

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A NEM SZINDRÓMÁS GENETIKAI EREDETŰ NAGYOTHALLÁS

Dr. Tóth Tímea



Témavezető: Prof. Dr. Sziklai István

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
FÜL-ORR-GÉGÉSZETI ÉS FEJ- NYAKSEBÉSZETI KLINIKA
DEBRECEN, 2003**

1. BEVEZETÉS

Az emberi kapcsolatokban a hallás a kommunikáció elengedhetetlen része. A halláskárosodás az egyik leggyakoribb érzékszervi megbetegedés, amely több mint 350 millió embert érint a világon. Mégis a nagyothallást, mint betegséget alábecsülik. Igaz, az életet nem veszélyeztető állapotról van szó, azonban az érintettek életminőségét jelentősen rontva komoly terhet ró rájuk mind a társadalmi, mind pedig a szakmai életükben. Az elmúlt néhány évtizedben a technika ugrásszerű fejlődésével lehetőség nyílt az említett betegcsoport életminőségének javítására. A hallás javítása mellett a hallásrehabilitáció és habilitáció fejlesztése is fontos feladat, hiszen a gyermek normális személyiségfejlődésében a hallásnak kiemelkedő szerepe van. Az időben észre nem vett nagyothallás esetén nem csak a gyermek beszédfejlődése marad el, hanem mentális fejlődése is. Ezért is fontos követelmény ma már, hogy a hallásszűrés perinatalis korban megtörténjen.

A nagyothallás (NH) okainak egyre kiterjedtebb kutatásai során kiderült, hogy a genetikai tényezőknek fontosabb szerepük van, mint azt korábban gondoltuk. Statisztikai adatok alapján minden 1/1000 gyermeknek prelingualis, azaz a beszédfejlődés előtt kezdődő nagyothallása van, melynek hátterében 60%-ban genetikai defektus áll (Morton, 1991). A percepció halláskárosodásért, mely lehet belső fül, hallóideg vagy hallópálya eredetű, a genetikai hibákon túl leggyakrabban az agyhártyagyulladás, ototoxicitás, trauma ill. a vérellátási zavarok a felelősek. A kongenitális nagyothallás etiológiája szerint beszélhetünk öröklődő és nem öröklődő formáról. A két csoport megoszlási aránya csak becsülhető a kifejezett heterogenitás és az öröklődő nagyothallásért felelős hiányzó molekuláris genetikai ismeretünk miatt. A különböző fenotípusok eltérő génben történt mutációkra vezethetők vissza, amely gének által kódolt fehérjék a belső fülben szerkezeti, motoros, transzkripció, transzport vagy egyéb feladatokat látnak el.

Az öröklődő nagyothallás klinikai felosztása történhet a társuló egyéb szimptómák alapján is. Így a szindrómás halláscsökkenés eseteiben a károsodott fehérjefunkció következményeként egyéb szervi anomáliák is társulnak az audiológiai tünethez, mint pl. váz- és izomrendszeri zavarok, pigmentzavar, szív ingervezetési zavar, vese, pajzsmirigy érintettség stb. Ezekben az esetekben az érintett gén által

kódolt hibás fehérjék nem csak a cochleában, hanem a szervezet más szöveteiben is expresszálnának és funkcionális zavart okozhatnak. A szindrómás nagyothallás az örökletes esetek 30%-ért felelős, míg az esetek többsége (70%) egyéb szimptomával nem társul. Ez utóbbin belül a leggyakoribb öröklésmenet az autoszómális recesszív (AR) (75-80%), míg 15-20%-ban autoszómális domináns (AD), 2-3%-ban pedig X nemi kromoszómához kötött öröklődés figyelhető meg (Cohen, 1995). Az esetek kevesebb, mint 1%-ban a mitokondriális DNS által kódolt öröklésmenetről van szó, amely szintén halláscsökkenést okozhat (Hu, 1991). A különböző öröklésmenet legtöbbször eltérő klinikai megjelenéssel társul, bár sokszor azonos tünetekhez eltérő genetikai hiba párosul. A nagyothallás kutatását megnehezíti a belső fül kicsiny mérete és rejtett helyzete. A perifériás hallás mechanizmusát leíró elméletek pontosítása napjainkban is aktuális feladat, melynek megértéséhez az elmúlt évtizedben történt genetikai vizsgálatok nagyban hozzájárultak. A genetikai vizsgálatokat nehezíti, hogy a génkutatáshoz olyan több generációs nagyothalló családokra van szükség, ahol az öröklődésben az egyszerű mendeli törvények jól követhetők. A technika fejlődésének köszönhetően az utóbbi évtizedben sikerült automatizált kapcsoltság- ill. expresszióanalízissel, szekvenálással egyre több hallásért felelős lokuszt és gént azonosítani. A genetikai nagyothallás kutatásának első eredményei csak a 90-es évek elején lettek ismertek, ami eleinte a lokuszok azonosítását jelentette a kromoszómákon. Feltehetően közel 200 gén felelős a hallásért, melyből 1996-ban még csak egy volt ismert. Jelenleg több mint 70 lokuszt és 30 gént ismerünk. Ma már a DNS technikák elterjedésének köszönhetően rutin feladattá vált a humán gének izolálása és vizsgálata.

Több országban végzett vizsgálatok szerint mind a familiárisan, mind a sporadikusan öröklődő esetekben a veleszületett nem szindrómás nagyothallás legfőbb oka a *GJB2* (Gap Junction protein, Beta 2) génben történt mutáció. Az 1997 óta ismert *GJB2* gén egy Connexin 26 nevű proteint kódol, ami a gap junction proteinek családjába tartozik, s a belső fülben a káliumion (K^+) recirkulációját biztosítja. Munkánk során Északkelet-Magyarország területéről gyűjtöttünk olyan nem szindrómás nagyothalló eseteket, ahol feltételezhető volt a familiárisan ill. sporadikusan fellépő genetikai eredet, erre vonatkozó adatok jelenleg nem állnak rendelkezésre Magyarországon. Célunk volt megvizsgálni a magyar populációban (beteg és kontroll csoport) az említett gén nem szindrómás nagyothallásért felelős mutációk előfordulási

gyakoriságát. Az általunk vizsgált másik genetikai eltérés egy mitokondriális mutáció (A1555G) volt, mely a 12S rRNS molekula konzervatív régiójában fordul elő, s az érintett személyekben aminoglikozid antibiotikum érzékenységet indukál. Továbbá célunk volt olyan több generációs, halmozottan előforduló nagyothalló családok gyűjtése, ahol a fent említett genetikai eltérések nem voltak kimutathatók, de monogénis defektust feltételezve lokusz és génidentifikálás történhetett kapcsoltság analízissel.

Vizsgálati adatainkkal az említett génhibák gyakoriságát akartuk megállapítani Magyarország északkeleti régiójának lakosságában. Az eddigi genetikai ismereteink az említett génekről segítenek abban, hogy az érintett személyeknek genetikai tanácsadás történhessen a betegség kialakulásáról, öröklődéséről, patomechanizmusáról ill. gyermekvállalás esetén a nagyothalló gyermek születésének esélyeiről.

Ez a tanulmány egy kooperáció eredménye, amely a Debreceni Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, valamint a Tübingeni Egyetem Fül-Orr-Gégeklinika, a Tübingeni Humán Genetika Intézet és a Debreceni Egyetem Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet együttműködése révén jött létre.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A gyermekkori hallászavarok kérdése már hosszú idő óta áll az orvostudomány és a fül-orr-gégészeti gyakorlat középpontjában. Az esetek nagyobb részében (60%) molekuláris genetikai eltérésről van szó, bár ma még nem teljeseek a hallás genetikai ismereteink. Ennek a területnek a teljes feltérképezése elengedhetetlen ahhoz, hogy megértsük a hallás ill. a nagyothallás bonyolult patomechanizmusát, jobb lehetőséget nyújtva ezzel a hatékony terápiára.

Hartmann és Politzer, nem sokkal Gregor Mendel brünni szerzetes öröklési törvényeinek megjelenése után (Mendel, 1865) írásaikban már emlegetik a genetika fontos szerepét a nagyothallás etiológiájában (Hartmann, 1880; Politzer 1887). Ennek bizonyításához a technika fejlődésére volt szükség, ami XX. század végéig váratott magára. Az első nagyothallásért felelős lokusz azonosítása az X kromoszómán történt (Wallis, 1988). A nem szindrómás nagyothallás történetében a nagy vízvázlatzó 1997-ben volt, amikor három egymástól független munkacsoport közel azonos időben jelentette meg közleményeit a *GJB2* génről (Denoyelle, 1997; Kelsell, 1997; Zelante, 1997). Azóta számos szindrómás és nem szindrómás nagyothallásért felelős lokuszt és gént sikerült már azonosítani.

Az öröklődő nagyothallás csoportosítása különböző szempontok alapján történhet, mint például a hallásvesztés mértéke, a betegség kezdete, típusa, más tünetekkel történő társulása stb. (*I. táblázat*). A különböző öröklésmenetek legtöbbször eltérő fenotípussal társulnak, de nem olyan mértékben, hogy abból a génre egyértelműen következtetni lehetne. Egyszerűsítve elmondható, hogy az autoszómális recesszív öröklődésű nagyothallás prelingualis kezdetű, súlyosabb a klinikai képe (minden frekvenciatartományt érint), progresszió nélküli, míg az autoszómális domináns esetekben a nagyothallás kezdetben enyhébb fokú, később progrediál és gyakran csak bizonyos frekvenciatartományokat érint (*II. táblázat*).

I. táblázat: A nagyothallás (NH) osztályozása különböző szempontok alapján

Osztályozás	
Nagyothallás mértéke	- kisfokú: 20- 39 dB - közepes fokú: 40- 69 dB - nagyfokú: 70- 95 dB - siketséggel határos: > 95 dB
Nagyothallás kezdete	- prelingualis: beszédfejlődés előtt - posztlingualis: beszédfejlődés után
Típusa	- vezetékes: külső vagy középfül eredetű - percepciós: cochlearis vagy retrocochlearis eredetű - kevert
Érintett frekvenciák	- mély frekvenciák: 250- 500 Hz - közép frekvenciák: 500- 2000 Hz - magas frekvenciák: 2000- 8000 Hz
Egyoldali / Kétoldali	- szimmetrikus - aszimmetrikus: >15 dB hallásküszöb a két oldal között (1-4 kHz)
Progresszió	- progrediál - stabil
Szindrómás / Nem szindrómás	- szindrómás: a nagyothallás egyéb klinikai szimptomáival társul - nem szindrómás: a nagyothallás egyéb szimptomáival nem társul

II. táblázat: Az autoszómális recesszíven ill. autoszómális dominánsan öröklődő NH fenotípus jellemzői

Szempontok	autoszómális recesszív	autoszómális domináns
Előfordulási gyakorisága	75-80%	15-20%
Hallásvesztés mértéke	nagyfokú v. siketséggel határos	kis-, közepes fokú
NH kezdete	prelingualis	pre- / posztlingualis
Típusa	percepciós	percepciós
Érintett frekvenciák	minden frekvencia	főleg a magas frekvenciatartomány
Érintett oldal	kétoldali	kétoldali
Progresszió	nem jellemző	jellemző

2.1. SZINDRÓMÁS NAGYOTHALLÁS

A genetikai eredetű halláskárosodások 30%-a szindrómás formában fordul elő, azaz a nagyothallás egyéb anomáliákkal társul, mint pl. izom- és vázrendszer, idegrendszer, szív, szem, bőr, urogenitális rendszer, endokrin szervek eltérései. A különböző szindrómás nagyothallással járó betegségek száma több mint 400 (OMIM, 2002), míg az egyéb fül-orr-gégészeti fejlődési rendellenességgel társuló szindrómás kórképek száma több mint ezer. Ezekben az esetekben a genetikai mutáció nem csak a cochleában okoz zavart, hanem az egyéb szövetekben is. Sőt, eltérő génhibák azonos tüneteket is eredményezhetnek, mint ahogy ez pl. 1. típus. Usher szindrómát okozó négy különböző génben (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*) történt hibáknál megfigyelhető (III. táblázat). A szindrómás nagyothallás eseteire is elmondható, hogy azonos mutációk mellett a klinikai kép igen változó lehet, megnehezítve ezzel a tünetek alapján történő meghatározásukat. Néhány gyakrabban előforduló szindrómás nagyothallás jellemzőit mutatja be a III. táblázat (III. táblázat).

2.2. NEM SZINDRÓMÁS NAGYOTHALLÁS

Már az első „siketségért” felelős gén identifikálásakor ismert volt, hogy függetlenül az autoszómális domináns vagy recesszív öröklésmenettől egy heterogén megbetegedésről van szó. Pontos adatunk még nincs, de hozzávetőlegesen 100-150 gén okoz monogénes, nem szindrómás nagyothallást (Morton, 1991). A 90-es évek elején még csak néhány lokuszt és még kevesebb gént identifikáltak, de ma már több mint 70 hallásért felelős lokusz és 30 gén ismert, melyek száma évről évre nő. A nemzetközi konvenció szerint a nem szindrómás nagyothallásért felelős lokusz rövidítése DFN (DeaFNess), melynek számozása az azonosítás időrendi sorrendjében történik. Az öröklésmenetnek megfelelően külön jelöljük az autoszómális domináns (DFNA), az autoszómális recesszív (DFNB) ill. az X kromoszómához kötött öröklődést (DFN).

III. táblázat: Néhány gyakoribb szindrómás nagyothallás jellemző genotípusa és fenotípusa. (NH: nagyothallás, AD: autoszómális domináns, AR: autoszómális recesszív, X krom.: X-nemi kromoszómához kötött öröklődés)

Szindróma	Egyéb anomális	Öröklődés módja	Lokalizáció	Gén
Alport	Glomerulonephritis ocularis anomália NH	X krom.	Xq22.3	<i>COL4A5</i>
		AR	2q36-37	<i>COL4A3/</i> <i>COL4A4</i>
BOR (Branchio- Oto-Renalis)	Renalis anomália fül malformáció (NH)	AD	8q13.3	<i>EYA1</i>
	cervicalis fistula		1q31	ismeretlen
LQT	Cardialis arrhythmia NH	AD	11p15.5	<i>KCNQ1</i> (LQT1)
		AD	7q35-36	<i>HERG</i> (LQT2)
		AD (Romano-Ward- szindróma)	3p21-24	<i>SCN5A</i> (LQT3)
		AR	4q25- 27	ismeretlen (LQT4)
		AR (Jervell-Lange- Nielson-szindróma)	21q22.1	<i>KCNE1</i> (LQT5)
			21q22.1	<i>KCNE2</i> (LQT6)
Pendred	Diffúz thyroid megnagyobbodás (golyva), cochlea fejlődési rendellenesség (NH)	AR	7q31	<i>SLC26A4</i> (<i>Pendrin</i>)
Stickler	Retina degeneráció izületi degeneráció abnormális epiphysealis fejlődéssel, NH	AD	12q13.11-13.2	<i>COL2A1</i> (STL1)
	arc hypoplasia, csigolyatest deformitás, NH		1p12	<i>COL11A1</i> (STL2)
	szájpadhasadék		6p21.3	<i>COL11A2</i> (STL3)
Usher	Retinitis pigmentosa cochlea degeneráció (NH) vesztibuláris tünet	AR	14q32	ismeretlen (USH1A)
			11q13.5	<i>MYO7A</i> (USH1B)
			11p15.1	<i>USH1C</i> (USH1C)
			10q	<i>CDH23</i> (USH1D)
			21q	ismeretlen (USH1E)
			10q21-22	<i>PCDH15</i> (USH1F)
			1q41	<i>USH2A</i> (USH2A)
			3p23-24.2	ismeretlen (USH2B)
			5q14.3-21.3	ismeretlen (USH2C)
Waardenburg	Dystopia canthorum, pigment anomália NH	AD	3q21-25	<i>USH3</i> (USH3)
			2q35	<i>PAX 3</i> (WS1)
			3p14.1-12.3	<i>MITF</i> (WS2)
			2q35	<i>PAX 3</i> (WS3)
			13q22	<i>EDNRB</i> (WS4)
			20q13.2-13.3	<i>EDN3</i> (WS4)
			22q13	<i>SOX10</i> (WS4)

2.2.1. AUTOSZÓMÁLIS DOMINÁNS NEM SZINDRÓMÁS NAGYOTHALLÁS (DFNA)

A genetikai eredetű halláscsökkenet esetek 15-20%-a autoszómális domináns öröklésmenetet mutat, azaz a mutáns gén már minden hordozó egyénben hallássérülést okoz és minden generációban megjelenik nemtől függetlenül. Az érintett heterozigóta személyek házasságából körülbelül 1:1 arányban születnek jelleghordozó és normális fenotípusú utódok, ami gyakran csak késő gyermekkorban vagy fiatal felnőttkorban manifesztálódik, s legtöbbször progrediál. Máig több mint 35 lokuszt és 17 gént írtak le domináns öröklésmenettel (*IV. táblázat*).

2.2.2. AUTOSZÓMÁLIS RECESSÍV NEM SZINDRÓMÁS NAGYOTHALLÁS (DFNB)

A recesszíven öröklődő genetikai eltérés akkor manifesztálódik, ha az egyén a mutációra nézve homozigóta genotípussal rendelkezik. Így azok tünetmentesek maradnak, akik csak az egyik allélon hordozzák a genetikai hibát, amely akár több generáción keresztül is rejtve maradhat. A fenotípus szempontjából egészséges hordozók házasságából egészséges és beteg gyermekek egyaránt születhetnek 3:1 arányban. Így csak azokat a heterozigótákat ismerjük fel, akiknek legalább egy hallássérült gyermekük van. A genetikai eredetű nagyothallások legnagyobb csoportját ez az öröklésforma teszi ki, melyre általában a prelingualis kezdet és a minden frekvenciát érintő nagyfokú percepció típusú NH jellemző. A homozigóta beteg gyermekek rendszerint nem tanulnak meg beszélni és egymással jelbeszéddel kommunikálnak. Az érintett gének azonosítása az extrém genetikai heterogenitás miatt igen nehéz, és nem is lehetséges csupán a fenotípus alapján elkülöníteni a különböző géndefektusokat.

A lokuszok azonosítására többféle módszerrel van lehetőség. Az egyik a kapcsoltság analízis, amelyhez nagy, izolált családokra van szükség legalább 8-10 érintett és ugyanennyi normál halló személlyel. A hallásért felelős lokuszok egész sorát azonosították ezzel a módszerrel (DFNB1, DFNB2, DFNB4, DFNB8, DFNB9 stb.). Másik lehetőség a homozigóta analízis, ami már kisebb családokban is eredményt hozhat (DFNB5, DFNB6, DFNB7 stb.). Lényege, hogy az érintett testvérpároknak a betegség lokuszára homozigótáknak kell lenniük, s összehasonlítva őket a család

egészséges tagjaival a speciális régió behatárolható. A harmadik módszerrel nem kis családokat, hanem izolált populációkat lehet vizsgálni, ha bennük az átlagosnál gyakrabban jelentkezik egy adott betegség (DFNB3). Jelenleg 33 lokusz és 15 AR gén ismert (V. táblázat).

IV. táblázat: A jelenleg ismert autoszómális domináns öröklésmenetű, nem szindrómás nagyothallásért felelős lokuszok és gének (Van Camp és Smith, 2003)

Név	Lokalizáció	Gén	Referencia
DFNA1	5q31	<i>HDIA1</i>	Leon, 1992; Lynch, 1997
DFNA2	1p34	<i>GJB3</i> <i>KCNQ4</i>	Coucke, 1994; Xia, 1999; Kubisch, 1999
DFNA3	13q12	<i>GJB2</i> <i>GJB6</i>	Chaib, 1994; Denoyelle, 1998; Grifa, 1999
DFNA4	19q13	ismeretlen	Chen, 1995
DFNA5	7p15	<i>DFNA5</i>	Van Camp, 1995; Van Laer, 1998
DFNA6	4p16.3	<i>WFS1</i>	Lesperance, 1996; Bepalova, 2001
DFNA7	1q21-q23	ismeretlen	Fagerheim, 1996
DFNA8	11q22-24	<i>TECTA</i>	Kirschhofer, 1996; Verhoeven, 1998
DFNA9	14q12-q13	<i>COCH</i>	Manolis, 1998; Robertson, 1998
DFNA10	6q22-q23	<i>EYA4</i>	O'Neill, 1996; Wayne, 2001
DFNA11	11q12.3-q21	<i>MYO7A</i>	Tamagawa, 1996; Liu, 1997
DFNA12	11q22-q24	<i>TECTA</i>	Verhoeven, 1997, 1998
DFNA13	6p21	<i>COL11A2</i>	Brown, 1997; McGuirt, 1999
DFNA14	4p16	<i>WFS1</i>	Van Camp, 1999; Bepalova 2001
DFNA15	5q31	<i>POU4F3</i>	Vahava, 1998
DFNA16	2q24	ismeretlen	Fukushima, 1999
DFNA17	22q	<i>MYH9</i>	Lalwani, 1999, 2000
DFNA18	3q22	ismeretlen	Boensch, 1998
DFNA19	10 pericentr.	ismeretlen	Green, 1998
DFNA20	17q25	ismeretlen	Morell, 2000
DFNA21	6p21	ismeretlen	Kunst, 2000
DFNA22	6q13	<i>MYO6</i>	Melchionda, 2001
DFNA23	14q21-q22	ismeretlen	Salam, 1999
DFNA24	4q	ismeretlen	Hafner, 1999
DFNA25	12q21-24	ismeretlen	Greene, 1999
DFNA26	17q25	ismeretlen	Yang, 2000
DFNA27	4q12	ismeretlen	Fridell, 1999
DFNA28	8q22	<i>TFCP2L3</i>	Anderson, 1999; Peters, 2002
DFNA30	15q26	ismeretlen	Mangino, 1999
DFNA32	11p15	ismeretlen	Li, 2000
DFNA34	1q44	ismeretlen	Kurima, 2000
DFNA36	9q13-q21	<i>TMCI</i>	Kurima, 2000; Kurima, 2002
DFNA37	1p21	ismeretlen	Talebizadeh, 2000
DFNA38	4p16	<i>WFS1</i>	Young, 2001
DFNA39	4q21.3	<i>DSPP</i>	Xiao, 2001
DFNA41	12q24-qter	ismeretlen	Blanton, 2002
DFNA44	3q28-29	ismeretlen	Modamio-Hoybjor, 2003

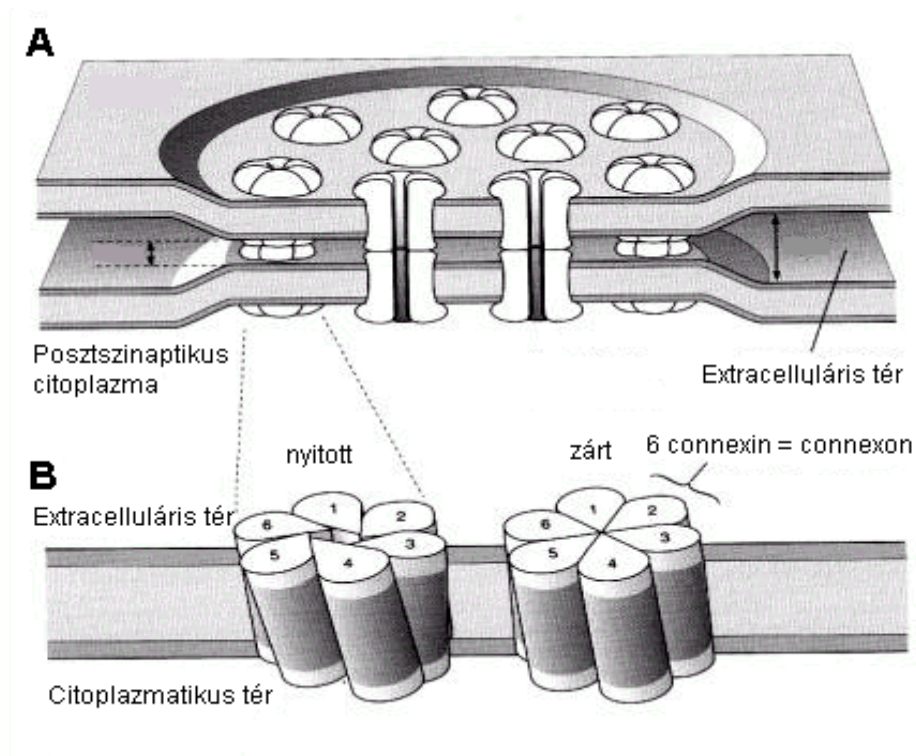
V. táblázat: A jelenleg ismert autoszómális recesszív öröklésmenetű, nem szindrómás nagyothallásért felelős lokuszok és gének (Van Camp és Smith, 2003)

Név	Lokalizáció	Gén	Referencia
DFNB1	13q12	<i>GJB2</i>	Guilford, 1994 Kelsell, 1997
DFNB2	11q13.5	<i>MYO7A</i>	Guilford, 1994 Liu, 1997; Weil, 1997
DFNB3	17p11.2	<i>MYO15</i>	Friedman, 1995 Wang, 1998
DFNB4	7q31	<i>SLC26A4</i>	Baldwin, 1995 Li, 1998
DFNB5	14q12	ismeretlen	Fukushima, 1995
DFNB6	3p14-p21	<i>TMIE</i>	Fukushima, 1995
DFNB7	9q13-q21	<i>TMC1</i>	Jain, 1995 Kurima, 2002
DFNB8	21q22	<i>TMPRSS3</i>	Veske, 1996 Scott, 2000
DFNB9	2p22-p23	<i>OTOF</i>	Chaib, 1996 Yasunaga, 1999
DFNB10	21q22.3	<i>TMPRSS3</i>	Bonne-Tamir, 1996 Scott, 2000
DFNB11	9q13-q21	<i>TMC1</i>	Scott, 1996 Kurima, 2002
DFNB12	10q21-q22	<i>CDH23</i>	Chaib, 1996 Bork, 2001
DFNB13	7q34-36	ismeretlen	Mustapha, 1998
DFNB14	7q31	ismeretlen	Mustapha, 1998
DFNB15	3q21-q25 19p13	ismeretlen	Chen, 1997
DFNB16	15q15-q22	<i>STRC</i>	Campbell, 1997 Verpy, 2001
DFNB17	7q31	ismeretlen	Greinwald, 1998
DFNB18	11p14-15.1	<i>USH1C</i>	Jain, 1998
DFNB19	18p11	ismeretlen	Green, 1998)
DFNB20	11q25-qter	ismeretlen	Moynihan, 1999
DFNB21	11q	<i>TECTA</i>	Mustapha, 1999
DFNB22	16p12.2	<i>OTOA</i>	Zwaenepoel, 2002
DFNB23	10p11.2-q21	ismeretlen	Smith R, közlés alatt
DFNB24	11q23	ismeretlen	Smith R, közlés alatt
DFNB25	4p15.3-q12	ismeretlen	Smith R, közlés alatt
DFNB26	4q31 modifikáló: 1q24	ismeretlen	Riazzudin, 2000
DFNB27	2q23-q31	ismeretlen	Pulley, 2000
DFNB28	22q13	ismeretlen	Walsh, 2000
DFNB29	21q22	<i>CLDN14</i>	Wilcox, 2000
DFNB30	10p	<i>MYO3A</i>	Walsch, 2002
DFNB31	9q32-q34	ismeretlen	Mustapha, 2002
DFNB32	1p13.3-22.1	ismeretlen	Hamadi Ayadi, közlés alatt
DFNB33	9q34.3	ismeretlen	Medlej-Hashim, 2002

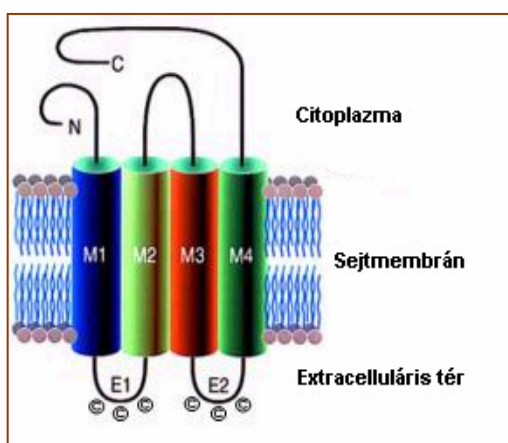
CONNEXIN 26, GAP JUNCTION PROTEIN

Egy tunéziai családon végzett kapcsoltág analízis vizsgálat eredményeként az első nem szindrómás, recesszíven öröklődő nagyothallásért felelős lokuszt (DFNB1) a 13q12 kromoszómán 1994-ben identifikálták (Guilford, 1994). Az ezt követő tanulmányok szintén megerősítették, hogy ezen a kromoszóma régióan egy fontos génnek kell lennie, mely az örökletes nagyothallásokban fontos szerepet játszik. Ugyanebben az évben egy francia család esetében ehhez a régióhoz kötődve (13q12) autoszómális dominánsan öröklődő nagyothallásról számoltak be (DFNA3) (Chaib, 1994). Csak 3 év múlva sikerült az említett régiót 14 cM-re behatárolni (Gasparini, 1997). Még ebben az évben az itt lokalizálódó gént (*GJB2*) egymástól több független munkacsoport identifikálta. A gént domináns öröklésmentet mutató percepciós nagyothallással és palmoplantaris keratodermával társuló családban is analizálták (Kelsell, 1997). A másik munkacsoport 5 cM intervallumban határolta be az említett lokuszt, mely a Connexin 26 fehérjét kódoló gént tartalmazza. Ezt követően a gén szekvenálása rámutatott arra, hogy az általuk megvizsgált esetek 63%-ban egy speciális deléció, a 35delG volt kimutatható (Zelante, 1997). Azóta a világ több országában végzett molekuláris biológiai vizsgálatok igazolták, hogy ez a gén felelős az összes autoszómális recesszív, nem szindrómás nagyothalló esetek kb. 60-70%-ért.

A *GJB2* gén egy Connexin 26 (Cx26) nevű fehérjét kódol, mely a gap junction proteinek családjába tartozik. Az eddig ismert húsz különböző connexint négy alcsoportba soroljuk (α , β , γ és nem klasszifikálható csoport). A genomiális struktúrája az α - és β -connexineknek nagyon hasonló. Két exonjuk van, de az első egy nem kódoló exon, míg a második tartalmazza az egész kódoló szakaszt. Jelenleg 6 β -connexint ismerünk (Cx26, Cx30, Cx30.3, Cx31, Cx31.1, Cx32). Hat connexin fehérje a sejtmembránba épülve alkot egy connexont, s két szomszédos sejt connexonja képez egy komplett intercelluláris csatornát (gap junction), amelyen keresztül a két sejt között az extracelluláris tér kihagyásával molekulák áramlása történik. Az 1,2 nm átmérőjű csatornán 1000 daltonnál kisebb molekulasúlyú molekulák passzívan áramolhatnak (1. ábra).



1. ábra: (A): Két szomszédos sejt connexonjából felépülő gap junction csatorna szerkezete. (B): A connexon konfigurációjának változtatásával nyitható és zárható a csatorna (Bruzzone, 1996)

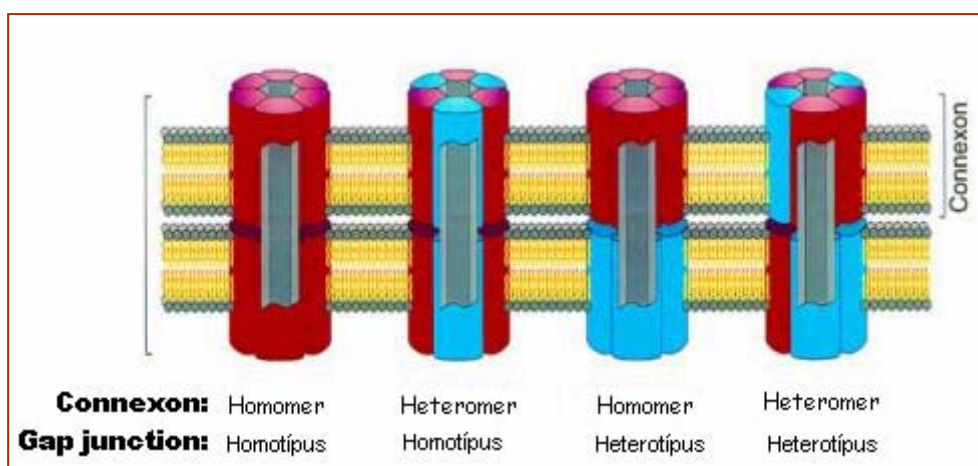


Az említett protein többféle sejtben expresszálódik, mint pl.: neuron, glia, szívizom, simaizom, máj ill. a cochlea bizonyos sejtjei. A Connexin 26 összesen 9 domainból áll (4 transzmembrán, 2 extracelluláris és 3 citoplazmatikus) (2. ábra). A fehérje szerkezeti stabilitását a domáinek közti disszulfid hidak biztosítják.

2. ábra: Connexin 26 fehérje 4 transzmembrán, 2 extracelluláris és 3 citoplazmatikus domainból áll (Kumar és Gilula, 1996)

A Cx26 makromolekuláris szerkezetére jellemző, hogy más connexin molekulákkal is képes connexont ill. gap junction csatornát képezni (Lautermann, 1998; Adams, 2000). A Cx26 molekulát expresszáló sejtek felszínén Cx30 fehérjét is kimutattak, valamint jóval kisebb mennyiségben Cx43-t. A Cx26 és Cx43 fehérjék funkcionálisan inkompatibilisek és nem képesek egymással heteromer connexont képezni (Elfgang, 1995). Cx31 expressziót fetális egér cochlea spiralis ligamentum és a limbus spiralis fibrocitáiban azonosítottak (Xia, 2000).

Abban az esetben, ha a csatorna csak egyfajta fehérjéből épül fel, beszélünk homomer-homotípusos csatornáról. Ellenben ha egy connexon összetétele heterogén és a csatorna sem identikus connexonokból áll, nevezzük heteromer-heterotípusos csatornának (3. ábra).

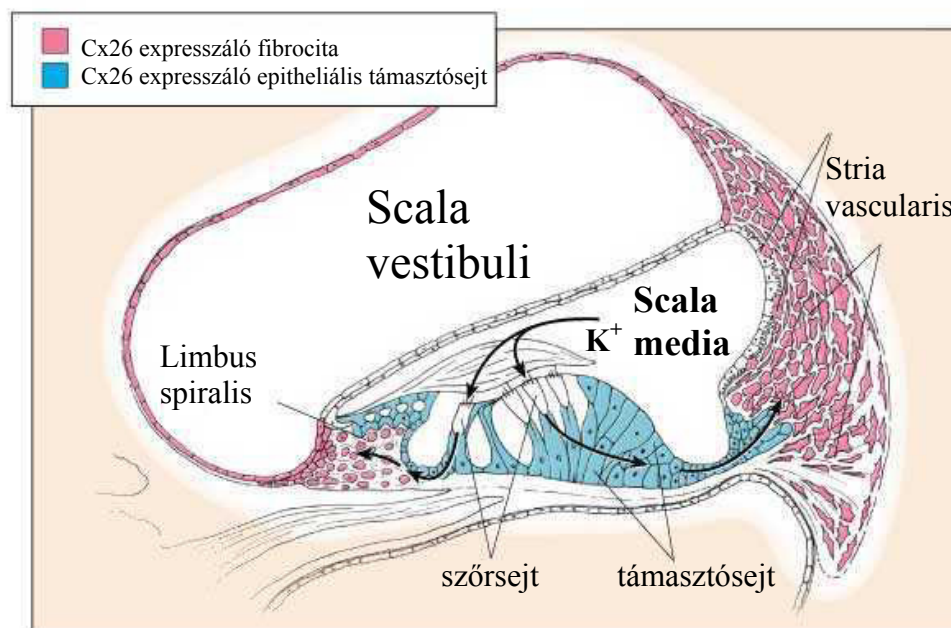


3.ábra: Gap junction csatorna szerkezeti variációi connexin molekulákból (Kumar és Gilula, 1996)

A csatorna nyitását több faktor is szabályozhatja. Vannak foszforiláció útján szabályozott csatornák, de lehet a csatorna működése feszültségfüggő, pH-regulált vagy egyéb faktorkhoz kötött. A gap junction permeabilitás szabályozásának három formája van (gyors, közepes, megnyúlt), és ezek közül a mutációk leggyakrabban a megnyúlt formát érintik (Holder, 1993).

Az emlős cochleában végzett immunhisztokémiai vizsgálatok két, Connexin 26 molekulákból álló gap junction hálózatot igazolt, melyeken keresztül a káliumion (K^+)

recirkulációja történik a csigában. Az egyik az epithelialis gap junction rendszer, amely összeköttetést biztosít az összes támasztósejt, Claudius-sejtek, bazális sejtek és interdentalis sejtek között, de a külső, belső szőrsejtek membránjában nem volt kimutatható Connexin 26 protein. A második hálózat tagjai mesenchymalis eredetűek, melyet a ligamentum spirale és a limbus spirale fibrocytai, valamint a stria vascularis bazális és intermedier sejtjei alkotják (Kikuchi, 2000).



4. ábra: K^+ recirkuláció a cochleában. A piros jelzés az epithelialis gap junction hálózat elemeit tartalmazza, míg késsel a mesenchymalis rendszer látható. Az ábrán a nyilak a K^+ recirkulációját szemléltetik a scala mediából a stria vascularis felé (Kikuchi, 2000)

A stria vascularis marginalis sejtjei juttatják a perilymphából eredő K^+ -t az endolymphába. Az intrastrialis térből a marginális sejtekbe a K^+ aktív felvétele a sejt bazolaterális membránjában lévő $Na^+-K^+-ATPáz$ és $Na^+-K^+-2Cl^-$ -kotranszporter segítségével történik, majd a K^+ -t az apikális felszínükön keresztül az endolymphába bocsátják, így az endolymphatikus térben +80 mV körüli egyenáramú potenciált tartva fenn. Akusztikus inger hatására a sejtek sztereociliumai deflektálódnak és K^+ áramlik be az endolymphából a sejtekbe. Ez a mechano-elektrikus transzdukció, mely receptor potenciál kialakulásához vezet. A K^+ fluxus a sejt bazolaterális részén kilépő K^+ révén

repolarizációhoz vezet és ezt követően a K^+ az epithelialis majd a kötőszöveti gap junction hálózaton keresztül recirkulálódik a stria vascularis bazális és intermedier sejtjeihez, innen továbbadódik a marginális sejteknek, hogy azok ismét az endolymphába juttathassák (4. ábra) (Kikuchi, 2000). A hálózat funkcionális károsodása az endocochlearis potenciál csökkenését és ezzel együtt nagyothallást eredményez.

A *GJB2* a kis gének csoportjába tartozik, csupán egy kódoló exonja van. Az általa kódolt Connexin 26 protein 226 aminosavból áll. Európában a leggyakoribb patológiás eltérést okozó genetikai hibája a 35delG mutáció, amely a recesszíven öröklődő nagyothalló esetek több mint 50%-ért felelős. A 35delG deléciót mind a familiáris, mind pedig a sporadikus esetekben kialakuló nem szindrómás nagyothallás legfőbb okaként még 1997-ben több nagyothalló populációban kimutatták (Denoyelle, 1997). A mutáció prevalenciája Európában átlag 1:50, de ez az érték szignifikánsan alacsonyabb az észak-európai országokban és Közép-Európában (1:75), de magasabb a mediterrán térségben (1:35) (VI. táblázat). Ez korrelál a *GJB2* génhez kötött gyermekkori nagyothallás gyakoriságával az adott régiókban. Hozzávetőlegesen elmondható, hogy mivel a gyermekkori nagyothallás fele genetikai eredetű, így az összes prelingualisan fellépő nagyothallás kb. 20%-ért, míg az összes sporadikus eset 10 %-ért a 35delG mutáció a felelős (Kelley, 1998).

A 35delG mutáció során egy nukleotid deléciója miatt kereteltolódás (frameshift) jön létre az N-terminális intracelluláris domainben (IC1). Pontosabban, a kódoló szekvencia 30-35 pozíciójában egy guanin deléciója következtében a leolvasó bázistriplet eltolódik, s glicin helyett valin épül be 12. aminosavként a polipeptidláncba. A következő triplet egy stop kodont kódol (timin-guanin-adenin), és így az eredetileg 226 aminosavból álló protein helyett csupán egy 12 aminosavat tartalmazó működésképtelen polipeptidlánc képződik zavarva ezzel a Corti-szerven belül a káliumion cirkulációjában. A mutáció okozta nagyothallás klinikai képére a prelingualis kezdet és a súlyos fokú percepció jelleg a jellemző, bár a hallásvesztés mértéke sokszor igen variábilis.

VI. táblázat: A 35delG mutáció hordozási gyakorisága különböző európai országok normál populációiban

Normál populáció	Hordozási gyakoriság
Belgium	0.5%
Csehország	2.1%
Franciaország	1%
Görögország	3.03%
Nagy-Britannia	0.8%
Németország	2%
Norvégia	0.5%
Olaszország	3.4%
Spanyolország	3.7%

Ma már több mint 70 autoszómális recesszív és 6 autoszómális domináns öröklésmenetet mutató különböző genetikai eltérés ismert a *GJB2* génben. A különböző népességcsoportok vizsgálata során eltérő mutációk gyakori fellépését írták le, mint pl. az Ashkenazi zsidók esetében a 167delT, ázsiaiakban a 235delC. Európa országaiban végzett tanulmányok során még nem számoltak be a 35delG mutáció mellett egyéb genetikai hibának halmozottan történő előfordulásáról.

2.2.3. X KROMOSZÓMÁHOZ KÖTÖTT NEM SZINDRÓMÁS NAGYOTHALLÁS (DFN)

Az X kromoszómához kötött nem szindrómás, percepcióos nagyothallás csupán az esetek 2-3%-ban figyelhető meg. Hasonlóan a recesszív öröklődéshez a nagyothallás kezdete prelingualis, de a fenotípus extrém heterogén. A genetikai hiba azonosítása ebben az esetben a legegyszerűbb, hiszen legtöbbször a férfiak betegednek meg, akikben egy mutáns allél jelenléte már elegendő ahhoz, hogy egy X-hez kötött hibás génre következtethessünk. Igazoltan az emberi X nemi kromoszómához kötött ismert gének száma megközelíti a háromszázat, amelyből 6 lokuszról és 2 génről tudjuk, hogy hibája halláskárosodást okoz (VII. táblázat).

VII. táblázat: X nemi kromoszómához kötött nem szindrómás nagyothallással társuló lokuszok és gének (Van Camp és Smith, 2003)

Név	Lokalizáció	Gén	Referencia
DFN1	Xq22	<i>DDP</i>	Tranebjaerg, 1995 Jin, 1996
DFN2	Xq22	ismeretlen	Tyson, 1996
DFN3	Xq21.1	<i>POU3F4</i>	De Kok, 1995
DFN4	Xp21.1	ismeretlen	Lalwani, 1994 Pfister, 1998
DFN6	Xp22	ismeretlen	Del Castillo, 1996

2.3. MITOKONDRIÁLIS GENOM MUTÁCIÓI OKOZTA NAGYOTHALLÁS

Az örökletes nagyothallás kevesebb, mint 1%-ért a mitokondrium genomjának genetikai hibája a felelős. A mitokondrium saját DNS-sel rendelkezik („25. kromoszóma”), mely duplaszálú cirkuláris és elsősorban az energiatermeléssel kapcsolatos fehérjéket kódol. Az oxidatív foszforiláció sorozatos biokémiai reakcióinak eredményeként a mitokondrium belső membránjában ADP-ből ATP képződik, amely a sejt energiaellátását biztosítja. Különösen a transzportáló és az anyagcseréért felelős sejtek gazdagok mitokondriumban.

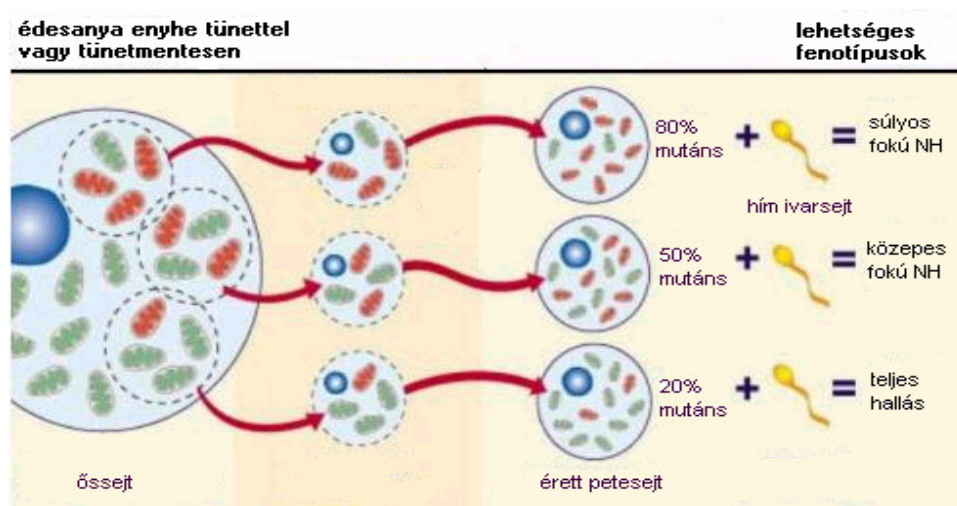
A genom maga kicsi (16569 kilobázispár) és nem tartalmaz intront. Összességében 13 fehérjét, 22 transzfer RNS-t (tRNS) és 2 riboszómális RNS-t (rRNS) (12S rRNS, 16S rRNS) kódol. (A tRNS és rRNS gének átíródnak de nem transzlálódnak, így nincs fehérjetermékük.) Az energiaháztartásban résztvevő több fehérje részben a mitokondriumban, részben a sejtmagban kódolódik.

Extranukleáris öröklésmenete a petesejten keresztül történik, így kizárólag az anyától származhat mitokondriális genom az utódban, egyaránt érintve a fiú és a lány gyermekeket. Igaz, a mitokondrium saját DNS-sel rendelkezik, mégsem képes önállóan működni, ugyanis az energiaellátáshoz szükséges fehérjék előállításához szükséges molekulák egy része a sejtmagban kódolódik (pl.: a mitokondriumban történt transzkripció folyamatot követő transzlációhoz a sejtgenom által kódolt, citoplazmában található fehérjékre (pl.: RNS-polimeráz) van szükség). A mitokondrium örökítő anyagában fellelő genetikai eltérések az oxidatív foszforiláció zavarát okozzák.

A sejtek további sajátossága a heterogén mitokondriális plazma, ami azt jelenti, hogy egy adott sejten belül normális és hibás mitokondriumok egyaránt megtalálhatóak (5. ábra). A klinikai kép súlyossága attól függ, hogy milyen arányban találhatók meg a genetikailag hibás mitokondriumok a sejtekben. A betegség kialakulásában fontos szerepet játszik a sérült szövet energiaigénye is. A heterogén mitokondriális plazma miatt a genetikai tanácsadás és a születendő gyermek fenotípusának előre történő pontos meghatározása ma még nem lehetséges.

Az első, nem szindrómás nagyothallásért felelős mutáció (A1555G) identifikálása a mitokondriális genomban az *a 12S rRNS* génben volt, melynek gyakorisága igen változó Európában (Prezant, 1993). Azóta több nem szindrómás és szindrómás

betegséget írtak már le maternális öröklődéssel (*VIII. táblázat*). Az összes nem szindrómás mutáció teljesen vagy csaknem teljesen homogén mitokondriális plazmájú sejtek esetében fordul elő, míg a szindrómás nagyothallók esetében a mutációk mindig heterogén mitokondriális plazmával rendelkeznek. Ebben az esetben a homogén mitokondriális plazma az étellel nem összeegyeztethető (Van Camp, 2000).



5. ábra: Heterogén mitokondriális plazma. A petesejt egyaránt tartalmaz hibás (piros) és egészséges (zöld) mitokondriumokat, melyek továbböröklődése véletlenszerű, így ettől függően a nagyothallás mértéke az utódokban variálódik. (NH: nagyothallás)

12S rRNS, A1555G MUTÁCIÓ

Először 1992-ben számoltak be egy nagy izraeli-arab nagyothalló családról maternális öröklődéssel (Jaber, 1992). Az érintett családtagok aminoglikozid indukálta nagyfokú ill. a siketséggel határos halláskárosodást mutattak. Következő évben azonosították az A1555G mitokondriális mutációt az érintett családtagokban (Prezant, 1993). Az említett mutáció a 12S rRNS molekula konzervatív régiójában található. A 12S rRNS fontos szerepet játszik a mitokondrium által kódolt gének transzlációjában, mely gének terméke az oxidatív foszforilációért, azaz az ATP termelésért felelősek. Az A1555G mutáció módosítja a tRNS kötőhelyét a riboszómán, kedvezőtlenül hatva ezzel az mRNS transzlációs folyamatára. Az aminoglikozid antibiotikum képes a mutációval rendelkező cochlea sejtekhez kötődni és az energiatermelő fehérjék szintézisében okozott zavarral a sejtek ATP termelését gátolni. Energia hiányában az aktív ionpumpák hatástalanul működnek, így felborul az ionháztartás a csigában, az endocochlearis

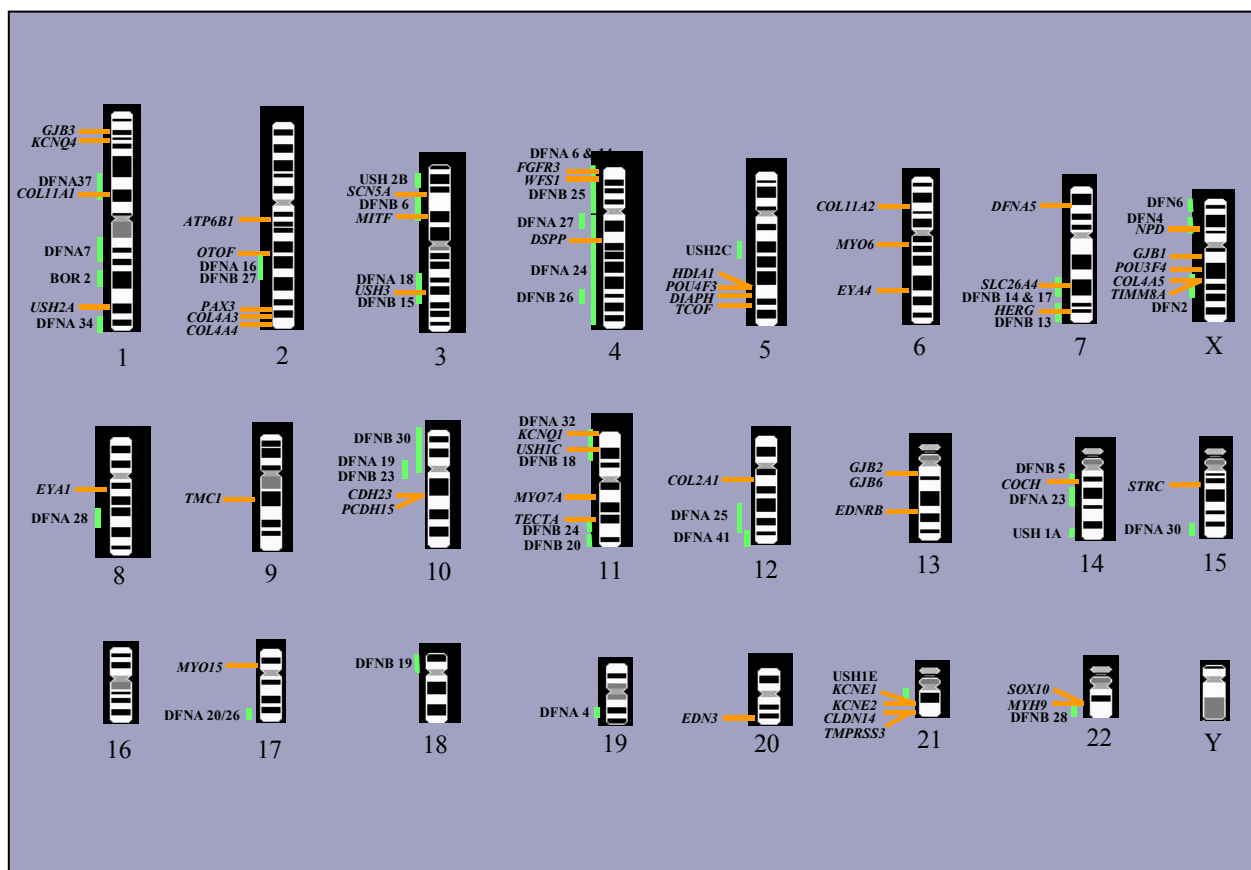
potenciál csökken, amely a szőrsejtek és / vagy a stria vascularis - melynek intermedier sejtjei mitokondriumban gazdagok - pusztulása révén nagyothallást okoz, bár a pontos patomechanizmus még nem tisztázott (Guan, 1996). A nagyothallás leggyakrabban bilaterális, szimmetrikus, percepciós típusú és a magas frekvenciatarományt érinti lassú progresszióval, mely nagyfokú nagyothalláshoz vezethet (Usami, 2000). A világon több mint 120 családban sikerült eddig ezt a genetikai hibát kimutatni, különösen magas előfordulási gyakorisággal a kínai, japán, finn és spanyol lakosságban (Hutchin, 1998; Usami, 2000, Lehtonen, 2000; Estivill, 1998). A nagyothallás progrediáló, de azokban is jelentkezhethet, akik nem részesültek korábban aminoglikozid terápiában. Ennek oka még nem tisztázott. A spanyol családokban a mutációval rendelkező és antibiotikummal kezelt esetekben a nagyothallás kezdete $11,1 \pm 12,1$ év volt, míg a hordozó, de terápia mentes személyeknél $21,2 \pm 17,6$ év (Estivill, 1998). Ez jelezi, hogy az A1555G mutáció önmagában nem mindig elég a betegség kialakulásához, azaz egyéb tényezők is befolyásolják a megjelenő fenotípust. Ez lehet külső környezeti faktor, de valószínűbb egy másik nukleáris szabályozó gén jelenléte. Feltehetően egy összetett folyamatról van szó, melynek tisztázása még megoldandó feladat.

VIII. táblázat: Mitokondriális génekben történt mutációk okozta szindrómás és nem szindrómás betegségek. (NH: nagyothallás, MELAS: Mitochondrialis encephalopathia, laktát acidózissal és stroke-szerű epizódokkal, MERRF: Myoclonusos epilepsia és "regged red fibers", CM: Cardiomyopathia and NH, MIDD: maternalis öröklődésű diabetes és siketség, PKK: Palmoplantaris keratoderma NH-sal, NH & NF: NH és neurológiai jelek, MEADF: Myoclonicus epilepsia, ataxia és NH.)

Név	Mutáció	Fenotípus	Referencia
<i>tRNS^{Leu}</i> [MTTL1]	C3256T T3271C A3243G	MIDD MELAS MELAS, MIDD	Moraes, 1993 Goto, 1991 Goto, 1990
<i>tRNS^{Lys}</i> [MTTK]	A8296G A8344G T8356C G8363A	MIDD MERRF MERRF CM	Kameoka, 1998 Shoffner, 1990 Silvestri, 1992 Santorelli, 1996
<i>tRNS^{Ser}</i> [MTTS1]	A7445G 7472 insC T7510C T7511C T7512C	PKK, NH NH&NF, NH NH NH MEADF	Reid, 1994 Jaksch, 1998 Verhoeven, 1999 Hutchin, 2000 Sue, 1999 Jaksch, 1998
<i>tRNS^{Glu}</i> [MTTE]	T14709C	MIDD	Hao, 1995
<i>12S rRNS</i> [MTNR1]	A1555G 961delT, insC T1095C	NH NH NH	Prezant, 1993 Bacino, 1995 Tessa, 2001

2.4. HALLÁSÉRT FELELŐS GÉNEK ÉS FEHÉRJÉK FUNKCIONÁLIS OSZTÁLYOZÁSA

Ma már több mint 50 hallásért felelős gént ismerünk, de az általuk kódolt fehérjék szerepe a hallásban még nem minden esetben tisztázott. A gének bármely kromoszómán elhelyezkedhetnek, s teljesen eltérő fehérjéket kódolhatnak (6. ábra).



6. ábra: Humán genomban eddig azonosított hallásért felelős lokuszok (zöld) és gének (narancssárga) lokalizációja

A kódolt fehérjék funkcióbeosztásuk alapján a következő csoportokba sorolhatók:

2.4.1. IONÁRAMLÁSÉRT FELELŐS CSATORNAFEHÉRJÉKET KÓDOLO GÉNEK

A hallásélettan alapja az endolymphaticus és a perilymphaticus tereken belüli és a terek közötti ionáramlás a cochleában. Ahhoz viszont, hogy ez az áramlás irányított módon létrejöhessen a sejtek között különböző gap junction ill. tight junction hálózatra valamint ioncsatornákra van szükség.

IX. táblázat: A hallásban szerepet játszó ionáramlásért felelős gének és proteinek

Gén	Lokusz	Protein	Funkció	Fenotípus	Referencia
<i>GJA1</i>	6q21-23.2	Connexin 43	gap junction	sporadikus NH	Willecke, 1990 Liu, 2001
<i>GJB1</i>	Xq13.1	Connexin 32	gap junction	Charcot-Marie Tooth	Willecke, 1990 Bergoffen, 1993
<i>GJB2</i>	13q12	Connexin 26	gap junction	DFNB1 DFNA3	Guilford, 1994 Kelsell, 1997
<i>GJB3</i>	1p35.1	Connexin 31	gap junction	DFNA2	Xia, 1998 Lopez-Bigas, 2001
<i>GJB6</i>	13q12	Connexin 30	gap junction	DFNA3	Chaib, 1994 Dahl, 1996
<i>KCNQ4</i>	1p34	KCNQ4	ioncsatorna	DFNA2	Coucke, 1999 Kubisch, 1999
<i>KCNQ1</i>	11p15.5	KCNQ1, LQT1 KVLQT1	ioncsatorna	LQTS	Barhanin, 1996 Splawski, 1998&2000
<i>HERG</i>	7q35-36	HERG, LQT2 KCNH2	ioncsatorna	LQTS	Curran, 1995 Splawski, 1998&2000
<i>SCN5A</i>	3p21-24	SCN5A, LQT3	ioncsatorna	LQTS	Wang, 1996
<i>KCNE1</i>	21q22.1	KCNE1 LQT5	ioncsatorna	LQTS	Splawski, 1998&2000 Tinel, 2000
<i>KCNE2</i>	21q22.1	KCNE2 LQT6	ioncsatorna	LQTS	Splawski, 2000 Tinel, 2000
<i>CLDN14</i>	21q22.3	Claudin 14	tight junction	DFNB29	Hattori, 2000 Wilcox, 2001
<i>SLC26A4</i>	7q31	PDS Pendrin	ion transzporter	DFNB4 Pendred szindr.	Everett, 1997 Everett, 1999
<i>ATP6B1</i>	2cen-q13	ATP6B1	ionpumpa	Renalis tubularis acidózis, NH	Karet, 1999

Az utóbbi esetben a csatornát alkotó fehérjék konformációjának változtatásával lehet a csatornát nyitni és zárni. Ezen kívül ide sorolhatók még az aktívan transzportáló ionpumpák a szállítandó molekulát magukhoz kötő ion transzporter proteinekkel együtt. Minden esetben a sejtmembránba épült fehérjéről van szó (IX. táblázat).

2.4.2. TRANSZKRIPCÍÓS FAKTOROKAT KÓDOLÓ GÉNEK

Az embrionális fejlődésért, sejt differenciálódásért felelős fehérjék zavara a belső fülben nagyothallást eredményezhet. Már 10 gén esetében sikerült a kódolt fehérjét azonosítani (X. táblázat).

Az autoszómális dominánsan öröklődő nagyothallás heterogén csoportjába tartozik a Wayne és mts-i által a DFNA10 lokuszon identifikált *EYA4* gén is (Wayne,

2001). Az *EYA4* a 6q23 kromoszómán található és 21 exonból áll, melyek közül néhány alternatív, és így izoformális fehérjéket kódol. A protein 271 aminosavból épül fel, melynek C-terminális vége az *eya*-homológ régió (*eyaHR*), míg az N-terminális végén prolin-szerin-treonin gazdag domain található (Borsani, 1999). Az *EYA4* fehérje egy transzkripció aktivátor, mely interakcióban van a SIX, PAX és a DACH proteinek családjával, s szabályozzák a korai embrionális fejlődést. (*Drosophilakban* a fehérje funkciójának defektusa szemfejlődési zavart okoz.) Wayne és *mts-i* két *EYA4* izoformát mutattak ki, melyek a human fetalis cochlea cDNS-ben expresszálódnak, de ugyanebben a tanulmányban mutációkat is identifikáltak az *EYA4* génben, amely posztlingualis kezdetű, progresszív lefolyású, autoszómális dominánsan öröklődő nagyohallást okoz. Heanue és *mts-i* tanulmánya a Dach/Pax/Eya hálózatról szolt egerekben és csirkékben. Kimutatták a *DachI* és *EyaI* expressziót a fejlődő fülben, valamint *Pax2* és *EyaI* gének szükségességét a normál fülfejlődéshez (Heanue, 1999, 2002).

X. táblázat: Transzkripció gének és fehérjék a belső fülben

Gén	Lokusz	Protein	Funkció	HI típusa	Referencia
<i>POU3F4</i>	Xq21.1	POU3F4	transzkripció faktor	DFN3	De Kok, 1995 Bitner-Glindzicz, 1995
<i>POU4F3</i>	5q31	POU4F3	transzkripció faktor	DFNA15	Xiang, 1995 Vahava, 1998
<i>EYA1</i>	8q13.3	EYA1	transzkripció faktor / embrionális fejlődés	BOR (Branchio-Oto- Renalis szindróma)	Abdelhak, 1997a & b Xu, 1999
<i>EYA4</i>	6q23	EYA4	transzkripció faktor	DFNA10	Borsani, 1999 Wayne, 2001
<i>PAX3</i>	2q35	PAX3	transzkripció faktor	Waardenburg I/III	Burri, 1989 Tassabehji, 1992
<i>MITF</i>	3p14.1- 12.3	MITF	transzkripció faktor	Waardenburg IIA	Tachibana, 1994 Tassabehji, 1994
<i>SOX10</i>	22q13.1	SOX10	transzkripció faktor	Waardenburg Shah/ Yemenite	Pingault, 1998 Bondurand, 1999
<i>EDNRB</i>	13q22	Endothelin receptor	receptor	Hirschsprung II/ Waardenburg IV	Arai, 1993 Attie, 1995
<i>EDN3</i>	20q13.2 -13.3	Endothelin	ligand	Waardenburg IV	Inoue, 1989 Edery, 1996
<i>FGFR3</i>	4p16.3	FGF- receptor	receptor	Achondroplasia, Chondroplasia, craniosynostosis, NH	Keegan, 1991 Shiang, 1994

2.4.3. STRUKTURÁLIS FEHÉRJÉKET KÓDOLOÓ GÉNEK

A strukturális fehérjék feladata a szöveti szerkezet stabilitásának, integritásának biztosítása. Az eddig megismert és génhiba miatt károsodott strukturális fehérjék legnagyobb része az extracellularis matrixban található. A citoskeletális fehérjékről még nem sokat tudunk, de feltehetően több nagyothallás hátterében ennek károsodása áll, melynek tisztázásához további vizsgálatokra van szükség (XI. táblázat).

XI. táblázat: A belső fül strukturális fehérjék lokuszai és génjei

Gén	Lokusz	Protein	Funkció	Fenotípus	Referencia
<i>DIAPH</i>	5q31	Diaphanous	cytoskeleton protein	DFNA1	Lynch, 1997
<i>TECTA</i>	11q22-24	alpha Tectorin	extracellularis matrix	DFNA8/12 DFNB21	Legan, 1997 & 2000 Mustapha, 1999
<i>COCH</i>	14q12-13	Cochlin	extracellularis matrix	DFNA9	Manolis, 1996 Fransen, 1999
<i>COL11A1</i>	1p21	Kollagén 11A1	extracellularis matrix	Stickler II	Richards, 1996 Martin, 1999
<i>COL11A2</i>	6p21.3	Kollagén 11A2	extracellularis matrix	DFNA13 Stickler III, OSMED	Vuoristo, 1995 Pihlajama, 1998
<i>COL2A1</i>	12q13.11-13.2	Kollagén 2A1	extracellularis matrix	Stickler I	Francomano, 1987 Helfgott, 1991
<i>COL4A3</i>	2q36-37	Kollagén 4A3	extracellularis matrix	Alport recesszív Alport domináns	Butowski, 1987 Jefferson, 1997
<i>COL4A4</i>	2q35-37	Kollagén 4A4	extracellularis matrix	Alport recesszív Alport domináns	Leinonen, 1994 Lemmink, 1997
<i>COL4A5</i>	Xq22	Kollagén 4A5	extracellularis matrix	Alport X krom.	Zhou, 1993 Harvey, 2001
<i>NDP</i>	Xp11.4	NDP Norrin	extracellularis matrix	Norrie szindróma	Berger, 1992 Chen, 1992 & 1993
<i>USH2A</i>	1q41	USH2A Usherin	extracellularis matrix	Usher II szindróma	Weston, 2000 Eudy, 1998
<i>OTOG</i>	11p14.3	Otogelin	extracellularis matrix	DFNB18	Simmler, 2000 Cohen-Salmon, 1999
<i>DSPP</i>	4q21.3	Dentin	extracellularis matrix	Dentinogenezis DFNA39	Xiao, 2001 MacDougall, 1997
<i>USH1C</i>	11p15.1	USH1C Harmonin	extracellularis matrix	Usher Ic szindróma	Verpy, 2000; Bitner-Glindzicz, 2000

2.4.4. MOTOROS FEHÉRJÉKET KÓDOLÓ GÉNEK

A miozin az aktin fehérjével együtt (aktomiozin komplex) a sejtek kontraktilis képességét ill. az intracellularis mozgást biztosítják. Jelenleg négy miozin molekuláról ismert, hogy károsodása nagyothalláshoz vezet (*XII. táblázat*). A miozin molekulákon kívül meg kell említenünk a külső szőrsejtek laterális plazmamembránjában lévő Prestin motoros fehérjét, amely a külső szőrsejtek hosszának változtatásával a hallásban játszik fontos szerepet (Zheng, 2000). A protein 744 aminosavból áll és a 7. kromoszómán lévő SLC26A5 gén kódolja, de nem közöltek még le a szakirodalomban ehhez a génhez társuló nagyothallást.

XII. táblázat: Belső fül motoros fehérjéi és génjei

Gén	Lokusz	Protein	Funkció	Fenotípus	Referencia
<i>MYO7A</i>	11q13.5	Myosin 7A	kontraktilitás	DFNB2 DFNA11 USH1B	Weil, 1995 Liu, 1997
<i>MYO15</i>	17p11.2	Myosin 15	kontraktilitás	DFNB3	Friedman, 1995 Wang, 1998
<i>MYH9</i>	22q11.2	Myosin H9	kontraktilitás	DFNA17	Lalwani, 1999 Lalwani, 2000
<i>MYO6</i>	6q13	Myosin 6	kontraktilitás	DFNA22	Melchionda, 2001

2.4.5. EGYÉB PROTEINEKET KÓDOLO GÉNEK

Néhány gén által kódolt fehérje belső fül funkciója ma még pontosan vagy egyáltalán nem ismert, s további kutatásokra vár (*XIII. táblázat*).

XIII. táblázat: Más csoportba nem sorolható egyéb hallásért felelős gének és fehérjéi

Gén	Lokusz	Protein	Besorolás	Fenotípus	Referencia
<i>CDH23</i>	10q21-22	Otocadherin	cadherin család tagja	DFNB12 USH1D	Chaib, 1996 Bork, 2001 Di Palma, 2001
<i>PCDH15</i>	10q21-q22	Protocadherin 15	cadherin család tagja	USH1F	Alagraman, 2001 Ahmed, 2001
<i>DFNA5</i>	7p15	DFNA5	ismeretlen	DFNA5	Van Camp, 1995 Van Laer, 1997
<i>OTOF</i>	2q23.1	Otoferlin	szinapszis komponens	DFNB9 DFNB6	Yasunaga, 1999 Yasunaga, 2000
<i>STRC</i>	15q15	Stereocilin	sztereocilium	DFNB16	Verpy, 2001
<i>TCOF</i>	5q32-33.1	Treacle	nucleus szállító protein	Treacher Collins szindróma	Treacher Collins syndrome collabor 1996 Wise, 1997 Dixon, 1997
<i>TIMM8A</i>	Xq22.1	Dystonia peptid DDP	mitochondrialis protein	DFN1, Mohr-Tranebjaerg szindróma (MTS)	Tranebjaerg, 1995 Jin, 1996 Koehler, 1999
<i>TMC1</i>	9q13-21	TMC1	transzmembran protein	DFNA36, DFNB7/11	Kurima, 2002
<i>TMPRSS3</i>	21q22.3	TMPRSS3	szerin kináz	DFNB8/10	Veske, 1996 Bonne-Tamir, 1996 Scott, 2001
<i>USH3A</i>	3q21-q25	USH3A	transzmembran protein	USH3	Joensuu, 2001
<i>WFS1</i>	4p16.1	Wolframin	ismeretlen	Wolfram szindróma DFNA6,14,38	Young, 2001 Bespolova, 2001

3. BETEGANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. BETEGANYAG

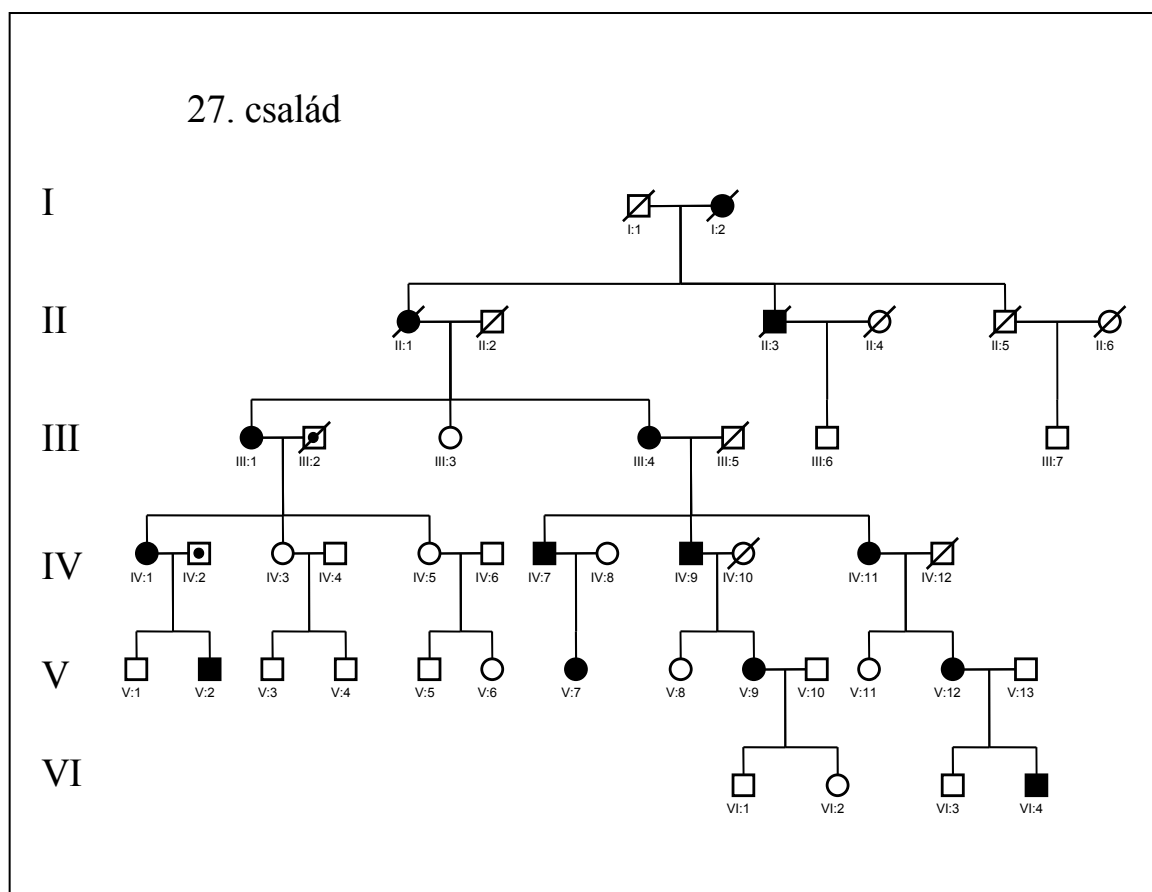
3.1.1. *GJB2*, *12S rRNS*

A tanulmány során vizsgált személyek Északkelet-Magyarország területéről (Hajdú-Bihar megye, Szabolcs-Szatmár-Bereg megye) származtak. 1999-2002 között összesen 176 (84 férfi, 92 nő) közepes vagy nagyfokú perцепciós típusú, bilaterális nagyothalló beteget vizsgáltunk molekuláris genetikai módszerekkel (*GJB2* gén ill. *12S rRNS*). A legfiatalabb esetünk 11 hónapos, míg a legidősebb 75 éves volt. Az átlag életkor 24,6 év. Húsz család anamnézisében két vagy több családtagnak bizonytalan eredetű, kongenitális, nem szindrómás perцепciós nagyothallása volt. A nagyothallás mértéke minden esetben legalább három frekvencián meghaladta a 40 dB-t. Értekezésünkben 84 vizsgált személy (43 férfi, 41 nő) alkotja a familiáris eseteket. Egy roma család kivételével (17. család) a családok között vérrokon kapcsolat nem ismert. A másik nagy csoportot a sporadikus esetek alkották (92 család), amibe a normál hallású szülők veleszületetten hallássérült gyermekei tartoztak. A kontroll csoportba 500 teljes hallású, random módon kiválasztott személy tartozott. Utóbbi esetben a fent említett génekben a mutációk hordozási gyakoriságának megállapítása volt a célunk. A betegek előzetes tájékoztatás után saját elhatározásukból vettek részt a genetikai vizsgálatban - kiskorúak esetében (18 év alatt) szülői jóváhagyással -, amit a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága által engedélyezett beleegyező nyilatkozat aláírásával erősítettek meg. Minden beteg esetében az anamnézis felvétele után legalább három generációra kiterjedő családfakészítés történt. A nehezen kommunikáló páciensekkel a beszélgetést jeltolmács segítségével végeztük. Ezt követően a betegek részletes fül-orr-gégészeti vizsgálaton estek át szükség esetén egyéb vizsgáló eljárásokkal kiegészítve (labor, CT, bőrgyógyászat, szemészet), kizárva ezzel az esetleges szindrómás vagy más eredetű halláskárosodás lehetőségét.

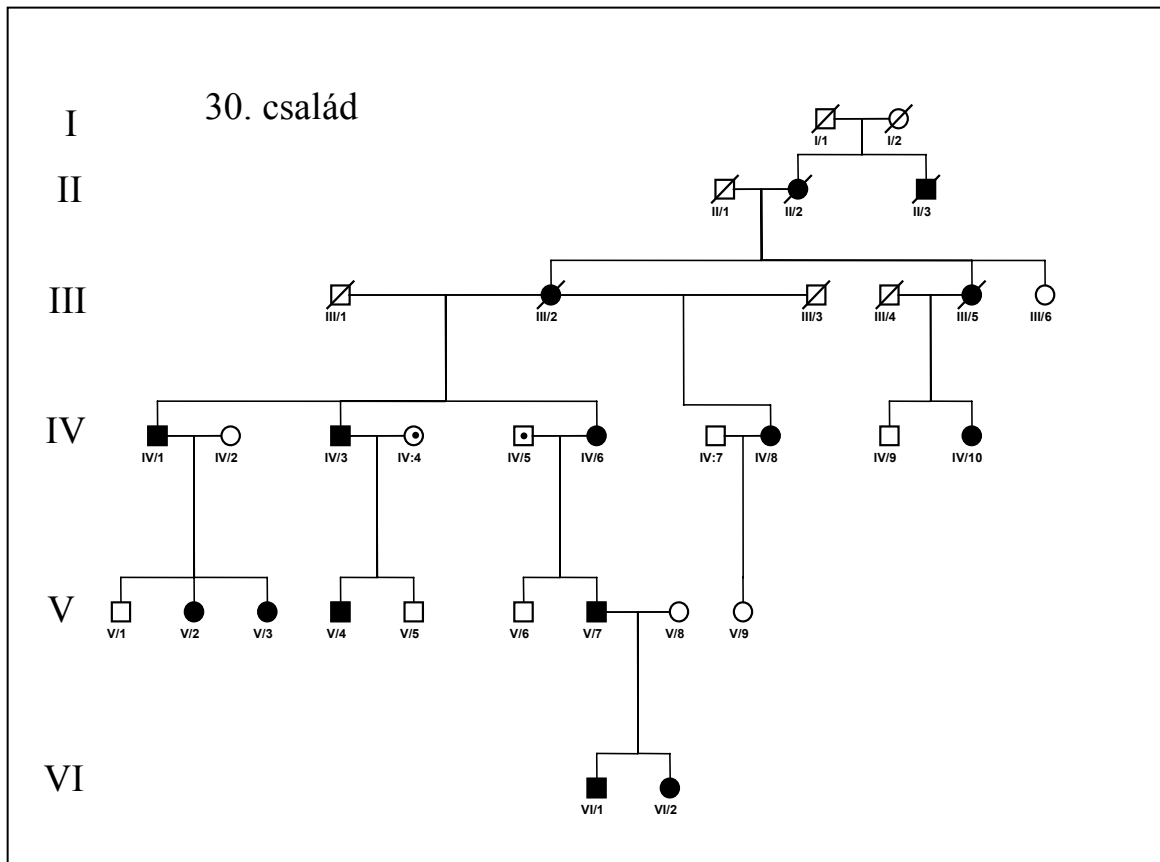
3.1.2. Ismeretlen lokusz és génidentifikálás

Tanulmányunkba két olyan nagyobb család került be, ahol a nagyothallás posztlingualisan kezdődött és folyamatosan progrediált. Mivel mindkét családban az

érintettek és a teljes hallású személyek száma több volt mint 10-10, lehetőségünk nyílt az ismeretlen eredetű genetikai háttér kimutatására kapcsoltság analízissel (linkage analysis). Mindkét család egészséges és nagyothalló tagjait az audiológiai állomásunkon vizsgáltuk. A családtagok (27. család; 30. család) főként Magyarország ÉK-i régiójában élnek. Minden egyes családtagnál a genetikai vizsgálat a Debreceni Egyetem Etikai Bizottsága által engedélyezett beleegyező nyilatkozat aláírásával - kiskorúak esetében (18 év alatt) szülői jóváhagyással - kezdődött. A 27. családból 32 fő (17 férfi és 15 nő) (7. ábra), míg a 30. családból 22 fő (11 férfi, 11 nő) vett részt tanulmányunkban (8. ábra). A 27. családban az átlagéletkor 39,5 év (legfiatalabb 6, legidősebb 85 éves), míg a 30. család esetében 47,8 év (legfiatalabb 14, legidősebb 83 éves) volt.



7. ábra: „27. család” családfája. Jelölések: ○ nő, □ férfi, ● nagyothalló nő, ■ nagyothalló férfi, ○ áthúzva: elhunyt nő, □ áthúzva: elhunyt férfi, ● áthúzva: elhunyt nagyothalló nő, ■ áthúzva: elhunyt nagyothalló férfi, □ közepén ponttal: szerzett nagyothalló férfi. A római számok a generációkat jelzik, míg az arab számok a személyeket azonosítják.



8. ábra: „30. család” családfája. Jelölések: ○ nő, □ férfi, ● nagyothalló nő, ■ nagyothalló férfi, áthúzva: elhunyt személy, közepén ponttal: szerzett nagyothalló személy. A római számok a generációkat jelzik, míg az arab számok a személyeket azonosítják.

3.2. FÜL-ORR-GÉGÉSZETI VIZSGÁLAT

FIZIKÁLIS VIZSGÁLAT

A külső fül vizsgálatakor elsősorban a fejlődési rendellenességre, míg a dobhártya megtekintésével akut vagy krónikus középfül gyulladásra utaló jeleket figyeltünk meg.

HALLÁSVIZSGÁLAT

Az audiológiai vizsgálatok a Debreceni Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika audiológiai állomásának hangszigetelt helységében történtek. Küszöbaudiometriás vizsgálattal a résztvevők tisztahang hallásküszöbét határoztuk meg, melyet minden esetben tympanometria követett. Gyermekeknél a kortól és értelmi képességtől függően végeztünk hallásvizsgálatot. Ha a gyermek a hagyományos szubjektív vizsgálmódszerekkel nem volt megvizsgálható, akkor otoakusztikus emisszió ill. BERA (Brainstem Evoked Response Audiometry) vizsgálat történt. Az audiogramokat az „European Work Group on Genetics of Hearing Impairment” ajánlása alapján értékeltük (EWGGHI, 1996). Képalkotó eljárásos vizsgálat (piramis CT) csak akkor történt, ha felmerült a csontos labirintus deformitás ill. cerebrális morfológiai eltérés lehetősége.

VESZTIBULÁRIS VIZSGÁLAT

A vestibuláris jelek (spontán nystagmus, Romberg-vizsgálat, Bárány-féle félremutatás) megfigyelése mellett az otolith apparátus kalorikus ingerlésével ellenőriztük az egyensúlyszerv működését minden nagyothalló esetében.

3.3. GENETIKAI ANALÍZIS

3.3.1. DNS IZOLÁLÁS

A betegektől 4,5 ml nátrium-citráttal kevert alvadásgátolt vért vettünk a beleegyező nyilatkozatok aláírása után, és a gyártó előírásainak megfelelően (PUREGENE Kit, GENTRA System, Minneapolis USA) a leukocitákból DNS-t izoláltunk. A kapott DNS mintákat koncentráció meghatározás céljából 1%-os agaróz gél elektroforézissel megfuttattuk, majd ethidium-bromiddal megfestettük.

3.3.2. GJB2 GÉN MUTÁCIÓ ANALÍZIS

A DNS minták szűrése 35delG mutációra speciális primerekkel történő PCR reakció (polimeráz láncreakció) után *BsiYI* enzimemésztéssel történt (Strom, 1999). A keletkezett PCR termék a mutációval nem rendelkező esetekben 208 bázispár nagyságú. A 35delG mutáció jelenléte esetén az enzim felismerve ezt a régiót hasítja a PCR terméket és egy 181 bázispárnyi (bp) fragmentum képződik, amelyet 6%-os poliakrilamid gélen futtatva ethidium-bromid festés után UV fényben detektáltunk. A betegeket genotípusuk alapján három csoportba soroltuk: 35delG vad típus, 35delG heterozigóta és 35delG homozigóta. A heterozigóta és vad genotípusú nagyothalló betegek DNS mintáit megszekvenáltuk.

→ PCR / 35delG:

Primer szekvenciák:

- Primer 1: GGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGG
- Primer 2: CTGGTGGAGTGTTTGTTCAC

PCR összetétel:

	Mennyiség	Koncentráció
DNA		100ng
dNTPs	2-2 mM	0,4 mM
PCR puffer	10 x	1 x
MgCl ₂	50 mM	3 mM
Primer 1	10 µM	0,4 µM
Primer 2	10 µM	0,4 µM
Taq polimeráz	1 U/µl	0,05 U/µl
dH ₂ O		ad 25 µl
Összesen:		25 µl

PCR program:

94 °C	2 min	} 30 ciklus
94 °C	40 sec	
60 °C	40 sec	
72 °C	90 sec	
72 °C	2 min	
4 °C	∞	

→ **BsiYI emésztés:**

A *BsiYI* restrikciós enzimmel (*CCN₅/N₂GG*) történő emésztés során a 35delG mutációval rendelkező PCR terméket elhasítjuk, melynek során 181 bp + 26 bp-i nagyságú fragmentumok keletkeznek (Restriction Endonuclease BsiYI, Roche Diagnostics GmbH).

	Mennyiség	Koncentráció
PCR termék		10 µl
<i>BsiYI</i>	10 U/µl	0,25 U/µl
Puffer	10 x	1 x
dH ₂ O		ad 20 µl
Összesen:		20 µl

Emésztő program:

55 °C	3 óra
80 °C	20 min
4 °C	∞

→ **Kimutatás:**

poliakrilamid gél elektroforézissel (6%-os)

- Paraméterek: - feszültség: 160V
- áramerősség: 250 mA
- futtatási idő: 90 min

GJB2 GÉN SZEKVENÁLÁS

A 35delG heterozigóta és vad genotípusú nagyothalló esetekben a szekvenálások ABI PrismTM 377 fluoreszcens DNS szekvenálóval történtek, mellyel a keletkezett PCR termék nukleotid sorrendjét határoztuk meg. Így kimutathatóvá vált a *GJB2* génben lévő nukleotid eltérések. A 35delG heterozigóta és vad típus esetekben a gén teljes kódoló exonját megszekvenáltunk (Accession NM_004004) (9. ábra). A szekvenálások kiértékeléséhez „DNAsis” programot alkalmaztunk.

1	gatttaatcc	tatgacaaac	taagttggtt	ctgtcttcac	ctgttttggg	gaggttgtgt	
61	aagagttggt	gtttgctcag	gaagagattt	aagcatgctt	gcttaccag	ag actcagagaa	
121	gtctccctgt	tctgtcctag	ctatgttcct	gtgttgtgtg	cattcgtctt	ttccagagca	1F
181	aaccgcccag	agtagaagat	ggattggggc	acgctgcaga	cgatcctggg	gggtgtgaac	
241	aaacactcca	ccagcattgg	aaagatctgg	ctcaccgtcc	tcttcatttt	tcgcattatg	
301	atcctcgttg	tggctgcaaa	ggaggtgtgg	ggagatgagc	aggccgactt	tgtctgcaac	
361	accctgcagc	caggctgcaa	gaacgtgtgc	tacgatcact	acttccccat	ctccacatc	2F
421	cggctatggg	ccctgcagct	gatcttcgtg	tccacgccag	cgctcctagt	ggccatgcac	
481	gtggcctacc	ggagacatga	gaagaagagg	aagttcatca	agggggagat	aaagagtga	3R
541	tttaaggaca	tcgaggagat	caaaacccag	aaggtccgca	tcgaaggctc	cctgtggtgg	
601	acctacacaa	gcagcatctt	cttccgggtc	atcttcgaag	ccgccttcat	gtacgtcttc	4F
661	tatgtcatgt	acgacggctt	ctccatgcag	cggctggtga	agtgaacgc	ctggccttgt	
721	ccaacactg	tggactgctt	tgtgtcccgg	cccacggaga	agactgtctt	cacagtgttc	
781	atgattgcag	tgtctggaat	ttgcatcctg	ctgaatgtca	ctgaattgtg	ttatttgcta	
841	attagatatt	gttctgggaa	gtcaaaaaag	ccagtttaac	gcattgcccc	gttggttagat	5R
901	taagaaatag	acagcatgag	agggatgagg	caaccctg	tcagctgtca	aggctcagtc	

9. ábra: *GJB2* gén kódoló régiójának nukleotid sorrendje (sárga) és a szekvenáláshoz használt primerek (piros) kötőhelyei (Accession NM_004004).

→ PCR / *GJB2*:

Primerszekvenciák:

- Primer 1F: AGACTCAGAGAAGTCTCCCTG
- Primer 2F: CCAGGCTGCAAGAACGTGTGC
- Primer 3R: CTCATGTCTCCGGTAGGCCAC
- Primer 4F: GCAGCATCTTCTTCCGGGT
- Primer 5R: GGGCAATGCGTTAACTGGC

3.3.3. *12S rRNS* / A1555G MUTÁCIÓ ANALÍZIS

Ebben a vizsgálatban csak olyan nagyothalló betegek DNS mintáit vizsgáltuk, akiknél nem igazolódott a *GJB2* génben történt mutáció okozta halláskárosodás (72 fő). A teljes hallású kontroll csoportból 224 személy izolált DNS-t szűrtük le az adott genetikai hibára. A *12S rRNS* A1555G mutáció analízisnél (*Accession NC_001807*) a PCR reakcióhoz az alábbi primereket alkalmazva egy 248 bp-i nagyságú szakaszt amplifikálunk.

→ **PCR / A1555G:**

Primerszekvenciák:

- Primer F: AGAAATGGGCTACATTTTCTACCC
(pozíció: 1354-1377 mtDNS)
- Primer R: GTTCGTCCAAGTGCACCTTCCA
(pozíció: 1580-1601 mtDNS)

PCR összetétel:

	Koncentráció	Mennyiség
DNA		2 µl
dNTPs	2-2 mM	2,5 µl
PCR puffer	10x	2,5 µl
MgCl ₂	50 mM	1,25 µl
Primer F/R	5-5 µM	2,5 µl
Taq polimeráz	5 U/µl	0,25 µl
dH ₂ O		17 µl
Összesen:		25 µl

PCR program:

94 °C	10 min	} 30 ciklus
94 °C	1 min	
60 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

→ **BsmAI enzimemésztés:**

A 248 bp-i PCR termék vad típus esetében *BsmAI* enzimemésztés után (GTCTCN/) két fragmentumra hasítódik (192 bp és 56 bp). A mutáció jelenléte esetén eltűnik az enzim felismerési szekvenciája és csak egy fragmentum látható (248 bp).

PCR termék	10 µl
<i>BsmAI</i> (10 U/µl)	5 µl
Puffer (10x)	2 µl
dH ₂ O	3 µl
Összesen:	20 µl

Emésztő program:

55 °C	12 óra
80 °C	20 min
4 °C	∞

→ **Kimutatás:**

poliakrilamid gél elektroforézis (6%-os)

3.3.4. Ismeretlen lokusz és génidentifikálás

Két többgenerációs, posztlingualis kezdetű nagyothalló család tagjaitól a beleegyező nyilatkozat aláírása után személyenként 15 ml nátrium-citráttal alvadásgátolt vért vettünk, és a gyártó előírásainak megfelelően (PUREGENE Kit, GENTRA System, Minneapolis USA) a leukocitákból DNS-t izoláltunk. A kapott DNS mintákat koncentrációjuk meghatározáshoz 1%-os agaróz gélen futtattuk, majd ethidium-bromiddal megfestettük.

A nagyothallásért felelős lokuszok kromoszómális lokalizációjához kapcsoltság analízist végeztünk. (A 27. család analízise kapcsoltságot mutatott a 4. kromoszóma rövid karjához, így ezt követően a következő polimorf markereket használtuk: D4S3038, D4S403, D4S412, D4S432, D4S3452, D4S3453, D4S2366, D4S394, D4S2639). A polimorf markerek PCR termékeit ABI 3100 automata szekvenálóval analizáltuk.

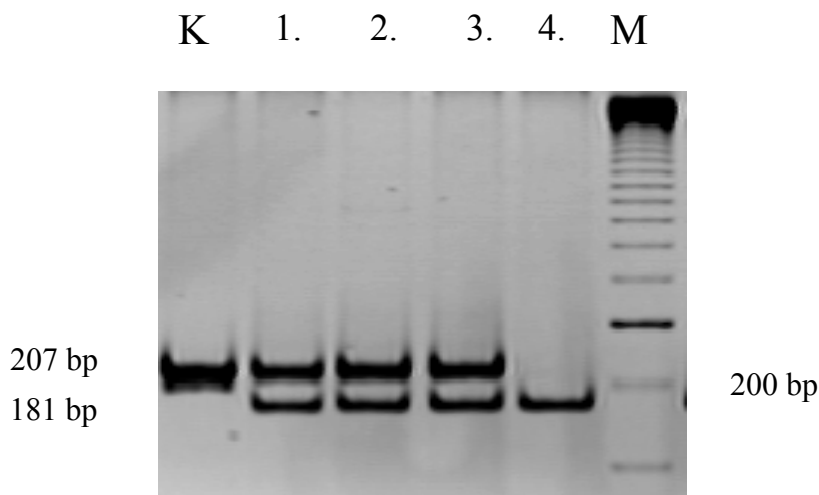
A 30. család vizsgálata során 384 mikroszatellit markert (átlag 11cM-es felbontásnak felel meg) használtunk, amelyeket MegaBACE-1000 automata szekvenálóval analizáltunk. A LOD score értékek számítására LINKAGE v5.2 programcsomagot használtunk (Lathrop, 1984). A 30. család DNS mintáinak szekvenálásához *Wayne és mts-i* által publikált primereket és protokolt alkalmaztunk (Wayne, 2001). A PCR termékek szekvenálása gél extrakciójuk után (Gel Extrakciós Kit, Qiagen) ABI 377 automata fluoreszcens szekvenálóval történt. A DNAsis szoftver (MWG) segítségével a szekvenciákat a referenciaszekvenciával (*NCBI-Accession 13642856*) hasonlítottuk össze. A kapcsoltság analízis részben a Berlini „Gene Mapping Center”-ben (Németország), részben pedig az Antwerpeni Egyetem Orvosi Genetika Intézetében (Belgium) zajlott.

4. EREDMÉNYEK

4.1. DFNB1 LOKUSZ / *GJB2* GÉN MUTÁCIÓI OKOZTA NAGYOTHALLÁS

4.1.1. *GJB2* GÉN / 35delG MUTÁCIÓ OKOZTA NAGYOTHALLÁS

Tanulmányunk során 176 ismeretlen etiológiájú, veleszületett, kétoldali, nem szindrómás, közepes ill. nagyfokú perцепciós nagyothalló betegnél, valamint 500 ép hallású személynél végeztünk genetikai vizsgálatot. A 20 hallássérült családból 15 családban tudtunk a *GJB2* génben halláskárosodást okozó mutációt identifikálni. Ez 84 főből 64 nagyothalló beteget jelent (76,2%). Ezen belül 58 személynél volt jelen a *GJB2* génben 35delG mutáció (69%), mely 37 betegnél homozigóta (44%), míg 21 főnél heterozigóta genotípust mutatott (25%). Hét 35delG heterozigóta személynél a második allélon nem volt kimutatható genetikai eltérés a *GJB2* gén kódoló exonjában. A familiáris esetben a 35delG mutáció allélgyakorisága 56,5% volt.



10. ábra: PCR termék *BsiYI* emésztés után poliakrilamid gélen megfuttatva. A nem hasított PCR produktum 207 bp nagyságú, míg emésztés során 181 bp-i fragmentum képződik. K: egészséges kontroll személy; M: kb-marker; 1, 2, 3: 35delG heterozigóta hordozó; 4: 35delG homozigóta beteg

A 92 sporadikus eset közül 59 esetben (64%) tudtunk mutációt kimutatni az említett génben, ezen belül 51 főnél 35delG mutáció volt detektálható (55,4%). Genotípusukat tekintve 34 fő volt homozigóta (37%) és 17 fő heterozigóta (18,5%) az adott genetikai hibára. Hat esetben a 35delG heterozigóta genotípus nem társult

szekunder mutációval a *GJB2* gén kódoló exonjában. A sporadikus betegcsoportban a 35delG deléció allélgyakorisága 46,2%-t mutatott.

A familiáris esetek közt 20, míg a sporadikus esetek közül 33 vad genotípussal rendelkező nagyothalló volt. A kontroll csoportban, amely 500 normál hallású személyből állt, a 35delG mutáció 24 esetben volt detektálható (4,8%) (XIV. táblázat). Az ÉK-Magyarország populációból származó betegcsoportunkban a leggyakoribb mutáció a 35delG deléció volt. A mutáció kimutatása a PCR termék *BsiYI* emésztése után poliakrilamid gélen történt (10. ábra).

XIV. táblázat: GJB2 gén mutációinak (35delG; W24X) gyakorisága a magyar populáció ÉK-i régiójában

	Familiáris eset	<u>Sporadikus eset</u>	Normál populáció
Esetszám	84 fő	92 fő	500
35delG homozigóta	37 fő	34 fő	-
35delG heterozigóta	21 fő	17 fő	24 fő
Összesen:	58 fő (69%)	51 fő (55,4%)	(4,8%)
Allélgyakoriság	95 / 168 (56,5%)	85 / 184 (46,2%)	24 / 1000 (2,4%)
Vad típus (35delG)	20 fő	33 fő	-
W24X homozigóta	-	2 fő (2,2%)	-
W24X / 35delG	4 fő (4,76%)	4 fő (4,3%)	-
W24X / -	-	-	6 / 215 fő (2,8%)
Allélgyakoriság	4 / 168 (2,38%)	8 / 184 (4,3%)	6 / 430 (1,4%)
Egyéb heterozigóta mutációk	6 fő	6 fő	

4.1.2. 35delG HOMOZIGÓTA GENOTÍPUSHOZ TÁRSULÓ FENOTÍPUS

A fenotípus analízis vizsgálatot 35delG mutációra homozigóta 71 nagyothalló esetben évekre visszamenőleg az audiogramok feldolgozásával végeztünk. A 71 esetből 35 fő volt férfi és 36 nő, az átlag életkor a vizsgálatkor 24,6 év. A legfiatalabb esetünk 2 éves, a legidősebb 74 éves. A nemzetközileg elfogadott szabályok értelmében kis fokú a hallásvesztés, ha a hallástartomány küszöb audiometriás vizsgálattal <40 dB; közepes fokú, ha 40-69 dB, míg nagyfokú, ha a hallásküszöb 70-94 dB között van az 500, 1000 és 2000 Hz frekvenciatartományban a jobban halló fül esetében. Súlyos fokú (siketséggel határos) halláskárosodásról beszélünk, ha a hallásküszöb >95 dB. A betegek besorolása ez alapján történt. A tympanometria eredménye mindegyik esetben A-típusú görbét mutatott. Az elvégzett egyensúlyszervi vizsgálatok a vestibuláris funkcióban eltérést nem jeleztek.

4.1.2.1. Halláskárosodás mértéke

A homozigóta betegek 87,3%-ban (62 fő) a hallásvesztés mértéke nagyobb volt mint 70 dB, ezen belül 26,8%-ban siketséggel határos hallásvesztés volt az 500, 1000 és 2000 Hz frekvenciatartományban. Csupán 9 esetben (12,7%) volt a hallásküszöb < 70 dB. A nemek között szignifikáns eltérés nem volt kimutatható (XV. táblázat).

XV. táblázat: A 35delG homozigóta genotípusú betegek halláscsökkenésének mértéke alapján történő csoportosítás nemzetközileg elfogadott beosztás szerint.

	< 40 dB	40-69 dB	70-95 dB	> 95 dB
Férfiak	–	4 (5,6%)	12 (16,9%)	19 (26,8%)
Nők	–	5 (7,1%)	16 (22,5%)	15 (21,1%)
Összesen	–	9 (12,7%)	28 (39,4%)	34 (47,9%)

4.1.2.2. Progresszió

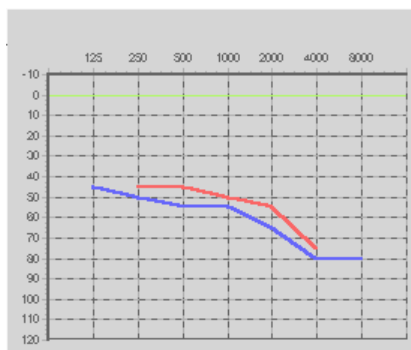
A nagyothallás progressziójáról beszélünk, ha 10 év alatt ennek mértéke több mint 15 dB-lel romlik három egymást követő frekvenciatartományban. Így a fiatal gyermekek adatai ebből a kiértékelésből kimaradtak (16 fő). Csaknem az esetek

egynegyede (23,6%) mutatott progressziót (XVI. táblázat), ebből 2 esetben a hallásromlás nagyobb volt, mint 30 dB (11. ábra). Ebben az esetben sem volt kimutatható különbség a nemek között

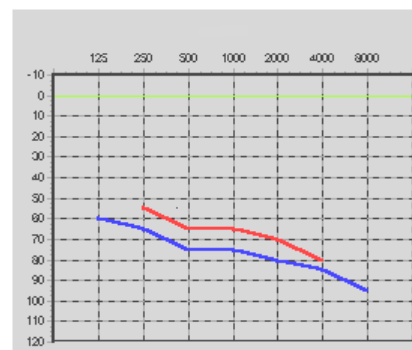
XVI. táblázat: A nagyothallás progressziójának mértéke (10 éven belül a halláskárosodás mértéke >15 dB egymást követő három frekvenciatartományban) a vizsgált beteganyagban.

	0-15 dB	> 15 dB	< 10 éves
Férfiak	22 (40%)	7 (12,7%)	6
Nők	20 (36,36%)	6 (10,9%)	10
Összesen	42 (76,36%)	13 (23,6%)	16

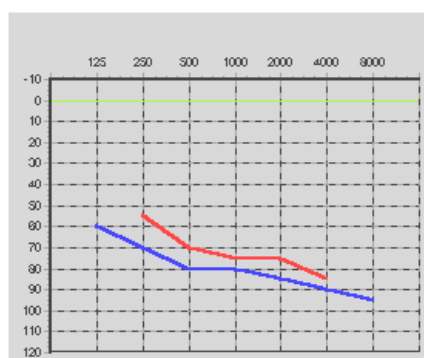
a)



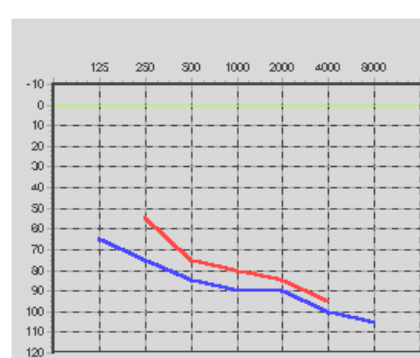
b)



c)



d)



11. ábra: A nagyothallás progressziója 10 év alatt egy 35delG homozigóta nő esetében küszöb audiogramokon. [a)1 év; b)3. év c)7. év; d)10. év]. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. Az ábrák csak az egyik oldali fül adatait tartalmazzák.

4.1.2.3. Görbe típusa

Az audiogram alapján két típus volt megfigyelhető: lapos görbe ill. a mély frekvenciák felől a magas frekvenciák felé ereszkedő görbe, amikor is a 125 Hz ill. 8000 Hz frekvenciákhoz tartozó küszöbértékek között a különbség >20 dB. Az audiogram ereszkedő volt 52,1%-ban (37 fő), míg 47,9%-ban lapos (34 fő). Egyéb típusú görbe nem volt megfigyelhető (XVII. táblázat).

XVII. táblázat: A 35delG homozigóta betegek audiogramjának típusai. Közel egyenlő arányban figyelhető meg a betegek között lapos ill. ereszkedő audiogram.

	Lapos audiogram	Ereszkedő audiogram
Férfiak	16 (22,5%)	19 (26,8%)
Nők	18 (25,4%)	18 (25,3%)
Összesen	34 (47,9%)	37 (52,1%)

4.1.2.4. Szimmetrikus nagyothallás

Az estek több mint 80%-ban a nagyothallás szimmetrikus volt. Aszimmetrikus nagyothallás (két oldal között a hallásküszöb >15 dB legalább 3 frekvencián) 13 főnél (18,3%) volt regisztrálható, de szignifikáns dominancia a két oldal között nem volt bizonyítható. Szintén nem volt kimutatható a nemek között jelentős eltérés (XVIII. táblázat).

XVIII. táblázat: Kétoldali szimmetrikus ill. aszimmetrikus nagyothallás (két oldal között a hallásküszöb > 15 dB) aránya betegeink közt.

	< 15 dB	≥ 15 dB
Férfiak	29 (40,85%)	6 (8,4%)
Nők	29 (40,85%)	7 (9,9%)
Összesen	58 (81,7%)	13 (18,3%)

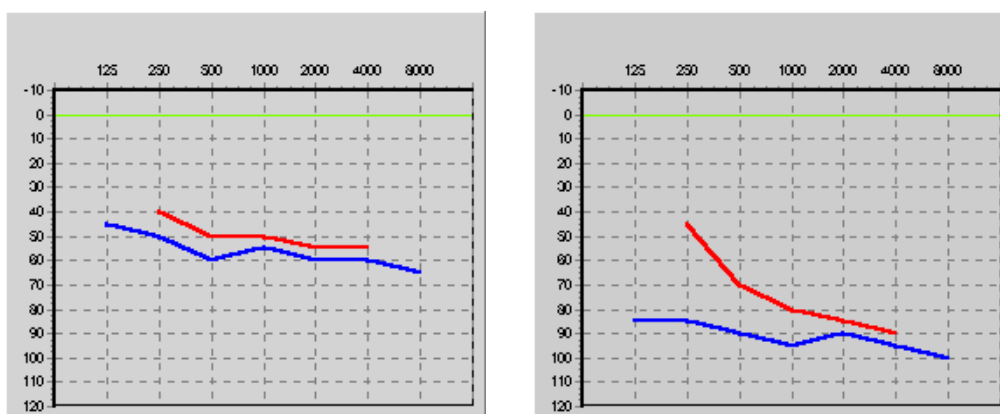
4.1.2.5. Testvérpár analízis

A 71 homozigóta beteg közül 8 testvérpárt (16 fő) tudtunk a fent említett szempontok alapján összehasonlítani (XIX. táblázat). A nagyothallás mértéke a 8 pár közül 5 esetben különböző volt (12. ábra). Három, a mutáció genotípusát tekintve azonos testvérpárnál eltérő a progresszió, a görbe lefutása és a kétoldali szimmetria.

XIX. táblázat: Nyolc 35delG homozigóta testvérpár összehasonlító táblázata a nagyothallás mértéke, a progresszió, az audiogram típusa és a két fül hallása alapján.

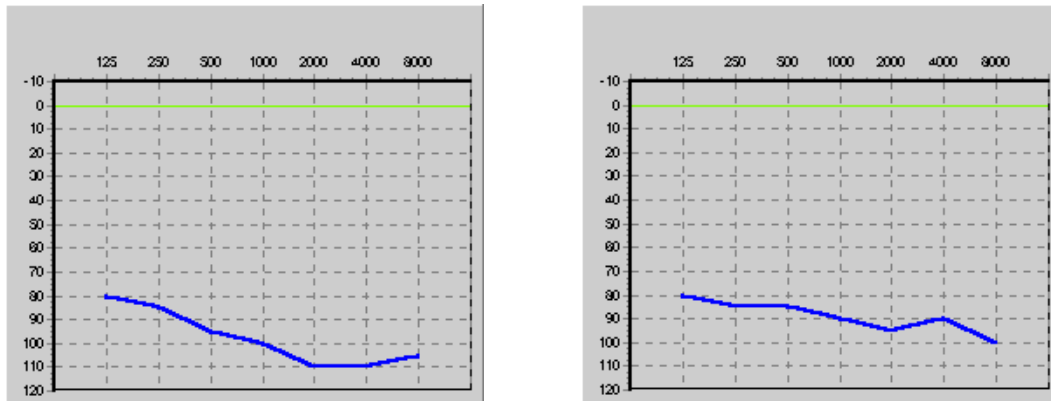
Testvérpár	Hallásvesztés	Progresszió	Görbe típusa	Két fül közti aszimmetria
A	< 65dB; 80-95dB	pozitív; negatív	lapos; lapos	nincs; 15-20dB
B	> 95dB; 80-95dB	negatív; negatív	ereszkedő; lapos	nincs; nincs
C	65-80dB; 65-80dB	pozitív; negatív	lapos; lapos	15dB; nincs
D	>95dB; >95dB	negatív; negatív	ereszkedő; ereszkedő	nincs; nincs
E	>95dB; >95dB	pozitív; negatív	lapos; ereszkedő	nincs; nincs
F	<65dB; >95dB	negatív; negatív	lapos; ereszkedő	nincs; nincs
G	80-95dB; >65-80dB	pozitív; pozitív	lapos; ereszkedő	nincs; nincs
H	80-95dB; >95dB	negatív; negatív	ereszkedő; ereszkedő	20dB; 25dB

a.)



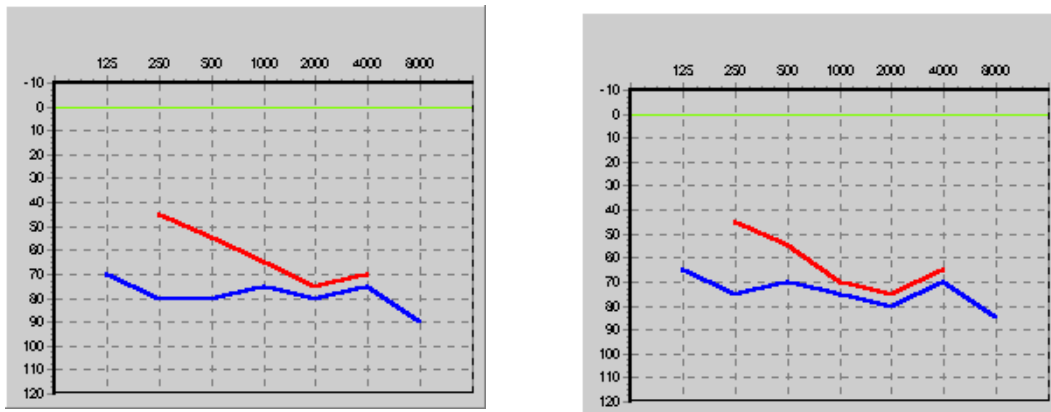
12.a. ábra: Az „A” testvérpár hallásgörbéi. Az ábrák csak a jobban halló fül adatait tartalmazzák. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. Az audiogram készítésekor az első testvér 36 éves, a míg a második 38 éves volt.

b.)



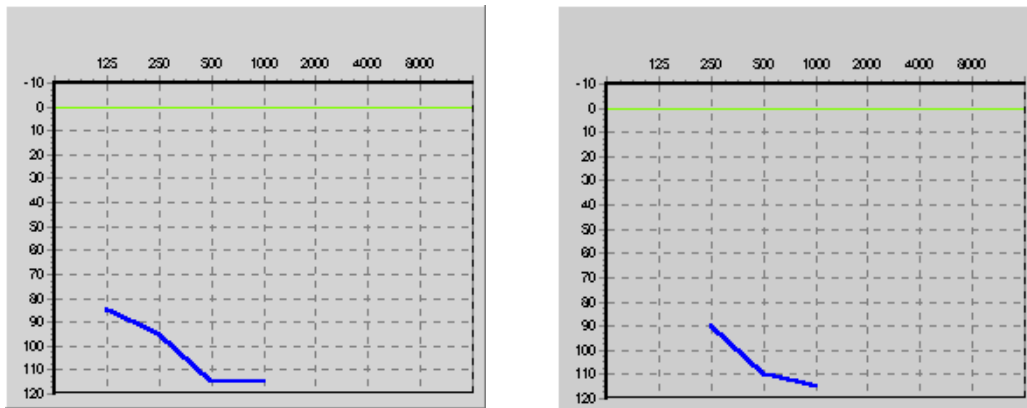
12.b. ábra: A „B” testvérpár halláslelete. Az ábrák csak a jobban halló fül adatait tartalmazzák. A kék vonal jelzi a légvezetést. Csontvezetést nem ábrázoltuk, mivel a nagyothallás mértéke nagyfokú, és így azt hamarabb érzik és jelzik, mint meghallják. Az első testvér (13 éves) nagyothallása rosszabb, görbájének lefutása ereszkedő. Testvérének (10 éves) a hallása valamivel jobb és a görbe lefutása lapos. A gyermekek édesanyjának hallásgörbéje a 12.a. ábra első audiogramján látható.

c.)



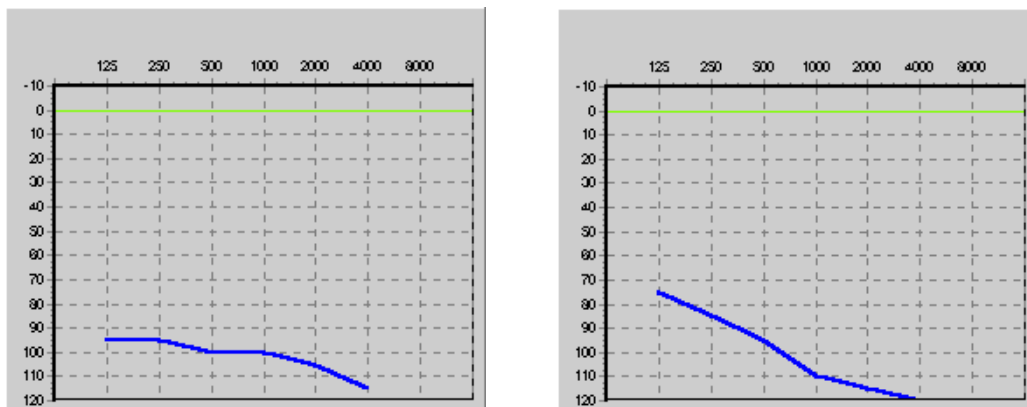
12.c. ábra: A „C” testvérpár hallásgörbéi. Az ábrák csak a jobban halló fül adatait tartalmazzák. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A hallásvesztés mértéke azonos a két esetben és a görbék lefutása lapos. A testvérek életkora az audiogram készítésekor 20 és 18 év volt.

d.)



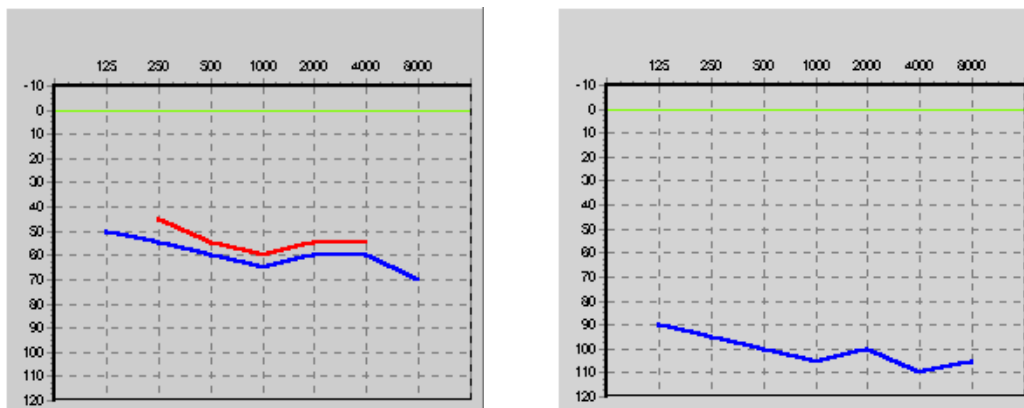
12.d. ábra: A „D” testvérpár halláslelete. Az ábrák csak a jobban halló fül adatait tartalmazzák. A kék vonal jelzi a légvezetést. Csontvezetést nem ábrázoltuk, mivel a nagyothallás mértéke nagyfokú, és így a csontvezetés mérésekor hamarabb érzik és jelzik a hangot, mint hallják. Mindkét testvér nagyothallása súlyos fokú. A testvérek életkora az audiogram készítésekor 46 és 41 év volt.

e.)



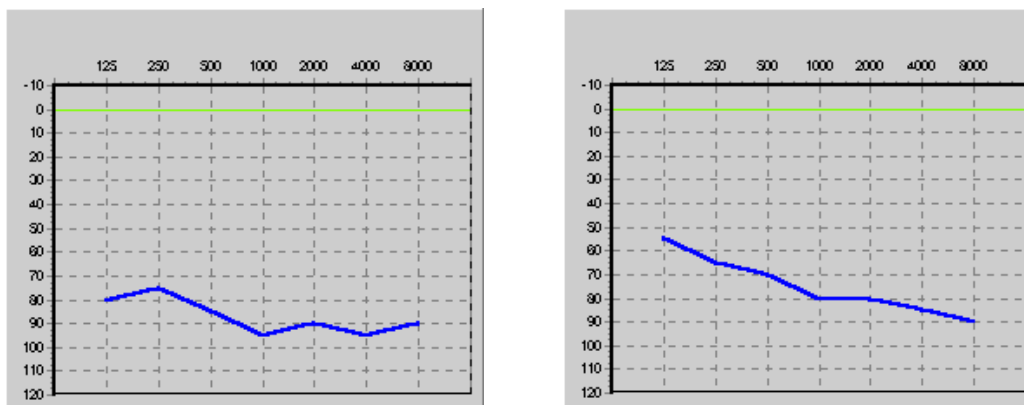
12.e. ábra: A „D” testvérpár halláslelete. Az ábrák csak a jobban halló fül adatait tartalmazzák. A kék vonal jelzi a légvezetést. A nagyothallás mértéke azonos az 500, 1000 és 2000 Hz tartományban, de a görbe lefutása az első esetben lapos, míg a másodikban ereszkedő. A testvérek életkora 18 és 16 év.

f.)



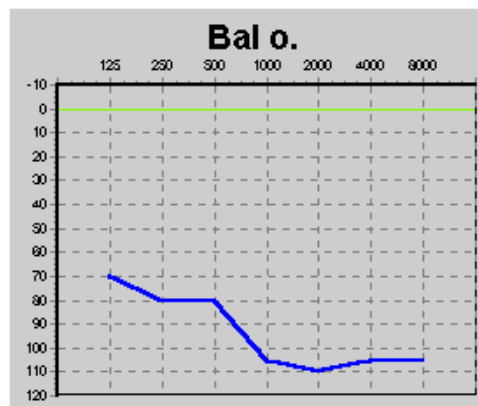
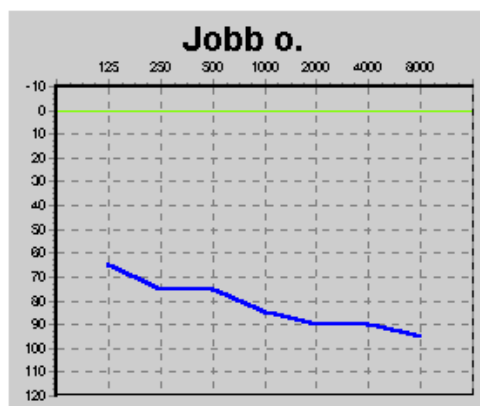
12.f. ábra: : Az „F” testvérpár hallásgörbéi. Az ábrák csak a jobban halló fül adatait tartalmazzák. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A nagyothallás mértéke az első esetben (10 éves) közepes fokú (<65 dB), míg testvérének hallásromlása nagyfokú (7 éves). A görbe lefutásában nincs eltérés a testvérek között.

g.)

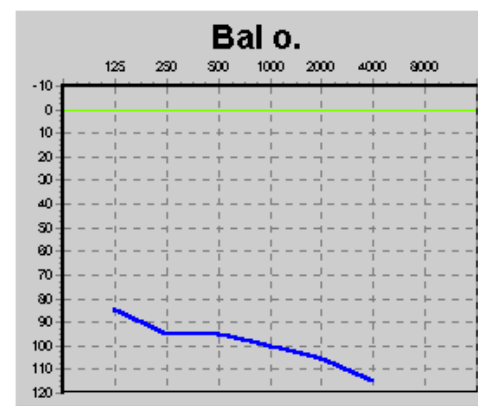
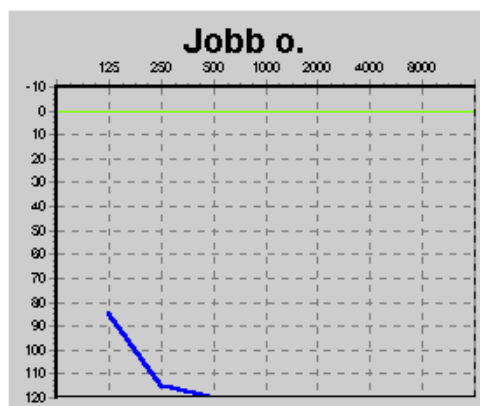


12.g. ábra: : A „G” testvérpár halláslelete. Az ábrák csak a jobban halló fül adatait tartalmazzák. A kék vonal jelzi a légvezetést. Az első testvér nagyothallásának mértéke 80-95 dB, míg a másodiknak 65-80 dB. A görbe lefutása lapos ill. ereszkedő formát mutat. A testvérek életkora az audiogram készítésekor 23 és 19 év volt.

h/1)



h/2.)



12.h. ábra: A „H” testvérpár audiogramjai. A nagyothallás mértéke, a görbe lefutása valamint a két fül közti aszimmetria eltérő az esetükben. Míg az első gyermeknél (9 éves) a jobb oldali fül, addig a testvérénél (7 éves) a bal oldali fül hallása jobb.

4.1.3. *GJB2* GÉN / 35delG HETEROZIGÓTA GENOTÍPUSHOZ TÁRSULÓ EGYÉB GENETIKAI ELTÉRÉSEK OKOZTA NAGYOTHALLÁS

A familiárisan és a sporadikusan öröklődő 35delG heterozigóta ill. vad genotípusú esetek DNS mintáit a *GJB2* gén kódoló exonjában lévő további mutációk detektálása céljából megszekvenáltuk. A 35delG mutáción kívül összesen 17 egyéb genetikai hibát identifikáltunk (*XX. táblázat*). A deléción és inszerción mellett leggyakrabban bázisszubsztitúció történt.

A mutációk egy része már ismert (31del14, S19T; W24X; R32C; M34T; V37I; E47X; 167delT; 235delC; L90P; 313del14; R127H; E129K; A149T; K223R), de a R127H; E129K; A149T szubsztitúciók esetében a mutáció patogén jellege még nem egyértelműen bizonyított. Két esetben új genetikai eltérést tudtunk analizálni (E42D; G59V). Kiemelendő a W24X nonszensz mutáció gyakorisága, amely 4 familiáris nem vérrokon betegnél (4,76%) és 6 sporadikus esetben (6,5%) volt azonosítható, így a második leggyakoribb eltérésként jellemezhető a nagyothalló betegeink *GJB2* génjében. A kontroll személyeket megvizsgálva 6 fő hordozta a W24X mutációt (2,8%) (*XIV. táblázat*).

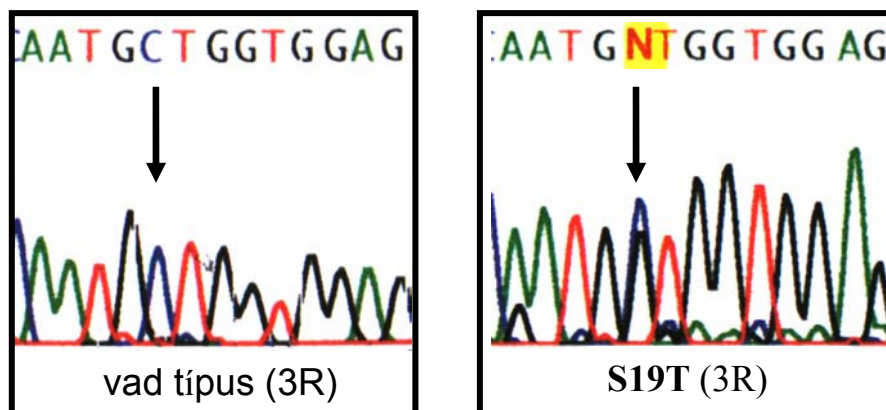
A továbbiakban a 35delG heterozigóta genotípushoz társuló egyéb genetikai eltérések jellemzőit mutatjuk be. Az ábrákon nyíllal jelöljük az egymásra vetített két allél eltérő nukleotidjait összehasonlítva a vad genotípussal. A pozitív eredmények szekvenálását minden esetben megismételtük mind „forward” (F), mind „reverse” (R) primerekkel, hogy a mindkét irányból történő szekvenálással a mutációt egyértelműen detektálhassuk.

XX. táblázat: Nagyothalló betegeinkben talált GJB2 gén mutációk összefoglalása

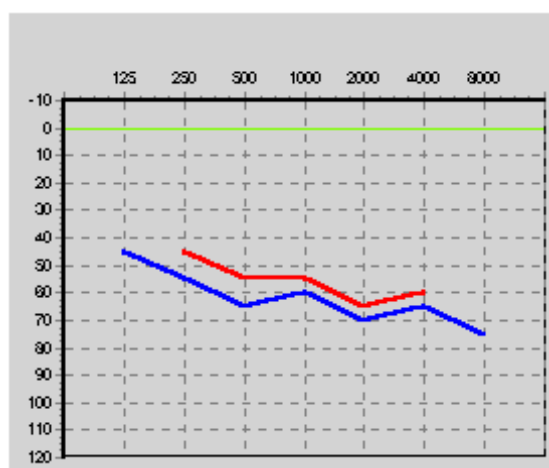
Mutáció	Nukleotid	Aminosav csere	Fehérje domain	Eset-szám	Öröklés-menet	Referencia
S19T	G / C	szerin (poláris)/ treonin (poláris)	IC1	1	recesszív	Rabionet, 2000
31del14	del14	kereteltolódás	IC1	1	recesszív	Murgia, 1999
W24X	G / A	triptofán (apoláris)/ STOP	TM1	10	recesszív	Kelsell, 1997
R32C	C / T	arginin (bázikus)/ cisztein (apoláris)	TM1	1	recesszív	Prasad, 2000
M34T	T / C	metionin (apoláris)/ treonin (poláris)	TM1	1	recesszív	Kelsell, 1997
V37I	G / A	valin (apoláris)/ izoleucin (apoláris)	TM1	2	recesszív	Kelley, 1998 Rabionet, 2000
E42D	G / C	glutaminsav (savas)/ asparaginsav (savas)	EC1	1	recesszív	(Tóth, 2003)
E47X	G / T	glutaminsav (savas)/ STOP	EC1	4	recesszív	Denoyelle, 1997
G59V	G / T	glicin (apoláris)/ valin (apoláris)	EC1	2	domináns (?)	(Tóth, 2003)
167delT	delT	kereteltolódás	EC1	1	recesszív	Zelante, 1997
235delC	delC	kereteltolódás	TM2	1	recesszív	Fuse, 1999
L90P	T / C	leucin (apoláris)/ prolin (apoláris)	TM2	3	recesszív	Murgia, 1999
313del14	del14	kereteltolódás	IC2	1	recesszív	Kupka, 2002
R127H	G / A	arginin (bázikus)/ hisztidin (bázikus)	IC2	7	recesszív	Rabionet, 2000 (Tóth, 2003)
E129K	G / A	glutaminsav (savas)/ lizin (bázikus)/	IC2	1	?	Kenna, 2001
A149T	G / A	alanin (apoláris)/ treonin (poláris)	TM3	3	nem meghatáro- zott	Rabionet, 2000 (Tóth, 2003)
K223R	A / G	lizin (bázikus)/ arginin (bázikus)	IC3	9	polimor- fizmus	Kupka, 2002

4.1.3.1. S19T / 35delG

Az S19T aminosavcsere egy közepes fokú nagyothalló beteg esetében 35delG mutációval társult. A kódoló exon 56. helyén egy guanin → citozin csere (AGC→ACC) következtében szerin (S) helyett treonin (T) épül be 19. aminosavként a fehérje N-terminális intracelluláris domainjébe (Rabionet, 2000). Az ábrán a komplementer (reverz) szekvenálás látható (13. ábra). A következő ábra a beteg hallásgörbáját mutatja (14. ábra).



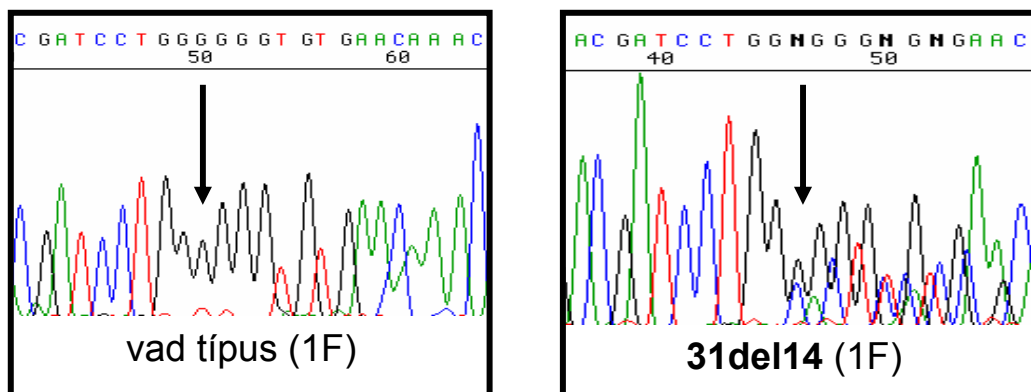
13. ábra: S19T mutáció a GJB2 génben. A nyíl jelzi a gén kódoló exonjának 56. pozícióját, mely a vad típus esetében mindkét allélon guanint tartalmaz, míg az S19T mutáció esetében ugyanezen a pozícióban az egyik allélon citozin (kék), a másikon guanin (fekete) látható. Mivel az ábra reverz szekvenálást (3R) mutat, így az adott nukleotidok komplementerei láthatók.



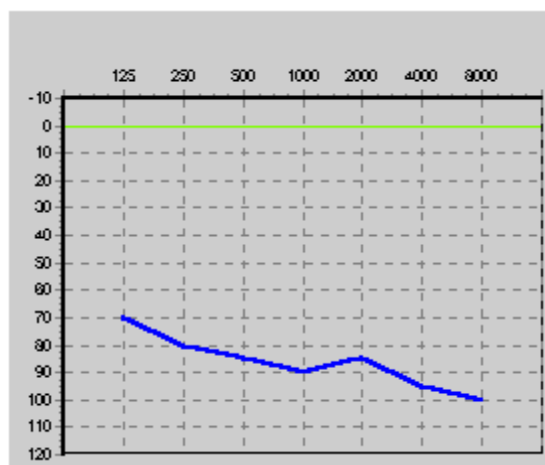
14. ábra: Az ábrán a S19T / 35delG genotípusú 58 éves beteg audiogramja látható. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A nagyothallás mértéke közepes fokú.

4.1.3.2. 31del14 / 35delG

A *GJB2* gén kódoló exonjának 31. pozíciójától kezdődően 14 nukleotid deléciója a connexin fehérje szintézisének súlyos zavarát okozza (Murgia, 1999) (15. ábra). Mivel recesszív öröklésmenetű, ezért csak a másik allél érintettsége esetén kerül felismerésre. Esetünkben a hordozó édesanya panaszmentes, míg a gyermekben 35delG mutációval társulva már nagyfokú nagyothallást eredményez (16. ábra).



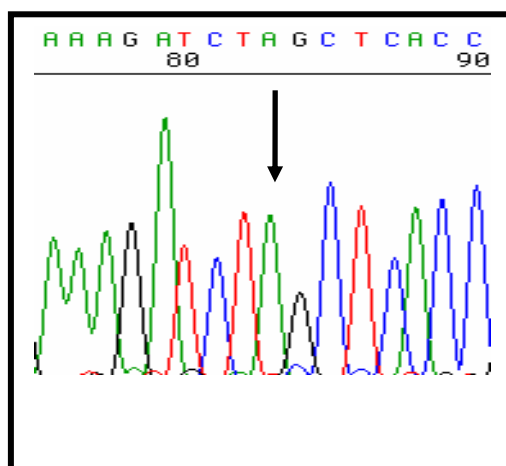
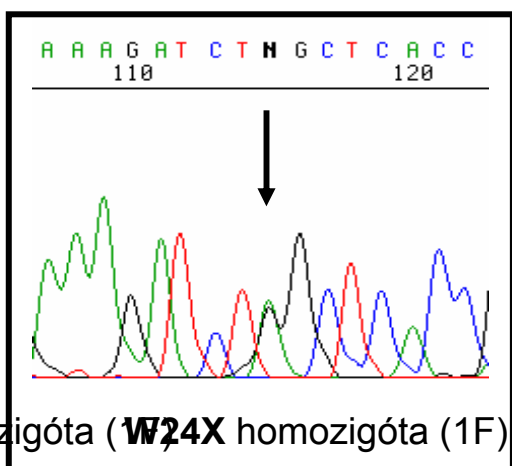
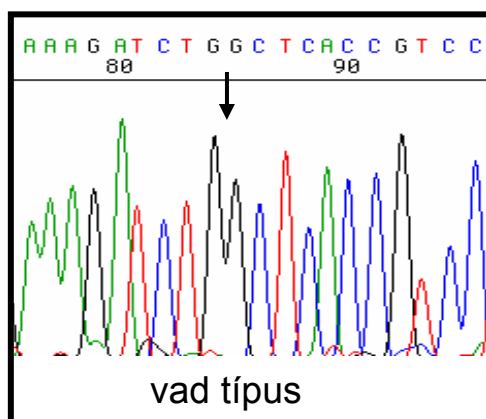
15. ábra: 31del14 mutáció a *GJB2* génben. A nyíl jelzi a kódoló exon 31. nukleotidját, ahol az egyik allélon a 14 nukleotid deléciója kezdődik. Az ábrán a vad típushoz a mutációval rendelkező 1F szekvenálási képét hasonlítottuk.



16. ábra: Az ábrán a 31del14 / 35delG genotípusú 8 éves kislány audiogramja látható. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést. A nagyothallás mértéke nagyfokú.

4.1.3.3. W24X / 35delG

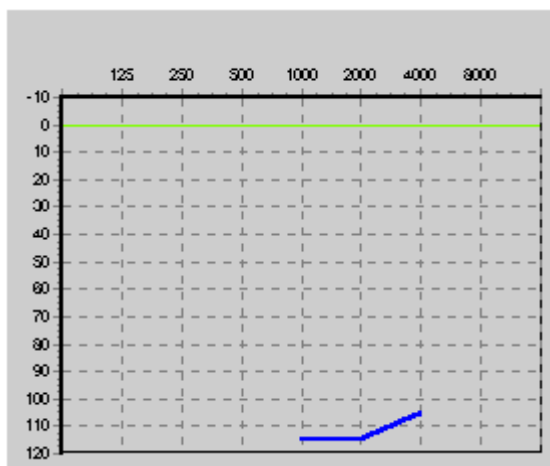
Négy familiáris esetben és 4 sporadikus személynél a W24X nonszensz mutáció 35delG delécióval társult. A W24X genetikai hiba a 71. nuleotid guaninról adeninre történő cserélődése miatt jött létre, amely során a 24. triplet a triptofán (W) helyett stop kodont (X) kódol az első transzmembrán domainban (17. ábra). Ennek következtében a transzlációs folyamat idő előtt befejeződik (Kelsell, 1997). (A 17. ábrán W24X homozigóta genotípus is látható, de a 2 homozigóta betegünk esetében audiogram nem áll a rendelkezésünkre, mert mindkét gyermek életkora 2 év alatt volt.) A nagyothallás mértékében és a görbe lefutásában nem találtunk egyértelmű jellegzetességeket (18. ábra).



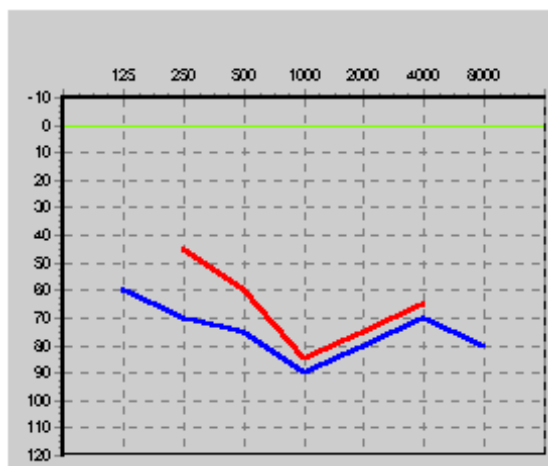
W24X heterozigóta (W24X homozigóta (1F))

17. ábra: W24X mutáció a GJB2 génben. A nyíl jelzi a heterozigóta esetben ugyanazon pozícióban lévő allélokon az adenin (zöld) és guanin (fekete) nukleotidokat. A homozigóta esetben a 71. pozícióban guanin helyett mindkét allélon adenin található. A mutációkat a vad típussal hasonlítottuk össze.

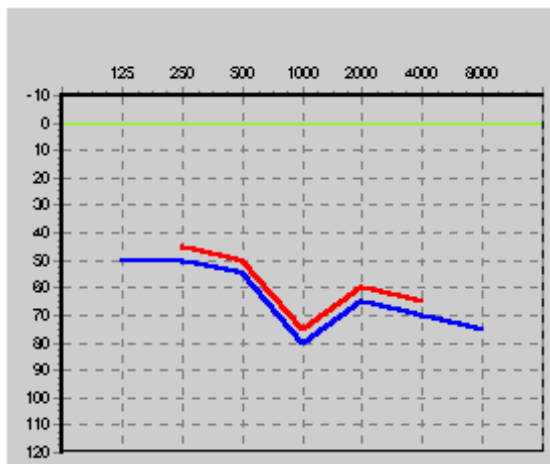
A.



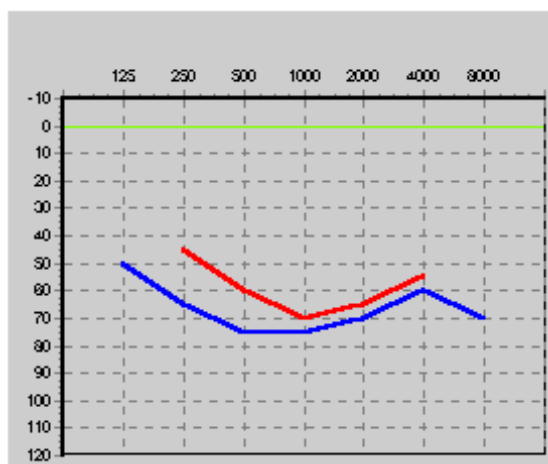
B.



C.



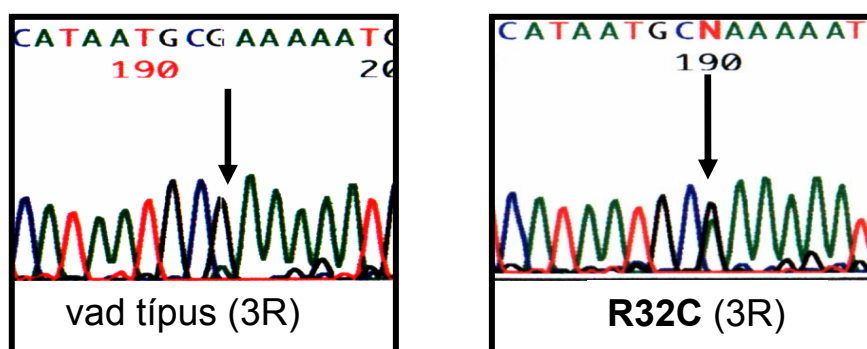
D.



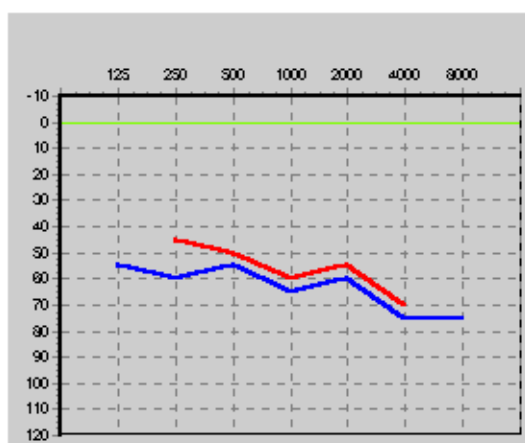
18. ábra: Az ábrán a W24X / 35delG genotípusú betegek audiogramjai láthatók. Az ábra a betegek jobban halló fülének adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. Az „A” és „B” audiogramok egy édesapa (49 éves) és fia (18 éves) hallását mutatja be ugyanolyan genotípus mellett. A „C” és „D” hallásgörbén egy-egy különálló eset halláslelete látható. A „C” személy a vizsgálatkor 47 éves volt, míg a „D” személy 10 éves.

4.1.3.4. R32C / 35delG

A 19. ábrán a kódoló exon 94. nukleotidjának (citozin) timinre cserélődése látható. Ezért 32. aminosavként a bázikus arginin (R) helyet apoláris cisztein (C) épül be (Prasad, 2000). Az ábrán a komplementer 3R szekvenálást hasonlítjuk össze a vad típusú genom ugyan ezen szakaszával (19. ábra). Egy közepes fokú nagyothalló betegünkönél tudtuk ezt a báziscserét 35delG delécióval társulva kimutatni (20. ábra).



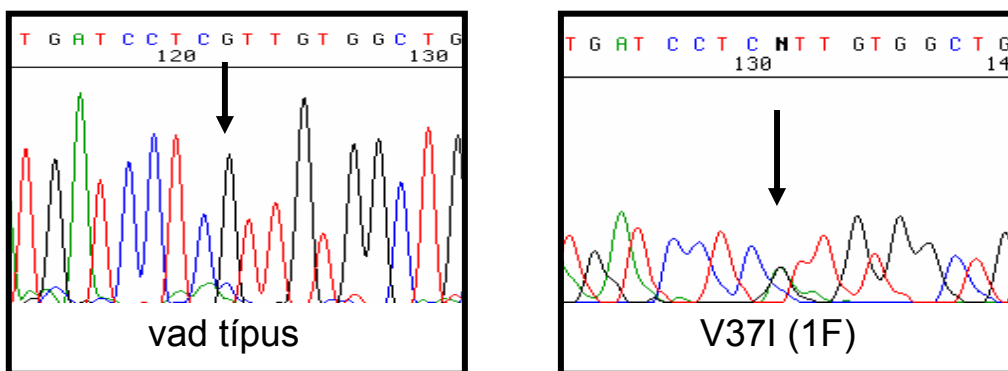
19. ábra: R32C mutáció a GJB2 génben. A nyíl jelzi a gén kódoló exonjának 94. pozícióját, mely a vad típus esetében mindkét allélon citozint (kék) tartalmaz, míg az R32C mutáció során ugyanezen a helyen az egyik allélon citozin, a másikon timin (piros) látható. Mivel reverz szekvenálásról (3R) van szó, így az adott nukleotidok komplementereit jelzi az ábra.



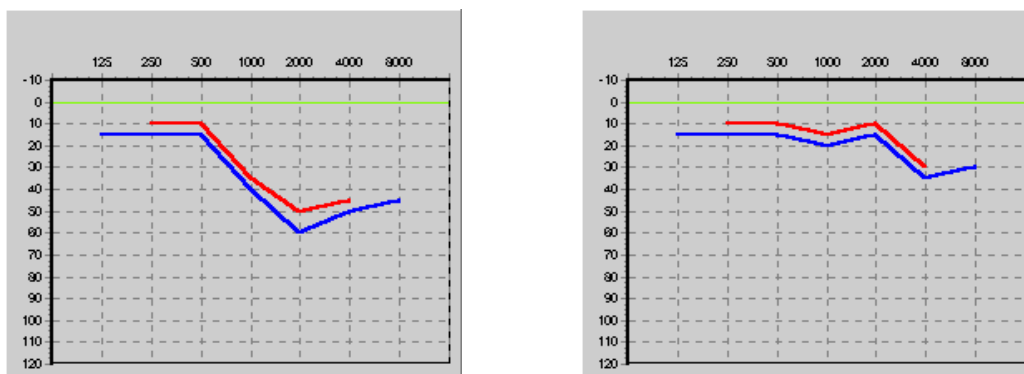
20. ábra: Az ábrán a R32C / 35delG genotípusú 54 éves beteg audiogramja látható. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A nagyothallás mértéke közepes fokú.

4.1.3.5. V37I / 35delG

Ez a szubsztitúció sokáig polimorfizmusként volt ismert. Először 1998-ban *Kelley és mts-i* írtak le V37I heterozigóta nagyothallókat, de ezek az esetek nem igazolták, hogy a V37I genetikai eltérés heterozigóta jelenléte patológiás elváltozást okozna a fenotípusban (Kelley, 1998). Két év múlva a japán populáció vizsgálata során még szintén polimorfizmusként emlegetik (Kudo, 2000). Ugyanebben az évben *Rabionet és mts-i* V37I homozigóta súlyos nagyothallókról számoltak be (Rabionet, 2000). A szubsztitúció eredménye, hogy 37. aminosavként valin (V) helyett izoleucin (I) épül be az első transzmembrán domainbe (21. ábra). Beteganyagunkban egy fiatal testvérpár mindkét tagjánál a V37I mutáció 35delG mutációval társulva a 11 éves fiú esetében magas hangoknál közepes fokú, az 5 éves kislánynál kismértékű nagyothallást eredményezett (22. ábra).



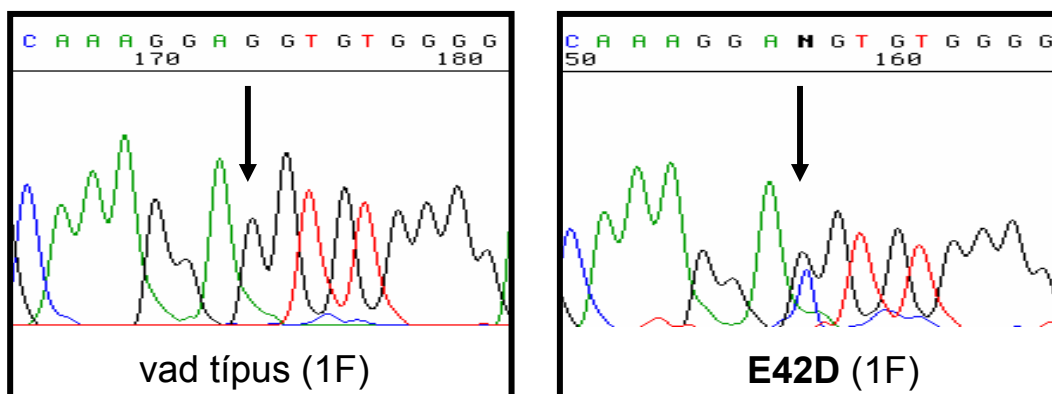
21. ábra: V37I szubsztitúció a GJB2 génben. A nyíl jelzi a gén kódoló exonjának 37. tripletjében lévő guanint (fekete), mely V37I heterozigóta állapot esetén adeninre (zöld) cserélődik. Az ábra az 1F primerrel történt szekvenálást mutatja.



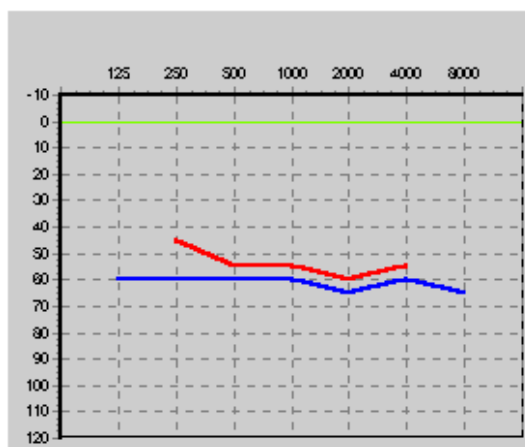
22. ábra: Az ábrán a V37I / 35delG genotípusú testvérpár audiogramjai láthatók. Az ábra csak a jobban halló fél adatait tartalmazza. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A 11 éves fiútestvérnél a magas hangoknál közepes fokú, míg az 5 éves kislánynál kismértékű perciepció nagyothallása van.

4.1.3.6. E42D / 35delG

Az E42D szubsztitúció a 126-s nukleotidnál történt guanin → citozin csere következménye, amikor 42. aminosavként glutaminsav (E) helyett aszparaginsav (D) épül be a fehérjelánc extracelluláris 1-es domainjébe (23. ábra). Ezt a mutációt egy 35delG heterozigóta esetben sikerült azonosítani, akinek fenotípusa prelingualis eredetű, percepciós típusú, közepes fokú nagyothallást mutatott (24. ábra). A beteg családjában szülei és testvére is nagyothalló, de ők nem járultak hozzá a genetikai vizsgálathoz.



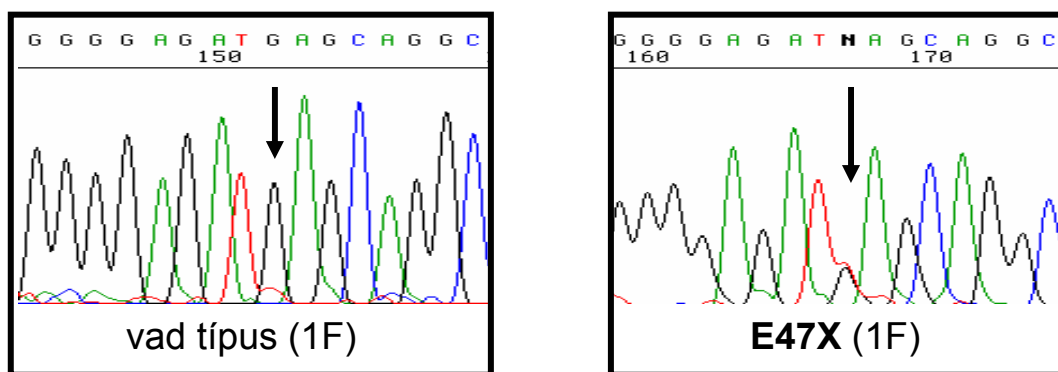
23. ábra: E42D mutáció a GJB2 génben. A mutációt hordozó szekvenciát a vad típussal hasonlítottuk össze. A nyíl a 126. pozícióban lévő guanin (fekete) és citozin (kék) nukleotidokra mutat rá.



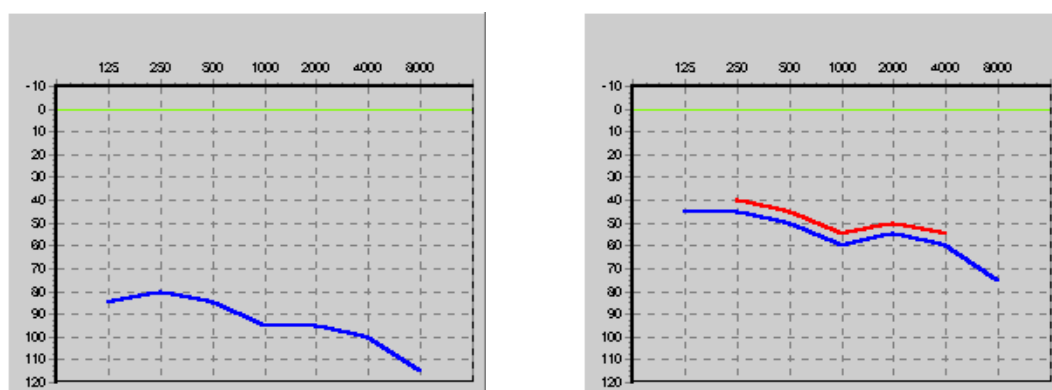
24. ábra: Az ábrán az E42D / 35delG genotípusú 22 éves lány audiogramja látható. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A nagyothallás közepes fokú és percepciós típusú.

4.1.3.7. E47X / 35delG

E47X nonszensz mutáció következtében a kódoló exon 139. bázisa guaninról timinre cserélődik (GAG → TAG), mely glutaminsav (E) helyett stop kodont (X) kódol, így a fehérje szintézise a 47. aminosav után ezen az allélon befejeződik (25. ábra). Ez a rövid polipeptidlánc funkcióképtelen (Denoyelle, 1997). Egy nagyothalló édesapa és lánya ill. egy másik családban az édesanya és lánya esetében az E47X genetikai hiba 35delG mutációval társult. A 33 éves édesapának mindkét oldalt nagyfokú nagyothallása, míg a 7 éves kislánynak mindkét oldalt közepes fokú hallásromlása van. A másik családban a 36 éves édesanyának és a 11 éves lányának súlyos fokú nagyothallása van. (26. ábra)



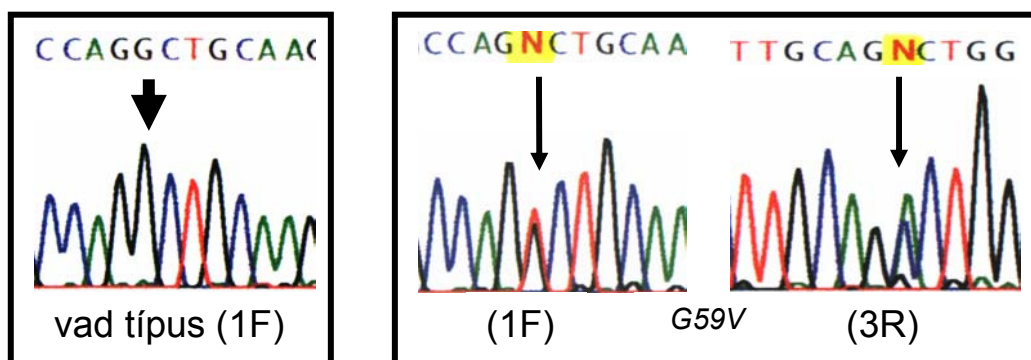
25. ábra: E47X nonszensz mutáció a GJB2 gén kódoló exonjában. A nyíl rámutat a 139. pozícióban lévő guaninra (fekete) a vad típusú, ill. a guanin és timin (piros) nukleotidokra a mutációt hordozó genomban.



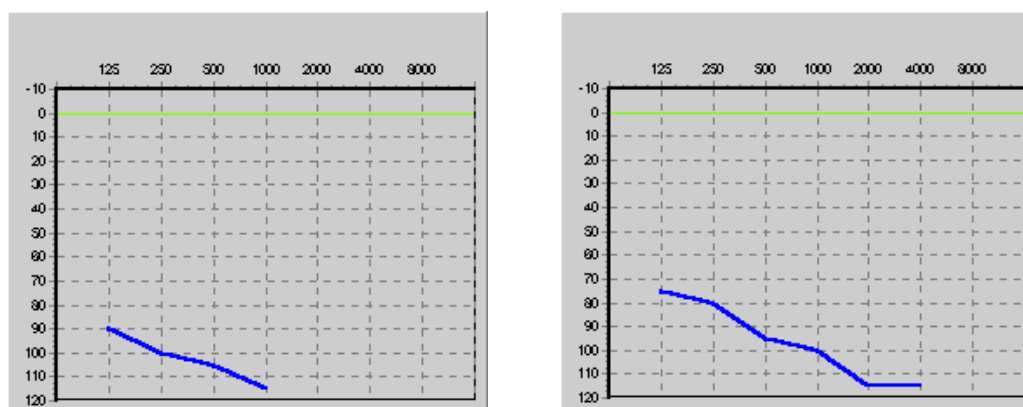
26. ábra: Az ábrán az E47X / 35delG genotípusú apa és lánya audiogramjai láthatók. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A 33 éves apánál a hallás nagyfokú NH-t mutatott és a csontvezetés nem volt pontosan meghatározható. A 7 éves kislány esetében közepes fokú NH volt regisztrálható.

4.1.3.8. G59V

A G59V mutáció egy guanin → timin transzverziót jelöl az 59-es kodonban, melynek következtében glicin (G) → valin (V) aminosavcsere történik az EC1 domainben. Egy familiáris nagyothalló beteg genotípusában a G59V mutáns allél 35delG mutációval társult, míg nagyothalló édesapja esetében nem volt kimutatható egyéb mutáció a *GJB2* másik allélján (27. ábra).



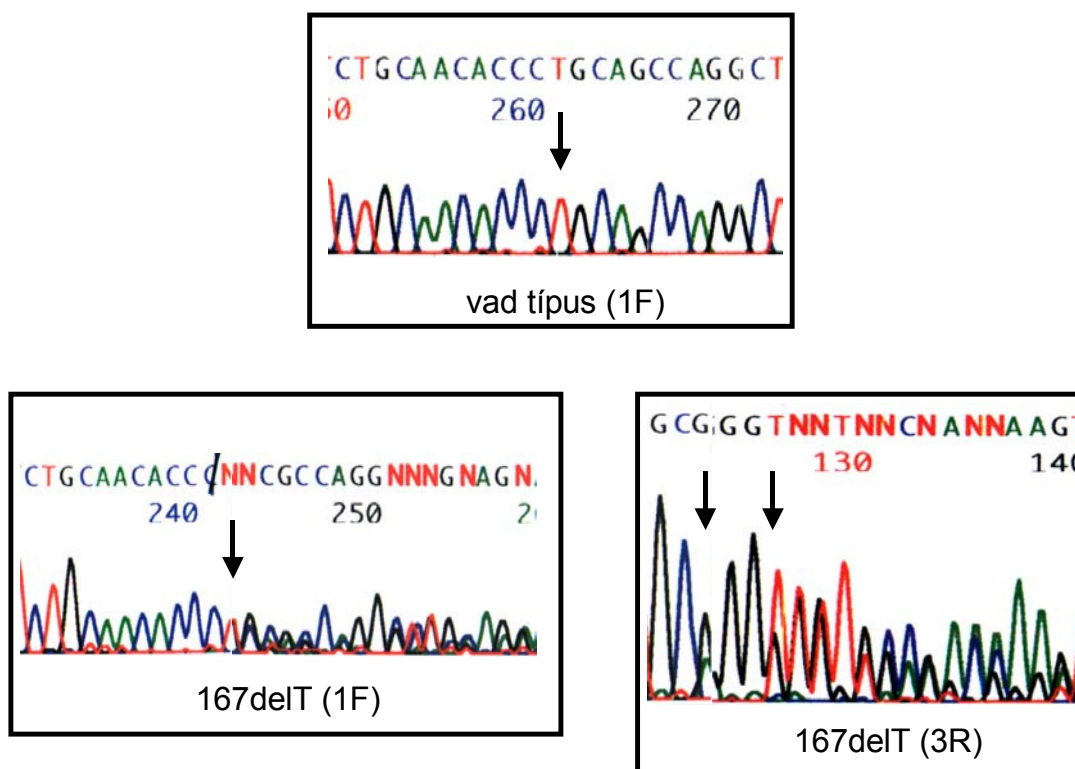
27. ábra: G59V mutáció a *GJB2* génben. A nyíl jelzi a gén kódoló exonjának 176. pozícióját, mely a vad típus esetében mindkét allélon guanint (fekete) tartalmaz, míg a G59V mutációnál ugyanezen az allélhelyen timin (piros) látható. Az 1F szekvenálás komplementere a 3R reverz szekvenálás, amely az 1F primer által megszekvenált szakasz komplement nukleotidjait tartalmazza.



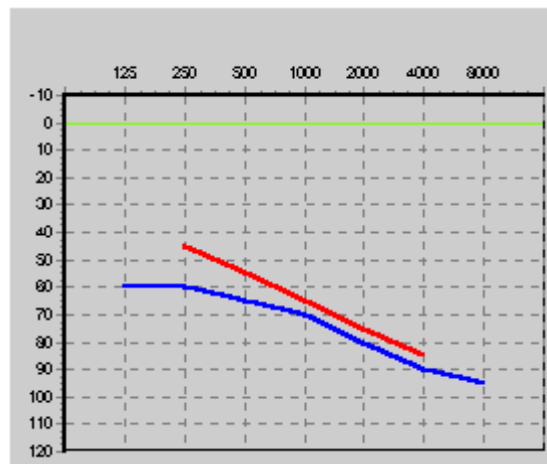
28. ábra: Az ábrán az G59V / 35delG genotípusú 30 éves nő audiogramja látható. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést. A második audiogram a 60 éves édesapa vizsgálata során készült, akinek a genotípusa G59V/-.

4.1.3.9. 167delT / 35delG

A 29. ábrán látható 167delT mutációt először *Zelante és mts-i* írták le (Zelante, 1997). Az 56-os kodonban a timin deléciója kereteltolódáshoz vezet, amelyet a heterozigóta genotípusú szekvenciaképen a görbék egymáshoz viszonyított egy nukleotidnyi eltolódása mutat (29. ábra). A kétirányú szekvenálással (1F és 3R) a genetikai hiba pontos helye meghatározható. *Morell és mts-i* az amerikai Ashkenázi zsidó populációt vizsgálva szignifikánsan magas 167delT előfordulási gyakoriságról számolt be (4,03%), míg ugyanebben a populációban a 35delG mutáció gyakorisága csak 0,73% volt (Morell, 1998). A mi beteganyagunkból egy 27 éves férfi esetében társult az említett genetikai hiba 35delG delécióval, s ezzel a mély frekvenciákon közepes fokú, míg a magasabb frekvenciákon nagyfokú nagyothalláshoz vezetett (30. ábra).



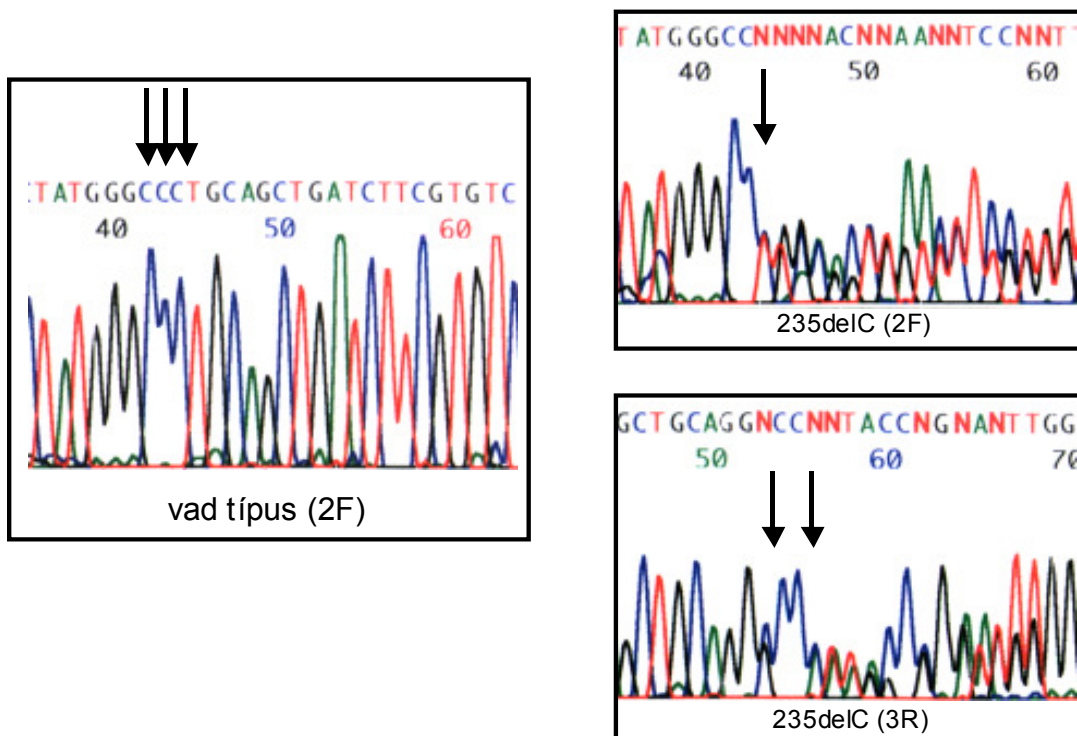
29. ábra: 167delT deléció a GJB2 génben. A nyíl jelzi a gén kódoló exonjának 167. pozícióját. Az 1F szekvenálás komplementere a 3R „reverse” szekvenálás. A kétirányú szekvenálással bizonyítható a timin deléciója a 167. pozícióban.



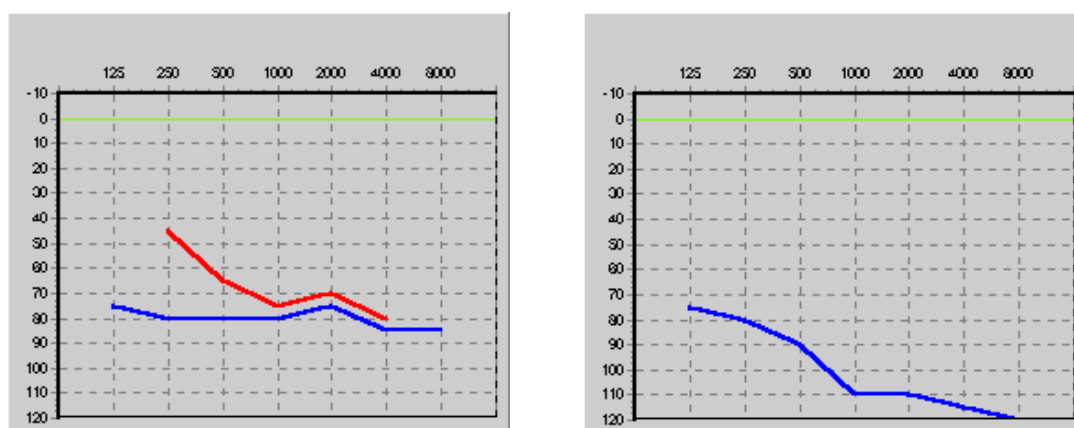
30. ábra: Az ábrán a 167delT / 35delG genotípusú 27 éves beteg audiogramja látható. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A nagyothallás mértéke a mély frekvenciatartományban közepes fokú, míg a magasabb frekvenciatartományban nagyfokú.

4.1.3.10. 235delC / 35delG

Egymástól független két tanulmány adatai szerint az ázsiai populációban a *GJB2* gén leggyakoribb genetikai hibája a 235delC. Kiemelendő, hogy ugyanebben a népességcsoportban nem találtak 35delG mutációt hordozó esetet (Fuse, 1999). A 233-235. nukleotidok közül (CCC) egy citozin kiesésének következtében kereteltolódás jön létre, így a második transzmembrán domainben a 79. triplettől a connexin fehérje aminosav sorrendje megváltozik, s szintézise idő előtt befejeződik (31. ábra). Vizsgálati anyagunkban két egymástól független nagyothalló esetben az említett mutáció a 35delG-vel társult. Egyik esetben sem ismert ázsiai eredetű rokon. Az 55 éves nőbeteg nagyothallása nagyfokú, míg a 15 éves fiúé súlyos fokú (32. ábra).



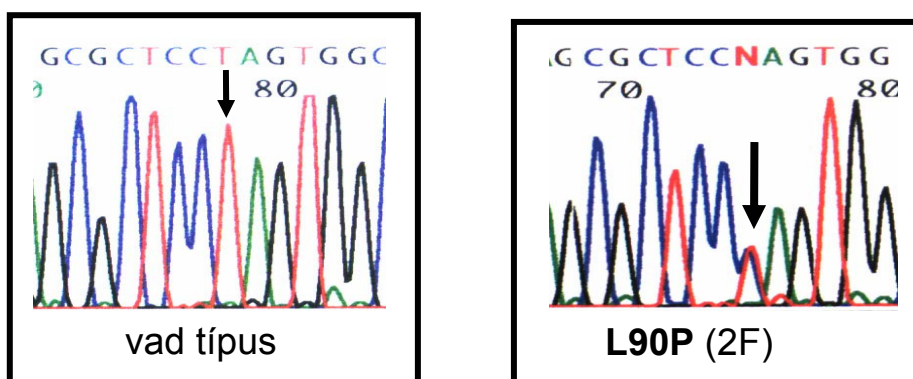
31. ábra: 235delC deléció a GJB2 génben. A nyíl jelzi a gén kódoló exonjának 235. pozícióját. A kétirányú szekvenálással (2F; 3R) bizonyítható a citozin deléciója. A 3R szekvenálás a nukleotidok komplementer párját tartalmazza.



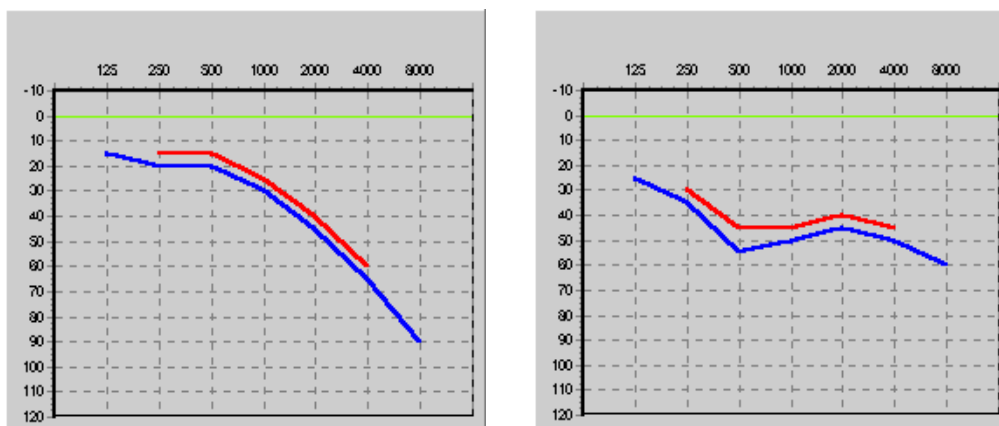
32. ábra: Az ábrán a 235delC / 35delG genotípusú nem rokon betegek audiogramjai láthatók. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. Az 55 éves nőbeteg nagyothallása nagyfokú (első audiogram), míg a 15 éves fiúé súlyos fokú.

4.1.3.11. L90P / 35delG

Az L90P genetikai eltérést három, egymástól független esetben sikerült kimutatni. Az 1999-ben leírt mutáció leucin (L) (CTA) → prolin (P) (CCA) cserét jelent a fehérjelánc 2. transzmembrán domainjének 90. kódoló tripletjében (Murgia, 1999) (33. ábra). A három esetből egy 42 éves férfinak súlyos fokú nagyothallása van, viszont egy 12 éves fiúnál és egy 9 éves lánynál ennél sokkal jobb hallást tudtunk mérni, mely audiogramok a 34. ábrán láthatók (34. ábra).



33. ábra: L90P mutáció a GJB2 génben. A nyíl jelzi a gén kódoló exonjának 269. pozícióját, mely a vad típus esetében mindkét allélon timint tartalmaz, míg az L90P mutáció esetében ugyanezen a helyen citozin látható. A 2F szekvenálási görbén a piros (timin) és a kék (citozin) görbék jelzik a két allél kódoló exonjának 269. nukleotidjait.

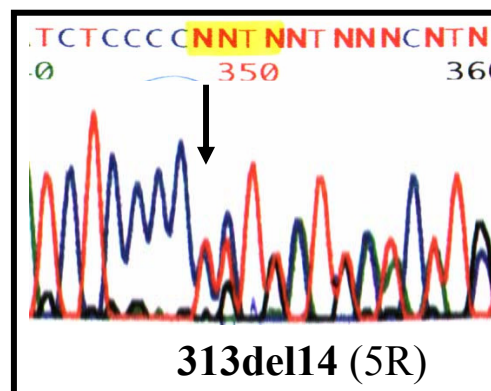
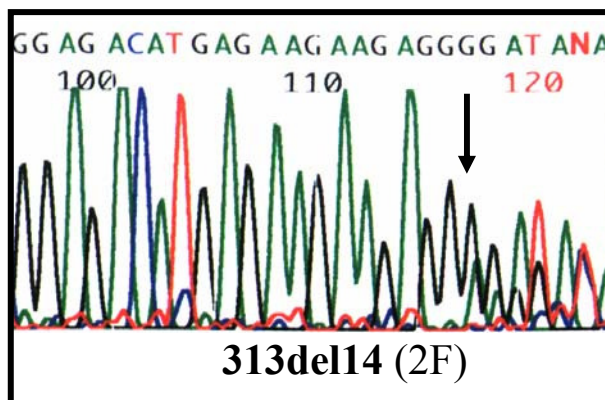
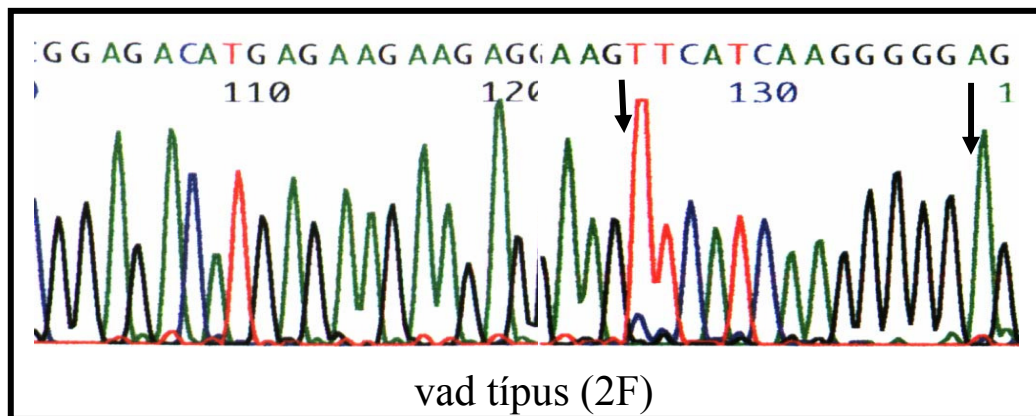


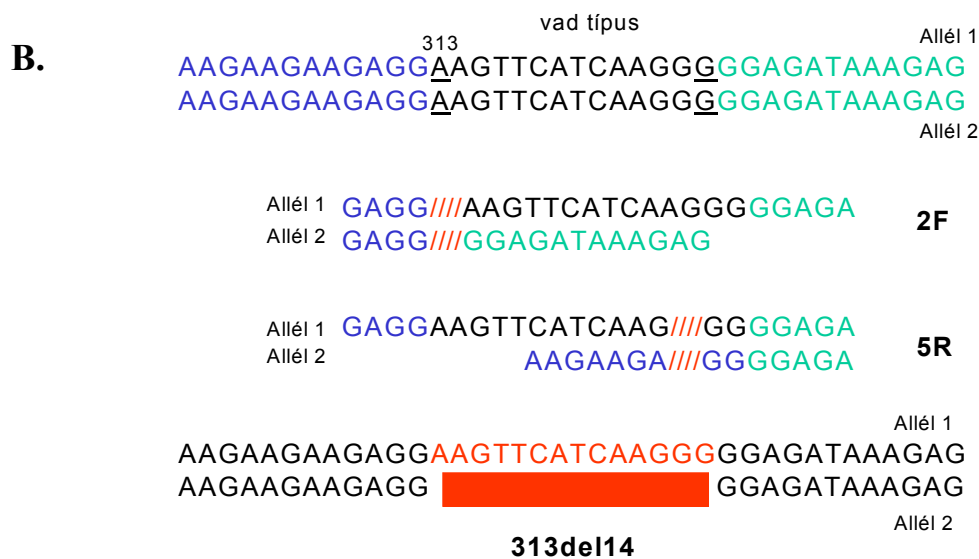
34. ábra: Az ábrán az L90P / 35delG genotípusú betegek audiogramjai láthatók. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. Az első audiogram egy 12 éves fiú közép frekvenciákon közepes fokú, a magas frekvenciáknál nagyfokú NH-át mutatja, míg a másodikon egy 9 éves kislány csaknem minden frekvenciatartományra kiterjedő közepes fokú NH hallásgörbéje látható.

4.1.3.12. 313del14 / 35delG

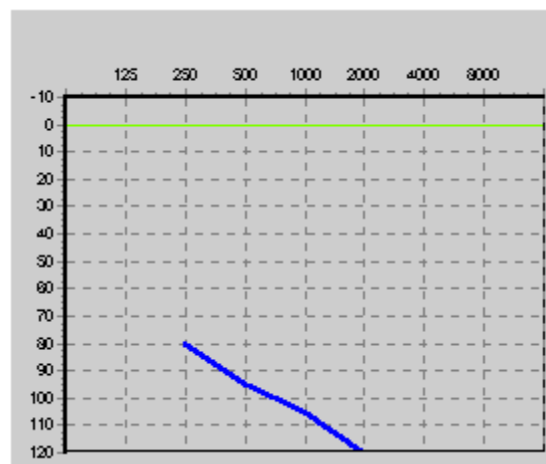
Ez a mutáció 14 nukleotid kiesését jelöli a 313-as pozíciótól kezdődően. A szakirodalomban négy hasonló mutációt írtak már le: 310del14, 311del14, 312del14 és 314del14. A 2F ill. 5R szekvenálással kimutatható, hogy a mi esetünkben a 313-s pozícióban van a deléció kezdete (35. ábra). Egy családon belül 3 normál halló hordozza ezt a mutációt, míg a negyedik súlyos fokú nagyothalló beteg genotípusában a mutáció 35delG genetikai hibával társul (36. ábra).

A.





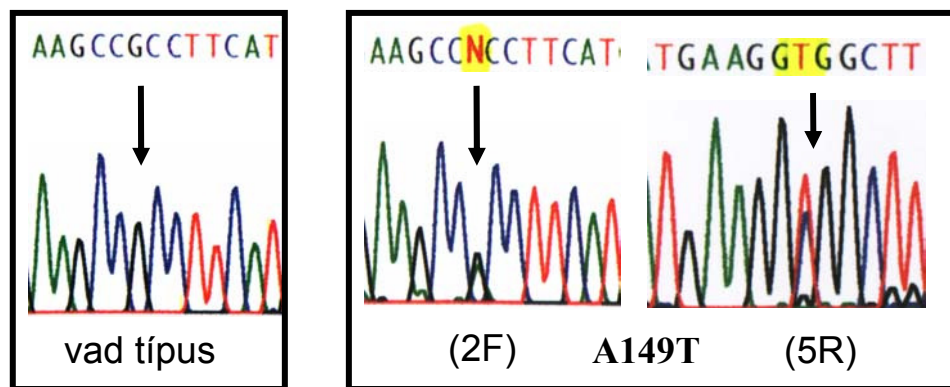
35. ábra: 313del14 deléció. **A:** 313del14 deléció a GJB2 génben. A nyíl jelzi a gén kódoló exonjának 313-as pozícióját. A 2F szekvenálás komplementere az 5R reverz szekvenálás. A kétirányú szekvenálással bizonyítható a 14 nukleotid deléciója a 313-as pozíciótól kezdődően. **B:** Sematikus ábrán látható a vad típusú genom nukleotid sorrendje az említett régióban, valamint a 14 nukleotid kiesésének kezdő és végpontjai 2F szekvenálás ill. az 5R szekvenálás alapján.



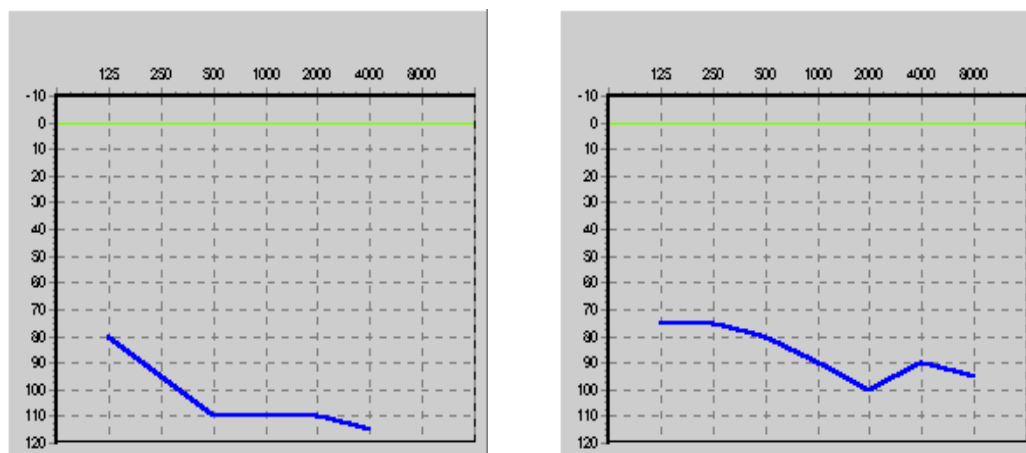
36. ábra: Az ábra a 313del14 / 35delG genotípusú 33 éves nőbeteg hallásgörbéjét mutatja. A hallásvesztés mértéke siketiséggel határos. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést. A csontvezetés nem volt meghatározható.

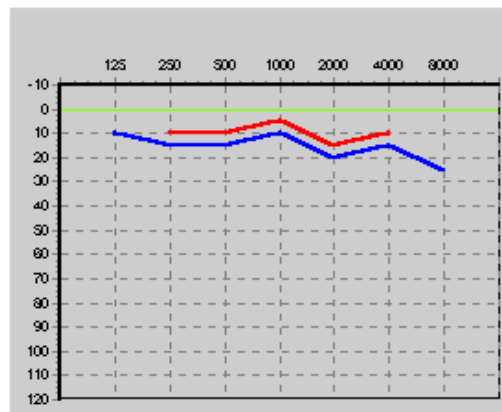
4.1.3.13. A149T / 35delG

A 6. családban négy A149T genetikai hibát hordozó családtagot (guanin → adenin csere a 445. pozícióban; alanin (A) helyett treonin (T) kódolódik) azonosítottunk (37. ábra). Három személynek nagyfokú halláskárosodása van, egy személy normál halló (49. ábra). Két hallássérült személy és egy normál halló, de szellemileg sérült gyermek esetében az említett genetikai hiba 35delG mutációval párosult (38. ábra).



37. ábra: A149T mutáció a GJB2 génben. A nyíl jelzi a gén kódoló exonjának 445. pozícióját, mely a vad típus esetében mindkét allélon guanint tartalmaz, míg az A149T mutáció esetében ugyanezen a helyen adenin látható. A 2F szekvenálás során a fekete szín guanin, a zöld adenin nukleotidot jelez, míg az 5R szekvenáláskor kék (citozin) és a piros (timin) görbék láthatók a két allél 445-ös nukleotidjaként.

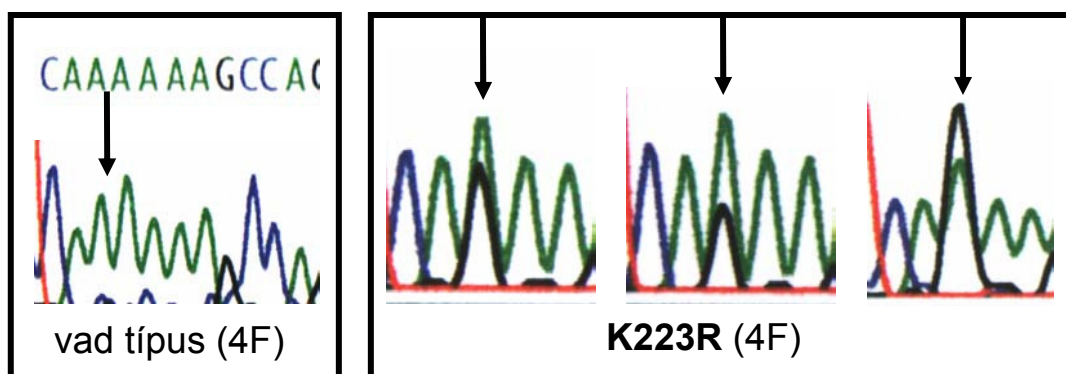




38. ábra: Az ábrán az A149T / 35delG genotípusú betegek audiogramjai láthatók. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. Az audiogram abszcisszája a frekvenciát, az ordináta az intenzitást mutatja. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A testvérek közül a 11 éves kislánynak súlyos fokú nagyothallása van (első audiogram), a 9 éves kisfiú nagyfokú nagyothalló (második audiogram), míg a 13 éves szellemi fogyatékos fiúnak teljes hallása van.

4.1.3.14. K223R

A 2002-ben leírt K223R mutációról tudjuk, hogy patológiás eltérést nem okozó polimorfizmus, mert mind a beteg, mind a kontroll személyek DNS mintáiban kimutatható volt (Kupka, 2002) (39. ábra). A szubsztitúció során a protein IC3 domainje érintett (bázikus lizin (K) helyett bázikus arginin (R) épül be 223. aminosavként).

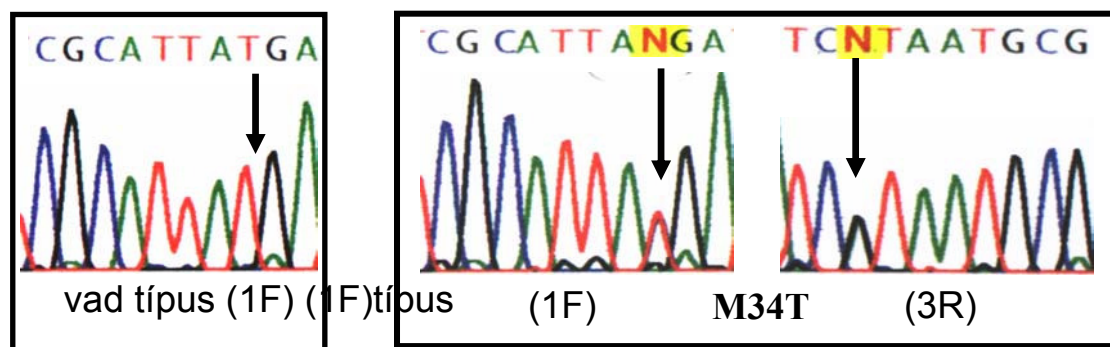


39. ábra: K223R polimorfizmus. A mutációkat tartalmazó szekvenálások két nagyothalló és egy halló személytől származnak. K223R szubsztitúció során a GJB2 gén kódoló exonjának 223-as kodonjában az egyik allélon adenin (zöld) helyett guanin (fekete) épül be. A szekvenálás 4F primerrel történt.

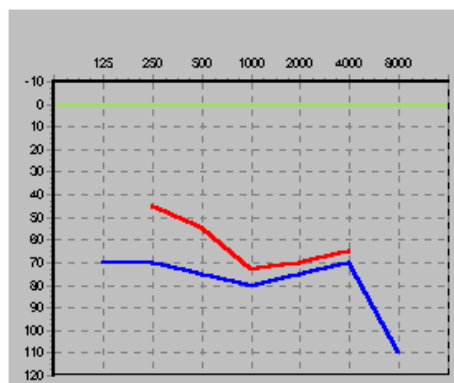
4.1.4. *GJB2* GÉN / EGYÉB GENETIKAI ELTÉRÉSEK OKOZTA NAGYOTHALLÁS (35delG MUTÁCIÓ NÉLKÜL)

4.1.4.1. M34T / A149T, K223R

A Kelsell és mts-i által 1997-ben leírt M34T missense mutációt (34. kodon ATG→ACG, apoláris metionin (M) → poláris treonin (T)) egy hallássérült betegünkénél azonosítottunk (40. ábra). Akkor domináns öröklődésű mutációként leírt eltérésről igazolódott, hogy recesszív öröklésmenetű (Kelsell, 1997). In vitro vizsgálatokból tudjuk, hogy a mutáció a connexin fehérjéből álló hexamer gap junction hemicsatorna összeszerelésében okoz zavart (Martin, 1999). Az M34T mutációt hordozó nagyfokú nagyothalló betegünk DNS mintájában két további genetikai eltérés volt kimutatható 35delg mutáció nélkül (A149T, K223R) (41. ábra).



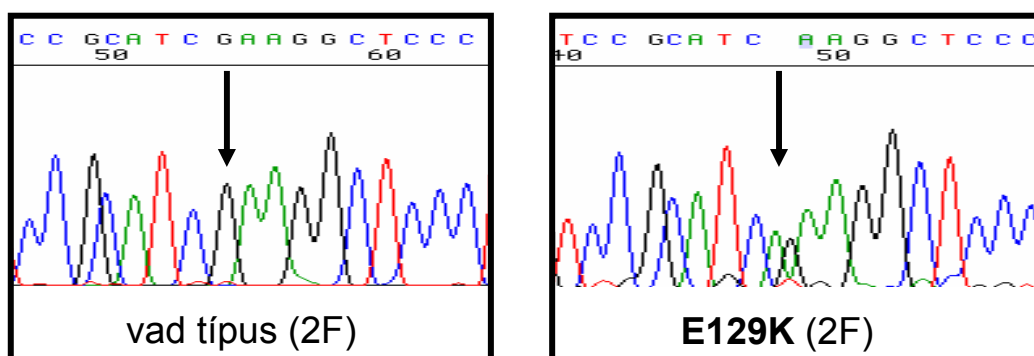
40. ábra: M34T mutáció a *GJB2* génben. A nyíl jelzi a gén kódoló exonjának 101. pozícióját, mely a vad típus esetében mindkét allélon timint (piros) tartalmaz, míg az M34T mutáció esetében ugyanezen a helyen citozin (kék) látható. Az 1F szekvenálás komplementere a 3R reverz szekvenálás.



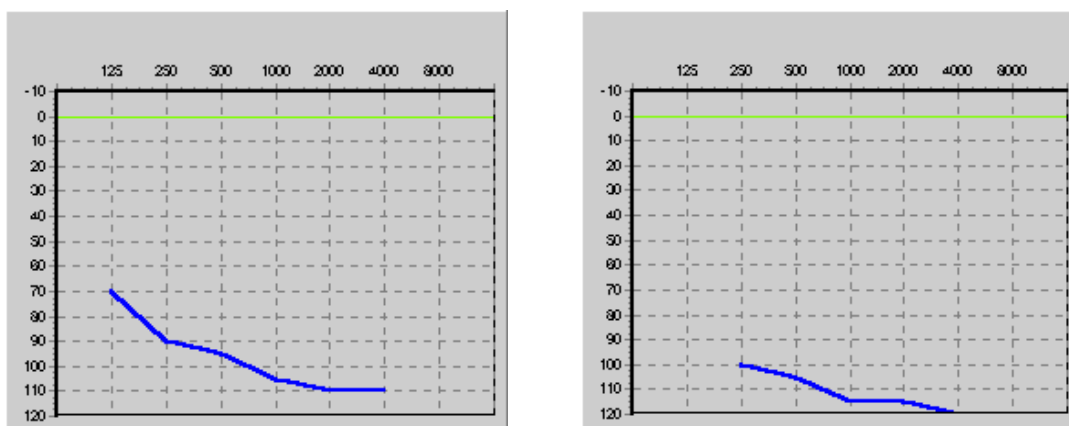
41. ábra: M34T / A149T, K223R genotípusú 32 éves nőbeteg audiogramja. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A percepciós nagyothallás mértéke nagyfokú.

4.1.4.2. E129K / -

A 2001-ben leírt E129K mutáció patogén jellege még nem tisztázott (Kenna, 2001). A *GJB2* gén kódoló exon 385. nukleotidja (guanin) adeninre cserélődik, s így 129. aminosavként a savas glutaminsav (E) helyett bázikus lizin (K) épül be a 2. intracelluláris egységbe (42. ábra). Anya és lánya E129K heterozigóta, súlyos fokú nagyothallók eseteiben a *GJB2* gén kódoló exonján belül nem volt detektálható ehhez társuló egyéb mutáció (43. ábra).



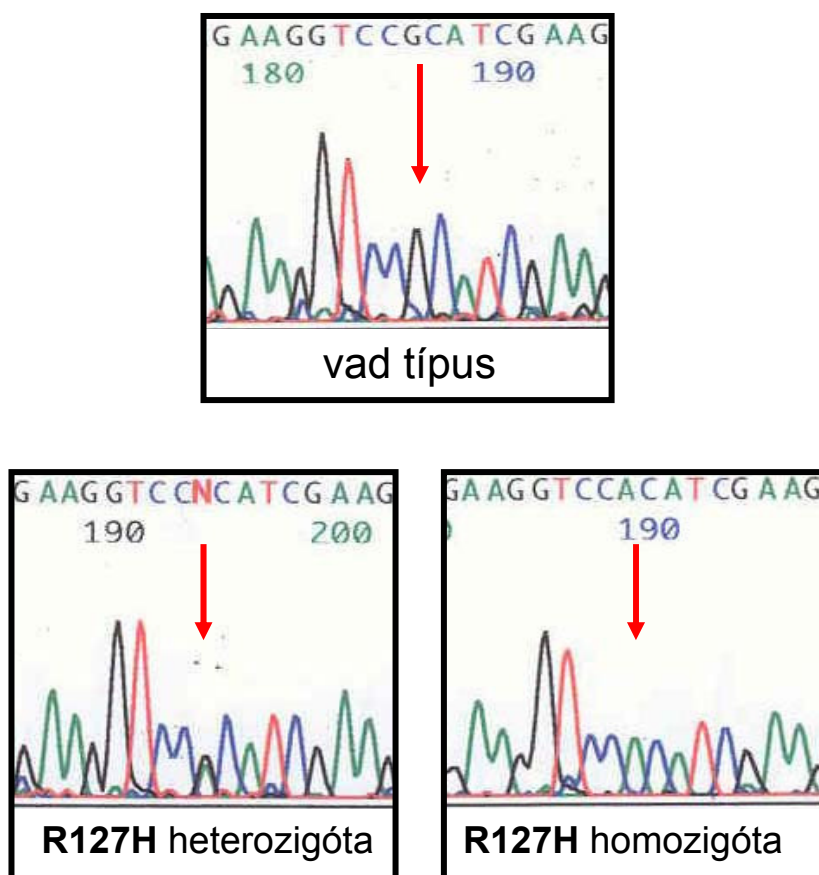
42. ábra: E129K mutáció a *GJB2* génben. A nyíl a 385. pozícióban lévő nukleotidokra mutat, amely vad típus esetén guanin (fekete). E129K heterozigóta esetben egyaránt láthatunk guanint és adenint (zöld) az adott pozícióban.



43. ábra: Az ábrán az E129K / 35delG genotípusú 84 éves édesanya és 50 éves lánya audiogramjai láthatók. Az ábra csak a jobban halló fül adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A nagyothallás mindkét esetben súlyos fokú és percepciós típusú.

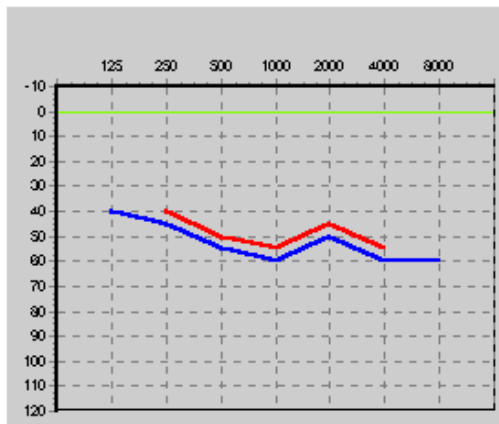
4.1.4.3. R127H

Öt sporadikus és egy vérrokon roma család 7 tagjában detektáltuk az R127H mutációt. A sporadikus esetek mindegyikének genotípusa R127H / - volt, azaz a második allél kódoló exonjában nem volt kimutatható genetikai eltérés. Valamennyi sporadikus gyermek a roma népcsoporthoz tartozott. A familiáris esetben (17. család) erre a mutációra heterozigóta genotípusú halló szülőknek homozigóta nagyfokú nagyothalló, heterozigóta halló és normál genotípusú halló gyermekük egyaránt van (55. ábra). Az 578. nukleotidcsere eredményeként a bázikus arginin (R) (CGC) helyett bázikus hisztidin (H) (CAC) épül be a 2. intracelluláris domain 127. aminosavként (Rabionet, 2000) (44. ábra). A homozigóta gyermekek közül csak két esetben sikerült audiogramot készítenünk (45. ábra).

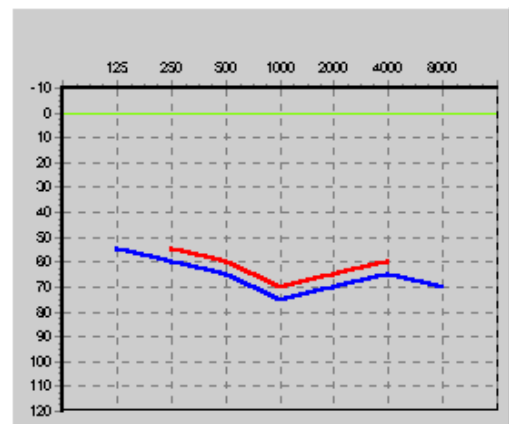


44. ábra: R127H mutáció a GJB2 génben. A nyíl jelzi a gén kódoló exonjának 578. pozícióját, mely a vad típus esetében mindkét allélon guanint (fekete) tartalmaz, míg az R127H heterozigóta állapot esetében ugyanezen a helyen az egyik allélon guanin, a másikon adenin (zöld) látható. Homozigóta R127H esetben mindkét allél adenint tartalmaz az adott pozícióban. A szekvenálás 2F primerrel történt.

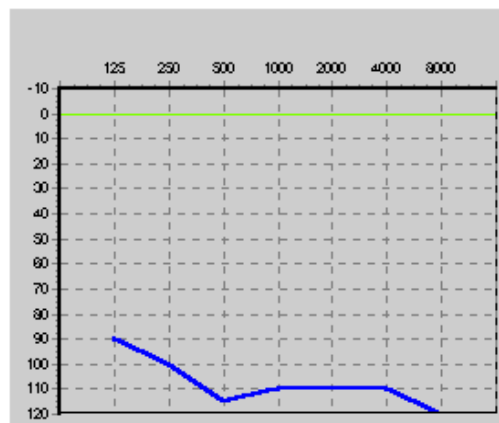
A.)



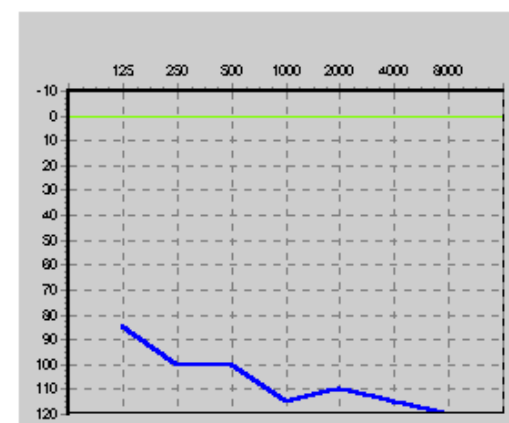
B.)



C.)



D.)



45. ábra: Az ábrán a R127H szubsztitúciót tartalmazó genotípusú betegek audiogramjai láthatók. Az ábra a betegek jobban halló fülének adatait tartalmazza. Az audiogram abszcisszáján a frekvencia, az ordinátán az intenzitás található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. Az „A” (12 éves lány) és „B” (27 éves fiú) személyekről készült audiogramok esetében az R127H heterozigóta genetikai eltéréshez nem társult másik mutáció. A hordozó állapot önmagában nem magyarázza meg a betegek nagyothallását, de genetikai terheltséget jelent. A „C”(11 éves fiú) és „D” (8 éves lány) roma testvérpárok R127H homozigóták. A testvérpárnak súlyos fokú nagyothallása van.

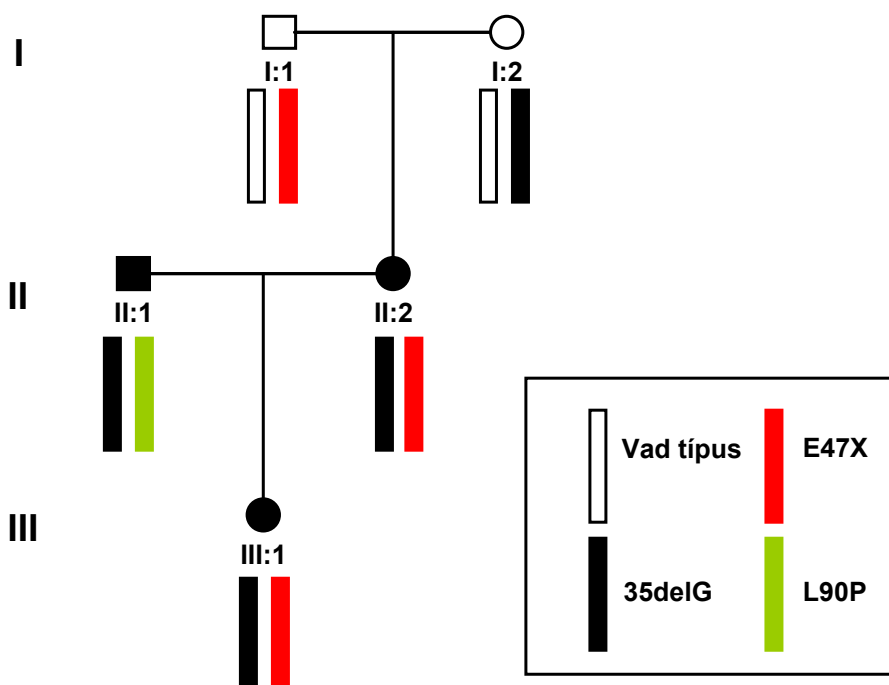
4.1.5. *GJB2* GÉN ÉRINTETT CSALÁDOK ANALÍZISE

Ebben az alfejezetben az általunk azonosított *GJB2* genetikai defektusokat családokra lebontva tárgyaljuk.

4.1.5.1. „3. CSALÁD”

A 3. családba tartozó érintett személyeknek súlyos fokú nagyothallása van, beszédjük nem fejlődött ki, egymással jelbeszéddel kommunikálnak (II:1, II:2, III:1) (46. ábra). Az I:1 és I:2 nagyszülők jól hallanak, beszédértésük normális. A Connexin 26 mutáció analízise során igazolódott, hogy az I:1 és I:2 személyek az egyik allélon egy-egy mutációt hordoznak (E47X, 35delG). Mindegyik nagyothalló családtag heterozigóta a 35delG mutációra nézve. Az édesapa (II:1) a másik allélján L90P mutációt hordoz, amely a második transzmembrán domaint érinti. Ezt a recesszíven öröklődő mutációt már több országban leírták.

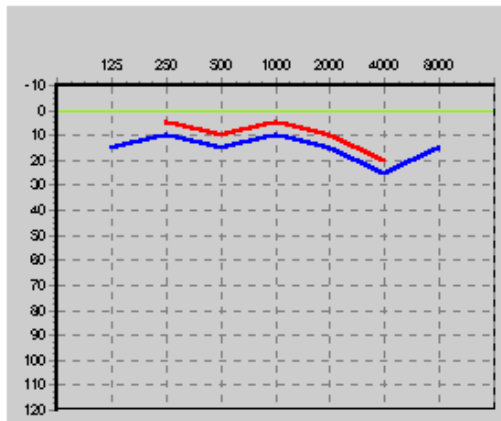
Az édesanya (II:2) és a lánya (III:1) a 35delG mutáció mellett 1997-ben már leírt, recesszíven öröklődő, stop kodon képzéséhez vezető E47X genetikai hibát hordozzák.



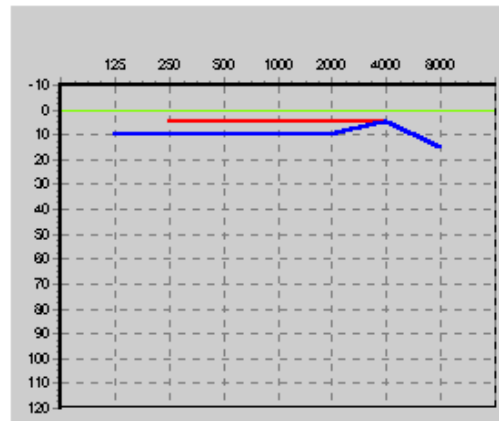
46. ábra: A 3. család családfája. Az édesanya és lánya a 35delG heterozigótaság mellett E47X mutációt hordoznak a másik alléljukon. Az édesapa genotípusa: 35delG / L90P. (Jelölések: ○ nő, □ férfi, ● nagyothalló nő, ■ nagyothalló férfi. A római számok a generációkat jelzik, míg az arab számok a személyeket azonosítják.)

Hallásvizsgálatot az anyai nagyszülőknél (I:1; I:2), valamint az édesanya (II:2) és lánya (III:1) esetében tudtunk végezni. A nagyszülők hallása kornak megfelelő. Az édesanyának csak hallásmaradványa van, a kislány audiogramján pedig a mély hangoknál nagyfokú, a magasabb hangoknál súlyos fokú nagyothallás látható (47 ábra).

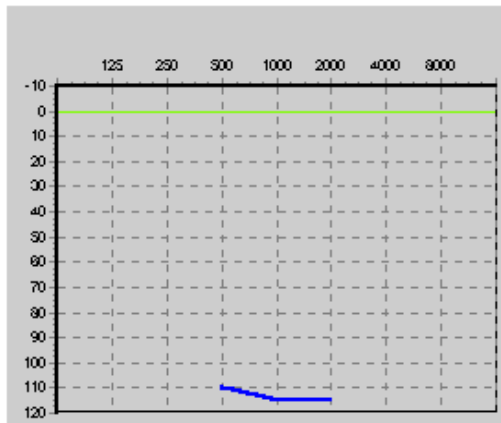
A.)



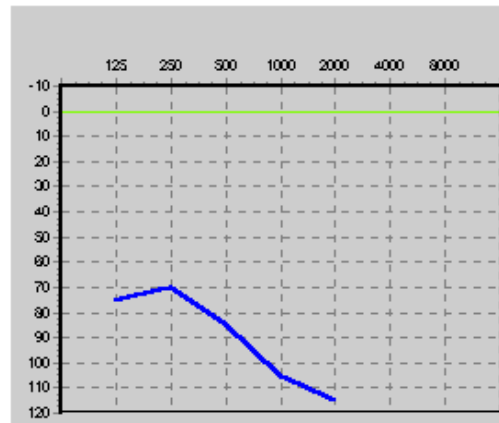
B.)



C.)



D.)



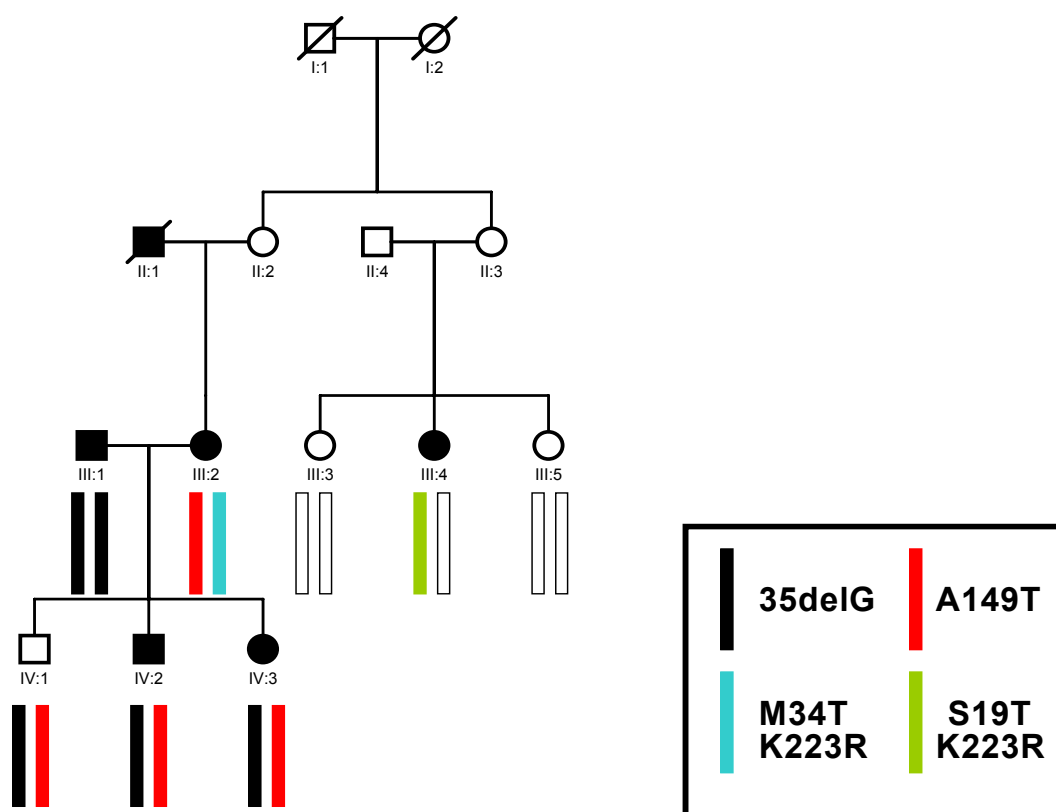
47. ábra: Az ábrán a 3. család I:1 (67 éves), I:2 (66 éves), II:2 (33 éves) és III:1 (13 éves) tagjainak hallásgörbéi láthatók. Az ábra a betegek jobban halló fülének adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A nagyszülők hallása („A”; „B”) kornak megfelelő, az édesanyánál („C”) csak hallásmaradványt regisztráltunk, míg a kislány („D”) súlyos nagyothalló.

4.1.5.2. „6. CSALÁD”

A 6. családban az apa (III:1) 35delG homozigóta genotípusú. Így minden gyermeke heterozigóta erre a mutációra nézve (48. ábra). Az anya (III:2) eltérő allélvariánsokat hordoz. Az egyik allélján a nem patogén polimorfizmusként leírt K223R aminosavcsere M34T mutációval társult. Az M34T szubsztitúciót először domináns öröklésmenettel írták le (Kelsell, 1997), de később recesszív öröklésmenetet is bizonyítottak (Wilcox, 2000). A mutáció hatása még ma sem teljesen tisztázott. M34T *in vitro* HeLa-sejteken történt expresszió vizsgálata kommunikációs zavart mutatott. Megfigyelték, hogy az M34T mutációval rendelkező Connexin 26 fehérjék esetében a hexamer képzés zavara miatt a sejtmembránba épülés és ezáltal a K⁺ transzport szenved zavart (Martin, 1999). A következő évben Griffith és mts-i analizáltak egy olyan DFNB1 érintett családot, ahol az M34T mutáció a 167delT delációval együtt lépett fel (M34T/167delT), s mégsem társult a fenotípus nagyothallással. Mivel a 167delT kereteltolódást eredményez, tehát az az allél biztos, hogy funkciót ellátni nem tud, arra kell következtetnünk, hogy a Connexin 26 molekula M34T mutációval bizonyos esetekben *in vivo* képes funkciót ellátni, melynek hátterében egyéb faktorok állhatnak (Griffith, 2000). A III:2 nagyfokú nagyothalló anya az M34T mutáció mellett egy A149T genetikai eltérést is hordoz (41. ábra). Az utóbbi mutáció először Rabionet és mts-i által lett publikálva, mint nem egyértelműen NH okozó DNS elváltozás (Rabionet, 2000). A 6. család esetében mind a 3 gyermek (IV:1, IV:2, IV:3) genotípusát nézve 35delG/A149T, ami a IV:1 gyermeknél nem társult nagyothallással, míg a másik két testvér halláskárosodása nagyfokú (38. ábra). Mivel ez a mutáció a Connexin 26 fehérje konzervatív domainjét érinti, ez is azt támasztja alá, hogy patogén folyamatról kell hogy szó legyen. A IV:1 esetben magyarázatként egy olyan ismeretlen genetikai faktor jelenléte lehet a háttérben, mely szupresszálja a nagyothallás kifejlődését a gyermekben.

A III:4 családtag esetében a recesszíven öröklődő heterozigóta S19T mutációt azonosítottunk, de a második allélen nem volt kimutatható genetikai eltérés. Ugyanennek a betegnek a DNS mintájában K223R polimorfizmus is kimutatható volt (39. ábra). Összességében ez a genetikai terheltség nem magyarázza meg a beteg prelingualis eredetű NH-t. Mivel csak egy recesszív mutációt találtunk a *GJB2* gén kódoló régiójában, további faktorok összehatásának az eredménye kell hogy legyen a

nagyothallás. Ilyen lehet a gén promoter régiójában történt genetikai eltérés - Szabályozó régió a struktúrgének előtt. Szerepe abban van, hogy a DNS-függő *RNS-polimeráz* számára felismerési helyül szolgál. -, vagy akár egyéb a cochleában expresszáldó connexin molekulák érintettsége, melynek következtében a gap junction csatornák összeszerelésében zavar lép fel.

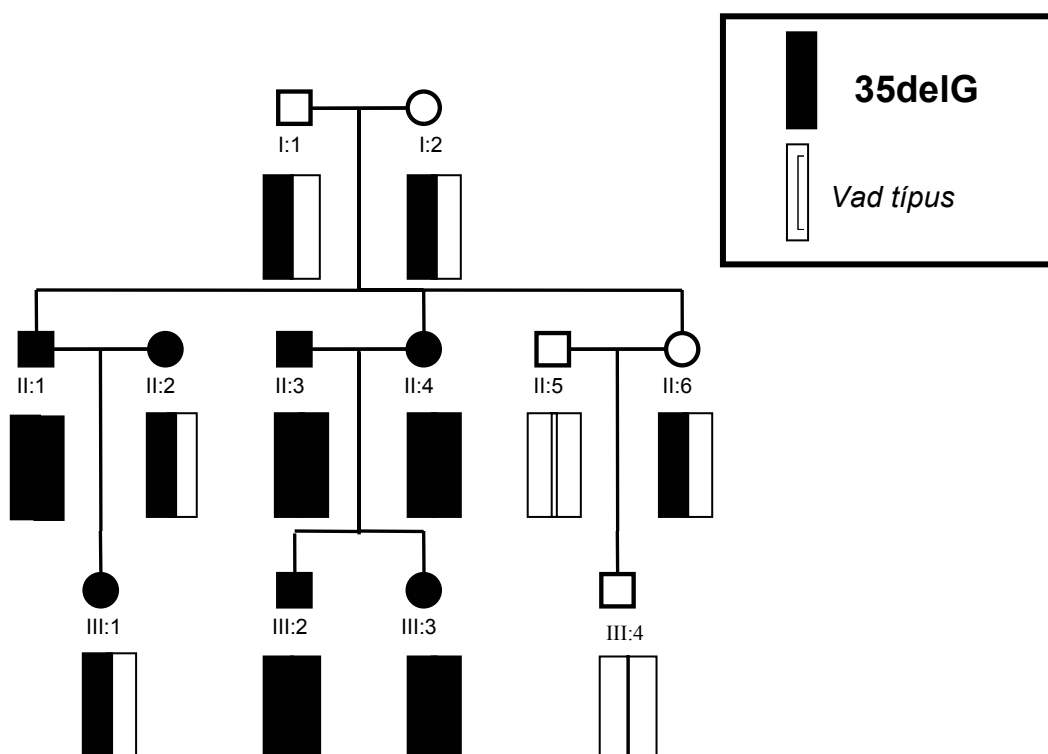


48. ábra: A 6. család ábrája négy generációt mutat. Három generációban jelenik meg nagyothallás 35delG, A149T, S19T, M34T, K223R genetikai eltérésekkel kombinálva. (Jelölések: ○ nő, □ férfi, ● nagyothalló nő, ■ nagyothalló férfi, áthúzva: elhunyt személy. A római számok a generációkat jelzik, míg az arab számok a személyeket azonosítják.)

Összefoglalásként megállapítható, hogy a III:2, III:4, IV:2, IV:3 családtagok esetében nem egyértelmű, hogy a nagyothallás kialakulásáért csak a *GJB2* gén lenne a felelős. Feltételezzük, hogy további tényezőknek kell szerepet játszaniuk, mely tisztázásához funkcionális analízis vizsgálatok elvégzésére lenne szükséges.

4.1.5.3. „7. CSALÁD”

A 7. család Connexin 26 analízis eredménye összefoglalva a 49. ábrán látható. Az érintettek *GJB2* gén kódoló szakaszában csak 35delG mutáció volt kimutatható. Érdekes eset a III:2 fiúgyermek, aki bár homozigóta volt erre a mutációra nézve, mégsem volt a szüleihez és a lánytestvéréhez hasonlóan nagyfokú nagyothalló, mert hallásküszöbe 500, 1000 és 2000 Hz frekvenciákon < 65 dB volt (50. ábra).

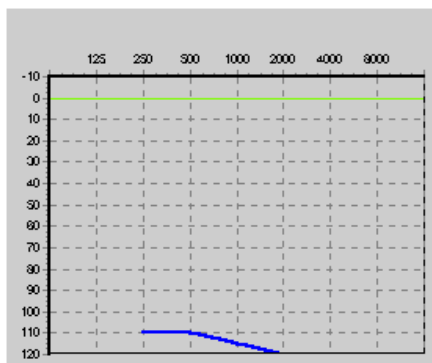


49. ábra: A 7. család családfája a *GJB2* gén kódoló régiójának analízise után. A nagyothalló esetek közt találunk 35delG homozigóta, 35delG heterozigóta genotípusú betegeket, valamint 35delG hordozó halló személyeket is. (Jelölések: ○ nő, □ férfi, ● nagyothalló nő, ■ nagyothalló férfi. A római számok a generációkat jelzik, míg az arab számok a személyeket azonosítják.)

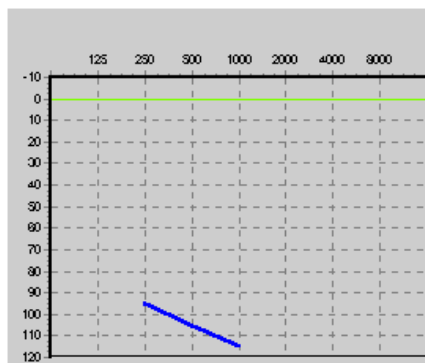
Ez azt mutatja, hogy a 35delG homozigóta genotípushoz társuló fenotípus variábilis, megnehezítve ezzel a várható fenotípus korrekt genetikai tanácsadását. A fenotípus variációk molekuláris genetikai okai ma még ismeretlenek. Figyelemre méltó a II:2 és III:1 személyek, akiknek nagyfokú halláscsökkenésük van, de a kódoló régióban nem volt kimutatható második genetikai eltérés (51. ábra). Ez ismét felveti a további mutáció lehetőségét a promoter régióban vagy az egyéb szabályozó régiókban, amiket

tanulmányunk során nem vizsgáltunk. Ugyanakkor ki kellene zárni más hibás connexin fehérjék lehetőségét is (Connexin 30, 31, 43), mely a gap junction összeszerelését zavarhatja.

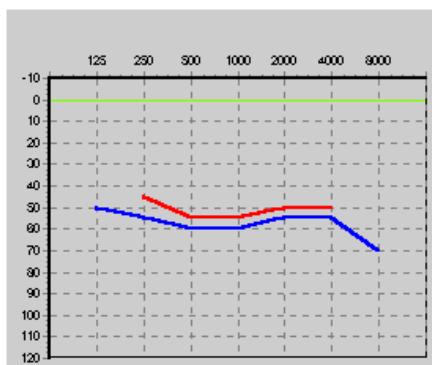
II:3.



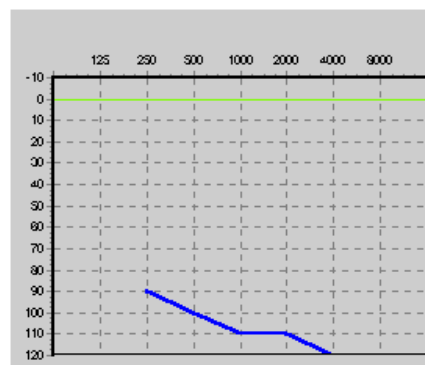
II:4



III:2

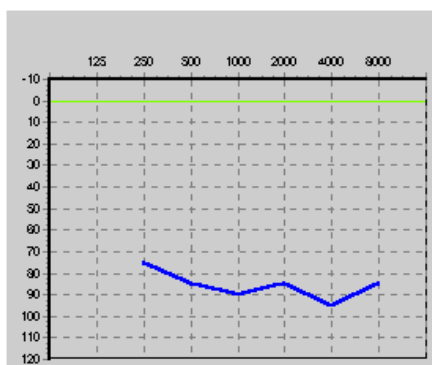


III:3

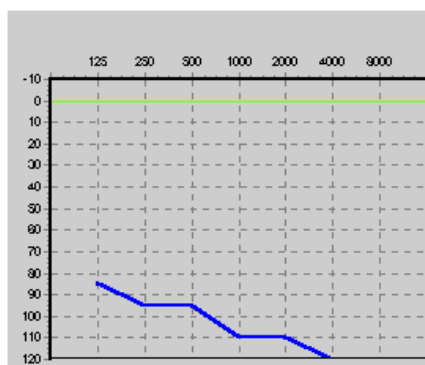


50. ábra: Az audiogramok a 7. család II:3, II:4, III:2 és III:3 tagjainak hallását mutatja be. A 41 éves édesapa, a 39 éves édesanya és az 5 éves kislány nagyothallása súlyos fokú, míg a 8 éves kislányé közepes fokú. Az ábra a betegek jobban halló fülének adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést.

II:2



III:1



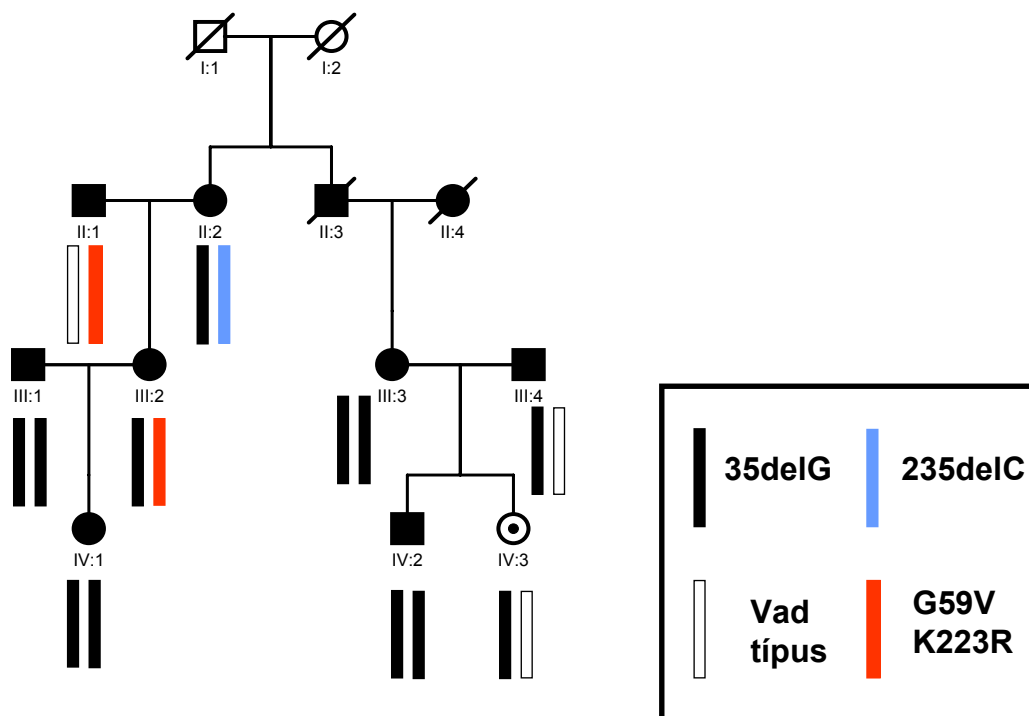
51. ábra: A 34 éves édesanya (II:2) és 6 éves kislánya (III:1) genotípusa 35delG heterozigóta egyéb genetikai eltérés nélkül a GJB2 gén kódoló exonjában. Az ábra a betegek jobban halló fülének adatait tartalmazza. A frekvencia az audiogram abszcisszáján, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést. Az édesanya nagyfokú, a kislány súlyos fokú nagyothalló.

4.1.5.4. „10. CSALÁD”

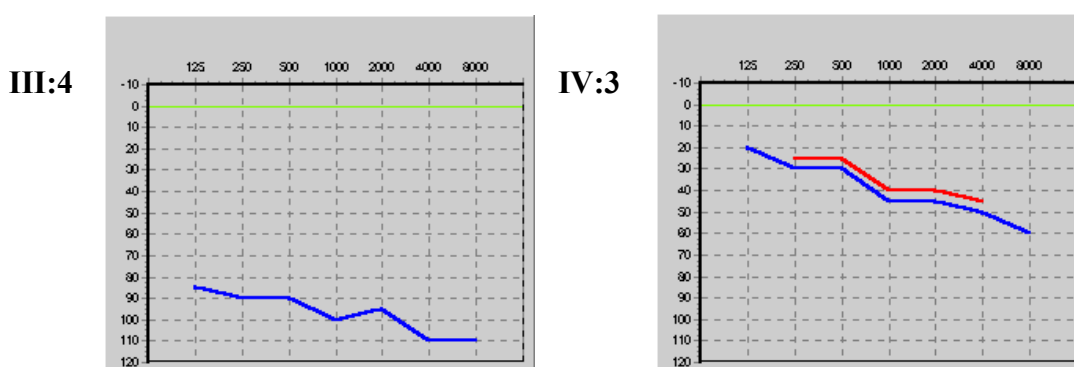
A 52. ábra a 10. család esetét mutatja be az allélok megoszlása alapján. A II:2 nőbeteg a japán populációban leírt nagyobb gyakoriságú 235delC deléciót hordoz a 35delG mutációval társulva. A japán gyermekkori nagyothallás 5%, míg a familiáris esetek 10%-ban ez a mutáció a kiváltó ok (Fuse, 1999). Egy évvel később *Abe és mts-i* a 235delC mutáció 73%-os előfordulási gyakoriságáról számoltak be a japán familiáris esetek között, míg az Európában gyakori 35delG mutációt hordozó esetekük nem volt (Abe, 2000). Az 55 éves nőbeteg nagyothallása prelingualis eredetű, percepció típusú és nagyfokú (32. ábra)

A II:1 súlyos fokú nagyothalló férfi az egyik allélján G59V mutációt hordoz. Ennek következtében az első extracelluláris domainban (EC1) glicin aminosav valinra cserélődik. Ehhez hasonló mutációról (G59A) *Heathcote és mts-i* számoltak be egy palmoplaris keratosiszal és nagyfokú nagyothallással társuló családban domináns öröklésmenettel (Heathcote, 2000). A mi esetünkben a G59V szubsztitúció következtében kialakult nagyothallás nem társult egyéb szimptomával. Megfigyelhető, hogy a legtöbb autoszómális domináns öröklődésű genetikai hiba az első extracelluláris domainben történik. Feltehetően az EC1-ben a mutáció következtében egy csavarulat szerkezete megbomlik, mellyel a protein konformációja károsodik, vagy a connexon kompozíciója deformálódik, vagy esetleg a permeabilitás szenved zavart. Feltételezzük, hogy a G59V mutáció domináns hatással rendelkezik, mivel a II:1 személynél nem társul más mutációval, s mégis nagyothallása van, s ugyanúgy halláskárosodást okoz 35delG mutációval együtt (III:2). Ez megmagyarázná a II:1 férfi és III:2 lánya halláscsökkenését (28. ábra).

A családfa másik ágán lévő III:4 és IV:3 esetekben csak az egyik allélon tudunk mutációt detektálni. Az eset érdekessége, hogy a III:4 édesapa halláskárosodása nagyfokú, beszédképessége nem fejlődött ki, addig a leánygyermek halló közösségben nőtt fel, s csak 10 éves kora után diagnosztizálták mély frekvenciákon kisméretű, míg a többi frekvenciákon közepes fokú nagyothallását (53. ábra). A családon belül további azonos genotípushoz társuló eltérő fenotípus figyelhető meg az édesanya és a fiúgyermek között. A III:3 édesanya nagyothallása súlyos fokú és csak jelbeszéddel kommunikál, de a IV:2 fiúnak azonos genotípus mellett közepes fokú nagyothallása van, nagyothallók iskolájába jár és beszéde kiválóan érthető.



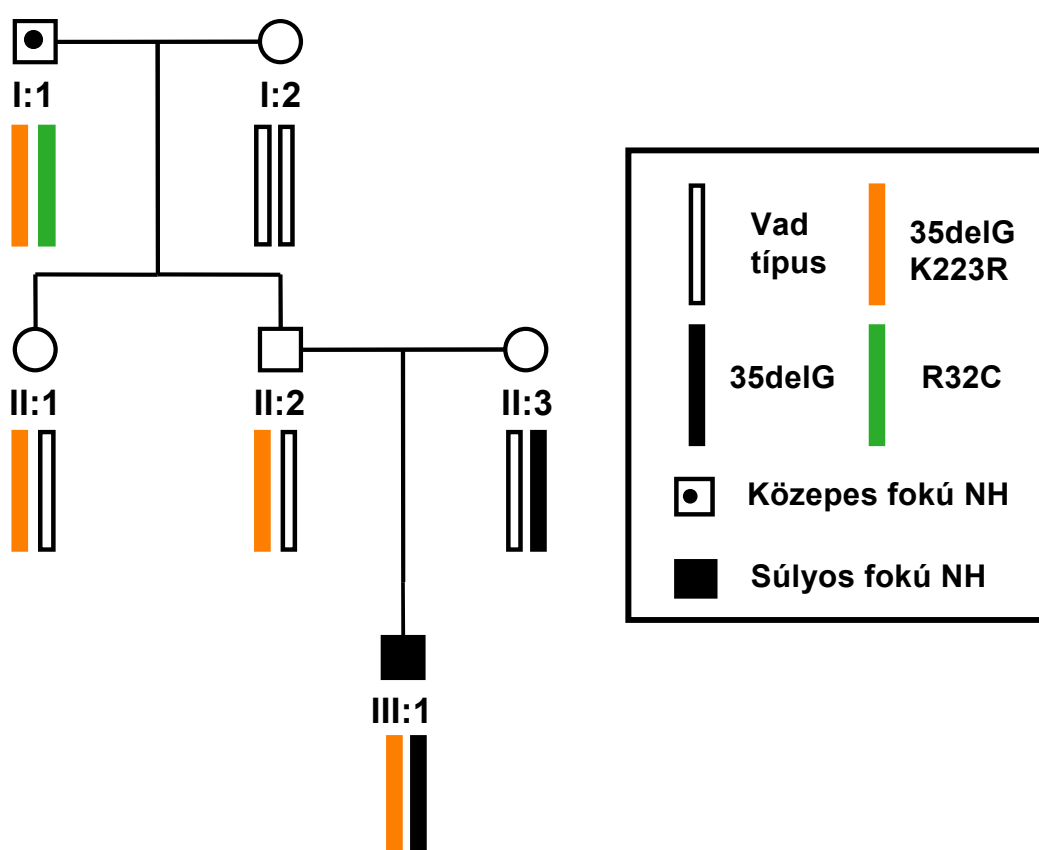
52. ábra: A 10. család családfája GJB2 gén genotípezálás után. A 235delC deléció 35delG mutációval társulva a II:2 személyben volt kimutatható. A G59V szubsztitúció mind 35delG mutációval, mind pedig anélkül nagyothallással társult. A III:4 és IV:3 személyek esetében 35delG heterozigóta állapot nem társult egyéb mutációval a GJB2 gén kódoló exonjában.



53. ábra: Az első audiogram a 45 éves 35delG heterozigóta édesapa (III:4) nagyfokú nagyothallását, míg a második a 35delG heterozigóta 16 éves lányának (IV:3) mély frekvenciákon kis fokú, a többi frekvenciákon közepes fokú nagyothallását mutatja. Az ábra a betegek jobban halló fülének adatait tartalmazza. A frekvencia az abszcisszán, az intenzitás az ordinátán található. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést.

4.1.5.5. „14 CSALÁD”

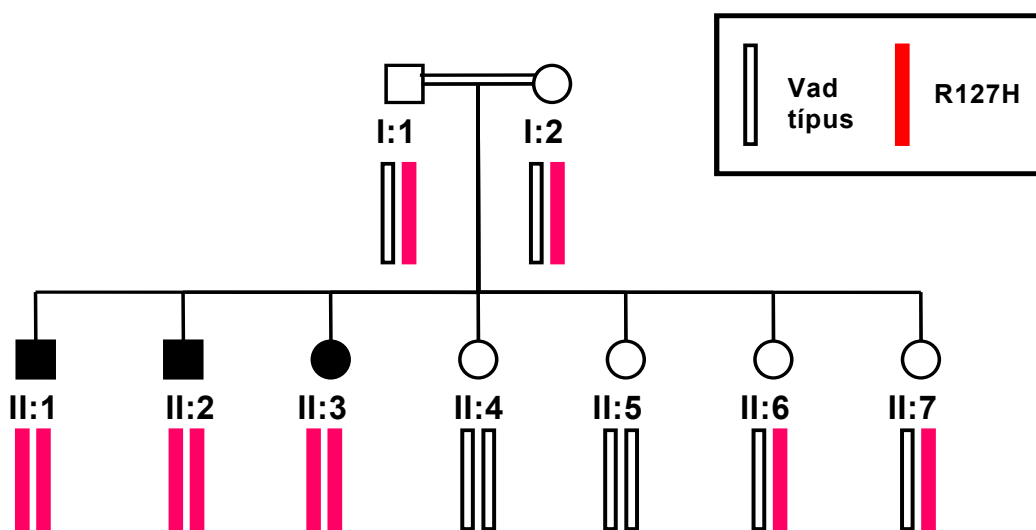
Ebben a családban a *GJB2* gén kódoló exonjának analízise során több genetikai eltérés is kimutatható volt (54. ábra). Az I:1 beteg az egyik allélján R32C, míg a másikon 35delG-t és K223R mutációkat hordoz. Nagyothallása kezdetben csak kisfokú volt, de progrediált és kb. 40 éves korára közepes fokú lett (20. ábra). A II:2 férj és a II:3 feleség 35delG heterozigóta tünetmentes hordozó. A született gyermek mindkét szülőtől a beteg allélt örökölt, és születésétől kezdve súlyos fokú nagyothallása van.



54. ábra: Különböző allélvariációk öröklődése a 14. családon belül. (Jelölések: ○ nő, □ férfi, ■ nagyothalló férfi, □ közepén ponttal: közepes fokú nagyothalló férfi. A római számok a generációkat jelzik, míg az arab számok a személyeket azonosítják.)

4.1.5.6. „17. CSALÁD”

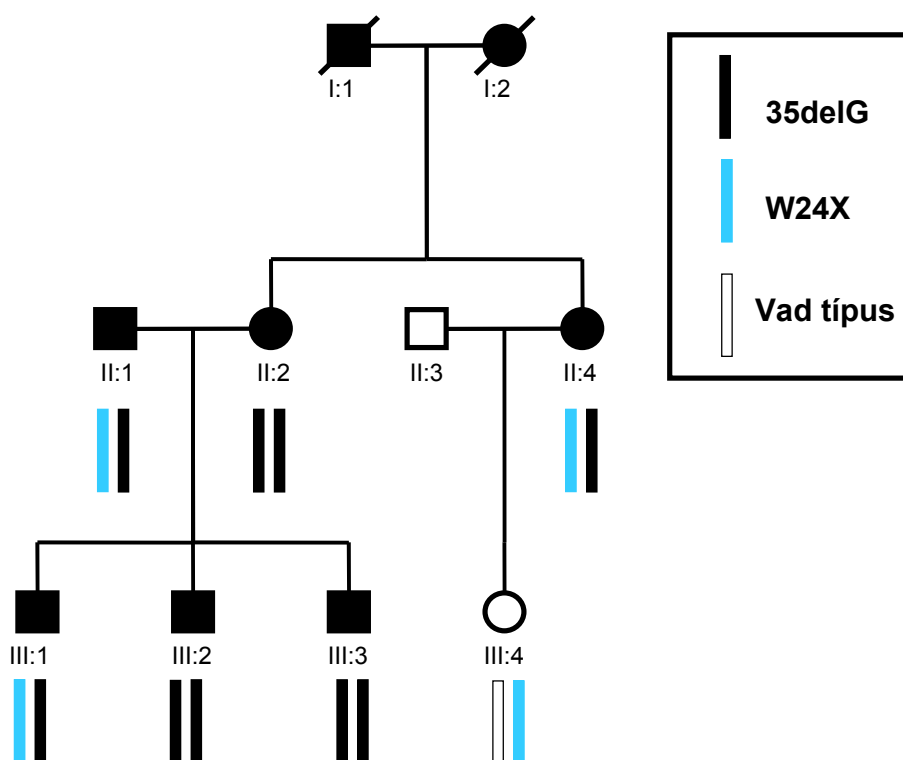
A 17. család egy vérrokon roma kisebbséghez tartozó család három súlyos fokú nagyothalló és négy teljes hallású gyermekkel (55. ábra). A *GJB2* / 35delG a család egyetlen tagjában sem volt kimutatható. A *GJB2* gén kódoló szakasz szekvenálás eredményeként R127H szubsztitúciót tudtunk identifikálni. Mindkét szülő R127H heterozigóta hordozó és mindegyik nagyothalló gyermek (3 fő) R127H homozigóta genotípusú. A szülők és az R127H hordozó gyermekek hallása normális volt, míg az R127H homozigóta gyermekeké súlyos fokú (46. ábra). Először 1998-ban *Estivill és mts-i* számoltak be az R127H aminosavcseréről, de esetükben nem tudták bizonyítani a mutáció patogén jellegét (Estivill, 1998). Humán HeLa sejtbe transzfektált R127H mutációval rendelkező *GJB2* gén immunfluoreszcens vizsgálata a connexin 26 fehérjék hexamer hemicsatorna összeszerelésében nem mutatott ki zavart, de ez nem zárja ki a csatorna funkcionális zavarának lehetőségét (Thönnissen, 2002).



55. ábra: Allélanalízis a 17. család esetében. Az I:1 és I:2 személyek közötti kettős vonal vérrokon kapcsolatot jelöl. (Jelölések: ○ nő, □ férfi, ● nagyothalló nő, ■ nagyothalló férfi. A római számok a generációkat jelzik, míg az arab számok a személyeket azonosítják.)

4.1.5.7. „23. CSALÁD”

A 23. család tagjainak genetikai vizsgálata során a *GJB2* génben két mutáció volt identifikálható: 35delG, W24X. Az érintett családtagok nagyothallása nagyfokú és prelingualis kezdetű. A II:2, III:2 és III:3 személyek esetében a fenotípus oka a 35delG homozigóta genotípusra vezethető vissza (56. ábra). A II:1, II:4 és III:1 nagyothalló esetekben a 35delG hordozó állapot W24X mutációval társult. A II:1 és II:4 személyek között nincs rokon kapcsolat. A W24X hordozó III:4 lány hallása teljes. Ez a család jól szemlélteti az általunk megállapított eredményeket, mely szerint a tanulmányunkban vizsgált nagyothalló és normális hallású csoportban a *GJB2* gén második leggyakoribb eltérése a W24X nonszensz mutáció. Más populációk vizsgálata során még nem számoltak be a szakirodalomban a W24X mutáció gyakoribb előfordulásáról, bár a genetikai eltérés már 1997 óta ismert (Kelsell, 1997).

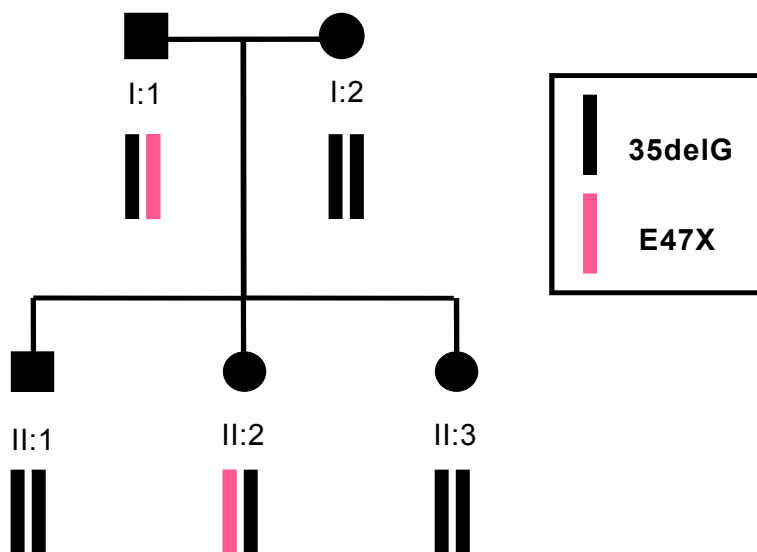


56. ábra: Különböző *GJB2* gén allélvariációknak öröklődése a 14. család esetében. A fekete hasáb 35delG, míg a kék hasáb W24X mutációt jelöl. (Jelölések: ○ nő, □ férfi, ● nagyothalló nő, ■ nagyothalló férfi, áthúzva: elhunyt személy. A római számok a generációkat jelzik, míg az arab számok a személyeket azonosítják.)

A II:1, III:1 és II:4 személy hallásgörbéi a 18. ábrán „A, B, C” audiogramjain láthatók (18. ábra), míg a 35delG homozigóta (III:2 és III:3) testvérpár hallásleletét a 12. g. ábra mutatja (12. ábra).

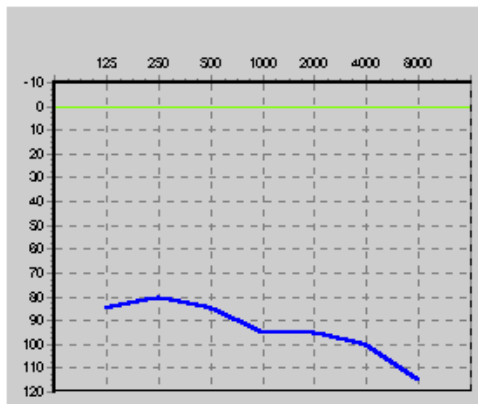
4.1.5.8. „33. CSALÁD”

A 33. család mindegyik tagjának anamnézisében veleszületett nagyothallás szerepel. A *GJB2* szekvenálás eredménye a 57. ábrán látható (57. ábra). Kétféle mutáció figyelhető meg a családtagoknál, melynek mindegyike stop kodonhoz vezet (35delG, E47X), csak az egyik a 13., míg a másik a 47. kódoló tripletben. A gyermekek fenotípusában eltérés nincs, de mindegyik gyermek hallása min. 20 dB-lel jobb, mint a szülőké (58. ábra). Mivel a II:1 gyermek a vizsgálatkor másfél éves volt, audiogrammal nem rendelkezünk, de nagyothallását a BERA vizsgálat igazolta.

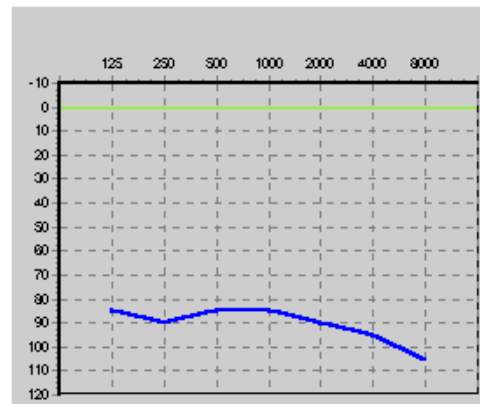


57. ábra: A 35delG és E47X mutációk öröklődése a 33. családon belül. A fekete hasáb 35delG, míg a rózsaszín hasáb E47X mutációt jelöl. (Jelölések: ● nagyothalló nő, ■ nagyothalló férfi. A római számok a generációkat jelzik, míg az arab számok a személyeket azonosítják.)

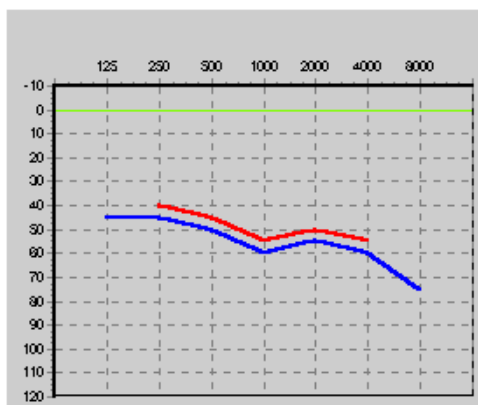
A.)



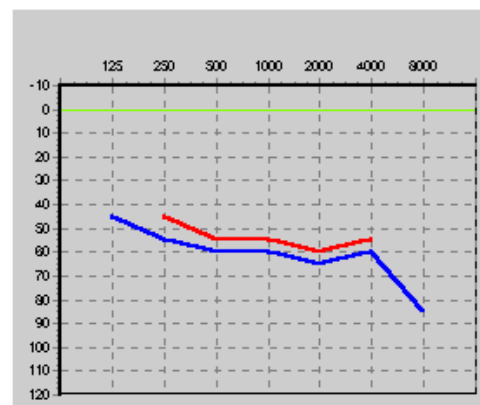
B.)



C.)



D.)



58. ábra: Az audiogramok a 33. család tagjainak hallásleletét mutatja be. Az ábra a betegek jobban halló fülének adatait tartalmazza. A frekvencia az abszcisszán, az intenzitás az ordinátán látható. A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. A 33 éves E47X / 35delG genotípusú édesapa („A”) és a 32 éves 35delG homozigóta édesanya („B”) nagyothallása nagyfokú, míg a 7 éves E47X / 35delG genotípusú kislánynak („C”) és az 5 éves 35delG homozigóta húgának („D”) közepes fokú nagyothallása van.

4.2. *12S rRNS / A1555G*

Ebben a vizsgálatban olyan ismeretlen eredetű, pre- vagy posztlingualisan kezdődő percepciós típusú nagyothalló betegek vettek részt (72 fő), akikben nem igazolódott a *GJB2* gén egyik allélján sem mutáció. Az A1555G mitokondriális mutáció kimutatásához a DNS mintákat speciális primerekkel történő PCR amplifikáció után *BsmA1* enzimmel emésztettük (GTCTCN/).

Az említett betegcsoportot megvizsgálva nem találtunk A1555G mutációval rendelkező esetet (előfordulási gyakoriság <1,38%). A 224 kontroll eset DNS mintáiban szintén nem volt kimutatható mutációt hordozó eset (előfordulási gyakoriság < 0,44%). Az A1555G ritka mitokondriális genetikai hiba előfordulási gyakoriságának pontosabb meghatározásához mind a nagyothalló mind pedig a halló populációból nagyobb számú beteganyag lenne szükséges. Természetesen az is felmerül, hogy más mitokondriális génmutációk fordulnak elő a magyar populációban.

4.3. ISMERETLEN LOKUSZ ÉS GÉNIDENTIFIKÁLÁS

4.3.1. DFNA6/14 LOKUSZ, *WFS1* GÉN (WOLFRAMIN)

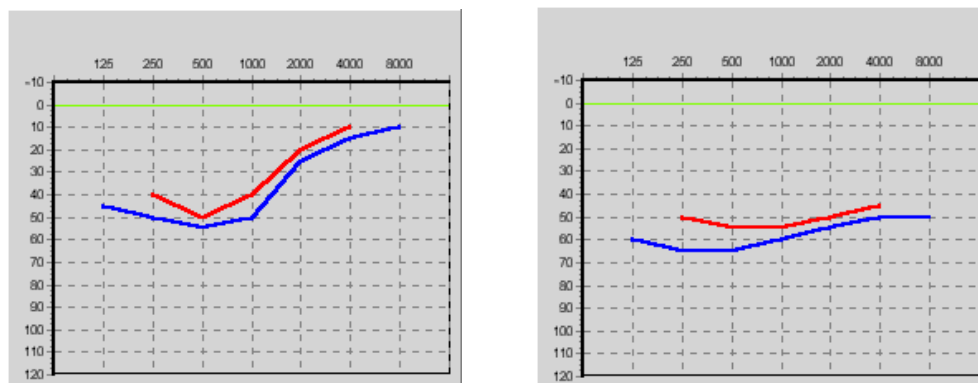
4.3.1.1. Anamnézis

A 27. család általunk vizsgált 32 tagjából 14 esetben lehetett *WFS1* (*Wolfram szindróma 1*) génben T699M mutációt igazolni, mely autoszómális dominánsan öröklődő, nem szindrómás, bilaterális nagyothallást okoz. A családfa 6 generációra tagolódik (7. ábra). A négy generáció 14 nagyothalló páciense már a vizsgálat előtt klinikánkon dokumentálva volt. Az érintettek nemi megoszlása 5 férfi / 9 nő (1:1,8). Minden halláscsökkenő beteg beszédértése és beszédképzése kornak megfelelő.

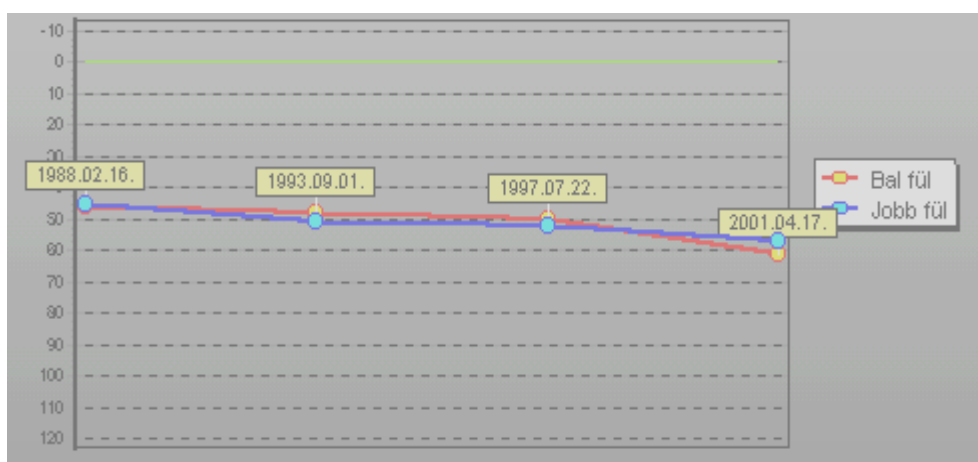
Az érintett családtagok anamnézisében csaknem minden esetben a halláscsökkenés a 25. életév előtt kezdődött. Öt személynél már 7-15 év között halláskárosodást diagnosztizáltak. Két nagyothalló családtagnál 40 év felett történt az első audiológiai vizsgálat. Így a betegség kezdete átlagosan a húszas évekre tehető.

4.3.1.2. Halláslelet

A család minden egyes tagjánál elvégzett audiológiai vizsgálat alapján 16 esetben volt percepciós nagyothallás kimutatható. A III:2 és IV:2 férfi személyek nagyothallásának oka exogén eredetű (krónikus otitis, zajártalom). A többi 14 beteg anamnézisében nem volt kimutatható külső környezeti faktoroknak vagy egyéb betegségeknek befolyásoló szerepe. Aszimmetrikus nagyothallás (két oldal között a hallásküszöb >15 dB legalább 3 frekvencián) két páciens görbájén volt megfigyelhető (III:4, V:9). A halláslelet a legtöbb esetben 125-1000 Hz frekvenciákat érintő (mélyfrekvenciák), emelkedő görbájú percepciós típusú nagyothallást mutatott a 30-70 dB-s hallástartományban (59. ábra). A 20 évnél fiatalabb érintett családtagoknál a halláskárosodás kismértékű volt, míg az idősebb személyeknél mértéke a korral emelkedve nőtt. Lineáris progresszióanalízis segítségével a III. és IV. generációból 1-1 személy (III:4, IV:1) évekre visszamenő, rendszeresen dokumentált hallásleleteit dolgoztuk fel (60. ábra). Az ábrán látható a lineáris kapcsolat a hallásvesztés mértéke és az életkor előrehaladása között fluktuáció nélkül. Az évek során a magasabb frekvenciatartomány is károsodott, 50-60 év felett már lapos lefutású görbe volt megfigyelhető, de minden frekvencián < 70 dB nagyothallással. Tympanometria minden esetben A-típusú görbét mutatott.



59. ábra: Az első audiogramon mély frekvenciákat érintő közepes fokú perceptoros nagyothallás látható (VI:4), míg a második lapos lefutású görbén minden frekvenciatartomány károsodott, de a hallásvesztés mértéke < 70 dB (III:4). A kék vonal jelzi a légvezetést, a piros vonal a csontvezetést. Az ábrák a jobb oldali fül adatait tartalmazzák, a nagyothallás mindkét esetben szimmetrikus.



60. ábra: Az ábra a IV:1 nagyothalló családtag WFS1 gén T699M mutációja következtében 13 év alatt bekövetkezett hallásváltozást mutatja. Az ordinátán a nagyothallás mértékét dB-ben, az abszcisszán az éveket jelöltük.

4.3.1.3. Veszitibuláris és radiológiai leletek

Négy érintett családtagnál történt veszitibuláris és koponya CT vizsgálat (IV:1, V:2, V:9, V:12). Otoneurológiai vizsgálat egyik esetben sem mutatott centrális, perifériás vagy veszitibulocochlearis jellegű megbetegedést.

A nagy felbontású CT vizsgálat eredménye minden személynél normális külső, közép és belsőfűl anatómiát mutatott, s nem volt kimutatható malformáció a sziklacsontban sem.

4.3.1.4. Kapcsoltság analízis

A családfaanalízis az autoszómális domináns öröklésmenetet támasztotta alá. A kapcsoltság analízis (linkage analysis) során kiderűlt, hogy a DFNA6/14 lokusz (4p16.1 kromoszóma) öröklődése szoros kapcsoltságot mutatott (LOD score: 3,42) a nagyothalló fenotípussal (Cryns, 2002). A család valamennyi nagyothalló tagja ugyanazon polimorf markerekkel jellemezhető DFNA6/14 lokuszt örökölte. Ehhez a lokuszhoz tartozó *WFS1* gén (Wolframin) kódoló exonjának szekvenálását a család minden tagjánál elvégeztűk. Igazolódott, hogy a nagyothalló személyeknél a kódoló exon 2096. nukleotidja citozinról timinre (ACG → ATG) cserélődött, amely aminosavcserével járó T699M misszensz mutációhoz vezet (699. aminosavként poláris treonin apoláris metionre cserélődött). Összesen 88 egészséges kontrollt analizálva egy esetben sem volt kimutatható ez a mutáció. Az V:12 páciensnél egy további misszensz mutáció volt identifikálható (R818C). *Gomez-Zaera és mts-i* 2001-ben már közleműnyűkben leírták ennek a genetikai eltérésnek homozigóta előfordulását a *WFS1* génben, mely Wolfram szindrómát (DIDMOAD) okozott (diabetes insipidus, diabetes mellitus, opticus atrophia és nagyfokű nagyothallás) (Gomez-Zaera, 2001). A mi 39 éves nőbetegűnk mindkét mutációt hordozta, de közepes fokű nagyothallásához más tünet nem társult. A család két egészséges tagjának *WFS1* génjében is kimutatható volt az R818C mutáció (V:11, VI:3).

4.3.2. DFNA10 LOKUSZ, *EYA4* GÉN (*EYA4*)

4.3.2.1. Anamnézis

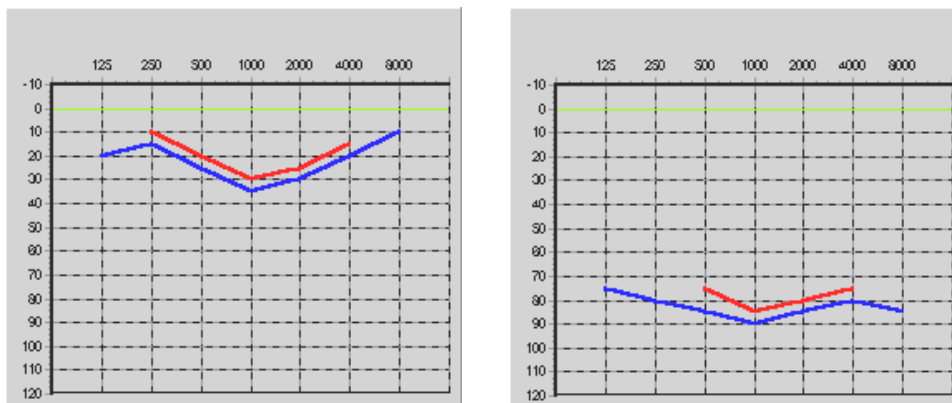
A 30. család megvizsgált 22 tagja közül 13 esetben volt kimutatható nem szindrómás, percepciós típusú nagyothallás. Tizenegy érintett személy nagyothallása a vizsgálat kezdetekor ismeretlen eredetű volt. Az érintettek nemi megoszlása 5 férfi / 6 nő (1:1,2). A családfa 6 generációig visszamenőleg volt felrajzolható (8. ábra). Két genetikailag érintett gyermeknél a tanulmány előtt nem történt hallásvizsgálat. Minden halláscsökkenet beteg beszédfejlődése és hangképzése kornak megfelelő. A nagyothallás minden esetben a húszas évek előtt kezdődött, ezen belül is nagyobb arányban 15 éves kor előtt, de 40 évesen már mindkét fülön minden frekvencián 60 dB-t meghaladó tisztahang hallásküszöb volt mérhető.

4.3.2.2. Halláslelet

A 22 fős család 13 tagjánál (6 férfi, 7 nő) elvégzett hallásvizsgálat különböző fokú percepciós nagyothallást mutatott. A IV:4 nő anamnézisében a halláskárosodás szerzett, mert a második gyermek szülése közben fellépő komplikáció következtében veszítette el hallását. A IV:5 férfi nagyothallása zajártalom következménye. A fennmaradó 11 személy halláscsökkenése szimmetrikus volt és a korral előre haladva minden frekvenciát érintett. Kezdetben csak az 1000 Hz és 2000 Hz frekvenciákon volt mérhető halláskárosodás (teknő görbe), de a 30. életév után a görbe alakja először a magas frekvenciákat, majd később a mély frekvenciákat is érintve ellaposodott. 55 év felett minden esetben nagyfokú nagyothallás volt regisztrálható (75-90 dB) (5 fő) (61. ábra). A progresszióanalízis ábráját tekintve látható, hogy 20-40 év között átlag 15 dB / 10 év a progresszió mértéke, míg 40-60 év között 10 dB / 10 év (62. ábra). A legidősebb nagyothalló páciens (68 év) hallása egyik frekvencián sem érte el a 95 dB. A tympanometria minden esetben A-típusú görbét mutatott.

4.3.2.3. Veszitibuláris és radiológiai leletek

A családból négy nagyothalló személynél történt otoneurológiai vizsgálat (IV:8; V:2; V:7; VI:2). A vizsgálat nem igazolta a veszitibuláris rendszer érintettségét. Piramis CT eredménye mindegyik esetben kizárta a belsőfül deformitást, valamint a sziklacsont malformációt.



61. ábra: Az első audiogram egy 14 éves gyermeké (VI:1) kis fokú percepció nagyothallással. A második egy 63 éves érintett családtagé (IV:1) nagyfokú idegi típusú halláscsökkenéssel.

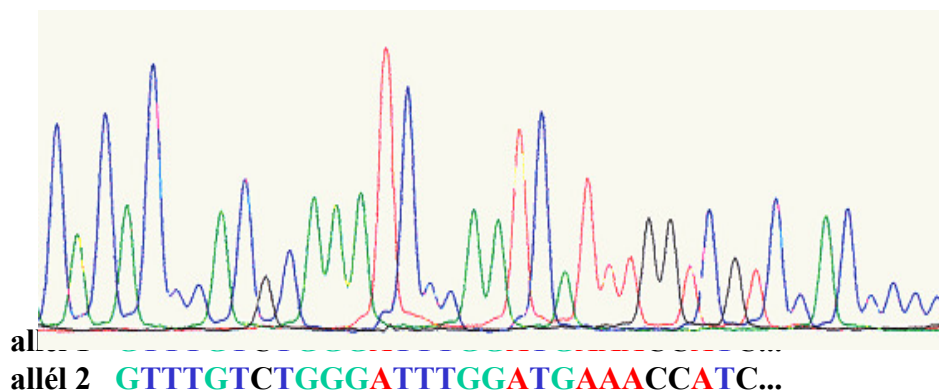


62. ábra: Az ábra a IV:1 érintett férfi hallásában 38 év alatt bekövetkezett hallásromlást mutatja az évek függvényében.

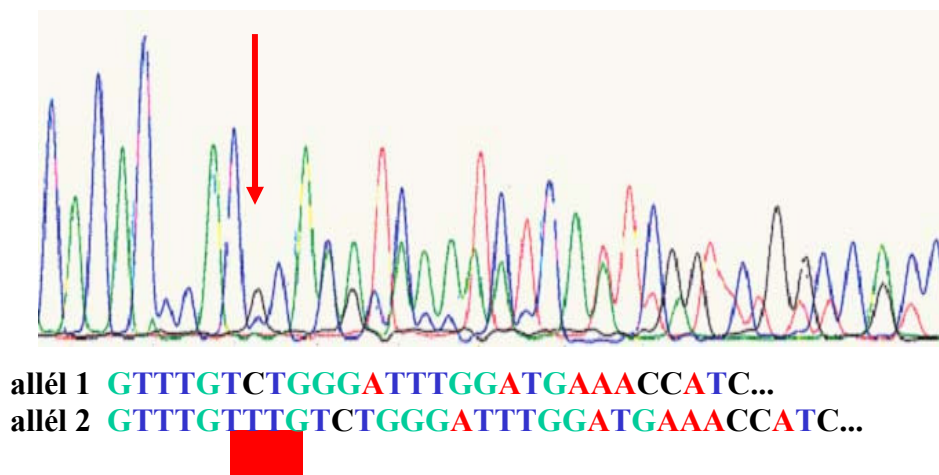
4.3.2.4. Kapcsoltság analízis

Mikroszatellit analízissel vizsgált hallássérült családtagok mintái szignifikáns kapcsolatot mutattak a D6S1009 markerrel (max. LOD score: 4,73). Az érintett régió lokalizációja: 6q23.2-q26 (DFNA10). Az *EYA4* gént („*Eyes Absent 4*”) is magában foglaló 36,8 cM-i régiót a D6S262 és a D6S305 markerek határolják. gént. A 22 családtag *EYA4* gén exonjait megszekvenáltuk, melynek eredménye a nagyothalló személyek 13. exonjában 4 nukleotid (TTTG) inszertióját igazolta. Az 1558insTTTG mutáció a 373. kodontól kereteltolódást eredményez, majd a 379. kodonnál stop kodon jön létre, ami truncált fehérje szintéziséhez vezet (64. ábra). Ez a mutáció az eddig leírt harmadik genetikai eltérés az *EYA4* génben.

A



B



63. ábra: *EYA4* gén 13. exonjának egy részlete. A: a nem érintett családtagok mindkét allélja normális nukleotid sorrenddel; B: *EYA4* gén TTTG inszercióval a nagyothalló esetek 13. exonjában

5. MEGBESZÉLÉS

A genetikai eredetű nagyothallás napjaink fülészeti kutatásának egyik fontos területe. Bár a leggyakoribb formája az időskori nagyothallás, mégsem hanyagolható el az a tény, hogy minden ezredik gyermeknek prelingualis nagyothallása van (Morton, 1991). Az utóbbi évtized eredményeként ma már tudjuk, hogy a nagyothalló gyermekek jelentős részében genetikai hiba áll a háttérben, bár ennek kimutatására csak bizonyos esetekben van módunk.

A belső fül működéséért feltehetően 150-200 gén fehérjeterméke felelős. A gén által kódolt fehérjék funkciója, ezek izoformái és a mutációk következménye a belső fül folyamatokra még szinte csak teoretikus. De ezek az információk elengedhetetlenek a betegség megértéséhez és új, hatékony terápia kifejlesztéséhez. Ahhoz, hogy az érintett családoknak genetikai tanácsadás történhessen, tisztában kell lennünk egyes nagyothallásért felelős génekben történt genetikai hibák gyakoriságával, patomechanizmusával és a fenotípusban okozott eltéréseivel. Természetesen ez régióként, populációként változhat, ezért is van jelentősége a populáció specifikus vizsgálatoknak. Csak ezeknek az ismeretében és ilyen adatok birtokában lehetséges rizikó meghatározásról, valószínűségről és ezzel együtt genetikai tanácsadásról beszélnünk.

5.1. DFNB1, *GJB2* GÉN (CONNEXIN 26)

A Connexin 26 a gap junction membránfehérjék családjának tagja, amely a sejtek közötti elektromos és metabolikus kommunikációt biztosítja. A Connexin 26 jelentősége a hallásban feltehetően a cochleán belüli káliumion cirkulációban rejlik. A *GJB2* génben történt mutációk az egyik leggyakoribb oka a nem szindrómás, prelingualis eredetű, percepciós típusú nagyothallásnak az északkelet-magyarországi nagyothalló populációban.

5.1.1. 35delG MUTÁCIÓ

Tanulmányom során célom volt a *GJB2* génben a 35delG mutáció gyakoriságát az ÉK-magyarországi lakosságban megvizsgálni 84 familiárisan, 92 sporadikusan öröklődő, percepciós típusú, prelingualis kezdetű nagyothalló ill. 500 normál kontroll

esetében. A „sporadikus esetek” megnevezés pontosítást igényel. A sporadikus csoportba azok a nagyothalló esetek kerültek, akiknek a szülei hallók voltak és a családban sem volt visszamenőleg nagyothalló felderíthető. A szó eredeti értelmében sporadikus esetről új mutáció keletkezésekor beszélünk. Minden esetben, ha halló szülők hallássérült gyermekénél 35delG homozigóta genotípust találtunk a szülőket is analizáltuk. A 34 sporadikus homozigóta gyermek szülei 35delG heterozigóta hordozók voltak, tehát nem volt kimutatható olyan eset, ahol a genetikai eltérés új mutációként jelentkezett volna. Így tanulmányunkban a sporadikus szó – a szakirodalomhoz hasonlóan – egy családon belüli új fenotípus megjelenését jelöli.

Tanulmányunk eredményeként a 35delG deléció allélgyakorisága a familiáris esetekben 56,5%, a sporadikusan jelentkező betegek közt 46,2%, míg a kontroll csoportban 2,4% volt. A halló kontroll csoport 35delG hordozási gyakorisága 1/21 fő (4,8%) volt, mely érték valamivel magasabb, mint a többi európai országokban eddig mért adatok (*VI. táblázat*). Ezek az eredmények is alátámasztják azt a feltételezést, hogy Európában a prelingualis eredetű percepciós nagyothallást okozó leggyakoribb genetikai eltérés a magyar populációban is szignifikánsan jelen van és a betegek viszonylag magas százalékában ez a felelős genetikai eltérés. Feltételezzük, hogy az ÉK-i régió több évtizeddel ill. évszázaddal ezelőtt egy zártabb közösséget alkotott, nem történtek nagyobb mozgások és keveredések más régiók csoportjaival és ezért tudott a 35delG genetikai hiba gyakorisága megemelkedni. Ahhoz, hogy a magyar populációra jellemző pontosabb epidemiológiai adatokkal szolgálhassunk, kiterjedtebb és nagyobb esetszámú vizsgálatokra van szükség. Mégis a tanulmányunkban kapott értékek jelzés értékűek, rámutatva a hallássérültek között a mutáció magas előfordulási gyakoriságára. Ezért is tartjuk fontosnak a *GJB2* gén vizsgálatát a rutin medicinában.

Megegyezve más 35delG homozigóta betegek fenotípusáról szóló tanulmányokkal a mi beteganyagunkban sem volt kimutatható kisfokú nagyothalló (*XV. táblázat*). Hét beteg esetében 60 dB-nél jobb hallásküszöb szint volt mérhető az 500, 1000, 2000 Hz tartományban (9,8%). Ezzel szemben az esetek több mint 80%-ban a halláskárosodás nagyfokú ill. a siketséggel határos volt (>70 dB). Ellentétben a *Murgia és mts-i* megfigyeléseivel, mi a betegeink 23,6%-nál progressziót tudtunk kimutatni (*XVI. táblázat*) (*Murgia, 1999*). Ez az érték magasabb a *Denoyelle és mts-i* (*Denoyelle,*

1999) által közölt adatoknál, de korrelál *Lefebvre* megfigyeléseivel (Lefebvre, 2000). A homozigóta betegeink hallásgörbéi ereszkedő (52,1%) vagy lapos (47,9%) típusúak voltak. Más minta nem volt megfigyelhető, megegyezve a szakirodalommal (*XVII. táblázat*).

Általánosságban összefoglalva a 35delG homozigóta beteg legjellemzőbb tulajdonsága a prelingualis eredetű, nagyfokú, perцепciós típusú, kétoldali, szimmetrikus hallásvesztés progresszió nélkül. A jellemző küszöbaudiogram ereszkedő vagy lapos lefutású közel azonos arányban. De fontos megjegyezni, hogy az általunk vizsgált kritériumok alapján a betegeink fenotípus variabilitása közel 30% volt. Ezt különösen jól szemlélteti a testvérpárok adatainak összehasonlító feldolgozása (*XIX. táblázat, 12. ábra*). Akár a halláskárosodás mértékét, a progressziót, a görbe lefutását vagy a szimmetrikus megjelenést nézzük, egyértelmű a különbség. A fenotípus megjelenése meglehetősen véletlenszerű, még az egyébként erre a génre nézve azonos genotípusú testvérpároknál is. Hiszen ha a hallásvesztés az egyik testvérnél csak közepes fokú, míg a másiknál a siketséggel határos, akkor az utóbbi beszédfejlődése jóval elmarad a jobban halló testvérétől. De a genetikai vizsgálatot mindkét esetben fontos elvégezni, hisz a mi beteganyagunk 12,7%-ban is 40-69 dB közti hallása volt a betegeknek. Ellentétben azzal az általános mendeli megfigyeléssel, hogy az autoszómális recesszíven öröklődő betegségek fenotípus megjelenése közel állandó és mindig súlyos fokú, a *GJB2* gén 35delG homozigóta genotípus esetében ez nem teljesen helytálló. Ez megnehezíti az azonosított genotípus által a korrekt fenotípus megjósolásának a lehetőségét. Az sem mondható meg biztosan, hogy az évek során a hallásvesztés progrediál-e. Pontos magyarázat erre a variabilitásra ma még nem ismert, de feltételezések vannak. Legnagyobb a valószínűsége annak, hogy egyéb faktorok állnak a háttérben, mint pl. más gének által kódolt fehérjék vagy más génekben jelenlévő egyéb mutációk hatása, melyek befolyásolják a betegség megjelenését és lefolyását. Hasonló befolyásoló tényező lehet a hallás genetikában is csupán csak pár éve ismert "modifier" gén jelenléte, melyet egy DFNB26-hoz kapcsolódó nagyothalló pakisztáni családban írtak le. A DFNM1 lokuszhoz (1q24) kapcsolódó gén terméke aktív állapotban szuppresszálni képes a homozigóta beteg várt fenotípusát, s a DFNB26 érintett genotípushoz társuló nagyothallással ellentétben normál halló lesz (Riazuddin, 2000). De akár más, eddig ismeretlen gének is befolyásolhatják a klinikai képet. Fontos

tehát, hogy genetikai vizsgálatot nem csak a nagyfokú hallássérülteknél, hanem a közepes fokú, veleszületett nagyothallóknál is elvégezzük.

5.1.2. *GJB2* GÉN EGYÉB MUTÁCIÓI

Ma már több mint 80 különböző genetikai eltérés ismert a *GJB2* génben, mely legtöbbször autoszómális recesszív öröklésmenetet mutat, de előfordul domináns formája is (Van Camp, 2003). Vizsgálatunk során a 35delG mutáción kívül 17 egyéb genetikai eltérést tudtunk kimutatni betegeink *GJB2* gén kódoló exonjában. Ezek közül kiemelendő a W24X nonszensz mutáció, mint a második leggyakoribb patogén genetikai hiba a vizsgált anyagunkban. Egyes esetekben, ha a 35delG delécióra megvizsgált vad típusú mintákat nem szekvenáltuk volna meg, akkor a W24X homozigóta betegeink genotípusa nem derült volna ki. A kontroll csoportban a W24X mutáció allélgyakorisága 1,4% volt (*XIV. táblázat*). Igaz, a mutáció már 1997 óta ismert, de eddig nem írták le halmozódását egy adott populáción belül. A többi genetikai eltérés csak néhány nagyothalló esetben volt kimutatható legtöbbször 35delG mutációval társulva. A különböző mutációkhoz társuló fenotípusok képe szintén színes. Egy családon belül a második nagyothalló gyermek halláskárosodásának mértéke nem határozható meg előre ezekben az esetekben sem. Talán a 35delG / L90P genotípusú esetekben találtunk két gyermeknél 60 dB-nél jobb hallást, de az egyetlen azonos genotípusú felnőtt esetében a NH már súlyos fokú volt (*34. ábra*). A többi mutációhoz szintén teljesen eltérő fenotípusok társultak, s nem lehetett konkrét következtetéseket levonni. Általánosságban annyi megállapítható, hogy az esetek nagyobb részében, ha a *GJB2* gén mindkét allélja érintett, akkor a nagyothallás mértéke csak ritkán közepes fokú.

A tanulmány eredményei rámutatnak a nem szindrómás veleszületett nagyothallók esetében a *GJB2* gén vizsgálatának fontosságára a medicinában. Ez a DNS változás – eddigi ismereteink szerint - a leggyakoribb oka a genetikai eredetű, prelingualis kezdetű, percepciós típusú, kétoldali nagyothallásnak a magyar populációban. A gén kicsi méretének köszönhetően a genetikai vizsgálat könnyen kivitelezhető, s hamar eredmény kapható. A Connexin 26 molekuláris diagnosztikája

jelentősen bővítette a nagyothallásról szóló genetikai ismeretünket, hiszen sok sporadikus esetben, ahol korábban az etiológia csak feltételezhető volt, a genetikai ok ma már diagnosztizálható. A nagyothalló személy *GJB2* génjének mindkét alléljában történő mutáció kimutatása lehetőséget ad a heterozigóta szülők felderítésére és a következő utód ismétlődés rizikójának meghatározására, de jelenleg még nem ad tökéletes lehetőséget a kezelésre, ami viszont egyre sürgetőbb lenne.

A genetikai tanácsadást nehezíti az a lelet, ha a Cx26 molekuláris genetikai diagnosztikája során csak egy allélon sikerül mutációt azonosítani, de a fenotípus halláskárosodást mutat. Ilyenkor nagyon óvatosnak kell lenni a tanácsadással, s inkább további genetikai vizsgálatokra lenne szükség a NH egyértelműen genetikai eredetének tisztázására, persze csak ha lehetséges. A Cx26 gap junction csatornává való szerelődésében a Cx30, Cx31 és Cx43 fehérjék is szerepet játszhatnak (Lautermann, 1998; Adams, 2000), így ezeknek a géneknek a molekuláris genetikai vizsgálata megmagyarázhatja a Cx26 heterozigóta, de nagyothalló állapotot. Nem hanyagolható el a domináns mutációk szerepe sem – igaz jóval kevesebb ismert, mint recesszív -, mely önmagában képes a connexon ill. a csatorna szerkezetét, permeabilitását vagy szabályozhatóságát módosítani.

A hallássérültek iskolájában végzett felmérésem szerint a veleszületett gyermekek halláskárosodásának először történő észlelése és diagnosztizálása átlagosan 2-3 éves kor közé tehető, ami meglehetősen késő a gyermek beszéd- és szellemi fejlődése szempontjából. Ennek megelőzésére ma már az ország több intézetében bevezetésre került az újszülöttek otoakusztikus emisszióval történő szűrése. Az így kiszűrt újszülötteknél pár hónapos korban elvégzett molekuláris genetikai vizsgálat (*GJB2*) egyértelműen bizonyítja a halláskárosodás tényét, megkímélve ezzel a csecsemőt a sorozatos egyéb, sokszor költségesebb vizsgálóeljárásoktól (pl.: altatásban történő BERA vizsgálat). A költséghatékonysági („cost benefit”) szempontból a molekuláris genetikai vizsgálat egyszerűbb, olcsóbban kivitelezhető, s kevésbé megterhelő mind az intézet, mind pedig a család számára. Így már pár hónapos korban konkrét diagnózisunk van, s elkezdhető a rehabilitáció a korai hallókészülék ellátással, ill. az időben történő cochlearis implantatum beültetésével. Több tanulmány is beszámolt már a Cx26 érintett csecsemőkben végzett cochlearis implantáció hatékonyságáról. *Fukushima és mts-i* által végzett japán felmérésben a cochlearis

implantátummal ellátott gyerekek beszédfejlődését vizsgálták, s a nagyothallás eredete alapján osztályozták őket. A vizsgálat szignifikánsan jobb eredményről számolt be a *GJB2* gén érintettségű nagyothalló gyermekek esetében, szemben az egyéb eredetű hallássérültekkel (Fukushima, 2002). Ugyanezt az eredményt találták egy Amerikában végzett felmérés során is, amely rámutat a perifériás és centrális hallóideg rendszer érintettségének, funkciójának integritására, bizonyítva a cochleris implantáció hatékonyságát ezekben a gyermekekben (Green, 2002). Ez is bizonyítja, hogy a korán kezdődő rehabilitációval nagyobb esélyük van a gyermekeknek a tökéletesebb beszédtanuláshoz, a jobb mentális fejlődéshez ill. a halló világba történő beépüléshez.

5.1.3. GENETIKAI TANÁCSADÁS

Amikor genetikai szűrésről és tanácsadásról beszélünk egy ehhez kapcsolódó másik témakört is érintenünk kell: prenatalis diagnosztika. A mutációt hordozó halló szülők esélye arra, hogy a második gyermekük is hallássérült lesz 25%. A fennmaradó 50%-ban hordozó, de egészséges, míg 25%-ban normál genotípusú és fenotípusú gyermekük születhet. Connexin 26 mutációt hordozó szülők magzatának esélye a spontán abortuszra és a koraszülött gyermek születésére nem nagyobb, mint az átlag populációé (Engel-Yeger, 2002). Amikor egy hordozó házaspárt felvilágosítunk arról, hogy második gyermekük is lehet hallássérült, joggal merül fel bennük a terhesség alatti genetikai vizsgálat igénye. A prenatalis diagnosztikai eljárásokat két csoportba oszthatjuk: invazív intrauterin beavatkozás és a nem invazív diagnosztika. A magzati genetikai vizsgálat leggyakrabban invazív módszerekkel történik. Legkorábban ultrahang-monitorozás mellett chorionboholy-mintavételt végezhetünk a méhlepényből vagy annak kezdeményéből a terhesség 8-12. hetében, s az így nyert minta már alkalmas a magzat DNS-szintű diagnosztikájára, hiszen mennyisége PCR-technikával megsokszorozható. Hátránya, hogy a chorionboholy-mintavételt követő spontán vetélés kockázata 3-5%. Így ezzel a mintavétellel lehetőség van arra, hogy a 11-12. héten tájékoztathassuk a szülőket a magzat genotípusáról és a várható fenotípusáról.

Az 1992. évi LXXIX. törvény a magzati élet védelméről és a terhesség megszakításáról a következőket mondja ki:

„...5. § (1) A terhesség csak veszélyeztettség, illetőleg az állapotos nő súlyos válsághelyzete esetén, az e törvényben meghatározott feltételekkel szakítható meg.

(2) Súlyos válsághelyzet az, amely testi vagy lelki megrendülést, illetve társadalmi ellehetetlenülést okoz.

6. § (1) A terhesség a 12. hetéig szakítható meg, ha

a) azt az állapotos nő egészségét súlyosan veszélyeztető ok indokolja;

b) a magzat orvosiilag valószínűsíthetően súlyos fogyatékoságban vagy egyéb károsodásban szenved;

c) a terhesség bűncselekmény következménye, valamint

d) az állapotos nő súlyos válsághelyzete esetén....”

A terhesség megszakításáról szóló egészségügyi törvény értelmében a nagyothallás nem sorolható a súlyos fogyatékoság körébe, hiszen hallókészülékkel jól kezelhető, valamint nem az élettel összeegyeztethetetlen betegségről van szó, s az érintettek szellemileg nem fogyatékosak. Mégis a 12. hét előtti pozitív genetikai vizsgálati lelet birtokában a terhesség megszakítását a törvény következő rendelkezésére hivatkozva lehet kérni: „(2) Súlyos válsághelyzet az, amely testi vagy lelki megrendülést, illetve társadalmi ellehetetlenülést okoz”, azaz szociális indokkal. Így végül is kivitelezhető lenne a mesterséges szelekció.

Egyéb etikai problémát is felvet a hallássérültek zárt közössége. Ismert tény, hogy a nagyothallók egymással gyakrabban házasodnak, s elszigetelten élnek. Sok esetben sokkal inkább szeretnék hallássérült gyermeket, sem mint hallót. Ha feltételezzük, hogy egy hallássérült házaspár kérné a prenatális genetikai vizsgálatot, s az eredmény halló magzatot mutat ki, akkor az is előfordulhat, hogy a szülők éppen ezért vetetnék el születendő gyermeküket akár anyagi vagy szociális problémákra hivatkozva. Így egy ép, egészséges magzat halálát okoznánk. Mivel minden embernek – hallásától függetlenül – joga van a bevezetett vizsgálatokra, nem tehetünk különbséget halló és nagyothalló házaspárok között. Viszont a hallássérült magzat kiszűrésével és abortuszával egy életen át tartó költséges rehabilitációs, ill. szociális problémát előzhetnénk meg, újabb lehetőséget adva a szülőknek egy halló gyermek fogantatására. Amíg ez a témakör mind etikailag, mind jogilag nem tisztázódik, nem ajánlott a prenatális diagnosztika elvégzése.

A *GJB2* génnel kapcsolatban további célunk újabb családok analízise, hogy segítségével meghatározhassunk új és ismert *GJB2* mutációk öröklődését, és azok jellegét. De ezzel még a mutációk által a fehérjében *in vivo* bekövetkezett funkcióváltozások és módosító hatásmechanizmusuk jórészt ismeretlen. Éppen ezért kell a továbbiakban a detektált mutációkon funkcionális analízist végezni, mely egy fontos lépés ahhoz, hogy jobban megérthessük a nagyothallás élettanát és molekuláris hátterét. Összefoglalva, eredményeink indokoltá teszik a *GJB2* gén, különösen a 35delG mutáció vizsgálatát a rutin orvoslásban mind a familiáris, mind pedig a sporadikus nem szindrómás nagyothalló esetek tekintetében a halláscsökkenés okának tisztázására. Ezáltal lehetőség nyílik az igen korai rehabilitációra és ezzel a betegnek a jobb beszéd- és szellemi fejlődésére.

5.2. A1555G MUTÁCIÓ ANALÍZIS A 12S *rRNS* GÉNEN

Az A1555G volt az első mitokondriális genomban identifikált mutáció, amit a nagyothallással hoztak kapcsolatba (Prezant, 1992). A mutáció a 12S *rRNS* nem variábilis régiójában van, ahova egyébként az aminoglikozid kötődni tud. A mutáció érzékenyíti az érintetteket az aminoglikozid antibiotikumok mellékhatásaival szemben és az ATP termelésben okozott zavarral a cochlean belüli ionpumpák hatástalan működése révén az ioneqyensúly felborul és a szőrsejtek és / vagy a stria vascularis károsodását eredményezi, amely irreverzibilis hallásvesztéshez vezet (Guan, 1996).

A mutációról szóló európai adatok igen változatosak. Különösen a spanyol népesség nem szindrómás esetei közt fordul elő nagyobb gyakorisággal a mutációhoz társuló szimmetrikus, progrediáló, különösen a magas frekvenciákat érintő percpációs nagyothallással (Estivill, 1998), de leírták már előfordulását a görög, angol, finn, olasz, japán, kínai, mexikói, kubai és a vietnámi populációkban is. A magyar populációban eddig ismeretlen volt a mutáció gyakorisága, ezért tanulmányunkban megvizsgáltuk a sporadikus, a familiáris ill. a kontroll eseteket. Adataink alapján a nem szindrómás nagyothallók esetében < 1,38%, míg az egészséges kontroll esetekben < 0,44% volt a mutáció előfordulási gyakorisága. Ez az eredmény azt mutatja, hogy ÉK-Magyarországon az említett mutáció gyakorisága igen alacsony, így költséghatékonyság szempontjából nem éri meg minden nagyothallónál ill. újszülöttnél a mutáció rutinszerű szűrését elvégezni. Viszont azokban az esetekben, ahol feltehetően a normál dózisú aminoglikozid készítmény halláscsökkenést okozott, javasolt a vizsgálat elvégzése. Hordozó genotípus esetén az egész család vizsgálatával kiszűrhetők a genetikailag érintett személyek, s ennek ismeretében megelőzhető a későbbiekben az aminoglikozid terápiás használata miatt indukált nagyothallás. Eddig ez az egyetlen ismert öröklődő nagyothallás forma, ahol a prevenció megvalósítható.

Ezzel kapcsolatban megemlíteném a *Bu* és *mts-i* által leírt „két lokusz modell” feltevését, amelyet arra alapoztak, hogy gyakran a mutációt hordozó aminoglikozid terápiában részesült esetek normál hallók, vagy a hordozók aminoglikozid terápia nélkül is nagyothallók (Bu, 1992). De ugyanezzel meg lehet a nagyothallás eltérő

megjelenését és különböző mértékét is magyarázni. A feltételezés szerint a mitokondriális eredetű genetikai hiba mellett egyidejűleg legalább egy, a sejtmag DNS állományát is érintő mutációnak kell jelen lennie. Habár a nukleáris gént még nem sikerült identifikálni, *Bykhovskaya és mts-i* beszámoltak a D8S277 marker körüli régióról (8. kromoszóma), ami tartalmazhat egy „modifier”-gént a mitokondriális A1555G mutációra nézve (Bykhovskaya, 2001). Egy következő vizsgálatban *GJB2* heterozigóta hordozó eseteknek az A1555G mutációval történő szignifikánsan magasabb előfordulási gyakoriságáról számoltak be a mutáns *GJB2* génnek aggraváló hatást feltételezve (Abe, 2001).

Mindenesetre a nagyothallásban a kapcsolat a mitokondrium által és a sejtmag által kódolt fehérjék, a modifikáló gének, valamint a külső környezeti faktorok szerepe között még nem tisztázott. Az is megmagyarázásra vár, hogy pontosan mi a szerepe az A1555G mutációnak, mi a pontos kapcsolat az aminoglikozid és a fennálló mitokondriális mutáció között, valamint miért csak a hallószerv érintett ezekben az esetekben.

5.3. DFNA6/14, *WFS1* GÉN (WOLFRAMIN)

A molekuláris genetikai analízis technikai fejlődésével lehetővé vált az öröklődő nagyothallás formái közötti különbségtétel és egy új osztályozás bevezetése. A 27. család esetében egy újabb gén vizsgálatára nyílt lehetőségünk: *WFS1* (*Wolfram szindróma 1*). A gén 1998 óta ismert, amikor Wolfram szindrómás családokban az érintettek *WFS1* génjében (DFNA6/14) recesszív homozigóta misszensz mutációt identifikáltak. A szindróma nagyothallással is társult, de a halláscsökkenés csak a magas frekvenciatartományt érintette. Először 2001-ben írtak le mély frekvenciákat érintő 6 nagyothalló családot egyéb szimptómák nélkül, ahol az érintettek *WFS1* génjében 5 különböző heterozigóta misszensz mutáció volt azonosítható (Bespalova, 2001).

Az emberi, egér és patkány *WFS1* gén nagymértékben identikus. A patkány protein aminosav összetétele 97%-ban ill. 86%-ban azonos az egér és az ember *WFS1* génjével (Takeda, 2001). A gén 8 exonból áll, melyből az első nem kódol. A kódoló szakaszok összesen 3628 bp nagyságúak, melyből a 8. exon a legnagyobb. A Wolframin protein 890 aminosavból felépülő, kilenc helikális szegmentet tartalmazó endoglikozidáz-H szenzitív transzmembrán fehérje az endoplazmatikus retikulumban (Strom, 1998). Wolfram szindrómát (DIDMOAD) okozó génen belüli recesszív mutáció 1998 óta ismert (Strom, 1998). A 27. család esetében a *WFS1* génben történt heterozigóta misszensz mutáció domináns öröklődésű, ami mély frekvenciákat érintő, nem szindrómás nagyothallással társult.

A 27. család tagjainak genetikai vizsgálata során két misszensz mutációt azonosítottunk a *WFS1* génben. Az R818C szubsztitúciót korábban DIDMOAD szindrómás betegséget okozó recesszív mutációként közölték le (Gomez-Zaera, 2001). R818C és T699M mutációt hordozó 39 éves nagyothalló nőbetegnél (V:19) a nagyothallás nem társult egyéb szimptómával. Két teljes hallású egészséges személyben szintén kimutatható volt az R818C szubsztitúció, így feltételezhetjük, hogy inkább egy benignus polimorfizmusról van szó. Ezzel szemben a család minden egyes érintett tagjának genomjában a heterozigóta, domináns öröklődésű T699M szubsztitúció volt kimutatható (ötödik intracelluláris domain), mely bizonyítja a *WFS1* gén érintettségét a családban. A fenotípus karakter az érintett esetekben kétoldali, lassan progrediáló, mély frekvenciákat érintő (125-1000 Hz) közepes fokú nagyothallást mutat, mely 30 éves kor

előtt manifesztálódik (59. ábra). A hallásvesztés mértéke idősebb korban sem haladja meg a 70 dB, bár ekkor már a magasabb frekvenciákon is kimutatható a halláskárosodás. Az elvégzett CT vizsgálatokra alapozva a sziklacsontban patológiás elváltozás kizárható volt.

Eredményeink nem zárják ki azt a tényt sem, hogy a *WFS1* gén mindkét allélján lévő recesszív mutáció a kódolt fehérje funkciókiesésével Wolfram-szindrómát okozhat. Ehhez hasonló patomechanizmus történhet, pl. a *Myosin-VIIA* gén esetében is, amely okozhat egyrészt nem szindrómás nagyothallást, valamint Usher 1B szindrómát is (Weil, 1997). Még az sem tisztázott, hogy a DIDMOAD miért társul csak a magas frekvenciákat érintő nagyothallással, míg ellenben az egy allélt érintő domináns öröklődésű kórkép főként csak a mély frekvenciákat érinti. Feltehetően az 5. intracelluláris domainben lévő T699M mutáció, amely domain fontos szerepet játszhat a belső fül működésében, csak részben károsítja a fehérje funkcióját. Funkcionális analízis lenne szükséges a WFS1 fehérje élettani szerepének meghatározásához, valamint a mutáció patológiai hatásának tisztázásához a hallásban.

5.4. DFNA10, *EYA 4* GÉN (*EYA4*)

Autoszómális dominánsan öröklődő nagyothallás egy heterogén betegség mind genetikailag, mind klinikai szempontból. Eddig 17 domináns gén és több mint kétszerannyi lokuszt ismert.

A 30. család nagyothalló tagjainak genomjában kapcsoltság volt kimutatható a 6q23 régióhoz (DFNA10). Először 2001-ben *Wayne és mts-i* identifikálták az ehhez a lokuszhoz kapcsolódó *EYA4* gént („*Eyes Absent 4*”), amelyben történt mutációk felelősek voltak egy belga (C2200T) és egy amerikai család (1468insAA) posztlingualis kezdetű, autoszómális domináns öröklődésű, progresszív nagyothallásáért. A gén 21 exonból áll és egy transzkripció aktivátor faktort kódol, melynek a korai embriogenezisben van szerepe.

A mi magyar családukban regisztrált mutáció az eddig leírt harmadik genetikai eltérés az *EYA4* génben. A négy nukleotid inszerciója (1558insTTTG) kereteltolódáshoz és a gén 379. pozíciójában időelőtti stop kodonhoz vezet. Eredménye az *eyaHR* (*eya*-homológ régió) régióinak a csaknem teljes delécioja az *EYA4* fehérjében. Az *eyaHR* az *EYA* proteinek családjának fontos része (271 aminosavból áll, prolin-szerin-treonin gazdag), mivel hálózatot képezve interakcióba tud lépni a *PAX*, *SIX* és *DACH* proteinekkal (Heanue, 1999). Később ugyanez a munkacsoport kimutatta, hogy a *Dach / Pax / Eya* hálózat a fül fejlődése során expresszálódik (Heanue, 2002). A mutáns régió megjelenése a fehérjében funkciózavart, haploinsufficienciát okoz. Eredményeinkre hivatkozva feltételezzük, hogy az *eyaHR* régió belső fül specifikus funkcionális szubregiót tartalmaz, de a működéskiesés kompenzációjának eredményeként nem okoz kongenitális abnormalitást a fülben a korai embriogenezis során.

A mutációhoz tartozó eseteink fenotípusában a nagyothallás kezdetben csak az 1000 és 2000 Hz frekvenciákat érintette, de már 20 éves kor előtt elkezdődött (61. ábra), s átlagban 15 dB / 10 év, később 10 dB / 10 év progresszióval nagyfokú nagyothalláshoz vezetett (62. ábra). A vestibuláris rendszer érintetlen volt. Érdekessége, hasonlóan az eddig leírt amerikai és belga családoknál tapasztalt nagyothallásokhoz, hogy függetlenül a mutáció típusától a fenotípus csaknem azonos. A mi magyar családukban és az amerikai családban a teljes *eyaHR* deletálódik, míg a belga család esetében csak a C-terminális végének egy kis szakasza, mégis egyik

esetben sem okozott veleszületett nagyothallást (Wayne, 2001). Ez a megfigyelés alátámasztja azt a feltételezést, hogy az *eyaHR* régió néhány funkcionális szubrégiót tartalmaz különböző szövetspecifikus tulajdonságokkal, de kiesése nem okoz olyan mértékű zavart, hogy kongenitális nagyothallást eredményezne.

A fül fejlődésében, ill. *Drosophilak* szemfejlődésben betöltött funkciója mellett az *EYA* gén család tagjairól nemrég kimutatták, hogy szerepük van a pro-apoptotikus szignálban is (Clark, 2002), és a kórosan expresszált vagy csökkent számban jelenlévő EYA téves apoptózist indukál. Az EYA-indukálta sejthalálnak sok olyan jellemzője van, ami tipikus az apoptózisra, beleértve a plazma és a mitokondriális membránváltozásokat és a „caspase” aktivitást. Úgy tűnik, hogy az EYA képes beindítani a „caspase”-dependens és „caspase”-independens útvonalat is (Clark, 2002). A „caspase”-dependens apoptózis előfordul a belső fülben, fontos szerepet játszva a hallásban. A Caspase-3 „knock out” egér progresszív, közepes fokú percepciós nagyothallást mutatott a támasztó sejtek hiperpláziájával és a szőrsejtek degenerációjával együtt (Morishita, 2001). Megjegyzem, hogy a progrediáló nagyothallás fontos tulajdonsága a DFNA10 lokuszhoz kapcsolódó eddig ismert 3 családnak.

Így az EYA4 fehérje apoptotikus funkciójának szerepe kell hogy legyen a hallásban, és így az *EYA4* génben történt genetikai hiba nem csak a hibás fülfejlődéssel, hanem az apoptózisban okozott zavarral együttesen vezet nagyothalláshoz.

5.5. GÉNTERÁPIA

A nagyothallásért felelős öröklődő rizikófaktorok megértése egy jobb diagnosztikai lehetőséget és ezzel együtt egy még tudományosabb alapokon nyugvó kezelést teremt. A jövő kutatásainak a kezelés és a prevenció kifejlesztésére kell fókuszálnia. A jövő nagy ígérete a génterápia, mellyel módunk lehet arra, hogy ép gént juttassunk be a megfelelő sejtekbe, ahol az kifejeződik és elláthatja azt a funkciót, amit a betegben a mutáns gén nem tudott teljesíteni. Mivel a sejtmembrán nem átjárható a fehérjemolekulák számára, az enzimeknek azokban a sejtekben kell szintetizálódniuk, melyekben szükség van aktivitásukra. A sikeres génterápia feltétele, hogy a génátvitel a célsejtbe történjen, aktiválódva működőképes fehérjét kódoljon normális mennyiségben, meglehetősen hosszan tartó stabilitással és ha szükséges az eljárás ismételhető legyen.

Kezdetben, a rekombináns DNS korszak előtt a génbeviteli kísérletekben felhasznált genetikai anyag tisztított DNS vagy RNS volt (transzfekció). Később már klónozott emlős géneket (pl. cDNS-t) alkalmaztak. A klónozott gének bevitele történhet *ex vivo* és *in vivo* módszerekkel. Az *ex vivo* módszer lényege, hogy a célsejt a beteg szervezetéből eltávolításra kerül, a vektor DNS-t *in vitro* juttatják be a sejtbe, ezeket a sejteket amplifikálják és visszajuttatják a beteg szervezetébe. Ez a módszer a belső fül tekintetében jelenleg nem kivitelezhető.

Az *in vivo* módszernél az idegen gén bejuttatása közvetlenül az érintett célsejtbe történik. A belső fül tekintetében a következő lehetőségek jöhetnek szóba:

- 1.) Vivőanyag segítségével a gén (pl. gelfoam) diffúzió útján történő bejuttatása a középfülből a belső fülbe a kerekablak membránján keresztül.
- 2.) A kerekablakon keresztül történő bejuttatás mikroinjekcióval a belső fül perilympa terébe.
- 3.) Infúzió a csontos labirintus falának feltárása után a perilympa térbe cochleo- vagy canalostoman keresztül. Ez tartósabb bejuttatási lehetőséget biztosít.
- 4.) Saccus endolymphaticuson keresztül történő mikroinjekció az endolympha térbe.

A beavatkozások nem veszélytelenek, fennáll a membránruptúra, a hallásromlás stb. szövődmények lehetősége. A belső fül kifejezett vulnerabilitásáért manapság inkább a

kevésbé invazívabb módszert tartják előnyben, mint pl. diffúzió a kerekablakon keresztül.

A génbeviteli technikák korlátait jelzi, hogy pl. a vektor nem mindig a célsejtbe épül be, vagy a sejt által felvett DNS gyakran elvész, s amikor meg beépül a helyes genomba az integráció véletlenszerűen bárhova történhet. Így egy aktív gén környezetébe való beépülése magas szintű génexpressziót eredményezhet, míg a genom néma régiójába való beépülése esetén egyáltalán nem lesz génkifejeződés.

A géntranszfer rendszereknek több formája is ismert: mechanikai, kémiai, liposzómális, virális (retrovírus, adenovírus, adeno-asszociált vírus, lentivírus), melyeket még csak állatkísérletekben használtak. Állatkísérletekben már beszámoltak a belső fülbe történő virális átvitelről adenovírus, adeno-asszociált vírussal és lentivírus (Lalwani, 1996; Han, 1999). A virális vektorok hátránya, hogy immunreakciót indukálhatnak, megtarthatja vagy visszaszerezheti fertőzést okozó képességét, vagy akár más géneket aktiválhat, mint pl. tumor gének. Előnye a jó beépülési képesség és a nagyobb expressziós titer biztosítása a célsejtekben. A hátrányok kiküszöbölésére nem virális transzfereket dolgoztak ki, amely egy meglehetősen heterogén csoport. A belső fülbe liposzómális módszerrel értek már el eredményt, azaz a DNS molekulákat mesterségesen létrehozott lipid vezikulumokba csomagolták, melyek összeolvadva a célsejt membránjával tartalmukat a citoplazmába ürítették (Wareing, 1999). Ennek technikának a hátránya, hogy kevésbé célsejt specifikus és az expresszió mértéke jóval elmarad a virális metodikáétól.

A génterápia lehetőségeinek korláti közé tartozik az a tény is, hogy a genetikai változás csak a testi sejteket érinti, a csíravonal sejtjeit, melyekből a gaméták képződnek nem. Ily módon a szomatikus sejt génterápiája olyan eljárásnak tekintendő, mely nem gyógyítja az öröklődő rendellenességet, hanem kezeli. A betegséget okozó gén továbböröklődik. A csíravonal génállományába történő beavatkozás etikai és morális okokból nem megengedhető. A különböző applikációs formák és a transzferrendszerek (vektorok) alkalmazása az egészséges gének sikeres bejuttatására a célsejtekbe lehet az első lépés az örökletes nagyothallás molekuláris genetikai terápiájának kifejlesztéséhez. De a jelenleg állatokon alkalmazott technikák emberen történő megvalósításához még további fejlesztésre van szükség a sejtspecifitás növelése és a mellékhatások csökkentése céljából.

Az értekezés az eddigi alapkutatásokra hivatkozva az öröklődő nagyothallás jövőbeni molekuláris genetikai aspektusait mutatja be. Az egyre nagyobb ismeretünk a génekben történt mutációk gyakoriságáról, patomechanizmusáról lehetőséget nyújt a pontosabb genetikai rizikó meghatározásra, az öröklődés módjára és a fenotípus jellemzésére. Bár a nagyothallás genetikai háttere nem teljesen tisztázott, mégis nyilvánvaló, hogy mennyire különböző komponensek összetett működésének eredménye a hallás. A legtöbb ezek közül a gének közül más szövetekben és szervekben is expresszál fehérjét, mégis ezekben a génekben történt mutációk kb. 70%-a csak nagyothallás szimptomával társul. Ez a tény is azt sugallja, hogy a Corti-szerv az egyik legérzékenyebb szervünk, s már minimális változás is a szerv kóros működését eredményezi.

A genetikai kutatásoknak köszönhetően a hallásban jó néhány újabb kulcslépés tisztázódott, de ezek további tisztázásához újabb családok identifikálására van szükség. A tudományos előnyei mellett segítségével epidemiológiai adatokat nyerünk, molekuláris diagnosztikai tesztekkel szűrhetjük az újszülötteket, valamint egy új, hatékonyabb terápiára nyújt lehetőséget. A Connexin 26 eredetű veleszületett nem szindrómás nagyothallás magas előfordulási aránya miatt a *GJB2* molekuláris genetikai vizsgálata ma már a rutin diagnosztika része kell hogy legyen. Ezen kívül a jövőben még több szűrővizsgálati módszereket kellene bevezetni, hogy szélesebb körben, megfelelő időben identifikálhassuk a különböző genetikai eredetű nagyothalló eseteket.

6.1. ÖSSZEFOGLALÁS

A nagyothallás (NH) az egyik leggyakoribb érzékszervi megbetegedés a világon. Minden 1/1000 gyermeknek prelingualis, azaz a beszédfejlődés előtt kezdődő NH-a van, melynek hátterében 60%-ban genetikai defektus áll. Az öröklődő NH egy heterogén betegség, melynek 70%-a a nem szindrómás kórképek közé tartozik. Többféle öröklődési módja közül a leggyakoribb az autoszómális recesszív (75%). A gap junction proteint (Connexin 26) kódoló *GJB2* génben történt mutációk a felelősek leginkább a familiárisan és a sporadikusan prelingualisan fellépő, nem szindrómás, recesszív NH-ért a különböző populációkban. Európában a leggyakoribb genetikai hibája a 35delG mutáció. Az értekezésben a *GJB2* gén genetikai hibáinak előfordulását vizsgáltuk veleszületett nagyothalló betegek és 500 egészséges kontroll személy esetében Északkelet-Magyarország területéről. A mi anyagunkban a leggyakoribb genetikai eltérés a 35delG délécio és W24X mutáció volt. A 35delG homozigóta betegek NH-a általában prelingualis kezdetű, percepciós típusú, kétoldali, nagyfokú, progresszió nélkül. A kontroll csoportban a 35delG allélfrekvenciája 2,4%-t mutatott, mely hasonlóan magas, mint amit Európa mediterrán területein megfigyeltek. Eredményeink igazolják a *GJB2* gén vizsgálatának fontosságát a rutin orvoslásban.

A maternális öröklődésű mitokondriális *12S rRNS* génben az A1555G mutáció aminoglikozid érzékenységet indukál, mely nem szindrómás NH okoz az antibiotikummal kezelt betegben. 72 ismeretlen eredetű nagyothalló beteg és a kontroll csoport DNS-ét vizsgáltuk erre a mutációra nézve. Az A1555G mutáció gyakorisága a beteg csoportban <1,38%, míg a kontroll csoportban <0,44% volt. Mivel a mutáció előfordulása igen alacsony, így költséghatékonyság szempontjából nem éri meg minden nagyothallónál a mutáció rutinszerű szűrését elvégezni.

A *WFS1* gént tartalmazó, 4p16 kromoszóma régióhoz kapcsolódó DFNA6/14 lokusz egyike a mély frekvenciatartományt érintő percepciós NH-ért (< 2000 Hz) felelős lokuszoknak. Egy öt generációs nagyothalló család tagjainak kapcsoltság analízise során kiderült, hogy a DFNA6/14 lokusz öröklődése szoros kapcsoltságot mutat a fenotípussal. A család minden egyes nagyothalló személyének *WFS1* génjében T699M misszensz domináns mutációt identifikáltunk, mely az egészségesekben nem volt detektálható. Egy nagyothalló és két normál halló esetben további mutáció (R818C) volt azonosítható, melyről feltételezzük, hogy polimorfizmus. A T699M érintettek fenotípusa nem szindrómás, posztlingualis kezdetű, percepciós típusú, kétoldali, mély frekvenciákat érintő NH mutat lassú progresszióval.

A DFNA10 lokuszon lévő *EYA4* génben történt mutáció dominánsan öröklődő, posztlingualis kezdetű, percepciós NH okoz progresszióval. Az *EYA4* fontos szerepet játszik az embriogenezisben és az apoptózisban. Egy négy generációs nagyothalló család kapcsoltság analízise során kapcsolat volt kimutatható a 6q23 kromoszómához. Az érintettek *EYA4* génjében négy nukleotid inszerciója (15558insTTTG) kereteltolódáshoz és így a 379. pozícióban időelőtti stop kodonhoz vezetett. Ez a mutáció az eddig leírt harmadik genetikai eltérés az *EYA4* génben.

6.2. SUMMARY

Hearing impairment (HI) is one of the most prevalent inherited sensory disorder in humans, affecting about one in 1000 live births with at least 60% of cases being inherited. Hereditary HI is a heterogeneous class of disorders that shows various patterns of inheritance and involves a multitude of different genes. About 70% of prelingual HI is non-syndromic. Autosomal recessive forms take up about 75% of these cases. Mutations in the *GJB2* gene encoding the gap junction protein connexin 26 have been established as a major cause of inherited and sporadic non-syndromic (NS) HI in different populations. One single mutation, 35delG, accounts for the majority of mutations in Caucasian patients with HI. In the present study we screened 500 healthy control individuals and a group of patients with HI from Northeastern Hungary for the 35delG mutation and for other *GJB2* mutations. The most common mutation is the 35delG, followed by the W24X mutation. Ordinarily these 35delG homozygous patients showed a prelingual, sensorineural, bilateral, symmetric HI without progression. In the general population an allele frequency of 2.4% was estimated for this mutation. The results confirm the importance of *GJB2* mutations in the Hungarian population displaying mutation frequencies that are comparable with mutation frequencies in the Mediterranean area.

Maternally inherited NSHI associated with the A1555G mutation in the human mitochondrial *12S rRNA* gene results in increased sensitivity to aminoglycoside. We analyzed 72 patients with NS severe to profound HI of unknown origin for this mutation. The frequency of the A1555G mutation in the hearing impaired population was below 1.38%, and no mutation was found in control individuals with normal hearing (frequency < 0.44%).

NS low-frequency sensorineural HI (LFSNHI) comprises a group of hearing disorders affecting only frequencies below 2000 Hz. DFNA 6/14 loci was mapped to non-overlapping adjacent regions on chromosome 4p16. This critical region includes *WFS1* gene. We analyzed a five-generational Hungarian family with LFSNHI and linkage to DFNA6/14. We have detected missense mutations changing amino acids and one of them (T699M) segregated completely with the affected haplotype. The second missense substitution (R818C) did not segregate with the hearing impairment, it most likely represents a polymorphism. In general, these patients showed a postlingual, sensorineural, bilateral, symmetric, nonsyndromic low frequency hearing impairment with a slow progression.

Mutations in the *EYA4* gene are responsible for postlingual, progressive, sensorineural, autosomal dominant HI at the DFNA 10 locus. EYA4 plays an important role in several developmental process. We report a four-generational DFNA 10 family displaying sensorineural, progressive HI and linkage to 6q23. By mutation analysis of *EYA4* an insertion of 4 bp (1558insTTTG) was detected. This insertion creates a frameshift and results in a stop codon at position 379. Our family is the third one linked to DFNA 10 and revealing a mutation in the *EYA4*.

7. IRODALOMJEGYZÉK

Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM and Kimberling WJ (2000) Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet* 37: 41-43.

Abe S, Kelley PM, Kimberling WJ and Usami S (2001) Connexin 26 gene (GJB2) mutation modulates the severity of hearing loss associated with the 1555A→G mitochondrial mutation. *Am J Med Genet* 103: 334-338.

Adams JC (2000) Immunolocalization of connexin 31 in the cochlea. Abstracts, 23rd ARO midwinter research meeting, St. Petersburg Beach, FL, USA, Feb 20-24 2000, p127.

Bespalova IN, Van Camp G, Bom SJ, Brown DJ, Cryns K, DeWan AT, Erson AE, Flothmann K, Kunst HP, Kurnool P, Sivakumaran TA, Cremers CW, Leal SM, Burmeister M, Lesperance MM (2001) Mutations in the Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet* 15; 10(22): 2501-2508.

Borsani G, DeGrandi A, Ballabio A (1999) EYA4, a novel vertebrate gene related to *Drosophila* eyes absent. *Hum Mol Genet* 8: 11-23.

Bruzzone R, White TW, Paul DL (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238: 1-27.

Bu X, Yang HY, Shohat M and Rotter JI (1992) Two-locus mitochondrial and nuclear gene models for mitochondrial disorders. *Genet Epidemiol* 9: 27-44.

Bykhovskaya Y, Yang H, Taylor K, Hang T, Estivill X, Casano RA, Majamaa K, Shohat M and Fischel-Ghodsian N (2001) Modifier locus for mitochondrial DNA disease: Linkage and linkage disequilibrium mapping of a nuclear modifier gene for maternally inherited deafness. *Genet Med* 3(3): 177-180.

Chaib 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(12): 2219-22.

Clark SW, Fee BE and Cleveland JL (2002) Misexpression of the eyes absent family triggers the apoptotic program. *J Biol Chem* 277: 3560-3567.

Cohen MMMM, Gorlin RJ. (1995) Epidemiology, etiology and genetic patterns. In: Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MMMM, eds. *Hereditary Hearing Loss and Its Syndromes*. New York: Oxford University Press 9-21.

Cryns K, Pfister M, Pennings RJE, Bom SJH, Flothmann K, Caethoven G, Kremer H, Schatteman I, Köln KA, Tóth T, Kupka S, Blin N, Nürnberg P, Thiele H, Heyning PH, Reardon W, Stephens D, Cremers CWRJ, Smith RJH and Van Cam G (2002) Mutations

in the WFS1 gene that cause low-frequency sensorineural hearing loss are small non-inactivating mutations. *Hum Genet* 110: 389-394.

Denoyelle F, Weil D, Wilcox SA, Lench NJ, Joannard A, Levilliers J, Garabédian ÉN, Müller RF, Gardner RJM, Petit C (1997) Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 6(12): 2172-2177.

Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabédian ÉN, Petit C (1999) Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 353: 1298–1303.

Elfgang C, Eckert R, Lichtenberg-Frate H, Butterweck A, Traub O, Klein RA, Hulser DF, Willecke K (1995) Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129(3): 805-817.

Engel-Yeger B, Zaaroura S, Zlotogora J, Shalev S, Hujeirat Y, Carrasquillo M, Barges S, Pratt H (2002) The effects of a connexin 26 mutation – 35delG – on oto-acoustic emissions and brainstem evoked potentials: homozygotes and carriers. *Hear Res* 163: 93-100.

Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, Govea N, Mila M, Zelante L, Gasparini P (1998) Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351: 394-398.

Estivill X, Govea N, Barcelo E, Badenas C, Romero E, Moral L, Scozzri R, D'Urbano L, Zeviani M and 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.

European Work Group on Genetics of Hearing Impairment (1996) Info Letter 2: Nov.

Fukushima K, Sugata K, Kasai N, Fukuda S, Nagayasu R, Toida N, Kimura N, Takishita T, Gunduz M, Nishizaki K (2002) Better speech performance in cochlear implant patients with GJB2 related deafness. *Int J Pediatr Otolaryngol* 62: 151-157.

Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, Sugii A, Hibino H and Kubo T (1999) Three novel connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. *Neuroreport* 10: 1853-1857.

Gasparini P, Estivill X, Volpini V, Totaro A, Castellvi-Bel S, Govea N, Ventruto V, De Benedetto M, Stanziale P, Zelante L, Mansfield ES, Sandkuijl L, Surrey S, Fortina P (1997) Linkage of DFNB1 to non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness in Mediterranean families. *Eur J Hum Genet* 5: 83-88.

Gomez-Zaera M, Strom TM, Rodriguez B, Estivill X, Meitinger T, Nunes V (2001) Presence of a major WFS1 mutation in Spanish Wolfram syndrome pedigrees. *Mol Genet Metab* 72: 72-81.

Green GE, Scott DA, McDonald JM, Teagle HFB, Tomblin BJ, Knutson JF, Gantz BJ, Sheffield VC, Smith RJH (2002) Performance of cochlear implant recipients with GJB2-related deafness. *Am J Med Genet* 109: 167-170.

Griffith AJ, Chowdhry AA, Kurima K, Hood LJ, Keats B, Berlin CI, Morell RJ and Friedman TB (2000) Autosomal recessive nonsyndromic neurosensory deafness at DFNB1 not associated with the compound-heterozygous GJB2 (connexin 26) genotype M34T/167delT. *Am J Hum Genet* 67: 745-749.

Guan MX, Fischel-Ghodsian N, Attardi G (1996) Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet* 5: 963-971.

Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A, and Petit C (1994) A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet* 6: 24-28.

Han JJ, Mhatre AN, Wareing M, Pettis R, Zufferey AN, Trono D, Lalwani AK (1999) Transgene expression in the guinea pig cochlea mediated by the Lentivirus derived gene transfer vector. *Hum Gene Therapy* 10(11): 1867-1874.

Hartmann A (1880) Taubstummheit und Taubstummenbildung, nach den vorhandenen Quellen sowie nach eigenen Beobachtungen und Erfahrungen. Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart.

Heanue TA, Reshef R, Davis RJ, Rowitch G (1999) Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1 homologs of genes required for Drosophila eye formation. *Genes Dev* 13: 3231-3234.

Heanue TA, Davis RJ, Rowitch G (2002) Dach1, a vertebrate homologue of Drosophila dachshund, is expressed in the developing eye and ear of both chick and mouse and is regulated independently of Pax and Eya genes. *Mech Dev* 111: 75-87.

Heathcote K, Syrris P, Carter ND and Patton MA (2000) A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis (MIM 148350) *J Med Genet* 37: 50-51.

Holder JW (1993) Gap junction function and cancer. *Cancer Res* 53: 3475-3485.

Hu DN, Qui WQ, Wu BT, Fang LZ, Zhou F, Gu YP, Zhang QH, Yan JH, Ding YQ and Wong H (1991) Genetic aspects of antibiotic induced deafness: mitochondrial inheritance. *J Med Genet* 28: 79-83.

Hutchin TP (1998) Sensorineural hearing loss and the 1555G mitochondrial DNA mutation. *Acta Otolaryngol* 118: 48-52.

Jaber L, Shohat M, Bu X, Fischel-Ghodsian N, Yang HY, Wang SJ, Rotter JI (1992) Sensorineural deafness inherited as a tissue specific mitochondrial disorder. *J Med Genet* 29: 86-90.

Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD and Kimberling WJ (1998). Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 62: 792-799.

Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF and Leigh IM (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387: 80-83.

Kenna MA, Wu BL, Cotanche DA, Korf BR, Rehm HL (2001) Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127(9): 1037-42.

Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, Kobayashi T (2000) Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc* 33: 51-56.

Kudo T, Ikeda K, Kure S, atsubara Y, Oshima T, Watanabe K, Kawase T, Narisawa K and Takasaka T (2000) Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. *Am J Med Genet* 90: 141-145.

Kumar NH, Gilula NB: The gap junction communication channel (1996) *Cell* 84(3): 381-388.

Kupka S, Braun S, Aberle S, Haack B, Ebauer M, Zeissler U, Zenner HP, Blin N and Pfister M (2002) Frequencies of GJB2 mutations in German control individuals and patients showing sporadic non-syndromic hearing impairment. *Hum Mutat* 20(1): 77-78.

Lalwani AK, Walsh B, Reilly PG, Muzyska N, Mhatre A (1996) Developmnet of in vivo gene therapy for hearing disorders: Introduction of Adeno-associated virus into the guinea pig cochlea. *Gene Therapy* 3(7): 588-592.

Lathrop GM, Lalouel JM (1984) Easy calculations of lod scores and genetic risks on small computers. *Am J um Genet* 36: 460-465.

Lautermann J, Ten Cate W-JF, Althenhoff P, Grummer R, Traub O, Frank HG, Jahnke K, Winterhager E (1998) Expression of the gap-junction connexin 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res* 294: 415-420.

Lefebvre P, Van De Water TR (2000) Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Res Rev* 32: 159–162.

Lehtonen MS, Uimonen S, Hassinen IE, Majamaa K (2000) Frequency of mitochondrial DNA point mutations among patients with familial sensorineural hearing impairment. *Eur J Hum Genet* 8: 315-318.

Martin PEM, Coleman SL, Casalotti SO, Forge A and Evans WH (1999) Properties of connexin 26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness. *Hum Mol Genet* 8(13): 2369-2376.

Mendel G (1865) Versuche über Pflanztenhybriden. Verhandlungen des Naturforschenden Vereins, Brühn.

Morell R J, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B and Friedman TB (1998) Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 339: 1500-1505.

Morishita H, Makishima T, Kaneko C, Lee YS, Segil N, Takahashi K, Kuraoka A, Nakagawa T, Nabekura J, Nakayama K, Nakayama KI (2001) Deafness due to degeneration of cochlear neurons in caspase-3-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 284(1): 142-9.

Morton NE (1991) Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann NY Acad Sci* 630: 16-31.

Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, Arslan E and Zacchello F (1999) Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet* 36: 829-832.

(OMIM) Online Mendeleian Inheritance in Man: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.

Politzer A (1887) Lehrbuch der Ohrenheilkunde für praktische Ärzte und Studierende. II. Band, 2nd ed. Ferdinand Enke, Stuttgart.

Prasad S, Cucci RA, Green GE and Smith RJ (2000) Genetic testing for hereditary hearing loss: connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness-causing mutations (R32C and 645- 648delTAGA). *Hum Mutat* 16: 502-508.

Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L and Rotter JI (1993) Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic- induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 4: 289-294.

Rabionet R, Zelante L, López-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, Arbonés ML, Gasparini P, Estivill X (2000) Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet* 106: 40-44.

Riazuddin S, Castelein CM, Ahmed ZM, Lalwani AK, Mastroianni MA, Naz S, Smith TN, Liburd NA, Friedman TB, Griffith AJ, Riazuddin S and Wilcox ER (2000) Dominant modifier DFNM1 suppresses recessive deafness DFNB26. *Nat Genet* 26: 431-434.

Storm K, Willocx S, Flothmann K, Van Camp G (1999) Determination of the carrier frequency of the common connexin 26 30delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method. *Mutat Res* 14: 263-266.

Strom TM, Hortnagel K, Hofmann S, Gekeler F, Scharfe C, Rabl W, Gerbitz KD, Meitinger T (1998) Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet* 7: 2021-2028.

Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, watanabe Y, Shinoda K, Oka Y (2001) WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet* 10: 477-484.

Thönnissen E, Rabionet R, Arbones LM, Estivill X, Willecke K, Ott T (2002) Human connexin26 (GJB2) deafness mutations affect the function of gap junction channels at different levels of protein expression. *Hum Genet* 111: 190-197.

Usami S, Abe S, Akita J, Namba A, Shinkawa H, Ishii M, Iwasaki S, Hoshino T, Ito J, Komiyama S, Tono T, Komune S (2000) Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. *J Med Genet* 37: 38-40.

Van Camp G, & Smith R.J. Hereditary hearing loss homepage, World Wide Web URL: <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>.

Van Camp G, Smith RJH (2000) Maternally inherited hearing impairment. *Clin Genet* 57: 409-414.

Wallis C, Ballo R, Wallis G, Beighton P, Goldblatt J (1988) X-linked mixed deafness with stapes fixation in a Mauritian kindred: linkage to Xq probe pDP34. *Genomics*, 3: 299- 301.

Wareing M, Mhatre AN, Han JJ, Pettis RM, Hong K, Pfister MHF, Zheng WW, Lalwani AK (1999) Cationic liposome mediated transgene expression in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 128: 61-69.

Wayne S, Robertson NG, DeClau F (2001) Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet* 10: 195-200.

We S, Robertson NG, DeClau F (2001) Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet* 10: 195-200.

Weil D, Kussel P, Blanchard S, Levy G, Levi-Acobas F, Drira M, Ayadi H and Petit C (1997) The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet* 16: 191-193.

Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, Collins V, Wilcox LJ, Gardner RJ, Kamarinos M, Cone-Wesson B, Williamson R, and Dahl HHM (2000) High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum Genet* 106: 399-405.

Xia AP, Ikeda K, Katori Y, Oshima T, Kikuchi T, Takasaka T (2000) Expression of connexin 31 in the developing mouse cochlea. *Neuroreport* 11(11): 2449-53.

Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Mila M, Monica MD, Lutfi J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S and 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, Shen W, He DZZ, Long KB, Madison LD and Dallos P (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405: 149-155.

8. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A	-	alanin, adenin
AD	-	autoszómális domináns
ADP	-	adenozin-difoszfát
AR	-	autoszómális recesszív
ATP	-	adenozin-trifoszfát
BERA	-	agytőtzi kiváltott potenciál audiometria (Brainstem Evoked Response Audiometry)
bp	-	bázispár
C	-	cisztein, citozin
cDNS	-	komplementer dezoxiribonukleinsav
Cl ⁻	-	kloridion
cM	-	centi-Morgan
Cx26	-	Connexin 26 fehérje
D	-	aszparaginsav
dB	-	deciBel
ddNTP	-	didezoxi-nukleotidok
del	-	delécio
DFN	-	nagyothallásért felelős X kromoszómához kötött nem szindrómás lokusz (deafness)
DFNA	-	nagyothallásért felelős autoszómális domináns öröklődésű, nem szindrómás lokusz (deafness)
DFNB	-	nagyothallásért felelős autoszómális recesszív öröklődésű, nem szindrómás lokusz (deafness)
DFNM	-	nagyothallásért felelős modifikáló nem szindrómás lokusz (deafness, modifier)
DIDMOAD	-	Wolfram szindróma (diabetes insipidus, diabetes mellitus, opticus atrophía, és nagyfokú nagyothallás)
DNS	-	dezoxiribonukleinsav
E	-	glutaminsav
EC	-	extracelluláris domain
EYA	-	„Eyes absent” gén ill. protein
eyaHR	-	eya Homológ Régió
F	-	fenilalanin, „forward” szekvenálás
G	-	glicin, guanin
GJB2	-	gap junction β2 protein génje
H	-	hisztidin
Hz	-	Hertz
I	-	izoleucin
IC	-	intracelluláris domain
Ins	-	inszerció
K	-	lizin
K ⁺	-	káliumion
kDa	-	kilo-Dalton

kHz	-	kilo-Hertz
L	-	leucin
M	-	metionin
mRNS	-	messenger ribonukleinsav
mtDNS	-	mitokondriális dezoxiribonukleinsav
N	-	aszparagin
Na ⁺	-	nátriumion
NH	-	nagyothallás
nm	-	nanométer
P	-	prolin
p	-	kromoszóma rövid karja
PCR	-	polimeráz láncreakció
Q	-	glutamin
q	-	kromoszóma hosszú karja
R	-	arginin, reverz szekvenálás
rRNS	-	riboszóma ribonukleinsav
S	-	szerin
T	-	treonin, timin
TM	-	transzmembrán domain
tRNS	-	transzfer ribonukleinsav
V	-	valin
W	-	triptofán
WFS1	-	Wolfram szindróma 1 génje
Y	-	tirozin

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönöm mindenk előtt **Prof. Dr. Sziklai István** egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, hogy lehetővé tette számomra ennek a témának a kutatását, munkámat támogatta, és következetesen irányította.

Köszönettel tartozom **Dr. Markus Pfister** és **Dr. Susan Kupka** kollégáknak a (Tübingeni Egyetem Fül-Orr-Gégeklinika), hogy lehetőséget biztosítottak a genetikai technikák elsajátításához és ebben mind anyagilag, mind szakmailag nagyban segítettek, valamint **Prof. Dr. Hans-Peter Zenner** intézetvezető úrnak, hogy mindezt engedélyezte.

Köszönöm **Prof. Dr. Nikolaus Blin** intézetvezető úrnak (Tübingeni Egyetem, Humán Genetika Intézet), hogy laboratóriumában dolgozhattam, munkámat figyelemmel kísérte és azt hasznos tanácsaival, ötleteivel segítette. Külön köszönettel tartozom az intézetében dolgozó munkatársaknak: **Ulrike Zeißlernek**, aki megtanított a molekuláris genetikai alapjaira és **Hakan Esmernek**, aki a génszekvenálás rejtélyeibe vezetett.

Köszönöm **Prof. Dr. Lampé Istvánnak**, a DE Fül-Orr-Gégeklinika, Audiológia Állomás vezetőjének, hogy tudományos tapasztalatait velem megosztva az audiológia problémás kérdéseit vele megbeszélhettem. Köszönet illeti és hálával tartozom az Audiológia Állomás dolgozóinak **Nagyné Nagy Katalin** vezetésével, akik mindig segítségemre voltak mind szakmailag mind lelkiileg a munkám során. Az ő segítségük révén tudtam a betegekkel a kapcsolatot tartani.

Köszönetemet fejezem ki **Prof. Dr. Muszbek László** intézetvezető úrnak (Debreceni Egyetem Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet), hogy intézetében megvalósíthattam a külföldön tanult módszerek alkalmazását és ezáltal egy országos nagyothallás genetikai labor működhet. Köszönöm **Dr. Fazakas Ferenc** tudományos munkatársnak a téma hazai kidolgozásához nyújtott kiemelkedő segítségét és áthidaló ötleteit, valamint **Pénzes Krisztinának** segítőkészségét és a gyors, precíz labormunkáját.

Köszönetet mondok a Debreceni Széchenyi utcai Általános Iskola, Óvoda, Diákotthon, Hallássérültek Korai Fejlesztő és Integrációt Segítő Központnak, **Pásku Tibor** igazgató úr vezetésével, hogy biztosította a nagyothalló családokkal való találkozásomat, valamint **Harasztosi Erzsébet** igazgató helyettesnek az állandó jeltolmácsolásért, és a lendületes, eredményes szervezésért.

Köszönöm **Rónai István** ügyvezető igazgatónak (MEDIROLL Orvostechnikai Kft, Debrecen), hogy tanulmányomhoz hordozható szűrő audiométer készüléket állandóan biztosított.

Végezetül köszönöm férjem megértését és szeretetteljes támogatását. Nehéz, hogy édesapámnak már nem köszönhetem meg...

10. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- 1./ **Tóth T**, Kupka S, Sziklai I, Zenner HP, Blin N, Pfister M: Frequency of the recessive 30 delG mutation in the *GJB2* gene in Northeast-Hungarian individuals and patients with hearing impairment. *International Journal of Molecular Medicine* 2001 Aug; 8: 189-192. [IF: 1,689]
- 2./ **Tóth T**, Pfister M, Sziklai I: A Connexin 26 protein mutációja következtében kialakuló nem szindrómás nagyothallás. *Fül-orr-gégegyógyászat* 2001,47:18-24.
- 3./ Kupka S*, **Tóth T***, Wrobel M*, Szyfter W, Szyfter K, Niedzielska G, Bal J, Zenner HP, Sziklai I, Blin N and Pfister M: Mutation A1555G in the 12S rRNA gene and its epidermiological importance in German, Hungarian and Polish patients. *Human Mutation* 2002 Mar; 19(3): 308-9. [IF: 6,134]
- 4./ Riemann R, **Tóth T**, Kupka S: Autosomal rezessiv vererbte Schwerhörigkeiten (Genetik der HNO-Krankheiten). *Medizinische Genetik* 2002, 14(1):39-45.
- 5./ Cryns K, Pfister M, Pennings R, Bom S, Flothmann K, Schatteman I, **Tóth T**, Köln K, Kupka S, Blin N, Nürnberg N, Thiele H, Reardon W, Stephens D, Cremers C, Smith R and Van Camp G: Mutations in the *WFS1* gene that cause low-frequency sensorineural hearing loss are small non-inactivating mutations. *Human Genetics* 2002, 110: 389-394. [IF: 3,209]
- 6./ **Tóth T**, Kupka S, Blin N, Pfister M és Sziklai I: Connexin26 / 35delG mutáció gyakorisága és jellemző fenotípusa Magyarország északkeleti régiójában vizsgált hallássérült és kontroll esetekben. *Orvosi Hetilap* 2002, 143 (40): 2285-2289.
- 7./ Pfister M, **Tóth T**, Thiele H, Haack B, Blin N, Zenner HP, Sziklai I, Nürnberg P and Kupka S: A 4bp-insertion in the *eya*-homologous region (*eyaHR*) of *EYA4* causes hearing impairment in a Hungarian family linked to DFNA10. *Molecular Medicine* 2002, 8 (10): 607-611. [IF: 3,234]
- 8./ **Tóth T**, Kupka S, Nürnberg P, Thiele H, Zenner HP, Sziklai I und Pfister M: Phänotypische Charakterisierung einer ungarischen DFNA6 Familie mit Tieftonschwerhörigkeit. *HNO* 2003, (közlésre elfogadva) [IF: 0,62]
- 9./ **Tóth T**, Kupka S, Sziklai I, Blin N, Zenner HP, Pfister M: Phänotypische Charakterisierung ungarischer Patienten mit homozygoter 35delG-Mutation im *Connexin 26*-Gen. *HNO* 2003, (közlésre elfogadva) [IF: 0,62]
- 10./ **Tóth T**, Pfister M, Fazakas F, Blin N, Zenner HP, Muszbek L, Kupka S, Sziklai I: High frequency of *GJB2* mutations in the Hungarian population. *European Journal of Human Genetics* (közlésre benyújtva)

* These authors contributed equally to this work.

11. FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	2.
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5.
2.1. Szindrómás nagyothallás	7.
2.2. Nem szindrómás nagyothallás	7.
2.2.1. Autoszómális domináns nem szindrómás nagyothallás	9.
2.2.2. Autoszómális recesszív nem szindrómás nagyothallás	9.
2.2.3. X kromoszómához kötött nem szindrómás nagyothallás	18.
2.3. Mitokondriális genom mutációi okozta nagyothallás	19.
2.4. Hallásért felelős gének és fehérjék funkcionális osztályozása	22.
2.4.1. Ionáramlásért felelős csatornafehérjéket kódoló gének	22.
2.4.2. Transzkripció faktorokat kódoló gének	23.
2.4.3. Strukturális fehérjéket kódoló gének	25.
2.4.4. Motoros fehérjéket kódoló gének	26.
2.4.5. Egyéb proteinek kódoló gének	27.
3. BETEGANYAG ÉS MÓDSZER	28.
3.1. Beteganyag	28.
3.1.1. <i>GJB2</i> , <i>12S rRNS</i>	28.
3.1.2. Ismeretlen lokusz és génidentifikálás	28.
3.2. Fül-orr-gégészeti vizsgálat	31.
3.3. Genetikai analízis	32.
3.3.1. DNS izolálás	32.
3.3.2. <i>GJB2</i> gén mutáció analízis	32.
3.3.3. <i>12S rRNS</i> / A1555G mutáció analízis	35.
3.3.4. Ismeretlen lokusz és génidentifikálás	37.
4. EREDMÉNYEK	38.
4.1. DFNB1 lokusz / <i>GJB2</i> gén mutációi okozta nagyothallás	38.
4.1.1. <i>GJB2</i> gén / 35delG mutáció okozta nagyothallás	38.
4.1.2. 35delG homozigóta genotípushoz társuló fenotípus	40.
4.1.2.1. Halláskárosodás mértéke	40.
4.1.2.2. Progresszió	40.
4.1.2.3. Görbe típusa	42.
4.1.2.4. Szimmetrikus nagyothallás	42.
4.1.2.5. Testvérpár analízis	43.
4.1.3. <i>GJB2</i> gén / 35delG heterozigóta genotípushoz társuló egyéb genetikai eltérések okozta nagyothallás	48.

4.1.3.1. <i>S19T / 35delG</i>	50.
4.1.3.1. <i>31del14 / 35delG</i>	51.
4.1.3.2. <i>W24X / 35delG</i>	52.
4.1.3.3. <i>R32C / 35delG</i>	54.
4.1.3.4. <i>V37I / 35delG</i>	55.
4.1.3.5. <i>E42D / 35delG</i>	56.
4.1.3.6. <i>E47X / 35delG</i>	57.
4.1.3.7. <i>G59V / 35delG</i>	58.
4.1.3.8. <i>167delT / 35delG</i>	59.
4.1.3.9. <i>235delC / 35delG</i>	60.
4.1.3.10. <i>L90P / 35delG</i>	62.
4.1.3.11. <i>313del14 / 35delG</i>	63.
4.1.3.12. <i>A149T / 36delG</i>	65.
4.1.3.13. <i>K223R / 35delG</i>	66.
4.1.4. GJB2 gén / egyéb genetikai eltérések okozta nagyothallás	67.
4.1.4.1. <i>M34T / A149T, K223R</i>	67.
4.1.4.2. <i>E129K / -</i>	68.
4.1.4.3. <i>R127H</i>	69.
4.1.5. GJB2 gén érintett családok analízise	71.
4.1.5.1. „3. család”	71.
4.1.5.2. „6. család”	73.
4.1.5.3. „7. család”	75.
4.1.5.4. „10. család”	77.
4.1.5.5. „14. család”	79.
4.1.5.6. „17. család”	80.
4.1.5.7. „23. család”	81.
4.1.5.8. „33. család”	82.
 4.2. 12S rRNS / A1555G	 84.
 4.3. Ismeretlen lokusz és génidentifikálás	 85.
4.3.1. DFNA6/14 lokusz, <i>WFS1</i> gén (Wolframin)	85.
4.3.1.1. <i>Anamnézis</i>	85.
4.3.1.2. <i>Halláslelet</i>	85.
4.3.1.3. <i>Vesztibuláris és radiológiai leletek</i>	87.
4.3.1.4. <i>Kapcsoltság analízis</i>	87.
4.3.2. DFNA10 lokusz, <i>EYA4</i> gén	88.
4.3.2.1. <i>Anamnézis</i>	88.
4.3.2.2. <i>Halláslelet</i>	88.
4.3.2.3. <i>Vesztibuláris és radiológiai lelet</i>	88.
4.3.2.4. <i>Kapcsoltság analízis</i>	90.
 5. MEGBESZÉLÉS	
5.1. DFNB1, GJB2 gén (Connexin 26)	91.
5.1.1. 35delG mutáció	91.
5.1.2. GJB2 gén egyéb mutációi	94.
5.1.3. Genetikai tanácsadás	96.

5.2. A1555G mutációanalízis a <i>12S rRNS</i> génben	99.
5.3. DFNA6/14, WFS1 gén (Wolframin)	101.
5.4. DFNA10, EYA4 gén (EYA4)	103.
5.5. Génterápia	105.
 6. ÖSSZEFOGLALÁS	
6.1. Összefoglalás	108.
6.2. Summary	109.
 7. IRODALOMJEGYZÉK	110.
 8. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	117.
 9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	119.
 10. PUBLIKÁCIÓS LISTA	120.
11. FÜGGELÉK	121.
(Az értekezés alapjául szolgáló közlemények)	