

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAMARA ROPOŠA

**ANALIZA SPREMEMB V GENU *TMPRSS3*, KI NOSI ZAPIS
ZA TRANSMEMBRANSKO SERINSKO PROTEAZO 3, PRI
BOLNIKI Z IZGUBO SLUHA**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAMARA ROPOŠA

**ANALIZA SPREMEMB V GENU *TMPRSS3*, KI NOSI ZAPIS
ZA TRANSMEMBRANSKO SERINSKO PROTEAZO 3, PRI
BOLNIKIHZ IZGUBO SLUHA**

**ANALYSIS OF *TMPRSS3* GENE ENCODING A
TRANSMEMBRANE SERINE PROTEASE 3 IN PATIENTS
WITH HEARING LOSS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Pediatrični kliniki UKC Ljubljana, Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko, pod mentorstvom izr. prof. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, spec. med. biokem., spec. lab. med. genet., in somentorstvom izr. prof. Sabe Battelino, dr. med.

ZAHVALE

Največja zahvala gre mentorici izr. prof. dr. Katarini Trebušak Podkrajšek za strokovno pomoč pri eksperimentalnem delu in pisanju, koristne napotke, potrpežljivost ter porabljen čas ob nastajanju končnega izdelka. Prav tako bi se rada zahvalila somentorici izr. prof. Sabi Battelino za strokovno podporo pri izvedbi magistrske naloge.

Kolektivu laboratorija Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko ter še posebej gospe Jurki se zahvaljujem za vso pomoč in nasvete pri delu.

Najlepša hvala moji družini, ki mi je študij omogočila, me podpirala in spodbujala.

Nazadnje pa se zahvaljujem Simoni, za vso pomoč in krajšanje časa med eksperimentalnim delom, in Kaji, zaradi tebe je bil študij zabavnejši.

Izjava: Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Katarine Trebušak Podkrajšek, spec. med. biokem., spec. lab. med. genet in somentorstvom izr. prof. Sabe Battelino, dr. med.

Tamara Ropoša

KAZALO

UVOD	1
FIZIOLOGIJA SLUHA	1
Prevajanje zvoka v živčni dražljaj	4
SENZORINEVRALNA IZGUBA SLUHA	5
Nesindromska izguba sluha	6
Proteini, vpleteni v nastanek nesindromske gluhosti	7
GEN <i>TMPRSS3</i>	8
Genetske okvare v genu <i>TMPRSS3</i>	10
Znane bolezenske spremembe v genu <i>TMPRSS3</i>	11
GENETSKI VZROKI V SLOVENSKI POPULACIJI BOLNIKOV S SENZORINEVRALNO IZGUBO SLUHA	13
NAMEN DELA, CILJI IN HIPOTEZE	15
METODE	17
PREISKOVANCI	17
GENETSKA ANALIZA GENA <i>TMPRSS3</i>	17
Osamitev DNA iz vzorcev periferne krvi	17
Določitev koncentracije in čistoče osamljene DNA	19
Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	19
Preverjanje dolžine produktov PCR z gelsko elektroforezo	23
Sekvenčna reakcija	25
Obarjanje sekvenčne reakcije	27
Analiza fragmentov DNA s kapilarno elektroforezo	28
Interpretacija rezultatov	28
REZULTATI	29
PREISKOVANCI	29
Bolniki s prirojeno izgubo sluha	29
Bolniki s progresivno izgubo sluha	29

REZULTATI GENETSKE ANALIZE <i>TMPRSS3</i>	29
Rezultati genetske analize pri bolnikih s prirojeno izgubo sluha	34
Rezultati genetske analize pri bolnikih z napredujočo izgubo sluha	38
RAZPRAVA	42
PREISKOVANCI	43
REZULTATI GENETSKE ANALIZE	43
Bolniki s prirojeno izgubo sluha.....	43
Bolniki z napredujočo izgubo sluha	45
Spremembe, prisotne v obeh skupinah.....	47
POMEN TESTIRANJA SPREMEMB V GENU <i>TMPRSS3</i>	49
ZAKLJUČKI.....	51
LITERATURA.....	53

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba ušesa (povzeto po (7)).	2
Slika 2: Prerez polža in zgradba Cortijevega organa (povzeto po (7)).	3
Slika 3: Prikaz celic notranjega ušesa, posnet z elektronskim mikroskopom. A, notranje dlačne celice. B, zunanje dláčne celice. C, podporne celice (povzeto po (16)).	5
Slika 4: Kwartarna struktura proteina <i>TMPRSS3</i> (http://swissmodel.exposy.org).	8
Slika 5: Interakcije proteina <i>TMPRSS3</i> z drugimi proteini (http://string-db-org).	9
Slika 6: Normalno nukleotidno zaporedje na mestu 268 kodirajočega zaporedja gena <i>TMPRSS3</i>	34
Slika 7: Sprememba p.Ala90Thr (c.268G>A) v genu <i>TMPRSS3</i> v heterozigotni obliki.	35
Slika 8: Sprememba p.Ala90Thr (c.268G>A) v genu <i>TMPRSS3</i> v homozigotni obliki.	35
Slika 9: Normalno nukleotidno zaporedje na mestu 372 kodirajočega zaporedja gena <i>TMPRSS3</i>	35
Slika 10: Sprememba p.Ser124= (c.372G>T) v genu <i>TMPRSS3</i> v heterozigotni obliki.	36
Slika 11: Normalno nukleotidno zaporedje na mestu 208 kodirajočega zaporedja gena <i>TMPRSS3</i>	38

Slika 12: Sprememba p.His70ThrTer19 (c.208delC) v genu <i>TMPRSS3</i> v heterozigotni obliki.	39
Slika 13: Normalno nukleotidno zaporedje na mestu 32 kodirajočega zaporedja gena <i>TMPRSS3</i>	39
Slika 14: Sprememba p.Ala11Asp (c.32C>A) v genu <i>TMPRSS3</i> v heterozigotni obliki.	40
Slika 15: Sprememba nukleotidnega zaporedja in posledično aminokislinskega zaporedja pri spremembi c.208delC (povzeto po (38)).	46
Slika 16: Najdene spremembe v genu <i>TMPRSS3</i> , razdeljeni po domenah (povzeto po (28)).	47

KAZALO TABEL

Tabela I: Molekule, procesi in geni, vpleteni v nastanek nesindromske gluhosti (povzeto po (24,25)).	7
Tabela II: Vloga posameznih domen v proteinu <i>TMPRSS3</i>	9
Tabela III: Nabor pogostejših vzročnih sprememb v genu <i>TMPRSS3</i> pri posameznih populacijah. Spremembe so poimenovane glede na referenčni zaporedji NP_076927.1 in NM_024022.2.	12
Tabela IV: Nukleotidna zaporedja uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov.	21
Tabela V: Reakcijska mešanica za PCR.	22
Tabela VI: Reakcijska mešanica za PCR (ekson 7).	23
Tabela VII: Reakcijski pogoji za PCR.	23
Tabela VIII: Reakcijski pogoji za sekvenčno reakcijo.	26
Tabela IX: Opredeljene spremembe v genu <i>TMPRSS3</i> pri preiskovancih z izgubo sluha (het. sprememba je prisotna v heterozigotni obliki, hom. sprememba je prisotna v homozigotni obliki); spremembe so poimenovane glede na referenčno zaporedje NP_076927.1 oz NM_024022.2. P, prirojena izguba sluha; N, napredujoča izguba sluha.	30
Tabela X: Rezultati <i>in silico</i> orodij za spremembo p.Ala90Thr (c.268G>A).	34

Tabela XI: Nabor genetskih sprememb, najdenih v skupini prirojeno gluhih bolnikov (kjer je mogoče, so spremembe so poimenovane na ravni cDNA (NM_024022.2) in na ravni aminokislinskega zaporedja (NP_076927.1); podatki o frekvenci redkejšega alela (MAF) so povzeti po bazi podatkov ExAC).	37
Tabela XII: Rezultati <i>in silico</i> orodij za spremembo p.Ala11Asp (c.32C>A).	39
Tabela XIII: Nabor genetskih sprememb v skupini bolnikov z napredujočo izgubo sluha (spremembe so poimenovane na ravni cDNA (NM_024022.2) in na ravni aminokislinskega zaporedja (NP_076927.1); podatki o frekvenci redkejšega alela (MAF) so povzeti po bazi podatkov ExAC).	41
Tabela XIV: Pogostost spremembe p.Ile253Val v genu <i>TMPRSS3</i> v različnih populacijah (heterozigotno ali homozigotno stanje).	45
Tabela XV: Prisotni znani eksonski polimorfizmi v genu <i>TMPRSS3</i> v celotni skupini bolnikov z izgubo sluha. Podatki o frekvenci redkejšega alela (MAF) so povzeti po bazi podatkov ExAC.	48

POVZETEK

Napake genetskega izvora predstavljajo kar polovico vzrokov sensorinevralne izgube sluha – dobrih 70 % primerov je nesindromskih, velika večina pa se jih deduje avtosomno recesivno. Med njih sodijo tudi bolezenske spremembe v genu *TMPRSS3*. Protein *TMPRSS3* spada med transmembranske serinske proteaze, njegova naloga pri zaznavanju sluha pa še ni popolnoma razjasnjena.

V primerjavi s pogostejšimi geni, vpletenimi v izgubo sluha, spremembe v *TMPRSS3* v kavkaški populaciji predstavljajo majhen delež. Kljub temu je bilo v Sloveniji najdenih dovolj primerov spremembe c.208delC, da se je pokazala potreba po izvedbi raziskave, predstavljene v nadaljevanju. V njo smo vključili 52 bolnikov z izgubo sluha, pri katerih so že bile izključene bolezenske spremembe v genih *GJB2* in *GJB6* in pri katerih je bilo v družini predpostavljeno avtosomno recesivno dedovanje. Preiskovance smo razdelili na dve skupini – tiste s prirojeno in tiste z napredujočo izgubo sluha. Iz odvzetih vzorcev krvi smo osamili DNA, nato pa izvedli verižno reakcijo s polimerazo, s čimer smo ločeno pomnožili vseh 12 kodirajočih eksonov pri vsakem posamezniku. Nukleotidno zaporedje smo določili s sekvenciranjem po Sangerju in analizo dobljenih fragmentov s kapilarno elektroforezo. Dobljene sekvence smo analizirali s pomočjo podatkovnih baz in bioinformatičnih orodij. V skupini 34 prirojeno gluhih bolnikov nismo našli nobene vzročne spremembe, bili pa so prisotni 4 intronski in 7 eksonskih polimorfizmov. Pri drugi skupini je bil nabor polimorfizmov manjši, našli pa smo znano patogeno spremembo c.208delC na enem alelu pri enem posamezniku. Le-ta je med najpogostejšimi najdenimi patogenimi spremembami v *TMPRSS3*, saj so jo poleg Slovenije zasledili tudi v Španiji, Grčiji, Novofundlandiji, na Nizozemskem in v Pakistanu.

V naši raziskavi nismo našli novih primerov izgube sluha, ki bi jih povzročile spremembe v genu *TMPRSS3*. Kljub temu pa smo ugotovili, da je delež le-teh pri bolnikih, ki nimajo prisotnih bolezenskih sprememb v genu *GJB2* ali *GJB6* in imajo avtosomno recesivno dedovano izgubo sluha v Sloveniji bistveno višji od povprečja v drugih kavkaških populacijah in znaša 10,3 %. Zaradi izjemno nizkega deleža prisotnih vzročnih sprememb povezave med genotipom in fenotipom nismo mogli opredeliti. Med spremembami v genu *TMPRSS3* je v Sloveniji najpogostejša sprememba c.208delC, zato je uvrstitev testiranja te spremembe med preiskave prvega izbora pri bolnikih z izgubo sluha morda smiselna, analiza celotne kodirajoče regije gena *TMPRSS3* pa ne.

ABSTRACT

Genetic defects account for as many as half of the causes of sensorineural hearing loss - about 70 % of the cases are non-syndromic and the vast majority are inherited in autosomal recessive mode. These also include variants in the *TMPRSS3* gene, which we studied in this thesis. *TMPRSS3* protein belongs to transmembrane serine proteases, but its function in hearing is not yet fully explained.

Comparing with genes more commonly involved in hearing loss, causative variants in *TMPRSS3* are very rare, especially among deaf people of Caucasian origin. Nevertheless, enough cases of the c.208delC variant in Slovenia were identified to show the need for the implementation of the study presented below. We included 52 patients with hearing loss, where mutations in the *GJB2* and *GJB6* genes were already excluded and who presumably had autosomal recessive hearing loss. The subjects were divided into two groups - those with congenital and those with progressive hearing loss. We isolated DNA from the blood samples and then carried out a polymerase chain reaction, individually multiplying all 12 coding exons for each participant. The nucleotide sequence was determined with Sanger sequencing and analysis of the fragments with capillary electrophoresis. The obtained sequences were analysed using online databases and *in silico* prediction tools.

In group of 34 congenital deaf patients no causal variants were found, but 4 intronic and 7 exonic polymorphisms were present. In the second group, spectrum of polymorphisms was smaller, but we found a known pathogenic variant c.208delC on one allele in one individual. It is one of the most commonly found pathogenic variants in *TMPRSS3*, also identified in Spain, Greece, Newfoundland, the Netherlands and Pakistan.

We did not identify new cases of hearing loss caused by variants in *TMPRSS3* gene; however, we calculated that their frequency in Slovenia in patients without *GJB2* or *GJB6* mutations and autosomal recessive inheritance is significantly higher than the average in other Caucasian populations and amounts to 10,3 %. Because of the extremely low portion of causative variants in here analysed group of participants, we were unable to identify the genotype- phenotype correlation. As the most common *TMPRSS3* variant in Slovenia is c.208delC, its testing in a first-tier analysis in patients with hearing loss might be reasonable, while the analysis of the whole coding region of *TMPRSS3* gene is not.

SEZNAM OKRAJŠAV

WHO – Svetovna zdravstvena organizacija; angl. World Health Organisation

SNHL – senzornevralna izguba sluha; angl. sensorineural hearing loss

DFN – genetski lokusi za nesindromsko okvaro sluha; angl. **Deafness**

ENaC – na amilorid občutljiv epitelni Na⁺ ionski kanal; angl. epithelial amiloride sensitive sodium channel

HGMD – angl. Human Gene Mutation Database

EAS - električna akustična stimulacija; angl. Electric Acoustic Stimulation

DNA – deoksiribonukleinska kislina

UV – ultravijolična (svetloba)

dH₂O – deionizirana voda

PCR – verižna reakcija s polimerazo; angl. Polymerase chain reaction

V – volumen

c – koncentracija

M – molarna koncentracija

dNTP – deoksiribonukleotid

ddNTP – dideoksiribonukleotid

R – protismerno; angl. Reverse

F – istosmerno; angl. Forward

TRIS – tris(hidroksimetil)aminometan

EDTA – etilendiaminotetraocetna kislina

TBE – tris/borat/EDTA

BLAST – angl. Basic Local Alignment Tool

DVB – angl. Deafness Variation Base

dbSNP – angl. The Single Nucleotide Polymorphism Database

LOVD – angl. Leiden Open Variation Database

MAF – najvišja frekvenca alela v katerikoli populaciji, angl. Minor Allele Frequency

ExAC – angl. Exome Aggregation Consortium

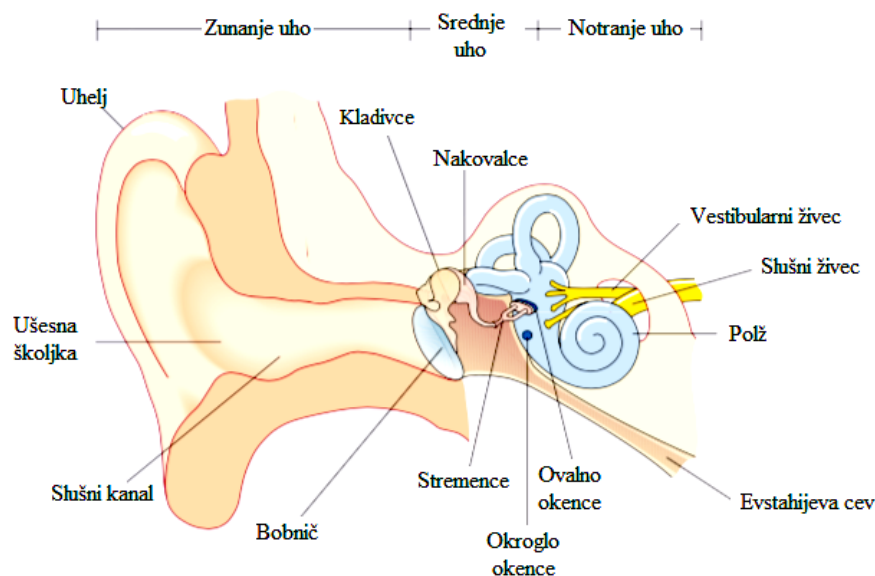
UVOD

Ena izmed najpogostejših prirojenih zaznavnih bolezni je izguba sluha, ki prizadene približno 1 na 1000 novorojenih otrok (1). Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije WHO so vzroki za izgubo sluha zelo heterogeni, od rdečk in sifilisa med nosečnostjo, do pomanjkanja kisika ob rojstvu, uporabe ototoksičnih zdravil med nosečnostjo (npr. aminoglikozidov) ali hude zlatenice, ki lahko prizadene slušni živec novorojenčka. Pri vsaj polovici bolnikov je izguba sluha posledica genetskih okvar (2). Genetska izguba sluha se deli na sindromsko in v 70 % primerih nesindromsko. Do sedaj je bilo po podatkih Hereditary Hearing Loss Homepage (3) prepoznanih 119 genov, povezanih z izgubo sluha, med njimi je 73 genov povezanih z nesindromsko izgubo sluha in 46 s sindromsko, število pa se še vedno večja. V populaciji gluhih oseb je izguba sluha v 30-60 % povezana z bolezenskimi spremembami v genu *GJB2* (4), za veliko ostalih vzročnih genov pa nimamo tako natančnih podatkov. Primanjkljaj takih informacij tako zavira morebitni razvoj diagnostičnih orodij ali uvedbo presejalnih testiranj, če bi se izkazalo, da je trenutno manj znan gen odgovoren za večji delež gluhosti v določeni populaciji (5).

V Sloveniji živi okoli 1500 gluhih oseb, po surditoloških kriterijih razdeljenih na prelingvalno ter postlingvalno gluhe ter naglušne (6).

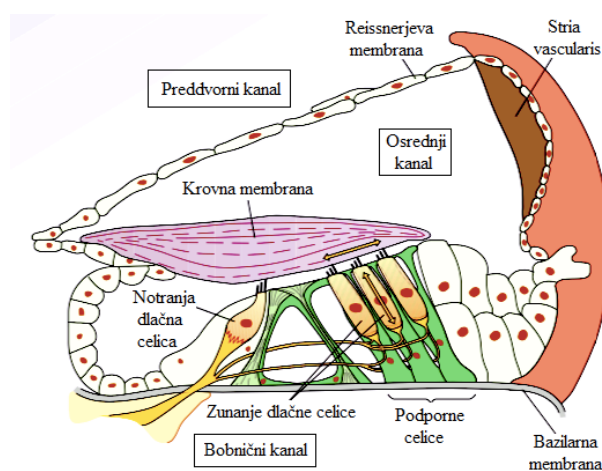
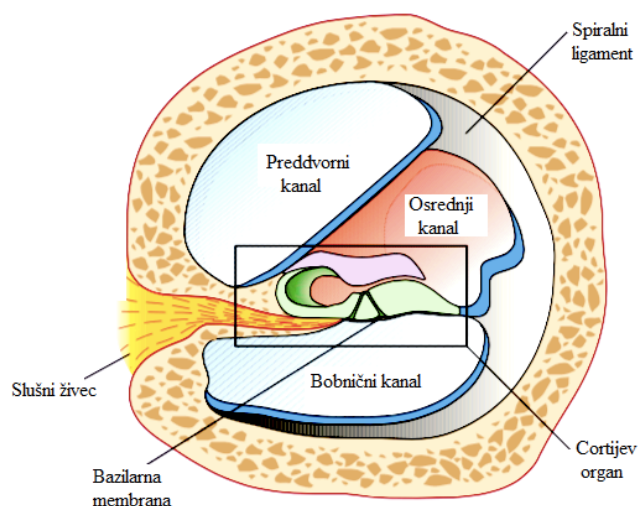
FIZIOLOGIJA SLUHA

Sluh je čut za zaznavanje zvočnih dražljajev, sestavljen iz različnih komponent, ki morajo posamezno in usklajeno delovati – od samega ušesa (zunanjega, srednjega in notranjega), zgradba katerega je prikazana na Sliki 1 (povzeto po (7)), do slušnega živca in slušne zaznave v terciarni možganski skorji (8).



Slika 1: Zgradba ušesa (povzeto po (7)).

Zunanje uho je sestavljeno iz uhlja in sluhovoda ter služi predvsem kot instrument za usmerjanje zvoka do srednjega ušesa, ki se prične z bobničem. Zvočni valovi vbočijo bobnič, kar povzroči prenos tresljajev na kosti srednjega ušesa (kladivce, nakovalce, stremence). Tukaj se zaključí proces zbiranja in usmerjanja zvočnih tresljajev, saj se stremence premakne v ovalno okence, ki je začetek notranjega ušesa. Na tem mestu se zvočno valovanje prenese iz zraka na tekočino, pri čemer se mora sila ojačati. Notranje uho je sestavljeno iz koščenega in kožnega labirinta – polž služi za zaznavo zvoka, labirintni del pa za zaznavo ravnotežja (9). Pri sluhu je najbolj pomembna sestava polža, spiralnega organa iz večih kanalov, ki jih med seboj ločujejo membrane. Na zgornji strani za ovalnim okencem se nahaja preddvorni kanal, ki na koncu polža (helikotrema) preide v bobnični kanal na spodnji strani, ki se zaključí z okroglim okencem, med njima pa se nahaja osrednji hodnik, ki se konča slepo. Osrednji hodnik na eni strani obdaja bazilarna membrana, na drugi Reissnerjeva membrana, na tretji pa *stria vascularis* (10). Na Sliki 2 so označene vse omenjene strukture.



Slika 2: Prerez polža in zgradba Cortijevega organa (povzeto po (7)).

Na bazilarni membrani se nahajajo čutilne celice, imenovane dlačne celice, ki so odgovorne za prenos zvoka do centralnega živčnega sistema. So vrsta mehanoreceptorjev, ki se v večih vrstah vijajo po bazilarni membrani in so prekrite s še eno membrano – togo krovno membrano, tesno stično z dlačicami (stereociliji) na vrhu dlačnih celic. Skupek krovne membrane, dlačnih celic (treh vrst zunanjih in ene vrste notranjih) in bazilarne membrane imenujemo Cortijev organ (Slika 2) (10). Oživčen je z aferentnimi vlakni osmega kranialnega živca in sicer z več kot 30 000, od katerih jih več kot 90 % oživčuje notranje dlačne celice, zunanje dlačne celice pa oživčujejo večinoma eferentna vlakna iz možganskega debla. Slušni živec tako sestavljajo osrednji nevriti celic spiralnega ganglija, ki so urejeni tonotopično – glede na frekvenco zvoka pri kateri so najbolj vzdraženi (9).

Prevajanje zvoka v živčni dražljaj

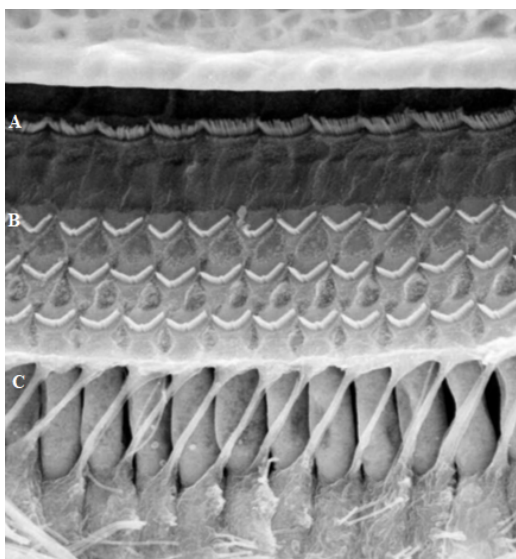
Ko zunanje in srednje uho zbereta in ojačata zvočne valove, jih usmerita do notranjega ušesa, kjer jih strukture v polžu, specifično v Cortijevem organu, pretvorijo v živčni dražljaj (11). Za delovanje pretvornih celic je pomembno ustrezno okolje, ki ga vzdržuje tekočina – v preddvornem in bobničnem kanalu najdemo perilimfo, v kateri je večja koncentracija natrijevih (Na^+) ionov in je podobna sestavi likvorja. V osrednjem hodniku pa se nahaja endolimfa, v kateri prevladujejo kalijevi (K^+) ioni, najdemo pa tudi nizke koncentracije kalcijevih (Ca^{2+}) ionov (8,12).

Zvočni dražljaji povzročijo tlačne valove v perilimfi in endolimfi, zaradi česar pride do vibracij bazilarne membrane v večih frekvencah. Dlačne celice so po bazalni membrani razporejene tonotopično, zato je osnovni princip zaznavanja zvoka ta, da različna območja Cortijevega organa zaznavajo različne frekvence – večja je oddaljenost od ovalnega okenca, nižje so zaznane frekvence (11). Te vibracije so vzrok premika stereocilijev na dlačnih celicah in posledično tvorbe signala, ki ga pošljejo v centralni živčni sistem. Ob premiku bazilarne membrane se posledično premaknejo tudi dlačne celice, ne pa stereociliji v tesnem stiku s krovno membrano, zato nastane med celico in izrastkom kot, kar katalizira mehanoelektrični prenos dražljaja (13).

Premik dlačnih celic povzroči odprtje neselektivnih kationskih kanalov, skozi katere K^+ ioni iz endolimfe potujejo v notranjost dlačnih celic, kar povzroči njihovo depolarizacijo (14). Le-ta se še poveča, ko skozi napetostno odvisne ionske kanale vstopijo Ca^{2+} ioni, ki katalizirajo odprtje od Ca^{2+} ionov odvisnih K^+ kanalov na spodnjem delu dlačnih celic – K^+ ioni začnejo izstopati, depolarizira se membrana in zaprejo se Ca^{2+} kanali. Zaradi tega se odprejo napetostno odvisni K^+ ionski kanali, izstopi še več K^+ ionov in depolarizacija membrane se še poveča. Na tej točki se, po vezavi prostih Ca^{2+} ionov na mitohondrije, dlačne celice vrnejo v prvotno stanje (15). Ta proces kulminira v sprostitvi neurotransmiterjev, ki preidejo sinaptično špranjo in se vežejo na dendrite aferentnih živčnih vlaken, le-ti pa signal popeljejo do ustreznega zaznavnega središča v centralnem živčnem sistemu (11).

SENZORINEVRALNA IZGUBA SLUHA

Do izgube sluha lahko pride na kateremkoli mestu slušne poti, od sluhovoda do živčnih vlaken (14). Glede na mesto okvare delimo izgubo sluha na prevodno in sensorinevralno – o prevodni izgubi sluha govorimo, kadar je okvarjeno delovanje zunanjega in srednjega ušesa, saj je moten prenos in ojačanje zvoka. Vzroki so lahko različni, od genetskih okvar do ušesnih bolezni, največkrat pa je razlog propadanje slušnih struktur zaradi staranja. Najpogostejša lokacija okvare so dlačne celice, ki jih lahko vidimo na Sliki 3 (povzeto po (16)) in katerih izguba je odgovorna za okoli 90 % primerov gluhosti (17). Dlačne celice se ne delijo in obnavljajo, zato je rezultat vsake izgube ali poškodbe zmanjšana sposobnost sluha (11).



Slika 3: Prikaz celic notranjega ušesa, posnet z elektronskim mikroskopom. A, notranje dlačne celice. B, zunanje dlačne celice. C, podporne celice (povzeto po (16)).

Senzorinevralna izguba sluha (SNHL) je najpogostejša oblika prirojene slušne okvare, ki jo lahko delimo naprej v centralno in periferno, ko govorimo o okvarjenem mestu na slušni poti. Periferno zaznavno izgubo sluha povzročajo stanja, ki poškodujejo notranje uho in slušni živec, na primer genetske okvare, okvara sluha zaradi starosti in okužba s citomegalovirusom. Centralno zaznavno izgubo sluha pa povzročajo meningitis, poškodbe možganovine in tumorji na kateremkoli delu slušnih območij centralnega živčnega sistema (18).

Če pa želimo SNHL razdeliti glede na vzrok nastanka, lahko govorimo o pridobljeni SNHL, neznanem vzroku, v največjem delu, približno 50 %, pa je vzrok genetska okvara. Do sedaj je bilo po podatkih Hereditary Hearing Loss Homepage (3) prepoznanih 119 genov, povezanih z izgubo sluha, med njimi 73 z nesindromsko izgubo sluha in 46 s sindromsko. Klasificiramo jih lahko na več različnih načinov: glede na avdiološke značilnosti izgube sluha, starost, pri kateri se pojavijo posledice okvare posameznega gena, njihovo lokacijo ali na način dedovanja (8). Glede na slednje imamo največ podatkov:

- 80 % primerov genetskih okvar se deduje avtosomno recesivno,
- 20 % avtosomno dominantno,
- do 1 % vezano na X kromosom,
- do 1 % mitohondrijsko (19).

Genetska gluhost je lahko tudi sindromska, pri teh stanjih je izguba sluha lahko le spremljajoč znak, lahko pa je velik del in celo ključen kliničen znak pri diagnozi. Primeri takih sindromov so branhio-oto-renalni sindrom (angl. Branchio-Oto-Renal, BOR), Waardenburgov sindrom, Pendredov sindrom in drugi (20). V tej magistrski nalogi se bomo osredotočili na nesindromsko avtosomno recesivno dedovano izgubo sluha.

Nesindromska izguba sluha

Zaradi velikega števila genov in najdenih lokusov, ki povzročajo nesindromsko izgubo sluha, je določen sistem oznak, ki ločijo posamezne gene glede na vrsto dedovanja in tip gluhosti. Avtosomno dominantno dedovane izgube sluha so označene s kratico DFNA, avtosomno recesivno z DFNB, izgube sluha dedovane X-vezano pa samo DFN. Pri posamezni oznaki kratici sledi številka po vrsti glede na čas identificiranja (21). Na primer gluhost, povzročena z bolezensko spremembo v genu *GJB2*, ki je odgovorna za 30-60 % (4) nesindromskih primerov izgube sluha, je označena z DFNB1, ker je bila prva opisana (22). Geni, vpleteni v razvoj izgube sluha, kodirajo proteine, ki sodelujejo pri različnih procesih v telesu, od transkripcijskih faktorjev, citoskeletnih in izvenceličnih sestavin matriksa do ionskih kanalov (23).

Uniformnih značilnosti nesindromske zaznavne izgube sluha ni, lahko je blaga ali huda, večinoma je obojestranska a lahko prizadene le eno uho, lahko je stabilna ali pa se slabša z

leti, pri nekaterih pa je omejena le na slabšo zaznavo posamičnih frekvenc. Odvisno od gena se lahko gluhost izrazi že ob rojstvu – kongenitalna gluhost, lahko pa tudi pozneje v življenju, ko se že ravije govor, glede na ta kriterij lahko govorimo tudi o prelingvalni oziroma postlingvalni izgubi sluha (8,21).

Proteini, vpleteni v nastanek nesindromske gluhosti

Velik nabor vzročnih genov pomeni tudi veliko raznolikost proteinov, ki jih kodirajo, kot na primer transkripcijske faktorje, različne celične in izvencelične proteine, transmembranske proteine, jedrne in citoplazemske proteine. Pregled je podan v Tabeli I (povzeto po 24,25). Ti proteini so vpleteni v različne celične procese na celotni slušni poti, kar pomeni, da ni določenega mesta, iz katerega bi izvirali vsi vzroki nesindromske gluhosti. Ko pride do bolezenske spremembe v genu, to pomeni nastanek nefunkcionalnega proteina in s tem oviro na poti procesiranja zvoka. Mesto te ovire pa določi, kako in kdaj se bo izrazila ter kakšen bo tip in stopnja izgube sluha (8).

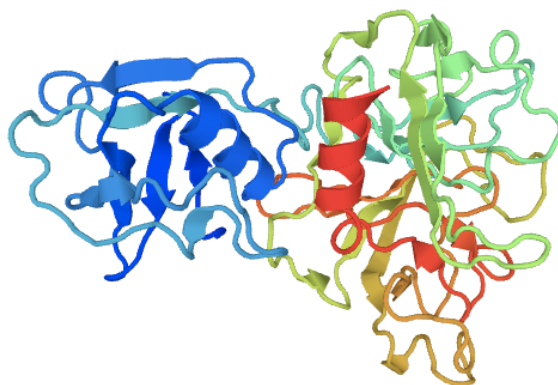
Tabela I: Molekule, procesi in geni, vpleteni v nastanek nesindromske gluhosti (povzeto po (24,25)).

Vrsta proteina	Proces	Primer gena
Transkripcijski faktorji	Začetek prepisovanja informacijske RNA (m-RNA) na različnih mestih procesa	<i>PAX3, POU4F3, EYA1</i>
Celični proteini	Atipični miozini in strukturni proteini, ki skrbijo za pravilno strukturo dlačnih celic in stereocilijev	<i>MYO7A, DIAPH1, STRC</i>
Transmembranski proteini	Proteini, ki tvorijo presledkovne stike, pravilno strukturo ionskih kanalov, so odgovorni za normalno celično adhezijo, proteini s proteazno aktivnostjo	<i>GJB2, KCNE1, SLC26A4, CDH23, TMPRSS3</i>
Izvencelični proteini	Kolageni, proteini, ki sodelujejo pri tesnem stiku dlačnih celic in krovne membrane	<i>COL2A1, COL11A2, COL11A1, OTOA</i>
Jedrne in citoplazemski proteini	Proizvodnja energije v mitohondrijih	gen za 12S mRNA

GEN *TMPRSS3*

Gen *TMPRSS3* kodira protein TMPRSS3, transmembransko serinsko proteazo 3, ki spada med transmembranske serinske proteaze tipa 2. Le-te so proteolitični encimi, vezani na membrano, kar jim omogoča sodelovanje s površinskimi proteini, sestavinami matriksa ter celičnimi proteini (23). Sodelujejo v procesih kot so strjevanje krvi, imunski odziv, celjenje ran in prebava (26).

Sam gen se nahaja na kromosomu 21q22.3, izraža pa se v spiralnem gangliju, podpornih in notranjih dlačnih celicah v polžu ter *strii vascularis*, primarno pa se protein nahaja v membranah endoplazmatskega retikuluma. Njegova naloga v telesu ni popolnoma jasna, sklepajo pa, da je vpleten v razvoj notranjega ušesa in vzdrževanje ionskega ravnotežja v perilimfi ter endolimfi (26,27). Protein TMPRSS3 je dolg 540 aminokislin in je sestavljen iz kratkega N-terminalnega konca, transmembranske domene in dolgega izvenceličnega C-terminalnega konca. Kvartarna struktura proteina je prikazana na Sliki 4.



Slika 4: Kvartarna struktura proteina *TMPRSS3* (<http://swissmodel.expasy.org>).

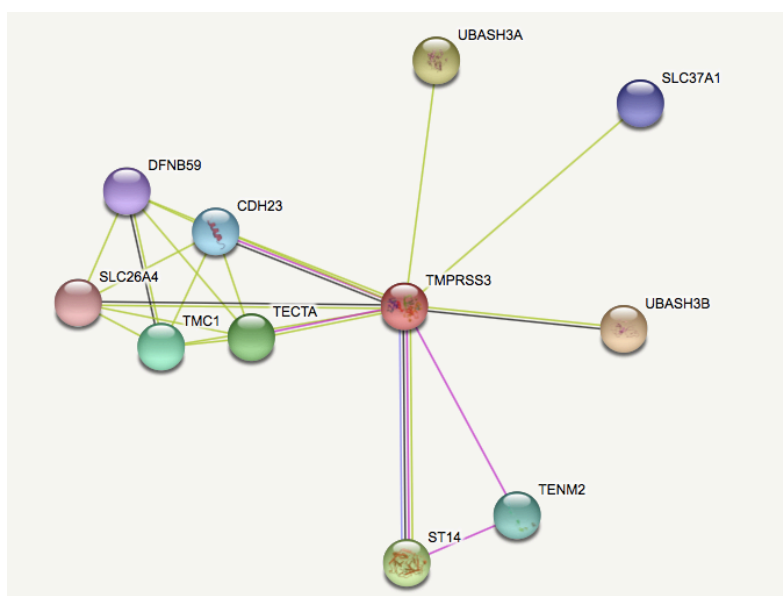
Vsebuje štiri domene: serinsko proteazno (katalitično) domeno, transmembransko domeno, domeno LDLRA, ki vsebuje lipoproteinski receptor tipa A, in domeno SRCR - odstranjevalni receptor, bogat s cisteinom (26,27,28). Vsaka izmed njih ima specifično nalogo (Tabela II), zaradi česar so vse potrebne za strukturno integriteto in pravilno delovanje proteina (16).

Tabela II: Vloga posameznih domen v proteinu TMPRSS3.

Domena	Funkcija
Transmembranska domena	Zasidranje v membrani
domena LDLRA	Vezava kalcija in lipoproteina z nizko gostoto
domena SRCR	Interakcije med proteini
Katalitična domena	Delovanje serinske proteaze

Najboljši kandidat za *in vivo* substrat proteina TMPRSS3 je epitelni Na⁺ ionski kanal, občutljiv na amilorid (ENaC), ki ga TMPRSS3 proteolitsko aktivira, kar vpliva na pomembne signalne poti v notranjem ušesu (28,29). ENaC je selektivno prepusten ionski kanal, katerega glavna naloga je uravnavanje toka Na⁺ ionov v nefronih, prisoten pa je tudi v apikalnih membranah epitelijev. Uravnavanje koncentracije Na⁺ ionov, ki vpliva na osmolarnost izvencelične tekočine, je ključnega pomena pri vzdrževanju volumna tekočine in krvnega tlaka (30).

Kot je prikazano na Sliki 5, TMPRSS3 interagira s številnimi proteini, mnogi med njimi so že znano povezani z razvojem izgube sluha, kot na primer DFNB59, SLC26, TMC1, TECTA ...



Slika 5: Interakcije proteina TMPRSS3 z drugimi proteini (<http://string-db-org>).

Genetske okvare v genu *TMPRSS3*

Bolezenske spremembe v genu *TMPRSS3* se dedujejo avtosomno recesivno in se izrazijo v dveh oblikah izgube sluha. Prva je nesindromska postlingvalna SNHL –(DFNB8), ki se pojavi v otroštvu, in druga prirojena, prelingvalna huda oblika izgube sluha (DFNB10) (31). Kot kaže, je fenotip odvisen od vrste bolezenske spremembe in njene lokacije, kar vpliva na to, koliko proteolitične aktivnosti proteina je ohranjene. Tako hujše spremembe vodijo v hudo, največkrat prelingvalno gluhost, milejše spremembe pa vodijo do blažjega fenotipa in postlingvalne izgube sluha (28,32).

Izguba sluha zaradi bolezenske spremembe v genu *TMPRSS3* so pogostejše v azijskih in mediteranskih populacijah ali populacijah z velikim deležem porok med sorodniki (33,34,35,36), redkeje pa med srednje- in severnoevropskimi populacijami. Pri tem je delež nesindromske izgube sluha zaradi okvare *TMPRSS3* v beli rasi manj kot 1 % (37,38).

Ker ni popolnoma jasno, kakšna je funkcija proteina *TMPRSS3* in kateri so njegovi substrati, tudi ni jasno, kateri procesi so moteni, ko pride do genetske okvare. Pri najbolj verjetnem substratu, ENaC, je zanimivo to, da pri posameznikih s psevdohipoaldosteronizmom, ki ga povzroči bolezenska sprememba v zgradbi podenot ENaC, ni prisotnih težav s sluhom (27). Ugotovili so tudi, da je v primeru mutiranega *TMPRSS3* moten tok K^+ , ker KCNMA1 ionski kanali niso več prisotni v notranjih dlačnih celicah – bodisi kot posledica odmiranja dlačnih celic ali kot posledica izgube funkcije proteina *TMPRSS3* (40). Najbolj obsežna raziskava učinkov mutiranega *TMPRSS3* pa je pokazala, da le-ti vključujejo:

- propad dlačnih celic na začetku razvoja sluha,
- izgubo nevronov v spiralnem gangliju,
- zmanjšano število podpornih celic v notranjem ušesu,
- motnje v razvoju ionskih kanalov (16).

Odvisno od bolezenske spremembe se ti učinki izražajo kot izguba sluha, lahko huda ali blažja, lahko pa pride tudi do blažjih motenj v ravnotežju. Do sedaj genetskih okvar niso opredelili le v transmembranskem delu *TMPRSS3*, po čemer lahko sklepamo, da sta za normalen sluh potrebni proteazna aktivnost in pa sposobnost interakcij z drugimi proteini (38).

Znane bolezenske spremembe v genu *TMPRSS3*

V podatkovni bazi HGMD (Human Gen Mutation Database) je bilo oktobra 2017 dokumentiranih 67 sprememb v genu *TMPRSS3*, od tega jih je 57 patogenih, 8 morebitno patogenih in 2 polimorfizma, povezana z razvojem raka na dojki. Največji del predstavljajo drugačnosmiselne spremembe, ki jih je 53 oz. 79 %, nato pa sledijo substitucije nukleotidov na povezovalnih mestih eksonov, regulatorne substitucije, majhne in velike delecije, insercije in duplikacije ter kompleksne preureditve. 65 vnešenih genetskih sprememb je povezanih z izgubo sluha – večinoma so klasificirane kot nesindromske in avtosomno recesivne; preostala 2 primera pa sta polimorfizma, ki sta povezana z napredovanjem raka na dojki (39).

Epidemiologija izgube sluha zaradi sprememb v genu *TMPRSS3*

Čeprav je *TMPRSS3* sorazmerno nedavno odkrit gen, je spekter odkritih vzročnih sprememb in polimorfizmov precej obsežen. Njihove posledice so različne – lahko pride do premika bralnega okvirja in prezgodnjega terminacijskega kodona, ali do spremembe v aminokislinskem zaporedju, delecij, insercij, itd (38). Med njimi je med najbolj pogostimi delecija c.208delC (p.His70ThrTer19) v eksonu 4, saj so jo zasledili med gluhi v Španiji, Grčiji, Novofundlandiji, Pakistanu in Sloveniji (1,20,31). Gre za spremembo, ki povzroči premik bralnega okvirja, posledično pa pride do prezgodnje zaustavitve prepisovanja in nastanka okrnjenega proteina, saj se prepisovanje zaključi takoj po izgradnji transmembranske domene (41). V Tabeli III so navedene še nekatere pogostejše spremembe v posameznih populacijah.

Tabela III: Nabor pogostejših vzročnih sprememb v genu *TMPRSS3* pri posameznih populacijah. Spremembe so poimenovane glede na referenčni zaporedji NP_076927.1 in NM_024022.2.

Populacija (država)	Odkrite vzročne spremembe	Prevalenca	Literatura
Kitajska (Tibet)	p.Ala179Thr (c.535G>A)	<1 %	(41)
Novofundlandija	p.His70ThrTer19 (c.208delC), c.782+8insT	<1 %	(27)
Nemčija	p.Arg216Cys (c.646C>T), p.Ala306Thr (c.916G>A)	<1 %	(37)
Velika Britanija	p.Ala138Glu (c.413C>A)	<1 %	(5)
Japonska	p.Glu76Ter (226C>T), p.Ala260Thr (c.778G>A)	<1 %	(42)
Pakistan	p.Cys242Trp (c.726C>G), p.Arg216Leu (c.647G>T), p.His70ThrTer19 (c.208delC), p.Cys407Arg (c.1219C>T), p.Cys194Phe (c.581G>T)	1,8 %	(1,27)
Maroko	p.Ala90Thr (c.268G>A; kasneje klasificirana kot benigna)	2,5 %	(33)
Tunizija	p.Trp251Cys (c.753G>C), p.Pro404Leu (c.1221C>T)	5 %	(34)
Južna Koreja	p.Ala306Thr (c.916G>A), p.Thr248Met (c.743C>T), p.Arg109Trp (c.325C>T)	5,9 %	(35)
Turčija	p.Pro404Leu (c.1211C>T), p.Gln398Ter (c.1192C>T), p.Arg216Leu (c.647G>T)	12 %	(43)

K višjemu deležu genskih okvar v *TMPRSS3* v posameznih populacijah bistveno prispeva tudi pogostost konsangvinih zakonov skozi več generacij v določenih populacijah, na primer v pakistanski ali tunizijski (34,36). To dejstvo pojasni tudi redkost vzročnih sprememb v evropski populaciji, kjer poroke med sorodniki niso tako pogoste.

GENETSKI VZROKI V SLOVENSKI POPULACIJI BOLNIKOV S SENZORINEVRALNO IZGUBO SLUHA

Med vzroki izgube sluha v slovenski populaciji so najbolj raziskane spremembe v genih *GJB2* in *GJB6*, ki kodirata koneksina 26 in 30. Koneksini se med sabo povežejo v medcelične enote, ki tvorijo presledkovne stike – ti sodelujejo v medcelični komunikaciji na različnih mestih, med katere spada tudi notranje uho (44), zaradi česar spremembe v njunem zaporedju vodijo do izgube sluha, označene z DFNB1. Večinoma avtosomno recesivno dedovane spremembe povzročajo različne fenotipe, od hude ali blage prirojene gluhosti do prevladujoče pozno izražene napredujoče (45). Pri prirojeno gluhih slovenski bolnikih so bile patogene spremembe v genu *GJB2* prisotne 26,6 % bolnikov (46), med progresivno gluhih pa so bile v genih *GJB2* in *GJB6* najdene pri 22,2 % preiskovancev (45). Skladno z drugimi raziskanimi kavkaškimi populacijami je najbolj pogosta vzročna sprememba c.35delG v *GJB2*, ki se med slovenskimi prirojeno gluhih bolniki v homozigorni obliki pojavlja pri 21,1 % preiskovancev (46), med bolniki z napredujočo izgubo sluha pa je ta delež nižji in sicer 6,9 % (45).

Manj raziskan gen je *ILDR1*, ki je vpleten v razvoj številnih struktur v notranjem ušesu, med drugimi tudi dlačnih celic. Napake v njegovem zaporedju povzročijo redko obliko napredujoče gluhosti, označene z DFNB42, ki se ponavadi pojavlja v državah Bližnjega vzhoda in se deduje avtosomno recesivno (47). V slovenski populaciji je bila prisotna sprememba p.Cys314Ter (c.942C>A) pri dveh sorodnih posameznikih, hkrati pa je bila to tudi prva najdena sprememba v genu *ILDR1* v evropski populaciji (48).

Najnovejša raziskava je zajemala slovensko in bosansko populacijo preiskovancev s sindromsko in nesindromsko izgubo sluha, ki se je pojavila pred razvojem govora, kjer so bile opisane spremembe v velikem naboru genov (*CHD7*, *HDAC8*, *MIR96*, *MITF*, *MYH14*, *NEFL*, *RYR1*, *SF3B4*, *TECTA*, *TMCI*, *TMPRSS3*, *USH2*, *WFS1*, *OTOF* in *SLC26A4*), vendar pa ni bilo opredeljeno, kateri geni so vzročni pri kateri populaciji (49).

V tej raziskavi so našli tudi spremembo c.208delC (p.His70ThrTer19) v genu *TMPRSS3*, na katerega so se osredotočili v raziskavi vzrokov avtosomno recesivne izgube sluha pri

slovenskih bolnikih iz leta 2015. Le-ta povzroča gluhost, ki se lahko pojavi v otroštvu in napreduje, ali pa je huda in prisotna že ob rojstvu. Sodelovalo je 38 bolnikov s prirojeno izgubo sluha, pri 5 je bila prisotna sprememba s.208delC v homozigotni obliki, kar predstavlja 13,1 % preiskovane populacije – za kavkaško populacijo izjemno visoka vrednost (31).

NAMEN DELA, CILJI IN HIPOTEZE

V slovenski populaciji bolnikov z izgubo sluha so vzroki zaradi bolezenskih sprememb v genu *GJB2* in *GJB6* dobro raziskani (45,46). Z razvojem sekvenciranja naslednje generacije pa se pri izbranih bolnikih rutinsko analizirajo tudi drugi genetski vzroki. Tako je bil gen *TMPRSS3* pri eni družini s prirojeno izgubo sluha identificiran kot vzrok bolezni, ista bolezenska sprememba v genu *TMPRSS3* pa je bila kasneje dokazana še pri treh drugih bolnikih z izgubo sluha. S tem je bil gen *TMPRSS3* prepoznan kot možni pogostejši vzrok avtosomno recesivne izgube sluha. Namen magistrske naloge je analiza celotne kodirajoče regije gena *TMPRSS3* pri bolnikih z izgubo sluha, pri katerih je v družini prisotno avtosomno recesivno dedovanje bolezni in pri katerih so bile bolezenske spremembe v genih *GJB2* in *GJB6* že izključene kot možen vzrok bolezni, druge genetske analize pa še niso bile opravljene.

Cilji magistrske naloge so naslednji:

- V izbrani skupini bolnikov s sumom na avtosomno recesivno dedovanje izgube sluha in še neprepznanim vzrokom bolezni opredeliti spremembe v kodirajoči regiji gena *TMPRSS3* s sekvenciranjem po Sangerju in ovrednotiti vzročnost opredeljenih genetskih sprememb.
- Preveriti povezavo med genotipom in fenotipom bolnikov glede na vrsto izgube sluha (prirojena ali napredujoča izguba sluha).
- Primerjati dobljene rezultate z rezultati iz literature za druge populacije.
- Ugotoviti, ali je *TMPRSS3* pogost vzrok za izgubo sluha v slovenski populaciji in ali je smiselno uvrstiti njegovo analizo med gene, ki sodijo v prvi izbor analize pri bolnikih z izgubo sluha.

Hipoteza: Glede na predhodne analize omejenega števila bolnikov predpostavljamo, da so bolezenske spremembe v genu *TMPRSS3* pogost vzrok za izgubo sluha v slovenski populaciji bolnikov. Pričakujemo, da bomo odkrili spekter genskih sprememb, ki bodo

značilne za prirojeno izgubo sluha in drug spekter, ki bo značilen za progresivno izgubo sluha.

METODE

PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 52 preiskovancev, ki se vodijo na Kliniki za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo Kliničnega centra v Ljubljani. Preiskovanci so imeli prirojeno ali progresivno sensorinevralno izgubo sluha in niso imeli prepoznanih genetskih vzrokov bolezni. To pomeni, da je bila pri vseh vključenih bolnikih sekvenčna analiza genov *GJB2* in *GJB6* negativna, analize drugih genov pa niso bile izvedene. Pri bolnikih so bili tudi izključeni sindromski vzroki izgube sluha in pomembnejši okoljski povzročitelji. V preiskovano skupino smo vključili le tiste bolnike, ki so imeli normoslišne starše in pri katerih smo glede na druge sorodnike z izgubo sluha sklepali na avtosomno recesivno dedovanje bolezni.

Vključeni preiskovanci so pacienti na Kliniki za otorinolaringologijo in cervikofacialno kirurgijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, vsi posamezniki, oziroma starši mladoletnih oseb, so podali pisno privolitev k sodelovanju v raziskavi. Raziskavo z naslovom 'Širitev molekularno genetske diagnostike pri bolnikih z izgubo sluha' je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko št. 37/04/07.

GENETSKA ANALIZA GENA *TMPRSS3*

Osamitev DNA iz vzorcev periferne krvi

Vzorec, ki smo ga uporabili, je bila sveža polna periferna kri, odvzeta z antikoagulantom EDTA, iz katere smo izolirali genomsko deoksiribonukleinsko kislino (DNA). Postopek smo izvedli z reagenčnim kompletom Flexigene DNA Kit 250 (QIAGEN).

Princip postopka je liza krvnih celic z deproteinizacijo, ki ji sledi obarjanje DNA, končni rezultat pa čista genomsko DNA, pripravljena za molekularno genetsko analizo.

Reagenti in kemikalije

Reagenčni komplet Flexigene DNA Kit vsebuje naslednje komponente:

- pufer FG1, pufer za lizo (shranjujemo na sobni T, 15-25°C),
- pufer FG2, pufer za denaturacijo (shranjujemo na sobni T, 15-25°C),
- pufer FG3, pufer za hidracijo (shranjujemo na sobni T, 15-25°C),
- piofilizirana QIAGEN Proteaza.

Potrebujemo tudi naslednje kemikalije, ki niso vključene:

- 100 % izopropanol,
- 70 % etanol.

Instrumenti in oprema

- 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirne epruvete,
- 50 mL centrifugirke (Falcon TPP),
- pipete (10, 100, 1000 µL),
- sterilni nastavki za pipete,
- vodna kopel,
- centrifuga (Megafuge, 1.0R, Heraeus),
- vibracijski mešalnik (Maxi mix II, Thermolyne).

Postopek

Začeli smo s pipetiranjem 12,5 mL pufera FG1 v 50 mL centrifugirko, v katero smo nato dodali 5 mL krvi, premešali z obračanjem in centrifugirali 7 minut pri 2300 g. Nežno smo odlili supernatant in obrnili centrifugirko na čisto papirnato brisačo. Peletu smo dodali 2,5 mL FG2-proteazne mešanice in premešali na vibracijskem mešalniku do popolne homogenizacije. Vzorec smo 5-krat obrnili in inkubirali 15 minut v vodni kopeli pri 65 °C, da je prišlo do razpada proteinov (sprememba barve iz rdeče v olivno zeleno). V centrifugirko smo napipetirali 2,5 mL 100 % izopropanola in jo obračali, dokler se ni pojavila DNA oborina. Nato smo centrifugirali 5 minut pri 2300 g, odlili supernatant ter obrnili na čisto papirnato brisačo, preden smo pelet posušili na zraku. Na koncu smo pelet

raztopili v pufru FG3, katerega volumen smo ocenili glede na velikost DNA oborine, in pustili raztapljati na sobni temperaturi preko noči.

Določitev koncentracije in čistoče osamljene DNA

Da zagotovimo kvalitetno nadaljnje delo, moramo spektrometrično izmeriti količino in čistost osamljene DNA. Dušikove baze v molekuli DNA maksimalno absorbirajo UV svetlobo pri valovni dolžini 260 nm, kar izkoristimo za merjenje koncentracije DNA. Če je izmerjena koncentracija vsaj 50 µg/mL, je DNA primerna za nadaljnjo analizo. Za čistost DNA moramo absorbanco izmeriti pri 260 nm in 280 nm. Nato izračunamo razmerje $R = A_{260}/A_{280}$, ki mora biti med 1,7 in 2,0, da lahko uporabimo vzorec za analizo.

Instrumenti in oprema

- UV spektrofotometer (Lambda 25, Perkin Elmer),
- centrifuga (Megafuge),
- pipete in sterilni nastavki,
- deionizirana voda (dH₂O),
- 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirke,
- mikro-kvarčne kivete (Helma).

Postopek

Spektrofotomer smo prižgali in pripravili vzorec DNA za merjenje – v mikrocentrifugirko smo odpipetirali 990 µL dH₂O, dodali 10 µL izhodne raztopine DNA in premešali. Najprej smo izmerili koncentracijo slepe raztopine (destilirana voda), nato pa odčitali absorbanco vzorca pri 260 nm in 280 nm ter določili razmerje absorbanco (R) in koncentracijo.

Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) nam omogoči pomnožitev izbranih odsekov DNA iz minimalne količine vzorca s pomočjo termostabilne DNA-polimeraze, ki sintetizira

komplementarno verigo že obstoječi matrici. Kot matrico uporabimo del DNA, ki ga omejimo s parom enoverižnih DNA molekul. Ta oligonukleotidna začetnika (angl. primer) morata biti komplementarna vsak eni verigi DNA.

Reakcijo sestavljajo trije koraki, ki se nato ciklično ponavljajo. Začne se s temperaturno denaturacijo dvojne vijačnice (94-96 °C), nato se temperatura zniža (55 do 65 °C, odvisno od nukleotidne sestave) in pride do prileganja oligonukleotidnih začetnikov. Tretji korak zahteva spet malo višjo temperaturo (72 °C), pri kateri pride do faze podaljševanja, v kateri DNA polimeraza obe novi verigi podaljšuje od 5'-3' koncu matrice. Ta cikel se ponovi 35-krat, na koncu pa sledi še dodatno podaljševanje verig, ki še niso dograjene. Reakcija se zaključuje s hlajenjem na 10 °C.

Reagenti in kemikalije

- vzorec DNA, razredčen do koncentracije 100 ng/μL z vodo,

Za izračun volumna vzorca DNA in vode pri redčenju uporabimo enačbo $V_1=(c_2*V_2)/c_1$.

V_1 volumen izhodnega vzorca DNA

c_1 koncentracija vzorca DNA, izmerjena spektrofotometrično

c_2 končna koncentracija redčenega vzorca DNA (100 ng/uL)

V_2 volumen redčenega vzorca DNA (50 uL)

- delovna raztopina oligonukleotidnih začetnikov s koncentracijo 10 pmol/μL (njihova zaporedja so navedena v Tabeli IV),

Pripravimo jo tako, da v 1,5 mL mikrocentrifugirko napipetiramo 10 μL izvorne raztopine začetnih oligonukleotidnih začetnikov in 90 μL vode ter premešamo.

- GoTaq® Master mix (Promega),

Vsebuje GoTaq® G2 DNA polimerazo, deoksiribonukleotide (dNTP), MgCl₂ in reakcijske pufre v optimalnih koncentracijah.

- voda brez prisotnih nukleaz.

Za ekson 7

- vzorec DNA, razredčen do koncentracije 100 ng/μL z vodo,
- delovna raztopina oligonukleotidnih začetnikov s koncentracijo 10 pmol/μL (njihova zaporedja so navedena v Tabeli IV),

- voda brez prisotnih nukleaz,
- raztopina dNTP s končno koncentracijo 2 mM,
- DNA polimeraza Taq Gold,
- 10x pufer Taq Gold,
- MgCl₂.

Tabela IV: Nukleotidna zaporedja uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov.

Ekson	Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje 5'-3'	Dolžina amplikona (št. baznih parov)
2	2F	TGCATTCTCACCAGATGACTG	145
	2R	GGAGATATTTCCCCACAGG	
3	3F	GGTGGAGCAGGTAGGACTGA	111
	3R	GGCACCCAGACTGACTTTA	
4	4F	GACAGGGACGCAATTTCAATA	117
	4R	TACAGATGGGAAGGGTCAGG	
5	5F	GGTCAGATTTGGCAGAGGAG	124
	5R	GGCATCCTAAGGTGGATGTG	
6	6F	ACATCCCCCATGTACAATCC	126
	6R	CTCCCTCAGGTTCTCACACC	
7	7F	TTCAAAGAGGGGGAAATAGAA	44
	7R	ACAGGTGAGGATGACACTGC	
8	8F	CCCTTGCAGCACTTGTCTTAG	166
	8R	CTTCTCACCACCCAAAGCAG	
9	9F	ACCTCTCCCACCATCTTCCT	170
	9R	CAACTGATGCCAACACCAAC	
10	10F	CTCCTCAGAGGCAGAAGCAT	96
	10R	ATGGAACCGTGACTCCTGAC	
11	11F	GCTTCGAGACAGTGGGAGTC	146
	11R	TTCTTCTCCACGCCCTGTAA	
12	12F	CTGGTGGGTTCCCTTCTGTA	153
	12R	TAGCAAGACCAGGGTTGCAT	
13	13F	GCCAACCTTGTCTTCATCGT	890
	13R	AGATGGAAGGGTGCCTCTTT	

Instrumenti in oprema

- 5 mL sterilne mikrocentrifugirne epruvete (Eppendorf),
- pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 μ L) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,
- tray-i (Applied Biosystems) in pripadajoči pokrovčki (Applied Biosystems),
- reakcijske epruvete 0,2 mL (Applied Biosystems) in pripadajoči pokrovčki (Applied Biosystems),
- vibracijski mešalnik (Maxi Mix II, Termolyne),
- komora za sterilno delo,
- aparat za PCR GeneAmp® PCR System 9700 ali SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Postopek

Reagente smo vzeli iz zamrzovalne skrinje, jih odmrznili in na kratko pomešali na vibracijskem mešalniku. Aparat za PCR smo prižgali in s 70 % etanolom obrisali delovno površino, pipete in ostalo opremo, ki smo jo rabili. Nato smo izračunali potrebne količine reagentov, pripravili ustrezno število reakcijskih epruvet (po eno za vsak preiskovan vzorec in eno za slepo raztopino) ter delovno PCR mešanico, ki smo jo na kratko premešali in centrifugirali. Količine uporabljenih reagentov so podane v Tabeli V in Tabeli VI.

Tabela V: Reakcijska mešanica za PCR.

	1X [μL]
H ₂ O	7
GoTaq® Master mix	10
Primer R	1
Primer F	1
DNA	1
SKUPAJ	20

Tabela VI: Reakcijska mešanica za PCR (ekson 7).

	1X [μL]
H ₂ O	14,85
dNTP	2,5
10x pufer Taq Gold	2,5
MgCl ₂	2
Polimeraza Taq Gold	0,15
Primer R	1
Primer F	1
DNA	1
SKUPAJ	25

Reakcijsko mešanico smo nato razdelili v epruvete in dodali DNA, jih dobro zaprli ter premešali, da smo se znebili morebitnih mehurčkov ali tekočine na steni epruвет. Pripravljeno zmes smo nato prestavili v aparat za PCR in zagnali primeren program z nastavljenimi pogoji, kot so opisani v Tabeli VII.

Tabela VII: Reakcijski pogoji za PCR.

Začetna denaturacija	95 °C, 10 '
35x cikel	94 °C, 30 "
	58 °C, 30 " (57 °C pri eksonu 7)
	72 °C, 30 "
Končno podaljševanje	72 °C, 7 '
Hlajenje	10 °C, ∞

Ko smo končali, smo reagent pospravili nazaj v zmrzovalnik in znova prebrisali delovne površine in opremo s 70 % etanolom.

Preverjanje dolžine produktov PCR z gelsko elektroforezo

Za ločitev in detekcijo odsekov nukleinskih kislin z gelsko elektroforezo izkoristimo njihov naboj in razlike v njihovi velikosti. Nukleinske kisline so negativno nabite in v električnem

polju potujejo proti pozitivno nabitemu polu, pri čemer je hitrost potovanja odvisna od dolžine odseka.

Reagenti in kemikalije

- TRIS (Sigma-Aldrich),
- borova kislina (Kemika),
- EDTA, pH 8 (Riedel),
- bromfenol modro (Kemika),
- glicerol (Salus),
- agarozna (Sigma-Aldrich),
- barvilo Syber Safe DNA Gel stain (Invitrogen),
- destilirana voda.

Iz reagentov smo pripravili 10x TBE pufer in sicer tako, da smo zmešali 108 g TRIS baze, 55 g borne kisline, 40 mL 0,5M EDTA in dolili destilirano vodo do 1 L. Iz tega smo nato pripravili 1x TBE pufer (100 mL 10x TBE pufra smo dodali 900 mL destilirane vode). Za potek elektroforeze smo rabili tudi nanašalni pufer, za katerega smo v erlenmajerico zatehtali 50 mg bromfenol modrega, dodali 50 mL ksilencianola, 30 mL glicerola in dolili destilirano vodo do 50 mL. Da smo dobili delovno raztopino nanašalnega pufra, smo rabili 300 μ L koncentriranega, 720 μ L destilirane vode in 25,5 μ L glicerola.

Instrumenti in oprema

- Tehnica (Sartorius TE6101),
- pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 μ L) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,
- erlenmajerica,
- merilni valj,
- urno steklo,
- mikrovalovna pečica Sharp R – 939,
- sistem za agarozno gelsko elektroforezo: nosilec za gel in glavniček (Biorad),
- transluminator G: Bix Syngene.

Postopek

Najprej smo pripravili 2 % agarozni gel tako, da smo v erlenmajerico natehtali 1,6 g agaroze in dolili 80 mL 1x TBE pufra, ki smo mu dodali 8 μ L barvila Syber Safe. Erlenmajerico smo stehali, pokrili z urnim steklom in v mikrovalovni pečici kuhali dvakrat po 1 minuto, da so se raztopili vsi delčki agaroze. Na tehtnici smo nato dolili toliko vode, da je bila teža enaka kot pred kuhanjem in gel ohladili na približno 60 °C. Gel smo vlili v pripravljen kalup, počakali, da se je strdil ter nato odstranili glavničke. Lahko smo ga takoj prenesli v kadičko za elektroforezo, lahko pa smo ga shranili v hladilniku na 4°C.

V žepke agaroznega gela smo prenesli 8 μ L PCR produkta (v primeru eksona 7 smo pred nanosom zmešali 6 μ L PCR produkta in 12 μ L barvila) in velikostni standard. Elektroforezo smo pustili delovati 30 minut na 90 V, nato pa fotografirali gel v transluminatorju – jasna lisa PCR produkta je pomenila uspešno pomnožitev DNA odseka.

Sekvenčna reakcija

Za proces določanja nukleotidnega zaporedja DNA oz. sekvenciranja smo uporabili metodo po Sangerju, ki temelji na vgradnji dideoksinukleotidov (ddNTP). ddNTP so modificirani nukleotidi brez 3'OH skupine na deoksiribozi, ki ustavijo sintezo verige, ko se vgradijo. Po končani sekvenčni reakciji tako dobimo mešanico odsekov različnih dolžin, ki se končajo vsak z enim od ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), ki imajo na sebi vezano drugačno fluorescentno barvilo.

Reagenti in kemikalije

- Delovna raztopina oligonukleotidnih začetnikov s koncentracijo 10 pmol/ μ L (njihova zaporedja so navedena v Tabeli IV),
- Exo-SAP-IT encim, odmrznjen in premešan (USB Corporation),
- Big-Dye Terminator 3.1v razredčen z Big Dye Terminator pufrom (Applied Biosystems),
- Big Dye Terminator 3.1v 5X pufer (Applied Biosystems),
- dH₂O.

Instrumenti in oprema

- 1,5 mL sterilne mikrocentrifugirne epruvete (Eppendorf),
- pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 μ L) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,
- tray-i in nosilci za njih (Applied Biosystems),
- reakcijske epruvete 0,2 mL in pripadajoči pokrovčki (Applied Biosystems),
- vibracijski mešalnik (Maxi Mix II, Termolyne),
- komora za sterilno delo,
- aparat za PCR GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems),
- centrifuga Universal 320R (Hettich).

Postopek

V vsako epruveto smo napipetirali 1 μ L encima Exo-SAP-IT in 2,5 μ L produkta PCR reakcije – encim je razgradil ostanke začetnih oligonukleotidov in dNTP. Zmes smo dobro premešali in centrifugirali, nato pa prenesli v aparat za PCR. Vzorec smo inkubirali 15 minut na 37 °C, nato pa še deaktivirali encim s povišanjem temperature na 80 °C za 15 minut.

V naslednjem koraku smo v epruveto z Big-Dye reagentom dodali 292,5 μ L vode in vsakemu vzorcu dodali 16,2 μ L mešanice in 0,3 μ L izbranega oligonukleotidnega začetnika. Dobro smo premešali, na kratko centrifugirali in pomnožili v PCR aparatu pod pogoji v Tabeli VIII.

Tabela VIII: Reakcijski pogoji za sekvenčno reakcijo.

Začetna denaturacija		96 °C, 1 '
25x	Denaturacija	96 °C, 10 "
	Prileganje primerjev	50 °C, 5 "
	Podaljševanje verige	60 °C, 4 '
Hlajenje		4 °C, ∞

Obarjanje sekvenčne reakcije

Sekvenčno reakcijo je pred analizo potrebno očistiti nevgrajenih ddNTP, saj barvilo, ki je v njih vgrajeno, vpliva na kvaliteto začetnega dela sekvenčnega elektroferograma in prepoznavanja nukleotidov. To dosežemo z obarjanjem s 3 M natrijevim acetatom in spiranjem s 70 % etanolom.

Reagenti in kemikalije

- 100 % etanol,
- 70 % etanol,
- 3 M natrijev acetat,
- formamid (Applied Biosystems).

Instrumenti in oprema

- 1,5 mL sterilne mikrocetrifugirne epruvete,
- pipete Gilson (10, 100, 200 in 1000 μ L) in ustrezni sterilni nastavki za pipete,
- vibracijski mešalnik (Maxi Mix II, Termolyne),
- centrifuga Universal 320R (Hettich).

Postopek

V vsako izmed epruvet s sekvenčno reakcijo smo dodali 52 μ L mešanice 100 % etanola in 3 M natrijevega acetata, nato jih dobro zmešali z vibracijskim mešalnikom in centrifugirali 45 minut na 3990 rpm. Da se bi se znebili supernatanta, smo epruvete odprli, obrnili na staničevino in ponovno centrifugirali 1 minuto pri 500 rpm. V vsako epruveto smo napipetirali 70 μ L 70 % etanola in centrifugirali na istih pogojih kot v prejšnjem koraku. Oborjeno sekvenčno reakcijo smo 10 minut sušili pri sobni temperaturi, nato pa smo jo lahko shranili pri -20 °C ali pa jo pripravili za kapilarno elektroforezo tako, da smo jo raztopili v 20 μ L formamida in denaturirali v aparatu za PCR (5 minut na 95 °C).

Analiza fragmentov DNA s kapilarno elektroforezo

Ko smo produkte PCR reakcije očistili, so bili pripravljeni na prenos v genetski analizator ABI 3500 (Applied Biosystems), ki po principu kapilarne elektroforeze loči in detektira posamezne fragmente in s tem določi nukleotidno zaporedje analiziranega odseka. V električnem polju negativno nabita DNA potuje skozi separacijski polimer tako, da manjši fragmenti prej dosežejo detektor, kar nam jih uredi po dolžini od najkrajšega do najdaljšega. V detektorski celici pride do ekscitacije fluorescentnih barvil, vezanih na ddNTP, z lasersko svetlobo. CCD detektor zazna te signale in jih pretvori v 4 različne signale za 4 različne nukleotide (A, G, C, T). Končni rezultat je bil elektroferogram, ki ga je proizvedla programska oprema (Sequencing Analyses Software 5.4, Applied Biosystems) glede na hitrost potovanja DNA fragmentov skozi separacijski polimer in barvne signale le-teh (50).

Interpretacija rezultatov

Da bi prepoznali genetske spremembe v analiziranih DNA zaporedjih gena *TMPPRS3* smo uporabili spletni program BLAST (angl. Basic Local Alignment Tool) (51), ki je primerjal naše dobljeno zaporedje z referenčnim. Referenčno zaporedje najdemo na spletni strani GenBank, javni bazi zaporedij, ki so označena vsako s svojo referenčno številko (referenčna številka za gen *TMPPRS3* je NG_011629.1) (52).

Vzročnost prepoznanih sprememb smo preverili v bazah podatkov HGMD (The Human Gene Mutation Database) (39), DVB (angl. Deafness Variation Base) (53), ClinVar (54) in pa v že objavljeni literaturi. Prav tako smo preverili prisotnost in pogostost teh genetskih sprememb v splošni populaciji v bazah Ensembl Genome Browser (55) in pa dbSNP (angl. The Single Nucleotide Polymorphism Database) (56). Spremembe, ki so bile redko prisotne v zdravi populaciji in še niso bile opisane pri bolnikih, smo analizirali z *in silico* predikcijskimi orodji SIFT (57), PolyPhen-2 (58) in MutationTaster (59). Tako smo ocenili, ali bi spremembe lahko vplivale na funkcijo proteina in bile vzrok za klinično sliko.

REZULTATI

PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 52 bolnikov, ki so izpolnjevali vključitvene kriterije, prav tako pri njih niso bila prisotna stanja v nosečnosti, med porodom in po porodu, okužbe ali ostala stanja, ki bi lahko kasneje v življenju povzročile upad sluha. Glede na starost vključenih oseb je bila izključena tudi starostna izguba sluha. Razdelili smo jih na 2 skupini. V prvo smo vključili bolnike s prirojeno gluhostjo, ki so predstavljali 65,4 % vseh preiskovancev, v drugo skupino smo zbrali bolnike s progresivno izgubo sluha.

Bolniki s prirojeno izgubo sluha

V to skupino je bilo vključenih 34 bolnikov, ki so bili gluhi od rojstva. Povprečna starost v skupini je bila 11,0 let, saj so jo sestavljali večinoma mladoletniki (91,2 %). Oseb ženskega spola je bilo 20, moškega pa 14. Dva bolnika sta imela prisoten tudi avtizem, en bolnik pa razvojno zaostalost. Polžev vsadek sta imela 2 bolnika.

Bolniki s progresivno izgubo sluha

Skupino je sestavljalo 18 bolnikov, od katerih je bilo 7 moških in 11 žensk. Povprečna starost v skupini je bila 30,1 let, mladoletni bolniki so predstavljali slabo petino skupine (22,2 %). Polžev vsadek je imela le ena oseba, pri 3 pa je bila izguba sluha asimetrična.

REZULTATI GENETSKE ANALIZE *TMPRSS3*

V analizirani skupini bolnikov smo med 52 preiskovanci prepoznali eno vzročno spremembo v heterozigotnem stanju in 12 sprememb, ki niso povezane z izgubo sluha. Rezultati so povzeti v Tabeli XI in natančneje opisani v nadaljevanju, posebej za vsako skupino preiskovancev.

Tabela IX: Opredeljene spremembe v genu *TMPRSS3* pri preiskovancih z izgubo sluha (het. sprememba je prisotna v heterozigotni obliki, hom. sprememba je prisotna v homozigotni obliki); spremembe so poimenovane glede na referenčno zaporedje NP_076927.1 oz NM_024022.2. P, prirojena izguba sluha; N, napredujoča izguba sluha.

Zaporedna številka bolnika		Intron 1-2	Ekson 2	Ekson 3	Ekson 4	Ekson 5	Intron 5-6	Ekson 6	Ekson 8	Intron 10-11	UTR
1	P	/	/	/	p.Ala90Thr hom.	/	/	/	/	c.1049-59G>A het.	/
2	P	/	/	/	p.Ala90Thr hom.	/	/	/	/	c.1049-59G>A het.	/
3	P	/	/	/	p.Ala90Thr het.	p.Gly111Ser het.	/	p.Val151= het.	/	/	/
4	P	/	/	/	p.Ala90Thr het.	p.Gly111Ser het.	/	p.Val151= het.	/	/	/
5	P	/	/	/	/	p.Gly111Ser het.	/	p.Val151= het.	/	/	/
6	P	/	/	/	/	p.Gly111Ser het.	c.447-13A>G het.	/	c.617-3_617-2dup(TA) het., p.Ile253Val het.	/	/
7	P	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
8	P	/	/	/	p.Ala90Thr het.	p.Gly111Ser het.	/	p.Val151= het.	/	/	/
9	P	/	/	/	/	p.Gly111Ser het.	/	/	/	/	/
10	P	c.51-7G>A het.	/	/	/	/	/	p.Val151= hom.	/	/	/
11	P	/	/	/	/	p.Gly111Ser het.	/	p.Val151= hom.	/	/	c.*2G>A het.
12	P	/	/	/	/	p.Gly111Ser het.	/	/	/	/	/
13	P	/	/	/	/	p.Ser124= het.	/	p.Val151= het.	/	/	c.*2G>A het.

14	N	/	/	p.Val53Ile het.	/	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	/
15	P	/	/	/	/	p.Gly111Ser het.	/	p.Val151= het.	c.617-3_617- 2dup(TA) het., p.Ile 253Val het.	/	c.*2G>A hom.
16	P	/	/	p.Val53Ile het.	/	/	/	p.Val151= het.	/	/	/
17	P	/	/	/	/	/	c.447-13A>G hom.	p.Val151= het.	/	/	c.*2G>A hom.
18	P	/	/	p.Val53Ile hom.	/	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	c.*2G>A het.
19	P	/	/	/	/	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	c.*2G>A het.
20	P	/	/	/	/	p.Gly111Ser hom.	c.447-13A>G hom.	p.Val151= hom.	/	/	/
21	P	/	/	/	/	/	c.447-13A>G hom.	/	c.617-3_617- 2dup(TA) hom., p.Ile 253Val hom.	/	c.*2G>A het.
22	P	/	/	/	p.Ala90Thr het.	p.Gly111Ser het.	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	/
23	P	/	/	/	/	p.Gly111Ser het.	c.447-13A>G hom.	/	/	/	c.*2G>A het.
24	P	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
25	P	/	/	/	/	p.Gly111Ser het.	c.447-13A>G hom.	/	/	/	/
26	P	/	/	/	/	p.Gly111Ser het.	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	/
27	P	/	/	/	/	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	/
28	N	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

29	P	/	/	/	/	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	/
30	N	/	/	/	/	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	c.*2G>A het.
31	N	/	/	/	/	p.Gly111Ser het.	c.447-13A>G hom.	p.Val151= het.	c.617-3_617-2dup(TA) het.		c.*2G>A het.
32	N	/	/	/	/	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	c.*2G>A het.
33	N	/	/	/	/	p.Gly111Ser het.	/	/	/	/	/
34	P	/	/	/	/	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	/
35	N	/	/	/	/	/	c.447-13A>G hom.	p.Val151= het.	c.617-3_617-2dup(TA) het.	/	c.*2G>A hom.
36	N	/	/	/	/	/	c.447-13A>G hom.	/	c.617-3_617-2dup(TA) het.	/	/
37	N	/	/	/	/	p.Gly111Ser hom.	c.447-13A>G hom.	p.Val151= het.	/	/	/
38	P	/	/	/	/	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	/
39	N	/	/	/	/	/	c.447-13A>G hom.	p.Val151= hom.	/	/	c.*2G>A hom.
40	P	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
41	P	/	/	/	p.Ala90Thr het.	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.			c.*2G>A het.
42	N	/	/	/	p.Ala90Thr het.	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	/
43	N	/	/	/	/	p.Gly111Ser het.	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	/
44	P	/	/	p.Val53Ile het.	/	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	/
45	N	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
46	P	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

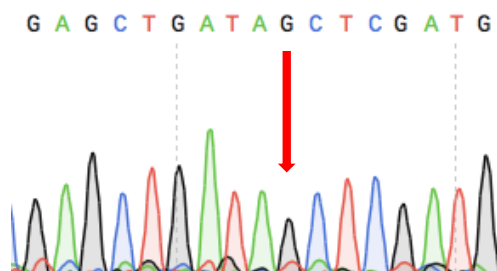
47	N	/	p.Ala11Asp het.	/	/	/	c.447-13A>G het.	/	c.617-3_617- 2dup(TA) het.	/	c.*2G>A het.
48	N	/	/	/	/	/	c.447-13A>G het.	p.Val151= het.	/	/	c.*2G>A het.
49	N	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
50	P	/	/	p.Val53Ile het.	/	/	/	/	/	/	/
51	N	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
52	N	/	/	/	p.His70ThrTer 19 het.	/	/	/	/	/	/

Rezultati genetske analize pri bolnikih s prirojeno izgubo sluha

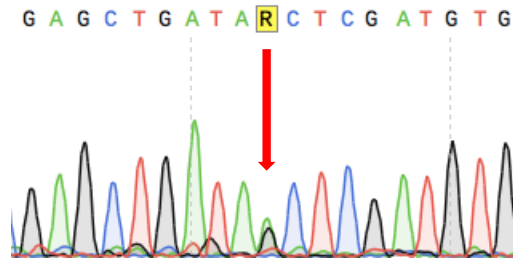
V skupini prirojeno gluhih preiskovancev smo prepoznali 11 sprememb v zaporedju gena *TMPRSS3*, od katerih nobena ni bila vzročna. Večina bolnikov je imela prisotnih več polimorfizmov naenkrat, še posebej p.Val151= in c.447-13A>G, pri 4 bolnikih (št. 7, 24, 40 in 46) pa nismo zaznali nobene spremembe v genskem zapisu. Celoten nabor najdenih sprememb v skupini prirojeno gluhih je prikazan v Tabeli XI. Pri 17 bolnikih so bile določene spremembe prisotne na obeh alelih. Med njimi sta bili 2 redkejši zamenjavi nukleotidov, ki smo ju pogledali podrobneje. Drugačnosmiselna sprememba p.Ala90Thr, kjer pride do zamenjave gvanina z adeninom na 268. mestu zaporedja (c.268G>A), je v bazi dbSNP zavedena pod oznako rs45598239 in je glede na podatke ExAC prisotna pri 3,3 % splošne populacije (MAF 0.0330/4002), v bazi ClinVar pa je zavedena kot benigna (RCV000039344.4), v bazi HGMD pa kot možno vzročna (CM054156). Našli smo jo pri 7 preiskovancih (št. 1, 2, 3, 4, 8, 22, 41), pri 2 sorodnih (št. 1 in 2) je bila v homozigotnem stanju. Rezultati, dobljeni z *in silico* orodji, so podani v Tabeli X.

Tabela X: Rezultati *in silico* orodij za spremembo p.Ala90Thr (c.268G>A).

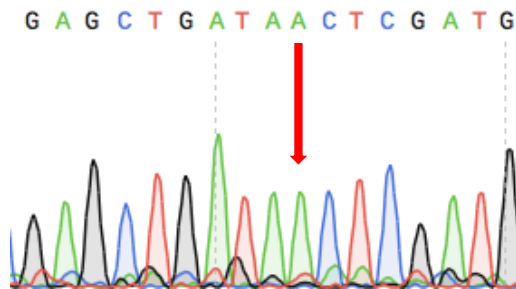
Mutation Taster	PolyPhen-2	SIFT
Polimorfizem (najverjetneje neškodljiv)	Verjetno škodljiva	Tolerirana
0,0468	0,960	0,68



Slika 6: Normalno nukleotidno zaporedje na mestu 268 kodirajočega zaporedja gena *TMPRSS3*.

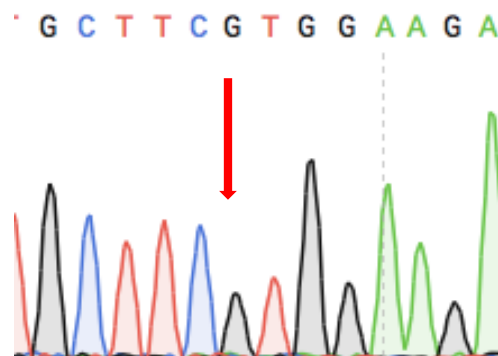


Slika 7: Sprememba p.Ala90Thr (c.268G>A) v genu *TMPRSS3* v heterozigotni obliki.

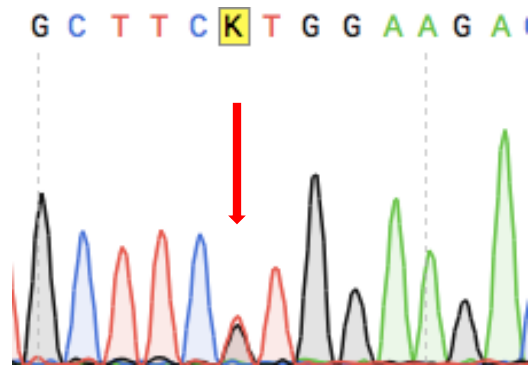


Slika 8: Sprememba p.Ala90Thr (c.268G>A) v genu *TMPRSS3* v homozigotni obliki.

Druga pogosta sprememba je enakosmiselna sprememba p.Ser124=, kjer pride do zamenjave gvanina z adeninom na 372. mestu (c.372G>T), ki pa ohrani kodon za serin. Gre za spremembo, ki je v bazi dbSNP zavedena pod oznako rs141682398 in zelo verjetno ni patološka, saj ne spremeni aminokislina. Glede na podatke ExAC je redko prisotna v splošni populaciji (MAF 0,00009). Prisotna je bila pri enem bolniku v heterozigotni obliki.



Slika 9: Normalno nukleotidno zaporedje na mestu 372 kodirajočega zaporedja gena *TMPRSS3*.



Slika 10: Sprememba p.Ser124= (c.372G>T) v genu *TMPRSS3* v heterozigotni obliki.

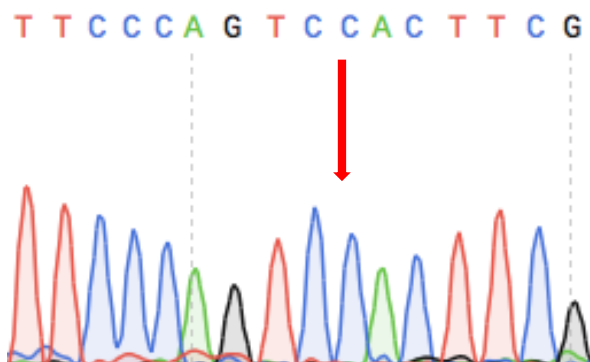
Tabela XI: Nabor genetskih sprememb, najdenih v skupini prirojeno gluhih bolnikov (kjer je mogoče, so spremembe so poimenovane na ravni cDNA (NM_024022.2) in na ravni aminokislinskega zaporedja (NP_076927.1); podatki o frekvenci redkejšega alela (MAF) so povzeti po bazi podatkov ExAC).

Genotip	Vrsta spremembe	MAF	Oznaka v bazi dbSNP	Število bolnikov	% (v skupini)	Število homozigotov
c.51-7G>A	intronska	0,05602	rs4920100	1	1,5 %	0
c.157G>A (p.Val53Ile)	drugačnosmiselna	0,07319	rs928302	4	7,4 %	1
c.268G>A (p.Ala90Thr)	drugačnosmiselna	0,033	rs45598239	7	13,2 %	2
c.331G>A (p.Gly111Ser)	drugačnosmiselna	0,09763	rs35227181	14	22,1 %	1
c.372G>T (p.Ser124=)	enakosmiselna	0,00009	rs141682398	1	1,5 %	0
c.453G>A (p.Val151=)	enakosmiselna	0,3694	rs2839501	22	38,2 %	4
c.447-13A>G	intronska	0,4877	rs8130564	16	30,9 %	5
c.617-3_617-2dup(TA)	sprememba bralnega okvirja	0,1232	rs34966432	3	5,9 %	1
c.757A>G (p.Ile253Val)	drugačnosmiselna	0,1627	rs2839500	3	5,9 %	1
c.1049-59G>A	intronska	0,015		2	2,9 %	0
c.*2G>A	intronska	0,2358	rs13047838	9	16,2 %	2

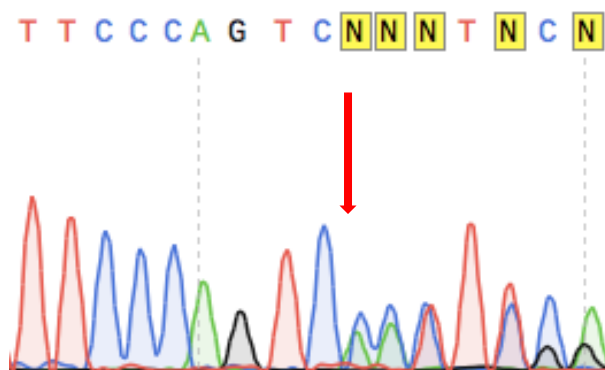
Rezultati genetske analize pri bolnikih z napredujočo izgubo sluha

V tej skupini smo med 18 preiskovanci zasledili 9 različnih sprememb, od katerih je bila ena znana vzročna sprememba. Večinoma so se spremembe pojavljale na samo enem alelu, v homozigotni obliki je bilo prisotnih 8 sprememb (Tabela IX). Tudi v tej skupini je bilo pri večini posameznikov prisotnih več polimorfizmov naenkrat. Pri 4 preiskovancih (št. 24, 45, 49, 51) nismo našli nobene spremembe v zapisu gena *TMPRSS3*. Vse najdene spremembe v skupini preiskovancev z napredujočo izgubo sluha smo zbrali v Tabeli XIII.

Najdena vzročna sprememba je bila enonukleotidna delecija citozina na 208. mestu (c.208del), ki povzroči premik bralnega okvirja, prezgodnjo vključitev terminalnega kodona in s tem zaustavitev prevajanja po osemnajstih aminokislinah (p.His70ThrTer19). Sprememba je opisana v bazi humanih sprememb HGMD (CD020353) kot vzročna (31,38,60). V bazi dbSNP je zavedena pod oznako rs727503493, v bazi ClinVar je označena kot patogena, po podatkih ExAC pa je prisotna pri 0,04 % populacije. Najdena je bila pri bolniku 52, v heterozigotni obliki.



Slika 11: Normalno nukleotidno zaporedje na mestu 208 kodirajočega zaporedja gena *TMPRSS3*.

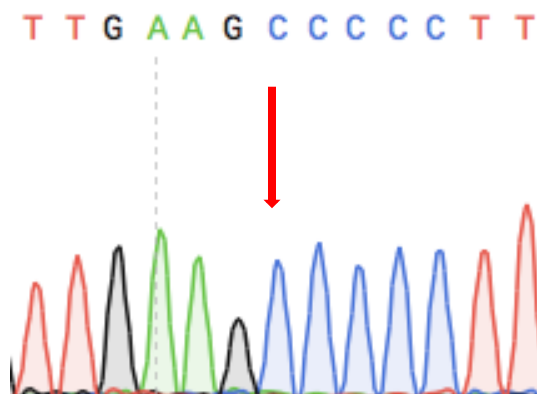


Slika 12: Sprememba p.His70ThrTer19 (c.208delC) v genu TMPRSS3 v heterozigotni obliki.

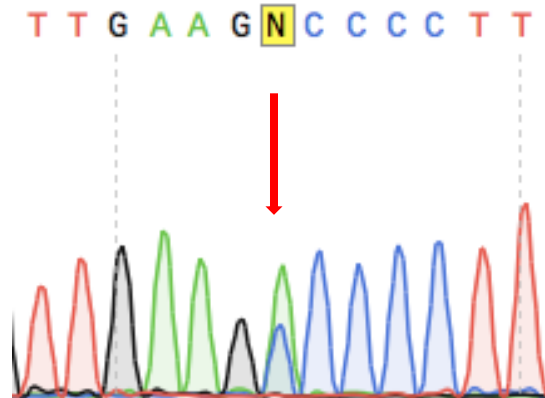
V tej skupini smo našli še eno spremembo v heterozigotni obliki, ki se v populaciji pojavlja v manj kot 1 %, in sicer zamenjavo citozina z adeninom c.32C>A, kar povzroči spremembo alanina v asparaginsko kislino na 11. mestu v aminokislinskem zaporedju (p.Ala11Asp). Sprememba je zavedena v bazi dbSNP pod oznako rs372629505, ni pa opisana pri bolnikih z izgubo sluha (baza HGMD). Glede na podatke ExAC pa je redko prisotna v splošni populaciji (0,00002). Da bi ovrednotili njen možen vpliv na razvoj izgube sluha, smo spremembo analizirali še z *in silico* predikcijskimi modeli, ki napovedujejo, da ni vzročna, rezultati so zbrani v Tabeli XII.

Tabela XII: Rezultati *in silico* orodij za spremembo p.Ala11Asp (c.32C>A).

Mutation Taster	PolyPhen-2	SIFT
Polimorfizem (najverjetnje neškodljiv)	Benigna	Tolerirana
0,9166	0,01	0,07



Slika 13: Normalno nukleotidno zaporedje na mestu 32 kodirajočega zaporedja gena TMPRSS3.



Slika 14: Sprememba p.Ala11Asp (c.32C>A) v genu *TMPRSS3* v heterozigotni obliki.

Tabela XIII: Nabor genetskih sprememb v skupini bolnikov z napredujočo izgubo sluha (spremembe so poimenovane na ravni cDNA (NM_024022.2) in na ravni aminokislinskega zaporedja (NP_076927.1); podatki o frekvenci redkejšega alela (MAF) so povzeti po bazi podatkov ExAC).

Genotip	Vrsta spremembe	MAF	Oznaka v bazi dbSNP	Število bolnikov	% (v skupini)	Število homozigotov
c.32C>A (p.Ala11Asp)	drugačnosmiselna	0.00002	rs372629505	1	2,8 %	0
c.157G>A (p.Val53Ile)	drugačnosmiselna	0,07319	rs928302	1	2,8 %	0
c.268G>A (p.Ala90Thr)	drugačnosmiselna	0,033	rs45598239	1	2,8 %	0
c.del208C (p.His70ThrTer19)	sprememba bralnega okvirja	0,00044	rs727503493	1	2,8 %	0
c.331G>A (p.Gly111Ser)	drugačnosmiselna	0,09763	rs35227181	4	13,9 %	1
c.453G>A (p.Val151=)	enakosmiselna	0,3694	rs2839501	10	30,6 %	1
c.447-13A>G	intronska	0,4877	rs8130564	12	44,4 %	4
c.617-3_617-2dup(TA)	sprememba bralnega okvirja	0,1232	rs34966432	4	11,1 %	0
c.*2G>A	intronska	0,2358	rs13047838	7	25,0 %	2

RAZPRAVA

Raziskava te magistrske naloge sledi že izvedeni raziskavi, ki je nakazala možnost za nepričakovano visoko prisotnost vzročnih sprememb v genu *TMPRSS3* v slovenski populaciji (25). S sekvenciranjem naslednje generacije sta bili prehodno spremembi c.208delC (p.His70ThrTer19) in c.579dupA (p.Cys194MetTer17) v genu *TMPRSS3* prepoznani kot vzrok za prirojeno izgubo sluha pri treh članih družine. Temu je sledila analiza teh dveh sprememb pri dodatnih 35 bolnikih s sensorinevralno izgubo sluha, brez znanega genetskega vzroka za bolezen in sumom na avtosomno recesivno dedovanje izgube sluha. Prepoznani so bili še trije dodatni bolniki (31). Glede na rezultate te predhodne raziskave je bila postavljena hipoteza, da so spremembe v genu *TMPRSS3* morda pomemben vzrok za genetsko izgubo sluha v Sloveniji. Zato smo zbrali 52 bolnikov, ki so imeli prirojeno ali progresivno sensorinevralno izgubo sluha, niso imeli znanega genetskega vzroka za bolezen in pri katerih je bila v družini postavljen sum na avtosomno recesivno dedovanje izgube sluha. Pri vseh preiskovancih so bile predhodno že izključene bolezenske spremembe v genih *GJB2* in *GJB6*, ki so pogostejši vzrok izgube sluha. V slovenski populaciji bolnikov so vzročne spremembe v genu *GJB2* namreč prisotne pri 26,6 % bolnikov s prirojeno izgubo sluha (46), v genih *GJB2* in *GJB6* pa pri 22,2 % bolnikov s progresivno izgubo sluha (45). V izbrani skupini bolnikov smo nato določili nukleotidno zaporedje celotne kodirajoče regije gena *TMPRSS3* z namenom prepoznati vzročne spremembe, ki bi lahko bile vzrok za klinično sliko.

Pri bolniku z izgubo sluha znan genetski vzrok pomeni postavitev genetske diagnoze, ki omogoča delno napoved prognoze in ustrenejše, personalizirano zdravljenje, s čimer se izognemo dodatnim analizam in posegom. Zato je pomembno, da opredelimo vzročne genetske spremembe in s tem omogočimo družini tudi ustrezno genetsko svetovanje, ki je pomembno za lažje razumevanje in soočanje z diagnozo, prav tako pa v nekaterih družinah pomembno vpliva na nadaljnje načrtovanje družine (62).

V slovenski populaciji bolnikov z nesindromsko izgubo sluha so vzroki izgube sluha, razen genov *GJB2* in *GJB6* (45,46), slabo raziskani. Poleg omenjene raziskave dveh vzročnih sprememb v genu *TMPRSS3* (31) je kot vzrok za nesindromsko izgubo sluha opisan še gen *ILDR* (48). Novejša referenca pa poroča o sindromskih in nesindromskih bolnikih z izgubo

sluha iz Slovenije in Bosne, kjer pa ni zavedeno, kateri geni so vzročni pri kateri populaciji (49).

PREISKOVANCI

Glede fenotipa sta med skupinama dve opazni razliki – prva je začetek gluhosti, ki je bila tudi povod za delitev na skupini, druga pa opazna razlika v povprečni starosti v obeh skupinah, kar je posledica zelo različnih obdobij, v katerih je bila pri preiskovancih izguba sluha klinično prepoznana. Skupina prirojeno gluhih je tudi opazno večja, vendar pa je v obeh razmerje med spoloma podobno.

REZULTATI GENETSKE ANALIZE

Nabor najdenih sprememb je bil v skupini bolnikov s prirojeno izgubo sluha in skupini s progresivno izgubo sluha precej podoben, saj je bila dobra polovica odkritih sprememb prisotna v obeh skupinah. Pri skupini prirojeno gluhih smo našli več različnih sprememb. V celotni skupini sta najpogosteje prisotni benigni spremembi p.Val151Val in c.447-13A>G, prva pri 26,9 %, druga pa pri 32,7 % vseh preiskovancev. To ni presenetljivo, saj sta spremembi opisani kot pogosto prisotni v splošni populaciji (po bazi ExAC je p.Val151Val prisotna pri 36,9 % populacije, c.447-13A>G pa pri 48,8 %) Prav tako sta ti dve spremembi največkrat prisotni hkrati pri istem bolniku. Pri ostalih spremembah nismo zaznali nobenega ponavljajočega vzorca kombinacij, zelo redko je bilo tudi, da je bila pri preiskovancu prisotna le ena sprememba.

Bolniki s prirojeno izgubo sluha

V tej skupini nismo opredelili nobene spremembe, ki bi bila vzrok za klinično sliko, niti v heterozigotni obliki. To je presenetljivo, saj je gen *TMPRSS3* znano povezan s prirojeno izgubo sluha (DFNB10) in smo glede na predhodne raziskave pričakovali, da bo pogost vzrok izgube sluha v preiskovani skupini bolnikov (25). Pri 35 slovenskih bolnikih s prirojeno izgubo sluha sta bili predhodno analizirani in dokazani le spremembi c.208delC in c.579dupA (25). V raziskavi so pri isti skupini bolnikov analizirali celotno kodirajočo regijo, kjer drugih vzročnih sprememb nismo odkrili. Mogoče je, da sta ti dve spremembi edini spremembi v genu

TMPRSS3, ki sta pogosteje prisotni pri slovenskih bolnikih. Za potrditev te trditve oziroma za opredelitev drugih potencialnih vzročnih sprememb v genu *TMPRSS3*, bi bilo potrebno analizirati večjo skupino bolnikov.

Smo pa v tej skupini bolnikov našli spremembo p.Ala90Thr, ki je v starejši literaturi pogosto klasificirana kot možno bolezenska sprememba (5,33,41,42), v bazah, kjer so podatki novejši (ClinVar) pa je nedvoumno opredeljena kot benigna (54). Nahaja se v četrtem eksonu, kjer pride do zamenjave gvanina z adeninom na 268. mestu kodirajočega zaporedja, zaradi česar pride do spremembe alanina v treonin. V tej skupini preiskovancev je bila v heterozigotni obliki prisotna pri 13,2 %, v homozigotni obliki pa smo jo našli pri dveh sestrah (bolnici 1 in 2). p.Ala90Thr je sprememba, ki se nahaja v domeni LDLRA in sodeluje pri vezavi kalcija v koordinacijsko mesto, s čimer prispeva k strukturalni integriteti proteina. Teoretično naj bi sprememba v domeni LDLRA proteina *TMPRSS3* povzročila pomanjkanje Ca^{2+} ionov, kar naj bi vodilo v odsotnost funkcionalnosti proteina (33), vendar pa je glede na bazo ClinVar klasificirana kot benigna. Dodatna napoved vzročnosti z *in silico* bioinformacijskimi orodji je dala nasprotujoče si rezultate – z rezultatom 0,68 je SIFT predvidel, da sprememba ni škodljiva (velja, da je sprememba vzročna, če je rezultat pod 0,05), Polyphen2 jo je uvrstil med verjetno patogene, Mutation Taster pa med spremembe, ki ne vplivajo na funkcijo proteina (Tabela X). Kljub temu je sprememba dokaj pogosto prisotna v splošni populaciji (3,3 % po podatkih ExAC). Tudi v več raziskavah se je izkazalo, da je p.Ala90Thr pogosto prisotna pri zdravih kontrolah in da ni dokaza, da neposredno vpliva na funkcijo *TMPRSS3* (5,54). Zato jo uvrščamo med benigne spremembe in ne moremo trditi, da je vzročna pri teh dveh posameznikah .

Med prisotnimi spremembami so bile tudi tri, ki niso bile prisotne v skupini bolnikov s progresivno izgubo sluha. p.Ser124= je bila prisotna pri enem bolniku (št. 13), in ima sicer nizko pojavnost med populacijami, vendar pa je enakosmiselna sprememba, ki ne vpliva na funkcijo proteina. p.Ile253Val je znana sprememba v katalitični domeni proteina, ki dokazano ne vpliva na proteolitično funkcijo proteina (28), v visokem deležu pa se pojavlja tudi pri drugih preiskovanih populacijah (Tabela XIV). V slovenski populaciji smo jo zasledili pri 3 preiskovancih (št. 6, 15 in 21), v homozigotni obliki je bila prisotna pri enem (št. 21).

Tabela XIV: Pogostost spremembe p.Ile253Val v genu *TMPRSS3* v različnih populacijah (heterozigotno ali homozigotno stanje).

Populacija	% v celotni populaciji	Literatura
Maroko	7,5	(33)
Avstralija	12,5	(33)
Španija	11	(33)
Grčija	9,5	(33)
Italija	12	(33)
Južna Koreja	1,5	(65)
Slovenija	5,8	(ta raziskava)
Pakistan	Prisotna, vendar ni podatka	(33)
Severna Amerika	Prisotna, vendar ni podatka	(33)
Tunizija	Prisotna, vendar ni podatka	(34)

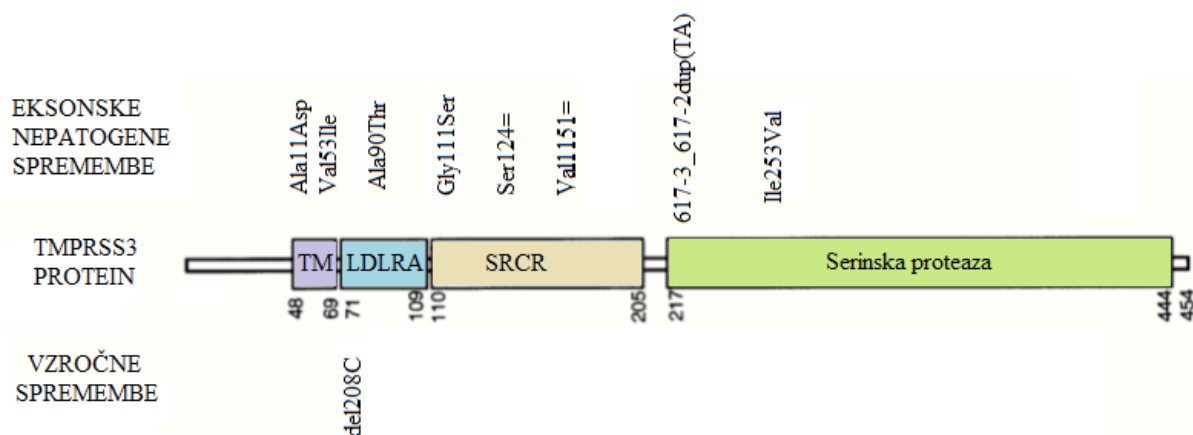
Zadnja sprememba, ki je bila prisotna samo v tej skupini, je bila c.1049-59G>A. Njena pojavnost v populaciji je sorazmerno nizka, 1,5 % glede na podatke v bazi ExAC, vendar še vedno previsoka, da bi bila verjeten vzrok za gluhost. Prav tako se nahaja globoko v intronski regiji in je zato manj verjetno, da vpliva na izrezovanje intronov. *In silico* orodje Mutation Taster je dalo rezultat 0,9999 in predvidelo, da je sprememba z visoko zanesljivostjo najverjetneje neškodljiv polimorfizem. Pri preiskovancih 1 in 2 je bila prisotna samostojno v heterozigotnem stanju, zato v tem primeru ne bi mogla biti vzrok izgube sluha.

Bolniki z napredujočo izgubo sluha

Tudi v tej skupini nismo pri nobenem bolniku dokončno opredelili genetskega vzroka bolezni. Tudi to je presenetljivo, saj ta skupina bolnikov pred tem ni bila testirana niti za spremembi c.208delC in c.579dupA, kot skupina z prirojeno gluhostjo. Edina vzročna sprememba, ki smo jo dokazali, je bila c.208delC v heterozigotni obliki pri bolniku 52. Vendar ta sprememba samostojno v heterozigotnem stanju ne more biti vzrok gluhosti, saj se tudi postlingvalna gluhost zaradi sprememb v genu *TMPRSS3* (DFNB8) deduje avtosomno recesivno. Spremembe na drugem alelu z uporabljenim pristopom nismo odkrili. Vzročne spremembe se morda nahajajo v regijah, ki jih z uporabljeno metodo nismo analizirali (globoke intronske regije,

Med bolniki z napredujočo izgubo sluha je bila prisotna tudi sprememba p.Ala11Asp, ki se ni pojavljala v prejšnji skupini. Gre za spremembo alanina v asparaginsko kislino čisto na začetku proteina, saj pride do zamenjave citozina z adeninom na 32. mestu v kodirajočem zaporedju (c.32C>A). Prisotna je bila pri enem preiskovancu v heterozigotni obliki, v populaciji pa se pojavlja pri manj kot 1 % posameznikov, kot smo zasledili v podatkovni bazi ExAC. Našli smo jo v dveh podatkovnih bazah, v Ensembl in LOVD, kjer je klasificirana kot benigna. V literaturi se ne pojavlja in ni dovolj raziskana, da bi lahko trdili, da kakorkoli vpliva na zgradbo ali funkcijo proteina (55,62). *In silico* orodje Mutation Taster z rezultatom 0,9166 zanesljivo napoveduje, da je sprememba neškodljiv polimorfizem; PolyPhen-2 z rezultatom 0,01 napoveduje, da je sprememba benigna, pri čemer velja, da je sprememba vzročna, če se vrednosti približujejo 1; orodje SIFT pa z rezultatom 0,07 napoveduje, da je sprememba tolerirana (sprememba je vzročna, če so vrednosti nižje od 0,05).

Spremembe, prisotne v obeh skupinah



Slika 16: Najdene spremembe v genu *TMPRSS3*, razdeljeni po domenah (povzeto po (28)).

Med najpogostejšimi ponavljajočimi spremembami sta p.Gly111Ser in p.Val151=. Obe sta potrjeno nepatogeni, saj dokazano ne vplivata na proteolitično aktivnost proteina *TMPRSS3* (28,33), obenem pa sta prisotni pri prevelikem deležu populacije, da bi povzročali gluhost. Deleži ostalih najdenih pogostih sprememb so podani v Tabeli XV.

Tabela XV: Prisotni znani eksonski polimorfizmi v genu *TMPRSS3* v celotni skupini bolnikov z izgubo sluha. Podatki o frekvenci redkejšega alela (MAF) so povzeti po bazi podatkov ExAC.

Polimorfizem	Domena	% v preiskovani skupini	Druge populacije	MAF	Literatura
p.Val53Ile	TM	5,8	Maroko, Velika Britanija, Južna Koreja	0,0732	(5,33,35,64)
p.Gly111Ser	SRCR	19,2	Maroko, Velika Britanija	0,0976	(5,33)
p.Val151=	SRCR	35,6	Maroko, Velika Britanija, Južna Koreja	0,3694	(5,33,64)
c.617-3_617-2dup(TA)	Katalitična	7,7	Južna Koreja	0,1232	(35)
p.Ile253Val	Katalitična	3,8	Maroko, Tunizija, Južna Koreja	0,1627	(33,34,64)

Poleg že omenjenih, smo našli tudi štiri intronske spremembe, c.51-7G>A, c.447-13A>G, c.1049-59G>A in c.*2G>A. Razen zadnje, v literaturi niso opisane, vendar so vse v populaciji prisotne v dovolj velikem deležu, da jih lahko uvrstimo med polimorfizme in tako med nepatogene spremembe (35).

Če povzamemo, eno znano bolezensko spremembo smo našli samo v skupini bolnikov z napredujočo gluhostjo na enem alelu. Zato lahko rečemo, da v celotni preiskovani populaciji vzročne spremembe v genu *TMPRSS3* niso pogost vzrok za izgubo sluha. V raziskavi, ki je bila predhodno izvedena v Sloveniji na skupaj 38 prirojeno gluhih posameznikih, je bila sprememba c.208delC prisotna pri petih preiskovancih, kar predstavlja 13,1 % skupine (31). Ta delež je izjemno visok za pripadnike bele rase, saj velja, da naj bi bile spremembe v genu *TMPRSS3* vzrok za manj kot 1 % gluhosti pri Kavkazijcih (38). Če rezultate te raziskave in prejšnje združimo, delež bolnikov pade na 10,3 %, kar je primerljivo s populacijama Tunizije in Južne Koreje, ter še zmeraj nadpovprečno visoko za državo pretežno bele rase (34,35,38). Vzrok za relativno pogostost je prisotnost le dveh vzročnih sprememb, c.208delC in c.579dupA (31), slednja je bila v tej raziskavi prisotna le pri enem bolniku v heterozigotni obliki. Tudi z razširitvijo analize na celotne kodirajoče regije gena tega nabora nismo povečali. Za opredelitev

potencialnih drugih vzročnih sprememb v genu *TMPRSS3* bi bilo potrebno analizirati večjo skupino bolnikov.

POMEN TESTIRANJA SPREMEMB V GENU *TMPRSS3*

Kot že omenjeno, je dobra polovica vzrokov izgube sluha genetskega izvora, zato je genetsko testiranje gluhih oseb pomemben korak pri postavitvi diagnoze. Določene diagnoze lahko pomenijo tudi boljše prognoze pri zdravljenju, kot z recimo električno akustično stimulacijo. EAS je eden izmed načinov amplifikacije sluha, ko izguba še ni popolna. Je kombinacija terapije z vstavitvijo polževega vsadka in akustične stimulacije, kar (odvisno od posameznika) omogoči signifikantno izboljšanje sluha (65). Gluhe osebe z bolezenskimi spremembami v *TMPRSS3* se na EAS zelo dobro odzivajo, kar pomeni velik korak k lažji prepoznavi kandidatov za EAS in personaliziranemu zdravljenju (42).

Ker točne vloge proteina *TMPRSS3* v notranjem ušesu še ne poznamo, nam lahko fenotipi, povezani s specifičnimi spremembami omogočijo tudi boljše razumevanje sluha na molekularnem nivoju. Prav tako nam postavitev boljše diagnoze in prognoze za bolnika olajša tudi morebitne psihološke posledice pri obolelih posameznikih, saj se je ob pravi diagnozi tudi lažje soočiti z izgubo sluha pri sebi ali sorodniku. Prinese pa tudi olajšanje ob dejstvu, da za izgubo sluha ni krivo potencialno napačno ravnanje v nosečnosti ali po njej (na primer cepljenje matere ali otroka) (62).

Odkritje čimvečjega spektra vzročnih sprememb pa je pomembno tudi pri morebitni vzpostavitvi presejalnega sistema, še posebej v državah, kjer je delež genskih okvar v *TMPRSS3* višji. Olajšana bi bila tudi diagnostika pri posameznikih, kjer je testiranje sluha oteženo - na primer pri novorojenčkih ali mentalno prizadetih odraslih. Hkrati lahko s tem izboljšamo tudi kakovost genetskega svetovanja pri nesindromski prirojeni ali napredujoči izgubi sluha, saj z odkritjem vzročne spremembe lahko najdemo izvor izgube sluha in opredelimo tveganje za prenos na potomce. Z učinkovito uporabo genetskih analiz in svetovanj pa bi izboljšali tudi ozaveščanje o koristnosti genetskega svetovanja med bolniki in njihovimi sorodniki (66).

Glede na rezultate te in predhodne raziskave, bi bilo morda smiselno premisliti o uvedbi analize pogoste spremembe c.208delC v genu *TMPRSS3* pri bolnikih z izgubo sluha in to kot preiskavo

prvega izbora, sočasno z analizo gena *GJB2*. Trenutno namreč genetska analiza pri bolnikih z izgubo sluha na Pediatrični kliniki že poteka stopenjsko. V prvi fazi se analizirata gena *GJB2* in *GJB6*, potem pa se po presoji napotnega zdravnika preiskave razširijo na sekvenciranje naslednje generacije, kjer se analizira 111 genov povezanih s sindromskimi in nesindromskimi oblikami izgube sluha.

ZAKLJUČKI

Na podlagi opravljenega dela in dobljenih rezultatov smo prišli do naslednjih sklepov:

- V izbrani skupini 52 bolnikov s sumom na avtosomno recesivno dedovanje izgube sluha in še neprepoznanim vzrokom bolezní smo analizirali spremembe v kodirajoči regiji gena *TMPRSS3* s sekvenciranjem po Sangerju in odkrili nabor znanih sprememb. Novih neodkritih sprememb nismo opredelili.
- Poleg ene vzročne spremembe (c.208delC) smo pri bolnikih prepoznali nabor sprememb, ki pri preiskovancih ne vplivajo na sluh (c.51-7G>A, p.Ala11Asp, p.Val53Ile, p.Ala90Thr, p.Gly111Ser, p.Ser124=, p.Val151=, c.447-13A>G, c.617-3_617-2dup(TA), p.Ile253Val, c.1049-59G>A in c.*2G>A). Delež vzročnih sprememb je bil izredno majhen, saj je bila prisotna le ena (c.208delC) pri enem bolniku. To je manj, kot smo pričakovali in zato ni bilo mogoče preveriti povezave med genotipom in fenotipom bolnikov glede na vrsto izgube sluha (prirojena ali progresivna izguba sluha).
- Celokupen delež bolnikov, ki niso imeli prisotnih drugih vzročnih sprememb, so imeli avtosomno recesivno podedovano izgubo sluha ter in imajo prisotne vzročne spremembe iz te in iz predhodne raziskave v genu *TMPRSS3* je v Sloveniji 10,3 %, To je mnogo več od splošnega povprečja v kavkaški rasi, ki je 0,38 %.
- Glede na rezultate te in predhodne raziskave bi bilo smiselno premisliti o uvedbi analize pogoste spremembe c.208delC v genu *TMPRSS3* pri bolnikih z izgubo sluha kot preiskavo prvega izbora, sočasno z analizo gena *GJB2*. Analiza celotnega gena *TMPRSS3* pa verjetno ni smiselna.

Glede na predhodne analize omejenega števila bolnikov smo v hipotezi predpostavili, da so bolezenske spremembe v genu *TMPRSS3* pogost vzrok za izgubo sluha v slovenski populaciji bolnikov. V nalogi nismo prepoznali dodatnih bolnikov, pri katerih bi bile te spremembe vzrok za izgubo sluha. Vseeno je celokupen delež bolnikov z izgubo sluha v Sloveniji iz te in iz predhodne raziskave in s prisotno vzročno spremembo v genu *TMPRSS3* 10,3 %, kar je več kot

je splošno povprečje v kavkazijski rasi. Povezave genotipa s fenotipom glede na rezultate nismo mogli ovrednotiti, zato ta del hipoteze ni bil potrjen.

LITERATURA

1. Shafique S, Sidiqqi S, et al: Genetic spectrum of autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Pakistani families. *PLoS ONE* 2014; 9(6): e100146.
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>, dostopno: marec 2018
3. <http://hereditaryhearingloss.org>, dostopno: december 2017.
4. Gasparini P, Rabionet R, et al: High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Eur J Hum Genet* 2000; 8:19-23.
5. Hutchin T, Coy NN, et al: Assessment of the genetic causes of recessive childhood non-syndromic deafness in the UK – implications for genetic testing. *Clin Genet* 2005; 68: 506-512.
6. <http://www.zveza-gns.si/o-zvezi/o-gluhoti/>, dostopno: december 2017.
7. Roberts D: *Signals and perception: The fundamentals of human sensation*. Palgrave, New York 2002: 1-13.
8. Tekin M, Arnos KS, Pandya A: Advances in hereditary deafness. *Lancet* 2001; 35: 1082-1090.
9. Dalos P: The active cochlea. *J Neurosci* 1992; 12: 4575-4585.
10. Berne & Levy: *Physiology*, 6th ed. Mosby Elsevier, Canada 2010: 123-57.
11. Kandel E, Schwartz JH, et al: *Principles of neural science*, 3rd ed. Appleton&Lange 1991: 481-98.
12. <http://www.cochlea.eu/en/cochlea/cochlear-fluids>, dostopno: marec 2017.
13. Elliott SJ, Shera CA: The cochlea as a smart structure. *Smart Matter Struct.* 2012; 21(6): 064001.
14. Shin-ya N, Mitsuru H, et al: Gene expression profiles of the cochlea and vestibular endorgans: localization and function of genes causing deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2015; 124 (5S): 6S-48S.

15. Hibino H, Kurachi Y: Molecular and physiological bases of the K⁺ circulation in the mammalian inner ear. *Physiology* 2006; 21: 336-345.
16. Fasquelle L, Scott HS: *Tmprss3*, a transmembrane serine protease deficient in human DFNB8/10 deafness, is critical for cochlear hair cell survival at the onset of hearing. *J Biol Chem* 2011; 286 (19): 17383-17397.
17. Rivolta MN: New strategies for the restoration of hearing loss: challenges and opportunities. *Br Med Bull* 2013; 105: 69-84.
18. Booth JB: *Otology*, 5th ed. Scott-Brown Otorinolaringology. Butterworths, London 1987.
19. Hilgert N, Smith RJH, Van Camp G: Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analysed in DNA diagnostics?. *Mutat Res* 2009; 681 (2-3): 189-196.
20. Koffler T, Ushakov K, Avraham KB: Genetics of hearing loss – syndromic. *Otolaryngol Clin North Am* 2015; 48 (6): 1041-1061.
21. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/nonsyndromic-hearing-loss#genes>, dostopno: februar 2018.
22. Kelsell, D.P., et al., Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 1997. 387(6628): p. 80-3.
23. Birkenhäger R, Aschendorf A, et al: Nicht-syndromale hereditäre Schwerhörigkeiten. *Laryngo Rhino Otol* 2007; 86: 299-313.
24. Nance WE: The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2003; 9: 109-119.
25. Hasson T, Gillespie PG, et al: Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J Cell Biol* 1997; 137(6): 1287-1307.
26. Guipponi M, Toh MY, et al: An integrated genetic and functional analysis of the role of type II transmembrane serine proteases (TMPRSSs) in hearing loss. *Hum Mutat* 2008; 29(1): 130-141.
27. Ahmed ZM, Li XC, et al: Characterization of a new full length *TMPRSS3* isoform and identification of mutant alleles responsible for nonsyndromic recessive deafness in Newfoundland and Pakistan. *BMC Med Genet* 2004; 5: 24.

28. Lee YJ, Park D, et al: Pathogenic mutations but not polymorphisms in congenital and childhood onset autosomal recessive deafness disrupt the proteolytic activity of *TMPRSS3*. *J Med Genet* 2003; 40: 629-631.
29. Guipponi M, Vuagniaux G, et al: The transmembrane serine protease (*TMPRSS3*) mutated in deafness DFNB8/10 activates the epithelial sodium channel (ENaC) *in vitro*. *Hum Mol Genet* 2002; 11(23): 2829-2836.
30. Hanukogen I, Hanukogen A: Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure – function, tissue distribution and associated inherited diseases. *Gene* 2016; 579(2): 95-132.
31. Battelino S, Klančar G, et al: *TMPRSS3* mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015.
32. Weegerink NJD, Schraders M, et al: Genotype-phenotype correlation in DFNB8/10 families with *TMPRSS3* mutations. *J Assoc Res Otolaryngol* 2011; 12:753-766.
33. Charif M, Abidi O, et al: Molecular analysis of the *TMPRSS3* gene in Moroccan families with non-syndromic hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 419: 643-647.
34. Masmoudi S, Antonarakis SE, et al: Novel missense mutations of *TMPRSS3* in two consanguineous Tunisian families with non-syndromic autosomal recessive deafness. *Hum Mutat* 2001; 18: 101-108.
35. Chung J, Park SM, et al: A novel mutation of *TMPRSS3* related to milder auditory phenotype in Korean postlingual deafness: a possible future implication for a personalized auditory rehabilitation. *J Mol Med* 2014; 92(6): 651-663.
36. Lee K, Khan S, et al: Novel *TMPRSS3* variants in Pakistani families with autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *Clin Genet* 2012; 82(1): 56-63.
37. Elbracht M, Senderek J, et al: Autosomal recessive postlingual hearing loss (DFNB8): compound heterozygosity for two novel *TMPRSS3* mutations in German siblings. *J Med Genet* 2007; 44: e81.
38. Wattenhofer M, Di Lorio MV, et al: Mutations in *TMPRSS3* gene are a rare cause of childhood nonsyndromic deafness in Caucasian patients. *J Mol Med* 2002; 80: 124-131.
39. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>, dostopno: oktober 2017.

40. Molina L, Fasquelle L, et al: *Tmprss3* loss of function impairs cochlear inner hair cell *Kcna1* channel membrane expression. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 1289-1299.
41. Fan D, Zhu W, et al: Identification of a novel homozygous mutation, *TMPRSS3*: c.535G>A, in a Tibetan family with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *PLoS ONE* 2014; 9(12): e114136.
42. Miyagawa M, Shin-ya N, et al: The patients associated with *TMPRSS3* mutations are good candidates for electric acoustic stimulation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2015; 124(5): 193-204.
43. Wattenhofer M, Sahin-Calapoglu N, et al: A novel *TMPRSS3* missense mutation in a *DFNB8/10* family prevents proteolytic activation of the protein. *Hum Genet* 2005; 117: 528-535.
44. Zhao HB, Kikuchi T, et al: Gap junctions and cochlear homeostasis. *J Membr Biol* 2006; 209: 177-186.
45. Battelino S, Repič Lampret B, et al: Novel connexin 30 and connexin 26 mutational spectrum in patients with progressive sensorineural hearing loss. *J Laryngol Otol* 2012; 126:763-769.
46. Battelino S, Rudolf G, et al: Connexin 26 (*GJB2*) and connexin 30 del(*GJB6-D13S1830*) mutations in Slovenians with prelingual non-syndromic deafness. *Int Adv Otol* 2011; 7(3): 372-378.
47. Borck G, Ur Rehman A, et al: Loss-of-function mutations of *ILDR1* cause autosomal-recessive hearing impairment *DFNB42*. *Am J Hum Genet* 2011; 88: 127-137.
48. Kovač J, Klančar G, et al: Discovering the unexpected with the utilization of NGS in diagnostics of non-syndromic hearing loss disorders: The family case of *ILDR1*-dependent hearing loss disorder. *Front Genet* 2017; 8:95.
49. Likar T, Hasanhodžič M, et al: Diagnostic outcomes of exome sequencing in patients with syndromic or non-syndromic hearing loss. *PLoS ONE* 2018; 13(1): e0188578.
50. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4401661.pdf>, dostopno: november 2017.
51. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch, dostopno: november 2017.
52. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64699>, dostopno: november 2017.

53. <http://deafnessvariationdatabase.org>, dostopno: november 2017.
54. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, dostopno: november 2017.
55. <https://www.ensembl.org/index.html>, dostopno: november 2017.
56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, dostopno: november 2017.
57. http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html, dostopno: marec 2018.
58. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, dostopno: marec 2018.
59. www.mutationtaster.org, dostopno: marec 2018.
60. Leochowicz U, Gambin T, et al: Iterative Sequencing and Variant Screening (ISVS) as a novel pathogenic mutations search strategy - application for *TMPRSS3* mutations screen. *Sci Rep* 2017; 7(1): 2543.
61. http://databases.lovd.nl/whole_genome/variants/, dostopno: marec 2018.
62. Pandya A, Arnos KS: Genetic evaluation and counseling in the context of early hearing detection and intervention. *Semin Hear* 2006; 27: 205-212.
63. Shearer AE, Eppsteiner RW, et al: Utilizing ethnic-specific differences in minor allele frequency to recategorize reported pathogenic deafness variants. *Am J Hum Genet* 2014; 95(4): 445-453.
64. Lee J, Baek JI, et al: Genetic analysis of *TMPRSS3* gene in the Korean Population with autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Gene* 2013; 532(2): 276-280.
65. <http://www.medel.com/eas-how-eas-works/>, dostopano: januar 2018.
66. Mercer D: Guidelines for audiologists on the benefits and limitations of genetic testing. *Am J Audiol* 2015; 24: 451-461.