

Kuulmislangu geneetilised põhjused Eesti lastel ning leitud genotüübi ja fenotüübi omavaheline võrdlus

Rita Teek^{1,2}, Katrin Kruustük³, Riina Žordania⁴, Kairit Joost⁴, Tiia Reimand^{1,2,6}, Eneli Oitmaa^{5,7}, Mari Nelis⁸, Olga Žilina⁵, Tiina Kahre^{1,2}, Neeme Tõnisson^{1,7}, Katrin Õunap^{1,2} – ¹TÜ Kliinikumi ühendlabori geneetikakeskus, ²TÜ lastekliinik, ³TÜ Kliinikumi kõrvakliinik, ⁴Tallinna Lastehaigla, ⁵TÜ molekulaar- ja rakubioloogia instituut, ⁶TÜ sünnitusabi ja günekoloogia õppetool, ⁷Asper Biotech, ⁸Eesti Biokeskuse genotüpiseerimise tuumiklabor

Võtmesõnad: kuulmislangu, geneetika, GJB2 geen, DNA diagnostika

Eesmärk. Selgitada välja kuulmislangu (KL) geneetilised põhjused Eesti lastel ja kirjeldada nende fenotüüpi.

Metoodika. Uuringus osales 233 KLiga last, kellele tehti APEX-geenikiibi analüüs 201 erineva mutatsiooni suhtes 8 pärilikku KLi põhjustavas geenis (GJB2, GJB3, GJB6, GJA1, SLC26A4, SLC26A5, 12S-rRNA ja tRNA (Ser) geenid).

Tulemused. Leidsime 115 patsiendil (49%) GJB2 mutatsiooni vähemalt ühes alleelis, neist 100 lapsel esines vähemalt ühes alleelis mutatsioon c.35delG. 5 patsiendi (2%) KL oli tingitud kaasasündinud tsütomegaloviirusinfektsioonist. Sündroomne KL kinnitati 7 uuritava. Kogu genoomi genotüpiseerimisplatformi analüüs tehti 28 patsiendile, selle tulemusel leidsime 4 erinevat

potentsiaalselt patogeenset deleteerunud kromosoomipiirkonda.

Järeldused. Kõige sagedasem lapsea KLi põhjustav mutatsioon on c.35delG, mille osakaal KLiga laste hulgas on 75% GJB2 geeni mutatsioonidest. Uuringu tulemusena selgus või täpsustus KLi etioloogias geneetiline faktor 140 patsiendil (60%).

Kuulmislangu (KL) on sensoorne haigus, mille all kannatab miljoneid inimesi üle kogu maailma. Kuigi KL ei ole eluohtlik, on see nii ühiskondlikus kui ka ametialases elus arvestatavaks probleemiks. Varajase algusega KL on 50–60%-l juhtudest pärilik ehk geneetiline ja 40–50%-l juhtudest on tegemist omandatud KLiga. Pärilik KL on põhjustatud geenimuutustest, omandatud KL aga kahjulike väliskeskkonnategurite toimel organismile (perinataalsed, lapsea infektsioonid, täiskasvanutel müra ja traumad) (1, 2). Pärilik KL jagatakse omakorda sündroomseks ja mittedüendroomseks vormiks. Sündroomse KLi korral esineb patsiendil lisaks kuulmisfunktsiooni häirumisele väliskõrva nähtav anomaalia või teiste elundisüsteemide patoloogia. Kirjanduse alusel on sündroomse KLi osakaal geneetilise KLiga patsientide hulgas ligikaudu 30%, kuid kõikide KLiga isikute hulgas (geneetiline ja omandatud KL) on see protsent väiksem (3). Mittedüendroomse ehk isoleeritud KLi korral ei esine patsiendil väliselt nähtavaid arenguanomaaliaid ega teiste elundisüsteemide patoloogiat. Kaasasündinud päriliku KLiga

patsientidest on 50–80%-l juhtudest tege- mist isoleeritud KLiiga (2, 4). Kuna isoleeritud KL on enamasti põhjustatud sise- kõrva teo kahjustusest, siis patsientidel esineb kõige sagedamini neurosensoorne KL (1). Päriliku KLiiga seotud geenide identifitseerimise ja kaardistamisega alustati 20. sajandi 90. aastate esimesel poolel. Esimene DFNA1 lookus kaardistati 1992. aastal autosoom-dominantse (AD) KLiiga suure perekonna liikmetel Costa Ricas (1). AD lookuseid tähistatakse DFNAga, kus DFN on lühend ingliskeelsest sõnast *deafness* (kurtus) ja A tähistab autosoom-dominantset KLi. Esimesed autosoom-retsessiivse (AR) KLiiga seotud geenid isoleeriti 1997. aastal (5). ARi lookuseid tähistatakse DFNBga, kus DFN pärineb sõnast *deafness* ja B tähistab autosoom-retsessiivset KLi. Normaalse kuulmisprotsessiga arvatakse olevat seotud umbes 1% inimese geenidest, s.o 300–500 geeni, KLi põhjustajana on kirjeldatud 120 geeni (1). Kuigi 20. sajandi viimasel dekaadil identifitseeriti kiiresti suur hulk KLiiga seotud gene, tuleb sellesse suhtuda kui pooleliolevasse töösse, kus hinnanguliselt on teada vaid 1/3 võimalikest geenidest (1, 2, 6).

Vaatamata suurele AR-tüüpi pärilikku KLi põhjustavate geenide arvule on enamuse ARi mittesündroomse KLi juhtudest (58–88%) seotud 13. kromosoomi regioonis 13q11–12 asuva DFNB1 lookusega ning on tingitud mutatsioonist GJB2 geenis (MIM 121011). GJB2 geen kodeerib nn mulkühenduse valku (*gap junction protein*) nimetusega konneksiin 26 (7). GJB2 geen esineva c.35delG lugemisraami nihet põhjustav mutatsioon on Euroopa populatsioonides kõige sagedamini esinev pärilikku KLi põhjustav mutatsioon, mida leitakse umbes 30%-l europiidset päritolu KLiiga patsientidest (4, 8).

Alates 1960. aastate lõpust on tähelepanu pööratud laste KLi varajasele diagnostikale ja 1970. aastatel alustati vastsündinute KLi skriininguga (9). KLi varajane diagnostika vastsündinutel ja imikutel on tähtis kohese

rehabilitatsiooni seisukohast. Avastamata mõlemapoolne KL põhjustab kõne ja kognitiivse arengu hilistumise (10). Eestis alustati vastsündinute kuulmisskriininguga 2004. aastal ja 2009. aastal oli KLi sõeluuringuga hõlmatud juba 88% Eesti vastsündinutest (Kruustük jt, publitseerimata andmed).

Kuni 2005. aastani oli Eestis uuritud vaid KLi levimust. Uus ja Davis kirjeldasid oma retrospektiivses uuringus KLi esinemist ajavahemikul 1985–1990 sündinud Eestis elavatel lastel. KLi esinemissageduseks saadi 172 juhtu 100 000 elussünni kohta ning kaasasündinud KL esines 152 juhul 100 000 elussünni kohta (ehk üks KLiiga laps 658 vastsündinu kohta). Selle töö tulemusi võrreldi teiste Euroopas tehtud uurin- gutega ja leiti, et KLi esineb meil oluliselt sagedamini kui Euroopas keskmiselt (11).

Meie uurimistöö peamisteks eesmärki- deks oli välja selgitada Eesti lastel esineva varajase algusega KLi geneetilised põhjused ning analüüsida päriliku KLi genotüübi ja fenotüübi seoseid.

MATERJALID JA MEETODID

1. VARAJASE ALGUSEGA KUULMISLANGUSEGA LASTE UURINGURÜHM

Uuringurühma moodustasid 233 last vanuses 0–18 aastat üle Eesti, kellel oli diagnoositud lapseea-algusega KL. Patsiendid olid esmalt pöördunud nina-kõrva-kurgu- arsti konsultatsioonile kas vastsündinute KLi sõeluuringu mitteläbimise tõttu või hiljem tekkinud KLi-kahtlusega. Uuringu- rühma kuulusid KLiiga lapsed, kes suunati geneetiku konsultatsioonile ajavahemikul 01.01.2000–31.03.2009. Põhja-Eesti piir- konnas toimus geneetiku konsultatsioon Tallinna Lastehaiglas ja Lõuna-Eestis Tartu Ülikooli Kliinikumis. Kõikidel juhtudel täpsustati perekonna anamneesi ja sugupuukoostamisel pöörati tähelepanu KLi esine- misele mitme põlvkonna jooksul. Sünd- roomse KLi diagnostikas märgiti kliini- lisel läbivaatusel üles kasvu parameetrid ja fenotüübis esinevad tunnused elundkon- dade kaupa.

Arvestades Uusi ja Davise avaldatud kaasasündinud KLi esinemissagedust elussündide kohta (üks KLiga laps 658 vastsündinu kohta), peaks olema sellesse uurimistöösse haaratud vähemalt 56% kõiki-dest varajase algusega KLiga lastest, kes on sündinud ajavahemikul 1991–2008 (11).

Uurimistöösks oli olemas Tartu Ülikooli inimuuringu eetikakomitee luba. Lapsevanemad või uuritavate laste seaduslikud hooldajad andsid allkirja informeeritud nõusoleku lehele.

2. MOLEKULAARSED JA TSÜTOGENEETILISED UURINGUD

a) Kõigile uuringurühma patsientidele, kes pöördusid geneetiku konsultatsioonile ajavahemikul 2005–2009, tehti DNA analüüs 8 erinevas geenis (GJB2, GJB3,

GJB6, GJA1, SLC26A4, SLC26A5, 12S-rRNA ja tRNA (Ser) geen) paikneva 201 mutatsiooni suhtes oligonukleotiidmatriksil toimuva primer-ekstensiooni ehk APEX-meetodil (Asper Biotech, Tartu) TÜ Kliinikumi ühendlabori geneetikakeskuses (12). Enne 2005. aastat oli GJB2 mutatsiooni c.35delG suhtes PCR (polümeraasahelreaktsioon) analüüsiga uuritud 23 patsienti ja neil oli leitud mutatsiooni c.35delG homosügootsus. Nendele patsientidele APEX-analüüsi ei tehtud. Teistel enne 2005. aastat uuritud patsientidel, kaasa arvatud mutatsiooni c.35deG heterosügootid, tehti hiljem juurde APEX-analüüs. Genotüübi ja fenotüübi võrdluse tegemiseks määratlesime patsientidel esineva KLi sügavuse, arvestades paremini kuulva kõrva KLi raskusastet (vt tabel 1 ja 2).

b) Prestiini geeni uuringurühma kuulunud 194 last moodustasid osa varajase algusega KLiga laste uuringurühmast, kes 2005.–2007. aastal pöördusid geneetiku konsultatsioonile. Selle töö tulemused avaldasime 2009. aastal (13).

c) Vajaduse korral tehti kromosomaalne analüüs perifeerse vere lümfotsüütide kultuurist 55 patsiendile.

Tabel 1. Kuulmislanguse (KL) raskusastmed Euroopa kaasasündinud kurtuse uurimise koostöövõrgustiku GENDEAF (*European Thematic Network on Genetic Deafness*) kriteeriumide alusel (16)

KLi aste	dB
Kerge	21–40
Keskmine	41–70
Raske	71–95
Väga raske	> 95

Tabel 2. GJB2 mutatsioonide esinemissagedus erineva raskusastmega kuulmislanguse korral

Genotüüp	Juhtude arv (%)	Kerge KLi juhtude arv (%)	Keskmise KLi juhtude arv (%)	Raske KLi juhtude arv (%)	Väga raske KLi juhtude arv (%)	KL tugevuste määrata (%)
c.35delG/c.35delG	73 (31,3)	–	16 (21,9)	20 (27,4)	37 (50,7)	–
p.M34T/p.M34T	7 (3,0)	7 (100)	–	–	–	–
c.35delG/p.M34T	5 (2,2)	1	2 (40)	–	1	1
c.35delG/p.R143W	4 (1,7)	–	–	–	4 (100)	–
c.35delG/c.-3201G>A	4 (1,7)	1 (25)	–	2 (50)	–	1 (25)
c.35delG/c.312_325del14	2	–	–	2	–	–
c.35delG/c.167delT	1	–	–	1	–	–
c.35delG/p.E47X	1	–	1	–	–	–
c.35delG/-	9 (3,9)	2 (22,2)	1	1	3 (33,3)	2 (22,2)
c.35delG/- *	1	–	–	–	–	1
p.M34T/p.R143W	1	–	1	–	–	–
p.M34T/ c.-3201G>A	1	–	–	1	–	–
p.M34T/p.L90P	1	1	–	–	–	–
p.M34T/-	4 (1,7)	–	2	–	1	1
p.M34T/- **	1	1	–	–	–	–

* Patsiendi kuulmislangus on põhjustatud mitokondriaalses tRNA-Ser geenis asuvast mutatsioonist 7472insC.

** Patsiendi kuulmislangus on põhjustatud kaasasündinud tsütomegaloviirusinfektsioonist.

- d) Patsientide hulgast, kelle KLi etioloogia jäi ikkagi ebaselgeks, tehti 96 lapsel kaasasündinud tsütomegaloviirusinfektsiooni (CMV) DNA analüüs vastsündinute skriiningukaartidelt (kuivatatud vereplekid Guthrie kaartidel). Eesti vastsündinute skriininguprogramm fenüülketonuuria suhtes algas 1993. aastal, testkaardid olid olemas 96 väljavalitud patsiendist 85 uuritava.
- e) Ebaselge etioloogiaga KLiga laste hulgast valisime välja 24 patsienti, kellel esines lisaks näo düsmorfism, arengumahajäämus või käitumishäired ning kellel me ei diagnoosinud KLiga seotud sündroomi. Neil tegime kogu genoomi genotüüpiseerimise analüüsi, kasutades selleks HumanCytoSNP-12 versiooni 1.0 või Human370CNV-Duot (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Sündroomse KLi diferentsiaaldiagnostikas kasutasime Londoni düsmorfologia andmebaasi (14).

TULEMUSED JA DISKUSSIOON

1. APEX-GEENIKIIBI UURINGUTE TULEMUSED

A) GJB2 GEEN

Me leidsime 115 uuritava (49%) GJB2 mutatsiooni vähemalt ühes alleelis, neist 100 lapsel esines vähemalt ühes alleelis mutatsioon c.35delG. Seega on kõige sagedasem lapsea KLi põhjustav mutatsioon c.35delG, mille osakaal KLi laste hulgas moodustab 75% kõikidest GJB2 geeni mutatsioonidest. Mutatsiooni c.35delG suhtes olid 73 patsienti (31%) homosügootid ning 7 patsienti (3%) olid homosügootid teise Eestis enam levinud mutatsiooni p.M34T suhtes. 5 patsiendil (2,2%) esines mutatsioonide c.35delG/p.M34T suhtes liitheterosügootsus. 12 patsiendil (5,2%), kellel leidsime esialgu mutatsiooni c.35delG heterosügootsuse, tuvastasime ka teise GJB2 mutatsiooni, millest sagedasemad olid mutatsioonid p.R143W, c.-3201G>A, c.312_325del14. 10-l c.35delG heterosügootil ei õnnestunud teist GJB2 mutatsiooni leida. Detailsemad GJB2 geeni-

uuringute tulemused KLiga lastel ja tavapopulatsioonis on avaldatud eraldi artiklis (15). Leitud GJB2 genotüübid Eesti KLiga lastel on toodud tabelis 2.

Haiguse kõige enam levinud genotüübiga (c.35delG/c.35delG) patsientidel esinesid sagedamini väga raske (50,7%) ja raske (27,4%) KL ning kolmandal kohal oli keskmine KL (20,6%). Mutatsiooni c.35delG homosügootide hulgas ei olnud ühtegi kerge KLiga last. Meie uuringutulemused on vastavuses kirjanduse andmetega, kus enamikul c.35delG homosügootsusega patsientidest kirjeldatakse väga rasket ja rasket KLi (16). Mõnedel esineb keskmine KL ja üksikjuhtudel on varem leitud ka kergelt KLi (8, 17). Arvatavasti ei leidnud me Eesti c.35delG homosügootide hulgas kerge KLiga lapsi väikese uuringurühma tõttu. Suure esinemissageduse tõttu käsitletakse c.35delG homosügootse genotüübiga patsiente kirjanduses sageli referentsgrupina.

Jätakuvalt vaieldakse aminohappe asendusmutatsiooni p.M34T patogeensuse üle. Leidsime oma KLiga laste uuringurühmast 7 patsienti (3,0%), kes olid mutatsiooni p.M34T homosügootid. Kirjanduse andmetel esineb p.M34T homosügootsusega patsientidel enamasti kerge KL (8), ka Eesti p.M34T homosügootidel oli diagnoositud kerge KL. Samas olid kõigil 7-l p.M34T/p.M34T genotüübiga patsiendil erineva kujuga audiogramm (15).

Mutatsioonide c.35delG ja p.M34T suhtes liitheterosügootsetel lastel leidsime erineva raskusastmega KLi: 5 patsiendist (2,2%) 1-l esines kerge, 2-l keskmine ja 1-l raske KL; 1 patsiendil ei olnud KLi raskusastet määratud. Kirjanduse andmetel seostatakse mutatsiooni p.M34T homosügootsust kergema astme KLiga kui mutatsioonide c.35delG ja p.M34T liitheterosügootsust (8).

Teadaolevalt on c.35delG/p.R143W genotüüp üks väheseid, mille korral esineb patsientidel märgatavalt raskem KL kui c.35delG/c.35delG referentsgrupis (8).

Meie uuringurühma neljal mutatsioonide c.35delG ja p.R143W liitheterosügootidel (1,7%) oli diagnoositud väga raske KL. Leidsime 4 patsienti c.35delG/c.-3201G>A genotüübiga, kellel esines kergem KL kui mutatsiooni c.35delG homosügootidel. Teised genotüübid, mis esinesid üksikjuhitudena, on toodud tabelis 2.

B) GJB3 JA GJB6 GEEN

Oma uuringurühmas ei leidnud me ühtegi patsienti GJB6 geeni deletsioonidega. GJB6 geeni kahte suurt deletsiooni, del(GJB6-D13S1830) ja del(GJB6-D13S1854), leitakse sageli liitheterosügootsena koos GJB2 geeni mutatsioonidega. Lisaks GJB2 geeni asuvale mutatsioonile p.R143W põhjustavad mutatsiooni c.35delG homosügootsusest raskemat KLi ka GJB6 geenis esinevad kaks eespool toodud deletsiooni. Mutatsioonide esinemist GJB6 geenis on sagedamini kirjeldatud Hispaanias, Prantsusmaal, Inglismaal, Iisraelis ja Brasiilias ning harvemini USAs, Belgias ja Austraalias (18–20). Sarnaselt Eestiga ei ole GJB6 deletsioone leitud ka Austria, Türgi ja Hiina KLiiga patsientidel (21).

Eesti KLiiga laste hulgas ei leidnud me ka ühtegi patsienti GJB3 geeni mutatsioonidega. Eelnevate uuringute tulemusi arvestades peetakse GJB3 mutatsioone KLi põhjustajateks Hiina populatsioonis ning Euroopas ja kaukasoididel arvatakse nende mutatsioonide esinemissagedus olevat äärmiselt väike (22).

C) SLC26A5 EHK PRESTIINI GEEN

Me leidsime prestiini (sisekõrva teo karvarakkude motoorne valk) geeni heterosügootse mutatsiooni IVS2-2A>G 4 patsiendil (2,1%) 194-st KLiiga lapsest ning 5-l nende 68 pereliikmest. Patsientide ega pereliikmete hulgas ei esinenud ühtegi SLC26A5 geeni asuva mutatsiooni IVS2-2A>G homosügooti. Kirjeldasime 9 isikut 5 erinevast perekonnast. Meie töö tulemused toetasid ka varem kirjanduses esitatud arvamust, mille kohaselt IVS2-2A>G heterosü-

gootne mutatsioon SLC26A5 geenis ei ole üksinda piisav KLi väljakujunemiseks.

D) SLC26A4 EHK PENDREDI SÜNDROOMI GEEN

Meie leidsime oma uuringugrupis viis KLiiga last, kellel esines SLC26A4 geeni mutatsioon vaid ühes alleelis. Patsientidel esines SLC26A4 geenis kokku kolm erinevat aminohappe asendusmutatsiooni: p.L597S, p.F335L ja p.R409H. Pendredi sündroomi geeni mutatsioonide peetakse sageduselt teiseks AR-tüüpi KLi põhjustajaks. Selle geeni mutatsioonidega seotud fenotüüp võib väljenduda alates Pendredi sündroomist (süندroomne KL) kuni isoleeritud mittesüندroomse KLin (DFNB4 lookus) (17). SLC26A4 geenis on kirjeldatud üle 150 mutatsiooni, mis on leitud Pendredi sündroomiga, DFN4 lookusega või laienenud aju akvaduktiga patsientidel (23, 24). Kuna SLC26A4 geeni mutatsioonid on AR pärlikkuse tüübiga, siis ei saanud me ühelgi patsiendil kinnitada Pendredi sündroomi geeni muutustest põhjustatud KLi.

E) MITOKONDRIAALSED MUTATSIOONID

Leidsime 233 KLiiga lapse hulgas kaks patsienti (0,9%), kellel esines mutatsioon mitokondriaalses DNAs. Esimesel patsiendil esines mutatsioon m.1555A>G mitokondriaalses 12S r-RNA geenis. Patsient oli vastsüündinueas viibinud respiratoorse düstressi tõttu intensiivraviosakonnas. Teisel lapsel leidsime mutatsiooni m.7472insC mitokondriaalse seriini tRNA^{UCN} geenis. Patsient oli ka mutatsiooni c.35delG heterosügoot GJB2 geenis. Patsiendi vanematel esines KL, emal oli mutatsioon m.7472insC mitokondriaalse seriini tRNA^{UCN} geenis, isa oli mutatsiooni c.35delG homosügoot GJB2 geenis.

Mutatsioon m.1555A>G on kõige sagedasem KLiiga seotud mitokondriaalne mutatsioon maailmas. Mittesüندroomse KLiiga europiidsetel isikutel leitakse mutatsioon m.1555A>G 0,6–2,5%-l (25). Selle mutatsiooniga seotud KL võib tekkida aminoglükosiidide manustamise järel, kuid

võib tekkida ka iseseisvalt (25, 26). Ainult ühe m.1555A>G mutatsiooniga patsiendi leidmine uuritute seast näitab selle mutatsiooni väikest esinemissagedust Eesti KLiiga lastel. Mutatsiooni m.1555A>G kandlust võib esineda rohkem täiskasvanute hulgas, kes tavaliselt hilise algusega KLiiga geneetiku konsultatsioonile ei pöördu.

2. KROMOSOOMIANALÜÜSI TULEMUSED

Uuringurühma 233-st KLiiga lapsest 55-l (23,6%) tegime kromosomaalse analüüsi, mille näidustuse määras geneetik. Tabelis 3 on toodud neli kromosomaalset häiret, mis leidsime KLiiga lastel.

Kolmel patsiendil leidsime balansseeritud kromosomaalse aberratsiooni, mistõttu tegime täiendavalt kogu genoomi genotüpi-seerimise, kasutades Illumina geenikiipe. Me ei leidnud uuritud piirkondades patoloogilisi muutusi – deletsioone või duplikatsioone. Veebiotsingul päriliku KLi koduleheküljel

Tabel 3. Kuulmislangu (KLiiga) lastel leitud kromosomaalsed häired

Nr	Karütotüüp	KLi raskusaste	KLi tüüp
1	46,XY,t(2;7)(q21;q32)	määramata	määramata
2	46,XY,t(3;8)(q25;q24.1)	keskmise	bilateraalne SN*
3	46,XY,t(6;7)(p21.1;q36)	keskmise	bilateraalne SN
4	47,XY,+21 Downi sündroom	keskmise	bilateraalne SN

*SN – sensorineuraalne KL

Tabel 4. Erinevate geneetiliste muutuste seos kuulmislangu (KL) tekkega lastel

Uuringul leitud geneetilised muutused	Seos KLi tekkega. Juhtude arv (%)	
	Kindlalt KLi põhjustanud	Seotud KLi tekkega, kuid vajab edasist uurimist
Konneksiin 26 geeni mutatsioonid	100 (42,9)*	15 (6,4)**
Prestiini geeni mutatsioonid	–	4 (1,7)
Pendredi geeni mutatsioonid	–	5 (2,2)
Sündroomne KL	7 (3,0)	–
Kromosomaalne patoloogia	1	3 (1,3)
Submikroskoopiline kromosomaalne patoloogia	1***	3 (1,3)
Kaasasündinud CMV-infektsioon	5 (2,2)	–
Mitokondriaalsed mutatsioonid	2 (0,9)	–

* Kindlalt KLi põhjustavateks peeti konneksiin 26 geeni mutatsioonide homosügootid ja liitheterosügootid.

** Seotuks KLi tekkega alla arvestati konneksiin 26 geeni mutatsioonide heterosügootid. Siia alla kuulub ka 3 patsienti, kellel esines lisaks ka teises geenis mutatsioon või leidis kinnitust KLi etioloogia, mis ei olnud seotud GJB2 geeni mutatsioonidega (Pendredi sündroomi geeni mutatsiooni heterosügootsus, mitokondriaalne mutatsioon ja kaasasündinud CMV-infektsioon).

*** Seda haigusjuhtu on eelnevalt kirjeldanud dr H. Puusepp perekondliku vaimse arengu mahajäämuse uuringurühma tulemuste raames.

(*Hereditary Hearing Loss Homepage*) (27), leidsime mõned AD päriliku KLi lookused, mis lokaliseerusid patsientidel esinevate translokatsioonide murrukohtadesse. Seega ei saa välistada, et translokatsioonide murrukohtades võivad genoomis esineda väikesed muutused, mida ei ole võimalik tehtud uuringuga leida. Nendel kolmel patsiendil on plaanis teha täiendavaid uurin-guid, et kindlaks teha võimalikud KLi põhjustavad kandidaatgeenid.

3. KAASASÜNDINUD

TSÜTOMEGALOVIIIRUSINFEKTSIOON

APEX kiibiuringu järel jäi KLi etioloogia ebaselgeks 126 patsiendil, kelle hulgast tegime 85-le lapsele DNA analüüsi kaasasündinud CMV-infektsiooni esinemise suhtes, 5 patsiendil (2%) saime positiivse tulemuse. 5 lapsel on KL põhjustatud kaasasündinud CMV-infektsioonist.

Kirjanduse alusel on kaasasündinud CMV-infektsioon kõige sagedasem KLi põhjustav väliskeskkonnategur lastel (17), mille keskmine esinemissagedus sünnil on 0,64%. Kirjanduse andmetel tekivad 10–15%-l sümptomiteta ja kõikidel haiguse sümptomitega kaasasündinud CMV-infektsiooniga vastasündinutel hiljem püsivad meditsiinilised probleemid, millest sagedasemad on neuroloogilised häired, sensorineuraalne KL ja nägemishäired (28).

4. KOGU GENOOMI GENOTÜPISEERIMISE ANALÜÜSI TULEMUSED

Valisime KLiiga laste rühmast 24 patsienti, kelle KLi etioloogia oli eelnevate uuringute järel jäänud ebaselgeks, kellel esines lisaks düsmorfne välimus, arenguline mahajäämus ja/või käitumishäired ning kellel ei saanud diagnoosida sündroomset KLi.

Uurisime neid patsiente, kasutades kogu genoomi genotüpiseerimist Illumina geenikiipidega. Kolmel patsiendil leidsime deleetunud kromosoomipiirkonnad, mis võivad olla seotud nendel patsientidel esinevate kliiniliste sümptomitega (12q13.3-q41.1 deletsioon, k.a MYO1A geen; 3p26.2 deletsioon, k.a DFNB6 lookus ja 1p33 deletsioon).

5. SÜNDROOMSE KL-I DIAGNOSTIKA TULEMUSED

Uuringu raames diagnoosisime kliiniliste uuringute põhjal seitsmel patsiendil (3%) sündroomset KLi. Kahel patsiendil leidis kinnitust II tüüpi Waardenburgi sündroomi diagnoos ja ühel patsiendil vastavalt II tüüpi Stickleri sündroomi, Klippeli-Feili sündroomi, Kearnsi-Sayre'i sündroomi, Usheri sündroomi või Goldenhari sündroomi diagnoos.

Kuigi sellised sündroomid nagu Waardenburgi, Usheri, Jervelli ja Lange-Nielsen'i sündroomid esinevad käsiraamatute alusel suhtelised sageli, diagnoositakse reaalses elus neid vähe (29, 30). Kuna DNA analüüsiks kasutataval APEX-geenikiibil asuvad mutatsioonid põhjustavad peamiselt mittesündroomset ehk isoleeritud KLi, siis õnnestus ka meil oluliselt suuremal protsendil uuritustest kinnitada mittesündroomse KLi diagnoos. Tegelikult oli meie uuringurühmas rohkem patsiente, kellel esines kas Waardenburgi sündroomi või branhiootorenaalse (BOR) sündroomi kahtlus, kuid kergekujuliste sümptomite tõttu ei olnud võimalik kliinilise pildi alusel neid sündroomide diagnoosida. Usheri sündroomiga patsientide puudumine rühmast on

tõenäoliselt tingitud sellest, et sündroomile iseloomulik sümptom – pigmentretiniit – tekib enamasti pärast kümnendat eluaastat, kuid kaasasündinud KLiiga lapsed jõuavad geneetiku konsultatsioonile aastaid varem ning nende KLi etioloogia võib siis jääda ebaselgeks.

KOKKUVÕTE

Eestis on kõige sagedasemaks lapsega KLi põhjuseks mutatsiooni c.35delG homosügootsus GJB2 geenis, mille leidsime igal kolmandal geneetiku konsultatsioonile pöördunud varakult alanud KLiiga lapsel (31,3%). Samuti esineb meil ka suhteliselt palju teisi GJB2 geeni mutatsioone (11,4%), mistõttu on näidustatud geneetiku poole pöördunud KLiiga laste uurimine APEX-kiibiga. GJB2 geeni mutatsioonid olid ligikaudu 43%-l uuritud lastest KLi põhjustajaks.

Sündroomse KLi diagnoosimise osakaal oli uuringurühmas väike (3%). Seetõttu on soovitatav geneetiku konsulteeritud KLiiga lapsi, kelle KLi etioloogia on jäänud ebaselgeks, korduvalt konsulteerida teismelisena või varajases täiskasvanueas. Selleks ajaks hakkavad välja kujunema mitmete sündroomidele iseloomulikud sümptomid, nagu Usheri sündroomile iseloomulik pigmentretiniit või Pendredi sündroomile iseloomulikud kilpnäärme talitushäired. Samuti võivad aastate jooksul tekkida uued diagnostilised võimalused KLi etioloogia väljaselgitamiseks. Käesolevas uuringus leidis kinnitust või täpsustus kinnitus või täpsustus KLi etioloogia 140 lapsel (60%-l uuringualustest).

TÄNUAVALDUS

Uuringut rahastas Eesti Teadusfond (grant nr 6808 ja 8175). Täname kõiki uuringus osalenud patsiente ja nende vanemaid, Kati Kuuset keeleteadlast nõuannete eest artikli kirjutamisel ning professor Mart Kulli toetuse ja abi eest.

rita.teek@kliinikum.ee

KIRJANDUS

- Finsterer J, Fellingner J. Nuclear and mitochondrial genes mutated in nonsyndromic impaired hearing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005; 69: 621–47.
- Teek R, Raukas E, Oitmaa E jt. Pärilik ehk geneetiline kuulmislangus. *Eesti Arst* 2007;86:254–61.
- Smith RJH, Van Camp G. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. In: *GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource* (online database). Seattle; University of Washington:1993–2009. Saadaval <http://www.genetests.org>.
- Gasparini P, Rabionet R, Barbuji G, et al. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet* 2000;8:19–23.
- Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet* 2006;69:371–92.
- Nance WE. The genetics of deafness. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2003;9:109–19.
- Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, et al. A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet* 1994;6:24–8.
- Snœckx RL, Huygen PL, Feldmann D, et al. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet* 2005;77:945–57.
- Parving A. Early detection and assessment of genetic childhood hearing impairment. Martini, A, Stephens, D, Read, AP, eds. In: *Genes, Hearing, and Deafness*. Informa UK Ltd 2007;205–6.
- Jakubikova J, Kabatova Z, Pavlovicnova G, et al. Newborn hearing screening and strategy for early detection of hearing loss in infants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;73:607–12.
- Uus K, Davis AC. Epidemiology of permanent childhood hearing impairment in Estonia, 1985–1990. *Audiology* 2000;39:192–7.
- Gardner P, Oitmaa E, Messner A, et al. Simultaneous multigene mutation detection in patients with sensorineural hearing loss through a novel diagnostic microarray: a new approach for newborn screening follow-up. *Pediatrics* 2006;118:985–94.
- Teek R, Oitmaa E, Kruustuk K, et al. Splice variant IVS2-2A>G in the SLC26A5 (Prestin) gene in five Estonian families with hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;73:103–7.
- Winter RM, Baraitser M. *London Dysmorphology Database*. London Medical Databases, 2010.
- Teek R, Kruustuk K, Zordania R, et al. Prevalence of c.35delG and p.M34T mutations in the GJB2 gene in Estonia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010;74:1007–12.
- Cryns K, Orzan E, Murgia A et al. A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. *J Med Genet* 2004;41:147–54.
- Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res* 2009;681:189–96.
- del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002;346:243–9.
- Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, et al. Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. *Am J Hum Genet* 2003;73:1452–8.
- Marlin S, Feldmann D, Blons H, et al. GJB2 and GJB6 mutations: genotypic and phenotypic correlations in a large cohort of hearing-impaired patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131:481–7.
- del Castillo FJ, Rodriguez-Ballesteros M, Alvarez A, et al. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet* 2005;42:588–94.
- Liu XZ, Yuan Y, Yan D, et al. Digenic inheritance of non-syndromic deafness caused by mutations in the gap junction proteins Cx26 and Cx31. *Hum Genet* 2009;125:53–62.
- Kopp P, Pesce L, Solis SJ. Pendred syndrome and iodide transport in the thyroid. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:260–8.
- Anwar S, Riazuddin S, Ahmed ZM, et al. SLC26A4 mutation spectrum associated with DFNB4 deafness and Pendred's syndrome in Pakistanis. *J Hum Genet* 2009;54:266–70.
- Xing G, Chen Z, Cao X. Mitochondrial rRNA and tRNA and hearing function. *Cell Res* 2007;17:227–39.
- Van Camp G, Smith RJ. Maternally inherited hearing impairment. *Clin Genet* 2000;57:409–14.
- Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage. Saadaval <http://webho1.ua.ac.be/hhh/>.
- van der Knaap MS, Vermeulen G, Barkhof F, et al. Pattern of white matter abnormalities at MR imaging: use of polymerase chain reaction testing of Guthrie cards to link pattern with congenital cytomegalovirus infection. *Radiology* 2004;230:529–36.
- Billings KR, Kenna MA. Causes of pediatric sensorineural hearing loss: yesterday and today. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;125:517–21.
- Kenna MA, Wu BL, Cotanche DA, et al. Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:1037–42.

SUMMARY

Genetic causes of hearing loss among Estonian children and their genotype-phenotype correlation

Key words: hearing loss, genetics, *GJB2* gene, DNA diagnostics

AIM. To investigate genetic background and aetiology in Estonian children with hearing loss (HL) and to describe their phenotype.

METHODS. The study group included 233 children with HL. They were investigated by APEX gene array analysis, which covers

201 mutations in eight different genes (*GJB2*, *GJB3*, *GJB6*, *GJA1*, *SLC26A4*, *SLC26A5*, *12S-rRNA* and *tRNA (Ser)*).

RESULTS. A total of 115 patients had a mutation in at least one allele of the *GJB2* gene (49%). Seventy-three (31%) were homozygous for the c.35delG mutation and seven (3%) were homozygous for the p.M34T mutation. Five patients (2%) had congenital cytomegalovirus infection established by DNA analysis. Syndromic HL was confirmed in seven patients. Whole

genome array analysis was performed in 28 patients with different developmental problems; in 4 of them we identified four potentially pathogenic chromosomal deletions.

CONCLUSION. The most frequent *GJB2* allele causing HL in Estonian children was c.35delG (75%) followed by p.M34T (12%); the other alleles were found rarely (0.2–2%). The etiology of HL was established or specified in 140 investigated children of the study population (60%).