

# Genetička etiologija oštećenja sluha u hrvatskoj kod osoba negativnih na varijante u GJB2

Ivona Sansović<sup>1,2,3,4</sup>, Ana-Maria Meašić<sup>1,3,4</sup>, Adriana Bobinec<sup>1,3,4</sup>,  
Morana Mikloš<sup>1,3,4</sup>, Ljubica Odak<sup>1,3,4</sup>, Katarina Vulin<sup>1,3,4</sup>

*Cilj:* izvijestiti o spektru i učestalosti klinički važnih varijanti otkrivenih u 66 GJB2-negativna bolesnika s nesindromskim i 39 bolesnika sa sindromskim oštećenjem sluha kojima je genetičko testiranje napravljeno u Klinici za dječje bolesti Zagreb u razdoblju od travnja 2019. do prosinca 2024.

*Metode:* Metoda višestrukog umnažanja vezanih sonda korištena je za analizu varijanti broja kopija u genima STRC i OTOA kod 49 bolesnika s nesindromskim oštećenjem sluha. Sekvenciranje kliničkog egzoma provedeno je u bolesnika negativnih na bialelne varijante GJB2, GJB6, OTOA i STRC te bolesnika sa sindromskim oštećenjem sluha, ukupno njih 60.

*Rezultati:* bialelne varijante u genima STRC i OTOA nisu otkrivene vjerojatno zbog male ispitne grupe i ograničenja primijenjenih metoda. Analizom kliničkog egzoma u osam ispitanika s nesindromskim oštećenjem sluha otkrivena su tri autosomno dominantna oblika: DFNA8/12, DFNA11 i DFNA2A i tri autosomno recesivna oblika: DFNB23/Usherov sindrom tip 1F, DFNB8/10 i DFNB3. U 29 ispitanika sa sindromskim oštećenjem sluha otkriveno je 35 različitih varijanti u 21 genu, od kojih su dvije u genima SIX1 i CHD7 novoopisane. Nađeno je 19 različitih sindroma povezanih s oštećenjem sluha. 27.5 % (8/29) pozitivnih bolesnika sa sindromskim oštećenjem sluha imalo je Usherov sindrom tip 2A s varijantom c.11864G>A nađenoj u 62,5 % (5/8) bolesnika.

*Zaključak:* Visoka zastupljenost varijante c.11864G>A u našoj populaciji vjerojatno je posljedica učinka osnivača. S obzirom na vrlo heterogenu etiologiju oštećenja sluha, dijagnostika mu je vrlo složena i izazovna pogotovo u složenim sindromskim oblicima gdje promjene u različitim genima u istog bolesnika mogu doprinijeti oštećenju sluha odnosno njegovim ostalim kliničkim obilježjima.

**Ključne riječi:** GUBITAK SLUHA; SEKVENCIRANJE EGZOMA; MULTIPLEKSNA LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE; VARIJACIJE BROJA KOPIJE DNK

<sup>1</sup>Klinika za dječje bolesti Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za medicinsku i laboratorijsku genetiku, endokrinologiju i dijabetologiju s dnevnom bolnicom, Klaićeva 16, 10000 Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup>Zdravstveno veleučilište Zagreb, Mlinarska cesta 38, 10000 Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup>Znanstveni centar izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 2, Zagreb, Hrvatska

<sup>4</sup>član ERN ITHACA mreže

## UVOD

U oblikovanje i funkcioniranje slušnog aparata uključeno je oko 1000 gena stoga je etiologija oštećenja sluha (OS) vrlo heterogena. Smatra se da su genetički čimbenici uzrokom 60 % kongenitalnog OS, od toga nesindromsko oštećenje sluha (NOS) čini 70 % slučajeva, a sindromsko 30 % (1, 2). Sindromsko OS (SOS) je udruženo s malformacijama vanjskog uha te strukturnim i funkcijskim malformacijama drugih organskih sustava dok je NOS izolirani oblik koji može biti udružen s abnormalnostima srednjeg i unutarnjeg uha (2). NOS je u pravilu zamjedbeno, a nasljeđuje se u ~80 % slučajeva autosomno recesivno (AR), u ~15 % autosomno dominantno (AD), ~1 % pripada X - vezanom te ~1 % mitohondrijskom tipu nasljeđivanja. Nesindromsko kongenitalno OS karakterizira ekstremna genetička heterogenost. Do danas je poznato 157 gena povezanih s NOS, od kojih su 64 povezana s AD lokusima oznake DFNA, 88 s AR lokusima oznake DFNB, sedam ih se nasljeđuje spolno vezano, a devet gena je povezano s mitohondrijskim tipom nasljeđivanja (3). Najčešći uzrok teškog do potpunog AR oblika NOS (DFNB) su patogene varijante u genu *GJB2* (ili DFNB1A oblik gluhoće, MIM#220290), a blagog do umjerenog DFNB su patogene varijante u genu *STRC* (4,5). DFNA8/12 (MIM#601543) uzrokovana patogenim varijantama gena *TECTA* čini oko 5 % AD NOS (DFNA) i stoga je među najčešćim uzrocima AD OS. (4,6). Većina AD lokusa uzrokuje postlingvalno progresivno OS uz rijetke iznimke u kojima je gubitak sluha prelingvalan (npr. DFNA3 i DFNA8/12). Najveći broj sindroma kod kojih se javljaju naglušost ili gluhoća su monogenski, dok su neki uzrokovani kombiniranim učinkom više gena i vanjskih čimbenika (multifaktorski). Ushe-rov sindrom je najčešći tip AR oblika SOS dok je Waardenburgov sindrom najčešći AD sindrom s kongenitalnim zamjedbenim OS (2).

Ova je studija nastavak naše prethodne studije o NOS u Hrvatskoj (7). U odnosu na prethodnu studiju ova studija je obuhvatila i bolesnike sa SOS te su ispitane i varijante broja kopija (CNV, engl. *copy number variants*) u genima *STRC* i *OTOA* metodom višestrukog umnažanja vezanih sonda (MLPA, engl. *multiplex ligation-dependent probe amplification*) kod osoba negativnih na DFNB1A oblik gluhoće. Studija Shearer i sur. (2014) na 686 bole-

snika je pokazala da su CNV-i pridonijeli genetičkoj dijagnozi NOS-a u 15.2 % bolesnika (8). Od toga su CNV-i u genu *STRC* činili dvije trećine otkrivenih CNVs, a oni u *OTOA* 13 % CNV-a. Ovi rezultati naglašavaju važnost testiranja CNV-a u genima *STRC* i *OTOA*.

Cilj studije je bio izvijestiti o spektru i učestalosti klinički važnih varijanti otkrivenih u 105 nesrodnih bolesnika s OS kojima je genetičko testiranje napravljeno u Klinici za dječje bolesti Zagreb u razdoblju od travnja 2019. do prosinca 2024. Iz ove studije su isključeni bolesnici s NOS koji su imali dokazanu DFNB1A gluhoću jer su oni bili predmet istraživanja naših prethodnih studija (7, 9).

## ISPITANICI I METODE

### Ispitanici

Analizirali smo 132 nesrodnih bolesnika iz Hrvatske upućenih na genetičko testiranje izoliranog tj. NOS i SOS u Zavod za medicinsku i laboratorijsku genetiku, endokrinologiju i dijabetologiju s dnevnim bolnicom Klinike za dječje bolesti Zagreb. Klinički genetičari Klinike za dječje bolesti Zagreb, Kliničkog bolničkog centra Split, Kliničkog bolničkog centra Osijek i Kliničkog bolničkog centra Zagreb procijenili su bolesnike na temelju obiteljske anamneze, fizikalnog pregleda te, kada je bilo potrebno, i dodatnih laboratorijskih pretraga. U studiju NOS uključeni su bili samo *GJB2*-negativni bolesnici kojima je klinički genetičar dijagnosticirao obiteljski ili sporadični, blagi do teški oblik NOS. Svi bolesnici (10) s kliničkim obilježjima koji su upućivali na stečeni oblik OS (kao što su infekcija, trauma, buka, ototoksični lijekovi i prijevremeni porod) i oni s nedovoljno medicinskih podataka isključeni su iz studije. Bolesnike smo podijelili u dvije skupine, one s NOS i SOS. U studiju je uključeno 66 bolesnika s NOS te 39 bolesnika sa SOS. Od 66 bolesnika s NOS, njih 17 su bili negativni na *GJB2* mutacije iz testiranja DFNB1 lokusa provedenih prije 2022. godine, dok je 49 testirano na *GJB2*, *GJB6*, *STRC* i *OTOA* od 2022. do 2024. godine. Težina OS klasificirana je na sljedeći način: <20 dB, normalan sluh; 20–34,9 dB, blago OS; 35–49,9 dB, umjereno OS; 50–64,9 dB, umjereno teško OS; 65–79,9 dB, teško OS; 80–94,9 dB, duboko OS; i >95 dB, potpuno OS (srednja vrijednost sluha na 0,5–1–2–4 kHz) (10). Uzorci DNA

analizirani su u razdoblju od travnja 2019. do prosinca 2024. Prosječna dob testiranih probanda na NOS na početku istraživanja bila je 2,4 godine (41 mjesec, u rasponu od 1 mjeseca do 40 godina), a za SOS (7 godina, u rasponu od 4 mjeseca do 50 godina). Informirani pristanak dobiven je od svih testiranih ispitanika ili od njihovih roditelja/zakonskih skrbnika.

## METODE

### Otkrivanje varijanti broja kopija metodom MLPA

U razdoblju od siječnja 2022. do prosinca 2024. kod ukupno 66 ispitanika s NOS koji su bili negativni na *GJB2* i *GJB6* varijante napravljeno je MLPA testiranje na CNV-ije u genima *STRC* i *OTOA*. Studija je uključila 49 ispitanika budući da je iz studije isključeno njih 17 s postlingvalnim i jednostranim OS jer su *DFNB16* i *DFNB22* kongenitalni i obostri oblici gluhoće. Neki ispitanici pozitivni na *GJB2* - bialelne varijante su korišteni kao negativne kontrole. MLPA analiza je napravljena korištenjem dvije verzije smjese sonda (*MRC-Holland*, Nizozemska); *SALSA MLPA P461 DIS* je korištena od siječnja 2022. do svibnja 2023., a *P461-B1 STRC-CATSPER2-OTOA* od rujna 2023. do prosinca 2024., prema uputama proizvođača (11). Detaljan opis postupka, aparati i programi za analizu MLPA podataka su već opisani ranije (7, 9). Obje smjese su semi-kvantitativni testovi korišteni za otkrivanje delecija ili duplikacija u genima *STRC*, *CATSPER2* u regiji 15q15.3 i *OTOA* u regiji 16p12.2, kao i konverzija između gena *STRC* i njegovog pseudogena *STRCP1*. Namijenjen je za potvrđivanje potencijalnog uzroka i/ili kliničke dijagnoze sindroma gluhoće-neploidnosti (*DIS*, engl. *deafness infertility syndrome*), autosomno recesivne gluhoće 16 (*DFNB16*) i autosomno recesivne gluhoće 22 (*DFNB22*) (3). Obje smjese sonda obuhvaćaju sonde koje pokrivaju samo dio egzona spomenutih gena. Naime, zbog homolognosti sekvence od preko 98 % između *STRC* i njegovog pseudogena *STRCP1* te *OTOA* i njegovog pseudogena *OTOAP1*, dizajnirane su i u smjese uključene samo one sonde koje mogu razlikovati spomenute gene od njihovih pseudogena.

### Analiza kliničkog egzoma sekvenciranjem sljedeće generacije

Od travnja 2019. do prosinca 2024. sekvenciranje kliničkog egzoma (*CES*, engl. *Clinical exome sequencing*) je napravljeno kod 21 *GJB2*-negativnog bolesnika s NOS i kod 39 bolesnika koji su ispunjavali kriterije za SOS, ukupno 60 bolesnika. Od 21 bolesnika s NOS njih četvero je testirano na *GJB2*, *GJB6*, *STRC* i *OTOA* varijante, a ostali su bili testirani samo na *GJB2* i *GJB6* varijante u razdoblju do 2022. godine. Korišten je *TruSight One (TSO)* panel s fokusom na egzome 4813 gena povezanih s bolešću (*Illumina Inc.*, *SAD*). Sekvenciranje je provedeno na Illumininim platformama *MiniSeq*, *MiSeq* i *NextSeq* s 2 x 150 očitavanja sekvenci u oba smjera. Interpretirane su samo one varijante gdje je minimalni medijan pokrivenosti ciljanih regija genoma bio 70x i ako su varijante bile pokrivene s najmanje 20 očitavanja. Detaljan opis baza podataka te bioinformatičkih alata korištenih u analizi *CES* podataka i interpretaciji varijanti je opisan u radu iz 2024. (7).

Sve varijante klasificirane prema smjernicama Američkog koledža medicinske genetike i genomike/Društva za molekularnu patologiju (*ACMG/AMP*, engl. *American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology*) u patogene, vjerojatno patogene i varijante nejasnog značaja (*VUS*, engl. *variants of uncertain significance*) smatrane su mogućim uzrocima OS-a (12). Klinički relevantne varijante kod NOS filtrirane su prema sljedećim fenotipovima navedenim u Ontološkoj bazi podataka o ljudskom fenotipu (*HPO*, engl. *Human Phenotype Ontology database*): senzorneuralno oštećenje sluha (*HP:0000407*) i oštećenje sluha (*HP:0000365*). U slučaju SOS, u analizu su uključeni i geni povezani s *HPO* terminima koji su bili vezani za dodatna klinička obilježja navedena u uputnoj dijagnozi kod bolesnika (13).

## REZULTATI

### Spektar varijanti kod NOS

Korištenjem kompleta sonda *SALSA MLPA P461* koji je prvenstveno namijenjen za otkrivanje delecija i duplikacija u genima povezanim s OS tj. *STRC*, *CATSPER2* i *OTOA*, u četiri bolesnika utvrđene su heterozigotne varijante (na samo jednom alelu) i

**Tablica 1.** Varijante nađene u bolesnika s nesindromskim oblikom oštećenja sluha

Bolesnik	Gene/Transkript	Varijanta	Promjena u proteinu	Zigotnost	Nasljeđivanje	Pojavnost OS u obitelji	Fenotip	ACMG/AMP klasifikacija
FI4916	TECTA/NM_005422.2	c.6167G>T	p.Cys2056Phe	Het	AD	obiteljski	DFNA8/12	Vjerojatno patogeno
VK0914	TECTA/NM_005422.2	c.6183C>T	p.Arg2061Ser	Het	AD	obiteljski	DFNA8/12	Vjerojatno patogeno
PRJ34720	PCDH15/NM_001142763.1	c.794A>G c.2012+1G>A	p.Asp265Gly NA	Het Het	AR	sporadično	DFNB23/Usherov sindrom, tip 1F?	Vjerojatno patogeno Patogeno
LD57319	TMPRSS3/NM_024022.2	c.208del c.271C>T	p.His70Thrfs p.Arg91Ter	Het Het	AR	sporadično	DFNB8/10	Patogeno Patogeno
OIPT1616	MYO15A/NM_016239.4	c.8183G>A c.9518-2A>G	p.Arg2728His NA	Het Het	AR	obiteljski	DFNB3	Patogeno Patogeno
UJ632-23	MYO15A/NM_016239.4	c.7720C>T c.9303+5G>A	p.Gln2574Ter NA	Het Het	AR	sporadično	DFNB3	Patogeno Nepoznatog značaja
BD428-21	MYO7A/NM_000260.4	c.2698C>T	p.Arg900Cys	Het	AD	obiteljski	DFNA11	Nepoznatog značaja
S1762-23	KCNQ4/NM_004700.4	c.961G>A	p.Gly321Ser	Het	AD	obiteljski	DFNA2A	Patogeno

to: kod djevojčice s prelingvalnim perceptivnim teškim OS i dječaka s umjerenim do teškim OS je nađena delecija gena *OTOA* i *METTL9*, u jedne bolesnice delecija gena *STRC*, *CATSPER2* i *CKMT1B* i u jedne delecija egzona 19 *STRC* i duplikacija istog egzona *STRCP1*. Zadnje dvije osobe su imale teško do potpuno perceptivno OS. U dvije osobe s *DFNB1A* nađena je delecija egzona 19 *STRCP1* i duplikacija istog egzona *STRC*. U jednog ispitanika koji je imao heterozigotnu deleciju *OTOA* i *METTL9*, delecija je obuhvatila i gen *IGSF6*, a uz to je imao i duplikaciju egzona 19 *STRC*.

CES analizom u skupini bolesnika s NOS u njih osam pronađeno je dvanaest varijanti u šest gena (*TECTA*, *PCDH15*, *TMPRSS3*, *MYO15A*, *MYO7A* i *KCNQ4*). Po jedna varijanta je nađena u *KCNQ4* i *MYO7A*, dvije varijante su nađene u *TECTA*, *PCDH15*, *TMPRSS3*, a četiri varijante u *MYO15A*. Deset varijanti je klasificirano kao patogeno ili vjerojatno patogeno, a dvije varijante (c.9303+5G>A u *MYO15A* i c.2698C>T u *MYO7A*) kao VUS. U četiri probanda je detektirana heterozigotna varijanta u genima *TECTA*, *KCNQ4* i *MYO7A* koja je rezultirala AD OS. U ostala četiri probanda otkrivene su složene heterozigotne varijante u genima *PCDH15*, *TMPRSS3* i *MYO15A* povezanim s AR OS. Ispitanu skupinu s pozitivnim nalazima činilo je pet obiteljskih (*MYO15A*, *MYO7A*, *KCNQ4* i *TECTA* dva slučaja) i tri sporadična slučaja OS (*PCDH15*, *TMPRSS3* i *MYO15A*) (Tablica 1.).

Treba napomenuti kako analiza kliničkog egzoma još uvijek nije napravljena u 45 bolesnika s NOS koji su testirani u razdoblju 2022.-2024. na varijante u genima *GJB2*, *STRC* i *OTOA* te u 151 *GJB2*-negativnih bolesnika testiranih do 2022. iz naših prethodnih studija, dakle ukupno 196 *GJB2*-negativnih bolesnika (7, 9).

## Spektar varijanti kod SOS

U 29 osoba u skupini sa SOS otkriveno je 35 različitih patogenih/vjerojatno patogenih varijanti u 21 genu: *NOG*, *SOX10*, *GATA3*, *SLC26A4*, *USH2A*, *PAX3*, *COL11A2*, *TCOF1*, *DIAPH1*, *ATP6V1B1*, *ADNP*, *SIX1*, *CHD7*, *MAN2B1*, *ORC1*, *PEX6*, *COL2A1*, *ALOX12B*, *AAAS*, *MYO7A* i *COL4A5* (Tablica 2. i 3.). Po jedna varijanta u heterozigotnom obliku je nađena u genima *NOG*, *GATA3*, *DIAPH1*, *ADNP*, *SIX1*, *CHD7*, *SOX10* i *COL2A1* koji su svi bili vezani za AD oblik nasljeđivanja, s napomenom da

**Tablica 2.** Varijante nađene u bolesnika sa sindromskim oblikom oštećenja sluha

Bolesnik	Gen/Transkript	Varijanta	Promjena u proteinu	Zigotnost	Nasljeđivanje	Pojavnost OS u obitelji	Fenotip	ACMG/AMP klasifikacija
LA19613	NOG/NM_005450.6	c.291delC	p.Ala98Argfs	Het	AD	obiteljski	Teunissen-Cremersov sindrom	Patogeno
DL47917	GATA3/ NM_001002295.2	c.404dup	p.Ala136Glyfs	Het	AD	sporadično	Barakatov sindrom	Patogeno
KN01213	SLC26A4/ NM_000441.2	c.1334T>G	p.Leu445Trp	Het	AR	obiteljski	Pendredov sindrom	Patogeno
PI44118	USH2A/ NM_206933.4	c.918+1G>T c.4933G>T	NA p.Gly1645Ter	Het Het	AR AR	sporadično sporadično	Usherov sindrom tip 2A	Patogeno Patogeno
TI1920	USH2A/ NM_206933.4	c.11140C>T c.2610C>A	p.Gln3714Ter p.Cys870Ter	Het Het	AR AR	sporadično sporadično	Usherov sindrom tip 2A	Patogeno Patogeno
BM555-20	USH2A/ NM_206933.4	c.1277delA c.11864G>A	p.Asn426Thrfs p.Trp3955Ter	Het Het	AR AR	sporadično sporadično	Usherov sindrom tip 2A	Patogeno Patogeno
SJ80220	USH2A/ NM_206933.4	c.2610C>A c.11864G>A	p.Cys870Ter p.Trp3955Ter	Het Het	AR AR	sporadično sporadično	Usherov sindrom tip 2A	Patogeno Patogeno
VM07621	USH2A/ NM_206933.4	c.7524del c.11864G>A	p.Arg2509Glyfs p.Trp3955Ter	Het Het	AR AR	sporadično sporadično	Usherov sindrom tip 2A	Patogeno Patogeno
PA91220	USH2A/ NM_206933.4	c.2299del c.7524del	p.Glu767Serfs p.Arg2509Glyfs	Het Het	AR AR	sporadično sporadično	Usherov sindrom tip 2A	Patogeno Patogeno
KD36320	USH2A/ NM_206933.4	c.11864G>A c.1636C>T	p.Trp3955Ter p.Arg546Ter	Het Het	AR AD, AR?	sporadično	Usherov sindrom tip 2A	Patogeno
<b>VM3915</b>	PAX3/NM_181458.4	c.233T>A	p.Val78Glu	Het	AD	obiteljski	Waardenburgov sindrom tip 1	Patogeno
<b>RJ54820</b>	PAX3/NM_181458.4	c.232G>A	p.Val78Met	Het	AD	obiteljski	Waardenburgov sindrom tip 1	Patogeno
<b>RT67522</b>	COL11A2/ NM_080680.3	c.1636C>T	p.Arg546Ter	Het	AD, AR?	sporadično	otospondilomegalepifizealna displazija (Stickler sindrom III). U literaturi se opisuje s AR otospondilomegalepifizealnom displazijom (PMID: 10677296).	Patogeno

Bolesnik	Gen/Transkript	Varijanta	Promjena u proteinu	Zigotnost	Nasljeđivanje	Pojavnost OS u obitelji	Fenotip	ACMG/AMP klasifikacija
<b>Š1102423</b>	COL11A2/ NM_080680.3	c.2554C>T	p.Arg852Ter		AD, AR?	sporadično	AD otospondilomegapefiznu displaziju (OSMEDA; MIM#184840) ili AR – OSMEDB	Vjerojatno patogeno
<b>DP53120</b>	TCOF1/ NM_001371623.1	c.4372_4376del	p.Lys1458fs	Het	AD	sporadično	Treacher Collins syndrome-1	Patogeno
<b>BN33018</b>	TCOF1/ NM_001371623.1	c.3840_3841del	p.Ala1282fs	Het	AD	sporadično	Treacher Collins syndrome-1	Vjerojatno patogeno
<b>TT81423</b>	DIAPH1/ NM_005219.4	c.3637C>T	p.Arg1213Ter	Het	AD	obiteljski	AD gluhoća tip 1 s trombocitopenijom	Patogeno
<b>GZ98523</b>	ATP6V1B1/ NM_001692.4	c.242T>C	p.Leu81Pro	Hom	AR	obiteljski	Distalna renalna tubularna acidoza 2 s progresivnom perceptivnom gluhoćom	Patogeno
<b>IB23518</b>	ADNP/NM_015339.4	c.2496_2499del	p.Asn832Lysfs	Het	AD	sporadično	Helsmoortel-van der Aa sindrom	Patogeno
<b>MM6624</b>	COL4A5/ NM_033380.3	c.1871G>A	p.Gly624Asp	Het	X- vezano domin	obiteljski	Alport sindrom tip 1	Patogeno
<b>VM28624*</b>	SIX1/NM_005982.3	<b>c.520A&gt;C</b>	p.Asn174His	Het	AD	sporadično	AD branhioitični sindrom 3 - (vjerojatno) ili gluhoća tip 23	Patogeno
<b>ŠP6219*</b>	CHD7/NM_017780.4	<b>c.3345C&gt;A</b>	p.Cys1115Ter	Het	AD	sporadično	CHARGE sindrom	Patogeno
<b>ŠJ7518</b>	MAN2B1/ NM_000528.4	c.2248C>T	p.Arg750Trp	Hom	AR	sporadično	Lizosomska bolest nakupljanja-manozidoza ALPHA B	Patogeno
<b>FV35518</b>	ORC1/NM_004153.4	c.1996C>T druga varijanta?	p.Arg666Trp	Het	AR	sporadično	sindrom Meier-Gorlin 1	Patogeno
<b>GE7009</b>	PEX6/NM_000287.3	c.1314_1321del c.2626C>T	p.Glu439Glyfs p.Arg876Trp	Het	AR	sporadično	Heimlerov sindrom tip 2	Patogeno Vjerojatno patogeno

\*Nove varijante otkrivene u ovoj studiji označene su podebljanim tekstom

**Tablica 3.** Varijante nađene u bolesnika sa složenim sindromskim oblikom oštećenja sluha

Bolesnik	Gene/Transkript	Varijanta	Promjena u proteinu	Zigotnost	Nasljeđivanje	Pojavnost OS u obitelji	Fenotip	ACMG/AMP klasifikacija
<b>KK03215</b>	SOX10/NM_006941.3	c.456dup	p.Phe153Leufs	Het	AD	sporadično	Waardenburgov sindrom tip 4C	Patogeno
	COL2A1/NM_001844.4	c.2668C>T pat	p.Gln890Ter	Het	AD	obiteljski	Sticklerov sindrom tip 1, nesindromski oblik sa zahvaćanjem vida	Patogeno
<b>LJA75320</b>	USH2A/NM_206933.2	c.11864G>A	p.Trp3955Ter	Hom	AR	NA	Usherov sindrom tip 2A	Patogeno
	ALOX12B/NM_001139.2	c.1562A>G	p.Tyr521Cys	Hom	AR	NA	Kongenitalna ihtioza tip 2	Patogeno
<b>PT57321</b>	GJB2/NM_004004.6	c.35delG	p.Gly12ValfsTer	Hom	AR	NA	DFNB1A	Patogeno
	AAAS/NM_015665.5	c.1159C>T	p.Gln387Ter	Hom	AR	NA	Triple A sindrom	Patogeno
<b>VI34521</b>	MYO7A/NM_000260.3	c.[635G>A];[5208del]	p.[Arg212His];[Lys1737Argfs]	Het	AR	sporadično	Usher tip 1B?	Patogeno
	COL4A5/NM_033380.2	c.1871G>A pat	p.Gly624Asp	Het	X-vezano dominantno	obiteljski	sindrom Alport 1	Patogeno

smo varijante u zadnja dva gena pronašli kod iste osobe. Dvije su varijante nađene u genima *PAX3*, *TCOF1* i *COL11A2* kod različitih bolesnika u heterozigotnom obliku s tim da su u slučaju prva dva gena radi o AD sindromima, a u dva slučaja s *COL11A2* varijantama nije jasan oblik nasljeđivanja. Homozigotne varijante našli smo u genima *USH2A*, *ALOX12B*, *AAAS*, *ATP6V1B1* i *MAN2B1* kod AR oblika SOS. Zanimljivo je da su dvije osobe bile dvostruki homozigoti, jedna za varijante u genima *USH2A* i *ALOX12B*, a druga za varijante u genima *GJB2* i *AAAS* (Tablica 3.). U osam ispitanika nađene su patogene varijante u genu *USH2A* koje su uzrok AR Usher sindroma tip 2a (*USH2A*). Otkriveno je osam različitih varijanti s tim da je varijanta c.11864G>A nađena kod pet, a varijante c.2610C>A i c.7524del kod dva bolesnika. U jedne osobe nađena je česta varijanta c.11864G>A na samo jednom alelu. Složene heterozigotne varijante nađene su u genima *SLC26A4*, *PEX6* i *MYO7A* u tri osobe. Heterozigotna varijanta u *ORC1* nađena je kod jedne osobe, ali nije nađena druga varijanta koja bi potvrdila dijagnozu sindroma Meier-Gorlin 1 (MIM # 224690). U dvije ženske osobe otkrivena je varijanta c.1871G>A u genu *COL4A5* koja se nasljeđuje X-vezano dominantno i uzrokuje nastanak Alport sindroma 1. Jedna od ovih osoba bila je i složeni heterozigot za patogene varijante u genu *MYO7A*.

U ovoj su skupini otkrivene dvije nove varijante: c.520A>C u *SIX1* i c.3345C>A u *CHD7*.

## RASPRAVA I ZAKLJUČCI

Činjenica da je OS najčešći osjetni poremećaj te da intervencija prije 6. mjeseca života značajno poboljšava adaptaciju osoba s OS, potiču nas da što ranije pristupimo dijagnostici ovih poremećaja.

Varijante u lokusu 13q12, *DFNB1* (*GJB2* i *GJB6*), uzrok su čak polovice svih *DFNB*-a kako u Hrvatskoj tako i u ostalim dijelovima Europe. *DFNB16* oblik OS uzrokovan varijantama u *STRC* smatra se drugim najčešćim uzrokom *DFNB*-a (4, 5). Gen *STRC* kodira ekstracelularni strukturni protein stereocilin koji je izražen u vanjskim dlakavim stanicama unutarnjeg uha. *STRC* se nalazi u skupini vezanih gena koju još čine: *CATSPER2*, *PIIP5K1* i *CKMT1B*. Iako se u genu *STRC* mogu naći različite vrste genetičkih promjena, bialne delecije čine većinu *STRC* patogenih varijanti (5). Delecije

STRC-a često su popraćene delecijama gena *CATSPER2* koji je odgovoran za pokretljivost spermija.

Bialelne varijante gubitka funkcije u *OTOA* su poznati uzrok umjerenog do potpunog OS. Nađena delecija gena *OTOA* i *METTL9* ili slične delecije koje obuhvaćaju gen *OTOA* su već opisane kod osoba s *DFNB22* (MIM#607039) u homozigotnom ili složenom heterozigotnom obliku. Za potvrdu dijagnoze *DFNB22* kod dva bolesnika koji su bili heterozigoti na delecije *OTOA* i *METTL9* gena potrebno je u drugom alelu gena *OTOA* utvrditi dodatnu patogenu varijantu, a koju nismo našli CES analizom. Naime, korištenjem tehnologije sekvenciranja sljedeće generacije (NGS, engl. *next generation sequencing*) s kratkim čitanjima sekvence koja se koristi u CES analizi nije moguće sa sigurnošću detektirati varijante u egzonima 20-28 *OTOA* zbog prisutnosti *OTOA* pseudogena. Za razlikovanje *OTOA* i njegovog pseudogena *OTOAP1* potrebno je sekvenciranje s pomoću NGS tehnologija treće generacije koje se zasnivaju na sekvenciranju dugih čitanja (engl. *long read sequencing*). Takve platforme za sekvenciranje s dugim čitanjima u sekvenciranju cijelog genoma (engl. *whole genome sequencing*; WGS), osim što mogu riješiti probleme sa pseudogenima, omogućuju otkrivanje CNV i strukturnih varijanti, ali zbog visoke cijene se još uvijek rijetko koriste u kliničkoj praksi. Umjesto njih, za detekciju delecija *OTOA* i konverzija između *OTOA* i *OTOAP1* češće se koristi analiza dubine čitanja nakon sekvenciranja cijelog egzoma (WES, engl. *whole exome sequencing*) ili WGS u kombinaciji s lančanom reakcijom polimeraze dalekog dosega (engl. *long range polymerase chain reaction* ili *long range PCR*) (14).

Heterozigotna duplikacija sondi za egzon 19 *STRC* koja je nađena kod ispitanika s heterozigotnom delecijom *OTOA*, *METTL9* i *IGSF6* nema jasno kliničko značenje. Specifičnost ovih sondi oslanja se na razliku samo jednog nukleotida u usporedbi s povezanim genom ili pseudogenom. Kao rezultat, prividno dupliciranje samo ovih sondi gena *STRC* može biti rezultat neznačajne promjene slijeda jednog nukleotida tj. polimorfizma u vezanom genu/pseudogenu. Također, ova duplikacija može nastati zbog preslagivanja/konverzije između gena *STRC* i pseudogena *STRCP1*. Ovu konverziju smo otkrili kod dvije kontrole korištenjem novije

verzije smjese sondi (P461-B1) koja je, za razliku od prethodne verzije, uključivala i sonde za *STRCP1* (11). U slučaju konverzije, duplikaciju egzona 19 *STRC* uvijek prati i delecija odgovarajućeg egzona pseudogena. S obzirom na to da je ova konverzija otkrivena kod osoba koje su već imale dokazani genetički uzrok OS, vjerojatno je benigna.

Monoalelna delecija gena *STRC*, *CATSPER2* i *CKMT1B* nađena je kod ženske osobe s teškim do potpunim obostranim perceptivnim OS. Bialelne delecije gena *STRC* i *CATSPER2* su opisane kod osoba s *DIS* s tim da se neplodnost javlja samo kod muškaraca. Za potvrdu *DFNB16* dijagnoze potrebno je u drugom alelu gena *STRC* utvrditi patogenu varijantu. Kao i kod gena *OTOA* i *OTOAP1* za to je potrebno sekvenciranje gena NGS tehnologijom treće generacije i/ili daleko dosežni PCR koji može razlikovati *STRC* od njegovog pseudogena. Sonde za *METTL9*, *IGSF6* i *CKMT1B* su granične sonde čija je jedina uloga precizno određivanje veličine delecije/duplikacije stoga promjene u broju kopija tih sondi nemaju klinički značaj (11). Kod ženske osobe s teškim do potpunim obostranim perceptivnim OS nađena je delecija egzona 19 *STRC* i duplikacija istog egzona *STRCP1* na jednom alelu. Vjerojatno se radi o konverziji *STRC* koja nema jasan klinički značaj.

Rezultati meta analize prevalencije *STRC* mutacija objavljeni 2021. pokazali su da je prevalencija nositelja varijanti *STRC* u bolesnika s OS (GJB2-negativni) 4.84 % (od 0.92 % u Španjolskoj do 11.27 % u Kini) dok je prevalencija u osoba s normalnim sluhom 1.36 % (5). S obzirom na ovako visoku prevalenciju nositelja i da se *DFNB16* obično veže s blagim do umjerenim OS, upitno je je li kod ove dvije ispitanice delecija gena *STRC* uzrok OS. Za razliku od toga, delecije *OTOA* su puno rjeđe, procjenjuju se u rasponu od manje od 0.1 % u gnomAD SV v2.1 do manje od 0.2 % u bazi *Database of Genomic Variants* (15). Budući da oba ispitanika spadaju u kategoriju umjerenog do teškog OS, vjerujemo da je moguće da se radi o *DFNB22*, ali za to su potrebna daljnja istraživanja.

Za razliku od naše prethodne studije gdje su kod AR oblika NOS dominirale mutacije u genu *GJB2*, u ovoj studiji, iz koje smo isključili *DFNB1*, nema gena koji bi se isticao kao uzrok NOS. CES analizom otkrivena su tri AD oblika NOS: *DFNA8/12*, *DFNA11* i *DFNA2A*. Treba naglasiti da su svi bili

obiteljski slučajevi što i nije rijedak nalaz kod ovih AD oblika NOS. Mutacije u genu *TECTA* su jedan od najznačajnijih uzročnika AD srednjefrekventnog ili visokofrekventnog gubitka sluha (DFNA8/12) u različitim populacijama. *TECTA* kodira nekologenski glikoprotein  $\alpha$ -tektorin koji čini glavnu komponentu tektorijalne membrane u pužnici. DFNA11 (MIM#601317) uzrokuju heterozigotne varijante u genu *MYO7A*, a obilježena je progresivnim neurosenzornim postlingvalnim OS (16). Kod ispitanika s umjerenim perceptivnim bilateralnim postlingvalnim OS nađena je *missense* varijanta c.2698C>T u *MYO7A*. Ova varijanta c.2698C>T je opisana u bazi ClinVar kao VUS, te se tako klasificira i prema ACMG/AMP kriterijima (PP2, PP3, PM2). Ista heterozigotna varijanta je nađena kod sestre s blagim do umjerenim progresivnim OS, ali i kod majke s normalnim sluhom. S obzirom na to da se DFNA11 može javiti i nakon 40. godine života, nije isključeno da i majka kasnije razvije OS. Međutim, obrazac nasljeđivanja više upućuje na AR oblik OS pa je upitno je li ova monoalelna varijanta uzročnik OS u ovoj obitelji. Gen *KCNQ4* kodira kanal kojim prolaze kalijevi ioni iz stanica s dlačicama u okolne stanice, a njegove mutacije uzrokuju DFNA2 (MIM#600101) kojeg karakterizira simetrični, pretežno visokofrekventni perceptivni gubitak sluha koji je progresivan na svim frekvencijama. Nadalje, nađena su tri AR oblika NOS: DFNB23 ili Usherov sindrom tip 1F, DFNB8/10 i DFNB3. U jednom slučaju DFNB3 (MIM#600316), varijanta c.9303+5 u *MYO15A* je anotirana kao VUS. Tako je klasificirana u ClinVar (ID:523518) te se kod osoba s OS može pronaći u *trans* položaju s drugom patogenom varijantom. Ova varijanta nije prisutna u populacijskoj bazi gnomAD, a *in silico* algoritmi za teoretsko predviđanje patogenosti predviđaju štetan učinak varijante. Iz navedenih razloga, prema ACMG/AMP klasifikaciji (PP3, PM2), ova varijanta se smatra VUS (3, 12, 17).

Poteškoće u analizi NOS-a su izrazita genska heterogenost i činjenica da različite varijante u istom genu (npr. *GJB2*, *TECTA* i *MYO7A*) mogu uzrokovati recesivne i dominantne oblike NOS pa čak i SOS (npr. u genima *PCDH15* i *MYO7A*) što otežava genetičko savjetovanje zahvaćenih obitelji (3). U slučaju patogenih varijanti u *PCDH15* nađenih kod četverogodišnjeg dječaka vrijeme će pokazati je li riječ o NOS tj. o DFNB23 (MIM#609533) ili Usherov

rovu sindromu tip 1F (MIM# 602083), ovisno o tome hoće li se kasnije pojaviti progresivna, bilateralna, simetrična degeneracija retine tj. retinitis pigmentosa (RP) (18).

Kod SOS našli smo 19 različitih sindroma s tim da dva sindroma navedena kod složenih sindromskih oblika (Triple A sindrom i kongenitalna ihtioza tip 2) koji nisu vezani za OS, nismo uračunali. Među ovih 19 našli su se najučestaliji SOS: Usherov, Pendredov, Waardenburgov, Alportov i Stickler sindrom, ali i neki rijetki oblici kao npr. Helsmoortelvan der Aa sindrom i Heimlerov sindrom tip 2. Budući da prostor ograničava raspravu o svim varijantama nađenim u SOS, a o varijantama u genima *NOG*, *GATA3*, *SLC26A4*, *SOX10* i *COL2A1* je bilo rasprave u prethodnom radu, ovdje će se raspravljati samo o slučajevima koja je važno spomenuti s obzirom na učestalost varijanti, složenost kliničke slike i izazove u dijagnostici OS (7).

Usherov sindrom (USH) je najčešći tip AR sindromskog OS. USH je klinički i genetički heterogen AR poremećaj obilježen kongenitalnim perceptivnim, bilateralnim OS i razvojem RP obično u 2. desetljeću života odnosno adolescenciji. Najčešći je uzrok kombiniranog javljanja OS i sljepoće u odraslih i pogađa 3 do 6 % djece rođene s OS. Usherov sindrom tip I (USH1) može biti uzrokovan patogenim varijantama u najmanje šest gena, među ostalim u *MYO7A* i *PCDH15*. USH1 karakterizira kongenitalno teško do potpuno perceptivno OS i vestibularna disfunkcija. Slušna pomagala su obično neučinkovita kod USH1 te je indicirana što ranija ugradnja kohlearnog implantata. Usherov sindrom tip II (USH2) čini 70 % svih oblika USH i može biti uzrokovan patogenim varijantama u tri gena *USH2A*, *ADGRV1* i *DFNB31*. Mutacije gena *USH2A* povezane su s Usherovim sindromom tipa IIa (MIM#276901;USH2A) ili izoliranom RP tip 39 (MIM#613809). Bolesnici s *USH2A* imaju blago do umjereno OS u niskim frekvencijama i teško do potpuno OS u višim frekvencijama s normalnim vestibularnim odgovorima (19). Varijanta c.11864G>A (p.Trp3955Ter) u genu *USH2A* je nađena kod pet od osam bolesnika s *USH2A*: tri složena heterozigota, jednog heterozigota te jednog homozigota. Ona je više puta opisana u bolesnika s RP i Usherovim sindromom tipa 2 iz raznih zemalja, kao i u slučajevima izoliranog nasljednog gubitka sluha. U studiji koja je

analizirala veliku kohortu od 282 bolesnika s USH2 iz raznih europskih medicinskih centara nađeno je da su dvije najčešće mutacije u USH2A bile: c.2299del i c.11864G>A. Udjeli bolesnika s USH2A koji su nosili varijantu c.2299del i varijantu c.11864G>A bili su 32,7 % (18/55) i 20 % (11/55) u Njemačkoj, 28,7 % (29/101) i 4,9 % (5/101) u Francuskoj, 11,1 % (4/36) i 11,1 % (4/36) u Italiji, odnosno 0 % (0/40) i 82,5 % (33/40) u Sloveniji (19, 20). Također u 14 ruskih bolesnika sa sindromskim oblikom RP varijanta c.11864G>A je bila najčešća, čineći 35,7 % mutiranih alela (20). Slično kao i u Sloveniji i Rusiji, i u našoj studiji je varijanta c.11864G>A bila najčešća kod osoba s USH2A, s udjelom od 40 % (6/15) mutiranih alela tj. u 62,5 % (5/8) bolesnika s USH2A. Akumulacija ove patogene varijante u srednjoj Europi pripisuje se učinku osnivača, a izrazito visoka prevalencija u slovenskih bolesnika vjerojatno je posljedica višestrukih nepovezanih osnivača kao rezultat migracije iz susjednih populacija (22). Kod osobe koje je imala monoalelnu varijantu u USH2A trebalo bi ispitati i CNV koje mogu znatno smanjiti broj neriješenih USH2A slučajeva. (19, 23).

Otkrivene su dvije nove patogene varijante: c.520A>C u SIX1 i c.3345C>A u CHD7. Ove varijante nisu pronađene u dostupnim bazama podataka (ClinVar, HGMD, LOVD) ni u znanstvenoj literaturi (17, 24, 25). Kod 10-ogodišnjeg dječaka s klinički postavljenom sumnjom na sindrom CHARGE (MIM #214800) (stanje nakon operacije atrezije hoana, obostrana zamjedbena naglušnost kao posljedica obostrane hipoplazije kohleje, aplazije vestibuluma i polukružnih kanalića, nedostatak n. statoacusticus desno, coloboma PNO i korioretne) CES analizom je otkrivena heterozigotna nonsense varijanta u egzonu 13 gena CHD7 (OMIM\*608892). Rezultat ove mutacije je preuranjeni STOP kodon na poziciji 1115 (p.Cys1115Ter) u proteinu CHD7 koji ima ulogu u regulaciji transkripcije. Patogene varijante ovog gena povezuju se s AD sindromom CHARGE (26). Ova promjena se prema ACMG/AMP klasifikaciji (PVS1, PM2, PP3) smatra patogenom (12). Kod 10-godišnje djevojčice s rascjepom nepca, malformacijom uški, aplazijom obje pužnice, obostranom gluhoćom, stenozom/aplazijom slušnog kanala, kašnjenjem u razvoju, strabizmom, slabovidnosti, spina bifida-om, stanjem nakon febrilnih konvulzija, kardiorespiratornog aresta, i nakon paralitič-

kog ileusa, otkrivena je heterozigotna pogrešna (engl. *missense*) *de novo* varijanta c.520 A>C u genu SIX1 (OMIM \*601205) koja je dovela do supstitucije aminokiseline arginin u histidin u kodonu 174. Patogene varijante u genu SIX1 uzrokuju AD poremećaje: branhiootični sindrom 3 (MIM #608389) i gluhoću 23 (MIM #605192), a ovdje se radi o sindromskom obliku (27). Prema ACMG/AMP klasifikaciji otkrivena promjena se smatra patogenom (PS2, PP3, PM1, PM2) (12).

Procjenjuje se da 2-5 % osoba s kongenitalnim OS ima Waardenburgov sindrom (WS). S obzirom na genotipske i fenotipske varijacije, postoje četiri različita tipa WS, a tip WS1 je uzrokovan mutacijama u PAX3. WS1 je obilježen s kongenitalnim zamjedbenim najčešće obostranim i potpunim OS, pigmentacijskim anomalijama šarenica, kose i kože (kongenitalna leukodermija) te *dystopia canthorum* (lateralno pomaknut unutarnji očni kut) (28). Zanimljivo je da smo kod dva obiteljska slučaja WS1 našli različite *missense* varijante u egzonu 2, ali u istom kodonu 78 proteina, koje mijenjaju aminokiselinu valin u metionin odnosno glutaminsku kiselinu. Premda ovaj egzon 2 ima najveću stopu *missense* mutacija u PAX3, nismo pronašli podatak da je učestalost mutacija u kodonu 78 značajno veća (17).

Alportov sindrom (AS) je nasljedni poremećaj bazalne membrane, koji rezultira progresivnim zatajenjem bubrega zbog glomerulonefropatije, varijabilnim perceptivnim OS i različitim očnim anomalijama. AS je genetički heterogen poremećaj, a svi njegovi oblici su rezultat mutacija u genima koji kodiraju kolagen tipa IV, koji je glavna strukturna komponenta bazalne membrane. X-vezani sindrom Alport 1 (MIM#301050) je uzrokovan patogenim varijantama u COL4A5 i čini do 80 % slučajeva AS-a. OS je bilateralno, progresivno, u visokim frekvencijama te se obično ne manifestira prije desete godine života (29). Za istaknuti je da smo istu varijantu c.1871G>A u COL4A5 pronašli kod dvije ženske osobe s različitom kliničkom slikom. Kod 17-godišnje djevojke zabilježena je hematurija, proteinurija te sumnja na OS, dok je kod trogodišnje djevojčice zabilježeno kongenitalno obostrano teško zamjedbeno OS, ali bez bubrežne bolesti. Kod 17-godišnjakinje baka i otac imaju obiteljsku hematuriju, a otac, baka te bakina sestra i brat također imaju i OS. U

trogodišnjakinje otkrivene su još i dvije patogene varijante u genu *MYO7A* (MIM\*276903). Bialelne patogene varijante u *MYO7A* se povezuje s AR gluhoćom 2 (MIM#600060) te AR sindromom Usher tip 1B (MIM #276900) (16). OS prisutno kod ove djevojčice je posljedica mutacija u *MYO7A*, a ne u *COL4A5*. Kod obje ispitanice potrebno je redovito kontrolirati vid vezano za Usher tip 1B odnosno AS, te bubrežnu funkciju s obzirom na AS.

U jednog jednogodišnjeg i jednog sedmogodišnjeg dječaka s rascjepom nepca i perceptivnim OS nađene su heterozigotne besmislene varijante c.2554C>T odnosno c.1636C>T u genu *COL11A2* (MIM\*120290). Heterozigotne patogene varijante u genu *COL11A2* mogu uzrokovati AD otospondilomegaepifiznu displaziju (OSMEDA; MIM#184840), također poznatu kao Weissenbacher-Zweymullerov sindrom (WZS) ili neokularni Sticklerov sindrom, koji ima tipičnu sistemsku manifestaciju bez očnih anomalija, jer je *COL11A2* (odgovorni za stvaranje kolagena tipa XI) izražen u zglobovima, unutarjem uhu i kraniofacijalnim strukturama, ali ne u oku. Nešto teži oblik AR otospondilomegaepifizna displazija (OSMEDB; MIM#215150) također je uzrokovana mutacijama gena *COL11A2*. OSMED karakterizira perceptivna gluhoća i relativno kratki ekstremiteti s abnormalno velikim koljenima i laktovima, ali normalnom ukupnom duljinom tijela. Bolesnici imaju tipične crte lica, uključujući hipoplaziju srednjeg dijela lica stoga i rascjep nepca (30). Problem kod dijagnostike OSMED, ako nemate dostupne roditelje za testiranje, je utvrđivanje načina nasljeđivanja varijante tj. radi li se o OSMEDB ili OSMEDA. Kod starijeg dječaka kod kojega je prisutna i teža klinička slika vjerojatno se radi o OSMEDB jer je varijanta c.1636C>T već spomenuta u literaturi kod OSMEDB oblika. To znači da još treba naći dodatnu uzročnu varijantu za potvrdu genetičke dijagnoze. Kod mlađeg dječaka s varijantom c.2554C>T, teško je reći o kakvom obliku OSMED se radi samo iz kliničke slike jer je još premali, a status nositeljstva kod roditelja nije određen.

Heterozigotna varijanta u *ORC1* nađena je kod jednogodišnje djevojčice s usporenim neuromotornim razvojem, anemijom, dismorfijom, IUGR, stanjem nakon perinatalne asfiksije, hipotrofijom, obostranom atrezijom zvukovoda i umjerenom naglušnosti. Nije nađena druga patogene varijanta

koja bi potvrdila dijagnozu AR sindroma Meier-Gorlin 1 (MIM # 224690), stoga je potrebno testirati ostale kodirajuće regije (npr. egzon 6) te nekodirajuće regije *ORC1* gena koje su ovim TSO panelom slabo ili nisu pokriveni (31).

U složenim sindromskim oblicima, otkrili smo dva složena homozigota. U slučaju 35-godišnje bolesnice s *USH2A* te AR kongenitalnom ihtiozom tip 2 (MIM#242100), OS je posljedica homozigotne varijante c.11864G>A u *USH2A*. U drugom slučaju riječ je o jedno i pol godišnjem dječaku s teškom kongenitalnim OS koje je posljedica c.35delG u *GJB2* genu tj. *DFNB1A*, ali ne Triple A sindroma (MIM#231550). Premda se radi o dvostrukim homozigotima, podataka o krvnom srodstvu u obitelji nema.

Ograničenja ove studije su bila prvenstveno metodološke prirode. U odnosu na prethodnu studiju, napravljena je analiza CNV-a kod osoba s NOS. Međutim, u tu studiju je uključeno premalo bolesnika s prelingvalnim bilateralnim OS da bi uspjeli otkriti one sa *STRC*- i *OTOA*-vezanim OS. Također, s postojećim molekularnim tehnikama koje se primjenjuju u dijagnostici u našem Zavodu nismo u mogućnosti testirati sve egzone *STRC* i *OTOA* gena, zbog postojanja pseudogena, pa je moguće to dodatni razlog zašto kod osoba s heterozigotnom delecijom ovih gena nismo našli patogenu varijantu na drugom alelu. Nadalje, u većine *GJB2* negativnih bolesnika s NOS, još uvijek nije testiran klinički egzom. Razlog tome je što se mali broj takvih bolesnika nakon dobivanja negativnih MLPA nalaza upućuje dalje na CES analizu. CES analizu bi pogotovo bilo korisno napraviti kod bolesnika s postlingvalnim AD obiteljskim oštećenjem sluha koji su redovito negativni MLPA testiranjem gena *GJB2*, *STRC* i *OTOA*, a velika je vjerojatnost da se kod njih nađe genetički uzrok OS.

Također, treba napomenuti da ovom studijom nisu obuhvaćeni mitohondrijski geni čije mutacije mogu doprinijeti razvoju perceptivnog, bilateralnog, uglavnom progresivnog i sindromskog OS. Smatra se da je oko 5 % postlingvalne gluhoće u bjelačkoj populaciji uzrokovano upravo mitohondrijskim poremećajima (3, 32).

*USH2A* se isticao kao vodeći uzrok kongenitalnog OS, a varijanta c.11864G>A u genu *USH2A* je bila najčešća varijanta u SOS. Visoka zastupljenost

ove varijante u našoj populaciji vjerojatno je posljedica učinka osnivača, slično kao i u ostalim zemljama centralne Europe. S obzirom na vrlo heterogenu etiologiju OS te postojanje pseudogena *STRCP1* i *OTOAP1*, dijagnostika OS je klinički i metodološki vrlo kompleksna i izazovna. Pogotovo treba biti oprezan u dijagnostici složenih sindromskih oblika OS gdje promjene u različitim genima u istog bolesnika mogu doprinijeti etiologiji OS odnosno njegovim ostalim kliničkim obilježjima. Upravo širokogenomska analiza poput CES-a omogućuje razjašnjavanje etiologije OS u takvim izazovnim slučajevima. Ovim istraživanjem dobivene su vrijedne spoznaje važne kako za dijagnostiku oboljelih s OS tako i otkrivanje i genetsko savjetovanje rizičnih članova obitelji što unapređuje skrb o oboljelima s OS.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se bolesnicima i obiteljima na sudjelovanju i suradnji u studiji. Također, veliko hvala svim pedijatrima, pogotovo kliničkim genetičarima iz svih kliničkih bolničkih centara u RH na dugogodišnjoj suradnji.

## Potpora/Funding

Rad je izrađen u okviru Znanstvenog centra izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu, a financiran sredstvima Europske unije kroz europski fond za regionalni razvoj, u okviru projekata: „Reproduktivna i regenerativna medicina - Istraživanje novih platformi i potencijala” (ugovor o dodjeli bespovratnih sredstava br. KK.01.1.1.01.0008) i “Razvoj i jačanje istraživačkih i inovacijskih kapaciteta, te primjena naprednih tehnologija”.

## Kratice:

OS	- oštećenje sluha
NOS	- nesindromsko oštećenje sluha
SOS	- sindromsko oštećenje sluha; AR- autosomno recesivno
AD	- autosomno dominantno
DFNA	- deafness, non-syndromic, autosomal dominant
DFNB	- deafness, non-syndromic, autosomal recessive
USH	- Usherov sindrom
WS	- Waardenburg sindrom

CNV	- varijante broja kopija (engl. <i>copy number variants</i> )
MLPA	- metoda višestrukog umnažanja vezanih sonde (engl. <i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> ); DIS- sindrom gluhoće-neplodnosti (engl. <i>deafness infertility syndrome</i> )
CES	- sekvenciranje kliničkog egzoma (engl. <i>Clinical exome sequencing</i> )
TSO	- TruSight One
NGS	- sekvenciranje sljedeće generacije (engl. <i>next generation sequencing</i> )
WGS	- sekvenciranje cijelog genoma (engl. <i>whole genome sequencing</i> )
WES	- sekvenciranje cijelog egzoma (engl. <i>whole exome sequencing</i> )
ACMG/AMP	- Američki koledž medicinske genetike i genomike/Društvo za molekularnu patologiju (engl. <i>American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology</i> )
VUS	- varijante nejasnog značaja (engl. <i>variants of uncertain significance</i> )
HPO	- Ontološka baza podataka o ljudskom fenotipu (engl. <i>Human Phenotype Ontology database</i> )
RP	- retinitis pigmentosa
USH1	- Usherov sindrom tip 1
USH2A	- Usherov sindrom tip IIa
AS	- Alportov sindrom

## LITERATURA

1. Van Camp G, Willems PJ, Smith RJH. Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 1997;60(4):758-64.
2. Toriello HV, Smith SD, editors. *Hereditary hearing loss and its syndromes.* 3rd ed. Oxford University Press; 2013.
3. Walls WD, Azaiez H, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Available from: <https://hereditaryhearing-loss.org>. Accessed 2025 Jan 8.
4. Sloan-Heggen CM, Bierer AO, Shearer AE, et al. Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss. *Hum Genet.* 2016;135(4):441-50.
5. Han S, Zhang D, Guo Y, Fu Z, Guan G. Prevalence and characteristics of *STRC* gene mutations (DFNB16): a systematic review and meta-analysis. *Front Genet.* 2021;12:707845.
6. Yasukawa R, Moteki H, Nishio SY, et al. The prevalence and clinical characteristics of *TECTA*-associated autosomal dominant hearing loss. *Genes (Basel).* 2019;10(10):744.

7. Sansović I, Meašić AM, Bobinec A, et al. Spectrum of genetic variants in 306 patients with non-syndromic hearing loss from Croatia. *Croat Med J.* 2024;65(3):198-208.
8. Shearer AE, Kolbe DL, Azaiez H, et al. Copy number variants are a common cause of non-syndromic hearing loss. *Genome Med.* 2014;6:37.
9. Sansović I, Knezević J, Musani V, Seeman P, Barisić I, Pavelić J. *GJB2* mutations in patients with nonsyndromic hearing loss from Croatia. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009;13(5):693-9.
10. Olusanya BO, Davis AC, Hoffman HJ. Hearing loss grades and the International Classification of Functioning, Disability and Health. *Bull World Health Organ.* 2019;97(10):725-8.
11. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57.
12. Richards S, Aziz N, Bale S, et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.
13. Human Phenotype Ontology database. Available from: <http://human-phenotype-ontology>. Accessed 2024 Dec 10.
14. Laurent S, Gehrig C, Nospikel T, et al. Molecular characterization of pathogenic *OTOA* gene conversions in hearing loss patients. *Hum Mutat.* 2021;42(4):373-7.
15. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D986-92.
16. Watanabe K, Nishio SY, Usami SI; Deafness Gene Study Consortium. The prevalence and clinical features of *MYO7A*-related hearing loss including *DFNA11*, *DFNB2* and *USH1B*. *Sci Rep.* 2024;14(1):8326.
17. ClinVar. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Accessed 2025 Jan 8.
18. Ahmed ZM, Riazuddin S, Aye S, et al. Gene structure and mutant alleles of *PCDH15*: nonsyndromic deafness *DFNB23* and type 1 Usher syndrome. *Hum Genet.* 2008;124(3):215-23.
19. Bonnet C, Riahi Z, Chantot-Bastarad S, et al. An innovative strategy for the molecular diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(12):1730-8.
20. Neuhaus C, Eisenberger T, Decker C, et al. Next-generation sequencing reveals the mutational landscape of clinically diagnosed Usher syndrome: copy number variations, phenocopies, a predominant target for translational read-through, and *PEX26* mutated in Heimler syndrome. *Mol Genet Genom Med.* 2017;5(5):531-52.
21. Ogorodova N, Stepanova A, Kadyshev V, et al. A comparative evaluation of the genetic variant spectrum in the *USH2A* gene in Russian patients with isolated and syndromic forms of retinitis pigmentosa. *Int J Mol Sci.* 2024;25(22):12169.
22. Zupan A, Fakin A, Battelino S, et al. Clinical and haplotypic variability of Slovenian *USH2A* patients homozygous for the c.11864G>A nonsense mutation. *Genes (Basel).* 2019;10(12):1015.
23. Zampaglione E, Kinde B, Place EM, et al. Copy-number variation contributes 9% of pathogenicity in the inherited retinal degenerations. *Genet Med.* 2020;22(6):1079-87.
24. HGMD. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk>. Accessed 2025 Jan 8.
25. LOVD. Available from: <http://www.lovd.nl/3.0/home>. Accessed 2025 Jan 8.
26. Hsu P, Ma A, Wilson M, et al. CHARGE syndrome: a review. *J Paediatr Child Health.* 2014;50(7):504-11.
27. Chen A, Song J, Acke FRE, et al. Otological manifestations in branchiootorenal spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Clin Genet.* 2021;100(1):3-13.
28. Udagawa T, Takahashi E, Tatsumi N, et al. Loss of *Pax3* causes reduction of melanocytes in the developing mouse cochlea. *Sci Rep.* 2024;14(1):2210.
29. Gregorio V, Caparali EB, Shojaei A, Ricardo S, Barua M. Alport syndrome: clinical spectrum and therapeutic advances. *Kidney Med.* 2023;5(5):100631.
30. Acke FRE, De Leenheer EMR. Hearing loss in Stickler syndrome: an update. *Genes (Basel).* 2022;13(9):1571.
31. Nielsen-Dandoroff E, Ruegg MSG, Bicknell LS. The expanding genetic and clinical landscape associated with Meier-Gorlin syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2023;31(8):859-68.
32. Fancello V, Fancello G, Palma S, et al. The role of primary mitochondrial disorders in hearing impairment: an overview. *Medicina (Kaunas).* 2023;59(3):608.

### Adresa za dopisivanje:

Klinika za dječje bolesti Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
 Zavod za medicinsku i laboratorijsku genetiku, endokrinologiju i dijabetologiju s dnevnom bolnicom  
 Klaićeva 16, 10 000 Zagreb, Croatia  
 e-mail: [ivonas3010@gmail.com](mailto:ivonas3010@gmail.com)

SUMMARY

## Genetic etiology of hearing loss in Croatia in individuals negative for GJB2 variants

Ivona Sansović, Ana-Maria Meašić, Adriana Bobinec, Morana Mikloš, Ljubica Odak, Katarina Vulin

**Objective:** To report on the spectrum and frequency of clinically relevant variants detected in 66 GJB2-negative patients with non-syndromic and 39 patients with syndromic hearing loss who underwent genetic testing at the Children's Hospital Zagreb between April 2019 and December 2024.

**Methods:** A multiplex ligation-dependent probe amplification method was used to analyze copy number variants in STRC and OTOA genes in 49 patients with non-syndromic hearing loss. Clinical exome sequencing was performed in patients negative for biallelic variants of GJB2, GJB6, OTOA, and STRC genes and patients with syndromic hearing loss, a total of 60.

**Results:** Biallelic variants in STRC and OTOA genes were not detected, probably due to the small study group and limitations of the applied methods. Clinical exome analysis in eight subjects with non-syndromic hearing loss revealed three autosomal dominant forms: DFNA8/12, DFNA11, and DFNA2A and three autosomal recessive forms: DFNB23/Usher syndrome type 1F, DFNB8/10, and DFNB3. 35 different variants in 21 genes were detected in 29 subjects with syndromic hearing loss, two of which in SIX1 and CHD7 genes were newly described. 19 different syndromes associated with hearing loss were found. 27.5 % (8/29) of positive patients with syndromic hearing loss had Usher syndrome type 2A with the variant c.11864G>A found in 62.5 % (5/8) of patients.

**Conclusion:** The high prevalence of the c.11864G>A variant in our population is likely due to a founder effect. Considering the heterogeneous etiology of hearing loss, its diagnosis is very complex and challenging, especially in complex syndromic forms where changes in different genes in the same patient can contribute to hearing impairment or its other clinical features.

**Key words:** HEARING LOSS; EXOME SEQUENCING; MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION; DNA COPY NUMBER VARIATIONS