

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A GENETIKAI EREDETŰ NEM SZINDRÓMÁS
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. A gyermekkorban fellépő nagyfokú nagyothallás prevalenciája kb. 1/1000. A percepciós 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 nagyothallás molekuláris genetikájának hiányos ismerete miatt.

Feltehetően közel 200 gén felelős a hallásért, melyből 1996-ban még csak egy volt ismert. Jelenleg több mint 70 lokuszt és 30 gént ismerünk. Az öröklődő nagyothallás klinikai felosztása történhet a társuló egyéb tünetek alapján is. A szindrómás nagyothallás az örökletes esetek kb. 30%-ért felelős, míg az esetek többsége (kb. 70%) egyéb tünetekkel 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. Az esetek kevesebb, mint 1%-ban a mitokondriális DNS által kódolt öröklésmenetről van szó, amely szintén halláscsökkenést okozhat. A különböző öröklésmenet legtöbbször eltérő klinikai megjelenéssel társul, bár sokszor azonos tünethez eltérő genetikai hiba tartozik. 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).

DFNB1 / *GJB2* / Connexin 26

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. A *GJB2* gén egy Connexin 26 (Cx26) nevű fehérjét kódol, ami a gap junction proteinek családjába tartozik. 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. Az említett protein többféle sejtben expresszálódik, mint pl.: neuron, glia, szívizom, simaizom, máj ill. a cochlea bizonyos sejtjei. A Connexin 26 összesen 9 domainből áll (4 transzmembrán, 2 extracelluláris és 3 citoplazmatikus). A fehérje szerkezeti stabilitását a domainek közti disszulfid hidak biztosítják. Az emlős cochleában végzett immunhisztokémiai vizsgálatok két, Connexin 26 molekulákból álló gap junction hálózatot igazolt a cochleában, amin keresztül a káliumion recirkulációja történik. Az egyik az epithelialis gap junction rendszer, amely összeköttetést biztosít az összes támasztósejt, Claudius-sejt, bazális sejt és interdentalis sejt 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 alkotnak. A *GJB2* a kis gének csoportjába tartozik. Az általa kódolt Connexin 26 protein 226 aminosavból áll. Európában a leggyakoribb genetikai hibája a 35delG mutáció, amely a recesszíven öröklődő nagyothalló esetek több mint 50%-ért felelős. A 35delG mutáció során egy nukleotid deléciója miatt kereteltolódás (frameshift) jön létre az N-terminális első intracelluláris domainben (IC1). 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 zavart okozva a Corti-szerven belüli káliumion recirkulációban. A mutáció okozta nagyothallás klinikai képére a prelingualis kezdet és a súlyos fokú percepció jelleg jellemző, bár a hallásvesztés mértéke sokszor igen variábilis. Ma már több mint 70 autoszómális recesszív és 6 autoszómális domináns öröklésmenetet mutató különböző genetikai eltérés ismert a *GJB2* génben.

12S rRNS / A1555G

Az örökletes nagyothallás kevesebb, mint 1%-ért a mitokondrium genomjának genetikai hibája a felelős. A mitokondrium saját duplaszálú cirkuláris DNS-sel rendelkezik („25. kromoszóma”), 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. 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. A mitokondriális genomban az első, nem szindrómás nagyothallásért felelős mutáció (A1555G) identifikálása a *12S rRNS* génben volt, melynek gyakorisága igen változó Európában. Azóta több nem szindrómás és szindrómás betegséget írtak már le maternális öröklődéssel. Az említett mutáció a 12S rRNS molekula konzervatív régiójában található. 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.

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) a *GJB2* és a *12S rRNS* génekben történt nem szindrómás nagyothallásért felelős mutációk előfordulási gyakoriságát.

Továbbá célunk volt olyan több generációs, halmozottan előforduló nagyothalló családok gyűjtése, ahol a fent említett genetikai eltérések nem voltak kimutathatók, de monogénes defektust feltételezve lokusz és génidentifikálás történhetett kapcsoltság analízissel.

Vizsgálati adatainkkal az említett génhibák gyakoriságát akartuk megállapítani Magyarország északkeleti régiójának lakosságában. Az eddigi genetikai ismereteink abban segítenek, 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. BETEGANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. *GJB2, 12S rRNS*

Beteganyag. 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. A másik nagy csoportot a sporadikus esetek alkották (92 család), amibe a normál hallású szülők veleszületetten hallássérült gyermekei tartoztak. A kontroll csoport 500 teljes hallású, random módon kiválasztott személyből áll. Utóbbi esetben az említett génekben a mutációk (35delG, A1555G) 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.

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. Ha a gyermek a hagyományos szubjektív vizsgálómódszerekkel 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.

Genetikai analízis – Connexin 26. A betegektől 4,5 ml nátrium-citráttal alvadástgátolt vért vettünk a beleegyező nyilatkozatok aláírása után, és a gyártó előírásának megfelelően (PUREGENE Kit, GENTRA System, Minneapolis USA) a leukocitákból DNS-t izoláltunk. A kapott DNS mintákat koncentráció meghatározás céljából 1%-os agaróz gélelektroforézissel megfuttattuk, majd ethidium-bromiddal megfestettük. A DNS minták szűrése 35delG mutációra speciális primerekkel történő PCR reakció (polimeráz

láncreakció) után *BsiYI* enzimemésztéssel történt (Primer 1: GGTGAGGTTGTGTAAGAGTTGG, Primer 2: CTGGTGGAGTGTTTGTTCAC). 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 produktumot 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.

A 35delG heterozigóta és vad genotípusú nagyothalló esetekben a szekvenálások ABI PrismTM 377 fluoreszcens DNS szekvenálóval történtek, (Primer 1F: AGACTCAGAGAAGTCTCCCTG, Primer 2F: CCAGGCTGCAAGAACGTGTGC, Primer 3R: CTCATGTCTCCGGTAGGCCAC, Primer 4F: GCAGCATCTTCTTCCGGGT, Primer 5R: GGGCAATGCGTTAACTGGC). Így az eredeti DNS fragmentum teljes nukleotid sorrendjét lefedve kimutathatóvá vált a *GJB2* génben lévő nukleotid eltérések (*Accession NM_004004*).

Genetikai analízis – 12S rRNS. 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-ét szűrtük le az adott genetikai hibára. A 12S rRNS A1555G mutáció analízisénél a PCR reakcióhoz az alábbi primereket alkalmazva egy 248 bp-i nagyságú terméket amplifikáltunk (Primer 1: AGAAATGGGCTACATTTTCTACCC, Primer 2: GTTCGTCCAAGTGCACCTTCCA). A 248 bp-i PCR termék vad típus esetében *BsmAI* enzimemésztés után két fragmentumra hasítódik (192 bp és 56 bp). A mutáció jelenléte esetén az enzim hasító helyét nem ismeri fel és csak egy fragmentum látható (248 bp) (*Accession NC_001807*).

2.2. ISMERETLEN LOKUSZ ÉS GÉNIDENTIFIKÁLÁS

Beteganyag. Tanulmányunkba két olyan nagyobb család került bele, 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 kapcsoltág analízissel (linkage analysis). A családtagok (27. család; 30. család) főként Magyarország ÉK-i régiójában élnek. A 27. családból 32 fő (17 férfi és 15 nő), míg a 30. családból 22 fő (11 férfi, 11 nő) vett részt tanulmányunkban. 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.

Hallásvizsgálat. Az audiológiai vizsgálatok a Debreceni Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika audiológiai állomásának hangszigetelt helységében történtek. Küszöbaudiometria vizsgálattal hallásküszöb meghatározás történt - légvezetés 125-8000 Hz, csontvezetés 250-4000 Hz frekvenciákon -, melyet minden esetben tympanometria követett. BERA (Brainstem Evoked Response Audiometry) vizsgálatot családonként két-két nagyothalló esetében végeztünk.

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.

Egyéb vizsgálatok. Mindkét családból 3-3 nagyothalló személynél képalkotó eljárásos vizsgálat történt az esetlegesen felmerülő koponyán belüli csontdeformitás ill. neurológiai eltérés kizárása céljából.

Kapcsoltág analízis. Két többgenerációs, posztlingualis kezdetű nagyothalló család tagjaitól a beleegyező nyilatkozat aláírása után személyenként 15 ml nátrium-citráttal kevert alvadásgátolt vért vettünk, és a gyári előírásoknak megfelelően (PUREGENE Kit, GENTRA System, Minneapolis USA) a leukocitákból DNS-t izoláltunk. A nagyothallásért felelős lokuszok kromoszómális lokalizációjához kapcsoltág analízist végeztünk. (A 27. család analízise kapcsoltágot 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 (Wayne, 2001). 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.

3. EREDMÉNYEK

3.1. DFNB1 – *GJB2* – CONNEXIN 26

Genetikai analízis. 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.

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 deléción 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 teljes hallású személyből állt, a 35delG mutáció 24 esetben volt detektálható (4,8%).

A 35delG mutáción kívül összesen 17 egyéb genetikai hibát identifikáltunk betegeink *GJB2* gén kódoló exonjában. 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.

Öt sporadikus és egy vérrokon roma család esetében R127H mutációt detektáltunk, vagyis az 578. nukleotid csere eredményeként a bázikus arginin (R) (CGC) helyett bázikus hisztidin (H) (CAC) épül be a 2. intracelluláris domain 127. kodonjába. A sporadikus esetek mindegyikének genotípusa R127H / - volt, azaz a második allél kódoló exonjában nem volt kimutatható genetikai eltérés. Mindegyik sporadikus eredetű nagyothalló 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.

A 2001-ben már leírt E129K mutáció szerepe még nem tisztázott. 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. Az E129K heterozigóta, súlyos fokú nagyothalló anya és lánya esetében a *GJB2* gén kódoló exonján belül nem volt detektálható ehhez társuló egyéb mutáció.

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

Két esetben új genetikai eltérést tudtunk analizálni (E42D; G59V). Az E42D szubsztitúció a 126-s nukleotidnál történt G→C csere következménye, amikor 42. aminosavként glutaminsav (E) helyett aszparaginsav (D) épül be a fehérjelánc extracelluláris 1-es domainjébe. Ezt a mutációt egy 35delG heterozigóta esetben sikerült azonosítani, mely fenotípusát tekintve prelingualis eredetű, percepciós típusú, közepes fokú nagyothallással járt. A G59V mutáció egy guanin → timin transzverziót jelöl az 59-es kodonban, melynek következtében glicin (G) → valin (V) aminosavcsere történik. Egy familiáris nagyothalló beteg genotípusában a G59V mutáns allél 35delG mutációval társult, míg nagyothalló édesapja esetében nem volt kimutatható egyéb mutáció a *GJB2* gén kódoló exonjában.

Kiemelendő a W24X nonszensz mutáció gyakorisága beteganyagunkban, amely 4 familiáris nem vérrokon betegnél (4,76%) és 6 sporadikus esetben (6,5%) volt azonosítható,

így a második leggyakoribb eltérésként jellemezhető a nagyothalló betegek *GJB2* génjében. A kontroll személyeket megvizsgálva 6 fő hordozta a W24X mutációt (2,8%).

35delG homozigóta genotípushoz társuló fenotípus. A fenotípus analízis vizsgálatot 35delG mutációra homozigóta 71 nagyothalló esetben évekre visszamenőleg az audiogramok feldolgozásával végeztünk. A legfiatalabb esetünk 2 éves, a legidősebb 74 éves, az átlag életkor a vizsgálatkor 24,6 év. 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 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, ebből 2 esetben a hallásromlás nagyobb volt, mint 30 dB. 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. Aszimmetrikus nagyothallás (két oldal között legalább 3 frekvencián a hallásküszöb >15 dB) 13 főnél (18,3%) volt regisztrálható. A nemek között szignifikáns eltérés semelyik szempont esetében sem volt kimutatható. A 71 homozigóta beteg közül 8 testvérpárt (16 fő) hasonlítottunk össze a fent említett szempontok alapján. A nagyothallás mértéke a 8 pár közül 5 esetben különböző volt. Három, a mutáció genotípusát tekintve azonos testvérpárnál eltérő a progresszió, a görbe lefutása és a kétoldali szimmetria.

A tympanometria eredménye mindegyik esetben A-típusú görbét mutatott. Az elvégzett egyensúlyszervi vizsgálatok a vesztibuláris funkcióban eltérést nem jeleztek.

3.2. 12S rRNS – A1555G

Ebben a vizsgálatban olyan ismeretlen eredetű, pre- vagy posztlingualisan kezdődő percepcióos nagyothalló betegek vettek részt (72 fő), akikben nem igazolódott a *GJB2* gén egyik allélján sem mutáció. 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 esetszámra lenne szükséges.

3.3. DFNA6/14 – *WFS1*

A 27. család általunk vizsgált 32 tagjából 14 esetben lehetett *WFS1* (*Wolfram szindróma 1*) génben mutációt kimutatni. A négy generáció 14 nagyothalló személye már a vizsgálat előtt klinikánkon dokumentálva volt. Az érintettek nemi megoszlása 5 férfi / 9 nő (1:1,8). 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.

Halláslelet. A 14 nagyothalló családtag anamnézisében nem volt kimutatható külső környezeti faktoroknak vagy egyéb betegségeknek befolyásoló szerepe. Aszimmetrikus nagyothallás (két oldal között legalább 3 frekvencián a hallásküszöb >15 dB) két páciens görbéjén volt megfigyelhető. A halláslelet a legtöbb esetben 125-1000 Hz frekvenciákat érintő (mélyfrekvenciák), emelkedő görbéjű percepciós típusú nagyothallást mutatott a 30-70 dB-s hallástartományban. A 20 évnél fiatalabb érintett családtagoknál a halláskárosodás kismértékű volt, míg az idősebb személyeknél mértéke a korral emelkedve nőtt. Az évek során a magasabb frekvenciartomány 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.

Vesztibuláris és radiológiai lelet. Négy érintett családtagnál történt vestibuláris és koponya CT vizsgálat. Otoneurológiai vizsgálat egyik esetben sem mutatott centrális, perifériás vagy vestibulocochlearis jellegű megbetegedést. A nagy felbontású CT vizsgálat eredménye minden személynél normális külső, középső és belsőfül anatómiát mutatott, s nem volt kimutatható malformáció a sziklacsontban sem.

Kapcsoltság analízis. A családfaanalízis az autoszómális domináns öröklésmenetet támasztotta alá. A kapcsoltság analízis (linkage analysis) során kiderült, hogy a DFNA6/14

lokusz (4p16.1 kromoszóma) öröklődése szoros kapcsoltságot mutatott (LOD score: 3,42) a nagyothalló fenotípussal. 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 elvégeztük. 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 egyik nagyothalló páciensnél egy további misszensz mutáció volt identifikálható (R818C), amely a család két egészséges tagjának *WFS1* génjében is kimutatható volt.

3.4. DFNA10 – *EYA4*

A 30. család megvizsgált 22 tagja közül 11 esetben volt kimutatható ismeretlen eredetű nem szindrómás, percepciós típusú nagyothallás. Az érintettek nemi megoszlása 5 férfi / 6 nő (1:1,2). 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.

Halláslelet. A 22 fős család 11 tagjánál (5 férfi, 6 nő) elvégzett hallásvizsgálat különböző fokú percepciós nagyothallást mutatott. 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). A progresszióanalízis alapján 20-40 év között átlag 15 dB / 10 év a progresszió mértéke, míg 40-60 év között 10 dB / 10 év. A legidősebb nagyothalló páciens (68 év) hallása egyik frekvencián sem érte el a 95 dB. A tympanometria minden esetben A-típusú görbét mutatott.

Vesztibuláris és radiológiai lelet. A családból négy nagyothalló személynél történt otoneurológiai vizsgálat. A vizsgálat nem igazolta a vestibuláris rendszer érintettségét. Piramis CT eredménye mindegyik esetben kizárta a belsőfül deformitást, valamint a sziklacsont malformációt.

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. 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. Ez a mutáció az eddig leírt harmadik genetikai eltérés az *EYA4* génben.

4. 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. Ahhoz, hogy az érintett családoknak genetikai tanácsadás működhessen, 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.

4.1. *DFNB1 – GJB2- Connexin 26*

A Connexin 26 a gap junction membránfehérjék családjának tagja, amely a sejtek közötti elektromos és metabolikus kommunikációt biztosítja. A *GJB2* génben történt mutációk az egyik leggyakoribb okai a nem szindrómás, prelingualis eredetű, percepció típusú nagyothallásnak az északkelet-magyarországi nagyothalló populációban. A tanulmány során célunk volt a *GJB2* génben a 35delG mutáció gyakoriságát az ÉK-magyarországi lakosságban megvizsgálni 84 familiárisan, 92 sporadikusan öröklődő percepció típusú, prelingualis eredetű nagyothalló ill. 500 normál kontroll esetében.

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. 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. Ahhoz, hogy a magyar populációra jellemző pontosabb epidemiológiai adatokkal szolgálhassunk kiterjedtebb, nagyobb esetszámú vizsgálatokra van szükség.

Megegyezve más 35delG homozigóta betegek fenotípusáról szóló tanulmányokkal a mi beteganyagunkban sem volt kimutatható kisfokú nagyothalló. 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 (>70dB). A homozigóta betegeink hallásgörbéi ereszkedő (52,1%) vagy lapos (47,9%) típusúak voltak. Más minta nem volt megfigyelhető, megegyezve a szakirodalommal. Általánosságban összefoglalva a 35delG homozigóta beteg legjellemzőbb tulajdonsága a prelingualis eredetű, nagyfokú, percepciós 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. 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 másikonál 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. 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.

Ma már több mint 80 különböző genetikai eltérés ismert a *GJB2* génben, mely legtöbbször autoszómális recesszív öröklésmenetet mutat, de előfordul domináns formája

is. 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. Igaz, a mutáció már 1997 óta ismert, de eddig nem írták le halmazódását egy adott populáción belül. A többi genetikai eltérés csak néhány nagyothalló esetben volt kimutatható, de legtöbbször 35delG mutációval társult. A különböző mutációkhoz társuló fenotípusok képe szintén színes. Talán a 35delG / L90P genotípust hordozó esetben találtunk két gyermeknél 60 dB-nél jobb hallást, de az egyetlen azonos genotípusú felnőtt esetében a NH már súlyos fokú volt. Általánosságban megállapítható, hogy az esetek nagyobb részében, ha a *GJB2* gén mindkét allélja érintett, akkor a nagyothallás mértéke csak ritkán közepes fokú vagy jobb.

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 nagyothallásoknak 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 hallássérültek iskolájában végzett felméréseink 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). Így már pár hónapos korban konkrét diagnózisunk van, s elkezdhető a rehabilitáció a korai hallókészülék ellátással, ill. az időben történő cochlearis implantatum beültetésével. Ezáltal

nagyobb esélyük van a gyermekeknek a tökéletesebb beszédtanuláshoz, a jobb mentális fejlődéshez ill. a halló világba történő beépüléshez.

4.2. *12S rRNS – A1555G*

Az A1555G volt az első mitokondriális genomban identifikált mutáció, amit a nagyothallással hoztak kapcsolatba. 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. A mutációról szóló európai adatok igen változatosak. Különösen a spanyol népesség nem szindrómás esetei közt fordul elő nagyobb gyakorisággal a mutációhoz társuló szimmetrikus, progresszív, főleg a magas frekvenciákat érintő perceptoros nagyothallás, 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. 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.

4.3. DFNA6/14 – WFS1

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. 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.

A gén 8 exonból áll, melyből az első nem kódol. A Wolframin protein 890 aminosavból felépülő, kilenc helikális szegmenetet tartalmazó endoglikozidáz-H szenzitív transzmembrán fehérje az endoplazmatikus retikulumban. 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. Az R818C és T699M mutációt hordozó 39 éves nagyothalló nőbetegnél 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. 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. 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.

4.4. DFNA10 – EYA4

A 30. család nagyothalló tagjainak genomjában kapcsoltság volt kimutatható a 6q23 régióhoz (DFNA10). Először 2001-ben identifikálták az ehhez a lokuszhoz kapcsolódó *EYA4* gént („*Eyes Absent 4*”). 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 idő előtti stop kodonhoz vezet. Eredménye az *eyaHR* (*eya*-homológ régió) régiónak a csaknem teljes deléciója az *EYA4* fehérjében. Eredményeinkre hivatkozva feltételezzük, hogy az *eyaHR* régió belső fül specifikus funkcionális szubrégiót 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, s átlagban 15dB / 10 év, később 10dB / 10 év progresszióval nagyfokú nagyothalláshoz vezetett. A vesztibuláris rendszer érintetlen volt.

A fül fejlődésében, ill. *Drosophilak* szemfejlődésben betöltött funkciója mellett az *EYA* gén család tagjairól nemrég kimutatták, hogy szerepük van a pro-apoptotikus szignálban is, és a kórosan expresszált vagy csökkent számban jelenlévő *EYA* téves apoptózist indukál. Úgy tűnik, hogy az *EYA* képes beindítani a „caspase”-dependens és „caspase”-independens útvonalat is. Így az *EYA4* fehérje apoptotikus funkciójának szerepe kell hogy legyen a hallásban is, és így az *EYA4* génben történt genetikai hiba nem csak a hibás fülfejlődéssel, hanem az apoptózisban okozott zavarral is nagyothalláshoz vezethet.

Az értekezés az eddigi alap kutatásokra hivatkozva az öröklődő nagyothallás jövőbeni molekuláris genetikai aspektusait mutatja be. 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 tisztázáshoz 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 identifíkálassuk a különböző genetikai eredetű nagyothallókat.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenek előtt köszönöm **Prof. Dr. Sziklai István** egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, hogy lehetővé tette számomra intézetében 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 genetika technikai 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 lelkileg, és szeretetükkel a mélypontokon átlendítettek. Valamint azért is, mert az ő segítségükkel tudtam a betegekkel a kapcsolatot felvenni és fenntartani.

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** laborvezetőnek a téma hazai kidolgozásához nyújtott kiemelkedő segítségét és áthidaló ötleteit, valamint **Pénzes Krisztinának** a segítőkészségét és a precíz, gyors, megbízható 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 találkozását, 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 biztosított.

Végezetül köszönöm férjem türelmét, megértését és szeretetteljes támogatását.

6. 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**, Bal J, Sziklai I, Blin N and Pfister M: Mutation A1555G in the 12S rRNA gene and its epidemiological 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, 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]
- 9./ **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]
- 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.

Az értekezés témájával kapcsolatos előadások és poszterek jegyzéke:

- 1) *Sziklai István, Tóth Tímea*: Genetikai eredetű nagyothallások. A Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesülete, Észak Magyarországi tagozatának alakuló ülése, Debrecen, 1999. December 03. (előadás)
- 2) *S Kupka, T Tóth, N Blin, I Sziklai, M Pfister*: Mutation analysis of the Cx26 gene in patients with moderate to profound hearing impairment. 10th International Congress of Human Genetics, Vienna, Austria, 2001. May 13-16. (poster)
- 3) *Tóth Tímea, Sziklai István*: A Connexin 26 protein 30delG mutációja következtében kialakuló nagyothallás. A Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesülete Audiológiai Szekciójának Vándorgyűlése, Pécs, 2001. szeptember 6-8. (előadás)
- 4) *S Kupka, T Tóth, N Blin, I Sziklai, M Pfister*: Mutation analysis of the Cx26 gene in patients with moderate to profound hearing impairment. 51st Annual meeting, American Society of Human Genetics, San Diego, USA, 2001, Oktober. (poster)
- 5) *Tóth Tímea*: A nagyothallás szűrése molekuláris biológiai módszerekkel. DE OEC Tudományos Ülés, Debrecen, 2001. december 11. (előadás)
- 6) *Tóth Tímea*: Hallás genetikai szűrés a gyakorlatban. Tudományos hétvége az audiológia jegyében, Workshop, Seregélyes, 2002. március 8-9. (előadás)
- 7) *Tóth Tímea*: Belső fül genetikai eredetű megbetegedése. Válogatott fejezetek a fül-orr-gégegyógyászatból, Kerekasztal Konferencia, Budapest, 2002. március 21. (előadás)
- 8) *Tímea Tóth, István Sziklai*: The phenotypic manifestation and frequency of the recessive 30delG mutation in the *GJB2* gene in Northeast-Hungarian individuals and patients with hearing impairment. Medical Aspects of Mental Handicap, 3RD International Conference, Debrecen, Hungary, June 6-8, 2002. (előadás)
- 9) *Kupka S, Tóth T, Wróbel M, Szyfter W, Zenner HP, Sziklai I, Blin N and Pfister M*: Mutation A1555G in the *12S rRNA* gene and its epidemiological importance in German, Hungarian and Polish patients. European Human Genetics Conference, Strasbourg (France), 25-28 May, 2002. (poster)
- 10) *Haack B, Tóth T, Wróbel M, Sziklai I, Szyfter W, Zenner HP, Blin N, Pfister M, Kupka S*: Mutations in the *connexin 26* gene in German, Hungarian and Polish patients with hearing impairment. European Human Genetics Conference, Strasbourg (France), 25-28 May, 2002. (poster)
- 11) *T Tóth, S Kupka, N Blin, M Pfister and I Sziklai*: Hearing impairment related *GJB2* mutations in the Hungarian population. 39th meeting of the Inner Ear Biology Society, Liege, Belgium, September 8-10, 2002. (poster)

- 12) **Tóth Tímea:** A connexin 26 (*GJB2*) gén genetikai hibái miatt kialakuló nagyothallások. Magyar Fül-Orr-Gégeorvosok Egyesülete Északkelet-Magyarországi tagozatának ülése, Debrecen, 2002. december 6. (előadás)
- 13) **Tóth T, Kupka S, Cryns K, Van Camp G, Zenner HP, Blin N, Pfister M and Sziklai I:** Phenotypic characterization of a DFNA6 Hungarian family showing low-frequency sensorineural hearing impairment ARO MidWinter Meeting, Daytona Beach, Florida, (USA) 23-27. February, 2003. (poster)
- 14) **Tóth Tímea:** A Connexin 26 fehérjében történt genetikai hibák okozta veleszületett nagyothallás. Tudományos hétvége az audiológia jegyében, Workshop, Seregélyes, 2003. március 7-8. (előadás)