nomenklaturního hlediska (gen *DFNA5* leží v lokusu DFNA5), z hlediska výskytu mutací (je prokázáno, že pouze mutace vedoucí k vystřížení exonu 8 z transkriptu vedou k AD-NSHL a jedná se vždy o „gain of function“ mechanismus) (Van Laer et al., 2004) a zejména z hlediska další interakce a funkce genu

(metylace genu *DFNA5* hraje významnou roli v regulaci karcinogeneze v souvislosti s poruchou proteinu p53 – jedná se tedy zejména o familiární nádorové onemocnění žaludku, prsou a střev) (Masuda et al., 2006). *DFNA5* je typicky progresivní a byla dosud popsána u 5 rodin, a to zejména v jihovýchodní Asii a Holandsku (Bischoff et al., 2004; Huizing et al., 1966; Yu et al., 2003).

1.1.2.2.6. DFNA6/14/38

Druhým typem AD-NSHL s maximální ztrátou v nízkých frekvencích (LFHL) je *DFNA6/14/38*, jejíž příčinou jsou heterozygotní (dominantní) mutace v genu *WFS1* v lokusu 4p16.1 (Bespalova et al., 2001). Na rozdíl od *DFNA1* (LFHL1) u *DFNA6/14/38* ztráta sluchu ve frekvencích do 2000 Hz nastávající v první až druhé dekádě progreduje pouze velmi pomalu a nekončí úplnou ztrátou sluchu ani ve vysokém věku (Van Camp et al., 1999). V genu *WFS1* se vyskytují také tzv. recesivní mutace, které v homozygotní, nebo složené heterozygotní formě způsobují Wolframův syndrom neboli DIDMOAD (Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy and Deafness), který je oproti *DFNA6/14/38*, s pouhými 11 dosud popsanými rodinami, mnohem častější (incidence 1 : 100 000) (Cryns et al., 2003). Třetí jednotkou způsobenou mutacemi v genu *WFS1* je tzv. Wolfram-like syndrom, který je fenotypově shodný s Wolframovým syndromem, má však AD dědičnost a dosud byl popsán u 12 rodin, převážně evropského původu (Valéro et al., 2008).

1.1.2.2.7. DFNA8/12

Stejně jako její alelická choroba *DFNB21* se *DFNA8/12* vyznačuje pro AD-NSHL netypickým prelingválním nástupem a typickou křivkou audiogramu ve tvaru U (tj. postihuje zejména střední až vyšší frekvence). Obě jednotky jsou způsobeny mutacemi v genu *TECTA* (Verhoeven et al., 1998). *DFNA8/12* byla popsána u 9 rodin převážně evropského původu (Benelux, Francie, Švédsko, Španělsko a Rakousko) (Hildebrand et al., 2011, p. 12).

1.1.2.2.8. DFNA9

Dobře klinicky odlišitelnou jednotkou je *DFNA9*, která se sice vyznačuje postlingválním nástupem v časně dospělosti a progresivním vývojem společným pro většinu AD-NSHL, od ostatních ji však odlišuje výskyt vestibulárních obtíží včetně vertiga a tinnitu, audiogram s obrazem klesající křivky a HRCT (High Resolution Computed Tomography) pyramid ukazující dehiscenci jednoho z vestibulárních kanálků. Pomocí MRI lze zjistit ukládání specifických plaků do oblastí kanálků vestibulokokleárního nervu (n.VIII), což vede k jeho atrofii (Manolis et al., 1996). Příčinou *DFNA9* jsou mutace v genu *COCH*, jehož produktem

je protein cochlin, tvořící základ plaků v kanálcích skalní kosti (Robertson et al., 1998). Mutace v genu *COCH* jsou opakovaně nacházeny u rodin evropského původu, zejména ze zemí Beneluxu, ale i z Japonska, Číny, Austrálie a USA (Fransen and Van Camp, 1999; Hildebrand et al., 2010a; Manolis et al., 1996; Street et al., 2005; Yuan et al., 2008). Ačkoliv přesná frekvence výskytu DFNA9 nebyla dosud stanovena, mutace v *COCH* genu jsou považovány za jednu z nejčastějších příčin AD-NSHL a v případě výskytu kombinace sluchové a vestibulární poruchy je doporučováno jeho testování (Fransen and Van Camp, 1999). Toto testování provádí řada laboratoří, zejména v Belgii, ale i v Německu, Francii, Itálii a Španělsku.

1.1.2.2.9. DFNA10

Čtyři různé missense mutace v genu *EYA4*, který leží v oblasti 6q23.2, jsou zodpovědné za DFNA10 u 4 popsanych rodin ze 4 různých světadílů (Hildebrand et al., 2007; Makishima et al., 2007; Verhoeven et al., 2000; Wayne et al., 2001). Jediná popsaná delece v tomto genu způsobuje hluchotu provázenou dilatační kardiomyopatií typu 1J (CMDJ1) (Schönberger et al., 2000).

1.1.2.2.10. DFNA11

Jednotka DFNA11 je způsobena mutacemi v genu *MYO7A* (Liu et al., 1997), je tedy alelickou chorobou pro recesivní Usherův syndrom typu 1B (Weil et al., 1995) a DFNB2 (Liu et al., 1997). Ztráta sluchu je u DFNA11 postlingvální s pozorovaným nástupem od dětství do dospělosti, nejčastěji plochou křivkou audiogramu a nekonstantními vestibulárními obtížemi (Sun et al., 2011; Tamagawa et al., 1996). DFNA11 byla identifikována zatím u 7 rodin, zejména v Číně a Holandsku (Luijendijk et al., 2004; Sun et al., 2011; Tamagawa et al., 1996).

1.1.2.2.11. DFNA13

Další z AD poruch sluchu s typicky postlingválním nástupem a progresivním průběhem s maximem postižení ve středních frekvencích je DFNA13, jejíž příčinou jsou dominantní (heterozygotní) mutace v genu *COL11A2* (McGuirt et al., 1999), které jsou zodpovědné i za Sticklerův syndrom typu 3 (non-okulární forma) (Brunner et al., 1994), recesivní (bialeické) mutace v témže genu způsobují DFNB53 (Chen et al., 2005) a OSMED (Otospondylomegaepiphyseal dysplasia – porucha sluchu, stigmatizace, epifyzeální dysplázie, anomálie obratlů, zkrácení dlouhých kostí končetin) (Melkoniemi et al., 2000). Dominantní i recesivní formu pak mají další alelické choroby – Fibrochondrogenesis typ 2 (FBCG2), a

Weissenbacher-Zweymullerův syndrom (porucha sluchu, psychomotorická retardace, rhizomelické zkrácení končetin, deformity pánve) (Pihlajamaa et al., 1998). Dosud byly popsány 2 rodiny s DFNA13 (USA a Holandsko) (Brown et al., 1997).

1.1.2.2.12. DFNA15

Gen pro stejnojmenný transkripční faktor *POU4F3* je exprimován pouze ve tkáni vnitřního ucha (Hertzano et al., 2004). Jeho mutace jsou zodpovědné za DFNA15, která byla dosud prokázána u jedné rozsáhlé izraelské rodiny původem z Itálie (Vahava et al., 1998; Weiss et al., 2003), dvou holandských rodin (Collin et al., 2008a; van Drunen et al., 2009) a u dvou rodin v Koreji (Kim et al., 2013). Baekova studie prokázala novou mutaci u další korejské rodiny (Baek et al., 2012).

1.1.2.2.13. DFNA17

Mutace v genu *MYH9* jsou zodpovědné nejen za DFNA17, která je spíše jejich vzácným projevem, ale zejména za spektrum chorob vyznačujících se poruchou tvorby krevních destiček. May-Heglinův (Kelley et al., 2000), Sebastianův a Fechterův syndrom (Heath et al., 2001) sdílejí typickou trias – trombocytopenie, megakaryocytémie a typické Döhle-like inkluze v leukocytech. U Fechterova syndromu se k obrazu přidává ztráta sluchu, katarakta a nefritida. Jeho neúplné vyjádření se někdy označuje jako Alport-like syndrom. Jmenované příznaky sdílí také Epsteinův syndrom (Arrondel et al., 2002), který se od Fechterova odlišuje pouze nepřítomností Döhle-like inkluzí. Poslední jednotkou způsobenou mutací v genu *MYH9* je makrotrombocytopenie spojená se ztrátou sluchu. Pro DFNA17 je typická tzv. kochleosakulární degenerace zvaná též Scheibeho dysplázie (Scheibe A., 1892) a byla dosud popsána u dvou rodin, jedné americké (Lalwani et al., 2000) a jedné Australské (Hildebrand et al., 2006). Od roku 2003 se spekuluje, že všechny jednotky způsobené *MYH9* mutacemi jsou pouze spojitým spektrem příznaků jediného onemocnění, které se pak označuje jako MYH9-related disease (Seri et al., 2003). Diagnostika genu *MYH9* je k dispozici v ČR v ÚHKT, kde byly mutace v *MYH9* prokázány již u 15 pacientů s poruchami krvetvorby z 10 rodin (Provaznikova et al., 2009).

1.1.2.2.14. DFNA20/26

V roce 2000 byly v USA na třech různých rodinách identifikovány dva nové lokusy pro AD nesyndromovou ztrátu sluchu – DFNA20 a DFNA26 (Morell et al., 2000; Tlili et al., 2007), o tři roky později byl identifikován gen *ACTG1* jako příčina ztráty sluchu u všech popsáných rodin (Zhu et al., 2003) a bylo tedy konstatováno, že obě jednotky mapované do oblasti

17q25, jsou totožné a zavedlo se označení DFNA20/26 (DeWan, 2003). Mutace v genu *ACTG1* zároveň vyvolávají také Baraitser-Winterův syndrom typu 2 (BWS2), který je typický kolobomy duhovky, ptózou, hypertelorismem, mikrocefalií, ztrátou sluchu, mentální retardací a záchvatovým onemocněním (Rivière et al., 2012). Dosud bylo popsáno 12 pacientů s DFNA20/26 (USA, Norsko, Holandsko, Španělsko, Korea – vč. Baekovy studie) (DeWan et al., 2003; Morell et al., 2000; Rendtorff et al., 2006; van Wijk et al., 2003; Zhu et al., 2003) a 8 pacientů s BWS2 (Rivière et al., 2012).

1.1.2.2.15. DFNA22

Mutace v genu *MYO6* byly popsány u pěti rodin s DFNA22 (Itálie, Dánsko, Belgie, Německo, Čína) (Melchionda et al., 2001) a u jedné rodiny s familiární AD ztrátou sluchu a hypertrofickou kardiomyopatií (Mohiddin et al., 2004). DFNA22 se vyznačuje progresivní ztrátou sluchu začínající ve věku 8–10 let s progresí do úplné ztráty sluchu po padesátém roce věku. V některých případech může její obraz napodobovat presbyakusii (Nele Hilgert et al., 2008).

1.1.2.2.16. DFNA23

Jednotka DFNA23 byla popsána dosud pouze u jedné rozsáhlé švýcarsko-německé rodiny (Salam et al., 2000). Mutace v genu *SIX1*, které jsou její příčinou, zároveň způsobují Branchio-oto-renální syndrom, či jeho neúplně vyjádřenou formu – Branchio-otický syndrom (Ruf et al., 2004).

1.1.2.2.17. DFNA36

DFNA36 je alelickou chorobou k DFNB7/11, na rozdíl od recesivní ztráty sluchu jsou však mutace v genu *TMC1* spíše vzácnou příčinou dominantní ztráty sluchu – dosud byly popsány pouze 2 rodiny s touto jednotkou (Kitajiri et al., 2007; Kurima et al., 2002).

1.1.2.2.18. DFNA51

Pouze jediný prokázaný typ nesyndromové ztráty sluchu je způsoben mikroduplikací, a to DFNA51, za kterou je zodpovědná duplikace 269 kb v oblasti 9p21.1. Tato jednotka byla identifikována u rozsáhlé židovské rodiny tuniského původu, vyznačuje se nástupem progresivní ztráty sluchu ve čtvrté dekádě s přednostním postižením vysokých frekvencí (Walsh et al., 2010).

1.1.2.3. X-vázaná nesyndromová ztráta sluchu

Jako první X-vázaná nesyndromová ztráta sluchu byla popsána jednotka původně pojmenovaná DFN1, a to již v roce 1960 (Mohr and Mageroy, 1960), později byla však tato rodina přešetřena a byly u ní zjištěny další příznaky, zejména porucha zraku a dystonie, a ty byly společně se ztrátou sluchu shrnuty do syndromu Mohr-Tranebjaerg (Tranebjaerg et al., 1995). Ve stejné studii byl kauzální gen lokalizován do oblasti Xq22, a později identifikován jako *TIMM8A* (Tranebjaerg et al., 2000). Diagnostika genu *TIMM8A* je dostupná i v ČR.

Vzhledem k nomenklaturnímu zrušení pojmenování DFN a tím i této jednotky a zrušení jednotky DFN5 byla zavedena nová nomenklatura označující jednotku původně pojmenovanou DFN2 jako DFNX1, DFN3 jako DFNX2, DFN4 jako DFNX3 a DFN6 jako DFNX4. Jako DFNX5 je nyní označována jednotka původně pojmenovaná AUNX1 (Petersen et al., 2008) (viz tabulka 5).

Dle publikovaných dat jsou X-vázané ztráty sluchu zodpovědné za cca 5–6 % ztrát sluchu u mužů (Fraser, 1965a; Reardon and Pembrey, 1990).

Tabulka 5 – Tabulka shrnuje příčiny a frekvence XL dědičné nesyndromové ztráty sluchu

XL-NSHL	dřívější název	Gen / lokus	Alelické syndromy	Počet rodin s XL-NSHL / s alelickými syndromy
DFNX1	DFN2	<i>PRPS1</i>	Arts sy, CMTX5, PRPS1S	4 / 2 / 3 / 6
DFNX2	DFN3	<i>POU3F4</i>		až 50 XL-NSHL
DFNX3	DFN4	Xq23q27.3		2
DFNX4	DFN6	<i>SMPX</i>		6
DFNX5	AUNX1	Xq23q27.3	CMTX4, CMTX5	1

1.1.2.3.1. DFNX1

X-vázaná nesyndromová ztráta sluchu typu 1 (DFNX1, dříve DFN2) je lokalizována do Xq22.3 (Tyson et al., 1996) a způsobena mutací v genu *PRPS1* (Liu et al., 2010). Mutace ve stejném genu jsou také zodpovědné za Artsův syndrom (de Brouwer et al., 1993), XR typ choroby Charcot-Marie-Tooth – CMTX5 a Phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity (Kim et al., 2007). Ztráta sluchu u postižených mužů byla kongenitální a hluboká, nebo progresivní s absolutní ztrátou sluchu do 50 let, u žen přenašeček byla zjištěna mírná až střední porucha sluchu. Izolovaná ztráta sluchu způsobená mutacemi *PRPS1* genu byla dosud popsána u 4 rodin (Liu et al., 2010; Tyson et al., 1996).

1.1.2.3.2. DFNX2

Nejčastějším typem, zahrnujícím až 50 % X-vázané ztráty sluchu je DFNX2 (dříve DFN3), způsobená mutací v genu *POU3F4* (Bitner-Glindzicz et al., 1995; de Kok et al., 1995). Typickým znakem je fixace třmínku způsobující převážně převodní ztrátu sluchu na 30–40 dB. Na HRCT pyramid se kromě fixace třmínku typicky objevují také dilatace vestibula a vnitřního zvukovodu (Phelps et al., 1991). Molekulárně genetická diagnostika hraje důležitou roli především proto, že chirurgický zásah upravující fixaci třmínku je u pacientů s DFNX2 přísně kontraindikovaný vzhledem k téměř konstantní komplikaci – masivnímu proudění perilymfy do středního ucha – tzv. „perilymphatic gusher“ (Cremers et al., 1983), naopak jako velmi úspěšná se jeví léčba pomocí kochleární implantace (Lee et al., 2009). U mužů začíná porucha sluchu převodní složkou v časném dětství. Ženy přenašečky mohou trpět mírnější formou kombinované ztráty sluchu, nebyly však u nich zjištěny žádné anomálie skalní kosti (Phelps et al., 1991).

1.1.2.3.3. DFNX3

Dosud pouze u 2 rodin byla definována DFNX3 (dříve DFN4), typická hlubokou vrozenou ztrátou sluchu bez abnormalit na HRCT u mužů a mírnou poruchou sluchu u žen (Lalwani et al., 1994; Pfister et al., 1998). Molekulárně genetická příčina byla umístěna do lokusu Xp21.1, do těsné blízkosti genu *DMD*, bylo dokonce naznačeno, že právě dystrofin může hrát roli v patogenezi této jednotky (Pfister et al., 1998).

1.1.2.3.4. DFNX4

U celkem 6 rodin s muži postiženými progresivní ztrátou sluchu začínající v předškolním věku a končící úplnou ztrátou sluchu v druhé dekádě života a ženami s velmi variabilním, i když mírnějším stupněm a pozdějším nástupem sluchové poruchy, bylo identifikováno 5 různých mutací v genu *SMPX*. Tyto mutace jsou příčinou jednotky DFNX4 (dříve DFN6), gen je lokalizován v Xp22.12 (del Castillo et al., 1996; Schraders et al., 2011).

1.1.2.3.5. DFNX5

Jednotka DFNX5 (dříve AUNX1), jejíž dosud neidentifikovaný kauzální gen je lokalizován do oblasti Xq23q27.3 (Wang et al., 2006), je součástí spektra jednotek nazvaných „auditory neuropathy“ společně s AUNB1 (DFNB9, způsobená mutacemi v genu *OTOF*) a AUNA1 (není zahrnuta do „DFN“ nomenklatury, způsobena mutacemi v genu *DIAPH3*) (Schoen et al., 2010). Tato jednotka je typická progresivní ztrátou sluchu od druhé dekády života, poklesem otoakustických emisí (OAE) a abnormální odpovědí mozkového kmene (ABR)

(Wang et al., 2006). V dospělosti může DFNX5 provázet také periferní neuropatie. Dle Petersena (Petersen et al., 2008) se lokus překrývá také s CMTX4 a CMTX5, jejichž příznaky jsou také porucha sluchu a periferní neuropatie, hypotetizuje tedy, že v budoucnosti může dojít ke sloučení této jednotky s jednou z CMT jednotek.

1.1.3. Mitochondriální ztráta sluchu

Mutace v mitochondriální DNA jsou příčinou jak syndromové, tak i nesyndromové ztráty sluchu. Syndromové formy zahrnují MIDD (Maternally Inherited Diabetes and Deafness syndrome (Ballinger et al., 1992)) a ztrátu sluchu s pamoplantárním keratoderma (podobný obraz jako u KID syndromu vyvolanému genem *GJB2* (Hatamochi et al., 1982; Seviour et al., 1998)), kde je hluchota jedním ze dvou hlavních znaků, a syndromy MELAS (Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes (Goto et al., 1991; Montagna et al., 1988) a MERRF (Myoclonic Epilepsy associated with Ragged-Red Fibers (Fukuhara et al., 1980; Shoffner et al., 1990)), kde je ztráta sluchu nekonstantním znakem. Některé mutace jsou spojovány pouze s nesyndromovou ztrátou sluchu (m.827A>G, m.961delT/insC, m.961T>G, m.1494C>T, m.1555A>G, m.3388C>A, m.7510T>C, m.7511T>C, m.12201T>C), jiné mohou způsobovat jak nesyndromovou tak i syndromovou ztrátu sluchu (m.7472insC, m.7444G>A, m.7445A>G, m.8363G>A) – viz tabulka 6. Tíže příznaků většinou závisí na úrovni heteroplasmie (poměru počtu postižených a nepostižených mitochondrií) v dané tkáni. Přehled jednotlivých mutací a jimi vyvolaných afekcí je v tabulce 6.

Tabulka 6 – Mutace mtDNA a jejich klinické projevy

mtDNA mutace	NSHL	Další syndromy
m.827A>G	+	
m.961delT/insC	+	
m.961T>G	+	
m.1494C>T	+	
m.1555A>G	+	
m.3388C>A	+	
m.3243A>G		MIDD, MELAS, MERRF
m.3271T>C		MIDD, MELAS
m.7472insC	+	ataxie, myoklonus
m.7444G>A	+	LHON
m.7445A>G	+	Palmoplantární Keratoderma
m.7510T>C	+	
m.7511T>C	+	
m.8296A>G		MIDD, MELAS, MERRF
m.8363G>A	+	MERRF, KMP
m.12201T>C	+	
m.12258C>A		MIDD
m.14535_14536insC		MIDD
m.14709T>C		MIDD

(Upraveno dle Masindova et al., 2012)

Nesyndromová mitochondriální ztráta sluchu zahrnuje až 5 % veškeré NSHL (Ballana et al., 2007), nejčastější mutací je m.1555A>G, její prevalence v bělošské populaci byla různými studiemi stanovena na 1 : 385 (Rahman et al., 2012) a 1 : 500 (Bitner-Glindzicz et al., 2009). Mutace m.1555A>G je v Japonsku uváděna jako příčina až u 10 % pacientů s kochleárním implantátem a u 3 % všech pacientů s nesyndromovou ztrátou sluchu (Usami et al., 2000). Nosiče této mutace většinou postihne náhlá ztráta sluchu v souvislosti s užíváním aminoglykosidových antibiotik (Estivill et al., 1998; Rahman et al., 2012), mutace je zjišťována až u 33 % pacientů s historií užívání aminoglykosidových antibiotik (Usami et al., 2000). Existují však i pacienti bez prokázané expozice aminoglykosidům, u kterých byla prokázána ztráta sluchu v souvislosti s mutací m.1555A>G (Usami et al., 1997), a naopak

také nosiči mutace, kteří ani po expozici aminoglykosidům ztrátu sluchu neutrpěli (Rahman et al., 2012).

Vyšetření mutací 1494C>T, 1555A>G, 7510T>C, 7511T>C, 7512T>C, 7472insC a 7445A>G mtDNA způsobujících ztrátu sluchu je v ČR dostupné, žádná z mutací však nebyla dosud u žádného pacienta prokázána (osobní komunikace doc. Honzík, Laboratoř mitochondriálních poruch při Klinice dětského a dorostového lékařství Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, ze dne 25. 4. 2014).

1.2. Pendredův syndrom a NSEVA

Pendredův syndrom (PS, OMIM #274600) je autosomálně recesivně dědičné onemocnění projevující se kombinací senzorieurální (percepční) hluchoty a neendemické dyshormonogenetické strumy (Fraser, 1965b; Pendred V., 1896).

Porucha sluchu je převážně prelingvální, těžká či progredující a je doprovázena strukturálními abnormalitami vnitřního ucha a to obligátně rozšířeným vestibulárním akveduktem (Enlarged Vestibular Aqueduct – EVA) a/nebo vzácněji Mondiniho dysplázií (MD) (Phelps et al., 1998).

Postižení štítné žlázy u Pendredova syndromu se manifestuje nejčastěji v druhé dekádě života pod obrazem eutyroidní nebo hypotyroidní strumy (Fraser, 1965b; Reardon et al., 2000). Vzácně se může projevit dyshormonogeneze již při narození a onemocnění je pak diagnostikováno novorozeneckým screeningem pro kongenitální hypotyreózu (Banghova et al., 2008a).

Toto onemocnění je způsobeno mutacemi v genu *SLC26A4* (nazývaném také *PDS* gen, OMIM *605646) kódujícím aniontový transportér pendrin (Everett et al., 1997), který je exprimován zejména ve štítné žláze a vnitřním uchu (Scott et al., 2000).

Mutace v genu *SLC26A4* způsobují kromě PS také nesyndromovou ztrátu sluchu spojenou s EVA (DFNB4 – AR dědičná nesyndromová ztráta sluchu typ 4, OMIM #600791) (Li et al., 1998), která je definována jako autosomálně recesivně dědičná nesyndromová ztráta sluchu spojená s nálezem EVA/MD na HRCT pyramid, bez prokazatelné poruchy štítné žlázy (Baldwin et al., 1995).

Později byla u obou těchto chorob popsána i digenická dědičnost – mutace v genu *SLC26A4* v kombinaci s mutací v genu *FOXI1* (OMIM *601093) (Yang et al., 2007) nebo genu *KCNJ10* (OMIM *602208) (Yang et al., 2009), v recentních studiích však byl tento efekt opakovaně zpochybněn (Chen et al., 2012; Landa et al., 2013; Wu et al., 2010).

1.2.1 Historická fakta

V roce 1896 popsal Vaughan Pendred v Lancetu (Pendred V., 1896) hluchotu provázenou nálezem strumy u dvou neslyšících sester pocházejících z osmi sourozenců irského původu. Jako další Brain v roce 1924 popsal hluchotu a poruchu štítné žlázy u několika rodin a upozornil na autosomálně recesivní vzorec dědičnosti.

V 60. letech 20. století se problematikou ztráty sluchu spojené s poruchou štítné žlázy s abnormálním vstřebáváním jódu zevrubně zabýval G.R. Fraser, který navrhl pojmenování tohoto syndromu právě po V. Pendredovi, ačkoliv jisté zmínky o asociaci hluchonělosti a strumy byly v literatuře zaznamenány už dříve. Fraserovi se podařilo shromáždit 207 rodin s klinickou diagnózou Pendredova syndromu z různých částí Velké Británie a na základě rozsáhlých výpočtů stanovil prevalenci PS u dospělých na 7,5 na 100 000 a empiricky stanovil frekvenci heterozygotů v populaci na 0,008. PS určil jako příčinu hluchoty u 7,8 % dospělých a 4,8 % dětí ze dvou anglických hrabství (Fraser, 1965b). Nižší prevalence u dětí je nejspíše dána věkem manifestace poruchy štítné žlázy, protože právě porucha štítné žlázy byla hlavním vstupním diagnostickým kritériem do této studie.

Téměř přesně 100 let po Pendredově publikaci identifikovali Everettová a její spolupracovníci gen *SLC26A4* (*PDS*) lokalizovaný do oblasti 7q31 (Everett et al., 1997) jako molekulárně genetickou podstatu PS. Poukázali také na koincidenci s DFNB4, která byla lokalizována již v roce 1995 Baldwinem do lokusu 7q31 (Baldwin et al., 1995) a vyslovují podezření, že mutace v nově identifikovaném genu jsou zodpovědné i za DFNB4. O dva roky později tuto hypotézu potvrzuje Li, když identifikuje v rozsáhlé indické konsangvinní rodině s DFNB4 jako příčinu homozygotní mutaci v genu *SLC26A4* (*PDS*) (Li et al., 1998). U všech členů této rodiny byla prokázána EVA, ale u žádného z nich MD ani porucha štítné žlázy (nejstaršímu neslyšícímu probandovi bylo 38 let).

V návaznosti na toto zjištění popisuje Reardon rozšíření vestibulárního akveduktu (původně Large Vestibular Aqueduct syndrom (LVAS) popsaný Valvassorim (Valvassori and Clemis, 1978)) jako typický znak Pendredova syndromu. Zároveň poukazuje, že porucha štítné žlázy je nekonstantním znakem, označuje tedy jako Pendredův syndrom jakýkoliv výskyt EVA sdružený s mutacemi v genu *SLC26A4* (*PDS*) – bez ohledu na přítomnost poruchy štítné žlázy (Reardon et al., 2000). Toto sloučení pojmů však nebylo odbornou veřejností přijato a proto i nadále rozumíme Pendredovým syndromem původně popsanou jednotku se současným výskytem poruchy sluchu a štítné žlázy, v optimálním případě potvrzený nálezem obou mutací v genu *SLC26A4/PDS* dále viz definice PS a NSEVA.

První rodina s Pendredovým syndromem byla v ČR popsána ještě před objevením molekulárně genetické podstaty onemocnění (Astl et al., 1996) a bylo o něm dále referováno (Astl et al., 2004; Laštůvka, Petr, 2001). Rodina skládající se z tří postižených sester s poruchou štítné žlázy a vrozenou ztrátou sluchu popsána Astlem v původní publikaci, byla zařazena do této studie pro molekulárně genetické potvrzení diagnózy Pendredova syndromu.

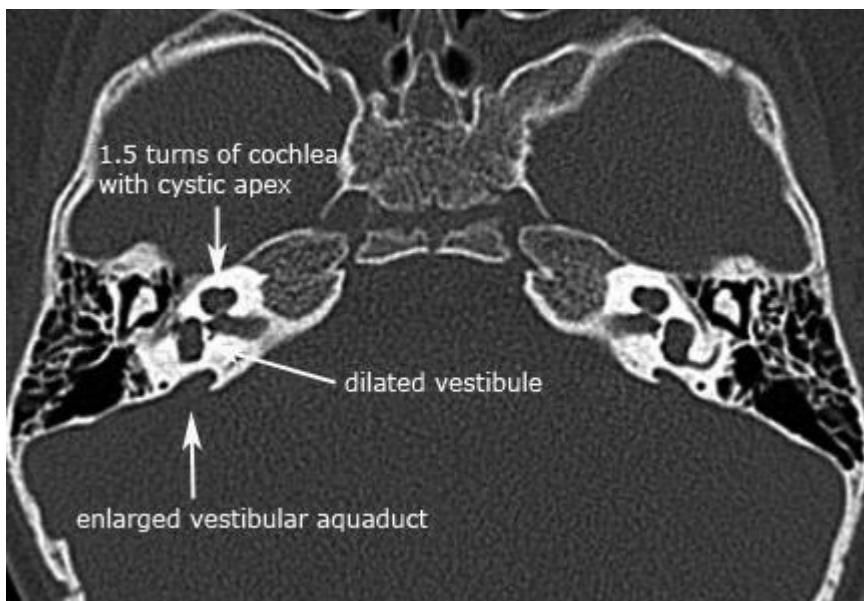
1.2.2. Klinický obraz Pendredova syndromu a NSEVA

Porucha sluchu: je ve většině případů těžká vrozená oboustranná, percepční. Pokud není naprostá hluchota přítomna již při narození, ztráta sluchu nastupuje typicky progresivně, občas vykazuje i fluktuální průběh (Colvin et al., 2006; Mori et al., 2008). Tíže postižení je velmi individuálně variabilní (inter- i intrafamiálně) a může kolísat (Napiontek et al., 2004). I bilaterální postižení sluchu může být asymetrické. U několika jedinců byla zjištěna progresivní nedoslýchavost, která se vyvinula po úrazu hlavy, nebo po závažné středoušní infekci. U některých pacientů jsou postiženy hlavně vyšší frekvence, k bazokochleárnímu postižení se přidává postupně i apikochleární nebo pankochleární. Problematická může být diagnostika u dětí s vrozenou hypotyreózou, kde je nedoslýchavost jedním z projevů tohoto stavu (Gaudino et al., 2005). Průkaz mutace v genu *SLC26A4/PDS* je pak optimální možností k odlišení různých jednotek (Banghova et al., 2008a), protože příčin kongenitální hypotyreózy může být mnoho, včetně mutací v dalších genech, např. *TTF 1, 2* a *PAX 8* (Al Taji et al., 2007; Lacroix et al., 2006).

Vestibulární příznaky: vestibulární dysfunkce je nekonstantním znakem PS/NSEVA, byla zjištěna u 12–66 % nemocných s PS, jejichž projevy byly charakterizovány jednostranným postižením polokruhových kanálků. Klinicky se projevuje epizodami vertiga, které mohou být spojeny s náhlým zhoršením sluchu či fluktuujícím průběhem ztráty sluchu (Stinckens et al., 2001). Zjednodušeně je možné přirovnat poruchu rovnováhy u PS k obrazu Menièrovy nemoci, se kterou je u některých pacientů zaměňována. V některých případech, kdy se objeví epizoda náhlého zhoršení sluchu a rotačního vertiga, může po určité době dojít k přetrvávání poruch rovnováhy. Obvykle je přítomna oboustranná vestibulární hyporeflexie.

Abnormality temporální kosti: patologický radiologický obraz temporální kosti (HRCT/MRI) byl zjištěn u všech pacientů s prokázaným Pendredovým syndromem či NSEVA, kde bylo toto zobrazení provedeno (Ito et al., 2011; Phelps et al., 1998). Nejčastější je rozšíření vestibulárního akveduktu - EVA (obr. 2), méně často v kombinaci s Mondiniho dysplázií (obr. 2), kde hlemýžď má jen jeden a půl závitů na místo dvou a půl a vzniká zde patologická komunikace mezi scala vestibuli a scala tympani se současným rozšířením saccus

a ductus endolymphaticus (Fugazzola et al., 2007). Ve většině případů je zjišťována oboustranná dilatace vestibulárního akveduktu. Vestibulární akvedukt je považován za rozšířený, pokud jeho průměr přesáhl 1,5 mm uprostřed jeho délky, resp. uprostřed šíře pyramidy kosti spánkové (Pryor et al., 2005). Dominující zobrazovací metodou je HRCT pyramid se zaměřením na struktury vnitřního ucha a šíři akveduktu (Goldfeld et al., 2005), v individuálních případech je indikována MRI (Sharghi et al., 2007), a to zejména pokud nelze celou délku vestibulárního akveduktu zachytit pomocí HRCT. Dle Fugazzoly (Fugazzola et al., 2007) jsou malformace membranózního labyrintu zobrazitelné při MRI považovány za znak s vůbec nejvyšší diagnostickou hodnotou.



Obrázek 2 – EVA a MD na HRCT pyramid

Převzato z <http://uwmsk.org/temporalbone/congenital.html>. Šipky označují rozšíření vestibulárního akveduktu – EVA, Mondiniho dysplázii a rozšířené vestibulum

Rozšíření vestibulárního akveduktu (EVA) je nejčastější radiologickou abnormitou nacházenou u 7-23 % pacientů se sensorineurální ztrátou sluchu (Albert et al., 2006; Azaiez et al., 2007; Cross et al., 1999) mediánem 15 % (Antonelli et al., 1999; Arcand et al., 1991; Phelps et al., 1998). Mondiniho dysplázie (MD) je naopak vzácnou malformací nacházenou u 2–4 % neslyšících pacientů (Albert et al., 2006; Cross et al., 1999), je však považován za více specifický pro PS než EVA (Campbell et al., 2001).

Porucha štítné žlázy: přibližně 75 % nemocných má v době diagnózy Pendredova syndromu zjištěnu klinicky přítomnou strumu většinou ve formě eufunkční. U ostatních pacientů svědčí o diagnóze pouze abnormální hodnoty hormonů štítné žlázy (ŠŽ), UZ nález bez makroskopického ekvivalentu nebo pozitivní perchlorátový test. Porucha funkce štítné

žlázy je vzácně pozorována již v dětství, avšak pacienti jsou většinou v pásmu eutyreózy (Caksen et al., 2001). Asi u 40 % postižených se struma vyvíjí v pozdním dětství či v počátku dospělosti, nejčastěji v období puberty, při existenci významné intrafamiliární variability těchto obtíží (Goldfeld et al., 2005; Pendred V., 1896). Většina nemocných je léčena substituční terapií, pouze 10 % postižených má abnormální funkci štítné žlázy spojenou s vzestupem sérových hladin TSH (Reardon et al., 1999). Zpočátku se jedná o difuzní postižení ŠŽ, později se objevuje nodulární přestavba, při které může i narůstat riziko maligní transformace (Skubis-Zegadło et al., 2005). Porucha štítné žlázy se však u přibližně 20 % pacientů nemusí vůbec klinicky projevit (Skubis-Zegadło et al., 2005). V těchto případech byl považován za vhodný diagnostický nástroj perchlorátový test prokazující zhoršenou organifikaci jódu, jelikož důsledkem poruchy jodidového transportního mechanismu je parciální defekt organifikace. U pacientů s Pendredovým syndromem je však patologický či hraniční výsledek perchlorátového testu pouze u 25 až 50 % případů (Gross et al., 1981; Scinicariello et al., 2005). Perchlorátový test je proto v současnosti již považován za málo senzitivní a s ohledem na vyšší radiační zátěž je logickou snahou jej nahradit molekulárně genetickým vyšetřením mutací v genu *SLC26A4* (Reardon et al., 1999). Perchlorátový test nelze doporučit především u žen ve fertilním věku a u dětí.

Nezbytné je odlišit endemický kretenismus, který je také spojen s poruchou sluchu, která však navazuje až na získanou hypotyreózu. Banghová publikovala nález dvou případů s potvrzenými mutacemi v genu *SLC26A4* ve skupině pacientů s kongenitální hypotyreózou z dvacetiletého intervalu sledování. Jde tedy v této skupině o zcela vzácný nález resp. příčinu (Banghova et al., 2008a). Poruchy sluchu společně s onemocněním štítné žlázy jsou popsány a jsou spojeny se 3 základními typy tyreopatií: endemickým kreténismem, Pendredovým syndromem a hypotyreózou vznikající v dospělém věku (Li et al., 1998). Byla popsána také hypertyreóza spojená s nedoslýchavostí (Stolbová et al., 1983). Výskyt fenokopií byl také popsán v české studii, kde u dvou pacientů s kongenitální hypotyreózou došlo perinatálně k rozvoji ztráty sluchu, avšak mutace v genu *SLC26A4* nebyly detekovány (Banghova et al., 2008a).

V souvislosti s Pendredovým syndromem byly popsány karcinomy štítné žlázy (Abs, 1991) a heterotopie štítné žlázy na kořeni jazyka (Wetke, 1989).

1.2.3. Incidence a prevalence Pendredova syndromu a NSEVA

Incidence Pendredova syndromu uváděná Fraserem (Fraser, 1965b) je 7,5 na 100 000 obyvatel, ostatní autoři uvádějí incidenci v rozmezí 1 až 8 na 100 000 obyvatel (Pryor et al.,

2005, p. 20; Reardon et al., 2000). Pendredův syndrom je považován za nejčastější příčinu syndromové hluchoty. Uváděná prevalence molekulárně geneticky potvrzeného PS či NSEVA je 7,5–10 % všech postižených vrozenou hluchotou (Grimaldi et al., 2007; Kopp et al., 2008; Maciaszczyk and Lewiński, 2008; Pearce, 2007; Reardon et al., 2000). Pro takto vysokou četnost však nesvědčí údaje dalších autorů (Azaiez et al., 2007; Hutchin et al., 2005), jejichž výsledky odpovídají až 3× nižšímu výskytu.

Reardon předpokládá poddiagnostikování obou jednotek, zejména u pacientů, kteří trpí NSEVA, a jsou tedy zařazeni do rozsáhlé skupiny NSHL, odkud je nelze diferencovat, pokud není provedeno vyšetření HRCT nebo MRI, které by odhalilo EVA/MD, což se však většinou děje pouze u kandidátů kochleární implantace, nebo v případě náhlého zhoršení sluchu či rovnováhy nebo úrazu (Reardon et al., 1999). Právě určením podílu NSEVA v celkovém počtu pacientů s NSHL se také zabývá má studie.

1.2.4. Molekulární genetika

Příčinou PS a NSEVA jsou bialelické mutace v genu *SLC26A4*. Záchyt mutací mezi pacienty s PS je popisován vysoký – 60–90 % (Blons et al., 2004; Campbell et al., 2001; Coyle et al., 1998; Pera et al., 2008b), zatímco u NSEVA, kde údaje v původních publikacích sice také uváděly vysokou záchytnost – 60–80 % (Cremers, 1998; Reardon, 1999, Wu, 2005), jsou v novějších publikacích uváděna spíše nižší čísla – 24–40 % (Albert et al., 2006; Azaiez et al., 2007; Yang et al., 2009).

Spektrum mutací se liší podle etnického složení populace, zatímco v evropské a americké bělošské populaci není žádná mutace dominantní, ale rekurentně se objevují mutace p.Leu236Pro, p.Thr416Pro, c.1001+1G>A a p.Val138Phe (Blons et al., 2004; Campbell et al., 2001; Pryor et al., 2005), v asijské populaci dominují mutace c.919A>G, zejména v Číně a Jihovýchodní Asii (Park et al., 2003; Reyes et al., 2009) a p.His723Arg v Japonsku (Kitamura et al., 2000; Tsukamoto et al., 2003; Usami et al., 1999). U většiny rekurentních mutací v evropské populaci byl prokázán jejich společný původ resp. efekt zakladatele (founder efekt) (Borck et al., 2003; Pera et al., 2008b).

Dosud bylo nalezeno více než 400 variant v genu *SLC26A4*, které byly zpočátku shrnovány na Pendred and BOR homepage provozované University of Iowa (“Pendred and BOR homepage,” n.d.). Jsou zde uvedeny všechny mutace popsané v literatuře do roku 2007 tj. 174 variant, z nichž některé byly v pozdějších publikacích prokázány jako nepatogenní polymorfismy.

V Single Nucleotide Polymorphisms **database** (dbSNPs) of the National Center for Biotechnology Information (“Variation Viewer: SLC26A4,” n.d.) je však uvedeno pouze 83 odchylek v genu *SLC26A4*, z toho u 32 mutací byla prokázána jasná patogenita, 12 odchylek je považováno za pravděpodobně patogenní, 5 za pravděpodobně nepatogenní a 9 odchylek za nepatogenní varianty. Zbýlých 16 odchylek je dosud neznámého významu.

Exome Variant Server (“Exome Variant Server,” n.d.) zveřejňuje 182 variant v genu *SLC26A4* z toho 37 pravděpodobně patogenních, 12 s možnou patogenitou, 31 benigních a 102 s neznámým efektem – to vše dle skóre z programu PolyPhen2.

The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff - HGMD[®] Professional 2013.4 (“HGMD[®] home page,” n.d.) uvádí 406 mutací z toho 266 missense/nonsense, 56 splicing, 47 malých delecí, 25 malých insercí, 3 jejich kombinace, 4 velké delece, 3 mutace v regulačních oblastech genu a dvě komplexní přestavby. Z hlediska patogenity uvádí HGMD[®] 378 patogenních mutací, 24 mutací (16 z kategorie missense/nonsense, 7 splicing a 1 malá inserce) se spornou patogenitou a 4 funkční polymorfismy (všechny missense/nonsense). Jako funkční polymorfismy jsou označovány odchylky, jejichž efekt na strukturu nebo funkci genu byl prokázán in vitro, ale jejich patogenita nebyla dosud podpořena klinickými údaji. V těchto počtech jsou zahrnuty i mutace detekované a publikované v rámci uváděné studie.

Výsledky starších studií s vyšším záchytem *SLC26A4* mutací tedy může vysvětlit mimo jiné také vyloučení pacientů nesoucích nepatogenní variantu.

Recentně byl prokázán také vliv mutací promotorové oblasti genu lokalizované v nekódujícím exonu 1 genu *SLC26A4* a možný podíl digenní dědičnosti, kde fenotyp PS nebo NSEVA může způsobit dvojitá heterozygita jedné mutace v genu *SLC26A4* a jedné mutace v genu *FOXII* (Yang et al., 2007), a nebo v genu *KCNJI* (Yang et al., 2009). Tato příčina je však zřejmě velmi vzácná, do 1% všech pacientů s PS/NSEVA (Chen et al., 2011; Jonard et al., 2010; Landa et al., 2013).

Dosud bylo provedeno pouze velmi málo studií frekvence *SLC26A4* mutací na velkých souborech (>100 pacientů) neslyšících pacientů, pacienti v těchto studiích byli k molekulárně genetickému vyšetření vždy vybráni buď na základě HRCT nálezu (Azaiez et al., 2007; Madden et al., 2007), nebo pomocí haplotypové analýzy sourozeneckých dvojic (Hutchin et al., 2005; Kahrizi et al., 2009), nebo screeningem nejčastěji mutovaných exonů (Park et al., 2003) a pacienti s negativním nálezem dále sekvenováni nebyli. Kompletní kódující oblast *SLC26A4* genu byla u více než 100 pacientů s NSHL (bez předchozí selekce pomocí HRCT nebo rodinné anamnézy) analyzována pouze v jediné čínské studii (Dai et al.,

2008), která udává výskyt bialelických mutací v daném souboru u 14,4 % a monoalelických mutací u 5,4 % ze 111 neslyšících pacientů s již vyloučenými mutacemi v *GJB2* genu, což je číslo mnohem vyšší oproti výše uvedeným studiím s provedenou selekcí, jejichž výsledná frekvence se pohybuje mezi 4,4–8,7 % *GJB2* negativních pacientů. Z tohoto důvodu považujeme za důležité provést sekvenování genu *SLC26A4* v souboru neslyšících pacientů s vyloučenými patogenními mutacemi v *GJB2* genu, bez ohledu na jejich HRCT skalní kosti.

2. Východiska a cíle práce

2.1. Východiska práce

V rámci dřívějších studií *GJB2* genu, které prokázaly, že mutace na obou alelách tohoto genu jsou přítomné u 43 % českých pacientů s prelingvální nesyndromovou ztrátou sluchu (Seeman et al., 2004, 2005; Seeman and Sakmaryová, 2006), byl v DNA laboratoři Kliniky dětské neurologie 2. LF UK a FNM shromážděn rozsáhlý soubor pacientů a rodin s vrozenou nebo prelingvální nesyndromovou ztrátou sluchu včetně většiny dětských uživatelů kochleárních implantátů. V tomto souboru zůstalo téměř 60 % pacientů, u nichž ani po kompletním vyšetření *GJB2* genu nebyla objasněna genetická příčina jejich ztráty sluchu. Tito pacienti a jejich rodiny byli výchozím souborem pro mou studii a disertaci. Tento soubor byl dále rozšířen o pacienty z jiných pracovišť, s nimiž byla navázána spolupráce v rámci studie.

Na základě publikovaných skutečností shrnutých v předchozích částech úvodu jsem zvolila jako nejpravděpodobnější druhou nejčastější příčinu nesyndromové ztráty sluchu u neslyšících pacientů v ČR (a tedy nejčastější ve zvoleném souboru neslyšících bez *GJB2* bialelických mutací) mutace v genu *SLC26A4* způsobující nesyndromovou ztrátu sluchu typu 4 – DFNB4 a Pendredův syndrom.

V první části studie bylo vyšetřeno 303 pacientů s časnou nesyndromovou hluchotou s cílem zjistit frekvenci mutací v rozsáhlém souboru neslyšících pacientů bez předchozí selekce, po uzavření této části studie bylo dále vyšetřeno 10 pacientů vybraných v rámci diagnostických kritérií stanovených na základě výsledků první části studie s cílem doplnit spektrum zjištěných mutací a potvrdit efektivnost zvolených diagnostických kritérií a dalších 16 pacientů bylo vyšetřeno v rámci zavedení haplotypové analýzy lokusu DFNB4 u sourozeneckých dvojic s NSHL.

V průběhu této mé studie proběhl na jiném pracovišti výzkum podílu *SLC26A4* mutací na příčinách kongenitální hypotyreózy. Výsledky tohoto výzkumu jsou shrnuty v příloženém článku (Banghova et al., 2008a). Na tomto projektu jsem spolupracovala, jeho orientace je však zcela rozdílná od cílů mého vlastního výzkumu a můj podíl nemajoritní, takže jsem se rozhodla jej do výsledků své disertační práce nezahrnout. Závěry tohoto výzkumu cituji v úvodu a v diskusi mé práce.

2.2. Cíle práce

- 1) Zjistit frekvence a spektrum mutací v *SLC26A4* genu v české populaci vyšetřením rozsáhlého souboru (300-400) pacientů s prelingvální nesyndromovou poruchou sluchu

autosomálně recesivní nebo s Pendredovým syndromem, s již dříve vyloučenými poruchami *GJB2* genu a určit frekvence heterozygotů pro nalezené mutace ve slyšící české populaci.

- 2) Na základě zjištěných údajů o prevalentních mutacích v *SLC26A4* a jejich frekvencích navrhnout optimální postup pro budoucí efektivní DNA diagnostiku pacientů s prelingvální ztrátou sluchu bez mutací v *GJB2* genu.
- 3) Určit podíl hluchoty podmíněné mutacemi v *SLC26A4* genu mezi uživateli kochleárních implantátů s kongenitální nebo prelingvální ztrátou sluchu.
- 4) Vytvořit algoritmus a metodické doporučení pro péči o pacienty trpící PS/DFNB4 a zejména zajistit odpovídající endokrinologickou péči a dispenzarizaci u pacientů s *SLC26A4* mutacemi a tím předcházet následkům včas nerozpoznané poruchy štítné žlázy.
- 5) Po uzavření první části studie dosažením cílového počtu (viz bod 1) nadále vyšetřovat již jen pacienty splňující kritéria pro analýzu genu *SLC26A4* stanovená v první části studie k ověření těchto kritérií a dalšímu rozšiřování spektra nalezených mutací.
- 6) U pacientů s pouze jednou zachycenou mutací vyšetřit sekvenováním gen *FOXII*, neboť mutace v tomto genu byly prokázány u pacientů s jednou mutací v genu *SLC26A4* jako příčina PS či NSEVA v rámci digenního působení.
- 7) Pacienty z rodin s více postiženými sourozenci, kteří nebudou splňovat ostatní indikační kritéria pro *SLC26A4* analýzu, vyšetřit pomocí STR markerů, ke zjištění zda se u nich nachází společný haplotyp obou alel, což by nasvědčovalo tomu, že lokus DFNB4 je zodpovědný za ztrátu sluchu u těchto pacientů, toto dále ověřit sekvenováním genu *SLC26A4*.

3. Pacienti a metody

3.1. Pacienti

Všichni pacienti (nebo zákonní zástupci dětí mladších 18 let) podepsali informovaný souhlas s DNA vyšetřením. Všem byla poskytnuta genetická konzultace se sdělením výsledků tohoto vyšetření. U pacientů s pozitivním výsledkem byla zavedena vhodná dispenzarizace dle schématu vypracovaného v rámci studie.

3.1.1. Soubor 303 českých neslyšících pacientů – studie frekvence mutací

Studie byla zahájena vyšetřením genu *SLC26A4* u 303 pacientů, u kterých byly dříve vyloučeny patogenní mutace v *GJB2* genu. Tento soubor pacientů byl podroben retrospektivní analýze klinických dat se zaměřením na průběh onemocnění (progresivní versus stacionární ztráta sluchu) a eventuální souběžnou přítomnost poruch vestibulárního aparátu, zjištění možných zevních příčin ztráty sluchu a ověření výskytu dalších pacientů se ztrátou sluchu v rodině. Dále bylo ověřováno, zda se u pacientů s původně nesyndromovou ztrátou sluchu neobjevily známky Pendredova syndromu – porucha funkce štítné žlázy, projevující se nejčastěji hypotyreózní strumou, a to obvykle od puberty nebo časně dospělosti. U všech pacientů s dostupnou HRCT dokumentací bylo provedeno její přehodnocení – viz dále.

Do první části studie byli zařazeni pacienti **splňující následující kritéria**:

- vyloučené patogenní mutace v *GJB2* nebo pacienti s pouze jednou (monoalelickou) mutací v *GJB2*, u kterých byla vyloučena i sestřihová mutace IVS1+1G>A;
- vrozená percepční nedoslýchavost bez organického postižení se ztrátou větší než 40dB;
- rodinná anamnéza svědčící pro nebo alespoň připouštějící autosomálně recesivní typ dědičnosti (jeden nebo více sourozenců s nesyndromovou ztrátou sluchu u slyšících rodičů nebo obou neslyšících rodičů s vyloučenými mutacemi v *GJB2*).

Vylučujícími kritérii byly:

- jednoznačně získaná etiologie ztráty sluchu, tj. meningitida, perinatální asfyxie, kraniocerebrální malformace, velmi nízká porodní hmotnost (<1500g), prokázané krvácení do CNS;
- pravděpodobně AD dědičná ztráta sluchu plynoucí z genealogické analýzy;

- ztráta sluchu, která je součástí klinického syndromu (kromě Pendredova syndromu) jako například Waardenburgův, Alportův či Usherův syndrom apod.

3.1.2. Pacienti vybraní dle diagnostických kritérií k doplnění spektra mutací a evaluaci kritérií

Po dokončení analýzy 303 českých neslyšících pacientů bylo vybráno 10 pacientů, kteří splňovali vstupní kritéria pro pacienty z první části studie a zároveň předběžná diagnostická kritéria pro vyšetření *SLC26A4* genu stanovená na základě výsledků první části studie – viz oddíl 4.10.

3.1.3. Pacienti vyšetření pomocí haplotypové analýzy

V rámci studie bylo dále vyšetřeno 8 sourozeneckých dvojic (16 pacientů), které odpovídaly kritériím pro pacienty z první části studie, avšak nespĺňovaly žádnou z podmínek stanovených pro ostatní pacienty druhé části studie. U těchto pacientů bylo provedeno vyšetření pomocí STR markerů ke zjištění jejich haplotypu v oblasti lokusu DFNB4 na chromosomu 7q31.

3.2. Analýza HRCT a MRI snímků

Starší i nově pořízené snímky HRCT a MRI byly přehodnoceny MUDr. Marcelou Dvořákovou, zkušenou radioložkou se specializací v oboru radiodiagnostika s více než 15letou praxí v oboru a dlouholetou zkušeností s hodnocením HRCT nálezů na spánkové kosti u dětí. Přítomnost EVA byla definována jako rozšíření vestibulárního akveduktu na více než 1,5 mm v polovině vzdálenosti mezi zadní jámou lební a vestibulem vnitřního ucha (Pryor et al., 2005). Mondiniho dysplázie byla diagnostikována v případě, že byla nalezena aplastická kochlea s chybějícím posledním závitem (Cremers et al., 1998). Za Mondini-like anomálie (ML) byly označeny těžké malformace kochley vyššího stupně než MD.

3.3. Metody molekulárně genetické analýzy

3.3.1. Izolace DNA

DNA byla izolována z periferní krve nebo ze slin běžnými metodami.

3.3.2. Sekvenační analýza

Byla provedena amplifikace všech 21 exonů *SLC26A4* genu metodou PCR, za použití dříve publikovaných primerů (viz tabulka 7) a Plain PP mastermixu (Top-Bio) nebo Taq DNA polymerase (Invitrogen) v cycleru ABI2700 (program viz tabulka 8). Produkty PCR reakce byly přečištěny metodou magnetických kuliček Agencourt AMPure (Beckman Coulter).

Sekvenační reakce byly provedeny s použitím kitu BDT v.3.1 (Applied Biosystems). Produkty sekvenační reakce byly přečištěny pomocí magnetických kuliček CleanSeq (Beckman Coulter) a dále analyzovány na kapilárních automatických analyzátoch ABI 310 a ABI 3130.

Tabulka 7 – Primery použité při PCR a přímém sekvenování dle Sangera

Exon	Primer	Sekvence primeru	Délka fragmentu
1	1F	CCTGACCTCGCAACCCTTGA	403
	1R	CCACCTGATCCGTGACCACTT	
2	2F	TCTTCCCCTCCGATCGTCCT	292
	2R	CCTCCCCAAGGCGTGGAC	
3	3F	TGCAAATTGGTTGTGACTGAG	242
	3R	AACTCCTGCTGGAGACCAGA	
4	4F	GGAACCATTGTAAGTTGAGGAC	243
	4R	GCCAAAACACTTTAAACATGAGC	
5	5F	CCTATGCAGACACATTGAACATTTG	373
	5R	AATTTTGGGTTCCAGGAAAT	
6	6F	AGCTTGATGTAATATTTCCAGAGAG	288
	6R	GGAATGAACAGTGACCCATC	
7, 8	7F	GCGTGTAGCAGCAGGAAGTA	483
	8R	GGAGTATCAGTGAAATGAAGCTTG	
9	9F	GGAAAAAGGATGGTGGTCAA	254
	9R	TTTTCTGTTTCCAGCCCTA	
10	10F	GCAGAGTAGGCATGGGAGTT	288
	10R	CCTTCTCTCGTTGCCATTCC	
11, 12	11F	GACACAAGGGAGAAGGACGA	485
	12R	TCCTCTGGAGTTCCCAAAGCAC	
13	13F	CACATGATGGTACCTGATACA	264
	13R	AACGAAAGAAAGTGGCTTCA	
14	14F	CGATTCCACACAAACACCAG	387
	14R	TTCATGACACTCCCTGTGGA	
15	15F	CCTTGCTAAGTAGCCCAGAAATG	254
	15R	TTGGACCCAGTAAATACTTGT	
16	16F	CCTTGAGAAAATAGCCTTTCCAG	241
	16R	GCTCTCATCAGGGAAAGGAA	
17	17F	CCAAGGAACAGTGTGTAGGTC	374
	17R	ATTGCCAAAGCTCCAAATGT	
18	18F	TCCTGAGCAAGTAACTGAATGC	190
	18R	GAAAGGGCTTACGGGAAAGT	
19	19F	GGCAATAGAATGAGACTCTGT	312
	19R	CTAGACTTGTGTAATGTTTGCC	
20	20F	CAGTGGAGCATCAGGTGGG	246
	20R	GTTCCCTGACAGTTCTTAATCAG	
21	21F	CTGGGCAACAGTGAGTGAGA	296
	21R	GCATTGAGGAAGTTTTGTCTTG	

(Převzato Prasad et al., 2004)

Tabulka 8 – Program pro PCR amplifikaci v cycleru ABI 2700

Program:	94 °C	3 min	
	94 °C	30 sec	
	61 °C	45 sec	2x
	68 °C	45 sec	
	94 °C	30 sec	
	59 °C	45 sec	2x
	68 °C	45 sec	
	94 °C	30 sec	
	57 °C	45 sec	2x
	68 °C	45 sec	
	94 °C	30 sec	
	55 °C	45 sec	20x
	68 °C	45 sec	
	68 °C	20 min	
	15 °C	hold	

3.3.3. Vyšetření pomocí restrikčních enzymů

Pro zjištění populační frekvence mutací p.Val138Phe a p.Leu597Ser bylo využito restrikčního štěpení enzymy Ddel, respektive Tsp509I (New England Biolabs). Vhodné enzymy byly vyhledány pomocí nástroje NEBcutter (“NEBcutter V2.0,” n.d.).

3.3.4. Multiplex Ligase-dependent Probe Analysis (MLPA)

Rozsáhlejší delece či duplikace genu *SLC26A4* byly vyšetřovány pomocí SALSA MLPA KIT R280-A1 Pendred-SLC26A4 (MRC-Holland b.v.).

3.3.5. Haplotypová analýza

U sourozenských párů v druhé části studie bylo provedeno PCR za použití polymerasy Taq-Gold (ABI, USA) a uvedených primerů s fluorescenčním značením: D7S24206-FAM, D7S3313-HEX, D7S3074-TET, D7S24596-FAM a D7S496-HEX. Vyšetřované STR markery lokusu DFNB4 mají následující pořadí: Cen-D7S2420-D7S496-D7S2459-D7S3312-D7S3074-Tel. Přítomnost produktu byla ověřena elektroforézou na agarózovém gelu. Po přidání délkového standardu TAMRA 500 ve formamidu byla provedena analýza na přístroji ABI 3130 a vyhodnocení pomocí programu GeneMapper.

3.4. Analýza patogenity nalezených mutací

Ke zjištění dosud publikovaných údajů o nalezených mutacích byly použity následující databáze:

1. Single Nucleotide Polymorphisms **database** (dbSNPs) of the National Center for Biotechnology Information, (“Variation Viewer: SLC26A4,” n.d.), dále NCBI dbSNP,
2. Exome Variant Server, (“Exome Variant Server,” n.d.), dále EVS,
3. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff – HGMD® Professional 2013.4 (HGMD®), (“HGMD® home page,” n.d.), dále HGMD
4. Pendred and BOR homepage provozované University of Iowa (“Pendred and BOR homepage,” n.d.), dále Pendred and BOR homepage.

K ověření patogenity zejména nových mutací byly použity následující predikční programy:

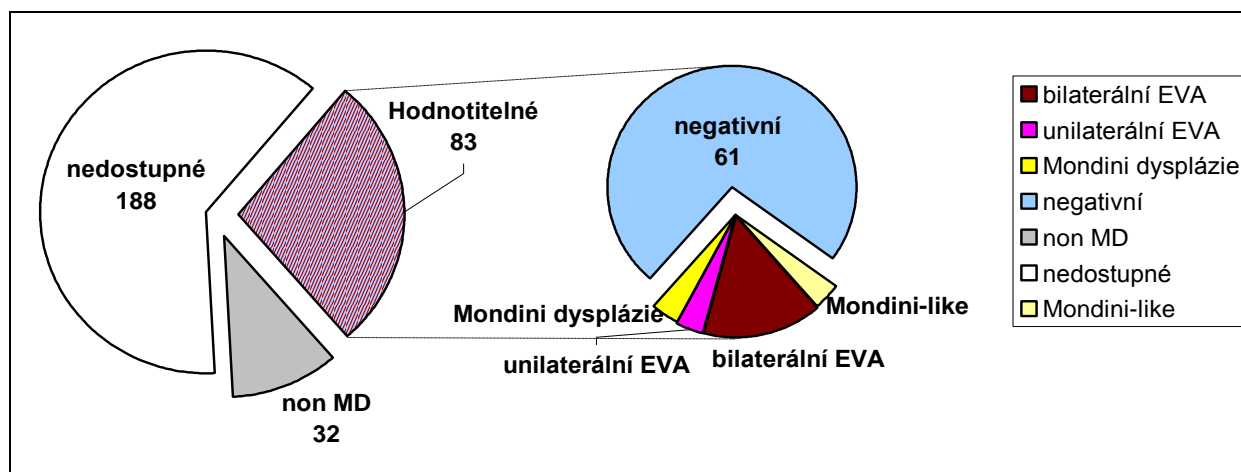
1. PolyPhen2 (Adzhubei et al., 2010; “PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs,” n.d.), dále PolyPhen2,
2. Panther (Brunham et al., 2005; “PANTHER - Gene List Analysis,” n.d.), dále Panther,
3. SIFT (Kumar et al., 2009; “SIFT - Tool to predict nonsynonymous / missense variants,” n.d.), dále SIFT.

4. Výsledky

4.1. Klinické a radiologické nálezy v souboru 303 českých neslyšících pacientů

Analýzou klinických dat u 303 českých pacientů s nesyndromovou ztrátou sluchu bylo nalezeno 19 (6,3 %) pacientů s progredující ztrátou sluchu, ale žádného pacienta s fluktuující ztrátou sluchu. U dvou pacientů (0,7 %) se objevily poruchy vestibulárního aparátu. U 11 pacientů ze 121 (9 %) postpubertálních pacientů (starších 12 let v době posledního klinického vyšetření) se v časně pubertě objevila struma.

Retrospektivním vyhodnocením všech 115 dostupných HRCT/MRI snímků, ze kterých 83 snímků bylo hodnotitelných (úroveň vestibulárního akveduktu byla zobrazena), bylo nalezeno: 3× Mondiniho dysplázie (MD, 2,6 % všech snímků), 3× Mondini-like afekce (ML, 2,6 % všech snímků) a 16× EVA (19,2 % hodnotitelných snímků), z toho 13× bilaterální (15,6 % hodnotitelných snímků). Zbylých 61 snímků nevykazovalo známky ani MD, ani EVA (87,3 % hodnotitelných snímků). Třicet dva z dostupných HRCT snímků skalní kosti bylo z pohledu EVA nehodnotitelných (úroveň vestibulárního akveduktu nebyla zachycena), u všech těchto snímků však bylo možné vyloučit Mondiniho dysplázii, tyto snímky označujeme jako nonMD. Tato data jsou shrnuta v grafu na obrázku 3:



Obrázek 3 – Radiologické nálezy

4.2. Frekvence *SLC26A4* mutací v souboru 303 českých neslyšících pacientů

Podle klinických a radiologických nálezů jsem rozdělila pacienty do 3 skupin podle předpokládané pravděpodobnosti nálezu mutací v *SLC26A4* genu.

Skupina A (nejvyšší očekávání nálezu mutací v *SLC26A4* genu) – pacienti s EVA a/nebo MD, či ML na HRCT/MRI skalní kosti.

Kritéria této skupiny splnilo 22 pacientů (7,3 %).

Skupina B – pacienti bez hodnotitelné CT/MRI dokumentace (snímky nebyly dostupné, nebo úroveň vestibulárního akveduktu nebyla zachycena).

Do této skupiny bylo zařazeno 220 pacientů (72,6 %).

Skupina C (nejnižší očekávání nálezu *SLC26A4* mutací) – pacienti s CT/MRI vylučujícím EVA/MD.

V této skupině bylo 61 pacientů (20,1 %).

Výsledky molekulárně genetické analýzy pacientů v jednotlivých skupinách jsou shrnuty v následující tabulce 9.

Tabulka 9 – Frekvence výskytu patogenních mutací u pacientů v jednotlivých skupinách

Skupina	počet pacientů	počet pacientů s pouze jednou (monoalelickou) mutací (%)	počet pacientů se dvěma (bialelickými) mutacemi (%)	celkový počet pacientů s alespoň 1 mutací (%)
A	22	3 pac. (13,6 %)	6 pac. (27,3 %)	9 pac. (41 %)
B	220	12 pac. (5,5 %)	2 pac. (0,9 %)	14 pac (6,4 %)
C	61	3 pac. (4,9 %)	0	3 pac. (4,9 %)
celkem	303	18 pac. (5,9 %)	8 pac. (2,6 %)	26 pac (8,6 %)

Do studie bylo zařazeno 27 pacientů s familiárním a 276 pacientů se sporadickým výskytem. Procentuální výskyt mutací byl 3× vyšší ve skupině pacientů s familiárním výskytem, a to významněji u bialelických mutací (3,4× vyšší) než u monoalelických mutací (2,9× vyšší). V absolutních číslech tyto frekvence ukazuje tabulka 10.

Tabulka 10 – Frekvence výskytu patogenních mutací v genu *SLC26A4* u pacientů se sporadickým vs. familiárním výskytem nesyndromové ztráty sluchu a Pendredova syndromu

	počet pacientů	počet pacientů s pouze jednou (monoalelickou) mutací (%)	počet pacientů se dvěma (bialelickými) mutacemi (%)	celkový počet pacientů s alespoň 1 mutací (%)
Familiární případy	27	4 pac. (14,8 %)	2 pac. (7,4 %)	6 pac. (22,2 %)
Sporadické případy	276	14 pac. (5,1 %)	6 pac. (2,2 %)	20 pac (7,3 %)
celkem	303	18 pac. (5,9 %)	8 pac. (2,6 %)	26 pac (8,6 %)

4.3. Spektrum mutací v souboru 303 českých neslyšících pacientů

Vyšetřením 303 pacientů jsem našla celkem 21 různých mutací u celkem 26 pacientů (8,6 % všech testovaných pacientů) a 9 polymorfismů včetně dvou v kódující oblasti (p.Gly6Val a p.Leu597Ser), které jsem původně považovala za mutace, avšak frekvence jejich výskytu v našem souboru a v kontrolní populaci mne vedla k jejich vyřazení z počtu mutací (viz oddíl 4.6.). Mutace na obou alelách byly nalezeny u 8 pacientů (2,6 % všech vyšetřovaných pacientů) – ve všech případech se jednalo o složené heterozygoty, žádná z mutací nebyla nalezena v homozygotním stavu (viz tabulky 11 a 12). U 18 pacientů (5,9 % ze všech vyšetřovaných pacientů a 69 % všech pacientů s alespoň jednou detekovanou mutací) byla nalezena pouze jedna patogenní mutace a druhá porucha v genu *SLC26A4* zůstala neobjasněna (tabulky 13 a 14). Nejčastější mutací byla p.Val138Phe nalezená 6x (18 % všech mutovaných alel), po ní následovala p.Leu445Trp s 3 výskyty (8,9 % z mutovaných alel), dále byly nalezeny 2x mutace p.Glu29Gln, p.Arg409His, p.Thr416Pro, p.Asn457Lys, c.1001+1 G>A a c.1614+1 G>A (každá 5,9 % z mutovaných alel), ostatní mutace byly nalezeny pouze jednou. Přehled nalezených mutací je v tabulce 17 a podrobnější rozbor spektra mutací a jejich patogenity je v oddílech 4.12. až 4.14. spolu s mutacemi nalezenými v další části studie.

4.4. Fenotypy a genotypy pacientů v jednotlivých skupinách

4.4.1. Fenotypy a genotypy pacientů ve skupině A

Pacienti ve skupině A tvoří homogenní skupinu pacientů, u kterých byl výskyt *SLC26A4* mutací předpokládán s velkou pravděpodobností. Překvapivě a zcela v rozporu s publikovanými případy nebyla prokázána žádná mutace u pacientů s Mondiniho dysplázií

ani s Mondini-like afekcemi. Tento fakt však lze nejlépe vysvětlit chybou malých čísel, protože ve vyšetřeném nacházeli pouze 3 pacienti s MD a 3 pacienti s ML. Vzhledem k tomu není možné vyvozovat z tohoto pozorování spolehlivé závěry a pacienty s MD a ML vyřazovat z dalšího vyšetřování. Všichni 3 pacienti s unilaterální EVA měli zároveň progresivní ztrátu sluchu a ani u jednoho nebyly prokázány mutace *SLC26A4*, platí však stejný závěr jako u MD a ML. Progresivní ztráta sluchu byla dokumentována u 8 pacientů a z toho u 4 byly nalezeny bialelické mutace *SLC26A4*. Stejně tak se vertigo vyskytovalo u jedné pacientky s prokázanými mutacemi v *SLC26A4* a u jedné pacientky zcela bez mutací. Oba tyto znaky tedy mají pouze 50 % výpovědní hodnotu. Vysoký záchyt mutací v *SLC26A4* naopak byl ve skupině pacientů s bilaterální EVA – u 9 pacientů ze 13 (69 %) byla zachycena alespoň jedna mutace a u 6/13 (46 %) byly zachyceny obě mutace. Fenotypy a genotypy pacientů ze skupiny A jsou shrnuty v tabulce 11.

Tabulka 11 – Fenotypy a genotypy pacientů ze skupiny A

# DNA	RA*	Věk **	Ztráta sluchu	HRCT/MRI	Štítná žláza	Alela 1	Alela 2
1790	0	10	progresivní	bil. EVA	O	p.Thr193Ile	p.Asn457Lys
1928	0	9	kongenitální	bil. EVA	NTH	p.Leu236Pro	p.Thr721Met
2333	0	19	progresivní	bil. EVA	struma	p.Glu29Gln	p.Leu445Trp
4748	0	23	progresivní	bil. EVA	struma	p.Val138Phe	p.Leu445Trp
3832	0	6	progresivní	bil. EVA	O	p.Val138Phe	c.1001+1G>A
4947	1	5	kongenitální	bil. EVA	O	p.Arg409His	p.Leu445Trp
3831	0	20	kongenitální	bil. EVA	struma	p.Arg185Thr ⁺	wt
2795	0	7	kongenitální	bil. EVA	O	p.Val138Phe	wt
4950	0	3	kongenitální	bil. EVA	O	p.Arg409His	wt
1254	0	9	kongenitální	bil. EVA	O	p.Glu6Val ⁺⁺	wt
1557	0	8	kongenitální	bil. EVA	O	wt	wt
3336	0	4	kongenitální	bil. EVA	O	wt	wt
3802	0	6	progresivní	bil. EVA	O	wt	wt
4949	0	3	kongenitální	MD+EVA	O	wt	wt
2797	0	5	kongenitální	MD	O	wt	wt
4566	0	8	kongenitální	MD	O	wt	wt
4956	0	1	kongenitální	ML	O	wt	wt
1939	1	7	kongenitální	ML	O	wt	wt
2415	0	6	kongenitální	ML	O	wt	wt
3834	0	10	progresivní	uniEVA	O	wt	wt
1655	0	11	progresivní	uniEVA	O	wt	wt
1773	0	9	progresivní	uniEVA	O	wt	wt

* = počet stejně postižených sourozenců ** = věk v době vyšetření uvedený v letech

+ = nová mutace ++ = nový polymorfismus wt = bez mutace

NTH = transientní novorozenecká hypotyreóza O = štítná žláza bez patologického nálezu

Skupina B je naopak velmi heterogenní. Skládá se z pacientů s velmi suspektním PS (rozvoj strumy, pozitivní neonatální screening), či DFNB4 (progresivní ztráta sluchu, vestibulární poruchy), ale také z pacientů, o kterých máme pouze velmi málo údajů. V následující tabulce 12 jsou shrnuty fenotypy a genotypy pacientů, u kterých byla nalezena alespoň jedna mutace. V horní části tabulky jsou umístěni pacienti s familiárním výskytem, v dolní části se sporadickým.

Tabulka 12 – Fenotyp a genotyp pacientů ze skupiny B s alespoň 1 mutací v SLC26A4 genu

# DNA	RA*	Věk **	Ztráta sluchu	HRCT/MRI	Štítná žláza	Alela 1	Alela 2
3830	2	55	progresivní	n/a	Struma	p.Asn457Lys	c.1001+1G>A
4776	1	29	progresivní	nonMD	Struma	p.Val138Phe	wt
4840	1	32	kongenitální	n/a	Struma	p.Val138Phe	wt
1513	1	29	kongenitální	nonMD	n/a	p.Val144Ala ⁺	wt
4837	1	32	kongenitální	n/a	n/a	p.Arg776Cys	wt
1255	0	2	kongenitální	nonMD	n/a	p.Thr416Pro	wt
4745	0	38	progresivní	n/a	Struma	p.Val281Ile ⁺	c.1614+1G>A
1737	0	7	kongenitální	nonMD	n/a	p.Leu236Pro	wt
2275	0	23	kongenitální	nonMD	n/a	p.Trp518Stop ⁺	wt
3163	0	9	kongenitální	nonMD	n/a	p.Glu740Val	wt
4771	0	44	kongenitální	n/a	n/a	p.Glu29Gln	wt
4784	0	16	kongenitální	nonMD	n/a	c.1614+1G>A	wt
4822	0	8	kongenitální	n/a	normální	p.Thr99Met	wt
4825	0	33	kongenitální	n/a	normální	p.Thr416Pro	wt

* = počet stejně postižených sourozenců ** = věk v době vyšetření uvedený v letech wt=bez mutace

+ = nové mutace

n/a = HRCT/MRI či endokrinologická dokumentace pacienta není dostupná

nonMD = HRCT pacienta nezachycuje úroveň vestibulárního akveduktu – EVA nelze vyloučit ani potvrdit, lze však vyloučit MD

U všech pacientů uvedených v tabulce 12, kde to bylo vzhledem ke stanovisku rodiny a poloze kochleárního implantátu možné, bylo v rámci závěrečné genetické konzultace se sdělením výsledku projektu pacientům a jejich rodinám, provedeno dodatečné HRCT vyšetření, jehož výsledky jsou shrnuty v následujícím oddíle 4.4.3. a v tabulce 13.

4.4.3. Fenotypy a genotypy pacientů ve skupině B po doplnění klinických dat u pacientů s monalelickými mutacemi

U pacientů 4776, 1255 a 2275 byla zjištěna bilaterální EVA na HRCT pyramid, u pacientky 4840 byla zjištěna Mondiniho malformace II. typu – aplasie poslední otáčky kochley s cystickou malformací a bilaterální EVA. Nálezy v její rodině jsou diskutovány dále v oddíle 4.15.5., stejně jako u pacientky 4776. Pacientka 1255 byla vyšetřena ve věku 8 let a její hladiny tyreoidálních hormonů i morfologie štítné žlázy byly v normě. Pacientka 2275 se od

15 let léčí pro poruchu štítné žlázy, její porucha sluchu je vrozená a v předškolním věku trpěla vestibulárními příznaky, zejména poruchami rovnováhy.

U pacientů 1513, 1737, 3163 a 4822 bylo provedeno HRCT pyramid s nálezem vylučujícím EVA či MD. Nález pacienta 1513 odpovídá nejspíše náhodnému nosičství dosud nepopsané varianty p.Val144Ala také proto, že ačkoliv jeho bratr trpí stejným sluchovým postižením, není nosičem této mutace. U pacienta 1737, který kromě ztráty sluchu trpí dále mírně opožděným psychomotorickým vývojem a hypotonií, bylo kromě HRCT zajištěno rovněž vyšetření MRI, které poukázalo na bilaterální kortikální změny charakteru gliových jizev, které mohou vysvětlovat příčinu ztráty sluchu jako perinatální s podílem infekce. U tohoto pacienta bylo postnatálně vysloveno podezření na kongenitální CMV infekci. U pacientky 3163 bylo podezření na ztrátu sluchu vysloveno až při nástupu do první třídy. Teprve při kontrolní genetické konzultaci ve věku 14 let v rámci sdělení výsledků této studie vyplynulo, že stejně postižená je i její matka a o něco mírněji starší bratr. U žádného z členů rodiny nebyla zjištěna porucha štítné žlázy. Pacientka 4822 byla v době genetické konzultace ve věku 12 let, její perinatální i rodinná anamnéza byly negativní, bez jednoznačné příčiny ztráty sluchu, t.č. nevykazovala žádné známky poruchy štítné žlázy.

U pacientů 4745, 4837, 4771 a 4825 se ani přes vytrvalou snahu nepodařilo chybějící klinická a zobrazovací data doplnit.

Tabulka 13 – Fenotypy a genotypy pacientů ze skupiny B s pouze jednou prokázanou mutací (monoalelickou) v *SLC26A4* po doplnění klinických dat

# DNA	RA*	Věk**	Ztráta sluchu	HRCT/MRI	Štítná žláza	Alela 1	Alela 2
4776	1	29	progresivní	<u>bil. EVA</u>	struma	p.Val138Phe	wt
4840	1	32	kongenitální	<u>MD+EVA</u>	struma	p.Val138Phe	wt
2275	0	23	kongenitální	<u>bil. EVA</u>	<u>struma</u>	p.Trp518Stop ⁺	wt
1255	0	2	kongenitální	<u>bil. EVA</u>	<u>normální</u>	p.Thr416Pro	wt
4784	0	16	kongenitální	nonMD	n/a	c.1614+1G>A	wt
4771	0	44	kongenitální	n/a	n/a	p.Glu29Gln	wt
4825	0	33	kongenitální	n/a	normální	p.Thr416Pro	wt
4837	1	32	kongenitální	n/a	n/a	(p.Arg776Cys)	wt
1737	0	7	kongenitální	<u>EVA, MD negativní</u>	<u>normální</u>	p.Leu236Pro	wt
1513	1	29	kongenitální	<u>EVA, MD negativní</u>	<u>normální</u>	(p.Val144Ala ⁺)	wt
3163	0	9	kongenitální	<u>EVA, MD negativní</u>	<u>normální</u>	(p.Glu740Val)	wt
4822	0	8	kongenitální	<u>EVA, MD negativní</u>	normální	(p.Thr99Met)	wt

Tučně jsou zvýrazněni pacienti z rodin s více postiženými sourozenci, kurzívou a podtržením označena nově získaná data. V závorce jsou uvedeny mutace, jejichž patogenita byla zpochybněna (viz dále oddíl 4.13.)

* = počet stejně postižených sourozenců ** = věk v době 1. vyšetření uvedený v letech

⁺ nová mutace ⁺⁺ mutace popsána, ale bez korelace s fenotypem, wt=bez mutace

n/a = HRCT/MRI dokumentace pacienta stále není dostupná

nonMD = HRCT pacienta nezachycuje úroveň vestibulárního akveduktu – EVA nelze vyloučit ani potvrdit, lze však vyloučit MD

Celkový dopad těchto nově získaných údajů na výsledky studie je rozebrán v diskusi.

4.4.4. Fenotypy a genotypy pacientů ve skupině C

U pacientů s vyloučenou malformací středního ucha nebyly, zcela v souladu s očekáváním, nalezeny bíaleické mutace v genu *SLC26A4*, u 3 pacientů (3/61 tj. 4,9 %) však byla nalezena jedna mutace, což převažuje nad očekávanou frekvencí nosičů mutací v populaci, která byla stanovena na 0,8 % (Fraser, 1965b; Pera et al., 2008b). Fenotyp a genotyp těchto 3 pacientů je shrnut v tabulce 14.

Tabulka 14 – Fenotyp a genotyp pacientů ze skupiny C s alespoň jednou mutací v *SLC26A4* genu

# DNA	RA*	Věk **	Ztráta sluchu	HRCT/MRI	Štítná žláza	Alela 1	Alela 2
3836	0	5	kongenitální	EVA, MD negativní	normální	p.Val138Phe	wt
4818	0	7	kongenitální	EVA, MD negativní	normální	(p.Phe335Leu)	wt
4954	0	3	kongenitální	EVA, MD negativní	normální	p.Tyr530Ser	wt

* = počet stejně postižených sourozenců ** = věk v době vyšetření uvedený v letech
wt = bez mutace. V závorce jsou uvedeny mutace, jejichž patogenita byla zpochybněna (viz dále oddíl 4.13.).

4.5. Stanovení heterozygotních frekvencí nejčastějších mutací v populaci

Bylo provedeno testování 500 anonymizovaných vzorků DNA od slyšících osob pro zjištění populační frekvence tří mutací nejčastěji nalezených v souboru 303 českých neslyšících pacientů: p.Val138Phe (6 pacientů), p.Leu597Ser (5 pacientů), p.Glu6Val (6 pacientů). Zatímco mutace p.Val138Phe nebyla detekována u žádného z 500 testovaných vzorků, varianty p.Leu597Ser a p.Glu6Val vykazovaly stejnou frekvenci mezi neslyšícími pacienty a mezi slyšícími kontrolami (viz tabulka 14.), jedná se proto s velkou pravděpodobností o nepatogenní polymorfismy v kódující sekvenci genu *SLC26A4*. Viz dále oddíl 4.6. a 4.13.2.

4.6. Vedlejší nálezy - polymorfismy

Při sekvenování genu *SLC26A4* byla nalezena řada variant, které považujeme za nepatogenní polymorfismy, jsou shrnuty včetně jejich frekvencí v tabulce 15.

Tabulka 15 – Polymorfismy a jejich frekvence

Varianta	pacienti	kontroly
c.607-17C>T	1 %	-
c.606+331 T>G	41 % (33 %*)	-
c.1437+243T>C	3,5 %	-
c.1545-14 del ATT	0,7 %	-
c.1708-18 T>A	2,6 %	-
c.1-698 G>C	0,3 %	-
c.1-697 T>G	5,6 % (0,3 %*)	-
c. 17 G>T (p.Gly6Val)	1,7 %	1,6 %
c. 1790 T>C (p.Leu597Ser)	2,1 %	2,4 %

* frekvence homozygotů

4.6.1. Polymorfismy nekódujících oblastí

Polymorfismus c.1-697 T>G (c.IVS1+90 T>G), který byl nalezen v heterozygotním stavu u 5,6 % vyšetřených pacientů a u 1 pacienta (0,3 % vyšetřených pacientů) v homozygotním stavu, mění 90. purinovou bazi guanin v intronu 1 na pyrimidinovou bazi thymín. Tato baze je první bází všeobecně používaného primeru 1R (viz tabulka 7). Tato záměna může tedy při použití zmíněného primeru až u 6 % vyšetřených pacientů zapříčinit výpadek amplifikace jedné alely při PCR a tím falešně negativní výsledek vyšetření exonu 1 dané alely. Podobně polymorfismus c.1-698 G>C (c.IVS1+89 G>C), kde se jedná o záměnu ve 2. bázi zmíněného primeru. Byl však nalezen pouze u 1 pacienta (0,3 % vyšetřených pacientů). Tuto skutečnost se mi podařilo včas zjistit díky použití odlišné kombinace primerů (1F a 2R – viz tabulka 7).

4.6.2. Polymorfismy kódujících oblastí

Varianta p.Leu587Ser (rs55638457) byla opakovaně označována za nepatogenní, zejména proto, že je často nacházena pouze v monoalelické formě u různých pacientů (Pera et al., 2008a), funkční studie však zjistila, že se jedná o hypofunkční variantu, která v kombinaci s druhou patogenní mutací může způsobit mírnější fenotyp PS/NSEVA (Choi et al., 2009). I v mé studii však byla p.Leu597Ser u všech 7 pacientů (6 pacientů ze souboru 303 českých neslyšících pacientů a 1 pacientka z 10 pacientů vybraných na základě diagnostických kritérií, viz oddíl 4.11. a tabulka 16) nalezena pouze na jedné alele (2,1 %), přičemž na druhé alele nebyla nalezená žádná mutace. V kontrolní populaci byla nalezena u 2,4 % slyšících osob.

V projektu 1000 Genomes byla frekvence výskytu varianty p.Leu597Ser v populaci uvedena jako 0,004, ve vyšetřeném vzorku české populace se však přenašečtví této varianty vyskytuje až 6× častěji – 0,021 mezi pacienty a 0,024 mezi kontrolami. Je tedy pravděpodobné, že se tato varianta v české populaci vyskytuje častěji než v ostatní světové populaci.

Varianta p.Gly6Val (rs111033423) je nově uvedena v databázi dbSNP NCBI jako „With probable-non-pathogenic allele“ a v databázi EVS je na základě nízkého skóre programu PolyPhen2 (0,005) a nízkého stupně konzervace (GERP 0,15) označena jako benigní. V databázi HGMD není tato varianta uvedena a její MAF není známa.

Také varianta p.Gly6Val byla nalezena pouze v kombinaci s normální sekvencí druhé alely *SLC26A4* genu a to u 5 neslyšících pacientů (1,7 %), u kontrol byla nalezena se srovnatelnou frekvencí 1,6 %. Blíže je patogenita těchto variant rozebrána v kapitole 4.13.2.

4.6.3. Kumulace odchylek v genech způsobujících poruchu sluchu

Dalším vedlejším nálezem je zajímavé zjištění, že 3 z 5 pacientů nesoucích na jedné alele *SLC26A4* genu variantu p.Gly6Val, jsou zároveň nosiči mutace p.Arg127His v genu *GJB2* (tato varianta je nepatogenní a je častá v Indii a u Romů), žádný z dalších 9 pacientů nesoucích mutaci p.Arg127His, nenese žádnou odchylku v genu *SLC26A4*. Avšak pacientka 1413 nesoucí intronickou variantu c.1708-18 T>A (c.IVS15-18 T>A) v genu *SLC26A4* je zároveň nosičem polymorfismu p.Val153Ile v genu *GJB2*, pacientka 2412 je nosičkou mutace 35delG v genu *GJB2* a zároveň polymorfismu c.1708-18 T>A (c.IVS15-18 T>A) v genu *SLC26A4*. Pacient 3839 je nosičem varianty p.Met34Thr v genu *GJB2* a intronické varianty c.1-698 G>C (c.IVS1+89 G>C) v genu *SLC26A4*. Pacientka 4779 je také nosičkou intronické varianty c.1-698 G>C (c.IVS1+89 G>C) v genu *SLC26A4* a zároveň je nosičkou synonymické varianty p.Ala40Ala (c.210 A>C) v genu *GJB2*. U žádného z uvedených pacientů nebyla prokázána EVA nebo MD.

Pacientka 4748, která je složeným heterozygotem pro mutace p.Val138Phe a p.Leu445Trp v genu *SLC26A4* je zároveň nosičkou mutace 35delG v genu *GJB2*.

Z vyšetřených pacientů tedy 2,6 % (8/303) nesou odchylku v obou genech, u 0,6 % (2/303) je alespoň jedna z mutací patogenní a u 0,3 % (1/303) jsou patogenní mutace v obou genech. Podrobnější rozbor kumulace odchylek v genech způsobujících poruchu sluchu je proveden v rámci diskuse.

4.7. MLPA

Vysoké procento heterozygotů bez druhé nalezené mutace a několik popsáných případů delecí několika exonů v genu *SLC26A4* (Park et al., 2003; Pera et al., 2008b) vedly k nastolení hypotézy, že příčinou fenotypu mohou být rozsáhlé delece či duplikace na druhé alele genu. Všechny pacienty s pouze jednou patogenní mutací jsem vyšetřila pomocí MLPA. Vyšetření všech 18 pacientů s pouze 1 mutací však neprokázalo žádnou patologii větších úseků genu ve smyslu delece či duplikace. Od vyšetření dalších pacientů bylo tedy upuštěno.

4.8. Vyšetření genu *FOXII*

Vyšetření genu *FOXII* proběhlo přímým sekvenováním ve spolupráci s pracovištěm Studio di mallatie rare při Clinica Pediatrica v Padově. Vyšetřeno bylo 20 pacientů ze skupin A a B s jednou nebo žádnou mutací v genu *SLC26A4*. Byla nalezena pouze jedna mutace v genu *FOXII* a to u pacienta 2797 s Mondiniho dysplázií a EVA, ale bez mutací v genu *SLC26A4*. Nalezená mutace c.483_485delCAA (p.161delAsn) byla již dříve popsána u pacientů s hluchotou a EVA (Yang et al., 2007). Tato zjištění jsou v souladu s později publikovanými údaji, které roli *FOXII* mutací v patogenezi EVA a PS zpochybňují (Landa et al., 2013).

4.9. Haplotypová analýza sourozeneckých dvojic

Vzhledem k vysokému podílu pacientů s pouze jednou nalezenou mutací jsem vyslovila domněnku, že u těchto pacientů by se na druhé alele mohla nacházet mutace nedetekovatelná použitými metodami DNA diagnostiky (mutace hluboko v intronu, inverze a pod.), která je v české populaci vysoce prevalentní díky tzv. efektu zakladatele (founder efektu). Takové alely by se tedy vyznačovaly společným haplotypem v lokusu DFNB4 (7q31). Tato hypotéza se nepotvrdila, avšak díky zavedení haplotypové analýzy pro gen *SLC26A4* a vzhledem k faktu, že ve familiární skupině byly mutace nalezeny u 14,8 % pacientů, jsem se rozhodla začít vyšetřovat také pacienty z rodin slyšících rodičů, kde je ztrátou sluchu postiženo 2 a více sourozenců. Sourozence i jejich rodiče jsem vyšetřila pomocí porovnání jejich haplotypů v lokusu DFNB4. Sourozenci, kteří od svých rodičů zdělili stejnou kombinaci alel ve sledovaném lokusu byli označeni jako konkordantní a následovala u nich sekvenční analýza všech 21 exonů genu *SLC26A4*.

V průběhu roku 2011 bylo indikováno k vyšetření genu *SLC26A4* z různých pracovišť celé ČR celkem 8 sourozeneckých dvojic, které kromě stejného postižení ztrátou sluchu u dvou sourozenců, nesplňovaly žádné z diagnostických kritérií uvedených v bodě 4.10. U těchto pacientů jsem provedla haplotypovou analýzu pomocí STR markerů a u dvou z těchto

dvojic byla nalezena shoda haplotypů – konkordanci. Doplnila jsem sekvenování všech 21 exonů genu *SLC26A4* vždy u jednoho sourozence z dvojice a u jedné z pacientek (6004) našla dvě mutace v genu *SLC26A4* (p.Glu29Gln a p.Leu445Trp), které se následně potvrdily i u její sestry (6005). Vyšetření rodičů potvrdilo, že každý z nich je nosičem jedné mutace, mutace u postižených sester se tedy nacházejí v pozici trans. U druhé konkordantní sourozenecké dvojice nebyly nalezeny mutace v genu *SLC26A4*. U pacientů z ostatních 6 dvojic jsem v rámci kontroly této hypotézy také provedla sekvenaci všech 21 exonů *SLC26A4* a mutace podle očekávání neprokázala.

Zavedení a ověření této metody významně sníží náklady diagnostiky *SLC26A4* genu v této rizikové skupině.

4.10. Předběžná kritéria pro vyšetření *SLC26A4* genu

Na základě zjištěných údajů byla stanovena následující kritéria pro zařazení pacientů do druhé fáze studie:

- bilaterální EVA nebo MD na HRCT pyramid
- progresivní ztráta sluchu nebo ztráta sluchu spojená s vestibulární dysfunkcí
- struma nebo hypotyreóza, která se objevila v průběhu puberty nebo časně dospělosti
- neonatální transientní hypotyreóza v anamnéze
- neslyšící děti slyšících rodičů s konkordantním haplotypem v lokusu DFNB4

Neslyšící děti neslyšících rodičů se slyšícími prarodiči, což je po vyloučení mutací v genu *GJB2* velmi vzácný nález, budeme vyšetřovat pomocí sekvenace genu *SLC26A4* a to preferenčně u obou rodičů, protože nelze vyloučit, že u jednoho nebo obou rodičů se jedná o AD ztrátu sluchu vzniklou de novo mutací a tato je příčinou ztráty sluchu i u potomků. V našem vyšetřeném vzorku neslyšící populace byla zachycena jedna rodina neslyšících rodičů s neslyšícími dětmi na podkladě mutací v genu *SLC26A4*. Tyto rodiny tedy nelze z vyšetřování vyloučit i přes nemožnost stoprocentního určení způsobu dědičnosti.

4.11. Fenotypy a genotypy 10 českých neslyšících pacientů vybraných k vyšetření *SLC26A4* genu na základě diagnostických kritérií

Na základě výše uvedených diagnostických kritérií jsem vybrala 10 pacientů a provedla u nich sekvenaci genu *SLC26A4* k evaluaci daných kritérií a rozšíření zjištěného spektra mutací v české populaci neslyšících. Do této části studie byli zařazení 4 pacienti se suspektním PS –

porucha sluchu a struma, 1 pacientka s poruchou sluchu a hypotyreózou a 5 pacientů s nesyndromovou ztrátou sluchu a prokázanou bilaterální EVA na HRCT. Fenotypy a genotypy těchto pacientů jsou shrnuty v tabulce 16.

U 50 % z těchto pacientů byla zjištěna alespoň 1 mutace v genu *SLC26A4*. Obě mutace byly zjištěny u 25 % pacientů se suspektním PS (1/4 pacientů). U pacientů s bilaterální EVA byly nalezeny obě mutace u 60 % (3/5) pacientů a alespoň jedna mutace u 80 % (4/5).

Tato čísla jasně mluví ve prospěch bilaterální EVA jako diagnostického kritéria a jsou v souladu se záchytem mutací u pacientů s bilaterální EVA v první části studie, kde byla alespoň jedna mutace nalezena u 69% (9/13).

Tabulka 16 – Fenotypy a genotypy 10 pacientů vybraných dle diagnostických kritérií

# DNA	RA*	Věk **	Ztráta sluchu	HRCT/MRI	Štítná žláza	Alela 1	Alela 2
5153	0	1	kongenitální	bil. EVA	O	p.Glu29Gln	p.Phe122fs
5217	0	31	kongenitální	n/a	struma	p.Val570Ile	p.Ser594fs ⁺
5706	1	5	progresivní	bil. EVA	O	p.Val570Ile	p.Ile379fs ⁺
5488	1	6	kongenitální	bil. EVA	O	p.Val138Phe	p.Arg409His
5181	0	3	kongenitální	bil. EVA	O	c.1001+1G>A	wt
5224	0	35	kongenitální	n/a	struma	wt	wt
5265	0	20	kongenitální	n/a	struma	wt	wt
5270	0	47	kongenitální	n/a	struma	wt	wt
5637	0	3	progresivní	bil. EVA	O	p.Leu597Ser ⁺⁺	wt
5705	0	22	progresivní	n/a	hypotyreóza	wt	wt

* = počet stejně postižených sourozenců ** = věk v době vyšetření uvedený v letech

+ = nové mutace ++ = polymorfismus wt = bez mutace

n/a = HRCT/MRI dokumentace není k dispozici O = bez patologického nálezu

4.12. Spektrum všech mutací nalezených u 315 českých neslyšících pacientů

K původnímu souboru 303 pacientů s NSHL jsem v další fázi studie připojila 10 pacientů vybraných dle diagnostických kritérií (viz oddíl 4.10.) v rámci jejich evaluace (viz oddíl 4.11.) a dále 2 zástupce sourozeneckých párů, u kterých byla zjištěna konkordance v lokusu *DFNB4* (viz oddíl 4.9).

U těchto 12 pacientů bylo nalezeno dalších 9 mutací na 13 alelách, z toho 5 mutací, které již byly detekovány v první části studie, dvě jiné mutace již popsány v literatuře a 2 zcela nové mutace – viz tabulka 17 (šedě podbarveno).

Celkově tedy bylo pomocí sekvenace genu *SLC26A4* vyšetřeno 315 českých neslyšících pacientů, u kterých bylo nalezeno 45 patogenní mutací (25 různých) u 32 pacientů, z toho u 13 z nich na obou alelách a u 19 pacientů mutace monoalelické. Devatenáct detekovaných mutací bylo popsáno již dříve a 6 mutací jsem prokázala jako první, respektive tyto mutace nebyly před uveřejněním mé studie publikovány, ani uvedeny v databázích dbSNP NCBI, HGMD, EVS či na Pendred and BOR homepage (viz tabulka 17).

U všech pacientů s bialelickými mutacemi byli vyšetřeni rodiče (nebo potomci – v případě 3830, 4745 a 5217) na přítomnost nalezené mutace, a byla tak prokázána nezávislá segregace mutací v *trans* formě – na různých alelách (všichni nepostižení přímí příbuzní pacientů nesli jednu zdravou a jednu patogenní alelu).

Tabulka 17 – Spektrum všech dosud nalezených SLC26A4 mutací u českých pacientů

	název mutace na AMK úrovni	název mutace na úrovni nukleotidů	počet nezávislých alel (% pat. alel)	reference pro mutaci	exon
1.	p.Val138Phe	<i>c.412 G>T</i>	7 (15,6 %)	(Van Hauwe, 1998)	4
2.	p.Leu445Trp	<i>c.1334 T>G</i>	4 (8,9 %)	(Van Hauwe, 1998)	11
3.	p.Glu29Gln	<i>c.85 G>C</i>	4 (8,9 %)	(Campbell, 2001)	2
4.	<i>c.1001+1 G>A</i>		3 (6,7 %)	(Coyle et al., 1998)	Intron 8
5.	p.Arg409His	<i>c.1226 G>A</i>	3 (6,7 %)	(Coyle et al., 1998)	10
6.	p.Thr416Pro	<i>c.1246 A>C</i>	2 (4,5 %)	(Van Hauwe, 1998)	10
7.	p.Asn457Lys	<i>c.1371 C>A</i>	2 (4,5 %)	(Park et al., 2003)	12
8.	<i>c.1614+1 G>A</i>		2 (4,5 %)	(Blons et al., 2004)	Intron 14
9.	p.Val570Ile	<i>c.1708 G>A</i>	2 (4,5 %)	(Prasad et al., 2004)	16
10.	p.Thr99Met	<i>c.296 C>T</i>	1 (2,2 %)	(Propst et al., 2006)	3
11.	p.Phe122fs	<i>c.365_366insT</i>	1 (2,2 %)	(Park et al., 2003)	4
12.	p.Val144Ala	<i>c.431 T>C</i>	1 (2,2 %)	Nová	5
13.	p.Arg185Thr	<i>c.554 G>C</i>	1 (2,2 %)	Nová	5
14.	p.Thr193Ile	<i>c.580 C>T</i>	1 (2,2 %)	(Adato et al., 2000)	5
15.	p.Gly209Val	<i>c.626 G>T</i>	1 (2,2 %)	(Van Hauwe, 1998)	6
16.	p.Leu236Pro	<i>c.707 T>C</i>	1 (2,2 %)	(Van Hauwe, 1998)	6
17.	p.Val281Ile	<i>c.841 G>A</i>	1 (2,2 %)	Nová	7
18.	p.Phe335Leu	<i>c.1003 T>C</i>	1 (2,2 %)	(Campbell, 2001)	9
19.	p.Ile379fs	<i>c.1136_1148del13</i>	1 (2,2 %)	Nová	9
20.	p.Trp518Stop	<i>c.1554 G>A</i>	1 (2,2 %)	Nová	14
21.	p.Tyr530Ser	<i>c.1589 A>C</i>	1 (2,2 %)	(Pryor et al., 2005)	14
22.	p.Ser594fs	<i>c.1781_1782insA</i>	1 (2,2 %)	Nová	16
23.	p.Thr721Met	<i>c.2162 C>T</i>	1 (2,2 %)	(Usami et al., 1999)	19
24.	p.Gly740Val	<i>c.2219 G>T</i>	1 (2,2 %)	(Prasad et al., 2004)	19
25.	p.Arg776Cys	<i>c.2326 C>T</i>	1 (2,2 %)	(Pryor et al., 2005)	21
	Total #		45 alel (100 %)		

V tabulce nejsou zahrnuty varianty kódující oblasti p.Leu597Ser a p.Gly6Val, u kterých byla hned na počátku práce vyslovena pochybnost o jejich patogenitě vzhledem k jejich vysoké frekvenci v souboru a jsou popsány v oddílech 4.6.2. a 4.13.2.)

Šedou barvou jsou označeny mutace nalezené v druhé části studie, u opakovaně detekovaných mutací je zvýrazněn pouze sloupec s navýšeným počtem alel.

4.13. Patogenita všech nalezených mutací a kódujících variant

Patogenita všech nalezených mutací, tj. 25 výše uvedených variant s přepokládaným patogenním účinkem i obou pravděpodobně nepatogenních variant v kódující oblasti genu *SLC26A4* (p.Gly6Val a p.Leu597Ser – viz oddíl 4.6.2.) byla prověřena pomocí predikčních programů a databází SNP (viz oddíl 3.4.). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 18. Pomocí programů PolyPhen2 a Panther lze analyzovat pouze missense mutace, v programu SIFT dále inserce a delece. Mutace typu splice-site v žádném z těchto programů analyzovat nelze, avšak obě splice site mutace vyskytující se ve vyšetřeném souboru (c.1001+1 G>A a c.1614+1 G>A) byly již opakovaně popsány jako patogenní a jsou uvedeny ve všech třech použitých databázích i na Pendred and BOR homepage.

Tabulka 18 – Výskyt mutací nalezených v české populaci v genetických databázích a predikce jejich patogenity pomocí predikčních programů

mutace	Databáze			Predikční programy		
	NCBI dbSNP (MAF)	HGMD	EVS GERP (EAA)	PolyPhen2 Score	Panther P _{DELETTERIOUS}	SIFT score – S (MAF)
<i>p.Gly6Val</i>	<i>Pr. non-pat.</i>	<i>x</i>	0,15 (1/7880)	<i>Benign 0,005</i>	<i>x</i>	<i>Tolerated S0,32</i>
p.Glu29Gln	Probably Pathogenic	DM	x	Possibly D 0,662	0.29944	Tolerated S 0,27
p.Thr99Met	Unknown (0,0009)	x	x	Probably D 0,997	0,52871	Damaging S0,04 (0,001)
p.Phe122fs	x	DM	x	x	x	Damaging
p.Val138Phe	Pathogenic	DM	5,12 (0/8600)	Probably D 0,996	0,797	Damaging S0
p.Val144Ala	x	x	x	Possibly D 0,939	0.52035	Damaging novel S0,01
p.Arg185Thr	x	DM(*)	x	Probably D 0,999	0.6706	Damaging novel S0,01
p.Thr193Ile	Pathogenic	DM	x	Possibly D 0,929	0.72059	Damaging S0
p.Gly209Val	Pathogenic	DM	5,61 (6/8600)	Probably D 1,0	0.97909	Damaging S0 (0,0)
p.Leu236Pro	Pathogenic	DM	5,41 (9/8600)	Probably D 0,998	0.88076	Damaging S0 (0,001)
p.Val281Ile	x	DM(*)	x	Benign 0,012	0.20661	Tolerated novel S0,55
c.1001+1 G>A	Pathogenic	DM	5,62 (5/8600)	x	x	X
p.Phe335Leu	Pathogenic	DM	5,62 (16/8600)	Probably D 0,997	0.58894	Tolerated S0,47 (0,002)
p.Ile379fs	x	x	x	x	x	Damaging
p.Arg409His	Pathogenic	DM	x	Probably D 1,0	0.95981	Damaging S0
p.Thr416Pro	Pathogenic	DM	5,1 (1/8600)	Probably D 1,0	0.90341	Damaging S0 (0,0)
p.Leu445Trp	Pathogenic	DM	5,93 (2/8600)	Probably D 1,0	0.99503	Damaging S0
p.Asn457Lys	x	DM	x	Probably D 1,0	0.94879	Damaging S0
p.Trp518Stop	x	DM(*)	x	x	x	Damaging due to stop
p.Tyr530Ser	x	DM	x	Probably D 0,998	0.96494	Damaging S0
c.1614+1 G>A	Pathogenic	DM	5,07 (1/8600)	x	x	X
p.Val570Ile	Probably Pathogenic	x	x	Probably D 0,972	0.39221	Tolerated novel S 0,11
p.Ser594fs	x	x	x	x	x	Damaging
<i>p.Leu597Ser</i>	<i>non-pat. (0,004)</i>	<i>DM?</i>	5,72 (78/8600)	<i>Probably D 0,999</i>	<i>0.81399</i>	<i>Tolerated S0,11(0,007)</i>
p.Thr721Met	Pathogenic	DM	x	Probably D 1,0	0.79236	Damaging S0

p.Gly740Val	Unknown (0,0005)	DM (0,001)	5,51 (2/8600)	Benign 0,167	0.09219	Damaging S0
p.Arg776Cys	Pr. non-pat. (0,0005)	DM?	5,76 (19/8600)	Probably D 0,999	0.05276	Damaging** S0

Šedě podbarvené jsou nově popsané mutace. Kurzívou jsou značeny předpokládaně nepatogenní varianty.

MAF = Minor Allele Frequency = procentuelní četnost minoritní tj. patogenní alely v populaci

GERP = The Genomic Evolutionary Rate Profiling = skóre nabývající hodnot od -12.3 do 6.17, kde 6.17 znamená nejvyšší stupeň konzervovanosti dané aminokyseliny (Cooper et al., 2005)

EAA = EA Allele Count = počet alel s danou variantou nalezených v uvedeném vzorku z euro-americké populace

P_{DELETERIOUS} = pravděpodobnost, že mutace je patogenní (Brunham et al., 2005)

DM = Damaging Mutation = patogenní mutace

DM? = varianta se spornou patogenitou

DM(*) = patogenní mutace v HGMD má jako referenci uveden článek Pourová et al, 2010

Probably D = pravděpodobně patogenní mutace

Possibly D = nejspíše patogenní mutace

Pr. non-pat. = Probably non-pathogenic = pravděpodobně nepatogenní varianta

Non-pat = nepatogenní varianta

Damaging** = Damaging with low confidence warning = nízká důvěryhodnost informace o patogenitě

x = mutace není v dané databázi uvedena, nebo ji nelze uvedeným programem analyzovat

4.13.1. Patogenita již popsaných mutací

Na základě rozboru uvedených mutací a variant jsem dospěla k několika překvapivým závěrům: některé mutace opakovaně popisované jako patogenní získaly ve skórovacím systému predikčních programů nečekaně nízké skóre a naopak některé varianty, jejichž patogenita byla opakovaně zpochybněna, získaly skóre vysoké.

Z opakovaně popisovaných a prokazatelně patogenních mutací je ve všech použitých databázích uvedeno jako patogenní a z predikčních programů získalo odpovídající skóre následujících 10 missense mutací: p.Val138Phe, p.Thr193Ile, p.Gly209Val, p.Leu236Pro, p.Arg409His, p.Thr416Pro, p.Leu445Trp, p.Asn457Lys, p.Tyr530Ser a p.Thr721Met.

Naopak 6 dalších missense mutací považovaných v literatuře na počátku mého výzkumu za patogenní (p.Glu29Gln, p.Thr99Met, p.Phe335Leu, p.Val570Ile, p.Gly740Val a p.Arg776Cys) poskytuje po této analýze rozporuplné výsledky. Patogenita některých z nich se však již v průběhu mého výzkumu stala předmětem spekulací v jiných publikacích (zejména p.Arg776Cys) (Hutchin et al., 2005; Pera et al., 2008a; Pfarr et al., 2006).

Mutace p.Glu29Gln je v databázi HGMD uváděna jako patogenní, v NCBI dbSNP jako pravděpodobně patogenní, v EVS uvedena není, PolyPhen2 ji hodnotí jako nejspíše patogenní se skóre 0,662, ale program Panther jí přiznává pouze velmi nízké skóre kolem 0,3 a SIFT ji vyhodnotil jako „tolerated“ čili nepatogenní se skóre 0,27. Funkční studie této mutace (Pera et al., 2008a) ukazuje na signifikantní snížení funkce proteinu nesoucího tuto mutaci a označuje ji za hypofunkční variantu, která spolu s plně patogenní mutací na druhé

alele způsobuje u pacientů fenotyp NSEVA/PS. Mutaci tedy i nadále považuji za patogenní, i když se sníženým potenciálem.

Mutace p.Thr99Met není uvedena v databázi HGMD, EVS ani na Pendred and BOR homepage. NCBI dbSNP ji uvádí jako variantu neznámého významu a její frekvenci v populaci jako 0,0009. Program PolyPhen2 ji považuje za pravděpodobně patogenní, stejně jako SIFT, avšak Panther skóre je pouze 0,53. Frekvence v 1000 genomes je 0,001. Tato mutace byla v literatuře popsána pouze v publikaci zabývající se zobrazením skalní kosti u pacientů se ztrátou sluchu způsobenou mutacemi v genu *GJB2* (Probst et al., 1999). Pacient nesoucí mutaci p.Thr99Met v heterozygotní formě byl zároveň složeným heterozygotem pro mutace c.35delG a c.167delT v genu *GJB2*, ačkoliv v této skupině byla popsána EVA u 14% pacientů, o fenotypu tohoto konkrétního pacienta nejsou údaje uvedeny. Funkční studie této mutace nebyla dosud provedena. Na základě těchto faktů mutaci nadále považuji za nepatogenní.

Mutace p. Phe335Leu je v NCBI dbSNP uvedena jako patogenní, stejně tak v HGMD a EVS. Její stupeň konzervace (GERP) je vysoký (5,62, což je třetí nejvyšší ze všech mutací v souboru s dostupným GERP) a program PolyPhen2 ji predikuje jako pravděpodobně patogenní se skóre 0,997. Program Panther jí přisuzuje intermediální skóre 0,59 (zaokrouhleno) a SIFT ji se skóre 0,47 považuje za nepatogenní. V 1000 genomes je MAF 0,002 a EVS uvádí frekvenci mutované alely jako 16/8600, což po zaokrouhlení odpovídá 0,002. Funkční studie této mutace (Choi et al., 2009) ukázala jen mírně sníženou funkci pendrinu s vysokou zachovanou reziduální funkcí a uvádí ji pouze jako hypofunkční variantu, nepovažují ji tedy pro potřeby této studie nadále za patogenní.

Mutaci p.Val570Ile databáze NCBI a program PolyPhen2 hodnotí jako pravděpodobně patogenní, nicméně v HGMD ani EVS není uvedena a programy SIFT a Panther jí přidělují spíše nepatogenní hodnoty skóre (0,39 resp. 0,11). Mutace však byla nalezena vždy v trans pozici s nově nalezenými frame-shiftovými mutacemi a zároveň segreguje v rodině pacienta 5706, kde oba postižení sourozenci nesou na jedné alele frameshift mutaci (p.Ile379fs) a na druhé mutaci p.Val570Ile a jejich rodiče jsou přenašeči každý jedné mutace. Tento fakt lze vysvětlit buď dle funkční studie tím, že se jedná o hypofunkční variantu, která se v přítomnosti silně patogenní mutace na druhé alele podílí na fenotypu (Choi et al., 2009) nebo faktem, že alela nesoucí mutaci p.Val570Ile zároveň nese dále v genu mutaci nedetekovatelnou použitými metodami DNA diagnostiky, tj. patogenní mutaci, která je s hypofunkční variantou p.Val570Ile v konfiguraci *cis*. Vzhledem k prokázanému efektu zakladatele u většiny ostatních *SLC26A4* mutací lze i u této mutace předpokládat tento efekt a

stejnou hypotézu o patogenní mutaci v konfiguraci *cis*, implikovat i na pacientku 5217, jejíž sestra je slyšící a je pouze přenašečkou mutace p.Ser594fs. Mutaci p.Val570Ile považují tedy nadále za patogenní.

Patogenita mutace p.Gly740Val je v databázi NCBI dbSNP označena jako neznámá, program PolyPhen ji vyhodnocuje jako benigní (skóre 0,167) a podobně Panther jí určuje velmi nízké skóre (0,09), v databázi HGMD je však mutace uvedena jako patogenní a program SIFT ji vyhodnocuje jako patogenní se skóre 0. Její frekvence v populaci je dle NCBI dbSNP 0,0005, dle HGMD 0,001 a dle EVS 2 z 8600 alel. Funkční studie této varianty bohužel dosud provedena nebyla. Ve vyšetřovaném souboru se tato mutace vyskytuje jako monoalelická u pacientky s dodatečně zjištěným negativním EVA/MD fenotypem a zřejmě AD mechanismem přenosu sluchové vady, její podíl na ztrátě sluchu u pacientky je tedy spíše nepravděpodobný. Nadále tedy považují p.Gly740Val za nepatogenní variantu.

Mutace p.Arg776Cys (c.2326 C>T) je v databázi NCBI dbSNP uvedena jako pravděpodobně nepatogenní, v HGMD jako mutace s pochybnou patogenitou a program Panther jí predikuje velmi nízké skóre (0,05). V databázi EVS je však uvedeno velmi vysoké skóre konzervovanosti (5,76) a PolyPhen2 ji uvádí jako pravděpodobně patogenní se skóre 0,999. V programu SIFT je uvedena jako patogenní se skóre 0, avšak s poznámkou, že se jedná o nízký stupeň důvěryhodnosti. Frekvence v NCBI dbSNP je 0,0005, avšak v EVS je to 19/8600 což se rovná více než čtyřnásobku (0,0022), podle 1000 genomes programu je frekvence 0,004 a podle SIFT databáze dokonce 0,007. Mutace je pravidelně popisována pouze u pacientů s monoalelickými mutacemi (Albert et al., 2006; Campbell et al., 2001; Pera et al., 2008a; Prasad et al., 2004; Pryor et al., 2005) a funkční studie u ní prokázaly pouze velmi mírně sníženou až normální funkci pendrinu (Pera et al., 2008a; Pfarr et al., 2006) (Pfarr, 2006, Pera, 2008). Mutaci nadále považují za pravděpodobně nepatogenní variantu (Choi et al., 2009; Pera et al., 2008a; Pfarr et al., 2006).

Frame-shift mutace p.Phe122fs je uvedena v databázi HGMD a na Pendred and BOR homepage jako patogenní, pomocí programů PolyPhen2 a Panther ji nelze analyzovat, ale SIFT ji vyhodnotil jako patogenní. Poprvé byla popsána v asijské populaci (Park et al., 2003). Mutaci tedy považují za patogenní.

4.13.2. Patogenita předpokládaných polymorfismů

Analýza obou předpokládaných polymorfismů nacházejících se v kódující oblasti (p.Gly6Val a p.Leu597Ser) také přinesla překvapivé výsledky. První z nich sice hypotézu o nepatogenitě varianty potvrdil – v databázi NCBI dbSNP je uveden jako pravděpodobně nepatogenní,

v HGMD nefiguruje, v EVS je uvedena velmi nízká úroveň konzervovanosti (GERP 0,15), program PolyPhen2 jej považuje za benigní se skóre 0,005, v programu Panther jej nelze vzhledem k poloze blízko počátku genu predikovat a program SIFT jej vyhodnotil jako nepatogenní se skóre 0,32. O četnosti v 1000 genome projektu nejsou dostupné údaje, v EVS je však uvedena jako 1/7880 alel euro-amerického původu.

Varianta p.Leu597Ser je naopak z hlediska analýzy velmi rozporuplná. V databázi NCBI dbSNP je uvedena jako nepatogenní, v HGMD jako varianta se spornou patogenitou a SIFT vyhodnotil variantu jako nepatogenní se skóre 0,11, EVS však uvádí vysokou konzervovanost aminokyselinového zbytku (GERP 5,72), program PolyPhen2 jej vyhodnotil jako pravděpodobně patogenní a Panther mu predikuje vysoké skóre patogenity 0,81. Frekvence této alely je dle NCBI dbSNP 0,004, v 1000 genomes 0,007, avšak podle EVS je frekvence v euro-americké populaci 78/8600 alel (tj. 1,8 % osob). Tyto počty jsou spíše vysoké a odpovídají hypotéze o polymorfismu. Mé pozorování heterozygotní frekvence této alely v české populaci bylo ještě nepatrně vyšší (2,4 % u kontrol). Je tedy možné, že tento polymorfismus je v české populaci častější, nebo se může jednat o chybu malých čísel – bylo vyšetřeno pouze 500 kontrol. Patogenitu varianty p.Leu597Ser zpochybnilo několik publikací a její funkční studie (Choi et al., 2009) prokázala pouze mírně sníženou funkci pendrinu. Tato varianta byla tedy označena za hypofunkční variantu, která může hrát modulující roli v případě nálezů silně patogenní mutace na druhé alele. Ve většině publikovaných prací však stejně jako v mé studii byla varianta p.Leu597Ser nacházena pouze ve spojení s druhou alelou bez jakékoliv patologie (Blons et al., 2004; Campbell et al., 2001; Fugazzola et al., 2002; Pera et al., 2008a; Pryor et al., 2005).

4.13.3. Patogenita nových mutací

V rámci mé studie bylo nalezeno 6 nových mutací, z toho 3 typu missense (p.Val144Ala, p.Arg185Thr a p.Val281Ile), 2 typu frame-shift (p.Ile379fs a p.Ser594fs) a jedna typu nonsense (p.Trp518Stop).

Mutace p.Arg185Thr, p.Val281Ile a p.Trp518Stop byly uveřejněny v publikaci Pourová et al. 2010 a na jejím základě jsou nyní uvedeny v HGMD, v žádné další z použitých databází se ke dni 22.4.2014 žádná z těchto mutací nenachází.

Mutace p.Val144Ala byla programem PolyPhen2 vyhodnocena jako nejspíše patogenní se skóre 0,939 a programem SIFT jako patogenní se skóre 0,01, skóre 0,52035 z programu Panther je intermediální. Mutace byla nalezena jako monoalelická u nedoslýchavého pacienta se stejně postiženým bratrem, který však tuto mutaci nenesl. Jedná

se tedy nejspíše o koincidentální nosičství mutace. Vzhledem k těmto faktům považuji tuto mutaci pro potřeby mé studie za nepatogenní.

Mutace p.Arg185Thr byla velmi podobně vyhodnocena programy PolyPhen2 a SIFT jako patogenní a v programu Panther získala skóre 0,67. Mutace byla nalezena jako monoalelická u pacientky s velmi přesvědčivým fenotypem (bilaterální EVA, struma), u které předpokládám přítomnost další kryptické mutace (viz diskuse). Mutaci na základě těchto údajů považuji za patogenní.

Mutace p.Val281Ile je sice uvedena v HGMD na základě publikace (Pourová et al., 2010) jako patogenní, nebyla však dosud popsána v žádné další práci. Program PolyPhen2 ji považuje za patogenní (skóre 0,012), podobně Panther (0,2) a SIFT (0,55). Tato mutace byla nalezena ve složeně heterozygotním stavu spolu s mutací c.1614+1 G>A u pacienta s Pendredovým syndromem. Mutaci tedy považuji za patogenní – podrobněji viz diskuse 5.1.

Delece 13 bazí v exonu 9 způsobuje frame-shift mutaci p.Ile379fs, kterou program SIFT vyhodnotil jako patogenní, ačkoliv nezpůsobuje vznik předčasného stopkodonu. Byla nalezena u dvou bratrů s bilaterální EVA v předškolním věku a u jejich slyšícího otce. U obou bratrů se nachází ve složeně heterozygotním stavu s mutací p.Val570Ile, kterou zdědili od své slyšící matky. Mutaci považuji za patogenní.

Inserce baze A v exonu 16 způsobuje mutaci p.Ser594fs, která způsobuje vznik předčasného stop kodonu a kterou SIFT v souladu s tím považuje za patogenní. Mutace byla v našem souboru nalezena u pacientky s PS ve složeně heterozygotním stavu s mutací p.Val570Ile (viz výše) a u její slyšící sestry spolu s nepatogenní alelou. Mutaci p.Ser594fs považuji nadále za patogenní.

Záměna baze G za A v exonu 14 je zodpovědná za vznik nonsense mutace p.Trp518Stop, kterou vzhledem ke vzniku předčasného stop kodonu považuje program SIFT za patogenní. Mutaci jsem našla jako monoalelickou u pacientky se strumou a později doplněné HRCT prokázalo bilaterální EVA. Mutaci považuji za patogenní.

4.14. Frekvence a spektrum mutací v české populaci po zohlednění míry jejich patogenity

4.14.1. Spektrum patogenních mutací v souboru 315 českých neslyšících pacientů

Na základě rozboru patogenity pomocí analýzy databází, predikčních programů, funkčních hypotéz a publikovaných výsledků funkčních studií jsem ze seznamu identifikovaných patogenních mutací vyřadila celkem 5 mutací (p.Thr99Met, p.Val144Ala, p.Phe335Leu,

p.Gly740Val a p.Arg776Cys – čtyři dříve popsané a jednu novou) na pěti alelách. Celkový počet patogenních mutací ve vyšetřovaném souboru je tedy 20 různých mutací na 40 alelách u 27 pacientů, z toho u 13 pacientů na obou alelách a u 14 z nich na pouze jedné alele (viz tabulka 19). Zohlednění patogenity neovlivnilo počet pacientů s dvěma prokázanými mutacemi, avšak u 5 pacientů s monoalelickou mutací byla eliminována jediná přítomná mutace. Počet pacientů ve skupině s jednou mutací se tedy snížil o pět. Ve všech pěti případech se jedná o pacienty s negativním nebo neznámým EVA/MD fenotypem. Všechny 5 mutací určených jako nepatogenní bylo nalezeno u pacientů ze skupin B a C v souboru 303 českých neslyšících pacientů (viz oddíl 4.2.- 4.4.).

Nejčastější mutací ve vyšetřovaném souboru je p.Val138Phe (17,5 % všech patogenních alel), druhými nejčastějšími jsou p.Leu445Trp a p.Glu29Gln (10 % všech patogenních alel). Všechny mutace považované v mé studii za patogenní jsou shrnuty v tabulce 19.

Tabulka 19 – Spektrum a relativní podíl všech dosud nalezených *SLC26A4* patogenních mutací u českých neslyšících pacientů

	název mutace na AMK úrovni	název mutace na úrovni nukleotidů	počet nezávislých alel (% pat. alel)	reference pro mutaci	exon
1.	p.Val138Phe	<i>c.412 G>T</i>	7 (17,5 %)	(Van Hauwe, 1998)	4
2.	p.Leu445Trp	<i>c.1334 T>G</i>	4 (10 %)	(Van Hauwe, 1998)	11
3.	p.Glu29Gln	<i>c.85 G>C</i>	4 (10 %)	(Campbell et al., 2001)	2
4.	<i>c.1001+1 G>A</i>		3 (7,5 %)	(Coyle et al., 1998)	Intron 8
5.	p.Arg409His	<i>c.1226 G>A</i>	3 (7,5 %)	(Coyle et al., 1998)	10
6.	p.Thr416Pro	<i>c.1246 A>C</i>	2 (5 %)	(Van Hauwe, 1998)	10
7.	p.Asn457Lys	<i>c.1371 C>A</i>	2 (5 %)	(Park et al., 2003)	12
8.	<i>c.1614+1 G>A</i>		2 (5 %)	(Blons et al., 2004)	Intron 14
9.	p.Val570Ile	<i>c.1708 G>A</i>	2 (5 %)	(Prasad et al., 2004)	16
10.	p.Phe122fs	<i>c.365_366insT</i>	1 (2,5 %)	(Park et al., 2003)	4
11.	p.Arg185Thr	<i>c.554 G>C</i>	1 (2,5 %)	Nová	5
12.	p.Thr193Ile	<i>c.580 C>T</i>	1 (2,5 %)	(Adato et al., 2000)	5
13.	p.Gly209Val	<i>c.626 G>T</i>	1 (2,5 %)	(Van Hauwe, 1998)	6
14.	p.Leu236Pro	<i>c.707 T>C</i>	1 (2,5 %)	(Van Hauwe, 1998)	6
15.	p.Val281Ile	<i>c.841 G>A</i>	1 (2,5 %)	Nová	7
16.	p.Ile379fs	<i>c.1136_1148del13</i>	1 (2,5 %)	Nová	9
17.	p.Trp518Stop	<i>c.1554 G>A</i>	1 (2,5 %)	Nová	14
18.	p.Tyr530Ser	<i>c.1589 A>C</i>	1 (2,5 %)	(Pryor et al., 2005)	14
19.	p.Ser594fs	<i>c.1781_1782insA</i>	1 (2,5 %)	Nová	16
20.	p.Thr721Met	<i>c.2162 C>T</i>	1 (2,5 %)	(Usami et al., 1999)	19
	Total #		40 (100 %)		

Šedou barvou jsou označeny mutace nalezené v druhé části studie, u opakovaně detekovaných mutací je zvýrazněn pouze sloupec s navýšeným počtem alel.

4.14.2. Frekvence *SLC26A4* mutací v souboru 303 českých neslyšících pacientů po zohlednění jejich patogenity

V původním souboru 303 českých neslyšících pacientů byla stanovena frekvence bialelických mutací na 2,6% (8/303) a tato frekvence zůstává nezměněna i po zohlednění patogenity mutací. Došlo k redukci počtu monoalelických mutací z 18 na 13, frekvence monoalelických mutací v daném souboru je tedy 4,3% (13/303) a podíl pacientů s alespoň jednou patogenní mutací je nově 6,9% (21/303).

Ve skupině familiárních případů (27/303) došlo k redukci počtu monoalelických pacientů ze čtyř na dva. V jednom případě se jednalo o pacienta, který byl v nosičství dané mutace se svým bratrem diskordantní a jehož HRCT bylo EVA/MD negativní, ve druhém

případě o sourozenecký pár, jehož doplňující data se nepodařilo získat. Zbývající dva sourozenecké páry s monoalelickými patogenními mutacemi mají potvrzené EVA/MD na HRCT. Ve skupině familiárních případů je tedy výskyt bialelických mutací 7,4 % (2/27) stejně jako při původním pozorování a monoalelických mutací nově také 7,4 % (2/27). Alespoň jedna mutace byla nalezena u 4 z 27 familiárních případů tj. 14,8 %.

Podrobný rozbor dopadu zohlednění patogenity mutací na jejich spektrum a frekvenci v souboru je proveden v rámci diskuse.

4.15. Korelace genotypu s fenotypem

4.15.1. Korelace mezi typem mutace a fenotypem

Bylo zachyceno celkem 13 pacientů s oběma identifikovanými (bialelickými) patogenními mutacemi, dále 8 pacientů s EVA/MD a jednou identifikovanou (monoalelickou) patogenní mutací, 3 pacienti s neznámým EVA/MD fenotypem a jednou mutací (nezapočten pacient s hypofunkční variantou p.Arg776Cys) a 3 pacienti s EVA/MD negativním HRCT (nezapočtení pacienti s nepatogenními variantami p.Thr99Met, p.Val144Ala, p.Phe335Leu a p.Glu740Val).

Celkem bylo identifikováno 25 variant - mutací v *SLC26A4*. Z toho 5 jsem označila za pravděpodobně nepatogenní. Celkem jsem bylo detekováno 20 patogenních mutací, ze kterých 6 způsobuje tvorbu zkráceného proteinu (p.Trp518Stop, p.Phe122fs, p.Ile379fs, p.Ser594fs a dvě splice site mutace - c.1001+1G>A a c.1614+1G>A) a 14 missense mutací způsobuje pouze záměnu jedné aminokyseliny za jinou. Žádná z mutací nebyla nalezena v homozygotním stavu. U 6 pacientů byly nalezeny mutace s předčasným stopkodonom ve složeně heterozygotním stavu spolu s patogenní missense mutací a 7 pacientů je složenými heterozygoty pro dvě missense mutace. U žádného pacienta nebyly nalezeny dvě nonsense mutace. Fenotypy a genotypy pacientů se dvěma patogenními mutacemi, nebo s jednou patogenní mutací a EVA/MD jsou shrnuty v tabulkách 20, 21 a 22.

Tabulka 20 – Fenotypy a genotypy pacientů s oběma prokázanými mutacemi v genu *SLC26A4*

# DNA	RA*	Věk **	Ztráta sluchu	HRCT/MRI	Štítná žláza	Alela 1	Alela 2
2333	0	19	progresivní	bil. EVA	struma	p.Glu29Gln	p.Leu445Trp
4748	0	23	progresivní	bil. EVA	struma	p.Val138Phe	p.Leu445Trp
1928	0	9	kongenitální	bil. EVA	NTH	p.Leu236Pro	p.Thr721Met
1790	0	10	progresivní	bil. EVA	O	p.Thr193Ile	p.Asn457Lys
4947	1	5	kongenitální	bil. EVA	O	p.Arg409His	p.Leu445Trp
5488	0	6	kongenitální	bil. EVA	O	p.Val138Phe	p.Arg409His
6004	1	7	kongenitální	n/a	O	p.Glu29Gln	p.Leu445Trp
5153	0	1	kongenitální	bil. EVA	O	p.Glu29Gln	p.Phe122fs
5706	1	5	progresivní	bil. EVA	O	p.Val570Ile	p.Ile379fs ⁺
3832	0	6	progresivní	bil. EVA	O	p.Val138Phe	c.1001+1G>A
3830	2	55	progresivní	n/a	struma	p.Asn457Lys	c.1001+1G>A
4745	0	38	progresivní	n/a	struma	p.Val281Ile ⁺	c.1614+1G>A
5217	0	31	kongenitální	n/a	struma	p.Val570Ile	p.Ser594fs ⁺

Tučně jsou zvýrazněni pacienti z rodin s mutacemi potvrzenými u sourozenců.

Na šedém pozadí jsou pacienti z druhé části studie.

* = počet stejně postižených sourozenců ** = věk v době vyšetření uvedený v letech + = nové mutace

NTH = transientní novorozenecká hypotyreóza O = normální nález n/a = dokumentace není k dispozici

Tabulka 21 – Fenotypy a genotypy pacientů s pouze jednou prokázanou patogenní mutací (monoalelickou) v SLC26A4

# DNA	RA*	Věk**	Ztráta sluchu	HRCT/MRI	Štítná žláza	Alela 1	Alela 2
4776	1	29	progresivní	<u>bil. EVA</u>	struma	p.Val138Phe	wt
4840	1	32	kongenitální	<u>MD+EVA</u>	struma	p.Val138Phe	wt
2275	0	23	kongenitální	<u>bil. EVA</u>	<u>struma</u>	p.Trp518Stop ⁺	wt
1255	0	2	kongenitální	<u>bil. EVA</u>	<u>normální</u>	p.Thr416Pro	wt
3831	0	20	kongenitální	bil. EVA	struma	p.Arg185Thr ⁺	wt
2795	0	7	kongenitální	bil. EVA	normální	p.Val138Phe	wt
4950	0	3	kongenitální	bil. EVA	normální	p.Arg409His	wt
5181	0	3	kongenitální	bil. EVA	normální	c.1001+1G>A	wt

Tučně jsou zvýrazněni pacienti z rodin s více postiženými sourozenci, na šedém pozadí pacient z druhé části studie, kurzívou a podtržením označena nově získaná data.

* = počet stejně postižených sourozenců ** = věk v době 1. vyšetření uvedený v letech
⁺ nová mutace ⁺⁺ mutace popsána, ale bez korelace s fenotypem, wt=bez mutace
n/a = HRCT/MRI dokumentace pacienta stále není dostupná

nonMD = HRCT pacienta nezachycuje úroveň vestibulárního akveduktu – EVA nelze vyloučit ani potvrdit, lze však vyloučit MD

Celkový dopad těchto nově získaných údajů na výsledky studie je rozebrán v diskusi.

Tabulka 22 – Výsledky vyšetření SSEP (odhadovaný audiogram) nebo audiogramu u pacientů s bíalelickými mutacemi nebo monoalelickou mutací a EVA/MD v korelaci s typem mutace

# DNA	mutace		levé ucho				pravé ucho			
	alela 1	alela 2	0,5 kH	1 kH	2kH	4kH	0,5 kH	1 kH	2kH	4kH
2333	M	M	90	110	100	*	100	*	*	110
4748	M	M	*	*	*	*	105	110	105	105
1790	M	M	110	100	100	120	110	100	100	120
5488	M	M	95	95	125	*	90	85	100	120
6004	M	M	110	120	120	*	100	110	100	115
1928	M	M	100	95	100	110	90	95	105	120
4947	M	M	*	110	110	125	*	115	110	120
5706	M	T	105	100	100	105	75	65	110	110
3830	M	T	90	90	100	120	100	110	100	120
5217	M	T	85	90	90	110	90	95	90	95
4745	M	T	80	85	100	95	90	95	110	100
3832	M	T	*	120	*	*	*	100	*	120
5153	M	T	*	*	*	*	*	*	*	*
2795	M	wt	120	120	120	120	120	110	120	120
4950	M	wt	*	110	110	115	*	120	125	*
4954	M	wt	110	115	115	*	100	110	125	*
3831	M	wt	60	65	75	80	50	60	75	70
4840	M	wt	85	90	95	100	95	95	100	110
1255	M	wt	100	110	110	*	*	120	120	*
4776	M	wt	75	80	85	90	70	85	80	95
5181	T	wt	95	95	*	110	110	110	*	*
2275	T	wt	65	75	80	90	60	80	85	90

Modře podbarvení jsou uživatelé kochleárních implantátů.

M = missense mutace, T = mutace způsobující zkrácení výsledného proteinu, * bez odpovědi

Všech 7 pacientů se dvěma missense mutacemi jsou uživateli kochleárních implantátů, jejich tíže sluchového postižení je tedy na úrovni praktické hluchoty. Ze šesti pacientů s kombinací missense mutace a mutace zkracující délku pendrinu jsou tři (50 %) uživatelé kochleárního implantátu, ostatní 3 pacienti byli do studie indikováni jako pacienti s PS v dospělém věku a

podstoupili operaci štítné žlázy pro strumu. Tíže jejich poruchy sluchu je však stejně závažná jako u uživatelů kochleárních implantátů, ke kterým nepatří zejména proto, že v době jejich dětství nebyla tato technologie k dispozici. Jediná korelace se tedy týká tyroidálního fenotypu, protože všichni tři pacienti, kteří byli indikováni do studie pro klinicky diagnostikovaný PS (manifestovali rozvinutou strumu), a byly u nich nalezeny *SLC26A4* mutace, nesou kombinaci missense mutace a mutace zkracující výsledný protein. U dalších tří pacientů s touto kombinací nelze vzhledem k jejich nízkému věku dosud stanovit tyroidální fenotyp, jsou však pečlivě sledováni a je u nich každoročně prováděno vyšetření hladiny tyroidálních hormonů v krvi a sonografie štítné žlázy.

4.15.2. Fenotypy a genotypy pacientů s bilaterální EVA

Bilaterální EVA se potvrdila jako spolehlivý indikátor, u kterého je záchyt pro aspoň jednu patogenní mutaci 72,2 % (13/18) a pro obě patogenní mutace 50 % (9/18) – viz tabulka 23 – horní část. Do tohoto výpočtu nezahrnuji pacienty, u kterých bylo HRCT provedeno až na základě zjištěné přítomnosti mutace v genu *SLC26A4*, protože jejich připočtením k pacientům s EVA zjištěnou před analýzou genu by byla záchytnost zkreslena (tito pacienti jsou uvedeni v dolní části tabulky 23). Všichni pacienti s bíalelickými mutacemi a dostupnou HRCT/MRI dokumentací mají prokázanou bilaterální EVA (eventuelně v kombinaci s MD).

Tabulka 23 – Fenotypy a genotypy pacientů s bilaterální EVA vyšetřených v rámci studie

# DNA	RA*	Věk **	Ztráta sluchu	HRCT/MRI	Štítná žláza	Alela 1	Alela 2
2333	0	19	progresivní	bil. EVA	struma	p.Glu29Gln	p.Leu445Trp
4748	0	23	progresivní	bil. EVA	struma	p.Val138Phe	p.Leu445Trp
1928	0	9	kongenitální	bil. EVA	NTH	p.Leu236Pro	p.Thr721Met
1790	0	10	progresivní	bil. EVA	normální	p.Thr193Ile	p.Asn457Lys
4947	1	5	kongenitální	bil. EVA	normální	p.Arg409His	p.Leu445Trp
5488	0	6	kongenitální	bil. EVA	normální	p.Val138Phe	p.Arg409His
5153	0	1	kongenitální	bil. EVA	normální	p.Glu29Gln	p.Phe122fs
5706	1	5	progresivní	bil. EVA	normální	p.Val570Ile	p.Ile379fs ⁺
3832	0	6	progresivní	bil. EVA	normální	p.Val138Phe	c.1001+1G>A
5181	0	3	kongenitální	bil. EVA	normální	c.1001+1G>A	wt
3831	0	20	kongenitální	bil. EVA	struma	p.Arg185Thr+	wt
2795	0	7	kongenitální	bil. EVA	normální	p.Val138Phe	wt
4950	0	3	kongenitální	bil. EVA	normální	p.Arg409His	wt
1254	0	9	kongenitální	bil. EVA	normální	wt	wt
1557	0	8	kongenitální	bil. EVA	normální	wt	wt
3336	0	4	kongenitální	bil. EVA	normální	wt	wt
3802	0	6	progresivní	bil. EVA	normální	wt	wt
5637	0	3	progresivní	bil. EVA	normální	wt	wt
1255	0	2	kongenitální	<i>bil. EVA</i>	<i>normální</i>	p.Thr416Pro	wt
4776	1	29	progresivní	<i>bil. EVA</i>	struma	p.Val138Phe	wt
4840	1	32	kongenitální	<i>MD+EVA</i>	struma	p.Val138Phe	wt
2275	0	23	kongenitální	<i>bil. EVA</i>	<i>struma</i>	p.Trp518Stop+	wt

V horní části je uvedeno 18 pacientů, kteří byli pro bilaterální EVA do studie indikováni, nebo byla zjištěna v rámci vstupního vyšetření. V dolní části jsou pacienti, u kterých byla zjištěna jedna mutace v genu *SLC26A4* při neznámém EVA/MD fenotypu a při dodatečném vyšetření byla bilaterální EVA zjištěna.

Tučně jsou zvýrazněni pacienti z rodin s více postiženými sourozenci, na šedém pozadí pacient z druhé části studie, kurzívou a podtržením označena nově získaná data.

* = počet stejně postižených sourozenců ** = věk v době 1. vyšetření uvedený v letech

⁺nová mutace wt=bez mutace NTH = transientní novorozenecká hypotyreóza

4.15.3. Fenotypy a genotypy uživatelů kochleárních implantátů s alespoň jednou prokázanou mutací v *SLC26A4* genu

Ze 131 vyšetřených uživatelů kochleárních implantátů (CI) s již vyloučenými mutacemi v *GJB2* genu (124 ze souboru 303 pacientů, 5 ze souboru 10 pacientů a 2 ze souboru sourozenských dvojic vyšetřených haplotypovou analýzou) byly nalezeny mutace v genu *SLC26A4* na obou alelách u 10 pacientů a na jedné alele u dalších 7 pacientů. Celkově tedy alespoň jedna mutace byla nalezena u 13,0 % (17/131), dvě mutace u 7,6 % (10/131) a jedna mutace u 5,3 % (7/131) pacientů s CI s již vyloučenými mutacemi v *GJB2*. Tato frekvence je vyšší než v běžné populaci neslyšících a koreluje spíše s frekvencí familiárních případů, kde byly zjištěny bialelické mutace v 7,4 % případů (2/27) a alespoň jednu mutaci u 14,8 % (4/27). Přehled fenotypů a genotypů uživatelů kochleárních implantátů s alespoň jednou zjištěnou mutací je uveden v tabulce 24. Uživatelé CI jsou pacienti s nejtěžší ztrátou sluchu a jsou pečlivě vybíráni. Tuto skupinu lze proto považovat za velmi dobře vybranou a vyšetřenou a tyto výsledky za vysoce relevantní. Ve skupině uživatelů CI nebyla nalezena žádná z mutací, jejichž patogenita byla zpochybněna po použití databází a predikčních programů.

Tabulka 24 – Fenotypy a genotypy uživatelů CI s prokázanými mutacemi v genu *SLC26A4*

# DNA	RA*	Věk **	Ztráta sluchu	HRCT/MRI	Št. žláza	Alela 1	Alela 2
2333	0	19	progresivní	bil. EVA	struma	p.Glu29Gln	p.Leu445Trp
4748	0	23	progresivní	bil. EVA	struma	p.Val138Phe	p.Leu445Trp
1928	0	9	kongenitální	bil. EVA	NTH	p.Leu236Pro	p.Thr721Met
3832	0	6	progresivní	bil. EVA	O	p.Val138Phe	c.1001+1G>A
1790	0	10	progresivní	bil. EVA	O	p.Thr193Ile	p.Asn457Lys
4947	1	5	kongenitální	bil. EVA	O	p.Arg409His	p.Leu445Trp
5488		6	kongenitální	bil. EVA	O	p.Val138Phe	p.Arg409His
6004	1	7	kongenitální	n/a	O	p.Glu29Gln	p.Leu445Trp
5153	0	1	kongenitální	bil. EVA	O	p.Glu29Gln	p.Phe122fs
5706	1	5	progresivní	bil. EVA	O	p.Val570Ile	p.Ile379fs ⁺
2795	0	7	kongenitální	bil. EVA	O	p.Val138Phe	wt
4950	0	3	kongenitální	bil. EVA	O	p.Arg409His	wt
5181	0	3	kongenitální	bil. EVA	O	c.1001+1G>A	wt
1255	0	2	kongenitální	<u>bil. EVA</u>	n/a	p.Thr416Pro	wt
1737	0	7	kongenitální	<u>EVA, MD negativní</u>	n/a	p.Leu236Pro	wt
4954	0	3	kongenitální	EVA, MD negativní	normální	p.Tyr530Ser	wt
3836	0	5	kongenitální	EVA, MD negativní	normální	p.Val138Phe	wt

Tučně jsou zvýrazněni pacienti z rodin s více postiženými sourozenci, na šedém pozadí pacienti z druhé části studie, kurzívou a podtržením označena nově získaná data. Pacienti 4947 a 5488 jsou sourozenci, viz dále oddíl 4.15.5.

V závorce jsou uvedeny mutace, jejichž patogenita byla zpochybněna, viz výše.

* = počet stejně postižených sourozenců ** = věk v době 1. vyšetření uvedený v letech

⁺nová mutace ⁺⁺mutace popsána, ale bez korelace s fenotypem, wt=bez mutace

n/a = HRCT/MRI dokumentace pacienta stále není dostupná

4.15.4. Fenotypy pacientů s Pendredovým syndromem

Z 15 pacientů s klinicky diagnostikovaným Pendredovým syndromem byla prokázána alespoň jedna patogenní mutace v *SLC26A4* genu u osmi (53,4 %) z nich, a to u pěti pacientů (33,3 %) bialelické mutace a u tří dalších (20 %) mutace monoalelické. Pět z pacientů se suspektním PS má podobně postiženého sourozence. Z nich byly obě patogenní mutace (bialelické) prokázány u 1 rodiny a pouze 1 patogenní mutace (monoalelická) u 2 rodin. U pacientů z dalších dvou rodin zůstala příčina ztráty sluchu a poruchy štítné žlázy neobjasněna. Fenotypy a genotypy těchto pacientů jsou shrnuty v tabulce 27.

Tabulka 25 – Fenotypy a genotypy pacientů s klinicky diagnostikovaným Pendredovým syndromem

# DNA	RA*	Věk **	Ztráta sluchu	HRCT/MRI	Štítná žláza	Alela 1	Alela 2
3830	2	55	progresivní	n/a	struma	p.Asn457Lys	c.1001+1G>A
4776	1	29	progresivní	nonMD	struma	p.Val138Phe	wt
4840	1	32	kongenitální	n/a	struma	p.Val138Phe	wt
4779	1	30	kongenitální	n/a	struma	wt	wt
3179	1	17	kongenitální	n/a	struma	wt	wt
2333	0	19	progresivní	bil. EVA	struma	p.Glu29Gln	p.Leu445Trp
4748	0	23	progresivní	bil. EVA	struma	p.Val138Phe	p.Leu445Trp
4745	0	38	progresivní	n/a	struma	p.Val281Ile ⁺	c.1614+1G>A
5217	0	31	kongenitální	n/a	struma	p.Val570Ile	p.Ser594fs ⁺
3831	0	20	kongenitální	bil. EVA	struma	p.Arg185Thr ⁺	wt
3829	0	60	kongenitální	n/a	struma	wt	wt
3835	0	14	kongenitální	n/a	struma	wt	wt
5224	0	35	kongenitální	n/a	struma	wt	wt
5265	0	20	kongenitální	n/a	struma	wt	wt
5270	0	47	kongenitální	n/a	struma	wt	wt

Tučně jsou zvýrazněni pacienti z rodin s více postiženými sourozenci, na šedém pozadí pacienti z druhé části studie.

* = počet stejně postižených sourozenců ** = věk v době vyšetření uvedený v letech

+ = nové mutace wt=bez mutace n/a = HRCT/MRI dokumentace pacienta není dostupná

nonMD = HRCT pacienta nezachycuje úroveň vestibulárního akveduktu – EVA nelze vyloučit ani potvrdit, lze však vyloučit MD

4.15.5. Fenotypy a genotypy familiárních případů výskytu mutací v genu *SLC26A4* - intrafamiliární variabilita

V průběhu druhé fáze studie se podařilo dovyšetřit i další postižené členy rodin pacientů s prokázanými bialelickými mutacemi. Intrafamiliární variabilita je vysoká. Fenotypy a genotypy pacientů z rodin s více postiženými sourozenci, u kterých byla zachycena alespoň jedna mutace v genu *SLC26A4*, jsou shrnuty v tabulce 28.

Tabulka 26 – Pacienti s familiárním výskytem hluchoty a zachycenými patogenními mutacemi v genu *SLC26A4*

# DNA	RA*	Věk **	Ztráta sluchu	HRCT/MRI	Štítná žláza	Alela 1	Alela 2
3830	2	55	progresivní	n/a	struma	p.Asn457Lys	c.1001+1G>A
4776	1	29	progresivní	nonMD	struma	p.Val138Phe	wt
4840	1	32	kongenitální	n/a	struma	p.Val138Phe	wt
4947	1 ⁺	5	kongenitální	bil. EVA	O	p.Arg409His	p.Leu445Trp
5706	1	5	progresivní	bil. EVA	O	p.Val570Ile	p.Ile379fs ⁺
6004	1	7	kongenitální	n/a	O	p.Glu29Gln	p.Leu445Trp

Tučně jsou zvýrazněni pacienti z rodin s mutacemi potvrzenými u sourozenců (v tabulce vždy pouze původní proband tj. 1 pacient z rodiny).

Na šedém pozadí jsou pacienti z druhé části studie.

+ = u bratra pacientky byla nalezena jiná kombinace mutací – viz dále v textu

* = počet stejně postižených sourozenců ** = věk v době vyšetření uvedený v letech wt = bez mutace

n/a = HRCT/MRI či endokrinologická dokumentace pacienta není dostupná nonMD = HRCT pacienta nezachycuje úroveň vestibulárního akveduktu – EVA nelze vyloučit ani potvrdit, lze však vyloučit MD

Pacientka 3830 je probandkou z rodiny publikované ještě před identifikací genu *SLC26A4* (Astl et al., 1996). Jedná se o tři sestry postižené ztrátou sluchu a strumou. U probandky je vada sluchu kongenitální s progresí k úplné ztrátě sluchu během časného dětství, porucha štítné žlázy byla zjištěna ve 41 letech v rámci vyšetření celé rodiny po operaci nejstarší sestry, od 47 let se objevila diskrétní struma. Její starší sestra měla progredující ztrátu sluchu, endokrinologické vyšetření ve věku 42 let prokázalo pouze hraniční hypotyreózu. Zemřela však v 51 letech bez jakéhokoliv klinického projevu poruchy štítné žlázy. U nejstarší sestry byla ztráta sluchu zjištěna až v 10 letech spolu s poruchou štítné žlázy. I přes terapii se u ní rozvinula rozsáhlá struma, která si ve věku 46 let vyžádala tyroidektomii. Histologické vyšetření prokázalo benigní proces. Kontrolní HRCT prokázalo EVA. Rodiče i děti všech tří sester jsou slyšící.

Pacientka 4776 trpí těžkou progredující ztrátou sluchu od 5 let a od 8 let hypofunkční strumou. U její mladší sestry byla těžká porucha sluchu verifikována krátce po narození. V dětském věku se u ní objevily vestibulární příznaky, zejména vertigo, a v pozdní pubertě také hypofunkční struma.

Pacientka 4840 je od narození neslyšící, stejně jako její bratr, od 17 let se u ní začala rozvíjet struma, pro kterou jí byla ve 30 letech odstraněna štítná žláza. Průběh onemocnění u jejího bratra byl velmi podobný. U bratra byla operace strumy provedena ve věku 32 let. Na dodatečném HRCT u pacientky byla zjištěna Mondiniho dysplázie II. typu v kombinaci

s bilaterální EVA, u jejího bratra však pouze prostá EVA. Oba sourozenci mají s neslyšícími partnery slyšící děti, jejich rodiče a další příbuzní jsou slyšící.

Pacientka 4947 pochází z manželství neslyšících rodičů a má neslyšícího bratra, který nese stejně jako pacientka mutaci p.Arg409His, ale druhou mutací je u něj p.Val138Phe, na rozdíl od pacientky, u níž byla detekována patogenní varianta p.Leu445Trp. Rodiče DNA vyšetření odmítli. Intrafamiliární variabilita v tomto případě tedy neposuzuje jedince se stejným genotypem. Sourozenci i rodiče otce obou sourozenců jsou slyšící, matka má slyšící rodiče a jednu slyšící sestru, druhá její sestra je neslyšící, obě sestry mají slyšící děti. U probandky i jejího mladšího bratra byla praktická hluchota verifikována v 1,5 roce, kochleární implantace proběhla ve věku dvou a půl, respektive tří let. O poruchách štítné žlázy u rodičů vzhledem k jejich noncompliance nemáme údaje. U obou sourozenců byla na HRCT zjištěna EVA.

Pacient 5706 s negativní perinatální anamnézou se vyvíjel dobře až do věku dvou let, kdy si rodiče všimli opoždění vývoje řeči a absence reakce na zvuk, vada byla verifikována jako oboustranně středně těžká. Ve 4 letech po úraze se sluchová ztráta výrazně zhoršila a začala být zvažována kochleární implantace. Vyšetření HRCT odhalilo bilaterální EVA. Od věku 3 let trpěl poruchami vestibulárního systému. U jeho bratra byl sluch díky anamnéze vyšetřen už v novorozeneckém věku a byla zjištěna bilaterální těžká ztráta sluchu, praktická hluchota. Kochleární implantace u něj byla provedena ve věku 2 let. Štítná žláza u obou bratrů zatím nevykazuje známky hypofunkce. Významným nálezem u mladšího bratra, který nese stejnou kombinaci mutací jako pacient 5706, je jeho HRCT pyramid, které nevykazovalo známky EVA, ale pouze rozšíření laterálního semicirkulárního kanálku. Doplněné vyšetření MRI však bilaterální EVA prokázalo. Toto pozorování podporuje publikovanou hypotézu italských vědců, že MRI je nejvhodnějším zobrazovacím vyšetřením ke zjištění EVA (Fugazzola et al., 2002).

Pacientky 6004 a 6005 jsou sestry 5 a 7 let staré s vrozenou ztrátou sluchu a negativní perinatální anamnézou, u kterých zatím nebylo vyšetření HRCT provedeno. K sekvenaci genu *SLC26A4* jsem přikročila na základě společného haplotypu v lokusu DFNB4. U obou sester byl prokázán stejný genotyp dvou missense mutací v pozici trans.

Je tedy zřejmé, že korelace mezi genotypem a fenotypem není příliš těsná, roli zde mohou hrát i další, např. environmentální či epigenetické faktory, ale i modifikující geny.

4.16. Stanovení finálních kritérií pro vyšetření *SLC26A4* genu

Kritéria nastavená na konci 1. části studie byla v její druhé části ověřena a potvrzena, a to včetně přístupu k pacientům z rodin s AR ztrátou sluchu, viz odstavec 4.10.

4.17. Algoritmus a metodické doporučení pro péči o pacienty s PS/DFNB4

Na základě našich pozorování a literárního přehledu (viz oddíl 1.2.) navrhuji následující algoritmus péče pro pacienty s prokázanými patogenními mutacemi v genu *SLC26A4* (a to bialelickými, nebo monoalelickou mutací a prokázaným EVA/MD):

1. Dispenzarizace v genetické ambulanci 1× ročně – kontrola fenotypu a probíhající dispenzarizace v dalších oborech.
2. Dispenzarizace PLDD – kontrola hladiny tyroidálních hormonů v krvi – ve věku do 8 let u děvčat a 10 let u chlapců 1x ročně, po dosažení tohoto věku 2× ročně.
3. Sonografie štítné žlázy dle schématu z bodu 2.
4. Dispenzarizace v endokrinologické ambulanci okamžitě po zjištění patologické hladiny hormonů, nebo patologického nálezu na štítné žláze.
5. Dispenzarizace ve foniatrické ambulanci dle stavu a typu léčby u pacienta – pacienti s CI dle schématu, pacienti se sluchadly 4× ročně.

5. Diskuze

5.1. Spektrum a patogenní charakter mutací v *SLC26A4* v české populaci neslyšících s vyloučenými mutacemi v *GJB2* genu

Nejčastěji nalezenou mutací je p.Val138Phe (c.412 G>T) v exonu 4, která tvoří 17,5 % všech patogenních alel. Tato mutace je známa už od roku 1998 a vyskytuje v řadě evropských populací (Albert et al., 2006; Blons et al., 2004; Campbell et al., 2001; Fugazzola et al., 2002; Madden et al., 2007; Pera et al., 2008a; Pryor et al., 2005; Taylor et al., 2002). Na 4 německých rodinách nesoucích tuto mutaci bylo prokázáno, že se zde jedná o tzv. efekt zakladatele (founder effect) (Borck et al., 2003). Tato mutace byla nalezena u 3 našich bialelických pacientů a u 4 monoalelických pacientů, z toho u 3 ve skupině A a u 1 ve skupině C. Provedla jsem vyšetření této mutace u 500 zdravých kontrol, ale u žádné z nich nebyla mutace nalezena. Tento výsledek není překvapivý vzhledem k tomu, že předpokládaná frekvence heterozygotů pro všechny patogenní alely *SLC26A4* genu je 0,8 %, tj. 1:125 a pokud mutace p.Val138Phe činí 17,5 % všech mutací v tomto genu, její očekávaný výskyt v populaci je cca 0,14%, tj. 1:714. Větší vzorek slyšící populace jsem neměla k dispozici, avšak ani větší vzorek by nemusel zaručovat pozitivní výsledek, protože dle EVS nebyla tato mutace nalezena u žádného z 4300 vyšetřených pacientů.

Druhými nejčastějšími mutacemi jsou p.Leu445Trp (c.1334 T>G) v exonu 11 a p.Glu29Gln (c.85 G>C) v exonu 2 s frekvencí 10 % z patogenních alel. Obě mutace jsou opakovaně prokazovány v evropské populaci (Albert et al., 2006; Blons et al., 2004; Campbell et al., 2001; Fugazzola et al., 2002; Madden et al., 2007; Pera et al., 2008a; Prasad et al., 2004; Pryor et al., 2005; Reardon et al., 1999; Shears et al., 2004; Van Hauwe et al., 1998). Podobně jako v literatuře byla mutace p.Leu445Trp prokázána pouze ve složené heterozygotním stavu s dalšími mutacemi a to dvakrát s p.Glu29Gln a jednou s p.Val138Phe. Mutace je v databázích NCBI dbSNP, HGMD i EVS popsána jako patogenní, což potvrzují i všechny tři použité predikční programy. Byla nalezena na dvou z 8600 testovaných alel z euro-americké populace dle serveru EVS.

Mutaci p.Glu29Gln jsem na základě analýzy pomocí predikčních programů a databází a na základě funkčních studií definovala jako patogenní se sníženým potenciálem. Mutace byla opakovaně popsána u složených heterozygotů spolu s dalšími mutacemi (Blons et al., 2004; Campbell et al., 2001; Pera et al., 2008a; Shears et al., 2004), nejčastěji spolu s p.Leu445Trp (Blons et al., 2004; Shears et al., 2004) i v kombinaci s mutací v genu *FOXII* (Yang et al., 2007). Populační frekvence nejsou v žádné z databází uvedeny, ve vyšetřovaném

souboru je však mutace jako druhá nejčastější nalezena u 4 pacientů z toho ve 3 případech jako složený heterozygot – dvakrát spolu s mutací p.Leu445Trp a jednou spolu s mutací p.Phe122fs.

Jako třetí nejčastější byly nalezeny mutace c.1001+1 G>A v intronu 8 a p.Arg409His (c.1226 G>A) v exonu 10 a to v 7,5 % z patogenních alel tj. na třech alelách. Obě mutace jsou databázemi a (v druhém případě i predikčními programy) hodnoceny jako jednoznačně patogenní. Tento nálezn je opět zcela v souladu s publikovanými výsledky ostatních studií, protože se jedná o mutace opakovaně identifikované v evropské populaci (Albert et al., 2006; Blons et al., 2004; Bogazzi et al., 2004; Campbell et al., 2001; Coyle et al., 1998; Fugazzola et al., 2002; Gillam et al., 2005; Pera et al., 2008a; Prasad et al., 2004; Pryor et al., 2005; Van Hauwe et al., 1998). Obě mutace byly nalezeny dvakrát u pacientů s bialelickými mutacemi a jednou u pacienta s monoalelickou mutací, ale s fenotypem bilaterální EVA.

U více než jednoho pacienta byly dále prokázány mutace p.Thr416Pro (c.1246 A>C), c.1614+1 G>A, p.Asn457Lys (c.1371 C>A) a p.Val570Ile (c.1708 G>A). Poslední dvě zmíněné mutace byly nalezeny v obou případech u pacientů s bialelickými mutacemi, c.1614+1 G>A byla nalezena v jednom případě u pacienta monoalelickou mutací a jednou u pacienta bialelickými mutacemi a mutace p.Thr416Pro byla nalezena vždy pouze na jedné alele - pouze u pacientů s monoalelickými mutacemi. Tato mutace byla také popsána u české pacientky s vrozenou středně závažnou poruchou sluchu a poruchou štítné žlázy manifestovanou od 7 let, ve složené heterozygotním stavu s mutací p.Tyr530Ser (Banghova et al., 2008b).

Zatímco první tři jmenované mutace jsou databázemi i programy vyhodnocovány jako patogenní, mutace p.Val570Ile opět přináší rozpor, kdy NCBI a Polyphen2 ji hodnotí jako patogenní, zatímco SIFT a Panther spíše naopak. Vzhledem k nálezu této mutace v pozici trans s framshiftovou mutací a její segregaci v rodině pacienta 5706 ji však hodnotím jako patogenní.

Pět z 16 mutací nalezených ve vyšetřovaném souboru pouze jednou (p.Thr193Ile, p.Gly209Val, p.Leu236Pro, p.Tyr530Ser a p.Thr721Met) je vyhodnoceno databázemi i programy jako s velkou pravděpodobností patogenní. Pouze u dvou z nich jsou uvedeny frekvence alel v euro-americké populaci a to 6/8600 z EVS pro p.Gly209Val a 9/8600 pro p.Leu236Pro, což jsou dvě nejvyšší hodnoty z mutací nalezených ve vyšetřovaném souboru vyhodnocených jako patogenní (viz tabulka 18). Mutace p.Tyr530Ser byla nalezena u dvou nepříbuzných českých pacientů z celkem tří pacientů, u kterých byly v ČR prokázány mutace v genu *SLC26A4* mimo studii uvedenou v této disertační práci. První pacient byl identifikován

v rámci novorozeneckého screeningu kongenitální hypotyreózy a trpěl vrozenou těžkou sensorineurální poruchou sluchu. Mutace p.Tyr530Ser u něj byla nalezena ve složeně heterozygotním stavu s mutací p.Val422Asp, která byla v dané studii popsána jako nová (Banghova et al., 2008a). U druhé pacientky se tato mutace nacházela v pozici trans s mutací p.Thr416Pro (viz výše).

Mutace p.Phe122fs je uvedena v databázi HGMD jako patogenní a programem SIFT vyhodnocena taktéž. Byla nalezena v pozici trans s mutací p.Glu29Gln u pacienta s těžkou kongenitální ztrátou sluchu a EVA.

Všech 6 mutací identifikovaných jako nové v mé studii bylo nalezeno u pacientů pouze jednou. Tři z nich vedou ke vzniku předčasného stopkodonu - p.Ile379fs (c.1136_1148del13), p.Trp518Stop (c.1554 G>A), p.Ser594fs (c.1781_1782insA). Považuji je tedy za patogenní, protože významně zkracují délku výsledného proteinu a jejich patogenitu potvrzuje i predikční program SIFT, který jako jediný poskytuje informace i o mutacích tohoto typu. Mutace p.Ile379fs a p.Ser594fs se u dvou různých nepříbuzných rodin nacházejí v trans konfiguraci s mutací p.Val570Ile.

Zbýlé 3 nové mutace jsou typu missense - p.Val144Ala (c.431 T>C), p.Arg185Thr (c.554 G>C) a p.Val281Ile (c.841 G>A). Predikční programy určily mutaci p.Val144Ala jako spíše nepatogenní, p.Arg185Thr jako patogenní a p.Val281Ile jako benigní.

V genu *SLC26A4* bylo popsáno mnoho variant a patogenita některých mutací je opakovaně diskutována a přehodnocována (Choi et al., 2009; Pera et al., 2008a; Pfarr et al., 2006). Patogenitou missense mutací se zabývala zejména studie Pera (Choi et al., 2009; Pera et al., 2008a; Pfarr et al., 2006), která konstatovala, že za patogenní varianty lze považovat především mutace, kde v záměně figuruje nabitá AMK (Arg, Asp, Glu, His, Lys) nebo Pro. Toto pravidlo potvrzuje platnost predikcí zejména v případě mutace p.Arg185Thr, kde dochází k záměně kladně nabitého argininu za neutrální threonin.

Choi (Choi et al., 2009) pak doplňuje, že i mutace, které toto kritérium nesplňují, se mohou chovat jako patogenní, pokud se nacházejí v *trans* konfiguraci s patogenní mutací, hlavně u pacientů s plně rozvinutým PS, což je konsistentní i s pozorováním francouzské studie (Pryor et al., 2005). Tyto mutace jsou nadále v literatuře označovány jako hypofunkční varianty.

Za hypofunkční variantu je tak dle Choi třeba považovat i p.Val281Ile, kde sice zřejmě nedochází k významné redukci funkce (záměna dvou neutrálních aminokyselin), ale vzhledem k jejímu nálezu na pozici *trans* spolu s popsanou patogenní mutací c.1614+1G>A u pacienta 4745 s plně vyjádřeným tyreoidálním fenotypem PS a progresivní ztrátou sluchu,

zřejmě potencuje její patogenní efekt. I u této varianty lze zvažovat efekt kryptické mutace a proto ji stejně jako variantu p.Val570Ile budeme považovat za označující patogenní alelu, čili (pro zjednodušení vyjádření v dalším textu) patogenní.

Patogenita mutace p.Val144Ala, kde dochází k nahrazení neutrálního valinu neutrálním alaninem, je zřejmě velmi nízká. Nepatogenní charakter mutace dále podporuje nález u stejně postiženého bratra probanda, kde nebyla mutace p.Val144Ala potvrzena. Právě této sourozenecké dvojice se s velkou pravděpodobností jedná o případ souběhu přenašečství více patogenních alel v genech způsobujících AR-NSHL u jednoho z rodičů. Příčinou ztráty sluchu u obou bratrů jsou pak zřejmě mutace v jiném DFNB genu. Tato dvojice je tedy velmi vhodná k dalším studiím za pomoci STR markerů, SNP array nebo WES.

Stejně jako mutaci p.Val144Ala jsem zbylé 4 mutace nalezené ve vyšetřovaném souboru pouze jednou (p.Thr99Met, p.Phe335Leu, p.Gly740Val a p.Arg776Cys) na základě predikcí a publikovaných funkčních studií určila jako nepatogenní a vyloučila z počtu patogenních mutací určujících frekvenci a spektrum *SLC26A4* mutací v české populaci neslyšících.

Pokud na první tři uvedené mutace aplikujeme výše uvedenou hypotézu Pera et al., zjistíme, že jde vždy o záměnu dvou nenabitých aminokyselin, což podporuje rozhodnutí zařadit tyto mutace jako nepatogenní. Mutace p.Arg776Cys sice hypotéze neodpovídá – jedná se o záměnu nabitého argininu za nenabitý cystein, avšak sama Pera et al. ve svém článku upozorňuje, že v případě této mutace hraje velkou roli její pozice pouhých 5 aminokyselin před stop kodonem a ve funkční studii prokazuje její zcela minimální efekt na funkci pendrinu. Nepatogenní charakter těchto mutací podporuje i fakt, že byly (stejně jako p.Val144Ala) nalezeny ve všech případech jako monoalelické a to u pacientů s EVA/MD negativním nebo neznámým HRCT fenotypem.

Zcela v souladu s publikovanými daty pro evropskou populaci je spektrum mutací nalezených ve vyšetřovaném souboru široké, s mutacemi postihujícími celý gen (14 z 21 exonů a 2 introny), bez nálezů jedné prevalentní mutace jako je tomu například u genu *GJB2* (mutace 35delG, eventuálně p.Trp24stop v romské populaci). K diagnostice je tedy nutné provést sekvenování všech 21 exonů a přilehlých intronových oblastí.

Nalezené spektrum mutací odpovídá publikovaným údajům pro evropskou populaci. Jediná patogenní mutace typická pro evropskou populaci, která se v souboru 315 vyšetřených českých neslyšících pacientů nenachází, je p.Glu384Gly (c.1151A>G) (Blons et al., 2004; Borck et al., 2003; Campbell et al., 2001; Coyle et al., 1998; Cremers et al., 1998; Prasad et al., 2004; Pryor et al., 2005).

5.2. Frekvence mutací v souboru 303 českých neslyšících pacientů

Frekvence bialelických patogenních mutací v genu *SLC26A4* byla v souboru 303 českých neslyšících pacientů zjištěna u 2,6 % (8/303) ze všech vyšetřených pacientů. Počet pacientů, u kterých byla nalezena alespoň jedna patogenní mutace v *SLC26A4* byl však vyšší – 6,9 % (21/303) všech vyšetřených pacientů. V dosud nejrozsáhlejší studii pacientů s NSHL provedené na více než 1500 pacientech v USA (Azaiez et al., 2007) se uvádí, že sekvenováním exonů a přilehlých intronových úseků lze zřejmě zachytit pouze 60 % všech mutací v *SLC26A4* genu. Na podkladě statistických analýz a dříve publikovaných výsledků (Kimberling, 2005) rovněž vyvozují, že až u 98 % monoalelických pacientů s přítomnou EVA/MD lze předpokládat přítomnost druhé, současnými metodami nedetekovatelné, mutace a zároveň předpokládají výskyt dvou neidentifikovaných mutací až u 8 % pacientů s EVA/MD, u nichž dosud nebyla mutace nalezena. Jako mechanismus lze uvažovat mutace hluboko v intronech, v regulačních oblastech, inverze, nebo inaktivaci pomocí methylace apod.

Pacienti s bialelickými mutacemi společně s pacienty s jednou mutací a nálezem EVA/MD na HRCT jsou na základě této hypotézy některými autory společně označováni jako *SLC26A4* pozitivní pacienti (Azaiez et al., 2007).

Vzhledem k tomu, že se v původním souboru 303 neslyšících pacientů nacházel poměrně vysoký počet monoalelických pacientů ze skupiny B, jejichž radiologické nálezy nebyly k dispozici, proběhlo dodatečně u všech dostupných pacientů vyšetření vnitřního ucha pomocí HRCT. Výsledky jsou shrnuty v oddílu 4.4.3. a v tabulce 13. K původně 3 potvrzeným pacientům s monoalelickou mutací a bilaterální EVA (2795, 3831, 4950), byla nově zjištěna bilaterální EVA u dalších 3 pacientů (1255, 2275, 4776) a bilaterální MD dysplázie II. stupně u jedné pacientky (4840). Celkem je tedy ve vyšetřovaném souboru 7 pacientů s monoalelickou mutací v genu *SLC26A4* a bilaterální malformací vnitřního ucha EVA/MD, kteří nyní všichni spadají do původní skupiny A (pacienti v horní části tabulky 13). Žádný z těchto pacientů nenese žádnou z mutací, které byly dodatečně označeny za nepatogenní.

HRCT vyšetření bylo provedeno také u dalších 4 pacientů z původní skupiny B s monoalelickou mutací (1513, 1737, 3163, 4822), u kterých ukázalo nález vylučující EVA či MD. Tito pacienti tedy po přešetření patří do původní skupiny C, čímž se počet asymptomatických nosičů jedné mutace zvyšuje na 7 (pacienti v dolní části tabulky 13).

Pokud však i zde aplikujeme vyloučení potencionálně nepatogenních mutací, navrátí se počet pacientů ve skupině C opět na tři (1737, 3836 a 4954).

U 4 pacientů nebylo možné z medicínských důvodů, nebo pro přání pacienta či jeho rodičů HRCT pyramid provést. Tito pacienti tedy mohou mít EVA/MD a patřit do původní skupiny A, ale také mohou mít nález EVA/MD negativní a patřit do původní skupiny C. Vzhledem k tomu budeme nadále s těmito pacienty počítat a uvádět jejich započtení v dané skupině jako horní část rozmezí. Jediný familiární případ v této skupině nese pouze nepatogenní variantu p.Arg776Cys, nadále tedy budeme počítat pouze se třemi sporadickými pacienty v této skupině.

Pokud tedy aplikujeme všeobecně přijímanou Azaiezovu a Kimberlingovu hypotézu, že pacient s jednou patogenní mutací v genu *SLC26A4* a pozitivním nálezem na HRCT skalní kosti je s 98% pravděpodobností nosičem i druhé, současnými metodami neidentifikovatelne, mutace (Dai et al., 2008; Huang et al., 2011), počet pacientů s bialelickými mutacemi se zvýší o 7 - 10 (tj. všech 7 pacientů s jednou prokázanou mutací a EVA/MD plus event. 3 pacienti bez známého výsledku HRCT), tj. na 15 – 18 /303 (4,95 – 5,94 % ze všech vyšetřených NSHL pacientů), což odpovídá rozmezí frekvencí mutací u NSHL pacientů s vyloučenými mutacemi v *GJB2*, uváděných v dalších zahraničních studiích na rozsáhlých souborech (5,3 % (Hutchin et al., 2005), 4,7 – 6,6 % (Park et al., 2003), 8,7% (Kahrizi et al., 2009)).

Pokud takto doplněné údaje budeme dále aplikovat na rozdělení sporadických a familiárních případů, zjistíme tak, že ve skupině familiárních případů jsou *SLC26A4* pozitivní celkem 4 (14,8 %) pacienti a ve skupině sporadických případů celkem 12 až 15 (5,45–6,8 %) pacientů.

Záchyt *SLC26A4* pozitivních pacientů ve familiární skupině pak splňuje očekávání postulované na základě studie neselektovaných NSHL pacientů zachycující bialelické mutace u 14,4 % z nich (Dai et al., 2008). Žádný z pacientů s oběma mutacemi v genu *SLC26A4* však nebyl EVA/MD negativní, neselektovaný přístup ke skupině NSHL pacientů tedy není nutný, lze postupovat podle určených kritérií (viz odstavec 4.16.), bez rizika poddiagnostikování.

Diskrepanci mezi procentuálním zastoupením *SLC26A4* pozitivních pacientů ve familiární a sporadické skupině může vysvětlit fakt, že v rámci skupiny sporadických pacientů jsou zastoupeni i pacienti, u nichž je příčinou ztráty sluchu environmentální složka, která nebyla při výběru skupiny pacientů do první fáze studie zřejmá. Například inaparentní infekce matky v graviditě nebo perinatální poranění, které nebylo zaznamenáno, užití aminoglykosidových antibiotik či jiné riziko, které mohlo být opomenuto v případě neúplných

údajů poskytnutých rodinou v rámci vyplnění dotazníku pro pacienty se ztrátou sluchu event. neúplnou zdravotní dokumentací pacienta, zejména při chybějícím HRCT nálezu.

Velmi dobře definovanou skupinou pacientů s kompletní dokumentací, převážně včetně HRCT, jsou však uživatelé kochleárních implantátů. Do studie bylo zařazeno 131 uživatelů CI a alespoň jedna patogenní mutace v *SLC26A4* byla zachycena u 17 (13,0 %) z nich. Obě patogenní mutace (bialelické) byly nalezeny u 7,6 % (10/131) a jedna patogenní (monoalelická) mutace u 5,3 % (7/131) těchto pacientů. Po doplnění dat pacientů ze skupiny B, kdy jsem u dvou pacientů s CI a monoalelickou mutací zjistila bilaterální EVA/MD, a po zohlednění Kimberlingovy hypotézy, která pacienty s jednou mutací a bilaterální EVA/MD označuje také za *SLC26A4* pozitivní (viz oddíl 5.1.), zjišťujeme ve skupině uživatelů CI s již vyloučenými mutacemi v *GJB2* plných 11,5 % (15/131) *SLC26A4* pozitivních pacientů (z toho 10 pacientů s bialelickými mutacemi a 5 pacientů s monoalelickou patogenní mutací a EVA/MD na HRCT). Pouze dva pacienti (1,5 %) jsou nosiči jedné (monoalelické) patogenní mutace v genu *SLC26A4* bez přítomnosti EVA/MD. Žádný z pacientů s nezjištěným EVA/MD fenotypem není nositelem CI a žádná z mutací s dodatečně zpochybněnou patogenitou se nevyskytla u nositele CI.

V ČR byly dosud publikovány mutace ve 4 AR NSHL genech – *GJB2*, *GJB6*, *ESRRB* a *MARVELD2*. Zatímco mutace v genu *GJB2* jsou zodpovědné za až 43 % AR NSHL v ČR (Seeman 2004, 2006), mutace v genu *GJB6* jsou ve dvojité heterozygotním stavu s *GJB2* mutacemi velmi vzácnou příčinou ztráty sluchu v ČR (Seeman, 2005) a patogenní mutace v genu *ESRRB* byla nalezena dosud pouze u jedné konsangvinní české rodiny (a to mutace p.Arg291Leu v homozygotním stavu) (Šafka Brožková, 2012), žádné patogenní mutace však nebyly prokázány u dalších 39 nepřibuzných neslyšících pacientů s již vyloučenými mutacemi v *GJB2*. Mutace c.1331+2 T>C (IVS4 + 2 T>C) v genu *MARVELD2* byla nalezena v homozygotním stavu u 3 z 20 romských rodin, další mutace v tomto genu však nebyly nalezeny u žádného ze čtyřiceti neslyšících pacientů z nerómské české populace (Šafka Brožková, 2013). Mutace v genu *SLC26A4* jsou tedy stále druhou nejčastější dosud prokázanou příčinou nesyndromové AR ztráty sluchu u většinové populace ČR (žádný z pacientů s alespoň jednou prokázanou mutací v genu *SLC26A4* není rómského původu).

Po vyšetření pacientů s monoalelickými mutacemi ze skupiny B došlo nejen ke zvýšení počtu *SLC26A4* pozitivních pacientů, kterými jsem se zabývala v předchozím textu, ale také k navýšení počtu pacientů s monoalelickými mutacemi a vyloučenými EVA/MD malformacemi na HRCT, tedy původní skupina C. V původním souboru 61 pacientů s EVA/MD negativním nálezem na HRCT byli nalezeni 3 pacienti s monoalelickou mutací

(3836, 4818 a 4954), k nimž se po přešetření přidávají další 4 pacienti (1513, 1737, 3163, 4822) se stejným nálezem. U posledních 4 monoalelických pacientů ze skupiny B nebyl nálezn upřesněn, proto s nimi lze počítat v obou skupinách – A i C. V souboru 303 pacientů máme tedy 7–11 (2,3–3,6 %) pacientů s EVA/MD negativním nálezem a jednou mutací v genu *SLC26A4* z toho pouze 3-6 (1-2%) pacientů s EVA/MD negativním nálezem nese mutaci patogenní. Vzhledem k tomu, že dosud nebyl ve světové literatuře popsán ani ve vyšetřovaném souboru zjištěn nálezn EVA/MD negativního HRCT s oběma kauzálními mutacemi v genu *SLC26A4* či s přesvědčivým fenotypem PS, usuzujeme, že tito pacienti jsou pouze náhodnými přenašeči jedné patogenní alely v genu *SLC26A4*. Frekvence přenašečů jedné mutace v našem souboru neslyšících pacientů je tedy 2,3–3,6 % a nosičů prokazatelně patogenní mutace 1–2 % pacientů.

5.3. Frekvence heterozygotů pro *SLC26A4* mutace v české slyšící populaci

Heterozygotní frekvence nosičů patogenních alel *SLC26A4* genu byla stanovena nejprve empiricky Fraserem (1965) jako 0,008 tj. 0,8 % ve zdravé evropské populaci, později byla tato frekvence potvrzena populačními studii (Pera et al., 2008b). Frekvence heterozygotů – nosičů ve vyšetřovaném souboru neslyšících pacientů je tedy 2–3× vyšší. Tento fakt lze vysvětlit specifickým sociálním dopadem ztráty sluchu na chování postižených jedinců, kteří preferenčně uzavírají sňatky s dalšími stejně postiženými osobami, a typickým vzorem dědičnosti u NSHL – autosomálně recesivním. Potomci dvou neslyšících osob, u kterých je ztráta sluchu způsobena mutacemi ve dvou různých AR genech, což je nejčastější případ, budou vždy obligátními nosiči jedné patogenní alely v obou genech. Pokud se jedná o dva nezávislé lokusy na různých chromosomech, což je při extrémní genetické heterogenitě ARNSHL velmi pravděpodobné, mají 25% riziko, že obě tyto alely předají dále svým potomkům a tito mají 25% riziko pro své potomky. Vzhledem k obvyklému životu v komunitách jsou časté i sňatky mezi slyšícími dětmi neslyšících rodičů a tyto sňatky dále efekt společného dědění různých AR genů potencují. Tuto hypotézu potvrzují také nálezy monoalelických *SLC26A4* mutací u pacientů s bialelickými mutacemi v *GJB2* genu – 3,7 % (2/53) pacientů s patogenní *SLC26A4* mutací (p.Leu597Stop a p.Thr99Met) a 7,5 % (4/53) pacientů s odchylkou od sekvence genu *SLC26A4* (Propst et al., 2006), resp. 1,5 % (4/264) v jiné studii (Usami et al., 2012), nálezy pacientů s bialelickými mutacemi v obou genech (Chen et al., 2012)(Chen, 2012) i vlastní pozorování, kdy 2,6 % pacientů nese odchylky v obou genech *SLC26A4* i *GJB2* (z toho 0,6% alespoň jednu patogenní) a 3 nepříbuzní,

neendogamní neslyšící pacienti jsou nosiči dvou stejných variant v obou genech (p.Gly6Val v genu *SLC26A4* a mutace p.Arg127His v genu *GJB2*).

Alespoň o části monoalelických pacientů bez EVA/MD je tedy důvodné se domnívat, že příčinou jejich ztráty sluchu jsou mutace v jiném AR-NSHL genu a dále u nich pátrat po genetické příčině ztráty sluchu, například pomocí WES.

5.4. Korelace genotyp fenotyp

U všech pacientů s bialelickými mutacemi, kde bylo provedeno HRCT, byly nalezeny malformace vnitřního ucha – EVA nebo MD. Nebyl prokázán žádný pacient s bialelickými mutacemi a EVA/MD negativním HRCT, stejně jako ve světové literatuře (Maciaszczyk and Lewiński, 2008; Naganawa et al., 2004). Hypotéza, že by mohlo docházet k poddiagnostikování *SLC26A4* pozitivních pacientů z důvodu nepřítomnosti EVA, se tedy nepotvrdila.

Nebyla jasně prokázána ani korelace mezi typem mutace a EVA/MD fenotypem. Zejména je tento fakt zřejmý z intrafamiliární variability (kapitola 4.15.5.), kdy například u pacientky 4840 byla prokázána bilaterální EVA a MD II. typu (s apikální cystickou dysplázií), ale u jejího bratra byla potvrzena pouze bilaterální EVA.

Typ mutace však v našem souboru naznačoval korelaci s tyroidálním fenotypem. U všech tří postpubertálních pacientů s kombinací mutace zkracující délku pendrinu a missense mutace dominoval tyroidální fenotyp, který byl důvodem zařazení do studie. Avšak u dalších tří pacientů s touto kombinací mutací nebylo vzhledem k jejich věku definovat tyroidální fenotyp. Zatímco v naší studii nebyl prokázán žádný pacient s kombinací dvou mutací zkracujících délku pendrinu, druhá česká studie (Banghova et al., 2008a), zaměřující se na detekci *SLC26A4* mutací u pacientů s kongenitální hypotyreózou, u jedné pacientky tuto kombinaci mutací prokázala. Tato studie zjistila, mutace v genu *SLC26A4* jsou vzácnou příčinou congenitální hypotyreózy a našla bialelické mutace u dvou pacientů ze 197 (1%). U první pacientky a její stejně postižené sestry, u kterých se ztráta sluchu manifestovala v předškolním věku, se jedná o kombinaci splice site mutace c.2089+1 G>A a mutace c.3 G>C interferující se startkodonem, avšak u druhého pacienta s těžkou kongenitální ztrátou sluchu se jednalo o kombinaci dvou missense mutací. Ani z této studie tedy neplyne jednoznačná korelace tyroidálního fenotypu s typem mutace. Žádný z našich pacientů netrpěl závažnou kongenitální hypotyreózou, pouze jedna pacientka (1928), nesoucí kombinaci dvou missense mutací, měla pozitivní novorozenecký screening kongenitální hypotyreózy, avšak

při kontrolním vyšetření byla její štítná žláza v pořádku, stav byl endokrinologem uzavřen jako transientní neonatální hypothyreóza (viz tabulka 11).

V literatuře bylo opakovaně poukazováno na korelaci mezi počtem mutací a tyreoidálním fenotypem – častěji byly nacházeny dvě mutace u pacientů s PS a jedna mutace u pacientů s NSEVA/DFNB4 (Azaiez et al., 2007; Pryor et al., 2005). Vzhledem k věku pacientů s detekovanými mutacemi (1-55 let, průměr 16,5 roku, medián 9 let) nelze na vyšetřeném souboru tuto domněnku spolehlivě vyvrátit. Avšak data pacientů starších 12 let – 3 pacienti s oběma mutacemi a 9 pacientů s jednou identifikovanou mutací a nevyločenou EVA/MD – pro tuto korelaci nnesvědčí, neboť u všech jedinců s oběma mutacemi a u všech pacientů s jednou potvrzenou mutací a EVA/MD byla prokázána struma či jiná porucha štítné žlázy. Tento nález svědčí spíše pro dřívější hypotézu, že jednotka NSEVA/DFNB4 je pouze neúplně vyjádřeným fenotypem PS, který se po dosažení určitého věku objeví u všech pacientů (Reardon et al., 2000).

5.5. Klinické dopady studie

Zjištěná frekvence mutací v genu *SLC26A4* v české neslyšící populaci s již vyloučenými mutacemi v *GJB2*, zejména v populaci nosičů CI a pacientů s familiárním výskytem AR-NSHL je důvodem k zařazení vyšetření těchto mutací do schématu genetického vyšetření pacientů s vrozenou hluchotou. Běžná praxe dosud obnášela pouze rutinní testování genu *GJB2* u všech pacientů s vrozenou hluchotou, další molekulárně genetická vyšetření však nebyla k dispozici. Na základě této studie bylo zavedeno do praxe vyšetření druhého nejčastějšího genu a stanovena jasná klinická kritéria pro efektivní výběr pacientů k vyšetření *SLC26A4* genu, které je mnohem náročnější než vyšetření malého *GJB2* genu s prevalentní mutací c.35delG (viz odstavec 4.16.).

Kromě testování pacientů splňujících stanovená kritéria, u kterých je indikováno sekvenování celého genu *SLC26A4*, byla zavedena i haplotypová analýza pro pacienty s familiárním výskytem AR-NSHL bez známého HRCT fenotypu. Vyšetření haplotypů je s výhodou zejména u pacientů předškolního věku, kde jednak radiační zátěž a jednak nutnost celkové anestezie je pro pacienty, u kterých se nezvažuje z různých důvodů zavedení CI, neadekvátní zátěží. Touto nenáročnou metodou lze zjistit, zda jsou dva sluchově postižení sourozenci kandidáty na sekvenování genu *SLC26A4* či ne pomocí vyloučení diskordantních dvojic.

Důležitým klinickým přínosem je zejména zjištění *SLC26A4* mutací u pacientů před rozvinutím tyreoidálních příznaků, tedy v prepubertální věku. U pacientů se sporadickým

výskytem poruchy sluchu je vhodné provedení HRCT v časném školním věku, kdy už k tomuto vyšetření není nutná celková anestezie, aby analýza *SLC26A4* genu mohla proběhnout do věku 8 let, kdy začíná hrozit manifestace poruchy štítné žlázy u pozitivních pacientů. U pozitivních pak může být zavedena preventivní dispenzární péče, pravidelné kontroly hladiny tyreoidálních hormonů a USG štítné žlázy prostřednictvím praktického lékaře. V případě prvních známek postižení štítné žlázy je pacient předán do péče dětského endokrinologa, který včasnou substituční léčbou zamezí vzniku strumy a nutnosti tyroidektomie v dospělosti. Pravidelná USG vyšetření štítné žlázy mohou zároveň včas zachytit možnou malignizaci ve štítné žláze a umožnit včasnou terapii před rozvojem závažného disseminovaného onemocnění.

6. Závěr

Tato studie zjistila frekvenci a spektrum mutací v genu *SLC26A4* v české populaci a objasnila příčinu ztráty sluchu u další části českých neslyšících pacientů. Na základě jejích výsledků byla zahájena preventivní dispenzarizační péče o pacienty s rizikem rozvoje poruchy štítné žlázy v rámci Pendredova syndromu. Většina relevantních výsledků tohoto projektu je shrnuta v publikaci v *Annals of Human Genetics* (Pourová et al., 2010). Další část projektu byla zaměřena zejména na zavedení diagnostiky genu *SLC26A4* do praxe. Na základě výsledků projektu bylo vyšetření genu *SLC26A4* zahrnuto do návrhu metodického pokynu MZČR k provádění screeningu sluchu u novorozenců. Vyšetření je nyní k dispozici v laboratoři ÚBLG 2. LF UK a FN Motol k diagnostickým účelům a díky opakované prezentaci na domácím i mezinárodním poli je s tímto faktem seznámena široká profesionální a částečně i laická veřejnost. Byla zahájena spolupráci s Centry rané péče a neziskovými organizacemi zabývajícími se péčí o sluchově postižené, které o této možnosti informují přímo rodiče postižených dětí a rodiny jsou pak odesílány ke genetické konzultaci na naše pracoviště, kde jsou pacienti splňující diagnostická kritéria (včetně vyloučení vrozené ztráty sluchu způsobené mutacemi v genu *GJB2* a event. dalších zjevných příčin) indikováni k vyšetření genu *SLC26A4*. Neslyšící sourozenci nesplňující uvedená diagnostická kritéria jsou vyšetřeni pomocí haplotypové analýzy a dle výsledků zařazeni k dalšímu vyšetřování *SLC26A4*. Pacienti s prokázanými mutacemi v genu *SLC26A4* (bialelickými nebo monoalelickou mutací za přítomnosti EVA/MD) jsou dispenzarizováni v genetické ambulanci a pravidelně vyšetřováni dle stanoveného algoritmu, aby se u nich předešlo rozvoji strumy.

7. Souhrn

Pomocí sekvenace genu *SLC26A4* bylo vyšetřeno 315 neslyšících pacientů s vyloučenými bialelickými mutacemi v *GJB2* genu, z toho 30 familiárních a 285 sporadických případů. Alespoň jedna patogenní mutace genu *SLC26A4* byla zjištěna u 6,9 % pacientů a bialelické patogenní mutace u 2,6 %, u familiárních případů to však bylo již 14,8 % pacientů s alespoň jednou mutací, resp. 7,4 % pacientů s oběma identifikovanými mutacemi. Ve skupině nositelů CI s vyloučenými mutacemi v *GJB2* byla alespoň jedna patogenní mutace nalezena u 13,0 %, a bialelické mutace u 7,6%. Mutace v genu *SLC26A4* jsou tedy zřejmě druhou nejčastější známou příčinou AR-NSHL v české populaci.

Bylo nalezeno 25 různých variant na 45 alelách, z nichž prokazatelně patogenní je 20 mutací na 40 alelách. Prevalentní mutace genu *SLC26A4* se v české populaci nevyskytuje, nejčastější mutací je p.Val138Phe (17,5 %), a dále p.Leu445Trp a p.Glu29Gln (10 % každá), spektrum mutací je široké a mutace postihují celý gen *SLC26A4* (14 z 21 exonů a 2 introny), z čehož plyne nutnost sekvenace celého genu.

Byla stanovena klinická kritéria pro výběr pacientů k vyšetření genu *SLC26A4*. Jako nejspolehlivější diagnostické kritérium se ukázaly bilaterální EVA (záchyt 72,2 % pro aspoň 1 mutaci a 50 % pro obě mutace) a plně rozvinutý tyroidální fenotyp (53,4 % resp. 33,3 %).

Vzhledem k vysokému podílu *SLC26A4* mutací u familiárních pacientů byla zavedena haplotypová analýza k vyšetření sourozenců, na kterou bude v případě shody STR markerů v lokusu DFNB4 u obou sourozenců navazovat sekvenační analýza genu *SLC26A4*.

Na základě mojí studie byla zavedena rutinní diagnostika druhé nejčastější příčiny vrozené nesyndromové ztrátu sluchu a nastaven algoritmus pro dispenzarizaci pacientů s *SLC26A4* mutacemi.

8. Summary

Sequencing of *SLC26A4* gene was used to examine 315 patients with NSHL where biallelic mutations in *GJB2* gene were dismissed, out of that 30 familiar and 285 sporadic cases. At least one pathogenic mutation in *SLC26A4* gene was found in 6.9% patients and biallelic pathogenic mutations in 2.6% patients, however for familial cases it was 14.8% patients with at least one mutation, or 7.4% patients with both identified mutations. In the group of cochlear implant users with no *GJB2* mutations at least one pathogenic mutation was found in 13.0% and biallelic mutation in 7.6%. The *SLC26A4* mutations appear to represent the second most common cause of HHL in the population of the Czech Republic.

There were identified 20 pathogenic mutations in 40 alleles. There is no prevalent mutation of gene *SLC26A4* in the Czech population, the most frequent mutation is p.Val138Phe (17.5%), the others are p.Leu445Trp and p.Glu29Gln (10% each), the spectrum of mutations is broad a dispersed throughout the whole *SLC26A4* gene (14 out of 21 exons and 2 introns), which means that sequencing needs to cover the whole gene.

The most reliable diagnostic criterion appears to be bilateral EVA (72.2 % for at least 1 mutation and 50% for both) and fully developed thyroidal phenotype (53.4 % or 33.3 %).

Due to the elevated ratio of *SLC26A4* mutations in familial patients haplotypical analysis was introduced to examine siblings. Sequencing analysis of gene *SLC26A4* will follow, if there is a concord of STR markers in the *DFNB4* locus of both siblings.

As a result of my study there was introduced routine diagnostics of the second most common cause of congenital non-syndromic hearing loss and there was set an algorithm for dispensarization of patients with *SLC26A4* mutations.

9. Použitá literatura

- ...::: The Connexin-deafness homepage :::... [WWW Document], n.d. URL <http://davinci.crg.es/deafness/> (accessed 4.24.14).
- Abdelhak, S., Kalatzis, V., Heilig, R., Compain, S., Samson, D., Vincent, C., Weil, D., Cruaud, C., Sahly, I., Leibovici, M., Bitner-Glindzicz, M., Francis, M., Lacombe, D., Vigneron, J., Charachon, R., Boven, K., Bedbeder, P., Van Regemorter, N., Weissenbach, J., Petit, C., 1997. A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat. Genet.* 15, 157–164. doi:10.1038/ng0297-157
- Acke, F.R.E., Dhooge, I.J.M., Malfait, F., De Leenheer, E.M.R., 2012. Hearing impairment in Stickler syndrome: a systematic review. *Orphanet J. Rare Dis.* 7, 84. doi:10.1186/1750-1172-7-84
- Adato, A., Raskin, L., Petit, C., Bonne-Tamir, B., 2000. Deafness heterogeneity in a Druze isolate from the Middle East: novel OTOF and PDS mutations, low prevalence of GJB2 35delG mutation and indication for a new DFNB locus. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 8, 437–442. doi:10.1038/sj.ejhg.5200489
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249. doi:10.1038/nmeth0410-248
- Ahmad, N.N., Ala-Kokko, L., Knowlton, R.G., Jimenez, S.A., Weaver, E.J., Maguire, J.I., Tasman, W., Prockop, D.J., 1991. Stop codon in the procollagen II gene (COL2A1) in a family with the Stickler syndrome (arthro-ophthalmopathy). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 6624–6627.
- Ahmed, Z.M., Li, X.C., Powell, S.D., Riazuddin, S., Young, T.-L., Ramzan, K., Ahmad, Z., Luscombe, S., Dhillon, K., MacLaren, L., Ploplis, B., Shotland, L.I., Ives, E., Riazuddin, S., Friedman, T.B., Morell, R.J., Wilcox, E.R., 2004. Characterization of a new full length TMPRSS3 isoform and identification of mutant alleles responsible for nonsyndromic recessive deafness in Newfoundland and Pakistan. *BMC Med. Genet.* 5, 24. doi:10.1186/1471-2350-5-24
- Ahmed, Z.M., Riazuddin, S., Aye, S., Ali, R.A., Venselaar, H., Anwar, S., Belyantseva, P.P., Qasim, M., Riazuddin, S., Friedman, T.B., 2008. Gene structure and mutant alleles of PCDH15: nonsyndromic deafness DFNB23 and type 1 Usher syndrome. *Hum. Genet.* 124, 215–223. doi:10.1007/s00439-008-0543-3
- Al Taji, E., Biebermann, H., Límanová, Z., Hníková, O., Zikmund, J., Dame, C., Grüters, A., Lebl, J., Krude, H., 2007. Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 156, 521–529. doi:10.1530/EJE-06-0709
- Albert, S., Blons, H., Jonard, L., Feldmann, D., Chauvin, P., Loundon, N., Sergent-Allaoui, A., Houang, M., Joannard, A., Schmerber, S., Delobel, B., Leman, J., Journal, H., Catros, H., Dollfus, H., Eliot, M.-M., David, A., Calais, C., Drouin-Garraud, V., Obstoy, M.-F., Tran Ba Huy, P., Lacombe, D., Duriez, F., Francannet, C., Bitoun, P., Petit, C., Garabédian, E.-N., Couderc, R., Marlin, S., Denoyelle, F., 2006. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 14, 773–779. doi:10.1038/sj.ejhg.5201611
- Alport, A.C., 1927. Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Br. Med. J.* 1, 504–506.
- Ansar, M., Din, M.A. ud, Arshad, M., Sohail, M., Faiyaz-Ul-Haque, M., Haque, S., Ahmad,

- W., Leal, S.M., 2003. A novel autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB35) maps to 14q24.1-14q24.3 in large consanguineous kindred from Pakistan. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 11, 77–80. doi:10.1038/sj.ejhg.5200905
- Antonelli, P.J., Varela, A.E., Mancuso, A.A., 1999. Diagnostic yield of high-resolution computed tomography for pediatric sensorineural hearing loss. *The Laryngoscope* 109, 1642–1647. doi:10.1097/00005537-199910000-00018
- Arcand, P., Desrosiers, M., Dubé, J., Abela, A., 1991. The large vestibular aqueduct syndrome and sensorineural hearing loss in the pediatric population. *J. Otolaryngol.* 20, 247–250.
- Arrondel, C., Vodovar, N., Knebelmann, B., Grünfeld, J.-P., Gubler, M.-C., Antignac, C., Heidet, L., 2002. Expression of the nonmuscle myosin heavy chain IIA in the human kidney and screening for MYH9 mutations in Epstein and Fechtner syndromes. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 13, 65–74.
- Asthagiri, A.R., Parry, D.M., Butman, J.A., Kim, H.J., Tsilou, E.T., Zhuang, Z., Lonser, R.R., 2009. Neurofibromatosis type 2. *Lancet* 373, 1974–1986. doi:10.1016/S0140-6736(09)60259-2
- Astl, J., Štolbová, D., Skřivan, J., Holcát, M., 1996. Struma spojená s nedoslýchavostí 45, 31–34.
- Astl, J., Veselý, David, Jablonický, Pavol, 2004. Pendredův syndrom - poznámky k problematice vrozené autosomálně recesivní nedoslýchavosti spojené se strumou 53, 55–59.
- Azaiez, H., Yang, T., Prasad, S., Sorensen, J.L., Nishimura, C.J., Kimberling, W.J., Smith, R.J.H., 2007. Genotype-phenotype correlations for SLC26A4-related deafness. *Hum. Genet.* 122, 451–457. doi:10.1007/s00439-007-0415-2
- Baek, J.-I., Oh, S.-K., Kim, D.-B., Choi, S.-Y., Kim, U.-K., Lee, K.-Y., Lee, S.-H., 2012. Targeted massive parallel sequencing: the effective detection of novel causative mutations associated with hearing loss in small families. *Orphanet J. Rare Dis.* 7, 60. doi:10.1186/1750-1172-7-60
- Balciuniene, J., Dahl, N., Borg, E., Samuelsson, E., Koisti, M.J., Pettersson, U., Jazin, E.E., 1998. Evidence for digenic inheritance of nonsyndromic hereditary hearing loss in a Swedish family. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 786–793. doi:10.1086/302012
- Baldwin, C.T., Weiss, S., Farrer, L.A., De Stefano, A.L., Adair, R., Franklyn, B., Kidd, K.K., Korostishevsky, M., Bonné-Tamir, B., 1995. Linkage of congenital, recessive deafness (DFNB4) to chromosome 7q31 and evidence for genetic heterogeneity in the Middle Eastern Druze population. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1637–1642.
- Ballana, E., Mercader, J.M., Fischel-Ghodsian, N., Estivill, X., 2007. MRPS18CP2 alleles and DEFA3 absence as putative chromosome 8p23.1 modifiers of hearing loss due to mtDNA mutation A1555G in the 12S rRNA gene. *BMC Med. Genet.* 8, 81. doi:10.1186/1471-2350-8-81
- Ballinger, S.W., Shoffner, J.M., Hedaya, E.V., Trounce, I., Polak, M.A., Koontz, D.A., Wallace, D.C., 1992. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat. Genet.* 1, 11–15. doi:10.1038/ng0492-11
- Banghova, K., Al Taji, E., Cinek, O., Novotna, D., Pourova, R., Zapletalova, J., Hnikova, O., Lebl, J., 2008a. Pendred syndrome among patients with congenital hypothyroidism detected by neonatal screening: identification of two novel PDS/SLC26A4 mutations. *Eur. J. Pediatr.* 167, 777–783. doi:10.1007/s00431-007-0588-7
- Banghova, K., Cinek, O., Al Taji, E., Zapletalova, J., Vidura, R., Lebl, J., 2008b. Thyroidectomy in a patient with multinodular dysmorphogenetic goitre--a case of Pendred syndrome confirmed by mutations in the PDS/SLC26A4 gene. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* 21, 1179–1184.

- Becirovic, E., Ebermann, I., Nagy, D., Zrenner, E., Seeliger, M.W., Bolz, H.J., 2008. Usher syndrome type 1 due to missense mutations on both CDH23 alleles: investigation of mRNA splicing. *Hum. Mutat.* 29, 452. doi:10.1002/humu.9526
- Belguith, H., Aifa-Hmani, M., Dhoub, H., Said, M.B., Mosrati, M.A., Lahmar, I., Moalla, J., Charfeddine, I., Driss, N., Arab, S.B., Ghorbel, A., Ayadi, H., Masmoudi, S., 2009. Screening of the DFNB3 locus: identification of three novel mutations of MYO15A associated with hearing loss and further suggestion for two distinctive genes on this locus. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 13, 147–151. doi:10.1089/gtmb.2008.0077
- Ben Said, M., Ayedi, L., Mnejja, M., Hakim, B., Khalfallah, A., Charfeddine, I., Khifagi, C., Turki, K., Ayadi, H., Benzina, Z., Ghorbel, A., Castillo, I.D., Masmoudi, S., Aifa, M.H., 2011. A novel missense mutation in the ESRRB gene causes DFNB35 hearing loss in a Tunisian family. *Eur. J. Med. Genet.* 54, e535–541. doi:10.1016/j.ejmg.2011.06.008
- Bespalova, I.N., Van Camp, G., Bom, S.J., Brown, D.J., Cryns, K., DeWan, A.T., Erson, A.E., Flothmann, K., Kunst, H.P., Kurnool, P., Sivakumaran, T.A., Cremers, C.W., Leal, S.M., Burmeister, M., Lesperance, M.M., 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.
- Bischoff, A.M.L.C., Luijendijk, M.W.J., Huygen, P.L.M., van Duijnhoven, G., De Leenheer, E.M.R., Oudsluijs, G.G., Van Laer, L., Cremers, F.P.M., Cremers, C.W.R.J., Kremer, H., 2004. A novel mutation identified in the DFNA5 gene in a Dutch family: a clinical and genetic evaluation. *Audiol. Neurootol.* 9, 34–46. doi:10.1159/000074185
- Bitner-Glindzicz, M., Pembrey, M., Duncan, A., Heron, J., Ring, S.M., Hall, A., Rahman, S., 2009. Prevalence of mitochondrial 1555A-->G mutation in European children. *N. Engl. J. Med.* 360, 640–642. doi:10.1056/NEJMc0806396
- Bitner-Glindzicz, M., Turnpenny, P., Höglund, P., Kääriäinen, H., Sankila, E.M., van der Maarel, S.M., de Kok, Y.J., Ropers, H.H., Cremers, F.P., Pembrey, M., 1995. Further mutations in Brain 4 (POU3F4) clarify the phenotype in the X-linked deafness, DFNB3. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1467–1469.
- Blank, C.E., 1960. Apert's syndrome (a type of acrocephalosyndactyly)-observations on a British series of thirty-nine cases. *Ann. Hum. Genet.* 24, 151–164.
- Blons, H., Feldmann, D., Duval, V., Messaz, O., Denoyelle, F., Loundon, N., Sergout-Allaoui, A., Houang, M., Duriez, F., Lacombe, D., Delobel, B., Leman, J., Catros, H., Journal, H., Drouin-Garraud, V., Obstoy, M.-F., Toutain, A., Oden, S., Toublanc, J.E., Couderc, R., Petit, C., Garabédian, E.-N., Marlin, S., 2004. Screening of SLC26A4 (PDS) gene in Pendred's syndrome: a large spectrum of mutations in France and phenotypic heterogeneity. *Clin. Genet.* 66, 333–340. doi:10.1111/j.1399-0004.2004.00296.x
- Bogazzi, F., Russo, D., Raggi, F., Ultimieri, F., Berrettini, S., Forli, F., Grasso, L., Ceccarelli, C., Mariotti, S., Pinchera, A., Bartalena, L., Martino, E., 2004. Mutations in the SLC26A4 (pendrin) gene in patients with sensorineural deafness and enlarged vestibular aqueduct. *J. Endocrinol. Invest.* 27, 430–435.
- Bonné-Tamir, B., DeStefano, A.L., Briggs, C.E., Adair, R., Franklyn, B., Weiss, S., Korostishevsky, M., Frydman, M., Baldwin, C.T., Farrer, L.A., 1996. Linkage of congenital recessive deafness (gene DFNB10) to chromosome 21q22.3. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 1254–1259.
- Borck, G., Roth, C., Martiné, U., Wildhardt, G., Pohlenz, J., 2003. Mutations in the PDS gene in German families with Pendred's syndrome: V138F is a founder mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2916–2921. doi:10.1210/jc.2002-021334
- Bork, J.M., Morell, R.J., Khan, S., Riazuddin, S., Wilcox, E.R., Friedman, T.B., Griffith, A.J.,

2002. Clinical presentation of DFNB12 and Usher syndrome type 1D. *Adv. Otorhinolaryngol.* 61, 145–152.
- Bork, J.M., Peters, L.M., Riazuddin, S., Bernstein, S.L., Ahmed, Z.M., Ness, S.L., Polomeno, R., Ramesh, A., Schloss, M., Srisailpathy, C.R., Wayne, S., Bellman, S., Desmukh, D., Ahmed, Z., Khan, S.N., Kaloustian, V.M., Li, X.C., Lalwani, A., Riazuddin, S., Bitner-Glindzicz, M., Nance, W.E., Liu, X.Z., Wistow, G., Smith, R.J., Griffith, A.J., Wilcox, E.R., Friedman, T.B., Morell, R.J., 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. doi:10.1086/316954
- Boughman, J.A., Vernon, M., Shaver, K.A., 1983. Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *J. Chronic Dis.* 36, 595–603.
- Brown, M.R., Tomek, M.S., Van Laer, L., Smith, S., Kenyon, J.B., Van Camp, G., Smith, R.J., 1997. A novel locus for autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, DFNA13, maps to chromosome 6p. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 924–927. doi:10.1086/514892
- Brunham, L.R., Singaraja, R.R., Pape, T.D., Kejariwal, A., Thomas, P.D., Hayden, M.R., 2005. Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene. *PLoS Genet.* 1, e83. doi:10.1371/journal.pgen.0010083
- Brunner, H.G., van Beersum, S.E., Warman, M.L., Olsen, B.R., Ropers, H.H., Mariman, E.C., 1994. A Stickler syndrome gene is linked to chromosome 6 near the COL11A2 gene. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1561–1564.
- Caksen, H., Kurtoglu, S., Yüksel, S., Ciftçi, A., Kendirci, M., 2001. Do not overlook Pendred's syndrome in children with sensorineural hearing loss. *Ear. Nose. Throat J.* 80, 760.
- Campbell, C., Cucci, R.A., Prasad, S., Green, G.E., Edeal, J.B., Galer, C.E., Karniski, L.P., Sheffield, V.C., Smith, R.J., 2001. Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations. *Hum. Mutat.* 17, 403–411. doi:10.1002/humu.1116
- Cengiz, F.B., Duman, D., Sirmaci, A., Tokgöz-Yilmaz, S., Erbek, S., Oztürkmen-Akay, H., Incesulu, A., Edwards, Y.J.K., Ozdag, H., Liu, X.Z., Tekin, M., 2010. Recurrent and private MYO15A mutations are associated with deafness in the Turkish population. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 14, 543–550. doi:10.1089/gtmb.2010.0039
- Chaïb, H., Lina-Granade, G., Guilford, P., Plauchu, H., Levilliers, J., Morgon, A., Petit, C., 1994. A gene responsible for a dominant form of neurosensory non-syndromic deafness maps to the NSRD1 recessive deafness gene interval. *Hum. Mol. Genet.* 3, 2219–2222.
- Chaïb, H., Place, C., Salem, N., Chardenoux, S., Vincent, C., Weissenbach, J., El-Zir, E., Loiselet, J., Petit, C., 1996. A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22-23. *Hum. Mol. Genet.* 5, 155–158.
- Chaib, H., Place, C., Salem, N., Dodé, C., Chardenoux, S., Weissenbach, J., el Zir, E., Loiselet, J., Petit, C., 1996. Mapping of DFNB12, a gene for a non-syndromal autosomal recessive deafness, to chromosome 10q21-22. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1061–1064.
- Charif, M., Bounaceur, S., Abidi, O., Nahili, H., Rouba, H., Kandil, M., Boulouiz, R., Barakat, A., 2012. The c.242G>A mutation in LRTOMT gene is responsible for a high prevalence of deafness in the Moroccan population. *Mol. Biol. Rep.* 39, 11011–11016. doi:10.1007/s11033-012-2003-3
- Chen, A.H., Ni, L., Fukushima, K., Marietta, J., O'Neill, M., Coucke, P., Willems, P., Smith,

- R.J., 1995. Linkage of a gene for dominant non-syndromic deafness to chromosome 19. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1073–1076.
- Chen, K., Wang, X., Sun, L., Jiang, H., 2012. Screening of SLC26A4, FOXI1, KCNJ10, and GJB2 in bilateral deafness patients with inner ear malformation. *Otolaryngol.-Head Neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol.-Head Neck Surg.* 146, 972–978. doi:10.1177/0194599812439670
- Chen, W., Kahrizi, K., Meyer, N.C., Riazalhosseini, Y., Van Camp, G., Najmabadi, H., Smith, R.J.H., 2005. Mutation of COL11A2 causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss at the DFNB53 locus. *J. Med. Genet.* 42, e61. doi:10.1136/jmg.2005.032615
- Chen, Y., Tudi, M., Sun, J., He, C., Lu, H.-L., Shang, Q., Jiang, D., Kuyaxi, P., Hu, B., Zhang, H., 2011. Genetic mutations in non-syndromic deafness patients of Uyghur and Han Chinese ethnicities in Xinjiang, China: a comparative study. *J. Transl. Med.* 9, 154. doi:10.1186/1479-5876-9-154
- Choi, B.-O., Kang, S.H., Hyun, Y.S., Kanwal, S., Park, S.W., Koo, H., Kim, S.-B., Choi, Y.-C., Yoo, J.H., Kim, J.-W., Park, K.D., Choi, K.-G., Kim, S.J., Züchner, S., Chung, K.W., 2011. A complex phenotype of peripheral neuropathy, myopathy, hoarseness, and hearing loss is linked to an autosomal dominant mutation in MYH14. *Hum. Mutat.* 32, 669–677. doi:10.1002/humu.21488
- Choi, B.Y., Stewart, A.K., Madeo, A.C., Pryor, S.P., Lenhard, S., Kittles, R., Eisenman, D., Kim, H.J., Niparko, J., Thomsen, J., Arnos, K.S., Nance, W.E., King, K.A., Zalewski, C.K., Brewer, C.C., Shawker, T., Reynolds, J.C., Butman, J.A., Karniski, L.P., Alper, S.L., Griffith, A.J., 2009. Hypo-functional SLC26A4 variants associated with nonsyndromic hearing loss and enlargement of the vestibular aqueduct: genotype-phenotype correlation or coincidental polymorphisms? *Hum. Mutat.* 30, 599–608. doi:10.1002/humu.20884
- Cohen, M.M., Jr, Kreiborg, S., Lammer, E.J., Cordero, J.F., Mastroiacovo, P., Erickson, J.D., Roeper, P., Martínez-Frías, M.L., 1992. Birth prevalence study of the Apert syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 42, 655–659. doi:10.1002/ajmg.1320420505
- Collin, R.W.J., Chellappa, R., Pauw, R.-J., Vriend, G., Oostrik, J., van Drunen, W., Huygen, P.L., Admiraal, R., Hoefsloot, L.H., Cremers, F.P.M., Xiang, M., Cremers, C.W.R.J., Kremer, H., 2008a. Missense mutations in POU4F3 cause autosomal dominant hearing impairment DFNA15 and affect subcellular localization and DNA binding. *Hum. Mutat.* 29, 545–554. doi:10.1002/humu.20693
- Collin, R.W.J., Kalay, E., Tariq, M., Peters, T., van der Zwaag, B., Venselaar, H., Oostrik, J., Lee, K., Ahmed, Z.M., Caylan, R., Li, Y., Spierenburg, H.A., Eyupoglu, E., Heister, A., Riazuddin, S., Bahat, E., Ansar, M., Arslan, S., Wollnik, B., Brunner, H.G., Cremers, C.W.R.J., Karaguzel, A., Ahmad, W., Cremers, F.P.M., Vriend, G., Friedman, T.B., Riazuddin, S., Leal, S.M., Kremer, H., 2008b. Mutations of ESRRB encoding estrogen-related receptor beta cause autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB35. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 125–138. doi:10.1016/j.ajhg.2007.09.008
- Colvin, I.B., Beale, T., Harrop-Griffiths, K., 2006. Long-term follow-up of hearing loss in children and young adults with enlarged vestibular aqueducts: relationship to radiologic findings and Pendred syndrome diagnosis. *The Laryngoscope* 116, 2027–2036. doi:10.1097/01.mlg.0000240908.88759.fe
- Cooper, G.M., Stone, E.A., Asimenos, G., NISC Comparative Sequencing Program, Green, E.D., Batzoglou, S., Sidow, A., 2005. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res.* 15, 901–913. doi:10.1101/gr.3577405
- Corsten-Janssen, N., Saitta, S.C., Hoefsloot, L.H., McDonald-McGinn, D.M., Driscoll, D.A.,

- Derks, R., Dickinson, K.A., Kerstjens-Frederikse, W.S., Emanuel, B.S., Zackai, E.H., van Ravenswaaij-Arts, C.M.A., 2013. More Clinical Overlap between 22q11.2 Deletion Syndrome and CHARGE Syndrome than Often Anticipated. *Mol. Syndromol.* 4, 235–245. doi:10.1159/000351127
- Coucke, P., Van Camp, G., Djoyodiharjo, B., Smith, S.D., Frants, R.R., Padberg, G.W., Darby, J.K., Huizing, E.H., Cremers, C.W., Kimberling, W.J., 1994. Linkage of autosomal dominant hearing loss to the short arm of chromosome 1 in two families. *N. Engl. J. Med.* 331, 425–431. doi:10.1056/NEJM199408183310702
- Coucke, P.J., Van Hauwe, P., Kelley, P.M., Kunst, H., Schatteman, I., Van Velzen, D., Meyers, J., Ensink, R.J., Verstreken, M., Declau, F., Marres, H., Kastury, K., Bhasin, S., McGuirt, W.T., Smith, R.J., Cremers, C.W., Van de Heyning, P., Willems, P.J., Smith, S.D., Van Camp, G., 1999. Mutations in the KCNQ4 gene are responsible for autosomal dominant deafness in four DFNA2 families. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1321–1328.
- Coyle, B., Reardon, W., Herbrick, J.A., Tsui, L.C., Gausden, E., Lee, J., Coffey, R., Grueters, A., Grossman, A., Phelps, P.D., Luxon, L., Kendall-Taylor, P., Scherer, S.W., Trembath, R.C., 1998. Molecular analysis of the PDS gene in Pendred syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1105–1112.
- Cremers, C.W., Admiraal, R.J., Huygen, P.L., Bolder, C., Everett, L.A., Joosten, F.B., Green, E.D., van Camp, G., Otten, B.J., 1998. Progressive hearing loss, hypoplasia of the cochlea and widened vestibular aqueducts are very common features in Pendred's syndrome. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 45, 113–123.
- Cremers, C.W., Hombergen, G.C., Wentges, R.T., 1983. Perilymphatic gusher and stapes surgery. A predictable complication? *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 8, 235–240.
- Cross, N.C., Stephens, S.D., Francis, M., Hourihan, M.D., Reardon, W., 1999. Computed tomography evaluation of the inner ear as a diagnostic, counselling and management strategy in patients with congenital sensorineural hearing impairment. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 24, 235–238.
- Cryns, K., Sivakumaran, T.A., Van den Ouweland, J.M.W., Pennings, R.J.E., Cremers, C.W.R.J., Flothmann, K., Young, T.-L., Smith, R.J.H., Lesperance, M.M., Van Camp, G., 2003. Mutational spectrum of the WFS1 gene in Wolfram syndrome, nonsyndromic hearing impairment, diabetes mellitus, and psychiatric disease. *Hum. Mutat.* 22, 275–287. doi:10.1002/humu.10258
- Dai, P., Yuan, Y., Huang, D., Zhu, X., Yu, F., Kang, D., Yuan, H., Wu, B., Han, D., Wong, L.-J.C., 2008. Molecular etiology of hearing impairment in Inner Mongolia: mutations in SLC26A4 gene and relevant phenotype analysis. *J. Transl. Med.* 6, 74. doi:10.1186/1479-5876-6-74
- De Brouwer, A.P., Duley, J.A., Christodoulou, J., 1993. Arts Syndrome, in: Pagon, R.A., Adam, M.P., Ardinger, H.H., Bird, T.D., Dolan, C.R., Fong, C.-T., Smith, R.J., Stephens, K. (Eds.), *GeneReviews*(®). University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
- De Brouwer, A.P.M., Pennings, R.J.E., Roeters, M., Van Hauwe, P., Astuto, L.M., Hoefsloot, L.H., Huygen, P.L.M., van den Helm, B., Deutman, A.F., Bork, J.M., Kimberling, W.J., Cremers, F.P.M., Cremers, C.W.R.J., Kremer, H., 2003. Mutations in the calcium-binding motifs of CDH23 and the 35delG mutation in GJB2 cause hearing loss in one family. *Hum. Genet.* 112, 156–163. doi:10.1007/s00439-002-0833-0
- De Heer, A.-M.R., Collin, R.W.J., Huygen, P.L.M., Schraders, M., Oostrik, J., Rouwette, M., Kunst, H.P.M., Kremer, H., Cremers, C.W.R.J., 2011. Progressive sensorineural hearing loss and normal vestibular function in a Dutch DFNB7/11 family with a novel mutation in TMC1. *Audiol. Neurootol.* 16, 93–105. doi:10.1159/000313282

- De Kok, Y.J., van der Maarel, S.M., Bitner-Glindzicz, M., Huber, I., Monaco, A.P., Malcolm, S., Pembrey, M.E., Ropers, H.H., Cremers, F.P., 1995. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science* 267, 685–688.
- De Oliveira, C.A., Alexandrino, F., Christiani, T.V., Steiner, C.E., Cunha, J.L.R., Guerra, A.T.M., Sartorato, E.L., 2007. Molecular genetics study of deafness in Brazil: 8-year experience. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A, 1574–1579. doi:10.1002/ajmg.a.31838
- Del Castillo, I., Villamar, M., Sarduy, M., Romero, L., Herraiz, C., Hernández, F.J., Rodríguez, M., Borrás, I., Montero, A., Bellón, J., Tapia, M.C., Moreno, F., 1996. A novel locus for non-syndromic sensorineural deafness (DFN6) maps to chromosome Xp22. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1383–1387.
- DeWan, A.T., Parrado, A.R., Leal, S.M., 2003. A second kindred linked to DFNA20 (17q25.3) reduces the genetic interval. *Clin. Genet.* 63, 39–45.
- Diaz-Horta, O., Duman, D., Foster, J., 2nd, Sirmacı, A., Gonzalez, M., Mahdieh, N., Fotouhi, N., Bonyadi, M., Cengiz, F.B., Menendez, I., Ulloa, R.H., Edwards, Y.J.K., Züchner, S., Blanton, S., Tekin, M., 2012. Whole-exome sequencing efficiently detects rare mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *PloS One* 7, e50628. doi:10.1371/journal.pone.0050628
- Dixon, M.J., 1996. Treacher Collins syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 5 Spec No, 1391–1396.
- Dixon, M.J., Dixon, J., Raskova, D., Le Beau, M.M., Williamson, R., Klinger, K., Landes, G.M., 1992. Genetic and physical mapping of the Treacher Collins syndrome locus: refinement of the localization to chromosome 5q32-33.2. *Hum. Mol. Genet.* 1, 249–253.
- Donaudy, F., Snoeckx, R., Pfister, M., Zenner, H.-P., Blin, N., Di Stazio, M., Ferrara, A., Lanzara, C., Ficarella, R., Declau, F., Pusch, C.M., 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. doi:10.1086/383285
- Du, X., Schwander, M., Moresco, E.M.Y., Viviani, P., Haller, C., Hildebrand, M.S., Pak, K., Tarantino, L., Roberts, A., Richardson, H., Koob, G., Najmabadi, H., Ryan, A.F., Smith, R.J.H., Müller, U., Beutler, B., 2008. A catechol-O-methyltransferase that is essential for auditory function in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14609–14614. doi:10.1073/pnas.0807219105
- Duman, D., Sirmacı, A., Cengiz, F.B., Ozdag, H., Tekin, M., 2011. Screening of 38 genes identifies mutations in 62% of families with nonsyndromic deafness in Turkey. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 15, 29–33. doi:10.1089/gtmb.2010.0120
- Edvardson, S., Jalas, C., Shaag, A., Zenvirt, S., Landau, C., Lerer, I., Elpeleg, O., 2011. A deleterious mutation in the LOXHD1 gene causes autosomal recessive hearing loss in Ashkenazi Jews. *Am. J. Med. Genet. A.* 155A, 1170–1172. doi:10.1002/ajmg.a.33972
- Elbracht, M., Senderek, J., Eggermann, T., Thürmer, C., Park, J., Westhofen, M., Zerres, K., 2007. Autosomal recessive postlingual hearing loss (DFNB8): compound heterozygosity for two novel Tmprss3 mutations in German siblings. *J. Med. Genet.* 44, e81. doi:10.1136/jmg.2007.049122
- Estivill, X., Govea, N., Barceló, E., Badenas, C., Romero, E., Moral, L., Scozzri, R., D'Urbano, L., Zeviani, M., Torroni, A., 1998. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 27–35.
- Evans, D.G.R., 2009. Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review. *Orphanet J. Rare Dis.* 4, 16. doi:10.1186/1750-1172-4-16

- Everett, L.A., Glaser, B., Beck, J.C., Idol, J.R., Buchs, A., Heyman, M., Adawi, F., Hazani, E., Nassir, E., Baxevanis, A.D., Sheffield, V.C., Green, E.D., 1997. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat. Genet.* 17, 411–422. doi:10.1038/ng1297-411
- Exome Variant Server [WWW Document], n.d. URL <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> (accessed 4.25.14).
- Fattahi, Z., Shearer, A.E., Babanejad, M., Bazazzadegan, N., Almadani, S.N., Nikzat, N., Jalalvand, K., Arzhangi, S., Esteghamat, F., Abtahi, R., Azadeh, B., Smith, R.J.H., Kahrizi, K., Najmabadi, H., 2012. Screening for MYO15A gene mutations in autosomal recessive nonsyndromic, GJB2 negative Iranian deaf population. *Am. J. Med. Genet. A.* 158A, 1857–1864. doi:10.1002/ajmg.a.34411
- Fransen, E., Van Camp, G., 1999. The COCH gene: a frequent cause of hearing impairment and vestibular dysfunction? *Br. J. Audiol.* 33, 297–302.
- Fraser, F.C., Ling, D., Clogg, D., Nogrady, B., 1978. Genetic aspects of the BOR syndrome--branchial fistulas, ear pits, hearing loss, and renal anomalies. *Am. J. Med. Genet.* 2, 241–252. doi:10.1002/ajmg.1320020305
- Fraser, F.C., Sproule, J.R., Halal, F., 1980. Frequency of the branchio-oto-renal (BOR) syndrome in children with profound hearing loss. *Am. J. Med. Genet.* 7, 341–349. doi:10.1002/ajmg.1320070316
- Fraser, G.R., 1965a. Sex-linked recessive congenital deafness and the excess of males in profound childhood deafness. *Ann. Hum. Genet.* 29, 171–196.
- Fraser, G.R., 1965b. Association of congenital deafness with goitre (Pendred's syndrome) a study of 207 families. *Ann. Hum. Genet.* 28, 201–249.
- Fraser, G.R., FROGGATT, P., JAMES, T.N., 1964. Congenital deafness associated with electrocardiographic abnormalities, fainting attacks and sudden death. A recessive syndrome. *Q. J. Med.* 33, 361–385.
- Friedman, T.B., Hinnant, J.T., Ghosh, M., Boger, E.T., Riazuddin, S., Lupski, J.R., Potocki, L., Wilcox, E.R., 2002. DFNB3, spectrum of MYO15A recessive mutant alleles and an emerging genotype-phenotype correlation. *Adv. Otorhinolaryngol.* 61, 124–130.
- Friedman, T.B., Liang, Y., Weber, J.L., Hinnant, J.T., Barber, T.D., Winata, S., Arhya, I.N., Asher, J.H., Jr, 1995. A gene for congenital, recessive deafness DFNB3 maps to the pericentromeric region of chromosome 17. *Nat. Genet.* 9, 86–91. doi:10.1038/ng0195-86
- Fugazzola, L., Cerutti, N., Mannavola, D., Crino, A., Cassio, A., Gasparoni, P., Vannucchi, G., Beck-Peccoz, P., 2002. Differential diagnosis between Pendred and pseudo-Pendred syndromes: clinical, radiologic, and molecular studies. *Pediatr. Res.* 51, 479–484. doi:10.1203/00006450-200204000-00013
- Fugazzola, L., Cirello, V., Dossena, S., Rodighiero, S., Muzza, M., Castorina, P., Lalatta, F., Ambrosetti, U., Beck-Peccoz, P., Bottà, G., Paulmichl, M., 2007. High phenotypic intrafamilial variability in patients with Pendred syndrome and a novel duplication in the SLC26A4 gene: clinical characterization and functional studies of the mutated SLC26A4 protein. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 157, 331–338. doi:10.1530/EJE-07-0263
- Fukuhara, N., Tokiguchi, S., Shirakawa, K., Tsubaki, T., 1980. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *J. Neurol. Sci.* 47, 117–133.
- Fukushima, K., Ramesh, A., Srisailapathy, C.R., Ni, L., Wayne, S., O'Neill, M.E., Van Camp, G., Coucke, P., Jain, P., Wilcox, E.R., Smith, S.D., Kenyon, J.B., Zbar, R.I., Smith, R.J., 1995. An autosomal recessive nonsyndromic form of sensorineural hearing loss

- maps to 3p-DFNB6. *Genome Res.* 5, 305–308.
- Gaudino, R., Garel, C., Czernichow, P., Léger, J., 2005. Proportion of various types of thyroid disorders among newborns with congenital hypothyroidism and normally located gland: a regional cohort study. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 62, 444–448. doi:10.1111/j.1365-2265.2005.02239.x
- Gillam, M.P., Bartolone, L., Kopp, P., Benvenga, S., Bevenga, S., 2005. Molecular analysis of the PDS gene in a nonconsanguineous Sicilian family with Pendred's syndrome. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 15, 734–741. doi:10.1089/thy.2005.15.734
- Goldfeld, M., Glaser, B., Nassir, E., Gomori, J.M., Hazani, E., Bishara, N., 2005. CT of the ear in Pendred syndrome. *Radiology* 235, 537–540. doi:10.1148/radiol.2352031583
- Gorlin, J. J., Cohen, M. M. Jr., Hennekam, R.C. M., 2001. Syndromes of the Head and Neck, in: *Syndromes of the Head and Neck*. Oxford Univ. Press, New York, p. p.790.
- Goto, Y., Nonaka, I., Horai, S., 1991. A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Biochim. Biophys. Acta* 1097, 238–240.
- Grillet, N., Schwander, M., Hildebrand, M.S., Sczaniecka, A., Kolatkar, A., Velasco, J., Webster, J.A., Kahrizi, K., Najmabadi, H., Kimberling, W.J., Stephan, D., Bahlo, M., Wiltshire, T., Tarantino, L.M., Kuhn, P., Smith, R.J.H., Müller, U., 2009. Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 85, 328–337. doi:10.1016/j.ajhg.2009.07.017
- Grimaldi, R., Capuano, P., Miranda, N., Wagner, C., Capasso, G., 2007. [Pendrin: physiology, molecular biology and clinical importance]. *G. Ital. Nefrol. Organo Uff. Della Soc. Ital. Nefrol.* 24, 288–294.
- Grøndahl, J., 1987. Estimation of prognosis and prevalence of retinitis pigmentosa and Usher syndrome in Norway. *Clin. Genet.* 31, 255–264.
- Gross, M., Hahn, K., Biesalski, H.K., 1981. [The diagnosis of the Pendred syndrome in children by the perchlorate discharge test with 123I (author's transl)]. *HNO* 29, 95–97.
- Guilford, P., Ben Arab, S., Blanchard, S., Levilliers, J., Weissenbach, J., Belkahia, A., Petit, C., 1994. A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat. Genet.* 6, 24–28. doi:10.1038/ng0194-24
- Guipponi, M., Antonarakis, S.E., Scott, H.S., 2008. TMPRSS3, a type II transmembrane serine protease mutated in non-syndromic autosomal recessive deafness. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 1557–1567.
- Hallgren, B., 1959. Retinitis pigmentosa combined with congenital deafness; with vestibulo-cerebellar ataxia and mental abnormality in a proportion of cases: A clinical and genetical-statistical study. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* 34, 1–101.
- Hatamochi, A., Nakagawa, S., Ueki, H., Miyoshi, K., Iuchi, I., 1982. Diffuse palmoplantar keratoderma with deafness. *Arch. Dermatol.* 118, 605–607.
- Heath, K.E., Campos-Barros, A., Toren, A., Rozenfeld-Granot, G., Carlsson, L.E., Savige, J., Denison, J.C., Gregory, M.C., White, J.G., Barker, D.F., Greinacher, A., Epstein, C.J., Glucksman, M.J., Martignetti, J.A., 2001. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 1033–1045. doi:10.1086/324267
- Hereditary Hearing Loss - Hereditary Hearing loss Homepage [WWW Document], n.d. URL <http://hereditaryhearingloss.org/> (accessed 4.21.14).
- Hertzano, R., Montcouquiol, M., Rashi-Elkeles, S., Elkon, R., Yücel, R., Frankel, W.N., Rechavi, G., Möröy, T., Friedman, T.B., Kelley, M.W., Avraham, K.B., 2004.

- Transcription profiling of inner ears from Pou4f3(ddl/ddl) identifies Gfi1 as a target of the Pou4f3 deafness gene. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2143–2153.
doi:10.1093/hmg/ddh218
- HGMD® home page [WWW Document], n.d. URL <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> (accessed 4.25.14).
- Hildebrand, M.S., Coman, D., Yang, T., Gardner, R.J.M., Rose, E., Smith, R.J.H., Bahlo, M., Dahl, H.-H.M., 2007. A novel splice site mutation in EYA4 causes DFNA10 hearing loss. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A, 1599–1604. doi:10.1002/ajmg.a.31860
- Hildebrand, M.S., de Silva, M.G., Gardner, R.J.M., Rose, E., de Graaf, C.A., Bahlo, M., Dahl, H.-H.M., 2006. Cochlear implants for DFNA17 deafness. *The Laryngoscope* 116, 2211–2215. doi:10.1097/01.mlg.0000242089.72880.f8
- Hildebrand, M.S., Gandolfo, L., Shearer, A.E., Webster, J.A., Jensen, M., Kimberling, W.J., Stephan, D., Huygen, P.L.M., Smith, R.J.H., Bahlo, M., 2010a. A novel mutation in COCH-implications for genotype-phenotype correlations in DFNA9 hearing loss. *The Laryngoscope* 120, 2489–2493. doi:10.1002/lary.21159
- Hildebrand, M.S., Kahrizi, K., Bromhead, C.J., Shearer, A.E., Webster, J.A., Khodaei, H., Abtahi, R., Bazazzadegan, N., Babanejad, M., Nikzat, N., Kimberling, W.J., Stephan, D., Huygen, P.L.M., Bahlo, M., Smith, R.J.H., Najmabadi, H., 2010b. Mutations in TMC1 are a common cause of DFNB7/11 hearing loss in the Iranian population. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 119, 830–835.
- Hildebrand, M.S., Morín, M., Meyer, N.C., Mayo, F., Modamio-Hoybjor, S., Mencía, A., Olavarrieta, L., Morales-Angulo, C., Nishimura, C.J., Workman, H., DeLuca, A.P., del Castillo, I., Taylor, K.R., Tompkins, B., Goodman, C.W., Schrauwen, I., Wesemael, M.V., Lachlan, K., Shearer, A.E., Braun, T.A., Huygen, P.L.M., Kremer, H., Van Camp, G., Moreno, F., Casavant, T.L., Smith, R.J.H., Moreno-Pelayo, M.A., 2011. DFNA8/12 caused by TECTA mutations is the most identified subtype of nonsyndromic autosomal dominant hearing loss. *Hum. Mutat.* 32, 825–834.
doi:10.1002/humu.21512
- Hilgert, N., Alasti, F., Dieltjens, N., Pawlik, B., Wollnik, B., Uyguner, O., Delmaghani, S., Weil, D., Petit, C., Danis, E., Yang, T., Pandelia, E., Petersen, M.B., Goossens, D., Favero, J.D., Sanati, M.H., Smith, R.J.H., Van Camp, G., 2008. Mutation analysis of TMC1 identifies four new mutations and suggests an additional deafness gene at loci DFNA36 and DFNB7/11. *Clin. Genet.* 74, 223–232. doi:10.1111/j.1399-0004.2008.01053.x
- Hilgert, N., Topsakal, V., van Dinther, J., Offeciers, E., Van de Heyning, P., Van Camp, G., 2008. A splice-site mutation and overexpression of MYO6 cause a similar phenotype in two families with autosomal dominant hearing loss. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 16, 593–602. doi:10.1038/sj.ejhg.5202000
- Hmani, M., Ghorbel, A., Boulila-Elgaied, A., Ben Zina, Z., Kammoun, W., Drira, M., Chaabouni, M., Petit, C., Ayadi, H., 1999. A novel locus for Usher syndrome type II, USH2B, maps to chromosome 3 at p23-24.2. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 7, 363–367. doi:10.1038/sj.ejhg.5200307
- Hoskins, B.E., Cramer, C.H., Silvius, D., Zou, D., Raymond, R.M., Orten, D.J., Kimberling, W.J., Smith, R.J.H., Weil, D., Petit, C., Otto, E.A., Xu, P.-X., Hildebrandt, F., 2007. Transcription factor SIX5 is mutated in patients with branchio-oto-renal syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 800–804. doi:10.1086/513322
- Huang, S., Han, D., Yuan, Y., Wang, G., Kang, D., Zhang, X., Yan, X., Meng, X., Dong, M., Dai, P., 2011. Extremely discrepant mutation spectrum of SLC26A4 between Chinese patients with isolated Mondini deformity and enlarged vestibular aqueduct. *J. Transl. Med.* 9, 167. doi:10.1186/1479-5876-9-167

- Huizing, E.H., van Bolhuis, A.H., Odenthal, D.W., 1966. Studies on progressive hereditary perceptive deafness in a family of 335 members. I. Genetical and general audiological results. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 61, 35–41.
- Hutchin, T., Coy, N.N., Conlon, H., Telford, E., Bromelow, K., Blaydon, D., Taylor, G., Coghill, E., Brown, S., Trembath, R., Liu, X.Z., Bitner-Glindzicz, M., Mueller, R., 2005. Assessment of the genetic causes of recessive childhood non-syndromic deafness in the UK - implications for genetic testing. *Clin. Genet.* 68, 506–512. doi:10.1111/j.1399-0004.2005.00539.x
- Ito, T., Choi, B.Y., King, K.A., Zalewski, C.K., Muskett, J., Chattaraj, P., Shawker, T., Reynolds, J.C., Butman, J.A., Brewer, C.C., Wangemann, P., Alper, S.L., Griffith, A.J., 2011. SLC26A4 genotypes and phenotypes associated with enlargement of the vestibular aqueduct. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 28, 545–552. doi:10.1159/000335119
- Ito, T., Noguchi, Y., Yashima, T., Kitamura, K., 2006. SIX1 mutation associated with enlargement of the vestibular aqueduct in a patient with branchio-oto syndrome. *The Laryngoscope* 116, 796–799. doi:10.1097/01.mlg.0000209096.40400.96
- Jahrsdoerfer, R.A., Jacobson, J.T., 1995. Treacher Collins syndrome: otologic and auditory management. *J. Am. Acad. Audiol.* 6, 93–102.
- Jaijo, T., Oshima, A., Aller, E., Carney, C., Usami, S., Millán, J.M., Kimberling, W.J., 2012. Mutation screening of the PCDH15 gene in Spanish patients with Usher syndrome type I. *Mol. Vis.* 18, 1719–1726.
- Jain, P.K., Fukushima, K., Deshmukh, D., Ramesh, A., Thomas, E., Lalwani, A.K., Kumar, S., Plopis, B., Skarka, H., Srisailapathy, C.R., 1995. A human recessive neurosensory nonsyndromic hearing impairment locus is potential homologue of murine deafness (dn) locus. *Hum. Mol. Genet.* 4, 2391–2394.
- Jervell, A., Lange-Nielsen, F., 1957. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am. Heart J.* 54, 59–68.
- Jonard, L., Niasme-Grare, M., Bonnet, C., Feldmann, D., Rouillon, I., Loundon, N., Calais, C., Catros, H., David, A., Dollfus, H., Drouin-Garraud, V., Duriez, F., Eliot, M.M., Fellmann, F., Francannet, C., Gilbert-Dussardier, B., Gohler, C., Goizet, C., Journal, H., Mom, T., Thuillier-Obstoy, M.-F., Couderc, R., Garabédian, E.N., Denoyelle, F., Marlin, S., 2010. Screening of SLC26A4, FOXI1 and KCNJ10 genes in unilateral hearing impairment with ipsilateral enlarged vestibular aqueduct. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 74, 1049–1053. doi:10.1016/j.ijporl.2010.06.002
- Kahrizi, K., Mohseni, M., Nishimura, C., Bazazzadegan, N., Fischer, S.M., Dehghani, A., Sayfati, M., Taghdiri, M., Jamali, P., Smith, R.J.H., Azizi, F., Najmabadi, H., 2009. Identification of SLC26A4 gene mutations in Iranian families with hereditary hearing impairment. *Eur. J. Pediatr.* 168, 651–653. doi:10.1007/s00431-008-0809-8
- Kalay, E., Karaguzel, A., Caylan, R., Heister, A., Cremers, F.P.M., Cremers, C.W.R.J., Brunner, H.G., de Brouwer, A.P.M., Kremer, H., 2005. Four novel TMC1 (DFNB7/DFNB11) mutations in Turkish patients with congenital autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum. Mutat.* 26, 591. doi:10.1002/humu.9384
- Källén, K., Robert, E., Mastroiacovo, P., Castilla, E.E., Källén, B., 1999. CHARGE Association in newborns: a registry-based study. *Teratology* 60, 334–343. doi:10.1002/(SICI)1096-9926(199912)60:6<334::AID-TERA5>3.0.CO;2-S
- Kamada, F., Kure, S., Kudo, T., Suzuki, Y., Oshima, T., Ichinohe, A., Kojima, K., Niihori, T., Kanno, J., Narumi, Y., Narisawa, A., Kato, K., Aoki, Y., Ikeda, K., Kobayashi, T., Matsubara, Y., 2006. A novel KCNQ4 one-base deletion in a large pedigree with hearing loss: implication for the genotype-phenotype correlation. *J. Hum. Genet.* 51, 455–460. doi:10.1007/s10038-006-0384-7

- Kashtan, C.E., 1999. Alport syndrome. An inherited disorder of renal, ocular, and cochlear basement membranes. *Medicine (Baltimore)* 78, 338–360.
- Kelley, M.J., Jawien, W., Ortel, T.L., Korczak, J.F., 2000. Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly. *Nat. Genet.* 26, 106–108. doi:10.1038/79069
- Kelsell, D.P., Dunlop, J., Stevens, H.P., Lench, N.J., Liang, J.N., Parry, G., Mueller, R.F., Leigh, I.M., 1997. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387, 80–83. doi:10.1038/387080a0
- Khan, S.Y., Riazuddin, S., Tariq, M., Anwar, S., Shabbir, M.I., Riazuddin, S.A., Khan, S.N., Husnain, T., Ahmed, Z.M., Friedman, T.B., Riazuddin, S., 2007. Autosomal recessive nonsyndromic deafness locus DFNB63 at chromosome 11q13.2-q13.3. *Hum. Genet.* 120, 789–793. doi:10.1007/s00439-006-0275-1
- Kharkovets, T., Hardelin, J.P., Safieddine, S., Schweizer, M., El-Amraoui, A., Petit, C., Jentsch, T.J., 2000. KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4333–4338.
- Kim, H.-J., Sohn, K.-M., Shy, M.E., Krajewski, K.M., Hwang, M., Park, J.-H., Jang, S.-Y., Won, H.-H., Choi, B.-O., Hong, S.H., Kim, B.-J., Suh, Y.-L., Ki, C.-S., Lee, S.-Y., Kim, S.-H., Kim, J.-W., 2007. Mutations in PRPS1, which encodes the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase enzyme critical for nucleotide biosynthesis, cause hereditary peripheral neuropathy with hearing loss and optic neuropathy (cmtx5). *Am. J. Hum. Genet.* 81, 552–558. doi:10.1086/519529
- Kim, H.-J., Won, H.-H., Park, K.-J., Hong, S.H., Ki, C.-S., Cho, S.S., Venselaar, H., Vriend, G., Kim, J.-W., 2013. SNP linkage analysis and whole exome sequencing identify a novel POU4F3 mutation in autosomal dominant late-onset nonsyndromic hearing loss (DFNA15). *PloS One* 8, e79063. doi:10.1371/journal.pone.0079063
- Kimberling, W.J., 2005. Estimation of the frequency of occult mutations for an autosomal recessive disease in the presence of genetic heterogeneity: application to genetic hearing loss disorders. *Hum. Mutat.* 26, 462–470. doi:10.1002/humu.20221
- Kitajiri, S.-I., McNamara, R., Makishima, T., Husnain, T., Zafar, A.U., Kittles, R.A., Ahmed, Z.M., Friedman, T.B., Riazuddin, S., Griffith, A.J., 2007. Identities, frequencies and origins of TMC1 mutations causing DFNB7/B11 deafness in Pakistan. *Clin. Genet.* 72, 546–550. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00895.x
- Kitamura, K., Takahashi, K., Noguchi, Y., Kuroishikawa, Y., Tamagawa, Y., Ishikawa, K., Ichimura, K., Hagiwara, H., 2000. Mutations of the Pendred syndrome gene (PDS) in patients with large vestibular aqueduct. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 120, 137–141.
- Konigsmark, B.W., Mengel, M., Berlin, C.I., 1971. Familial low frequency hearing loss. *The Laryngoscope* 81, 759–771. doi:10.1288/00005537-197105000-00017
- Kopp, P., Pesce, L., Solis-S, J.C., 2008. Pendred syndrome and iodide transport in the thyroid. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 19, 260–268. doi:10.1016/j.tem.2008.07.001
- Kubisch, C., Schroeder, B.C., Friedrich, T., Lütjohann, B., El-Amraoui, A., Marlin, S., Petit, C., Jentsch, T.J., 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, P.C., 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* 4, 1073–1081. doi:10.1038/nprot.2009.86
- Kurima, K., Peters, L.M., Yang, Y., Riazuddin, S., Ahmed, Z.M., Naz, S., Arnaud, D., Drury, S., Mo, J., Makishima, T., Ghosh, M., Menon, P.S.N., Deshmukh, D., Oddoux, C., Ostrer, H., Khan, S., Riazuddin, S., Deininger, P.L., Hampton, L.L., Sullivan, S.L., Battey, J.F., Jr, Keats, B.J.B., Wilcox, E.R., Friedman, T.B., Griffith, A.J., 2002.

- Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nat. Genet.* 30, 277–284. doi:10.1038/ng842
- Lacroix, L., Michiels, S., Mian, C., Arturi, F., Caillou, B., Filetti, S., Schlumberger, M., Bidart, J.-M., 2006. HEX, PAX-8 and TTF-1 gene expression in human thyroid tissues: a comparative analysis with other genes involved in iodide metabolism. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 64, 398–404. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02477.x
- Lalani, S.R., Safiullah, A.M., Fernbach, S.D., Harutyunyan, K.G., Thaller, C., Peterson, L.E., McPherson, J.D., Gibbs, R.A., White, L.D., Hefner, M., Davenport, S.L.H., Graham, J.M., Bacino, C.A., Glass, N.L., Towbin, J.A., Craigen, W.J., Neish, S.R., Lin, A.E., Belmont, J.W., 2006. Spectrum of CHD7 mutations in 110 individuals with CHARGE syndrome and genotype-phenotype correlation. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 303–314. doi:10.1086/500273
- Lalani, S.R., Safiullah, A.M., Molinari, L.M., Fernbach, S.D., Martin, D.M., Belmont, J.W., 2004. SEMA3E mutation in a patient with CHARGE syndrome. *J. Med. Genet.* 41, e94.
- Lalwani, A.K., Brister, J.R., Fex, J., Grundfast, K.M., Pikus, A.T., Ploplis, B., San Agustin, T., Skarka, H., Wilcox, E.R., 1994. A new nonsyndromic X-linked sensorineural hearing impairment linked to Xp21.2. *Am. J. Hum. Genet.* 55, 685–694.
- Lalwani, A.K., Goldstein, J.A., Kelley, M.J., Luxford, W., Castelein, C.M., Mhatre, A.N., 2000. Human nonsyndromic hereditary deafness DFNA17 is due to a mutation in nonmuscle myosin MYH9. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1121–1128. doi:10.1016/S0002-9297(07)62942-5
- Landa, P., Differ, A.-M., Rajput, K., Jenkins, L., Bitner-Glindzicz, M., 2013. Lack of significant association between mutations of KCNJ10 or FOXI1 and SLC26A4 mutations in Pendred syndrome/enlarged vestibular aqueducts. *BMC Med. Genet.* 14, 85. doi:10.1186/1471-2350-14-85
- Laštůvka, Petr, 2001. Pendredův syndrom u dospívající dívky 50, 92–95.
- Leal, S.M., Apaydin, F., Barnwell, C., Iber, M., Kandogan, T., Pfister, M., Braendle, U., Cura, O., Schwalb, M., Zenner, H.P., Vitale, E., 1998. A second middle eastern kindred with autosomal recessive non-syndromic hearing loss segregates DFNB9. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 6, 341–344. doi:10.1038/sj.ejhg.5200201
- Lee, H.-K., Lee, S.-H., Lee, K.-Y., Lim, E.-J., Choi, S.-Y., Park, R.-K., Kim, U.-K., 2009. Novel POU3F4 mutations and clinical features of DFN3 patients with cochlear implants. *Clin. Genet.* 75, 572–575. doi:10.1111/j.1399-0004.2009.01181.x
- Lee, K., Khan, S., Ansar, M., Santos-Cortez, R.L.P., Ahmad, W., Leal, S.M., 2011. A Novel ESRRB Deletion Is a Rare Cause of Autosomal Recessive Nonsyndromic Hearing Impairment among Pakistani Families. *Genet. Res. Int.* 2011, 368915. doi:10.4061/2011/368915
- Lejska M, Havlík R, 2008. Auditory neuropathy. *Otorinolaryng. a Foniat.* 57, 165–172.
- Leon, P.E., Lalwani, A.K., 2002. Auditory phenotype of DFNA1. *Adv. Otorhinolaryngol.* 61, 34–40.
- Lezirovitz, K., Pardono, E., de Mello Auricchio, M.T.B., de Carvalho E Silva, F.L., Lopes, J.J., Abreu-Silva, R.S., Romanos, J., Batissoco, A.C., Mingroni-Netto, R.C., 2008. Unexpected genetic heterogeneity in a large consanguineous Brazilian pedigree presenting deafness. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 16, 89–96. doi:10.1038/sj.ejhg.5201917
- Li, X.C., Everett, L.A., Lalwani, A.K., Desmukh, D., Friedman, T.B., Green, E.D., Wilcox, E.R., 1998. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat. Genet.* 18, 215–217. doi:10.1038/ng0398-215
- Liang, Y., Wang, A., Belyantseva, I.A., Anderson, D.W., Probst, F.J., Barber, T.D., Miller,

- W., Touchman, J.W., Jin, L., Sullivan, S.L., Sellers, J.R., Camper, S.A., Lloyd, R.V., Kachar, B., Friedman, T.B., Fridell, R.A., 1999. Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics* 61, 243–258. doi:10.1006/geno.1999.5976
- Liburd, N., Ghosh, M., Riazuddin, S., Naz, S., Khan, S., Ahmed, Z., Riazuddin, S., Liang, Y., Menon, P.S., Smith, T., Smith, A.C., Chen, K.S., Lupski, J.R., Wilcox, E.R., Potocki, L., Friedman, T.B., 2001. Novel mutations of MYO15A associated with profound deafness in consanguineous families and moderately severe hearing loss in a patient with Smith-Magenis syndrome. *Hum. Genet.* 109, 535–541. doi:10.1007/s004390100604
- Liu, X., Han, D., Li, J., Han, B., Ouyang, X., Cheng, J., Li, X., Jin, Z., Wang, Y., Bitner-Glindzicz, M., Kong, X., Xu, H., Kantardzhieva, A., Eavey, R.D., Seidman, C.E., Seidman, J.G., Du, L.L., Chen, Z.-Y., Dai, P., Teng, M., Yan, D., Yuan, H., 2010. Loss-of-function mutations in the PRPS1 gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, DFN2. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 65–71. doi:10.1016/j.ajhg.2009.11.015
- Liu, X.Z., Walsh, J., Mburu, P., Kendrick-Jones, J., Cope, M.J., Steel, K.P., Brown, S.D., 1997. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat. Genet.* 16, 188–190. doi:10.1038/ng0697-188
- Liu, X.Z., Xia, X.J., Xu, L.R., Pandya, A., Liang, C.Y., Blanton, S.H., Brown, S.D., Steel, K.P., Nance, W.E., 2000. Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss. *Hum. Mol. Genet.* 9, 63–67.
- Liu, X.-Z., Yuan, Y., Yan, D., Ding, E.H., Ouyang, X.M., Fei, Y., Tang, W., Yuan, H., Chang, Q., Du, L.L., Zhang, X., Wang, G., Ahmad, S., Kang, D.Y., Lin, X., Dai, P., 2009. Digenic inheritance of non-syndromic deafness caused by mutations at the gap junction proteins Cx26 and Cx31. *Hum. Genet.* 125, 53–62. doi:10.1007/s00439-008-0602-9
- López-Bigas, N., Olivé, M., Rabionet, R., Ben-David, O., Martínez-Matos, J.A., Bravo, O., Banchs, I., Volpini, V., Gasparini, P., Avraham, K.B., Ferrer, I., Arbonés, M.L., Estivill, X., 2001. Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum. Mol. Genet.* 10, 947–952.
- Luijendijk, M.W.J., Van Wijk, E., Bischoff, A.M.L.C., Krieger, E., Huygen, P.L.M., Pennings, R.J.E., Brunner, H.G., Cremers, C.W.R.J., Cremers, F.P.M., Kremer, H., 2004. Identification and molecular modelling of a mutation in the motor head domain of myosin VIIA in a family with autosomal dominant hearing impairment (DFNA11). *Hum. Genet.* 115, 149–156. doi:10.1007/s00439-004-1137-3
- Lynch, E.D., Lee, M.K., Morrow, J.E., Welch, P.L., León, P.E., King, M.C., 1997. Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene diaphanous. *Science* 278, 1315–1318.
- Maciaszczyk, K., Lewiński, A., 2008. Phenotypes of SLC26A4 gene mutations: Pendred syndrome and hypoacusis with enlarged vestibular aqueduct. *Neuro Endocrinol. Lett.* 29, 29–36.
- Madden, C., Halsted, M., Meinzen-Derr, J., Bardo, D., Boston, M., Arjmand, E., Nishimura, C., Yang, T., Benton, C., Das, V., Smith, R., Choo, D., Greinwald, J., 2007. The influence of mutations in the SLC26A4 gene on the temporal bone in a population with enlarged vestibular aqueduct. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 133, 162–168. doi:10.1001/archotol.133.2.162
- Maestrini, E., Korge, B.P., Ocaña-Sierra, J., Calzolari, E., Cambiaghi, S., Scudder, P.M., Hovnanian, A., Monaco, A.P., Munro, C.S., 1999. A missense mutation in

- connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1237–1243.
- Mahdieh, N., Rabbani, B., Wiley, S., Akbari, M.T., Zeinali, S., 2010. Genetic causes of nonsyndromic hearing loss in Iran in comparison with other populations. *J. Hum. Genet.* 55, 639–648. doi:10.1038/jhg.2010.96
- Makishima, T., Madeo, A.C., Brewer, C.C., Zalewski, C.K., Butman, J.A., Sachdev, V., Arai, A.E., Holbrook, B.M., Rosing, D.R., Griffith, A.J., 2007. Nonsyndromic hearing loss DFNA10 and a novel mutation of EYA4: evidence for correlation of normal cardiac phenotype with truncating mutations of the Eya domain. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A, 1592–1598. doi:10.1002/ajmg.a.31793
- Manolis, E.N., Yandavi, N., Nadol, J.B., Jr, Eavey, R.D., McKenna, M., Rosenbaum, S., Khetarpal, U., Halpin, C., Merchant, S.N., Duyk, G.M., MacRae, C., Seidman, C.E., Seidman, J.G., 1996. A gene for non-syndromic autosomal dominant progressive postlingual sensorineural hearing loss maps to chromosome 14q12-13. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1047–1050.
- Marres, H., van Ewijk, M., Huygen, P., Kunst, H., van Camp, G., Coucke, P., Willems, P., Cremers, C., 1997. Inherited nonsyndromic hearing loss. An audiovestibular study in a large family with autosomal dominant progressive hearing loss related to DFNA2. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 123, 573–577.
- Masindova, I., Varga, L., Stanik, J., Valentinova, L., Profant, M., Klimes, I., Gasperikova, D., 2012. Molecular and hereditary mechanisms of sensorineural hearing loss with focus on selected endocrinopathies. *Endocr. Regul.* 46, 167–186.
- Masmoudi, S., Antonarakis, S.E., Schwede, T., Ghorbel, A.M., Gratri, M., Pappasavas, M.P., Drira, M., Elgaied-Boulila, A., Wattenhofer, M., Rossier, C., Scott, H.S., Ayadi, H., Guipponi, M., 2001. Novel missense mutations of TMPRSS3 in two consanguineous Tunisian families with non-syndromic autosomal recessive deafness. *Hum. Mutat.* 18, 101–108. doi:10.1002/humu.1159
- Masuda, Y., Futamura, M., Kamino, H., Nakamura, Y., Kitamura, N., Ohnishi, S., Miyamoto, Y., Ichikawa, H., Ohta, T., Ohki, M., Kiyono, T., Egami, H., Baba, H., Arakawa, H., 2006. The potential role of DFNA5, a hearing impairment gene, in p53-mediated cellular response to DNA damage. *J. Hum. Genet.* 51, 652–664. doi:10.1007/s10038-006-0004-6
- McGuirt, W.T., Prasad, S.D., Griffith, A.J., Kunst, H.P., Green, G.E., Shpargel, K.B., Runge, C., Huybrechts, C., Mueller, R.F., Lynch, E., King, M.C., Brunner, H.G., Cremers, C.W., Takanosu, M., Li, S.W., Arita, M., Mayne, R., Prockop, D.J., Van Camp, G., Smith, R.J., 1999. Mutations in COL11A2 cause non-syndromic hearing loss (DFNA13). *Nat. Genet.* 23, 413–419. doi:10.1038/70516
- Melchionda, S., Ahituv, N., Bisceglia, L., Sobe, T., Glaser, F., Rabionet, R., Arbones, M.L., Notarangelo, A., Di Iorio, E., Carella, M., Zelante, L., Estivill, X., Avraham, K.B., Gasparini, P., 2001. MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 635–640. doi:10.1086/323156
- Melkonniemi, M., Brunner, H.G., Manouvrier, S., Hennekam, R., Superti-Furga, A., Kääriäinen, H., Pauli, R.M., van Essen, T., Warman, M.L., Bonaventure, J., Miny, P., Ala-Kokko, L., 2000. Autosomal recessive disorder otospondylomegaepiphyseal dysplasia is associated with loss-of-function mutations in the COL11A2 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 368–377. doi:10.1086/302750
- Mencía, A., González-Nieto, D., Modamio-Høybjør, S., Etxeberria, A., Aránguez, G., Salvador, N., Del Castillo, I., Villarroel, A., Moreno, F., Barrio, L., Moreno-Pelayo, M.A., 2008. A novel KCNQ4 pore-region mutation (p.G296S) causes deafness by

- impairing cell-surface channel expression. *Hum. Genet.* 123, 41–53.
doi:10.1007/s00439-007-0447-7
- Meyer, C.G., Gasmelseed, N.M., Mergani, A., Magzoub, M.M.A., Muntau, B., Thye, T., Horstmann, R.D., 2005. Novel TMC1 structural and splice variants associated with congenital nonsyndromic deafness in a Sudanese pedigree. *Hum. Mutat.* 25, 100.
doi:10.1002/humu.9302
- Meyer, N.C., Alasti, F., Nishimura, C.J., Imanirad, P., Kahrizi, K., Riazalhosseini, Y., Malekpour, M., Kochakian, N., Jamali, P., Van Camp, G., Smith, R.J.H., Najmabadi, H., 2007. Identification of three novel TECTA mutations in Iranian families with autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment at the DFNB21 locus. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A, 1623–1629. doi:10.1002/ajmg.a.31718
- Migliosi, V., Modamio-Høybjør, S., Moreno-Pelayo, M.A., Rodríguez-Ballesteros, M., Villamar, M., Tellería, D., Menéndez, I., Moreno, F., Del Castillo, I., 2002. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *J. Med. Genet.* 39, 502–506.
- Mirowski, M., Reid, P.R., Mower, M.M., Watkins, L., Gott, V.L., Schauble, J.F., Langer, A., Heilman, M.S., Kolenik, S.A., Fischell, R.E., Weisfeldt, M.L., 1980. Termination of malignant ventricular arrhythmias with an implanted automatic defibrillator in human beings. *N. Engl. J. Med.* 303, 322–324. doi:10.1056/NEJM198008073030607
- Mohiddin, S.A., Ahmed, Z.M., Griffith, A.J., Tripodi, D., Friedman, T.B., Fananapazir, L., Morell, R.J., 2004. Novel association of hypertrophic cardiomyopathy, sensorineural deafness, and a mutation in unconventional myosin VI (MYO6). *J. Med. Genet.* 41, 309–314.
- Mohr, J., Mageroy, K., 1960. Sex-linked deafness of a possibly new type. *Acta Genet. Stat. Med.* 10, 54–62.
- Moloney, D.M., Slaney, S.F., Oldridge, M., Wall, S.A., Sahlin, P., Stenman, G., Wilkie, A.O., 1996. Exclusive paternal origin of new mutations in Apert syndrome. *Nat. Genet.* 13, 48–53. doi:10.1038/ng0596-48
- Montagna, P., Gallassi, R., Medori, R., Govoni, E., Zeviani, M., Di Mauro, S., Lugaresi, E., Andermann, F., 1988. MELAS syndrome: characteristic migrainous and epileptic features and maternal transmission. *Neurology* 38, 751–754.
- Morell, R.J., Friderici, K.H., Wei, S., Elfenbein, J.L., Friedman, T.B., Fisher, R.A., 2000. A new locus for late-onset, progressive, hereditary hearing loss DFNA20 maps to 17q25. *Genomics* 63, 1–6. doi:10.1006/geno.1999.6058
- Moreno-Pelayo, M.A., Goodyear, R.J., Mencía, A., Modamio-Høybjør, S., Legan, P.K., Olavarrieta, L., Moreno, F., Richardson, G.P., 2008. Characterization of a spontaneous, recessive, missense mutation arising in the Tecta gene. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 9, 202–214. doi:10.1007/s10162-008-0116-0
- Mori, T., Westerberg, B.D., Atashband, S., Kozak, F.K., 2008. Natural history of hearing loss in children with enlarged vestibular aqueduct syndrome. *J. Otolaryngol. - Head Neck Surg. J. Oto-Rhino-Laryngol. Chir. Cervico-Faciale* 37, 112–118.
- Morton, N.E., 1991. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 630, 16–31.
- Mustapha, M., Weil, D., Chardenoux, S., Elias, S., El-Zir, E., Beckmann, J.S., Loiselet, J., Petit, C., 1999. An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21. *Hum. Mol. Genet.* 8, 409–412.
- Naganawa, S., Koshikawa, T., Fukatsu, H., Ishigaki, T., Sato, E., Sugiura, M., Yoshino, T., Nakashima, T., 2004. Enlarged endolymphatic duct and sac syndrome: relationship between MR findings and genotype of mutation in Pendred syndrome gene. *Magn.*

- Reson. Imaging 22, 25–30. doi:10.1016/j.mri.2003.07.002
- Napiontek, U., Borck, G., Müller-Forell, W., Pfarr, N., Bohnert, A., Keilmann, A., Pohlenz, J., 2004. Intrafamilial variability of the deafness and goiter phenotype in Pendred syndrome caused by a T416P mutation in the SLC26A4 gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5347–5351. doi:10.1210/jc.2004-1013
- Naz, S., Alasti, F., Mowjoodi, A., Riazuddin, S., Sanati, M.H., Friedman, T.B., Griffith, A.J., Wilcox, E.R., Riazuddin, S., 2003. Distinctive audiometric profile associated with DFNB21 alleles of TECTA. *J. Med. Genet.* 40, 360–363.
- Naz, S., Giguere, C.M., Kohrman, D.C., Mitchem, K.L., Riazuddin, S., Morell, R.J., Ramesh, A., Srisailpathy, S., Deshmukh, D., Riazuddin, S., Griffith, A.J., Friedman, T.B., Smith, R.J.H., Wilcox, E.R., 2002. Mutations in a novel gene, TMIE, are associated with hearing loss linked to the DFNB6 locus. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 632–636. doi:10.1086/342193
- NEBcutter V2.0 [WWW Document], n.d. URL <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php> (accessed 4.25.14).
- Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Fauré, S., Gary, F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K., Guicheney, P., 1997. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nat. Genet.* 15, 186–189. doi:10.1038/ng0297-186
- Norris, V.W., Arnos, K.S., Hanks, W.D., Xia, X., Nance, W.E., Pandya, A., 2006. Does universal newborn hearing screening identify all children with GJB2 (Connexin 26) deafness? Penetrance of GJB2 deafness. *Ear Hear.* 27, 732–741. doi:10.1097/01.aud.0000240492.78561.d3
- OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man [WWW Document], n.d. URL <http://www.omim.org/> (accessed 4.21.14).
- Orphanet [WWW Document], n.d. URL <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php> (accessed 4.22.14).
- PANTHER - Gene List Analysis [WWW Document], n.d. URL <http://www.pantherdb.org/> (accessed 4.25.14).
- Pardono, E., van Bever, Y., van den Ende, J., Havrenne, P.C., Iughetti, P., Maestrelli, S.R.P., Costa F, O., Richieri-Costa, A., Frota-Pessoa, O., Otto, P.A., 2003. Waardenburg syndrome: clinical differentiation between types I and II. *Am. J. Med. Genet. A.* 117A, 223–235. doi:10.1002/ajmg.a.10193
- Park, H.-J., Shaukat, S., Liu, X.-Z., Hahn, S.H., Naz, S., Ghosh, M., Kim, H.-N., Moon, S.-K., Abe, S., Tukamoto, K., Riazuddin, S., Kabra, M., Erdenetungalag, R., Radnaabazar, J., Khan, S., Pandya, A., Usami, S.-I., Nance, W.E., Wilcox, E.R., Riazuddin, S., Griffith, A.J., 2003. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J. Med. Genet.* 40, 242–248.
- Parry, D.M., Eldridge, R., Kaiser-Kupfer, M.I., Bouzas, E.A., Pikus, A., Patronas, N., 1994. Neurofibromatosis 2 (NF2): clinical characteristics of 63 affected individuals and clinical evidence for heterogeneity. *Am. J. Med. Genet.* 52, 450–461. doi:10.1002/ajmg.1320520411
- Parving, A., 1984. Inherited low-frequency hearing loss. A new mixed conductive/sensorineural entity? *Scand. Audiol.* 13, 47–56.
- Patton, M.A., Goodship, J., Hayward, R., Lansdown, R., 1988. Intellectual development in Apert's syndrome: a long term follow up of 29 patients. *J. Med. Genet.* 25, 164–167.
- Pearce, J.M.S., 2007. Pendred's syndrome. *Eur. Neurol.* 58, 189–190. doi:10.1159/000104724
- Pendred and BOR homepage [WWW Document], n.d. URL <http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/slcMutations.htm> (accessed

- 4.25.14).
- Pendred V., 1896. Deaf-mutism and goitre. *Lancet* 532.
- Pera, A., Dossena, S., Rodighiero, S., Gandía, M., Bottà, G., Meyer, G., Moreno, F., Nofziger, C., Hernández-Chico, C., Paulmichl, M., 2008a. Functional assessment of allelic variants in the SLC26A4 gene involved in Pendred syndrome and nonsyndromic EVA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18608–18613.
doi:10.1073/pnas.0805831105
- Pera, A., Villamar, M., Viñuela, A., Gandía, M., Medà, C., Moreno, F., Hernández-Chico, C., 2008b. A mutational analysis of the SLC26A4 gene in Spanish hearing-impaired families provides new insights into the genetic causes of Pendred syndrome and DFNB4 hearing loss. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 16, 888–896.
doi:10.1038/ejhg.2008.30
- Petersen, M.B., Wang, Q., Willems, P.J., 2008. Sex-linked deafness. *Clin. Genet.* 73, 14–23.
doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00913.x
- Pfarr, N., Borck, G., Turk, A., Napiontek, U., Keilmann, A., Müller-Forell, W., Kopp, P., Pohlenz, J., 2006. Goitrous congenital hypothyroidism and hearing impairment associated with mutations in the TPO and SLC26A4/PDS genes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 2678–2681. doi:10.1210/jc.2006-0142
- Pfister, M.H., Apaydin, F., Turan, O., Bereketoğlu, M., Bylgen, V., Braendle, U., Zenner, H.P., Lalwani, A.K., 1998. A second family with nonsyndromic sensorineural hearing loss linked to Xp21.2: refinement of the DFN4 locus within DMD. *Genomics* 53, 377–382. doi:10.1006/geno.1998.5538
- Phelps, P.D., Coffey, R.A., Trembath, R.C., Luxon, L.M., Grossman, A.B., Britton, K.E., Kendall-Taylor, P., Graham, J.M., Cadge, B.C., Stephens, S.G., Pembrey, M.E., Reardon, W., 1998. Radiological malformations of the ear in Pendred syndrome. *Clin. Radiol.* 53, 268–273.
- Phelps, P.D., Reardon, W., Pembrey, M., Bellman, S., Luxon, L., 1991. X-linked deafness, stapes gushers and a distinctive defect of the inner ear. *Neuroradiology* 33, 326–330.
- Pihlajamaa, T., Prockop, D.J., Faber, J., Winterpacht, A., Zabel, B., Giedion, A., Wiesbauer, P., Spranger, J., Ala-Kokko, L., 1998. Heterozygous glycine substitution in the COL11A2 gene in the original patient with the Weissenbacher-Zweymüller syndrome demonstrates its identity with heterozygous OSMED (nonocular Stickler syndrome). *Am. J. Med. Genet.* 80, 115–120.
- Pingault, V., Ente, D., Dastot-Le Moal, F., Goossens, M., Marlin, S., Bondurand, N., 2010. Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum. Mutat.* 31, 391–406. doi:10.1002/humu.21211
- PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs [WWW Document], n.d. URL <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml> (accessed 4.25.14).
- Pourová, R., Janousek, P., Jurovcík, M., Dvorská, M., Malíková, M., Rasková, D., Bendová, O., Leonardi, E., Murgia, A., Kabelka, Z., Astl, J., Seeman, P., 2010. Spectrum and frequency of SLC26A4 mutations among Czech patients with early hearing loss with and without Enlarged Vestibular Aqueduct (EVA). *Ann. Hum. Genet.* 74, 299–307. doi:10.1111/j.1469-1809.2010.00581.x
- Prasad, S., Kölln, K.A., Cucci, R.A., Trembath, R.C., Van Camp, G., Smith, R.J.H., 2004. Pendred syndrome and DFNB4-mutation screening of SLC26A4 by denaturing high-performance liquid chromatography and the identification of eleven novel mutations. *Am. J. Med. Genet. A.* 124A, 1–9. doi:10.1002/ajmg.a.20272
- Probst, F.J., Chen, K.S., Zhao, Q., Wang, A., Friedman, T.B., Lupski, J.R., Camper, S.A., 1999. A physical map of the mouse shaker-2 region contains many of the genes commonly deleted in Smith-Magenis syndrome (del17p11.2p11.2). *Genomics* 55,

- 348–352. doi:10.1006/geno.1998.5669
- Propst, E.J., Blaser, S., Stockley, T.L., Harrison, R.V., Gordon, K.A., Papsin, B.C., 2006. Temporal bone imaging in GJB2 deafness. *The Laryngoscope* 116, 2178–2186. doi:10.1097/01.mlg.0000244389.68568.a7
- Provaznikova, D., Geierova, V., Kumstyrova, T., Kotlin, R., Mikulenková, D., Zurkova, K., Matoska, V., Hrachovinova, I., Rittich, S., 2009. Clinical manifestation and molecular genetic characterization of MYH9 disorders. *Platelets* 20, 289–296. doi:10.1080/09537100902993022
- Pryor, S.P., Madeo, A.C., Reynolds, J.C., Sarlis, N.J., Arnos, K.S., Nance, W.E., Yang, Y., Zalewski, C.K., Brewer, C.C., Butman, J.A., Griffith, A.J., 2005. SLC26A4/PDS genotype-phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. *J. Med. Genet.* 42, 159–165. doi:10.1136/jmg.2004.024208
- Rahman, S., Ecob, R., Costello, H., Sweeney, M.G., Duncan, A.J., Pearce, K., Strachan, D., Forge, A., Davis, A., Bitner-Glindzicz, M., 2012. Hearing in 44-45 year olds with m.1555A>G, a genetic mutation predisposing to aminoglycoside-induced deafness: a population based cohort study. *BMJ Open* 2, e000411. doi:10.1136/bmjopen-2011-000411
- Ramzan, K., Shaikh, R.S., Ahmad, J., Khan, S.N., Riazuddin, S., Ahmed, Z.M., Friedman, T.B., Wilcox, E.R., Riazuddin, S., 2005. A new locus for nonsyndromic deafness DFNB49 maps to chromosome 5q12.3-q14.1. *Hum. Genet.* 116, 17–22. doi:10.1007/s00439-004-1205-8
- Read, A.P., Newton, V.E., 1997. Waardenburg syndrome. *J. Med. Genet.* 34, 656–665.
- Reardon, W., Coffey, R., Chowdhury, T., Grossman, A., Jan, H., Britton, K., Kendall-Taylor, P., Trembath, R., 1999. Prevalence, age of onset, and natural history of thyroid disease in Pendred syndrome. *J. Med. Genet.* 36, 595–598.
- Reardon, W., OMahoney, C.F., Trembath, R., Jan, H., Phelps, P.D., 2000. Enlarged vestibular aqueduct: a radiological marker of pendred syndrome, and mutation of the PDS gene. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* 93, 99–104.
- Reardon, W., Pembrey, M., 1990. The genetics of deafness. *Arch. Dis. Child.* 65, 1196–1197.
- Rendtorff, N.D., Zhu, M., Fagerheim, T., Antal, T.L., Jones, M., Teslovich, T.M., Gillanders, E.M., Barmada, M., Teig, E., Trent, J.M., Friderici, K.H., Stephan, D.A., Tranebjaerg, L., 2006. A novel missense mutation in ACTG1 causes dominant deafness in a Norwegian DFNA20/26 family, but ACTG1 mutations are not frequent among families with hereditary hearing impairment. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 14, 1097–1105. doi:10.1038/sj.ejhg.5201670
- Reyes, S., Wang, G., Ouyang, X., Han, B., Du, L.L., Yuan, H.J., Yan, D., Dai, P., Liu, X.-Z., 2009. Mutation analysis of SLC26A4 in mainland Chinese patients with enlarged vestibular aqueduct. *Otolaryngol.--Head Neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol.-Head Neck Surg.* 141, 502–508. doi:10.1016/j.otohns.2009.07.004
- Riazuddin, S., Khan, S.N., Ahmed, Z.M., Ghosh, M., Caution, K., Nazli, S., Kabra, M., Zafar, A.U., Chen, K., Naz, S., Antonellis, A., Pavan, W.J., Green, E.D., Wilcox, E.R., Friedman, P.L., Morell, R.J., Riazuddin, S., Friedman, T.B., 2006. Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 137–143. doi:10.1086/499164
- Richard, G., Brown, N., Ishida-Yamamoto, A., Krol, A., 2004. Expanding the phenotypic spectrum of Cx26 disorders: Bart-Pumphrey syndrome is caused by a novel missense mutation in GJB2. *J. Invest. Dermatol.* 123, 856–863. doi:10.1111/j.0022-

- Richard, G., Rouan, F., Willoughby, C.E., Brown, N., Chung, P., Ryynänen, M., Jabs, E.W., Bale, S.J., DiGiovanna, J.J., Uitto, J., Russell, L., 2002. Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1341–1348. doi:10.1086/339986
- Richard, G., Smith, L.E., Bailey, R.A., Itin, P., Hohl, D., Epstein, E.H., Jr, DiGiovanna, J.J., Compton, J.G., Bale, S.J., 1998. Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nat. Genet.* 20, 366–369. doi:10.1038/3840
- Rivière, J.-B., van Bon, B.W.M., Hoischen, A., Kholmanskikh, S.S., O’Roak, B.J., Gilissen, C., Gijzen, S., Sullivan, C.T., Christian, S.L., Abdul-Rahman, O.A., Atkin, J.F., Chassaing, N., Drouin-Garraud, V., Fry, A.E., Fryns, J.-P., Gripp, K.W., Kempers, M., Kleefstra, T., Mancini, G.M.S., Nowaczyk, M.J.M., van Ravenswaaij-Arts, C.M.A., Roscioli, T., Marble, M., Rosenfeld, J.A., Siu, V.M., de Vries, B.B.A., Shendure, J., Verloes, A., Veltman, J.A., Brunner, H.G., Ross, M.E., Pilz, D.T., Dobyns, W.B., 2012. De novo mutations in the actin genes ACTB and ACTG1 cause Baraitser-Winter syndrome. *Nat. Genet.* 44, 440–444, S1–2. doi:10.1038/ng.1091
- Robertson, N.G., Lu, L., Heller, S., Merchant, S.N., Eavey, R.D., McKenna, M., Nadol, J.B., Jr, Miyamoto, R.T., Linthicum, F.H., Jr, Lubianca Neto, J.F., Hudspeth, A.J., Seidman, C.E., Morton, C.C., Seidman, J.G., 1998. Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic deafness with vestibular dysfunction. *Nat. Genet.* 20, 299–303. doi:10.1038/3118
- Rodríguez-Ballesteros, M., del Castillo, F.J., Martín, Y., Moreno-Pelayo, M.A., Morera, C., Prieto, F., Marco, J., Morant, A., Gallo-Terán, J., Morales-Angulo, C., Navas, C., Trinidad, G., Tapia, M.C., Moreno, F., del Castillo, I., 2003. Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (OTOF). *Hum. Mutat.* 22, 451–456. doi:10.1002/humu.10274
- Romano, C., 1965. Congenital cardiac arrhythmia. *Lancet* 1, 658–659.
- Rouleau, G.A., Merel, P., Lutchman, M., Sanson, M., Zucman, J., Marineau, C., Hoang-Xuan, K., Demczuk, S., Desmaze, C., Plougastel, B., 1993. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363, 515–521. doi:10.1038/363515a0
- Ruf, R.G., Xu, P.-X., Silvius, D., Otto, E.A., Beekmann, F., Muerb, U.T., Kumar, S., Neuhaus, T.J., Kemper, M.J., Raymond, R.M., Jr, Brophy, P.D., Berkman, J., Gattas, M., Hyland, V., Ruf, E.-M., Schwartz, C., Chang, E.H., Smith, R.J.H., Stratakis, C.A., Weil, D., Petit, C., Hildebrandt, F., 2004. SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8090–8095. doi:10.1073/pnas.0308475101
- Šafka Brožková, D., Laštůvková, J., Machalová, E., Lisoňová, J., Trková, M., Seeman, P., 2012. DFNB35 due to a novel mutation in the ESRRB gene in a Czech consanguineous family. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 76, 1681–1684. doi:10.1016/j.ijporl.2012.08.006
- Šafka Brožková, D., Laštůvková, J., Štěpánková, H., Krůtová, M., Trková, M., Myška, P., Seeman, P., 2012. DFNB49 is an important cause of non-syndromic deafness in Czech Roma patients but not in the general Czech population. *Clin. Genet.* 82, 579–582. doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01817.x
- Sakaguchi, H., Tokita, J., Müller, U., Kachar, B., 2009. Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 17, 388–393. doi:10.1097/MOO.0b013e3283303472
- Salam, A.A., Häfner, F.M., Linder, T.E., Spillmann, T., Schinzel, A.A., Leal, S.M., 2000. A novel locus (DFNA23) for prelingual autosomal dominant nonsyndromic hearing loss

- maps to 14q21-q22 in a Swiss German kindred. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 1984–1988. doi:10.1086/302931
- Scheibe A., 1892. A case of deaf-mutism, with auditory atrophy and anomalies of development in the membranous labyrinth of both ears 1, 12–22.
- Schoen, C.J., Emery, S.B., Thorne, M.C., Ammana, H.R., Sliwerska, E., Arnett, J., Hortsch, M., Hannan, F., Burmeister, M., Lesperance, M.M., 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. doi:10.1073/pnas.1003027107
- Schönberger, J., Levy, H., Grünig, E., Sangwatanaroj, S., Fatkin, D., MacRae, C., Stäcker, H., Halpin, C., Eavey, R., Philbin, E.F., Katus, H., Seidman, J.G., Seidman, C.E., 2000. Dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss: a heritable syndrome that maps to 6q23-24. *Circulation* 101, 1812–1818.
- Schraders, M., Haas, S.A., Weegerink, N.J.D., Oostrik, J., Hu, H., Hoefsloot, L.H., Kannan, S., Huygen, P.L.M., Pennings, R.J.E., Admiraal, R.J.C., Kalscheuer, V.M., Kunst, H.P.M., Kremer, H., 2011. Next-generation sequencing identifies mutations of SMPX, which encodes the small muscle protein, X-linked, as a cause of progressive hearing impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 628–634. doi:10.1016/j.ajhg.2011.04.012
- Schrijver, I., 2004. Hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss: transforming silence to sound. *J. Mol. Diagn. JMD* 6, 275–284. doi:10.1016/S1525-1578(10)60522-3
- Schultz, J.M., Bhatti, R., Madeo, A.C., Turriff, A., Muskett, J.A., Zalewski, C.K., King, K.A., Ahmed, Z.M., Riazuddin, S., Ahmad, N., Hussain, Z., Qasim, M., Kahn, S.N., Meltzer, M.R., Liu, X.Z., Munisamy, M., Ghosh, M., Rehm, H.L., Tsilou, E.T., Griffith, A.J., Zein, W.M., Brewer, C.C., Riazuddin, S., Friedman, T.B., 2011. Allelic hierarchy of CDH23 mutations causing non-syndromic deafness DFNB12 or Usher syndrome USH1D in compound heterozygotes. *J. Med. Genet.* 48, 767–775. doi:10.1136/jmedgenet-2011-100262
- Schultz, J.M., Yang, Y., Caride, A.J., Filoteo, A.G., Penheiter, A.R., Lagziel, A., Morell, R.J., Mohiddin, S.A., Fananapazir, L., Madeo, A.C., Penniston, J.T., Griffith, A.J., 2005. Modification of human hearing loss by plasma-membrane calcium pump PMCA2. *N. Engl. J. Med.* 352, 1557–1564. doi:10.1056/NEJMoa043899
- Schulze-Bahr, E., Haverkamp, W., Wedekind, H., Rubie, C., Hördt, M., Borggreffe, M., Assmann, G., Breithardt, G., Funke, H., 1997. Autosomal recessive long-QT syndrome (Jervell Lange-Nielsen syndrome) is genetically heterogeneous. *Hum. Genet.* 100, 573–576.
- Scinicariello, F., Murray, H.E., Smith, L., Wilbur, S., Fowler, B.A., 2005. Genetic factors that might lead to different responses in individuals exposed to perchlorate. *Environ. Health Perspect.* 113, 1479–1484.
- Scott, D.A., Carmi, R., Elbedour, K., Yosefsberg, S., Stone, E.M., Sheffield, V.C., 1996. An autosomal recessive nonsyndromic-hearing-loss locus identified by DNA pooling using two inbred Bedouin kindreds. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 385–391.
- Scott, D.A., Wang, R., Kreman, T.M., Andrews, M., McDonald, J.M., Bishop, J.R., Smith, R.J., Karniski, L.P., Sheffield, V.C., 2000. Functional differences of the PDS gene product are associated with phenotypic variation in patients with Pendred syndrome and non-syndromic hearing loss (DFNB4). *Hum. Mol. Genet.* 9, 1709–1715.
- Scott, H.S., Kudoh, J., Wattenhofer, M., Shibuya, K., Berry, A., Chrast, R., Guipponi, M., Wang, J., Kawasaki, K., Asakawa, S., Minoshima, S., Younus, F., Mehdi, S.Q., Radhakrishna, U., Papasavvas, M.P., Gehrig, C., Rossier, C., Korostishevsky, M., Gal, A., Shimizu, N., Bonne-Tamir, B., Antonarakis, S.E., 2001. Insertion of beta-satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood

- onset autosomal recessive deafness. *Nat. Genet.* 27, 59–63. doi:10.1038/83768
- Seeman, P., Bendová, O., Rasková, D., Malíková, M., Groh, D., Kabelka, Z., 2005. Double heterozygosity with mutations involving both the GJB2 and GJB6 genes is a possible, but very rare, cause of congenital deafness in the Czech population. *Ann. Hum. Genet.* 69, 9–14. doi:10.1046/j.1529-8817.2003.00120.x
- 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. doi:10.1111/j.1399-0004.2004.00283.x
- 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. doi:10.1111/j.1399-0004.2006.00602.x
- Seri, M., Pecci, A., Di Bari, F., Cusano, R., Savino, M., Panza, E., Nigro, A., Noris, P., Gangarossa, S., Rocca, B., Gresele, P., Bizzaro, N., Malatesta, P., Koivisto, P.A., Longo, I., Musso, R., Pecoraro, C., Iolascon, A., Magrini, U., Rodriguez Soriano, J., Renieri, A., Ghiggeri, G.M., Ravazzolo, R., Balduini, C.L., Savoia, A., 2003. MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness. *Medicine (Baltimore)* 82, 203–215. doi:10.1097/01.md.0000076006.64510.5c
- Seviour, K.B., Hatamochi, A., Stewart, I.A., Bykhovskaya, Y., Allen-Powell, D.R., Fischel-Ghodsian, N., Maw, M.A., 1998. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. *Am. J. Med. Genet.* 75, 179–185.
- Sharghi, S., Haghpanah, V., Heshmat, R., Fard-Esfahani, A., Hadizadeh, H., Lashkari, A., Tabatabaei, O., Taheri, E., Motesaddi, M., Mojtahedi, A., Larijani, B., 2007. Comparison of MRI findings with traditional criteria in diagnosis of Pendred syndrome. *Int. J. Audiol.* 46, 69–74. doi:10.1080/14992020601002123
- Shears, D., Conlon, H., Murakami, T., Fukai, K., Alles, R., Trembath, R., Bitner-Glindzicz, M., 2004. Molecular heterogeneity in two families with auditory pigmentary syndromes: the role of neuroimaging and genetic analysis in deafness. *Clin. Genet.* 65, 384–389. doi:10.1111/j.0009-9163.2004.00235.x
- Shoffner, J.M., Lott, M.T., Lezza, A.M., Seibel, P., Ballinger, S.W., Wallace, D.C., 1990. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 61, 931–937.
- SIFT - Tool to predict nonsynonymous / missense variants [WWW Document], n.d. URL <http://sift.bii.a-star.edu.sg/index.html> (accessed 4.25.14).
- Silan, F., Demirci, L., Egeli, A., Egeli, E., Onder, H.I., Ozturk, O., Unal, Z.S., 2004. Syndromic etiology in children at schools for the deaf in Turkey. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 68, 1399–1406. doi:10.1016/j.ijporl.2004.05.007
- Sirmaci, A., Oztürkmen-Akay, H., Erbek, S., Incesulu, A., Duman, D., Taşir-Yilmaz, S., Ozdağ, H., Tekin, M., 2009. A founder TMIE mutation is a frequent cause of hearing loss in southeastern Anatolia. *Clin. Genet.* 75, 562–567. doi:10.1111/j.1399-0004.2009.01183.x
- Skubis-Zegadło, J., Nikodemaska, A., Przytuła, E., Mikula, M., Bardadin, K., Ostrowski, J., Wenzel, B.E., Czarnocka, B., 2005. Expression of pendrin in benign and malignant human thyroid tissues. *Br. J. Cancer* 93, 144–151. doi:10.1038/sj.bjc.6602628
- Smith, A.C., McGavran, L., Robinson, J., Waldstein, G., Macfarlane, J., Zonona, J., Reiss, J., Lahr, M., Allen, L., Magenis, E., 1986. Interstitial deletion of (17)(p11.2p11.2) in nine patients. *Am. J. Med. Genet.* 24, 393–414. doi:10.1002/ajmg.1320240303
- Smith, R.J., Van Camp, G., 1999. Non-syndromic hearing impairment: gene linkage and

- cloning. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 49 Suppl 1, S159–163.
- Starr, A., Picton, T.W., Sininger, Y., Hood, L.J., Berlin, C.I., 1996. Auditory neuropathy. *Brain J. Neurol.* 119 (Pt 3), 741–753.
- Stickler, G.B., Belau, P.G., Farrel, F.J., Jones, J.D., Pugh, D.G., Steinberg, A.G., Ward, L.E., 1965. HEREDITARY PROGRESSIVE ARTHRO-OPHTHALMOPATHY. *Mayo Clin. Proc.* 40, 433–455.
- Stinckens, C., Huygen, P.L., Joosten, F.B., Van Camp, G., Otten, B., Cremers, C.W., 2001. Fluctuant, progressive hearing loss associated with Menière like vertigo in three patients with the Pendred syndrome. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 61, 207–215.
- Stolbová, D., Mozný, J., Límanová, Z., Macurová, H., 1983. [Familial hyperthyroidism and cochlear hearing loss syndrome with manifestation at a young age]. *Ceskoslovenská Otolaryngol.* 32, 34–39.
- Street, V.A., Kallman, J.C., Robertson, N.G., Kuo, S.F., Morton, C.C., Phillips, J.O., 2005. A novel DFNA9 mutation in the vWFA2 domain of COCH alters a conserved cysteine residue and intrachain disulfide bond formation resulting in progressive hearing loss and site-specific vestibular and central oculomotor dysfunction. *Am. J. Med. Genet. A.* 139A, 86–95. doi:10.1002/ajmg.a.30980
- Sun, Y., Chen, J., Sun, H., Cheng, J., Li, J., Lu, Y., Lu, Y., Jin, Z., Zhu, Y., Ouyang, X., Yan, D., Dai, P., Han, D., Yang, W., Wang, R., Liu, X., Yuan, H., 2011. Novel missense mutations in MYO7A underlying postlingual high- or low-frequency non-syndromic hearing impairment in two large families from China. *J. Hum. Genet.* 56, 64–70. doi:10.1038/jhg.2010.147
- Tamagawa, Y., Kitamura, K., Ishida, T., Ishikawa, K., Tanaka, H., Tsuji, S., Nishizawa, M., 1996. A gene for a dominant form of non-syndromic sensorineural deafness (DFNA11) maps within the region containing the DFNB2 recessive deafness gene. *Hum. Mol. Genet.* 5, 849–852.
- Tamayo, M.L., Gelvez, N., Rodriguez, M., Florez, S., Varon, C., Medina, D., Bernal, J.E., 2008. Screening program for Waardenburg syndrome in Colombia: clinical definition and phenotypic variability. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A, 1026–1031. doi:10.1002/ajmg.a.32189
- Taylor, J.P., Metcalfe, R.A., Watson, P.F., Weetman, A.P., Trembath, R.C., 2002. Mutations of the PDS gene, encoding pendrin, are associated with protein mislocalization and loss of iodide efflux: implications for thyroid dysfunction in Pendred syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1778–1784. doi:10.1210/jcem.87.4.8435
- Tlili, A., Masmoudi, S., Dhouib, H., Bouaziz, S., Rebeh, I.B., Chouchen, J., Turki, K., Benzina, Z., Charfedine, I., Drira, M., Ayadi, H., 2007. Localization of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus DFNB63 to chromosome 11q13.3-q13.4. *Ann. Hum. Genet.* 71, 271–275. doi:10.1111/j.1469-1809.2006.00337.x
- Tlili, A., Rebeh, I.B., Aifa-Hmani, M., Dhouib, H., Moalla, J., Tlili-Chouchène, J., Said, M.B., Lahmar, I., Benzina, Z., Charfedine, I., Driss, N., Ghorbel, A., Ayadi, H., Masmoudi, S., 2008. TMC1 but not TMC2 is responsible for autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment in Tunisian families. *Audiol. Neurootol.* 13, 213–218. doi:10.1159/000115430
- Tranebjaerg, L., Hamel, B.C., Gabreels, F.J., Renier, W.O., Van Ghelue, M., 2000. A de novo missense mutation in a critical domain of the X-linked DDP gene causes the typical deafness-dystonia-optic atrophy syndrome. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 8, 464–467. doi:10.1038/sj.ejhg.5200483
- Tranebjaerg, L., Schwartz, C., Eriksen, H., Andreasson, S., Ponjavic, V., Dahl, A., Stevenson, R.E., May, M., Arena, F., Barker, D., 1995. A new X linked recessive deafness

- syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J. Med. Genet.* 32, 257–263.
- Tsukamoto, K., Suzuki, H., Harada, D., Namba, A., Abe, S., Usami, S., 2003. Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 11, 916–922. doi:10.1038/sj.ejhg.5201073
- Tyson, J., Bellman, S., Newton, V., Simpson, P., Malcolm, S., Pembrey, M.E., Bitner-Glindzicz, M., 1996. Mapping of DFN2 to Xq22. *Hum. Mol. Genet.* 5, 2055–2060.
- 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.
- Usami, S., Abe, S., Kasai, M., Shinkawa, H., Moeller, B., Kenyon, J.B., Kimberling, W.J., 1997. Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *The Laryngoscope* 107, 483–490.
- Usami, S., Abe, S., Weston, M.D., Shinkawa, H., Van Camp, G., Kimberling, W.J., 1999. Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. *Hum. Genet.* 104, 188–192.
- Usami, S., Nishio, S., Nagano, M., Abe, S., Yamaguchi, T., Deafness Gene Study Consortium, 2012. Simultaneous screening of multiple mutations by invader assay improves molecular diagnosis of hereditary hearing loss: a multicenter study. *PLoS One* 7, e31276. doi:10.1371/journal.pone.0031276
- Vahava, O., Morell, R., Lynch, E.D., Weiss, S., Kagan, M.E., Ahituv, N., Morrow, J.E., Lee, M.K., Skvorak, A.B., Morton, C.C., Blumenfeld, A., Frydman, M., Friedman, T.B., King, M.C., Avraham, K.B., 1998. Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science* 279, 1950–1954.
- Valentijn, L.J., Bolhuis, P.A., Zorn, I., Hoogendijk, J.E., van den Bosch, N., Hensels, G.W., Stanton, V.P., Jr, Housman, D.E., Fischbeck, K.H., Ross, D.A., 1992. The peripheral myelin gene PMP-22/GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat. Genet.* 1, 166–170. doi:10.1038/ng0692-166
- Valéro, R., Bannwarth, S., Roman, S., Paquis-Flucklinger, V., Vialettes, B., 2008. Autosomal dominant transmission of diabetes and congenital hearing impairment secondary to a missense mutation in the WFS1 gene. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 25, 657–661. doi:10.1111/j.1464-5491.2008.02448.x
- Valvassori, G.E., Clemis, J.D., 1978. The large vestibular aqueduct syndrome. *The Laryngoscope* 88, 723–728.
- Van Camp, G., Coucke, P.J., Kunst, H., Schattelman, I., Van Velzen, D., Marres, H., van Ewijk, M., Declau, F., Van Hauwe, P., Meyers, J., Kenyon, J., Smith, S.D., Smith, R.J., Djelantik, B., Cremers, C.W., Van de Heyning, P.H., Willems, P.J., 1997. Linkage analysis of progressive hearing loss in five extended families maps the DFNA2 gene to a 1.25-Mb region on chromosome 1p. *Genomics* 41, 70–74. doi:10.1006/geno.1997.4624
- Van Camp, G., Kunst, H., Flothmann, K., McGuirt, W., Wauters, J., Marres, H., Verstreken, M., Bernalova, I.N., Burmeister, M., Van de Heyning, P.H., Smith, R.J., Willems, P.J., Cremers, C.W., Lesperance, M.M., 1999. A gene for autosomal dominant hearing impairment (DFNA14) maps to a region on chromosome 4p16.3 that does not overlap the DFNA6 locus. *J. Med. Genet.* 36, 532–536.
- Van Drunen, F.J.W., Pauw, R.J., Collin, R.W.J., Kremer, H., Huygen, P.L.M., Cremers,

- C.W.R.J., 2009. Vestibular impairment in a Dutch DFNA15 family with an L289F mutation in POU4F3. *Audiol. Neurootol.* 14, 303–307. doi:10.1159/000212109
- Van Geel, M., van Steensel, M.A.M., Küster, W., Hennies, H.C., Happle, R., Steijlen, P.M., König, A., 2002. HID and KID syndromes are associated with the same connexin 26 mutation. *Br. J. Dermatol.* 146, 938–942.
- Van Hauwe, P., Everett, L.A., Coucke, P., Scott, D.A., Kraft, M.L., Ris-Stalpers, C., Bolder, C., Otten, B., de Vijlder, J.J., Dietrich, N.L., Ramesh, A., Srisailapathy, S.C., Parving, A., Cremers, C.W., Willems, P.J., Smith, R.J., Green, E.D., Van Camp, G., 1998. Two frequent missense mutations in Pendred syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1099–1104.
- Van Laer, L., Vrijens, K., Thys, S., Van Tendeloo, V.F.I., Smith, R.J.H., Van Bockstaele, D.R., Timmermans, J.-P., Van Camp, G., 2004. DFNA5: hearing impairment exon instead of hearing impairment gene? *J. Med. Genet.* 41, 401–406.
- Van Wijk, E., Krieger, E., Kemperman, M.H., De Leenheer, E.M.R., Huygen, P.L.M., Cremers, C.W.R.J., Cremers, F.P.M., Kremer, H., 2003. A mutation in the gamma actin 1 (ACTG1) gene causes autosomal dominant hearing loss (DFNA20/26). *J. Med. Genet.* 40, 879–884.
- Varga, R., Avenarius, M.R., Kelley, P.M., Keats, B.J., Berlin, C.I., Hood, L.J., Morlet, T.G., Brashears, S.M., Starr, A., Cohn, E.S., Smith, R.J.H., Kimberling, W.J., 2006. OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele. *J. Med. Genet.* 43, 576–581. doi:10.1136/jmg.2005.038612
- Variation Viewer: SLC26A4 [WWW Document], n.d. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/varvu?gene=5172&rs=7811324> (accessed 4.25.14).
- Verhoeven, K., Fagerheim, T., Prasad, S., Wayne, S., De Clau, F., Balemans, W., Verstreken, M., Schatteman, I., Solem, B., Van de Heyning, P., Tranebjärg, L., Smith, R.J., Van Camp, G., 2000. Refined localization and two additional linked families for the DFNA10 locus for nonsyndromic hearing impairment. *Hum. Genet.* 107, 7–11.
- Verhoeven, K., Van Laer, L., Kirschhofer, K., Legan, P.K., Hughes, D.C., Schatteman, I., Verstreken, M., Van Hauwe, P., Coucke, P., Chen, A., Smith, R.J., Somers, T., Offeciers, F.E., Van de Heyning, P., Richardson, G.P., Wachtler, F., Kimberling, W.J., Willems, P.J., Govaerts, P.J., Van Camp, G., 1998. Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat. Genet.* 19, 60–62. doi:10.1038/ng0598-60
- Veske, A., Oehlmann, R., Younus, F., Mohyuddin, A., Müller-Myhsok, B., Mehdi, S.Q., Gal, A., 1996. Autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB8) maps on chromosome 21q22 in a large consanguineous kindred from Pakistan. *Hum. Mol. Genet.* 5, 165–168.
- Vincent, C., Kalatzis, V., Abdelhak, S., Chaib, H., Compain, S., Helias, J., Vaneecloo, F.M., Petit, C., 1997. BOR and BO syndromes are allelic defects of EYA1. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 5, 242–246.
- Visser, L.E.L.M., van Ravenswaaij, C.M.A., Admiraal, R., Hurst, J.A., de Vries, B.B.A., Janssen, I.M., van der Vliet, W.A., Huys, E.H.L.P.G., de Jong, P.J., Hamel, B.C.J., Schoenmakers, E.F.P.M., Brunner, H.G., Veltman, J.A., van Kessel, A.G., 2004. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat. Genet.* 36, 955–957. doi:10.1038/ng1407
- Vozzi D, Giroto G, Faletra F, Abdulhadi K, Vuckovic D, D'Eustacchio A, Khalifa Alkowari M, Badii R, Gasparini P, 2013. Identification of new genes for Hereditary Hearing Loss (HHL) using linkage studies and Whole Exome Sequencing analysis. *Eur J Hum Genet* 21, 43.
- Wagatsuma, M., Kitoh, R., Suzuki, H., Fukuoka, H., Takumi, Y., Usami, S., 2007.

- Distribution and frequencies of CDH23 mutations in Japanese patients with non-syndromic hearing loss. *Clin. Genet.* 72, 339–344. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00833.x
- Walsh, T., Pierce, S.B., Lenz, D.R., Brownstein, Z., Dagan-Rosenfeld, O., Shahin, H., Roeb, W., McCarthy, S., Nord, A.S., Gordon, C.R., Ben-Neriah, Z., Sebat, J., Kanaan, M., Lee, M.K., Frydman, M., King, M.-C., Avraham, K.B., 2010. Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. *Am. J. Hum. Genet.* 87, 101–109. doi:10.1016/j.ajhg.2010.05.011
- Wang, Q.J., Li, Q.Z., Rao, S.Q., Lee, K., Huang, X.S., Yang, W.Y., Zhai, S.Q., Guo, W.W., Guo, Y.F., Yu, N., Zhao, Y.L., Yuan, H., Guan, J., Leal, S.M., Han, D.Y., Shen, Y., 2006. AUNX1, a novel locus responsible for X linked recessive auditory and peripheral neuropathy, maps to Xq23-27.3. *J. Med. Genet.* 43, e33. doi:10.1136/jmg.2005.037929
- Wattenhofer, M., Sahin-Calapoglu, N., Andreasen, D., Kalay, E., Caylan, R., Braillard, B., Fowler-Jaeger, N., Reymond, A., Rossier, B.C., Karaguzel, A., Antonarakis, S.E., 2005. A novel TMPRSS3 missense mutation in a DFNB8/10 family prevents proteolytic activation of the protein. *Hum. Genet.* 117, 528–535. doi:10.1007/s00439-005-1332-x
- Wayne, S., Robertson, N.G., DeClau, F., Chen, N., Verhoeven, K., Prasad, S., Tranebjärg, L., Morton, C.C., Ryan, A.F., Van Camp, G., Smith, R.J., 2001. Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum. Mol. Genet.* 10, 195–200.
- Weegerink, N.J.D., Schraders, M., Oostrik, J., Huygen, P.L.M., Strom, T.M., Granneman, S., Pennings, R.J.E., Venselaar, H., Hoefsloot, L.H., Elting, M., Cremers, C.W.R.J., Admiraal, R.J.C., Kremer, H., Kunst, H.P.M., 2011. Genotype-phenotype correlation in DFNB8/10 families with TMPRSS3 mutations. *J. Assoc. Res. Otolaryngol. JARO* 12, 753–766. doi:10.1007/s10162-011-0282-3
- Weil, D., Blanchard, S., Kaplan, J., Guilford, P., Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Levilliers, J., Weston, M.D., 1995. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 374, 60–61. doi:10.1038/374060a0
- 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. doi:10.1038/ng0697-191
- Weiss, S., Gottfried, I., Mayrose, I., Khare, S.L., Xiang, M., Dawson, S.J., Avraham, K.B., 2003. The DFNA15 deafness mutation affects POU4F3 protein stability, localization, and transcriptional activity. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7957–7964.
- Wetke, R., 1989. [Goiter of the tongue base and bilateral perceptive impairment of hearing]. *Ugeskr. Laeger* 151, 2734–2735.
- Wilkie, A.O., Slaney, S.F., Oldridge, M., Poole, M.D., Ashworth, G.J., Hockley, A.D., Hayward, R.D., David, D.J., Pulleyn, L.J., Rutland, P., 1995. Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat. Genet.* 9, 165–172. doi:10.1038/ng0295-165
- Woo, H.-M., Park, H.-J., Baek, J.-I., Park, M.-H., Kim, U.-K., Sagong, B., Koo, S.K., 2013. Whole-exome sequencing identifies MYO15A mutations as a cause of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in Korean families. *BMC Med. Genet.* 14, 72. doi:10.1186/1471-2350-14-72
- Wu, C.-C., Lu, Y.-C., Chen, P.-J., Yeh, P.-L., Su, Y.-N., Hwu, W.-L., Hsu, C.-J., 2010. Phenotypic analyses and mutation screening of the SLC26A4 and FOXI1 genes in 101

- Taiwanese families with bilateral nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct (DFNB4) or Pendred syndrome. *Audiol. Neurootol.* 15, 57–66.
doi:10.1159/000231567
- Yan, J., Pan, L., Chen, X., Wu, L., Zhang, M., 2010. The structure of the harmonin/sans complex reveals an unexpected interaction mode of the two Usher syndrome proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4040–4045. doi:10.1073/pnas.0911385107
- Yang, T., Gurrola, J.G., 2nd, Wu, H., Chiu, S.M., Wangemann, P., Snyder, P.M., Smith, R.J.H., 2009. Mutations of KCNJ10 together with mutations of SLC26A4 cause digenic nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 651–657. doi:10.1016/j.ajhg.2009.04.014
- Yang, T., Pfister, M., Blin, N., Zenner, H.P., Pusch, C.M., Smith, R.J.H., 2005. Genetic heterogeneity of deafness phenotypes linked to DFNA4. *Am. J. Med. Genet. A.* 139, 9–12. doi:10.1002/ajmg.a.30989
- Yang, T., Vidarsson, H., Rodrigo-Blomqvist, S., Rosengren, S.S., Enerback, S., Smith, R.J.H., 2007. Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). *Am. J. Hum. Genet.* 80, 1055–1063. doi:10.1086/518314
- 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. doi:10.1038/7693
- Yu, C., Meng, X., Zhang, S., Zhao, G., Hu, L., Kong, X., 2003. A 3-nucleotide deletion in the polypyrimidine tract of intron 7 of the DFNA5 gene causes nonsyndromic hearing impairment in a Chinese family. *Genomics* 82, 575–579.
- Yuan, H.J., Han, D.Y., Sun, Q., Yan, D., Sun, H.J., Tao, R., Cheng, J., Qin, W., Angeli, S., Ouyang, X.M., Yang, S.Z., Feng, L., Cao, J.Y., Feng, G.Y., Wang, Y.F., Dai, P., Zhai, S.Q., Yang, W.Y., He, L., Liu, X.Z., 2008. Novel mutations in the vWFA2 domain of COCH in two Chinese DFNA9 families. *Clin. Genet.* 73, 391–394.
doi:10.1111/j.1399-0004.2008.00972.x
- Zelante, L., Gasparini, P., Estivill, X., Melchionda, S., D'Agruma, L., Govea, N., Milá, M., Monica, M.D., 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.
- Zheng, J., Miller, K.K., Yang, T., Hildebrand, M.S., Shearer, A.E., DeLuca, A.P., Scheetz, T.E., Drummond, J., Scherer, S.E., Legan, P.K., Goodyear, R.J., Richardson, G.P., Cheatham, M.A., Smith, R.J., Dallos, P., 2011. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with alpha-tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4218–4223.
doi:10.1073/pnas.1005842108
- Zheng, Q.Y., Yan, D., Ouyang, X.M., Du, L.L., Yu, H., Chang, B., Johnson, K.R., Liu, X.Z., 2005. Digenic inheritance of deafness caused by mutations in genes encoding cadherin 23 and protocadherin 15 in mice and humans. *Hum. Mol. Genet.* 14, 103–111.
doi:10.1093/hmg/ddi010
- Zhu, M., Yang, T., Wei, S., DeWan, A.T., Morell, R.J., Elfenbein, J.L., Fisher, R.A., Leal, S.M., Smith, R.J.H., Friderici, K.H., 2003. Mutations in the gamma-actin gene (ACTG1) are associated with dominant progressive deafness (DFNA20/26). *Am. J. Hum. Genet.* 73, 1082–1091. doi:10.1086/379286
- Zina, Z.B., Masmoudi, S., Ayadi, H., Chaker, F., Ghorbel, A.M., Drira, M., Petit, C., 2001. From DFNB2 to Usher syndrome: variable expressivity of the same disease. *Am. J.*

Med. Genet. 101, 181–183.
Zong, L., Lu, C., Zhao, Y., Li, Q., Han, D., Yang, W., Shen, Y., Zheng, Q., Wang, Q., 2012.
Clue to a new deafness gene: a large Chinese nonsyndromic hearing loss family linked
to DFNA4. J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao 39, 653–657.
doi:10.1016/j.jgg.2012.11.002