# Charakterisierung von angeborenen Hörstörungen mit Hilfe von Hochdurchsatz-Sequenziermethoden

Dissertation zur Erlangung des

naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Michaela Angelika Hedwig Hofrichter

geboren in

Nürnberg

Würzburg, 2019

Eingereicht am: ……..……..

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: ……..

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums: ……..…

Doktorurkunde ausgehändigt am: …….…….

Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

# EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „**Charakterisierung von angeborenen Hörstörungen mit Hilfe von Hochdurchsatz-Sequenziermethoden**“ eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

# AFFIDAVIT

I hereby declare that my thesis entitled „**Characterization of inherited hearing loss by high throughput sequencing methods**” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet, the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg, den_____

_____

Unterschrift

# INHALTSVERZEICHNIS

Eidesstattliche Erklärung ..... 3
Affidavit ..... 3
Inhaltsverzeichnis ..... 4
Abbildungsverzeichnis ..... 8
Tabellenverzeichnis ..... 11
Abkürzungsverzeichnis ..... 12
Zusammenfassung ..... 19
Summary ..... 21
1 Einleitung ..... 23
1.1 Hörstörungen ..... 23
1.1.1 Definition und Funktionsweise des Hörens ..... 23
1.1.2 Klassifizierungen von Hörstörungen ..... 29
1.2 Genetik der Hörstörungen ..... 33
1.2.1 Nicht-syndromale Hörstörungen ..... 34
1.2.2 Syndromale Hörstörungen ..... 40
1.3 Next Generation Sequencing ..... 46
1.4 Zielsetzung ..... 49
2 Materialien und Methoden ..... 50
2.1 Allgemeine Laborausrüstung ..... 50
2.1.2 DNA-Aufreinigung ..... 52
2.1.3 Qualitätssicherung der DNA ..... 55
2.1.4 Panel- bzw. Exom-Sequenzierung ..... 56
2.1.5 Validierung und Segregationsanalyse ..... 59
2.1.6 STR-Analyse und X-Inaktivierung ..... 62

2.2 Methoden ..... 64
2.1.1 Extraktion der DNA ..... 64
2.1.3 Qualitätssicherung der DNA ..... 65
2.1.4 Vorbereitung der Proben ..... 68
2.1.5 Validierung und Segregationsanalysen ..... 78
3 Ergebnisse ..... 88
3.1 Patientenüberblick ..... 88
3.1.1 Anzahl der Patienten ..... 88
3.1.2 Einteilung der Patienten ..... 89
3.2 Genetische Ätiologie der Kohorten ..... 94
3.3 Varianten-Klassifizierung am Beispiel ausgewählter Familien ..... 98
3.3.1 Klassifizierung der kausalen Variante inmitten weiterer pathogen eingestufter Varianten ..... 98
3.3.2 Unvollständige Segregation ..... 102
3.3.3 Unilaterale Hörstörung – Akkumulation mehrerer Varianten ..... 106
3.3.4 Genetische Disposition im Verdacht von einer Cytomegalovirus (CMV)-assoziierte Hör-störung ..... 108
3.4 Der mehrdeutige Charakter von Hörstörungsfamilien mit syndromaler genetischer Ätiologie ..... 110
3.4.1 Falsch-positive nicht-syndromale Hörstörungsfälle ..... 110
3.4.2 Nicht-syndromale Hörstörungen mit syndromaler Ätiologie ..... 114
3.5 Intrafamiliäre Heterogenität ..... 125
3.5.1 Familiäre Locus-Heterogenität ..... 125
3.5.2 Kombination von familiären Mutationen ..... 131
3.6 *De novo*-Ereignis – Fallbeschreibung *CEACAM16* ..... 133
3.7 Rekurrent betroffene Aminosäuren – Fallbeschreibung *S1PR2* ..... 135
3.8 X-chromosomale Hörstörungen ..... 137
3.8.1 *POU3F4*-assoziierte Hörstörungen ..... 138

3.8.2 *SMPX*-assoziierte Hörstörungen ... 139
3.9 Rekurrent betroffene Hörstörungsgene ... 145
3.9.1 *TECTA*-assoziierte Hörstörungen ... 145
3.9.2 *SLC26A4*-assoziierte Hörstörungen ... 145
3.9.3 MYO15A-assoziierte Hörstörungen ... 146
3.9.4 *LHFPL5*-assoziierte Hörstörungen ... 148
3.10 Deletionen und Duplikationen als genetische Ursache ... 151
3.10.1 CNV-Analyse mit Hilfe von Exom-Daten ... 151
3.10.2 Intragenische Deletion im *COL9A1*-Gen ... 154
3.11 Charakterisierung von Kandidatengenen ... 156
3.11.1 Ungelöste Kandidatengenfamilien ... 157
3.11.2 Kandidatengenfamilie mit potentiellem Kandidatengen ... 161
4 Diskussion ... 166
4.1 Unterschiede Genetische Unterschiede in den Ethnien ... 166
4.1.1 Unterschied in der Aufklärungsrate ... 166
4.1.2 Variantenspektrum in den Hörstörungsgenen ... 168
4.2 Die Herausforderung der Varianten-klassifizierung ... 169
4.2.1 Schwierigkeiten bei der Variantenklassifizierung ... 170
4.2.2 Der zweideutige Charakter einzelner Hörstö-rungsgene ... 173
4.2.3 Familiäre Heterogenität ... 175
4.2.4 Phänotyp basierte Datenanalyse ... 176
4.2.5 Variantenklassifizierung Hinsichtlich angeführten Komponenten ... 177
4.2.6 Exom-Sequenzierung als Methodik in der Forschung und Diagnostik ... 178
4.3 Beispielfälle im Detail ... 179
4.3.1 De novo Mutation im *CEACAM16*-Gen ... 179
4.3.2 Rekurrent betroffene Aminosäure im *S1PR2*-Gen ... 182
4.3.3 X-chromosomale Hörstörungen ... 184

4.3.4 Rekurrent betroffene Hörstörungsgene ... 187
4.4 Charakterisierung neuer Kandidatengene ... 194
4.5 Re-Analyse der Daten und Re-Klassifizierung von Varianten ... 200
5 Schlussfolgerung und Ausblick ... 205
5.1 Paradigmenwechsel vom Gen zur Variante ... 205
5.2 Ungelöste Fälle – Möglichkeiten zur Aufklärung ... 205
5.2.1 Technische Neuerungen – whole genome sequencing ... 206
5.2.2 Re-Analyse der Daten ... 206
5.2.3 Modifier, die die Hörstörung beeinflussen ... 207
5.3 Zukünftige Therapiemöglichkeiten ... 209
5.1 Tiermodelle für die Bestätigung von neuen Hörstörungsgenen ... 208
6 Literaturverzeichnis ... 210
7 Danksagung ... 229
8 Publikationsliste und Kongressbeiträge ... 230
8.1 Publikationen die direkt aus dieser Arbeit hervorgegangen sind: ... 230
8.2 Publikationen, die im Rahmen der Doktorarbeit entstanden sind ... 230
8.3 Kongressbeiträge ... 232
9 Anhang ... 234
9.1 Primerliste ... 234
9.2 Stammbäume mit Segregationsanalyse ... 242
9.3 Auflistung aller Hörstörungsgene mit OMIM Nummer und allen zusätzlichen Phänotypen ... 314
9.4 Auflistung aller pathogener Varianten in Zusammenhang mit den Familien ... 338
9.5 Phänotyp der Familien ... 360

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Überblick über die Komponenten des Gehörs. 23
Abb. 2: Gehörorgan.. 25
Abb. 3: Ausschnitt Cochlea. 26
Abb. 4: Corti'sches Organ. 27
Abb. 5: Haarsinneszelle. 28
Abb. 6: Audiogramm mit Klassifizierung der Hörstörung nach betroffenen Frequenzen sowie des Schweregrades. 31
Abb. 7: Hörstörungen können hinsichtlich Art, Auftreten, Schweregrad, Frequenz, Progressivität und Lateralität eingestuft werden. 34
Abb. 8: Karyogramm mit nicht-syndromalen Hörstörungsgenen. 35
Abb. 9: FlowCell High Out Put für den NextSeq. 47
Abb. 10: Darstellung der einzelnen Schritte zur Library Präparation im Überblick. 68
Abb. 11: Qualitätscheck der tagmentierten DNA mittels einer Bioanalyzer-Messung. 70
Abb. 12: Qualitätscheck der gepoolten Library mittels einer Bioanalyzer-Messung.). 72
Abb. 13: MiSeq von Illumina (Illumina, San Diego, USA) (Foto: Michaela Hofrichter). 74
Abb. 14: NextSeq500 von Illumina (Illumina, San Diego, USA) (Foto: Michaela Hofrichter). 75
Abb. 15: Variantenliste erstellt mit GensearchNGS eines Beispielpatienten.. 77
Abb. 16: Auftritt der Hörstörung bei den Patienten.. 90
Abb. 17: Verteilung des Schweregrades innerhalb beider Kohorten.. 91
Abb. 18: Einteilung der Patientenhörstörung aufgrund ihrer Lateralität. 92
Abb. 19: Einteilung der Hörstörung anhand der Stammbaumnomenklatur.. 93
Abb. 20: Aufklärungsrate der Fälle. Graphische Darstellung aller Fälle in Abhängigkeit der Identifizierung kausaler genetischer Varianten. 94
Abb. 21: Mutationsspektrum der betroffenen Hörstörungsgene von aufgeklärten Fällen in den verschiedenen Kohorten. 95
Abb. 22: Variantenarten, die zu einer Hörstörung führen. 96
Abb. 23: Variantenspektrum der einzelnen Gene. 97
Abb. 24: Stammbaum und Segregationsanalyse der Familie G9. 100
Abb. 25: Position der heterozygoten pathogenen Variante in TECTA in Relation zu schon beschriebenen Mutationen, die ebenfalls die vWFD4-Domäne des Gens betreffen. 101
Abb. 26: Audiogramme von betroffenen Familienmitgliedern G9. . 102
Abb. 27: Stammbaum der Familie E39. 103
Abb. 28: Stammbaum und Segregation der Familie G12. 104
Abb. 29: Stammbaum der Familie G42. 105
Abb. 30: Audiogramme des Patienten II-3 G11 über einen Zeitraum von 12 Jahren. 106
Abb. 31: Stammbaum der Familie G11 mit einem sporadischen Fall eines Patienten mit unilateraler Hörstörung. . 107

Abb. 32: Stammbaum der Familie G26. 109
Abb. 33: Stammbaum der Familie G19. 110
Abb. 34: Stammbaum der Familie G41 mit zwei betroffenen Patienten. 112
Abb. 35: Stammbaum der Familie G64. 113
Abb. 36: Stammbaum der Familie E44. 114
Abb. 37: Stammbaum der Familie E71. 116
Abb. 38: Stammbaum der Familie E36. 117
Abb. 39: Stammbaum der Familie G13. 119
Abb. 40: Stammbaum der Familie E2. 120
Abb. 41: Stammbaum der Familie G2. 122
Abb. 42: Stammbaum der Familie G6. 124
Abb. 43: Stammbaum der Familie E6. 126
Abb. 44: Stammbaum der Familie E70. 127
Abb. 45: Stammbaum der Familie E52. 128
Abb. 46: Stammbaum der Familie E72. 129
Abb. 47: Stammbaum der Familie E75. 130
Abb. 48: Stammbaum der Familie E55. 131
Abb. 49: Stammbaum der Familie G5. 133
Abb. 50: Ergebnisse der STR-Analyse. 134
Abb. 51: Stammbaum der Familie E30. 135
Abb. 52: 3D-Darstellung des Proteins S1PR2 mit Focus auf die Aminosäureposition 108 im Homologie-Modell. 136
Abb. 53: Stammbaum der Familie G63. 138
Abb. 54: Stammbaum der Familie E43. 139
Abb. 55: Stammbaum der Familie E79. 140
Abb. 56: Stammbaum der Familie E80. 141
Abb. 57: Stammbaum der Familie E81. 143
Abb. 58: Stammbaum der Familie E47. 146
Abb. 59: Auftragung aller in dieser Studie detektierten pathogenen Varianten im MYO15A-Gen. 147
Abb. 60: Stammbaum der Familie E1. 149
Abb. 61: Stammbaum der Familie E32. 149
Abb. 62: Stammbaum der Familie E63. 150
Abb. 63: Stammbaum der Familie E24. 152
Abb. 64: Nachweis von Deletionen im OTOA-Gen und deren Validierung. 153
Abb. 65: Stammbaum der Familie E26. 154
Abb. 66: Darstellung der Deletion im COL9A1-Gen in GensearchNGS und Validierung der Deletion mit Hilfe einer PCR. 155
Abb. 67: Darstellung der Übergangsstelle von Intron 5 in Intron 33 im COL9A1-Gen. 156
Abb. 68: Stammbaum der Familie G1. 157

Abb. 69: Stammbaum der Familie G18. 158
Abb. 70: Stammbaum der Familie G21. 159
Abb. 71: Stammbaum der Familie G27. 160
Abb. 72: Stammbaum der Familie G28. 160
Abb. 73: Stammbaum der Familie G22. 162
Abb. 74: Stammbaum der Familie G8. 163
Abb. 75: Stammbaum der Familie G7. 164
Abb. 76: Darstellung der Aufklärungsrate in Abhängigkeit der Kohorten.. 167
Abb. 77: Schematischer Überblick über das Gen CEACAM16 und dessen Protein. 180
Abb. 78: Audiogramm von der Patientin II-2 G22 im Alter von 17 Jahren. 196
Abb. 79: Reintonaudiometriemessung von Tochter (rechts) und Mutter (links) über einen größeren Zeitrahmen der Familie G8. 197
Abb. 80: Reintonaudiogramme von III-4 Cousine (links) und III-5 Indexpatient (rechts) der Familie G7. 199
Abb. 81: Cochlea-Implantat. 202

# TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Übersicht aller Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien einer Standardlaborausrüstung. 50
Tab. 2 Übersicht aller Geräte, Chemikalien und Puffer für die DNA-Aufreinigung. 52
Tab. 3: Übersicht aller Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Puffer zur Qualitätssicherung der DNA. 55
Tab. 4: Übersicht alle Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Puffer zur TruSight One- bzw. Exom Sequenzierung. 56
Tab. 5: Übersicht aller Geräte, Chemikalien und Puffer für die Validierung und die Segregationsanalyse. 59
Tab. 6: Übersicht aller Chemikalien für eine STR-Analyse und einer X-Inaktivierung. 62
Tab. 7: Auflistung von mit Hörstörung assoziierten Varianten der Familie G9. 98
Tab. 8: Überblick der Variantenklassifizierung der Familie G11. 108
Tab. 9: Liste aller verwendeten Primer 234
Tab. 10: Hörstörungsgene, eingeteilt nach Vererbungsmuster, OMIM Nummer, Charakterisierung und zusätzlichen Assoziation mit Syndromen. 314
Tab. 11: Tabelle mit einzelnen Familien und zugehörige Klassifizierung der Varianten.. 338
Tab. 12: Auflistung der einzelnen familiären Hörstörung.. 360

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

**A**

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| ABHD12 | Abhydrolase domain-containing protein 12 |
| ACTG1 | Actin, Gamma-1 |
| AD | autosomal dominant |
| ADCY1 | Adenylate cyclase I |
| ADGRV1 | Adhesion G protein-coupled receptor VI |
| AIFM1 | Apoptosis-inducing factor, mitochondria-associated, 1 |
| Ala | Alanin |
| AR | autosomal dominant |
| Arg | Arginin |
| ARSG | Arylsulfatase G |
| AS | Aminosäure |
| Asn | Asparagin |
| Asp | Asparaginsäure |
| ASSR | Auditory steady state measurement |
| ATP1A3 | ATPase, Na+/K+ transporting, alpha-3 polypeptide |
| ATP2B2 | ATPase, Ca (2+)-transporting, plasma membrane, 2 |
| ATP6V1B1 | ATPase, H+ transporting, lysosomal, 56/58-KD, VI subunit B, isoform 1 |

**B**

| | |
|---|---|
| BDP1 | B-double prime 1, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB |
| bp | Basenpaare |
| BSND | Barttin |
| BTD | Biotinidase |
| bzw. | beziehungsweise |

**C**

| | |
|---|---|
| c. | transkriptcodierende Position |
| C2orf71 | Chromosome 2 open reading frame 71 |
| CABP2 | Calcium-binding protein 2 |
| CCDC50 | Coiled-coil domain-containing protein 50 |
| CD164 | CD164 Antigen |
| CDC14A | Cell division cycle 14, S cervisiae homolog A |
| CDH23 | Cadherin 23 |
| CEACAM16 | Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 |
| CEP250 | Centrosomal protein 250-kD |
| CEP78 | Centrosomal proein 78-kD |
| CHD7 | Chromodomain helicase DNA-binding protein 7 |
| CHST3 | Carbohydrase Sulfotransferase 3 |
| CIB2 | Calcium- and integrin-binding protein 2 |
| CISD2 | CDGSH iron sulfur Domain prtein 2 |
| CLDN14 | Claudin 14 |
| CLIC5 | Chloride intracellular channel 5 |
| CLPP | Caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit |
| CLRN1 | Clarin 1 |
| CLRN2 | Clarin 2 |
| CNV | Kopiezahlveränderung (copy number variation) |
| COCH | Cochlin |
| COL11A1 | Collagen Type XI alpha 1 |

| | |
|---|---|
| COL11A2 | Collagen Type XI alpha 2 |
| COL2A1 | Collagen Typ II alpha 1 |
| COL4A3 | Collagen Typ IV alpha 3 |
| COL4A4 | Collagen Typ IV alpha 4 |
| COL4A5 | Collagen Typ IV alpha 5 |
| COL4A6 | Collagen Typ IV alpha 6 |
| COL9A1 | Collagen Typ IX alpha 1 |
| COL9A2 | Collagen Typ IX alpha 2 |
| COL9A3 | Collagen Typ IX alpha 3 |
| CRYM | Crystallin, MU |
| Cys | Cystein |
| **D** | |
| d | Tag |
| dB | Dezibel |
| $ddH_2O$ | deminaralisiertes Wasser |
| ddNTP | Didesoxynukleosidtriphospat |
| del | Deletion (Nukleotide oder Genabschnitt) |
| DCDC2 | Doublecortin domain-containing protein 2 |
| DIABLO | Direct IAP-Bidning protein with low pI |
| DIAPH1 | Diaphanous drosophila homolog of 1 |
| DIAPH3 | Diaphanous drosophila homolog of 3 |
| DMXL2 | DMX-like 2 |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid) |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DPOAEs | Distorsivproduzierte otoakustische Emissionen |
| Dup | Duplikation (Nukleotide oder Genabschnitt) |
| DVD | Deafness Variation Database |
| **E** | |
| EDN3 | Endothelin 3 |
| EDNRB | Endothelin Rezeptor Typ B |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELMOD3 | ELMO/CED12 Domain-containing protein 3 |
| EPS8 | Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 |
| EPS8L2 | EPS8-like protein 2 |
| ERAL1 | ERA G-protein-like 1 |
| ESPN | Espin, Mouse, homolog, of |
| ESRP1 | Epithelial splicing regulatory protein 1 |
| ESRRB | Estrogen-related receptor, beta |
| EXOSC2 | Exosome component 2 |
| Exo | Exonuklease I |
| EYA1 | Eyes absent 1 |
| EYA4 | Eyes absent 4 |
| **F** | |
| FAM65B | Family with sequence similarity 65, member B |
| FDXR | Ferredoxin reductase |
| FGF3 | Fibroblast growth factor 3 |
| FGFR1 | Fibroblast growth factor receptor 1 |
| FGFR2 | Fibroblast growth factor receptor 1 |
| FITM2 | Fat storage-inducing transmembrane protein 2 |
| FOXF2 | Forkhead Box F2 |
| FOXI1 | Forkhead Box I1 |

| | |
|---|---|
| FRMPD4 | Ferm and PDZ Domains-containing protein 4 |
| fs | Frameshift |
| fwd | forward |
| **G** | |
| g | Gramm |
| g. | genomische Position auf dem Chromosom |
| gDNA | genomische DNA |
| GAB1 | GRB2-associated binding protein 1 |
| GATA3 | GATA-binding protein 3 |
| GIPC3 | GIPC PDZ domain-containing family, member 3 |
| GJB2 | GAP Junction protein beta-2 |
| GJB3 | GAP junction protein beta-3 |
| GJB6 | GAP junction protein beta-6 |
| Gln | Glutamin |
| Glu | Glutaminsäure |
| Gly | Glycin |
| GPRASP2 | G protein-coupled receptor-associated sorting protein 2 |
| GPSM2 | G protein signaling modulator 2 |
| GRAP | GRB2-related adaptor protein |
| GRCh37 | Genome Reference Consortium Human Build 37 |
| GRHL2 | Grainyhead-like 2 |
| GRXCR1 | Glutaredoxin, cysteine -rich 1 |
| GRXCR2 | Glutaredoxin, cysteine-reich 2 |
| GSDME | Gasdermin E (DFNA) |
| **H** | |
| h | Stunde |
| HARS | Histidyl-tRNA synthetase |
| HARS2 | Histidyl-tRNA synthetase 2 |
| hem. | hemizygot |
| het. | heterozygot |
| hg19 | humane Genomversion 19 |
| HGF | Hepatocyte growth factor |
| His | Histidin |
| hom. | homozygot |
| HOMER2 | HOMER, Drosophila homolog of,2 |
| HS | Hörstörung |
| HSD17B4 | 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV |
| Hz | Hertz |
| **I** | |
| IFNLR1 | Interferon-Lambda receptor 1 |
| ILDR1 | immunoglobulin-like domain containing receptor 1 |
| Ile | Isoleucin |
| **K** | |
| K | Kontrolle |
| KARS | Lysyl-tRNA synthetase |
| kb | Kilo-Basenpaare |
| KCNE1 | Potassium channel, voltage-gated, ISK-related subfamily, member 1 |
| KCNJ10 | Potassium channel, inwardly rectifying, subfamily J, member 10 |
| KCNQ1 | Potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 1 |
| KCNQ4 | Potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 1 |
| kg | Kilogramm |

| | |
|---|---|
| KIAA0391 | KIAA0391-Gene |
| KIT | V-KIT hardy-zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog |
| KITLG | KIT Ligand |
| KMT2D | Lysine-specific methyltransferase 2D |
| **L** | |
| l | Liter |
| LARS2 | Leucyl-tRNA Synthetase 2 |
| Leu | Leucin |
| LHFPL5 | LHFP-like protein 5 |
| LMX1A | Lim homeobox transcription factor 1, alpha |
| LOXHD1 | Lipoxygenase homology domain-containing 1 |
| LOXL3 | Lysyl oxidase -like 3 |
| LRP5 | Low density lipoprotein receptor-related protein 5 |
| LRTOMT | Leucine-rich transmembrane o-methyltransferase |
| Lys | Lysin |
| **M** | |
| M | Molar |
| M | Marker |
| MAF | Minor allele frequency |
| MARVELD2 | Marvel domain-containing protein 2 |
| MASP1 | Mannan-binding lectin serin protease 1 |
| Mb | Mega-Basenpaare |
| MCM2 | Minichromosome maintenance complex component 2 |
| Met | Methionin |
| MET | MET Protooncogene |
| METTL13 | eEFA1A lysine and N-terminal methyltransferase |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| MIR96 | Micro RNA 96 |
| MITF | Microphthalmia-associated transcription factor |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| MPZL2 | Myelin protein zero-like 2 |
| mRNA | Messenger RNA |
| MSRB3 | Methionine sulfoxide reductase B3 |
| MT-RNR1 | Ribosomal RNA, mitochondrial, 12S |
| MT-TS1 | Transfer RNA, mitochondrial, serine 1 |
| MYH14 | Myosin, heavy chain 14, nonmuscle |
| MYH9 | Myosin, heavy chain 9, nonmuscle |
| MYO15A | Myosin XVA |
| MYO3A | Myosin IIIA |
| MYO6 | Myosin VI |
| MYO7A | Myosin VIIA |
| **N** | |
| NAHR | non-allelic homologous recombination |
| NARS2 | Asparaginyl-tRNA synthetase 2 |
| NDP | NDP-Gene |
| ng | Nanogramm |
| NGS | Next Generation Sequencing |
| NISCH | Nischarin |
| NLRP3 | NLR family, pyrin domain-containing 3 |

**O**

| | |
|---|---|
| OSBPL2 | Oxysterol-binding protein-like protein 2 |
| OTOA | Otoancorin |
| OTOF | Otoferlin |
| OTOG | Otogelin |
| OTOGL | Otogelin-like protein |

**P**

| | |
|---|---|
| p. | transkriptbasierte AS-Position |
| P2RX2 | purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 2 |
| PAX3 | paired box gene 3 |
| PCDH15 | protocadherin 15 |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| PDB | Proteindatenbank |
| PDE1C | Phosphodiesterase 1C |
| PDZD7 | PDZ domain-containing 7 |
| PEX1 | Peroxisome biogenesis factor 1 |
| PEX6 | Peroxisome biogenesis factor 6 |
| PEX7 | Peroxisome biogenesis factor 7 |
| Phe | Phenylalanin |
| PHYH | Phytanoyl-CoA hydrolase |
| PJVK | Pejvakin, DFNB59 |
| pM | Pikomolar |
| PNPT1 | Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1 |
| POLD1 | Polymerase (DNA-directed), delta 1, catalytic subunit |
| POLD3 | Polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit |
| POLR1C | Polymerase I, RNA, subunit C |
| POLR1D | Polymerase I, RNA, subunit D |
| POU3F4 | POU domain, class 3, transcription factor 4 |
| POU4F3 | POU domain, class 4, transcription factor 3 |
| PPIP5K2 | Diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 1 |
| Pro | Prolin |
| PRPS1 | Phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity |
| PSIP1 | PC4- and SFRS1-interacting protein 1 |
| PTPN11 | Protein -tyrosine phosphatase, non-receptor type, 11 |
| PTPRQ | Protein-tyrosine phosphatase, receptor type, Q |

**Q**

| | |
|---|---|
| qPCR | quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real-time PCR) |

**R**

| | |
|---|---|
| RAI1 | Retinoic acid-induced gene 1 |
| RDX | Radixin |
| REST | RE1-silencing transcription factor |
| rev | reverse |
| RNA | Ribonukleinsäure (ribonucleic acid) |
| ROR1 | Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 |
| rpm | rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |

**S**

| | |
|---|---|
| s | Sekunde |
| SAP | Shrimp Alkaline Phosphatase |
| S1PR2 | Sphingosine-1-phosphate receptor 2 |
| SEMA3E | Semaphorin 3E |

| | |
|---|---|
| Ser | Serin |
| SERAC1 | Serine active site-containing protein 1 |
| SERPINB6 | Serine peptidase inhibitor, clade B (Ovalbumin), Member 6 |
| SERPINF1 | Serine peptidase inhibitor, clade F, Member 1 |
| SGO2 | Shugoshin-like 2 |
| SIX1 | Sine oculis homeobox, drosophila, homolog of 1 |
| SIX5 | Sine oculis homeobox, drosophila, homolog of 5 |
| SLC17A8 | Solute carrier family 17 (Vesicular glutamate cotransporter), member 8 |
| SLC22A4 | Solute carrier family 22 (Organic cation transporter), member 4 |
| SLC26A4 | Solute carrier family 26, member 4, Pendrin |
| SLC26A5 | Solute carrier family 26, member 5, Prestin |
| SLC44A4 | Solute carrier family 44, member 4 |
| SLC7A8 | Solute carrier family 7 (Cationic amino acid transporter, y+ System), member 8 |
| SLITRK6 | Slit- and NTRK-like family, member 6 |
| SMPX | Small muscle protein, x-linked |
| SNAI2 | Snail, drosophila, homolog of 2 |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| SOX10 | SRY-Box 10 |
| STR | short tandem repeats |
| STRC | Stereocilin |
| SYNE4 | Spectrin repeat-containing nuclear envelope protein 4 |
| **T** | |
| TBC1D24 | TBC1 domain family, member 24 |
| TBL1Y | Transduction-beta-like 1, Y-linked |
| TBX1 | T-Box 1 |
| TCOF1 | TCOF1-Gene |
| TECTA | Tectorin, alpha |
| TECTB | Tectorin, beta |
| TEOAEs | Transitorisch evozierte otoakustische Emissionen |
| Thr | Threonin |
| TIL | Trypsin Inhibitor-like |
| TIMM8A | Translocase of inner mitochondrial membrane 8, yeast, homolog of A |
| TJP2 | Tight junction protein 2 |
| TMC1 | Transmembrane channel-like protein 1 |
| TMEM132E | Transmembrane protein 132E |
| TMIE | Transmembrane inner ear-expressed gene |
| TMPRSS3 | Transmembrane protease, serine 3 |
| TMTC2 | Transmembrane and tetratricopeptide repeat domains-containing protein 2 |
| TNC | Tenascin C |
| TPRN | Taperin |
| TRIOBP | Trio- and F-actin-binding protein |
| Trp | Tryptophan |
| TSPEAR | Thrombospondin-type laminin G domain and ear repeats |
| TWNK | Twinkle mtDNA helicase |
| Tyr | Tyrosin |
| **U** | |
| U | Units |
| USH1C | USH1C gene, Harmonin |
| USH1G | USH1G gene, SANS |
| USH2A | Usherin |
| usw. | und so weiter |

**V**

| | |
|---|---|
| Val | Valin |
| vWFD | van Willebrand Faktor Type D |

**W**

| | |
|---|---|
| WBP2 | WW Domain-binding protein 2 |
| WFS1 | Wolfram Syndrom 1 |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |
| WHRN | Whrilin (DFNB31) |
| WT | Wildtyp |

**Z**

| | |
|---|---|
| ZA | Zonaadhesin-like |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZP | Zona pellucida |

# ZUSAMMENFASSUNG

Fast 500 Millionen Menschen weltweit sind von einer Hörstörung betroffen. Es wird sogar angenommen, dass diese Anzahl laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) noch steigen und 2050 jeder zehnte Mensch eine Hörstörung aufweisen wird. Mindestens in 50% aller Fälle ist die Hörstörung genetisch bedingt. Durch die jüngsten Fortschritte der Sequenzierungstechnologien hat die genetische Analyse von Hörstörungen an Bedeutung gewonnen, vor allem hinsichtlich Familienplanung, geeigneter Therapien und zukünftiger möglichen Therapieansätzen, um das Hörvermögen wiederherzustellen. Die folgende Arbeit stellt 155 familiäre Fälle vor, die genetisch untersucht wurden. Diese Fälle konnten in zwei Kohorten unterteilt werden. Eine Kohorte (n = 74) umfasste Patienten mit kaukasischem Hintergrund, während die andere Kohorte (n = 81) Patienten beinhaltete, die aus dem Iran rekrutiert wurden. Für die Untersuchung wurde zum einen eine Panel-Analyse mit dem TruSight One Panel (Illumina, San Diego, USA) und zum anderen eine Exom-Sequenzierung durchgeführt. Anschließend wurden die Daten mit Analyse-Programmen wie GensearchNGS (PhenoSystems, Wallonia, Belgien) ausgewertet. Insgesamt konnte für 55% aller Fälle eine pathogene oder wahrscheinlich pathogene Variante durch Next Generation Sequencing diagnostiziert werden. Die meisten der gelösten Fälle (ca. 73%) stammten aus der iranischen Kohorte, was durch elterliche Blutsverwandtschaft und erhöhte Inzidenz von Hörstörungen im Iran zu erklären ist. 27% der gelösten Fälle gehörten der zweiten Kohorte an. Mutationen in den Genen *MYO15A*, *LHFPL5*, *TECTA* und *SLC26A4* konnten überwiegend bei iranischen Patienten identifiziert werden. Varianten im Gen *TECTA* als auch im Gen *SLC26A4* wurden ebenfalls in der kaukasischen Kohorte identifiziert. Beide Ethnien wiesen jeweils ein eigenes Mutationsspektrum auf. Jedoch wurden in beiden Gruppen Überschneidungen im klinischen Bild durch pathogene Varianten in einer Vielzahl von Hörstörungsgenen, sowie unterschiedliche klinische Phänotypen, deren Ursache pathogene Varianten im gleichen Hörstörungsgen zugrunde liegen, und familiäre Locus-Heterogenität beobachtet.. In dieser Arbeit konnte eine *De Novo* Mutation im *CEACAM16*-Gen (DFNA4B) bestätigt und der Effekt von einer wiederholt betroffenen Aminosäure im *S1PR2*-Gen (DFNB68) beschrieben werden. Darüber hinaus wurden mehrere Patienten mit X-chromosomalem Hörverlust aufgrund von Defekten im *POU3F4*-Gen (DFNX2) und Deletionen im *SMPX*-Gen (DFNX4) diagnostiziert. Zusätzlich konnte mit Hilfe einer Exom-basierten Copy Number Variation-Analyse eine Deletion im *OTOA*-Gen (DFNB22) gefunden werden, welche sich bis in die Tandempseudogenregion erstreckte.

Diese Untersuchung zeigt die enormen Möglichkeiten zur Detektion von Mutationen bei heterogenen Erkrankungen durch Anwendung von Next Generation Sequencing. Weiterhin konnte eine intragenische Deletion im Gen *COL9A1* identifiziert werden, die im Zusammenhang mit einer scheinbar isolierten Hörstörung steht und durch den komplexen Umlagerungsmechanismus FoSTeS/MMBIR (Fork Stalling und Template Switching/Microhomology-mediated Break-induced Replication) entstand, der so bei Hörstörungen noch nicht beschrieben wurde. Auf der Suche nach Genen, die bisher noch nicht mit Hörstörungen assoziiert werden konnten, wurden acht Familien in eine Kandidatengenuntersuchung miteinbezogen und eine Exom-weite Analyse durchgeführt. Bei fünf Familien konnte noch keine ursächliche Variante identifiziert werden. Jedoch wurde bei drei Familien mit einer autosomal dominanten Schwerhörigkeit eine genetische Ursache identifiziert und *TECTB*, *ATP11A* und *THBS2* konnten als Kandidatengene ermittelt werden. Diese Arbeit zeigt, wie wichtig es ist, die kausale Variante bei Hörstörungspatienten zu detektieren. Eine genetische Diagnostik ermöglicht eine endgültige Diagnose eines Syndroms, ist für die Klassifizierung der Hörstörung notwendig und trägt zu einer zukünftigen Therapie der Patienten bei.

# SUMMARY

Nearly 500 million people are affected by hearing impairment. According to the World Health Organization (WHO), the prevalence of hearing loss will increase to one in ten people in 2050. It is expected that at least half of all cases have a genetic etiology. Due to recent advancements in sequencing technologies the genetic analysis of hearing loss gain in importance, especially in regard to family planning, directing appropriate therapies and engaging in future therapeutic approaches for hearing restoration. The following thesis describes the genetic causes of 155 familial cases with hearing loss. These cases were divided into two cohorts. One cohort (n = 74) included patients with a Caucasian background, while the other cohort (n = 81) comprised patients who were recruited from the Iran. A panel analysis using the TruSight One Panel (Illumina, San Diego, USA) as well as an exome sequencing approach were applied. The data were subsequently analyzed using bioinformatics programs such as GensearchNGS (PhenoSystems, Wallonia, Belgium). Overall, 55% of all cases disclosed a pathogenic or likely pathogenic genetic variant by utilizing next generation sequencing methods. Most of the resolved cases (ca. 73%) were detected in the Iranian cohort, a fact which is traced back to parental consanguinity and increased incidence of overall hearing impairment in the Iran. 27% of resolved cases were revealed in the second cohort. Variants in the genes *MYO15A* (DFNB3), *LHFPL5* (DFNB67), *TECTA* (DFNB21), and *SLC26A4* (DFNB4) were especially prevalent in Iranian patients. Variants in the genes *TECTA* and *SLC26A4* were also identified in the Caucasian cohort. The two ethnic groups each exhibited a distinctly unique mutational landscape. Additionally, the overlapping clinical outcomes caused by pathogenic variants in a multitude of hearing impairment genes as well as the phenotypical different characters of variants in the same gene generating hearing loss and familial locus heterogeneity were observed. This work also described a *de novo* mutation in the *CEACAM16* (DFNA4B) gene and described the effect of a recurrently substituted amino acid residue in the *S1PR2* (DFNB68) gene. In addition, several X-linked hearing loss patients were diagnosed due to defects in the POU3F4 (DFNX2) gene and deletions in the *SMPX* (DFNX4) gene. Furthermore, exome-based copy number variation analysis identified a deletion in the *OTOA* (DFNB22) gene extending into the tandem pseudogene region. This study demonstrates the enormous potential for the detection of mutations in a genetically heterogeneous disorder applying next generation sequencing. Furthermore, an intragenic deletion in the gene *COL9A1* was identified, which is related to an apparent isolated hearing impairment and was likely caused by the complex rearrangement of FoSTeS/MMBIR mechanism (fork stalling and template switching/microhomology-mediated break-induced replication), which has not been previously described in hearing disorders. In order to reveal

new genes associated with hearing loss, eight families were investigated with an exome-wide analysis in a candidate gene study. In five families, no causal variant could be identified. However, a genetic cause was identified in three families with autosomal dominant hearing loss and *TECTB*, *ATP11A*, and *THBS2* were identified as candidate genes. This work shows the importance of the identification of the causal variant. Herein, genetic diagnostic could be necessary for the final diagnosis of a syndrome, is important for classification of the hearing loss and contributes to a future therapy.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 HÖRSTÖRUNGEN

Obwohl ca. zwei Drittel aller Menschen im Laufe des Lebens eine Hörstörung aufweisen, sind die zugrunde liegenden Ursachen noch nicht vollständig erforscht [1] . Es bestehen immer noch grundlegende Fragen zur Funktion des Hörens. Dies liegt an der Komplexität des Ohres als Organ und dessen Wirkweise, welche noch nicht im Detail verstanden ist [2]. Diese Komplexität jedoch weckt das Interesse der Forschung. Ähnlich wie ein Uhrmechanismus, muss auch im Ohr jedes Detail funktionieren und jedes Rädchen ineinandergreifen, um die Zeit ablesen bzw. etwas hören zu können. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) gibt es über 466 Millionen Menschen, die an einer Hörstörung leiden. Dies entspricht ca. 5% der gesamten Weltbevölkerung [3]. Diese Zahlen stützen sich auf Studien, jedoch ist die Dunkelziffer schätzungsweise viel höher, da erfahrungsgemäß nicht jede Hörstörung als solche erkannt und behandelt wird [4]. Im Folgenden wird der Begriff „Hören“ definiert und die Funktionsweise des menschlichen Hörvorgangs erläutert, sowie die Klassifizierung von Hörstörungen im Detail vorgestellt. Anschließend wird vor allem die Rolle der genetischen Disposition genauer betrachtet.

### 1.1.1 DEFINITION UND FUNKTIONSWEISE DES HÖRENS

Der Hörvorgang ist ein Prozess, bei dem Schallwellen als Informationsdatenträger mit Hilfe unseres Ohrs wahrgenommen, an das Gehirn weitergeleitet und dort verarbeitet werden. Dabei müssen mehrere Komponenten zusammenarbeiten wie in Abb. 1 im Überblick dargestellt.

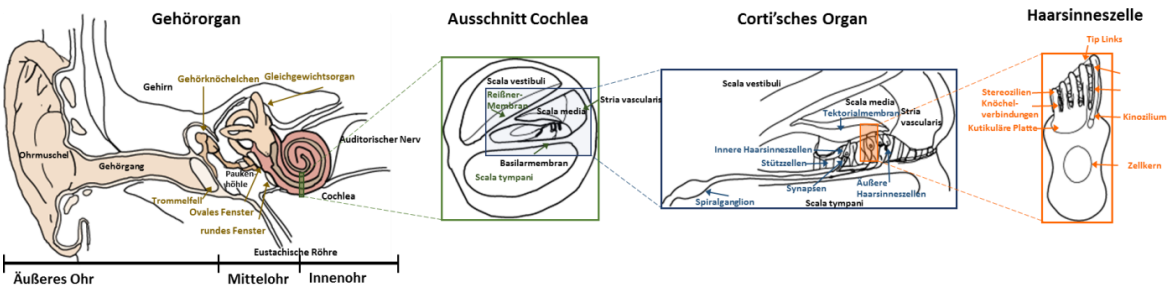



*Abb. 1: Überblick über die Komponenten des Gehörs. Vom Gehörorgan wird in Schritten zu den sensorischen Zellen des Ohres vergrößert (Abbildung erstellt in Anlehnung an [5, 6]).*

Im ersten Schritt werden die Schallwellen, Longitudinalwellen im Luftraum, mit Hilfe der Ohrmuschel aufgefangen. Je nachdem, welches Ohr zuerst den Schall wahrnimmt bzw. wie der Schall auf die Ohrmuschel auftrifft, kann dadurch später ermittelt werden, aus welcher Richtung der Schall kommt [2]. Der Schall wird über den Gehörgang an das Trommelfell, welches das äußere Ohr vom Mittelohr abgrenzt, weitergeleitet. Dieses wird dadurch zum Schwingen gebracht und regt die Gehörknöchelchen, Hammer, Amboss und Steigbügel, im Mittelohr an. Sie verstärken die Schwingung und der Steigbügel überträgt letztendlich die mechanische Energie auf das ovale Fenster, welches an die mit Flüssigkeit gefüllte *Scala vestibuli* und an das Innenohr grenzt. Hierbei erfolgt eine Impedanzanpassung, da bei einem Übergang von Luft auf Flüssigkeit die Schallenergie verloren gehen würde [7]. Am ovalen Fenster wird dann eine Druckwelle ausgelöst, die sich als Wanderwelle in der *Scala vestibuli* bis an die Spitze der Schnecke über das Helikotrema hinweg fortpflanzt, von wo aus die *Scala vestibuli* in die *Scala tympani* übergeht. Beide Kanäle sind mit Perilymphe gefüllt, die in ihrer ionischen Komposition extrazellulären Lösungen gleicht und daher viel Natrium und wenig Kalium besitzt [7, 8]. Die *Scala tympani* grenzt an das runde Fenster, welches zum luftgefüllten Mittelohr hin verschlossen ist und zum Druckausgleich dient. Im Mittelohr befindet sich auch die Eustachische Röhre, die eine Verbindung zum Rachenraum bildet und zum Druckausgleich zwischen Mittelohr und Atmosphäre unerlässlich ist (Dargestellt in Abbildung 2)

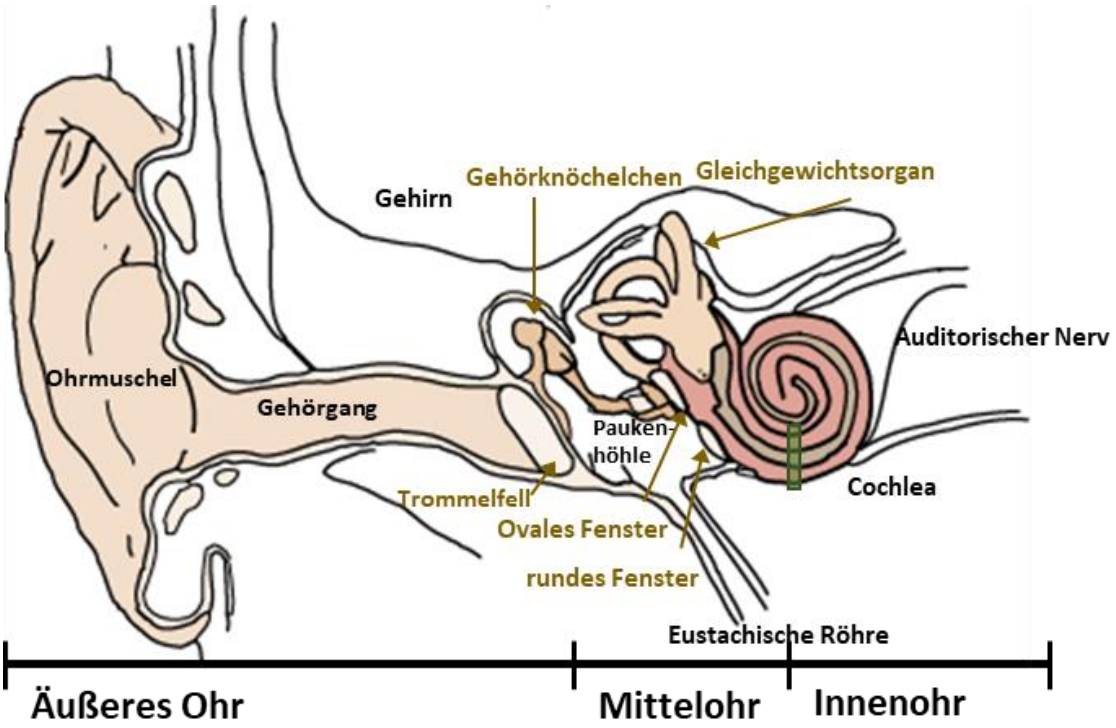



*Abb. 2: Gehörorgan. Teilausschnitt der Abbildung 1. An die Ohrmuschel grenzt der Gehörgang, der zum Trommelfell führt (äußeres Ohr). Darauf folgen die Gehörknöchelchen, Hammer, Amboss und Steigbügel (Mittelohr). Das Innenohr mit der Cochlea und dem vestibulären Apparat folgen. An die Cochlea bindet der auditorische Nerv (Abbildung erstellt in Anlehnung an [5].*

Die beiden Kanäle *Scala vestibuli* und *Scala tympani* sind durch die mit Endolymphe gefüllte *Scala media*, auch *Ductus cochlearis* genannt, über die Reißner Membran und die Basilarmembran getrennt. Die Basilarmembran, auf der zudem das Corti'sche Organ liegt, wird durch die zuvor erläuterte Wanderwelle in Schwingung gesetzt. Aufgrund der abnehmenden Steifigkeit der Basilarmembran zum Helikotrema hin, entstehen durch die Übereinstimmung von Anregungs- und Eigenfrequenz der Basilarmembran für hohe Frequenzen am ovalen Fenster und für niedrige Frequenzen am Helikotrema maximale Schwingungsamplituden. Auf diese Weise hat jede Frequenz einen charakteristischen Ort auf der Basilarmembran mit maximaler Schwingungsamplitude. Die Abbildung 3 beschreibt einen Ausschnitt durch die Cochlea mit den einzelnen Strukturen innerhalb der Kanäle.

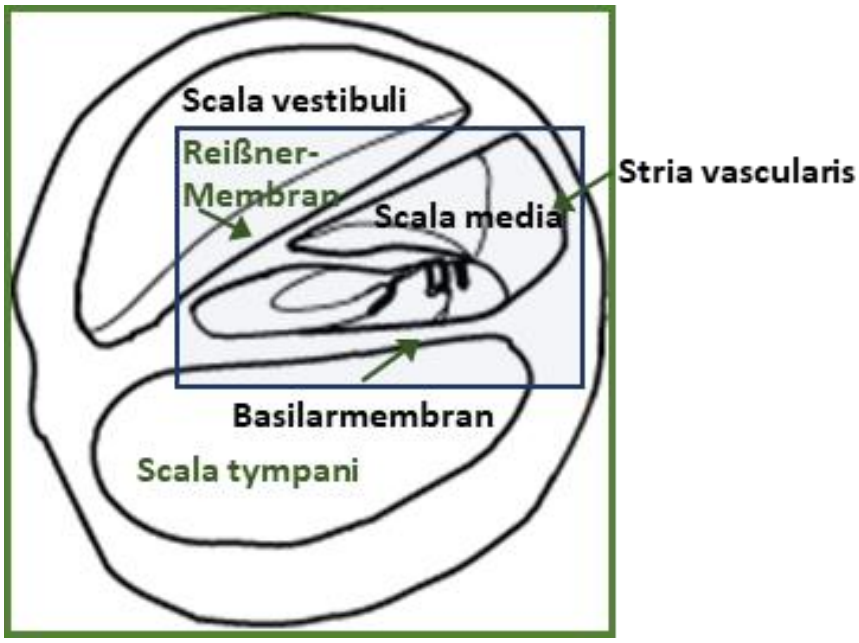



*Abb. 3: Ausschnitt Cochlea. Teilausschnitt der Abbildung 1. Die Cochlea besteht aus drei Kammern, von denen die Scala media das Corti'sche Organ enthält (Ausschnitt Cochlea) (Abbildung erstellt in Anlehnung an [5])*

Menschen sind in der Lage Töne zwischen 20–16.000 Hz wahrzunehmen. Im Corti'schen Organ findet die Umwandlung des mechanischen Signals in ein neuronales Signal statt. Dies wird durch die Endolymphe ermöglicht, welche aus 150 mM $K^+$-, 2 mM $Na^+$- und 20 µM $Ca^{2+}$-Ionen besteht, die ein positives Potential von 80 mV erzeugen. Dieses Potential nennt man „endocochleares Potential" welches essenziell für den Hörvorgang ist [8, 9]. Die maximale Schwingungsamplitude führt zur einer Scherbewegung der Tektorialmembran, die das Corti'sche Organ bedeckt, und der Basilarmembran. Das Corti'sches Organ ist in Abbildung 4 dargestellt.

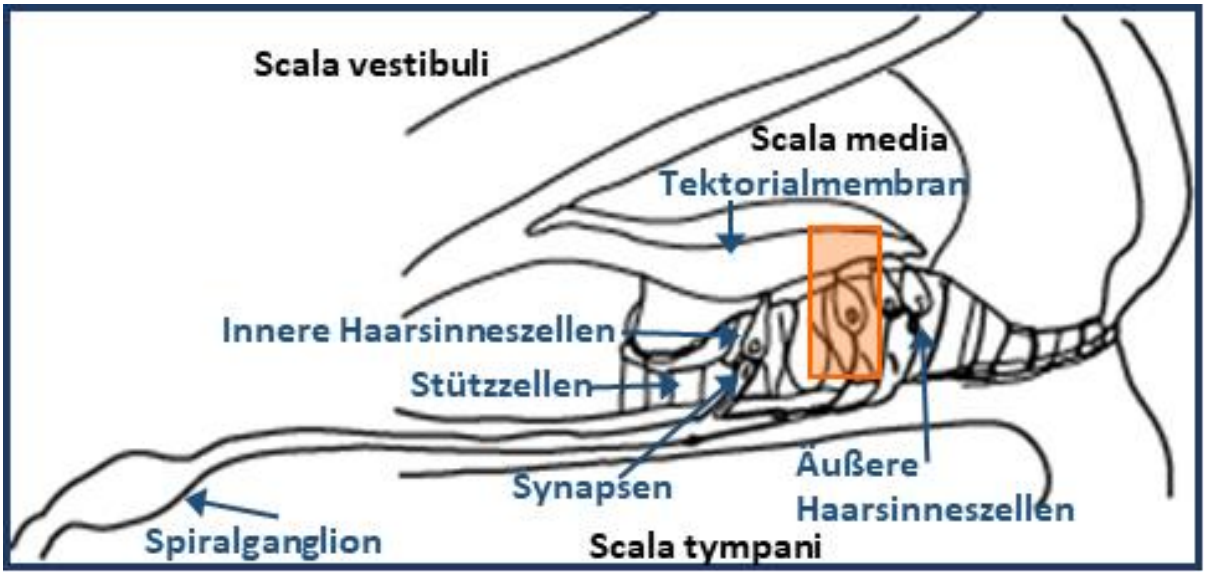



*Abb. 4: Corti'sches Organ. Teilausschnitt der Abbildung 1. Im Corti'schen Organ ist das sensorische Epithel mit den dreireihigen äußeren Haarsinneszellen und den inneren Haarsinneszellen enthalten (Corti'sches Organ). Diese tragen an ihrer Oberfläche ca. 80 Stereozilien, die über verschiedene Verbindungen miteinander verknüpft sind (Abbildung erstellt in Anlehnung an [5])*

Die längsten Stereozilien, welche sich auf dem Corti-Organ befinden, haben Kontakt zur Tektorialmembran. Werden diese Stereozilien durch die Scherbewegung ausgelenkt, öffnen sich kationendurchlässige mechanoelektrische Transduktionskanäle. Dem Potentialgefälle in der Endolymphe zu den äußeren Haarsinneszellen folgend, strömen $K^+$-Ionen in die Haarsinneszellen ein und depolarisieren diese, wodurch ein Rezeptorpotential entsteht. Dieses Rezeptorpotential führt in den drei äußeren Haarsinneszellenreihen zu einer oszillierenden Längenänderung, wodurch eine zusätzliche Schwingungsenergie erzeugt wird. Damit fungieren die äußeren Haarsinneszellen auch als ein cochleärer Verstärker. Zur Repolarisierung werden Kaliumkanäle geöffnet, wodurch $K^+$-Ionen wieder entströmen. Die so verstärkte Schwingungsenergie wird über Endolymphbewegungen an die inneren Haarsinneszellen übertragen, wodurch diese ebenso wie die äußeren Haarsinneszellen ausgelenkt und erneut mechanoelektrische Transduktionskanäle geöffnet werden. Die Haarsinneszellen werden wieder depolarisiert, aber im Gegensatz zu äußeren Haarsinneszellen kommt es bei inneren Haarsinneszellen zu einer Erregung der afferenten Nervenfasern. Insgesamt nehmen 16.000 Haarsinneszellen den Schall wahr und geben ein neurales Signal an die Nerven weiter. Jede Haarsinneszelle trägt bis zu ca. 80 Stereozilien.

Diese sind miteinander über verschiedene Verbindungen verknüpft um die typische Haarbündelstruktur zu erhalten [6]. Die Abbildung 5 zeigt eine Haarsinneszelle im Detail.

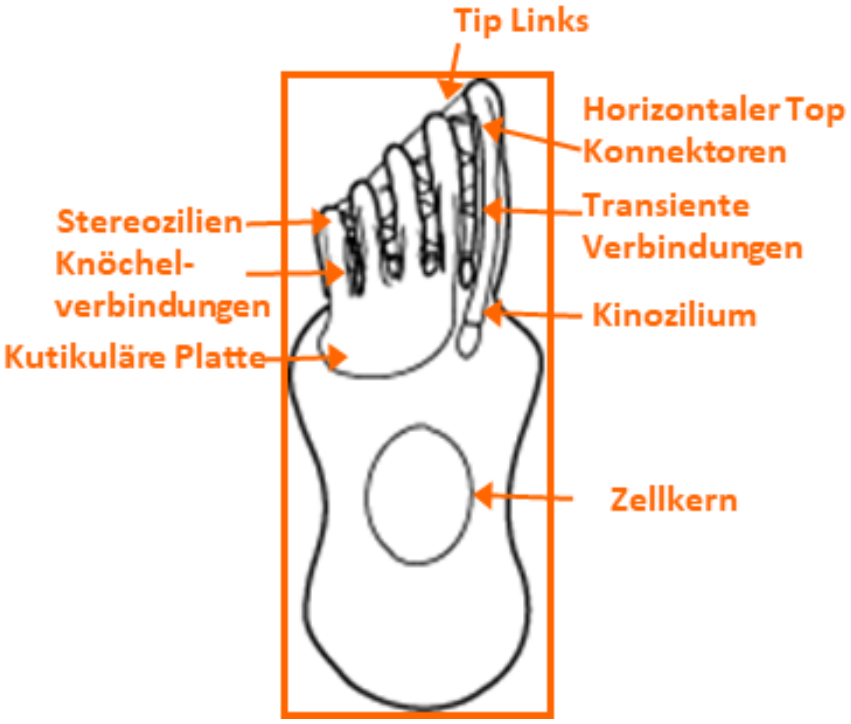



*Abb. 5: Haarsinneszelle. Teilausschnitt der Abbildung 1. Die Haarsinneszellen besitzen auf der kutikulären Platte Stereozilien, die über mehrere Verbindungen miteinander verknüpft sind [6]. Jede dieser Verbindung ist für die Struktur der Stereozilien und die Funktion bei der Öffnung von mechanoelektrischen Transduktionskanälen notwendig (Abbildung erstellt in Anlehnung an [6]).*

Von dort werden die Aktionspotentiale an den Hörnerv und an das Gehirn weitergeleitet. Nach der Reizweiterleitung wird zur Repolarisation die in die Haarsinneszellen aufgenommenen $K^+$-Ionen zur basolateralen Membran transportiert. Von dort können die Ionen die laterale cochleäre Wand entweder durch die perlymphatische Route oder über das Gap-Junction-Netzwerk der Deiters's Zellen und der epithelialen Zellen auf der basilaren Membran erreichen [7]. Auf diese Weise wird das Potentialgefälle wiederhergestellt. Danach werden die $K^+$-Ionen über die *Stria vascularis* zurück in die Endolymphe transportiert [8]. Die *Stria vascularis* gewährleistet die Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung des endocochleären Potentials in der Endolymphe. Sie befindet sich an der Außenwand des *Ductus cochlearis* und besteht aus drei Schichten: die Epithelial-Syncytium-Schicht mit Basal- und Zwischenzellen, einem extrazellulären Raum, auch *intrastrial space* genannt, und einer marginalen Zellschicht, die mit ihrer apikalen Seite mit der Endolymphe verbunden ist.

$K^+$-Ionen werden von Fibrozyten zur Epithelial-Syncytium-Schicht transportiert, von wo aus sie in den *intrastrial space* gelangen. Dort herrscht ein Potential von +90 mV, welches durch den $K^+$-Ionenfluss erzeugt wird. Die $K^+$-Ionen fließen von dort über Kaliumkanäle durch Randzellen der *Scala media* in die Endolymphe und erzeugen das endocochleare Potential [7, 8].

Zusätzlich zur Cochlea grenzt auch das Gleichgewichtsorgan an das Mittelohr an. Es besteht aus zwei Makulaorganen, die *Macula sacculi* und *Macula utriculi*, und drei Bogengängen. Sie besitzen ein Sinnesepithel, das aus tausenden Haarsinneszellen und Stützzellen mit Stereozilien und einem langen Kinozilium besteht. Die Sinneszellen ragen in eine gallertartige Masse, die das Sinnesepithelium bedeckt. In den Makularorganen enthält diese Masse noch eine Vielzahl von Otolithen. Der Aufbau und die Funktion der Masse ist dem der Cochlea ähnlich [7].

### 1.1.2 KLASSIFIZIERUNGEN VON HÖRSTÖRUNGEN

Hörstörungen können unterschiedlich klassifiziert werden, je nachdem, welcher Bereich des Ohres betroffen ist, in welchem Alter die Hörstörung auftritt, wie schwer die Hörstörung ist, welche Frequenzen beeinträchtigt sind, ob nur ein Ohr oder beide eine Hörstörung aufweisen oder ob die Hörstörung im Laufe des Lebens zunimmt. Zur Einteilung des Hörverlustes stehen verschiedene Messmöglichkeiten zur Verfügung.

#### 1.1.2.1 KLASSIFIZIERUNGSRICHTLINIEN

Die Art der Hörstörung kann je nach anatomisch betroffenem Teil des Ohres in drei Untergruppen unterteilt werden. So spricht man von einer Schallleitungsschwerhörigkeit, wenn das äußere Ohr oder das Mittelohr eine Anomalie oder anderweitige Veränderung aufweist. Hierbei sollten die Grenzwerte einer Knochenleitungsmessung und einer Luftknochenmessung einen höheren Wert als 15 dB im Schnitt über einen Frequenzbereich von 0,5–2 kHz haben. Eine Schallempfindungsschwerhörigkeit liegt vor, wenn das innere Ohr, also die Cochlea bzw. das Corti'sche Organ, betroffen ist. Ebenfalls wird ein Schaden an den cochleären Nerven zu den Schallempfindungsschwerhörigkeiten gezählt. Wenn eine gemischte Schwerhörigkeit vorliegt, dann sind sowohl das äußere Ohr/Mittelohr sowie das innere Ohr bzw. die cochleären Nerven betroffen. Eine gemischte Schwerhörigkeit zeigt sich bei Richtwerten von >20 dB in der Reintonaudiometrie sowie einem Grenzwert von >15 dB in der Knochenleitungsmessung über einen Frequenzbereich von 0,5–2 kHz [10].

Je nachdem, wann eine Hörstörung im Leben auftritt, kann sie dementsprechend in drei Kategorien eingeteilt werden: kongenital, prälingual oder postlingual. Wenn eine Hörstörung bei der Geburt festgestellt werden kann, wird sie als kongenital bezeichnet. Als prälingual werden alle Hörstörungen bezeichnet, die vor dem Spracherwerb (<5 Jahre) diagnostiziert wurden und als postlingual jene, die erst nach Spracherwerb (> 5 Jahre) aufgetreten sind [10].

Des Weiteren kann eine Hörstörung aufgrund ihres Schweregrads charakterisiert werden. Dieser richtet sich nach den betroffenen Frequenzen (kHz) und in welcher Lautstärke (dB) diese noch wahrgenommen werden können. Als milde Hörstörung werden all diejenigen eingestuft, bei denen Frequenzen im 20–40 dB-Bereich wahrgenommen werden können. Moderate Hörstörungen zeigen eine notwendige Lautstärke von 41–70 dB. Probanden mit einer schweren Hörstörung können die Frequenzen nur bei einer Lautstärke von 71–95 dB wahrnehmen. Als eine an Taubheit grenzende Hörstörung bzw. taub gelten alle Patienten, die 95 dB bzw. mehr als 95 dB benötigen, um etwas zu hören bzw. nicht mehr in der Lage sind etwas zu hören [10].

Zusätzlich werden die Hörstörungen anhand der Frequenzen eingeteilt, die nicht mehr wahrgenommen werden können. Dabei handelt es sich entweder um hohe oder tiefe Töne oder gar Töne, die für die Kommunikation notwendig sind. Dabei werden sie wie folgt unterteilt: Eine Tieftonschwerhörigkeit liegt vor, wenn alle Frequenzen ≤0,5 kHz nicht wahrgenommen werden können. Eine Schwerhörigkeit, die die mittleren Frequenzen betrifft, zeigt sich bei Patienten die im Bereich von >0,5≤2 kHz keine auditive Wahrnehmung zeigen. Hörstörungen, die den Hochtonfrequenzbereich betreffen, werden dann diagnostiziert, wenn im Bereich von >2≤8 kHz keine Wahrnehmung stattfindet [10]. Die folgende Abbildung 6 zeigt die Einteilung des Schweregrades und der betroffenen Frequenzen.

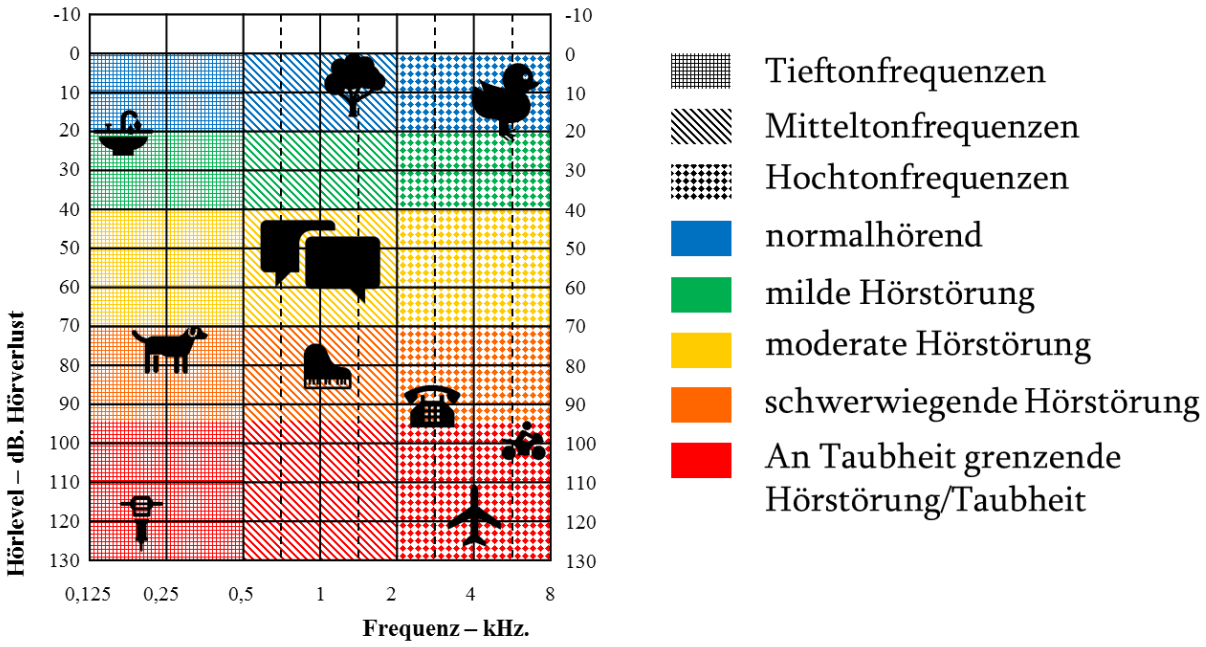



*Abb. 6: Audiogramm mit Klassifizierung der Hörstörung nach betroffenen Frequenzen sowie des Schweregrades. Links und rechts ist die Lautstärke in dB angeben. Auf der x-Achse sind die betroffenen Frequenzen in kHz aufgetragen. Mit Hilfe von Piktogrammen sind Geräusche dargestellt, die stellvertretend für den betroffenen Frequenzbereich und die Lautstärke stehen, die bei einem Hörverlust betroffen sein könnten. Die Farbskala gibt den Schwergrad im Audiogramm an, die unterschiedliche Musterung entsprechend der betroffenen Frequenzen (Abbildung erstellt in Anlehnung an [11]).*

Zur weiteren Charakterisierung werden die Hörstörungen hinsichtlich ihres Verlaufs betrachtet. In vielen Fällen bleibt die Hörstörung nicht stabil, sondern verschlechtert sich im Lauf des Lebens. Eine progressive Hörstörung liegt vor, wenn innerhalb von zehn Jahren im Schnitt über 15 dB Verschlechterung in den Frequenzen 0,5, 1 und 2 kHz aufgetreten sind. Bei Probanden über 50 Jahren muss hier allerdings auch eine Altersschwerhörigkeit mitberücksichtigt werden [10].

Zusätzlich werden die Hörstörungen nach der Lateralität eingeteilt. So spricht man von einer einseitigen bzw. unilateralen oder beidseitigen bzw. bilateralen Hörstörung. Dabei wird ein Unterschied zwischen den beiden Ohren von über 10 dB bei mindesten zwei Frequenzen betrachtet [10].

#### 1.1.2.2 ERMITTLUNG DES HÖRVERLUSTS

Zur Ermittlung des Hörverlustes stehen mehrere Messmöglichkeiten zu Verfügung, die im Folgenden aufgeführt sind.

##### 1.1.2.2.1 REINTON-AUDIOMETRIE

Zur Messung der Hörschwelle wird, die Luft- und die Knochenleitung mit einem Audiometer bestimmt. Die Luftleitung bezieht sich dabei auf den Schall, der über das äußere Ohr wahrgenommen wird, während die Knochenleitung das äußere Ohr und das Mittelohr umgeht. Das Audiometer erzeugt Sinustöne unterschiedlicher Lautstärke. Es wird in den Frequenzen von 250–8.000 Hz gemessen. Dabei wird die relative Hörschwelle ermittelt, also das subjektiv frequenzspezifisch Hörbare. Das heißt, der Proband gibt an, wann er die Töne noch wahrnehmen kann. Der Hörverlust wird für Luftleitungs- und Knochenleitungsmessung jeweils frequenzspezifisch in dB in ein Audiogramm eingetragen [12].

##### 1.1.2.2.2 DISTORSIVPRODUZIERTE OTOAKUSTISCHE EMISSIONEN (DPOAE)-MESSUNG

Otoakustische Emissionen (OAEs) sind messbare Schallwellen im Gehörgang. Als Folge eines akustischen Reizes werden die äußeren Haarsinneszellen erregt und erzeugen als cochleärer Verstärker ebenfalls eine Schwingungsenergie, die vom Innenohr in das Mittelohr und damit zum Gehörgang zurückgelangt.

Bei einer DPOAE-Messung werden zwei Töne präsentiert, die ein unterschiedliches Level und unterschiedliche Frequenzen aufweisen. Durch die Beziehung zwischen ihren Frequenzen soll eine Antwort in der Cochlea erzeugt werden, die eine dritte Frequenz aufweist. Wenn diese dritte Frequenz sich als Vibration retrograd entlang der Cochlea fortpflanzt, kann sie im Gehörgang gemessen werden. Auf diese Weise wird während der cochleären Aktivierung die DPOAEs im Bereich von 1.000-8.000 Hz bei 5–6 dB über dem Hintergrundrauschen gemessen [13, 14].

##### 1.1.2.2.3 TRANSITORISCH EVOZIERTE OTOAKUSTISCHE EMISSIONEN (TEOAE)-MESSUNG

Bei einer TEOAE-Messung werden Klick-Geräusche oder andere kurze Stimuli genutzt, um otoakustische Emissionen (OAEs) über einen breiten Frequenzbereich zu erzeugen. Diese Klicks aktivieren weite Teile der Basilarmembran. Die TEOAEs treten zwischen den stillen Intervallen auf. Die Latenzzeit bewegt sich dabei zwischen 5–15 ms. Kürzere Latenzen können dabei zu höheren Frequenzregionen zugeordnet werden, längere Latenzen kommen

bei niedrigen Frequenzen vor. Generell können TEOAEs zwischen 1000–4000 Hz gemessen werden. Bei der TEOAE-Messung muss gewöhnlich ein Wert von 3–6 dB über dem Hintergrundrauschen gemessen werden, um aussagekräftig genug zu sein. Da diese TEOAE-Amplituden in Säuglingen größer sind als bei Erwachsenen, eignen sich diese ideal für das Neugeborenen-Hörscreening, zumal eine Reintonaudiometrie, die auf die Mitarbeit der Probanden basiert, nicht funktionieren würde. Hörstörungen, die schwerwiegender sind als 35 dB, können durch das Fehlen der TEOAEs ermittelt werden. Jedoch ist der Test zwischen 25–35 dB nicht verlässlich [14].

##### 1.1.2.2.4 Auditory Brainstem Response (ABR)- und Auditory Steady-State Response (ASSR)-Messung

Die ASSR ist eine elektrophysikalische Reaktion auf schnelle auditorische Stimuli. Dies gilt ebenso für die ABR. Bei beiden handelt es sich um auditorisch evozierte Signale, die über bioelektrische Aktivitäten von Elektroden erfasst werden. ASSR wird mit Tonreizen ausgelöst, die häufig wiederholt werden. ABR werden durch kurze Klickreize ausgelöst, deren Wiederholungsrate niedrig ist. Zudem müssen die ABRs von einem Prüfer anhand der Wellenformen ausgewertet und die Latenzen bestimmt werden. ASSR verwendet einen mathematischen Erkennungsalgorithmus, um die Hörschwelle zu bestimmen. Beide Verfahren dienen aber zur Ermittlung eines Hörverlustes anhand Nerven- bzw. Hirnaktivität und sind beides objektive Messverfahren, die keine Mitarbeit der Probanden benötigt [15].

## 1.2 Genetik der Hörstörungen

Etwa jedes 500. Kind kommt mit einer Hörstörung zur Welt, im Kindesalter steigt die Prävalenz sogar an [16]. Ursächlich hierfür sind sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Veränderungen von Genen, die mit Hörstörungen assoziiert werden. Auf diese Weise treten die Hörstörungen häufiger als eine Trisomie 21 auf [17]. Zu den Umweltfaktoren, die eine Hörstörung bedingen können, zählen Infektionen, vor allem Infektionen mit Cytomegaloviren, toxische Medikamentation, sowie Lärmexposition [18, 19]. Sie sind zur Hälfte aller Fälle für eine Hörstörung verantwortlich. In den restlichen Fällen liegt eine genetische Ätiologie zugrunde [20]. In Industrieländern liegt die genetische Ätiologie sogar bei ca. 80% [21]. Die Hörstörungen treten in 70% isoliert auf und sind in 30% aller Fälle mit einem Syndrom assoziiert[22]. Insgesamt gibt es über 600 verschiedene Syndrome, die mit einer Hörstörung einhergehen [23, 24]. Die isolierten, nicht-syndromalen Hörstörungen können ebenfalls noch weiter unterteilt werden. 70–80% aller genetisch bedingten Hörstörungen treten autosomal rezessiv auf. Am zweithäufigsten sind mit 20% autosomal

dominante Hörstörungen, während X-chromosomale (2–5%) und mitochondriale Hörstörungen (1%) seltener sind (Abb. 7)[25].

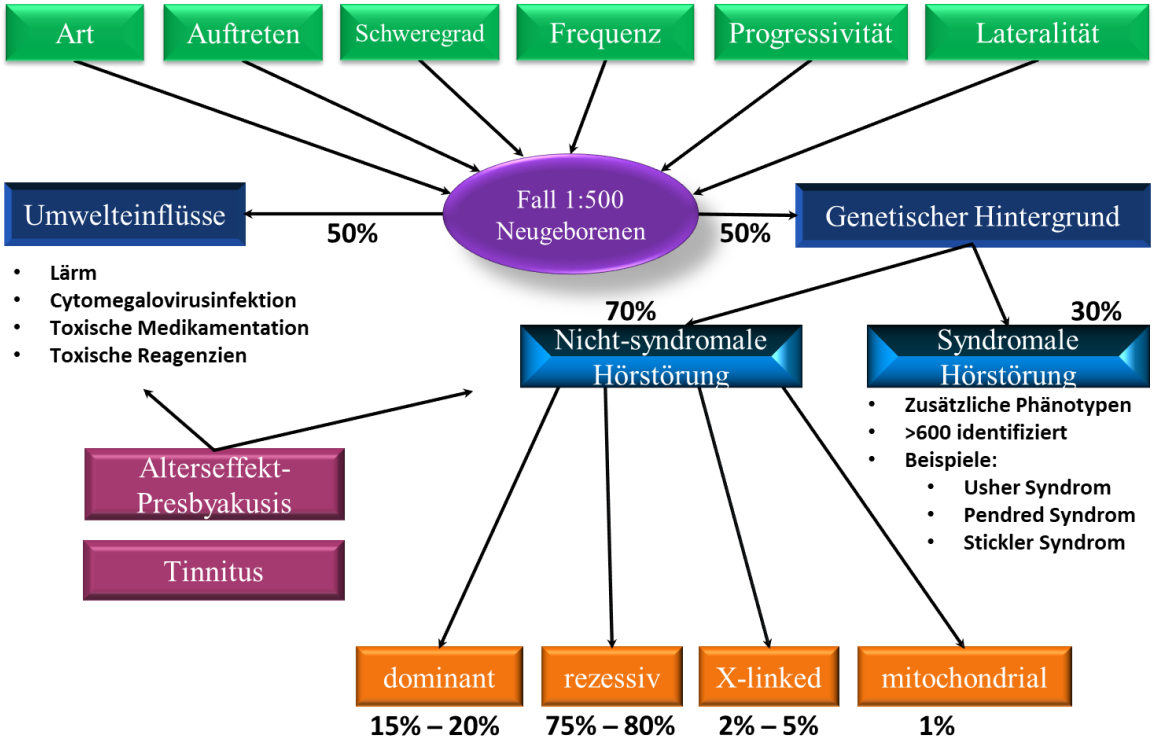



*Abb. 7: Hörstörungen können hinsichtlich Art, Auftreten, Schweregrad, Frequenz, Progressivität und Lateralität eingestuft werden. Ausgehend von einer genetischen Ätiologie in 50% aller Fälle, können diese weiter in nicht-syndromale und syndromale Hörstörungen unterschieden werden. Nicht-syndromale Hörstörungen werden abhängig vom Vererbungsmuster eingestuft. Da Tinnitus und Presbyakusis (altersabhängig Schwerhörigkeit) sowohl durch Umwelteinflüsse als auch durch einen genetischen Einfluss bedingt sein können, sind sie ebenfalls aufgeführt (Abbildung erstellt nach [10, 16, 18, 24-27]).*

### 1.2.1 Nicht-syndromale Hörstörungen

Nicht-syndromale Hörstörungen treten isoliert auf und können je nach Vererbungsmuster in rezessive, dominante und X-chromosomale Gene eingeordnet werden. Im Folgenden sind alle bis zu diesem Zeitpunkt bekannten mit Hörstörungen assoziierten Genen dargestellt.

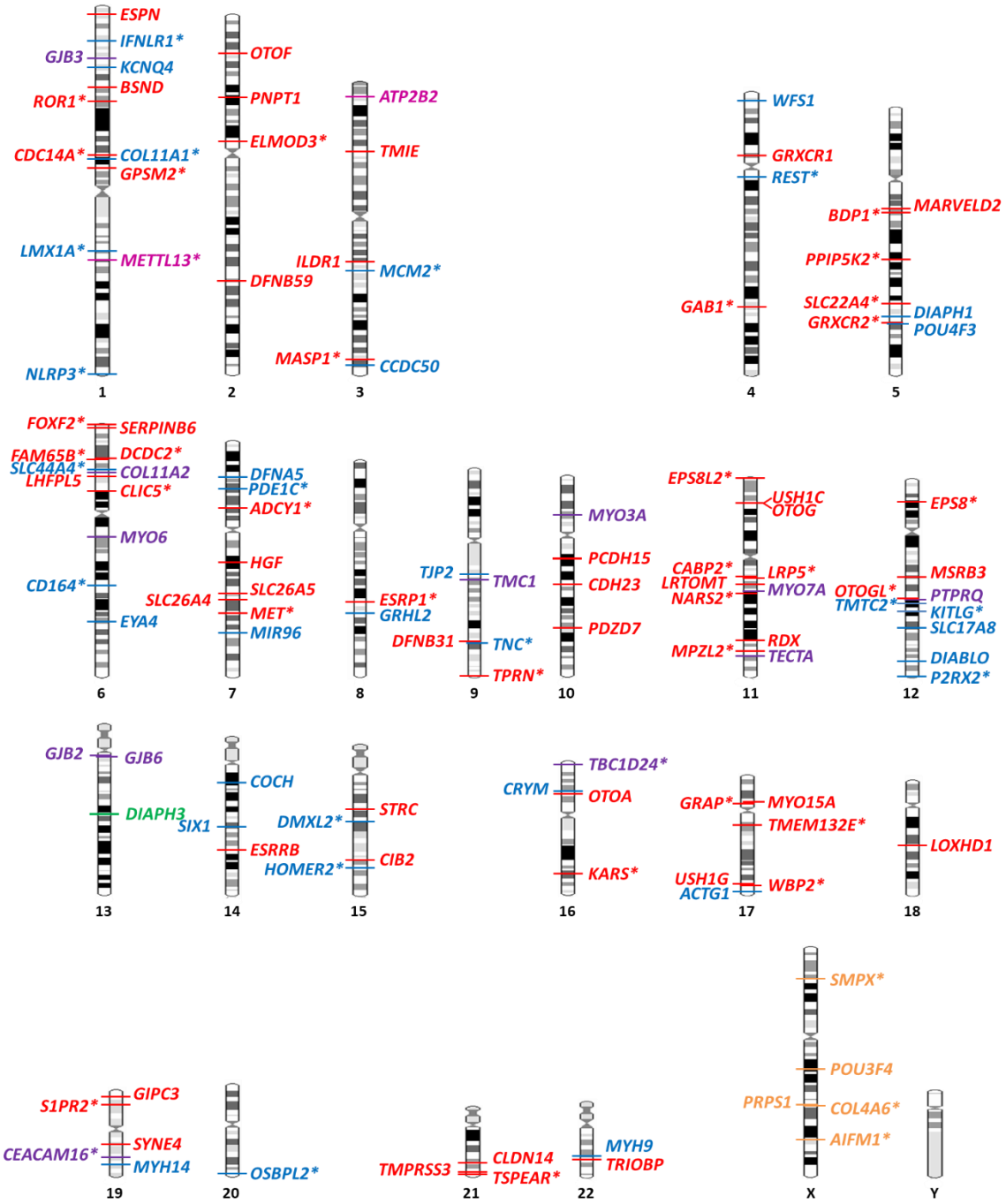



*Abb. 8: Karyogramm mit nicht-syndromalen Hörstörungsgenen. Blau: autosomal dominante Hörstörungsgene; rot: autosomal rezessive Hörstörungsgene; lila: duales Vererbungsmuster, autosomal dominant und rezessiv; orange: X-chromosomale Hörstörungsgene; grün: Gene, die mit auditorischer Neuropathie assoziiert sind (adaptiert von Barbara Vona, Michaela A.H. Hofrichter, Barry A Chioza, Andrew H. Crosby, Indrajit Nanda, Chapter 6, Genetics of Deafness vol20 p.55–57, Karger Verlag, Basel [14]).*

Allerdings sind allein im Verlauf der Doktorarbeit mehr als 40 neue Hörstörungsgene entdeckt worden [28]. Man geht daher davon aus, dass bis zu 1% aller kodierenden Gene im Zusammenhang mit einer Hörstörung stehen können, was insgesamt ca. 250 Genen entsprechen würde [29].

#### 1.2.1.1 AUTOSOMAL REZESSIVE HÖRSTÖRUNGEN

Autosomal rezessive Hörstörungen zeigen sich in 75–80% der Fälle [25]. Bei einer rezessiven Erkrankung sind beide elterliche Allele von einem Defekt betroffen. Ein Phänotyp bildet sich aus, wenn die pathogene Veränderung der codierenden Basensequenz homozygot, das heißt auf beiden elterlichen Allelen identisch vorliegt. Ebenfalls wird ein Phänotyp erzeugt, wenn eine compound heterozygote Veränderung vorliegt. In diesem Fall treten zwei unterschiedliche pathogene Varianten in einem Gen auf, wovon ein Variante auf dem mütterlichen Allel liegt, während die zweite Variante auf dem väterlichen Allel zu finden ist. Die Varianten liegen somit biallelisch vor [30]. Daher treten rezessive Hörstörungen, wenn beide Eltern Anlageträger für ein Allel mit einer pathogenen Variante im gleichen rezessiven Hörstörungsgen sind, mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% laut Mendel bei den Kindern auf [30]. Dabei sind aber Modifier, also Varianten in bestimmten Genen, die den Phänotyp verändern können, sowie digenische Vererbung, das heißt eine Kombination aus zwei pathogenen Varianten in zwei Genen, nicht in die Kalkulation miteinbezogen [30]. Im Allgemeinen kann man rezessive Hörstörungen als prälingual, nicht-progressiv und schwerwiegend – an Taubheit grenzend – einstufen [31, 32]. Bis heute sind 66 Gene bekannt, die mit einer rezessiven Hörstörung assoziiert sind. Linkage- und Mapping-Analysen von Familien mit mehreren Generationen haben zur Aufdeckung von sogenannten Deafness Loci geführt. In diesen Loci konnten im Laufe der Jahre krankheitsverursachende Gene identifiziert werden. Diese Gene, die innerhalb eines Loci liegen, werden mit der Abkürzung DFN beschrieben. Handelt es sich um rezessive Gene, werden sie einem Deafness Locus DFNB zugeordnet. Obwohl viele der 66 Gene mit einem Deafness Locus in Zusammenhang gebracht wurden, konnten in 23 autosomal rezessiven Loci noch keine kausalen Gene ausgemacht werden [33].

Das bekannteste Hörstörungsgen ist *GJB2*. In ungefähr 50% aller Patienten mit autosomal rezessiver Hörstörung kann eine Hörstörung aufgrund einer pathogenen Mutation in *GJB2* festgestellt werden [34]. Dieses Gen kodiert für einen Kaliumionentransporter, der für die Depolarisation der Haarsinneszellen und für das Aufrechterhalten des endocochleären Potentials essentiell ist. Inzwischen sind mehr als 110 Mutationen in diesem Gen bekannt, die für eine Hörstörung verantwortlich sein können [34]. Die häufigste Mutation ist c.35delG,

p.Gly12Valfs, eine kleine Deletion, die zu einem Frameshift führt [34]. Sie kommt auf allen Kontinenten der Welt vor. Diese Variante zeigt auch eine erhöhte Heterozygotenfrequenz, wodurch sich die Häufung von Hörstörungspatienten aufgrund dieser Variante erklärt [35].

Ein weiteres, häufig betroffenes Gen bei autosomal rezessiven Hörstörungen ist *STRC*. *STRC* kodiert für Stereozilin, welche Verlinkungen zwischen den Stereozilien bildet [36]. Dies ist notwendig für die Aufrechterhaltung der Stereozilienstruktur, welche bei der Auslenkung zur Depolarisation eine Rolle spielen [36]. Die Inzidenz für *STRC*-assoziierte Hörstörungen wird bei 1:16.000 geschätzt [37]. Aufgrund eines Pseudogenes in der Gennachbarschaft erschwert sich eine molekulargenetische Untersuchung dieses Gens. Dennoch kann in 6% aller milden bis moderaten Hörstörungen, die vor allem die hohen Frequenzen betreffen, eine *STRC*-assoziierte Schwerhörigkeit vermutet werden [38]. Mutationen in *STRC* sind auch in Kombination mit Mutationen in *CATSPER2* für das Deafness Infertility-Syndrom verantwortlich, das bei Männern zu einer Infertilität führt [39].

*SLC26A4* ist ebenfalls ein Gen, welches mit rezessiven Hörstörungen in Verbindung gebracht wird [40]. Es kodiert für das Protein Pendrin, das ein Mikrotubuli-assoziiertes, strukturelles Protein mit der Funktion eines Anionentransporters darstellt [41]. Es ist durch die Sekretion von $HCO^-$-Ionen in der Regulation der endolymphatischen Flüssigkeit involviert und damit indirekt auch wichtig für das endocochleäre Potential [41, 42]. Zudem gelten Mutationen in diesem Gen als der zweihäufigste genetische Grund für eine sensorineurale Hörstörung. *SLC26A4* ist in ca. 4–10% aller Hörstörungsfälle populationsunabhängig ursächlich [43].

Das *MYO15A*-Gen, welches für das unkonventionelle Myosin XVa-Protein kodiert, ist an der Organisation der Haarstruktur beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der Verlängerung und Differenzierung von Stereozilien. Durch das Fehlen des Myosins XVa werden die Strukturen der Stereozilien verändert, was wiederum eine direkte Auswirkung auf den Hörvorgang hat [44]. Mutationen im *MYO15A*-Gen sind bei 3,3–5,8% autosomal rezessiver Hörstörungspatienten in der Türkei, Iran und Pakistan, also im nahen bzw. mittleren Osten, ursächlich und daher ebenfalls relativ häufig in der Population vorhanden [43].

Ein besonderes Interesse gilt außerdem dem Usher-Komplex, welcher aus verschiedenen Komponenten besteht, die miteinander interagieren. Dieser Komplex ist ein Proteinnetzwerk, das im Wachstumsprozess der Stereozilien involviert sowie für die Stabilität und den Zusammenhalt der Stereozilien zueinander zuständig ist [1]. Schlüsselkomponenten dieses Komplexes bilden die Gene *USH1C* und *DFNB31*. Ihre Genprodukte Harmonin und Whirlin binden die restlichen Mitglieder des Usher-Komplexes, die von den Genen *MYO7A*, *CDH23*,

*USH1G*, *PCDH15*, *USH2A* und *ADGRV1* kodiert werden. Ebenso ist Myosin XVa ebenfalls ein Teil des Usher-Interaktums, da es von Whirlin gebunden wird. Jedes dieser Gene ist mit einer autosomal rezessiven Hörstörung und syndromalen Hörstörung assoziiert[1].

#### 1.2.1.2 AUTOSOMAL DOMINANTE HÖRSTÖRUNGEN

Autosomal dominante Hörstörungen sind mit 20% die zweithäufigste Form der nicht-syndromalen, ererbten Hörstörungen [25, 45]. Im Gegensatz zu den rezessiven Erkrankungen ist eine pathogene Veränderung eines elterlichen Allels Phänotyp induzierend, obwohl die Variante nur heterozygot, auf einem Allel, vorliegt. Kinder haben ein 50% Risiko das elterliche Allel mit der pathogenen Variante zu erben [30]. Primär kann man autosomal dominante Hörstörungen als postlingual und progressiv einstufen [31]. Es gibt 34 Gene, die mit einer autosomal dominanten Hörstörung einhergehen. Sie werden wie in 1.2.1.1.erwähnt mit DFNA beschrieben. Ebenfalls sind 20 autosomal dominante Loci noch nicht mit einem kausalen Gen in Verbindung gebracht worden [33].

Das autosomal dominante Hörstörungsgen *TECTA* kodiert für Tectorin alpha [46], ein nicht-kollagenes Protein der Tektorialmembran [47]. Die Tektorialmembran besteht als extrazelluläre Matrix aus Kollagenen und Glykoproteinen und bedeckt das sensorische Epithel. Man kann drei genetisch verschiedene Kollagene unterscheiden: Typ II, IX und XI. Zusätzlich sind weitere nicht-kollagene Proteine enthalten wie Otogelin (*OTOG*), Otogelin-ähnliches Protein (*OTOGL*), Otolin 1 (*OTOL1*), Tectorin-alpha (*TECTA*), Tectorin-beta (*TECTB*) und Carcinoembryonale Antigen verwandte Zelladhäsionsmolekül 16 (*CEACAM16*) [47, 48]. Tectorin alpha ist ein Teil der striated-sheet Matrix, einer Untereinheit der Tektorialmembran, in der die Kollagenfibrillen eingebettet sind. Defekte im Tektorin alpha führen zu einer Zerstörung der Tektorialmembranstruktur. 4% aller dominanten Hörstörungspatienten weisen tatsächlich Mutationen im *TECTA*-Gen auf und sind damit eine Hauptursache für autosomal dominante Hörstörungen [49].

Veränderungen im *WFS1*-Gen, dessen Produkt das Wolframin ist, sowie Mutationen in *MYO7A*, als auch pathogene Varianten im *COCH*-Gen sind ebenfalls häufiger bei autosomal dominanten Hörstörungen als ursächlich identifiziert worden [50].

Einige Gene, zu denen auch *TECTA* zählt, können ebenfalls für eine rezessive Hörstörung verantwortlich sein [51]. Inzwischen gibt es 12 Gene [52-54], die für beide Formen der Hörstörung ursächlich sein können (siehe Abb. 4).

#### 1.2.1.3 X-CHROMOSOMALE HÖRSTÖRUNGEN

Mit ca. 2–5% aller Hörstörungsfälle sind die X-chromosomalen Hörstörungen selten [25]. Hierbei handelt es sich um eine geschlechtsgebundene Vererbung. Da Männer nur ein X-Chromosom besitzen, kommt es im Falle eines Defektes auf diesem X-Chromosom zur Ausprägung eines Phänotyps bei Männern, welches als hemizygot bezeichnet wird. Handelt es sich um eine X-chromosomale rezessive Erkrankung, tritt diese bei Frauen selten auf. Eine Ausprägung des Phänotyps kann entweder durch eine X-Inaktivierung des gesunden Allels bei Konduktorinnen (Trägerinnen) oder durch Homozygotie einer pathogenen Varianten gegeben sein. Im Falle einer X-chromosomalen dominanten Erkrankung sind Frauen ebenfalls im heterozygoten Zustand betroffen, wobei auch hier die X-Inaktivierung eine Rolle spielt und daher zu einem milderen Phänotyp führen kann [30]. Das Risiko für Kinder eine Hörstörung zu erben, ist in diesem Fall abhängig vom Träger der pathogenen Variante und vom Geschlecht des Kindes. Bis jetzt sind 5 Gene bekannt, die mit einer X-chromsomalen Hörstörung verknüpft sind. Diese werden als DFNX klassifiziert [33].

Das *POU3F4*-Gen ist das am häufigsten betroffenen Gen bei X-chromosomalen Hörstörungen[55]. Der Phänotyp von Männern zeigt eine kongenitale schwere, bis an Taubheit grenzende Hörstörung entweder sensorineural oder gemischt mit einer Tendenz für perilymphatischen Gusher während einer otologischen Operation und Veränderung des Schläfenbeins [55]. Die Hörstörung tritt variabel auf. Frauen zeigen ebenfalls einen milden Phänotyp [56].

*SMPX* ist ein Hörstörungsgen, das X-chromosomal vererbt wird. Es kodiert für ein kleines Muskelprotein[57]. Dieses spielt eine Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der sensorischen Haarzellen des Innenohrs durch die Interaktion mit verschiedenen Regulatoren wie Wachstumsfaktoren [57, 58]. Auch hier zeigt sich schon sehr früh (innerhalb der 1. Dekade) eine Hörstörung, die sich progressiv zu einem schwerwiegenden Phänotyp entwickelt, während Frauen einen variablen Hörstörungsphänotyp aufweisen, der mild und sich erst in späteren Dekaden des Lebens zeigt [58], [59].

#### 1.2.1.4 MITOCHONDRIALE HÖRSTÖRUNGEN

Mitochondriale Hörstörungen bilden mit ca. 1% die seltensten Hörstörungen. Diese werden in erster Linie von der Mutter an alle Kinder übertragen, da im Gegensatz zu den restlichen Formen der Hörstörungen nicht das Genom, sondern das mitochondriale Genom betroffen ist [30]. Dieses wird komplett von der Mutter an die Kinder übertragen. Im Moment sind zwei Gene bekannt, die mit einer mitochondrialen Hörstörung in Verbindung stehen: *MT-RNR1*

und *MT-TS1* [60, 61]. Nach neuesten Erkenntnissen wird die rein mütterliche Vererbung der mitochondrialen DNA in Frage gestellt, denn auch das väterliche mitochondriale Genom kann nachweislich bis zu einem gewissen Prozentsatz an die Kinder übertragen werden. Dadurch muss die Vererbung bei mitochondrialen Hörstörungen kritisch betrachtet werden [62].

### 1.2.2 Syndromale Hörstörungen

Es gibt über 600 Syndrome, bei denen eine Hörstörung als Teil des syndromalen Phänotyps auftritt [24]. Daher fokussierte sich diese Arbeit nur auf die bekanntesten syndromalen Hörstörungen. Zu diesen zählen das Alport-Syndrom, das Branchio-oto-Renal-Syndrom, das CHARGE-Syndrom, das Jervell-und-Lange-Nielson-Syndrom, das Norrie-Syndrom, das Pendred-Syndrom, das Perrault-Sydrom, das Stickler-Syndrom, Treacher-Collins-Syndrom, das Usher-Syndrom und das Waardenburg-Syndrom [33]. Nachfolgend wird eine kurze Zusammenfassung zu jedem Syndrom präsentiert.

#### 1.2.2.1 Alport-Syndrom

Das Alport-Syndrom zeichnet sich durch eine progressive sensorineurale Hörstörung aus, die mit einer renalen Erkrankung einhergeht. Ohne Behandlung kommt es über eine mikroskopische Hämaturie (Harnblutung) zu einer Proteinurie (übermäßige Ausscheidung von Proteinen) und einer fortschreitenden renalen Insuffizienz, die zu einem terminalen Nierenversagen führt[63, 64]. Begleitend treten Augenveränderungen auf, wie Lenticonus anterior (Deformierung der vorderen Linsenanteile), Makulopathie, Vesikel im Hornhautendothel und wiederholende Hornhauterosionen. Während die Hämaturie schon im Kindesalter vorliegt, tritt die Hörstörung im späten Kindesalter oder der frühen Adoleszenz auf [64]. Je nach betroffenem Gen, tritt das Alport-Syndrom rezessiv, dominant oder X-chromosomal auf. Dabei sind die X-chromosomalen Fälle mit 65% am häufigsten. Verantwortlich hierfür ist das Gen *COL4A5*. In 15% kommt es zu einem autosomal rezessiven, in 20% zu einem dominanten Alport-Syndrom. Beide Formen können durch *COL4A3* und *COL4A4* verursacht werden. Auch eine digenische Vererbung wurde beschrieben [64, 65].

#### 1.2.2.2 Branchio-oto-Spektrum-Erkrankungen

Das Branchio-oto-renal-Syndrom ist charakterisiert durch Fehlbildungen des äußeren, Mittel- und Innenohr, wodurch eine konduktive, sensorineurale oder gemischte Hörstörung vorliegt. Zusätzlich entstehen Kiemenbogenanomalien, sogenannte Branchialfisteln, und Zysten. Ebenso wie beim Alport-Syndrom ist die Niere beteiligt. So kommt es zu renalen

Fehlbildungen, die von einer milden Hypoplasie, einer Unterentwicklung, bis zu einer bilateralen Agenesis, einem Fehlen des Organs, reichen kann. Dadurch zeigen einige Patienten ebenfalls ein terminales Nierenversagen [66]. Das Branchio-otischen-Syndrom unterscheidet sich nur durch das Fehlen einer Nierenabnormalität. Der Phänotyp dieser Erkrankung ist sehr variabel, sowohl in der Schwere, im Typ und der Präsenz [66]. Sogar innerhalb der Familie können unterschiedliche Phänotypen auftreten. Branchio-oto-Spektrum-Erkrankungen werden autosomal dominant vererbt, wobei in 40% aller Fälle das Gen *EYA1* betroffen ist [67]. Dennoch können auch die Gene *SIX1* und *SIX5* ebenfalls mit Branchio-oto-Spektrum-Erkrankungen assoziiert sein. In 10% der Fälle liegen Neumutationen vor [66].

#### 1.2.2.3 CHARGE-SYNDROM

Das Akronym CHARGE steht für Kolobom, Herzdefekte, Coanalatresie, verzögertes Wachstum und Entwicklung, Genitalanomalien und Ohranomalien und beschreibt somit gleichzeitig die Symptome dieser Erkrankung [68]. Ein Kolombom ist in 80–90% aller Patienten ersichtlich und beinhaltet eine Spaltbildung des Auges. Ein Verschluss der hinteren Nasenöffnung tritt in 50–60% aller Fälle ein und verhindert eine Nasenatmung der Neugeborenen. Ebenso zählen Hörstörungen, sowie abnormale äußere Ohren, Veränderung der Gehörknöchelchen, Mondini-Defekte (die Gehörschnecke zeigt weniger Windungen) und Verlust semizirkulärer Kanäle oftmals zu diesem Krankheitsbild. In den meisten Fällen liegt zudem eine kardiovaskuläre Fehlbildung und ein Wachstumsdefizit vor [68]. In ca. 40% aller CHARGE-Syndrom-Fälle treten auch Hirnnervenfunktionsstörungen auf, die zum Verlust des Geruchsinns führen können, sowie zu Gesichtslähmungen. Ebenso werden Schluckbeschweren sehr häufig beschrieben, seltener auch Lippen- und Gaumenspalten, sowie tracheoösophageale Fisteln. Zusätzlich kommt es zu einer Entwicklungsverzögerung und Lagenanomalien des Hodens, als auch zu hypogonadotroper Hypogonadismus. Für Neugeborene sind dies lebensbedrohliche Konditionen, vor allem da es zu Schwierigkeiten bei der Nahrungszufuhr kommt, was ein Hauptgrund der Morbidität ist[68]. Pathogene Varianten im *CHD7*-Gen können in 65–70% aller Fälle für das CHARGE-Syndrom verantwortlich gemacht werden. *SEMA3E* wurde ebenfalls mit dem CHARGE Syndrom assoziiert, wobei es bis dato nur einen beschriebenen Fall gibt [69]. Es wird autosomal dominant vererbt und hat eine Inzidenz von1:10.000 bzw. 1:8.500. Das Wiederholungsrisiko für ein weiteres Kind mit CHARGE-Syndrom liegt bei 1–2% [68].

#### 1.2.2.4 JERVELL-UND-LANGE-NIELSON-SYNDROM

Eine an Taubheit grenzende bilaterale sensorineurale Hörstörung in Assoziation mit einem Long-QT-Syndrom sind Kennzeichen des Jervell-und-Lange-Nielson-Syndroms. Das Long-QT-Syndrom geht einher mit Tachyarrhythmien (Herzrhythmusstörungen und schneller Herzschlag), ventrikulärer Tachykardie (schneller Herzschlag) und ventrikulärem Fibrillieren (Herzkammerflimmern), welche zu Synkopen (kurze Bewusstlosigkeit) oder plötzlichem Tod führen können. Bei Angst, Bewegung oder Stress treten synkopale Episoden auf, die unbehandelt bei mehr als 50% der Patienten zum Tod vor dem 15. Lebensjahr führen können[70]. Die Hälfte aller betroffenen Kinder zeigen schon vor dem 3. Lebensjahr kardiale Auffälligkeiten. Das Jervell-und-Lange-Nielson Syndrom wird autosomal rezessiv vererbt. Pathogene Varianten in zwei Genen, *KCNQ1* und *KCNE1*, sind mit diesem Syndrom assoziiert. Eine Besonderheit beim Jervell-und-Lange-Nielson-Syndrom ist die Tatsache, dass heterozygote Anlageträger zwar keine Hörstörungen aufweisen, aber ein Long-QT-Syndrom zeigen können, da dieses autosomal dominant vererbt wird und einige Varianten ebenfalls im heterozygoten Zustand pathogen für das Long-QT-Syndrom sein können. Das Long-QT-Syndrom wird mit Beta-Blockern und dem Einsatz von implantierbarem Kardioverter-Defibrillator behandelt[70]. In erster Linie wird bei Kindern die Hörstörung wahrgenommen. Ein Herzproblematik bleibt lange unentdeckt, vor allem da die Symptomatik nur unter bestimmten Bedingungen auftritt. Vor allem bei Kindern wird eine nicht-syndromale Hörstörung zunächst angenommen, da weitere Symptome, in diesem Fall die des Long-QT-Syndroms, unbemerkt bleiben und somit das Syndrom als solches nicht erkannt wird [70].

#### 1.2.2.5 NORRIE-SYNDROM

Das Norrie-Syndrom ist eine X-chromosomal rezessive Erkrankung, die durch pathogene Varianten im *NDP*-Gen verursacht wird. Folglich sind hauptsächlich Männer vom Norrie-Syndrom betroffen. Bei der Geburt liegt bei Betroffenen eine Blindheit vor, die auf eine Fehlentwicklung der Netzhautgefäße und eine Netzhautablösung zurückzuführen ist. Charakteristisch sind hierbei Pseudogliome. 30–50% der betroffenen Männer leiden an einer Entwicklungsverzögerung bzw. geistigen Behinderung mit Verhaltensauffälligkeiten. Ebenso zeigt die Mehrheit aller Betroffenen eine sensorineurale Hörstörung, die in der Kindheit auftritt und progressiv verläuft. Zuerst mild und asymmetrisch, kann sie im Erwachsenenalter als schwerwiegend eingestuft werden [71].

#### 1.2.2.6 PENDRED-SYNDROM

Das Pendred-Syndrom zeichnet sich durch eine Hörstörung, vergrößertes Aquädukt, vestibuläre Dysfunktion, cochleäre Hypoplasie, Hypothyreose (Schilddrüsenunterfunktion) und Kropfbildung aus, wobei letzteres bei der Hälfte der Patienten und erst in der Pubertät auftritt. Es wird durch das Gen *SLC26A4* oder durch eine digenische Vererbung in Kombination mit Mutationen in den Genen *KCNJ10* oder *FOXI1* vererbt. Das Vererbungsmuster ist rezessiv. Das Pendred-Syndrom ist eines der am häufigsten auftretenden syndromalen Formen von Hörstörungen [72, 73].

#### 1.2.2.7 PERRAULT-SYNDROM

Während Männer eine sensorineurale Hörstörung aufweisen, entwickeln Frauen beim Perrault-Syndrom zusätzlich eine ovariale Dysfunktion[74]. Das Spektrum der ovarialen Dysfunktion kann dabei von einer Fehlbildung der Gonaden (Fehlen bzw. Funktionslosigkeit), welche sich als primäre Amenorrhoe ausbildet und mit dem Ausbleiben der Menstruation verbunden ist, bis hin zu einer primären Ovarialinsuffizienz POI reichen, bei der vor dem 40. Lebensjahr der Frau die Menopause eintritt [74]. Bei Männern wird die Fertilität im Allgemeinen als normal beschrieben[74]. Die Hörstörungen der Patienten sind bilateral, treten prälingual auf, rangieren im Bereich von moderat bis an Taubheit grenzend und nehmen einen progressiven Verlauf. Zusätzlich wurde von einigen Patienten mit Perrault-Syndrom berichtet, die auch an Lernproblemen, Entwicklungsverzögerung, einer zerebellaren Ataxie und motorische und einer sensorischen peripheren Neuropathie litten. In 60% der Fälle kann eine molekulare Diagnose anhand von Mutationen in den Genen *CLPP, ERAL1, HARS2, HSD17B4, LARS2, SGO2* und *TWNK* gestellt werden. Das Perrault-Syndrom wird autosomal rezessiv vererbt und kommt sehr selten vor. Auch hier wird oft das Syndrom als solches nicht erkannt, da gerade bei männlichen Patienten kein zusätzlicher Phänotyp zu erkennen ist [74].

#### 1.2.2.8 STICKLER-SYNDROM

Das Stickler-Syndrom (STL), eine seltene Erkrankung des Bindegewebes, tritt bei Neugeborenen mit einer Inzidenz von 1:7.500–1:9.000 auf [75, 76]. Sie ist klinisch und genetisch heterogen und kann eine hohe intrafamiliäre Variabilität aufweisen [75]. Klinisch präsentiert sich STL durch Augenabnormalitäten, Hörverlust (konduktiv, sensorineural oder gemischt), Entwicklungsstörungen des mittleren Gesichts und/oder Gaumenspalte sowie spondyloephiphysäre Dysplasie in Kombination mit vorzeitiger Arthritis [75]. Aufgrund der betroffenen Gene sowie der assoziierten Phänotypen wird STL in sechs Subtypen unterteilt. Die Mehrheit der STL-Fälle bilden hierbei die autosomal dominanten Erkrankungen STL1–

STL3[75] [77]. STL4–STL6 werden autosomal rezessiv vererbt und sind im Vergleich dazu seltener [75, 77]. 80–90% aller STL-Fälle können durch pathogene Varianten in *COL2A1* (STL1) erklärt werden, während die zweihäufigste Form (10–20% der Fälle) durch Mutationen in *COL11A1* (STL2) verursacht wird [75]. STL3 ist mit dem Gen *COL11A2* assoziiert. Alle STLs zeigen eine Hörstörung, wobei es phänotypische Unterschiede in der Ausprägung gibt. Eine milde, stabile Hörstörung ist bei 60% der STL1-Patienten vorhanden [77], wohingegen STL2 und STL3 mit einer moderaten bis schweren, progressiven Hörstörung, beginnend im Hochtonbereich, verbunden sind. Die hier aufgelisteten Gene von Kollagenen werden in verschiedenen Gewebetypen exprimiert. Ausgenommen des Kollagens Typ 11 alpha 2 werden alle anderen Kollagene innerhalb des Auges exprimiert. Daher ist bis jetzt beim STL-Spektrum von *COL11A2* noch kein Augenphänotyp beschrieben worden [77]. Die rezessiven Formen von STL sind mit Defekten in den Kollagen-IX-Genen verknüpft. Das Kollagen IX ist ein Heterotrimer und besteht aus drei Kollagenketten, die von den jeweiligen Genen *COL9A1* (STL4), *COL9A2* (STL5) und *COL9A3* (STL6) kodiert werden. Eine Kiefer-Lippen-Gaumenspalte ist bei den rezessiven Subtypen nicht vorhanden[77]. Zudem zeigen sie eine progressive senorineurale Hochtonfrequenzhörstörung [77].

#### 1.2.2.9 TREACHER-COLLINS-SYNDROM

Bilaterale symmetrisch abfallende Lidspalten, Hypoplasie des Jochbeins, Mikrognathie und Fehlbildungen des äußeren Ohrs sind Merkmale des Treacher-Collins-Syndroms. 40–50% der Patienten zeigen eine konduktive Hörstörung, welche auf eine Fehlbildung der Gehörknöchelchen und Hypoplasie der Paukenhöhle zurückzuführen ist [78]. Eine sensorineurale Hörstörung liegt normalerweise nicht vor, da die Strukturen des Innenohrs in der Regel normal sind. Seltener liegen Gaumenspalten oder Coanalstenose bzw. -atresie vor (Verschluss der hinteren Nasenöffnung). Pathogene Varianten in *TCOF1* und *POLR1D* sind mit einem autosomalen Treacher-Collins-Syndrom assoziiert, während biallelische pathogene Varianten in *POLR1C* oder *POLR1D* mit einem rezessiven Treacher-Collins-Syndrom verbunden sind [78]. Bei 96% der Patienten kann die Ursache der Erkrankung molekulargenetisch erklärt werden [78]. In über 50% der autosomal dominanten Treacher-Collins-Fälle konnten *De novo* pathogene Varianten in den Genen *TCOF1* und *POLR1D* nachgewiesen werden [78].

#### 1.2.2.10 USHER SYNDROM

In 50% aller Taub-Blindheitsfälle handelt es sich um ein Usher-Syndrom. Das Usher-Syndrom wird in drei Untergruppen unterteilt. Die schwerste Form, Usher Syndrom Typ 1, zeichnet sich durch eine Hörstörung bei der Geburt, einer Retinitis pigmentosa und

Gleichgewichtsstörungen aus [79]. Die Retinitis pigmentosa führt zu einer progressiven bilateralen symmetrischen Degeneration der Stäbchen- und Kegelfunktion der Retina, wodurch es zu einer fortschreitenden Verengung des Gesichtsfeldes und einer Beeinträchtigung der Sehschärfe kommt. Das früheste Zeichen der Retinitis pigmentosa ist eine Nachtblindheit und ein Tunnelblick und zeigen sich schon innerhalb der ersten zehn Lebenstagen [80], [79]. Dieses Syndrom kann durch Defekte der Gene *MYO7A*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G*, *USH1C* und *CIB2* verursacht werden und wird autosomal rezessiv vererbt.

Das Usher Syndrom Typ 2 bedingt eine Hörstörung und eine Retinitis pigmentosa, die aber erst im Laufe der Pubertät oder später auftritt (zweite Dekade des Lebens) und gehört zur häufigsten Form. Defekte in den Genen *USH2A* und *DFNB31* sowie in *ADGRV1* sind für diese Erkrankung ausschlaggebend, wobei fast 80% der Fälle durch Mutationen im *USH2A*-Gen aufgeklärt werden können [81, 82].

Die dritte und mildeste Form des Usher-Syndroms zeichnet sich durch eine postlinguale und progressive Hörstörung, eine variable Ausprägung der Retinitis pigmentosa, sowie variable Gleichgewichtsproblematiken aus. Dieser Typ wird durch Störungen in den Genen *HARS* und *CLRN1* ausgelöst [73, 83].

#### 1.2.2.11 WAARDENBURG-SYNDROM

Waardenburg ist eine Erkrankung, die mit einer angeborenen Hörstörung und einer Pigmentstörung assoziiert ist. Von der Pigmentstörung sind die Iris im Sinne einer Heterochromie, die Haare und die Haut betroffen und es zeigt sich eine Dystopia canthorum, eine Gesichtsdysmorphie. In 60% der Fälle sind sensorineurale Hörstörungen vorhanden, die bilateral oder auch unilateral auftreten können. Die klassische weiße Haarlocke ist in 45% aller Probanden als Pigmentanomalie vorhanden [84]. Das Waardenburg-Syndrom kann sowohl autosomal dominant als auch autosomal rezessiv vererbt werden [84]. Das Gen *MITF* ist mit einer autosomal dominanten Hörstörung verknüpft. Die weiteren Gene *PAX3*, *SOX10*, *EDNRB* und *EDN3* können sowohl eine autosomal dominante als auch eine rezessive Form des Waardenburg-Syndroms hervorrufen. Die Prävalenz liegt bei 1: 42.000 [84].

## 1.3 NEXT GENERATION SEQUENCING

Aufgrund der hohen molekulargenetischen Heterogenität der Hörstörungen sind Einzelgenanalysen aus verschiedenen Gründen nicht rentabel. Dies ist zum einen auf die Kosten zurückzuführen und auf die Zeit, die es dauern würde, sämtliche mit Hörstörungen assoziierte Gene mit Hilfe einer Sanger-Sequenzierung zu analysieren. Zugleich kann auch nur jedes Gen einzeln betrachtet werden, so dass ein Gesamtbild von allen mit Hörstörung assoziierten Genen nicht erstellt werden kann [85]. Daher wurde in dieser Arbeit mit sogenannten Next Generation Sequencing-Methoden gearbeitet. Durch diese Sequenziermethoden gelingt es mehrere Gene parallel zu analysieren. Hierfür gibt es verschiedene Plattformen, die eine massive Parallelsequenzierung von Genen anbieten. Hierzu zählt zum einen der Roche 454 FLX, dessen Methode auf Pyrosequenzierung basiert und bei welchem die DNA-Präparation über eine Emulsions-PCR erfolgt [30]. Hierbei findet zunächst eine Fragmentierung der DNA und eine Ligation an spezifische Adaptersequenzen statt. Agarosebeads, die Oligonukleotide komplementär zur Zielsequenz aufweisen, können an die Adaptersequenzen binden. Eine anschließende Emulsions-PCR soll DNA-Kopien an der Oberfläche der Beads erzeugen. Dazu werden die Beads in eine Mikrotiterplatte gegeben und mit Nukleotiden, einer DNA-Polymerase und Puffern versorgt. Bei der PCR werden nun Nukleotide in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut. Der Einbau der Nukleotide wird von einer Abspaltung von Pyrophosphat begleitet, die durch das Enzym Luciferase messbar gemacht werden kann [30]. Des Weiteren gibt es die Plattform Applied Biosystems SOLiD Sequencer. Diese basiert ebenfalls auf einer Emulsions-PCR mit magnetischen Beads, aber dem Prinzip der Sequencing by Ligation-Methode. An DNA-Fragmente werden Adapter ligiert. Zusätzlich werden an die Adaptersequenzen Primer komplementär gebunden. An diese binden kurze synthetisch generierte DNA-Fragmente, Oktamere. Diese Oktamere bestehen aus zwei definierten Nukleotiden am Anfang, die durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, und weiteren zufällig synthetisierten Nukleotiden. Wenn die Oktamere an die Zielsequenz komplementär binden, wird das Fluoreszenzsignal des gebunden Primers detektiert. Anschließend wird der Fluoreszenzfarbstoff entfernt, damit ein weiteres passendes Oktamer binden kann. Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt [30].

Durch die Zugabe von verkürzten Primern und der Wiederholung der oben beschriebenen Schritte kann auf diese Weise die Zielsequenz detektiert werden. Eine Vormachtstellung entwickelte die Plattform der Firma Illumina. Die in dieser Arbeit generierten Daten wurden ebenfalls mit den Maschinen (MiSeq und NextSeq500) der Firma Illumina generiert. Ebenso wie bei den anderen Plattformen wird die zu untersuchende DNA in Stücke fragmentiert. Über eine Hybridisierung werden die DNA Fragmente an Oligos gebunden, die mit Biotin

markiert sind. Durch eine Bindung der Oligos and Streptavidin-markierte Beads könnten die gewünschten zu sequenzierenden Fragmente gefiltert werden[86]. Die Sequenzierung erfolgte mittels der Synthesis by Synthesis-Methode nach dem Paired End-Prinzip [87]. An eine FlowCell, wie sie im Folgenden abgebildet ist (Abb. 9), sind tausende von Adapteroligonukleotiden gebunden.

*Abb. 9: FlowCell High Out Put für den NextSeq. In dieser Abbildung ist beispielhaft eine FlowCell dargestellt. Sie besteht aus einer Plastikhalterung, in die die tatsächliche FlowCell mit den vier Lanes eingebunden ist. Die Lanes sind parallel paarig angeordnet, getrennt durch einen Barcode und der individuellen FlowCell-Nummer (Foto Michaela Hofrichter).*

Diese befinden sich in den sogenannten Lanes. Die zu untersuchenden DNA-Fragmente werden mit Adaptoren versehen, die an diese Olgionukleotidsequenzen auf den Lanes binden können. Dafür werden die DNA-Fragmente denaturiert, um Einzelstränge zu generieren. Die gebundenen Fragmente werden über Brücken-Amplifikation auf der FlowCell zur Clustergenerierung vervielfältigt. Anschließend erfolgt eine Synthese der einzelnen Stränge, wobei pro Zyklus, der von der Sequenzierkassette vorgeben wird, ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid eingebaut wird. Dessen Signal wird detektiert und nach Abspaltung des Fluoreszenzfarbstoffes kann im nächsten Zyklus das nächste passende Nukleotid eingebaut werden. Am MiSeq ist jedes Nukleotid mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert[87]. Im Gegensatz dazu sind am NextSeq500 nur zwei Fluoreszenzfarbstoffe im Einsatz. Die Base Thymidin wird mit grün, Cytosin mit rot markiert. Die dritte Base Adenosin zeichnet sich durch die Kombination der beiden Fluoreszenzfarbstoffe aus und die Base Guanin trägt

keinen Fluoreszenzfarbstoff und wird auch als „Dark Base“ bezeichnet. Dies ist sinnvoll für die Verarbeitung der Daten, da mit weniger Signalen gearbeitet wird, jedoch kann dies auch zu Problemen bei der Detektion führen. Wenn die „Dark Base G“ mehrfach hintereinander in einer Sequenz gelesen werden muss, kann es sein, dass der Sequencer ein Fehlen oder eine zusätzliche Base G nicht ermitteln kann. Zu diesem Zeitpunkt kann er nicht unterscheiden, ob das Signal fehlt, weil ein G eingebaut wurde oder fehlt, weil die Base G zu gering vorhanden ist. Insgesamt werden entweder 76 oder 151 Zyklen abhängig von der Sequenzierkassette in das Fragment am Forward-Strang sequenziert. Da die Fragmente aber größer sind, als die maximale Sequenzierstrecke, werden die Fragmente von beiden Seiten ansequenziert (Paired end-Sequenzierung). Dadurch geht Information im Mittelteil des Fragmentes verloren. Dieser kann aber durch die unterschiedlichen Fragmente als auch durch die Information des Abstandes der einzelnen ansequenzierten Fragmente zueinander zum Schluss bioinformatorisch ermittelt werden. Daher wird im weiteren Verlauf der Reverse-Strang für weitere 76 oder 151 Zyklen sequenziert. Die so ermittelten Fluoreszenzsignale werden von einer Kamera aufgenommen und in bcl-Files umgerechnet. Diese können anschließend in fastq-Dateien umgewandelt werden, die zur Datenanalyse verwendet werden können. Die Details zu den Library-Präparationen, sowie die Vorbereitungen zum Sequenzieren sind im Methodenteil detailliert beschrieben [88].

## 1.4 ZIELSETZUNG

Hörstörungen sind eine heterogene Erkrankung, die sowohl durch Umwelteinflüsse als auch genetisch bedingt sein können. Ca. 5% der Weltbevölkerung sind von einer Hörstörung betroffen, welche in bestimmte Kriterien eingeteilt werden kann. Diese beinhalten den Typ, die Frequenz, die Lateralität, die Progressivität, den Schweregrad und zu welchem Zeitpunkt die Hörstörung aufgetreten ist. Von allen Hörstörungen sind 50% genetisch bedingt. Diese lassen sich ebenfalls in syndromale und nicht-syndromale Hörstörungen unterteilen. Es sind über 600 Syndrome bekannt, bei denen Hörstörung eine Rolle spielen. Nicht syndromale Hörstörungen liegen in 70% der Fälle vor, die hinsichtlich ihrer Vererbung weiter eingeteilt werden konnten. Bis jetzt sind über 100 Gene bekannt, die mit einer nicht-syndromalen Hörstörung in Zusammenhang stehen. Dabei wurde ein drittel dieser Gene in den letzten 5 Jahren entdeckt, welches auf die massive parallele Sequenzierung zurückzuführen ist. Daher war das Ziel dieser Arbeit, mit Hilfe dieser Next Generation Sequenzierung Hörstörungsfälle aufzuklären und zu charakterisieren. Hierbei sollte mit einer Trio-Analyse und Probanden-Analyse mittels des TruSight One Panels (Illumina, San Diego), welches 4.813 Gene enthält, am MiSeq (Illumina, San Diego) bzw. am NextSeq500 (Illumina, San Diego) erste Analysen erfolgen. Anschließend sollte im weiteren Verlauf der Arbeit eine Exom-Sequenzierung (Illumina, San Diego) der Proben durchgeführt werden, bei denen mittels der Panel-Analyse keine genetische Ursache identifiziert werden konnte. Insgesamt standen 155 Hörstörungsfälle zur Verfügung, die in zwei unterschiedlichen Kohorten unterteilt werden konnten. Auf diese Weise wurde eine Analyse der ethnischen Unterschiede der Kohorten angestrebt. Mit Hilfe der Ergebnisse anhand aufgeklärter Hörstörungsfällen wurde ein Focus auf die Charakterisierung bekannter Hörstörungen auf Variantenebene gelegt und die Effektivität der Next Generation Sequenzierung bestimmt. Mittels Segregationsanalysen wurde eine Validierung durch Segregationsanalysen durchgeführt, um die Kausalität der einzelnen detektierten Varianten zu klassifizieren. Auf diese Weise sollte eine mögliche Genotyp-Phänotyp Korrelation beobachtet werden und die so gewonnenen Erfahrungen im Rahmen der Diagnostik umgesetzt werden. In Fällen, bei denen die genetische Ursache in bekannten mit Hörstörung assoziierten Genen nicht identifiziert werden konnte, erfolgte die Suche nach Kandidatengenen.

# 2 MATERIALIEN UND METHODEN

Für die Durchführung der vorliegenden Doktorarbeit wurden verschiedene humangenetische Methoden angewandt, die im Detail im folgenden Kapitel erläutert werden. Für die Durchführung dieser Methoden war wiederum eine gewisse Laborausrüstung, Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Puffer und Kits nötig, die auch im folgenden Abschnitt umfassend aufgeführt werden.

## 2.1 ALLGEMEINE LABORAUSRÜSTUNG

In der nachfolgenden Tabelle sind alle Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien aufgelistet, welche als allgemeine Laborausrüstung vorausgesetzt und verwendet wurden.

*Tab. 1: Übersicht aller Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien einer Standardlaborausrüstung.*

| GERÄTE | |
|---|---|
| Gefrierschränke -20°C (versch.) | Liebherr, Biberach an der Riß (Deutschland),<br>AEG, Frankfurt (Deutschland) |
| Kühlschränke 4°C (versch.) | Liebherr, Biberach an der Riß (Deutschland),<br>Robert Bosch GmbH, Gerlingen (Deutschland) |
| Mikrowelle Typ HMG 762B | Robert Bosch GmbH, Gerlingen (Deutschland) |
| Pipetten (versch. Volumina) | LABMATE, Saint Albans (Vereinigtes Königreich)<br>Eppendorf, Hamburg (Deutschland)<br>Brand GmbH und Co KG, Wertheim (Deutschland) |
| Vortex-Genie® 2 | Scientific Industries Inc. , Bohemia (NY, USA) |

| | |
|---|---|
| Vortexer IKA® WORKS | Thermo Scientific, Waltham (MA, USA) |
| Waage Mettler PM460 Delta Range ® | Mettler, Greifensee (Schweiz) |
| Zentrifuge 5424 | Eppendorf, Hamburg (Deutschland) |
| Zentrifuge Heraeus Pico 17 centrifuge | Thermo Scientific, Waltham (MA, USA) |
| Zentrifuge Mikro 20 Typ 2004 | Hettich Lab Technology, Tuttlingen (Deutschland) |
| Zentrifuge Rotilabo® -mini-cenrtifuge „Uni-fuge“ | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland) |
| **VERBRAUCHSMATERIALIEN** | |
| 96-Well-Plate | Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland)<br><br>Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, (Deutschland) |
| BioCentrix 96-Well Plate, ABI style | Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach (Deutschland) |
| Falcon (50er und 15er) | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht (Deutschland) |
| GLS 80® Laborglasflasche (verschied. Größen) | DURAN Group GmbH, Wertheim (Deutschland) |
| Latexhandschuhe | L&R, Ahlen (Deutschland) |
| Multiply®-Pro Biosphere®PCR-Tube | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht (Deutschland) |
| Multiply®-Pro Biosphere®PCR-Tube 8er Streifen | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht (Deutschland) |
| Nitrilhandschuhe | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland) |

| | |
|---|---|
| Pipettenspitzen (mit Filter, versch. Volumina) | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht (Deutschland) |
| Qubit® Assay Tubes | Thermo Fisher Sientific, Waltham (MA, USA) |
| Reagiergefäß SafeSeal | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht (Deutschland) |
| Safe-Lock-Tubes (verschiedene Volumina) | Eppendorf, Hamburg (Deutschland)<br>Qiagen, Hilden (Deutschland) |
| **CHEMIKALIEN** | |
| Ampuwa | Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (Deutschland) |
| Aqua ad injectable | Braun, Kronberg (Deutschland) |
| Flächendesinfektion Terralin | Schülke, Norderstedt (Deutschland) |

### 2.1.2 DNA-AUFREINIGUNG

In Tabelle 2 sind alle Geräte, Chemikalien und Puffer für die DNA-Aufreinigung aufgeführt, sofern sie nicht schon in der allgemeinen Laborausstattung erwähnt wurden, die vor allem für eine DNA-Aufreinigung notwendig sind.

*Tab. 2 Übersicht aller Geräte, Chemikalien und Puffer für die DNA-Aufreinigung.*

| | |
|---|---|
| **GERÄTE** | |
| Combimag | IKA, Staufen im Breisgau (Deutschland) |
| HERAEUS Multifuge 2SR3+ | Thermo Scientific, Waltham, (MA, USA) |
| Messpipetten | Greiner-Bio One, Kremsmünster (Österreich) & Sarstedt AG & Co, Nümbrecht (Deutschland) |
| pH-Meter inolab | WTW, Weilheim (Deutschland) |

| | |
|---|---|
| Pipettenboy | Boeco, Hamburg (Deutschland) |
| Wasserbad | GFL, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel (Deutschland) |
| **CHEMIKALIEN** | |
| 10 M Natronlauge<br>Summenformel: NaOH | AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland) |
| Ammoniumclorid<br>$NH_4Cl$ | Merck, KGaA, Darmstadt (Deutschland) |
| Ethanol absolut zur Analyse<br>Summenformel: $C_2H_5OH$ | Laborhaus Scheller GmbH & Co KG, Euerbach (Deutschland) |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)<br>Summenformel: $C_{10}H_{16}N_2 O_2$ | AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland) |
| Kaliumhydrogencarbonat<br>Summenformel: $KHCO_3$ | AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland) |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland) |
| Nonidet P40 | Sigma-Aldrich, St. Louis (MO, USA) |
| Proteinkinase K | Merck, KGaA, Darmstadt (Deutschland) |
| Salzsäure (HCL) | AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland) |
| SDS-Pellets<br>Summenformel: $C_{12}H_{25}NaO_4S$ | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland) |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS-Puffer)<br>Summenformel: $C_4H_{11}NO_3$ | AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland) |

**PUFFER**

| | |
|---|---|
| 20% SDS-Lösung | 100 g SDS Pellets<br>Mit 500 ml Wasser auffüllen |
| 0,5 M ETDA Puffer | 93,06 g EDTA<br>mit 500 ml Wasser auffüllen<br>mit 10 M NaOH auf pH 8,0 einstellen |
| 1 M TRIS-HCL pH 8 | 10 ml 1 M TRIS-HCl pH 8,0<br>2 ml 0,5 M EDTA<br>mit Wasser auffüllen (100 ml) |
| Gesättigte NaCl-Lösung | 360g NaCl<br>Auf 1 l Wasser |
| Lysispuffer | 8,29 g $NH_4Cl$<br>1,0 g $KHCO_3$<br>0,034 g EDTA<br>mit Wasser auffüllen auf 1 l (pH 7,4) |
| Nonidet P40 Lysispuffer | 2 ml Nonidet<br>18 g NaCl<br>Mit Wasser auffüllen auf 2 l |
| SE-Puffer | 4,39 g NaCl<br>8,41 g EDTA<br>Mit Wasser auffüllen auf 1 l (pH 8,0) |

### 2.1.3 QUALITÄTSSICHERUNG DER DNA

Nachfolgend (Tabelle 3) sind alle Geräte und Reagenzien zur Qualitätssicherung der gewonnenen DNA aufgeführt, sofern sie nicht schon vorher erwähnt wurden.

*Tab. 3: Übersicht aller Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Puffer zur Qualitätssicherung der DNA.*

| | |
|---|---|
| **GERÄTE** | |
| Bioanalyzer Agilent 2100 | Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA) |
| Bioanalyzer Chip Priming Station | Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA) |
| **VERBRAUCHSMATERIALIEN** | |
| High-Sensitivity DNA Chip | Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA) |
| High-Sensitivity Spin Filters | Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA) |
| High-Sensitivity Wash Chip | Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA) |
| Nanodrop | PeQlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland) |
| Qubit® Fluorometer | Invitrogen, Carlsbad (CA, USA) |
| **CHEMIKALIEN** | |
| High-Sensitivity DNA Dye Concentrate | Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA) |
| High-Sensitivity DNA Gel Matrix | Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA) |
| High-Sensitivity DNA Ladder | Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA) |

| | |
|---|---|
| High-Sensitivity DNA Marker 35/10380bp | Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA) |
| Qubit® dsDNA BR & HS Buffer | Life Technologies™, Carlsbad (CA, USA) |
| Qubit® dsDNA BR & HS Reagent 200X | Life Technologies™, Carlsbad (CA, USA) |
| Qubit® dsDNA BR & HS Standard<br>0 ng/µl | Life Technologies™, Carlsbad (CA, USA) |
| Qubit® dsDNA BR & HS Standard<br>10 bzw. 100 ng/µl | Life Technologies™, Carlsbad (CA, USA) |
| **PUFFER** | |
| Arbeitspuffer | Für 2 ml:<br>2x 995 µl BR- bzw. HS-Buffer<br>10 µL REAGENT 200X |

### 2.1.4 PANEL- BZW. EXOM-SEQUENZIERUNG

Anschließend (Tabelle 4) sind alle Geräte und Reagenzien zur Panel- bzw. Exom-Sequenzierung aufgeführt, sofern sie nicht schon vorher erwähnt wurden.

*Tab. 4: Übersicht alle Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und* Puffer *zur TruSight One- bzw. Exom Sequenzierung.*

| **GERÄTE** | |
|---|---|
| Concentrator plus | Eppendorf, Hamburg (Deutschland) |
| Illumina MiSeq | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Illumina NextSeq™ 500 | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |

| | |
|---|---|
| Magnetständer DynaMag™-2 | Life technologies ™, Carlsbad (CA, USA) |
| Thermocycler Biometra® TPersonal | Analytik Jena, Jena (Deutschland) |

**VERBRAUCHSMATERIALIEN**

| | |
|---|---|
| NextSeq 500/550 Buffer Cartridge v2 | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| NextSeq 500/550 High Output FlowCell | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| NextSeq 500/550 Mid Output FlowCell | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| NextSeq 500/550 High Output Reagent Cartridge v2 150 cycles | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| NextSeq 500/550 High Output Reagent Cartridge v2 300 cycles | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| NextSeq 500/550 Mid Output Reagent Cartridge v2 300 cycles | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| TruSight™ One MiSeq V2 Reagent | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| TruSight™ One MiSeq V3 Reagent | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |

**CHEMIKALIEN**

| | |
|---|---|
| 3 M Natriumaceta pH 5,2<br>Summenformel: $C_2H_3NaO_2$ | Sigma-Aldrich, St. Louis (MO, USA) |
| 2 N NaOH | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Natriumhydroxid-Plätzchen | AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland) |
| Amplification Mix | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |

| | |
|---|---|
| Blocker | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Elute Target Buffer 2 | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Elution Buffer (EB) | Quiagen, Hilde (Deutschland) |
| Enrichment Amplification Mix | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Enrichment Elution Buffer 1 | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Enrichment Hybridization Buffer | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Enrichment Wash Solution | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| HT1 Buffer | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Indizes | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| PCR Primer Cocktail | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| PhiX Control v3 | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Resuspension Buffer | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Sample Purification Beads | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Streptavidin Magnetic Beads | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Tagment DNA Buffer | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Tagment DNA Enzyme | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| Tagment Stop Tagment Buffer | Illumina Inc., San Diego (CA, USA)) |
| TruSight One Oligos bzw. Coding Exome Oligos | Illumina Inc., San Diego (CA, USA) |
| **PUFFER** | |

| | |
|---|---|
| 75% EtOH | Für 10 ml:<br>7,5 ml 100% EtOH<br>2,5 ml PCR-Wasser |
| 80% EtOH | Für 10 ml:<br>8 ml 100% EtOH<br>2 ml PCR-Wasser |
| 5 M NaOH | 40 g NaOH<br>200 ml PCR-Wasser |

### 2.1.5 VALIDIERUNG UND SEGREGATIONSANALYSE

In Tabelle 5 sind alle Geräte, Chemikalien und Puffer für die Validierung und die Segregationsanalyse aufgeführt, sofern sie nicht schon vorher erwähnt wurden.

*Tab. 5: Übersicht aller Geräte, Chemikalien und Puffer für die Validierung und die Segregationsanalyse.*

**GERÄTE**

| | |
|---|---|
| DNA Analyzer 3730xl | Applied Biosystems, Foster city (CA, USA) |
| DNA Engine Tetrad2® Peltier Thermal-Cycler | Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules (CA, USA) |
| Gelelektrophorese-Apparatur<br>(Kammer: Model 40-121A) | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland) |
| Genetic Analyzer 3130xl | Applied Biosystems, Foster city (CA, USA) |
| Mastercycler® flexid nexus x2e | Eppendorf, Hamburg (Deutschland) |
| Pipettierroboter Janus | Perkin Elmar, Waltham (MA, USA) |

| | |
|---|---|
| qPCR-Cycler Corbett Rotor-Gene 6000 | Quiagen, Hilden (Deutschland) |
| Spannungsgerät | GIBCO BRL, Life techologies™, Carlsbad (CA, USA) |

**CHEMIKALIEN**

| | |
|---|---|
| 2x SensiMix™ SYBR® No-Rox | BioRad, München (Deutschland) |
| 5x Sequencing Puffer | Applied Biosystems, Foster City (CA, USA) |
| 6x Loading Dye | Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA) |
| 10x Ammonium-Puffer | Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland) |
| Big Dye® Terminator v1.1 Cycle | Applied Biosystems, Foster City (CA, USA) |
| Borsäure<br>Summenformel: $H_3BO_3$ | Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland) |
| Desoxyadenosintriphosphat (dATP) | Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA) |
| Desoxycytosintriphosphat (dCTP) | Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA) |
| Desoxyguanintriphosphat (dGTP) | Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA) |
| Desoxythymidintriphosphat (dTTP) | Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA) |
| ExoSAP-IT® | Affymetrix, Santa Clara (CA, USA) |
| Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA) |
| Gene Ruler DNA Ladder Mix | Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA) |

| | |
|---|---|
| HDGreen™ DNA stain | Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen (Deutschland) |
| Hi-Di™ Formamide<br>Summenformel: $CH_3NO$ | Applied Biosystems, Foster City (CA, USA) |
| Magnesiumsulfat<br>Summenformel: $MgSO_4$ | Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland) |
| MLPA-Kit P163-GJB-WFS1 | MRC Holland, Amsterdam (Holland) |
| MLPA-Kit P461-DIS | MRC Holland, Amsterdam (Holland) |
| PCR 10x Enhancer Solution | Thermo Fisher Scientific, Waltham (MA, USA) |
| pegGOLD Universal Agarose | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland) |
| Platinum® *Taq* DNA Polymerase | Invitrogen, Carlsbad (CA, USA) |
| **PUFFER** | |
| 10 mM Nukleotidstammlösung | 20 µl dATP (c = 100 nmol/ml)<br>20 µl dCTP (c = 100 nmol/ml)<br>20 µl dGTP (c = 100 nmol/ml)<br>20 µl dTTP (c = 100 nmol/ml)<br>120 µl PCR-Wasser |
| 50 mM $MgSO_4$ | 6,02 mg $MgSO_4$ mit PCR-Wasser auf 1 ml auffüllen |
| 1x TBE-Puffer | 200 ml 5x TBE-Puffer<br>800 ml Ampuwa-Wasser auffüllen |

| | |
|---|---|
| 5x TBE-Puffer | 108 g TRIS<br>55 g $H_3BO_3$<br>40 ml 0,5 M EDTA pH 8,3<br>auf 2 l mit Ampuwa-Wasser auffüllen |
| Puffer A | 800 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer<br>240 µl Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)<br>80 µl dATP<br>80 µl dTTP<br>80µl dCTP<br>80 µl dGTP<br>6,096 ml PCR-Wasser |
| Puffer B | 800 µl 10x Ammonium-Puffer<br>1280 µl 10 mM Nukleotidstammlösung<br>329 µl 50 mM $MgSO_4$<br>1600 µl Enhancer<br>2624 µl PCR-Wasser |

### 2.1.6 STR-ANALYSE UND X-INAKTIVIERUNG

In Tabelle 6 sind alle Chemikalien für die Durchführung einer STR-Analyse und X-Inaktivierung aufgeführt, sofern sie nicht schon vorher erwähnt worden sind.

*Tab. 6: Übersicht aller Chemikalien für eine STR-Analyse und einer X-Inaktivierung.*

| CHEMIKALIEN | |
|---|---|
| 10x Buffer C | Promega, Mannheim (Deutschland) |
| HhaI | Promega, Mannheim (Deutschland) |

| | |
|---|---|
| Powerplex5 | Promega, Mannheim (Deutschland) |
| Rox | Life Technologies™, Carlsbad (CA, USA) |

## 2.2 METHODEN

In dem nachfolgenden Abschnitt werden nun alle Methoden vorgestellt, welche innerhalb dieser Dissertation durchgeführt wurden. Für alle untersuchten Proben lag ein gültiges Ethikvotum und die Einverständniserklärung der untersuchten Patienten vor.

### 2.2.1 EXTRAKTION DER DNA

Für alle Untersuchungen wurde DNA aus Vollblut mit EDTA verwendet. Je nachdem, ob es sich um gefrorenes Blut oder frisches Blut handelte, wurde der jeweils passende Lysispuffer und das entsprechende Protokoll verwendet. Alle weiteren Schritte sind bei beiden Verfahren identisch.

Für frisches Blut wurde je nach bereitgestellter Blutmenge die dreifache Menge Lysispuffer zugegeben und gemischt. Das Gemisch wurde für 15 min auf Eis gestellt, bevor es für 10 min bei 2000 U/min und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgenommen und 10 ml Lysispuffer auf das Pellet gegeben. Hierbei wurden die Erythrozyten zerstört, die keinen Zellkern besitzen und folglich auch keine DNA. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 5 ml SE-Puffer resuspendiert. Es wurden 250 µl Proteinkinase K zugegeben und das Gemisch leicht geschüttelt, um den Verdau der Proteine zu starten. Anschließend wurde 250µl 20%ige SDS-Lösung zugegeben und gemischt, um sämtliche Zellmembranen zu zerstören. Über Nacht wurden die DNA-Proben bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Im Unterschied zu Frischblut wird bei gefrorenem Blut ein anderer Lysispuffer, Nonidet P40, verwendet. Auch hier wurde ebenfalls die dreifache Menge an Lysispuffer zum Blut gegeben, das Ganze bei 4°C für 15 min bei 4000 U/min zentrifugiert und anschließend 10 min auf Eis gestellt, bevor es für weitere 15 min bei 4°C und 4000 U/min zentrifugiert wurde. Die restlichen Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Am nächsten Tag wurde die DNA gefällt. Waren weniger als 5 ml EDTA-Blut als Ausgangsmaterial vorhanden, wurde zum Fällen kein weiterer SE-Puffer zugegeben. Ansonsten folgte die Zugabe von 2,5 ml SE-Puffer. Anschließend wurden 2,1 ml gesättigte NaCl-Lösung zum Entsalzen zugegeben. Bei weniger als 5 ml Ausgangsmaterial wurden dagegen nur 1,5 ml gesättigte NaCl-Lösung hinzugefügt. Die Proben wurden für mindestens 10 min bei 55°C im Wasserbad inkubiert, um ausgefallene Salze zu lösen. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 4000 U/min und RT zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden Pasteurpipetten in der Bunsenbrennerflamme zu Häkchen gebogen und DNA-Gefäße akkurat beschriftet. Der Überstand wurde dann in ein neues Falcon überführt, das zweifache

Volumen an 100%igem Ethanol zugefügt und gut gemischt. Die gefällte DNA wurde mit einem Häkchen herausgefischt und in ein angepasstes TE-Puffer-Volumen aufgenommen. War es nicht möglich, die DNA mit einem Häkchen extrahieren zu können, wurden die Proben nochmals abzentrifugiert. Der Ethanol wurde abgenommen und das Pellet getrocknet. Anschließend wurde das nicht sichtbare Pellet in TE-Puffer aufgenommen und in ein neues Tube überführt.

### 2.2.3 QUALITÄTSSICHERUNG DER DNA

Sowohl für die quantitative Realtime-PCR als auch für die Panel- bzw. Exom-Sequenzierungen muss die DNA eine bestimmte Konzentration und Qualität aufweisen. So darf sie nicht degradiert sein und sollte eine minimale Konzentration von 5 ng/µl für die Panel- und Exome-Sequenzierung besitzen. Zusätzlich fallen während der Exom-Sequenzierung Qualitätsprüfungen an, die über die Messung der DNA-Konzentration und dem Nachweis einer Fragmentierung erfolgt. Dafür stehen verschieden Messmöglichkeiten zur Verfügung.

#### 2.2.3.1 NANODROP-MESSUNG

Zur Einschätzung der DNA-Konzentration wurden die Proben am Nanodrop gemessen. Dazu wurde 1 µl der Lösung, in der die DNA gelöst ist, also TE-Puffer, als Vergleichswert gemessen und anschließend 1 µl aller der zu messenden DNA-Proben. Mit dem Nanodrop konnte auf diese Weise die Qualität der DNA hinsichtlich Verunreinigungen überprüft werden und die Konzentration gemessen werden.

#### 2.2.3.2 QUBIT-MESSUNG

Da die Nanodrop-Messung für die Einstellungen auf eine bestimmte DNA-Konzentration zu ungenau ist, wurde zusätzlich eine Messung am Qubit™ durchgeführt. Für die Qubit-Messung wurde entweder das Broad Range (BR)-Kit oder das HighSensitivity (HS)-Kit verwendet, je nachdem, wie hoch die zu messende DNA konzentriert war. Während das BR-Kit vor allem für DNA-Konzentrationen ab 5 ng/µl zu verwenden ist, kann das HS-Kit für Konzentrationen von 1–50 ng/µl herangezogen werden.

Das Prozedere der Messung wurde für beide Kits identisch durchgeführt. Es wurde ein Arbeitspuffer hergestellt, der das notwendige fluoreszierende Reagenz enthielt. Dazu wurden für zehn Messansätze 1.990 µl Puffer mit 10 µl Reagent 200x vermischt, das Gemisch gevortext und dann kurz anzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Herstellung der Standards. Hierzu wurden jeweils 10 µl der Standards (0 und 10 ng/µl (HS) bzw. 0 und 100 ng/µl (BR))

entnommen und mit je 190 µl Arbeitspuffer vermischt. Zur Probenmessung wurden von jeder Probe 2 µl DNA entnommen und mit 198 µl Arbeitspuffer vermischt. Alle Proben wurden gevortext und für 3 min bei RT ohne Licht inkubiert. Anschließend wurden die Proben nochmal gevortext und am Qubit® 2.0 Fluorometer mit dem entsprechenden Programm für HS oder BR gemessen. Zur Kalibrierung wurde zuerst der Standard 1 und dann der Standard 2 gemessen, anschließend daran die Proben. Um stabile Messergebnisse zu erhalten, wurden die DNA-Proben im Rahmen der Panel- bzw. Exom-Sequenzierungen im doppelten Ansatz gemessen. Während der Messung wurde zudem der Standard 10 ng/µl bzw. 100 ng/µl mehrmals gemessen, um die Stabilität der Messung zu bestätigen. Anschließend wurde mit der folgenden Formel die DNA auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt:

$$\mathbf{c1}\ (\text{Konzentration Probe 1}) \times \mathbf{v1}\ (\text{Volumen Probe 1}) = \mathbf{c2}\ (\text{Konzentration Probe 2}) \times \mathbf{v2}\ (\text{Volumen Probe 2})$$

#### 2.2.3.3 BIOANALYZER-MESSUNG

Zur Qualitätskontrolle während der Panel- bzw. Exom-Library Präparation wurde zur Fragment- und Konzentrationsmessung eine Bioanalyzer-Untersuchung durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine hochsensitive Gelelektrophorese. Sie kann sowohl für DNA, RNA als auch für Proteinmessungen verwendet werden. Dafür werden unterschiedliche Kits von der Firma Agilent (Santa Clara, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Für die Panel- bzw. Exom-Library und Sequenzierungsvorbereitung wurde das Protokoll des DNA HighSensivity (HS)-Kits herangezogen, welches für DNA-Konzentrationen im Bereich von 5–500 pg/µl und einem Fragmentgrößenbereich von 50–7.000 bp geeignet ist. Das HS-Kit für den Bioanalyzer wurde für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Herstellung des Gel-Dye-Mixes. Dafür wurden 15 µl des HighSensitivity DNA Dye-Konzentrats zu der DNA Gel-Matrix gegeben. Der Mix wurde gevortext und auf einen Spin-Filter transferiert. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 6.000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge. Der Gel-Dye-Mix wurde bei 4°C gelagert und konnte so für mehrere Anwendungen genutzt werden. Für die Messung am Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA)) wurde ein Chip in die Chip Priming-Station gelegt. Die Chip Priming-Station besteht aus einer Einlage für den Chip, die mit einer Klappe verschlossen werden kann. An der Klappe ist eine Spritze angebracht, mit der in den Innenraum Luft gepresst werden kann. Die Spritze ist in einen Clip eingespannt, der dafür sorgt, dass ein stetiger Luftdruck aufgebaut werden kann. Je nachdem, welche Justierung an dem Clip eingestellt wird, können unterschiedliche Drücke erzeugt werden. Zur weiteren Präparation wurden 9 µl des Gel-Dye-Mixes in ein schwarz markiertes Well des Chips pipettiert. Der Spritzenstempel wurde auf 1 ml eingestellt, bevor die Chip Priming-Station geschlossen

wurde. Der Spritzenstempel wurde heruntergedrückt, bis er in der Vorrichtung des Clips einrastete. Durch den Luftdruck wurde der Gel Dye-Mix im schwarz markierten Well zusammengedrückt. Je nach Justierung kam es dadurch zu einer unterschiedlichen Dichte des Gels. Dieser Zustand wurde für 60 s beibehalten. Dann wurde der Stempel aus der Vorrichtung ausgeklinkt und 5 s gewartet, während sich der Spritzenstempel in die Ausgangssituation zurückbewegte und anschließend der Spritzenstempel in die Ausgangssituation gebracht wurde. Die Priming-Station wurde geöffnet und die restlichen Wells im Chip, die mit einem G bezeichnet sind, wurden mit 9 µl des Gel Dye-Mix befüllt. Die restlichen Wells 1–12 wurden mit 5 µl eines Markers gefüllt. Dabei handelt es sich eigentlich um zwei Marker-Fragmente, die den unteren und den oberen Messbereich markieren. Der Marker sorgt dafür, dass im späteren Verlauf die Daten genormt und miteinander verglichen werden können. In das 12. Well wurde 1 µl Marker gegeben, der ähnlich zur Gelelektrophorese unterschiedliche Fragementgrößen vorgibt. In die restlichen Wells 1–11 wurden die Proben pipettiert. Der Chip wurde für 1 min gevortext. Anschließend wurde der Chip in den Bioanalyzer gestellt. Im Computer wurde das Programm 2100 Expert software (Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA)) aufgerufen und darin eingetragen, in welchem Well sich welche Probe befand. Dann wurde das Programm gestartet und die Bioanalyzer-Messung durchgeführt. Nach erfolgter Messung wurde der Chip verworfen und ein Waschchip mit 350 µl $H_2O$ gefüllt. Dieser Waschchip wurde für 10 s in die Maschine gestellt. Dann wurde er herausgenommen und die Maschine bzw. die Pins wurden ebenfalls für 10 s getrocknet.

#### 2.2.3.4 KLINISCHE PANEL- BZW. EXOM-SEQUENZIERUNG

Um eine Patienten-DNA gezielt mittels eines Panels oder Exomanreicherung sequenzieren zu können, mussten mehrere Laborschritte durchgeführt werden. Zuerst wurden die Proben für die Library-Präparation vorbereitet. Anschließend wurde eine Library hergestellt. Diese diente dazu, die gewünschten kodierenden Bereiche der DNA herauszufiltern. Die Library-Präparation erfolgte in mehreren Schritten. Zuerst wurden Fragmente generiert. Die Fragmentierung kann hierbei durch Ultrasonifizierung mit einem zum Beispiel M220 Focused-ultrasonicator (Covaris, Inc, Woburn, MA, USA) oder enzymbasiert erfolgen. In dieser Arbeit wurde eine enzymbasierte Fragmentierung, eine Tagmentierung, durchgeführt. Hierbei wurden zusätzlich Adaptorsequenzen an die Fragmente angefügt. Die einzelnen Fragmente wurden außerdem mit Indizes versehen, die an die Adaptorsequenzen anbinden konnten. Auf diese Weise konnte jedes Fragment einem Patienten zugeordnet werden. Zugleich wurden Indizes an die Fragmente angebunden, die an FlowCell binden können. Danach wurden die Patientenproben gepoolt. Für den MiSeq waren es bis zu drei Proben, für

den NextSeq bis zu 12 Proben. Mit der Hybridisierung erfolgte die Filterung der gewünschten Fragmente. Dafür banden von Illumina bereitgestellte DNA-Oligos an die Fragmente. Diese Oligos wurden mit Biotin markiert. Durch diese Bindung wurden über Streptavidin markierte magnetische Beads die Fragmente herausgefiltert, die sequenziert werden sollten. Diese Library wurde abschließend am MiSeq bzw. NextSeq sequenziert. Im Detail sind die einzelnen Schritte nachfolgend notiert und in der folgenden Abbildung wird ein Überblick über die einzelnen Schritte gegeben (Abb.10).

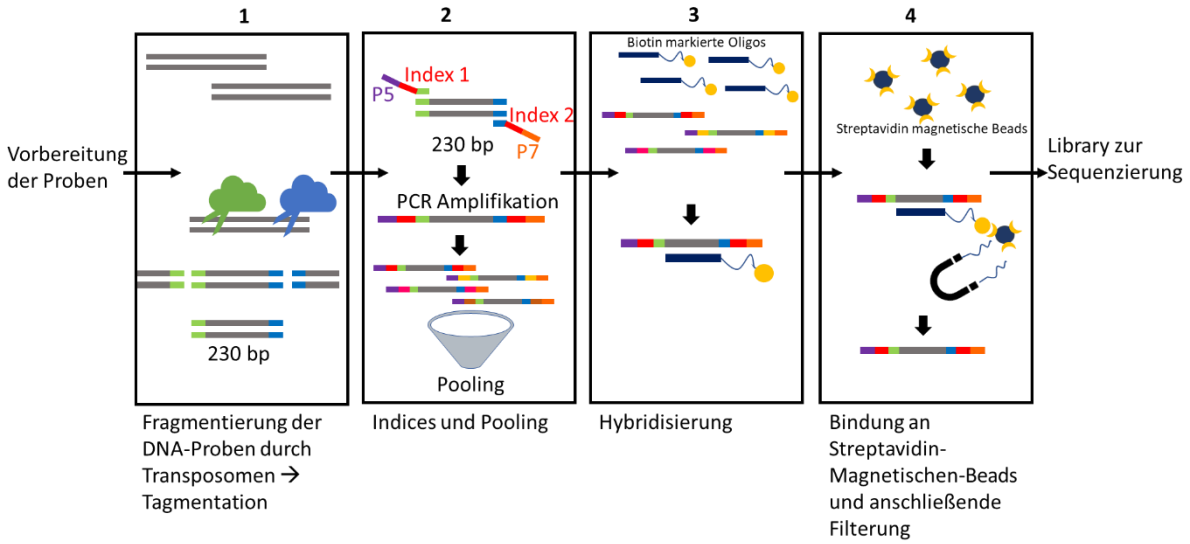



*Abb. 10: Darstellung der einzelnen Schritte zur Library Präparation im Überblick. Zuerst erfolgt eine Vorbereitung der Proben. Die DNA-Proben werden mit Hilfe von Transposomen fragmentiert. Dabei werden Adaptersequenzen angefügt (1). Danach werden Indizes angefügt und die Proben gepoolt (2). Die Library wird mit Biotin markierten Oligos hybridisiert (3). Anschließend erfolgt die Filterung über Streptavidin magnetischen Beads (4). Zum Schluss erfolgt die Sequenzierung der Library (Abbildung erstellt nach [86]).*

### 2.2.4 Vorbereitung der Proben

Um zu vermeiden, dass EDTA die Tagmentation stören könnte, wurden alle Proben vorsorglich präzipitiert und in EB-Puffer aufgenommen. Weiterhin wurde von jeder Probe eine Verdünnung erstellt. Bei hoher DNA-Konzentration wurde eine 1:10-Verdünnung vorgenommen, bei schlechter DNA-Qualität entsprechend niedrigere Verdünnungen. Das Volumen wurde dementsprechend angepasst. Bei 100 µl Ausgangsvolumen wurden 10 µl 3 M NaAcetat pH 5,2 verwendet, um anschließend die DNA mit 250 µl EtOH auszufällen. Danach wurden die Proben für 15 min bei höchster Geschwindigkeit (13.000 rpm) mit der

Tischzentrifuge Heraeus Pico 17 Centrifuge (ThermaScientific, Waltham (MA, USA)) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Dann wurden 500 µl 75%iger EtOH dazugegeben und für weitere 5 min zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand entfernt und für 2 min zentrifugiert. Der noch übrige gebliebene Überstand wurde abermals entfernt. Die DNA wurde an der Luft getrocknet, bis alles EtOH verdampft war. Nun wurde die DNA in 100 µl EB-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde gemessen und auf 5 ng/µl eingestellt.

#### 2.2.4.1 TRUSIGHT EXOME/ONE-PANEL

Für das TruSight Exome- bzw. TruSight One-Panel wurde eine enzymbasierte Fragmentierung der DNA ausgeführt. Protokollgemäß [89] wurden hierfür 25 µl Tagment DNA Buffer und 15 µl Tagment DNA Enzym zu 10 µl DNA-Probe gegeben und für 10 min bei 58°C tagmentiert. Anschließend wurden 15 µl Stop Tagment Buffer zum Abstoppen der Reaktion zugegeben und für 4 min bei RT inkubiert. Während der Tagmentation wurden zudem Adaptorsequenzen angefügt, an denen wiederum die Indixes binden konnten. Die tagmentierte DNA wurde zur weiteren Verwendung aufgereinigt. Dazu wurden 65 µl Sample Purification Beads zur Lösung gegeben, für 8 min bei RT inkubiert und kurz abzentrifugiert. Die Proben wurden für 2 min auf einen Magnetständer gestellt, bis sich die Beads an den Magnetständer abgesetzt hatten und die Lösung klar wurde. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, wobei die Beads dabei nicht berührt werden durften. Die an die Beads gebundene DNA wurde mit einer 80%igen EtOH-Lösung gewaschen. Dazu wurden 200 µl 80%iger EtOH zugegeben, 30 s gewartet und abschließend das EtOH wieder entfernt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Während dieser Waschschritte blieben die Proben auf dem Magnetständer. Danach wurde zum Verdampfen des restlichen EtOHs 10 min bei RT gewartet, bis die Beads trocken waren und Risse im Pellet aufwiesen. Darauffolgend wurden die Proben vom Magnetständer abgenommen und 22,5 µl Resuspensionspuffer zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei RT wurde die Probe auf den Magnetständer zurückgestellt und nach weiteren 2 min 20 µl klare Lösung abgenommen. Da dieser Schritt der Fragmentierung essenziell ist für das weitere Vorgehen, wurde die erfolgreiche Fragmentierung durch eine Bioanalyzer-Messung überprüft. In der folgenden Abbildung 11 ist dies ersichtlich.

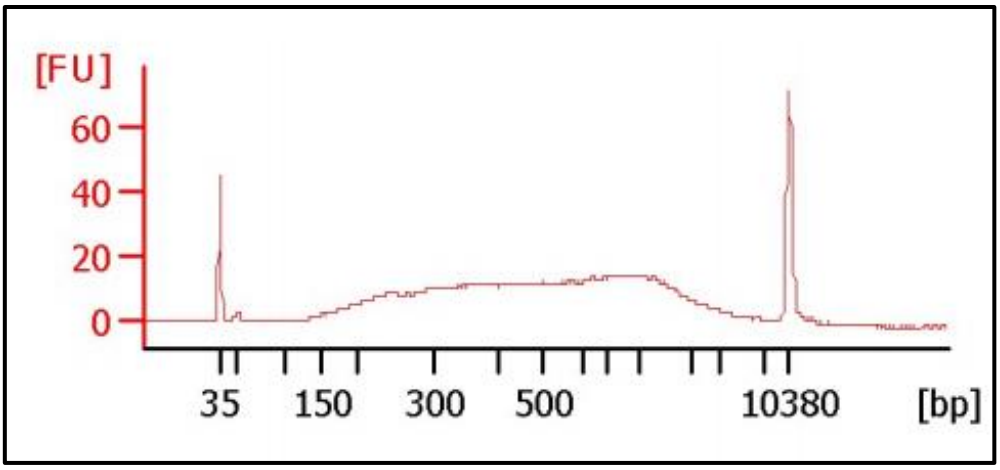



*Abb. 11: Qualitätscheck der tagmentierten DNA mittels einer Bioanalyzer-Messung. Auf der X-Achse ist die Größe der Fragmente in bp angegeben, während auf der Y-Achse die Intensität der Fluoreszenz aufgeführt ist. Der Peak bei 35 bp ist der untere Marker, während der Peak bei 10.380 bp den oberen Marker darstellt. Die Kurve zeigt mehrere Fragmente mit Größen von ca. 150–1.000 bp, welche erwartungsgemäß war (Abbildung generiert mit Hilfe 2100 Expert Software Agilent, (Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA))*

Nach dem ersten Qualitätscheck wurde eine PCR durchgeführt, bei der für jeden einzelnen Patienten ein individueller Index angefügt wurde. Dazu wurde jeweils 5 µl eines sogenannten N-Indizes und 5 µl eine E-Indizes als Primer zu jeder Probe gegeben. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden mehrere unterschiedliche Kombinationen aus Indizes, die von Illumina (Illumina Inc., San Diego (CA, USA)) innerhalb der verschiedenen Anreicherungen zur Verfügung gestellt worden sind, verwendet. Zusätzlich wurden 20 µl Amplifcation Mix zu jeder Probe pipettiert. Dies wurde gemischt, abzentrifugiert und das folgende Cycler-Programm gestartet.

1. 72°C für 3 min
2. 98°C für 10 s
3. 60°C für 30 s
4. 72°C für 30 s → Schritte 2–4 wurden 10x wiederholt
5. 72°C für 5 min
6. Inkubation bei 10°C

Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe von Ethanol aufgereinigt. Der Aufreinigungsablauf entsprach dem der Aufreinigung nach der Tagmentation. Die Menge der Beads war natürlich dem Volumen der PCR-Lösung angepasst. So wurden in diesem Fall 90 µl Sample Purification Beads verwendet und bei der Resuspension 27,5 µl Resuspensionspuffer genutzt.

Das PCR-Produkt wurde zur weiteren Verwendung und zur Kontrolle der Qualität mit Hilfe einer Qubit-Messung kontrolliert. Danach wurden die Proben gepoolt. Dafür wurde berechnet, wieviel µl von jeder Probe benötigt wurde, um 500 ng DNA einzusetzen. Hierbei wurden eine möglichst genaue Messung und Berechnung angestrebt, um zu garantieren, dass von jeder Probe gleich viel DNA-Menge eingebracht wurde. Abschließend wurde die entsprechende Menge von jeder Probe in ein Eppendorf-Gefäß überführt und damit gepoolt. Waren weniger als 40 µl Volumen vorhanden, wurde mit Hilfe eines Resuspensionpuffers das erforderliche Volumen ausgeglichen. Bei einem Volumen von mehr als 40 µl, wurde die gepoolte Probe, die sogenannte Library, mit Hilfe eines Konzentrators verdampft. Dann erfolgte eine Zugabe von 50 µl Enrichment Hybridization Puffer und 10 µl der TruSight One Oligos. Danach erfolgte eine Hybridisierung bei 95°C für 10 min. Anschließend wurde in 18 Zyklen die Temperatur jeweils um 2°C erniedrigt. Dabei wurde jede Temperatur für 1 min gehalten. Die Ausgangstemperatur war 94°C. Wenn die Temperatur 58°C erreicht hatte, wurde diese über Nacht gehalten. Während der Hybridisierung wurden Biotin-markierte Sonden über DNA-DNA-Bindung an die Fragmente der einzelnen Proben gebunden. Am nächsten Tag wurden die an die Sonden gebundene Fragmente mit Hilfe von Streptavidin-markierten magnetischen Beads gefiltert. Dazu wurden 250 µl Streptavidin Magnetic Beads zu der Library geben und für 25 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf den Magnetständer gestellt und gewartet, bis die Lösung klar wurde. Dann wurde der Überstand abgenommen und 200 µl Waschlösung, die Enrichment Wash Solution, zugegeben. Die Lösung wurde anschließend für 30 min bei 50°C im Cycler inkubiert. Sobald die Zeit abgelaufen war, wurde die Probe sofort auf den Magnetständer gestellt und der Überstand abgenommen. Der Waschschritt wurde wiederholt. Danach wurde die Library in 23,5 µl Elutionspuffer aufgenommen. Dieser wird aus 28,5 µl Enrichment Elution Buffer 1 und 1,5 µl 2 N NaOH hergestellt. Daraufhin wurde die Lösung mit den Beads für 2 min inkubiert, auf den Magnetständer gestellt und 21 µl des Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Zusätzlich wurde ein Stopppuffer zugegeben. Dann erfolgte eine 2. Hybridisierung: Es wurden noch 15 µl Resuspensionspuffer zugegeben und weiterhin wie beim ersten Mal 50 µl Enrichment Hybridisation Puffer und 10 µl TruSight One Sonden. Die weiteren Schritte waren identisch zur ersten Hybridisierung. Am nächsten Tag erfolgte eine zweite Filterung der Fragmente, das Capturing, welches ebenfalls identisch wie oben beschrieben ablief. Des Weiteren wurde eine Aufreinigung mit Sample Purification Beads durchgeführt, wie sie schon nach der Tagmentation und der 1. PCR beschrieben wurde. Abschließend erfolgte eine 2. PCR-Amplifikation. Dafür wurden 5 µl eines Primercocktails und 20 µl eines Enchriment Amplification Mix zur Library gegeben, die Probe in den Cycler gestellt und im Cycler folgendes Programm gestartet:

1. 98°C für 30 s
2. 98°C für 10 s
3. 60°C für 30 s
4. 72°C für 30 s →Schritte 2–4 wurden 10x wiederholt
5. 72°C für 5 min
6. Inkubation bei 10°C

Zum Schluss erfolgte wiederum eine Aufreinigung der Probe mittels Sample Purification Beads, wie sie schon im Vorfeld beschrieben wurde.

Zur Kontrolle der Library-Qualität und Abklärung der Fragmentgrößen wurde eine Bioanalyzer-Messung durchgeführt. Ein Beispiel hierzu findet sich in der anschließenden Abbildung 12.

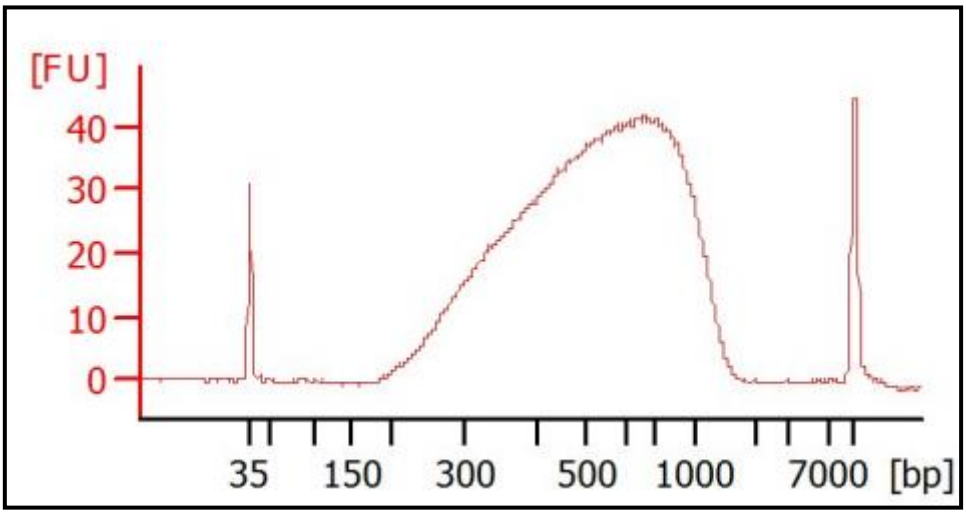



*Abb. 12: Qualitätscheck der gepoolten Library mittels einer Bioanalyzer-Messung. Auf der X-Achse ist die Größe der Fragmente in bp angegeben, während auf der Y-Achse die Intensität der Fluoreszenz aufgeführt ist. Der Peak bei 35 bp ist der untere Marker, während der Peak bei 10.380 bp den oberen Marker anzeigt. Es zeigt sich eine Gauß'sche Kurve deren durchschnittliche Fragmentgröße bei 578 bp lag (Kurvenspitze). Dieser Wert wurde für die Kalkulation zur Bestimmung der Molarität genutzt. Damit liegt diese Kurve in der zu erwarteten Spektrum, welches von Illumina angegeben worden ist. (Abbildung generiert mit Hilfe 2100 Expert Software Agilent, (Agilent Technologies, Santa Clara (CA, USA)).*

Die Präparation der Proben für die Exom-Sequenzierung mit dem Nextera rapid enrichment Kit war identisch zu der Anreicherung mit dem TruSight One Kit [90]. Es wurden nur unterschiedliche Sonden (Coding exome Oligos) verwendet. Deshalb wird dies hier nicht

mehr im Detail beschrieben. Während der Dissertationszeit musste allerdings aufgrund eines Produktwechsels auf ein weiteres Kit umgestiegen werden. Dies war im Anreicherungsprozess sehr ähnlich zum schon beschriebenen Vorläuferkit [91]. Daher werden hier nur nochmal die Unterschiede des neuen Protokolls dargestellt. Die größten Änderungen gab es bei der Tagmentation. Um vor allem kleinere Fragmente zur erhalten, wurde die Tagmentation im Cycler bei 60°C für 5 min inkubiert. Bei der Aufreinigung der Tagmentation wurde ebenfalls ein weiterer Schritt eingeführt, um kleine Fragmente zu begünstigen. Dazu wurde 52 µl Sample Purification Beads zu jeder Probe gegeben und für 5 min inkubiert. Dann wurde die Proben auf den Magnetständer gestellt, bis die Lösung klar war. Von diesem Überstand wurden 98 µl in ein anderes Gefäß überführt, 137 µl Sample Purification Beads zugegeben und für 5 min inkubiert. Abgesehen von dieser Abweichung verlief die Tagmentation und die Aufreinigung wie vorher beschrieben. Eine weitere große Veränderung im Protokoll war der Ablauf der Hybridisierung: Es wurde 30 µl der Library als Ausgangsmaterial verwendet. Zu dieser wurden 10 µl Blocker und 10 µl der Coding Exome Oligos gegeben. 125µl der Sample Purification Beads folgten und es wurde ein Aufreinigungsschritt mit EtOH durchgeführt. Zur Elution wurden 8,5 µl Enrichment Hybridization Buffer 1 verwendet. Diese wurden auf die Beads gegeben, für 2 min inkubiert und für 2 min auf den Magnetständer gestellt. 7,5 µl des Überstandes wurden überführt, mit 2,5 µl Enrichment Hybridzation Buffer 2 gemischt und anschließend in den Cycler gestellt. Hierbei unterschied sich ebenfalls das Hybridisierungsprogramm: Die Proben wurden bei 95°C für 10 min inkubiert und für weitere 30 min bei 58°C gehalten. Die Waschung erfolgte wie gewohnt. Diese Art der Hybridisierung wurde ebenfalls zweimal durchgeführt.

#### 2.2.4.2 SEQUENZIERUNG AM MISEQ BZW. AM NEXTSEQ

Sobald die Library fertig vorbereitet war, konnte sie am MiSeq oder am NextSeq sequenziert werden. Für beide Sequenzierungen mussten aber zunächst die Library auf eine Konzentration von 4 nM eingestellt werden. Dafür wiederum wurden die Fragmentlängen und die Konzentrationen am Bioanalyzer am Qubit-Fluorometer bestimmt. Für die Berechnung wurde folgende Formel herangezogen:

$$\frac{\boldsymbol{Konzentration}\ (\frac{\boldsymbol{ng}}{\boldsymbol{\mu l}})}{\left(\boldsymbol{660}\frac{\boldsymbol{g}}{\boldsymbol{mol}} \times \boldsymbol{Fragmentl\ddot{a}nge}[\textbf{durchschnittl. Library Gr\ddot{o}\ss e}]\right)} \times \boldsymbol{10^6} = \boldsymbol{Konzentration\ in\ nM}$$

Um die Libraries am MiSeq und am NextSeq sequenzieren zu können, muss die DNA mit einer 0,2 N NaOH-Lösung denaturiert werden. Dafür wurden 40 µl einer 5 N NaOH-Lösung mit 960 µl Wasser verdünnt.

Ab hier unterscheidet sich das weitere Verfahren zum Sequenzieren der Proben am MiSequ und NextSeq. Daher werden die Abläufe nun nacheinander beschrieben.

Für die Sequenzierung am MiSeq wurden 40 pM denaturierte Library benötigt. Hierzu wurden zunächst 10 µl der 4 nM Library mit 10 µl 0,2 N NaOH-Lösung verdünnt. Die Proben wurden gevortext und für 5 min inkubiert, um die Doppelstränge der DNA zu trennen. Es erfolgte eine Zugabe von 980 µl HT1 Puffer. 12,5 pM einer Library wurden jeweils am MiSeq sequenziert. Daher mussten die 40 pM Library nochmals verdünnt werden. Es wurde zudem auch PhiX zugegeben, eine bekannte Phagen Library, die die Qualität der Sequenzierung verbessern sollte. Dafür wurden 312,5 µl 40 pM Library, 62,5 µl 20 pM Library PhiX und 625 µl HT1 Puffer gemischt[92]. Von diesen so vorbereiteten Library wurden 600 µl in eine für den MiSeq vorgesehene Kassette geladen. Diese wurde dann mit einer neuen FlowCell und einem neuen Puffer in den MiSeq gestellt. Abbildung 13 zeigt den MiSeq.

*Abb. 13: MiSeq von Illumina (Illumina, San Diego, USA) (Foto: Michaela Hofrichter).*

Für die Sequenzierung am NextSeq wurde 20 pM denaturierte Library benötigt. Hierzu wurden 5 µl der 4 nM Library mit 5 µl der 0,2 N NaOH-Lösung gemischt und gevortext. Zusätzlich wurden 5 µl EB Puffer und 985 µl HT1 Puffer zugegeben. Dadurch entstand eine 20 pM Library. Zu dieser wurde anteilig mit 1% eine 20 pM Library PhiX zugegeben. Dazu

wurde 10 µl der ursprünglichen Library herausgenommen und durch 10 µl 20 pM Library PhiX ersetzt. Dann wurde eine 1,3 pM bzw. 1,5 pM Library hergestellt. Dafür wurden die 20 pM Libraries entsprechend mit HT1-Puffer auf ein finales Endvolumen von 1,3 ml verdünnt[93]. Die Library wurde vollständig in die Sequenzierkassette entsprechend der Anweisung geladen und diese mit der FlowCell und dem Puffer in den NextSeq gestellt, der dargestellt ist (Abb. 14).

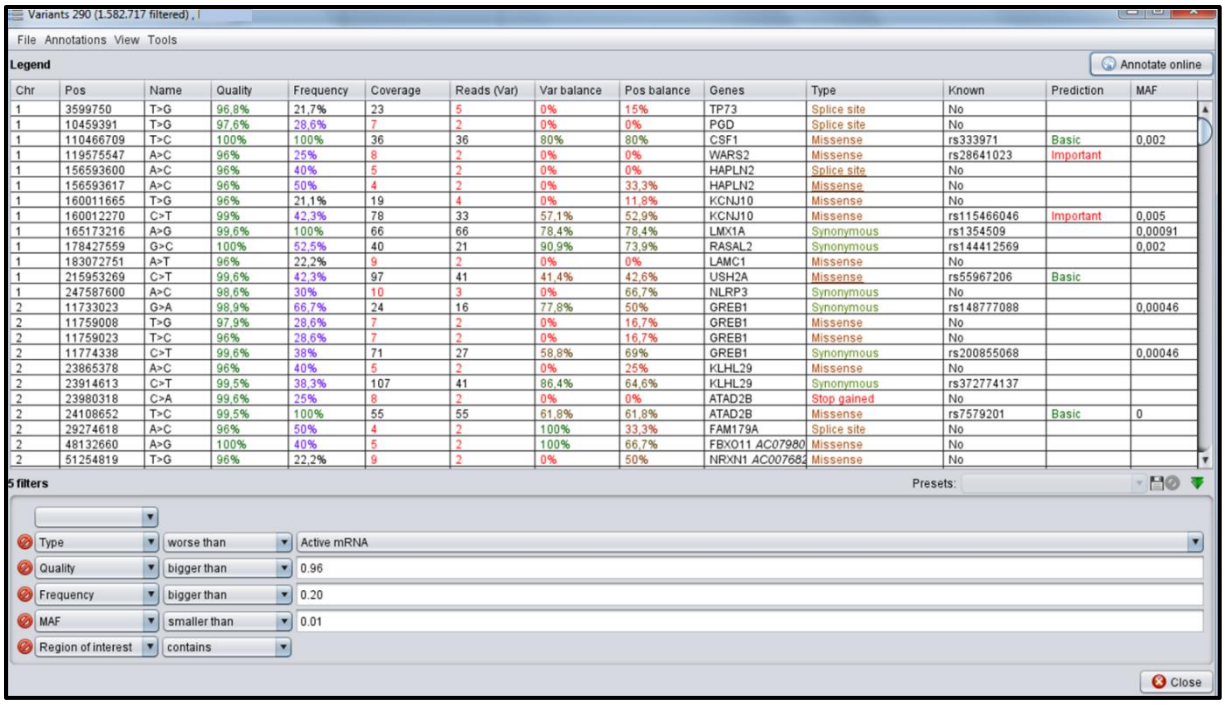
*Abb. 14: NextSeq500 von Illumina (Illumina, San Diego, USA) (Foto: Michaela Hofrichter).*

#### 2.2.4.3 DATENANALYSE

Die Datenanalyse erfolgte in Abhängigkeit von der Sequenzierplattform. Am MiSeq konnte mit Hilfe des SampleSheets, das mit dem Illumina Experiment Manager (Illumina, San Diego, USA) erstellt wurde, und durch das Hinterlegen eines Referenzgenoms, Fastq-Dateien erstellt werden. Diese Dateien enthielten schon die Informationen der genomischen Positionen. Anschließend konnten aus den Fastq-Dateien bam-Dateien mit Hilfe des Programms GensearchNGS (Phenosystems, Wollonia, Belgien) erstellt werden. Das Programm GensearchNGS bietet die Möglichkeit Varianten zu finden und zu klassifizieren, Filtereinstellungen vorzunehmen, die Qualität der Reads zu bewerten sowie die Abdeckung und die Allelhäufigkeit zu filtern. Zudem konnte mit einer Minor Allel-Frequenz von <1% gefiltert werden. Die Minor Allel-Frequenz gibt die Häufigkeit von Varianten in der Bevölkerung an. Varianten, die häufiger als 1% innerhalb der Bevölkerung auftreten, werden

als Single Nukleotid Polymorphismus (SNP) angesehen und nicht als Mutation eingestuft [30].

Bei der NextSeq-Plattform wurden zunächst bcl-Files durch das System generiert, die in Fastq-Files konvertiert werden mussten. Diese Konvertierung erfolgte am Core Unit Systemmedizin der Universität Würzburg. Ebenfalls wurde hierfür ein SampleSheet erstellt, das aber keine Referenzgenomangaben enthielt. Die Fastq-Dateien wurden mit Hilfe der Bioinformatiker Herrn Dr. Dr. Marcus Dittrich und Herrn Dr. Tobias Müller in bam-Dateien umgewandelt, die in das Programm GensearchNGS (PhenoSystems, Wallonia, Belgien) geladen werden konnten. Dieses Programm bildete das Haupttool zur Analyse aller mit Next Generation Sequencing erzeugten Daten. Im Laufe dieser Dissertation hat sich dieses Programm ebenfalls weiterentwickelt und viele neue Möglichkeiten zur erweiterten Analyse geboten. Dies involvierte verbesserte Filtermöglichkeiten, verbesserte Abdeckungsanalysen und mehrere Verbindungen zu Datenbanken. Nachdem die Daten die einzelnen Daten in das Programm geladen wurden, konnten anschließend mögliche Varianten ermittelt werden. Als humanes Referenzgenom diente das Genombild CRCh37/hg19. Pro Patient waren es zunächst mehrere 1.000 Varianten. Viele konnten aufgrund schlechter Qualität aussortiert werden. Jedoch blieben dabei immer noch mehrere 1.000 Varianten übrig. Deshalb wurden diese in erster Linie mit der Allelfrequenz gefiltert. Dieser Filter lag bei >20% und bedeutete, dass das alternative Allel in mehr als 20% aller Reads vorhanden sein musste. Des Weiteren wurde die MAF auf <1% gesetzt. Es wird davon ausgegangen, dass bei einem Auftreten einer Variante in mehr als 1% in der Bevölkerung, es sich um keine seltene Variante handeln kann, die für einen Phänotyp kausal sein kann[30]. Außerdem wurden alle intronischen Varianten oder Varianten, die keine regulatorischen Informationen enthalten, entfernt. Im weiteren Verlauf wurden die Hörstörungsgene fokussiert. Ein Beispiel für diese Filterung ist aus der nachfolgenden Abbildung ersichtlich.



Variants 290 (1.582.717 filtered) , |

File Annotations View Tools

Legend

Annotate online

| Chr | Pos | Name | Quality | Frequency | Coverage | Reads (Var) | Var balance | Pos balance | Genes | Type | Known | Prediction | MAF |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3599750 | T>G | 96,8% | 21,7% | 23 | 5 | 0% | 15% | TP73 | Splice site | No | | |
| 1 | 10459391 | T>G | 97,6% | 28,6% | 7 | 2 | 0% | 0% | PGD | Splice site | No | | |
| 1 | 110466709 | T>C | 100% | 100% | 36 | 36 | 80% | 80% | CSF1 | Missense | rs333971 | Basic | 0,002 |
| 1 | 119575547 | A>C | 96% | 25% | 8 | 2 | 0% | 0% | WARS2 | Missense | rs28641023 | Important | |
| 1 | 156593600 | A>C | 96% | 40% | 5 | 2 | 0% | 0% | HAPLN2 | Splice site | No | | |
| 1 | 156593617 | A>C | 96% | 50% | 4 | 2 | 0% | 33,3% | HAPLN2 | Missense | No | | |
| 1 | 160011665 | T>G | 96% | 21,1% | 19 | 4 | 0% | 11,8% | KCNJ10 | Missense | No | | |
| 1 | 160012270 | C>T | 99% | 42,3% | 78 | 33 | 57,1% | 52,9% | KCNJ10 | Missense | rs115466046 | Important | 0,005 |
| 1 | 165173216 | A>G | 99,6% | 100% | 66 | 66 | 78,4% | 78,4% | LMX1A | Synonymous | rs1354509 | | 0,00091 |
| 1 | 178427559 | G>C | 100% | 52,5% | 40 | 21 | 90,9% | 73,9% | RASAL2 | Synonymous | rs144412569 | | 0,002 |
| 1 | 183072751 | A>T | 96% | 22,2% | 9 | 2 | 0% | 0% | LAMC1 | Missense | No | | |
| 1 | 215953269 | C>T | 99,6% | 42,3% | 97 | 41 | 41,4% | 42,6% | USH2A | Missense | rs55967206 | Basic | |
| 1 | 247587600 | A>C | 98,6% | 30% | 10 | 3 | 0% | 66,7% | NLRP3 | Synonymous | No | | |
| 2 | 11733023 | G>A | 98,9% | 66,7% | 24 | 16 | 77,8% | 50% | GREB1 | Synonymous | rs148777088 | | 0,00046 |
| 2 | 11759008 | T>G | 97,9% | 28,6% | 7 | 2 | 0% | 16,7% | GREB1 | Missense | No | | |
| 2 | 11759023 | T>C | 96% | 28,6% | 7 | 2 | 0% | 16,7% | GREB1 | Missense | No | | |
| 2 | 11774338 | C>T | 99,6% | 38% | 71 | 27 | 58,8% | 69% | GREB1 | Synonymous | rs200855068 | | 0,00046 |
| 2 | 23865378 | A>C | 96% | 40% | 5 | 2 | 0% | 25% | KLHL29 | Missense | No | | |
| 2 | 23914613 | C>T | 99,5% | 38,3% | 107 | 41 | 86,4% | 64,6% | KLHL29 | Synonymous | rs372774137 | | |
| 2 | 23980318 | C>A | 99,6% | 25% | 8 | 2 | 0% | 0% | ATAD2B | Stop gained | No | | |
| 2 | 24108652 | T>C | 99,5% | 100% | 55 | 55 | 61,8% | 61,8% | ATAD2B | Missense | rs7579201 | Basic | 0 |
| 2 | 29274618 | A>C | 96% | 50% | 4 | 2 | 100% | 33,3% | FAM179A | Splice site | No | | |
| 2 | 48132660 | A>G | 100% | 40% | 5 | 2 | 100% | 66,7% | FBXO11 AC07980 | Missense | No | | |
| 2 | 51254819 | T>G | 96% | 22,2% | 9 | 2 | 0% | 50% | NRXN1 AC007682 | Missense | No | | |

5 filters

Presets:

| | | |
|---|---|---|
| Type | worse than | Active mRNA |
| Quality | bigger than | 0.96 |
| Frequency | bigger than | 0.20 |
| MAF | smaller than | 0.01 |
| Region of interest | contains | |

Close

*Abb. 15: Variantenliste erstellt mit GensearchNGS eines Beispielpatienten. Die Liste enthält die genomische Position, den Aminosäureaustausch, die Qualität, die Allelfrequenz mit der das betroffene Allel vorliegt, die Abdeckung, die Reads, die die alternierte Base enthalten, Verhältnis der Variante im Forward- und Reverse-Read, die Positivbilanz, das betroffene Gen, Art der Mutation, Bekanntheitsgrad, Vorhersage und MAF. Unterhalb der Liste sind die Filterkriterien aufgeführt (Abbildung erstellt mit Hilfe dem Programm GensearchNGS (PhenoSystems, Wallonia, Belgien).*

Diese Varianten wurden mit Hilfe von Alamut (Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich) weiter analysiert. So wurden die in Alamut integrierten Vorhersageprogramme, wie SIFT [94], Polyphen_2 [95], MutationTaster [96] für Missense-Varianten und diverse Splice-Vorhersageprogramme, wie MaxEntScan [97], NNSPLICE [98], GeneSplicer [99], Human Splicing Finder [100] und SpliceSiteFinder-like, genutzt. Mit Hilfe dieser Tools konnten die Basensubstitutionen hinsichtlich ihrer Auswirkung bestimmt werden. Des Weiteren wurden Datenbanken wie ExAC, gnomAD [101], HGMD [102], ClinVar [103]und die Deafness Variation Database [104] zur Kategorisierung zu Rate gezogen. Bei ExAC und gnomAD [101] handelt es sich um Populationsdatenbanken, bei denen die einzelnen Varianten in Hinblick auf ihre Häufigkeit gelistet sind. HGMD [102] und ClinVar [103] sind klinische Datenbanken, die Varianten einstufen aufgrund bereits beschriebener Varianten im Zusammenhang mit Phänotypen. Die Deafness Variation Database [104], ist eine Datenbank, die spezifisch für Hörstörungen ist. Weitere klinische Informationen zu den Genen oder

einzelnen genetischen Erkrankungen wurde mit Hilfe der Datenbank OMIM [105] gewonnen. Auf diese Weise wurden die in Frage kommenden Varianten hinsichtlich ihrer Pathogenitätswahrscheinlichkeit eingegrenzt. Zur Validierung und Verbesserung der Datenanalyse wurde eine bioinformatische Pipeline entwickelt. Diese wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Bioinformatik (Herrn Dr. Dr. Marcus Dittrich und Dr. Tobias Müller) der Universität Würzburg aufgebaut. Sie basiert auf dem Genom Analyse Toolkit (GATK) [106]. Diese beinhaltet die Burrows-Wheeler Alignment basierte Leseausrichtung zum humanen Genom [107] nach GATK Empfehlung [108]. Zusätzlich zu einem In-house Allel Filter, der technische Artefakte ausschloss, wurden die Daten des Greater Middle East Variome Projekts einbezogen [109]. Anschließend erfolgte eine populationsspezifische Filterung. Die übriggebliebenen Varianten wurden markiert. Mit verschiedenen bereits erwähnten Vorhersageprogrammen wie SIFT und CADD [110] erfolgte eine Priorisierung. Zusätzlich wurden Daten der Datenbanken Deafness Variation Database [111] und ClinVar in die Pipeline einbezogen. Damit standen letztendlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung, um Varianten im menschlichen Exom zu analysieren: Eine Analyse mit Hilfe von GensearchNGS oder mit der hausinternen Pipeline.

Da auch Deletionen als kausaler Grund für Hörstörungen in Frage kamen, wurde bei einigen Exom-Datensätzen eine CNV-Analyse durchgeführt. Diese wurde ebenfalls von den Bioinformatikern Herrn Dr. Dr. Marcus Dittrich und Herr Dr. Tobias Müller übernommen. Die CNV-Analyse liegt dem eXome-Hidden-Markov-Modell (XHMM, Version 1.0) zugrunde [112]. Aufgrund eines vorangegangenen SNP-Arrays und einer entsprechenden Validierung über eine qualitative Echtzeit PCR, war die Deletion eines untersuchten Patienten bereits bekannt. Daraufhin wurden die Parameter dieser Variante zur weiteren Auswertung aller anderen Varianten verwendet. Varianten, die mehrfach vorkamen mit identischen Start- und Endposition, wurden als Artefakte klassifiziert und ausgeschlossen. Zum Schluss erfolgten eine Validierung und eine Segregationsanalyse, die im Anschluss beschrieben werden.

### 2.2.5 Validierung und Segregationsanalysen

Für die Validierung der Varianten und Segregationsanalysen wurde eine Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) und Sanger-Sequenzierungen als molekulargenetische Methoden herangezogen. Homozygote Deletionen konnten mittels PCR nachgewiesen werden, heterozygote Deletion bzw. Duplikationen dagegen mit einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR).

#### 2.2.5.1 POLYMERASE KETTEN REAKTION (PCR) UND GELELEKTROPHORESE

Für eine PCR mussten zunächst entsprechende Primer designed werden. Dazu wurde das Programm Primer3 [113] genutzt. Die zu untersuchende Sequenz wurde aus Ensemble [114] kopiert, welches eine Datenbank ist, in der verschiedene Genome einzelner Spezien kartiert und klassifiziert sind. Diese Sequenz wurde in Primer3 eingegeben, um Primervorschläge zu generieren. Zur Überprüfung der vorgeschlagenen Primer wurden diese auf der Metabion Homepage [115] mit Blat (UCSC) [116] und SNPCheck [117] hinsichtlich Temperatur, Haarnadelstrukturen, Einzigartigkeit sowie auf SNPs getestet. Konnten alle Qualitätsmerkmale der Primer erfüllt werden, wurden sie bei Metabion (Metabion, Planegg/Steinkirchen, Deutschland) bestellt. Die verwendeten Primer sind im Anhang 9.1 aufgeführt. Bei einer PCR wird der zu untersuchende DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert. Die PCR verläuft in drei Schritten: Zuerst wird die DNA denaturiert, indem die Wasserstoffbrückenbindungen durch Hitze gelöst werden. Dann lagern sich die Primer an, Oligos, die komplementär an die DNA binden können. Die Annealing-Temperatur richtet sich dabei nach der Schmelztemperatur der für die Reaktion genutzten Primer. Daraufhin erfolgt die Elongation, bei der die Taq-Polymerase beginnend an den Primern den denaturierten DNA-Strang komplementär zur Matrize mit Desoxynukleotiden (dNTPs) auffüllt. Diese drei Schritte werden mehrfach wiederholt, wobei nicht mehr als 40 Zyklen angewandt werden sollten, da unspezifische Amplifikationen das Ergebnis verfälschen könnten.

Für jeden PCR-Ansatz wurden 12,5 µl Puffer B bzw. Puffer A, 0,2 µl Taq-Polymerase, jeweils 0,5 µl Primer Forward und 0,5 µl Primer Reverse und 1 µl genomische DNA vermischt. Anschließend wurde der Ansatz in einen Cycler gestellt und das PCR-Programm des Cyclers gestartet.

7. 94/95°C für 30 s
8. 98°C für 30 s
9. X°C für 30 s
10. 72°C für 45 s →Schritte 2–4 wurden 30–35x wiederholt
11. 72°C für 10 min
12. Inkubation bei 10°C

Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte anhand ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurde ein 2%iges Agarosegel gegossen. Hierbei wurden 2 g Agarose und 100 ml 1x TBE-Lösung aufgekocht und unter Rühren leicht abgekühlt, um ca. 5 µl vom fluoreszierenden

Farbstoff HDGreen zuzugeben und dann das Gel in eine Form zu gießen. Nach Abkühlen des Gels, wurde es in eine Kammer mit 1x TBE-Puffer gelegt, mit den entsprechenden Proben, vermischt mit Ladepuffer, beladen und ein Marker aufgetragen, der später an Hand definierter Fragmentgrößen zur Orientierung dienen sollte. Es wurde eine Gleichspannung angelegt von 120 V angelegt. Durch das elektrische Feld wandert die negativ geladene DNA zur positiv geladenen Kathode. Wegen der 3D-Gitter-Struktur des Gels wandern größere DNA-Fragmente langsamer als kleinere, wodurch die amplifizierten DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden können. Der Farbstoff HDGreen interkaliert zwischen die Basen der DNA der Amplifikate, wodurch sich das Anregungsspektrum von HDGreen verändert und so die Fluoreszenz bei Anregung mit ultraviolettem Licht bzw. grünen LED Licht stark erhöht. Somit konnten alle PCR-Produkte sichtbar gemacht werden. Auch homozygote Deletionen konnten mittels PCR nachgewiesen werden. Zudem diente die PCR als Ausgangsmaterial für die Sanger-Sequenzierung.

#### 2.2.5.2 SANGER-SEQUENZIERUNG

Die Sanger-Sequenzierung basiert auf einer Kettenabbruch-Synthese. Im Prinzip handelt es sich um eine PCR mit einem Primer, bei der zu den normalen dNTPs in einem geringem Anteil Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) beigemischt wurden. Diese besitzen keine 3'-Hydroxyl-Gruppe, wodurch bei einem Einbau eines ddNTPs im neu synthetisierten DNA-Strang die Synthese an dieser Stelle abgebrochen wird. In der Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, deren Ende ein ddNTP darstellt, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Die unterschiedlichen DNA-Fragmente werden am ABI Sequencer gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch einen eingebauten Laser wird das jeweilige farblich markierte Endnukleotid angeregt. Die Emission wird erfasst und dokumentiert. Auf diese Weise kann eine Nukleotidsequenz eines Amplifikats erfasst werden.

Bevor allerdings eine Kettenabbruch-Synthese durchgeführt werden konnte, musste zuerst ein ExoSAP-Verdau des PCR-Produktes stattfinden. Auf diese Weise sollten störende Nukleotide aus der vorhergehenden PCR mittels Exonuklease I (Exo) und Primerreste mittels einer Shrimp Alkalischen Phosphatase (SAP) entfernt werden. Dazu wurde zu je 1µl Probe 5,5 µl PCR-Wasser und 0,25 µl ExoSAP gegeben. Anschließend wurde jede Probe für 30 min bei 37°C im Cycler inkubiert. Bei 95°C wurde anschließend die Verdauung gestoppt. Danach wurde die Sequenzierreaktion angesetzt. Dafür wurden zu jeder verdauten Probe 0,5 µl PCR-Wasser, 2µl 5x Sequenzierpuffer sowie 1 µl BigDye pipettiert. Ebenso wurden 0,5 µl eines Forward-Primers oder eines Reverse-Primer zu der Reaktion gegeben. Anschließend wurde die Kettenabbruch-Synthese im Cycler mit folgendem Programm durchgeführt:

1. 96°C für 2 min 30 s
2. 98°C für 20 s
3. 60°C für 1 min 30 s
4. 50°C für 2 min →Schritte 2–4 wurden 27x wiederholt
5. 50°C für 3 min
6. Inkubation bei 10°C

Für die Sequenzierung am ABI-Sequencer wurde die DNA im Vorfeld präzipitiert. Auf diese Weise sollten Enzyme und Salze entfernt werden. Die Präzipitation erfolgte wie in 2.2.3.1 beschrieben, jedoch in kleinerem Maßstab. So wurden hierfür nur 1 µl 3M NaAc, 25 µl 100% EtOH und 50 µl 80% EtOH verwendet. Zum Schluss wurde die DNA in 30 µl HiDi-Formamid aufgenommen. Die vorbereiteten Proben wurden am ABI Sequenzer sequenziert und mit Hilfe des Programms Gensearch (PhenoSystems, Wallonia, Belgien) analysiert.

#### 2.2.5.2.1 QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR (QPCR)

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion können Aussagen über die Ausgangsgendosis getroffen werden. Hierbei werden während einer PCR-Reaktion DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe direkt in das Amplifikat eingebaut. Die Emission des Fluoreszenzfarbstoffes im PCR-Produkt wird während des Einbaus direkt gemessen werden und über eine Quantifizierung in direkten Zusammenhang mit der Menge des PCR-Produkts gestellt.

Um überhaupt eine Aussage über die Quantität treffen zu können, musste jede Probe, die eingesetzt wurde, dieselbe Ausgangskonzentration aufweisen. Als Vergleichskontrolle dienten eine männliche und eine weibliche gesunde DNA-Kontrolle. Für jede qPCR wurden 5µl von jeder Kontrolle eingesetzt. Zusätzlich wurden 2,5 µl von jeder Kontrolle mit 2,5 µl PCR-Wasser verdünnt, um durch diese 1:1-Verdünnung eine heterozygote Deletion zu imitieren. Als Negativ-Kontrolle dienten 5 µl PCR-Wasser. Von jeder zu testender Probe wurden ebenfalls 5 µl eingesetzt. Alle Ansätze wurden mit 20 µl Mastermix versetzt. Dieser bestand aus 12,5 µl SYBR Green Mix, 1 µl Forward-Primer, 1 µl Reverse-Primer sowie 5,5 µl PCR-Wasser. Die Proben wurden in einen 26-well-Rotor des Quiagen Rotor-Gene Q eingesetzt. Das Programm „Gendosis Standard“ wurde ausgewählt.

1. 95°C für 10 min
2. 95°C für 20 s
3. 54°C für 20 s
4. 72°C für 30 s →Schritte 2–4 wurden 39x wiederholt
5. 72°C für 3 min
6. Inkubation bei 10°C

Das Ergebnis wurde mit dem Programm Rotor-Gene Q Series Software 1.7 analysiert. Hiermit konnten Duplikationen und heterozygote Deletionen validiert werden.

#### 2.2.5.2.2 MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

Um ebenfalls Deletionen und Duplikationen im *OTOA*-Gen bzw. *GJB2*-Gen eindeutig nachweisen zu können, wurde in beiden Fällen eine MLPA durchgeführt. Die MLPA ist ein Multiplex-PCR-Verfahren, das auf Amplifikationen von bis zu 60 sequenzspezifischen ligierten Sonden basiert [118]. Zuerst folgt eine Denaturierung der DNA und anschließend wurden für die Hypbridisierung MLPA-Sonden zugegeben. Jede Sonde besteht hierbei aus zwei separaten Oligonukleotiden. Beide Oligonukleotide hybridisieren an einer nah zueinander liegenden Zielsequenz. Wenn beide Oligonukleotide hybridisiert sind, können sie

über eine Ligationsreaktion miteinander verbunden werden. In der darauffolgenden PCR können nur die Sonden amplifiziert werden, die durch eine Ligation im vorherigen Schritt miteinander verbunden wurden. Jedes Oligonukleotid enthält eine Primersequenz an der ein Forward-Primer bzw. ein Reverse Primer binden kann, wobei nur der Forward-Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Die generierten PCR-Amplifikate weisen Längen zwischen 130 und 400 bp auf. Diese können über eine Kapillarelektrophorese am ABI Sequencer aufgetrennt und entsprechende Fluoreszenzsignale gemessen werden.
Von jeder zu testenden DNA-Probe wurden 5 µl benötigt, die ca. 50–200 ng DNA enthielten. Zusätzlich mussten bei einer MLPA Positiv- wie auch Negativ-Kontrollen zu Validierungszwecken und eine Kontaminationskontrolle immer mitgeführt werden. Jede DNA-Probe wurde im Cycler für 5 min bei 98°C denaturiert. Anschließend wurden bei RT zu jeder Probe 3 µl eines Hybridisierungsmastermix gegeben, der aus 1,5 µl SALSA Probemix und 1.5 µl MLPA-Puffer bestand. Die Proben wurden für 1 min bei 95°C inkubiert und für 16 h bei 60°C hybridisiert. Dann wurde der Cycler auf 54°C heruntergekühlt und direkt am Cycler 32 µl Ligase-65 Mastermix zugegeben, der aus 3 µl Ligase Puffer A, 3 µl Ligase Puffer B, 25 µl PCR-Wasser und 1 µl Ligase-65 bestand. Die Proben wurden für 15 min bei 54°C inkubiert und anschließend wurde die Reaktion 5 min bei 98°C abgestoppt. Die Proben wurden auf RT gekühlt und 10 µl Polymerasemix wurde dazu pipettiert. Dieser bestand aus 7,5 µl PCR-Wasser, 2 µl PCR-Primermix und 0,5 µl SALSA-Polymerase. Dann erfolgte die PCR nach dem Folgendem Programm:

1. 95°C für 30 s
2. 60°C für 30 s
3. 72°C für 60 s →Schritte 1–3 wurden 35x wiederholt
4. 72°C für 20 min
5. Inkubation bei 15°C

Von jeder Probe wurden 1,5 µl mit 20 µl Formamid verdünnt sowie 0,5 µl ROX zugegeben, bevor die Mixtur kapillargelelektrophoretisch aufgetrennt wurde [119]. Die Datenanalyse wurde mittels Coffalyser.Net (MRC Holland, Amsterdam (Holland)) durchgeführt.

#### 2.2.5.3 STR-ANALYSE

Zur Vaterschaftsfeststellung bei einem *De novo* Mutationsfall im *CEACAM16*-Gen wurde eine STR-Analyse mit Hilfe des Powerplex5 durchgeführt. Grundlage sind Short-Tandem-Repeats-Polymorphismen. Diese repetitiven Di-, Tri oder Tetra-Nukleotide wiederholen sich mehrfach. Aufgrund der variablen Tandem Repeats liegen Polymorphism vor, die durch

Mikrosatelliten getestet werden können [30]. Für diesen Test wurden fünf Loci untersucht: 4 STR Loci und Amelogenin. Je ein Primer für ein Loci ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dazu wurde die Konzentration der DNA des Patienten und einer Positiv-Kontrolle (Zelllinie 9947A) im Vorfeld gemessen und auf von 2 ng/µl eingestellt. Zu jeweils 1 µl der eingestellten Patienten-DNA, Positiv-Kontroll-DNA und einer Negativ-Kontrolle wurden 5 µl Quiagen Multiplexmastermix (2x), 3 µl PCR-Wasser, 1 µl Primermix (10x) gegeben. Im Cycler eine PCR mit folgenden Einstellungen

1. 96°C für 2 min
2. 94°C°C für 2 min
3. 60°C für  s
4. 72°C für 1 min 30 s →Schritte 2–4 wurden 29x wiederholt
5. 72°C für 45 min
6. Inkubation bei 5°C

Zu 1 µl PCR-Probe wurden jeweils 20 µl Formamid und 0,5 µl Leiter (ILS600) pipettiert. Es folgte eine Denaturierung von 2 min bei 99°C [120]. Abschließend erfolgte eine Kapillargelelektrophorese am ABI Sequencer. Die Daten wurden mit dem Programm GeneMapper ausgewertet.

#### 2.2.5.4 X-INAKTIVIERUNG

Zur Ermittlung des inaktiven bzw. aktiven X-Chromosoms bei drei Familien mit einer X-chromosomalen Hörstörung, wurde ein X-Inaktivierungstest durchgeführt. Dieser Test basiert auf der Methylierung des inaktiven X-Chromosoms und einem CAG-Polymorphismus im Androgenrezeptor-Gen.

Zur Testung wurden von jeder zu untersuchender Probe zwei Ansätze hergestellt. Im ersten Ansatz wurden 10 µl DNA und 10 µl PCR-Wasser vorgelegt, im zweiten Ansatz 10 µl DNA und 10 µl Enzym *HhaI*. Dieses Enzym schneidet methylierungssensitiv an Schnittstellen, welche sich im Androgenrezeptor-Gen befinden. Während also im ersten Ansatz die DNA im ursprünglichen Zustand blieb, wurde im 2. Ansatz das nicht methylierte X-Chromosom durch das Enzym verdaut. Für beide Ansätze wurde anschließend eine PCR durchgeführt, die einen CAG-Polymorphismus im Androgenrezeptor umfasst. Während im ersten Ansatz das CAG-Repeat sowohl des methylierten als auch des unmethylierten Allels amplifiziert werden konnten, wurde im zweiten Ansatz nur das CAG-Repeat des methylierten Allels auf dem X-Chromosom amplifiziert. Abschließend wurde eine Fragmentanalyse mit 6-FAM als Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt. Da der Forward-Primer für die PCR mit diesem Fluoreszenzfarbstoff gelabelt wurde, konnte dessen Signal nach einer

kapillarelektrophoretischen Auftrennung am ABI Sequencer detektiert und mit Hilfe des Programms GeneMapper ausgewertet werden. Das Verhältnis im Ansatz ohne Verdau des methylierten zu unmethylierten Allels im Vergleich zum Ansatz mit Verdau lässt aufgrund der Menge an Amplifikaten Rückschlüsse geben, welches Allel unmethyliert und aktiv ist und ob das Verhältnis 50:50 entspricht oder zugunsten eines Allels verschoben ist. Dabei gilt ein Verhältnis um 80% als pathologisch[121].

#### 2.2.5.5 3D-MODELLIERUNG

Um den Austausch einer Aminosäure im Gen *S1PR2* besser zu verstehen und die Auswirkungen abschätzen zu können, wurde ein 3D-Modell generiert. Dazu wurde mit Hilfe von Phyre2 (Homology/analogY Recognition Engine version 2.0) [122] jeweils ein 3D-Modell der Wildtyp-Sequenz, der Sequenz mit bekannter Mutation p.Arg108Pro und der Sequenz mit erstmals beschriebener Mutation p.Arg108Gln erstellt. Für dieses Projekt wurde die Aminosäuresequenz aus NCBI [123] ermittelt und in Phyre2 eingefügt. Daraufhin konnte das wildtypische *S1PR2*-Homologmodell generiert werden. Per Hand wurde für den bereits bekannten Austausch p.Arg108APro und den erstmal beschriebenen Austausch p.Arg108Gln die Aminosäuresequenz an der Stelle p.108 geändert und ebenfalls Homologiemodelle erstellt. Die Homologiemodelle wurden in das Programm Chimera [124] und in das Programm PyMol™ (DeLano Scientific LLC) integriert und analysiert. Sowohl mit Chimera als auch mit PyMol™ konnten die Abstände der Aminosäuren zueinander sowie die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen analysiert werden. Für die Publikation Hofrichter et al., 2018 [125] wurde mit Hilfe von Chimera das Protein S1PR2 in Zusammenhang mit einem Liganden dargestellt. Die Wasserstoffbrückenausbildungen und deren Veränderungen aufgrund des Aminosäureaustausches wurden in PyMol™ verglichen und in der Publikation abgebildet. Zusätzlich wurde anhand des Interaktionsproteins S1PR1 (PDB ID: 3v2y) und dem Liganden ML056 mit Hilfe von *Coot* [126] deren Interaktion mit S1PR2 in PyMol™ betrachtet. Die Erstellung eines Homologiemodells ist nur dann möglich, wenn eine kristalline Struktur des zu untersuchenden Proteins vorliegt bzw. eines Proteins, das eine hohe Homologie zu dem gewünschten aufweist. Dies war bei dem Rezeptor S1PR2 der Fall, der hoch homolog zum Rezeptor S1PR1 ist. Dies konnte durch eine hohe Konservierung vor allem an der Stelle p.Arg108 nachgewiesen werden[127].

#### 2.2.5.6 BRUCHPUNKANALYSE

Bei einer Deletion im *COL9A1*-Gen, die die Exons 6–33 umfasste, sollte eine Bruchpunktbestimmung vorgenommen werden. Um den genauen Bruchpunkt der Deletion feststellen zu können, wurden zunächst PCRs durchgeführt, die die gesamten intronischen Regionen 5 und 33 umfassten. Intron 5 weist eine Größe von 10 kb, Intron 33 von 4 kb auf. Aufgrund der Größe der beiden Introns, wurden diese in kleine Stücke zu je ca. 800 bp für Intron 5 bzw. zu ca. 600 bp für Intron 33 unterteilt. Insgesamt wurde Intron 5 in 13 PCR-Produkte und Intron 33 in 7 unterteilt, die in Genrichtung nummeriert wurden. Jede PCR wurde mit Patienten-DNA (III-3), Patienten-Vater-DNA (II-2), Kontroll-DNA (HC) und Leer-Kontrolle durchgeführt. Die Primer für die Bruchpunktanalyse wurden wie in 2.2.3.1 beschrieben generiert und bei Metabion (Martinsried, Deutschland) bestellt. Für die PCR-Produkte 1–8 von Intron 5 und Produkte 2–7 von Intron 33 konnte ein PCR-Produkt bei allen getesteten Individuen detektiert werden. Dagegen konnte von PCR-Produkt 9 im Intron 5 und Produkt 1 im Intron 33 kein Amplifikat produziert werden. Somit konnten die Deletionsbruchpunktregionen eingegrenzt werden. Weiterhin wurden vier Touchdown-PCRs derselben Proben und des betroffenen Bruders (III-4) erzeugt, um ein Amplifikat zu generieren, das die Bruchpunktsequenz enthält. Eine Touchdown-PCR vermeidet eine Amplifizierung unspezifischer DNA-Sequenzen, in dem die Annealing-Temperatur schrittweise herabgesetzt wird. Nachfolgend ist das Programm der Touchdown-PCR aufgeführt:

1. 95°C für 5 min
2. 95°C für 30 s
3. 61°C für 30 s
4. 72°C für 1 min → Schritte 2–4 wurden 3x wiederholt
5. 95°C für 30 s
6. 58°C für 30 s
7. 72°C für 1 min → Schritte 5–7 wurden 3x wiederholt
8. 95°C für 30 s
9. 55°C für 30 s
10. 72°C für 1 min → Schritte 8–10 wurden 31x wiederholt
11. 72°C für 10 min
12. Inkubation bei 10°C

Hierfür wurden vier Kombinationen der Forward-Primer von PCR-Produkt 8 und 9 des Introns 5 sowie der Reverse-Primer von PCR-Produkt 1 und 2 des Introns 33 verwendet. Ein

generiertes PCR-Amplifikat wurde mittels standardisierte Sanger-Sequenzierung analysiert. Die Sequenz wurde mit dem Programm Sequenzscanner v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) untersucht. Die Sequenzen wurden mit Hilfe von Alamut Visual Version 2.7.1 (Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich) zur Ermittlung des Ursprungs einer inserierten Sequenz von 67bp untersucht.

# 3 ERGEBNISSE

Im Verlauf dieser Arbeit wurden 155 Hörstörungsfälle erforscht und deren genetische Ätiologie betrachtet. Die Patienten-DNAs wurden speziell für eine NGS-Untersuchung entweder mit Hilfe des TruSight One Panel oder einer Exom-Anreicherung (Illumina, San Diego, USA) vorbereitet. Zur Sequenzierung wurde sowohl der NextSeq500 (Illumina, San Diego, USA) als auch der MiSeq (Illumina, San Diego, USA) verwendet. Es erfolgte eine Analyse der Varianten mit dem Programm GensearchNGS (PhenoSystems, Wallonia, Belgien), welches eine Filterung der Allelfrequenz, der Minor-Allel-Frequenz, des Typs der Varianten und der Sequenzabdeckung zulässt. Diese vorgefilterten Varianten wurden weiter gefiltert hinsichtlich Hörstörungs-assoziierter Gene und Vererbung bzw. gegenüber Familienmitgliedern. Standen keine Familienmitglieder zur Verfügung, wurde der Hintergrund gegen Kontrollpersonen gefiltert. Zusätzlich sorgte eine bioinformatorische Pipeline zur Filterung der Varianten, wodurch noch bis zu ca. 200 Varianten als ursächlich in Betracht kamen. Diese wurden mit Hilfe von Vorhersageprogrammen und Datenbankinformationen bis zur kausalen Variante eingegrenzt. Zusätzlich erfolgte für einen Teil der Kohorte G und für die Kohorte E eine Exom-basierte CNV-Analyse. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls hinsichtlich Hörstörungs-assoziierter Varianten und mit Hilfe bekannter CNVs auf ihre Realität hin gefiltert. Anschließend wurden sämtliche Varianten validiert und Segregationsanalysen durchgeführt. Diese erfolgten mit einer Sanger-Sequenzierung. Die dargestellten Chromatogramme wurden alle mit dem Programm Gensearch (PhenoSystems, Wallonia, Belgien) erstellt. In einzelnen Fällen wurden zudem noch Vaterschaftstest, MLPA, 3D Modellierung, X-Inaktivierung und Bruchpunkanalysen durchgeführt. Diese Ergebnisse sind im Folgenden thematisch aufgeführt.

## 3.1 PATIENTENÜBERBLICK

Im Folgenden werden die Patienten, die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht worden sind, charakterisiert und in zwei unterschiedliche Kohorten unterteilt.

### 3.1.1 ANZAHL DER PATIENTEN

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 155 Familien untersucht. In 54 Fällen stand nur der Indexpatient, in den restlichen 101 Fällen standen weitere Familienmitglieder zur Verfügung. Von diesen Patienten sind zwei Drittel Männer und ein Drittel Frauen. Dies liegt der Rekrutierung zugrunde, da für einen bestimmten Teil der Studie vor allem männliche Patienten rekrutiert worden sind. Aufgrund der Häufigkeit *GJB2*-assoziierter Hörstörungen

wurden die Proben mit Hilfe einer Sanger Sequenzierung im Vorfeld untersucht. Zusätzlich wurde auch in einigen Fällen *STRC* untersucht, da dieses ebenfalls häufig im Zusammenhang mit autosomal rezessiven Hörstörungen auftreten kann. Während die Voruntersuchung in der Kohorte E mitaufgeführt ist, wurde in die Kohorte G nur Patienten aufgenommen, die keine Mutation in *GJB2* und keine homozygote Deletion in *STRC* aufwiesen.

### 3.1.2 EINTEILUNG DER PATIENTEN

Die Patienten wurden nach mehreren Merkmalen in Gruppen eingeteilt. Hierbei wurde die Ethnie berücksichtigt, der Phänotyp der Patienten, sowie durch familiäre Anamnese erkannte Vererbungsmuster.

#### 3.1.2.1 ETHNIE

Es wurden zwei Kohorten G und E gebildet. Die erste Kohorte G umfasst Patienten, die im Rahmen der Betreuung am Comprehensive Hearing Center in Würzburg für die Studie rekrutiert worden sind. Es konnten 32 Familien für diese Studie gewonnen werden. Ebenso sind hierbei Patienten mitaufgenommen (42), die in Mainz mit Hilfe von Herr Dr. Oliver Bartsch rekrutiert worden sind. Letztere Patienten wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Linda Schnapp untersucht und im Rahmen dieser Doktorarbeit nochmals re-analysiert. Da diese Patienten zudem für eine Kandidatengenuntersuchung gesammelt worden sind, wurden vor allem männliche Patienten untersucht. Die Patienten bzw. Familien weisen variable ethnische Hintergründe auf, wobei die meisten Patienten Kaukasier sind. Die zweite Kohorte bildet eine geschlossene Kohorte von iranischen Patienten, die von Kollaborationspartnern wie Herrn Reza Maroofian und Herrn Rad rekrutiert worden sind. Die Geschlechterverteilung ist hier 50:50. Diese Familien zeichnen sich durch vermehrte Verwandtschaftsehen und durch mehrere betroffenen Probanden aus. Es wurden 81 iranische Familien in dieser Doktorarbeit untersucht.

#### 3.1.2.1 PHÄNOTYP DER PATIENTEN

Zur Übersicht des Phänotyps der untersuchten Patienten wurden alle Patienten hinsichtlich des Auftretens der Hörstörung als auch hinsichtlich des Schweregrades der Hörstörung eingeteilt.

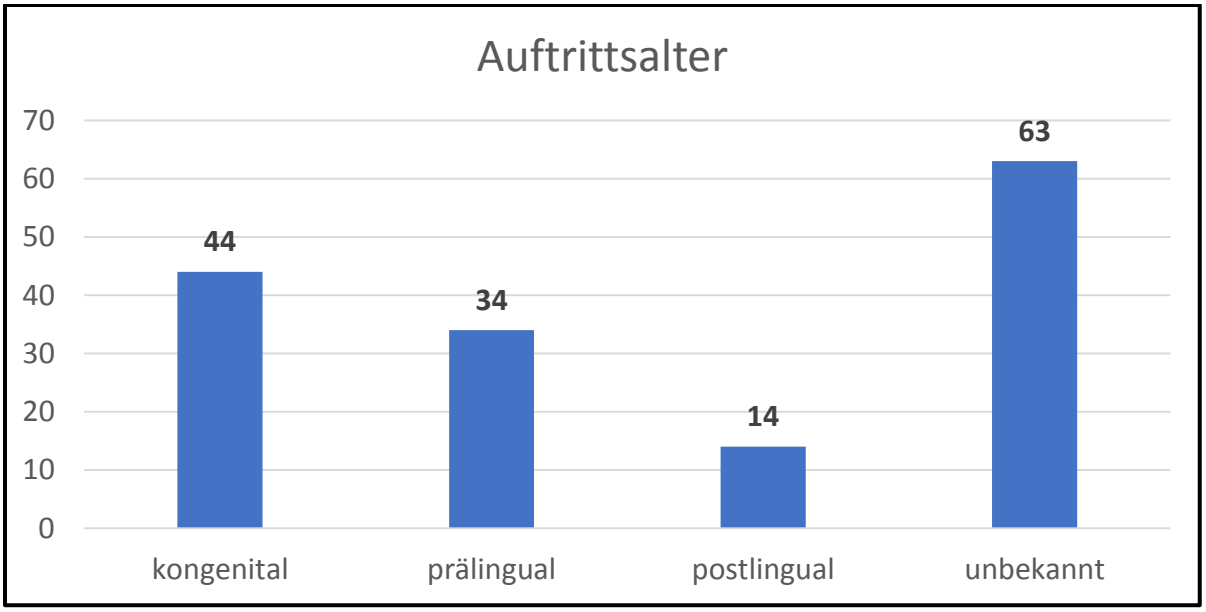



*Abb. 16: Auftritt der Hörstörung bei den Patienten. Auf der X-Achse sind die einzelnen Kategorien zu dem Auftrittsalter angefügt, in die die Patienten eingeteilt worden sind. Auf der Y-Achse befindet sich die Anzahl der Familien bzw. Patienten.*

Bei den meisten Patienten in den beiden Kohorten war der Zeitpunkt, an dem die Hörstörung auftrat, unbekannt. Von den Fällen, bei denen das Auftrittsalter bekannt war, zeigen die meisten Patienten eine kongenitale bzw. prälinguale Hörstörung. Bei diesen Patienten beginnt die Hörstörung vor dem Spracherwerb. Wenige Patienten weisen eine postlinguale Hörstörung auf.

Es konnten unterschiedliche Grade der Hörstörung festgehalten werden, die im Folgenden dargestellt sind.

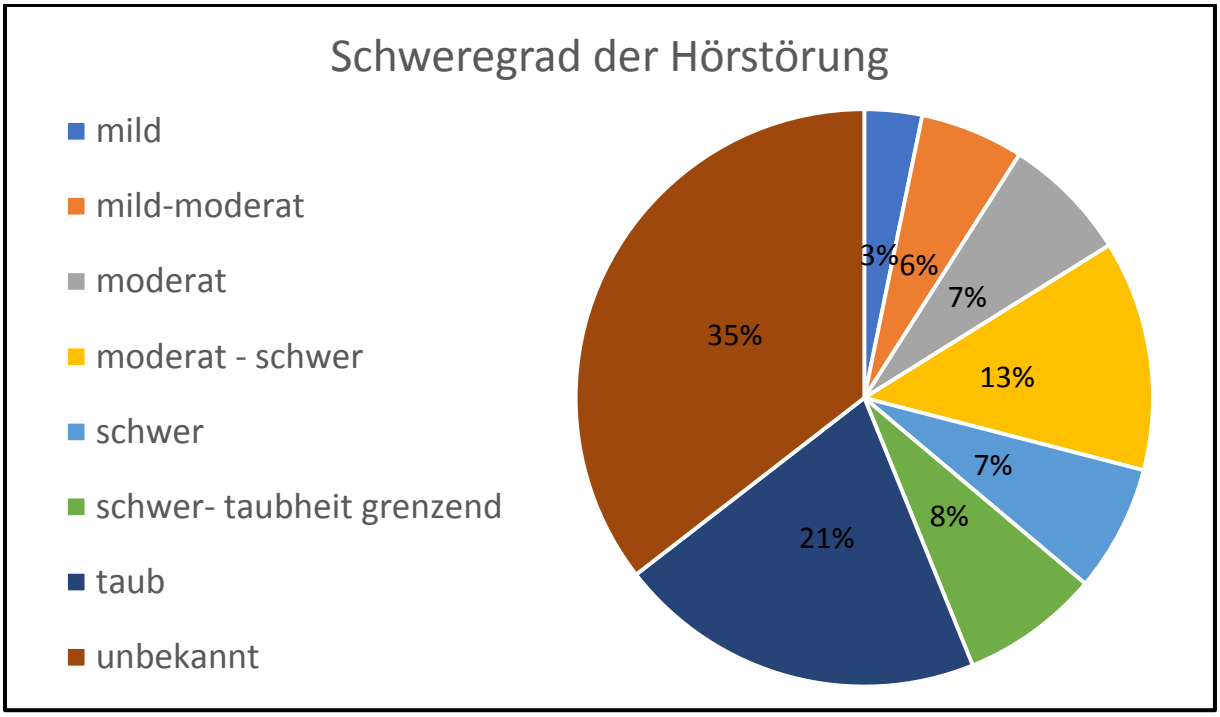



*Abb. 17: Verteilung des Schweregrades innerhalb beider Kohorten. Die Hörstörung jedes Patienten wurde in eine Kategorie von mild bis schwer-taubheit grenzend eingeteilt. Daraufhin wurde mit Hilfe des Tortendiagramms dargestellt, welche Hörstörung zu welchem Anteil in der Kohorte vorgekommen ist.*

Die meisten Patienten leiden an einer an Taubheit grenzenden Hörstörung bis hin zu einer vollkommenen Taubheit, gefolgt von moderat bis schwerwiegenden Hörstörungen. Nur sehr wenige Fälle von milden und mild bis moderaten Hörstörungen sind bei den Patienten bekannt.

Die Hörstörung können anhand ihrer Lateralität eingestuft werden. In der folgenden Abbildung wird aufgeschlüsselt, wie die Lateralität in den 155 Familien/Patienten verteilt ist.

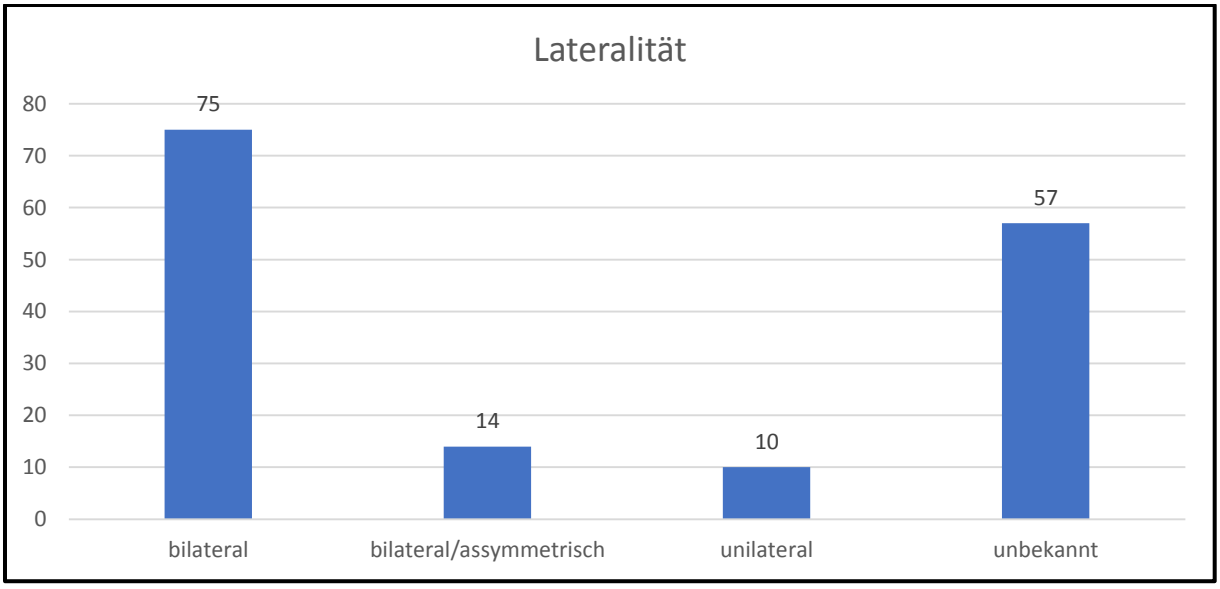



*Abb. 18: Einteilung der Patientenhörstörung aufgrund ihrer Lateralität. Auf der X-Achse sind alle Hörstörungen hinsichtlich Lateralität aufgeteilt. Auf der Y-Achse sind die Patienten aufgeführt, die in die jeweilige Kategorie fielen.*

Der Großteil der Patienten weist eine bilaterale Hörstörung auf, wobei ca. 6–10% eine unilaterale bzw. asymmetrische Hörstörung aufzeigen.

### 3.1.2.2 Stammbaum-assoziierte Vererbung

Ohne molekulargenetisches Vorwissen wurde die Hörstörung der Patienten anhand des Stammbaums in rezessive, dominante oder sporadische/unbekannte Hörstörungen unterteilt.

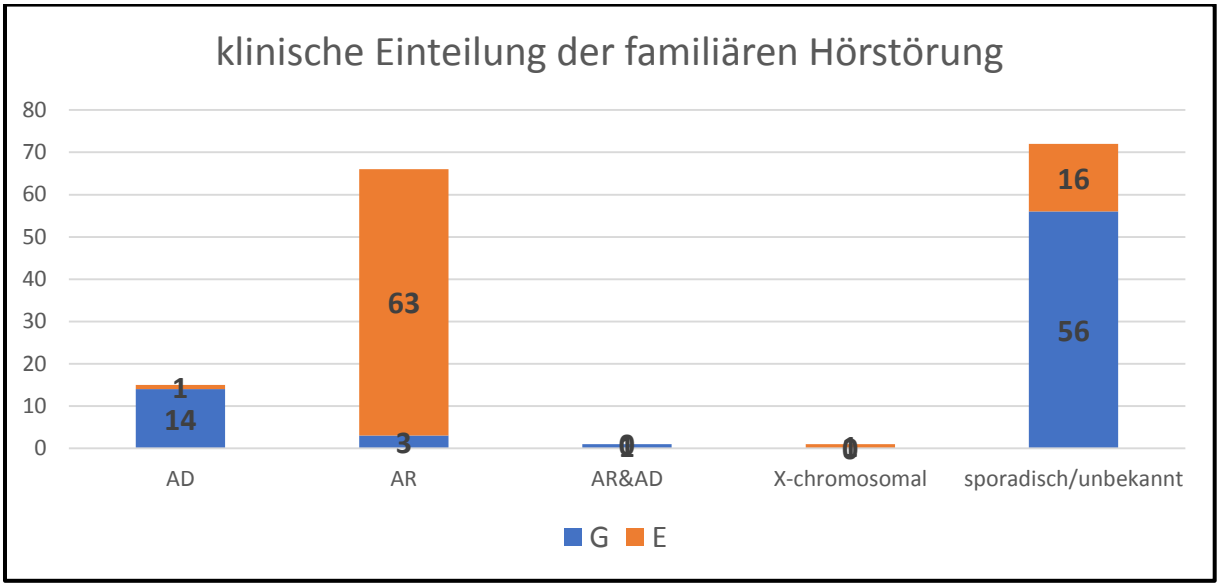



*Abb. 19: Einteilung der Hörstörung anhand der Stammbaumnomenklatur. Auf der Y-Achse ist wiederum die Anzahl der Patienten aufgeführt, die in der jeweiligen Kategorie eingestuft worden sind. Auf der X-Achse sind die einzelnen Vererbungsmuster angegeben. AD bedeutet autosomal dominant, AR autosomal rezessiv, AR & AD bedeutet eine Kombination aus autosomal rezessiv und autosomal dominant, X-chromosomal bedeutet eine mögliche X-chromosomale Ererbung der Hörstörung. Die letzte Kategorie bildet die sporadischen bzw. unbekannten Fälle, bei denen kein Vererbungsmuster festgestellt werden konnte. Als klar AD Fälle wurden alle bestimmt, bei denen in jeder Generation ein Familienmitglied betroffen war. Rezessiv wurden alle die Fälle bezeichnet, bei denen die Eltern betroffen waren und wenn von deren Kinder mehr als ein Kind eine Hörstörung aufwies. X-chromosomal wurden alle diejenigen bezeichnet, bei denen klar ersichtlich vor allem Männer betroffen waren. Alle weiteren Fälle wurden in die Kategorie sporadisch/unbekannt eingestuft. Zur Unterscheidung der Kohorten wurden eine Farbmarkierung eingeführt. Blau beinhaltet die Patienten der Kohorte G, Orange die Patienten der Kohorte E.*

Aus Abb. 19 wird ersichtlich, dass es sich in den meisten Fällen um sporadische bzw. unbekannte Fälle handelt, bei denen nur ein Familienmitglied betroffen ist, bzw. der Erbgang nicht ermittelt werden kann. Vor allem in der variablen Kohorte aus Deutschland sind vor allem sporadische und unbekannte Hörstörungen vorhanden. Am zweithäufigsten zeigen sich autosomal rezessive Hörstörungen. Diese hohe Prävalenz ist auf die iranische

Patientenkohorte zurückzuführen, bei der häufig Verwandtschaftsehen auftreten und sich somit rezessive Erkrankungen durchsetzen können.

Stammbäume und weitere Details sind im Anhang unter 9.2, 9.4 und 9.5 aufgelistet.

## 3.2 Genetische Ätiologie der Kohorten

In beiden Kohorten G und E konnten Hörstörungsfälle hinsichtlich kausaler pathogener Varianten aufgeklärt werden. Als aufgeklärt wurden solche Fälle klassifiziert, in denen eine pathogene Variante in einem Hörstörungsgen gefunden worden ist, die das Entstehen einer Hörstörung auch erklären kann. Wahrscheinlich pathogene Varianten, die aufgrund fehlender Segregation bzw. unvollständiger Segregation oder unbekanntem Literaturstatus den Fall nicht eindeutig aufklären können, werden zu den ungelösten Fällen gezählt. In der folgenden Abbildung 20 ist die Aufklärungsrate dargestellt.

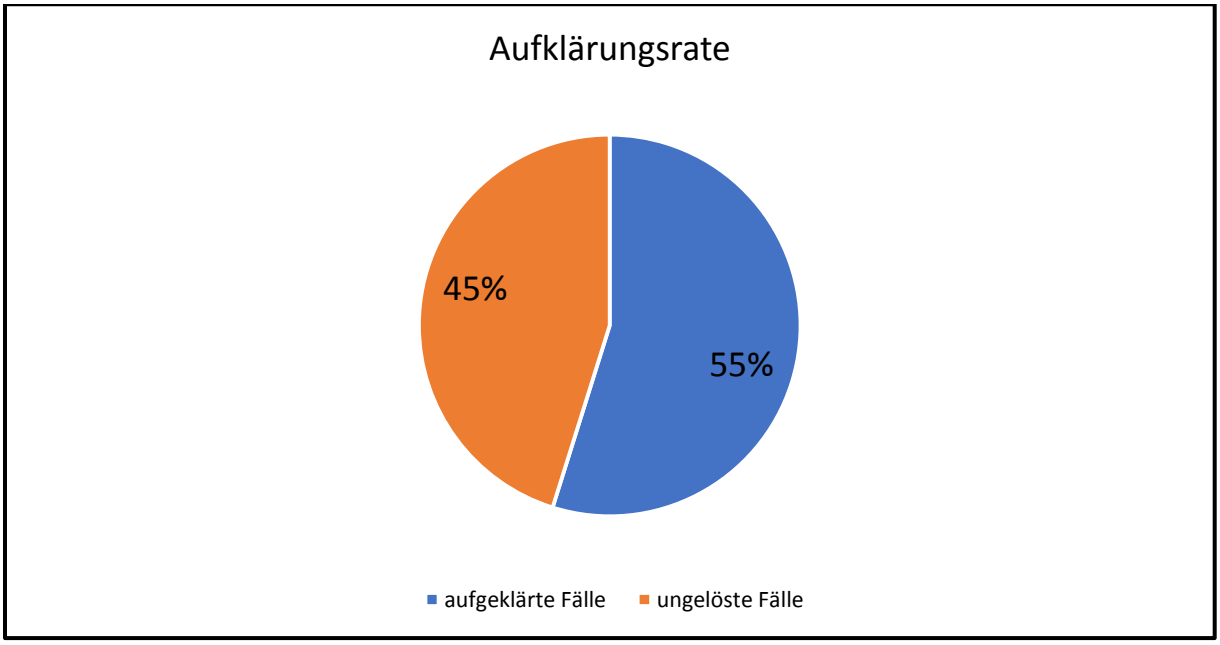



*Abb. 20: Aufklärungsrate der Fälle. Graphische Darstellung aller Fälle in Abhängigkeit der Identifizierung kausaler genetischer Varianten.*

Insgesamt konnten fast die Hälfte aller Fälle aufgeklärt werden. Jedoch ist das Verhältnis innerhalb der Kohorten unterschiedlich. So sind die meisten aufgeklärten Fälle (3/4) aus der Kohorte E, während nur 1/4 der Fälle aus der Kohorte G gelöst werden konnten.

Im der folgenden Abbildung 21 wird das Mutationsspektrum der aufgeklärten Fälle aufgezeigt.

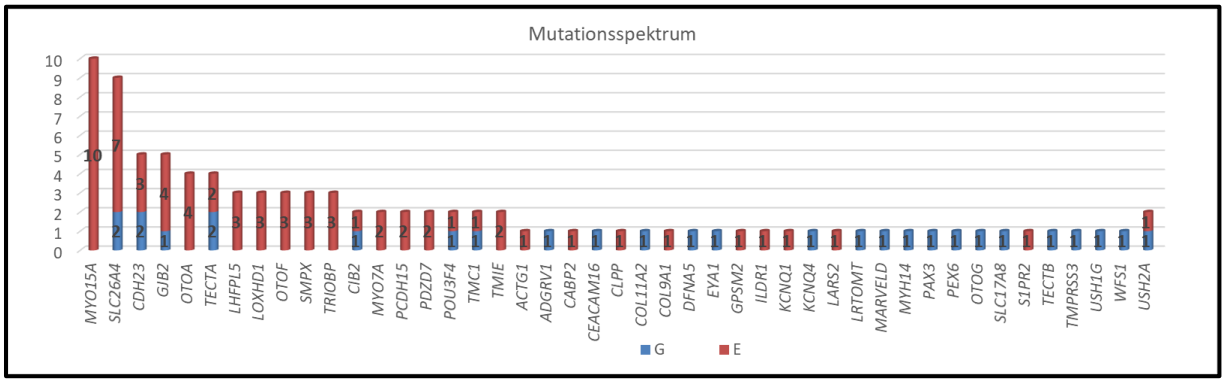



*Abb. 21: Mutationsspektrum der betroffenen Hörstörungsgene von aufgeklärten Fällen in den verschiedenen Kohorten. In Rot sind alle Fälle der Kohorte E, in blau alle Fälle der Kohorte G aufgeführt. Die Gene sind nach ihrer Häufigkeit entlang der X-Achse gestaffelt. Auf der Y-Achse sind die einzelnen Familien/Fälle aufgeführt. Die Varianten in USH2A sind in Zusammenhang mit anderen pathogenen Varianten aufgetreten und deshalb am Ende der X-Achse dargestellt.*

Am häufigsten war das *MYO15A*-Gen betroffen, allerdings ausschließlich nur in der Iranischen Kohorte E. Dagegen konnten an den zweithäufigsten Mutationen im *SLC26A4*-Gen in beiden Kohorten als ursächlich identifiziert werden. Ebenfalls häufig waren die Gene *GJB2*, *OTOA*, *TECTA*, *LHFPL5*, *LOXHD1*, *OTOF* und *SMPX* sowie *TRIOBP* betroffen, wobei nur Mutationen in den Genen *GJB2* und *TECTA* in beiden Kohorten nachzuweisen waren. Demnach sind in der Kohorte G viele unterschiedliche Gene an der Entstehung von Hörstörungen beteiligt.

Im Weiteren ist eine Übersicht aufgeführt, in der die identifizierten Mutationsarten aufgelistet sind (Abb. 22).

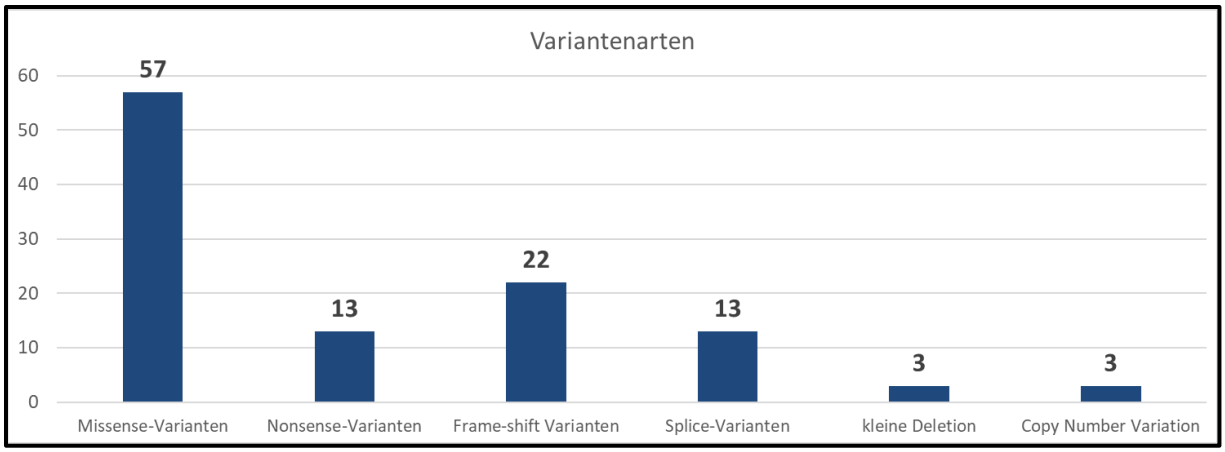



*Abb. 22: Variantenarten, die zu einer Hörstörung führen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der einzelnen Varianten aufgeführt. Auf der X-Achse sind die einzelnen Varianten hinsichtlich ihres Charakters aufgeschlüsselt.*

Die Varianten wurden in sechs Kategorien eingeteilt. Bei Missense-Varianten kommt es zu einem Basenaustausch, der mit dem Austausch der kodierenden Aminosäure einhergeht. Die Varianten sind vor allem in der ersten und zweiten Position des kodierenden Tripletts zu finden. Nonsense-Varianten sind DNA-Veränderungen, bei denen ein Basenaustausch in der Sequenz zu einem künstlich entstandenen Stoppcodon führt. Damit erfolgt ein Abbruch der Proteinsynthese. Frameshift Varianten verändern das Triplettmuster insofern, dass das Triplettraster verschoben wird und infolgedessen eine falsche Abfolge von Aminosäuren in das Protein eingebaut werden bzw. es zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese durch ein künstliches Stoppcodon kommt. Findet beispielsweise eine Deletionen dagegen in-frame statt, werden nur vereinzelt Aminosäuren deletiert, wodurch das Protein verkürzt weiter entstehen kann. Splice-Varianten beeinflussen die Übersetzung der DNA in die mRNA, d. h. diese Varianten beeinflussen das Herausschneiden der nicht-kodierenden Bereiche (Introne) zwischen den kodierenden Bereichen der DNA (Exons). Kleine Deletionen können sowohl zu einem Verlust von kodierenden Bereichen führen und damit zu einem verkürzten Protein oder aber zu einem Frameshift und damit zu einem vorzeitigen Abbruch der Synthese. Copy Number Variations (CNVs) sind Kopienzahlveränderungen, wie sie beispielsweise bei Deletionen und Duplikationen, die mehrere Gene und Chromosomenabschnitte umfassen können, vorkommen[30]. In unseren Analysen konnten als ursächliche Varianten vor allem Missense-Varianten ermittelt werden. Am zweithäufigsten traten Frameshift-Varianten auf, gefolgt von Nonsense- und Splice-Varianten. Selten waren kleine Deletion von mehreren Basen und Copy Number Variations vorhanden. Die Varianten werden in dieser Arbeit mit ihrer cDNA-Position (z.B. c.123) und Aminosäuren-Position (z.B. p.123) angegeben, die sich

auf das Transkript und nicht auf die genomische Position bezieht. Das Transkript wird im Anhang zu jeder Variante beschrieben.

Um zu sehen, ob bestimmte Gene eine bestimmte Variantenart aufweisen, wurde folgende Abbildung 23 erstellt.

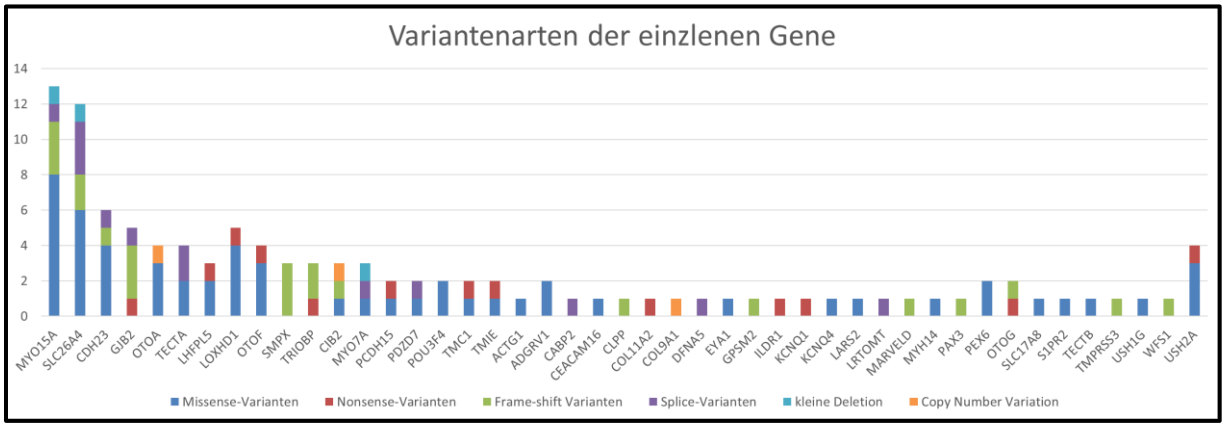



*Abb. 23: Variantenspektrum der einzelnen Gene. Jede Variantenkategorie wurde in einer bestimmten Farbe hinterlegt. Entlang der X-Achse befinden sich einzelnen Gene. Auf der Y-Achse die Anzahl der jeweiligen Varianten. Es wurden nur pathogene Varianten in diese Analyse einbezogen, die den Phänotyp der jeweiligen Familie/Probanden erklären konnten.*

In einigen Genen konnten nur Frameshift-Varianten festgestellt und in anderen Genen nur Nonsense-Variante identifiziert werden. Es sind sehr viele unterschiedliche Formen an Varianten feststellbar.

Die Stammbäume mit Segregation der wahrscheinlich pathogenen Varianten aller 155 Fälle sind im Anhang 9.2 aufgeführt. Im Anschluss wird auf einige dieser Fälle detailliert eingegangen.

## 3.3 VARIANTEN-KLASSIFIZIERUNG AM BEISPIEL AUSGEWÄHLTER FAMILIEN

### 3.3.1 KLASSIFIZIERUNG DER KAUSALEN VARIANTE INMITTEN WEITERER PATHOGEN EINGESTUFTER VARIANTEN

Eine Familie mit drei Generationen mit autosomal dominanter Hörstörung, die einen progressiven Verlauf aufweist, ist untersucht worden. Zur Erleichterung der Variantenfilterung wurde die betroffene Mutter, der nicht betroffene Vater und die Indexpatientin untersucht. Mit Hilfe des TruSight One Panels konnten mehrere Varianten ermittelt werden, die für die Hörstörung in dieser Familie ursächlich sein könnten.

Folgende Tab. 7 zeigt die als möglich pathogen identifizierten heterozygoten Varianten, die nach einer Stammbaum-assoziierten Filterung übrigblieben. Über die Zeit hinweg haben sich einige Veränderungen ergeben, die zur Verbesserung der Klassifizierung von Varianten hinsichtlich ihrer Pathogenität geholfen haben. So konnten aufgrund der Datenbank gnomAD eine Veränderung der Einschätzung mancher Varianten festgestellt werden, siehe letzte Spalte.

*Tab. 7: Auflistung von mit Hörstörung assoziierten Varianten der Familie G9. Die folgende Tabelle enthält im Überblick, die Varianten in den betroffenen Genen, sowie eine Zusammenfassung der drei Vorhersageprogramme SIFT, MutationTaster und Polyphen-2, eine Einschätzung der Datenbank Deafness Variation Database (DVD) und die das Vorkommen der jeweiligen Variante in den Populationsdatenbanken ExAC und gnomAD.*

| ***Gene*** | **cDNA position** | **Aminosäure-austausch** | **Vorhersage** | **DVD** | **ExAC** | **gnomAD** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***TECTA*** | c.4437C>G | p.Cys1479Trp | 3 x pathogen | keine Info | keine | keine Info |
| ***USH1C*** | c.2377C>T | p.His793Tyr | 2 x pathogen | unbekannte Signifikanz | 6 x het, 0 xhom | 15 x het, 0 x hom |
| ***MYO6*** | c.224A>G | p.His75Arg | 2 x pathogen | keine Info | keine Info | keine Info |
| ***MITF*** | c.1132G>A | p.Ala378Thr | 2 x pathogen | unbekannte Signifikanz | 9 x het, 0 x hom | 34 x het, 0 x hom |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ***SLC26A5*** | c.-53-2A>G | p.? | keine Info | 257 x het, 2 x hom |

Da *USH1C* und *SLC26A5* mit rezessiv assoziierter Hörstörung beschrieben sind, ist davon auszugehen, dass sie die vorliegende Hörstörung in der Familie G9 nicht erklären können. Dennoch können sie einen Effekt haben. Zur endgültigen Entscheidung, welche der aufgelisteten Varianten für die Hörstörung der Familie G9 ursächlich ist, wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt. Diese ist anschließend dargestellt.

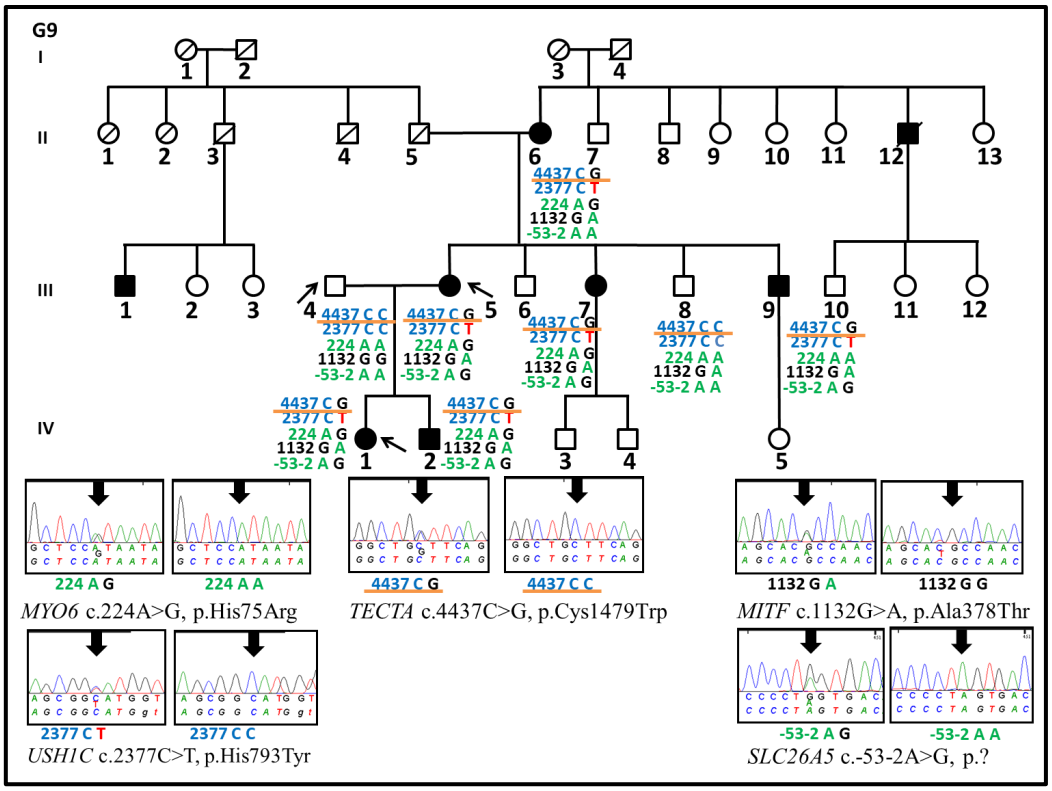



*Abb. 24: Stammbaum und Segregationsanalyse der Familie G9. Männer werden als Quadrate dargestellt, Frauen als Kreise. Wenn sie gestorben sind, ist der Kreis oder das Quadrat durchgestrichen. Eine Linie zwischen Kreis und Quadrat zeigt eine Ehe. Ist diese Linie doppelt, zeigt dies Blutverwandtschaft an. Geschwister sind miteinander verbundene Kreise bzw. Quadrate. Alle von einer Hörstörung betroffenen Familienmitglieder sind schwarz ausgefüllt. Diese Nomenklatur wird für alle folgenden Stammbäume übernommen. Die mit TruSight One Panel getesteten Personen sind jeweils mit einem schwarzen Pfeil markiert. Die Varianten sind für jeden getesteten Patienten aufgelistet worden. Ebenfalls sind die Chromatogramme jeder Variante angegeben in heterozygoter und wildtypischer Ausprägung. Jedes Chromatogramm enthält hierbei die Sequenz des Patienten (oben) und die Referenzsequenz (unten). Mit einem schwarzen Pfeil ist die relevante Variantenstelle markiert. Die hier beschriebene Nomenklatur zur Interpretation des Stammbaums ist ebenfalls in der weiteren Arbeit Standard und wird daher nicht nochmal erklärt.*

Innerhalb der Kernfamilie, deren Vater, Mutter und Indexpatientin mit dem TruSight One Panel untersucht wurden (Abbildung 9, schwarze Pfeile), sind alle betroffenen Familienmitglieder Träger aller 5 Varianten. Aufgrund ihres rezessiven Charakters können, wie schon erwähnt, höchstens die heterozygoten Varianten in *USH1C* und *SLC26A5* ausgeschlossen werden. Durch die Untersuchung der betroffenen Großmutter kann *SLC26A5* endgültig ausgeschlossen werden, da sie diese Variante nicht trägt. Eine betroffene Schwester

der Mutter gibt ebenfalls keinen weiteren Aufschluss über die kausale Variante, da sie ebenfalls Trägerin aller Varianten ist. Erst die Untersuchung des gesunden Bruders der Mutter führte zum Ausschluss der Variante in *MITF*, da er, obwohl nicht betroffen, diese Variante aufweist. Zur endgültigen Aufklärung dieses Falls trug ein weiterer betroffener Bruder der Mutter bei, da er die *MYO6*-Variante nicht trägt. Somit bleibt nur die Variante c.4437C>G im *TECTA*-Gen übrig (Abb. 24, orange markiert), die innerhalb der Familie segregiert. Ebenfalls segregiert die Variante in *USH1C* innerhalb der Familie. Sie kann aufgrund ihres rezessiven Charakters die Hörstörung nicht erklären, aber möglicherweise beeinflussen.

Damit konnte anhand der Segregationsanalyse die Variante c. 4437C>G, p.Cys1479Trp in *TECTA* als kausal in der Familie G9 ermittelt werden. Ohne eine Segregationsanalyse wäre dies nicht möglich gewesen. Die Kausalität dieser Variante bestätigt sich auch durch die Untersuchung weiterer dominant-assoziierter pathogener Varianten in *TECTA*. Die Variante c.4437C>G liegt innerhalb der vWFD4-Domäne, die weitere pathogene Varianten aufweist, deren dominante Charaktere zu einer Hochtonschwerhörigkeit der Patienten geführt haben.

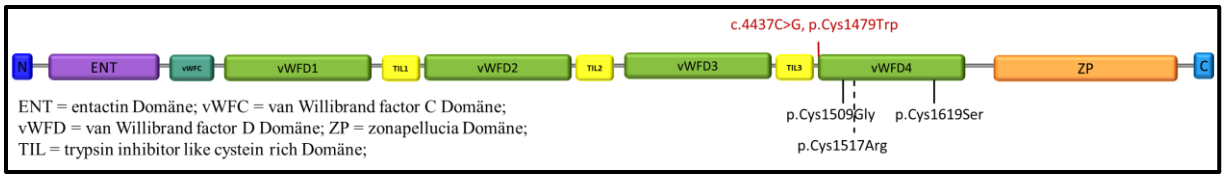



*Abb. 25: Position der heterozygoten pathogenen Variante in TECTA in Relation zu schon beschriebenen Mutationen, die ebenfalls die vWFD4-Domäne des Gens betreffen. In rot ist die in Familie G9 identifizierte Variante, in schwarz die schon beschriebenen Varianten dargestellt. Die in der Literatur berichteten Varianten zeigen einen Phänotyp mit progressiver Hochtonschwerhörigkeit.*

Da in Familie G9 ebenfalls eine Hochtonfrequenzhörstörung vorliegt, die im Laufe des Lebens zunimmt, welches aus den Audiogrammen aus Abbildung 26 ersichtlich wird, unterstützt dies die Kausalität der Variante in *TECTA* mit dominantem Charakter.

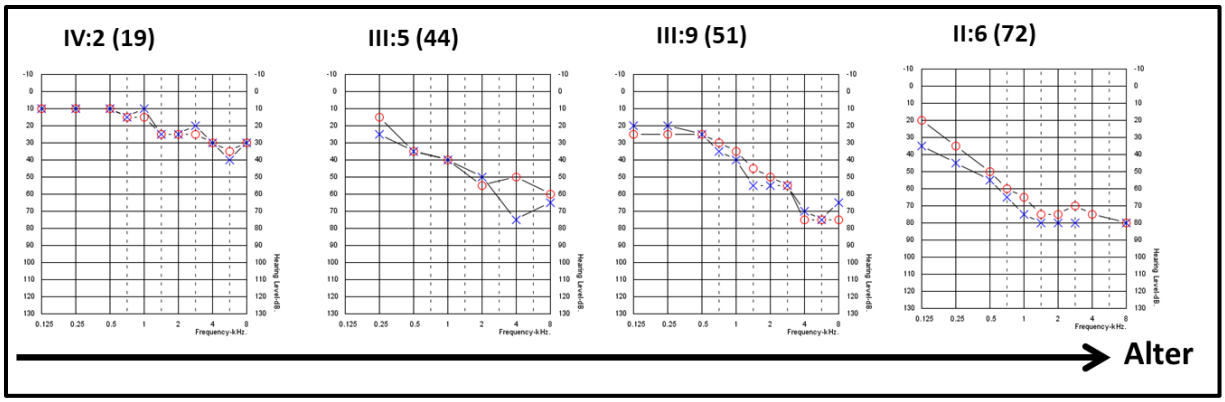



*Abb. 26: Audiogramme von betroffenen Familienmitgliedern G9. Es handelt sich hierbei um eine milde Hörstörung, die in der zweiten Lebensdekade auftritt und im Alter sich zu einer schweren Hochfrequenzhörstörung ausbildet. Die roten Kreise stehen für das rechte Ohr, die blauen Kreuze für das linke Ohr. Es handelt sich hierbei um eine Luftleitungsmessung. Das Alter der jeweiligen getesteten Personen aus dem Stammbaum ist in Klammern hinterlegt.*

## 3.3.2 Unvollständige Segregation

Bei einigen Fällen mit Hörstörung konnte eine interessante Variante in Hörstörungsgenen detektiert werden, aber es zeigte sich in der Segregation, dass nicht-betroffene Personen diese Varianten ebenfalls trugen. Obwohl diese Varianten einen starken Genotyp aufwiesen und als möglich kausal eingestuft werden könnten, konnte aufgrund der fehlenden Segregation der Fall nicht aufgeklärt werden. Beispiele für diese Problematik zeigen die abgebildeten Familien.

Folgend ist der Stammbaum von Familie E39 dargestellt (Abbildung 27). Die Indexpatientin II-2 zeigt eine Hörstörung über deren Grad keine weiteren Informationen bekannt sind. Die Eltern sind blutsverwandt und es gibt zwei gesunde Geschwister.

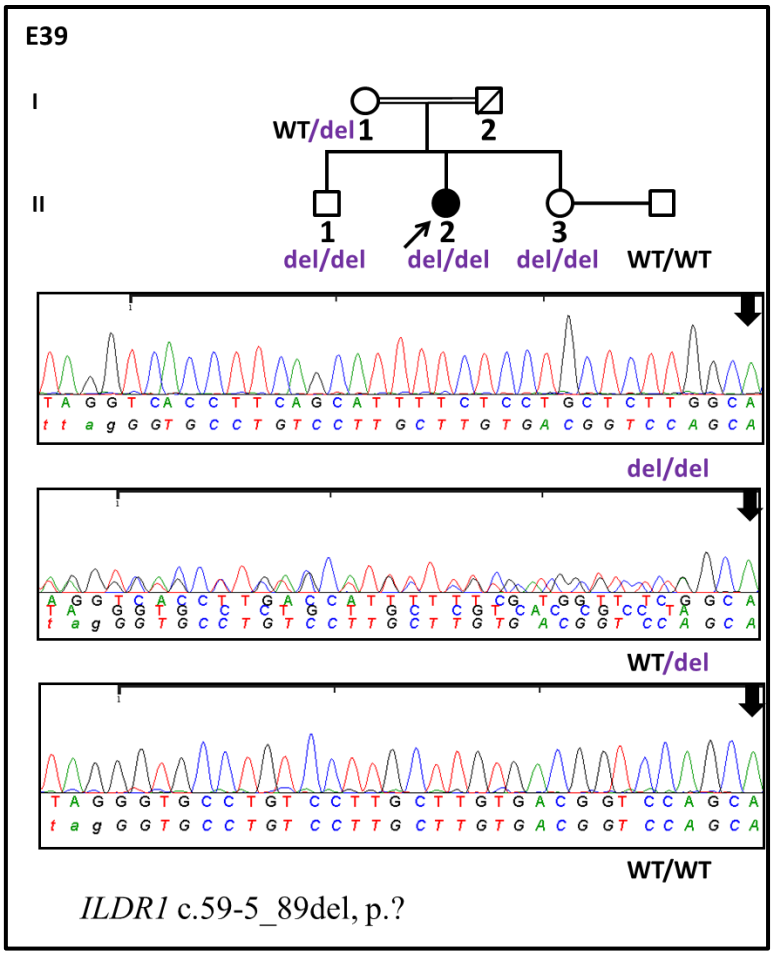



*Abb. 27: Stammbaum der Familie E39. Testung der Segregation einer Deletion, die den Anfang des Exons 2 des Gens ILDR1 umfasst, welches mit Hörstörungen assoziiert ist. Der Pfeil gibt an, welches Familienmitglied mittels Exomanalyse/TruSight One Panel getestet worden ist. Ebenfalls sind die Chromatogramme der Deletion in heterozygoter und homozygoter Form aufgeführt. Von jedem in der Segregation getesteten Probanden wurde ein Genotyp angefügt für entweder WT/del, WT/WT oder del/del entsprechend dem Vorliegen der Variante.*

Obwohl die homozygote Variante im rezessiven *ILDR1* zu einen Verlust von Exon 2 führt, sind auch gesunde Mitglieder dieser Familie homozygot für die Variante *ILDR1* c.59-5_89del, p.?. Eine Erklärung konnte bislang noch nicht gefunden werden. Es wird vermutet, dass es sich um ein Drop-off handelt, eine einseitige Allelamplifikation in der PCR. Mit neuem spezifischerem Primern wurde allerdings das gleiche Ergebnis erzeugt.

In der Familie G12 liegt ebenfalls eine unvollständige Segregation vor. Die Indexpatientin ist von einer sensorineuralen, bilateralen assymmetrischen Hörstörung betroffen, die prälingual auftrat und schwerwiegend die mittleren Frequenzen betrifft.

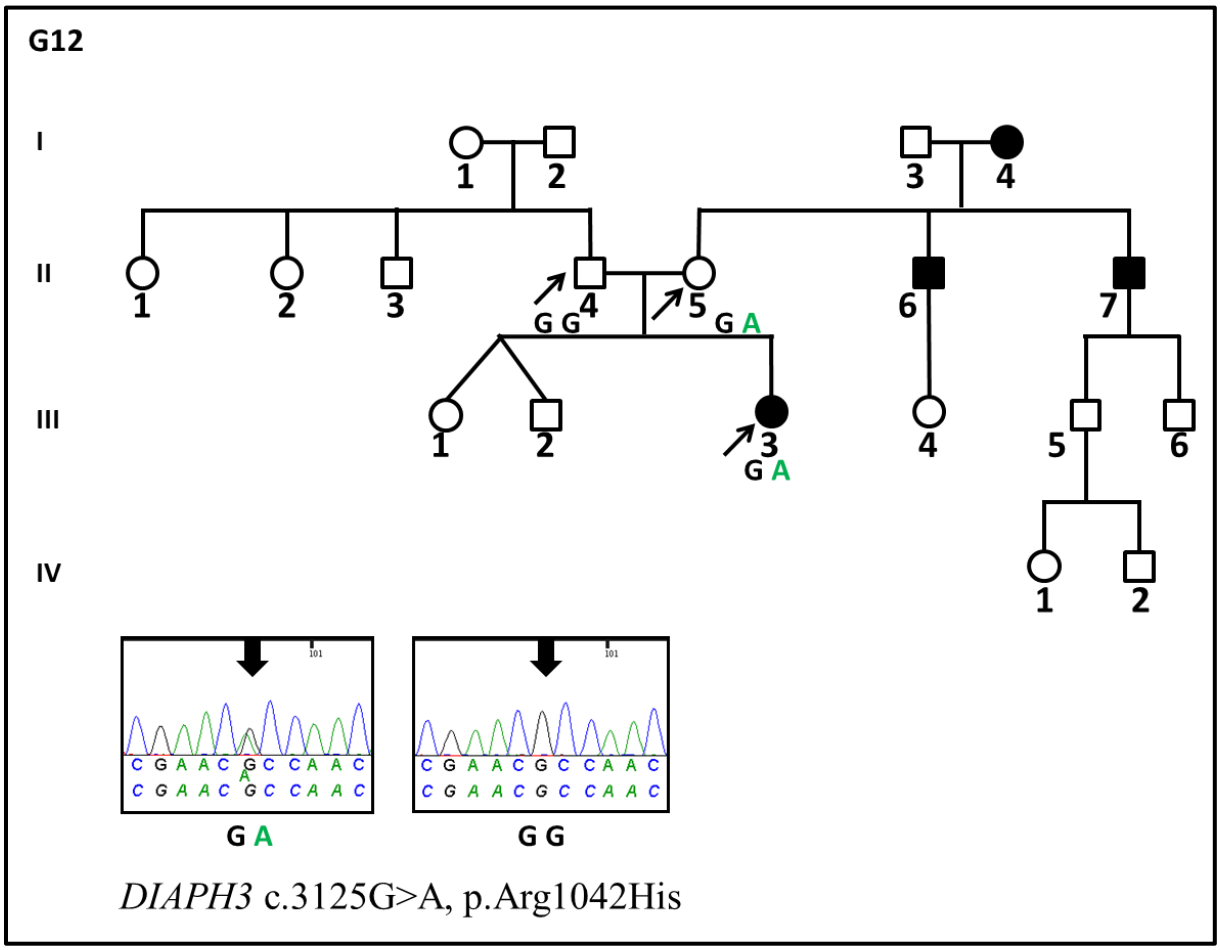



*Abb. 28: Stammbaum und Segregation der Familie G12. Der Pfeil gibt an, welches Familienmitglied mittels Exomanalyse/TruSight One Panel getestet worden ist. Ebenfalls sind die Chromatogramme der Variante in heterozygoter und wildtypischer Sequenz angezeigt. Der Genotyp der getesteten Probanden ist im Stammbaum mit GA bzw. GG beschrieben.*

Diese heterozygote Variante im Gen *DIAPH3* ist als pathogen durch Vorhersageprogramme eingestuft worden. In der Deafness Variation Database wird sie mit unbekannter Signifikanz eingestuft, wobei sie in der HGMD-Datenbank (CM168494) schon mit einer dominanten Hörstörung assoziiert worden ist[128]. Die fehlende Segregation aufgrund der nicht betroffenen Mutter könnte nun mehrere Gründe haben: 1. Die Mutter zeigt einen Phänotyp, der bislang nur nicht festgestellt werden konnte. 2. Die Variante ist nicht ursächlich, da mehrere (60) heterozygote Anlageträger in gnomAD beschrieben wurden, obwohl der

Phänotyp autosomal dominant vererbt werden würde. 3. Diese Variante zeigt eine unvollständige Penetranz. 4. Zusätzliche Modifier existieren, die die Variante beeinflussen.

In der dritten Familie G42 konnte ebenfalls eine Variante detektiert werden, die als ursächlich beschrieben werden könnte. Zur Bestätigung der Kausalität fehlte wiederum die Segregationsanalyse.

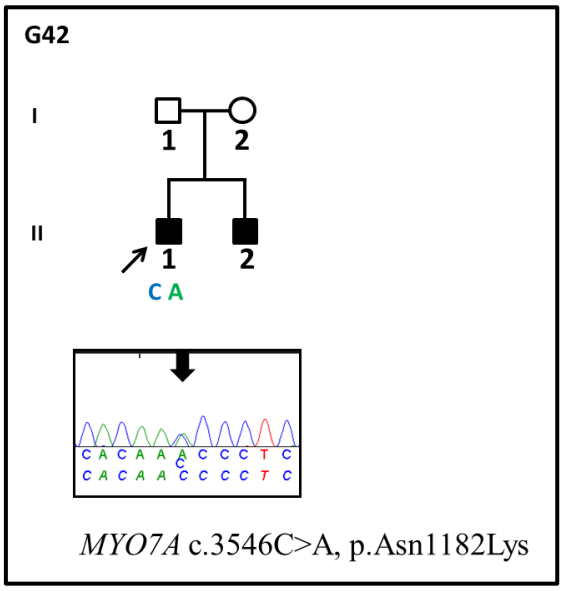



*Abb. 29: Stammbaum der Familie G42. Der Pfeil gibt an, wessen Exom analysiert wurde. Der Genotyp des Patienten wird als CA beschrieben. Weiterhin ist das Chromatogramm der heterozygoten Sequenz dargestellt.*

Die hier identifizierte Variante c.3546C>A, p.Asn1182Lys im Gen *MYO7A* ist in den Datenbanken noch nicht beschrieben worden. Sie wird aber von Vorhersagenprogrammen als pathogen beschrieben. *MYO7A* ist bekannt sowohl eine dominante Hörstörung oder eine rezessive Hörstörung bedingen zu können [129, 130]. Da nicht klar ist, ob die hier berichtete Variante für eine autosomale Hörstörung verantwortlich ist und dies durch eine Segregationsuntersuchung nicht geklärt werden konnte, bleibt die Hörstörung der Familie G42 ungeklärt. Die Hörstörung des Patienten trat prälingual auf und ist an Taubheit grenzend. Sie wirkt sich progressiv aus und zusätzlich konnten auch Schwindel und Tinnitus festgestellt werden.

### 3.3.3 Unilaterale Hörstörung – Akkumulation mehrerer Varianten

Im Folgenden ist ein Patient mit einer einseitigen Hörstörung beschrieben, die im Laufe seines Lebens leicht zunahm. Vier verschiedene Audiogramme des Patienten sind in Abbildung 30 dargestellt.

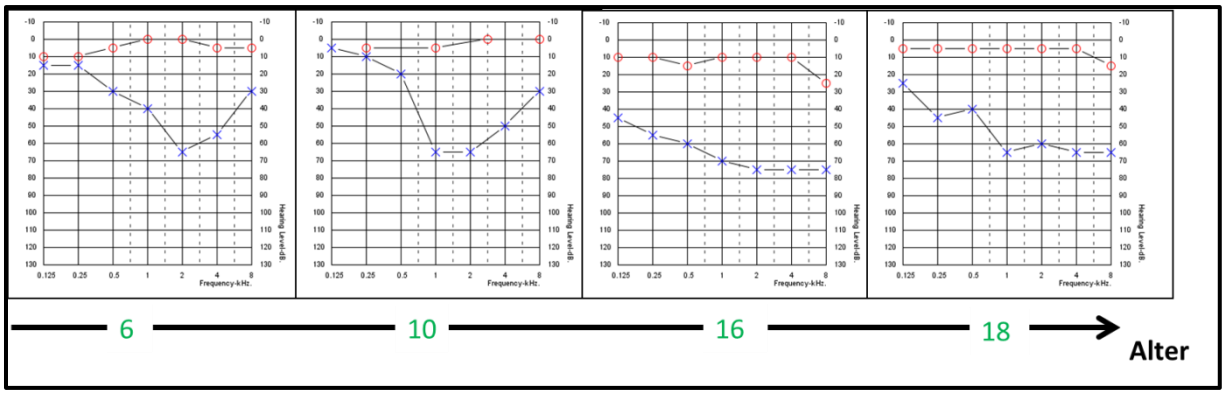



*Abb. 30: Audiogramme des Patienten II-3 G11 über einen Zeitraum von 12 Jahren. Das Alter zu jedem Audiogramm ist auf der Zeitachse unterhalb in grün angegeben. Die roten Kreise geben die Luftleitungsmessung des rechten Ohres an, die blauen Kreuze die Ergebnisse der Reinton-audiometrie des linken Ohres. Auf der X-Achse befindet sich die Frequenz in kHz, auf der Y-Achse der Hörverlust in dB.*

Anhand der Audiogramme wird deutlich, dass sich beim Patienten innerhalb von 12 Jahren die Hörstörung leicht verschlechterte. War sie am Anfang mild bis moderat und vor allem die hohen Frequenzen betroffen, wobei nur zwei Frequenzen einen moderaten Charakter aufwiesen, so zeigt sich nun eine moderate Hörstörung, die nun ebenfalls die tiefen Frequenzen mit einbezieht. Wie auch deutlich zu erkennen ist, bezieht sich die Hörstörung nur auf das linke Ohr. Im rechten Ohr zeigt der Patient Normakusis, das heißt er ist normalhörend. Der Patient ist als Einziger in der Familie betroffen, wie aus dem folgenden Stammbaum (Abb. 31) ersichtlich ist.

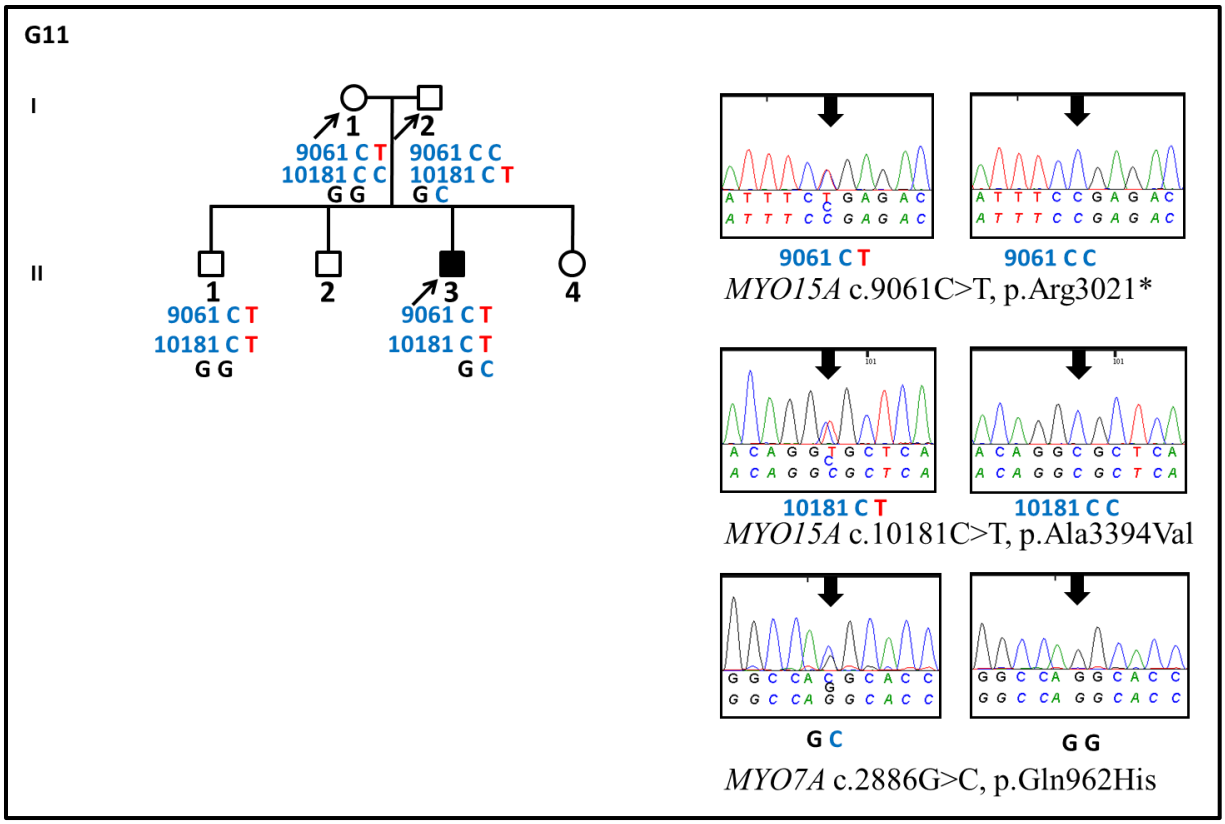



*Abb. 31: Stammbaum der Familie G11 mit einem sporadischen Fall eines Patienten mit unilateraler Hörstörung. Es wurden die Eltern und der Proband mittels des TruSight One Panel untersucht. Der Bruder wurde anschließend mit Hilfe von Sanger-Sequenzierung hinsichtlich der Varianten untersucht. Ebenfalls sind die Chromatogramme mit heterozygoter und wildtypischer Sequenz dargestellt. Der Genotyp jeder einzelnen Variante wurde im Stammbaum kenntlich gemacht.*

Eine Analyse hat zwei compound heterozygote Mutationen in *MYO15A*, einem rezessiven Hörstörungsgen, ergeben. Die Kombination dieser beiden Varianten konnte aber ebenfalls beim nicht-betroffenen Bruder nachgewiesen werden. Dadurch wurde erneut die Variantenliste überprüft und eine weitere heterozygote Variante in *MYO7A*-Gen untersucht. Diese wurde aufgrund einer familiären Filterung im Vorfeld ausgeschlossen. Diese Variante wies der gesunde Bruder nicht auf, so dass nur der betroffene Proband diese Akkumulation von den drei möglich pathogen-assoziierten heterozygoten Varianten aufwies (siehe Tab. 8).

*Tab. 8: Überblick der Variantenklassifizierung der Familie G11. Die folgende Tabelle enthält im Überblick, die Varianten in den betroffenen Genen, sowie eine Zusammenfassung der drei Vorhersageprogramme SIFT, MutationTaster und Polyphen-2, eine Einschätzung der Datenbank Deafness Variation Database (DVD) und das Vorkommen der jeweiligen Variante in der Populationsdatenbank gnomAD.*

| Gen | cDNA | Aminosäure-austausch | Vorhersage | DVD | gnomAD |
|---|---|---|---|---|---|
| **MYO15A** | c.9061C>T | p.Arg3021* | | Keine Info | no info |
| **MYO15A** | c.10181C>T | p.Ala3394Val | 3 x pathogen | Unbekannte Signifikanz | 110 x het, 0 x hom |
| **MYO7A** | c.2886G>C | p.Gln962His | 2 x pathogen | Unbekannte Signifikanz | 188 x het, 0 x hom |

Interessant ist dabei die Tatsache, dass beide Gene im Usher-Komplex miteinander assoziiert sind. Daher könnten sich die Varianten gegenseitig bedingen.

### 3.3.4 Genetische Disposition im Verdacht von einer Cytomegalovirus (CMV)-assoziierte Hörstörung

Der folgende Fall beschreibt, wie kritisch das Ausschlussverfahren bei genetischer Untersuchung betrachtet werden muss. Ein Patient mit einer Cytomegalovirus-Infektion bei seiner Geburt, die bekannt dafür ist eine Hörstörung auszulösen, wurde in die Studie mitaufgenommen. Die Eltern dieses Patienten der Familie G26 waren konsanguin, das heißt sie waren Cousin und Cousine ersten Grades und damit blutsverwandt. Das Kind zeigte eine sensorineurale, kongenitale, schwere bis an Taubheit grenzende Hörstörung auf beiden Ohren. Im Folgenden ist der Stammbaum der Familie G26 dargestellt (Abb. 32).

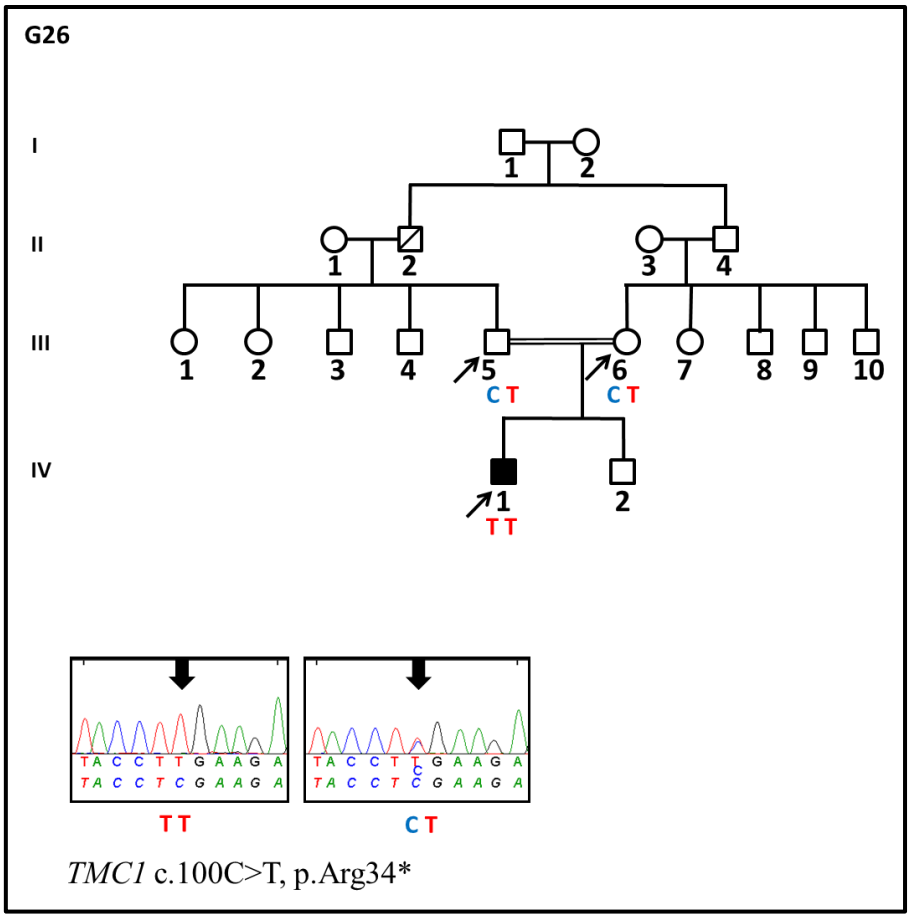



*Abb. 32: Stammbaum der Familie G26. Ein Patient mit kongenitaler, an Taubheit grenzender Hörstörung, der eine CMV Infektion aufwies, und seine Eltern wurden mittles TruSight One Panel untersucht (schwarze Pfeile). Ebenfalls sind die Chromatogramme in der Abbildung enthalten mit homozygoter und wildtypischer Sequenz. Der Genotyp wurde bei allen getesteten Probanden im Stammbaum kenntlich gemacht.*

Obwohl eine Cytomegalovirus-Infektion vorlag, konnte mit dieser bereits als pathogen beschriebenen homozygoten Variante *TMC1* c.100C>T, p.Arg34* der Klasse 5 nach Richards et al., 2015 [131] die Hörstörung des Patienten aufgeklärt werden. Es handelt sich hierbei um eine Stoppmutation, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese führt. Sie wird von mehreren Datenbanken wie DVD, HGMD (CM020519) und ClinVar als pathogen eingestuft und ist damit als kausal zu erachten. In der Literatur ist sie mit einer rezessiven Hörstörung assoziiert [132]. Details zu dieser Variante sind in Tabelle 11 im Anhang aufgelistet. *TMC1* ist ein bekanntes Hörstörungsgen, das für ein integrales Membranprotein kodiert, welches ein Teil der Mechanotransduktionskanäle der Haarzellen ist [133]. Es kann sowohl eine rezessive als auch eine dominante Hörstörung bedingen.

## 3.4 Der mehrdeutige Charakter von Hörstörungsfamilien mit syndromaler genetischer Ätiologie

Die vorliegenden Patienten wurden aufgrund einer nicht-syndromalen Hörstörung in diese Studie aufgenommen. Dennoch kam es in einigen Fällen zu Überschneidungen von syndromalen und nicht-syndromalen Hörstörungen. Diese können in zwei Kategorien eingeteilt werden: Zur ersten Kategorie gehören alle Fälle, die fälschlicherweise als nicht-syndromal eingestuft wurden, obwohl sie einen syndromalen Charakter aufwiesen, der durch erneute Konsultation der klinischen Information bestätigt werden konnte. Zur zweiten Kategorie zählen dagegen Fälle, bei denen tatsächlich nur eine nicht-syndromale Hörstörung vorliegt, jedoch die genetische Ätiologie ein Syndrom vermuten lässt.

### 3.4.1 Falsch-positive nicht-syndromale Hörstörungsfälle

Der erste Fall, der eine falsche Zuordnung aufwies, war eine autosomal dominant betroffene Familie mit drei betroffenen Familienmitgliedern. Diese wurden in einem Trioansatz mit Hilfe des TruSight One Panels untersucht. Der Stammbaum dieser Familie (G19) ist in der folgenden Abbildung 33 dargestellt.

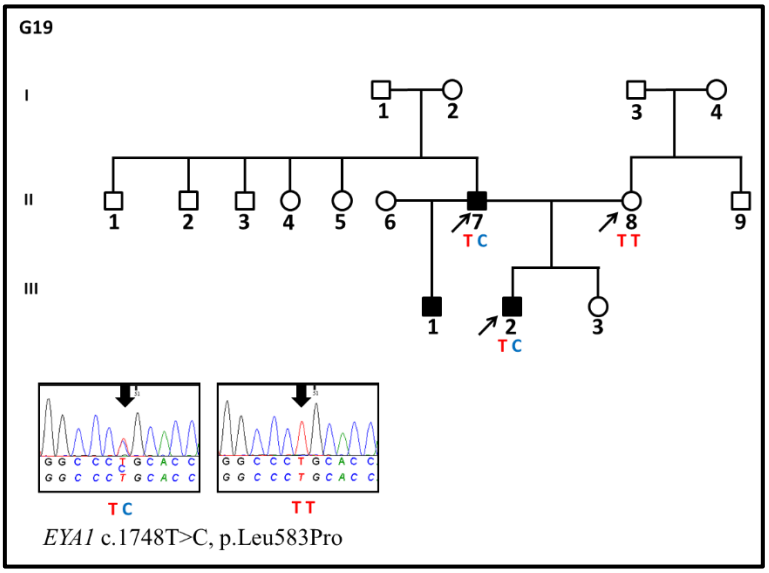



*Abb. 33: Stammbaum der Familie G19. Der betroffene Vater, der Indexpatient und die Mutter wurden im Trioansatz mit Hilfe des TruSight One Panels untersucht (schwarze Pfeile). Das Chromatogramm zeigt die ermittelten Varianten im EYA1-Gen. Der Genotyp ist bei allen getesteten Person angegeben.*

Die ermittelte heterozygote Variante im *EYA1*-Gen c.1748T>C, p.Leu583Pro ist eine pathogene Variante der Stufe 5 [131] und wurde von Vorhersageprogrammen (SIFT, MutatenTaster, PolyPhen-2) und Datenbanken (ClinVar, DVD und HGMD) als pathogen eingestuft [134]. *EYA1* ist ein syndromales Hörstörungsgen. Es ist in dominanter Form mit dem Branchio-oto-renalen Syndrom assoziiert und dieses, wie in der Einleitung erwähnt, zeigt Auffälligkeit hinsichtlich branchialer Fisteln und renaler Anomalien. Zur Bestätigung des Ergebnisses konnte nach Sichtung der klinischen Informationen diese Auffälligkeiten beim Sohn und Vater festgestellt werden und damit diese genetische Befundung validieren. Der Sohn wies eine gemischte Hörstörung auf, die prälingual auftrat und als moderat bis schwer angesehen werden kann. Beide Ohren waren asymmetrisch betroffen und es bestanden vor allem Schwierigkeiten beim Hören der hohen Frequenzen.

In den nächsten beiden Fällen konnte ebenfalls nach Sichtung der klinischen Informationen zusätzliche Phänotypen festgestellt werden. Deshalb konnte nach Ausschluss der klassischen nicht-syndromalen Hörstörungsgene jeweils eine Variante im *HUWE1*-Gen identifiziert werden. Diese Varianten sind noch nicht beschrieben worden, zeigen aber laut Vorhersageprogramme einen pathogenen Charakter. Das klinische Spektrum von pathogenen *HUWE1*-Varianten enthält unter anderem Hörstörungen. Jedoch kann diese genetische Veränderung noch nicht als Erklärung für die Phänotypen der beiden Patienten betrachtet werden, da keine Segregationsanalyse möglich war und noch keine zusätzlichen Informationen zur Einschätzung der Pathogenität zur Verfügung standen.

Die beiden Fälle werden im Einzelnen nun vorgestellt. Der betroffene Proband der Familie G41 zeigt Anzeichen des VACTERL-Syndroms. VACTERL steht für das Akronym vertebrale Anomalien, anale und aurikuläre Anomalien, Herzfehler, tracheo-ösophageale Fisteln, Ösophagusatresie, renale Fehlbildung und Fehlbildungen der Gliedmaßen (OMIM: %192350) [105]. Bei dem Patienten ist eine Syndaktylie von Zehe 2 und 3, distal rotierte Ohren, Sprachverzögerungen, fleckige Depigmentierung der Haut, eine Analatresie, Kleinwuchs und Astigmatismus bekannt. Im der nachfolgenden Abbildung ist der Stammbaum dieser Familie dargestellt (Abb. 34).

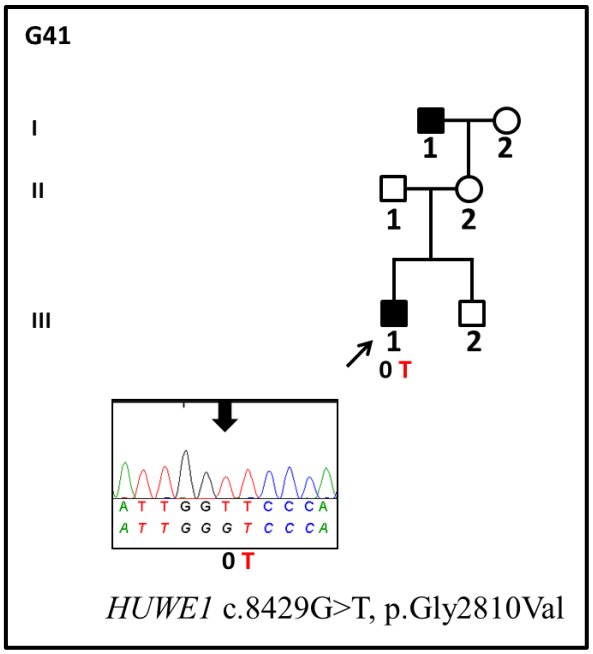



*Abb. 34: Stammbaum der Familie G41 mit zwei betroffenen Patienten. Der mit Pfeil markierte Proband wurde mit Hilfe einer Exom-Analyse untersucht. HUWE1 liegt auf dem X-Chromosom, infolgedessen ist der Sohn hemizygot von der Variante HUWE1 c.8429G>T, p.Gly2810Val betroffen. Dies wird dargestellt durch eine Null, welche für das fehlende X-Chromosom steht, und der Variante T. Das Chromatogramm der Variante ist ebenfalls dargestellt.*

Diese Variante ist bis dato noch nicht beschrieben worden. Ein Vorhersageprogramm stuft sie als pathogen ein, ein anderes als benigne. Es sind auch noch keine hemizygoten Träger bekannt. Im klinischen Spektrum von *HUWE1* sind geistige Behinderungen, Entwicklungsverzögerung, Hypotonie und Sprachverzögerungen sehr häufig aufgeführt. In ca. der Hälfte der Fälle sind auch Mikrozephalie, Epilepsie, Gehirnfehlbildungen, skelettale Anomalien, wie überlappende Zehen, Kleinwuchs und distal rotierte Ohren beschrieben. In ca. einem Viertel der Fälle zeigen sich auch Hörstörungen, Schlafstörungen und Hyperaktivität. Zudem sind auch Ernährungsprobleme aufgelistet [135]. In einigen Fällen konnten Übereinstimmungen der Patienten-Symptome und dem *HUWE1*-Spektrum festgestellt werden, wie z.B. skelettale Anomalien, Kleinwuchs, distal rotierende Ohren, Sprachverzögerungen sowie Hörstörung. Dagegen sind die Hautaufälligkeiten und die fehlende geistige Behinderung keine bekannten Phänotypen, die mit *HUWE1* in Verbindung gebracht werden können.

Der zweite vorliegende Fall der Familie G64 ist sporadisch aufgetreten. Der betroffene Patient zeigt Anzeichen eines Goldenhar-Syndroms (facio-auriculo-vertebral). Bei diesem Syndrom

treten die Symptome einseitig auf. Hierzu zählen Fehlbildungen des Ohres, kraniofaziale Mikrosomie mit Fehlbildung der Augen und einseitiger Wachstumsstörung des Gesichtes sowie Wirbelsäulenanomalien [136]. Der hier beschriebene Patient weist einen Hydrozephalus, bilateral intrakraniale Fibrolipome, Spina bifida, muskuläre Hypotonie, Strabismus und eine Mondini-Fehlbildung auf. Zudem zeigt er eine schwerwiegende mentale Retardierung sowie zerebrale Fehlbildungen. Der Stammbaum der Familie G64 ist in Abbildung 35 dargestellt.

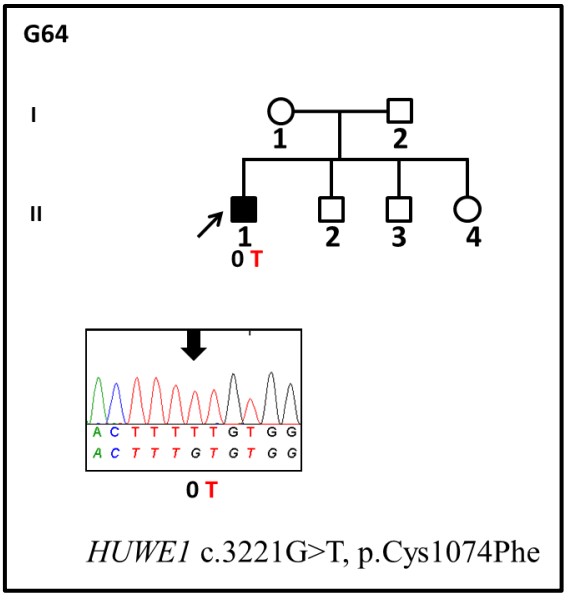



*Abb. 35: Stammbaum der Familie G64. Der Indexpatient (schwarzer Pfeil) wurde mit einer Exom-Analyse untersucht. Der Patient ist hemizygot für die Variante HUWE1 c.3221G>T, p.Cys1074Phe. Dies wird dargestellt durch eine Null, die für das fehlende X-Chromosom steht, und die Variante T. Das Chromatogramm der Variante ist ebenfalls dargestellt.*

Diese Variante c.3221G>T, p.Cys1074Phe im *HUWE1*-Gen ist im Gegensatz zur ersten Variante von zwei Vorhersageprogrammen als pathogen eingestuft worden und zeigt auch eine hohe Konservierung des Nukleotids. In gnomAD ist diese Variante noch nicht beschrieben worden, welches die Pathogenität dieser Variante unterstützt. Jedoch liegen auch hier keine weiteren Informationen vor, die die Pathogenität bestätigen könnten. Der Phänotyp dieses Patienten zeigt allerdings viele Übereinstimmungen mit dem Spektrum von *HUWE1*-assoziierten Erkrankungen im Gegensatz zu Familie G41. Sowohl die mentale Retardierung als auch die muskuläre Hypotonie und die Hörstörung würden die These der Pathogenität dieser Variante unterstützen. Dies kann jedoch nur mit Hilfe von Segregationsanalysen abschließend geklärt werden, was aufgrund fehlenden Materials nicht möglich war.

### 3.4.2 Nicht-syndromale Hörstörungen mit syndromaler Ätiologie

Im Folgenden werden nun Fälle vorgestellt, die eine nicht-syndromale Hörstörung aufwiesen, aber genetisch ein Syndrom zugrunde liegen müsste bzw. könnte.

#### 3.4.2.1 Versteckte Syndrome

In den ersten beiden Fällen wurde nur eine nicht-syndromale Hörstörung detektiert. Bei beiden Indexpatienten konnten jedoch Varianten in Genen detektiert werden, die mit dem Perrault- Syndrom assoziiert sind. Ein dritter Patient zeigt eine Variante, die mit dem Jervell-Lange-Nielson-Syndrom assoziiert wurde. In der anschließenden Abbildung 36 ist der Stammbaum der Familie E44 dargestellt.

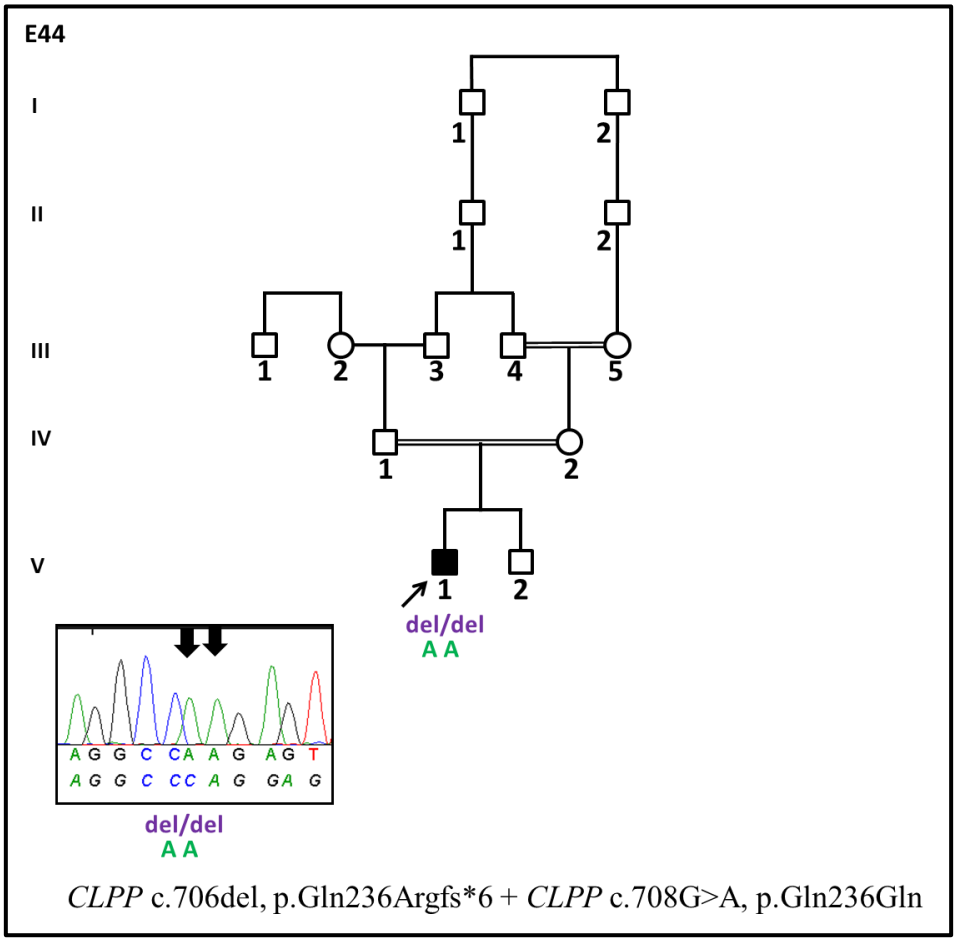



*Abb. 36: Stammbaum der Familie E44. Das Exom des betroffenen Indexpatienten wurde analysiert und anschließend wurden die Varianten validiert. Das Validierungsergebnis wurde im Chromatogramm festgehalten und der Genotyp beschrieben.*

Die homozygoten Varianten *CLPP* c.706del, p.Gln236Argfs*6 und c.708G>A, p.Gln236Gln sind noch nicht beschrieben worden. Jedoch führt die Variante c.706del zu einem vorzeitigen Stoppcodon und damit zu einer verkürzten Proteinsynthese. Sie ist weder in der Deafness Variation Database noch in genomAD berichtet worden Aufgrund ihrer Seltenheit und weil es sich um eine Stoppmutation handelt, kann sie als wahrscheinlich pathogen eingestuft werden. Weiterhin ist die Variante mit einem rezessiven Perrault-Syndrom assoziiert worden. Bei der folgenden Variante *CLPP* c.708G>A, p.Gln236Gln handelt es sich um eine synonyme Variante, die zu keinem Aminosäureaustausch führt. Es konnten keine Auswirkungen dieser Variante ermittelt werden. Klinische Daten liegen nicht vor, so dass eine Korrelation vom Phänotyp zu Genotyp nicht gezogen werden konnte.

In der nächsten Abbildung 37 ist der Stammbaum der Familie E71 zu erkennen.

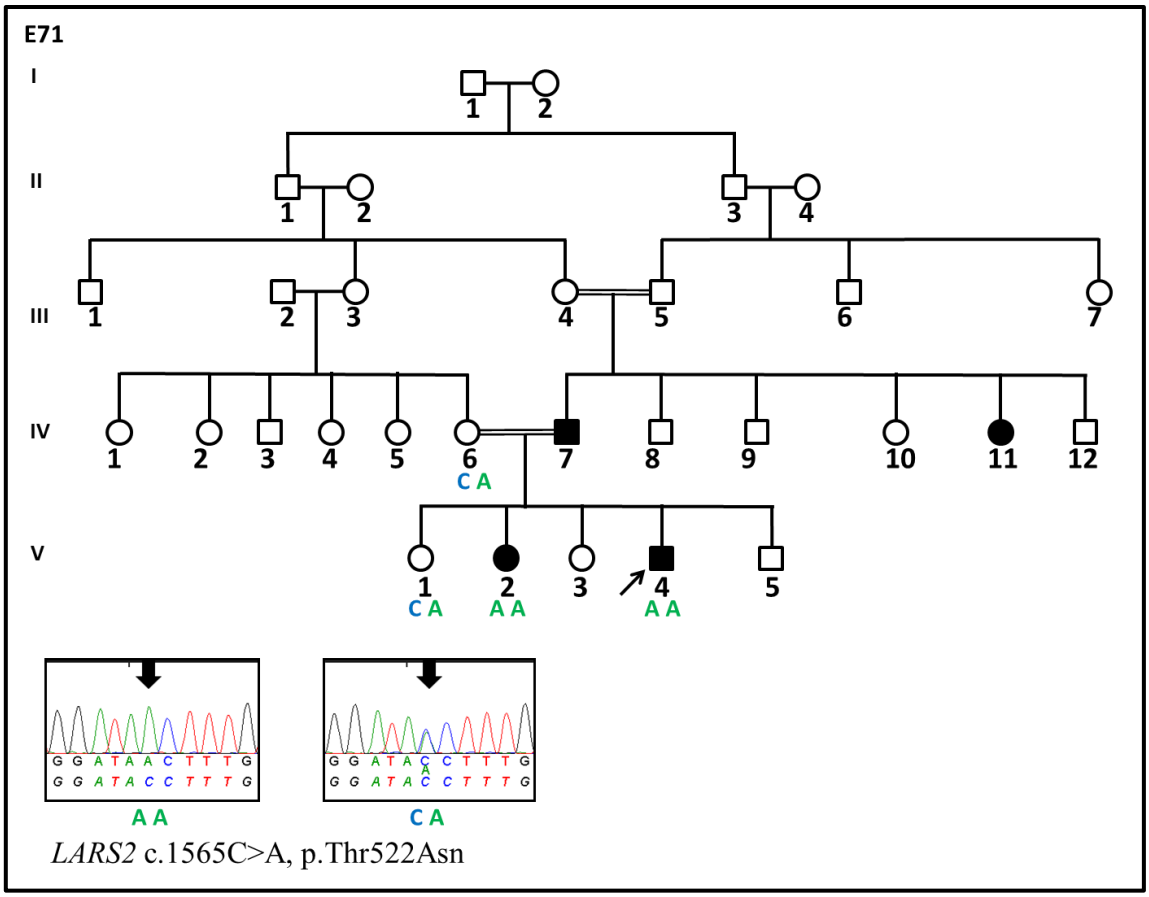



*Abb. 37: Stammbaum der Familie E71. Hier wurde das Exom des betroffene Indexpatienten analysiert. Es erfolgte außerdem eine Segregationsanalyse, deren Ergebnisse allen untersuchten Probanden zugeordnet wurden. Das Chromatogramm zeigt sowohl die homozygote als auch die heterozygote Sequenz der Variante LARS2 c.1565C>A, p.Thr522Asn.*

Die homozygote Variante c.1565C>A, p.Thr522Asn im *LARS2*-Gen wird von Vorhersageprogrammen als krankheitsverursachend eingestuft und ist in den Datenbanken DVD, HGMD (CM132509) und ClinVar als pathogen charakterisiert worden und in der Literatur bereits beschrieben [137]. Diese Variante ist kausal für das Pendred-Syndrom und wird als rezessiv beschrieben. Der Patient hat eine sensorineurale, schwerwiegende Hörstörung, die die tiefen und mittleren Frequenzen umfasst. Die Hörstörung ist bilateral asymmetrisch, war schon bei Geburt vorhanden und verläuft progressiv. Eine Segregationsanalyse unterstützt den pathogenen Charakter der c.1565C>A Variante in *LARS2*, da sie bei der betroffenen Schwester V-2 ebenfalls homozygot vorhanden ist, sowie die nicht-betroffene Schwester V-1 diese heterozygot zeigt. Die Mutter IV-6 ist

Anlageträgerin für diese Variante. Vom betroffenen Vater IV-7 konnte kein Material gewonnen werden und eine erweiterte Segregationsanalyse steht daher noch aus.

Bei beiden genannten betroffenen Patienten wurde von einer isolierten Hörstörung ausgegangen, aber eine kausale Variante in Genen gefunden, die mit dem Perrault- bzw. Pendred-Syndrom in Verbindung stehen. Dieses weist jedoch nur bei Frauen ein sekundäres Symptom auf.

Ebenfalls wurde eine Variante in einem Gen gefunden, das mit dem Jervell-Lange-Nielson-Syndrom assoziiert ist. Hier lag ebenfalls nur eine nicht-syndromale Hörstörung vor ohne Verdacht auf eine weitere Symptomatik. Nachfolgend ist der Stammbaum der Familie E36 dargestellt (Abb. 38).

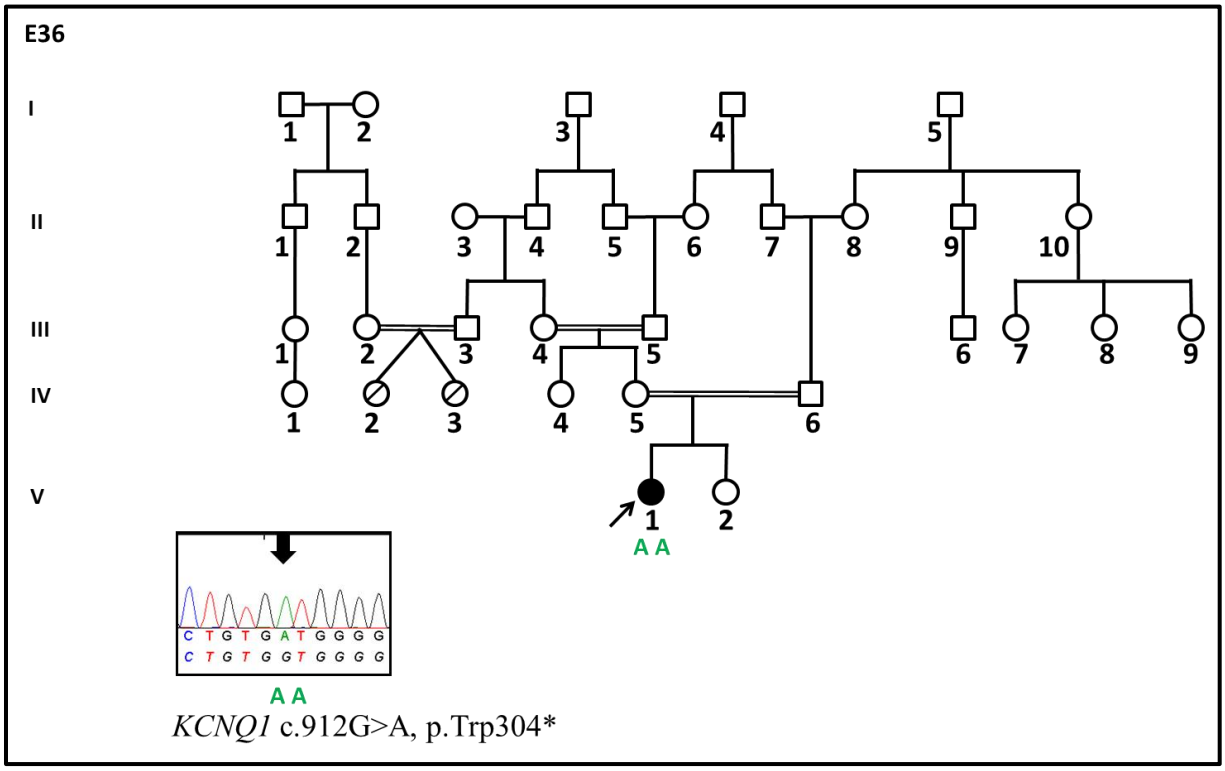



*Abb. 38: Stammbaum der Familie E36. Das Exom des betroffenen Indexpatienten wurde analysiert. Eine Segregationsanalyse konnte nicht durchgeführt werden. Angezeigt wird die Validierung der Variante KCNQ1 c.912G>A, p.Trp304* durch ein Chromatogramm und die Darstellung des Genotyps.*

Die homozygote Nonsense-Variante *KCNQ1* c.912G>A, p.Trp304* führt zu einem Stopp während der Proteinsynthese. Die beschriebene Variante ist noch nicht in der Literatur berichtet worden, ist sogar in genomAD nicht notiert und damit als selten zu erachten. Dies

sind Eigenschaften, für die diese Variante als wahrscheinlich pathogen klassifiziert werden kann.. Varianten im *KCNQ1*-Gen sind in dominanter Form mit dem Long-QT-Syndrom assoziiert, während homozygote bzw. compound heterozygote Varianten mit dem Jervell-Lange-Nielson-Syndrom in Zusammenhang stehen. Beim Jervell-Lange-Nielson-Syndrom zeigt sich ein Herzproblem in Belastungssituationen, so dass Kinder in erster Linie eine Hörstörung aufweisen

#### 3.4.2.2 Mit einem Syndrom assoziierte Varianten bzw. Genvarianten ohne weiteren Phänotyp

Die anschließenden zwei Fälle zeigen Varianten im *SLC26A4*-Gen, die aufgrund von Literatur und Datenbanken mit dem Pendred-Syndrom assoziiert sind. Bei den Patienten selbst konnte weder eine Kropfbildung noch eine Hyperthyreose, eine Schilddrüsenüberfunktion, festgestellt werden. In Abbildung 39 ist der Stammbaum der Familie G13 aufgezeigt.

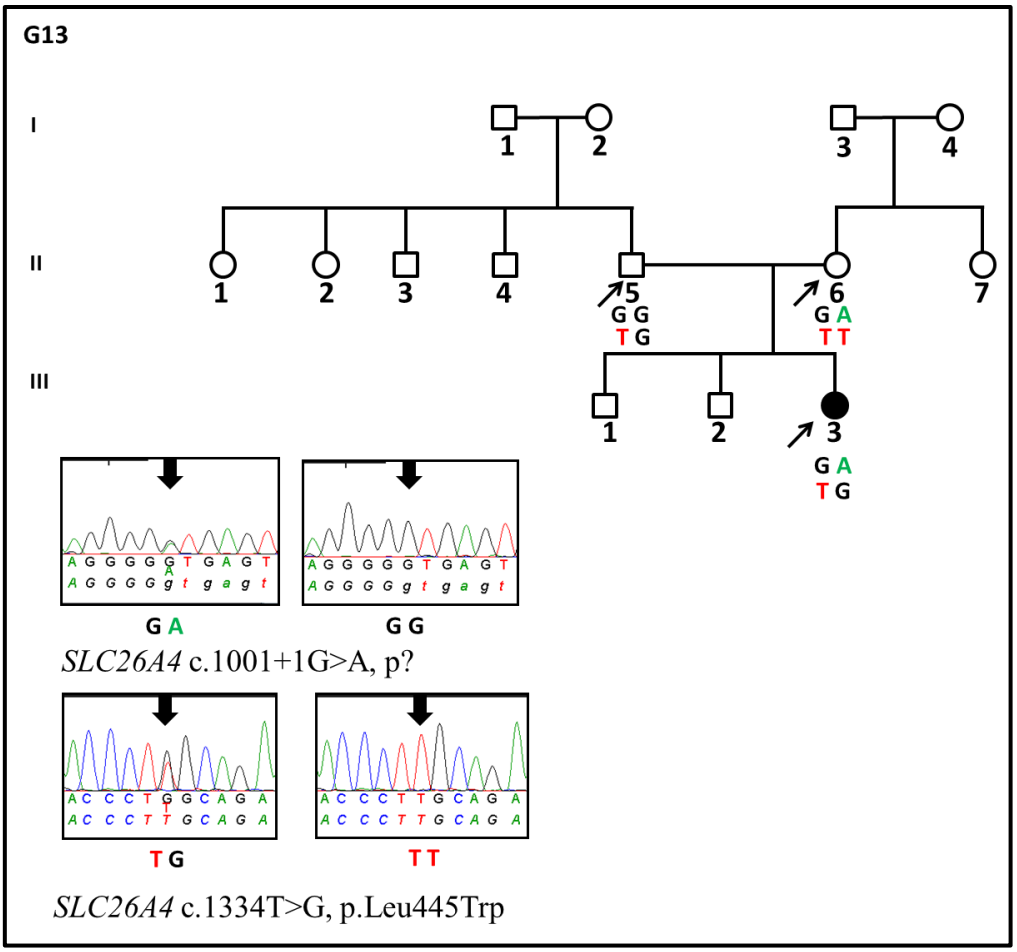



*Abb. 39: Stammbaum der Familie G13. Es wurde eine Trio-Analyse der betroffenen Tochter und ihrer Eltern (schwarze Pfeile) mittels des TruSight One Panels durchgeführt. Die identifizierten Varianten wurden mit einer Sanger-Sequenzierung validiert. Die entsprechenden Chromatogramme sind in heterozygoter und wildtypischer Form aufgeführt. Der entsprechende Genotyp ist ebenfalls bei den Patienten dargestellt.*

Die Varianten im *SLC26A4*-Gen liegen compound heterozygot vor, welches durch eine Testung der Eltern bestätigt werden konnte. Beide sind als pathogen anhand der Datenbanken (DVD, HGMD (CS982315, CM981506) und ClinVar) charakterisiert und sind ursächlich für ein Pendred-Syndrom. In gnomAD sind keine homozygoten Träger bekannt. Vor allem die Variante *SLC26A4* c.1001+1G>A, p? ist schon bei mehreren Pendred-Syndrom-Patienten beschrieben worden und unterstreicht damit den kausalen Charakter [138]. Dasselbe trifft auf die zweite Variante, c.1334T>G, p.Leu445Trp, zu, die ebenfalls schon in zwei großen konsanguinen Familien mit Pendred-Syndrom-Patienten beschrieben worden ist [139]. Zusätzlich konnte mit Hilfe eines In-Vitro-Assays ein Funktionsverlust durch die Mutation festgestellt werden [140]. Damit sind die Varianten als Klasse 5 nach Richards et al., 2015

[131] einzustufen. Obwohl die Varianten nachweislich ein Pendred-Syndrom bedingen, konnte bei der Patientin kein vergrößertes vestibulares Aquädukt, keine Schilddrüsenüberfunktion und auch keine Kropfbildung festgestellt werden. Die Patientin zeigte lediglich eine sensorineurale prälinguale, moderate bis schwerwiegende, asymmetrische Hörstörung, die vor allem Tieftonfrequenzen betrifft. Es konnte kein progressiver Verlauf festgestellt werden.

Der nächste Fall beschreibt einen erwachsenen Mann, der ebenfalls keine Symptomatik des Pendred-Syndroms aufweist. Er hat eine sensorineurale Schwerhörigkeit, die prälingual auftrat und als moderat bis schwer eingestuft werden kann. Nachfolgend ist in Abbildung 40 der Stammbaum der Familie dargestellt.

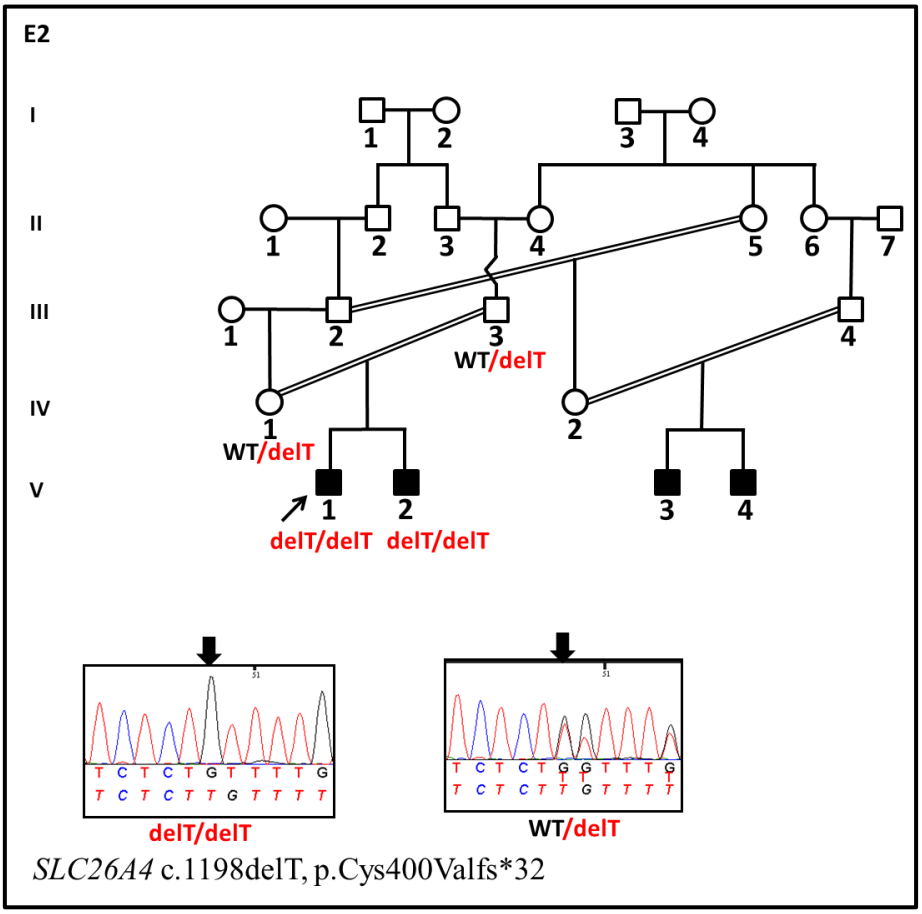



*Abb. 40: Stammbaum der Familie E2. Der Indexpatient wurde mit dem TruSight One Panel untersucht (schwarzer Pfeil). Die detektierte Variante wurde mit Sanger-Sequenzierung validiert und eine Segregationsanalyse durchgeführt. Die Chromatogramme zeigen die homozygote sowie die detektierte heterozygote Veränderung bei den Eltern. Der Genotyp ist bei jeder untersuchten Person angegeben.*

Die homozygote Variante c.1198delT im Gen *SLC26A4* wird als pathogen von den Datenbanken ClinVar, HGMD (CD972380) und DVD beschrieben. Sie ist mit dem Pendred-Syndrom assoziiert und mehrmals im Zusammenhang mit dem Syndrom berichtet worden [141]. Die beschriebene Variante ist in gnomAD nicht hinterlegt, aber führt aufgrund der Deletion zu einem Frameshift, dadurch zu einem vorzeitigen Stopp der Protein-Synthese und kann damit als Klasse 5 Variante kategorisiert werden [131]. Auch hier würde erwartet werden, dass aufgrund der genetischen Ätiologie sich phänotypisch ein Pendred-Syndrom beim Patienten ausbildet, jedoch konnte auch bei diesem keine Anzeichen hiervon bestätigt werden.

Das mit dem Usher-Syndrom assoziierte Gen *ADGRV1* konnte bei einer Familie als krankheitsverursachend für eine Hörstörung identifiziert werden. Ein okularer Phänotyp konnte aber bei keiner der beiden Patientinnen nachgewiesen werden. In Abbildung 41 ist der Stammbaum dieser Familie dargestellt.

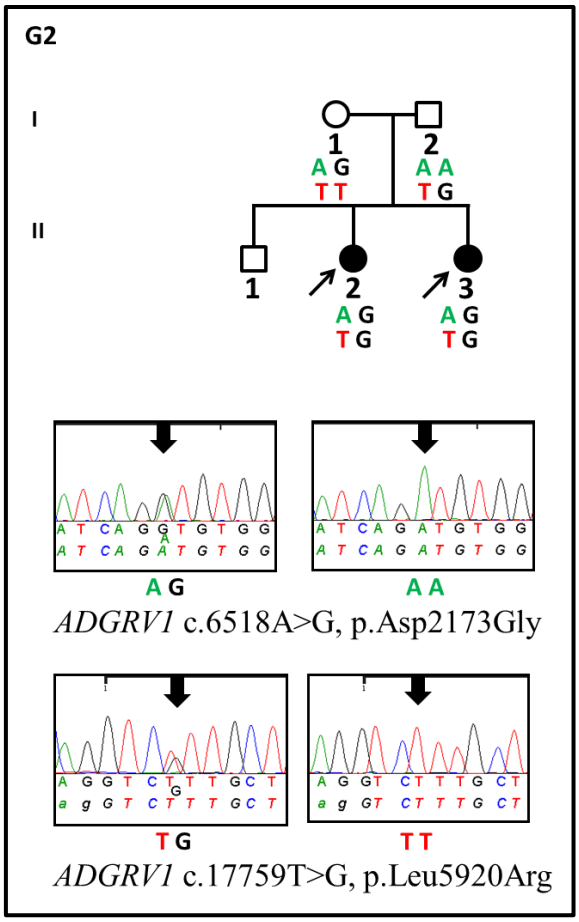



*Abb. 41: Stammbaum der Familie G2. Die beiden Indexpatientinnen (schwarze Pfeile) wurden mit dem TruSight Exome Panel (Illumina) untersucht, das ca. 2.700 Gene umfasst. Der compound heterozygote Charakter der beiden Varianten wurde durch eine Segregationsanalyse bestätigt. Die Eltern sind Anlageträger für jeweils eine der beiden Varianten im ADGRV1-Gen. Die Chromatogramme sind in heterozygoter und wildtypischer Sequenz aufgeführt. Der Genotyp ist bei den Patientinnen und den Eltern hinterlegt.*

Weder die Variante im rezessiven Gen *ADGRV1* c.6518A>G, p.Asp2173Gly, noch die Variante c.17758T>G, p.Leu5920Arg sind in der Literatur beschrieben worden, werden aber von Vorhersageprogrammen als pathogen eingestuft. Zusätzlich ist die Variante c.17758T>G mit unbekannter Signifikanz in der DVD-Datenbank notiert. Durch die Bestätigung der Segregationsanalyse kann diese Variante als wahrscheinlich pathogen angesehen werden.

Obwohl ein Usher-Syndrom zu erwarten wäre, zeigt keine der Patientinnen eine phänotypische Auffälligkeit. Dies kann nun an zwei Gründen liegen. Zum einen könnte sich der Augenphänotyp erst im späteren Lebensalter ausbilden, zum anderen könnten die beiden Varianten nur mit einer nicht-syndromalen Hörstörung assoziiert sein, da einige Varianten in

diesem Gen schon mit einer isolierten Hörstörung beschrieben worden sind (63) [102]. Die Hörstörung der beiden Patientinnen ist sensorineural und moderat, trat kongenital bzw. prälingual auf und betrifft die mittleren und hohen Frequenzen.

### 3.4.2.2 Ein komplexer Usher-Fall ohne Augenphänotyp

Das anschließende Beispiel präsentiert einen sehr komplexen Fall, der mehrere Komponenten dieser Arbeit beinhaltet. Zum einen sind mehrere krankheitsverursachende Varianten detektiert worden. Zum anderen handelt es sich um Gene, die mit einer syndromalen Form einer Hörstörung assoziiert sind. Die Patientin weist dagegen keine phänotypischen Eigenschaften eines Syndroms auf. Zusätzlich zeigt dieser Fall auch eine familiäre Heterogenität, da die betroffenen Probanden Unterschiede in der Schwere der Hörstörung zeigen. In der nachfolgenden Abbildung 42 ist der Stammbaum dieser Familie dargestellt.

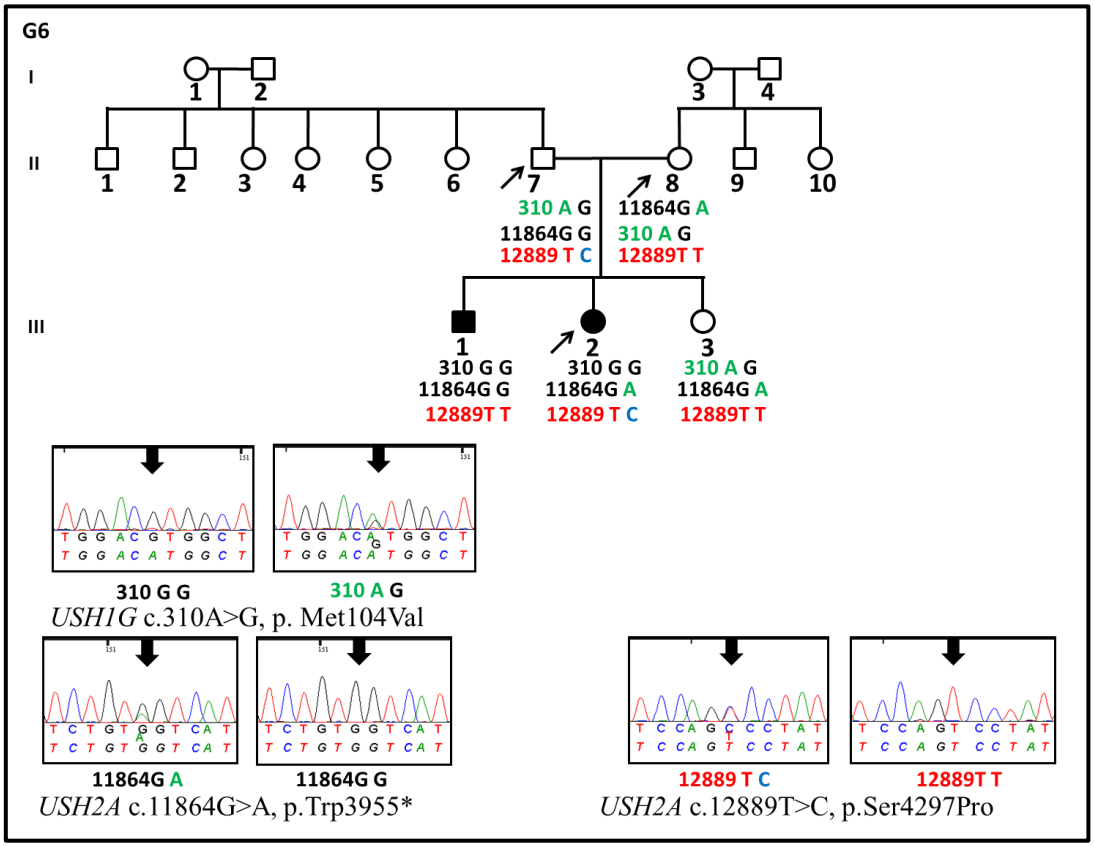


*Abb. 42: Stammbaum der Familie G6. Die Indexpatientin und ihre Eltern wurden mit dem TruSight One Panel untersucht (schwarze Pfeile). Des Weiteren wurde der betroffene Bruder und die nicht betroffene Schwester hinsichtlich der Varianten analysiert. Die Chromatogramme stellen die detektierten Basensubstitutionen in homozygoter und heterozygoter Form dar. Zusätzlich sind auch die wildtypischen Chromatogramme aufgezeigt. Die Segregation der Varianten ist in Form ihres Genotyps bei allen getesteten Familienmitgliedern dokumentiert.*

Die homozygote Variante im *USH1G*-Gen c.310A>G, p.Met104Val ist in der Literatur compound heterozygot mit einer isolierten Hörstörung beschrieben worden [142]. Es handelt sich um eine Missense-Variante, die von den Datenbanken DVD und HGMD (CM149898) als pathogen eingestuft worden ist. Diese homozygote Variante konnte sowohl bei der betroffenen Indexpatientin und beim betroffenen Bruder festgestellt werden. Jedoch zeigt der Bruder einen milderen Phänotyp. Seine Hörstörung offenbarte sich mit ca. 16 Jahren, ist postlingual, und wurde als mild klassifiziert. Die Indexpatientin zeigt eine moderate Hörstörung, die prelingual auftrat und die mittleren und hohen Frequenzen involviert. Möglicherweise lässt sich dies durch die compound heterozygoten Varianten erklären, die im *USH2A*-Gen identifiziert worden sind. Die Variante *USH2A* c.11864G>A, p.Trp3955* ist eine Nonsense-Variante, die in DVD und HGMD als pathogen eingestuft worden ist[102, 143]. Zwischenzeitlich war sie als benigne in DVD eingestuft, so dass sich eine finale Einschätzung der Variante als schwierig erweist. Die dritte Variante *USH2A* c.12889T>C, p.Ser4297Pro ist in keiner Datenbank bis jetzt beschrieben worden. In DVD wurde sie ebenfalls als „likely benign“ eingestuft, aber dieser Vorgang wurde wieder rückgängig gemacht. Sie wird von Vorhersageprogrammen als pathogen charakterisiert. Während für die Variante USH2A c.12889T>C noch keine homozygoten Träger bekannt sind, wurde die Variante c.11864G>A 1 x homozygot in gnomAD beschrieben. Daher könnten diese beiden compound heterozygoten Varianten für den Unterschied im Phänotyp von betroffenem Bruder zur betroffenen Schwester verantwortlich sein. Die nicht betroffene Schwester zeigt die Variante in *USH1G* und die Variante *USH2A* c.11864G>A heterozygot. Die Segregation unterstützt die These, dass für die Indexpatientin die Konstellation beider betroffener Usher-Gene für die unterschiedlichen Phänotyp verantwortlich sein könnte.

## 3.5 INTRAFAMILIÄRE HETEROGENITÄT

Familiäre Locus-Heterogenität ist in fünf Familien aufgetreten. In diesen Familien trägt mehr als eine pathogene Variante in einem Gen zu der familiären Hörstörung bei. Dies betraf in erster Linie Familien aus dem Iran. Jede Familie wird im Einzelnen vorgestellt. Zum Schluss wird ein Patient vorgestellt, bei dem durch zwei familiäre Mutationen in einem Gen eine compound heterozygote Form einer Hörstörung verursacht wird.

### 3.5.1 FAMILIÄRE LOCUS-HETEROGENITÄT

Die erste Familie zeichnet sich durch zwei betroffene Cousinen aus. Sie sind unterschiedlich schwer betroffen. Die Probandin IV-2 präsentiert eine moderate bis schwere Hörstörung, die bilateral, aber asymmetrisch detektiert werden konnte. Die Hörstörung ist prälingual und zusätzlich zeigte die Patientin IV-2 Epilepsie. Sie ist 10 Jahre alt und zeigt keine weiteren Symptome. Ihre Cousine IV-3 ist 9,5 Jahre alt und weist eine kongenitale, bilateral und sensorineurale Hörstörung auf, die schwer bis an Taubheit grenzend einzustufen ist und progressiv verläuft. Im Folgenden ist der Stammbaum dieser Familie dargestellt (Abb. 43).

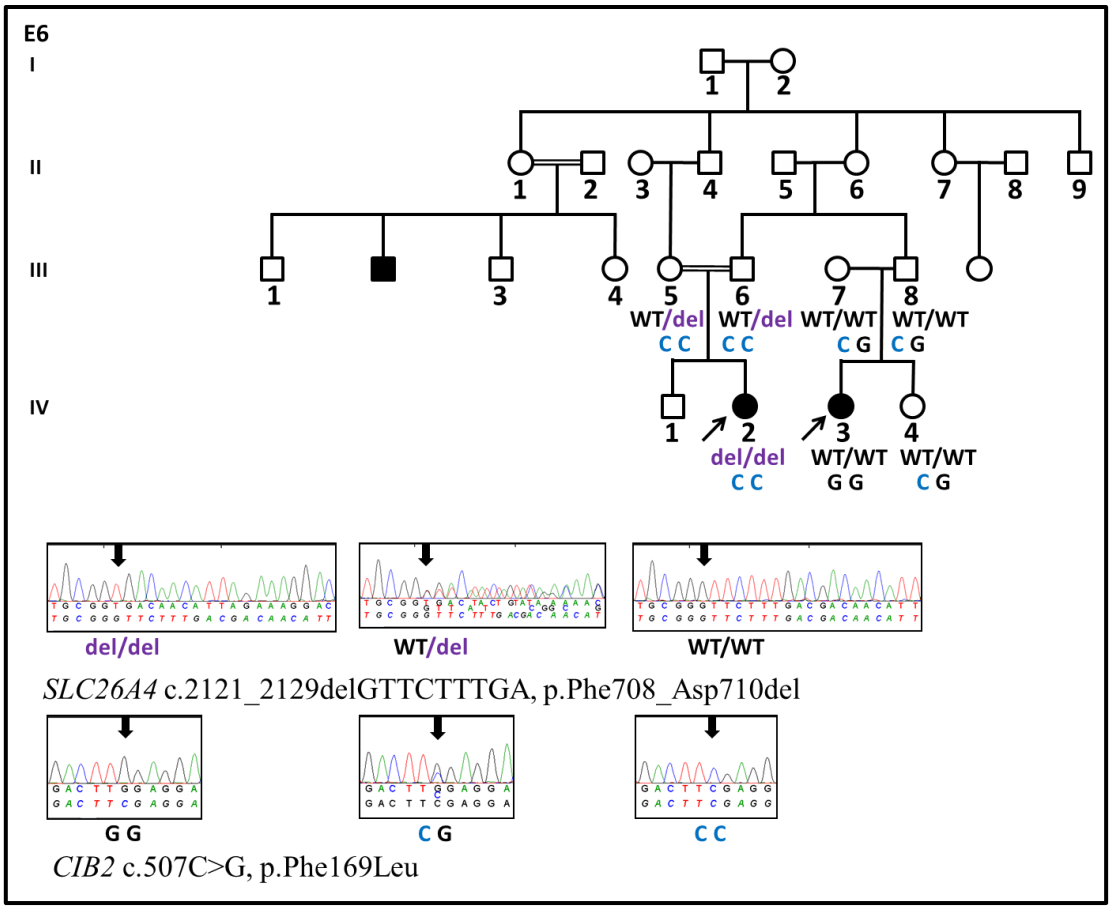



*Abb. 43: Stammbaum der Familie E6. Die mit schwarzem Pfeil markierten Patientinnen wurden mit einer Exom-Sequenzierung analysiert. Bei beiden Patientinnen konnte eine pathogene Variante ermittelt werden. Die Segregationsanalyse ist als Genotyp bei allen untersuchten Patienten hinterlegt. Die Chromatogramme für die pathogenen Varianten sind ebenfalls dargestellt, sowohl in homozygoter, heterozygoter und wildtypischer Sequenz.*

Die Deletion im *SLC26A4*-Gen ist noch in keiner Datenbank bekannt und daher als selten anzusehen. Da sie zu einer Deletion mehrerer Aminosäuren führt und in der Familie segregiert, kann sie wahrscheinlich als pathogen eingestuft werden. Direkt neben der Deletion befindet sich zudem ein homozygoter Austausch von c.2130C>T, p.Asp710Asp, welcher als benigner Polymorphismus in ClinVar annotiert ist. Die homozygote Variante im rezessiven Gen *CIB2* c.507C>G, p.Phe169Leu wird von Vorhersageprogrammen als pathogen klassifiziert. Darüber hinaus ist nichts bekannt. Sie ist vermutlich als selten anzusehen, da sie auch nicht in gnomAD zu finden ist. Aufgrund der Segregation kann diese Variante auch als wahrscheinlich pathogen angesehen werden.

Die Familie E70 ist ebenfalls von einer familiären Locus-Heterogenität betroffen. Die Indexeltern haben jeweils eine andere Gen-assoziierte Hörstörung. In der Familie ist eine sensorineurale, bilaterale, kongenitale Hörstörung beschrieben, die alle Frequenzen betrifft, progressiv verläuft und als taub bzw. an Taubheit grenzend eingestuft werden muss. Nachfolgend ist der Familienstammbaum dargestellt (Abb. 44).

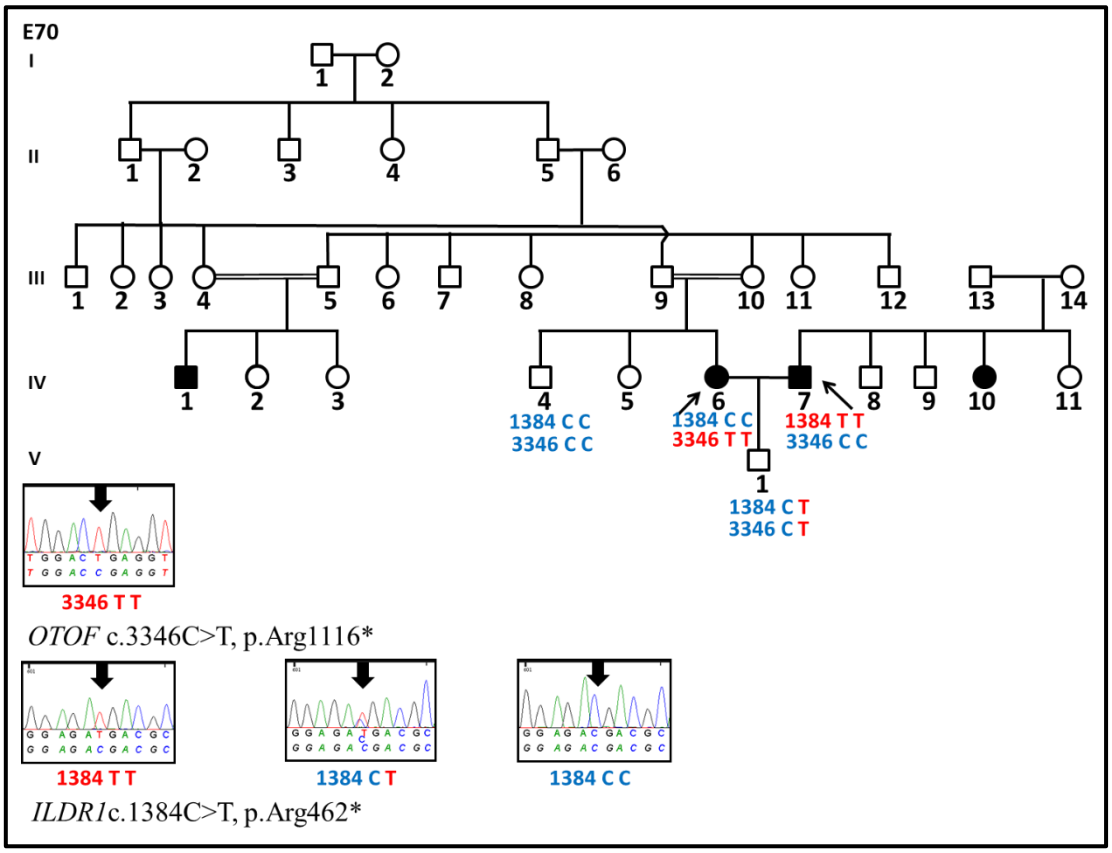



*Abb. 44: Stammbaum der Familie E70. Die Indexeltern wurden mit Hilfe einer Exom-Analyse sequenziert. Die gefundenen Varianten wurden per Sanger-Sequenzierung validiert und es wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt. Der Genotyp aller getesteten Probanden wurde im Stammbaum hinterlegt. Die Chromatogramme der beiden Varianten sind in homozygoter, heterozygoter und wildtypischer Sequenz aufgeführt.*

Die homozygote Stoppmutation im rezessivem *OTOF*-Gen c.3346C>T, p.Arg1116* ist noch nicht beschrieben worden und in keiner Datenbank, auch nicht in gnomAD notiert. Aufgrund ihrer Seltenheit und der Segregation ist sie als wahrscheinlich pathogen einzustufen. Die zweite homozygote Stoppmutation im rezessiven *ILDR1*-Gen c.1384C>T, p.Arg462* ist in der Literatur unbekannt, aber in der Deafness Variation Database mit unbekannter Signifikanz klassifiziert. Es gibt keine homozygoten Träger für diese Variante in gnomAD. Daher kann

hier auch aufgrund der Segregation von einer wahrscheinlich pathogenen Variante ausgegangen werden.

Eine weitere Familie zeigt mehrere betroffene Probanden, die unterschiedliche Genotypen aufweisen. In dieser Familie ist eine sensorineurale, moderate bis schwere Hörstörung von Geburt an vorhanden, die die hohen Töne umfasst und stabil ist. In der anschließenden Abbildung 45 ist der Stammbaum dieser Familie dargestellt.

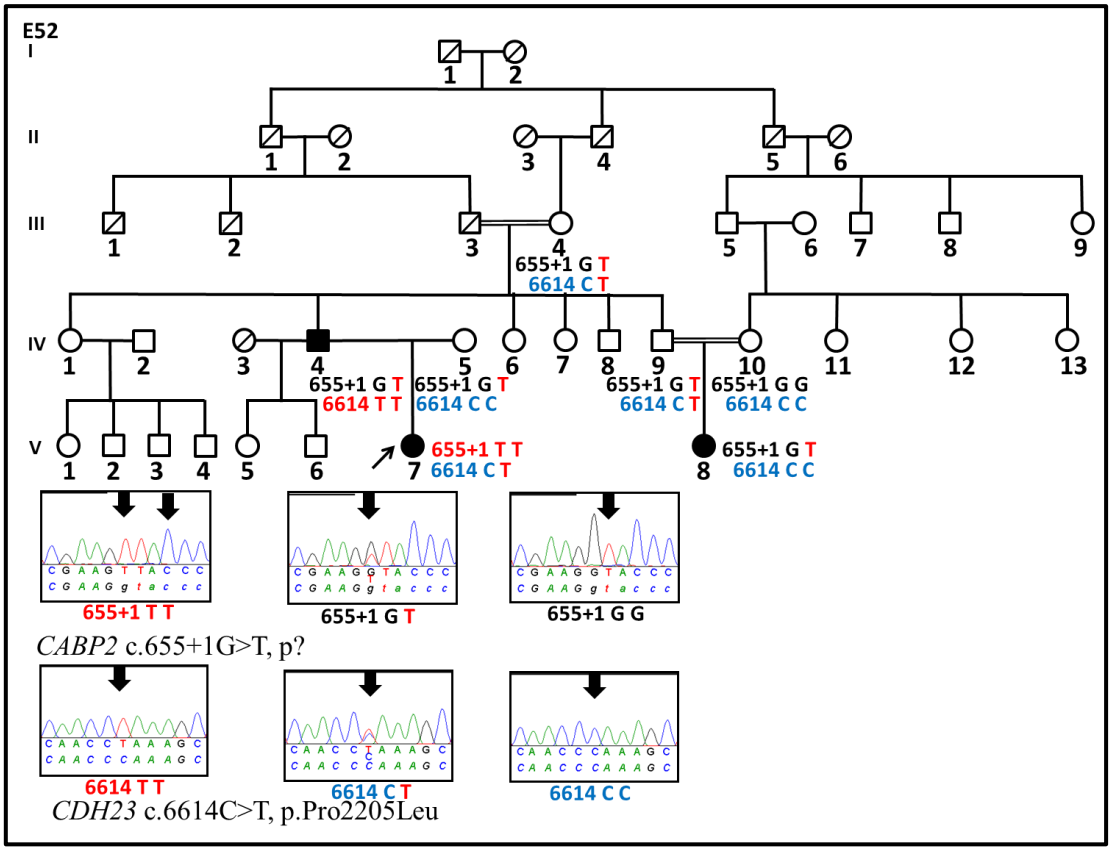



*Abb. 45: Stammbaum der Familie E52. Die mit schwarzem Pfeil markierte Patientin wurde mittels einer Exom-Sequenzierung analysiert. Für die Patientin konnte eine kausale Variante gefunden werden. Die für den Vater ursächliche Variante konnte durch eine Segregationsanalyse mit Sanger-Sequenzierung identifiziert werden. Für die Cousine der Indexpatientin konnte keine pathogene Variante detektiert werden. Die Segregationsanalyse ist als Genotyp bei jedem Patienten hinterlegt. Die Chromatogramme für die pathogenen Varianten sind hinterlegt, sowohl in homozygoter, heterozygoter und wildtypischer Sequenz.*

Die homozygote Variante im rezessiven *CABP2* c.655+1G>T, p? ist als pathogen in den Datenbanken DVD und HGMD (CS128787) notiert worden. In der Literatur ist diese Variante in drei nicht verwandten konsanguinen iranischen Familien berichtet worden und wurde durch

funktionelle Analysen als kausal bestätigt [144]. Die zweite Variante c.6614C>T, p.Pro2205Leu im rezessiven *CDH23*-Gen, die die Hörstörung des Vaters erklärt, ist aufgrund von Vorhersageprogrammen und Datenbanken, wie DVD, HGMD (CM165018) und ClinVar, als pathogen bestätigt worden. Zusätzlich ist diese Variante in der Literatur schon bei Patienten beschrieben worden [145, 146]. Damit sind beide Varianten als Klasse 5 Varianten anzusehen. Die Hörstörung der Indexpatientin wird daher durch die Variante in *CABP2*-Gen erklärt, während die ihres Vaters durch die Variante im *CDH23*-Gen bestätigt wird. Für die Cousine konnte keine kausale Mutation identifiziert werden.

In den beiden Familien E72 und E75 konnte jeweils nur für einen Patienten die Ursache der vorherrschenden Hörstörung ermittelt werden. Bei den weiteren Familienmitgliedern blieb die Kausalität der Hörstörung im Unklaren. In der nachfolgenden Abbildung 46 ist der Stammbaum der Familie E72 zu sehen.

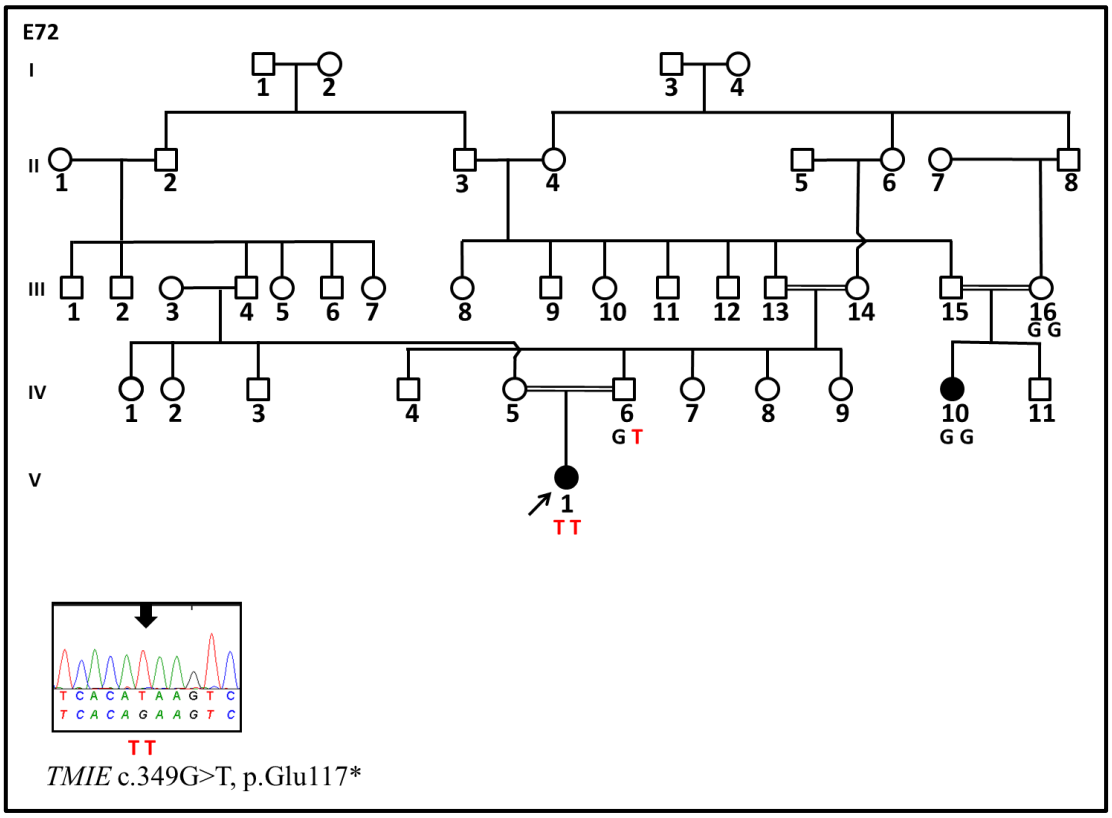



*Abb. 46: Stammbaum der Familie E72. Von der mit schwarzem Pfeil markierten Patientin wurde das Exom sequenziert. Die gefundene Variante wurde mit Sanger-Sequenzierung validiert und eine Segregationsanalyse durchgeführt. Der Genotyp ist bei allen untersuchten Probanden im Stammbaum hinterlegt. Das Chromatogramm ist in homozygoter, Sequenz dargestellt.*

Die homozygote Variante c.349G>T, p.Glu117* im rezessiven *TMIE*-Gen ist noch nicht in der Literatur berichtet worden. Da es sich um eine Stoppmutation handelt, die Segregation vorhanden ist und die Variante c.348G>T, p.Gu117* selten ist, kann sie als wahrscheinlich pathogen angenommen werden. Bei der Tante 2. Grades IV-10 konnte diese Variante nicht nachgewiesen werden, welches auf ein weiteres betroffenes Hörstörungsgen in dieser Familie hindeutet. Die Hörstörung in dieser Familie kann als sensorineural, kongenital und bilateral beschrieben werden, die alle Frequenzen betrifft und progressiv verläuft.

Bei Familie E75 zeigt sich die familiäre Heterogenität sogar in der Kernfamilie, welche aus Vater, Mutter und deren Kinder besteht. Die Hörstörung ist schwer, betriff alle Frequenzen, verläuft auf beiden Ohren progressiv, ist sensorineural und war bei der Geburt vorhanden. Es gibt einen Hinweis auf Syndromalität. Auch hier ist nachfolgend der Stammbaum der Familie dargestellt (Abb. 47).

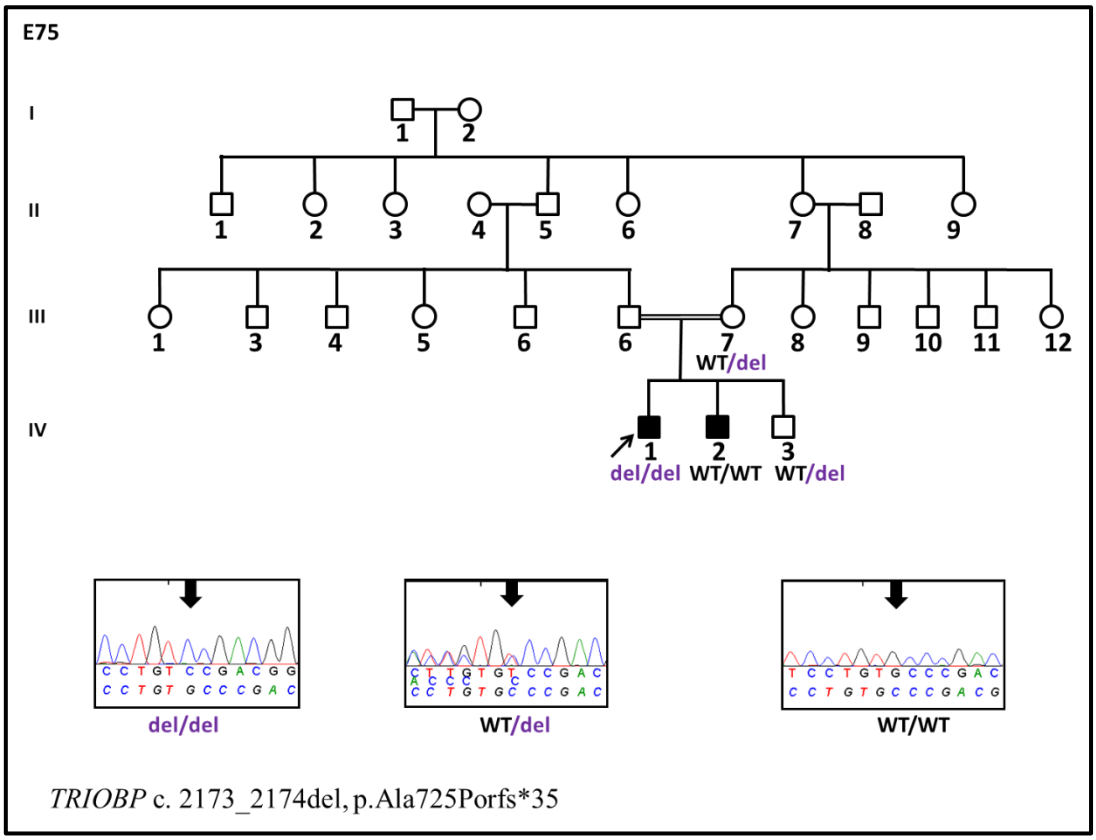



*Abb. 47: Stammbaum der Familie E75. Das Exom des Indexpatienten wurde sequenziert. Die gefundenen Variante im TRIOBP-Gen wurde anschließend per Sanger-Sequenzierung bestätigt und eine Segregationsanalyse innerhalb der Familie durchgeführt. Der entsprechende Genotyp ist bei allen untersuchten Familienmitgliedern beschrieben. Das Chromatogramm zeigt die Variante in homozygoter, heterozygoter und wildtypischer Form.*

Die homozygote Variante c.2173_2174del, p.Ala725Porfs*35 führt aufgrund einer Deletion von zwei Nukleotiden im rezessiven *TRIOBP*-Gen zu einem vorzeitigen Stoppcodon und damit zu einem Abbruch der Proteinsynthese. Zu dieser Variante liegen keine weiteren Informationen vor, aber aufgrund ihrer Seltenheit und der Segregation kann sie als wahrscheinlich pathogen betrachtet werden. Interessanterweise konnte bei einem betroffenen Bruder des Indexpatienten diese homozygote Variante im *TRIOBP*-Gen nicht nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine familiäre Heterogenität hin. Die krankheitsverursachende Variante des betroffenen Bruders konnte bis jetzt noch nicht identifiziert werden.

### 3.5.2 Kombination von familiären Mutationen

Dieser Fall zeigt die Kombination aus zwei familiären Mutationen in einem Gen, die bei dem Indexpatienten zu einer Hörstörung führen. In der anschließenden Abbildung 48 ist der Stammbaum der Familie E55 zu sehen.

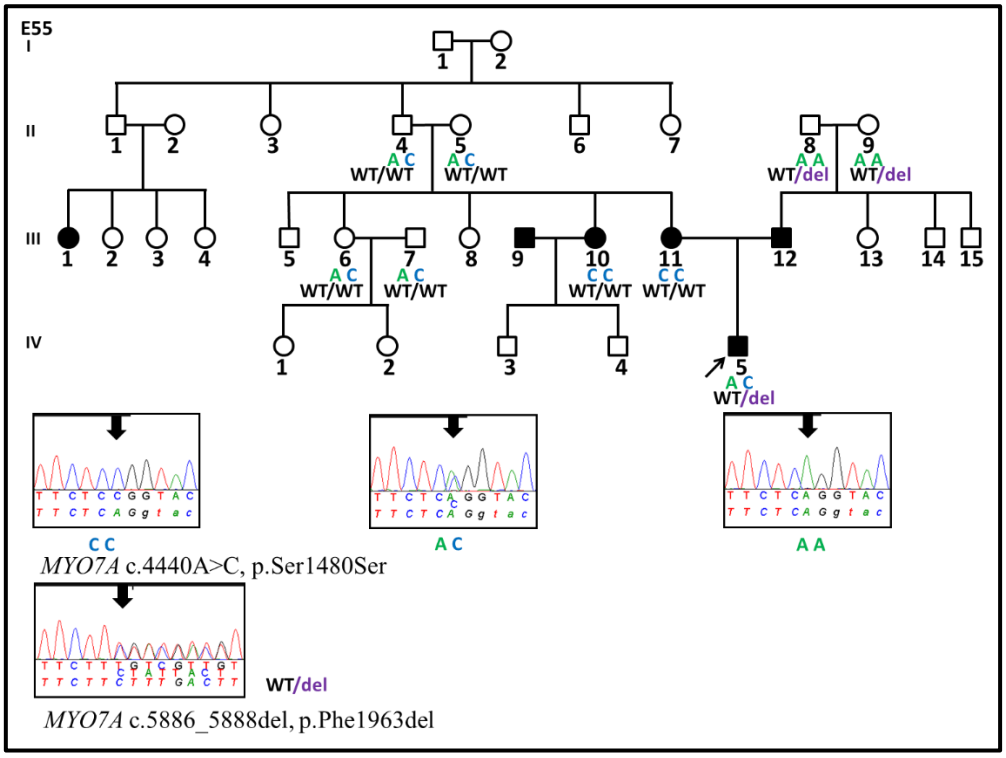



*Abb. 48: Stammbaum der Familie E55. Die DNA des Indexpatienten wurde mittels Exom-Analyse sequenziert (schwarzer Pfeil). Die Untersuchung zeigt zwei Varianten im MYO7A-Gen beim Patienten IV-5. Beide Mutationen wurden per Sanger-Sequenzierung validiert und eine Segregationsanalyse innerhalb beider Familien wurde durchgeführt. Der Genotyp ist bei allen untersuchten Familienmitgliedern beschrieben. Die Chromatogramme sind in homozygoter, heterozygoter und wildtypischer Sequenz dargestellt.*

Die heterozygote Deletion im *MYO7A*-Gen ist mit dem Usher-Syndrom Typ 1 in der Literatur assoziiert worden [147]. Sie wird von den Datenbanken ClinVar, DVD und HGMD (CD064586) als pathogen eingestuft. In gnomAD gibt es keine homozygoten Träger und damit kann die Variante als Klasse 5 nach Richards et al., 2015 [131]eingestuft werden. Die Variante im gleichen Gen c.4440A>C, p.Ser1480Ser führt zu einem Verlust einer Splice-Stelle, ist aber in keiner Datenbank annotiert und noch nicht beschrieben worden. Sie segregiert innerhalb der Familie der Mutter und ist daher als wahrscheinlich pathogen einzustufen. Der Indexpatient ist somit compound heterozygot für beide Varianten und daher von einer Hörstörung betroffen. Diese ist sensorineural, seit der Geburt vorhanden, betrifft die hohen Frequenzen, ist an Taubheit grenzend und stabil.

Wenn zusätzlich der Fall G6 miteinbezogen wird, konnten bei ca. 4% aller Fälle eine familiäre Locus-Heterogenität festgestellt werden.

## 3.6 *De novo*-Ereignis – Fallbeschreibung *CEACAM16*

In einer Trio-Analyse mit Hilfe des TruSight One Panels konnte bei einem Patienten eine *De novo*-Mutation im *CECAM16*-Gen detektiert werden [148]. In der nachfolgenden Abbildung 49 ist zunächst der Stammbaum des Patienten dargestellt.

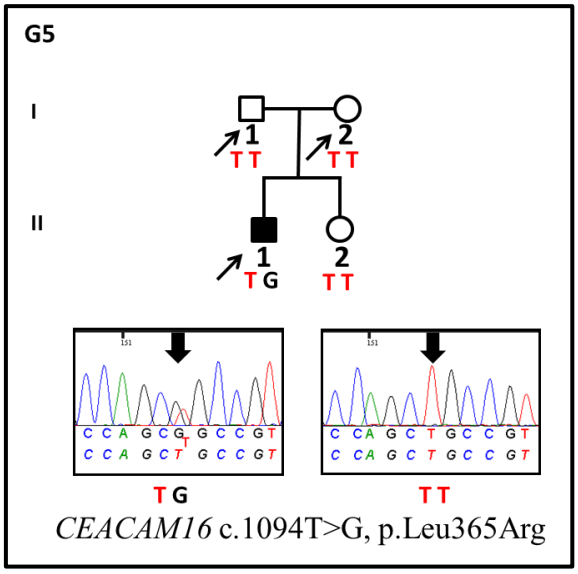



*Abb. 49: Stammbaum der Familie G5. Mit Hilfe des TruSight One Panels wurde der Patient und dessen Eltern sequenziert. Anschließend erfolgte eine Validierung per Sanger-Sequenzierung und zusätzlich die Untersuchung der Schwester. Die Chromatogramme der De novo-Mutation und der wildtypischen Sequenz sind dargestellt.*

Die heterozygote Variante im *CEACAM16*-Gen c.1094T>G, p.Leu365Arg war nicht beschrieben, konnte aber aufgrund von Vorhersageprogrammen als pathogen eingestuft werden. Konfirmation durch eine Segregationsanalyse und eine STR-Analyse bestätigte den *De novo*-Charakter dieser Variante. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der STR-Analyse.

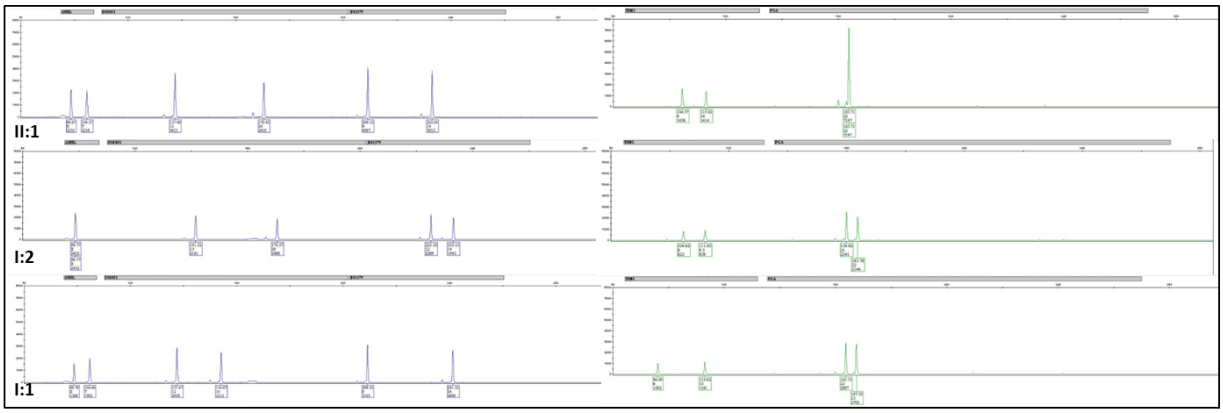



*Abb. 50: Ergebnisse der STR-Analyse. Fünf Marker wurden bei dem Indexpatienten (II-1), seiner Mutter und seinem Vater getestet. Die Marker des Kindes standen in Übereinstimmung zu den Markern der Mutter und des Vaters. Somit konnte die Verwandtschaft bestätigt und der De novo-Charakter validiert werden.*

In 50 Kontrollpersonen konnte diese Variante nicht entdeckt werden. Die Variante c.1094T>G betrifft die N2-Domäne des CEACAM16-Proteins, die am stärksten konserviert ist und eine wichtige Rolle in der Bindung von TECTA und TECTB spielt.

Der klinische Phänotyp des Patienten, eine postlinguale moderate Hörstörung, stimmte mit den schon publizierten dominanten Formen der *CECAM16*-assoziierten Hörstörung überein. Detailliert sind diese Ergebnisse in Hofrichter et al., 2015 [148] beschrieben.

## 3.7 Rekurrent betroffene Aminosäuren – Fallbeschreibung *S1PR2*

Eine iranische Fünf-Generationenfamilie mit multiplen konsanguinen Ehen ist nachfolgend dargestellt (Abb. 51).

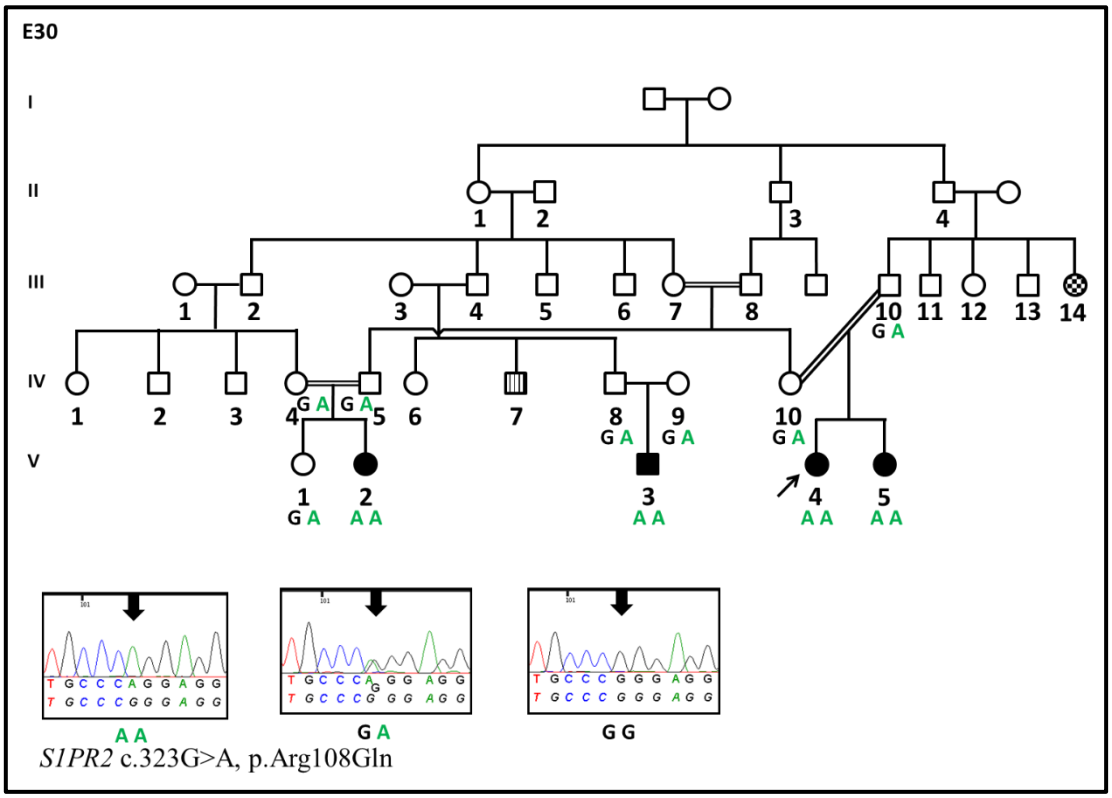



*Abb. 51: Stammbaum der Familie E30. Alle betroffenen Familienmitglieder sind schwarz markiert. Das Familienmitglied mit einer gestreiften Markierung zeigt eine Polydaktylie, während die Patientin mit der schwarz-weiß-gekachelten Markierung eine Epilepsie aufweist. Bei dem Patienten mit schwarzem Pfeil konnte über eine Exom-Analyse die homozygote Variante c.323G>A, p.Arg108Gln im S1PR2-Gen festgestellt werden. Diese wurde mit Sanger-Sequenzierung bestätigt und eine Segregationsanalyse bei 10 Probanden durchgeführt. Der Genotyp ist für alle untersuchten Probanden angeben. Zusätzlich sind die Chromatogramme in homozygoter, heterozygoter und wildtypischer Form aufgeführt.*

Die Besonderheit der homozygoten c.323G>A, p.Arg108Gln-Variante im rezessiven *S1PR2*-Gen liegt in der Position der betroffenen Aminosäure, die schon einmal in der Literatur beschrieben wurde[127]. Die Position scheint anfällig zu sein für einen Aminosäuren Austausch. Generell ist die Variante c.323G>A im Vorfeld noch nicht beschrieben, aber

aufgrund von Vorhersageprogrammen als pathogen eingestuft worden. In einer von einer Hörstörung betroffenen Familie aus Pakistan wurde diese Aminosäure bereits gegen ein Prolin ausgetauscht[127]. Inwiefern der hier ermittelte Aminosäureaustausch ebenfalls zu einer Pathogenität beiträgt, wurde mit Hilfe von 3D-Modellierung untersucht. Exemplarisch stellt die folgende Abbildung 36 den Aminosäureaustausch von Arginin an der Position 108 zu Glutamin dar.

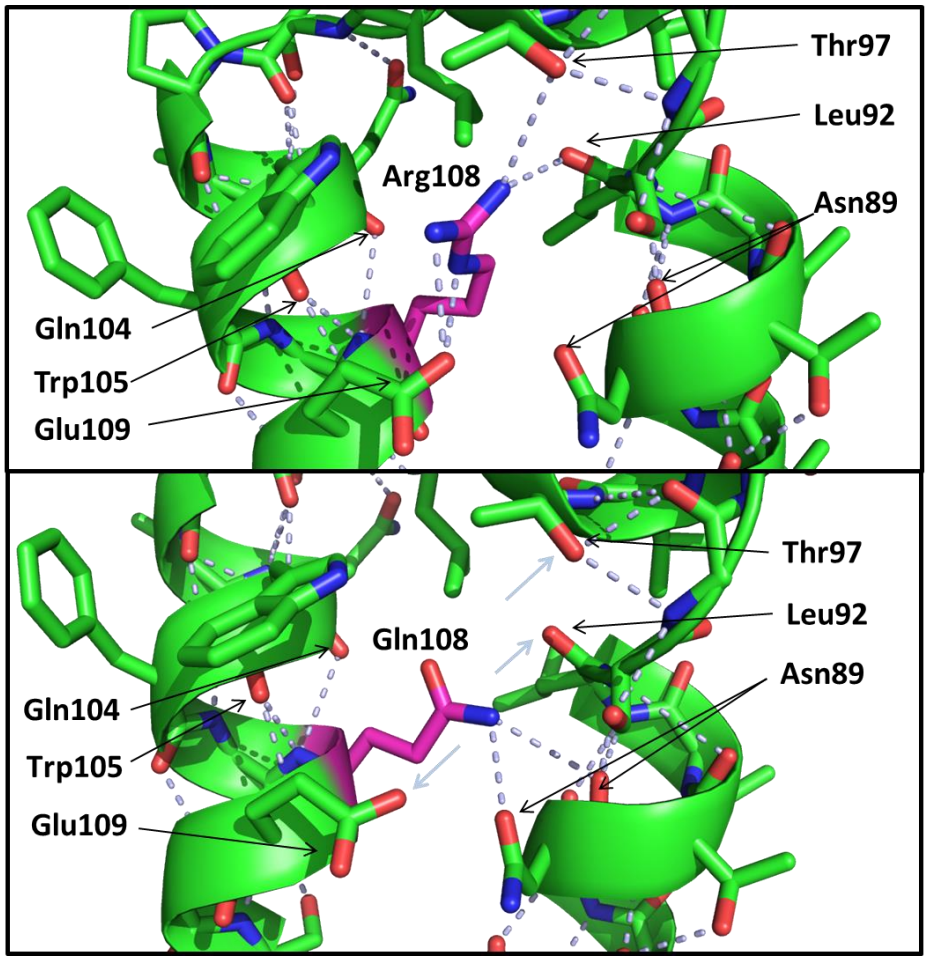



*Abb. 52: 3D-Darstellung des Proteins S1PR2 mit Focus auf die Aminosäureposition 108 im Homologie-Modell. Oben ist die wildtypische Aminosäuresequenz aufgezeigt, unten der Aminosäureaustauch zu Glutamin. Die aufgelisteten Aminosäuren (mit schwarzen Pfeilen versehen) sind Interaktionspartner der Aminosäure an Position 108. Die gestrichelten grauen Linien geben die Wasserstoffbrückenbindungen an. Der Vergleich von Protein mit wildtypischer Aminosäure an Position 108 mit der mutierten Proteinvariante zeigt eindeutig einen Verlust von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Komponenten, während eine neue Wasserstoffbrückenbindung mit Asn89 aufgebaut wird. Analyse der generierten 3D Modelle mit Hilfe von PyMol™ (DeLano Scientific LLC) (Abbildung erstellt nach [125])*

Die 3D-Analyse zeigt den wildtypischen Zustand des Rezeptors und die mit der Aminosäureaustauch verbundenen Veränderungen. Im aktiven Zustand, das heißt, wenn der Ligand S1P and den S1PR2-Rezeptor binden soll, wird diese Interaktion durch den Aminosäureaustausch gestört. Dies ist detailliert in Hofrichter et al., 2018 [125] beschrieben.

Die iranische Familie E30 ist somit die dritte beschriebene Familie mit einer *S1PR2*-assoziierten Hörstörung und zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie die bereits beschriebenen Familien aus Pakistan. Alle betroffenen Patienten haben eine schwerwiegende bis an Taubheit grenzende Hörstörung.

## 3.8 X-CHROMOSOMALE HÖRSTÖRUNGEN

X-chromosomale Hörstörungen sind in etwa 2–5% der Fälle zu erwarten. In unserer Kohorte konnten insgesamt fünf Fälle ermittelt werden, bei denen eine X-chromosomale Vererbung nachgewiesen wurde. Dies entspricht in etwa ca. 3% unserer Fälle und liegt in dem erwarteten Bereich.

Insofern konnte auch in zwei Fällen das am häufigsten betroffene X-chromosomale Gen *POU3F4* als verantwortliches Hörstörungsgen identifiziert werden. Sowohl aus der Kohorte G als auch aus der Kohorte E konnten Patienten mit X-chromosomalem Hörstörungsdefekt ermittelt werden. Zusätzlich konnte in drei der fünf Fällen die gleiche Variante im *SMPX*-Gen detektiert werden. Diese Patienten stammen alle aus der Kohorte E und damit aus dem Iran. Einen Gründereffekt konnte jedoch nicht ermittelt werden.

### 3.8.1 *POU3F4*-ASSOZIIERTE HÖRSTÖRUNGEN

Die nachfolgenden Familien G63 und E43 zeigen *POU3F4*-assoziierte Hörstörungen. Zunächst ist der Stammbaum der Familie G63 in Abbildung 53 dargestellt.

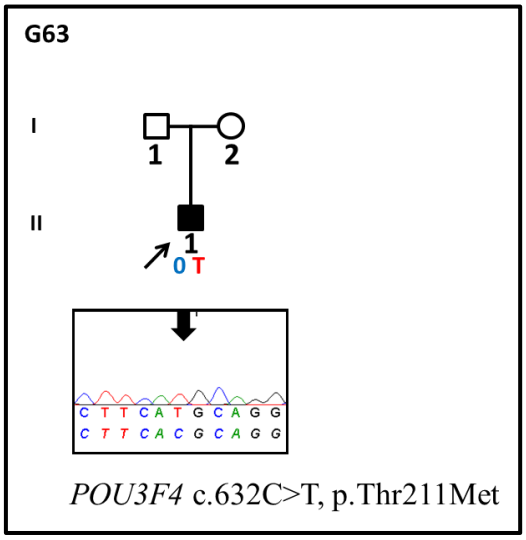



*Abb. 53: Stammbaum der Familie G63. Der Indexpatient (schwarzer Pfeil) wurde mittels einer Exom-Analyse untersucht. Die Variante wurde anschließend mit Sanger-Sequenzierung validiert. Das Chromatogramm und der Genotyp sind eingefügt. Null steht hierbei für das fehlende X-Chromosom bzw. für das Y-Chromosom. T gibt die Variante in hemizygoter Form wieder.*

Die hemizygote Variante *POU3F4* c.632C>T, p.Thr211Met ist von den Vorhersageprogrammen und von den Datenbanken DVD und HGMD (CM131499) als pathogen klassifiziert worden. Sie ist ebenfalls schon in der Literatur beschrieben und kann daher als pathogen eingestuft werden, obwohl keine Segregationsanalyse vorliegt [149]. Der Patient zeigt eine Hörstörung, jedoch sind nähere Informationen nicht bekannt.

Der Stammbaum der Familie E43 ist in Abbildung 54 dargestellt.

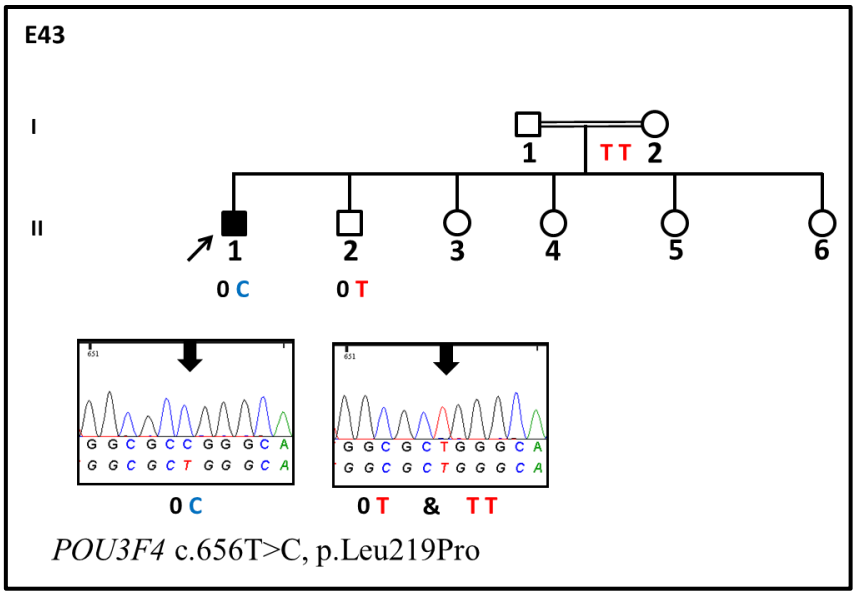



*Abb. 54: Stammbaum der Familie E43. Der Indexpatient (schwarzer Pfeil) wurde mit Hilfe einer Exom-Sequenzierung untersucht. Es konnte eine Variante im POU3F4-Gen detektiert werden, die mit Hilfe einer Sanger-Sequenzierung validiert wurde. Anschließend erfolgte eine Segregationsanalyse, deren Ergebnis im Stammbaum als Genotyp hinterlegt ist. Ebenso sind die Chromatogramme dargestellt. Null steht hierbei für die Hemizygotie aufgrund des fehlenden X-Chromosoms bzw. das vorhandene Y-Chromosom. C gibt das veränderte Nukleotid an, T die ursprüngliche wildtypische Sequenz.*

Im Gegensatz zur vorherigen Variante ist die c.646T>C, p.Leu219Pro Variante im *POU3F4*-Gen noch nicht beschrieben worden. Sie wird von Vorhersageprogrammen als pathogen charakterisiert und ist nicht in der Datenbank gnomAD aufgeführt, welches für ihre Seltenheit spricht. Daher könnte sie als wahrscheinlich pathogen eingestuft werden. Die Mutter zeigt diese Variante nicht, so dass es sich hier um eine Neumutation handeln könnte. Der Patient hat eine Hörstörung von der nähere Details nicht bekannt sind.

### 3.8.2 *SMPX*-ASSOZIIERTE HÖRSTÖRUNGEN

Gleich drei Familien aus dem Iran konnten mit einer Hörstörung identifiziert werden, die durch die gleiche Nukleotiddeletion im *SMPX*-Gen induziert worden ist. Zunächst ist der Stammbaum der Familie E79 zu sehen (Abb. 55).

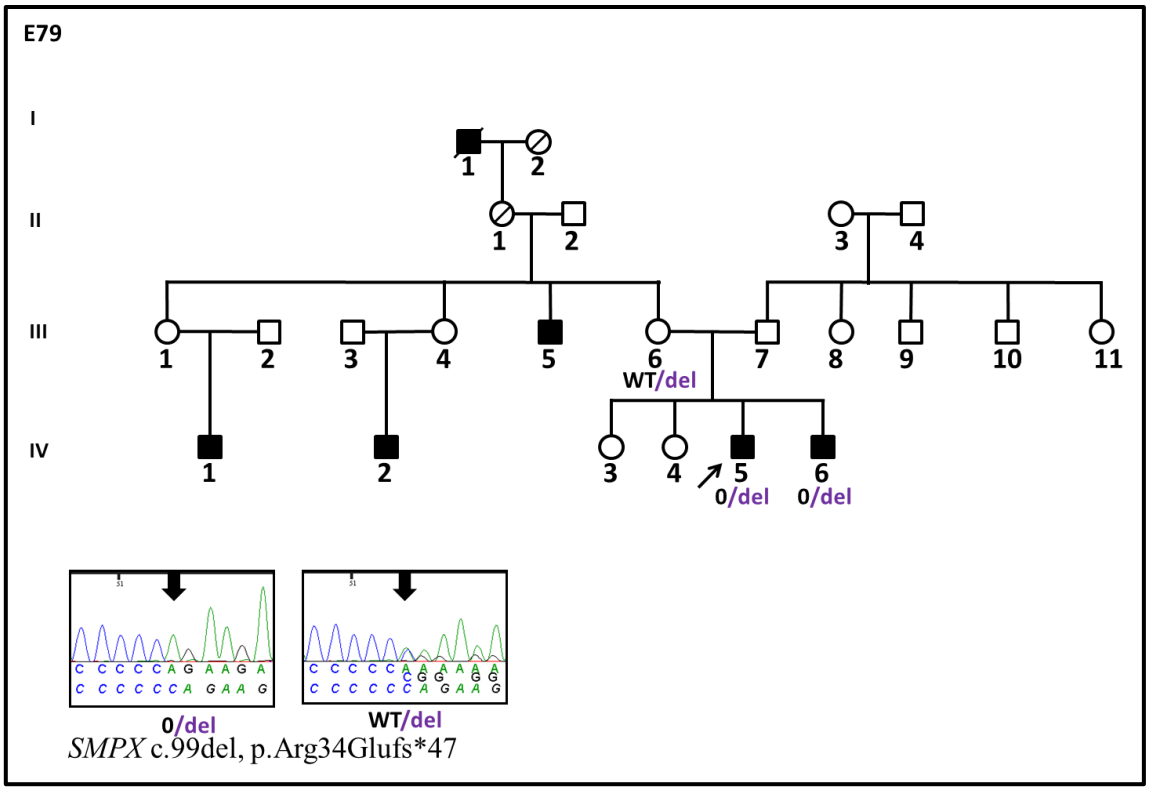



*Abb. 55: Stammbaum der Familie E79. Der Indexpatient (schwarzer Pfeil) wurde mittels Exom-Analyse untersucht. Anschließend erfolgte die Validierung und die Segregationsanalyse der Variante c.99del, p.Arg34Glufs*47 im SMPX-Gen. Der Genotyp und die Chromatogramme sind angegeben.*

Innerhalb der Familie konnte die Variante als vollständig segregierend festgestellt werden. Das heißt alle untersuchten betroffenen Männer tragen diese Variante hemizygot (0/del), während die Mutter, eine Konduktorin (Überträgerin) (WT/del) ist. Die Hörstörung in dieser Familie wurde als sensorineural, kongenital, moderat und alle Frequenzen betreffend beschrieben. Jede weibliche Zelle enthält zwei X-Chromosomen, wobei entweder das maternale oder paternale X-Chromosom nach der Lyon Hypothese[150] inaktiv ist. Das Verhältnis von aktiven maternal zu aktiven paternalen X-Chromosom liegt im Normalfall bei 1:1. Jedoch kann es auch zu einer Verzerrung des Verhältnisses kommen, wodurch präferenziell nur entweder das maternale oder das paternale Chromosom inaktiviert wird[30]. Diese Verschiebung kann mit Hilfe eines X-Inaktivierungstests untersucht werden. Wenn das kranke Allel bevorzugt aktiv ist, kann es zur Ausprägung des Phänotyps kommen. Durch Testung von IV-6 konnte das X-Chromosom ermittelt werden, welches die pathogene Variante trägt. Durch einen Verdau und anschließender PCR konnte bei der Mutter III-6 das aktive X-Chromosom festgestellt werden, da es im Vergleich zum ursprünglichen Produkt nicht mehr vollständig vorhanden war. Ein Vergleich der X-Chromsome hinsichtlich eines

Verdaus konnte ein X-Chromosom feststellen, das noch zu 83,4% vorhanden und damit zu 16,6% aktiv war. Des Weiteren konnte ein X-Chromosom gezeigt werden, das verdaut worden ist und damit zu 83,4% aktiv war. Bei diesem handelte es sich um das Allel, welches beim Probanden IV-6 ersichtlich war. So konnte bei der Mutter III-6 des Indexpatienten eine Verzerrung des Verhältnisses festgestellt werden. Ab einen Wert von 80% ist es pathologisch und die Mutter müsste einen Phänotyp ausprägen.

Die nächste Familie E80 mit der gleichen Mutation zeigt folgenden Stammbaum (Abb. 56).

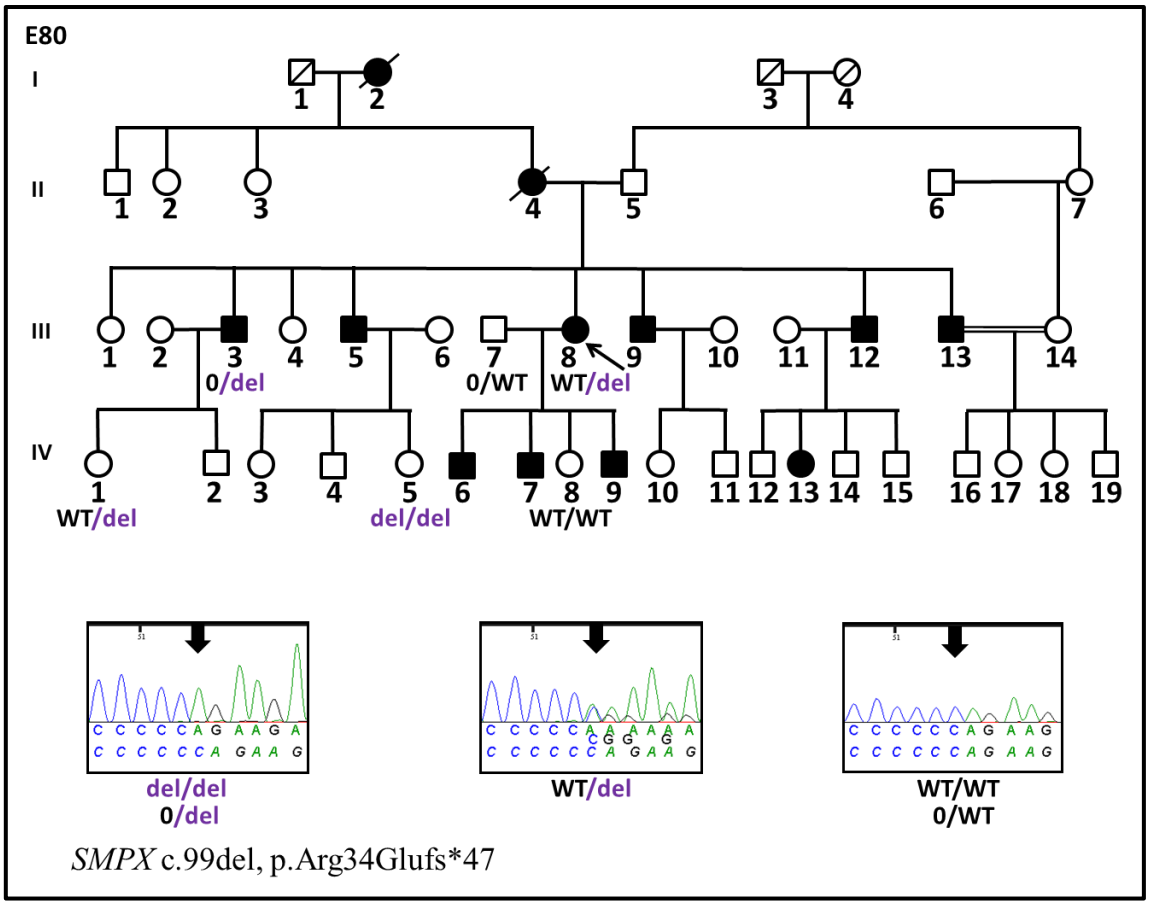



*Abb. 56: Stammbaum der Familie E80. Das Exom der Indexpatientin (schwarzer Pfeil) wurde sequenziert. Anschließend erfolgte die Validierung und die Segregationsanalyse der Variante c.99del, p.Arg34Glufs*47 im SMPX-Gen. Der Genotyp und die Chromatogramme sind angegeben.*

In dieser Familie E80 ist die Indexpatientin, obwohl diese nur Konduktorin für die Variante c.99del im SMPX-Gen ist, ebenfalls von einer Hörstörung betroffen. Die Hörstörung wird als schwerwiegend, nicht progressive klassifiziert, die die hohen Frequenzen betrifft und bei Geburt vorlag. Bei Patient III-3 und III-7 zeigt sich das zu erwartende Segregationsergebnis.

Ebenso weist die Probandin IV-8 erwartungsgemäß einen wildtypischen Genotyp auf. Abweichungen zum erwarteten Segregationsergebnis zeigen dagegen die Konduktorin IV-1, die homozygot betroffene Patientin IV-5 und wie oben erwähnt die Indexpatientin III-8 auf. Deshalb wurde in einem X-Inaktivierungstest, das Vorliegen des Verhältnisses des betroffenen Allels zum nicht-betroffenen Allel untersucht. Mit der Untersuchung der betroffenen Männer in dieser Familie III-7, III-3 konnte das gesunde Allel (III-7) und das Allel mit der Variante c.99del im SMPX-Gen identifiziert werden. Die nachfolgende Analyse der Konduktorinnen, die Indexpatientin III-6 und IV-1, sowie die homozygot betroffene Probandin IV-5 und die nicht betroffene Probandin IV-8 zeigt für jede Probandin bis auf die Indexpatientin eine Verzerrung des Verhältnisses und eine Präferenz für die X-Inaktivierung eines Allels. Bei der Indexpatienten waren die Untersuchungsergebnisse nicht aussagekräftig und konnten nicht ausgewertet werden. Bei der Konduktorin IV-1 kann präferenziell nur das X-Chromosom als aktiv mit 99% nachgewiesen werden, welches die c.99del im SMPX-Gen trägt. Daher sollte sie einen Phänotyp aufweisen und wie die Männer im gleichen Ausmaß betroffen sein. Eine erneute Überprüfung des Phänotyps sollte daher angestrebt werden. Beim homozygot betroffenen Mädchen IV-5 konnte nur das betroffene Allel nachgewiesen werden, aber keine Aussage bezüglich des Verhältnisses getroffen werden. Erstaunlicherweise zeigt die gesunde Probandin, die die Deletion nicht aufweist, ebenfalls eine Verzerrung des Verhältnisses der Aktivität der X-Chromosomen. Das väterliche Allel, welches ermittelt worden ist über den gesunden Vater III-7, ist zu 21% aktiv, während das mütterliche Allel zu 79% aktiv ist. Das mütterliche Allel scheint hierbei sich durchzusetzen. Da Konduktorinnen phänotypisch milder betroffen sind bzw. oftmals auch keinen Phänotyp aufweisen, könnte dies auf die X- Inaktivierung zurückgeführt werden. Dies würde in jedem Fall die phänotypischen Unterschiede der Konduktorinnen erklären. Der fehlende Phänotyp des homozygot betroffenen Mädchen IV-5 könnte auf ihr Alter von 10 Jahren zurückzuführen sein. Jedoch ist dies ungewöhnlich, da Jungen in diesem Alter bereits eine Hörstörung zeigen. Die Hörstörung in der Familie wurde als schwer, seit Geburt vorhanden, nicht progressiv, bilateral und sensorineural notiert.

Der Stammbaum der Familie E81 mit der gleichen Mutation ist in Abbildung 57 dargestellt.

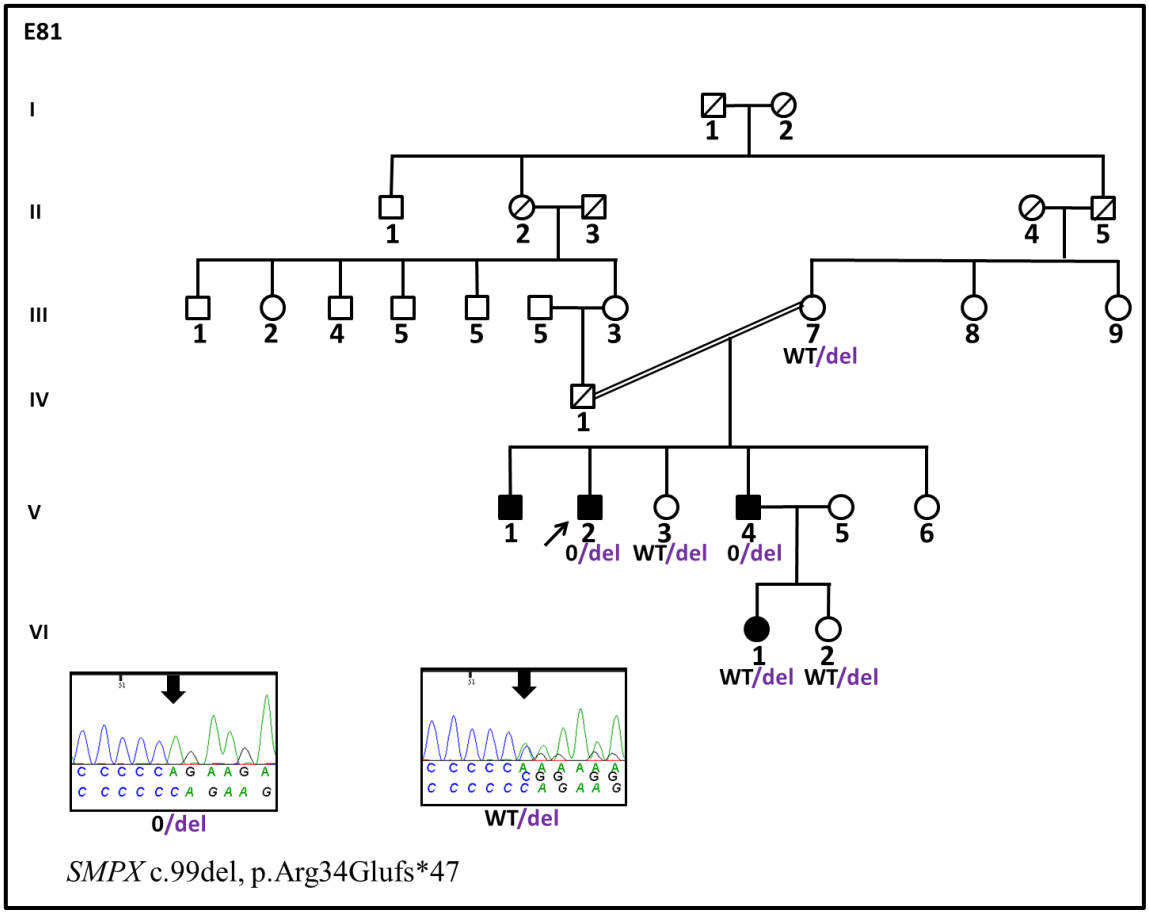



*Abb. 57: Stammbaum der Familie E81. Das Exom des Indexpatienten wurde sequenziert. Anschließend erfolgte die Validierung und die Segregationsanalyse der Variante c.99del, p.Arg34Glufs*47 im SMPX-Gen. Der Genotyp und die Chromatogramme sind angegeben.*

In der Familie E81 segregiert die Variante c.99del, p.Arg34Glufs* im *SMPX*-Gen bei den Männern wie erwartet. Die Hörstörung ist mild, betrifft die hohen Frequenzen, war bei Geburt vorhanden und ist nicht progressiv. Jedoch können auch hier bei den Konduktorinnen Unterschiede im Phänotyp festgestellt werden. Während die Frauen III-7, V-3 sowie VI-2 phänotypisch nicht betroffen sind, weist die heterozygote Trägerin VI-1 eine Hörstörung im jungen Alter auf. Daher sollte ein Test zur X-Inaktivierung Aufschluss geben. Hierfür wurde der Indexpatient getestet, um das krankheitsverursachende X-Chromosom zu identifizieren. Anschließend wurden die Konduktorinnen IV-2, V-3 und VI-1 sowie die betroffene heterozygote Allelträgerin VI-2 hinsichtlich der Aktivität der X-Chromsomen untersucht. Die Probandin IV-2 zeigt eine Verzerrung des Verhältnisses, bei der das betroffene Allel zu 78% aktiv ist und das gesunde Allel nur zu 22% aktiv ist. Daher zeigt die Probandin möglicherweise einen milden Phänotyp, der als solcher nicht erkannt worden ist. Die

Probandin V-3 weist eine Verzerrung des Verhältnisses der Aktivität der X-Chromosomen auf. Das Allel c.99del ist zu 27%, während das gesunde Allel zu 73% aktiv ist. Somit ist diese Allelträgerin pathologisch unauffällig, welches mit dem vorliegenden Phänotyp korreliert. Die Konduktorin VI-2 zeigt ein Verhältnis 67:33 der Aktivität der beiden X-Chromosomen, wobei das Allel mit der *SMPX*-Deletion zu 67% aktiv ist. Dennoch ist diese Konstellation pathologisch unauffällig, so dass kein Phänotyp zu erwarten ist, welches mit dem vorliegenden klinischen Phänotyp übereinstimmt. Die betroffene Probandin VI-1 zeigt ein Verhältnis von 70:30. Das betroffene Allel ist hierbei zu 70% aktiv, während das nicht betroffene Allel zu 30% inaktiv ist. Damit scheint die Patientin möglicherweise leicht betroffen zu sein, welches mit dem klinischen Phänotyp übereinstimmen würde.

Bei der Variante c.99del, p.Arg34Glufs* handelt es sich um eine Frame-shift- Variante, die zu einem vorzeitigen Stopp bei der Proteinsynthese führt. Diese Variante ist als pathogen in den Datenbanken ClinVar, HGMD (CD130105) und DVD klassifiziert worden und mit einer progressiven Hörstörung verbunden [59]. Sie ist damit als kausal einzustufen. Die Hörstörung kann als mild, nicht progressiv beschrieben werden, involviert alle Frequenzen und war schon bei Geburt vorhanden. Interessanterweise ist bei keinem der Indexpatienten der Familien E79–E81 eine progressive Hörstörung vorhanden. Alle Patienten zeigen eine kongenitale, sensorineurale, bilaterale, nicht syndromale Hörstörung, die vor allem die hohen Frequenzen betrifft. Dagegen zeigen sich individuelle Schweregrade zwischen den Familien. So ist der Indexpatient der Familie E81 mild betroffen, während die Patientin in der Familie E80 eine schwere Hörstörung aufweist.

Diese Variante wurde bislang nur in Neufundland (Nordamerika) beschrieben [59]und trat dort bei zwei Familien aufgrund eines Gründereffekts auf. Beide Familien mit der beschriebenen Deletion hatten einen gemeinsamen Vorfahren.

Eine Übersichtsuntersuchung homozygoter Varianten in lokaler Nähe zur c.99del-Variante bei den Indexpatienten konnte keinen klar deutlich übereinstimmenden Bereich zeigen, der auf einen gemeinsamen Vorfahren hinweisen würde. Daher könnte die Deletion c.99del auch rekurrent aufgetreten sein. Jedoch muss dies noch weiter überprüft werden.

Weiterhin wurden mehrere Familien aus derselben Region hinsichtlich dieser Deletion getestet, aber es konnten keine weiteren Patienten positiv für die c.99del Deletion aufgefunden werden.

## 3.9 REKURRENT BETROFFENE HÖRSTÖRUNGSGENE

In einigen Hörstörungsfällen ist dasselbe Hörstörungsgen betroffen. Dazu zählen die Gene *TECTA*, *SLC26A4*, *MYO15A* und *LHFPL5*.

### 3.9.1 *TECTA*-ASSOZIIERTE HÖRSTÖRUNGEN

Insgesamt konnten in vier Familien (E14, E28, G9, G62) mögliche pathogene Varianten im Gen *TECTA* nachgewiesen werden. Stammbäume mit Validierung und, falls vorhanden, Segregationsanalysen befinden sich im Anhang 9.2. Die Familie G9, die schon beschrieben wurde, und die Familie G62 zeigen jeweils eine autosomal dominante Hörstörung. In beiden Fällen handelt es sich um Missense-Varianten (c.4437C>G bzw. c.2858T>A). Die Variante c.2858T>A, p.Leu953His ist von Vorhersageprogrammen als pathogen klassifiziert worden und als selten anzunehmen, da sie in gnomAD nicht notiert ist. Ebenso konnte die Variante c.4437C>G in der Familie G9 wie in Punkt 3.3.1 beschrieben als wahrscheinlich pathogen eingestuft werden. Die Familien E14 und E28 weisen dagegen eine autosomal rezessiv-assoziierte Hörstörung auf, die sogar durch die gleiche homozygote Variante c.5272+5G>C bedingt ist. Hierbei handelt es sich um eine Splice-Variante, die in den Datenbanken noch nicht beschrieben worden ist. Möglicherweise liegt hier auch ein Gründereffekt vor, da beide Familien aus dem Iran stammen. Für beide Familien konnten keine klinischen Informationen gewonnen werden.

### 3.9.2 *SLC26A4*-ASSOZIIERTE HÖRSTÖRUNGEN

Es konnten neun Familien mit einer *SLC26A4*-bedingten Hörstörung detektiert werden. Hierbei handelt es sich um zwei Familien aus der Kohorte G (G13 und G17) und sieben Familien aus der Kohorte E (E2, E6, E10, E19, E47, E56 und E66). Die Stammbäume und die dazugehörigen Segregationen können im Anhang 9.2 & 9.4 eingesehen werden. Wie schon in 3.4.2.2 erwähnt, war die genetische Ätiologie nicht mit dem Phänotyp in einigen Fällen vereinbar. Jedoch konnten auch viele Fälle mit dem Phänotyp der gegebenen Variante assoziiert werden. Zum Beispiel wies Familie E47 ein phänotypisches Pendred-Syndrom auf, welches durch zwei compound heterozygote, mit Pendred-Syndrom-assoziierte Varianten (c.919-2A>G bzw. c. 1334T>G) [139, 151] erklärt werden konnte. Der Familienstammbaum ist in Abbildung 58 dargestellt.

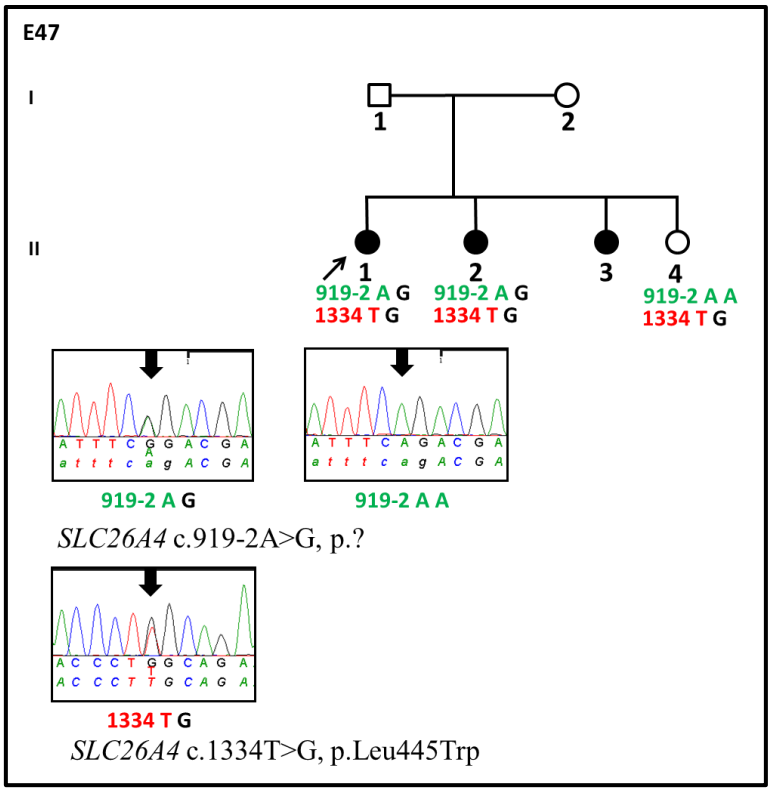



*Abb. 58: Stammbaum der Familie E47. Die Indexpatientin wurde mit Hilfe einer Exom-Analyse untersucht, wodurch die beiden Varianten c.1334T>G, p.Leu445Trp und c.919-2A>G identifiziert werden konnten. Der compound heterozygote Charakter konnte durch eine Segregationsanalyse bestätigt werden. Die Ergebnisse sind in Form des Genotyps bei allen untersuchte Probanden dargestellt. Des Weiteren sind die dazugehörigen Chromatogramme der heterozygoten und wildtypischen Sequenz zu sehen.*

Erstaunlicherweise konnte auch hier die rekurrente Variante c.1334T>G, p.Leu445Trp, die mit dem Pendred-Syndrom assoziiert ist und als pathogen gilt, als Ursache des Phänotyps identifiziert werden[139]. Sie ist bei beiden betroffenen Patientinnen heterozygot vorhanden und trägt compound heterozygot zum Phänotyp der Patientinnen in der Familie G13 als auch in der Familie E47 bei. Weiterhin ist sie dabei unabhängig vom genetischen Hintergrund der Patienten, da die Familie G13 einen kaukasischen Hintergrund hat, während die Familie E47 aus dem Iran stammt. Nähere Angaben zum Phänotyp der Patientinnen der Familie E47 liegen im Gegensatz der Patienten der Familie G13 nicht vor.

### 3.9.3 MYO15A-ASSOZIIERTE HÖRSTÖRUNGEN

Fast alle mit *MYO15A*-assoziierten Hörstörungen in dieser Studie stammen von Familien aus dem Iran. Da die Familie G11 eine Kombination von Varianten in *MYO15A* und *MYO7A*

aufweist (siehe 3.3.3) und die Varianten in *MYO15A* die Hörstörung nicht erklären können, wurden sie weiterhin nicht berücksichtigt. Zehn iranische Familien zeigten dagegen eindeutig eine *MYO15A*-pathogene Mutation, durch die die familiäre Hörstörung erklärt werden konnte. In den meisten Fällen handelt es sich um Missense-Mutationen. Obwohl viele dieser zehn Familien aus der gleichen Region stammen, konnte keine rekurrente pathogene Variante entdeckt werden. In sechs Familien (E5, E12, E17. E21, E59 und E69) wurden jedoch Varianten festgestellt, die schon in der Literatur beschrieben und in den Datenbanken als pathogen eingestuft wurden[44]. In weiteren drei Fällen (E13, E17 und E54) waren eine Frameshift-*MYO15A*-Mutationen vorhanden, die zwar in der Literatur noch nicht beschrieben wurden, aber aufgrund des kausalen Charakters hinsichtlich der Entwicklung eines vorzeitigen Stoppcodons als krankheitsverursachend einzustufen sind. In den Familien E13, E17 und E59 ist mehr als nur eine Variante im *MYO15A*-Gen an der Hörstörung beteiligt. In der folgenden Abbildung 59 sind alle Mutationen nochmal übersichtlich dargestellt. Hierbei wurde auf die kausalen Mutationen fokussiert.

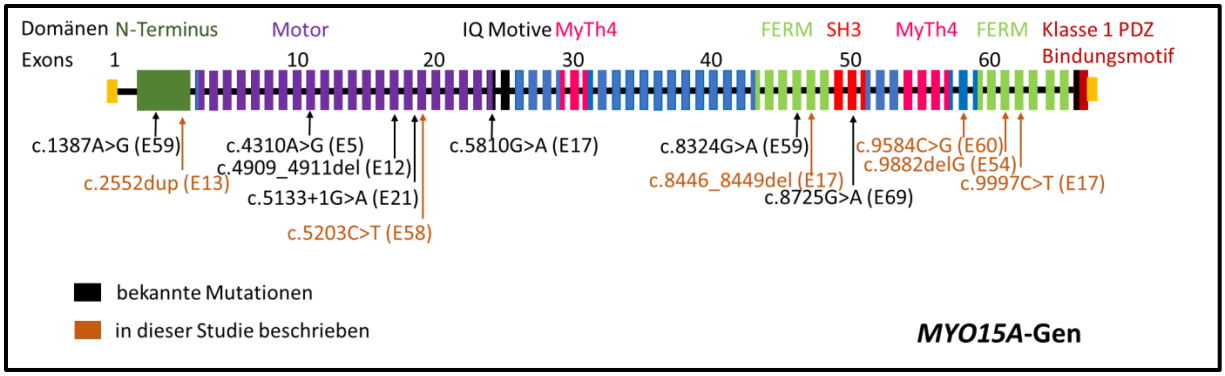



*Abb. 59: Auftragung aller in dieser Studie detektierten pathogenen Varianten im MYO15A-Gen. Hier dargestellt ist das komplette MYO15A-Gen, wobei alle Exons je nach Domänenzugehörigkeit farblich markiert wurden. Die Domänen werden oberhalb des Gens benannt. Unterhalb sind alle identifizierten pathogenen Varianten aufgelistet. Pfeile deuten jeweils auf das Exon, in dem die Variante liegt. Sie ist mit ihrer c. Position beschrieben. Hinter jeder Variante ist in Klammern die Familie notiert, die diese Variante trägt (Abbildung erstellt nach [44].*

Bei näherer Betrachtung fällt auf, dass bei den Varianten der Familien E13 und E59 der N-Terminus involviert ist. Da von der Familie E13 keine klinischen Daten vorliegen, kann ein direkter Vergleich leider nicht getroffen werden. Des Weiteren liegen die Varianten der Familien E5, E12, E21 und E58 in der Motordomäne des *MYO15A*-Gens. Hier kann ebenfalls aufgrund fehlender Daten keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation getroffen werden. In den

FERM-Domänen liegen Varianten der Familien E17, E59 und E54. Die Hörstörung der beiden letzteren Familien E59 sind vergleichbar, beide weisen eine nicht progressive, bilateral and Taubheit grenzende Hörstörung auf, die schon bei Geburt vorlag. Generell konnten diese Hörstörung bei allen betroffenen Familien (E54, E58, E59, E60 und E69) festgestellt werden, bei denen klinische Daten vorlagen.

### 3.9.4 *LHFPL5*-ASSOZIIERTE HÖRSTÖRUNGEN

Pathogene Varianten im *LHFPL5*-Gen konnten in dieser Studie nur drei familiäre Hörstörungsfälle erklären und sind daher als nicht allzu häufig anzusehen. Dennoch sind die mit *LHFPL5*-assoziierten Hörstörungen interessant, da auffälliger Weise diese Familien eine erhöhte Anzahl an betroffenen Kindern in einer Generation aufwiesen.

In der folgenden Abbildungen 60, 61 und 62 sind die drei Stammbäume präsentiert, bei denen eine *LHFPL5*-assoziierte Hörstörung vorlag.

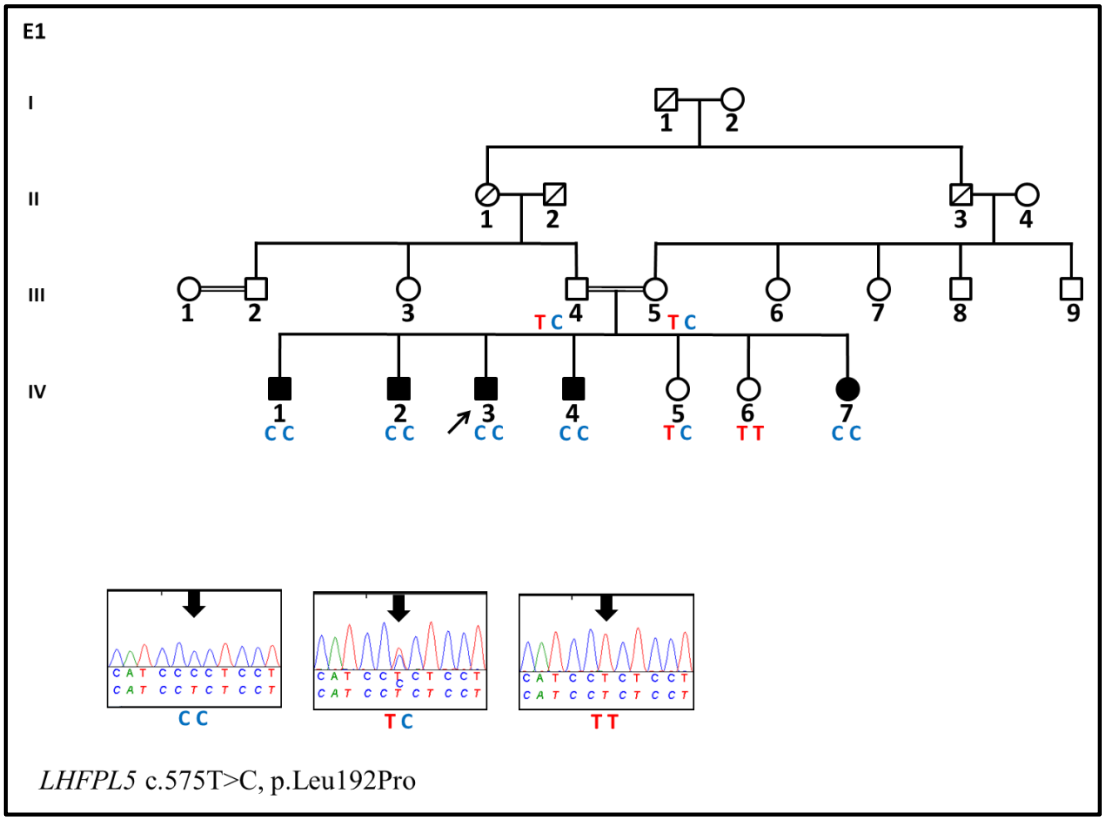


*Abb. 60: Stammbaum der Familie E1. Der Indexpatient wurde mit Hilfe einer TruSight One-Analyse untersucht, wodurch die homozygote Variante c.575T>C, p.Leu192Pro detektiert werden konnte. Eine Segregationsanalyse per Sanger-Sequenzierung erfolgte. Die Ergebnisse sind in Form der Genotypen bei allen untersuchten Probanden dargestellt. Des Weiteren sind die zugehörigen Chromatogramme mit homozygoter, heterozygoter und wildtypischer Sequenz zu sehen.*

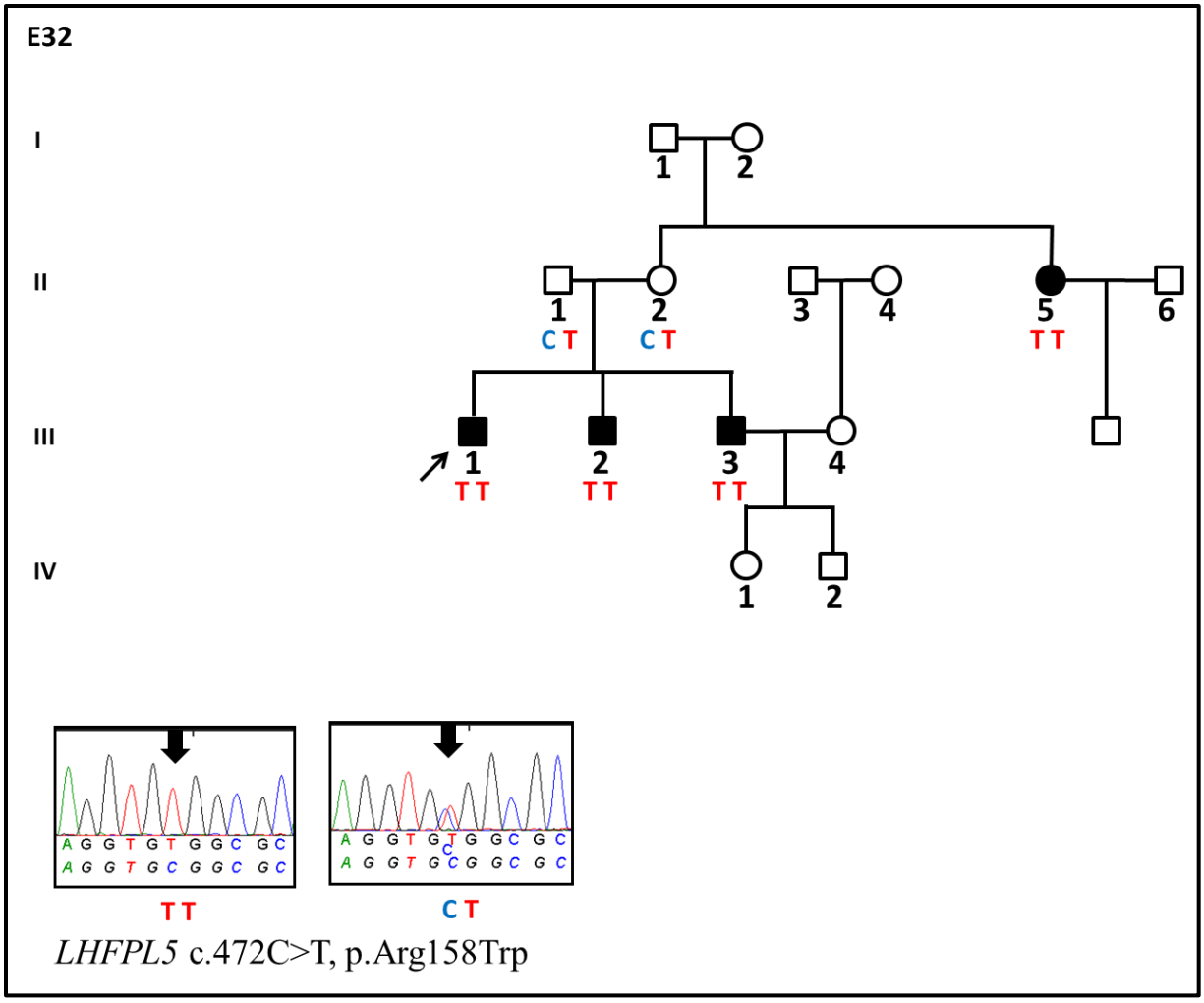



*Abb. 61: Stammbaum der Familie E32. Der Indexpatient wurde mit Hilfe einer Exome-Analyse untersucht, wodurch die homozygote Variante c.472C>T, p.Arg158Trp detektiert werden konnte. Eine Segregationsanalyse per Sanger-Sequenzierung erfolgte. Die Ergebnisse sind in Form der Genotypen bei allen untersuchten Probanden dargestellt. Des Weiteren sind die zugehörigen Chromatogramme mit homozygoter, heterozygoter und wildtypischer Sequenz zu sehen.*

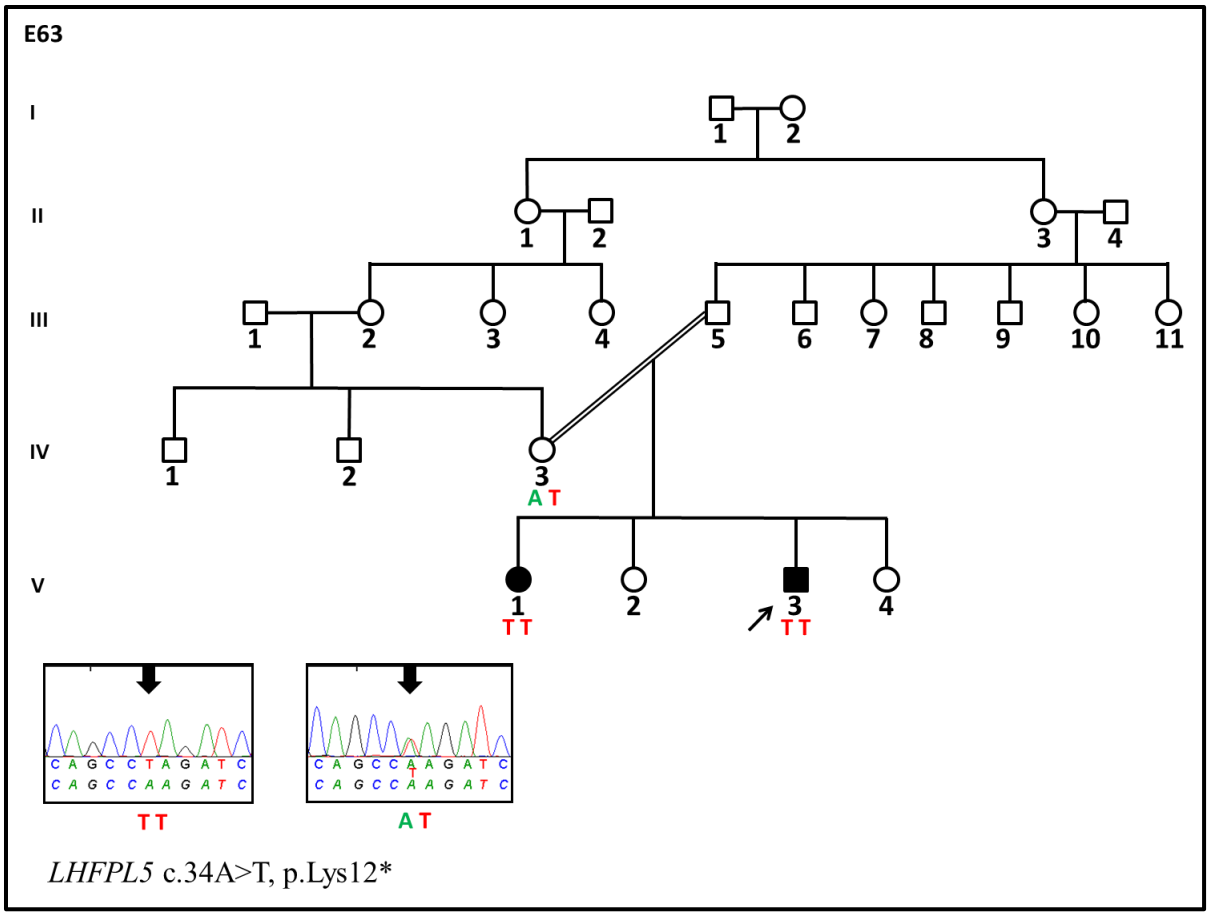



*Abb. 62: Stammbaum der Familie E63. Der Indexpatient wurde mit Hilfe einer Exome-Analyse untersucht, wodurch die homozygote Variante c.34A>T, p.Lys12* identifiziert werden konnte. Anschließend erfolgte eine Segregationsanalyse per Sanger-Sequenzierung. Die Ergebnisse sind in Form der Genotypen bei allen untersuchten Probanden dargestellt. Des Weiteren sind die zugehörigen Chromatogramme mit homozygoter, heterozygoter und wildtypischer Sequenz zu sehen.*

Interessanterweise konnte in allen drei Familien E1, E32 und E64 eine wahrscheinlich pathogene Variante im *LHFPL5*-Gen detektiert werden. Während die Variante in der Familie E32 c.472C>T schon in der Literatur und in Datenbanken HGMD (CM161008)) als pathogen beschrieben wurde [152], waren die beiden anderen Varianten c.575T>C, p.Leu192Pro und c.34A>T, p.Lys12* bis zu dieser Studie noch unbekannt. Jedoch ist die Variante c.575T>C, p.Leu192Pro von Vorhersageprogrammen als pathogen eingestuft worden und segregiert innerhalb der Familie. Bei der Variante c.34A>T, p.Lys12* handelt es sich um eine Nonsense-Variante, die ebenfalls innerhalb der Familie E64 segregiert. Daher kann sie ebenfalls als wahrscheinlich pathogen betrachtet werden. Betrachtet man die Stammbäume aller drei Familien mit einer *LHFPL5* assoziierten Hörstörung, fällt auf, dass verhältnismäßig

viele Betroffene in den Stammbäumen zu finden sind. Diese subjektive Beobachtung konnte bei keinem weiteren Gen in dieser Studie gesehen werden. Nur von Familie E63 konnten klinische Daten gesammelt werden. Die Hörstörung in dieser Familie zeichnet sich durch Taubheit aus, die alle Frequenzen betrifft, stabil und bilateral ist und bei Geburt vorhanden war.

## 3.10 DELETIONEN UND DUPLIKATIONEN ALS GENETISCHE URSACHE

Deletionen und Duplikationen in Hörstörungs-assoziierten Genen sind ein häufiger Grund für eine Hörstörung. Laut Shearer et al., 2014 [153] können in ca. 18,2% aller Fälle Kopienzahlvariationen (CNVs) in Form von Deletionen und Duplikationen für eine Hörstörung ursächlich sein. Vor allem Deletionen im Gen *STRC* sind für einen Großteil aller CNV-assoziierter Hörstörungsfälle verantwortlich [38]. Patienten in dieser Studie wurde jedoch im Vorfeld zum großen Teil auf eine Deletion im *STRC*-Gen getestet oder entsprachen nicht den klinischen Kriterien für eine *STRC*-assoziierte Schwerhörigkeit.

### 3.10.1 CNV-ANALYSE MIT HILFE VON EXOM-DATEN

Für einen Teil der Kohorten (Familien G30–G74 aus Kohorte G und fast die komplette Kohorte E) wurde eine Exom-basierte CNV-Analyse von den Bioinformatikern Herrn Marcus Dittrich und Herr Tobias Müller durchgeführt. Diese basiert auf dem eXome-Hidden-Markov-Modell (XHMM, Version 1.0), das von Menachem Fromer und Shaun M. Purcell entwickelt worden ist [112]. Insgesamt wurden 130 Patienten in diesem Ansatz getestet. Die Daten der einzelnen Patienten wurden gegen alle weiteren Hörstörungspatienten normalisiert, so dass Abdeckungsunterschiede unabhängig vom Hintergrundrauschen detektiert werden konnten. Diese CNVs wurden anschließend separat für jeden Patienten analysiert. Jeder Patient zeigte dabei ca. 50 CNVs im Exom. Diese wurde anschließend hinsichtlich ihrer Qualität weiter gefiltert. Dabei half als Referenz ein Patient, bei dem durch eine Array-Analyse eine Deletion detektiert und mit Hilfe von einer qPCRs validiert worden ist. Die Parameter dieser Deletion wurden verwendet, um die weiteren CNVs zu klassifizieren. Als Artefakte wurden solche CNVs entfernt, deren Deletions- bzw. Duplikationsstart- und Endpunkt bei über drei weiteren Patienten identisch war. Mit diesem Vorgehen konnte die folgende Deletion in der Familie E24 diagnostiziert werden. Der Phänotyp in der Familie zeichnet sich durch eine milde bis moderate Schwerhörigkeit aus, die bilateral und sensorineural ist. In der folgenden Abbildung 63 ist der Stammbaum dieser Familie dargestellt.

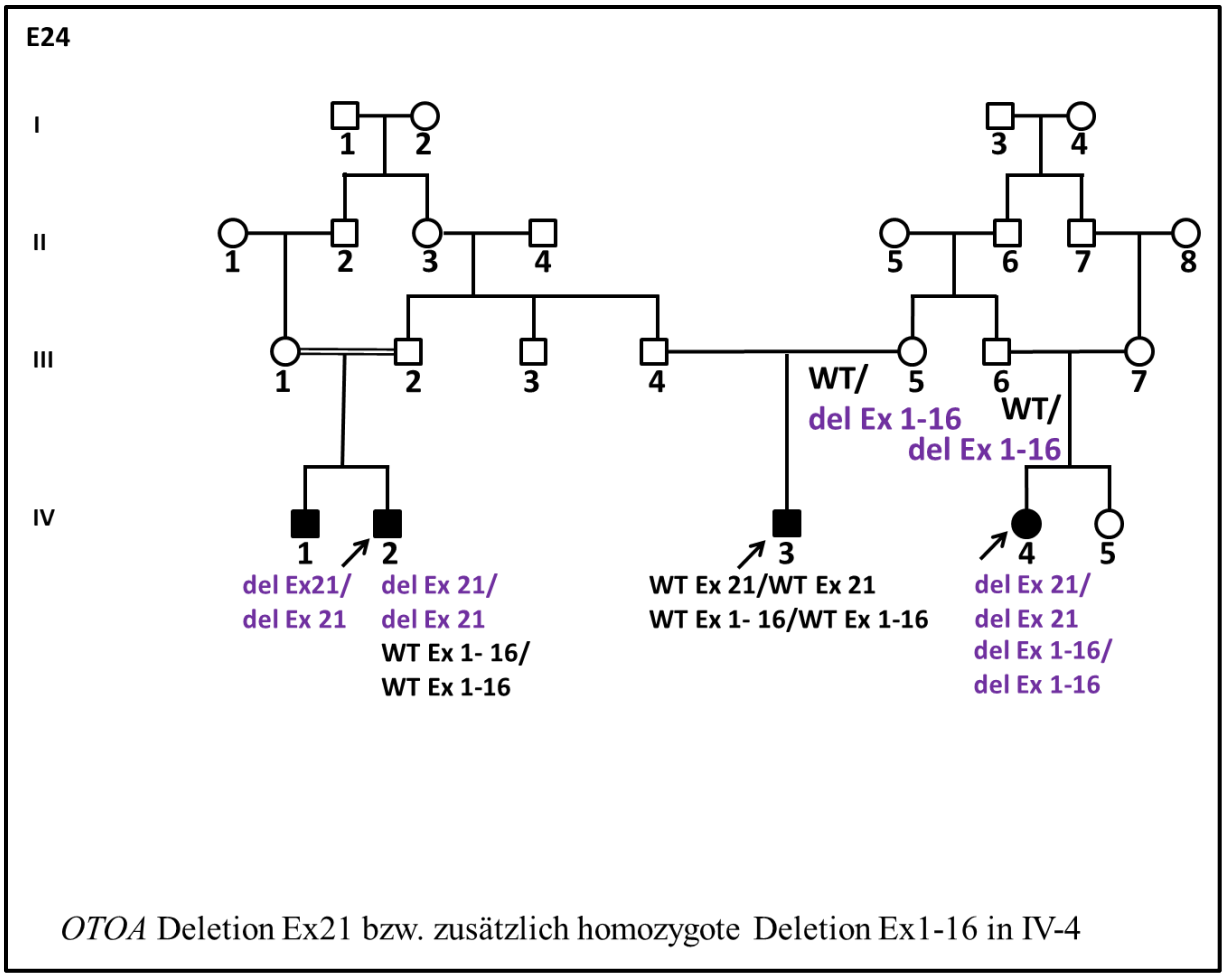



*Abb. 63: Stammbaum der Familie E24. In dieser Familie konnte eine homozygote Deletion im OTOA-Gen gefunden werden, die das Exon 21 vollständig umfasst. Die Segregation zeigte zudem, dass bei Patientin IV-4 eine zusätzliche Deletion der Exons 1–16 bestand. Der Genotyp ist unter jedem Patienten angegeben.*

Die Deletion wurde mit Hilfe einer PCR und einer MLPA der genomischen DNA der betroffenen Probanden validiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 64 einzusehen.

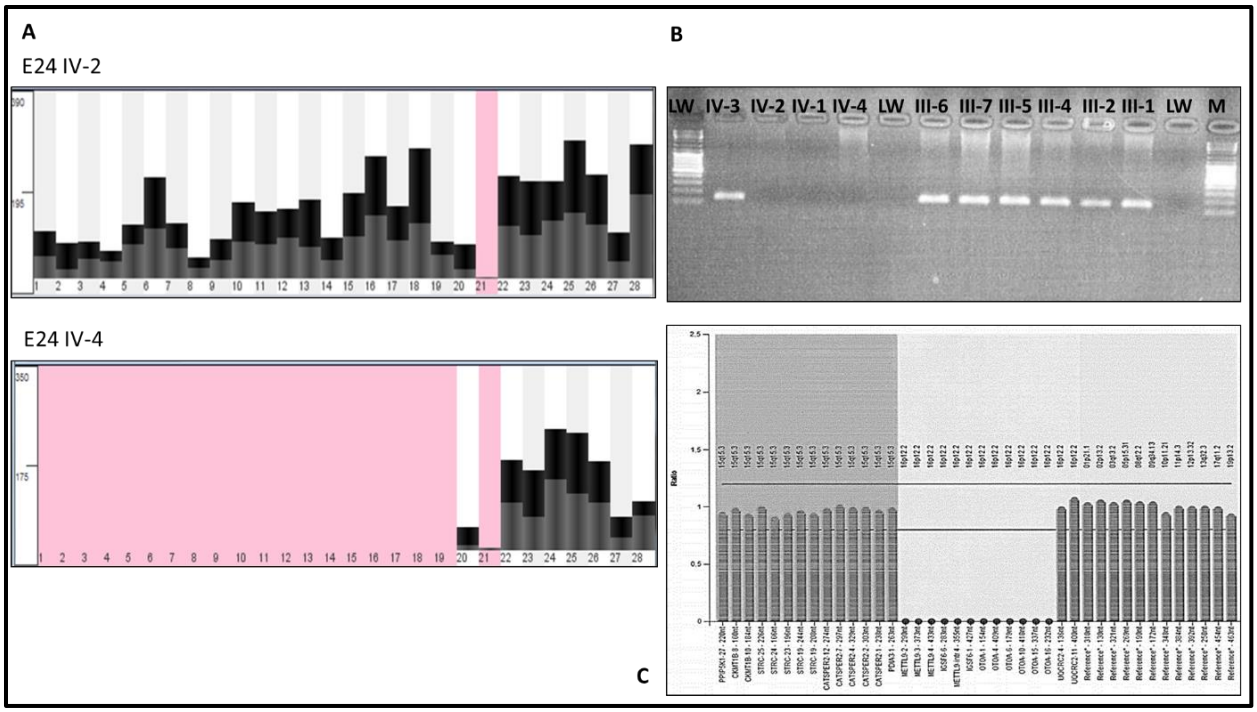



*Abb. 64: Nachweis von Deletionen im OTOA-Gen und deren Validierung. A. Aufstellung der Abdeckung der einzelnen Exone mit Reads. Das rosarote Feld zeigt bei Patient IV-2 eine fehlende Abdeckung im Exon 21 bzw. bei Patientin IV-4 zusätzlich noch im Exon 1–19 an. Die schwarzen Balken präsentieren die Abdeckung. Auf der X-Achse sind die betroffenen Exone angegeben. Die Visualisierung erfolge mit dem Programm GensearchNGS (PhenoSystems, Wallonia, Belgien). B. PCR-Nachweis der Deletionen. Mit Hilfe einer PCR wurde das Exon 21 von OTOA amplifiziert. Wie zu erwarten, konnten im Agarosegel keine PCR-Produkt für die betroffenen Patienten IV-4, IV-2 und IV-1 gewonnen werden. Nur der Patient IV-3 zeigte eine Bande und ist damit kein Träger einer homozygoten Deletion des Exons 21 im OTOA-Gen. Bei den restlichen nicht-betroffenen Familienmitgliedern konnten eine Bande und damit Exon 21 detektiert werden. Zur Kontaminationskontrolle diente ein Leerwert (LW).* C. *Des Weiteren wurde mit einer MLPA der Firma MRC Holland (P461A-A1 -DIS-v01) die Deletion der Exons 1–16 der Patientin IV-4 bestätigt. Dies wird deutlich durch den Verlust der Sonden OTOA-1, OTOA-4, OTOA-6, OTOA-10, OTOA-15 und OTOA-16, ersichtlich durch die fehlenden Säulen.*

Die Deletion des Exon 21 bzw. zusätzlich der Exons 1–16 erklärt die Hörstörung der Familie E24 und unterstreicht die Wichtigkeit der Untersuchung von Deletionen und Duplikationen.

### 3.10.2 INTRAGENISCHE DELETION IM *COL9A1*-GEN

Durch die oben beschriebene Exom-basierte CNV-Analyse konnte in der hier beschriebenen Familie E26 eine Deletion im *COL9A1*-Gen identifiziert werden. Der Stammbaum dieser Familie ist in Abbildung 65 dargestellt.

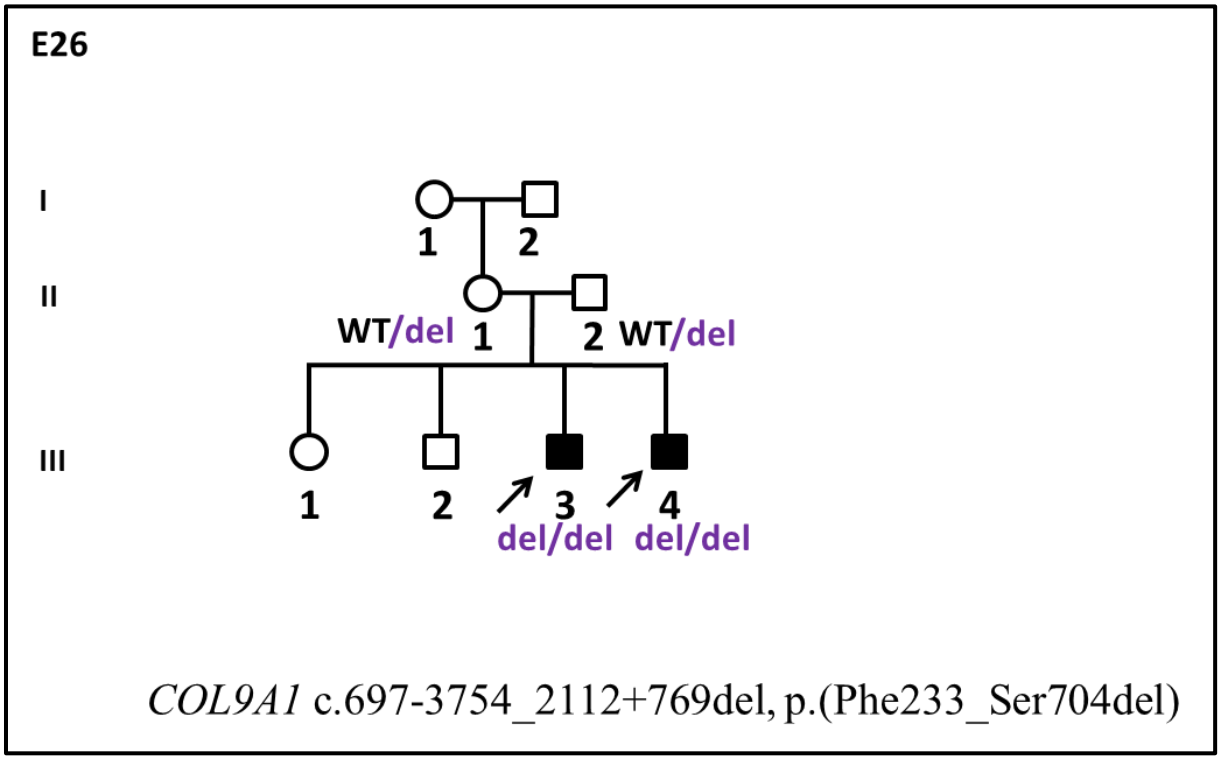
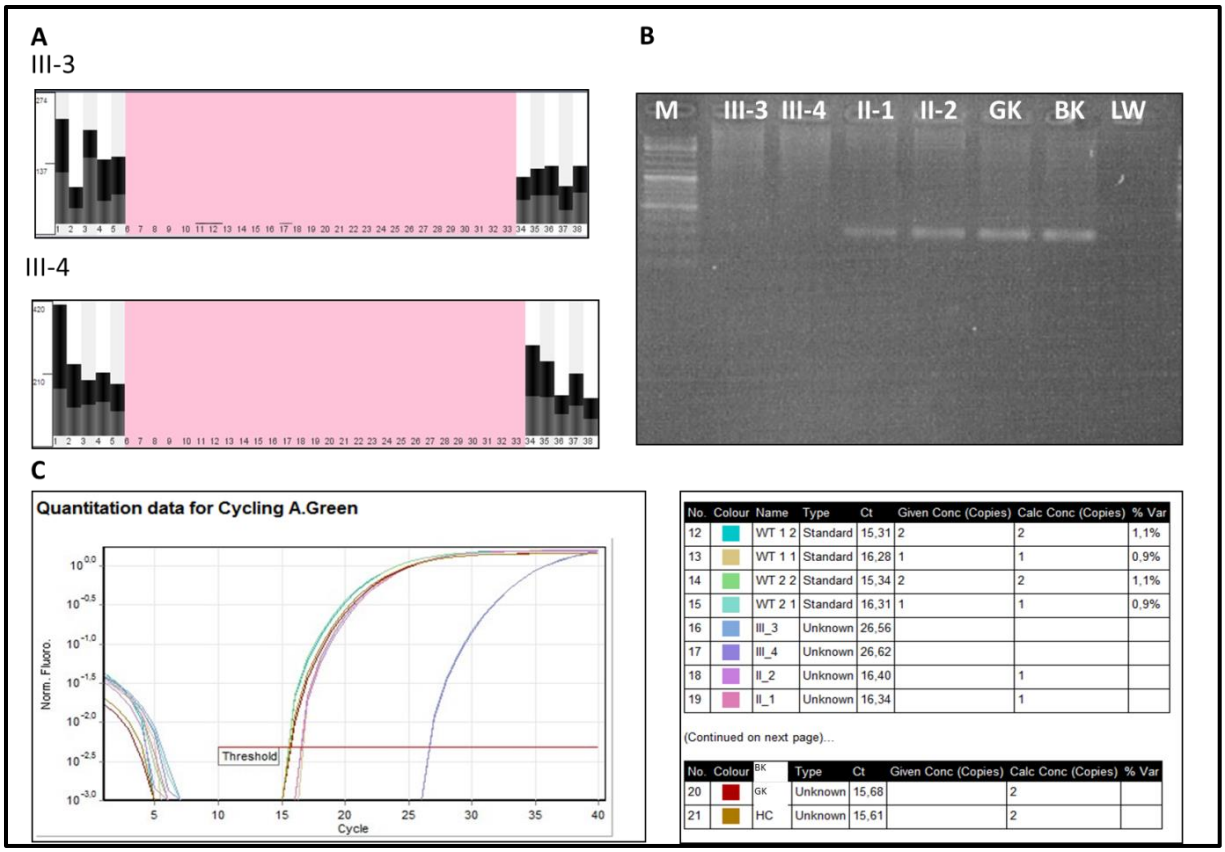



*Abb. 65: Stammbaum der Familie E26. Sowohl der Patient III-3 als auch der Bruder III-4 wurden mit Hilfe einer Exom-Analyse untersucht. Die Deletion konnte in den Hörstörungspatienten in homozygoter Form (del/del) und bei den Eltern heterozygot (WT/del) nachgewiesen werden (siehe Genotypangaben).*

Zur Veranschaulichung wurden die Rohergebnisse im Programm GensearchNGS (PhenoSystems, Wallonia, Belgien) betrachtet. Anschließend erfolgte eine Validierung der homozygoten Deletion durch eine PCR. Die Segregation wurde mit Hilfe einer qPCR durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der folgenden Abbildung 66 nachzuvollziehen.




| No. | Colour | Name | Type | Ct | Given Conc (Copies) | Calc Conc (Copies) | % Var |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 12 | | WT 1 2 | Standard | 15,31 | 2 | 2 | 1,1% |
| 13 | | WT 1 1 | Standard | 16,28 | 1 | 1 | 0,9% |
| 14 | | WT 2 2 | Standard | 15,34 | 2 | 2 | 1,1% |
| 15 | | WT 2 1 | Standard | 16,31 | 1 | 1 | 0,9% |
| 16 | | III_3 | Unknown | 26,56 | | | |
| 17 | | III_4 | Unknown | 26,62 | | | |
| 18 | | II_2 | Unknown | 16,40 | | 1 | |
| 19 | | II_1 | Unknown | 16,34 | | 1 | |

| No. | Colour | BK | Type | Ct | Given Conc (Copies) | Calc Conc (Copies) | % Var |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 20 | | GK | Unknown | 15,68 | | 2 | |
| 21 | | HC | Unknown | 15,61 | | 2 | |

*Abb. 66: Darstellung der Deletion im COL9A1-Gen in GensearchNGS und Validierung der Deletion mit Hilfe einer PCR. Sowohl bei Patient III-3 als auch bei Patient III-4 konnte mit Hilfe von GensearchNGS (PhenoSystems, Wallonia, Belgien) anhand der fehlenden Gen-Abdeckung eine Deletion detektiert werden (A). Auf der X-Achse sind die Exons angezeigt. Die schwarzen Balken reflektieren die Abdeckung der Exons des COL9A1-Gens. Der pinke Bereich markiert die fehlende Abdeckung. Die Deletion wurde anhand mehrerer PCRs der Exone 5, 6, 25, 33 und 34 nachgewiesen. Beispielhaft ist hier das PCR-Produkt des Exons 25 in einer Gelelektrophorese aufgetragen und damit die Deletion im COL9A1-Gen bei den Patienten III-3 und III-4 bestätigt worden (B). M ist der Marker, anschließend sind die betroffenen Probanden und die beiden Eltern sowie eine gesunde Kontrolle (GK) und eine betroffene Kontrolle (BK) aufgetragen. Der Leerwert (LW) diente der Kontaminationskontrolle. Durch eine Segregation mittels qPCR (Kurvendiagramm und Tabelle, C) konnte bei den Eltern eine heterozygote Deletion gefunden werden. Dies wird ersichtlich aus der Tabelle und dem zugehörigen Kurvendiagramm. Die gesunde Kontrolle (GK) und auch die betroffene Kontrolle (BK) zeigen eine normale Anzahl an Kopien und daher keine Deletion.*

Aufgrund fehlender PCR-Produkte der verschiedenen Exons des *COL9A1*-Gens der beiden Patienten III-3 und III-4, konnte die Deletion bestätigt werden.

Zur Charakterisierung der Deletion wurde zudem eine Bruchpunktanalyse durchgeführt. Dazu wurde ab den Enden der noch vorhandenen Exons in den intronische Bereich hinein sequenziert, bis ein Bruchpunkt ermittelt werden konnte. Erstaunlicherweise zeigte sich eine zusätzliche Insertion von 67 Nukleotiden, die auf einen FoSTeS/MMBIR-Entstehungsmechanismus zurückschließen lässt[154]. Bei diesem Mechanismus handelt es sich um einen Umlagerungsmechanismus, der auf DNA Replikationsmechanismus basiert. Hierbei kommt es während der DNA Replikation zu einem Wechsel zwischen dem Template Strang. Dies wird durch Mikrohomologien ermöglicht. Anbei folgt die eingefügte Sequenz (Abb. 67).

TTTTTGAATTTTGTGTAAAGAGGAACAGAGCAATAATGCATAAGAAAATATAATTCACTATTTTGCTTGTTAACTTGTGGAAAGTATTTTAATTAGAAATAGCAAATTATTAGAAGTAGAAAACGAT
Intron 5: g.70.997.277 – break point 1 Intron 33: g.70.948.189 – break point 2 Insertion of Intronic region 4, 37 and 28 Intron 33: g.70.948.188 – break point 2

*Abb. 67: Darstellung der Übergangsstelle von Intron 5 in Intron 33 im COL9A1-Gen. In dunkelblau und lila sind die wildtypischen Sequenzen bis zum Bruchpunkt angegeben. Dazwischen ist eine Insertion von zusätzlichen 67 bp zu erkennen. In magenta ist eine Sequenz aus dem Intron 33, in dunkelgrün eine Insertion aus dem Intron 28 und in orange und türkis ebenfalls kurze Sequenzen aus dem intronischen Bereich dargestellt.*

*COL9A1* ist eigentlich mit dem Stickler-Syndrom Typ assoziiert, jedoch weisen beide Patienten in dieser Familie eine isolierte Hörstörung auf.

Details zu diesem Fall finden sich in der Publikation:. Exome-wide copy number variation analysis identifies a *COL9A1* in frame deletion that is associated with hearing loss. Hofrichter et al., in submission.

## 3.11 CHARAKTERISIERUNG VON KANDIDATENGENEN

Insgesamt wurden acht Familien für die Charakterisierung von Kandidatengenen ausgewählt. Diese erwiesen sich in der Voranalyse negativ bezüglich aller Analysen von möglichen Genen, die mit Hörstörungen bisher assoziiert wurden. Hierbei wurden vor allen Dingen Hörstörungsfamilien mit dominantem Erbgang fokussiert. Von vier Familien wurden zur Exom Sequenzierung jeweils vier Probanden herangezogen. Von den restlichen vier Familien, die im Vorfeld mit dem TruSight One untersucht wurden, wurde mindestens der Indexpatient, wenn nicht ein Trio untersucht. In den meisten Fällen konnte ein Kandidatengen noch nicht detektiert werden, bzw. es kommen mehrere Gene als Kandidatengene in Frage. Jedoch in

drei Fällen konnte ein Kandidat identifiziert werden, bzw. das Gen konnte in Kooperation mit einem anderen Labor als Hörstörungsgen bestätigt werden.

### 3.11.1 UNGELÖSTE KANDIDATENGENFAMILIEN

Bei fünf Familien konnte bis jetzt noch kein attraktives Kandidatengen diagnostiziert werden, welches eine Hörstörung in der jeweiligen Familie erklären würde. Im Folgenden sind die Stammbäume der Familien sowie eine kurze Erklärung, warum diese Familien für die Kandidatengenstudie ausgewählt worden sind aufgeführt.

Bei Familie G1 handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine familiäre autosomal dominante Hörstörung, die erst in der dritten bzw. fünften Lebensdekade bei Betroffenen auftritt. Sie ist moderat bis schwer und es standen mehrere betroffene Probanden für die Untersuchung zur Verfügung. Der Stammbaum ist in Abbildung 68 zu betrachten.

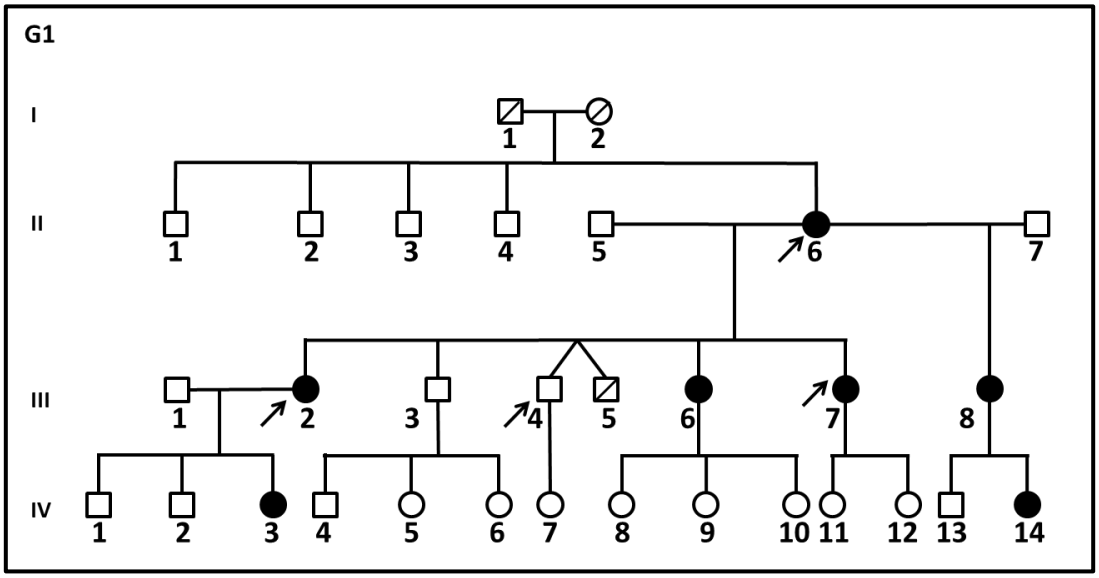



*Abb. 68: Stammbaum der Familie G1. Die Patienten mit einem schwarzen Pfeil wurden mit Hilfe einer Exom-Analyse untersucht.*

In der zweiten Kandidatenfamilie waren ebenfalls mehrere Personen von einer Hörstörung betroffen und es ergab sich eine zweifach elterlich vorbelastete Konstellation des Indexpatienten IV-1. Die krankheitsverursachenden Varianten dieser interessanten Konstellation zu identifizieren, weckte das Interesse an der Familie G18 (Stammbaum Abb. 69).

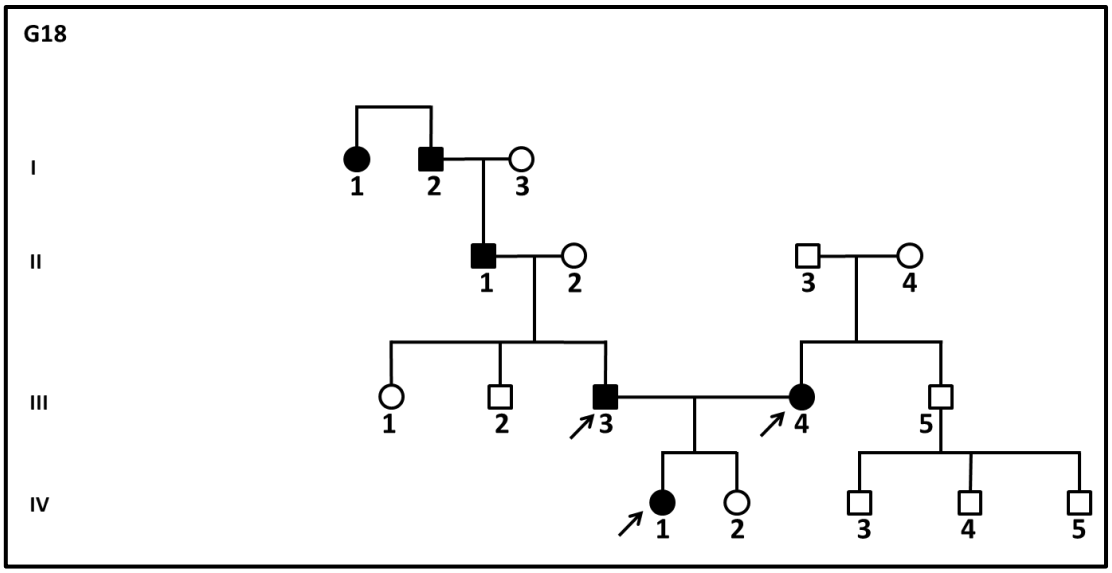



*Abb. 69: Stammbaum der Familie G18. Die Patienten mit einem schwarzen Pfeil wurden mit Hilfe einer Exom-Analyse untersucht.*

In der Familie G21 konnte ein variabler Hörstörungsphänotyp innerhalb der Familie festgestellt werden. So trat die Hörstörung zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf, sie ist schwer bis an Taubheit grenzend und zeigt einen progressiven Verlauf. In dieser Familie standen ebenfalls mehrere betroffene Patienten für die Untersuchung zur Verfügung (Abb. 70).

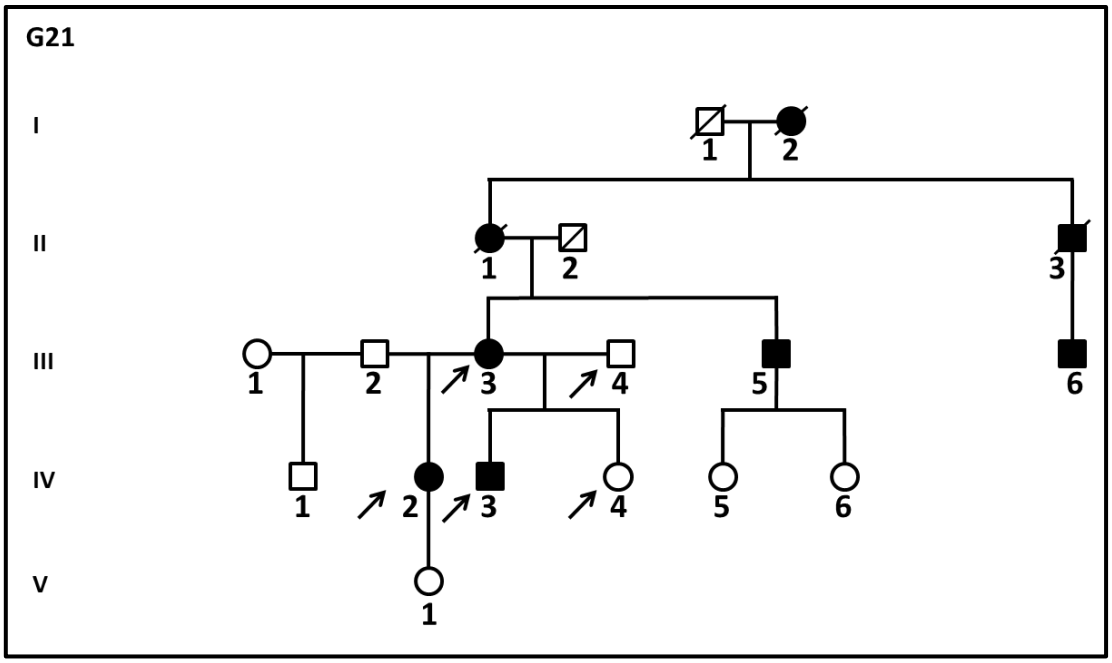



*Abb. 70: Stammbaum der Familie G21. Die Patienten mit einem schwarzen Pfeil wurden mit Hilfe einer Exom-Analyse untersucht.*

Bei der Familie G27 konnte ebenfalls eine autosomal dominante Hörstörung vermutet werden, so dass diese Familie ebenfalls zur weiteren Charakterisierung herangezogen wurde. Hier standen ebenfalls mehrere Familienmitglieder zur Verfügung (Abb. 71) und es handelte sich um eine schwerwiegende Hörstörung mit progressivem Verlauf, die postlingual aufgetreten ist.

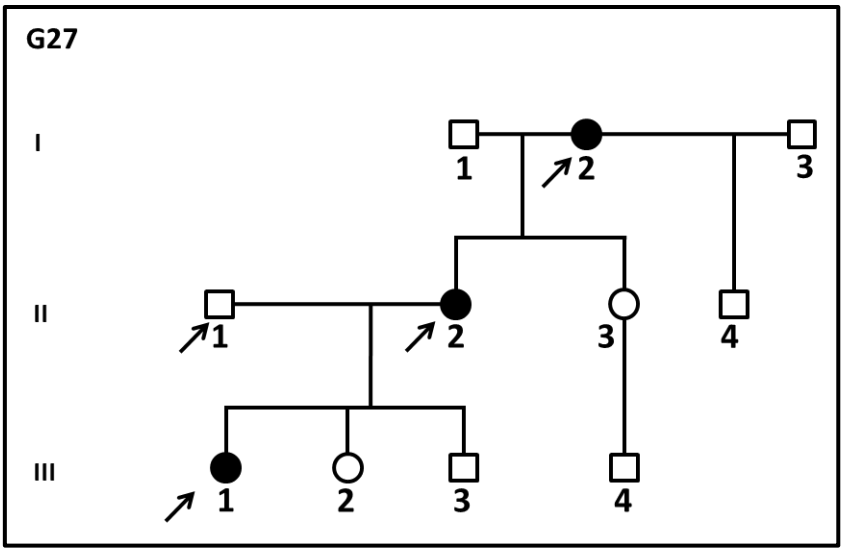



*Abb. 71: Stammbaum der Familie G27. Die Patienten mit einem schwarzen Pfeil wurden mit Hilfe einer Exom-Analyse untersucht.*

Die letzte Kandidatengenfamilie zeigt ebenfalls mehrere betroffene Personen in mehreren Generationen (Abb. 72). Diese Patienten präsentieren milde bis moderate Hörstörungen, die prälingual aufgetreten ist. Es stand ein Trio für die Analyse zur Verfügung.

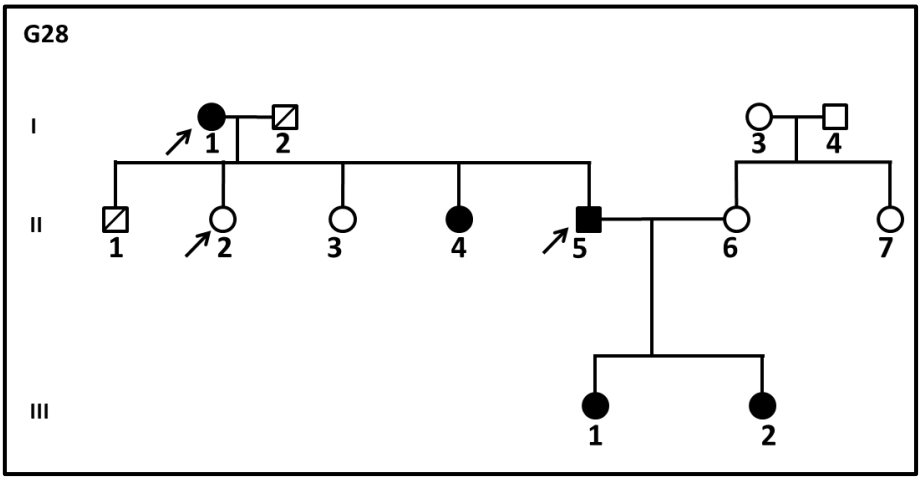



*Abb. 72: Stammbaum der Familie G28. Die Patienten mit einem schwarzen Pfeil wurden mit Hilfe einer Exom-Analyse untersucht.*

In keiner dieser Familien konnte eine kausale Variante in bekannten Hörstörungs- assoziierten Genen gefunden werden. Eine Kandidatengenuntersuchung hat ebenfalls bislang keine Ergebnisse erzielt. Es blieben mehrere mögliche Kandidaten übrig, so dass eine Re-Analyse der Daten erfolgen muss, um sie auf ein bestimmtes Kandidatengen eingrenzen zu können. Diese wurden daher nicht in die Arbeit mitaufgenommen.

### 3.11.2 KANDIDATENGENFAMILIE MIT POTENTIELLEM KANDIDATENGEN

In den nachfolgend beschriebenen Familien G22, G8 und G9 konnte jeweils ein Kandidatengen gefunden werden.

Die Indexpatientin der Familie G22 zeigt eine sporadische Hörstörung, da keine weitere Person in ihrer Familie betroffen ist. Diese Hörstörung ist sensorineural, postlingual, bilateral und konnte als moderat eingeordnet werden. Von ihrer Hörstörung sind die hohen und mittleren Frequenzen betroffen. Nachfolgend ist der Stammbaum der Familie G22 dargestellt (Abb. 73).

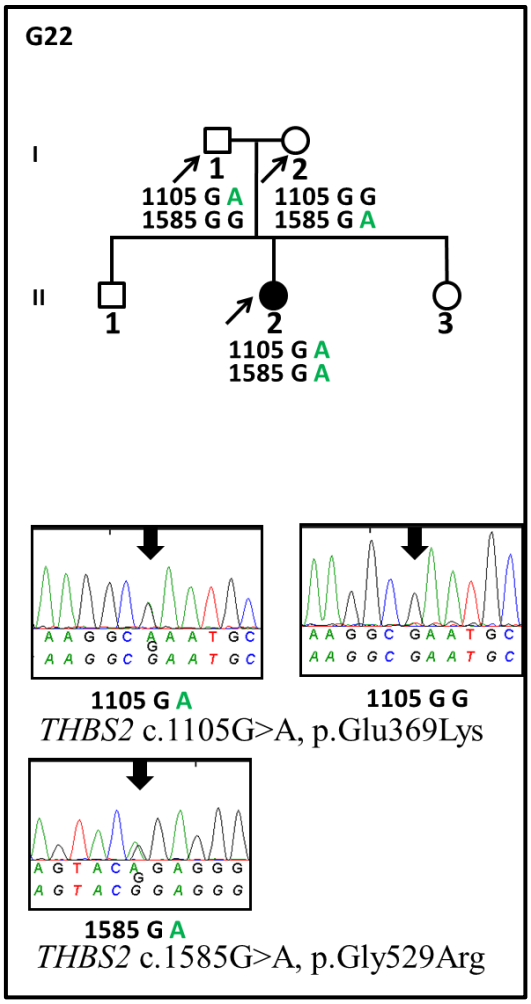



*Abb. 73: Stammbaum der Familie G22. Es wurde eine Trio-Analyse mit dem TruSight One-Panel durchgeführt. Hierbei waren alle mit schwarzem Pfeil markierte Familienmitglieder miteinbezogen. Zur weiteren Charakterisierung wurde die betroffene Indexpatientin mit Hilfe einer Exom-Analyse untersucht. Dabei konnten die compound heterozygote Varianten c.1105G>A, p.Glu369Lys und c.1585G>A, p.Gly529Arg im THBS2-Gen identifiziert werden. Die Ergebnisse der Validierung und der Segregation wurden bei allen getesteten Probanden dargestellt. Des Weiteren sind die zugehörigen Chromatogramme mit heterozygoter und wildtypischer Sequenz zu sehen.*

Die Variante c.1105G>A, p.Glu369Lys im *THBS2*-Gen ist von Vorhersagprogrammen als pathogen eingestuft worden. Zudem sind bis jetzt noch keine homozygoten Träger dieser Variante in gnomAD bekannt. Dies trifft ebenfalls für die Variante c.1585G>A, p.Gly529Arg zu. Sie wurde von Vorhersageprogrammen als pathogen klassifiziert und es gibt keine homozygoten Träger in gnomAD. Das Gen *THBS2* kodiert für das Thrombospondin II, welches die Synaptogenese im Nervensystem verbessert [155]. Es konnte eine Expression des

Thbs2 im Mausohr nachgewiesen werden [156], was die Pathogenität dieser Varianten unterstreicht.

In der Familie G8 konnte ebenfalls ein Kandidatengen entdeckt werden, das als potentielles Kandidatengen gehandelt wird. Die Hörstörung kann als sensorineural und prälingual eingeordnet werden, die zudem schwer ist und die mittleren und hohen Frequenzen umfasst. Sie ist stabil, aber es konnte zudem ein Tinnitus festgestellt werden. In Abbildung 74 ist der Stammbaum der Familie G8 zu sehen.

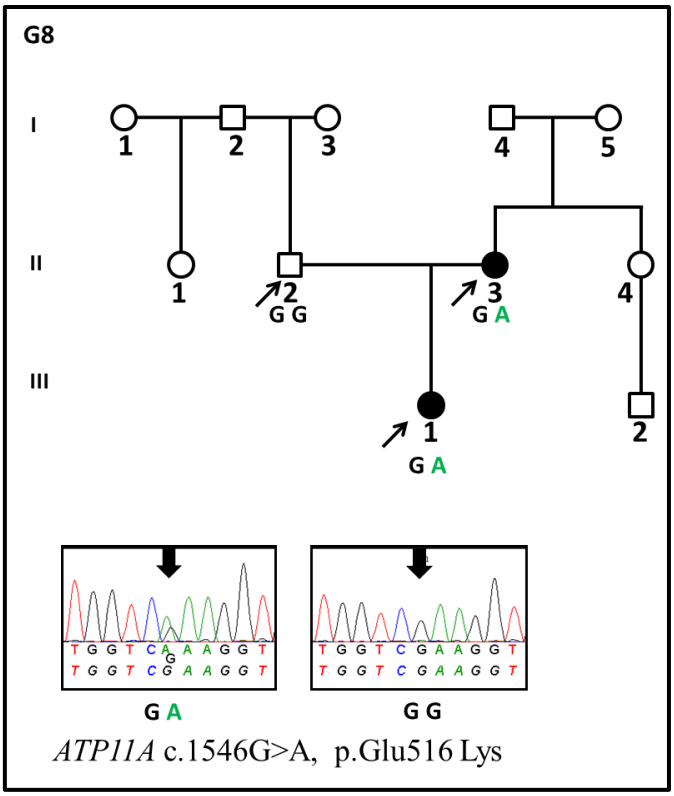



*Abb. 74: Stammbaum der Familie G8. Alle mit einem schwarzen Pfeil markierten Probanden wurden mit den TruSight One-Panel untersucht. Zusätzlich wurde eine Exom-Analyse durchgeführt. Hierbei konnte die Variante c.1546G>A, p.Glu516Lys im Gen ATP11A identifiziert werden. Eine Segregationsanalyse bestätige diese Variante ebenfalls bei der betroffenen Mutter, während der Vater wildtypisch ist. Das Chromatogramm mit den heterozygoten und wildtypischen Sequenzen ist unterhalb dargestellt.*

Die Variante c.1546G>A im *ATP11A*-Gen wird von Vorhersageprogrammen (SIFT, Mutation-Taster und Polyphen-2) als pathogen eingestuft und zeigt eine hohe Konservierung des Nukleotids und der Aminosäure. Sie ist in gnomAD dreimal in heterozygoter Form dokumentiert, was wiederum gegen die Pathogenität dieser Variante spräche. Jedoch ist

*ATP11A* in einem Deafness Loci zu finden, bei dem eine zugeordnete Familie einen ähnlichen Phänotyp aufwies.

Bei der Familie G7 konnte ebenfalls ein Kandidatengen gefunden werden, das in Kollaboration mit Jun Shen vom Morton Laboratory als solches bestätigt wird. Nachfolgend ist zunächst der Stammbaum der Familie G7 aufgetragen (Abbildung 75).

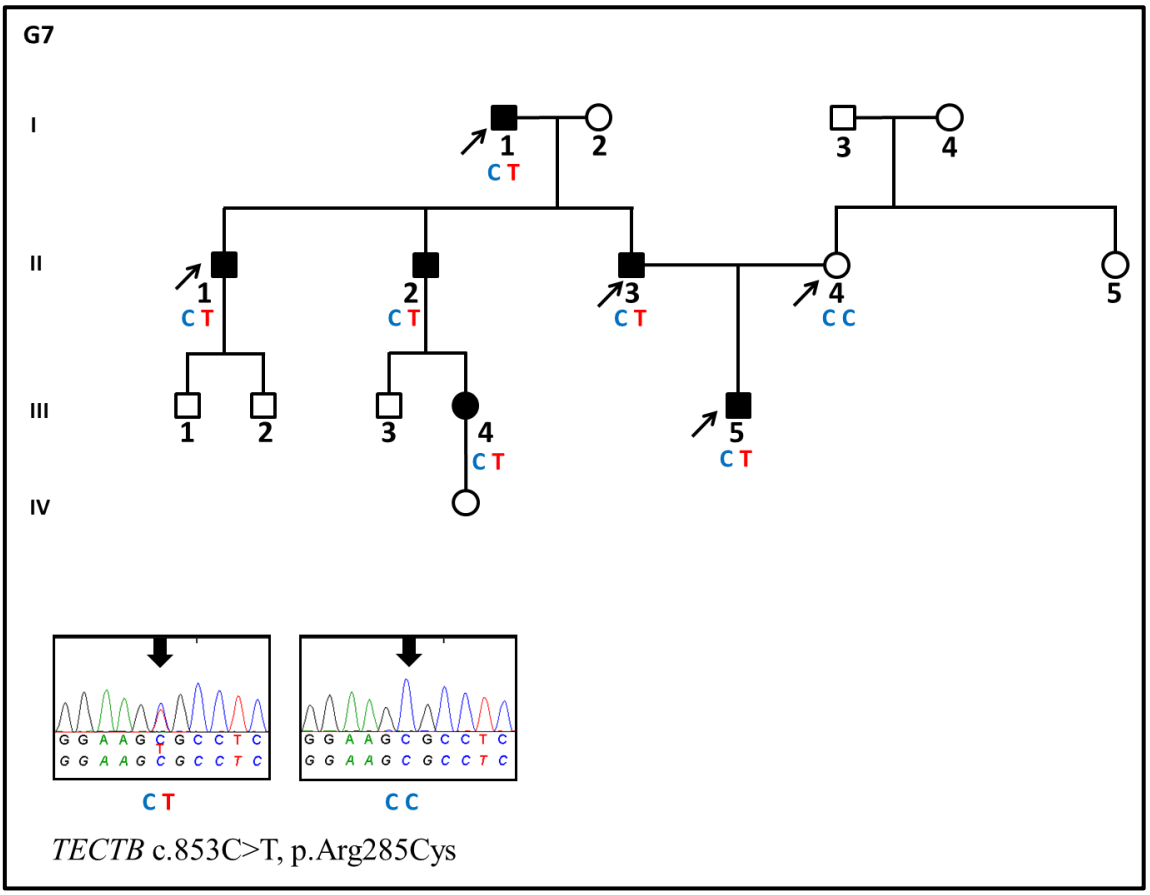



*Abb. 75: Stammbaum der Familie G7. Alle mit einem schwarzen Pfeil markierten Probanden wurden mittels Exom-Analyse untersucht. Eine Variante c.853C>T, p.Arg285Cys konnte im Gen TECTB identifiziert werden. Diese wurde per Sanger-Sequenzierung validiert und eine Segregationsanalyse durchgeführt. In allen betroffenen Patienten konnte die Variante heterozygot detektiert werden. Dies ist bei jedem Patienten in Form des Genotyps beschrieben. Zusätzlich ist das Chromatogramm mit der heterozygoten Variante sowie eines mit der wildtypischen Form angeführt.*

Die Variante c.853C>T, p.Arg285Cys in *TECTB* wird von Vorhersageprogrammen als pathogen eingestuft. Sie ist weder in gnomAD, noch in der Deafness Variation Database bekannt. Jedoch kann sie aufgrund der Segregation als kausal betrachtet werden. *TECTB*

kodiert für Tectorin beta und bildet mit Tectorin alpha die Striated sheet matrix in der Tektorialmembran [157]. Die Hörstörung in dieser Familie ist mild, postlingual und umfasst in erster Linie die tiefen Frequenzen.

# 4 DISKUSSION

## 4.1 UNTERSCHIEDE GENETISCHE UNTERSCHIEDE IN DEN ETHNIEN

Diese Studie zeigt, dass das Spektrum zugrunde liegender genetischen Ursachen für Hörstörungen innerhalb einer Ethnie im Vergleich zu anderen Ethnien sehr differieren kann. Dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse einer Studie, die aufgrund von Untersuchungen anhand rezessiver homozygoter Mutationen derselben 44Mb exomischen Region innerhalb verschiedener ethnischer Gruppen gravierende Unterschiede feststellen konnte [158]. Den größten genetischen Unterschied zeigte das Mutationsspektrum der amerikanischen im Vergleich zur afrikanischen Bevölkerung, während die Unterschiede der Mutationsspektren von amerikanischen im Vergleich zur asiatischen Bevölkerung geringer ausfielen. Interessanterweise sind die Unterschiede der Mutationsspektren von europäischer und Bevölkerung aus dem mittleren Osten eher gering [158]. Diese Unterschiede verdeutlichen vor allem auch hinsichtlich weiterer Untersuchungen, dass diese immer auf die zu untersuchende Population angepasst werden sollten.

### 4.1.1 UNTERSCHIED IN DER AUFKLÄRUNGSRATE

Während fast 73% aller Fälle der iranischen Kohorte E aufgeklärt werden konnten, wurden für nur 31% der Kohorte G eine genetische Ursache identifiziert. Letzterer Anteil entspricht der allgemeinen Aufklärungsrate durch Exom-basierte genetische Untersuchungen bei Hörstörungen [145, 159].

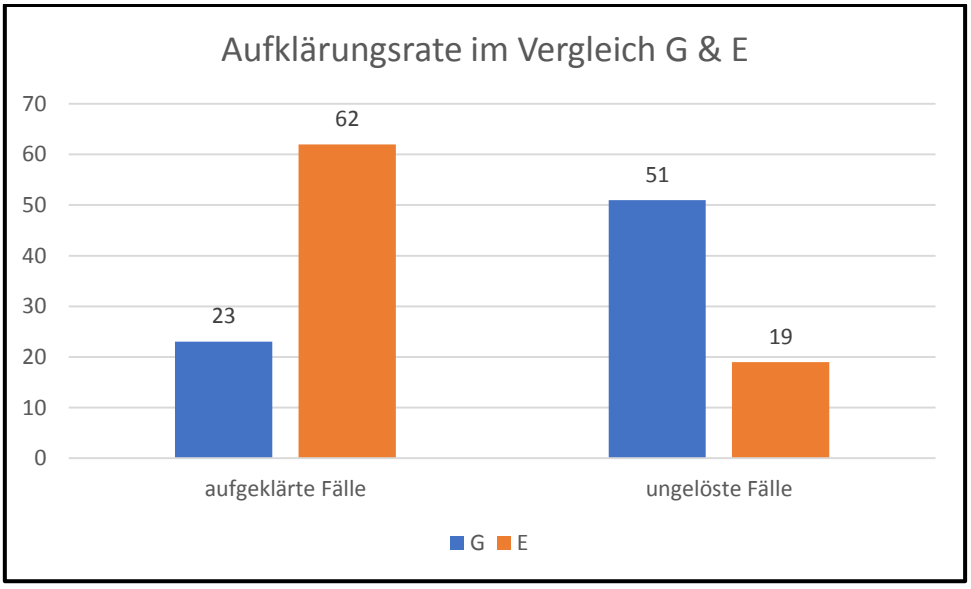



*Abb. 76: Darstellung der Aufklärungsrate in Abhängigkeit der Kohorten. Es konnten von insgesamt 81 Fällen aus Kohorte E 62 aufgeklärt werden, während für 23 von 74 Fällen aus der Kohorte G eine genetische Ursache gefunden werden konnte.*

Die Aufklärungsrate für Hörstörungen in der Kohorte E von 71% liegt etwas höher, als die schon in der Literatur beschriebenen Quote von 67%, die in einer iranischen Kohorte festgestellt werden konnte [160]. Diese Diskrepanz in der Aufklärungsrate beider Kohorten liegt einerseits an der Häufigkeit, mit welcher Hörstörungen in der iranischen Bevölkerung auftreten. So wird im Iran jedes 166. Kind mit einer Hörstörung geboren, und Hörstörungen werden als zweithäufigste Behinderung nach geistigen Behinderungen geführt [161, 162]. Diese hohe Prävalenz von Hörstörungen im Iran spiegelt wiederum den signifikanten Anteil von Verwandtschaftsehen [163]. Aufgrund von Homozygotie für pathogene Varianten verursacht durch Konsanguinität ist die Aufklärungsrate dementsprechend hoch [160]. Die niedrigere Aufklärungsrate in der Population G hat mehrere Gründe: Zum einen wurden alle Patienten ausgeschlossen, welche im Vorfeld positiv auf Mutationen im *GJB2*-Gen getestet wurden. Dieses Gen ist für einen Großteil aller Hörstörungen in der kaukasischen Bevölkerung verantwortlich [35], Des Weiteren wurden Patienten mit vermutlich dominant assoziierten Hörstörungen ausgewählt, die in der Regel seltener sind als die autosomal rezessiven Hörstörungen [25]. Zusätzlich wurden auch viele sporadische Fälle in diese Kohorte miteinbezogen, bei welchen aufgrund fehlender Segregation die Einschätzung von nicht beschriebenen Varianten sich als schwierig erwies [164].

### 4.1.2 VARIANTENSPEKTRUM IN DEN HÖRSTÖRUNGSGENEN

Insgesamt konnten in 51% aller aufgeklärten Fälle pathogene Missense-Varianten, in 20% Frameshift-Varianten, in 12% jeweils Nonsense- und Splice site-Varianten und in 3% kleine Deletionen und CNVs festgestellt werden. Die Häufigkeit von Missense-Varianten war erwartungsgemäß, während mehr Nonsense- und Splice site-Veränderungen als in der Literatur von Sloan-Heggen et al., 2016 angegeben detektiert werden konnten [145]. Dagegen waren in nur 3% aller aufgeklärten Fälle CNVs ursächlich und scheinen damit unterrepräsentiert, was möglicherweise an der geringeren Abdeckung in den Exomen liegen könnte, da in der Studie von Sloan-Heggen et al., 2016 Panels sequenziert wurden, die 66–89 mit Hörstörung assoziierte Gene enthielten [145].

#### 4.1.2.1 VARIANTENSPEKTRUM IN DER KOHORTE G

In der Kohorte G konnten in der Hälfte der Fälle Varianten in dominant assoziierten Genen festgestellt werden. In der anderen Hälfte wurden rezessiv assoziiert Varianten ermittelt, wobei diese in jeweils 50% der Fälle compound heterozygot oder homozygot nachgewiesen wurden. In der Literatur wurde hierbei auf ein Verhältnis von 1/3 zu 2/3 zugunsten der compound heterozygoten Varianten verwiesen, welches eher bei einer heterogenen Patientenkohorte zu erwarten gewesen wäre [159]. In einer beschriebenen Population aus den Niederlanden, die aufgrund der genetischen Ätiologie unserer Kohorte G ähnlich ist [158], konnte eine ähnliches Genspektrum beobachtet werden, wie es Kohorte G zeigt [159]. Bei den dominant assoziierten Hörstörungen konnten Gene wie *TECTA*, *WFS1* und *MYH14* identifiziert werden, die ebenfalls in der Kohorte G erfasst werden konnten [159]. Ebenfalls bei den rezessiv assoziierten Hörstörungen konnten Mutationen in Genen wie *SLC26A4*, *TMC1*, *TMPRSS3* und *CDH23* bestätigt werden [159]. Jedoch konnten Varianten in Genen, wie *CEACAM16*, *LRTOMT* oder *OTOG*, die eher seltener in Zusammenhang mit Hörstörungen auftreten, ermittelt werden [102].

#### 4.1.2.2 VARIANTENSPEKTRUM IN DER KOHORTE E

In der Kohorte E handelte es sich in den meisten Fällen um rezessiv assoziierte Hörstörungen. Eine Ausnahme bildete die Familie E78, bei der das dominante Hörstörungsgen *ACTG1* betroffen war (Stammbaum befindet sich im Anhang 9.2). Bei fast allen rezessiv assoziierten Fällen konnte eine homozygote pathogene Variante gefunden werden. Nur in vier Fällen lag eine compound heterozygote Variante als genetische Ursache vor. In der Literatur wurde ein solches Mutationsspektrum einer iranischen Population bereits beschrieben [160]. Interessanterweise wurden in dieser Kohorte von Sloan-Heggen mehr Nonsense- und auch

mehr Splice-Varianten beschrieben (14–18%) als in der beschriebenen Kohorte E (12%)[160]. In der von Sloan-Heggen untersuchten iranischen Population konnten ebenso *MYO15A* (18%) und *SLC26A4* (14%) als die am häufigsten betroffenen Hörstörungsgene ermittelt werden (Kohorte E *MYO15A* 14%, *SLC26A4* 9%). Weiterhin wurde in der Kohorte E das Gen *CDH23* relativ häufig (4%) als kausal identifiziert werden und auch in der Studie von Sloan-Heggen wurde bei 7% alle Fälle das gleiche Gen für eine Hörstörung verantwortlich gemacht [160]. Allerdings war das *OTOA*-Gen in 5% aller Fälle in der Kohorte E häufiger betroffen als zuvor beschrieben. In der Studie von Ghasemnejad et al., 2017 wurden einige Varianten in rezessiv assoziierten Hörstörungsgenen beschrieben, die in der Kohorte E bestätigt werden konnten, wie z.B. im *SLC26A4*-Gen die Varianten c.1198del, c.12229C>T, c.1334T>G und c.919-2A>G, im Gen *MYO15A* die Varianten c.1387A>G, c.5810G>A, c.4909–4911delGAG, im Gen *PDZD7* c.307G>C und im Gen *PCDH15* die Variante c.3652C>T, p.Gln1576Stop [43].

## 4.2 Die Herausforderung der Varianten-klassifizierung

Aufgrund der hohen genetischen und klinischen Heterogenität gestaltete sich die Variantenklassifizierung als Herausforderung. Dies wird ersichtlich durch die vorgestellte Familie G9 in 3.3.1, bei welcher mehrere pathogene Varianten zur Erklärung der Hörstörung in Frage kamen. Zudem erschweren unvollständige Segregationen, wie in 3.3.2, sowie ungewöhnliche Phänotypen, wie einseitige Hörstörungen (3.3.3), und die Frage, ob überhaupt eine genetisch bedingte Hörstörung vorliegen könnte (3.3.4), die Analyse. Ebenso erhöht der zweideutige Charakter einzelner Hörstörungsgene, die sowohl rezessive als auch dominante Hörstörungen bedingen können, die Schwierigkeit eine kausale Variante zu bestimmen. Zu diesen Genen zählen zum Beispiel *TECTA* [165, 166] oder *CEACAM16* [53, 167]. Einige andere Gene, wie zum Beispiel *COL11A2*, *COL11A1* und *MYO7A*, sind jeweils mit einem Syndrom (Stickler, Usher Typ 1) assoziiert [75, 80]. Dabei spielen vor allem die klinische Evaluierungen eine große Rolle. Oftmals werden Syndrome nicht in Zusammenhang mit einer Hörstörung gebracht, wie aus den Fällen G19, G41 und G64 ersichtlich wird (3.4.1). Des Weiteren können bei einer klinisch isolierten Hörstörung pathogene Varianten in Genen gefunden werden, die mit einer syndromalen Form der Hörstörung assoziiert sind (3.4.2). Weitere problematische Punkte hinsichtlich genetischer Untersuchungen bilden die familiäre Heterogenität und Kombinationen von familiären Mutationen (3.5.1 und 3.5.2) .

### 4.2.1 Schwierigkeiten bei der Variantenklassifizierung

Die Untersuchung der Familie G9 hat gezeigt, dass oftmals eine Analyse in der Kernfamilie, welche den Indexpatienten, dessen Eltern sowie etwaige Geschwister umfasst, keine genetisch eindeutige Erklärung zulässt, die die Hörstörung in der Familie erklären würde. Obwohl schon eine Analyse eines Trios erfolgte, welches die Eltern und den Indexpatienten beinhaltete, kamen mehrere Varianten (siehe 3.3.1) als kausaler Grund in Frage. Da keine der Varianten im Vorfeld bekannt war, konnte auch keine Varianten ausgeschlossen werden. Aufgrund des rezessiven Charakters einiger Varianten der betroffenen Gene konnten diese ausgeschlossen werden. So kamen zum Schluss drei Varianten in den Genen *TECTA*, *MYO6* und *MITF* als kausaler Grund in Frage. Letztere Variante könnte zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund der Allel-Häufigkeit angegeben in gnomAD ausgeschlossen werden. Dennoch könnte sowohl die Variante im *TECTA*-Gen als auch im *MYO6*-Gen die Hörstörung erklären. Sind keine weiteren Familienmitglieder zur Testung verfügbar, muss schlussendlich hier die Untersuchung mit diesem Ergebnis abgeschlossen werden. Bei der Ermittlung des Risikos einer Hörstörung für ein gemeinsames weiteres Kind der Eltern der Familie G9, wäre eine Aussage daher auch schwierig. Da in Familie G9 aber mehrere Familienmitglieder zur weiteren Testung zur Verfügung standen, worunter auch einige eine Hörstörung aufwiesen, konnte über die weitere Genotyp-basierte Auswertung die Variante c.4437C>G im *TECTA*-Gen als die ursächliche Variante identifiziert werden. Ein Vergleich des familiären und des in der Literatur beschriebenen Phänotyps stimmte überein [47, 165].

Dies stützte ebenfalls die Annahme, dass es sich bei der Variante im *TECTA*-Gen um die familiäre hörstörungsverursachende Variante handelte. Jedoch könnte dieser Schluss ohne die Segregationsanalyse von mehreren weiteren Familienmitgliedern nicht gezogen werden. Segregationsanalysen spielen daher eine große Rolle in der Diagnostik, da bei der Routinediagnostik nur der etwaige Indexpatient untersucht wird und nicht die komplette Familie. Eine generelle Empfehlung auf eine familiäre Segregationsuntersuchung vor allem bei dem Vorliegen einer dominanten Hörstörung wäre ratsam.

Dennoch kann eine Untersuchung einer Familie mittels einer Segregationstestung nicht immer die gewünschte Auskunft geben. Dies wird ersichtlich anhand der Familien E39 und G12, die Beispiele für unvollständige Segregationen bilden. In beiden Familien konnten Varianten detektiert werden, die aufgrund ihres Charakters als kausal betrachtet werden konnten, aber bis dato noch nicht in Erscheinung getreten sind bzw. deren Pathogenität in der Literatur kontrovers diskutiert wurde. Obwohl die Deletion c.59–5_89del in *ILDR1* bei Familie E39 kausal sein sollte, aufgrund des Verlustes von mehreren Aminosäuren, konnte diese Variante

dennoch in homozygoter Form auch bei den nicht betroffenen Geschwistern nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis könnte zum einen mit einem Allel-Drop Off bei der PCR mit der betroffenen Geschwister-DNA erklärt werden. Das bedeutet, dass nur ein Allel amplifiziert wurde, weil an das zweite Allel aufgrund von SNPs die Primer nicht anbinden konnten. Obwohl eine weitere PCR mit anderen Primern dasselbe Ergebnis aufwies, kann ein Allel-Drop Off nicht ausgeschlossen werden, da der Vater in dieser Familie nicht untersucht werden konnte. Zum anderen könnten auch die nicht betroffenen Geschwister eine Hörstörung aufweisen, die bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht als solche erkannt wurde. Des Weiteren könnte der Informationsverlust durch die Deletion im *ILDR1*-Gen an dieser Position keine Auswirkung auf die Funktion des Proteins hat. So hat man bei einigen Genen festgestellt, dass diese den Verlust bzw. Veränderungen innerhalb ihrer DNA in bestimmten Exonen hinnehmen können, ohne dass dies zur Ausprägung eines Phänotyps führt [168]. In Familie G12 konnte eine heterozygote Variante im *DIAPH3*-Gen festgestellt werden, die im Vorfeld schon mit einer Hörstörung assoziiert wurde [128]. Diese konnte in der DNA des Indexpatienten, aber auch in der DNA der nicht betroffenen Mutter, identifiziert werden. Auch für diese unvollständige Segregation, die in der Familie G12 beobachtet werden konnte, können mehrere mögliche Erklärungen vorliegen. Es könnte vermutet werden, dass entweder die Mutter eine Hörstörung aufweist, die bis jetzt noch nicht festgestellt worden ist, oder dass diese Variante eine reduzierte Penetranz aufweist. Letzteres würde auch erklären, warum mehrere heterozygote Allelträger in gnomAD bekannt sind. Umgekehrt könnte aber auch diese Allel-Häufigkeit in gnomAD als Anlass genommen werden die Variante zu re-klassifizieren, also als Variante ohne Auswirkung zu deklarieren, die somit ebenfalls die Hörstörung des Indexpatienten nicht erklären würde. Der Indexpatient müsste weiter untersucht werden, um eine tatsächlich kausale Variante zu identifizieren. Allerdings könnten aber auch Modifier existieren, die den Phänotyp des Patienten beeinflussen. Zum Beispiel ist bekannt, dass Varianten im *ATP2B2*-Gen einen Einfluss auf den Schweregrad von *CDH23*-assoziierten Hörstörungen haben können [169]. Auf diesen Punkt wird im Detail in den Schlussfolgerungen und im Ausblick eingegangen.

Bei einseitigen Hörstörungen wird die Identifizierung der kausalen Variante durch eine fehlende Genotyp-Phänotyp-Korrelation erschwert. Obwohl es viele Patienten mit einer einseitigen Hörstörung gibt, ca. 7% in der untersuchten Kohorte, gibt es bis dato nur das Gen *KITLG*, das mit einer nicht-syndromalen dominanten einseitigen Hörstörung mit unvollständiger Penetranz assoziiert ist [170]. Daher war es erstaunlich bei dem Indexpatienten II-3 der Familie G11 compound heterozygote Varianten im Gen *MYO15A* zu ermitteln. Beide Varianten waren bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht beschrieben, konnten

aber aufgrund ihres Charakters und ihrer Pathogenitätsvorhersagen als möglicherweise kausal eingestuft werden. Eine Segregationsanalyse zeigte jedoch denselben Genotyp beim gesunden Bruder. Daraufhin wurden alle Varianten nochmals überprüft und es konnte eine weitere heterozygote Variante im *MYO7A*-Gen identifiziert werden. Diese war beim Vater und beim Indexpatienten zu finden, jedoch nicht bei der Mutter und beim gesunden Bruder. In diesem Sinne zeigte der Indexpatient eine individuelle Akkumulation von möglichen pathogenen Varianten. Diese Art der Akkumulation wurde schon beobachtet und könnte möglicherweise die einseitige Hörstörung des hier beschriebenen Patienten erklären [171]. Unterstützt wird diese These durch die Tatsache, dass die Proteine MYO7A und MYO15A Teil des Usher-Komplexes sind [1]. Zuletzt wurden digenisch bedingte Hörstörungen bei Genen beschrieben, die derselben Proteingruppe angehören, wie zum Beispiel *GJB2* und *GJB6* [172]. Für eine eindeutige Abklärung sollten weitere Familienmitglieder in Form einer Segregationsanalyse getestet werden.

Ob eine genetische Untersuchung angefragt wird, ist abhängig vom Phänotypen des Patienten. Gibt es ein Anzeichen für eine genetisch unabhängige Erklärung der Hörstörung wird oftmals keine genetische Untersuchung angestrebt. So ist bei einer Vorerkrankung mit einem Cytomegalovirus (CMV), die ebenfalls zu einer Hörstörung führen kann, die genetische Untersuchung fraglich. Das Cytomegalovirus kommt schätzungsweise bei bis zu 2% aller Geburten vor und weist eine Hörstörungsinzidenz von 21–24% auf [18]. Kongenitale Cytomegalovirusinfektionen sind ein Risikofaktor für umweltbedingte Hörstörungen, die bei Kindern verzögert auftritt und progressiv voranschreitet [173]. In Hinblick auf eine solche Vorerkrankung werden die Patienten nicht genetisch untersucht, da die Hörstörung höchstwahrscheinlich auf die CMV-Infektion zurückzuführen ist. Umso erstaunlicher war der Fund einer genetisch ursächlichen Variante bei einem CMV-Patienten. Bei dem Indexpatienten der Familie G26 konnte eine bekannte Stoppmutation im Gen *TMC1* festgestellt werden, die eine Hörstörung erklären würde [132]. Aufgrund dieses Ergebnisses wäre ein Überdenken der Ausschlusskriterien für eine genetische Untersuchung von Hörstörungspatienten sinnvoll, vor allem bei Vorliegen eines umweltbedingten Faktors wie CMV-Infektion oder Lärmtraumata.

### 4.2.2 Der zweideutige Charakter einzelner Hörstörungsgene

Insgesamt sind bis dato 12 Gene bekannt, die sowohl eine rezessive als auch eine dominante Hörstörung verursachen können. Fünf dieser Gene wurden auch im Zuge dieser Studie vorgestellt (*TECTA, GJB2, MYO7A, TMC1* und *CEACAM16*). Von diesen Genen zeigten *GJB2* und *TMC1* einen rezessiven Charakter, während die Variante in *CEACAM16* mit einer dominanten Hörstörung assoziiert wurde [148]. Die Mutationen in *MYO7A*-Gen konnten vorwiegend mit einer rezessiven Hörstörung in Zusammenhang gebracht werden aufgrund von Segregationsanalysen in den Familien E31 und E55 (siehe Anhang). In der Familie G42 könnte eine autosomal dominante Hörstörung verursacht durch eine Variante im *MYO7A*-Gen vermutet werden, jedoch konnte dies abschließend nicht geklärt werden, da keine weiteren Informationen zu dieser Variante vorlagen und eine Segregationsanalyse aufgrund fehlender Familienmitglieder nicht möglich war. Dieser Fall beschreibt die Schwierigkeit eine unklare Variante zu klassifizieren im Angesicht ihres zweideutigen Charakters. Dies wird zudem noch durch die syndromale Assoziation von *MYO7A* erschwert, da dieses Gen ebenfalls für das Usher-Syndrom Typ 1 verantwortlich ist [80]. Interessanterweise konnten im *TECTA*-Gen sowohl dominant- als auch rezessiv-assoziierte pathogene Varianten detektiert werden. Die dominanten Varianten in *TECTA*-Gen waren ausschließlich Missense-Varianten (G9 und G62, siehe Stammbäume im Anhang). Im Gegensatz dazu konnte bei den beiden Familien E14 und E28 (Stammbäume finden sich im Anhang) eine Splice-Variante gefunden werden, die zu einer rezessiven Hörstörung führte. Ausgehend von diesen Ergebnissen geben unterschiedliche Varianten unterschiedliche Phänotypen vor. Dies zeigte sich auch bei der Betrachtung von einigen mutierten Mauslinien, bei welchen bestimmte Mutationen einen bestimmen klinischen Phänotyp aufwiesen [47]. Dies könnte möglicherweise auch auf dieses Gen-Modell übertragen werden. Auch bei dem Gen *CEACAM16* konnte ein interessanter Zusammenhang betrachtet werden. Waren die bisher beschriebenen Varianten in *CEACAM16* Missense-Varianten, die mit einer autosomal dominanten Hörstörung assoziiert wurden [148], handelte es sich bei den vor kurzem in der Literatur publizierten Varianten um Splice Site- und Stoppmutationen mit rezessivem Charakter [53, 174]. Man könnte daraus schließen, dass Missense-Mutationen einen gravierenderen negativen Effekt ausüben als Splice Site- oder Stoppmutationen. Möglicherweise hat ein fehlerhaftes Protein dramatischere Folgen, als ein verkürztes Protein bzw. ein wenig oder gar nicht exprimiertes Protein. Die Charakterisierung weiterer Varianten in diesen Genen von Hörstörungspatienten könnte in Zukunft Aufschluss über die Varianten- Phänotyp-Korrelation geben.

### 4.3.3 VERSTECKTE SYNDROME

Ein weiterer kritischer Punkt bei der Variantenfilterung und Variantenklassifizierung sind versteckte Syndrome. Solcherart bezeichnet wurden in dieser Arbeit das Perrault- [74] und das Jervell-Lange Nielson-Syndrom. Ebenso kann das Usher-Syndrom Typ II in diese Kategorie eingeordnet werden. Alle drei Syndrome präsentieren in den ersten Lebensjahren eine isolierte Hörstörung. Erst im Laufe ihres Lebens weisen Patienten mit dem Jervell-Lange Nielson-Syndrom ein Long-QT-Syndrom auf, bzw. wird später ausgeprägt, während Patienten mit dem Usher-Syndrom Typ II [82] eine Retinitis pigmentosa entwickeln, die sich in Form von Nachtblindheit ankündigt. Während Männer mit Perrault-Syndrom keine weiteren Auffälligkeiten präsentieren, haben Frauen eine ovariale Dysfunktion, die zu Infertilität führen kann. In den meisten Fällen werden die Patienten schon im Kindesalter untersucht, was zur Folge hat, dass keine Symptome erkannt werden, da sich diese erst später manifestieren, wie dies auch beim Pendred-Syndrom der Fall ist. Kommt es aufgrund einer solchen Fehleinschätzung zu einer Fokussierung auf nicht syndromale Hörstörungen, werden Syndrom-assoziierte Gene nicht weiter untersucht. Dies hätte in dieser Studie zur Folge, dass ca. 5% der Patienten keine oder nur eine unvollständige molekulargenetischer Diagnose bekämen. Des Weiteren scheinen verschiedene Varianten in syndromalen Hörstörungsgenen nicht syndromale Hörstörungen zu imitieren [175]. Ein gutes Beispiel zeigt in diesem Fall die Familie G2, bei der in dem mit Usher Typ II-assoziierten *ADGRV1*-Gen pathogene Varianten gefunden wurden, die aber nicht mit einem Augenphänotyp in Zusammenhang gebracht werden konnten. Beide Patientinnen befinden sich in der zweiten bzw. dritten Dekade ihres Lebens und entsprechen somit nicht dem zu erwartenden Phänotyp. In HGMD [102] sind zu diesem Gen schon weitere Varianten gelistet, die nur mit einer isolierten Hörstörung in Zusammenhang gebracht wurden. Dennoch könnten diese Patienten von einer ophthalmologischen Untersuchung profitieren, falls eine Retinitis pigmentosa sich noch ausbildet. Zusätzlich kann durch das Tragen von Linsen die Ausbildung der Retinitis pigmentosa verzögert werden[176].

### 4.2.3 FAMILIÄRE HETEROGENITÄT

Wenn innerhalb einer Familie mehrere Mitglieder an der gleichen genetisch bedingten Erkrankung leiden, die genetische Ursache aber unterschiedlich ist, spricht man von einer familiären Lokus Heterogenität. Familiäre Heterogenität konnte vor allem in der Kohorte E beobachtet werden (E6, E70, E52, E72 und E75), aber auch in der Familie G6 aus der Kohorte G. In der Studie von Rehman et al., 2015 [131] ist beschrieben, dass in ca. 15,3% aller Familien eine Lokus-Heterogenität nachgewiesen werden konnte[177]. Allerdings konnte diese hohe Anzahl an Familien mit Lokus-Heterogenität in unserer Kohorte nicht beobachtet werden [177]. Wie in der Publikation beschrieben, konnten in den Familien E6 und E70 in verschiedenen Zweigen der Familie verschiedene ursächliche Varianten detektiert werden. Waren in der Familie E6 die Gene *SLC26A4* und *CIB2* betroffen, konnte im Gegensatz dazu in der Familie E70 die ursächlichen Varianten in den Genen *ILDR1* und *OTOF* detektiert werden. In der Familie E52 zeigten der Vater und die Tochter ebenfalls Hörstörungen mit unterschiedlichen ursächlichen Varianten in den Genen *CABP2* und *CDH23*, während bei der Cousine der Tochter das für die Hörstörung ursächlich Gen nicht ermittelt werden konnte. Dies traf ebenso auf die Familie E72 zu, bei der die Hörstörung der Indexpatientin auf eine pathogene Variante im Gen *TMIE* zurückzuführen ist, jedoch die der Cousine ersten Grades nicht. In der letzten Familie E75 konnte sogar innerhalb von Geschwistern eine Heterogenität festgestellt werden. Hierbei zeigte der Indexpatient IV-1 eine *TRIOBP*-assoziierte Hörstörung. Diese konnte bei dem betroffenen Bruder IV-2 nicht nachgewiesen werden. Aufgrund fehlender klinischer Informationen konnte in den meisten Fällen keine Korrelation von Phänotyp und Genotyp beschrieben werden. Allerdings lagen die klinischen Daten der betroffenen Probanden der Familie E6 vollständig vor. Beide Cousinen zeigen einen ähnliches Auftrittsalter für die Hörstörung. Allerdings ist die Probandin IV-3 schwerer betroffen und ihre Hörstörung verläuft progressiv. Dieser Phänotyp konnte auch bei anderen Patienten mit einer *CIB2*-assoziierten Hörstörung festgestellt werden. Das Protein CIB2 ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der $Ca^{2+}$-Homöostase in den Zellen und interagiert mit Integrin- Transmembranrezeptoren, die für die Zelladhäsion, Migration und Aktivierung von Signalwegen essenziell sind. Im Innenohr wird das $Ca^{2+}$ für die Funktion der mechanosensitiven Transduktionskanäle benötigt [178, 179]. Die Hörstörung der Probandin IV-2 ist weniger stark ausgeprägt, zeigt sich aber asymmetrisch. Dies könnte auf eine *SLC26A4*-assoziierte Hörstörung hinweisen [180]. Allein aufgrund der phänotypischen Unterschiede kann nicht auf eine familiäre Heterogenität geschlossen werden, da viele Hörstörungen auch innerhalb einer Familie eine gewisse phänotypische Variabilität aufweisen. Wäre zum Beispiel die Probandin IV-3 zuerst untersucht worden, wäre die

Variante *CIB2* festgestellt worden. Diese könnte auch eine moderate phänotypische Ausprägung zeigen wie sie bei der Hörstörung in der Probandin IV-2 festgestellt werden konnte. Daher wäre die Probandin IV-2 nur für die Variante *CIB2* getestet worden, obwohl diese als genetische Ursache eine Deletion in *SLC26A4* aufweist [179]. Daher ist es oftmals notwendig in einer Familie mit mehreren betroffenen Patienten eine umfangreiche genetische Analyse durchzuführen im Sinne einer Panel- bzw. Exom-Analyse, um eine gegebene familiäre Locus-Heterogenität zu detektieren. In umgekehrter Weise könnten auch zwei verschiedene familiäre Mutationen in Kombination zu einer Hörstörung führen, wie es in der Familie E55 der Fall ist. Voraussetzung ist, dass beide Varianten in einem Gen liegen. Wie schon in 4.1 beschrieben, sind einige Gene in der iranischen Bevölkerung häufiger mit ursächlichen Hörstörungsvarianten assoziiert. Darunter fällt auch das Gen *MYO7A* [160], in welchem zwei Mutationen in der DNA des Indexpatienten der Familie E55 in compound heterozygoter Form detektiert werden konnten. Somit scheint eine Kombination von familiären Mutationen in iranischen Familien wahrscheinlicher.

### 4.2.4 PHÄNOTYP BASIERTE DATENANALYSE

Diese Studie beschränkte sich auf nicht syndromale bzw. isolierte Hörstörungen. Dennoch konnten in mehreren Fällen im Nachhinein weitere Symptome bei Patienten ermittelt werden. Beispielhaft sind dafür die Familien bzw. Indexpatienten G19, G41 und G64. Bei allen drei Familien konnten beim Indexpatienten mehrere weitere Symptome beschrieben werden. Durch eine Analyse dieser Patienten konnten Varianten in Genen detektiert werden, die mit einer syndromal-assoziierten Hörstörung verbunden sind. Aufgrund der genetischen Ergebnisse wurden die Phänotypen der Patienten überprüft und Übereinstimmungen zum syndromalen Phänotyp festgestellt. Dies zeigt die Leistung der genetischen Untersuchung mit Hilfe von Exomen, die es erlaubt retrospektiv den Phänotyp des Patienten aufzuklären. Nicht umsonst wird bei der Definition einiger Syndrome der Genotyp des Patienten miteinbezogen, wie es zum Beispiel beim Marfan-Syndrom, einer Bindegewebserkrankung, der Fall ist [181]. Oftmals ist daher die Diagnose einer Erkrankung nur durch das Zusammenspiel von Genotyp und Phänotyp möglich.

### 4.2.5 Variantenklassifizierung hinsichtlich angeführten Komponenten

Die Familie G6 ist ein Paradebeispiel für mehrere Problematiken bei der Variantenklassifizierung. Zum einen konnten mehrere pathogene Varianten beim Indexpatienten detektiert werden: eine homozygote Variante im Gen *USH1G* c.310A>G und zwei heterozygote Varianten im *USH2A*-Gen c.11864G>A und c.12889T>C. Beide betroffenen Gene für sich könnten eine Hörstörung erklären. Zum anderen sind hierbei Gene beteiligt, die eine syndromale Assoziation haben. Pathogene Varianten im Gen *USH2A* wurden mit dem Usher-Syndrom Typ II in Verbindung gebracht [82], während Varianten im Gen *USH1G* sowohl mit einer nicht syndromalen Hörstörung als auch mit dem Usher-Syndrom Typ I assoziiert wurden [142]. Die Patientin wies keine Retinitis pigmentosa auf, aber da es sich bei ihr um ein Kind handelt und klinische Symptome noch auftreten können, kann ein Syndrom nicht ausgeschlossen werden. Eine Segregationsanalyse der Eltern und der Geschwister konnte den compound heterozygoten Charakter im Gen *USH2A* bestätigen und zeigte, dass der mild betroffene Bruder nur die Variante in Gen *USH1G* homozygot aufwies. Daher ist dies ebenfalls ein Beispiel für familiäre Locus-Heterogenität. Ebenso zeigte sich hier eine Akkumulation mehrerer Varianten in Genen, deren Proteine zum Usher-Komplex gehören [1]. Daher könnte der phänotypische Unterschied des schwer betroffenen Patienten im Gegensatz zum milden betroffenen Bruder auf diese Akkumulation zurückzuführen sein.

### 4.2.6 Exom-Sequenzierung als Methodik in der Forschung und Diagnostik

Exom-Sequenzierungen finden auch immer öfter Anwendung im Rahmen der Routine-Diagnostik [182]. So wurden diese inzwischen für Hörstörungspatienten der Humangenetik Würzburg eingesetzt. Da Hörstörungen sowohl klinisch als auch genetisch sehr heterogen sind und immer wieder neue Hörstörungsgene entdeckt werden, kann durch eine Exom-Sequenzierung ein vollständiges Bild aller Gene im Zusammenhang untersucht werden. Wie in der Einleitung beschrieben, wurden im Laufe dieser Arbeit mehr als 40 Hörstörungsgene entdeckt. Aufgrund dessen ist eine Panel-assoziierte Analyse nachteilig, da ein Update eines Panels nicht ohne weiteres möglich ist. Dies wurde unter anderem bei den Familien G1–33 deutlich, die mit Hilfe des TruSight One-Panels untersucht wurden. Einige neuere Hörstörungsgene waren nicht auf diesem Panel enthalten, so dass zusätzlich von allen Familien ohne pathogene Variante nach der Panel-Untersuchung eine Exom-Anreicherung für eine Kandidatengenuntersuchung durchgeführt werden musste. Hierdurch konnten tatsächlich potentiell pathogene Varianten, wie unter 3,7 & 3.11.2 beschrieben, detektiert werden. Mit Hilfe einer Exom-Analyse kann auch für die Diagnostik ein *in Silico*-Panel angepasst werden. Hierbei werden nur bestimmte Gene untersucht. Durch die Anreicherung aller kodierender Gene ist die Nutzung des *in Silico*-Panels flexibel und kann für jeden Patienten individuell angepasst werden. Dennoch bringt die Exom-Sequenzierung und deren Anwendung nicht nur Vorteile, sondern auch Limitationen. Die Abdeckung der einzelnen Gene ist deutlich geringer, als bei den angepassten Panels. Deshalb zeigen einige Bereiche eine geringe bzw. gar keine Abdeckung, wie beispielsweise ein Bereich im Exon 2 des *MYO15A*-Gens. Dennoch konnten viele Hörstörungen von Patienten mit Hilfe einer Exom-Analyse aufgeklärt werden, was die Leistung dieser Anwendung unterstreicht.

## 4.3 BEISPIELFÄLLE IM DETAIL

Die nachfolgenden Fälle zeigen spezifische Eigenschaften einzelner Hörstörungen und werden daher im Detail diskutiert.

### 4.3.1 DE NOVO MUTATION IM *CEACAM16*-GEN

Das Gen *CEACAM16* (OMIM: 614591) spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung und Struktur der Tektorialmembran. Es kodiert für das carcinoembryonische Antigen Zelladhäsionsmolekül 16 und liegt auf dem Chromosom 19q13.32 im DFNA4A-Locus (OMIM: 600652) (Abb.8) [167, 183]. Das Protein besitzt 425 Aminosäuren und vier Proteindomänen, wobei die Domänen von den Exons 3–6 kodiert werden. Bei den vier Proteindomänen handelt es sich um eine $NH_2$-terminale N1-Immunglobulin variable Domäne, zwei Imunoglobulin ähnliche Domänen A und B und einer konservierten COOH-terminale N2-Domäne mit Immunoglobulin ähnlichem Charakter. CEACAM16 selbst ist innerhalb CEA-Genfamilie am stärksten in Säugetieren konserviert [184]. Bei CEACAM16 handelt es sich um ein sezerniertes Protein, dass in den interdentalen und den Deiters-Zellen sowie in der Tektorialmembran exprimiert wird [157]. Defekte in diesem Gen sind mit einer dominanten oder auch mit einer rezessiven Hörstörung verbunden [53, 167, 174, 185]. Die folgende Abbildung zeigt die kodierenden Exons in Zusammenhang mit den bekannten Mutationen und den betroffenen Domänen (Abb. 77).

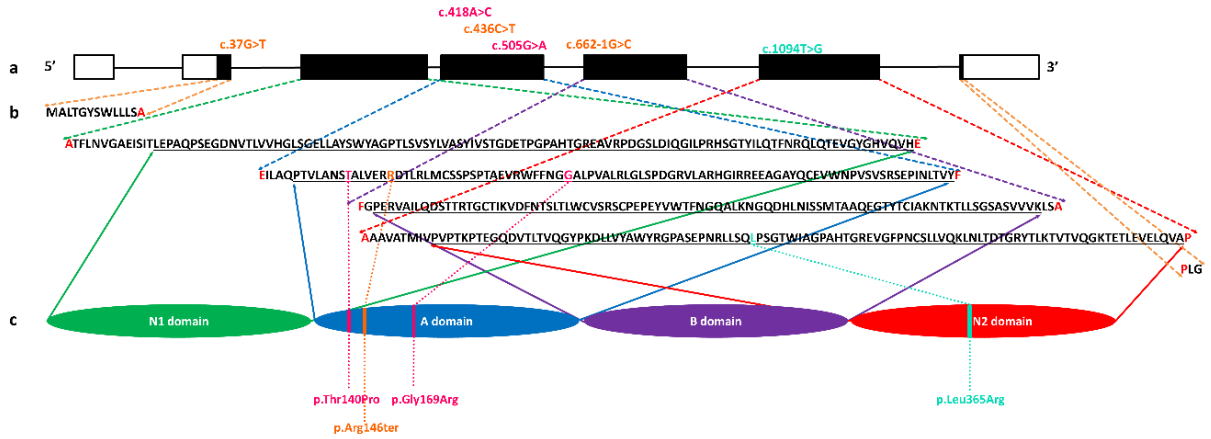



*Abb. 77: Schematischer Überblick über das Gen CEACAM16 und dessen Protein. a. CEACAM16 besteht aus 7 Exons, wovon Exons 2–6 für das Protein* CEACAM16 *kodieren. Die für eine autosomal dominante Hörstörung bisher bekannten ursächlichen Mutationen befinden sich im Exon 4 und sind pink markiert. Bekannte Varianten, die mit einer autosomal rezessiven Hörstörung in Zusammenhang stehen, sind in orange markiert. Bei den Varianten in Exon 2 und Exon 5 handelt es sich um Splice Site-Varianten, während die Variante c.436C>T im Exon 4 zu einem Stopp während der Proteinsynthese führt. Die bei Familie G5 gefundene Variante c.1094T>G befindet sich im Exon 6 und ist türkis markiert. b. Die Sequenz der Aminosäuren ist entsprechend zu den kodierenden Exons aufgeführt (gestrichelte Pfeile). Rot markierte Aminosäuren kennzeichnen überlappende Aminosäuren zwischen zwei Exons. Die bekannten Aminosäurensubstitutionen sind in pink und orange entsprechend markiert, während der Aminosäureaustausch p.Leu365Arg in der Familie G türkis dargestellt ist. c. Jede Domäne ist dem kodierenden Exon zugeordnet, was durch Pfeile verdeutlicht wird. Die Domänen sind wie folgt dargestellt: N1-Domäne in grün, A-Domäne in blau, B-Domäne in lila und N2-Domäne in rot. Alle Proteinvarianten sind in den betroffenen Domäne farblich hervorgehoben. Mit Hilfe von Esemble release 75 wurde die* CECAM16*-Domänen und Exongrenzen bestimmt (adaptiert von Michaela A.H. Hofrichter et al., 2015, A novel De novo Mutation in CEACAM16 associated with postlingual hearing impairment, Molecular Syndromology [148]).*

Familien mit einer dominanten *CEACAM16*-Hörstörung weisen eine postlinguale progressive Hörstörung auf, welche sowohl die niedrigen als auch die hohen Frequenzen betrifft [167]. Dieser Phänotyp konnte ebenfalls in Mausmodell nachgewiesen werden [157]. Interessanterweise konnte ein ähnlicher Phänotyp ebenfalls bei autosomal rezessiv-assoziierten Hörstörungen im *CEACAM16*-Gen festgestellt werden [53, 174]. Auch diese Patienten wiesen eine postlinguale milde bis moderate Hörstörung auf. Bei der Familie G5 konnte eine Variante *De novo* im Gen *CEACAM16* festgestellt werden. Weder die Eltern noch

die gesunde Schwester wiesen die Variante c.1094T>C auf. Ebenso konnte sie weder bei 50 Kontrollen, noch bei 19 Kontrollen mit gleichem Populationshintergrund, noch in ExAC nachgewiesen werden. *De novo*-Mutationen sind selten in constrainten Genen zu finden. Die vorhergesagt Mutationsrate von *CEACAM16* ist $10^{-4,6392}$, was sich nicht im Bereich von constrainten Genen befindet, jedoch ist die *De novo*-Mutationsrate ähnlich hoch, wie die von *CRYM* ($10^{-4,9127}$) [186]. *CRYM* ist ebenfalls ein autosomal dominantes nicht syndromales Hörstörungsgen [187]. In jeder Generation pro Individuum können an die 74 Single Nukleotid Varianten, drei Indels (kleine Insertionen oder Deletionen) und 0,02 CNVs im Genom festgestellt werden [188]. Im Gegensatz zu chromosomalen Aberrationen, die vor allem durch das zunehmende mütterliche Alter bedingt sind, nimmt die Anzahl der Single Nukleotid-Varianten mit dem väterlichen Alter zu. Damit entstehen also häufig *De novo*-Mutationen in der väterlichen Keimbahn [188]. Der Vater des Indexpatienten der Familie G5 war bei der Geburt seines Sohnes 33 Jahre alt, was in etwa dem durchschnittlichen Alter von Vätern entspricht. Nach der Berechnung, dass ca. 2,01 Mutationen pro Jahr in der männlichen Keimbahn entstehen inklusive einer Mutationsverdopplung alle 16,5 Jahr, bei Annahme von einem durchschnittlichen väterlichen Alter von 33 Jahren, steigt die durchschnittliche Mutationslast bei einem Kind auf ca. 69,9 laut der deCODE Studie [189]. Zusätzlich scheint das Chromosom 19 auf dem CEACAM16 einen höheren Anstieg an Mutationen in Relation zum jährlichen Anstieg vom paternalen Alter aufzuweisen, als in der Größe ähnliche Chromosomen wie 21 und 22 [189]. Interessanterweise erzeugt die T zu G Transversion an Position c.1094 beim Indexpatienten eine neue CpG-Stelle. CpG-Stellen sind oft methyliert und können die Genexpression inhibieren. Obwohl CpG-Stellen normalerweise eine höhere Mutationsrate aufweisen aufgrund von spontanen Desaminierungen von 5-Methylcytosin, was wiederum zu einem Verlust der CpG-Stelle führt, zeigt sich hier eine Kontroverse durch den Zusatz einer CpG-Stelle [190] Der Effekt dieses CpGs wurde nicht weiter untersucht. Jedoch könnte ein Einfluss auf die Methylierung entstehen, der die Genregulation beeinflusst. Da sich die *De novo*-Mutation in der Carboxyl-terminalen N2-Domäne befindet, könnte dies die Interaktion von CEACAM16 mit TECTB und TECTA beeinträchtigen, da laut MutationAssessor [191] eine Proteinbindestelle durch die Mutation verändert wird. Durch die homophilen Interaktionen der N2-Domäne werden Dimere geformt, die die Zelladhäsion unterstützen. Kommt es zur parallelen Ausrichtung dieser Dimere, können sich Disulfidbrückenbindungen bilden, wie sie bei Kammerer et al. 2012 in einem Modell dargestellt wurden [157]. Ist die Funktion der N2-Domäne durch die Mutation verändert, kann dies Auswirkungen auf die beiden Interaktionspartner TECTA und TECTB haben. Diese beiden sind für die Generierung der striated-sheet Matrix und die Hensen’s Stripe verantwortlich [49]. Damit ist die *De novo*-Mutation als höchstwahrscheinlich kausal für die

Hörstörung bei dem Indexpatienten der Familie G5 einzustufen. Diese Theorie wird ebenso von den Phänotypen des Patienten gestützt, der eine Hörstörung aufweist, die alle Frequenzen betrifft. Aufgrund der wenigen Messungen, die innerhalb von nur kurzer Zeit durchgeführt wurden, konnte kein progressiver Verlauf festgestellt werden. Dies ist die dritte identifizierte Mutation im *CEACAM16*-Gen, die mit einer autosomal dominanten Hörstörung assoziiert und *De novo* entstanden ist [148].

### 4.3.2 Rekurrent betroffene Aminosäure im *S1PR2*-Gen

Das *S1PR2*-Gen (OMIM: 605111) kodiert für einen Spingosin-1-Phosphat-Rezeptor 2. Er besteht aus 353 Aminosäuren und liegt im DFNB68 (OMIM: 610419)-Locus auf Chromosom 19p13.2. Der S1PR2-Rezeptor hat mehrere Funktionen, wie Induktion von Zellteilung, Überleben und transkriptionelle Aktivierung [192]. Des Weiteren konnten Defekte in diesem Rezeptor in Zusammenhang mit kongenitaler an Taubheit grenzender sensorineuraler Hörstörung ohne vestibuläre Effekte gebracht werden [127]. Detaillierte Expressionsexperimente im Mausmodell haben S1pr2 in den Zellkörpern von inneren und äußeren Haarzellen, in der Stria vascularis, in Fibrozyten des Spiralligaments, als auch in den spiralen Ganglion-Zellen nachgewiesen. Zudem konnten morphologische Veränderungen der stria vascularis und einer Haarzelldegeneration in Abhängigkeit vom fehlendem endocochleären Pontential (EP) festgestellt werden [193]. Bis jetzt sind drei *S1pr2*-Knockout-Mausmodelle und ein Missense-Mausmodell beschrieben worden. Während alle Knockout-Modelle eine an Taubheit grenzende bzw. Taubheit und progressive vestibulare Defekte aufwiesen, zeigten Missense-Mäuse eine schnelle progressive Hörstörung mit reduziertem endocochleären Potential. Weitere Symptome konnten in den Mäusen nicht detektiert werden [193-196]. Auch bei Studien zu diesem Gen im Zebrafisch konnten abnormale otische Vesikel, dem Hörorgan von Zebrafischen, und Veränderungen der Morphologie des Seitenlinienorgans, den Neuromasten, beobachtet werden [197]. Damit spielt S1PR2 höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle in der auditorischen Wahrnehmung [193].

Bis dato waren zwei Familien mit einer Mutation im *S1PR2*-Gen und einer autosomal rezessiven Hörstörung bekannt. In der iranischen Familie E30 konnte ebenfalls eine homozygote pathogene Variante festgestellt werden. Diese Variante führt zu einem Aminosäureaustausch an der gleichen Position, die schon in einer der beiden bekannten pakistanischen Familie beschrieben wurde [127]. Die neu entdeckte Basensubstitution c.323G>A im Gen *S1PR2* führt zu einem Austausch der Aminosäure Arginin zu Glutamin, welcher mit Hilfe von 3D-Modell-Analysen untersucht wurde. Im Ruhezustand des Rezeptors zeigt sich durch den Austausch der Aminosäure eine Veränderung der

Wasserstoffbrückenbindungen. So werden einige Verbindungen, wie zum Beispiel zu den Aminosäuren Glu109, Thr97 und Leu92, getrennt und eine neue zu Asn89 ausgebildet. Dieser Effekt ist ähnlich zu dem des bereits beschriebenen Aminosäureaustauschs p.Arg108Pro, jedoch wird hier das ganze Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk gestört und stattessen eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung mit Ser111 gebildet (Abb. 52) [127]. Im aktiven Zustand führt der Aminosäureaustausch in der Position p.108 zu einer Zerstörung der S1P-S1PR2-Interaktion, welche durch ein 3D-Modell von S1PR1-ML056, wie es in Hofrichter et al., 2018 beschrieben ist, dargestellt wurde [125]. Dieses Modell besteht aus dem ML056-Liganden, dessen Struktur analog zum natürlichen S1P-Liganden ist, und dem S1PR1-Rezeptor, der von der Struktur dem S1PR2-Rezeptor ähnelt. Es konnte anhand der Struktur belegt werden, dass die Aminosäuren, die eine Schlüsselrolle in der Interaktion von S1PR2 spielen, p.Arg108 und p.Glu109, ebenfalls im S1PR1-Rezeptor als p.Arg120 und p.Glu121 hochkonserviert sind. Anhand dieses Modells konnte auch ein Verlust der ionischen Verbindung der Aminosäure p.Arg120 zu dem Liganden durch den simulierten Austausch p.Gln120 detektiert werden. Es gibt jedoch noch eine ionische Bindung des Liganden zu der Aminosäure p.Lys34 im Rezeptor. Möglicherweise besteht daher eine Restfunktion des S1PR1-Rezeptors durch eine ionische Bindung von p.Lys34. Ist die Funktion des S1PR2-Rezeptors durch die Aminosäuresubstitution gestört, hat dies Einfluss auf den MAPK/ERK-Pathway und die Phosphorylierung der ERM (Ezrin, Radixin und Moesin)-Proteine [127, 198, 199]. Zudem ist auch die Stria vascularis betroffen, wo S1PR2 für die EP-Generation notwendig ist [8, 9].

Diese Aminosäuresubstitution führt in der Familie E30 bei allen betroffenen Individuen zu einer schweren bis an Taubheit grenzenden Hörstörung, die im frühen Alter auftrat. Diese Hörstörung ist vergleichbar mit den bereits beschriebenen *S1PR2*-assoziierten Hörstörungen [127]. Jedoch konnte bei einem Patienten V-2 eine gemischte Hörstörung festgestellt werden. Aufgrund des Alters der anderen betroffenen Kinder, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese ebenfalls eine gemischte Hörstörung aufweisen. Da S1P und S1PR2 auch eine Rolle in der Osteogenese spielen, könnte auch eine gemischte Hörstörung durch den genannten Austausch zu erklären sein [200]. Dennoch können auch modifizierende Faktoren für die gemischte Hörstörung bei der Probandin V-2 nicht ausgeschlossen werden. *S1PR2*-Varianten scheinen selten zu sein, da keine weiteren pathogenen Allele in der untersuchten Kohorte festgestellt werden konnten. Dies ist interessant, da die Prävalenz von angeborenen Hörstörungen im Iran höher ist als in westlichen Ländern, was zeigt wie selten S1PR2 assoziierte Hörstörungen sind im Allgemeinen sind. [160]. Einer von 332 Iranern hat eine angeborene Hörstörung, wovon die Hälfte vermutlich einen genetischen Hintergrund aufweist

[161]. Dies ist auf die hohe elterliche Konsanguinität zurückzuführen und dem hohen Anteil an rezessiven Hörstörungen [163, 201]. Trotzdem treten in der iranischen heterogenen Population immer wieder neue Varianten auf, wie auch die c.323G>A *S1PR2*-Mutation [202]. Damit ist die Familie E30 die dritte bekannte Familie mit einer *S1PR2*-assoziierten Hörstörung mit konsanguinem Hintergrund. Ebenfalls ist dies die erste Beschreibung in Zusammenhang mit einer gemischten Hörstörung. Weiterhin zeigt dieser Fall die Bedeutung der Aminosäure p.Arg108 im Gen *S1PR2*. Dieser Fall bestätigt *S1PR2* als Hörstörungsgen [125].

### 4.3.3 X-CHROMOSOMALE HÖRSTÖRUNGEN

X-chromosomale Hörstörungen treten in nur 2–5% aller Hörstörungsfälle und damit sehr selten auf. Insgesamt konnten in dieser Arbeit nur fünf von 155 Familien mit einer X-chromosomalen Hörstörung in Zusammenhang gebracht werden. Während bei zwei Familien eine *POU3F4*-assoziierte Hörstörung festgestellt werden konnte, wurden bei drei Familien identische Nukleotiddeletionen im Gen *SMPX* identifiziert. *POU3F4* ist das erste und am häufigsten identifizierte X-chromosomale Hörstörungsgen [203, 55]. Interessanterweise sind viele *POU3F4*-assoziierten Hörstörungen auf eine Deletion 900 kb vor dem *POU3F4*-Gen zurückzuführen [204]. Die Kohorte G umfasst viele sporadische Fälle mit männlichen Indexpatienten. Möglicherweise könnten einige dieser Hörstörungsfälle dieser Patienten durch eine *POU3F4*-Deletion aufgeklärt werden. Da diese Deletion aber im intronischen Bereich liegt, kann sie durch eine Exom-Sequenzierung nicht erfasst werden. Daher wäre eine weitere Untersuchung dieser Patienten mit Hilfe einer MLPA von MRC Holland, die diese Deletion detektieren könnte, sinnvoll. Auf diese Weise könnte die Aufklärungsrate der hier untersuchten Kohorte weiterhin erhöht werden.

Des Weiteren konnte im *SMPX*-Gen eine Deletion detektiert werden, die schon beschrieben worden ist[59]. Die c.99del Mutation in *SMPX* konnte als Gründereffekt in Familien auf der kanadischen Insel Neufundland identifiziert werden [59]. Beide kanadischen Familien mit dieser Variante zeigten denselben Haplotyp [59]. Daher war es erstaunlich diese Variante in drei iranischen Familien feststellen zu können. Die drei Familien kommen aus derselben Gegend, jedoch konnte ein gemeinsamer Haplotyp bislang nicht bestätigt werden. Ein diesbezüglicher Vergleich einzelner SNPs ergab keine Aussage. In jeder der Familien konnte eine Segregation der Variante bei den betroffenen Männern detektiert werden. Diese c.99del-Mutation führt zu einem Frameshift, welcher nach weiteren 47 Aminosäuren zu einem vorzeitigen Stopp führt [59]. Ein Test der mRNA, ob sie durch non-mediated decay abgebaut

wird (NMD), zeigte, dass das verkürzte Allel translatiert wird und ein verkürztes Protein entsteht [59].

Da Frauen mit einer heterozygoten Variante einen Phänotyp entwickeln, wurde ein X-Inaktivierungstest durchgeführt. Dieser zeigte bei der Familie E79, dass bei der Mutter (III-6) des Indexpatienten (IV-5), die eine Anlageträgerin ist, ein Ungleichgewicht in der X-Inaktivierung vorliegt. Das Allel mit der c.99del-Mutation zeigte eine Aktivität von 83,4%. Daher würde man bei der Mutter eine Ausprägung des Phänotyps erwarten, die aber offensichtlich nicht besteht. Daher sollte ihr Phänotyp nochmals überprüft werden. Männliche Patienten haben nur ein X-Chromosom und zeigen daher im X-Inaktivierungstest nur ein aktives Allel. Dieses aktive Allel kann anhand seiner spezifischen Größe mit den Peaks der Anlageträgerin verglichen werden und so das Verhältnis des betroffenen Allels zum gesunden Allel ermittelt werden.

Bei der Familie E80 ist die Indexpatientin (III-7) an einer Hörstörung erkrankt. Der X-Inaktivierungstest gab keine Aussage, ob bei ihr das defekte Allel aktiv ist. Durch ihren betroffenen Bruder (III-3) konnte das betroffene X-Allel identifiziert werden. Die Tochter der Indexpatientin (IV-8) ist laut Genotyp nicht betroffen. Durch die X-Inaktivierung konnte auch das gesunde Allel des Vaters, sowie das gesunde Allel der Mutter ermittelt werden. Interessanterweise lag auch hier ein Ungleichgewicht vor. Das mütterliche Allel zeigte eine Aktivität von 79%, im Gegensatz zum väterlichen Allel von 21%. Bei der Tochter (IV-1) des betroffenen Bruders (III-3) zeigte sich die Deletion c.99del im *SMPX*-Gen heterozygot. Die X-Inaktivierung ergab eine Aktivität des defekten Allels zu 99%. In diesem Fall würde ein deutlicher Phänotyp der Patientin erwartet werden. Jedoch lagen hierzu keine klinischen Informationen vor. Eine erneute klinische Konsultation dieser Patientin wäre aufschlussreich. Dies trifft ebenfalls auf eine Nichte (IV-5) der Indexpatientin zu, die die Deletion homozygot aufwies. Der X-Inaktivierungstest war leider nicht aussagekräftig, doch das Geschlecht der Patientin konnte bestätigt werden. Sie ist 10 Jahre alt, so dass der fehlende Phänotyp möglicherweise darauf zurückzuführen ist. Jedoch ist dies ungewöhnlich, da Jungen im Lauf der ersten Dekade einen Phänotyp aufweisen [58, 59]. Daher sollte diese Patienten ebenfalls den Hörstörungsphänotyp aufweisen und die Patientin hinsichtlich ihres Phänotyps erneut untersucht werden. Ebenso konnte eine Segregation dieser Deletion innerhalb der Familie E81 nachgewiesen werden. Durch den Indexpatienten V-2 konnte das Allel mit der Deletion ermittelt werden. Mit Hilfe der X-Inaktivierungstestung konnte bei der Mutter IV-2, eine Anlageträgerin der c.99del-Variante, ein Allel-Aktivitätsverhältnis von 78% zu 22% zugunsten des betroffenen Allels festgestellt werden. Daher würde ein milder Phänotyp erwartet werden. Die Schwester des Indexpatienten V-3 ist ebenfalls Anlageträgerin, jedoch

zeigte bei ihr das gesunde Allel eine Aktivität von 73% und das betroffene von nur 27%. Daher sollte diese Patientin keinen Phänotypen aufweisen. Dies gilt ebenfalls für die Nichte des Indexpatienten (VI-1), eine Anlageträgerin ohne Hörstörungssymptome. Bei ihr konnte ein Allel-Aktivitätsverhältnis von 67% zu 33% zugunsten des krankhaften Allels festgestellt werden. Dennoch ist das Verhältnis nicht eindeutig und daher würde höchstens eine milde Hörstörung erwartet werden. Die betroffene Nichte VI-2 hat die c.99del im Gen *SMPX* heterozygot und zeigt phänotypisch eine eindeutige Hörstörung. Eine X-Inaktivierungstestung detektierte ein Ungleichgewicht in der X-Chromosom-Inaktivierung, bei der zu 70% das deletierte Allel aktiv war und nur zu 30% das gesunde Allel. Damit korreliert der Phänotyp mit der X-Inaktivierung und dem Genotyp für die Deletion c.99del im *SMPX*-Gen. Bei den vorherigen Familien konnte dies nicht festgestellt werden. Allerdings wurde der X-Inaktivierungstest wurde anhand von Blutproben durchgeführt. Es kann daher keine Aussage getroffen werden, welches X-Allel im Ohr aktiv ist. Aufgrund der Verschiebung könnte aber die Wahrscheinlichkeit höher liegen, dass das pathogene X-Allel im Ohr mehr aktiv ist.

Männer, die eine c.99del im *SMPX*-Gen tragen, entwickeln eine Hörstörung in der ersten Dekade ihres Lebens, welche alle Frequenzen involviert. Frauen zeigen dagegen einen variablen Phänotyp. Die Patienten der Familien E79, E80 und E81 haben eine kongenitale, sensorineurale, bilaterale, nicht voranschreitende Hörstörung, welche dem Spektrum entspricht [57-59]. Der Indexpatient E79 IV-5 zeigte eine moderate Hörstörung von 56–70dB, die alle Frequenzen betraf, welche identisch ist zu der Hörstörung von Familie 2024 bei Abdelfatah et al., 2012 [59]. Ebenfalls ist die Hörstörung der Indexpatientin von Familie E80 mit ihrer schweren Ausprägung (71–90dB) und Hochtonschwerhörigkeit ähnlich zur Hörstörung der Patientin V-4 der Familie 2024 bei Abdelfatah et al., 2012 [59]. Die milde Hörstörung des Indexpatienten V-3 von Familie E81 fällt aus dem Rahmen der bislang beschriebenen Hörstörungen mit einer Deletion c.99del, so dass auch bei Männern auf eine Variabilität im Phänotyp geschlossen werden kann [59]. Obwohl die Variante bislang nur in Neufundland beschrieben wurde, auch im Zusammenhang mit einem Gründereffekt, kann nach den jetzigen Daten eher von einem möglichen Hotspot ausgegangen werden, da bislang bei den Familien kein gemeinsamer Haplotyp detektiert werden konnte. Dennoch ist es noch nicht ausgeschlossen, da eine Haplotypanalyse noch nicht erfolgt ist. *SMPX* ist ein Protein bestehend aus 88 Aminosäuren, welches zwei Isoformen besitzt. Dieses Protein hat eine Funktion beim Schutz der sarkolemmale Plasmamembran vor Schäden bei mechanischem Stress, welcher bei der Kontraktion von Muskelzellen auftritt [205]. Diese Schutzfunktion des Proteins spielt wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle für die Zellen der Cochlea, die vor dem mechanischen Stress während des Hörens geschützt werden müssen [57, 59, 206]. Ein Defekt

des Proteins führt zu einem kumulativen Schaden der inneren Haarzellen, der in einer progressiven Hörstörung endet [59]. Eine Progressivität konnte jedoch bei den untersuchten Patienten nicht ermittelt werden. Dies könnte auf eine fehlende Anamnese der Patienten über einen längeren Zeitraum zurückzuführen sein.

### 4.3.4 Rekurrent betroffene Hörstörungsgene

Innerhalb dieser Arbeit konnten pathogene Varianten in einigen Genen in mehreren Familien identifiziert werden. Am häufigsten waren dabei pathogene Varianten im Gen *MYO15A* zu finden. *MYO15A* hat 67 Exons, die für zwei Isoformen kodieren. Die erste Isoform umfasst 11.876 Nukleotide. Für die zweite Isoform fällt durch allternatives Spleißen das Exon 2, welches 3.828 Nukleotide umfasst, weg. Dieser Unterschied betrifft die N-terminale Domäne des Proteins [207, 208]. Wie alle Myosine hat auch Myosin 15A eine Prolin-reiche N-terminale Domäne, eine ATPase-Motordomäne, eine Hebelarm-Domäne (bestehend aus zwei Konsensus-IQ-Motiven und einer vorhergesagten dritten hochdivergenten IQ-Domäne) und eine globuläre Enddomäne. Die Enddomäne beinhaltet wiederum MyTH4 (Myosin Tail Homology 4), FERM (Band 4.1, Ezrin, Radixin und Moesin), SH3 (Src Homology 3) und einen Carboxy-terminalen PDZ-Liganden [44]. Eine weitere Isoform besitzt ein alternatives Exon 1 aus 218 bp, das direkt an das Exon 3 anschließt [44]. Myosin 15 kontrolliert die Stereozilienentwicklung [44]. Dazu interagiert es unter anderem mit Eps8 und Whirlin [44]. Isoform 1 beinhaltet als einzige Isoform Exon 2. Mausexperimente haben gezeigt, dass der Ausfall von Isoform 1 aufgrund einer Mutation im Exon 2 eine an Taubheit grenzende Hörstörung verursacht, aber die Stereozilienentwicklung nicht beeinträchtigt wird, da Isoform 2 in den Haarzellen auf der Spitze der Stereozilien vorhanden ist und deren Elongation antreibt [44, 208]. Allerdings wird durch das Fehlen der Isoform 1 eine Degeneration der Stereozilien ausgelöst [44, 208]. Interessanterweise wurden pathogene Varianten in diesem Gen vermehrt erst durch NGS-Analysen detektiert, da aufgrund der Größe des Gens eine Sanger-Sequenzierung zu aufwändig war. Inzwischen sind Varianten in *MYO15A* die dritthäufigste Ursache für eine Hörstörung [44]. Jedoch ist die Akkumulation von *MYO15A*-Varianten bei iranischen Familien interessant. Aufgrund fehlender klinischer Daten konnte keine Korrelation zwischen der jeweiligen Mutation und dem Phänotyp der jeweiligen Patienten der Familien hergestellt werden. Dies wäre vor allem hinsichtlich einer möglichen Therapie interessant, da wie beschrieben in Abhängigkeit der betroffenen Isoform bzw. in Abhängigkeit der betroffenen Domäne bestimmte Funktionen des *MYO15A*-Gens verloren gehen und evtl. therapeutisch behandelt werden könnten [44].

Pathogene Varianten im *SLC26A4*-Gen sind sowohl mit dem Pendred-Syndrom als auch mit einer nicht syndromalen Hörstörung verbunden. Zu den häufigsten Mutationen, die mit dem Pendred-Syndrom assoziiert sind, zählen die Varianten c.1246A>C, p.Thr416Pro und IVS8+1G>A (c.1001+1G>A), welche in 22% bzw. 30% der untersuchten Familien der Studie von Campbell et al., 2001 [209]. detektiert wurden. Letztere konnte ebenfalls in der vorliegenden Studie heterozygot bei der Familie G13 nachgewiesen werden. Die zweite pathogene Variante im *SLC26A2*-Gen in der Familie G13 c.1334T>G ist ebenfalls mit dem Pendred-Syndrom assoziiert [139]. Die Mutation IVS8+1G>A wird in Zusammenhang mit einer moderaten bis schwerwiegenden Hörstörung und einer Mondini-Dysplasie gebracht [138]. Bei einer Mondini-Dysplasie besteht die Hörschnecke nicht aus zweieinhalb Windungen, sondern aus eineinhalb Windungen. Bei den Familien G17 (c.412G>T, heterozygot) [210], E2 (c.1198del, homozygot)[141], und E47 (c.1334T>G, heterozygot))[139] sind ebenfalls Mutationen mit dem Pendred-Syndrom assoziiert. Trotzdem ist bei keiner Familie, außer Familie E47, eine Veränderung des vestibulären Aquädukts, eine Mondini-Dysplasie oder eine Schilddrüsenunterfunktion bekannt [209]. Interessanterweise ist eine homozygote c.919-2A>G mit einer Hörstörung verbunden, die einen spezifischen Phänotyp aufweist [151]. Diese Variante konnte heterozygot bei der Familie E47 detektiert werden, die aber ein Pendred-Syndrom aufweist. Die meisten hier beschriebenen Varianten wurden in Zusammenhang mit einem Pendred-Syndrom und/oder einer nicht syndromalen Hörstörung beschrieben. Eine Kombination zweier beschriebener Varianten bei Familie G13, führt zu einer prälingualen, moderaten bis schwerwiegenden, stabilen, bilateralen, asymmetrischen Hörstörung. Bei Familie G17 sind ebenfalls beide Varianten im *SLC26A4*-Gen beschrieben, die zu einer schweren bis an Taubheit grenzenden Hörstörung führen, bei der alle Frequenzen betroffen sind. Insgesamt wurden in ca. 6% der Fälle eine *SLC26A4*-assoziierte Hörstörung diagnostiziert, was ungefähr auch so zu erwarten war [32].

Varianten in *TECTA*-Gen wurden mit einer dominanten oder einer rezessiven Hörstörung assoziiert [47]. In dieser Arbeit konnten jeweils zwei pathogene Varianten im *TECTA*-Gen von Patienten mit einer dominanten und mit einer rezessiven Hörstörung detektiert werden. Interessanterweise handelte es sich bei den Varianten der Patienten mit dominanter Hörstörung um Missense-Mutationen, während bei Patienten mit rezessiver Form eine Splice-Mutation vorlag. Ein Vergleich in der Deafness Variation Database zeigte, dass vor allem Missense-Mutationen mit einer dominanten Hörstörung assoziiert waren, während Deletionen und Duplikationen, die zu einem Frameshift führen, sowie Splice-Mutationen mit einer rezessiven Hörstörung einhergehen. Diese Tatsache konnte ebenfalls in den vorliegenden Familien bestätigt werden. Je nachdem, in welcher Domäne die Mutationen liegen, kann für

jede Variante eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation aufgestellt werden[47]. Defekte in der Tectorin Alpha-Domäne sind bei 4% aller Patienten mit dominanter Hörstörung zu finden [165]. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte in ca. 2% der Fälle (unbekannte Vererbung, AR&AD- und AD-Fälle) eine dominante Hörstörung in Verbindung mit einer pathogenen Variante in *TECTA* gebracht werden. Tectorin Alpha ist ein nicht kollagenes, großes Glycoprotein, das aus verschiedenen Domänen besteht. Es ist aufgebaut aus einer N-terminalen Entactin-G1-like Domäne, einer zentralen Zonaadhesin-like (ZA) Domäne, die aus einem von Willebrand-Faktor Typ C Repeat, vier von Willebrand-Faktor Type D (vWFD) Repeats und drei Trypsin Inhibitor-like (TIL) Repeats besteht, sowie einer C-terminalen Zona pellucida (ZP)-Domäne [47]. Im Mausmodell konnte festgestellt werden, dass über die ZP-Domäne Tecta und Tectb assoziieren und homomere oder heteromere Filamente bilden, die miteinander interagieren und die striated sheet Matrix bilden [211]. Dabei scheint Ceacam16 ein Teil der Struktur zu sein. So zeigt ein Modell die Interaktion von Tecta/Tectb-Heteropolymeren, die über die Entactin-G1-like Domäne von Tecta and die N2 Domäne von CEACAM16 bindet [157]. Beispielsweise bei Varianten in der ZP-Domäne ist die Hörstörung schwerer und die hohen Frequenzen der Patienten sind betroffen, wohingegen bei Mutationen in der ZA-Domäne die mittleren Frequenzen der Patienten betroffen sind. Jedoch gibt es ein paar Ausnahmen. Mutationen in der ZA-Domäne, die die ersten zwei vWFD Repeats bzw.das TIL2 Repeat betreffen, zeigen ebenfalls eine Mittelfrequenzhörstörung [165]. Dasselbe gilt für Mutationen in der Entactin-G1-like Domäne, die auch zu einer Mittelfrequenzhörstörung führen. Die Mutation c.2858T>A, p. Leu953His befindet sich zwischen den beiden Repeats vWFD2 und TIL2 der ZA-Domäne und zeigt eine nicht progressive, moderate bis schwerwiegende Hörstörung, die die mittleren und hohen Frequenzen umfasst. Dies ist in Übereinstimmung mit bisherigen Ergebnissen, da vWFD2- und TIL2-Varianten mit einer Hörstörung der mittleren Frequenzen einhergehen, während Varianten in der ZA-Domäne generell mit einer Hochfrequenzstörung assoziiert sind [23, 47]. Die Mutation c.4437C>G, p.Cys1479Trp geht mit einer progressiven Hochfrequenzhörstörung einher. Dies entspricht ebenfalls dem erwarteten Phänotyp, da Mutationen mit Cystein-Austausch bisher immer in Zusammenhang mit einer progressiven Hörstörung beschrieben wurden [47]. Zusätzlich befindet sich die Mutation in der ZA-Domäne, die mit einer Hochfrequenzhörstörung assoziiert ist [47]. Die Mutation c.5272+5G>C konnte bei zwei unterschiedlichen Familien identifiziert werden. Splice-Mutationen in *TECTA* wurden bisher mit einer rezessiven Hörstörung assoziiert und auch hier zeigt sich diese Korrelation. Ein phänotypischer Vergleich beider Familien konnte nicht vorgenommen werden, da klinische Informationen fehlen.

Das Gen *LHFPL5* auch bekannt als *TMHS* (Tetraspan Membrane Protein of Hair cell Stereocilia) besteht aus vier Exons, wovon drei kodierend sind. *LHFPL5* ist ein vierfach Transmembran-durchspannendes Protein von 210 Aminosäuren und ist wichtig für die Struktur der Stereozilien [212]. In drei iranischen Familien (E1, E32, E63) konnte eine homozygote pathogene Variante detektiert werden, wovon eine, c.472C>T, p.Arg158Trp (E32), schon beschrieben wurde[152]. Bei allen drei Familien konnten in einer Generation von einem Elternpaar mehr betroffene als unbetroffene Kinder identifiziert werden. Dies widerspricht dem erwarteten Krankheitsauftritt für rezessive Erkrankungen [30]. Ebenfalls wurde diese Beobachtung von mehr betroffenen als unbetroffenen Kindern in einer Generation mit einer *LHFPL5*-assoziierten Hörstörung mehrmals in der Literatur beschrieben [152, 213-222]. Dies könnte natürlich auf die Einschlusskriterien der jeweiligen Studien zurückgeführt werden, bei welchen Familien mit mehr betroffenen Mitgliedern bevorzugt wurden oder an einer vorliegenden Blutsverwandtschaft der Eltern. Jedoch ist es ein interessantes Phänomen, das weiterverfolgt werden sollte.

## 4.4 CNV- ANALYSE MIT HILFE VON EXOM DATEN

Kopienzahlvarationen (CNVs) spielen eine große Rolle bei der Aufklärung von angeborenen Hörstörungen. So konnten bei 38,9% einer Studie mit 686 Patienten die Hörstörung mit einer Kopienzahlveränderung in Zusammenhang gebracht werden [153]. Am häufigsten war hierbei das Gen *STRC* von Deletionen betroffen. Eine homozygote Deletion dieses Gens wurde bei der vorliegenden Studie mit Hilfe einer PCR zum Großteil ausgeschlossen. Des Weiteren ist auch das Gen *OTOA* häufig von Kopienzahlveränderungen betroffen [153]. So konnte auch in dieser Studie eine Deletion im *OTOA*-Gen bei der Familie E24 identifiziert werden, die aber eine Besonderheit aufwies. Während in einem Zweig der Familie E24 bei den Patienten IV-1 und IV-2 das Exon 21 homozygot deletiert ist, weist der Patient IV-3 keine Deletion auf und Patientin IV-4 sowohl eine Deletion des Exons 21 als auch eine homozygote Deletion der Exons 1–16. Sowohl die Deletion im Exon 21 von Patient IV-2 als auch die Deletionen der Exons 1–16 und Exon 21 von Patientin IV-4 konnten mit Hilfe einer Exom-Analyse detektiert werden. Obwohl Exon 21 im Pseudogenbereich liegt, konnte mit Hilfe von spezifischem Primern die Deletion nachgewiesen und auch im Bruder IV-1 diagnostiziert werden. Exons 20–28 sind Teil einer segmentalen Duplikation, die zu 99% identisch ist und deren Ursprung ca. 820 kb entfernt ist [222]. Aufgrund der hohen Identität ist es schwierig Primer zu designen, die nur spezifisch das OTOA-Gen amplifizieren. Daher war es umso beeindruckender, dass über eine Exom-Analyse diese Deletion identifiziert werden konnte.

Die Patienten wiesen milde bis moderate, sensorineurale, bilaterale Hörstörungen auf. Damit zeigen sie einen ähnlichen Phänotyp wie die schon beschriebenen *OTOA*-assoziierten Hörstörungen, welchen eine homozygote Deletion des gesamten Gens zugrunde liegt [159]. Mit großer Wahrscheinlichkeit liegt der Deletion im *OTOA*-Gen der NAHR (non-allelic homologous recombination)-Mechanismus zugrunde, da *OTOA* sowie auch STRC NAHR-prädisponierende segmentale Duplikationen besitzen. Diese segmentalen Duplikationen sind in der Größe von 10–300 kb und haben mehr als 95% Homologie. Sie können ebenso Ausgangspunkt für Duplikationen, Inversionen oder Translokationen sein [153, 223].

Dagegen lag bei der nachfolgend beschriebenen homozygoten Deletion im *COL9A1*-Gen ein anderer Entstehungsmechanismus zugrunde. *COL9A1* ist mit dem Stickler-Syndrom sowie einer autosomal dominanten epiphysären Dysplasie assoziiert [224], [225]. Für COL9A1 existiert ein langes Transkript, welches 38 Exons umfasst und für NC4-, COL3-, NC3-, COL2-, NC2-, COL1- und NC1-Domänen kodiert. Zusätzlich gibt es ein weiteres kurzes Transkript, welches ein alternatives Exon 1* und 32 weitere Exons beinhaltet. Durch die Verkürzung entfällt die NC4-Domäne. Diese beiden Transkripte sind mit den Transkripten in Mäusen vergleichbar [114, 224]. Bei der Familie E26 konnte mit Hilfe einer CNV-Analyse anhand von Exom-Daten in der DNA des Indexpatienten III-3 und dessen Bruder III-4 eine Deletion im *COL9A1* Gen nachgewiesen werden, die die Exons 6–33 umfasst. Beide Brüder zeigen eine nicht syndromale Hörstörung. Diese ist moderat bis schwerwiegend mit Focus auf den hohen Frequenzen und damit vergleichbar mit bisher beschriebenen Stickler-Syndrom-Familien mit Varianten in diesem Gen [226, 227]. Eine nicht syndromale Hörstörung ist in Zusammenhang mit dem *COL9A1*-Gen nur einmal berichtet worden: eine Missens-Variante ohne detaillierte Beschreibung des Phänotyps [228]. Die bislang beschriebenen Patienten mit einem Defekt im *COL9A1*-Gen zeigten Symptome wie Glaskörperdegeneration, Katarakt, Netzhautdegeneration und Skelettanomalien, die von milden Formen wie abgeflachten Epiphysen bis zu starken Ausprägungen wie einer geringen Körperstatur reichen, wobei intrafamiliäre Variabilität auftrat. Sie wiesen jeweils eine Stoppmutation auf [226, 227], deren Auswirkung durch ein Mausmodell untersucht wurde.

Bei dieser Knockout-Maus wurde mit einer Neomycin-Kassette das Exon 8 homozygot unterbrochen und damit die Transkription gestoppt [229, 230]. Die Knockout-Mäuse entwickelten eine nicht entzündliche degenerative Gelenkerkrankung, eine Hörstörung und Arthrose [229, 231, 232]. Ein weiteres Mausmodell führte aufgrund einer großen Multidomänen-Deletion zu einem verkürzten Col9a1-Protein [233]. Mäuse mit einer heterozygoten Deletion zeigten osteoarthritische Veränderungen, während homozygote Tiere eine früh auftretende Osteoarthritis, milder proportionaler Zwergwuchs,

Wirbelsäulenbeeinträchtigungen und Augenanomalien aufwiesen [233]. Während heterozygot betroffene Mäuse den Phänotyp von einer autosomal dominanten Form einer epiphysären Dysplasie des Menschen widerzuspiegeln scheinen, weisen die homozygoten Mäuse einen Stickler-Syndrom-Phänotyp auf, welcher den rezessiven Charakter von Stickler Syndrom (STL) unterstützt. Die von einer epiphysären Dysplasie betroffenen Patienten zeigten jeweils eine heterozygote Splice-Mutation, die zu einer In-Frame-Deletion im Exon 8 und dadurch zu einem verkürzten COL9A1 führt [224], was ähnlich zum Mausmodell ist.

Die bei der Familie E26 vorliegende familiäre Deletion weist genotypische Ähnlichkeiten mit dem vorherig beschriebenen Mausmodell von Nakata et al.,1993 [233] auf. Alle Mäuse mit dieser eingebrachter Deletion haben ein langes und sollten auch ein kurzes Transkript aufweisen, da die Deletion nach dem alternativen Exon 1* eingebracht wurde. In beiden Fällen führt die Deletion zu einem verkürzten Protein. Die daraus resultierende restliche Col9a1 Funktion durch das lange Transkript ist im heterozygoten Zustand mit einem Phänotyp verbunden. Darum wird vermutet, dass die verkürzte α1-Kette durch das deletierte Transkript mit der endogenen α1-Kette der heterotrimeren Formation konkurriert und somit den Phänotyp erklärt [230]. Somit scheint eine Verkürzung des Proteins eine schwerwiegendere Auswirkung zu haben als eine komplette Inaktivierung wie beim Knockout-Mausmodell ersichtlich, bei dem keine mRNA für *Col9a1* und kein Kollagen IX festgestellt werden konnte [229, 230, 232]. Möglicherweise erklärt dies auch den Augenphänotyp im Mausmodell mit Mulitdomänendeletion, da das kurze Transkript hauptsächlich im Augengewebe exprimiert wird [230]. Im Gegensatz zu dem Multidomänendeletions Mausmodell, fehlt bei den Patienten von E26 das kurze Transkript. Möglicherweise hat dieser komplette Knockout einen weniger pathogenen Effekt, als wenn das verkürzte kurze Transkript ebenfalls vorliegen würde. So könnte vermutet werden, dass die verkürzte kurze Transkript Kette mit der verkürzten Kette des langen Transkripts konkurriert. Inwiefern jedoch das fehlende kurze Transkript für den Phänotyp der Patienten von E26 ausschlaggebend ist, kann nicht abschließend geklärt werden. Da bei den Patienten III-3 und III-4 keine radiologische Bildgebung durchgeführt wurde, können subklinische Skelettanomalien nicht ausgeschlossen werden. Der Proband war zum Zeitpunkt der letzten klinischen Beurteilung 28 Jahre. Daher sollte er schon erste Auffälligkeiten des Stickler Syndroms Typ 4 aufweisen. Ein verspäteter Auftritt weiterer Symptome kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Trotzdem ist dies der erste Bericht einer Deletion von 28 Exons im *COL9A1*-Gen. Die 5‘ oder 3‘-Gensequenz wird dabei nicht unterbrochen, aber ein Teil der NC4-Domäne, die gesamte COL3-, NC3- und ein Teil der COL2-Domäne sind betroffen. Dies ähnelt dem Mausmodell mit der Multideletion. Eine Bruchpunktanalyse konnte im

Intron 5 und im Intron 33 zwei Bruchpunkte identifizieren und zudem eine komplexe Insertion an der Bruchpunktstelle aufdecken. Höchstwahrscheinlich kann diese komplexe CNV-Variante auf einen FoSTeS/MMBIR-Entstehungsmechanismus zurückgeführt werden. Zur genaueren Analyse wurde die inserierte DNA-Sequenz hinsichtlich kurzer Mikrohomologien untersucht. Dabei konnte eine komplexe Umlagerung festgestellt werden [154]. So erfolgte ein Wechsel von Intron 5 zum Intron 33 aufgrund der Sequenzabfolge AGAGG wobei ein zusätzliches C eingefügt wurde. Dies konnte schon bei einem Patienten 2711 von Zhang et al., 2009 beobachtet werden [154]. Es folgen eine Mikrohomologie-Sequenz von den drei Basenpaaren AAT, die wahrscheinlich als Template dienten für ein weiteres FoSTeS/MMBIR-Ereignis. Die nachfolgende Sequenz ist mehrfach im Gen vorhanden, so dass eine abschließende Zuordnung zum Intron 4 bzw. Intron 37 nicht möglich ist. Sie wird durch die Nukleotide CA und AT flankiert [154]. Die umgekehrte TTA-Sequenz ist ebenfalls verantwortlich für ein weiteres FoSTeS/MMBIR-Event, wodurch eine Insertion der Intron Sequenz 28 vom nichtcodogenen Strang zu finden ist. Durch ein weiteres Event mit der Mikrohomologiesequenz AAT erfolgt wieder der Wechsel zur wildtypischen Sequenz im Intron 33. Dieser FoSTeS/MMBIR Mechanismus verursacht kleine Deletionen und erklärt den vorliegenden intragenischen Sequenzverlust. Ob diese inserierte Sequenz einen Einfluss auf den Phänotyp der Patienten der Familie E26 hat, kann nicht geklärt werden. Vor allem bei Hörstörungspatienten wird die Aufklärung von Mechanismen wie FoSTeS/MMBIR zu wenig untersucht, welches sowohl durch technische Limitationen als auch durch einen fehlenden Focus auf solchen Untersuchungen zu diesen Umlagerungen erschwert wird. So gibt es nur einen einzigen Waardenburg-Syndrom-Patienten, der komplexe Umlagerungen aufweist [234]. Dieser Mechanismus könnte für die Klärung offener Fälle nicht syndromaler und syndromaler Hörstörungspatienten von Bedeutung sein. Die Detektion von CNVs ist eine nicht zu unterschätzende wichtige Ursache für Hörstörungen. Es wird vermutet, dass bei fast 20% der Diagnosen für nicht syndromalen Hörstörung CNVs eine Rolle spielen [153]. Bislang konnte kein CNV in *COL9A1* identifiziert und mit einem STL oder einer nicht syndromalen Hörstörung in Zusammenhang gebracht werden. Bei Betrachtung aller STL-Formen sind nur 2–10% aller Fälle mit STL1–STL3 assoziiert. Jedoch ist noch keine Deletion von mehreren Exons in Kollagen IX berichtet worden [102]. Die komplexen Umlagerungen, wie sie in der Familie E26 beschrieben sind, sind nur schwer mittels Mikroarrays zu detektieren, da dies eine hohe Auflösung erfordert. Die vom FoSTeS/MMBIR-Mechanismus verursachten Deletionen und Duplikationen können sehr klein und damit weniger als 1 kb betragen [223]. In einigen Fällen liegen diese Umlagerungen bei 38 bp und damit unter der Auflösungsgrenze von Mikroarrays [223]. Durch die Exom-Analyse konnte die homozygote Deletion visuell detektiert werden. Dennoch musste die Umlagerung durch spezifischere

Analysen hinsichtlich des Bruchpunktes untersucht werden. Dies unterstreicht die Verwendung von Exomdaten für die CNV-Analyse, die auch bei anderen Krankheiten wie z.B. Autismus-Störung wichtig ist [235]. Durch die parallele Analyse von CNVs und Varianten ist die Exom-Analyse für diagnostische Zwecke bestens geeignet. Trotzdem könnten technische Verbesserungen, wie die Erhöhung der Abdeckung und die Länge der Fragmente, die Auflösung und damit die Detektionsrate erhöhen. Grenzen zeigt diese Methode allerdings bei der Erkennung von strukturellen Umlagerungen, wenn sie ganze Chromosomen oder sogar mehr als ein Chromosom betreffen. In diesem Zusammenhang wäre eine Genomsequenzierung notwendig, um komplexe Veränderungen jenseits von intergenen chromosomalen Strukturen untersuchen zu können [236].

Zusammengefasst sind CNVs häufiger mit Hörstörungen assoziiert als angenommen, deren Pathomechanismus weiter untersucht werden sollte. Zudem konnte innerhalb dieser Arbeit die erste Deletion im *COL9A1*-Gen beschrieben werden, die mit einer isolierten Hörstörung einhergeht. Für eine genaue Abklärung dieses Falls sind aber weitere klinische Informationen notwendig. In diesem Fall war die Exom-basierte CNV-Analyse für die molekulargenetische Diagnose von wesentlicher Bedeutung.

## 4.4 Charakterisierung neuer Kandidatengene

Insgesamt wurde acht Familien für die weitere Untersuchung auf Kandidatengenen ausgewählt. Voraussetzung war eine vorherige Analyse der bis dato bekannten Hörstörungsgenen. Zudem sollten mehr als nur ein Familienmitglied für die Untersuchung zur Verfügung stehen und die klinischen Informationen vorhanden sein. In den Familien G1, G18, G21, G27 und G28 konnten keine Variante detektiert werden, die die vorliegende Hörstörung in der jeweiligen Familie erklären würde. Dennoch sind die Analysen noch nicht abgeschlossen, da aufgrund neuer Informationen und Re-Klassifizierung sowie neuerer Ansätze zur Analyse eine mögliche Variante detektiert werden kann.

Bei der Familie G22 konnte zwei compound heterozygote Varianten im *THBS2*-Gen identifiziert werden. Diese beide wurden als pathogen eingestuft anhand von Vorhersageprogrammen. In Genen, die mit einer Hörstörung assoziiert sind, konnte keine Variante entdeckt werden, die für die vorliegende Hörstörung als Erklärung dienen könnte. Ebenso konnte der Compound heterozygote Charakter für die beiden heterozygoten Varianten c.1105G>A, p.Glu369Lys und c.1585G>A, p.Gly529Arg im *THBS2*-Gen durch die Analyse der Eltern bestätigt werden. Weitere Familienmitglieder müssen noch rekrutiert werden und

standen nicht zur Verfügung. *THBS2* kodiert für Thrombospondin II und ist ein multifunktionelles Protein, das eine Bindestelle für Thrombin, Fibrinogen, Heparin, Fibronektin, Plasminogen, Plasminogen Aktivator, Kollagen, Laminin und weitere Protein besitzt [237]. Es bildet homotrimerische und heterotrimerische Formen [238]. Ebenso spielt Thrombospondin II eine Rolle in der Synaptogenese im zentralen Nervensystem (ZNS) [155]. Knock out Mausmodelle zeigten eine Abnormalität in der Bindegewebsstruktur und -funktion. Zum einen ist die Haut fragil und der Schwanz hyperbeweglich. Zum anderen sind die Knochen verstärkt, die kleinen Blutbahnen verdickt und eine abnormale Blutungszeit ist aufgetreten. *THBS2* befindet sich im DFNB38, in dem bis jetzt noch kein kausales Gen identifiziert werden konnte [239]. Es ist laut SHIELD Datenbank[156] sowie UniGene [240] in der Cochlea bzw. im Ohr exprimiert. Kollagen spielt im Ohr eine große Rolle für die Struktur der Cochlea, beispielsweise in der Tektorialmembran [47, 48]. Daher könnte Thrombospondin II aufgrund seiner Eigenschaft Kollagene binden zu können eine Funktion in der Aufrechterhaltung der Strukturen im Innenohr haben. Zudem weist das Bindegewebe Veränderungen auf, wie es beim Stickler Syndrom beschrieben worden ist [75, 77]. Des Weiteren wurde es mit einer Funktion in der Bildung von Synapsen beschrieben. Möglicherweise könnte THBS2 dort ebenfalls eine Funktion haben.

Die Patientin zeigt eine hochtonbetonte mittelgradige Schallempfindungsschwerhörigkeit beidseits, die mit Hilfe von Hörgeräten versorgt werden konnte (Abbildung 78). Die Hörstörung ist stabil, wobei auf der rechten Seite ein hochfrequenter Tinnitus festgestellt werden konnten.

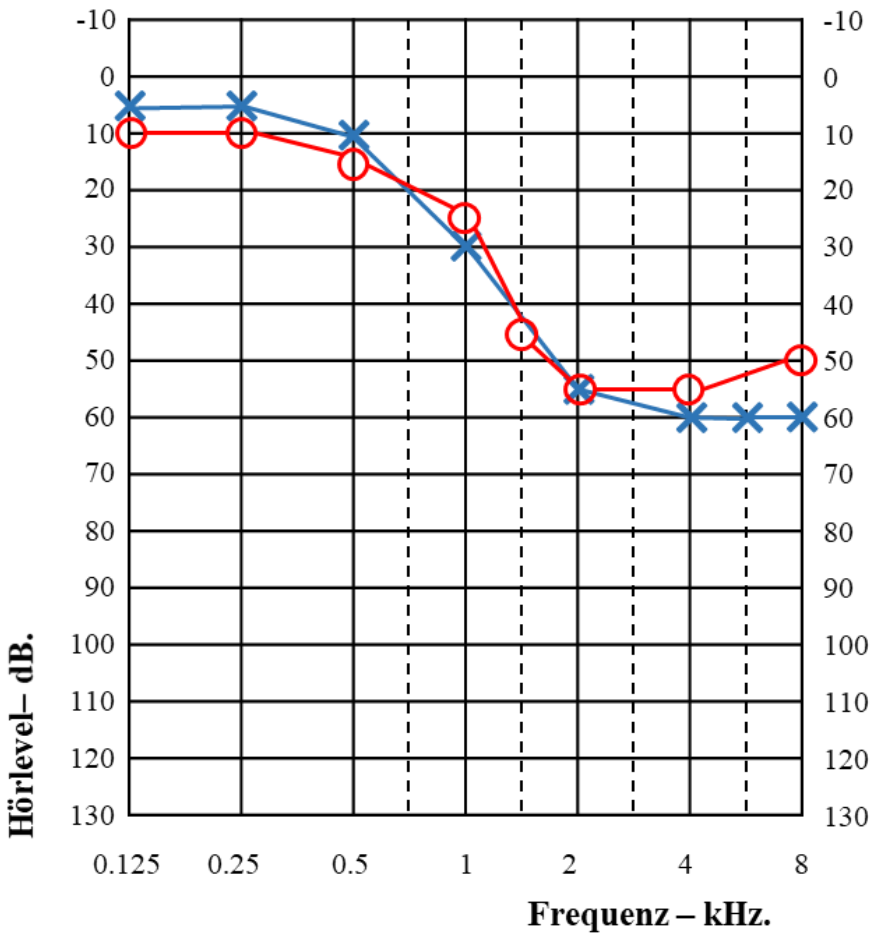



*Abb. 78: Audiogramm von der Patientin II-2 G22 im Alter von 17 Jahren. Rote Kreise geben die Messergebnisse der Reintonaudiometrie auf dem rechten Ohr wieder, blaue Kreuze die Messergebnisse auf dem linken Ohr. Es ist ein moderate Hochtonfrequenzhörstörung ersichtlich. Auf der X-Achse befinden sich die Frequenzen, auf der Y-Achse der Hörlevel in dB.*

Während die hier beschriebene Patientin eine moderate stabile Hörstörung aufweist, die postlingual auftrat, zeigten Patienten, deren genetische Ursache im DFNB38 Locus zugeordnet worden ist, eine an Taubheit grenzende Hörstörung, die alle Frequenzen betrifft [239]. Daher ist es wahrscheinlicher, dass die Hörstörungen beider Familien, obwohl sie demselben Locus zugeordnet werden konnten, eine andere genetische Ursache zugrunde liegen.

Ebenfalls konnte in der Familie G8 ein Kandidatengen ermittelt werden, nachdem die Analyse der bekannten Hörstörungsgene kein Ergebnis erzielte. Das Gen *ATP11A* kodiert für eine ATPase Klasse IV Typ 11 und ist für den Ionentransport über die Membran verantwortlich

[105], [241]. *ATP11A* liegt im DFNA33 Locus [242] und ist in der Cochlea exprimiert [156]. Patienten, die zu dem DFNA33 Locus zugeordnet worden sind, wiesen eine nicht syndromale früh auftretende Hörstörung mit autosomal dominantem Charakter auf, die eine progressiven Verlauf zeigte und bei ein paar der Patienten Tinnitus beinhaltete [242]. Ebenso konnte dieser Phänotyp bei der betroffenen Mutter und Tochter der Familie G8 beobachtet werden.

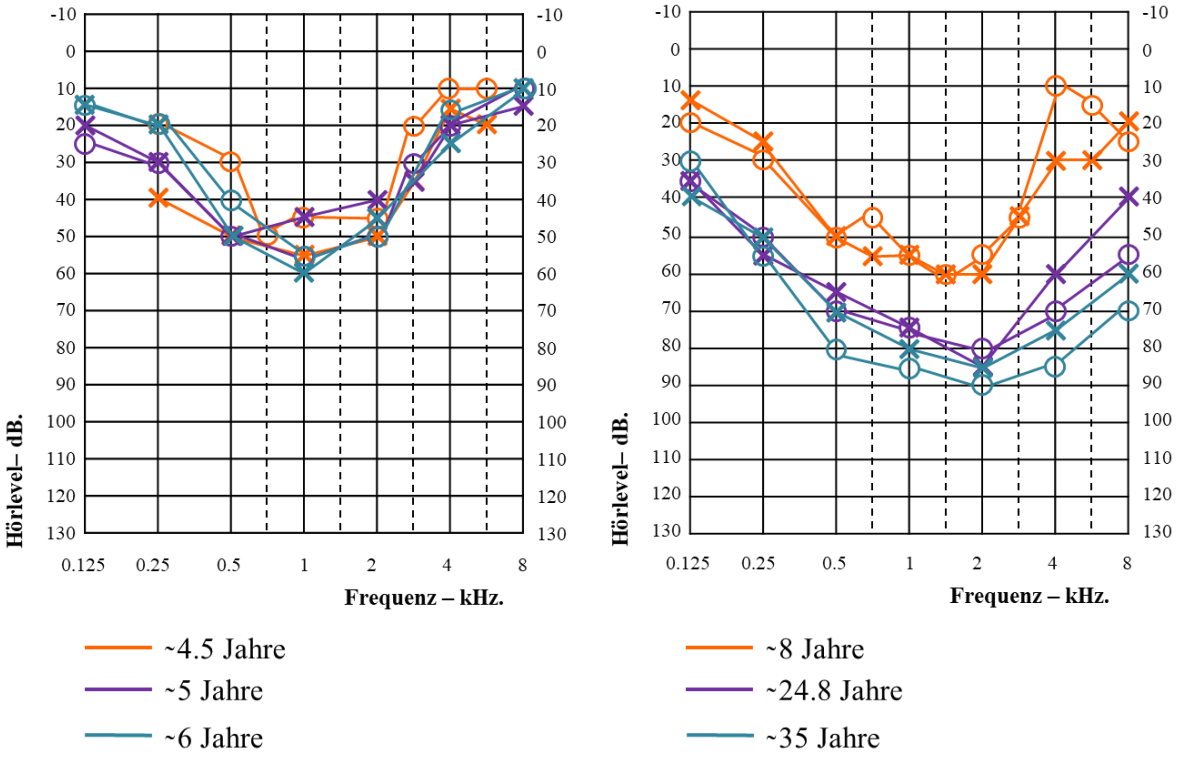



*Abb. 79: Reintonaudiometriemessung von Tochter (rechts) und Mutter (links) über einen größeren Zeitrahmen der Familie G8. Y-Achse zeigt den Hörverlust in dB, X-Achse die betroffenen Frequenzen. Ein Kreuz bezeichnet die Messungen des linken Ohres, ein Kreis die Messungen des rechten Ohres. Jede Farbe gibt die Messung zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder, welche in der Legende angegeben ist. Die Tochter zeigt einen moderate Mittelfrequenzhörstörung, die über 1,5 Jahre stabil blieb. Bei der Mutter konnte ebenfalls eine moderate Mittelfrequenzhörstörung im Alter von 8 Jahren, im ähnlichen Alter zur Tochter festgestellt werden. Im Lauf nahm diese aber zu und zeigte eine schwerwiegende Hörstörung, die vor allem die mittleren Frequenzen umfasst, aber auch die tiefen und die hohen Töne beeinträchtigt. Die Messung nahm hierbei einen Zeitraum von ca. 27 Jahren in Anspruch.*

Bei der Mutter trat die Hörstörung mit 3 – 4 Jahren auf. Bei der Tochter war das Neugeborenen Screening unauffällig, aber mit 2 – 3 Jahren konnte bei ihr ebenfalls eine

Hörstörung beobachtet werden (Abb.79). Damit scheint der Phänotyp ähnlich zu dem der beschriebenen Familie zu sein, die ebenfalls zu dem DFNA33 Locus zugeordnet werden konnte [242]. Des Weiteren konnte bei der Mutter eine Untererregbarkeit des vestibularen Organs mit Hilfe von Neurotologischen Tests festgestellt werden. Dies würde die Variante in ATP11A stützen. Jedoch konnten 3 Fälle in gnomAD gefunden werden, die ebenfalls diese Variante heterozygot tragen. Zusätzlich konnte sowohl bei der Mutter als auch bei dem Kind eine weitere Variante in *PTPRQ* festgestellt werden: c.2002-2A>G, p.? (NM_01145026.1). Diese Variante konnte ebenfalls bei drei heterozygotem Träger in gnomAD festgestellt werden. Sie führt zu einem möglichen Verlust des Exons 21 und hat einen CADD Score von 23.2, welches als pathogen einzustufen ist. Die Deafness Variation Database klassifiziert diese Variante als unbekannte Signifikanz. Da seit 2017 *PTPRQ* auch als dominantes Hörstörungsgen (DFNA73) bekannt ist [243], besteht nun die Frage ob dieses Gens für die vorliegende Hörstörung der Familie G8 verantwortlich ist. Jedoch sind dominante Hörstörungen im *PTPRQ*-Gen mit einer nonsense Variante verbunden, die das finale Exon des Gens betrifft und dadurch zu einem verkürzten Protein führt, welches einen dominant negativen Effekt ausübt. Daher ist es eher davon auszugehen, dass die Splice Variante im Intron 20, welches in der Mitte des Gens liegt, einen rezessiven Charakter aufweist. Generell sind Varianten in *PTPRQ* nämlich mit einer rezessiven Hörstörung DFNB84A verbunden [244]. Der Phänotyp für autosomal dominant *PTPRQ* assoziierte Hörstörung zeigt einen variablen Auftritt, mit einer hochtonbetonten Schwerhörigkeit, welche nicht zu der in der G8 beschriebenen Hörstörung passt. Daher könnte die Variante c.1546G>A, Glu516Lys im *ATP11A* für die Hörstörung der Familie G8 ursächlich sein.

In der Familie G7 konnte ebenfalls ein Kandidatengen ermittelt werden. In *TECTB* konnte eine wahrscheinlich pathogene Variante c.853C>T, p.Arg285Cys detektiert werden. *TECTB* ist als Kandidatengen wohlbekannt, da es in Zusammenhang mit *TECTA* und *CEACAM16* für die striated sheet Matrix in der Tektorialmembran verantwortlich ist [49, 245]. Bislang konnte jedoch noch keine Familie mit einer Hörstörung in *TECTB* zugeordnet werden. Mit Hilfe der Familie G7 kann *TECTB* nun als Hörstörungsgen bestätigt werden. Betroffene Patienten der Familie G7 weisen eine milde - moderate Hörstörung auf, wobei nur Reintonaudiometrie-Daten von III-4 und III-5 vorliegen. Dennoch ist davon auszugehen, dass keiner der weiteren Familienmitglieder eine deutlich schwerwiegendere Hörstörung vorliegend haben, da von keinem bekannt ist, dass er Hörgeräte trägt. Im Folgenden ist die Hörstörung der bekannten Familienmitglieder aufgetragen.

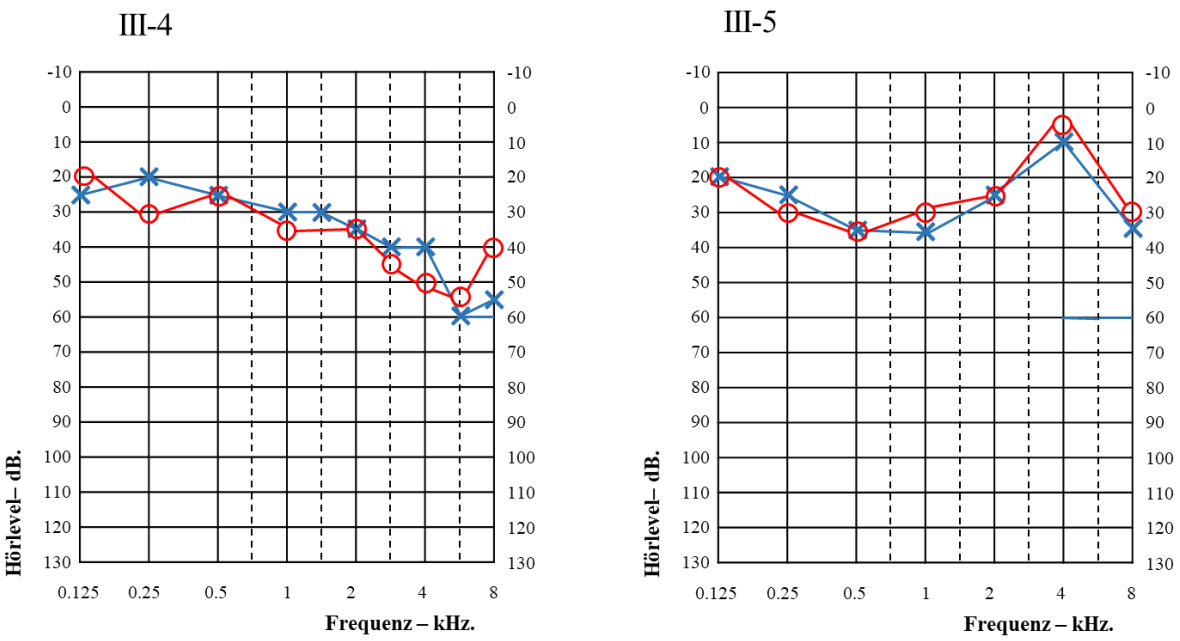



*Abb. 80: Reintonaudiogramme von III-4 Cousine (links) und III-5 Indexpatient (rechts) der Familie G7. Y-Achse zeigt den Hörverlust in dB, X-Achse die betroffenen Frequenzen. Ein blaues Kreuz bezeichnet die Messungen des linken Ohres, ein roter Kreis die Messungen des rechten Ohres. Das Reintonaudiogramm zeigt bei III-4 im Alter von 36 Jahren eine milde bis moderate Hörstörung, die vor allem die hohen Frequenzen betrifft. Der Indexpatient III-5 im Alter von 11 zeigt eine milde Hörstörung, die vor allem die tiefen Frequenzen betrifft.*

Es scheint eine gewisse familiäre Variabilität zu geben, wenn man die beiden Hörkurven betrachtet. Dies kann aber auch durch das Alter beeinflusst sein, so dass eine Hörstörung, welche die hohen Frequenzen beim III-5 umfasst, nicht ausgeschlossen werden kann. Dies würde dem dominanten Charakter vieler Hörstörungsgene entsprechen, die eine postlinguale progressive Hörstörung erwarten lässt [31]. In Kollaboration mit Jun Shen vom Morton Laboratory wird *TECTB* als Hörstörungsgen klassifiziert. Dazu sind weitere Analysen in Bearbeitung.

## 4.5 Re-Analyse der Daten und Re-Klassifizierung von Varianten

Die Re-Analyse der Daten und Re-Klassifizierung von Varianten spielen eine entscheidende Rolle in dieser Arbeit. Auf diese Weise konnten mehrere vormals ungelöste Fälle im Lauf der Arbeit aufgeklärt werden. Ein Beispiel ergab sich durch die Re-analyse der Daten, die von Linda Schnapp im Rahmen ihrer Masterarbeit erstellt worden sind, wodurch weitere Fälle von den Familien G34–G74 aufgeklärt werden konnten. So konnten zum Beispiel in der Familie G41 die Varianten im *HUWE1*-Gen detektiert werden aufgrund der Einbeziehung syndromal assoziierter Hörstörungsgene. Ebenso konnte durch eine erneute Analyse der Familie E30 mit Einbeziehung neuer Hörstörungsgene die Variante im *S1PR2*-Gen gefunden werden. Dieses Gen ist erst seit 2016 als potentielles Hörstörungsgen bekannt [127]. Re-analysen mit Einbeziehung neuer Hörstörungsgene und Gene, die mit einer syndromalen Hörstörung assoziiert sind, trugen somit in ca. 7% aller untersuchten Fälle in dieser Arbeit zu einer höheren Aufklärungsrate bei. Re-Analysen wurden auch zur nachträglichen Aufklärung anderer Krankheiten bereits beschrieben. So wird zum Beispiel auch bei Patienten mit Epilepsie und geistiger Behinderung empfohlen nach 6–12 Monaten die Daten erneut in Zusammenhang mit der klinischen Anamnese zu analysieren [246].

Diese Empfehlung sollte auch für ungeklärte Hörstörungsfälle gelten, da hier aufgrund der Etablierung neuer Hörstörungsgene und der Verbesserung von Analysetools einige Fälle im Nachhinein aufgeklärt werden könnten.

Des Weiteren spielt ebenfalls die Re-Klassifizierung von Hörstörungsgenen und deren Varianten eine entscheidende Rolle in der Gewichtung der Varianten innerhalb einer erneuten Re-Analyse. Im Jahr 2014 wurde das Gen *MYO1A* als Hörstörungsgen disqualifiziert [247], obwohl es vorherig 11 Jahre als bekanntes Hörstörungsgen galt [248]. In diesem Sinne müssten alle Fälle, die bis dato mit einer *MYO1A*-assoziierten Hörstörung in Zusammenhang gebracht wurden, neu bewertet und untersucht werden. Ebenso kommt es zu Re-Klassifizierungen mehrerer Varianten aufgrund der veränderten Allelfrequenz [104].

Dies führte beispielsweise bei der Familie G6 zu unterschiedlichen Einstufungen der beiden Usher-Varianten. Zwischenzeitlich wurde die Stoppmutation *USH2A* c.11864G>A, p.Trp3955* in DVD als benigne eingestuft. Dies galt ebenso für die zweite Variante *USH2A* c.12889T>C, p.Ser4297Pro, die in DVD als „likely benign“ kurzzeitig eingestuft war. Daraufhin wurden die Daten wiederholt re-analysiert und eine homozygote Variante im *USH1G*-Gen gefunden. Inzwischen ist die Variante *USH2A* c.11864G>A als pathogen

eingestuft und die zweite Variante *USH2A* c. 12889T>C überhaupt nicht mehr in der Datenbank beschrieben. Dieser Fall zeigt ebenfalls die Wichtigkeit der Re-Analyse und Neubewertung der Varianten. Dies ist aber mit großem Zeitaufwand verbunden, so dass nicht jeder Fall erneut einzeln bewertet werden kann. Daher solle eine Pipeline entwickelt werden, die Re-Analyse-Maßnahmen in den Diagnostikplan integriert.

## 4.7 THERAPIEMÖGLICHKEITEN IN ABHÄNGIGKEIT DER GENETISCHEN DISPOSITION

Momentan gibt es noch keine Therapie für genetisch bedingte Hörstörungen, die das Hörvermögen der Patienten wiederherstellen könnte, obwohl Ansätze in Form von klinischen Studien und Tiermodelle existieren [249, 250]. Daher können im Moment nur konventionelle Methoden helfen, um die Hörleistung zu verbessern. Dafür gibt es Hörgeräte oder die Implantation eines Cochlea-Implantats. Ersteres verbessert die Schalleitung ins Innenohr, indem der Schall verstärkt wird. Letzteres ist eine Art künstliches Innenohr, das über elektrische Signale mechanische Energie an das Gehirn weiterleitet. Die mechanische Energie wird über das runde Fenster in die Cochlea eingefügt. Im Folgenden ist ein Bild eines Cochlea-Implantats dargestellt (Abb. 81).

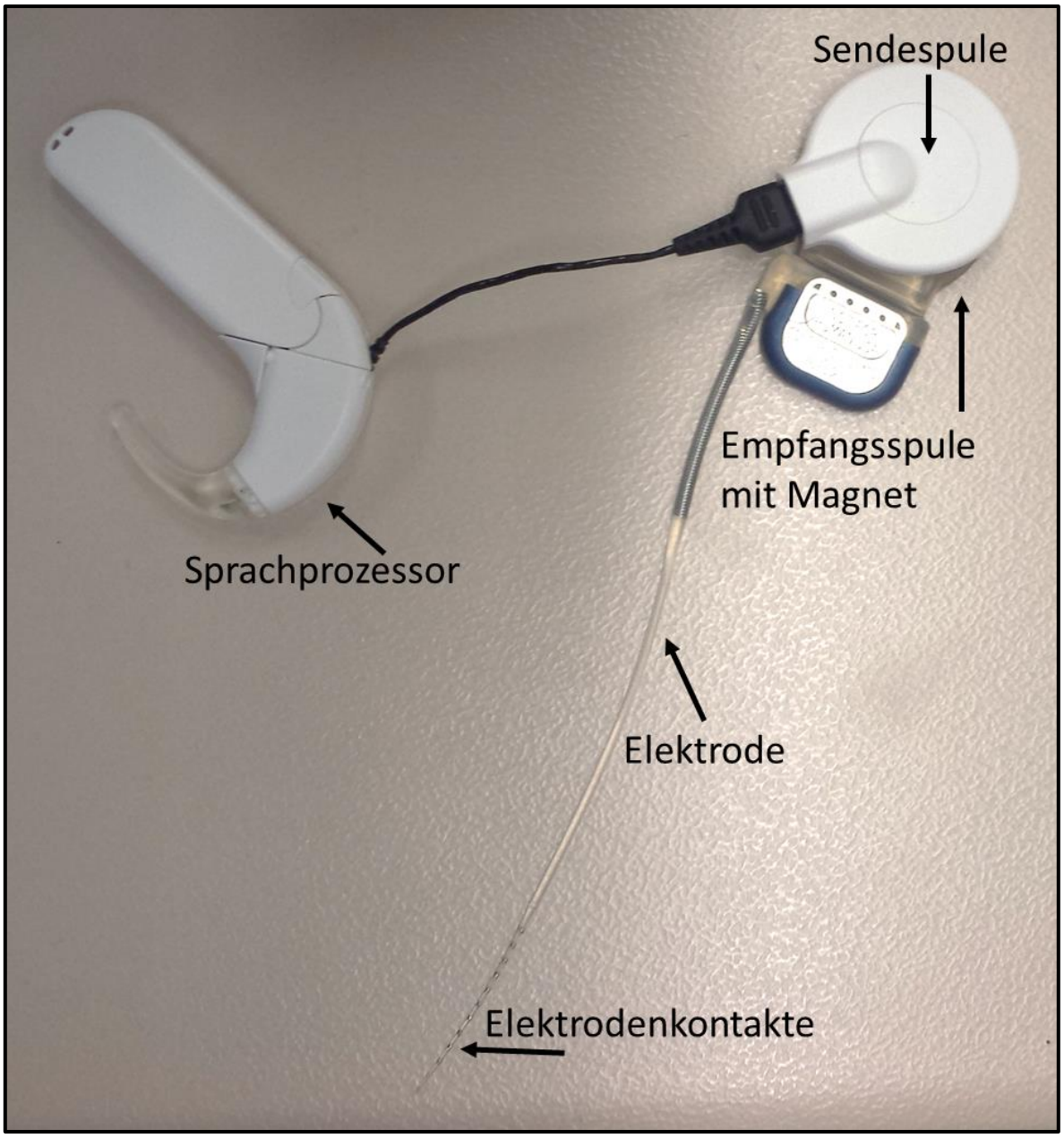



*Abb. 81: Cochlea-Implantat. Die Elektrode mit den Elektrodenkontakten wird in die Cochlea über das runde Fenster eingefügt. Die Empfangsspule mit dem Magneten wird im Schädelknochen eingesetzt. Über dem Magneten befindet sich eine Sendespule, die mit einem digitalen Sprachprozessor verbunden ist. Dieser wird hinter dem Ohr getragen. Der Sprachprozessor beinhaltet Batterien und Mikrofone. Die Ton- und Sprachsignale werden vom Mikrofon aufgenommen. Diese werden anschließend vom digitalen Prozessor verarbeitet. Über die Sendespule werden die Signale durch die intakte Haut an die Empfangsspule des Implantats gesendet. Von dort werden die Signale an die Elektroden gesendet, die den Hörnerv anregen [251] (Foto Michaela Hofrichter)*

Sowohl die Hörgeräte als auch das Cochlea-Implantat werden bei sensorineuralen Hörstörungen zur Verbesserung des Hörvermögens angewandt. Bei einer Schallleitungsschwerhörigkeit gibt es ebenfalls Mittelohr- und Schädelimplantate. Mittelohrimplantate werden an den Gehörknöchelchen befestigt. Dadurch wird deren Schwingung verstärkt. Knochenverankerte Implantate werden in den Schädelknochen eingesetzt. Sie stimulieren über ihre Schwingung den Schädel und damit die Hörschnecke. Ist der Hörnerv bzw. die auditorische Bahn von einem Defekt betroffen, können über Hirnstamm-Implantate das Gehirn direkt elektrisch stimuliert werden [252].

Genetische Untersuchungen können hierbei helfen zu entscheiden, welche Form der konventionellen Behandlung am sinnvollsten wäre. So kann zum Beispiel anhand bekannter pathogener Varianten in bestimmten Genen eine bestimmte Entwicklung der Hörstörung im Lauf des Lebens angenommen werden. Dies kann helfen zu entscheiden, ab wann eine Implantation eines Cochlea-Implantats sinnvoll wäre. Dies spielt vor allem bei progressiven Hörstörungen eine Rolle, wie sie beispielsweise mit dem Gen *TECTA* assoziiert sind. Hierbei kann die Hörstörung stabil bleiben oder sich im Lauf des Lebens verschlechtern. Während bei einer stabilen, moderaten Hörstörung ein Hörgerät ausreichend sein kann, könnte bei anderen Varianten im Gen *TECTA* eine Cochlea-Implantation notwendig werden. Entscheidend ist der Zeitpunkt einer Implantation [253]. Zum anderen kann mit Hilfe einer genetischen Diagnose festgestellt werden, ob ein Cochlea-Implantat überhaupt das Hörvermögen verbessern kann. Defekte im Gen *PJVK* sind mit einer Hörstörung verbunden, die die Hörbahn betreffen [254, 255]. Die Funktion der Cochlea ist somit intakt, wodurch ein Cochlea-Implantat nicht zur Verbesserung des Hörvermögens beitragen könnte und möglicherweise ein Hirnstammimplantat in Frage kommen würde. Varianten in diesem Gen *PJVK* und Varianten in *PCDH15* sind mit einem schlechten Hörergebnis nach einer Cochlea Implantation verbunden [256]. Dagegen sind bei *SMPX*-assoziierten Hörstörungspatienten (c.99del) mit Cochlea-Implantaten gute Ergebnisse erzielt worden, was in unserer Kohorte drei Familien interessieren sollte [59]. Zusätzlich kann im Vorhinein bei Operationen auf evtl. anstehende Komplikationen hingewiesen werden, wie zum Beispiel bei Mutationen im Gen *POU3F4*. Mutationen in diesem Gen wurden in Zusammenhang mit Fehlbildungen des Vestibulums, einem vergrößerten inneren Gehörgang und einem vestibulären Aquädukt, sowie einer Veränderung der cochleären Struktur und perilymphatischem Gusher-Phänomen beschrieben [55]. Während des Einlegens des Implantats kann es zu einem Austritt von Perilymphe aufgrund eines erhöhten Drucks im Innenohr kommen. Das Gusher-Phänomen ist auf das Fehlen der inneren knöchernen Begrenzung der cochleären Basalwindungen zurückzuführen,

wodurch eine Verbindung der Gehirnflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis) und der Perilymphe entsteht [257].

Davon abgesehen kann mit Hilfe einer genetischen Diagnose zudem ermittelt werden, ob etwa ein Syndrom, wie beispielsweise das Pendred-Syndrom oder das Jervell-Lange-Nielson-Syndrom, zugrunde liegt. In beiden Fällen kann durch entsprechende Therapie mittels Medikamente die Schilddrüsenunterfunktion bzw. die Herzrhythmusstörungen behandelt werden, was zehn Familien dieser Studie betreffen würde. Zusätzlich könnten bei Syndromen mit massiven Auswirkungen, wie beispielsweise das Usher- oder Perrault-Syndrom, eine entsprechende Beratung und Betreuung der Patienten stattfinden.

Ebenso könnten bei einer zeitigen genetischen Diagnose weitere Hörschäden mit Hilfe genetischer und medikamentöser Behandlung vermieden werden, was bei bestimmten Mutationen in mitochondrialen Genen eine zentrale Rolle spielt.

Des Weiteren kann die Genetik auch hilfreich bei einem bestehenden Kinderwunsch sein, um die Wahrscheinlichkeit einer auftretenden Hörstörung für ein geplantes Kind abzuschätzen.

# 5 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

## 5.1 PARADIGMENWECHSEL VOM GEN ZUR VARIANTE

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ansicht eine Krankheit durch ein Gen zu definieren überholt ist. Untersuchungen von Genen, die mit Hörstörungen assoziiert sind, haben bewiesen, dass der Übergang zwischen syndromalen und nicht syndromalen Genen fließend ist. Varianten in Genen wie *COL11A1* und *USH1G*, die vormals mit einem Syndrom assoziiert waren, können auch mit einer isolierten Hörstörung in Verbindung gebracht werden [75, 80, 142, 258]. Zusätzlich zeigen viele Gene einen dualen Charakter und können sowohl rezessiv als auch dominant auftreten, was von der jeweils ursächlichen Variante abhängig ist. Dies konnte am Beispiel der Gene *CEACAM16* und *TECTA* in dieser Arbeit belegt werden [51, 53, 148, 165]. Dies wird auch anhand der Literatur deutlich, in der beschrieben wurde, dass ein Aminosäureaustausch an der gleichen Position im Protein GJB2 zu verschiedenen Phänotypen führen kann: Die dominante Variante c.133G>A, p.Gly45Arg ist mit einer nicht syndromalen Hörstörung assoziiert, wohingegen die Variante c.134G>A, p.Gly45Glu das lethalen Keratitis-Ichthyose-Taubheit (KID)-Syndrom zur Folge hat [259]. Ebenso ist das Gen *MET* in erster Linie mit Krebs assoziiert [260]. Jedoch führt die Mutation c.2521T>G im Gen *MET* zu einer nicht syndromalen Hörstörung [261].

Daher muss in Zukunft die phänotypische Zuordnung der Varianten nur über die pathogene Variante selbst erfolgen. So sind Studien wie diese unerlässlich, um Hörstörungsvarianten zu beschreiben und phänotypisch zu charakterisieren.

## 5.2 UNGELÖSTE FÄLLE – MÖGLICHKEITEN ZUR AUFKLÄRUNG

Obwohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit über die Hälfte aller vorliegenden Hörstörungsfälle aufgeklärt werden konnte, sind viele Fälle ungelöst. Dies kann unterschiedliche Gründe haben. Zum einen könnte das krankheitsverursachende Gen noch nicht entdeckt worden sein und wurde daher innerhalb dieser Arbeit nicht untersucht [29]. Zum anderen könnte die krankheitsverursachende Variante durch technische Einschränkungen übersehen worden sein, z.B. aufgrund der Fokussierung auf kodierende Bereiche oder einer eingeschränkten Sequenzabdeckung. Weiterhin könnten bestimmte Konstellationen wie beispielsweise Multinukleotidvarianten nicht beachtet worden sein, wenn

diese die Filterungskonditionen nicht erfüllten. Zusätzlich gab es Schwierigkeiten bei der Detektion von Kopienzahlvariationen (CNVs), da aufgrund limitierter Abdeckung ein hohes Hintergrundrauschen vorlag. Auch sind regulatorische oder tiefintronische Varianten nicht berücksichtigt worden. Daher werden im folgenden Abschnitt mögliche Lösungsansätze vorgestellt, um auch bei den übrigen Patienten eine pathogene Variante zu detektieren.

### 5.2.1 TECHNISCHE NEUERUNGEN – WHOLE GENOME SEQUENCING

Limitationen wie eine fehlende Abdeckung könnten durch Verbesserung der Sequenzierungs-Kits ermöglicht werden. So gibt es inzwischen ein neues Exome Enrichment Kit von Illumina, das eine verbesserte und damit eine einheitlichere Abdeckung verspricht. Zusätzlich könnten statt der am meistens genutzten 150 Zyklen Kassette, also wieviel vom Fragment von jeder Seite sequenziert wird, eine größere Kassette verwendet werden. Die durchschnittliche Größe der Fragmente betrug ca. 350 – 450 bp. Bei einer 150 Zyklen Kassette wird von jedem Fragment von jeder Seite nur 76 bp gelesen. Bei einer 300er Kassette sind es 151 bp. Auf den Umstieg zu einer großen Kassette kann eine eine höhere Abdeckung erzielt werden und möglicherweise die CNV-Analyse damit verbessert werden. Spezialisierte und angepasste Analysetools könnten die erzeugten Daten auch besser verarbeiten, so dass Varianten gezielter detektiert und auch Multinukleotidvarianten als solche erfasst werden können. Des Weiteren könnten alle negativen Fälle mit Hilfe einer genomweiten Sequenzierung untersucht werden. Dabei werden ebenfalls die intronischen Bereiche angereichert und analysiert werden können. Auf diese Weise können sowohl kleine Veränderungen wie Basensubstitutionen als auch strukturelle Varianten bis hin zu großen chromosomale Aberrationen wie Translokationen festgestellt werden [262]. Auch tiefintronische Varianten, wie sie beispielsweise bei den Genen *USH2A [263]* oder *GJB2* [264] bekannt, könnten detektiert werden.

### 5.2.2 RE-ANALYSE DER DATEN

Eine weitere Möglichkeit bietet die Re-analyse der Daten. Dies kann von Untersuchung neuer Gene bis hin zu Reklassifizierung von bereits bekannten Varianten reichen. Wie ebenfalls in dieser Arbeit beschrieben, konnten bei einigen Fällen durch Re-analyse die ursächliche kausale Variante gefunden werden und die jeweiligen Fälle dadurch aufgeklärt werden. Dadurch steigt die Chance weitere Fälle mit Hilfe einer Re-Analyse aufzuklären deutlich an. Vor allem bei der Kandidatengenermittlung sind Re-Analysen immer wieder im Analyseprozess von Exomdaten zu berücksichtigen. Ein Kandidatengen kann schließlich nur als solches anerkannt werden, wenn alle anderen Gene, die bereits nachweislich mit einer

Hörstörung assoziiert werden konnten, ausgeschlossen wurden. Bei einigen Hörstörungsfamilien fehlen noch CNV-Analyse-Daten. Vermutlich könnten durch diese Daten einige Hörstörungsfälle aufgeklärt werden und daher sollte eine CNV-Analyse unbedingt nachgeholt werden [153]. Zugleich ist zu bedenken, dass auch Multinukleotidvarianten eine Hörstörung verursachen können. Diese komplexen Variantenkombinationen umfassen zum Teil auch synonyme Varianten, also Basensubstitutionen, die zu keinem Aminosäurenaustausch führen. Solche Varianten werden oftmals bei der Exom-Analyse ignoriert, da deren Pathogenität schwer vorhergesagt werden kann. Eine weitere Problematik stellen Kombinationen aus seltenen Varianten und Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) dar, da SNPs aufgrund ihrer erhöhten Allelfrequenz bei der Analyse ausgeschlossen wurden. Im Durschnitt werden 23 Mulitnukleotidvarianten bei einer Exom-Analyse eines Patienten detektiert [218]. Daher könnte durch diese ebenfalls einige Patienten noch aufgeklärt werden. Zusätzlich könnte auch die Mutationslast der Hörstörungsgene eine Rolle für die Hörstörung spielen. Eine weitere Analyse wäre in dieser Hinsicht der Daten sinnvoll [171].

### 5.2.3 Modifier, die die Hörstörung beeinflussen

Modifier sind Gene bzw. Genvarianten, die den Phänotyp nicht verursachen, aber beeinflussen können. Sie können die Hörstörung verbessern oder verschlechtern. Ein Beispiel hierfür bietet der Modifier *METTL2*, der das Gen *GAB1* beeinflusst [265]. Patienten, die einen homozygoten Defekt in *GAB1* aufwiesen, zeigten eine an Taubheit grenzende Schwerhörigkeit. Patienten, die zusätzlich noch eine heterozygote Mutation im Gen *METTL2* trugen, zeigten jedoch keinen Phänotyp. Dies ist ein Beispiel, wie ein Modifier den Hörstörungsphänotyp verbessern kann [265]. Gleichzeitig gibt es aber auch den umgekehrten Fall, wie beispielsweise eine heterozygote Modifikation im Gen *ATP2B2*, die in Kombination mit homozygoten Mutationen in *CDH23* das Hörvermögen verschlechtern [169]. Modifier können Gene, aber auch einzelne Varianten sein. Dadurch fällt es schwer etwaige Modifier auch in Hinblick auf die Heterogenität von Hörstörungen zu entdecken. Jedoch könnten Modifier das Phänomen der unvollständigen Segregation aufklären. So könnte das Zusammenspiel mehrerer Varianten in Hörstörungsgenen eventuell weitere Hörstörungsfälle aufklären. So könnte möglicherweise ebenfalls die Akkumulation mehrerer mit Hörstörung assoziierter Varianten in Form einer erhöhten Mutationslast eine Rolle spielen [171]. Zusätzlich könnten auch epigenetische Veränderungen eine Rolle bei der Ausprägung des Phänotyps einer Hörstörung spielen und möglicherweise auch ein ausschlaggebender Aspekt bei einer Hörregeneration darstellen [266, 267]. Epigenetische Veränderungen wurden

innerhalb dieser Arbeit nicht untersucht, doch könnte dies für alle Patienten nachgeholt werden.

## 5.3 Tiermodelle für die Bestätigung von neuen Hörstörungsgenen

Generell helfen Tiermodelle bei Untersuchungen der unterschiedlichsten Erkrankungen. In der Hörstörungsforschung wird hauptsächlich das Mausmodell aus mehreren Gründen herangezogen. Zum einen ist das Ohr der Maus dem Ohr des Menschen sehr ähnlich [268], zum anderen ist das Mausgenom vollständig sequenziert und am besten charakterisiert [268]. Zusätzlich teilen sich Maus und Mensch 99% ihrer Gene [269]. Des Weiteren sind Mäuse leicht zu halten, es ist einfach mit ihnen zu arbeiten, sie sind kosteneffizient und haben eine relativ hohe Reproduktionsrate im Gegensatz zu anderen Spezies [270]. So eignete sich das Mausmodell auch zur Verifizierung der Kandidatengene *TECTB* und *ATP11A*. Jedoch ist auch der Zebrafisch ein immer häufiger verwendetes Tiermodell zur Untersuchung von Kandidatengenen, da dessen Genom ebenfalls vollständig sequenziert ist [271].

Gerade im Zebrafisch werden gehäuft Inaktivierungen von Zielgenen vorgenommen [266, 267]. Die Besonderheit bei Zebrafischen liegt in der Visualisierung von Defekten im Innenohr, da diese direkt bei der Entwicklung des sensorischen Epithels aufgrund der Transparenz des Fisches beobachtet werden können [266]. Daher eigenen sie sich besonders für Expressionsanalysen. Jedoch können nicht alle Gene im Zebrafisch untersucht werden. Dies gilt zum Beispiel für das Gen *TECTB*. TECTB ist eine Komponente der Tektorialmembran. Zebrafische besitzen keine Tektorialmembran, daher kann die Funktion von TECTB im Zebrafisch nicht untersucht werden. Auch das Mausmodell ist nicht für Expressionsanalysen aller Gene ideal, wie beispielsweise für *CRYM*, *GRHL2* und *GJB3*. Bei diesen Genen konnte im Mausohr eine im Vergleich zum Menschen unterschiedliche Expression festgestellt werden und die Mäuse wiesen keinen humanspezifischen Phänotyp auf. Dagegen konnten mittels Untersuchungen am Weißbüschelaffen diese Hörstörungsgene in Zusammenhang mit einem Hörstörungsphänotyp gebracht werden. Daraus kann man schließen, dass für jedes Kandidatengen ein geeignetes Tiermodell sorgfältig ausgewählt werden muss, mit welchem weiterführende Expressionsanalysen durchgeführt werden können [272].

## 5.4 ZUKÜNFTIGE THERAPIEMÖGLICHKEITEN

Bislang stehen im Moment nur konventionelle Möglichkeiten zur Verfügung, um eine Hörstörung zu behandeln. Diese, wie in der Diskussion schon erwähnt, können mit Hilfe der genetischen Analyse angepasst werden. Dennoch existieren Ansätze, um eine genetisch bedingte Hörstörung gentechnisch zu behandeln. So konnte das krankheitsverursachende Allel des Gens *TMC1* im Mausmodell mit Hilfe von CRISPR/CAS9 ausgeschaltet werden und somit das Hörvermögen der Maus verbessert werden [273]. CRISPR/CAS9 ist eine Methodik, bei der das Genom gezielt editiert werden kann. Dabei wird mit Hilfe einer guide RNA und einer RNA-Nuklease Cas9 Doppelstrangbrüche an einer bestimmten Region mit wiederholender DNA-Abschnitte (CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) erzeugt [274]. Des Weiteren wurde mit Hilfe zweier viraler Vektoren in einem weiteren Mausmodell eine Hörstörung geheilt, die durch Mutationen im Gen *OTOF* verursacht wurde [275]. Dieses Prinzip wurde ebenfalls bei einer *USH1G*-assoziierten Hörstörung angewandt. Hierbei wurde mittels eines AAV8-rekombinaten Vektors, der die cDNA-Sequenz von *USH1G* enthielt, und dessen Injektion in die Cochlea von Mäusen, deren Gehör wiederhergestellt [276].

Auch wenn die Gentherapie bis dato nur in Mausmodellen gelungen ist, besteht die zukünftige Hoffnung, dass auch im Menschen eine solche Gentherapie möglich sein wird. Umso bedeutender wird daher zukünftig die genetische Analytik: Die Detektion des zugrunde liegenden genetischen Defekts der jeweiligen Patienten ist unerlässlich für eine spezifische Gentherapie.

.

# 6 LITERATURVERZEICHNIS


1. Brown SD, Hardisty-Hughes RE, Mburu P: **Quiet as a mouse: dissecting the molecular and genetic basis of hearing**. *Nature Reviews Genetics* 2008, **9**(4):277.
2. Genuit K, Sottek R: **Das menschliche Gehör und Grundlagen der Psychoakustik**. In: *Sound-Engineering im Automobilbereich.* Springer; 2010: 39-88.
3. **World Health Organization** [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss]
4. Zahnert T: **Differenzialdiagnose der Schwerhörigkeit**. *Dtsch Arztebl Int* 2011, **108**(25):432-443.
5. Cunningham LL, Tucci DL: **Hearing loss in adults**. *New England Journal of Medicine* 2017, **377**(25):2465-2473.
6. Kremer H, van Wijk E, Märker T, Wolfrum U, Roepman R: **Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways**. *Human molecular genetics* 2006, **15**(suppl_2):R262-R270.
7. Baumann R: **Physiologie**: Georg Thieme Verlag; 2010.
8. Hibino H, Nin F, Tsuzuki C, Kurachi Y: **How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus**. *Pflug Arch Eur J Phy* 2010, **459**(4):521-533.
9. Salt AN, Melichar I, Thalmann R: **Mechanisms of Endocochlear Potential Generation by Stria Vascularis**. *Laryngoscope* 1987, **97**(8):984-991.
10. Mazzoli M, Van Camp GUY, Newton V, Giarbini N, Declau F, Parving A: **Recommendations for the Description of Genetic and Audiological Data for Families with Nonsyndromic Hereditary Hearing Impairment**. *Audiological Medicine* 2003, **1**(2):148-150.
11. **Hörstörungen bei Kinder** [https://www.aerztezeitung.at/fileadmin/PDF/2017_Verlinkungen/State_Hoerstoerungen_Kinder.pdf]
12. Ernst A, Battmer R-D: **Audiometrie und Funktionsdiagnostik in der HNO**: BoD–Books on Demand; 2011.
13. Zelle D, Dalhoff E, Gummer A: **Objektive Hördiagnostik mit DPOAE**. *HNO* 2016, **64**(11):822-830.
14. Ramos JA, Sinnet Greve Bjerge Kristensen M, Beck DL: **An Overview of OAEs and Normative Data for DPOAEs Published on October 12, 2013**.
15. Beck DL, Speidel D, Petrak M: **Auditory steady-state response (ASSR): a beginner's guide**. *Hearing Review* 2007, **14**(12):34.
16. Morton CC, Nance WE: **Newborn hearing screening--a silent revolution**. *The New England journal of medicine* 2006, **354**(20):2151-2164.
17. Rodrigues M, Nunes J, Figueiredo S, de Campos AM, Geraldo AF: **Neuroimaging assessment in Down syndrome: a pictorial review**. *Insights into Imaging* 2019, **10**(1):52.

18. Vona B, Hofrichter MA, Chioza BA, Crosby AH, Nanda I, Haaf T: **Genetic elucidation of nonsyndromic hearing loss in the high-throughput sequencing era**. In: *Genetics of Deafness.* vol. 20: Karger Publishers; 2016: 56-72.

19. Roizen NJ: **Nongenetic causes of hearing loss**. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 2003, **9**(2):120-127.

20. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE: **Genetic epidemiological studies of early- onset deafness in the US school- age population**. *American journal of medical genetics* 1993, **46**(5):486-491.

21. Shearer AE, Smith RJ: **Genetics: advances in genetic testing for deafness**. *Current opinion in pediatrics* 2012, **24**(6):679.

22. Angeli S, Lin X, Liu XZ: **Genetics of hearing and deafness**. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 2012, **295**(11):1812-1829.

23. Eppsteiner RW, Shearer AE, Hildebrand MS, Taylor KR, DeLuca AP, Scherer S, Huygen P, Scheetz TE, Braun TA, Casavant TL: **Using the phenome and genome to improve genetic diagnosis for deafness**. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery* 2012, **147**(5):975-977.

24. Shen J, Morton CC: **Next-generation newborn hearing screening**. In: *Genetics of Deafness.* vol. 20: Karger Publishers; 2016: 30-39.

25. Smith RJ, Bale JF, Jr., White KR: **Sensorineural hearing loss in children**. *Lancet* 2005, **365**(9462):879-890.

26. Vona B, Nanda I, Shehata-Dieler W, Haaf T: **Genetics of tinnitus: still in its infancy**. *Frontiers in neuroscience* 2017, **11**:236.

27. Kikkawa Y, Miyasaka Y: **Genetic modifiers of hearing loss in mice: The case of phenotypic modification in homozygous Cdh23ahl age-related hearing loss**. In: *Genetics of Deafness.* vol. 20: Karger Publishers; 2016: 97-109.

28. **hearing loss homepage** [http://hereditaryhearingloss.org]

29. Friedman TB, Griffith AJ: **Human nonsyndromic sensorineural deafness**. *Annual review of genomics and human genetics* 2003, **4**(1):341-402.

30. Murken J: **Humangenetik**: Georg Thieme Verlag; 2006.

31. Vona B, Nanda I, Hofrichter MA, Shehata-Dieler W, Haaf T: **Non-syndromic hearing loss gene identification: a brief history and glimpse into the future**. *Molecular and cellular probes* 2015, **29**(5):260-270.

32. Bitner-Glindzicz M: **Hereditary deafness and phenotyping in humans**. *British medical bulletin* 2002, **63**(1):73-94.

33. **Hereditary Hearing Loss Homepage** [http://hereditaryhearingloss.org]

34. Mehta D, Noon SE, Schwartz E, Wilkens A, Bedoukian EC, Scarano I, Crenshaw III EB, Krantz ID: **Outcomes of evaluation and testing of 660 individuals with hearing loss in a pediatric genetics of hearing loss clinic**. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2016, **170**(10):2523-2530.

35. Chan DK, Chang KW: **GJB2- associated hearing loss: Systematic review of worldwide prevalence, genotype, and auditory phenotype**. *The Laryngoscope* 2014, **124**(2):E34-E53.

36. Verpy E, Leibovici M, Michalski N, Goodyear RJ, Houdon C, Weil D, Richardson GP, Petit C: **Stereocilin connects outer hair cell stereocilia to one another and to the tectorial membrane**. *Journal of Comparative Neurology* 2011, **519**(2):194-210.

37. Knijnenburg J, Oberstein SL, Frei K, Lucas T, Gijsbers AC, Ruivenkamp CA, Tanke HJ, Szuhai K: **A homozygous deletion of a normal variation locus in a patient with hearing loss from non-consanguineous parents**. *J Med Genet* 2009, **46**(6):412-417.

38. Vona B, Hofrichter MAH, Neuner C, Schroder J, Gehrig A, Hennermann JB, Kraus F, Shehata-Dieler W, Klopocki E, Nanda I *et al*: **DFNB16 is a frequent cause of congenital hearing impairment: implementation of STRC mutation analysis in routine diagnostics**. *Clinical genetics* 2015, **87**(1):49-55.

39. Zhang Y, Malekpour M, Al-Madani N, Kahrizi K, Zanganeh M, Mohseni M, Mojahedi F, Daneshi A, Najmabadi H, Smith RJ: **Sensorineural deafness and male infertility: a contiguous gene deletion syndrome**. *BMJ case reports* 2009, **2009**.

40. Li XC, Everett LA, Lalwani AK, Desmukh D, Friedman TB, Green ED, Wilcox ER: **A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness**. *Nature genetics* 1998, **18**(3):215.

41. Bassot C, Minervini G, Leonardi E, Tosatto SC: **Mapping pathogenic mutations suggests an innovative structural model for the pendrin (SLC26A4) transmembrane domain**. *Biochimie* 2017, **132**:109-120.

42. Wangemann P, Itza EM, Albrecht B, Wu T, Jabba SV, Maganti RJ, Lee JH, Everett LA, Wall SM, Royaux IE *et al*: **Loss of KCNJ10 protein expression abolishes endocochlear potential and causes deafness in Pendred syndrome mouse model**. *Bmc Med* 2004, **2**.

43. Ghasemnejad T, Khaniani MS, Zarei F, Farbodnia M, Derakhshan SM: **An update of common autosomal recessive non-syndromic hearing loss genes in Iranian population**. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 2017, **97**:113-126.

44. Rehman AU, Bird JE, Faridi R, Shahzad M, Shah S, Lee K, Khan SN, Imtiaz A, Ahmed ZM, Riazuddin S: **Mutational spectrum of MYO15A and the molecular mechanisms of DFNB3 human deafness**. *Human mutation* 2016, **37**(10):991-1003.

45. Petersen MB: **Non-syndromic autosomal-dominant deafness**. *Clinical genetics* 2002, **62**(1):1-13.

46. Verhoeven K, Van Laer L, Kirschhofer K, Legan PK, Hughes DC, Schatteman I, Verstreken M, Van Hauwe P, Coucke P, Chen A *et al*: **Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment**. *Nature genetics* 1998, **19**(1):60-62.

47. Legan PK, Goodyear RJ, Morín M, Mencia A, Pollard H, Olavarrieta L, Korchagina J, Modamio-Hoybjor S, Mayo F, Moreno F *et al*: **Three deaf mice: mouse models for TECTA-based human hereditary deafness reveal domain-specific structural phenotypes in the tectorial membrane**. *Human molecular genetics* 2014, **23**(10):2551-2568.

48. Jones GP, Elliott SJ, Russell IJ, Lukashkin AN: **Modified protein expression in the tectorial membrane of the cochlea reveals roles for the striated sheet matrix**. *Biophysical journal* 2015, **108**(1):203-210.

49. Cheatham MA, Goodyear RJ, Homma K, Legan PK, Korchagina J, Naskar S, Siegel JH, Dallos P, Zheng J, Richardson GP: **Loss of the tectorial membrane protein CEACAM16 enhances spontaneous, stimulus-frequency, and transiently evoked otoacoustic emissions**. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2014, **34**(31):10325-10338.

50. Venkatesh M, Moorchung N, Puri B: **Genetics of non syndromic hearing loss**. *medical journal armed forces india* 2015, **71**(4):363-368.

51. Mustapha M, Weil D, Chardenoux S, Elias S, El-Zir E, Beckmann JS, Loiselet J, Petit C: **An alpha-tectorin gene defect causes a newly identified autosomal recessive form of sensorineural pre-lingual non-syndromic deafness, DFNB21**. *Human molecular genetics* 1999, **8**(3):409-412.

52. Liu X-Z, Xia XJ, Xu LR, Pandya A, Liang CY, Blanton SH, Brown SD, Steel KP, Nance WE: **Mutations in connexin31 underlie recessive as well as dominant non-syndromic hearing loss**. *Human molecular genetics* 2000, **9**(1):63-67.

53. Booth KT, Kahrizi K, Najmabadi H, Azaiez H, Smith RJ: **Old gene, new phenotype: splice-altering variants in CEACAM16 cause recessive non-syndromic hearing impairment**. *J Med Genet* 2018, **55**(8):555-560.

54. **hearing loss homepager** [http://hereditaryhearingloss.org]

55. Pollak A, Lechowicz U, Kędra A, Stawiński P, Rydzanicz M, Furmanek M, Brzozowska M, Mrówka M, Skarżyński H, Skarżyński PH: **Novel and de novo mutations extend association of POU3F4 with distinct clinical and radiological phenotype of hearing loss**. *PloS one* 2016, **11**(12):e0166618.

56. Hoefsloot L, Feenstra I, Kunst H, Kremer H: **Genotype phenotype correlations for hearing impairment: approaches to management**. *Clinical genetics* 2014, **85**(6):514-523.

57. Schraders M, Haas SA, Weegerink NJ, Oostrik J, Hu H, Hoefsloot LH, Kannan S, Huygen PL, Pennings RJ, Admiraal RJ: **Next-generation sequencing identifies mutations of SMPX, which encodes the small muscle protein, X-linked, as a cause of progressive hearing impairment**. *The American Journal of Human Genetics* 2011, **88**(5):628-634.

58. Niu Z, Feng Y, Mei L, Sun J, Wang X, Wang J, Hu Z, Dong Y, Chen H, He C: **A novel frameshift mutation of SMPX causes a rare form of X-linked nonsyndromic hearing loss in a Chinese family**. *PloS one* 2017, **12**(5):e0178384.

59. Abdelfatah N, Merner N, Houston J, Benteau T, Griffin A, Doucette L, Stockley T, Lauzon JL, Young TL: **A Novel Deletion in SMPX Causes a Rare form of X- Linked Progressive Hearing Loss in Two Families Due to a Founder Effect**. *Human mutation* 2013, **34**(1):66-69.

60. Estivill X, Govea N, Barceló A, Perelló E, Badenas C, Romero E, Moral L, Scozzari R, D'Urbano L, Zeviani M: **Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides**. *The American Journal of Human Genetics* 1998, **62**(1):27-35.

61. Tang X, Li R, Zheng J, Cai Q, Zhang T, Gong S, Zheng W, He X, Zhu Y, Xue L: **Maternally inherited hearing loss is associated with the novel mitochondrial tRNASer (UCN) 7505T> C mutation in a Han Chinese family**. *Molecular genetics and metabolism* 2010, **100**(1):57-64.

62. Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee N-C, Slone J, Gui B, Wang X, Li Z, Dell S, Brown J: **Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018, **115**(51):13039-13044.

63. Wei G, Zhihong L, Huiping C, Caihong Z, Zhaohong C, Leishi L: **Spectrum of clinical features and type IV collagen α-chain distribution in Chinese patients with Alport syndrome**. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2006, **21**(11):3146-3154.

64. Kashtan CE: **Alport syndrome**. *Textbook of Clinical Pediatrics* 2012:2757-2761.

65. Mencarelli MA, Heidet L, Storey H, Van Geel M, Knebelmann B, Fallerini C, Miglietti N, Antonucci MF, Cetta F, Sayer JA: **Evidence of digenic inheritance in Alport syndrome**. *J Med Genet* 2015, **52**(3):163-174.

66. Smith RJ: **Branchiootorenal Spectrum Disorder**. In: *GeneReviews®[Internet]*. University of Washington, Seattle; 2018.

67. Chang EH, Menezes M, Meyer NC, Cucci RA, Vervoort VS, Schwartz CE, Smith RJ: **Branchio- oto- renal syndrome: The mutation spectrum in EYA1 and its phenotypic consequences**. *Human mutation* 2004, **23**(6):582-589.

68. Lalani S, Hefner M, Belmont J, Davenport S: **CHARGE Syndrome. 2006 Oct 2 [Updated 2012 Feb 2]**. *Pagon RA, Adam MP, Bird TD et al* 2014:1993-2014.

69. Lalani S, Safiullah A, Molinari L, Fernbach S, Martin D, Belmont J: **SEMA3E mutation in a patient with CHARGE syndrome**. *J Med Genet* 2004, **41**(7):e94-e94.

70. Tranebjaerg L, Samson RA, Green GE: **Jervell and Lange-Nielsen Syndrome**. In: *GeneReviews((R)).* Edited by Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A. Seattle (WA); 1993.

71. Sims KB: **NDP-related retinopathies**. In: *GeneReviews®[Internet]*. University of Washington, Seattle; 2014.

72. Smith RJ: **Pendred Syndrome/Nonsyndromic Enlarged Vestibular Aqueduct**. In: *GeneReviews®[Internet]*. University of Washington, Seattle; 2017.

73. Koffler T, Ushakov K, Avraham KB: **Genetics of hearing loss: syndromic**. *Otolaryngologic Clinics of North America* 2015, **48**(6):1041-1061.

74. Newman WG, Friedman TB, Conway GS, Demain LA: **Perrault syndrome**. In: *GeneReviews®[Internet]*. University of Washington, Seattle; 2018.

75. Robin NH, Moran RT, Ala-Kokko L: **Stickler Syndrome**. In: *GeneReviews((R)).* Edited by Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A. Seattle (WA); 1993.

76. Printzlau A, Andersen M: **Pierre Robin sequence in Denmark: a retrospective population-based epidemiological study**. *The Cleft palate-craniofacial journal* 2004, **41**(1):47-52.

77. Acke FR, Dhooge IJ, Malfait F, De Leenheer EM: **Hearing impairment in Stickler syndrome: a systematic review**. *Orphanet journal of rare diseases* 2012, **7**:84.

78. Katsanis SH, Jabs E: **Treacher collins syndrome**. *GeneReviews Seattle WA: University of Washington* 1993.

79. Zou J, Chen Q, Almishaal A, Mathur PD, Zheng T, Tian C, Zheng QY, Yang J: **The roles of USH1 proteins and PDZ domain-containing USH proteins in USH2 complex integrity in cochlear hair cells**. *Human molecular genetics* 2016, **26**(3):624-636.

80. Lentz J, Keats BJ: **Usher syndrome type I**. 2016.

81. Liquori A, Vaché C, Baux D, Blanchet C, Hamel C, Malcolm S, Koenig M, Claustres M, Roux AF: **Whole USH2A gene sequencing identifies several new deep intronic mutations**. *Human mutation* 2016, **37**(2):184-193.

82. Lentz J, Keats B: **Usher syndrome type II**. In: *GeneReviews®[Internet]*. University of Washington, Seattle; 2016.

83. Millán JM, Aller E, Jaijo T, Blanco-Kelly F, Gimenez-Pardo A, Ayuso C: **An update on the genetics of usher syndrome**. *Journal of ophthalmology* 2010, **2011**.

84. Milunsky JM: **Waardenburg syndrome type I**. In: *GeneReviews®[Internet]*. University of Washington, Seattle; 2017.

85. Elkan-Miller T, Avraham KB: **Deafness gene discovery in the genomic era**. In.: Nova Scientific Publishers, Inc; 2013.

86. **An introduction to Next-Generation Sequencing Technology** [https://www.illumina.com/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf]

87. **Ilumina Sequencing Technology** [https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf]

88. **2-Channel SBS Technology** [https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology/2-channel-sbs.html]

89. **TruSight Enrichment DNA Sample Preparation guide** [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/trusight/trusight_enrichment_sample_prep_guide_15040457_b.pdf]

90. **Rapid Capture Enrichment Reference Guide** [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nexterarapidcapture/nextera-rapid-capture-enrichment-guide-15037436-01.pdf]

91. **TruSeq Exome Library PrepReference Guide** [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseqexome/truseq-exome-library-prep-reference-guide-15059911-01.pdf]

92. **MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide** [http://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miseq/miseq-denature-dilute-libraries-guide-15039740-10.pdf]

93. **NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide** [http://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/nextseq/nextseq-denature-dilute-libraries-guide-15048776-10.pdf]

94. Ng PC, Henikoff S: **Predicting deleterious amino acid substitutions**. *Genome research* 2001, **11**(5):863-874.

95. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR: **A method and server for predicting damaging missense mutations**. *Nature methods* 2010, **7**(4):248-249.

96. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D: **MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age**. *Nature methods* 2014, **11**(4):361-362.

97. Yeo G, Burge CB: **Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals**. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 2004, **11**(2-3):377-394.

98. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D: **Improved splice site detection in Genie**. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 1997, **4**(3):311-323.

99. Pertea M, Lin X, Salzberg SL: **GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction**. *Nucleic acids research* 2001, **29**(5):1185-1190.

100. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C: **Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals**. *Nucleic acids research* 2009, **37**(9):e67.

101. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB: **Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans**. *Nature* 2016, **536**(7616):285.

102. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips A, Cooper DN: **The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine**. *Human genetics* 2014, **133**(1):1-9.

103. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Hoover J *et al*: **ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants**. *Nucleic acids research* 2016, **44**(D1):D862-D868.

104. Azaiez H, Booth KT, Ephraim SS, Crone B, Black-Ziegelbein EA, Marini RJ, Shearer AE, Sloan-Heggen CM, Kolbe D, Casavant T: **Genomic Landscape and Mutational Signatures of Deafness-Associated Genes**. *The American Journal of Human Genetics* 2018, **103**(4):484-497.

105. **OMIM** [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/]

106. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M *et al*: **The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data**. *Genome research* 2010, **20**(9):1297-1303.

107. Li H, Durbin R: **Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform**. *Bioinformatics* 2010, **26**(5):589-595.

108. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M *et al*: **A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data**. *Nature genetics* 2011, **43**(5):491-.

109. Scott EM, Halees A, Itan Y, Spencer EG, He Y, Azab MA, Gabriel SB, Belkadi A, Boisson B, Abel L *et al*: **Characterization of Greater Middle Eastern genetic variation for enhanced disease gene discovery**. *Nature genetics* 2016, **48**(9):1071-1076.

110. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J: **A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants**. *Nature genetics* 2014, **46**(3):310.

111. Shearer AE, Eppsteiner RW, Booth KT, Ephraim SS, Gurrola J, 2nd, Simpson A, Black-Ziegelbein EA, Joshi S, Ravi H, Giuffre AC *et al*: **Utilizing ethnic-specific differences in minor allele frequency to recategorize reported pathogenic deafness variants**. *American journal of human genetics* 2014, **95**(4):445-453.

112. Fromer M, Purcell SM: **Using XHMM Software to Detect Copy Number Variation in Whole-Exome Sequencing Data**. *Current protocols in human genetics* 2014, **81**:7 23 21-21.

113. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG: **Primer3--new capabilities and interfaces**. *Nucleic acids research* 2012, **40**(15):e115.

114. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Billis K, Cummins C, Gall A, Giron CG *et al*: **Ensembl 2018**. *Nucleic acids research* 2018, **46**(D1):D754-D761.

115. **Biocalculator** [http://www.metabion.com/support-and-solution/biocalculator/]

116. Kent WJ: **BLAT—the BLAST-like alignment tool**. *Genome research* 2002, **12**(4):656-664.

117. **SNPcheck** [www.snpcheck.net/]

118. 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 research* 2002, **30**(12):e57-e57.

119. **MLPA®General Protocol** [http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?Tag=_G1U3PYAOzf2SFuaxkiqa4YjruAIwx3T3q8uAJJ_V-Ws.]

120. **PowerPlex® S5 System** [https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-s5-system-protocol.pdf?la=en]

121. Harris A, Collins J, Vetrie D, Cole C, Bobrow M: **X inactivation as a mechanism of selection against lethal alleles: further investigation of incontinentia pigmenti and X linked lymphoproliferative disease**. *J Med Genet* 1992, **29**(9):608-614.

122. Kelley LA, Sternberg MJE: **Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server**. *Nat Protoc* 2009, **4**(3):363-371.

123. **NCBI-Gene** [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/]

124. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE: **UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis**. *J Comput Chem* 2004, **25**(13):1605-1612.

125. Hofrichter MA, Mojarad M, Doll J, Grimm C, Eslahi A, Hosseini NS, Rajati M, Müller T, Dittrich M, Maroofian R: **The conserved p. Arg108 residue in S1PR2 (DFNB68) is fundamental for proper hearing: evidence from a consanguineous Iranian family**. *BMC medical genetics* 2018, **19**(1):81.

126. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K: **Features and development of Coot**. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 2010, **66**(Pt 4):486-501.

127. Santos-Cortez RL, Faridi R, Rehman AU, Lee K, Ansar M, Wang X, Morell RJ, Isaacson R, Belyantseva IA, Dai H *et al*: **Autosomal-Recessive Hearing Impairment Due to Rare Missense Variants within S1PR2**. *American journal of human genetics* 2016, **98**(2):331-338.

128. Sommen M, Schrauwen I, Vandeweyer G, Boeckx N, Corneveaux JJ, van den Ende J, Boudewyns A, De Leenheer E, Janssens S, Claes K: **DNA diagnostics of hereditary hearing loss: a targeted resequencing approach combined with a mutation classification system**. *Human mutation* 2016, **37**(8):812-819.

129. Liu X-Z, Walsh J, Tamagawa Y, Kitamura K, Nishizawa M, Steel KP, Brown SD: **Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene**. *Nature genetics* 1997, **17**(3):268.

130. Weil D, Küssel P, Blanchard S, Lévy G, Levi-Acobas F, Drira M, Ayadi H, Petit C: **The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene**. *Nature genetics* 1997, **16**(2):191.

131. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E: **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**. *Genetics in medicine* 2015, **17**(5):405.

132. Kurima K, Peters LM, Yang Y, Riazuddin S, Ahmed ZM, Naz S, Arnaud D, Drury S, Mo J, Makishima T: **Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function**. *Nature genetics* 2002, **30**(3):277.

133. Pan B, Géléoc GS, Asai Y, Horwitz GC, Kurima K, Ishikawa K, Kawashima Y, Griffith AJ, Holt JR: **TMC1 and TMC2 are components of the mechanotransduction channel in hair cells of the mammalian inner ear**. *Neuron* 2013, **79**(3):504-515.

134. Rickard S, Boxer M, Trompeter R, Bitner-Glindzicz M: **Importance of clinical evaluation and molecular testing in the branchio-oto-renal (BOR) syndrome and overlapping phenotypes**. *J Med Genet* 2000, **37**(8):623-627.

135. Moortgat S, Berland S, Aukrust I, Maystadt I, Baker L, Benoit V, Caro-Llopis A, Cooper NS, Debray F-G, Faivre L: **HUWE1 variants cause dominant X-linked intellectual disability: a clinical study of 21 patients**. *European Journal of Human Genetics* 2018, **26**(1):64.

136. Lacombe D: **Goldenhar-Syndrom**. In.

137. Pierce SB, Gersak K, Michaelson-Cohen R, Walsh T, Lee MK, Malach D, Klevit RE, King M-C, Levy-Lahad E: **Mutations in LARS2, encoding mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, lead to premature ovarian failure and hearing loss in Perrault syndrome**. *The American Journal of Human Genetics* 2013, **92**(4):614-620.

138. Coyle B, Reardon W, Herbrick J-A, Tsui L-C, Gausden E, Lee J, Coffey R, Grueters A, Grossman A, Phelps PD: **Molecular analysis of the PDS gene in Pendred syndrome (sensorineural hearing loss and goitre)**. *Human molecular genetics* 1998, **7**(7):1105-1112.

139. Masmoudi S, Charfedine I, Hmani M, Grati Mh, Ghorbel AM, Elgaied- Boulila A, Drira M, Hardelin JP, Ayadi H: **Pendred syndrome: phenotypic variability in two families carrying the same PDS missense mutation**. *American journal of medical genetics* 2000, **90**(1):38-44.

140. Choi BY, Stewart AK, Madeo AC, Pryor SP, Lenhard S, Kittles R, Eisenman D, Jeffrey Kim H, Niparko J, Thomsen J: **Hypo- functional SLC26A4 variants associated with nonsyndromic hearing loss and enlargement of the vestibular aqueduct: genotype-phenotype correlation or coincidental polymorphisms?** *Human mutation* 2009, **30**(4):599-608.

141. Fugazzola L, Mannavola D, Cerutti N, Maghnie M, Pagella F, Bianchi P, Weber G, Persani L, Beck-Peccoz P: **Molecular analysis of the Pendred's syndrome gene and magnetic resonance imaging studies of the inner ear are essential for the diagnosis of true Pendred's syndrome**. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000, **85**(7):2469-2475.

142. Oonk AMM, van Huet RA, Leijendeckers JM, Oostrik J, Venselaar H, van Wijk E, Beynon A, Kunst HP, Hoyng CB, Kremer H: **Nonsyndromic hearing loss caused by USH1G mutations: widening the USH1G disease spectrum**. *Ear and hearing* 2015, **36**(2):205-211.

143. Van Wijk E, Pennings RJ, te Brinke H, Claassen A, Yntema HG, Hoefsloot LH, Cremers FP, Cremers CW, Kremer H: **Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type 2A (USH2A) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II**. *The American Journal of Human Genetics* 2004, **74**(4):738-744.

144. Schrauwen I, Helfmann S, Inagaki A, Predoehl F, Tabatabaiefar MA, Picher MM, Sommen M, Seco CZ, Oostrik J, Kremer H: **A mutation in CABP2, expressed in cochlear hair cells, causes autosomal-recessive hearing impairment**. *The American Journal of Human Genetics* 2012, **91**(4):636-645.

145. Sloan-Heggen CM, Bierer AO, Shearer AE, Kolbe DL, Nishimura CJ, Frees KL, Ephraim SS, Shibata SB, Booth KT, Campbell CA *et al*: **Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss**. *Human genetics* 2016, **135**(4):441-450.

146. Alkowari MK, Vozzi D, Bhagat S, Krishnamoorthy N, Morgan A, Hayder Y, Logendra B, Najjar N, Gandin I, Gasparini P: **Targeted sequencing identifies novel variants involved in autosomal recessive hereditary hearing loss in Qatari families**. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2017, **800**:29-36.

147. Roux A-F, Faugere V, Le Guedard S, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Chambert S, Marlin S, Hamel C, Gilbert B, Malcolm S: **Survey of the frequency of USH1 gene mutations in a cohort of Usher patients shows the importance of cadherin 23 and protocadherin 15 genes and establishes a detection rate of above 90%**. *J Med Genet* 2006, **43**(9):763-768.

148. Hofrichter MA, Nanda I, Gräf J, Schröder J, Shehata-Dieler W, Vona B, Haaf T: **A novel de novo mutation in CEACAM16 associated with postlingual hearing impairment**. *Molecular syndromology* 2015, **6**(4):156-163.

149. Choi BY, Kim DH, Chung T, Chang M, Kim EH, Kim AR, Seok J, Chang SO, Bok J, Kim D: **Destabilization and Mislocalization of POU 3 F 4 by C- Terminal Frameshift Truncation and Extension Mutation**. *Human mutation* 2013, **34**(2):309-316.

150. Lyon MF: **Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.)**. *Nature* 1961, **190**(4773):372.

151. Lee H, Jung J, Shin J, Song M, Kim S, Lee JH, Lee KA, Shin S, Kim UK, Bok J: **Correlation between genotype and phenotype in patients with bi- allelic SLC26A4 mutations**. *Clinical genetics* 2014, **86**(3):270-275.

152. Komara M, John A, Suleiman J, Ali BR, Al- Gazali L: **Clinical and molecular delineation of dysequilibrium syndrome type 2 and profound sensorineural hearing loss in an inbred Arab family**. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2016, **170**(2):540-543.

153. Shearer AE, Kolbe DL, Azaiez H, Sloan CM, Frees KL, Weaver AE, Clark ET, Nishimura CJ, Black-Ziegelbein EA, Smith RJ: **Copy number variants are a common cause of non-syndromic hearing loss**. *Genome medicine* 2014, **6**(5):37.

154. Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish SD, Lupski JR: **The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans**. *Nature genetics* 2009, **41**(7):849-853.

155. Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mullowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA: **Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis**. *Cell* 2005, **120**(3):421-433.

156. Shen J, Scheffer DI, Kwan KY, Corey DP: **SHIELD: an integrative gene expression database for inner ear research**. *Database* 2015, **2015**.

157. Kammerer R, Rüttiger L, Riesenberg R, Schäuble C, Krupar R, Kamp A, Sunami K, Eisenried A, Hennenberg M, Grunert F *et al*: **Loss of mammal-specific tectorial membrane component carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 16 (CEACAM16) leads to hearing impairment at low and high frequencies**. *The Journal of biological chemistry* 2012, **287**(26):21584-21598.

158. Peischl S, Dupanloup I, Bosshard L, Excoffier L: **Genetic surfing in human populations: from genes to genomes**. *Current opinion in genetics & development* 2016, **41**:53-61.

159. Seco CZ, Wesdorp M, Feenstra I, Pfundt R, Hehir-Kwa JY, Lelieveld SH, Castelein S, Gilissen C, De Wijs IJ, Admiraal RJ: **The diagnostic yield of whole-exome sequencing targeting a gene panel for hearing impairment in The Netherlands**. *European Journal of Human Genetics* 2017, **25**(3):308.

160. Sloan-Heggen CM, Babanejad M, Beheshtian M, Simpson AC, Booth KT, Ardalani F, Frees KL, Mohseni M, Mozafari R, Mehrjoo Z *et al*: **Characterising the spectrum of autosomal recessive hereditary hearing loss in Iran**. *J Med Genet* 2015, **52**(12):823-829.

161. Mahdieh N, Rabbani B, Wiley S, Akbari MT, Zeinali S: **Genetic causes of nonsyndromic hearing loss in Iran in comparison with other populations**. *Journal of human genetics* 2010, **55**(10):639-648.

162. Najmabadi H, Motazacker MM, Garshasbi M, Kahrizi K, Tzschach A, Chen W, Behjati F, Hadavi V, Nieh SE, Abedini SS: **Homozygosity mapping in consanguineous families reveals extreme heterogeneity of non-syndromic autosomal recessive mental retardation and identifies 8 novel gene loci**. *Human genetics* 2007, **121**(1):43-48.

163. Ajallouyan M, Radfar S, Nouhi S, Tavallaie SA, Amirsalari S, Yousefi J, Hasanali Fard M: **Consanguinity Among Parents of Iranian Deaf Children**. *Iranian Red Crescent medical journal* 2016, **18**(11):e22038.

164. Jung J, Lee JS, Cho KJ, Yu S, Yoon J-H, Gee HY, Choi JY: **Genetic predisposition to sporadic congenital hearing loss in a pediatric population**. *Sci Rep-Uk* 2017, **7**:45973.

165. Hildebrand MS, Morín M, Meyer NC, Mayo F, Modamio- Hoybjor S, Mencía A, Olavarrieta L, Morales- Angulo C, Nishimura CJ, Workman H: **DFNA8/12 caused by TECTA mutations is the most identified subtype of nonsyndromic autosomal dominant hearing loss**. *Human mutation* 2011, **32**(7):825-834.

166. Behlouli A, Bonnet C, Abdi S, Hasbellaoui M, Boudjenah F, Hardelin J-P, Louha M, Makrelouf M, Ammar-Khodja F, Zenati A: **A novel biallelic splice site mutation of TECTA causes moderate to severe hearing impairment in an Algerian family**. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 2016, **87**:28-33.

167. Zheng J, Miller KK, Yang T, Hildebrand MS, Shearer AE, DeLuca AP, Scheetz TE, Drummond J, Scherer SE, Legan PK *et al*: **Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with alpha-tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4)**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(10):4218-4223.

168. Amr SS, Al Turki SH, Lebo M, Sarmady M, Rehm HL, Tayoun ANA: **Using large sequencing data sets to refine intragenic disease regions and prioritize clinical variant interpretation**. *Genetics in Medicine* 2017, **19**(5):496.

169. Schultz JM, Yang Y, Caride AJ, Filoteo AG, Penheiter AR, Lagziel A, Morell RJ, Mohiddin SA, Fananapazir L, Madeo AC: **Modification of human hearing loss by plasma-membrane calcium pump PMCA2**. *New England Journal of Medicine* 2005, **352**(15):1557-1564.

170. Seco CZ, de Castro LS, Van Nierop JW, Morín M, Jhangiani S, Verver EJ, Schraders M, Maiwald N, Wesdorp M, Venselaar H: **Allelic mutations of KITLG, encoding KIT ligand, cause asymmetric and unilateral hearing loss and Waardenburg syndrome type 2**. *The American Journal of Human Genetics* 2015, **97**(5):647-660.

171. Vona B, Müller T, Nanda I, Neuner C, Hofrichter MA, Schröder J, Bartsch O, Läßig A, Keilmann A, Schraven S: **Targeted next-generation sequencing of deafness genes in hearing-impaired individuals uncovers informative mutations**. *Genetics in medicine* 2014, **16**(12):945.

172. Yan D, Liu X-Z: **Modifiers of hearing impairment in humans and mice**. *Current genomics* 2010, **11**(4):269-278.

173. Riga M, Korres G, Chouridis P, Naxakis S, Danielides V: **Congenital cytomegalovirus infection inducing non-congenital sensorineural hearing loss during childhood; a systematic review**. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 2018.

174. Dias AMM, Lezirovitz K, Nicastro FS, Mendes BC, Mingroni-Netto RC: **Further evidence for loss-of-function mutations in the CEACAM16 gene causing nonsyndromic autosomal recessive hearing loss in humans**. *Journal of human genetics* 2019, **64**(3):257.

175. Bademci G, Cengiz F, Foster Ii J, Duman D, Sennaroglu L, Diaz-Horta O, Atik T, Kirazli T, Olgun L, Alper H: **Variations in multiple syndromic deafness genes mimic non-syndromic hearing loss**. *Sci Rep-Uk* 2016, **6**:31622.

176. N Sahni J, Angi M, Irigoyen C, Semeraro F, R Romano M, Parmeggiani F: **Therapeutic challenges to retinitis pigmentosa: from neuroprotection to gene therapy**. *Current genomics* 2011, **12**(4):276-284.

177. Rehman AU, Santos-Cortez RLP, Drummond MC, Shahzad M, Lee K, Morell RJ, Ansar M, Jan A, Wang X, Aziz A: **Challenges and solutions for gene identification in the presence of familial locus heterogeneity**. *European Journal of Human Genetics* 2015, **23**(9):1207.

178. Patel K, Giese AP, Grossheim J, Hegde RS, Delio M, Samanich J, Riazuddin S, Frolenkov GI, Cai J, Ahmed ZM: **A novel C-terminal CIB2 (calcium and integrin binding protein 2) mutation associated with non-syndromic hearing loss in a hispanic family**. *PloS one* 2015, **10**(10):e0133082.

179. Jacoszek A, Pollak A, Płoski R, Ołdak M: **Advances in genetic hearing loss: CIB2 gene**. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 2017, **274**(4):1791-1795.

180. Reyes S, Wang G, Ouyang X, Han B, Du LL, Yuan HJ, Yan D, Dai P, Liu X-Z: **Mutation analysis of SLC26A4 in mainland Chinese patients with enlarged vestibular aqueduct**. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery* 2009, **141**(4):502-508.

181. Dietz H: **Marfan syndrome**. In: *GeneReviews®[Internet]*. University of Washington, Seattle; 2017.

182. Sheppard S, Biswas S, Li MH, Jayaraman V, Slack I, Romasko EJ, Sasson A, Brunton J, Rajagopalan R, Sarmady M: **Utility and limitations of exome sequencing as a genetic diagnostic tool for children with hearing loss**. *Genetics in Medicine* 2018, **20**(12):1663.

183. Chen AH, Ni L, Fukushima K, Marietta J, O'Neill M, Coucke P, Willems P, Smith RJ: **Linkage of a gene for dominant non-syndromic deafness to chromosome 19**. *Human molecular genetics* 1995, **4**(6):1073-1076.

184. Kammerer R, Zimmermann W: **Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families**. *BMC biology* 2010, **8**:12.

185. Wang H, Wang X, He C, Li H, Qing J, Grati M, Hu Z, Li J, Hu Y, Xia K *et al*: **Exome sequencing identifies a novel CEACAM16 mutation associated with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss DFNA4B in a Chinese family**. *Journal of human genetics* 2015, **60**(3):119-126.

186. Samocha KE, Robinson EB, Sanders SJ, Stevens C, Sabo A, McGrath LM, Kosmicki JA, Rehnstrom K, Mallick S, Kirby A *et al*: **A framework for the interpretation of de novo mutation in human disease**. *Nature genetics* 2014, **46**(9):944-950.

187. Abe S, Katagiri T, Saito-Hisaminato A, Usami S, Inoue Y, Tsunoda T, Nakamura Y: **Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues**. *American journal of human genetics* 2003, **72**(1):73-82.

188. Veltman JA, Brunner HG: **De novo mutations in human genetic disease**. *Nature reviews Genetics* 2012, **13**(8):565-575.

189. Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A *et al*: **Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk**. *Nature* 2012, **488**(7412):471-475.

190. Campbell CD, Eichler EE: **Properties and rates of germline mutations in humans**. *Trends in genetics : TIG* 2013, **29**(10):575-584.

191. Reva B, Antipin Y, Sander C: **Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics**. *Nucleic acids research* 2011, **39**(17):e118.

192. An S, Zheng Y, Bleu T: **Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5**. *Journal of Biological Chemistry* 2000, **275**(1):288-296.

193. Ingham NJ, Carlisle F, Pearson S, Lewis MA, Buniello A, Chen J, Isaacson RL, Pass J, White JK, Dawson SJ *et al*: **S1PR2 variants associated with auditory function in humans and endocochlear potential decline in mouse**. *Scientific reports* 2016, **6**:28964.

194. MacLennan AJ, Benner SJ, Andringa A, Chaves AH, Rosing JL, Vesey R, Karpman AM, Cronier SA, Lee N, Erway LC *et al*: **The S1P(2) sphingosine 1-phosphate receptor is essential for auditory and vestibular function**. *Hearing research* 2006, **220**(1-2):38-48.

195. Kono M, Belyantseva IA, Skoura A, Frolenkov GI, Starost MF, Dreier JL, Lidington D, Bolz SS, Friedman TB, Hla T *et al*: **Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice**. *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(14):10690-10696.

196. Herr DR, Grillet N, Schwander M, Rivera R, Muller U, Chun J: **Sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling is required for maintenance of hair cells mainly via activation of S1P2**. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007, **27**(6):1474-1478.

197. Hu ZY, Zhang QY, Qin W, Tong JW, Zhao Q, Han Y, Meng J, Zhang JP: **Gene miles-apart is required for formation of otic vesicle and hair cells in zebrafish**. *Cell death & disease* 2013, **4**:e900.

198. Gandy KAO, Canals D, Adada M, Wada M, Roddy P, Snider AJ, Hannun YA, Obeid LM: **Sphingosine 1-phosphate induces filopodia formation through S1PR2 activation of ERM proteins**. *Biochem J* 2013, **449**:661-672.

199. Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A: **Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins**. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2010, **11**(4):276-287.

200. Higashi K, Matsuzaki E, Hashimoto Y, Takahashi-Yanaga F, Takano A, Anan H, Hirata M, Nishimura F: **Sphingosine-1-phosphate/S1PR2-mediated signaling triggers Smad1/5/8 phosphorylation and thereby induces Runx2 expression in osteoblasts**. *Bone* 2016, **93**:1-11.

201. Hamamy H: **Consanguineous marriages: Preconception consultation in primary health care settings**. *Journal of Community Genetics* 2012, **3**(3):185-192.

202. Beheshtian M, Babanejad M, Azaiez H, Bazazzadegan N, Kolbe D, Sloan-Heggen C, Arzhangi S, Booth K, Mohseni M, Frees K *et al*: **Heterogeneity of Hereditary Hearing Loss in Iran: a Comprehensive Review**. *Archives of Iranian medicine* 2016, **19**(10):720-728.

203. Corvino V, Apisa P, Malesci R, Laria C, Auletta G, Franzé A: **X-linked sensorineural hearing loss: a literature review**. *Current genomics* 2018, **19**(5):327-338.

204. de Kok YJ, Vossenaar ER, Cremers CW, Dahl N, Laporte J, Jia Hu L, Lacombe D, Fischel-Ghodsian N, Friedman RA, Parnes LS: **Identification of a hot spot for microdeletions in patients with X-linked deafness type 3 (DFN3) 900 kb proximal to the DFN3 gene POU3F4**. *Human molecular genetics* 1996, **5**(9):1229-1235.

205. Ervasti JM: **Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle**. *Journal of Biological Chemistry* 2003, **278**(16):13591-13594.

206. Huebner AK, Gandia M, Frommolt P, Maak A, Wicklein EM, Thiele H, Altmüller J, Wagner F, Viñuela A, Aguirre LA: **Nonsense mutations in SMPX, encoding a protein responsive to physical force, result in X-chromosomal hearing loss**. *The American Journal of Human Genetics* 2011, **88**(5):621-627.

207. Liang Y, Wang A, Belyantseva IA, Anderson DW, Probst FJ, Barber TD, Miller W, Touchman JW, Jin L, Sullivan SL: **Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2**. *Genomics* 1999, **61**(3):243-258.

208. Fang Q, Indzhykulian AA, Mustapha M, Riordan GP, Dolan DF, Friedman TB, Belyantseva IA, Frolenkov GI, Camper SA, Bird JE: **The 133-kDa N-terminal domain enables myosin 15 to maintain mechanotransducing stereocilia and is essential for hearing**. *Elife* 2015, **4**:e08627.

209. Campbell C, Cucci RA, Prasad S, Green GE, Edeal JB, Galer CE, Karniski LP, Sheffield VC, Smith RJ: **Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype–phenotype correlations**. *Human mutation* 2001, **17**(5):403-411.

210. Borck G, Roth C, Martiné U, Wildhardt G, Pohlenz J: **Mutations in the PDS gene in German families with Pendred's syndrome: V138F is a founder mutation**. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003, **88**(6):2916-2921.

211. Legan PK, Rau A, Keen JN, Richardson GP: **The mouse tectorins modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system**. *Journal of Biological Chemistry* 1997, **272**(13):8791-8801.

212. Li X, Yu X, Chen X, Liu Z, Wang G, Li C, Wong EY, Sham MH, Tang J, He J: **Localization of TMC1 and LHFPL5 in auditory hair cells in neonatal and adult mice**. *The FASEB Journal* 2019:fj. 201802155RR.

213. Al-Amri AH, Al Saegh A, Al-Mamari W, El-Asrag ME, Al-Kindi MN, Al Khabouri M, Al Wardy N, Al Lamki K, Gabr A, Idris A: **LHFPL5 mutation: A rare cause of non-syndromic autosomal recessive hearing loss**. *European journal of medical genetics* 2018.

214. Lerat J, Bonnet C, Cartault F, Loundon N, Jacquemont ML, Darcel F, Rouillon I, Mezouaghi K, Guichet A, Litzler J: **High prevalence of congenital deafness on Reunion Island is due to a founder variant of LHFPL5**. *Clinical genetics* 2019, **95**(1):177-181.

215. Liaqat K, Chiu I, Lee K, Chakchouk I, Andrade-Elizondo PB, Santos-Cortez RLP, Hussain S, Nawaz S, Ansar M, Khan MN: **Novel missense and 3′-UTR splice site variants in LHFPL5 cause autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment**. *Journal of human genetics* 2018:1.

216. Shang H, Yan D, Tayebi N, Saeidi K, Sahebalzamani A, Feng Y, Blanton S, Liu X: **Targeted Next-Generation Sequencing of a Deafness Gene Panel (MiamiOtoGenes) Analysis in Families Unsuitable for Linkage Analysis**. *BioMed research international* 2018, **2018**.

217. Wang R, Han S, Khan A, Zhang X: **Molecular analysis of twelve Pakistani families with nonsyndromic or syndromic hearing loss**. *Genetic testing and molecular biomarkers* 2017, **21**(5):316-321.

218. Ammar- Khodja F, Bonnet C, Dahmani M, Ouhab S, Lefèvre GM, Ibrahim H, Hardelin JP, Weil D, Louha M, Petit C: **Diversity of the causal genes in hearing impaired Algerian individuals identified by whole exome sequencing**. *Molecular genetics & genomic medicine* 2015, **3**(3):189-196.

219. Bensaïd M, Hmani-Aifa M, Hammami B, Tlili A, Hakim B, Charfeddine I, Ayadi H, Ghorbel A, del Castillo I, Masmoudi S: **DFNB66 and DFNB67 loci are non allelic and rarely contribute to autosomal recessive nonsyndromic hearing loss**. *European journal of medical genetics* 2011, **54**(6):e565-e569.

220. Kalay E, Li Y, Uzumcu A, Uyguner O, Collin RW, Caylan R, Ulubil- Emiroglu M, Kersten FF, Hafiz G, van Wijk E: **Mutations in the lipoma HMGIC fusion partner- like 5 (LHFPL5) gene cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss**. *Human mutation* 2006, **27**(7):633-639.

221. Shabbir MI: **Prevalence of different deafness loci in pakistani inbred families**. University of Punjab, Lahore; 2008.

222. Shahin H, Walsh T, Rayyan AA, Lee MK, Higgins J, Dickel D, Lewis K, Thompson J, Baker C, Nord AS: **Five novel loci for inherited hearing loss mapped by SNP-based homozygosity profiles in Palestinian families**. *European Journal of Human Genetics* 2010, **18**(4):407.

223. Gu W, Zhang F, Lupski JR: **Mechanisms for human genomic rearrangements**. *PathoGenetics* 2008, **1**(1):4.

224. Czarny-Ratajczak M, Lohiniva J, Rogala P, Kozlowski K, Perälä M, Carter L, Spector TD, Kolodziej L, Seppänen U, Glazar R: **A mutation in COL9A1 causes multiple epiphyseal dysplasia: further evidence for locus heterogeneity**. *The American Journal of Human Genetics* 2001, **69**(5):969-980.

225. Posey JE, Harel T, Liu P, Rosenfeld JA, James RA, Coban Akdemir ZH, Walkiewicz M, Bi W, Xiao R, Ding Y *et al*: **Resolution of Disease Phenotypes Resulting from Multilocus Genomic Variation**. *The New England journal of medicine* 2017, **376**(1):21-31.

226. Nikopoulos K, Schrauwen I, Simon M, Collin RW, Veckeneer M, Keymolen K, Van Camp G, Cremers FP, van den Born LI: **Autosomal recessive Stickler syndrome in two families is caused by mutations in the COL9A1 gene**. *Investigative ophthalmology & visual science* 2011, **52**(7):4774-4779.

227. Van Camp G, Snoeckx RL, Hilgert N, van den Ende J, Fukuoka H, Wagatsuma M, Suzuki H, Smets RM, Vanhoenacker F, Declau F *et al*: **A new autosomal recessive form of Stickler syndrome is caused by a mutation in the COL9A1 gene**. *American journal of human genetics* 2006, **79**(3):449-457.

228. Miyagawa M, Naito T, Nishio SY, Kamatani N, Usami S: **Targeted exon sequencing successfully discovers rare causative genes and clarifies the molecular epidemiology of Japanese deafness patients**. *PloS one* 2013, **8**(8):e71381.

229. Fassler R, Schnegelsberg PN, Dausman J, Shinya T, Muragaki Y, McCarthy MT, Olsen BR, Jaenisch R: **Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(11):5070-5074.

230. Hagg R, Hedbom E, Mollers U, Aszodi A, Fassler R, Bruckner P: **Absence of the alpha1(IX) chain leads to a functional knock-out of the entire collagen IX protein in mice**. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(33):20650-20654.

231. Asamura K, Abe S, Imamura Y, Aszodi A, Suzuki N, Hashimoto S, Takumi Y, Hayashi T, Fassler R, Nakamura Y *et al*: **Type IX collagen is crucial for normal hearing**. *Neuroscience* 2005, **132**(2):493-500.

232. Suzuki N, Asamura K, Kikuchi Y, Takumi Y, Abe S, Imamura Y, Hayashi T, Aszodi A, Fassler R, Usami S: **Type IX collagen knock-out mouse shows progressive hearing loss**. *Neuroscience research* 2005, **51**(3):293-298.

233. Nakata K, Ono K, Miyazaki J, Olsen BR, Muragaki Y, Adachi E, Yamamura K, Kimura T: **Osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing alpha 1(IX) collagen chains with a central deletion**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(7):2870-2874.

234. Bondurand N, Fouquet V, Baral V, Lecerf L, Loundon N, Goossens M, Duriez B, Labrune P, Pingault V: **Alu-mediated deletion of SOX10 regulatory elements in Waardenburg syndrome type 4**. *European journal of human genetics : EJHG* 2012, **20**(9):990-994.

235. Poultney CS, Goldberg AP, Drapeau E, Kou Y, Harony-Nicolas H, Kajiwara Y, De Rubeis S, Durand S, Stevens C, Rehnstrom K *et al*: **Identification of small exonic CNV from whole-exome sequence data and application to autism spectrum disorder**. *American journal of human genetics* 2013, **93**(4):607-619.

236. Gonzaga-Jauregui C, Lupski JR, Gibbs RA: **Human genome sequencing in health and disease**. *Annual review of medicine* 2012, **63**:35-61.

237. Baenziger NL, Brodie G, Majerus PW: **A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1971, **68**(1):240-243.

238. O'Rourke KM, Laherty CD, Dixit VM: **Thrombospondin 1 and thrombospondin 2 are expressed as both homo-and heterotrimers**. *Journal of Biological Chemistry* 1992, **267**(35):24921-24924.

239. Ansar M, Ramzan M, Pham TL, Yan K, Jamal SM, Haque S, Ahmad W, Leal SM: **Localization of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus (DFNB38) to 6q26-q27 in a consanguineous kindred from Pakistan**. *Human heredity* 2003, **55**(1):71-74.

240. **UniGene** [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/]

241. Halleck MS, LAWLER JR JF, Blackshaw S, Gao L, Nagarajan P, Hacker C, Pyle S, Newman JT, Nakanishi Y, Ando H: **Differential expression of putative transbilayer amphipath transporters**. *Physiological genomics* 1999, **1**(3):139-150.

242. Bönsch D, Schmidt C, Scheer P, Bohlender J, Neumann C, Am AZ-D, Deufel T: **A new gene locus for an autosomal-dominant non-syndromic hearing impairment (DFNA 33) is situated on chromosome 13q34-qter**. *HNO* 2009, **57**(4):371-376.

243. Eisenberger T, Di Donato N, Decker C, Delle Vedove A, Neuhaus C, Nürnberg G, Toliat M, Nürnberg P, Mürbe D, Bolz HJ: **A C-terminal nonsense mutation links PTPRQ with autosomal-dominant hearing loss, DFNA73**. *Genetics in Medicine* 2018, **20**(6):614.

244. Schraders M, Oostrik J, Huygen PL, Strom TM, van Wijk E, Kunst HP, Hoefsloot LH, Cremers CW, Admiraal RJ, Kremer H: **Mutations in PTPRQ are a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment DFNB84 and associated with vestibular dysfunction**. *The American Journal of Human Genetics* 2010, **86**(4):604-610.

245. Ghaffari R, Aranyosi AJ, Richardson GP, Freeman DM: **Tectorial membrane travelling waves underlie abnormal hearing in Tectb mutant mice**. *Nature communications* 2010, **1**:96.

246. Li J, Gao K, Yan H, Xiangwei W, Liu N, Wang T, Xu H, Lin Z, Xie H, Wang J: **Reanalysis of whole exome sequencing data in patients with epilepsy and intellectual disability/mental retardation**. *Gene* 2019.

247. Eisenberger T, Di Donato N, Baig SM, Neuhaus C, Beyer A, Decker E, Mürbe D, Decker C, Bergmann C, Bolz HJ: **Targeted and Genomewide NGS Data Disqualify Mutations in MYO 1 A, the "DFNA 48 Gene", as a Cause of Deafness**. *Human mutation* 2014, **35**(5):565-570.

248. Donaudy F, Ferrara A, Esposito L, Hertzano R, Ben-David O, Bell RE, Melchionda S, Zelante L, Avraham KB, Gasparini P: **Multiple Mutations ofMYO1A, a Cochlear-Expressed Gene, in Sensorineural Hearing Loss**. *The American Journal of Human Genetics* 2003, **72**(6):1571-1577.

249. **A Study of the Gene Therapy CGF166 in Patients with Severe-to-Profound Hearing Loss** [http://www.entcolumbia.org/research/clinical-trials/find-clinical-trial/study-gene-therapy-cgf166-patients-severe-profound-hearing-loss]

250. Zhang W, Kim SM, Wang W, Cai C, Feng Y, Kong W, Lin X: **Cochlear gene therapy for sensorineural hearing loss: current status and major remaining hurdles for translational success**. *Frontiers in molecular neuroscience* 2018, **11**.

251. **Cochlea-Implantate** [https://www.ukw.de/hno-klinik/schwerpunkte/hoerzentrum-chc/cochlea-implantate-ci/]

252. **Implantierbare Hörsysteme** [https://www.ukw.de/hno-klinik/schwerpunkte/hoerzentrum-chc/implantierbare-hoersysteme/]

253. Dowell RC: **The case for earlier cochlear implantation in postlingually deaf adults**. *International journal of audiology* 2016, **55**(sup2):S51-S56.

254. Delmaghani S, Defourny J, Aghaie A, Beurg M, Dulon D, Thelen N, Perfettini I, Zelles T, Aller M, Meyer A: **Hypervulnerability to sound exposure through impaired adaptive proliferation of peroxisomes**. *Cell* 2015, **163**(4):894-906.

255. Delmaghani S, del Castillo FJ, Michel V, Leibovici M, Aghaie A, Ron U, Van Laer L, Ben-Tal N, Van Camp G, Weil D: **Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy**. *Nature genetics* 2006, **38**(7):770.

256. Wu C-C, Lin Y-H, Liu T-C, Lin K-N, Yang W-S, Hsu C-J, Chen P-L, Wu C-M: **Identifying children with poor cochlear implantation outcomes using massively parallel sequencing**. *Medicine* 2015, **94**(27).

257. Greess H, Baum U, Römer W, Tomandl B, Bautz W: **CT und MRT des Felsenbeins**. *HNO* 2002, **50**(10):906-919.

258. Booth KT, Askew JW, Talebizadeh Z, Huygen PL, Eudy J, Kenyon J, Hoover D, Hildebrand MS, Smith KR, Bahlo M: **Splice-altering variant in COL11A1 as a cause of nonsyndromic hearing loss DFNA37**. *Genetics in Medicine* 2019, **21**(4):948.

259. Rodriguez-Paris J, Waldhaus J, Gordhandas JA, Pique L, Schrijver I: **Comparative functional characterization of novel non-syndromic GJB2 gene variant p. Gly45Arg and lethal syndromic variant p. Gly45Glu**. *PeerJ* 2016, **4**:e2494.

260. Fischer J, Palmedo G, von Knobloch R, Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F, Kovacs G: **Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours**. *Oncogene* 1998, **17**(6):733.

261. Mujtaba G, Schultz JM, Imtiaz A, Morell RJ, Friedman TB, Naz S: **A mutation of MET, encoding hepatocyte growth factor receptor, is associated with human DFNB97 hearing loss**. *J Med Genet* 2015, **52**(8):548-552.

262. Bahassi EM, Stambrook PJ: **Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics**. *Mutagenesis* 2014, **29**(5):303-310.

263. Vaché C, Besnard T, le Berre P, García- García G, Baux D, Larrieu L, Abadie C, Blanchet C, Bolz HJ, Millan J: **Usher syndrome type 2 caused by activation of an USH2A pseudoexon: implications for diagnosis and therapy**. *Human mutation* 2012, **33**(1):104-108.

264. Barashkov NA, Dzhemileva LU, Fedorova SA, Teryutin FM, Posukh OL, Fedotova EE, Lobov SL, Khusnutdinova EK: **Autosomal recessive deafness 1A (DFNB1A) in Yakut population isolate in Eastern Siberia: extensive accumulation of the splice site mutation IVS1+ 1G> A in GJB2 gene as a result of founder effect**. *Journal of human genetics* 2011, **56**(9):631.

265. Yousaf R, Ahmed ZM, Giese AP, Morell RJ, Lagziel A, Dabdoub A, Wilcox ER, Riazuddin S, Friedman TB, Riazuddin S: **Modifier variant of METTL13 suppresses human GAB1–associated profound deafness**. *The Journal of clinical investigation* 2018, **128**(4):1509-1522.

266. Varshney GK, Pei W, Burgess SM: **Using zebrafish to study human deafness and hearing regeneration**. In: *Genetics of Deafness.* vol. 20: Karger Publishers; 2016: 110-131.

267. Varshney GK, Pei W, LaFave MC, Idol J, Xu L, Gallardo V, Carrington B, Bishop K, Jones M, Li M: **High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9**. *Genome research* 2015, **25**(7):1030-1042.

268. Jero J, Tseng CJ, Mhatre AN, Lalwani AK: **A surgical approach appropriate for targeted cochlear gene therapy in the mouse**. *Hearing research* 2001, **151**(1-2):106-114.

269. Rosenthal N, Brown S: **The mouse ascending: perspectives for human-disease models**. *Nature cell biology* 2007, **9**(9):993.

270. Friedman LM, Dror AA, Avraham KB: **Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss**. *International Journal of Developmental Biology* 2007, **51**(6-7):609-631.

271. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L: **The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome**. *Nature* 2013, **496**(7446):498.

272. Hosoya M, Fujioka M, Ogawa K, Okano H: **Distinct expression patterns of causative genes responsible for hereditary progressive hearing loss in non-human primate cochlea**. *Sci Rep-Uk* 2016, **6**:22250.

273. Gao X, Tao Y, Lamas V, Huang M, Yeh W-H, Pan B, Hu Y-J, Hu JH, Thompson DB, Shu Y: **Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents**. *Nature* 2018, **553**(7687):217.

274. Sander JD, Joung JK: **CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting**. *Nature biotechnology* 2014, **32**(4):347.

275. Akil O, Dyka F, Calvet C, Emptoz A, Lahlou G, Nouaille S, de Monvel JB, Hardelin J-P, Hauswirth WW, Avan P: **Dual AAV-mediated gene therapy restores hearing in a DFNB9 mouse model**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019, **116**(10):4496-4501.

276. Emptoz A, Michel V, Lelli A, Akil O, de Monvel JB, Lahlou G, Meyer A, Dupont T, Nouaille S, Ey E: **Local gene therapy durably restores vestibular function in a mouse model of Usher syndrome type 1G**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017, **114**(36):9695-9700.

# 7 DANKSAGUNG

# 8 PUBLIKATIONSLISTE UND KONGRESSBEITRÄGE

## 8.1 PUBLIKATIONEN DIE DIREKT AUS DIESER ARBEIT HERVORGEGANGEN SIND:

A Novel De novo Mutation in CEACAM16 Associated with Postlingual Hearing Impairment.

**Hofrichter MA**, Nanda I, Gräf J, Schröder J, Shehata-Dieler W, Vona B, Haaf T.

Mol Syndromol. 2015 Oct;6(4):156-63. doi: 10.1159/000439576. Epub 2015 Sep 3

The conserved p.Arg108 residue in S1PR2 (DFNB68) is fundamental for proper hearing: evidence from a consanguineous Iranian family.

**Hofrichter MAH**, Mojarad M, Doll J, Grimm C, Eslahi A, Hosseini NS, Rajati M, Müller T, Dittrich M, Maroofian R, Haaf T, Vona B.

BMC Med Genet. 2018 May 18;19(1):81. doi: 10.1186/s12881-018-0598-5.

An intragenic multi-exon in-frame deletion of *COL9A1* is associated with non-syndromic hearing loss.
**Hofrichter MAH**, Doll J, Habibi H, Enayati, Mehrjardi MYahyaVahidi, Müller T, Dittrich D, Haaf T, Vona B. EJMG_2018_830, in submission

## 8.2 PUBLIKATIONEN, DIE IM RAHMEN DER DOKTORARBEIT ENTSTANDEN SIND

Targeted next-generation sequencing of deafness genes in hearing-impaired individuals uncovers informative mutations.

Vona B, Müller T, Nanda I, Neuner C, **Hofrichter MA**, Schröder J, Bartsch O, Läßig A, Keilmann A, Schraven S, Kraus F, Shehata-Dieler W, Haaf T.

Genet Med. 2014 Dec;16(12):945-53. doi: 10.1038/gim.2014.65. Epub 2014 May 29.

Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future.

Vona B, Nanda I, **Hofrichter MA**, Shehata-Dieler W, Haaf T.

Mol Cell Probes. 2015 Oct;29(5):260-70. doi: 10.1016/j.mcp.2015.03.008. Epub 2015 Apr 3. Review. PMID:25845345

DFNB16 is a frequent cause of congenital hearing impairment: implementation of STRC mutation analysis in routine diagnostics.

Vona B, **Hofrichter MA**, Neuner C, Schröder J, Gehrig A, Hennermann JB, Kraus F, Shehata-Dieler W, Klopocki E, Nanda I, Haaf T.

Clin Genet. 2015;87(1):49-55. doi: 10.1111/cge.12332. Epub 2014 Jan 21.

PMID:26011646

Confirmation of PDZD7 as a Nonsyndromic Hearing Loss Gene.

Vona B, Lechno S, **Hofrichter MA**, Hopf S, Läig AK, Haaf T, Keilmann A, Zechner U, Bartsch O.

Ear Hear. 2016 Jul-Aug;37(4):e238-46. doi: 10.1097/AUD.0000000000000278.

PMID:26849169

Hereditary hearing loss SNP-microarray pilot study.

Vona B, **Hofrichter MAH**, Schröder J, Shehata-Dieler W, Nanda I, Haaf T.

BMC Res Notes. 2018 Jun 14;11(1):391. doi: 10.1186/s13104-018-3466-7.

PMID:29903040

Phenotypic Characterization of DFNB16-associated Hearing Loss.

Back D, Shehata-Dieler W, Vona B, **Hofrichter MAH**, Schroeder J, Haaf T, Rahne T, Hagen R, Schraven SP.

Otol Neurotol. 2019 Jan;40(1):e48-e55. doi: 10.1097/MAO.0000000000002059.

PMID: 30531641

## 8.3 KONGRESSBEITRÄGE

**3/2014** Excessive mutational fallout of *STRC* in patients with high frequency hearing loss, Michaela A. H. Hofrichter, Barbara Vona, Cordula Neuner, Jörg Schröder, Andrea Gehrig, Fabian Kraus, Wafaa Shehata-Dieler, Eva Klopocki, Indrajit Nanda and Thomas Haaf Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Essen,Deutschland

**4/2015** A novel *De novo* mutation in the gene *CEACAM16* in a German family with hearing impairment, Hofrichter MAH, Vona B, Gräf J, Schröder J, Shehata-Dieler W, Nanda I, Haaf T, Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Graz, Österreich

**9/2015** A haystack full of needles: the complicated interpretation of rare genetic variants in a German family with autosomal dominant non-syndromic hearing loss, Hofrichter MAH, Vona B, Kunstmann E, Nanda I, Haaf T, Posterpräsentation, Inner Ear biology Workshop (IEB), Rom, Italien

**3/2016** The ambiguity of syndromic and non- syndromic hearing loss, Hofrichter MAH, Vona B, Maroofian R, Nanda I, Chioza BA, Shehata-Dieler W, Kunstmann E, Schröder J, Crosby AH, Haaf T, Posterpräsentation, , Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Lübeck, Deutschland

**9/2016** The puzzle of hereditary hearing loss and the quest for the right diagnostic strategy, Hofrichter MAH, Vona B, Maroofian R, Nanda I, Chioza BA, Shehata-Dieler W, Kunstmann E, Schröder J, Crosby AH, Haaf T, Posterpräsentation, Inner Ear biology Workshop (IEB), Montpellier, Frankreich

**3/2017** Genotype-Phenotype correlation- The many facets of heterogeneous hearing loss in the context of molecular epidemiology, Hofrichter MAH, Vona B, Maroofian R, Schnapp L, Doll J, Röder T, Nanda I, Chioza BA, Wolf B , Shehata-Dieler W, Kunstmann E, Schröder J, Müller T, Zechner U, Bartsch O, Dittrich M, Haaf T; Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Bochum, Deutschland

**3/2018** Familial locus heterogeneity in non-syndromic hearing loss:
evidence from whole exome sequencing in extended Iranian families,

Hofrichter MAH, Vona B, Doll J, Bahena P, Röder T, Kolb S, Nanda I, Wolf B, Müller T, Dittrich M, Maroofian R, Haaf T, Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Münster, Deutschland

**3/2019** Key function of the conserved p.Arg108 residue in *S1PR2* (DFNB68) and its significance in sensorineural hearing loss, Hofrichter MAH, Mojarad M, Doll J, Grimm C, Eslahi A, Hosseini NS, Rajati M, Müller T, Dittrich M, Maroofian R, Haaf T, Vona B, Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Weimar, Deutschland

# 9 ANHANG

## 9.1 PRIMERLISTE

*Tab. 9: Liste aller verwendeten Primer*

| Primername | Sequenz 5' zu 3' | Richtung |
|---|---|---|
| **ACTG1 Ex 4 For** | TGCTCCTCCCGTCCTTTCC | fwd |
| **ACTG1 Ex 4 Rev** | CACGGCTTCAGCTCACAGAG | rev |
| **CABP2 Exon 5/6 F Primer** | ATCCATTCACGAAGGGAAGG | fwd |
| **CABP2 Exon 5/6 R Primer** | TTCCTTCCTCTCGGATTCTCC | rev |
| **CDH23 Ex10 F** | GAGTCTTTAATGCCCAGAGAGG | fwd |
| **CDH23 Ex10 R** | TTCATAACGTGGGTGCCTTCC | rev |
| **CDH23 Ex11 Forward** | TGGGATCATTCACATTGAGG | fwd |
| **CDH23 Ex11 Reverse** | ATAGCTGAGGACCTGAACAGC | rev |
| **CDH23 Ex23 Forward** | TTCAAAGGAAGGAAGGGAGGG | fwd |
| **CDH23 Ex23 Revers** | AAGAAGGCAAGTGGTGAGAGG | rev |
| **CDH23 Ex27Teil1qPCR F** | CAAAGGCTAGGGCAGATGG | fwd |
| **CDH23 Ex27Teil1qPCR R** | TGCCTGCAAGATGCTGTGG | rev |
| **CDH23 Ex27Teil2qPCR F** | GAAGGGCCTTTCAGAGTAG | fwd |
| **CDH23 Ex27Teil2qPCR R** | GCCCAGATTCCCTGTTTGG | rev |
| **CDH23 Ex35 For** | TGAGGGTTTGCTGATGTTCC | fwd |
| **CDH23 Ex35 Rev** | ACCACAGACTGGGTGATTGC | rev |
| **CDH23 Ex48 For** | TCAAGGCTGTCATGAGAAGG | fwd |
| **CDH23 Ex48 Rev** | AAGAGAGTAGCAAGGGAACAGC | rev |
| **CDH23 Exon54 left** | TCCTTCCTCTATCCAGGCTTACTCC | fwd |
| **CDH23 Exon54 right** | GTAGCTCTGGTTGAGACATCCTTC | rev |
| **CDH23 Exon61 Left** | TGATGATAACCGGCTGAGACC | fwd |
| **CDH23 Exon61 Right** | TAGGGACTATACTGCCTTTCACG | rev |
| **CDH23 Intron29/Ex30 For** | AGCAGGTGAAACGCATTGG | fwd |
| **CDH23 Intron29/Ex30 Rev** | CATTCAGCACCTAAATCAGTGG | rev |
| **CDH23 Intron58 Left** | ATAAGGCCTGGACAGTAAACTCC | fwd |
| **CDH23 Intron58 Right** | GGGCTGCAGATGGAAGTTCTT | rev |
| **CEACAM16 c.1094 forw** | AGATGCAGACCAAACTGACC | fwd |
| **CEACAM16 c.1094 rev** | CTCCAGTGTCTCAGTCTTGC | rev |
| **CIB2 Ex5 Forward** | TATCCCAAGAGTGTGCATGG | fwd |

| Primer | | |
|---|---|---|
| **CIB2 Ex5 Reverse Primer** | ACAGTGCCTCATTAGGGAACC | rev |
| **CIB2 Exon4 left** | TGCACCACTGTCCCTGGCTG | fwd |
| **CIB2 Exon4 right** | CAGCTTCACTGTTCTTGGTGTC | rev |
| **CLPP Exon 6 For** | GTGGGCACAAACATTCAGG | fwd |
| **CLPP Exon 6 Rev** | CTGTCTACTGCCACAAGAATGG | rev |
| **COL11A2 Exon57 c.4135 left** | CTTCCTCCCTGCCTCCTG | fwd |
| **COL11A2 Exon57 c.4135 right** | TGTGGAGAGATGGGAAGTCA | rev |
| **COL9A1 Ex5 qPCR R** | CCACTGGGAATCAAACAAGG | rev |
| **COL9A1 Ex5 qPCR R** | CCACTGGGAATCAAACAAGG | rev |
| **COL9A1 Ex6/7qPCR R** | CGATCGCAACTTACTTGAGC | rev |
| **COL9A1 Ex6/7qPCR R** | CGATCGCAACTTACTTGAGC | rev |
| **COL9A1 Ex25qPCR F** | TCCTATTTCCCACCCTACTCC | fwd |
| **COL9A1 Ex25qPCR R** | GCATGTCTCTCCCCAAAATG | rev |
| **COL9A1 Ex33qPCR F** | CCGGAGTTAATCTGTTCATGG | fwd |
| **COL9A1 Ex33qPCR F** | CCGGAGTTAATCTGTTCATGG | fwd |
| **COL9A1 Ex33qPCR R** | GATTGCACCACTGCATTCAC | rev |
| **COL9A1 Ex33qPCR R** | GATTGCACCACTGCATTCAC | rev |
| **COL9A1 Ex34qPCR F** | ACCTGTTAGGATGCAGAGTGC | fwd |
| **COL9A1 Ex34qPCR F** | ACCTGTTAGGATGCAGAGTGC | fwd |
| **COL9A1 Ex34qPCR R** | GAACTTGTTGAGAAGCTGATGC | rev |
| **COL9A1 Ex34qPCR R** | GAACTTGTTGAGAAGCTGATGC | rev |
| **COL9A1 Ex5 qPCR F** | TGGGTACAGGAAACAAGATGC | fwd |
| **COL9A1 Ex5 qPCR F** | TGGGTACAGGAAACAAGATGC | fwd |
| **COL9A1 Ex6/7qPCR F** | GGCGACTGTTGTCATTCTATCC | fwd |
| **COL9A1 Ex6/7qPCR F** | GGCGACTGTTGTCATTCTATCC | fwd |
| **COL9A1 Ex6qPCR F** | AGAGTCCTGGTCCAGTGTGC | fwd |
| **COL9A1 Ex6qPCR F** | AGAGTCCTGGTCCAGTGTGC | fwd |
| **COL9A1 Ex6qPCR R** | CAAAGCACAGGCTCTCTTAGC | rev |
| **COL9A1 Ex6qPCR R** | CAAAGCACAGGCTCTCTTAGC | rev |
| **DFNA5 Intron7 c.991-2 left** | TGTGGGGACAGATGCAGCTGC | fwd |
| **DFNA5 Intron7 c.991-2 right** | CAGAAGCATAGATAGTAGGCAAAGC | rev |
| **EYA1 Ex18T Forward Primer** | AGCATGGGAGTGGATTTCCA | fwd |
| **EYA1 Ex18T Reverse Primer** | CGTTTGCAGGTCCTTTCTTC | rev |
| **GJB2 Exon 2.1 F** | GTTGTGTAAGAGTTGGTGTTTGC | fwd |
| **GJB2 Exon 2.1 R** | TTGTGTAGGTCCACCACAGGG | rev |
| **GJB2 Exon 2.2 F** | GATCTTCGTGTCCACGCCAGC | fwd |
| **GJB2 Exon 2.2 R** | CCAAGGACGTGTGTTGGTC | rev |
| **GPR98 14_1 Forward P** | TTCATAGTTTGCCTCGTAGAACC | fwd |
| **GPR98 14_1 Reverse P** | TGTTTGAGGATGGATGTAGGC | rev |
| **GPR98 14_2 Forward Pr** | TGCTTCTTAAGACATCCTGTGG | fwd |

| | | |
|---|---|---|
| **GPR98 14_2 Reverse Pr** | ACGGTATGTTTGCATCTTGC | rev |
| **GPSM2 Exon 8 For** | AGCAGAAAGCAGCAGAGAGG | fwd |
| **GPSM2 Exon 8 Rev** | GGTCAAGGGCATATGGAACC | rev |
| **HUWE1 Ex30 For** | TGCCACATATCTGTCTCCTACC | fwd |
| **HUWE1 Ex30 Rev** | AAATTCAGTGGCTCACACTCC | rev |
| **HUWE1 Ex61 For** | CTCATCATTGGCTGGTTGC | fwd |
| **HUWE1 Ex61 Rev** | AAAGTGAATGCGCAAGACG | rev |
| **ILDR1 Exon 2 NEU Forward Primer** | TGTTGTTGGATATGTCATCACTG | fwd |
| **ILDR1 Exon 2 NEU Reverse Primer** | GGTGATCTTTGTGTCTTCTCCTC | rev |
| **ILDR1 Exon 7Teil2 For** | ACTGGTCAGACAGGGACAGC | fwd |
| **ILDR1 Exon 7Teil2 Rev** | CTCTGTGGTGGAATGAGAGG | rev |
| **KCNQ1 Ex6 For** | GAGGAGTGGGCTATATTGAAGC | fwd |
| **KCNQ1 Ex6 Rev** | CCAAAGGACTCAACACTGAGC | rev |
| **KCNQ4 Exon5 Left** | CTTTATCCCTTTCCCGTGTGG | fwd |
| **KCNQ4 Exon5 Right** | GTATAGTCACAAGGTCTTGATGTGC | rev |
| **LARS2 Exon 14 For** | CCCAGCCTGTGGCTTTATTC | fwd |
| **LARS2 Exon 14 Rev** | AGAGCACTCTCTGCCCACTC | rev |
| **LHFPL5 Ex 2 F** | CAACATAACAGCAGTGCAAGG | fwd |
| **LHFPL5 Ex 2 R** | GAGGACTGGCTAAGATGAACC | rev |
| **LHFPL5 Ex2 F** | CAACATAACAGCAGTGCAAGG | fwd |
| **LHFPL5 Ex2 R** | GAGGACTGGCTAAGATGAACC | rev |
| **LHFPL5 Exon 1 For** | GTCATCTCGGTTCAGGAAGG | fwd |
| **LHFPL5 Exon 1 Rev** | TCCCACCATCTCTGCTTACC | rev |
| **LOXHD1 Ex32 Forward Primer:** | CACTGCACTTTGTCTCTGAGC | fwd |
| **LOXHD1 Ex32 Reverse Primer:** | GGCTAGTTGGTTCTTCTCTGC | rev |
| **LOXHD1 Ex39 Forward Primer** | GGTCCCAAACTGAACTGAACC | fwd |
| **LOXHD1 Ex39 Reverse Primer:** | CATCATACCCTGCTCTCTTGC | rev |
| **LOXHD1 Ex5 Forward** | GGTAAGTGTAGATGGTGTGGTAGC | fwd |
| **LOXHD1 Ex5 Reverse** | AGTGTCCATGGTCTGAGATGC | rev |
| **LOXHD1 Exon 29 F Primer** | CACCTCCTACAAATCCAGTTCC | fwd |
| **LOXHD1 Exon 29 F Primer** | CACCTCCTACAAATCCAGTTCC | fwd |
| **LOXHD1 Exon 29 R Primer** | GGGAATAAGGCACACTTGC | rev |
| **LOXHD1 Exon 29 R Primer** | GGGAATAAGGCACACTTGC | rev |
| **LRTOMT Intron6 c.83+2 left** | GAAAGCCATTCCAGCCTCCTA | fwd |
| **LRTOMT Intron6 c.83+2 right** | TTGCAGTCAAAAACACCTTCACT | rev |
| **M13 Forward** | TGTAAAACGACGGCCAGT | for |
| **M13 Reverse** | CAGGAAACAGCTATGACC | rev |
| **Marveld2 Intron4 left** | TATTAACAAATCCTCTTTTTCTCCC | fwd |

| | | |
|---|---|---|
| **Marveld2 Intron4 right** | AGCACAGAGTATTAACTTGGAGAC | rev |
| **MITFc.1132 forward P** | GAAAGTTGCAACGAGAACAGC | fwd |
| **MITFc.1132 reverse P** | CATGTCDAAGAATGACTGTGG | rev |
| **MYH14 14 forward Pr** | CCATCCTCCATCAAATCTTCC | fwd |
| **MYH14 14 Reverse Pr** | TTCTTGCTGCCTGTACACACC | rev |
| **MYH14 Exon22 left** | AGCTTGGCTCTCTTGCTAAGG | fwd |
| **MYH14 Exon22 right** | ACATGGAGGAAGTCACTTGTC | rev |
| **MYH14 Exon4 Left** | CCAGGATTGTTACACATCAAGACC | fwd |
| **MYH14 Exon4 Right** | GGTACTGGATGACCTTCTTGGTG | rev |
| **MYO15A c.1387 Ex2 Forward Primer** | GCTTCGGCCTTTGTGTACC | fwd |
| **MYO15A c.1387 Ex2 Reverse Primer** | CCTCCTCGTCCTCTTCTTCG | rev |
| **MYO15A Ex 17 Forward** | CTCCTTCAGATTCAACATGGGAGG | fwd |
| **MYO15A Ex 17 Revers** | CAGGTTGTGAATAGTAGGTCGGG | rev |
| **MYO15A Ex 2/Teil F Primer** | CCTCAAGAAGACGCTGTCG | fwd |
| **MYO15A Ex 2/Teil R Primer** | CCCTGGGAAGGCTAGTAGG | rev |
| **MYO15A Ex 61 F Primer** | CTTTAATGAGGAAGCTGTGTCC | fwd |
| **MYO15A Ex 61 R Primer** | AGGGCTGTTTCGATTTCTCC | rev |
| **MYO15A Ex33 Forward** | CCCTCATTTCCATTCCTGTGC | fwd |
| **MYO15A Ex33 Revers** | TCCTTTGGTGAACTCTACCTCC | rev |
| **MYO15A Ex46 Fwd** | AGACACTGGTCAGATACCTTCTTGC | fwd |
| **MYO15A Ex46 Fwd** | AGACACTGGTCAGATACCTTCTTGC | fwd |
| **MYO15A Ex46 Rev** | ACCATCCTCAGGAGTTTGATGC | rev |
| **MYO15A Ex46 Rev** | ACCATCCTCAGGAGTTTGATGC | rev |
| **MYO15A Ex47FS Forward** | ATTCAGGGATGAGACAAGAGGATCC | fwd |
| **MYO15A Ex47FS Revers** | AAATGGGTTTGCTTCAATGGC | rev |
| **MYO15A Ex49 Forward** | CTTCCCTCTTCTCACCTAATGAAGG | fwd |
| **MYO15A Ex49 Reverse** | AGCCAGCACTGTAGCCTATGG | rev |
| **MYO15A Ex50 Forward** | TGACATCATACACCTGCAGCC | fwd |
| **MYO15A Ex50 Revers** | GGGAACATTCTTAACCCTTCTCTGG | rev |
| **MYO15A Ex50Neu Forward** | CTGGCCCATAGGCTACAGTG | fwd |
| **MYO15A Ex50Neu Revers** | GGAAACAGGCTCAGGGAAAG | rev |
| **MYO15A Ex60Teil Forward** | TAAACCTAAGTCTCAGACCACAAGC | fwd |
| **MYO15A Ex60Teil Reverse:** | AAACCTTTCCAGGATGTAATCTCC | rev |
| **MYO15A Ex62 Forward** | TGTTGATGCTCTGCTCTCACC | fwd |
| **MYO15A Ex62 Revers** | AGGGAACATGTGTCCTGAAAGC | rev |
| **MYO15A Exon 12 right** | AGTGTAATCTGAAAGGGAAACAG | rev |
| **MYO15A Exon 18/19 Reverse Primer** | ATGAGGCGCTAGGTTTAGGG | rev |
| **MYO15A Exon 24 For** | GCTCCTATCTGCCTCAGTGC | fwd |
| **MYO15A Exon 24 Rev** | CCACCCACCAGTCACAAGG | rev |

| | | |
|---|---|---|
| **MYO15A Exon 44 right** | GAGGCAGGCTTTGCAGCTAGCTC | rev |
| **MYO15A Exon11 left** | ACCCTCTCAAACTTCAATCATACC | fwd |
| **MYO15A Exon11 left** | ACCCTCTCAAACTTCAATCATACC | fwd |
| **MYO15A Exon11 right** | CTTCACACTCCATCACTCACA | rev |
| **MYO15A Exon11 right** | CTTCACACTCCATCACTCACA | rev |
| **MYO15A Exon12 left** | AGTGAAATGACAGCTTGAGTGACC | fwd |
| **MYO15A Exon18/19 Forward Primer** | GGGTGGGTTTGATAAAGAGTAGC | fwd |
| **MYO15A Exon44 left** | ACCAGGGGTGGGGTTACAGCCGG | fwd |
| **MYO15A Intron18 Forward** | ACCCACTGATCCCTAAATTGCC | fwd |
| **MYO15A Intron18 Revers** | TGAGCTACTCTTTATCAAACCCACC | rev |
| **MYO15A Intron57 left** | CAAATCCAGCTCTTAACCTCTAGC | fwd |
| **MYO15A Intron57 right** | ACCCTATGCTCACCAACATGG | rev |
| **MYO15A Mut 1 Forward** | GGTGAAGTCTACTGGGTTTGG | fwd |
| **MYO15A Mut 1 Reverse** | CACTGAAATGAGCCTCACACC | rev |
| **MYO15A Mut 2 Reverse** | CACTGAAATGAGCCTCACACC | rev |
| **MYO15A Mut2 Forward** | AGCCCATTTACACTCCCTAGC | fwd |
| **MYO15A TeilEx2 F** | GGCTACTGCTCACCCTTGG | fwd |
| **MYO15A TeilEx2 R** | CTGAGTCCTCGGGTTCTCG | rev |
| **MYO6c.224 forward Pr** | CGCTTTTAAATCAGCTTCTAGGG | fwd |
| **MYO6c.224 reverse pr** | TACCAGGCATGCTTTAACTCC | rev |
| **MYO7A c2886 F** | CCCGTGTCTTCTGTGTCACC | fwd |
| **MYO7A c2886R** | GAGGGAGGATCAACACAAGC | rev |
| **MYO7A Ex33 F Primer** | GCTATGCTTTCTCTGACTTTGG | fwd |
| **MYO7A Ex33 R Primer** | CCTGGCTCAAGACGTTTCC | rev |
| **MYO7A Ex43 F Primer** | AGGCACTGAATGGAATGACC | fwd |
| **MYO7A Ex43 R Primer** | TGAGTGAGGGCACAATTCC | rev |
| **MYO7A Exon28 left** | ATGATCCTGTCTCCAAAGCCA | fwd |
| **MYO7A Exon28 right** | CTACCTTGACAAACTTCTCGGA | rev |
| **MYO7A Exon29 forward** | GAAATAGATGGTGGAGCTGAGAGG | fwd |
| **MYO7A Exon29 revers** | AGAACTTGAGGGTAGGTGTCTGAGG | rev |
| **OTOA Ex18F** | GAATGTCTTTGGGATGAGCTCTTGG | fwd |
| **OTOA Ex18R** | TTTAGAGTAAGCTTCAAGACCCACC | rev |
| **OTOA Ex21 qPCR F** | CAGGACCCTGCCCaCTAAAg | fwd |
| **OTOA Ex21 qPCR R** | ATTAATTACTATGtCAgCAa | rev |
| **OTOA Exon 16 F Primer** | CCTGTTAAGCCTCCATTTCC | fwd |
| **OTOA Exon 16 R Primer** | TTAGATGCCACAGCCAATCC | rev |
| **OTOA Exon 7 For** | AGGCCTTGACTTTGTTCTGC | fwd |
| **OTOA Exon 7 Rev** | AATTAGTCGGGTGTGGTAGGC | rev |
| **OTOF Ex 27 F** | CATCCTGACCAAAGCTGGG | fwd |
| **OTOF Ex 27 R** | CTGGTGATGGTGGTGGG | rev |
| **OTOF Ex26 F** | ACAACAACTCATGGCGCTG | fwd |
| **OTOF Ex26 R** | CCAGCCTTCAGGGTCCAG | rev |
| **OTOF Ex 47 F** | GCTGCAGGGAGGATAGAGTTT | fwd |

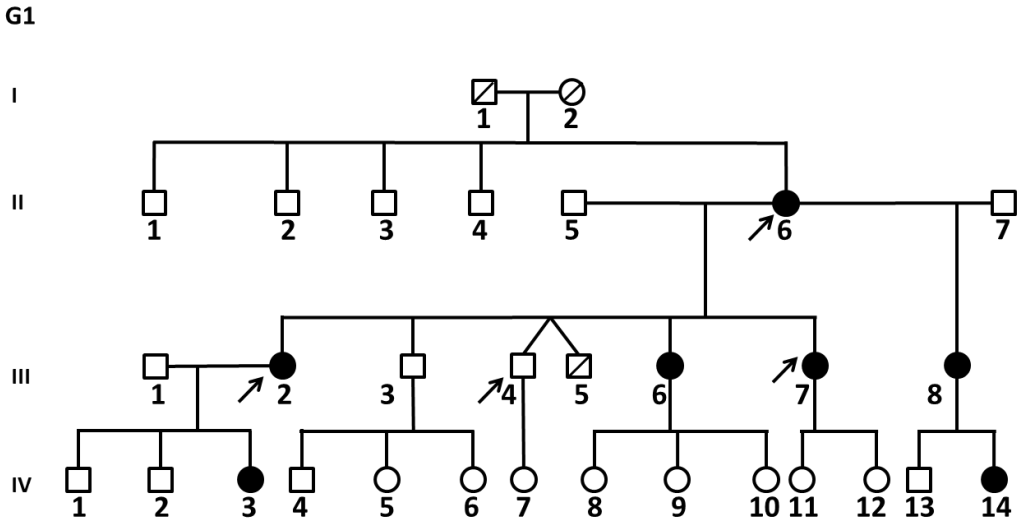
| | | |
|---|---|---|
| **OTOF Ex 47 R** | ATGATGAGCCACTTGTACCGG | rev |
| **OTOG Ex15 For** | GGATGATCCCTGATATCTTTGG | fwd |
| **OTOG Ex15 Rev** | AAGTCCACTGTCCTGTTGAGG | rev |
| **OTOG Exon35 left** | GCCCTAACATCACAGTCTCC | fwd |
| **OTOG Exon35 right** | ATTGCTGCTGGAGTGAAAGG | rev |
| **PAX3 Exon2 left** | CAGAAGACTGCGAAATTACGTGCTG | fwd |
| **PAX3 Exon2 right** | ACCTCAGAAATAACTCATTGGAGAG | rev |
| **PCDH15 3'UTRTeilA For** | CATTCCTGCGTAGCTTTCG | fwd |
| **PCDH15 3'UTRTeilA Rev** | TTCTTGTGGCTCCTCTTTCC | rev |
| **PCDH15 Exon 5 F Primer** | GCAGATACTTTGGCCTTTTGG | fwd |
| **PCDH15 Exon 5 R Primer** | AGGACACAGATGTTCCCTTCC | rev |
| **PDZD7 Ex 3Teil1Neu F** | ACTGTGCCCAGCAACCTAGC | fwd |
| **PDZD7 Ex 3Teil1Neu R** | CAGTGCCTAGGGATCTGTCC | rev |
| **PDZD7 Exon 11/12 For** | CCTACATGCGTAGAAGAAACACC | fwd |
| **PDZD7 Exon 11/12 For** | CCTACATGCGTAGAAGAAACACC | fwd |
| **PDZD7 Exon 11/12 Rev** | CTGGTTGGAGAGATGAACAGG | rev |
| **PDZD7 Exon 11/12 Rev** | CTGGTTGGAGAGATGAACAGG | rev |
| **PDZD7 Exon 3Teil1 For** | GCCTTAGAAATGGGCTGACC | fwd |
| **PDZD7 Exon 3Teil1 Rev** | TCCTAAGCGTGGACTTCAGC | rev |
| **PEX6 Ex13 For** | CCAGGCTACTCATGATCATTCC | fwd |
| **PEX6 Ex13 Rev** | ACCCTGCCCAATTTCATGG | rev |
| **PEX6 Ex8 For** | TAGATGCTCATCTCCCTACCC | fwd |
| **PEX6 Ex8 Rev** | CCCAAAGTGCTAGGATTACAGG | rev |
| **POU3F4 Exon1 right** | TTGGGACACTTGAGGAAATG | rev |
| **POU3F4 Exon1 right** | TTGGGACACTTGAGGAAATG | rev |
| **POU3F4 -F** | CCTACAGCATTCTCAGTTCC | fwd |
| **POU3F4 -F** | CCTACAGCATTCTCAGTTCC | fwd |
| **RAI1 TeilEx3 For** | AAGGTGTCAAGAACCTCGTGTCC | fwd |
| **RAI1 TeilEx3 Rev** | ACGGAAGGGTCTTCAAACAGC | rev |
| **S1PR2 Exon 2TeilA For** | AATTGAATCTCAGCCCATCC | fwd |
| **S1PR2 Exon 2TeilA Rev** | TAATGCTTGGCGTAGAGAGG | rev |
| **SLC17A8 Ex3 Forward** | CCCAAGTATGTAAGATGCCCTCC | fwd |
| **SLC17A8 Ex3 Revers** | GAGCCAGCTATGCAGAATTTATAGG | rev |
| **SLC26A4 Ex 10 F** | ATTAAATTGGACCACCACGC | fwd |
| **SLC26A4 Ex 10 R** | TCTGTTGCCATTCCTCGAC | rev |
| **SLC26A4 Ex 11_12 F** | TCCAGTGAGCTGGAAGACAC | fwd |
| **SLC26A4 Ex 11_12 R** | GTGAGACTTAGGGGATGGGG | rev |
| **SLC26A4 Ex 4 F** | TGCATCATCATAAAGGCAAAG | fwd |
| **SLC26A4 Ex 4 R** | AATGCACTTAATATAGCCAAAACAC | rev |
| **SLC26A4 Ex 5 F** | TGCAGACACATTGAACATTTG | fwd |
| **SLC26A4 Ex 5 R** | TTCCAGGAAATTACTTTGTTTTG | rev |
| **SLC26A4 Ex 8 F** | TTTGAGTGTTGTTTGATGCTG | fwd |

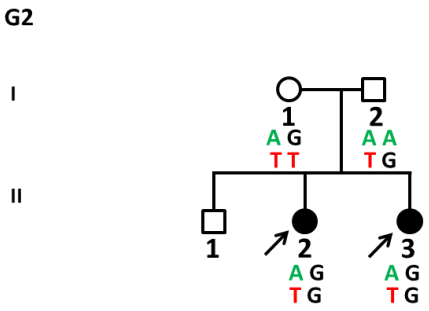
| | | |
|---|---|---|
| **SLC26A4 Ex 8 R** | GAAGGAGTATCAGTGAAATGAAGC | rev |
| **SLC26A4 Ex17 F** | TGCTTACCAAGGAACAGTGTG | fwd |
| **SLC26A4 Ex17 R** | GCCCTGTTGCAATACTGGAC | rev |
| **SLC26A4 Ex19 F** | AGTGAGCAATGATGCCACTG | fwd |
| **SLC26A4 Ex19 R** | GGCTCCATGAAGTTATATAGG | rev |
| **SLC26A5 Splice forwa** | CCTCAGAAGAACTTGGAACACC | fwd |
| **SLC26A5 Splice rever** | ACGTGAATGCCTGTTTCAGC | rev |
| **SMPX Exon 3 Reverse Primer** | CTTGACACACAGCCATTTGC | rev |
| **SMPX Exon3 Forward Primer** | AAATTCTGCCATCCAACAGG | fwd |
| **TECTA c.4437 forward** | GCCAAGCCTGATAAAAGACG | fwd |
| **TECTA c.4437 reverse** | TAAGCTGGAAGGAGATGTCG | rev |
| **TECTA Exon9 Left** | GGTCCAGAACACACAAATAAACAGCA | fwd |
| **TECTA Exon9 Right** | AGGACACATCAGACTAGGGTAGGTA | rev |
| **TECTA Splice Forward** | AGCCACAAGAAGTTCCAGCT | fwd |
| **TECTA Splice Forward** | AGCCACAAGAAGTTCCAGCT | fwd |
| **TECTA Splice Reverse** | TCACTGAATCTCGGCTGCA | rev |
| **TECTA Splice Reverse** | TCACTGAATCTCGGCTGCA | rev |
| **TECTB Ex8 Forward** | GGATGAACAGTGTGTCTTCTGG | fwd |
| **TECTB Ex8 Reverse** | GTTTGGCTTGAGCTGTTCC | rev |
| **TMC1 Ex17 Forward** | GGATGAGATTAACAACAAGGTAAGC | fwd |
| **TMC1 Ex17 Revers** | TATTTACCTCAAGGGATAGATTTGC | rev |
| **TMC1 Ex7 Forward Primer** | ATCACGATGTGGAGAATTGC | fwd |
| **TMC1 Ex7 Reverse Primer** | TGAAAGGAGTGATCTTCTTCAGC | rev |
| **TMIE Ex3 Forward** | GACACATGTGGGTGGATGG | fwd |
| **TMIE Ex3 Reverse** | CAGAGGAACAGGGTGACTCC | rev |
| **TMIE Exon 3 For** | ATGAAGTCAGCCCTGCTTAGG | fwd |
| **TMIE Exon 3 Rev** | CTATTTGCCTCATGCCAACC | rev |
| **TMPRSS3 Intron4 fwd** | TCTGAAAGAGCTGTTGGTTAATTC | fwd |
| **TMPRSS3 Intron4 rev** | AAATGCTCTTTAACTTACCTTGGGA | rev |
| **TRIOBP Ex7 c.2173_2174 For** | ACCACCCAACAAGACAGC | fwd |
| **TRIOBP Ex7 c.2173_2174 Rev** | TGTCTCGTTGAAAGGAAAAGG | rev |
| **TRIOBP Ex7/2 homz Forward** | AGCCTCCTCTCCCATCAGA | fwd |
| **TRIOBP Ex7/2 homz Reverse** | GAGGATGTCTGAGGCCTGTC | rev |
| **TRIOBP Ex7/3 homz F Primer** | ATCTCGCTCCAAGCAAAGC | fwd |
| **TRIOBP Ex7/3 homz R Primer** | GAATAAGAGGGAAGGCTCTGG | rev |
| **TULP2 1-2 ExqPCR F** | TTCCAAAGAGAGGATCAGG | fwd |
| **TULP2 1-2 ExqPCR R** | ATCAGAACTCAGGACTGTGC | rev |
| **USH1C c.2377 forward** | TTCTCTCTAGTTCACCCCAGAGC | fwd |
| **USH1C c.2377 reverse** | TGGTCACCTGTTTGCTTTCC | rev |

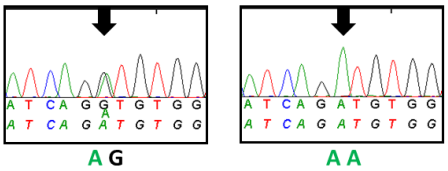
| | | |
|---|---|---|
| **USH1G homz F** | GGAGTGGGAGAGATCTCAGG | fwd |
| **USH1G homz R** | GAAGGCCTTGTCCTTCAGC | rev |
| **USH2A Ex 61 F** | TTATGGATGAAGGAGACACC | fwd |
| **USH2A Ex 61 F** | TTATGGATGAAGGAGACACC | fwd |
| **USH2A Ex 61 R** | GGCTGTTAAATGTAGGATCG | rev |
| **USH2A Ex 61 R** | GGCTGTTAAATGTAGGATCG | rev |
| **USH2A Ex18 F** | AAGTAACCCCTTTGTCTGATGAGTT | fwd |
| **USH2A Ex18 R** | TGAGGAAACATTTGCATTCAGAGGT | rev |
| **USH2A Ex40 F** | CACAAGATTACAGACTCAGCCAATG | fwd |
| **USH2A Ex40 R** | AATAAGGGAGGCTCATTTCTTTGC | rev |
| **USH2A Ex61 F** | TTTACTATGACACCAGGAAGAAACAGC | fwd |
| **USH2A Ex61 F** | TTTACTATGACACCAGGAAGAAACAGC | fwd |
| **USH2A Ex61 F** | TTTACTATGACACCAGGAAGAAACAGC | fwd |
| **USH2A Ex61 R** | TCGTGGTCTACAAACTGGTCTCC | rev |
| **USH2A Ex61 R** | TCGTGGTCTACAAACTGGTCTCC | rev |
| **USH2A Ex61 R** | TCGTGGTCTACAAACTGGTCTCC | rev |
| **USH2A Ex66 F** | CATGGTACTCCATTTGTAGGAGGTG | fwd |
| **USH2A Ex66 R** | CGCAGGTAACATTACCACTCAAATC | rev |
| **WFS1 Ex8 Forward** | GCTACAAGTTTGAGATTACCGTGG | fwd |
| **WFS1 Ex8 Revers** | CTTGGTATTCAGAGTGGACAGAGC | rev |

## 9.2 Stammbäume mit Segregationsanalyse

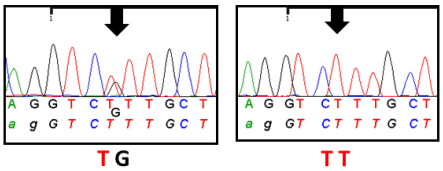
Nachfolgend sind alle Stammbäume mit Segregationsanalyse aufgeführt.



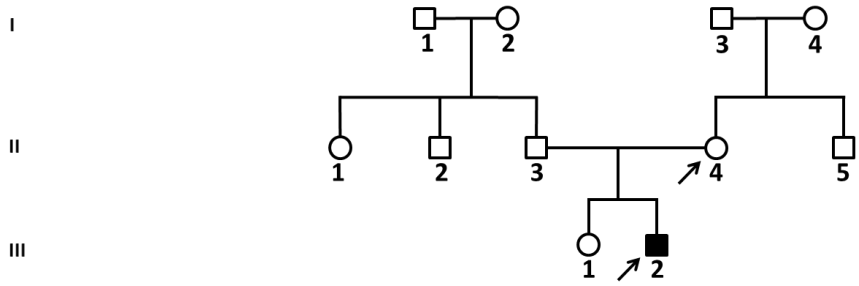




*ADGRV1* c.6518A>G, p.Asp2173Gly

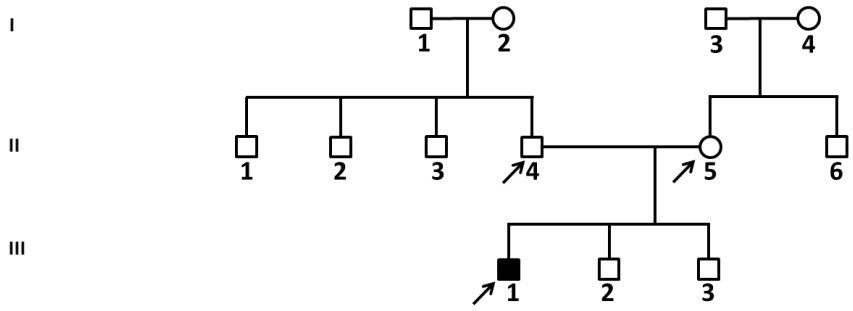



*ADGRV1* c.17759T>G, p.Leu5920Arg

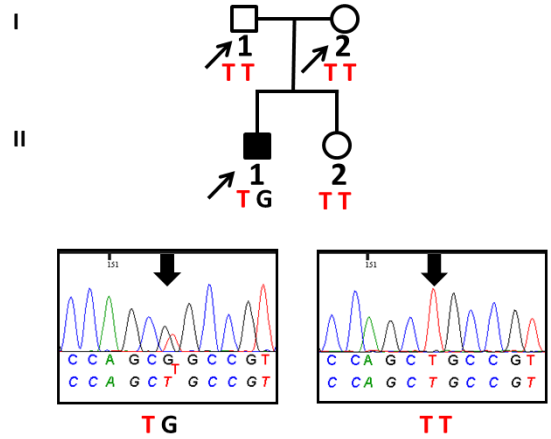
**G3**



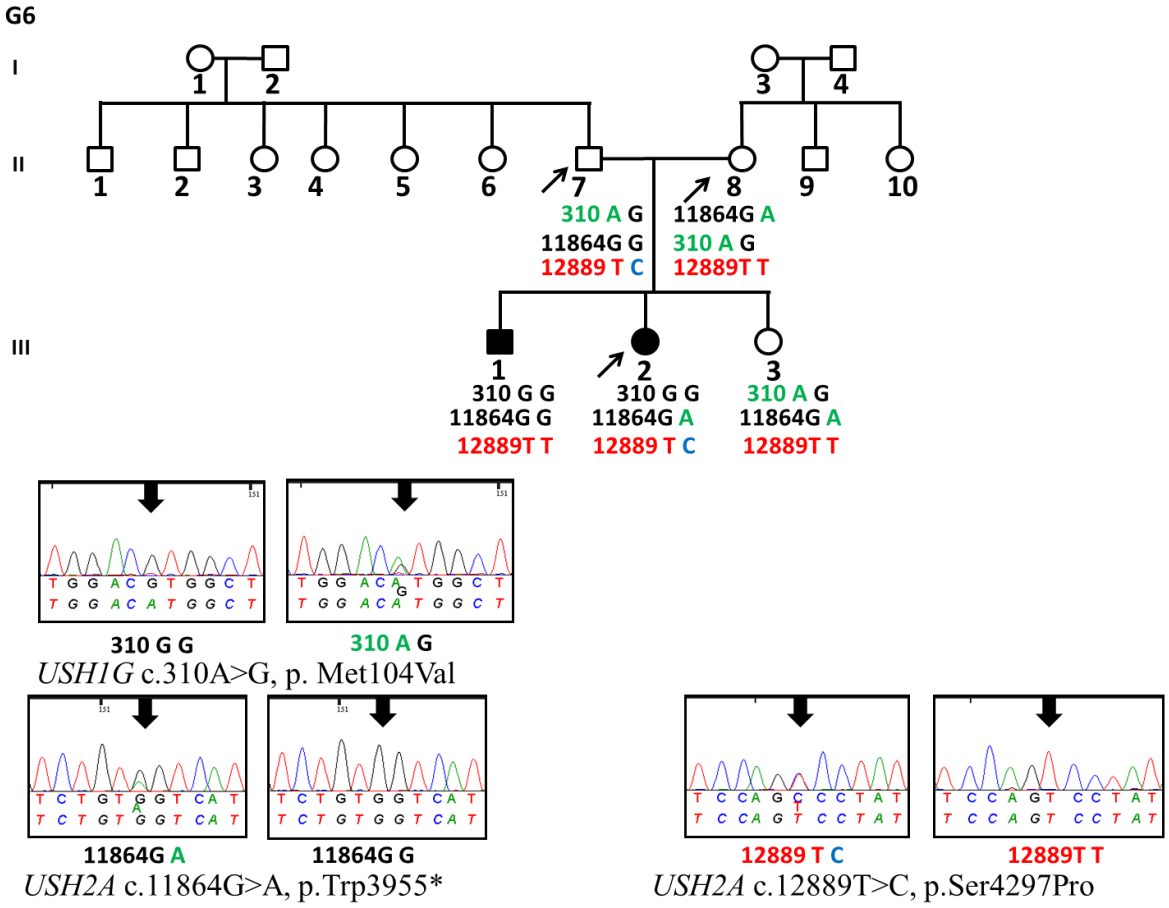

**G4**



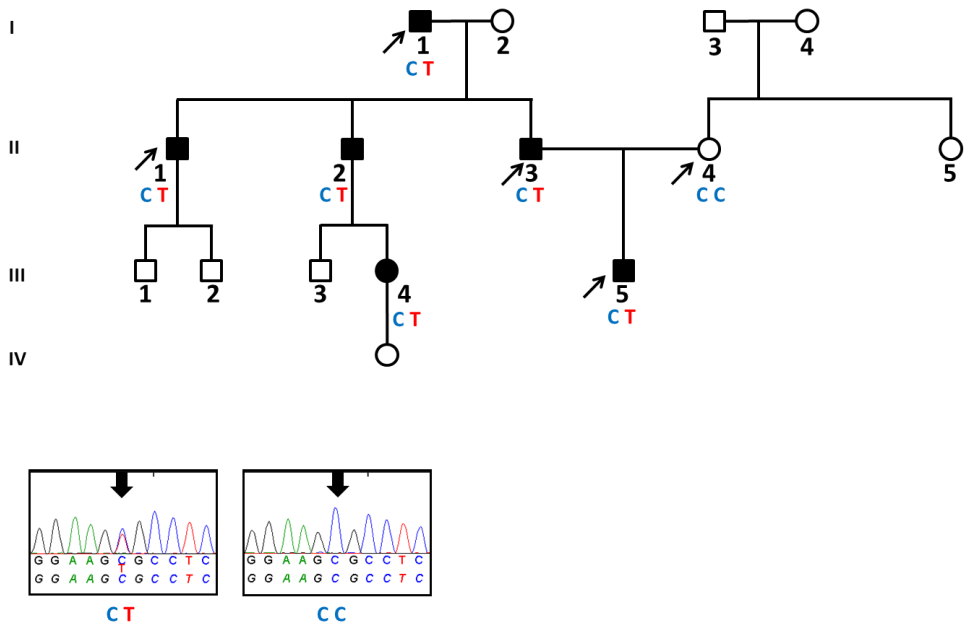

**G5**




*CEACAM16* c.1094T>G, p.Leu365Arg

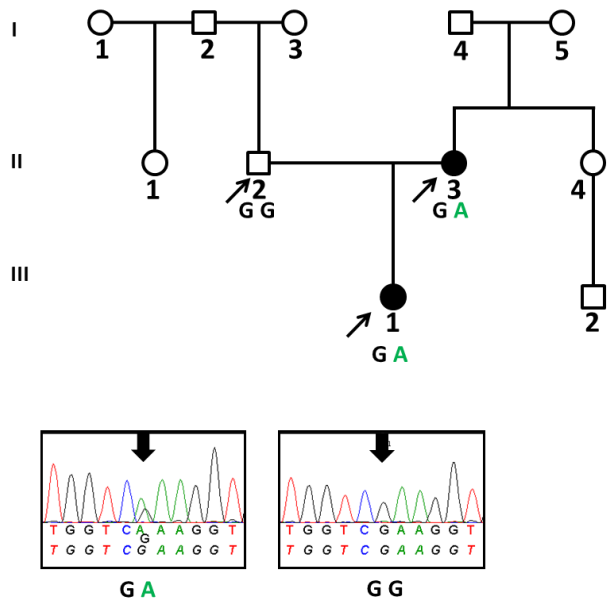

G6
I
II
III
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
310 A G
11864G G
12889 T C
11864G A
310 A G
12889T T
310 G G
11864G G
12889T T
310 G G
11864G A
12889 T C
310 A G
11864G A
12889T T
310 G G
310 A G
USH1G c.310A>G, p. Met104Val
11864G A
11864G G
USH2A c.11864G>A, p.Trp3955*
12889 T C
12889T T
USH2A c.12889T>C, p.Ser4297Pro

**G7**

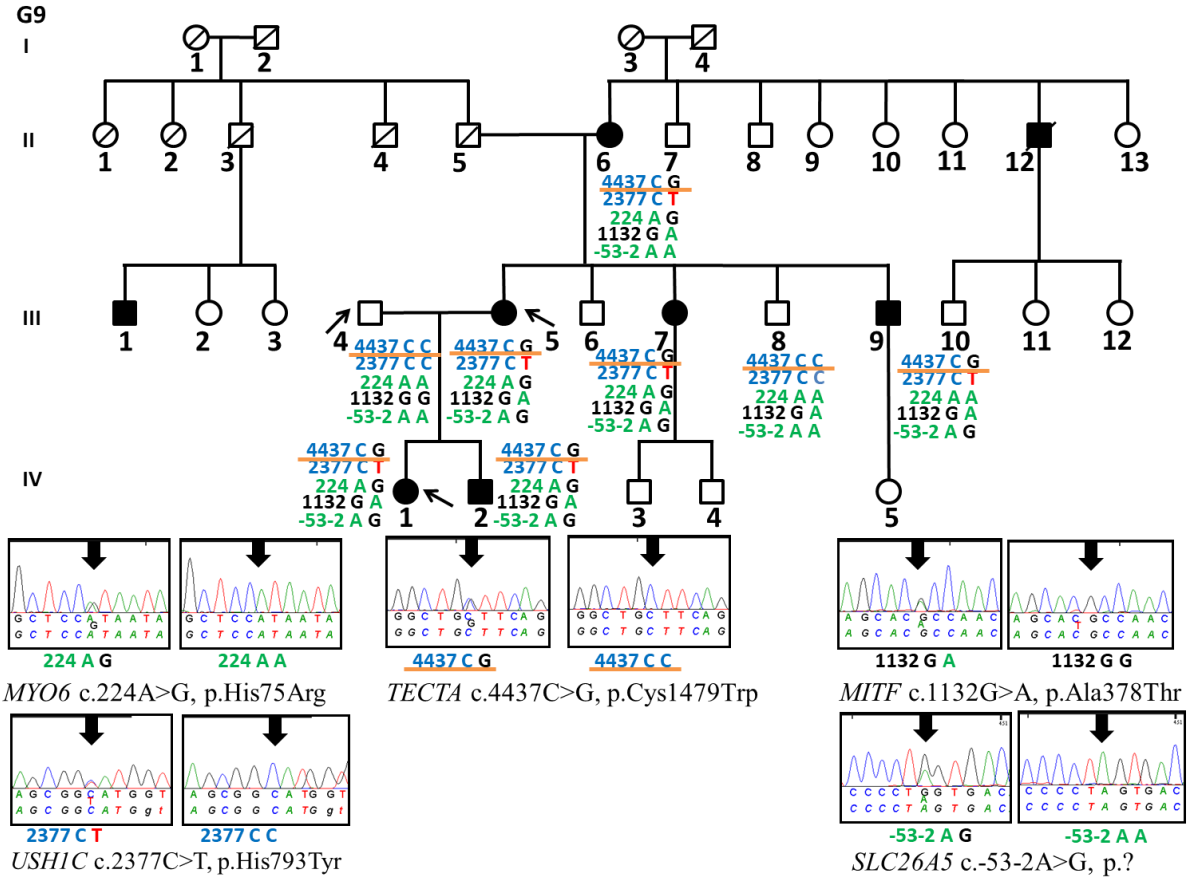


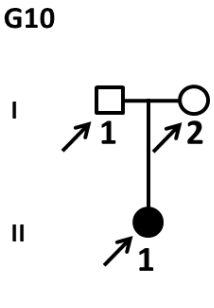

*TECTB* c.853C>T, p.Arg285Cys

**G8**

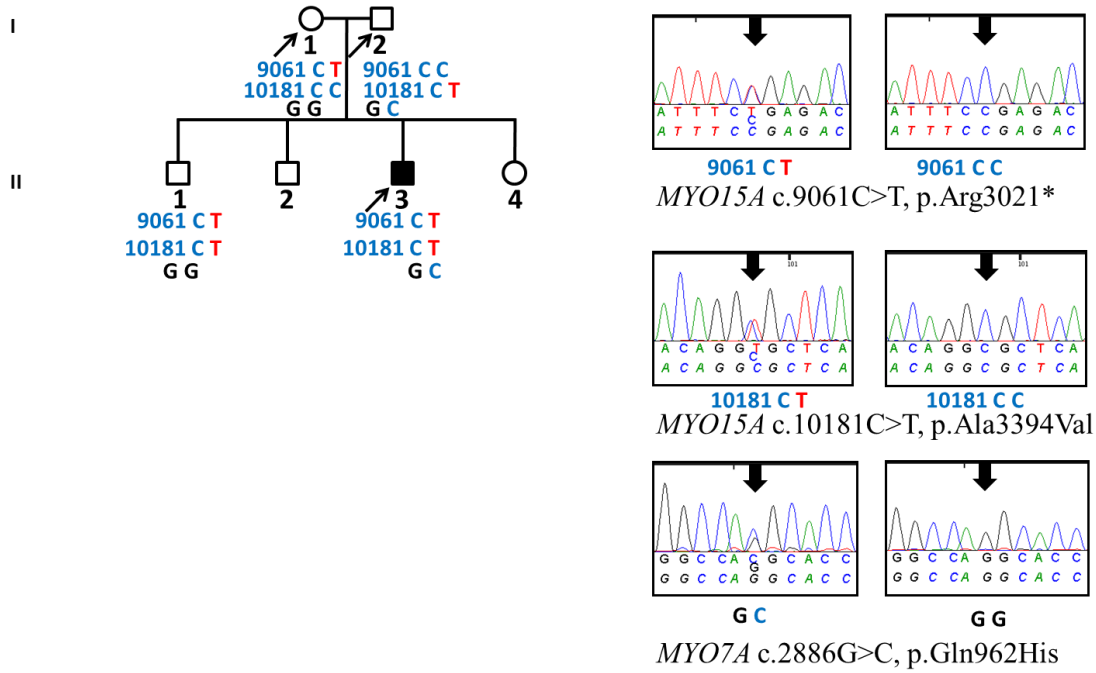



*ATP11A* c.1546G>A, p.Glu516 Lys

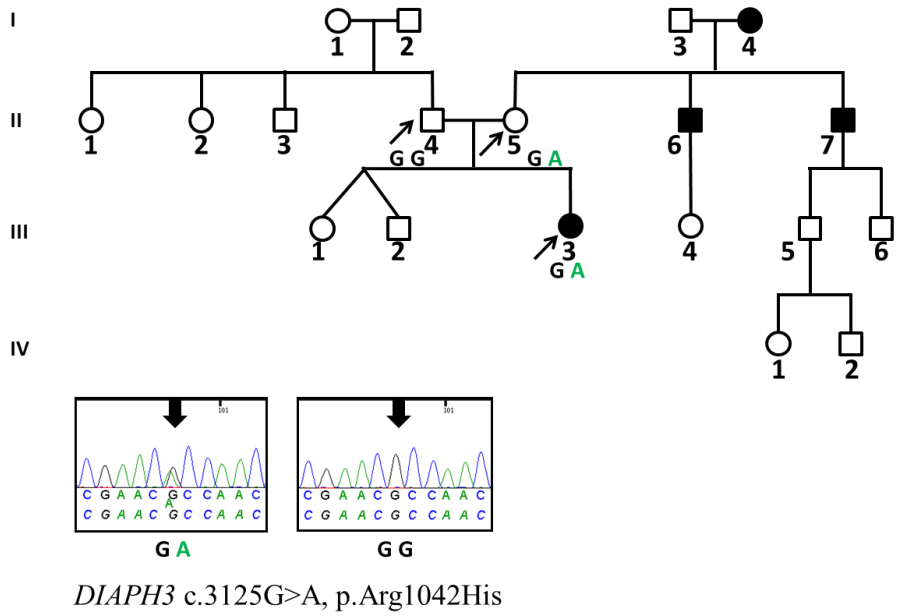

G9
I
II
III
IV
4437 C G
2377 C T
224 A G
1132 G A
-53-2 A A
4437 C C
2377 C C
224 A A
1132 G G
-53-2 A G
224 A G
224 A A
4437 C G
4437 C C
1132 G A
1132 G G
MYO6 c.224A>G, p.His75Arg
TECTA c.4437C>G, p.Cys1479Trp
MITF c.1132G>A, p.Ala378Thr
2377 C T
2377 C C
USH1C c.2377C>T, p.His793Tyr
-53-2 A G
-53-2 A A
SLC26A5 c.-53-2A>G, p.?


G10
I
II

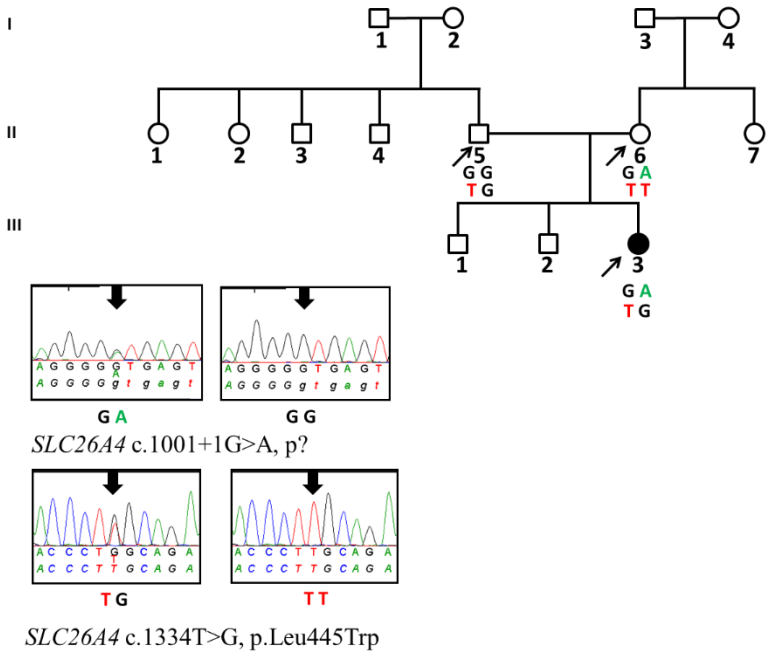
**G11**


I
II
1
9061 C T
10181 C C
G G
2
9061 C C
10181 C T
G C
1
9061 C T
10181 C T
G G
2
3
9061 C T
10181 C T
G C
4
9061 C T
9061 C C
MYO15A c.9061C>T, p.Arg3021*
10181 C T
10181 C C
MYO15A c.10181C>T, p.Ala3394Val
G C
G G
MYO7A c.2886G>C, p.Gln962His

**G12**


I
II
III
IV
1
2
3
4
1
2
3
4
G G
5
G A
6
7
1
2
3
G A
4
5
6
1
2
G A
G G
DIAPH3 c.3125G>A, p.Arg1042His

**G13**

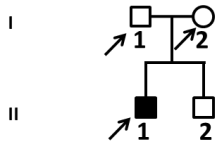



*SLC26A4* c.1001+1G>A, p?

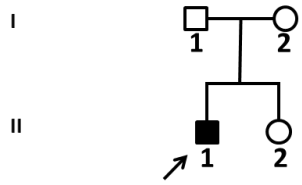



*SLC26A4* c.1334T>G, p.Leu445Trp

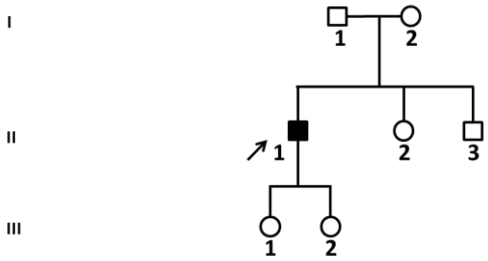
**G14**



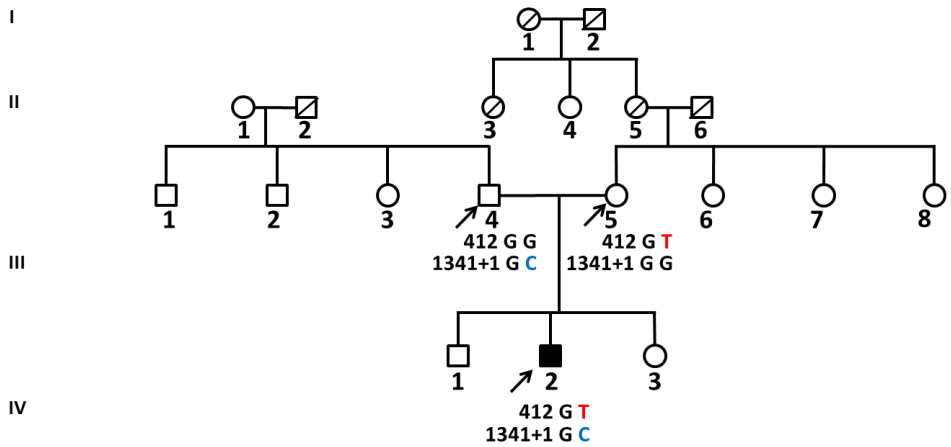

**G15**

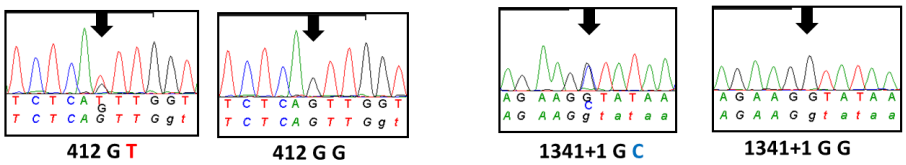



**G16**



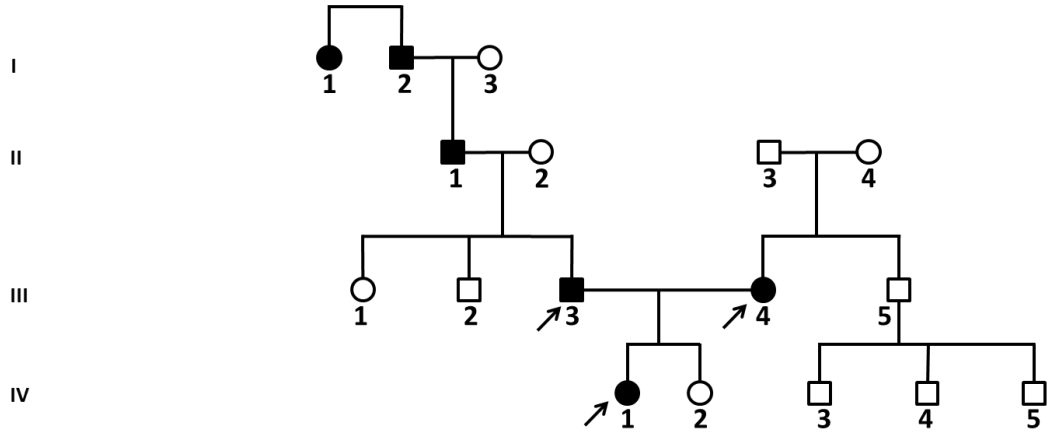
**G17**



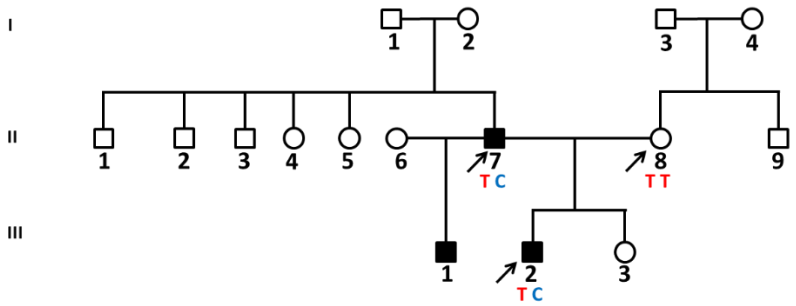



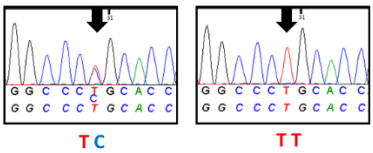

*SLC26A4* c.412G>T, p.Val138Phe *SLC26A4* c.1341+1G>C, p.?

**G18**



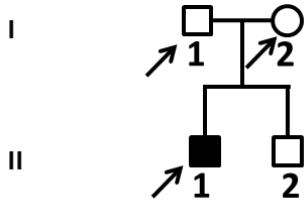
**G19**



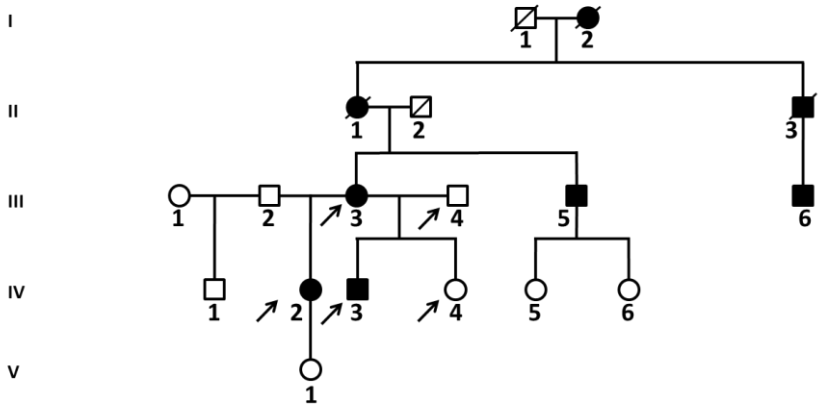




*EYA1* c.1748T>C, p.Leu583Pro

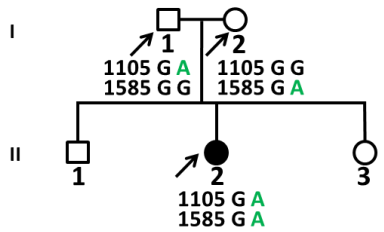
**G20**

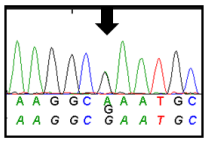



**G21**

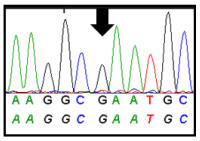


**G22**



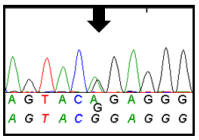



**1105 G A**



**1105 G G**

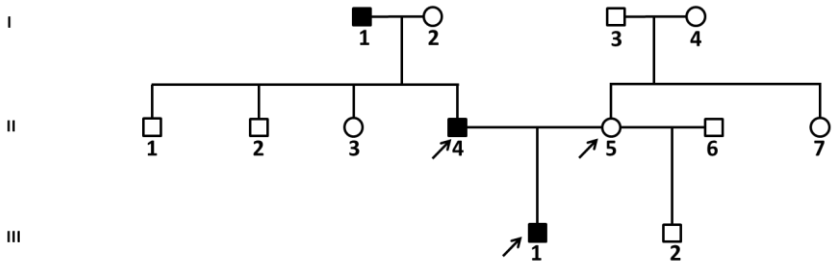
*THBS2* c.1105G>A, p.Glu369Lys



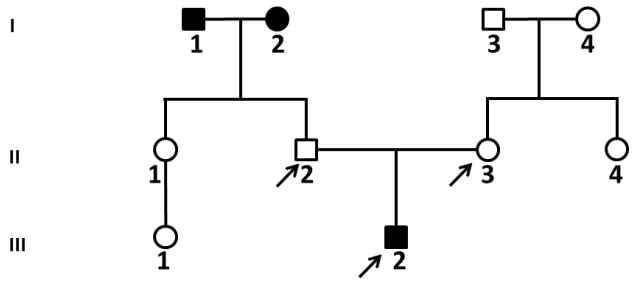
**1585 G A**

*THBS2* c.1585G>A, p.Gly529Arg

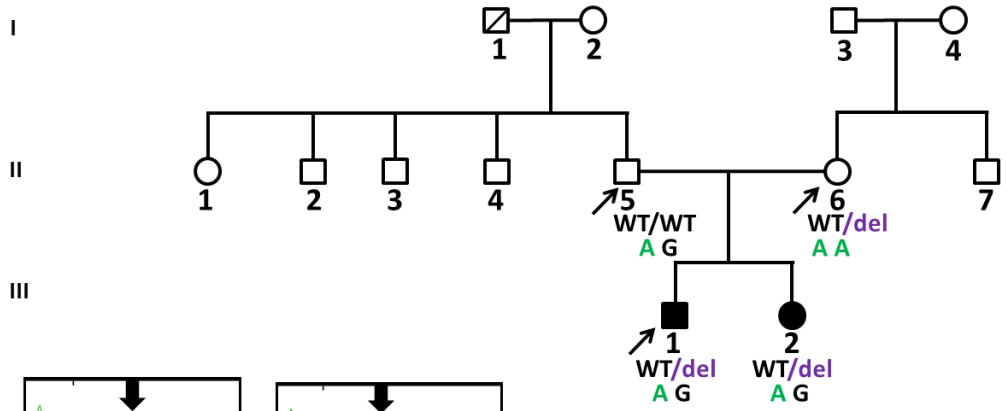
**G23**

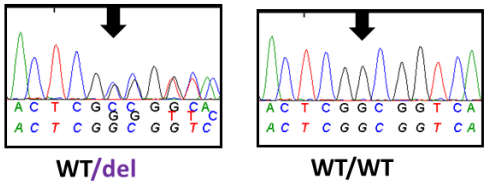



**G24**

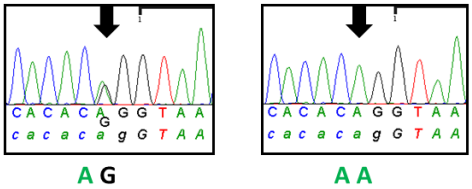


**G25**



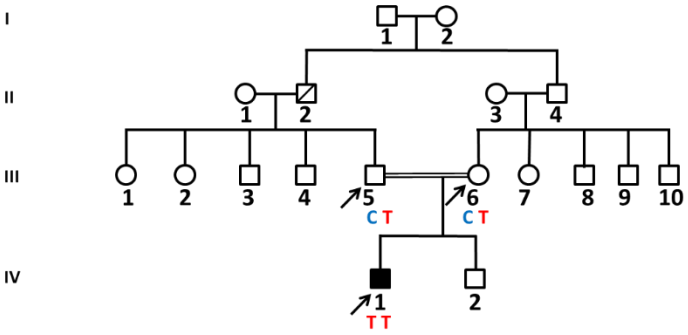



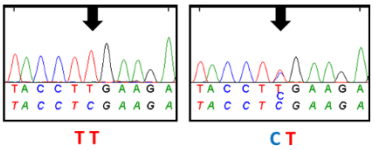

*CDH23* c.4273del, p.Ala1425Argfs*91




*CDH23* c.3431-2A>G, p.?

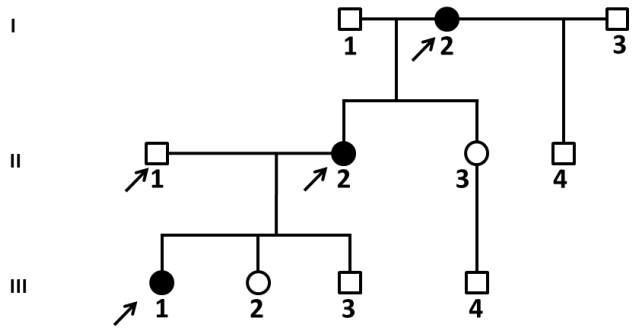
**G26**



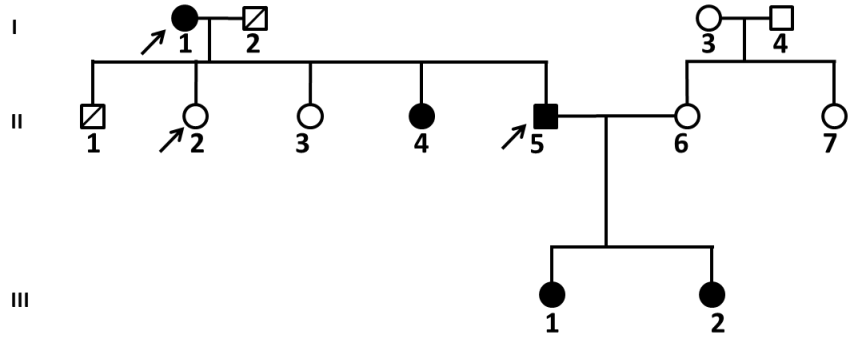




*TMC1* c.100C>T, p.Arg34*

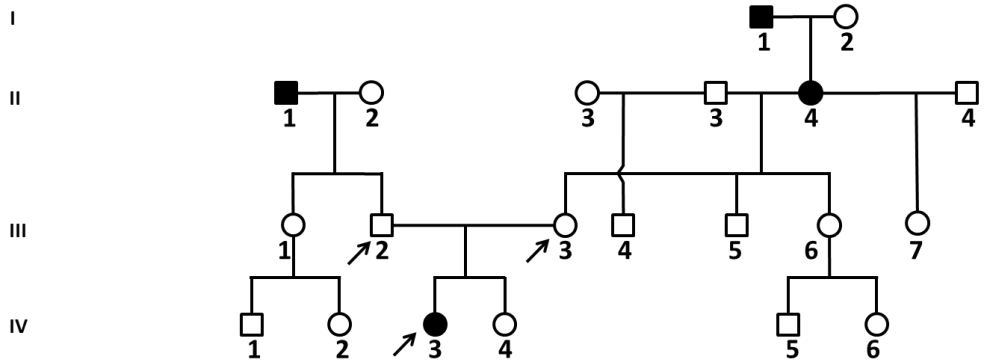
**G27**


I
1
2
3
II
1
2
3
4
III
1
2
3
4

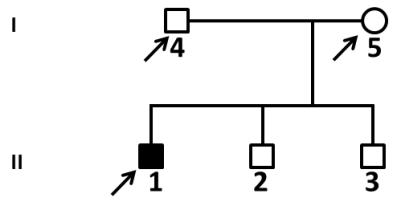
**G28**


I
1
2
3
4
II
1
2
3
4
5
6
7
III
1
2

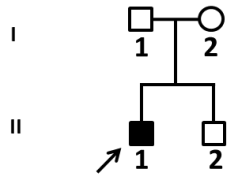
**G29**


I
1
2
II
1
2
3
3
4
4
III
1
2
3
4
5
6
7
IV
1
2
3
4
5
6

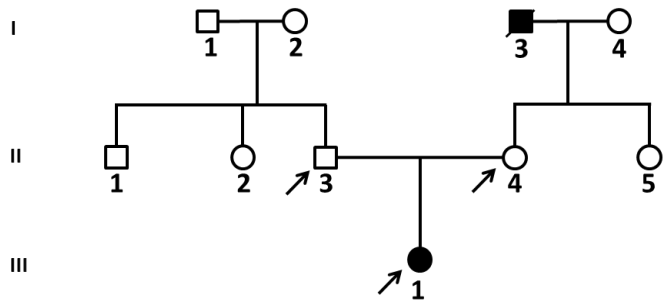
**G30**



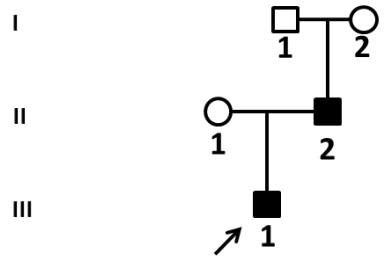

**G31**



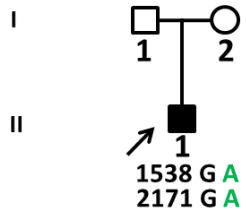

**G32**

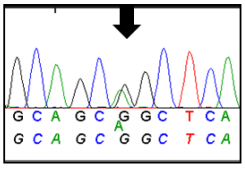



**G33**



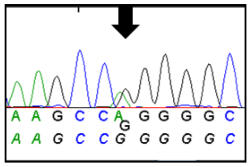
**G34**



1538 G A

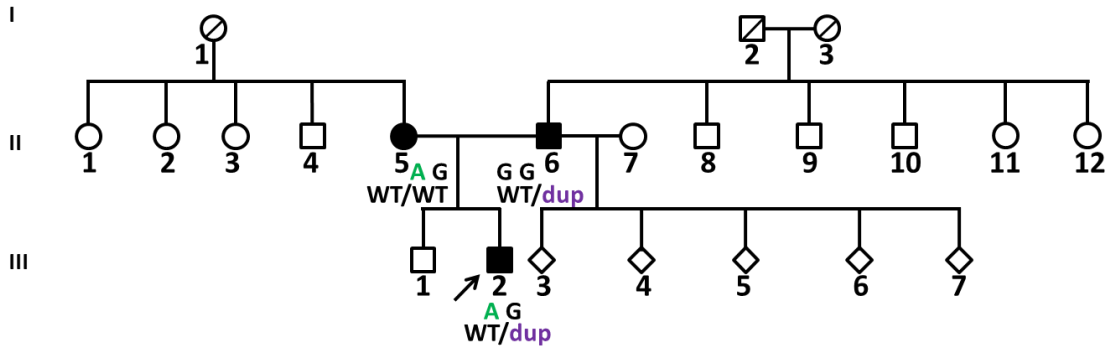
*PEX6* c.1538G>A, p.Arg513Gln

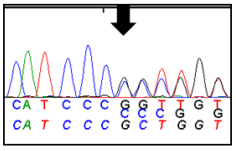


2171 G A

*PEX6* c.2171G>A, p.Arg724Gln

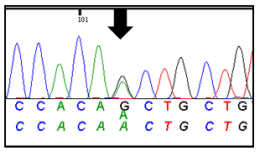
**G35**



WT/dup

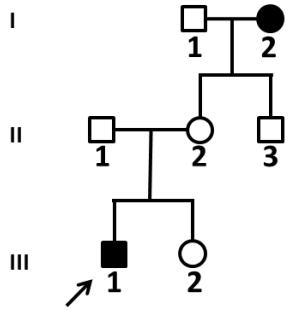
*WFS1* c.1037dup, p. Leu347Alafs*196



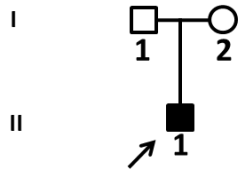
A G

*SLC17A8* c.1156A>G, p.Thr386Ala

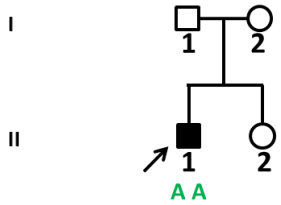
**G36**

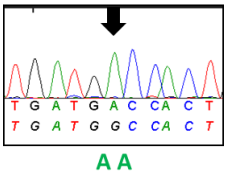



**G37**



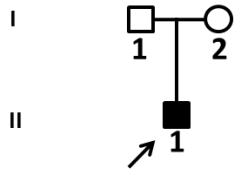

**G38**



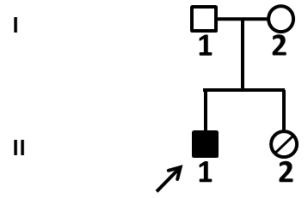




*CDH23* c.7597G>A, p.Ala2533Thr

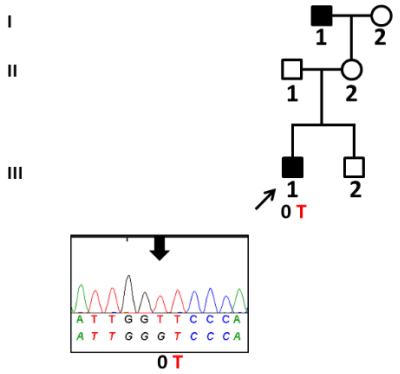
**G39**



**G40**

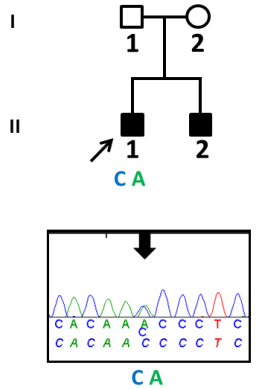



**G41**



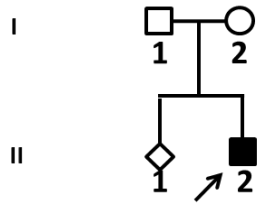

*HUWE1* c.8429G>T, p.Gly2810Val

**G42**

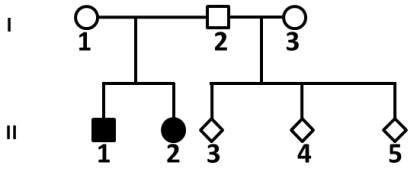



*MYO7A* c.3546C>A, p.Asn1182Lys

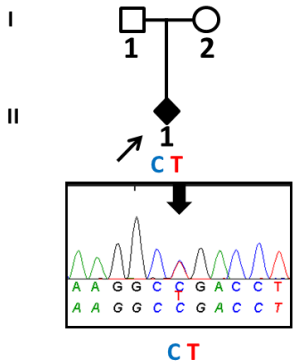
**G43**




**G44**

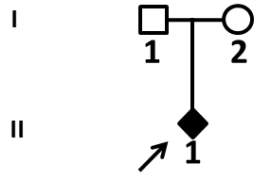



**G45**

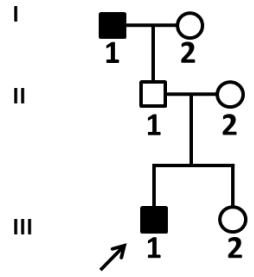



*COL11A2* c.4135C>T, p.Arg1379*

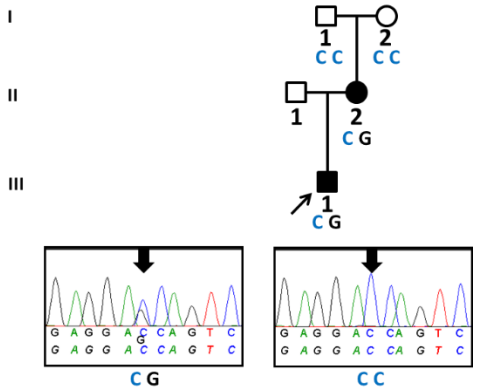
**G46**



**G47**

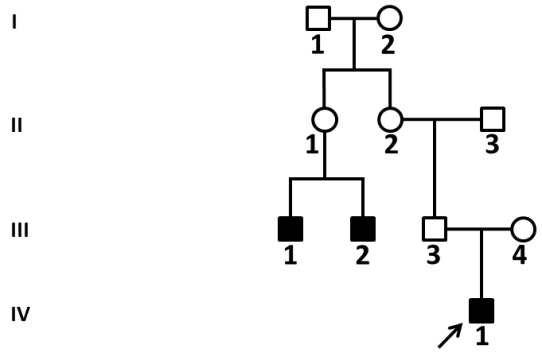



**G48**

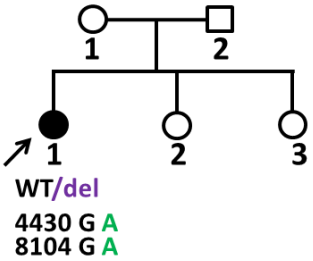


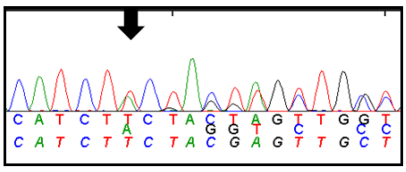

*MYH14* c.573C>G, p.Asp191Glu

**G49**



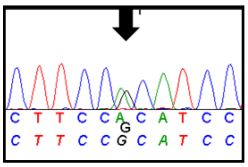
**G50**



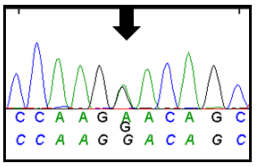
WT/del

*MYO15A* c.4235_4237del, p.Phe1412del



4430 G A

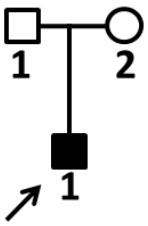
*MYO15A* c.4430G>A, p.Arg1477His



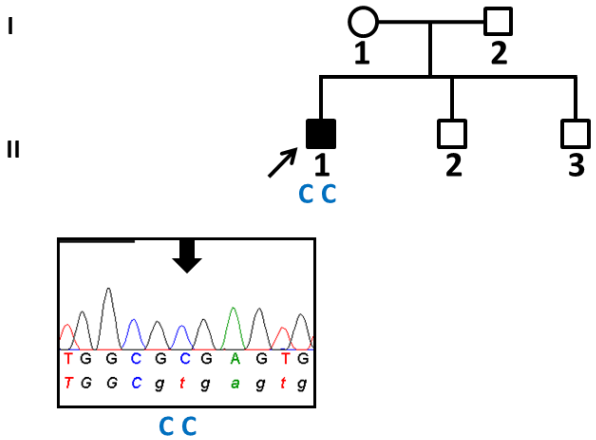
8104 G A

*MYO15A* c.8104G>A, p.Asp2702Asn

**G51**

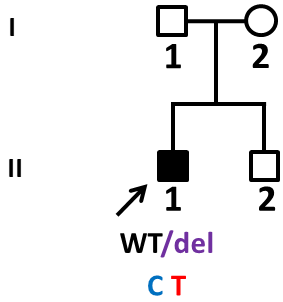


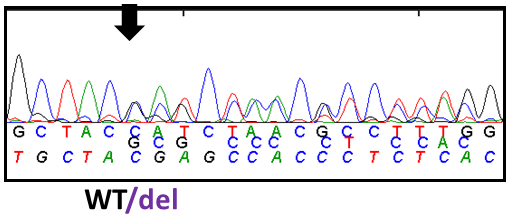
**G52**



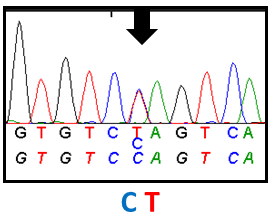

*MARVELD2* c.1331+2T>C, p.Lys445fsX449, p.Lys445fsX437

**G53**



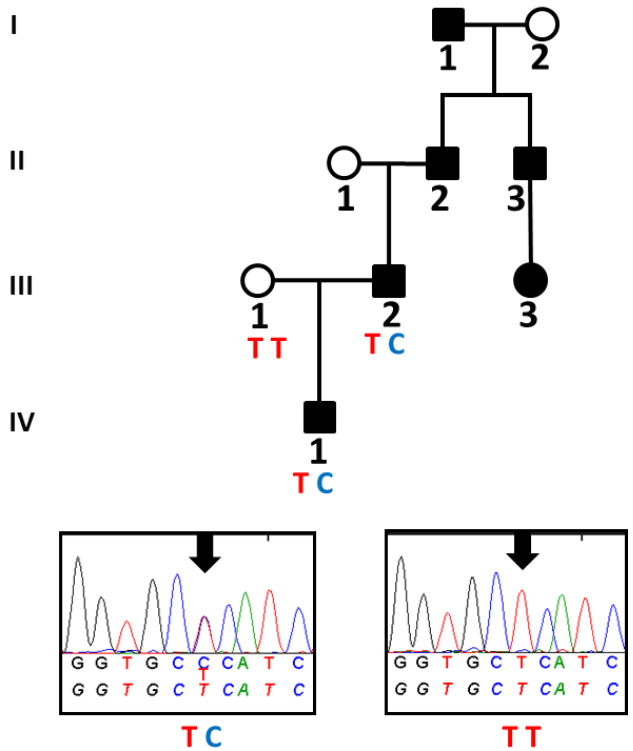




*OTOG* c.5850_5856del, p.Ser1951Leufs*26



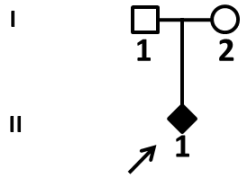

*OTOG* c.1702C>T, p.Gln568*

**G54**

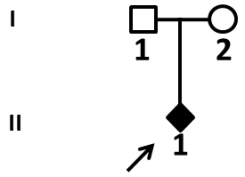



*KCNQ4* c.746T>C, p.Leu249Pro

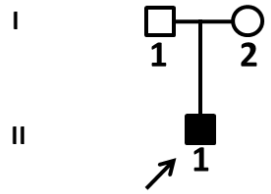
**G55**



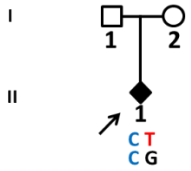

**G56**

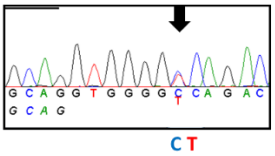


**G57**

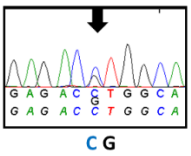



**G58**



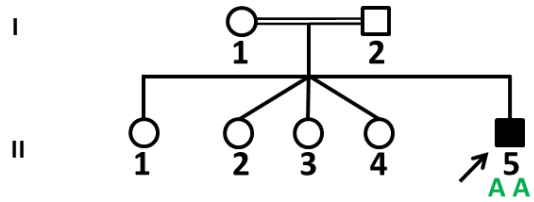



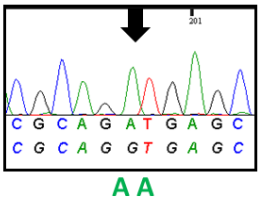

*CDH23* c.8308+7C>T, p.?




*CDH23* c.8809C>G, p.Leu2937Val

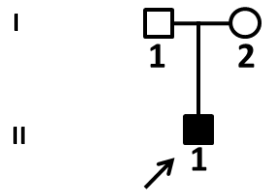
**G59**



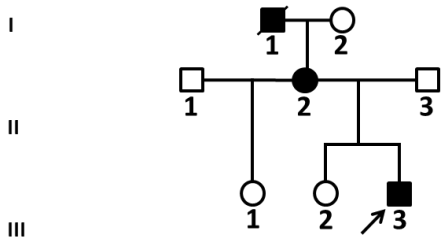




*GJB2* c.-23+1G>A, ?

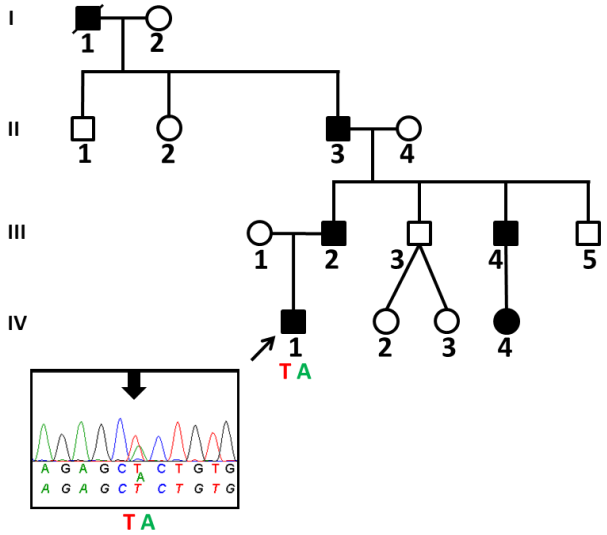
**G60**




**G61**

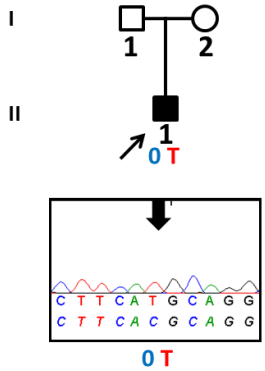



**G62**



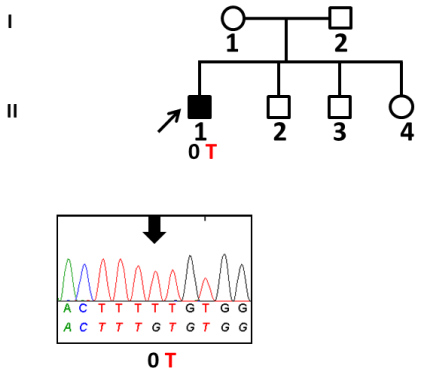

*TECTA* c.2858T>A, p.Leu953His

**G63**



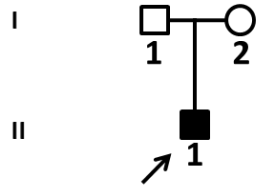

*POU3F4* c.632C>T, p.Thr211Met

**G64**



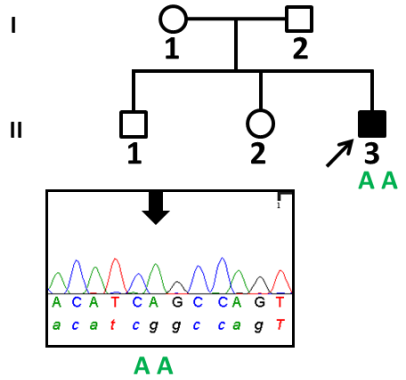

*HUWE1* c.3221G>T, p.Cys1074Phe

**G65**



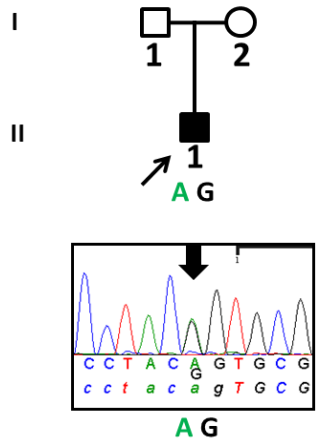

#

**G66**



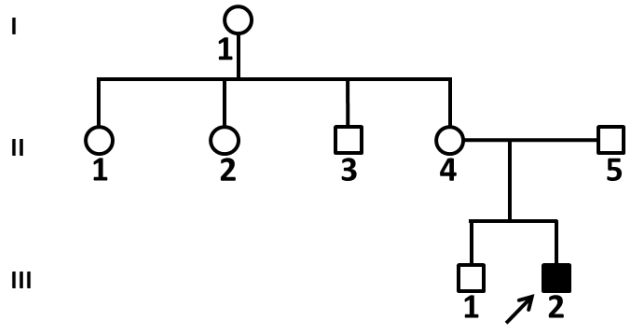

*TMPRSS3* c.323-6G>A, p.Cys107fsX132

**G67**

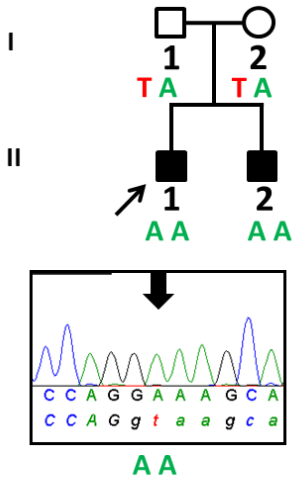



*DFNA5* c.991-2A>G, p.?

**G68**

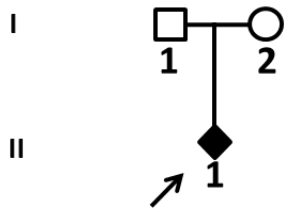


**G69**

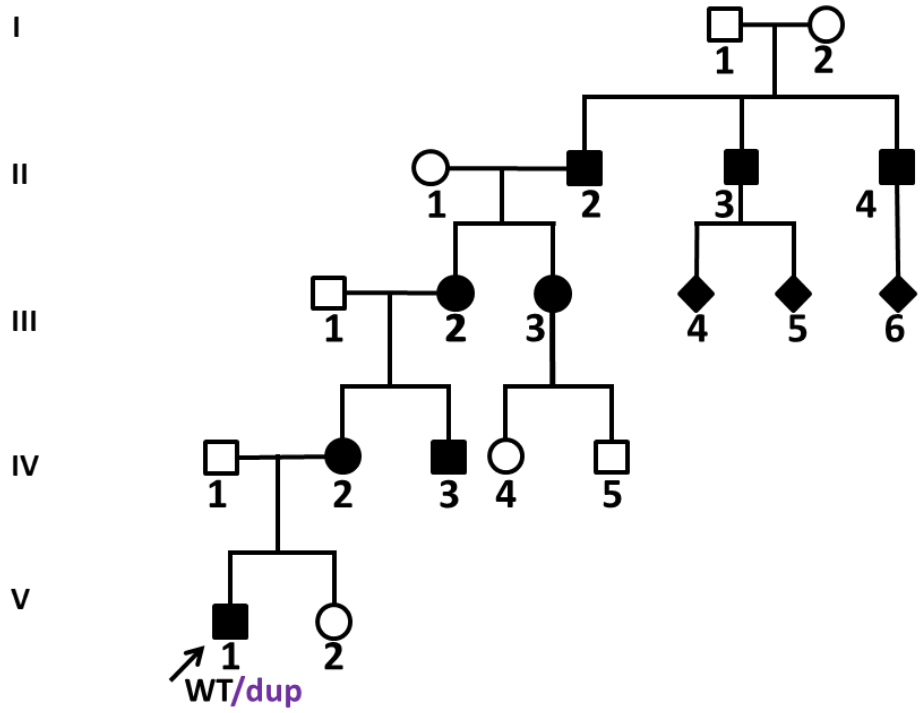


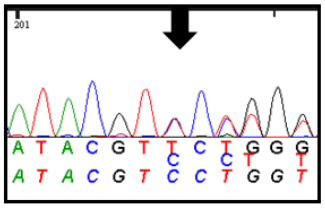

*LRTOMT* c.83+2T>A, p.?,

**G70**



**G71**

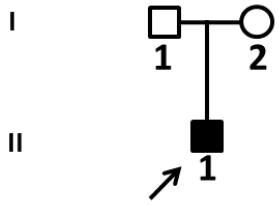


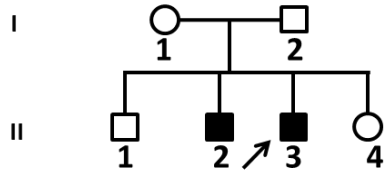

WT/dup

*PAX3* c.291dup, p.Pro98Serfs*16

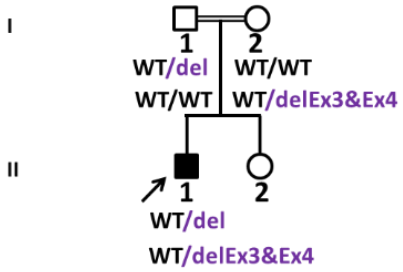
**G72**



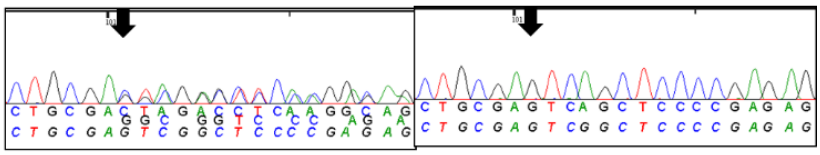
**G73**




**G74**

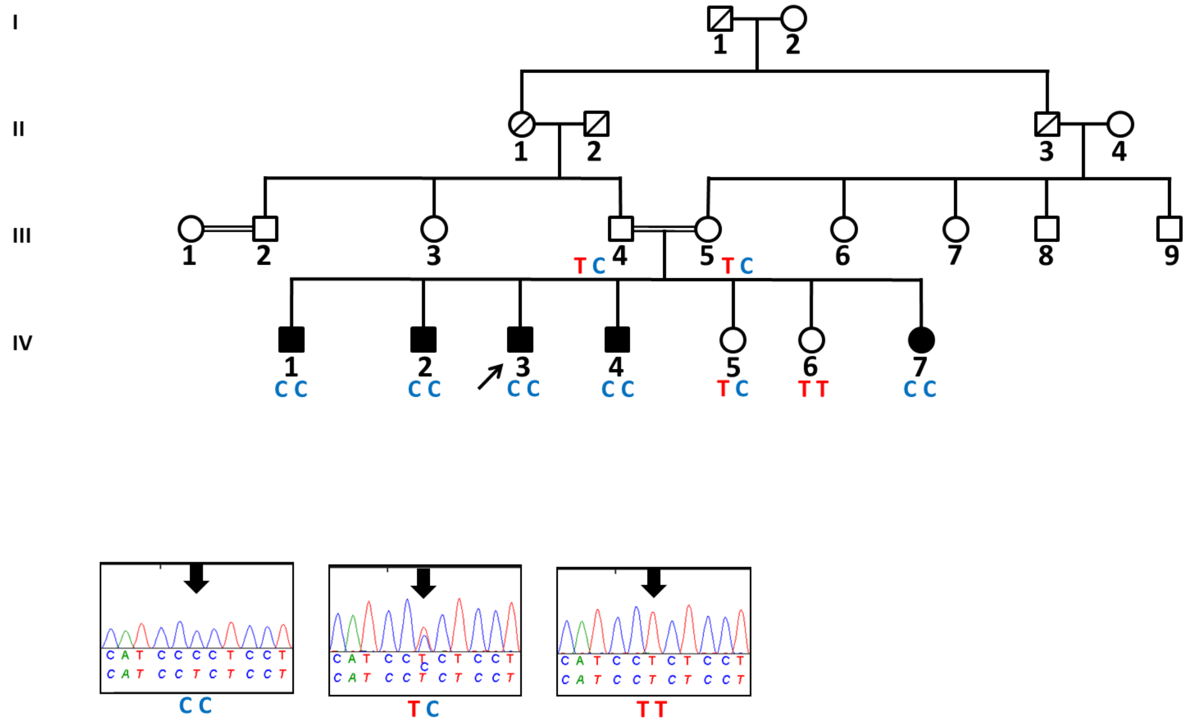



*CIB2* Deletion Exon 3 & 4



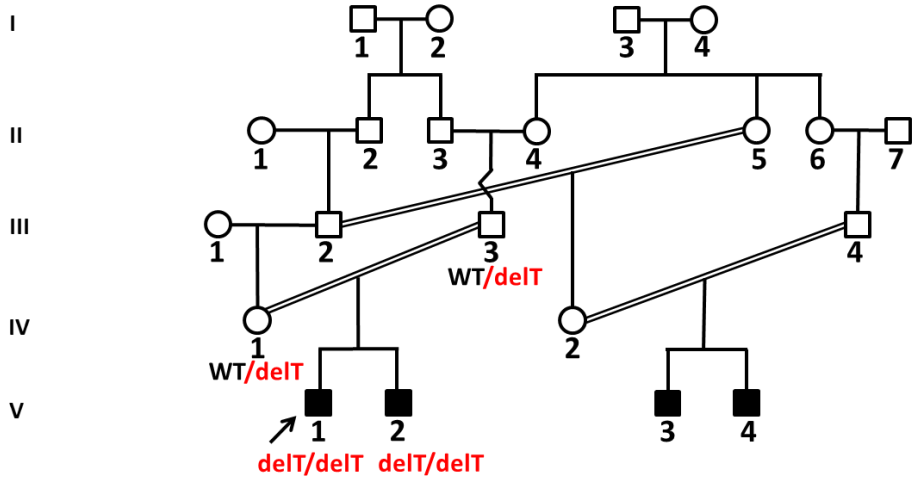
*CIB2* c.300_309delGGGAGCCGAC, p.Glu100AspfsX28

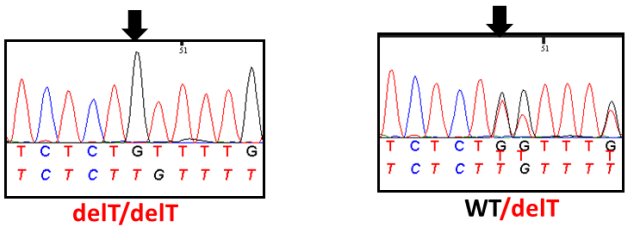
**E1**




*LHFPL5* c.575T>C, p.Leu192Pro

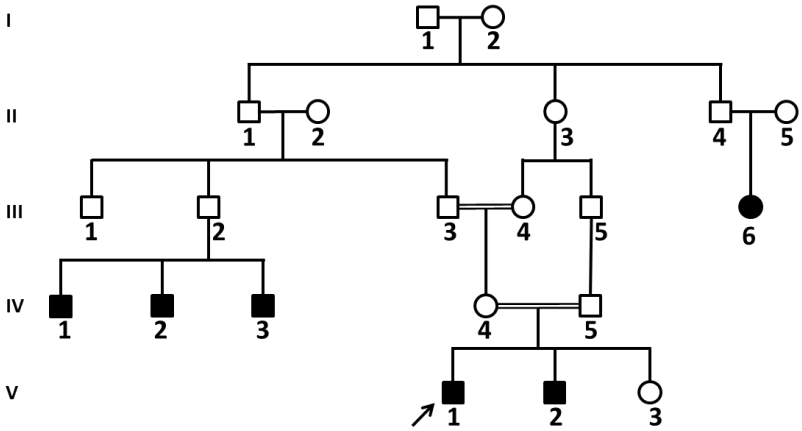
**E2**



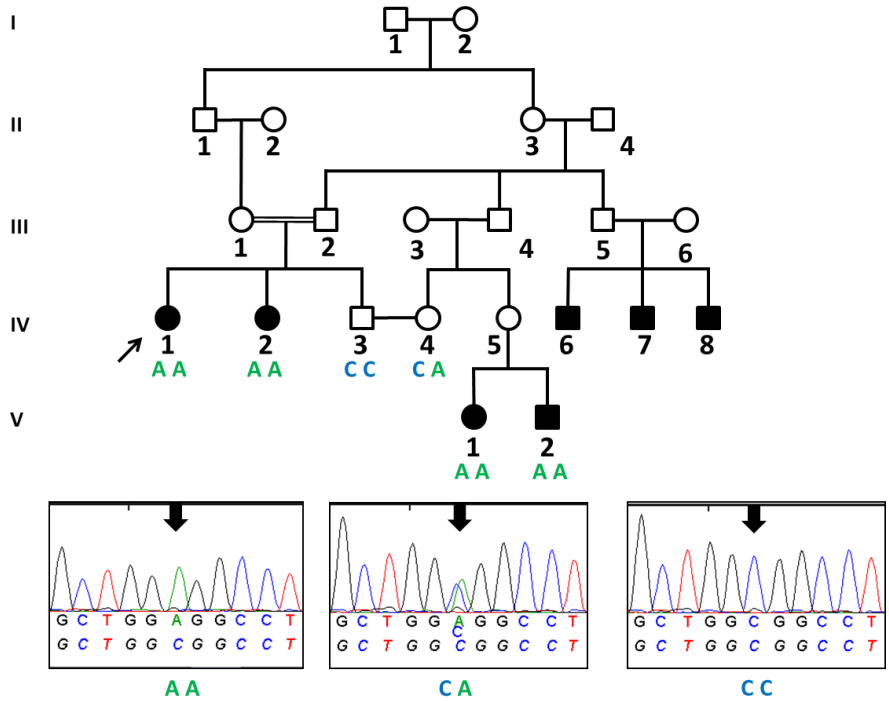




*SLC26A4* c.1198delT, p.Cys400Valfs*32

**E3**

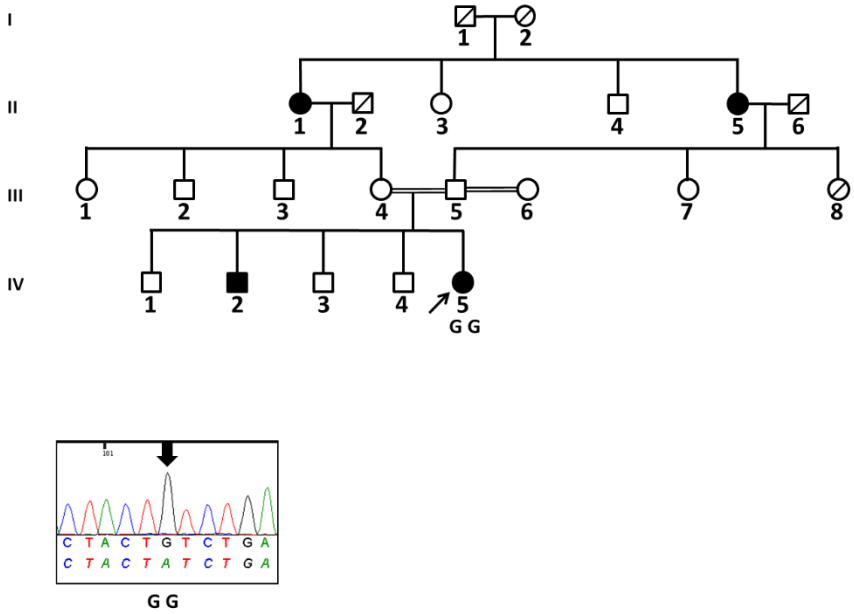


E4



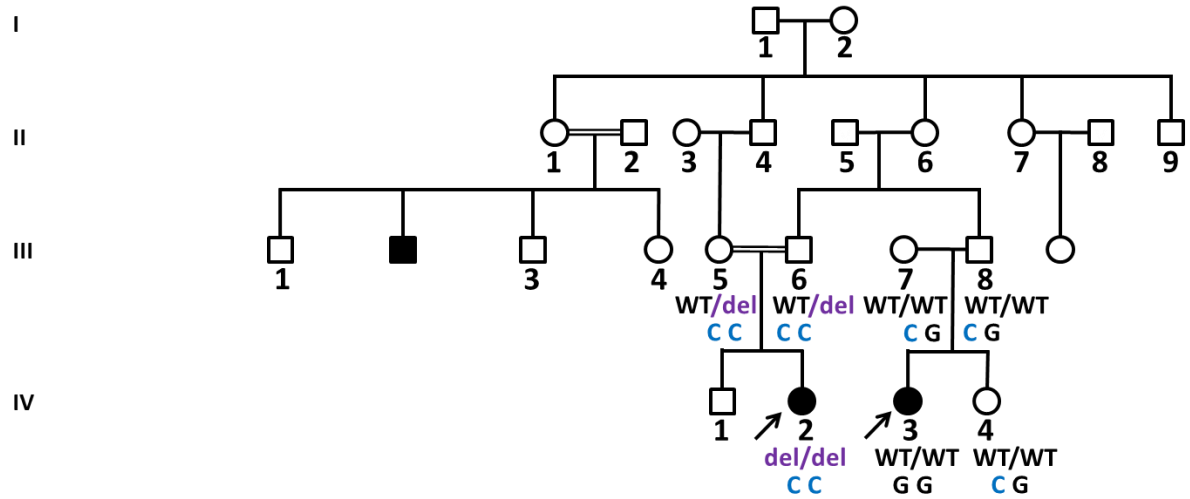

*OTOF* c.3269C>A, p.Ala1090Glu

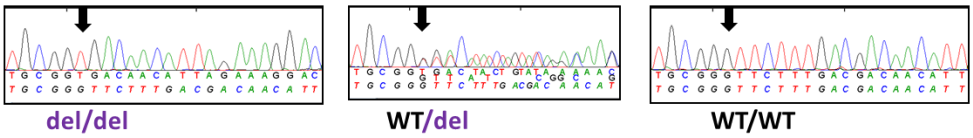
E5



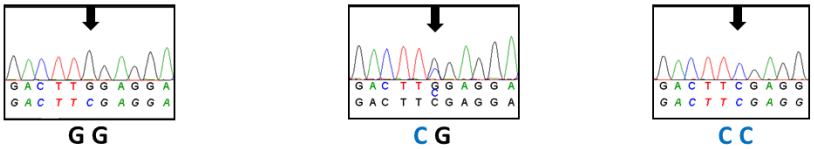

*MYO15A* c.4310A>G, p.Tyr1437Cys

**E6**



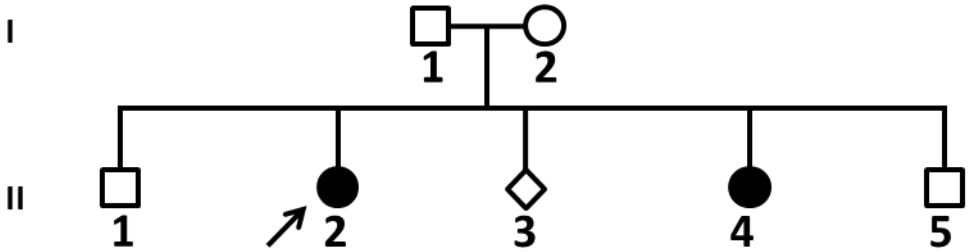



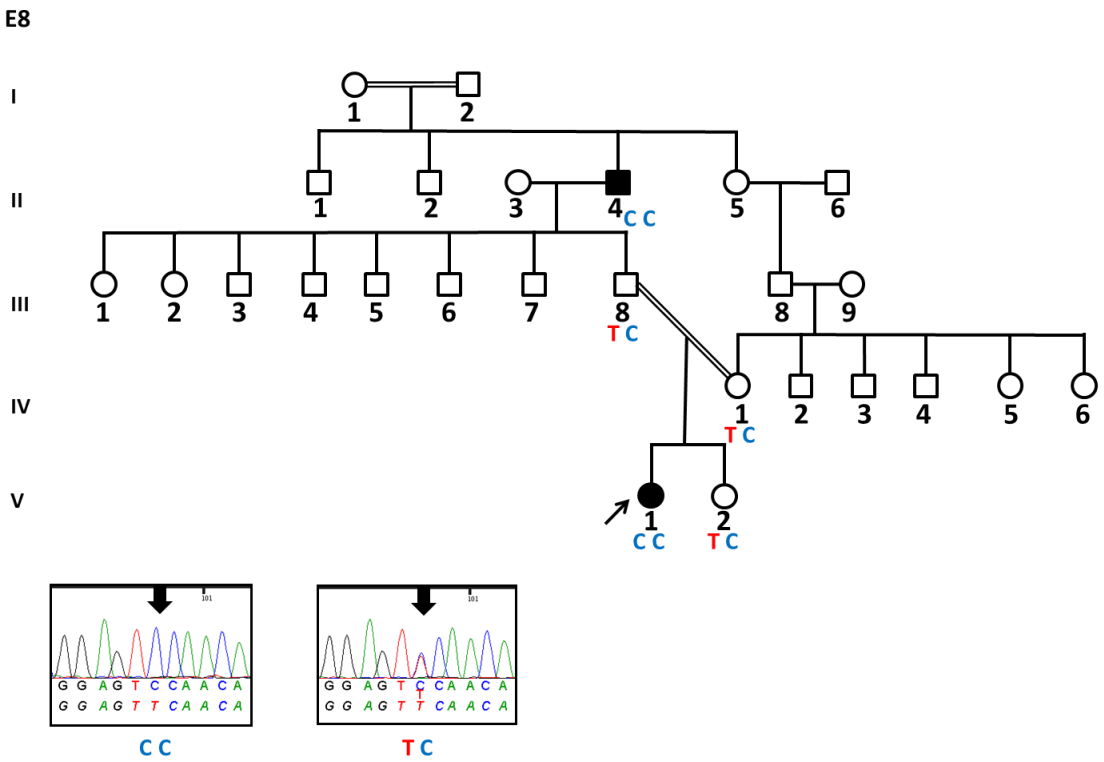

*SLC26A4* c.2121_2129delGTTCTTTGA, p.Phe708_Asp710del




*CIB2* c.507C>G, p.Phe169Leu

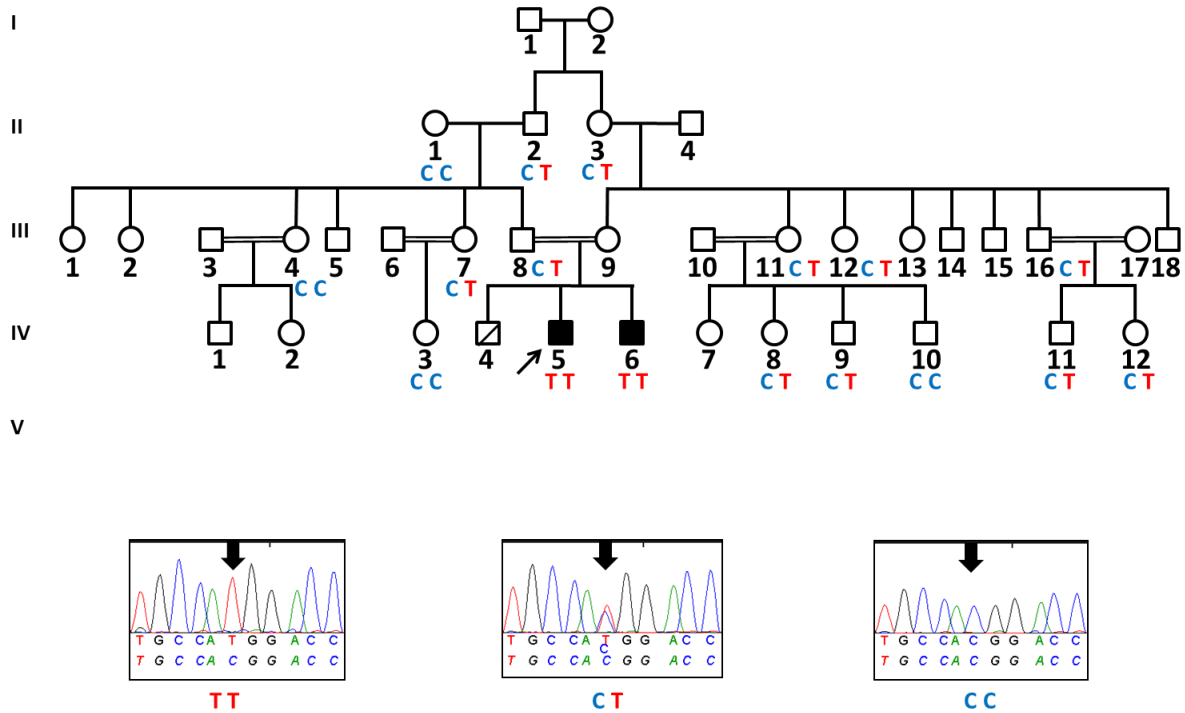
**E7**





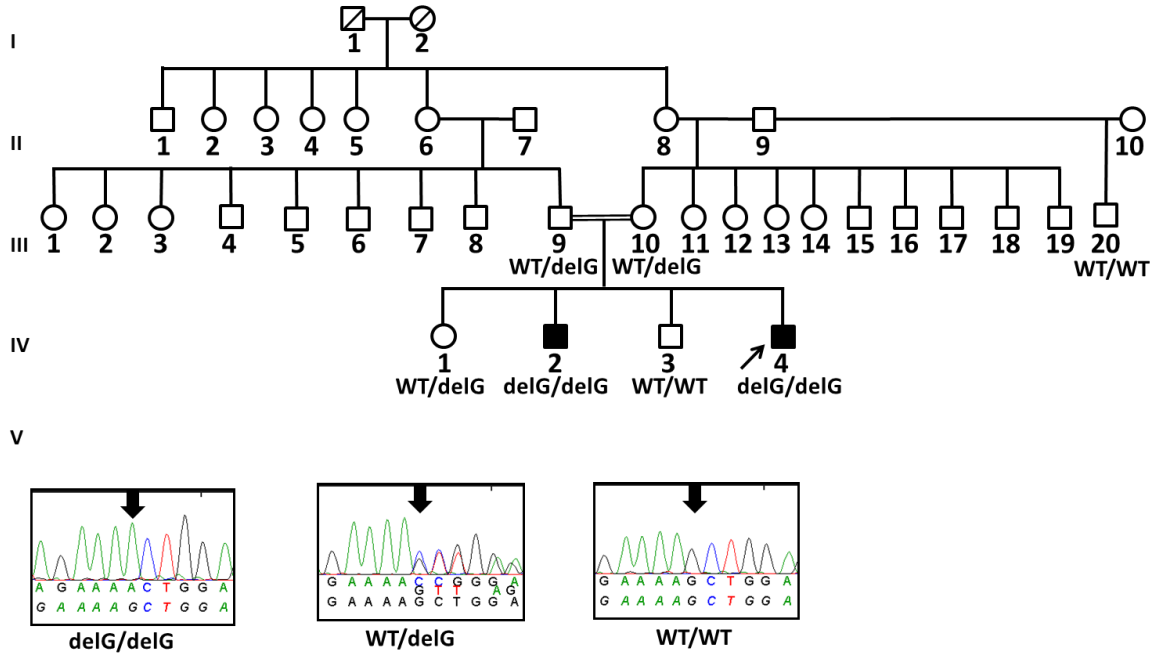

*CHD23* c.1043T>C, p.Phe348Ser

**E9**

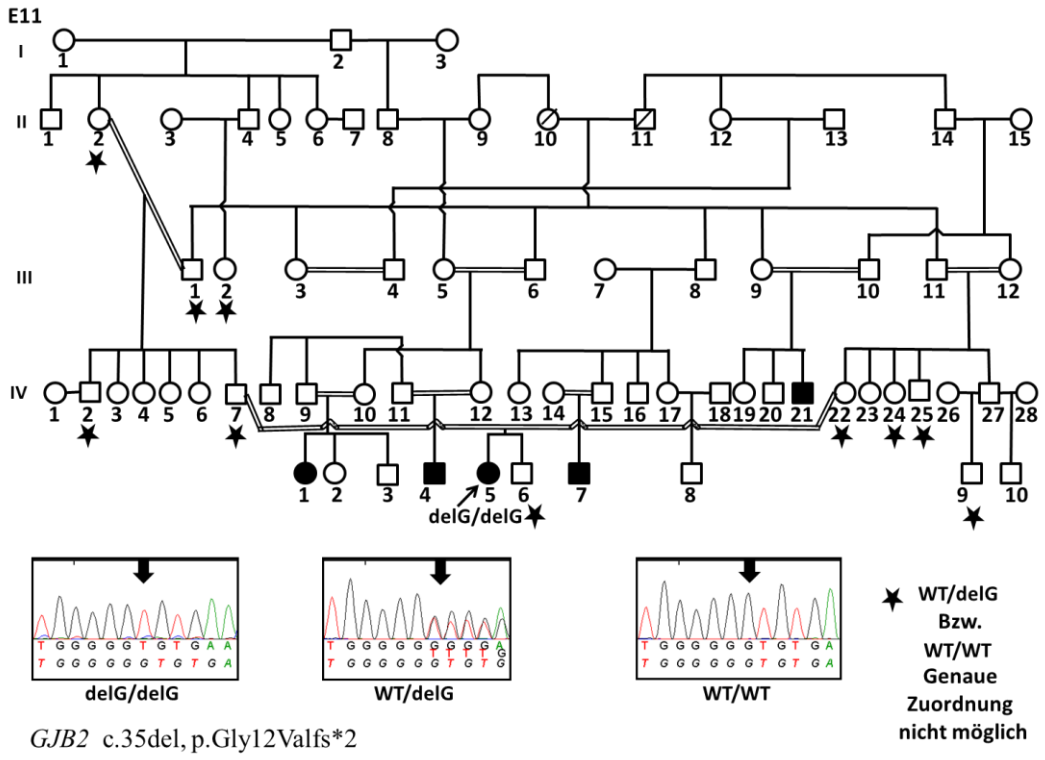



*TMIE* c.250C>T, p.Arg84Trp

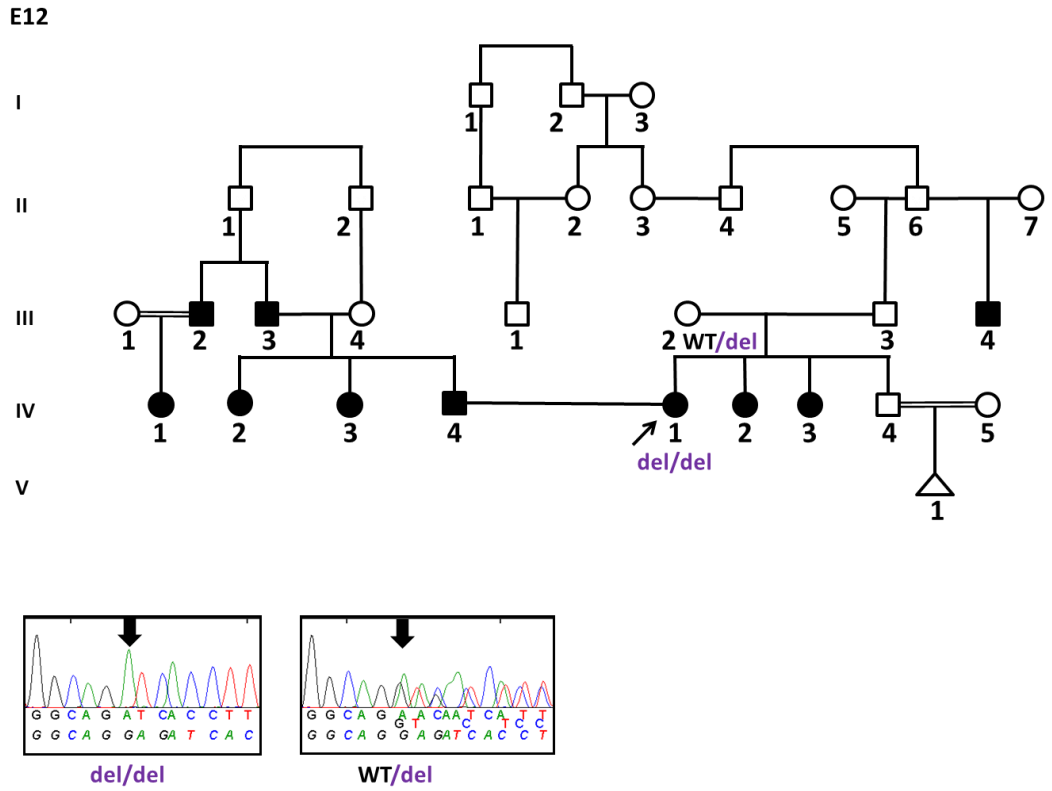
**E10**




*SLC26A4* c.2106delG, p.Lys702Asnfs*19

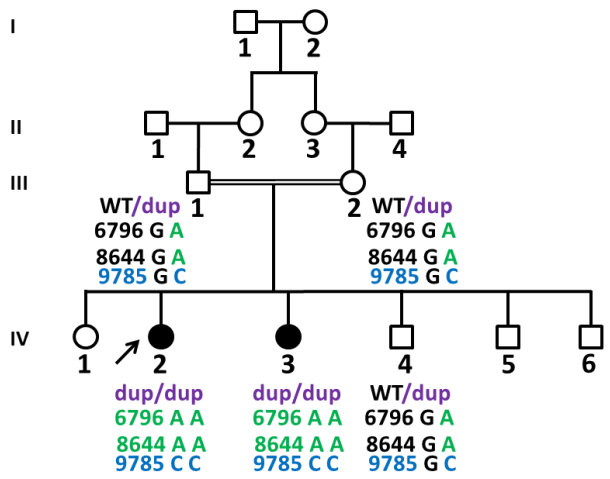


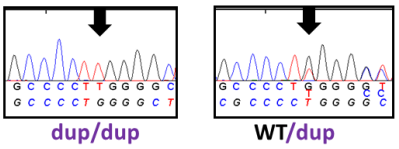

*GJB2* c.35del, p.Gly12Valfs*2



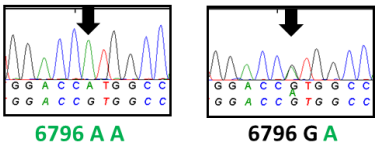

*MYO15A* c.4909_4911del, p.Glu1637del

**E13**

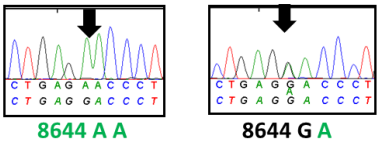


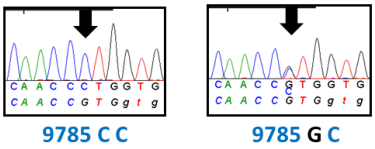

MYO15A c.2552dup,p.Leu853Alafs*127




MYO15A c.6796G>A,p.Val2266Met

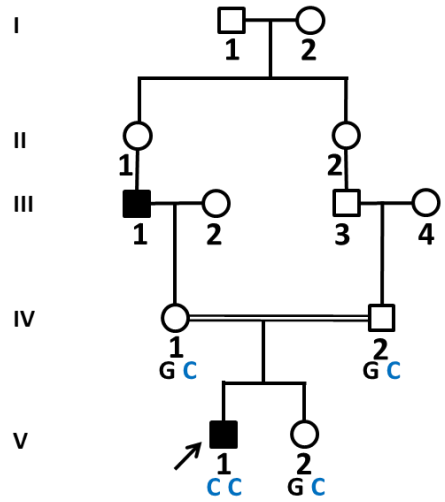


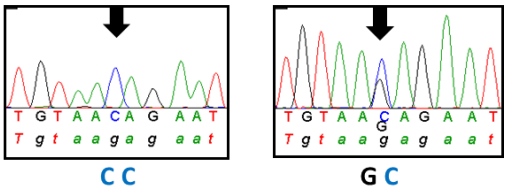

MYO15A c.8644G>A,p.Asp2882Asn




MYO15A c.9785G>C,p.Arg3262Pro

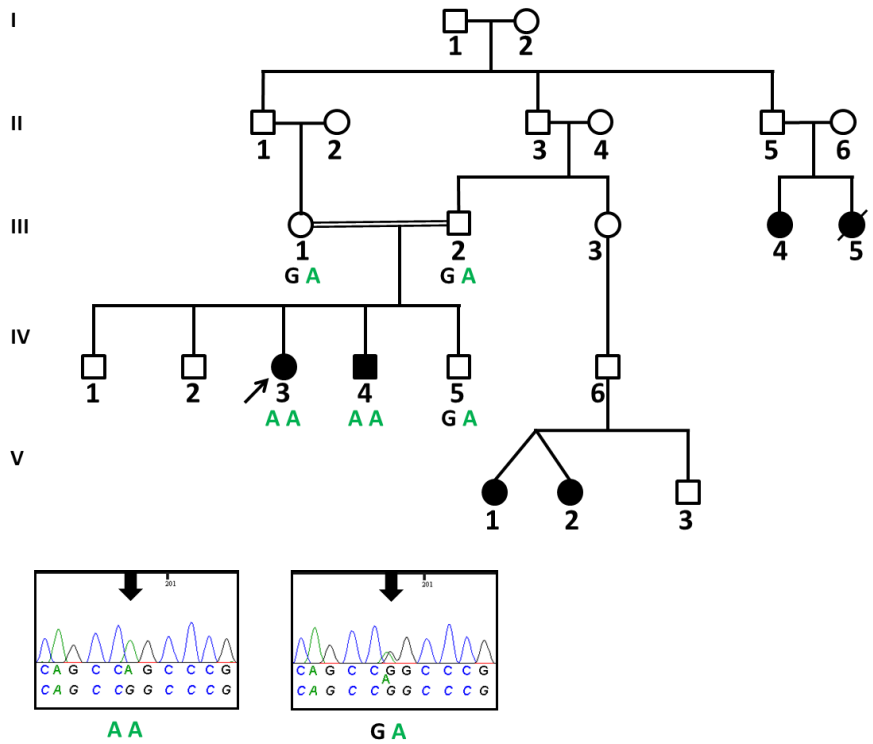
**E14**



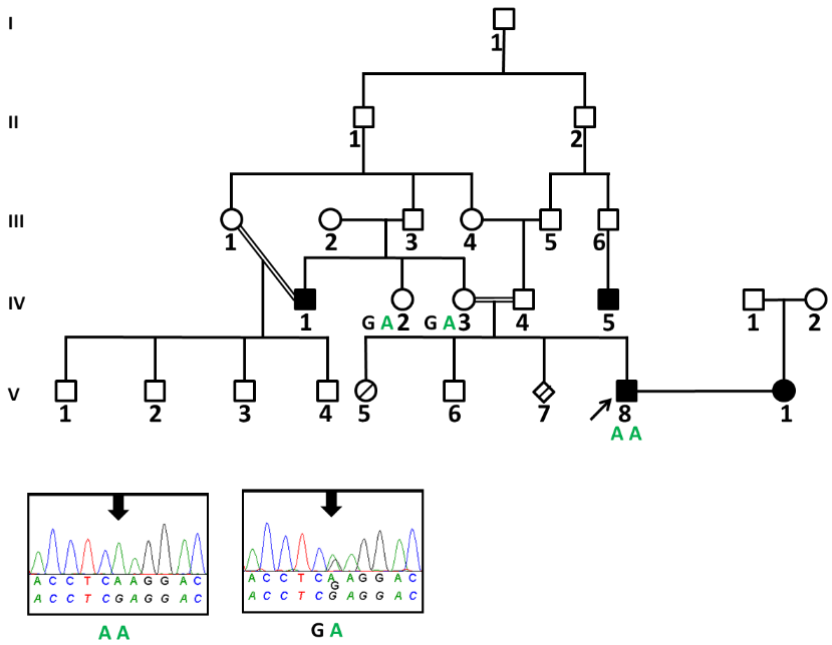

*TECTA* c.5272+5G>C, p.?

**E15**



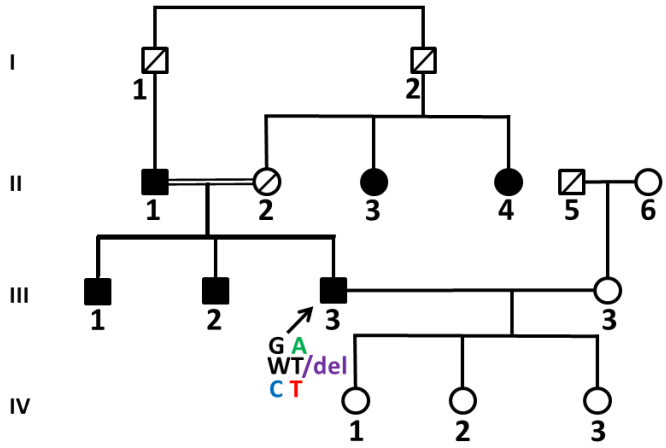

*OTOF* c.20*G>A, p.?

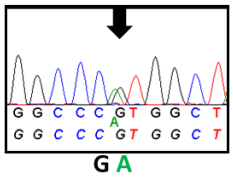
**E16**



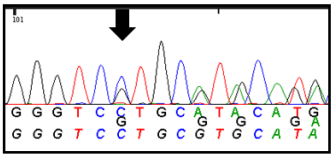

*TMC1* c.1535G>A, p.Arg512Gln

**E17**

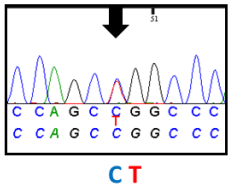



*MYO15A* c.5810G>A, p.Arg1937His

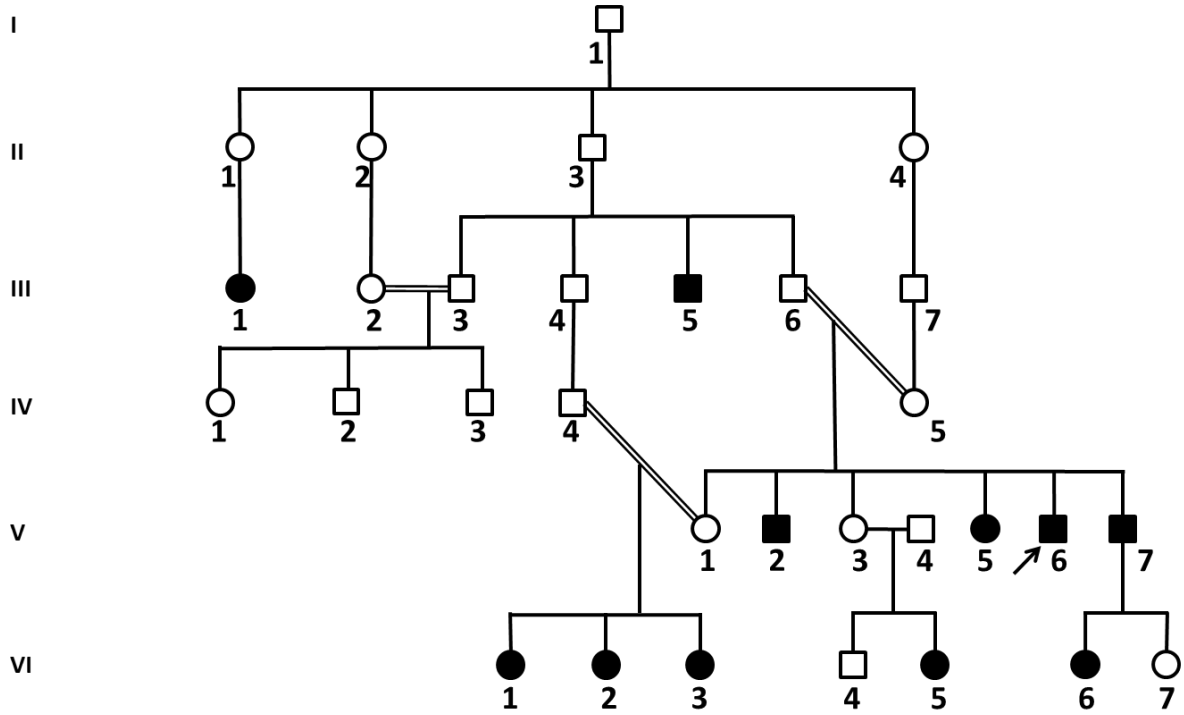



*MYO15A* c.8446_8449del, p.Leu2816Valfs*11

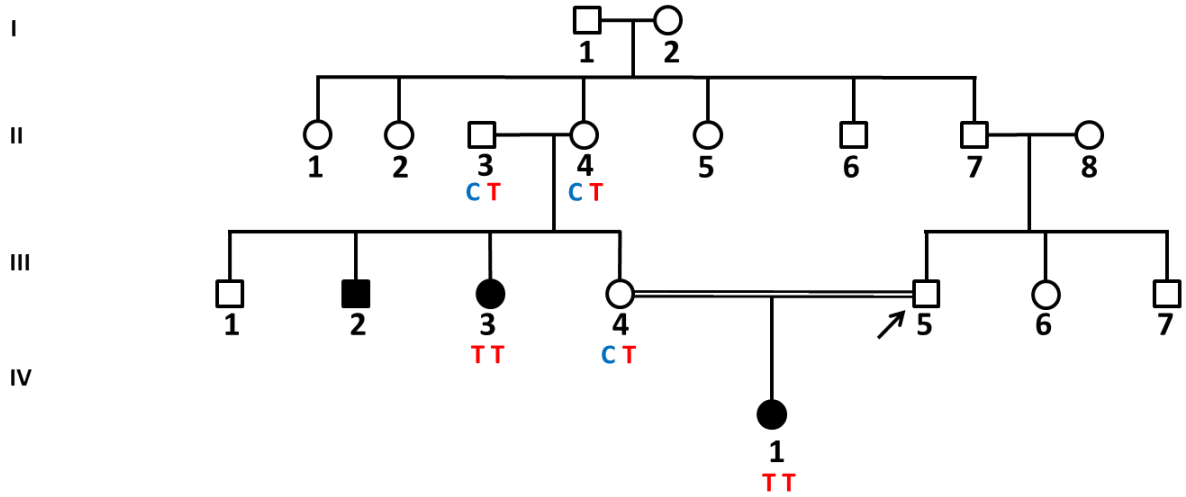


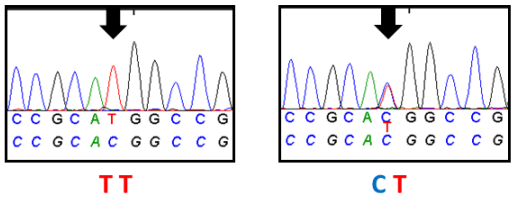

*MYO15A* c.9997C>T, p.Arg3333Trp

**E18**



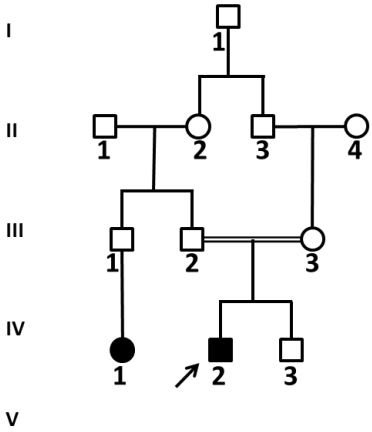
**E19**

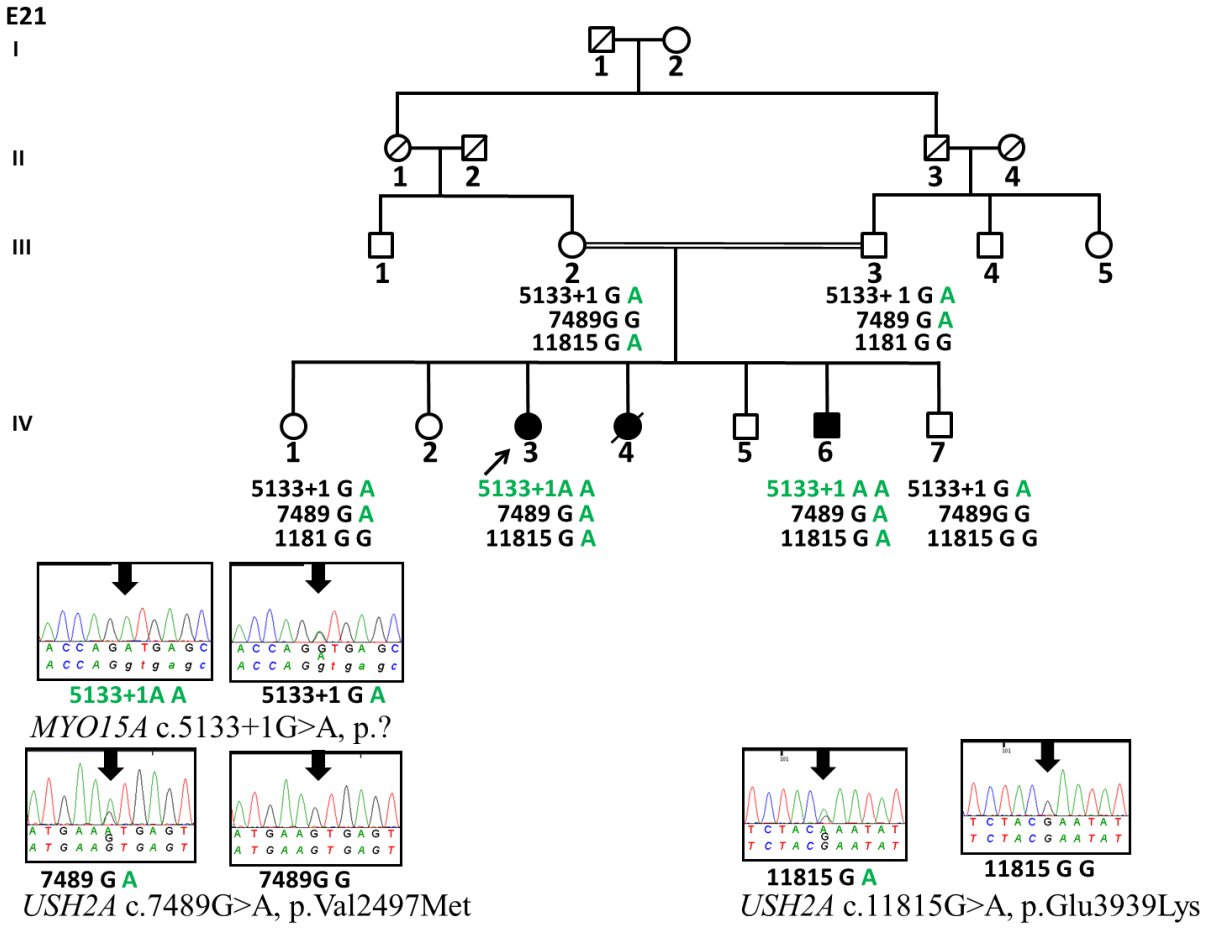


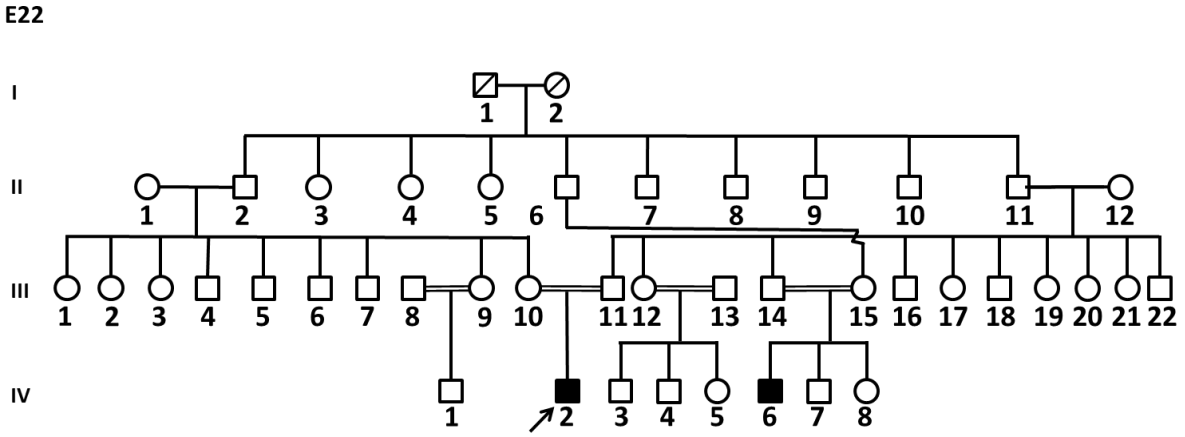




*SLC26A4* c.1229C>T, p.Thr410Met

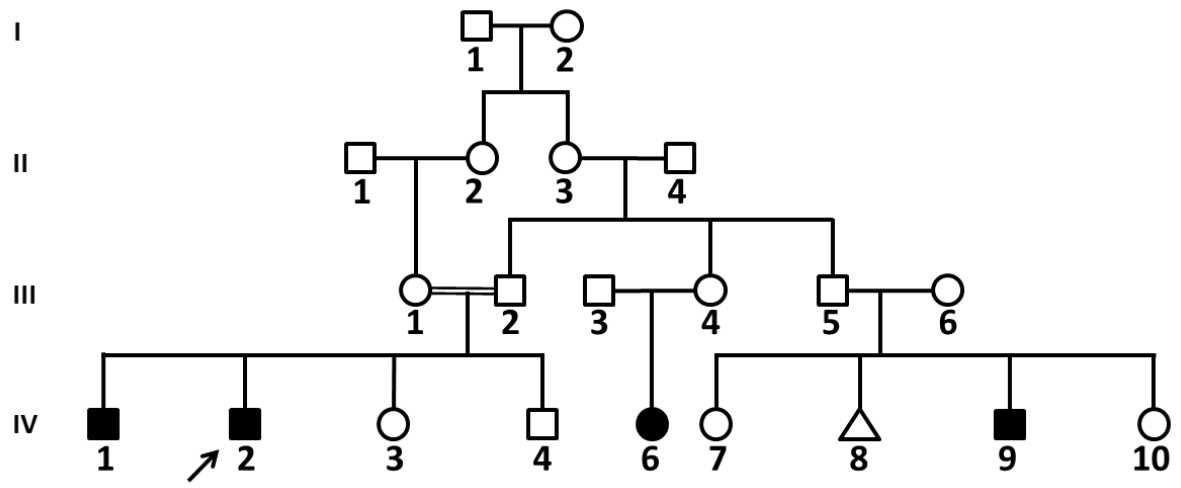
**E20**



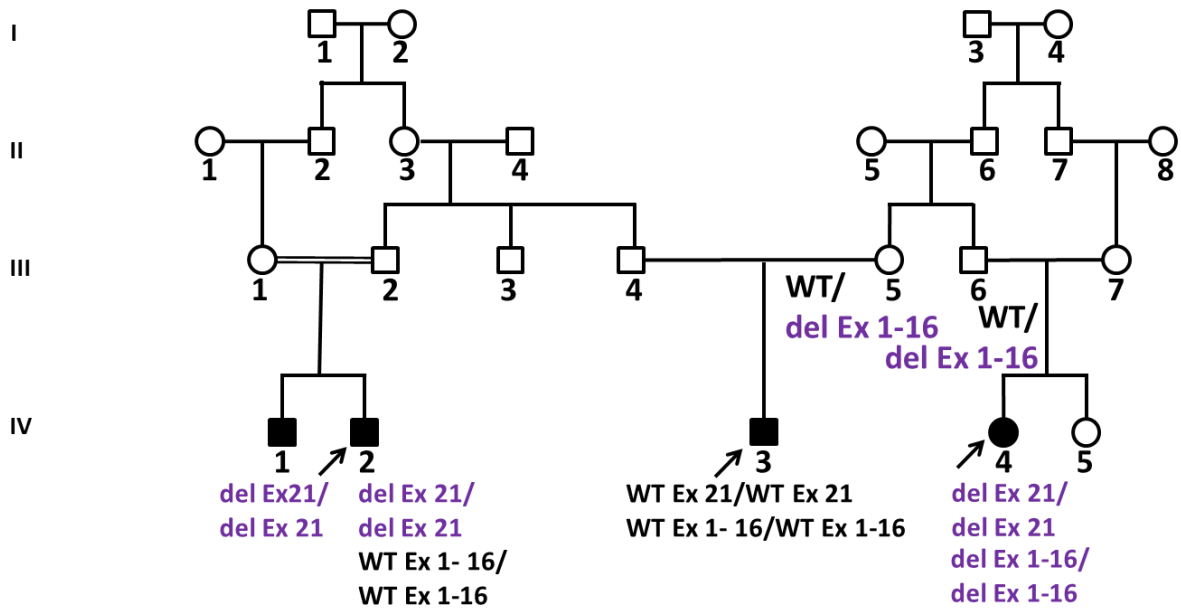

E21
I
II
III
IV
5133+1 G A
7489G G
11815 G A
5133+ 1 G A
7489 G A
1181 G G
5133+1 G A
7489 G A
1181 G G
5133+1A A
7489 G A
11815 G A
5133+1 A A
7489 G A
11815 G A
5133+1 G A
7489G G
11815 G G
5133+1A A
5133+1 G A
MYO15A c.5133+1G>A, p.?
7489 G A
7489G G
USH2A c.7489G>A, p.Val2497Met
11815 G A
11815 G G
USH2A c.11815G>A, p.Glu3939Lys


E22
I
II
III
IV

**E23**

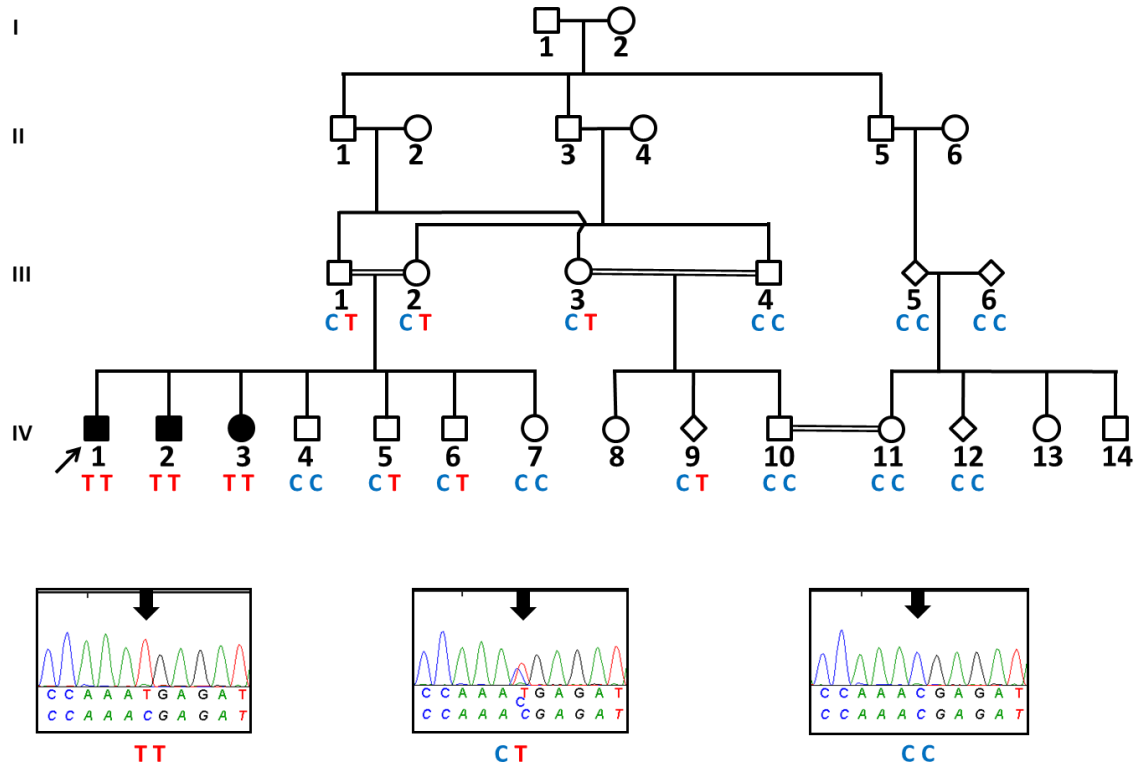



**E24**



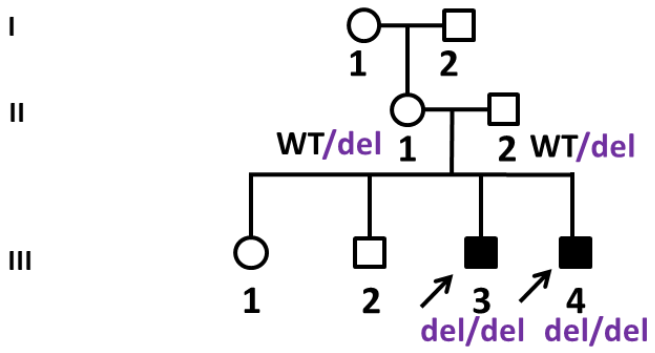

*OTOA* Deletion Ex21 bzw. zusätzlich homozygote Deletion Ex1-16 in IV-4

**E25**



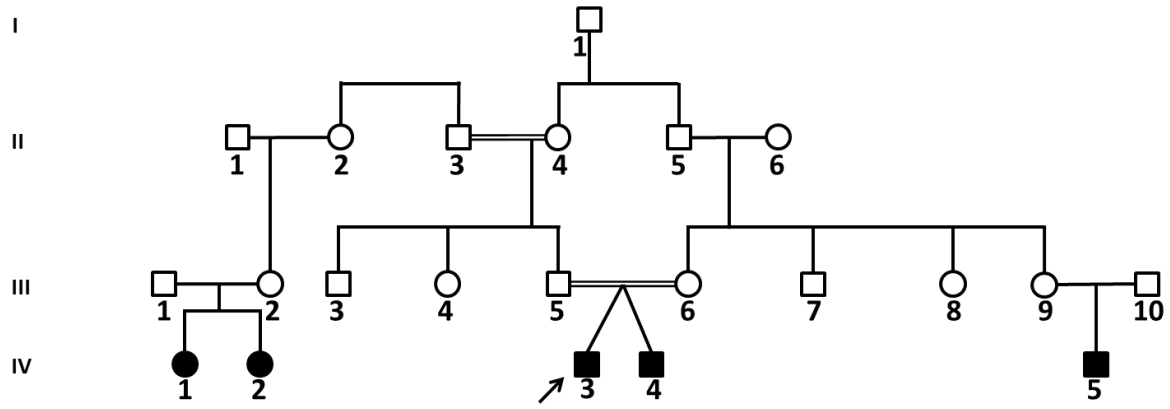

*TRIOBP* c.2521C>T, p.Arg841*

**E26**

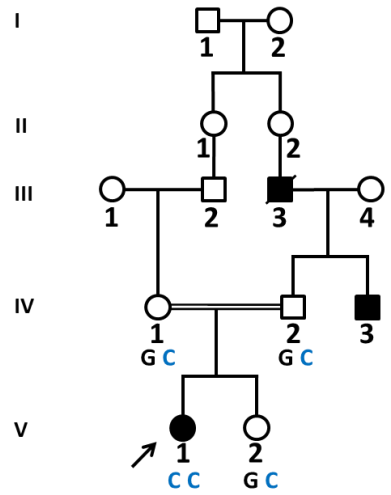


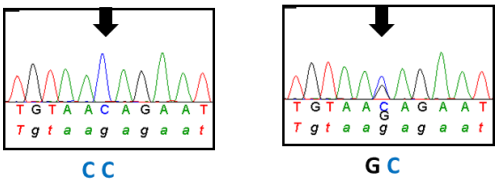

*COL9A1* c.697-3754_2112+769del, p.(Phe233_Ser704del)

**E27**



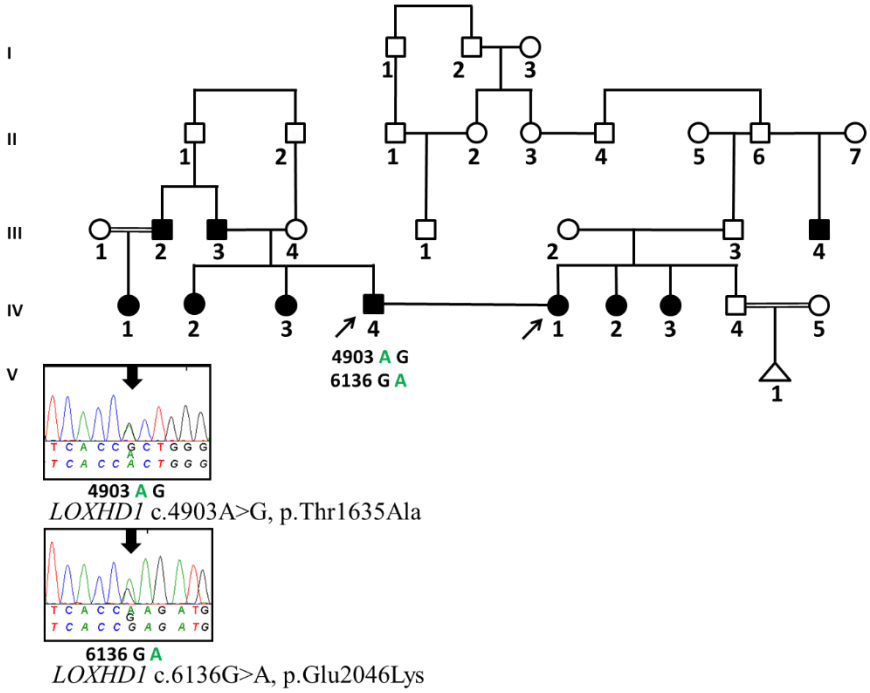

**E28**




*TECTA* c.5272+5G>C, p.?

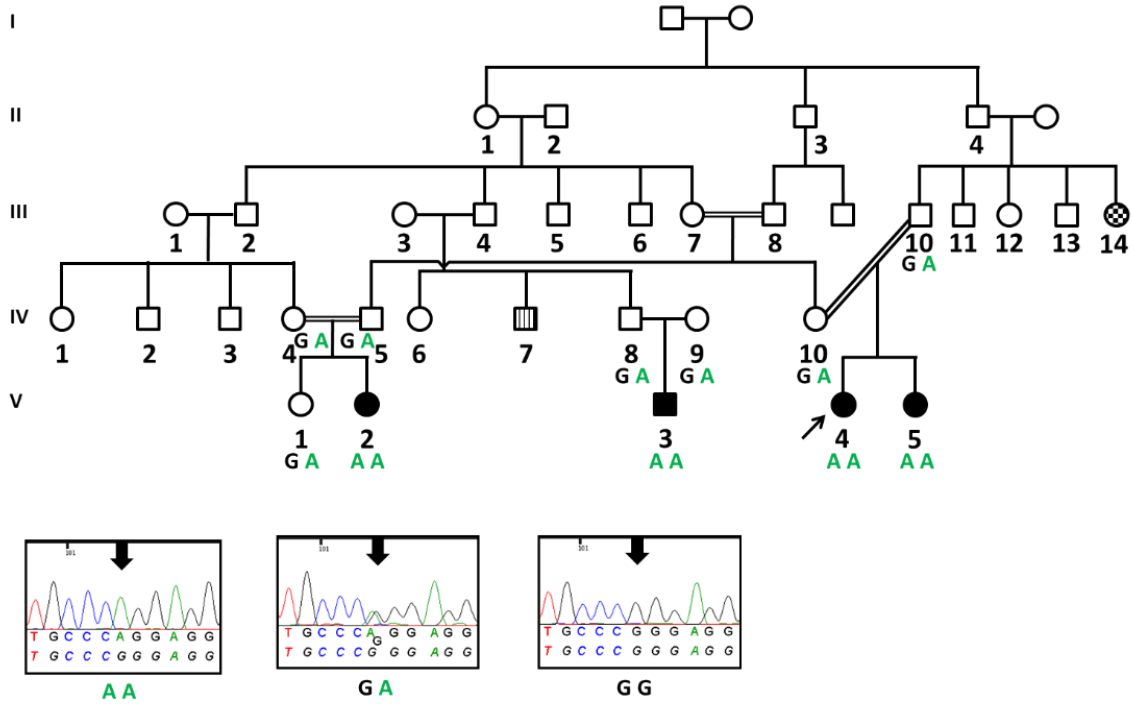
**E29**




*LOXHD1* c.4903A>G, p.Thr1635Ala

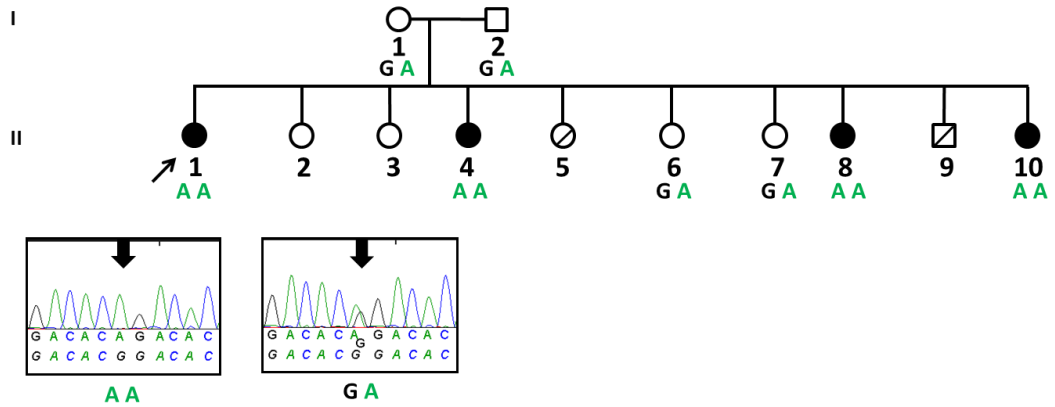
*LOXHD1* c.6136G>A, p.Glu2046Lys

**E30**



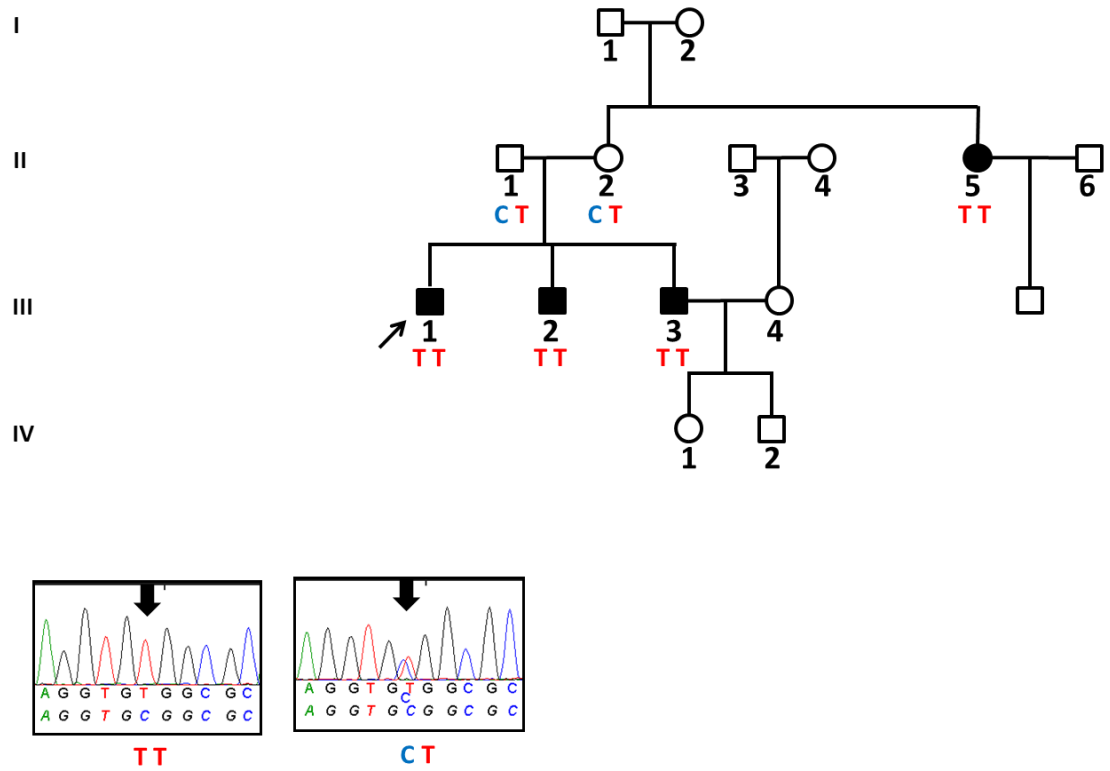

*S1PR2* c.323G>A, p.Arg108Gln

**E31**



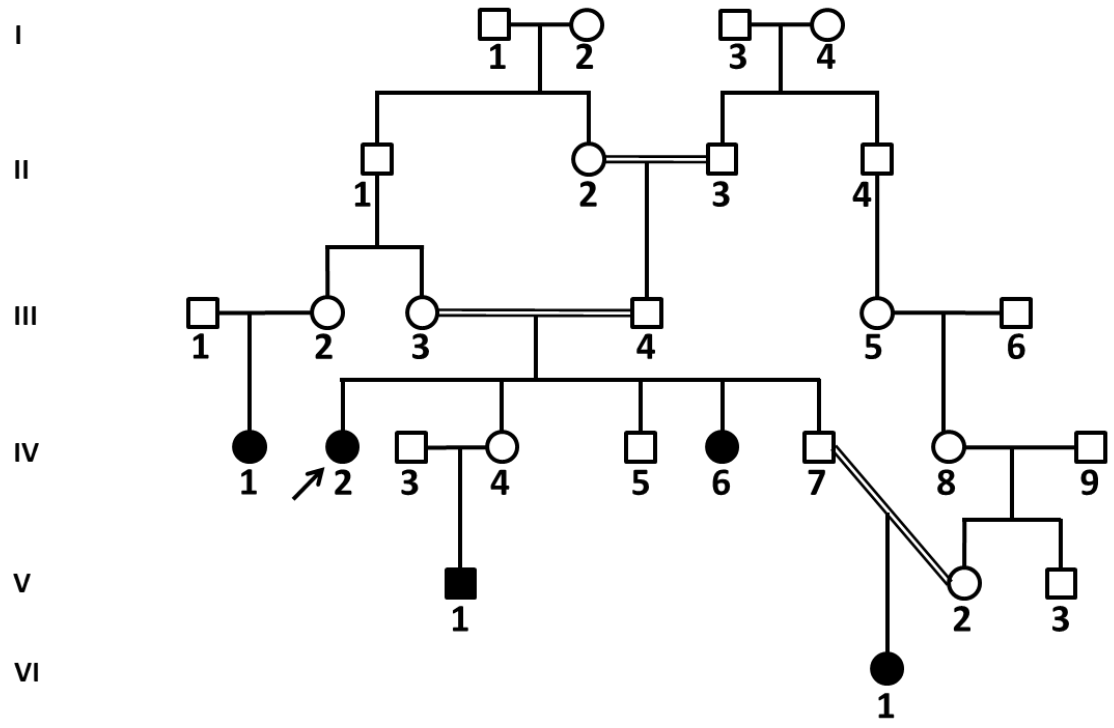

*MYO7A* c.3719G>A, p.Arg1240Gln

**E32**

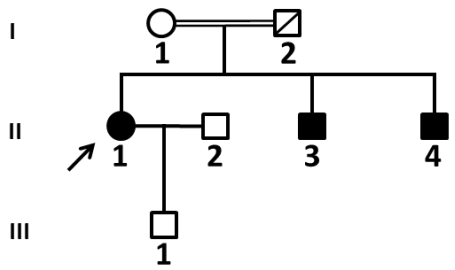



*LHFPL5* c.472C>T, p.Arg158Trp

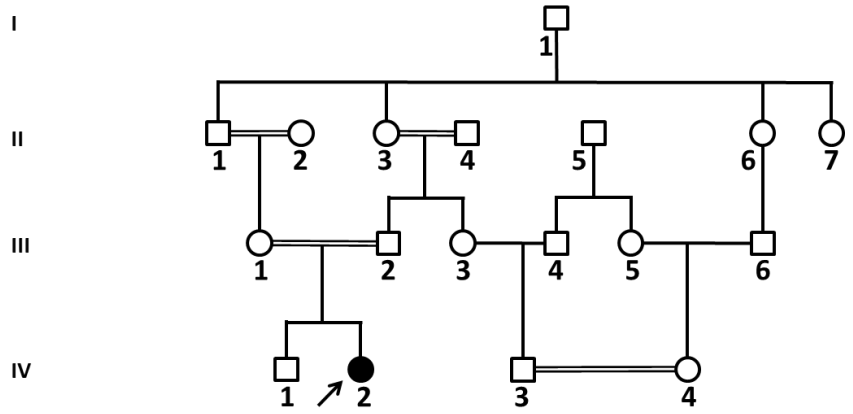
**E33**



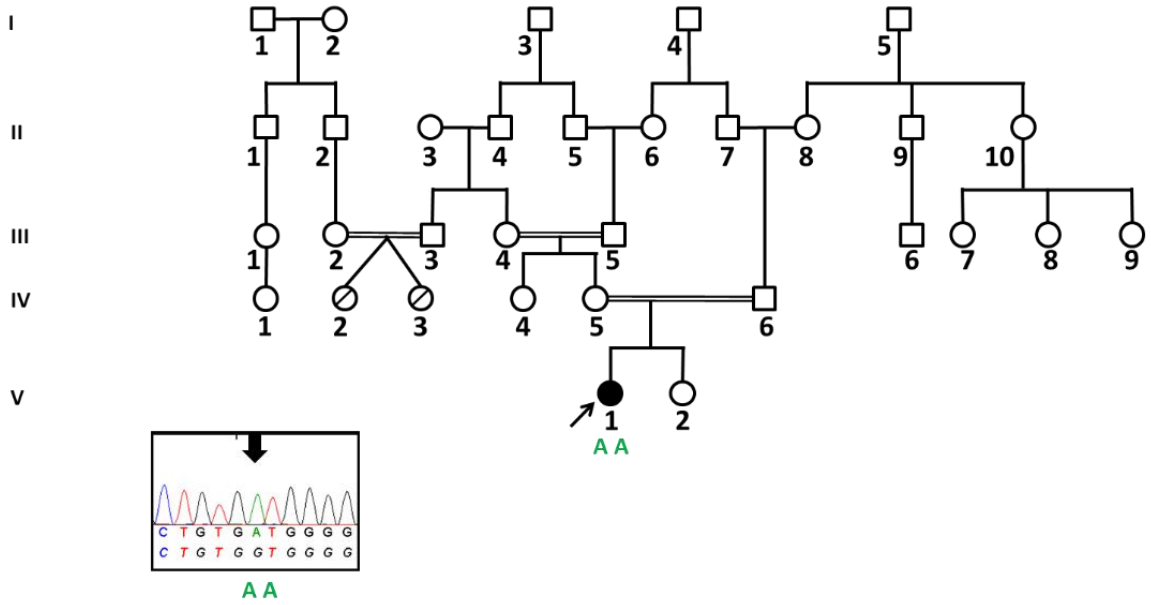

**E34**



**E35**

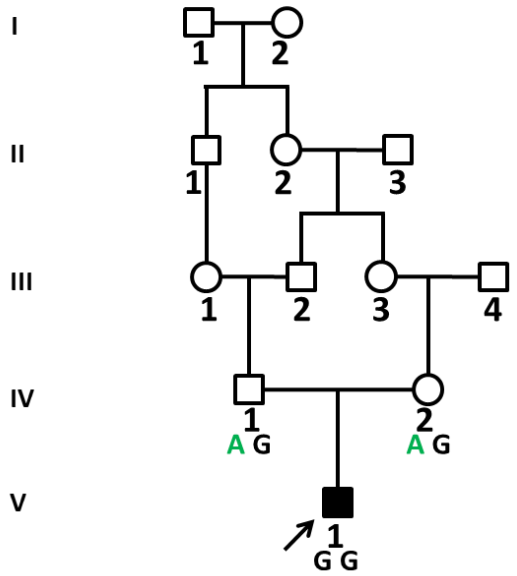


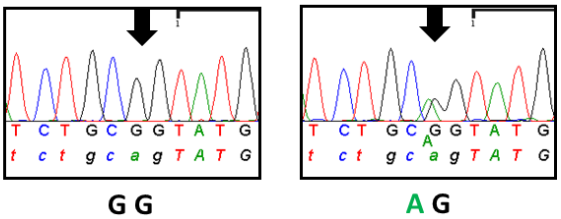

**E36**




*KCNQ1* c.912G>A, p.Trp304*

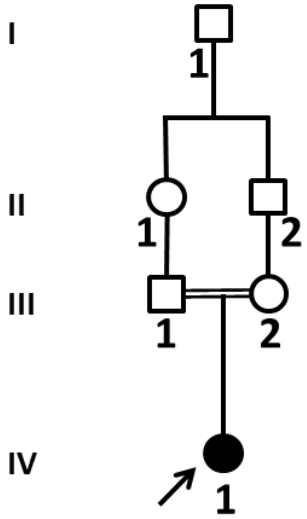
**E37**



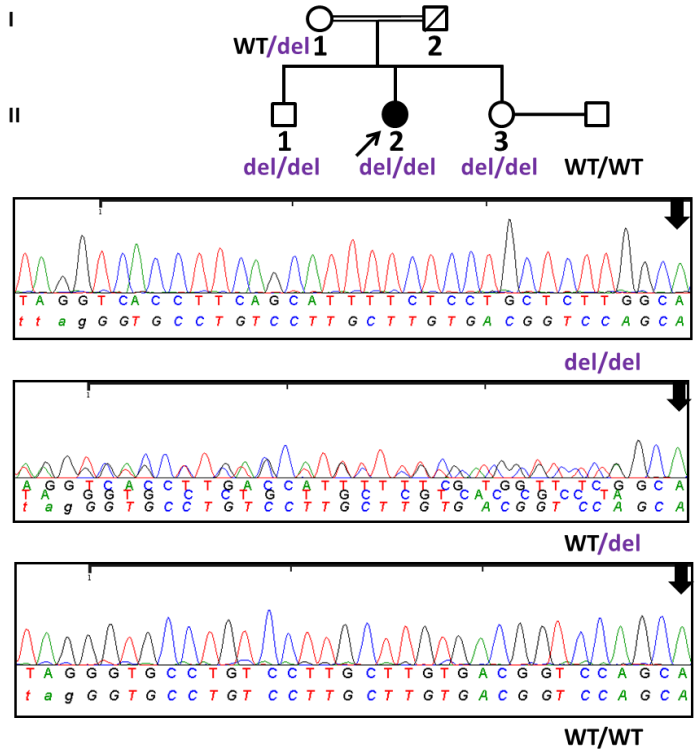




*PDZD7* c.1750-2A>G, p.?

**E38**

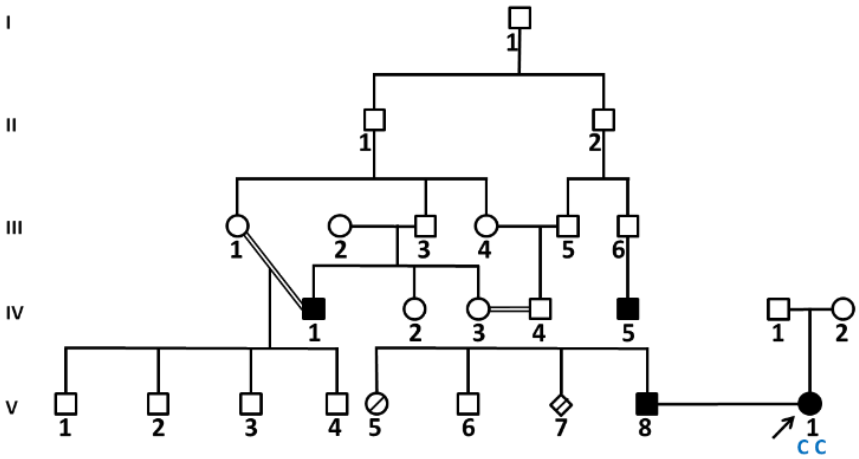


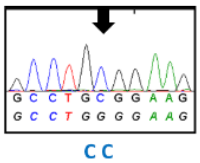
**E39**




*ILDR1* c.59-5_89del, p.?

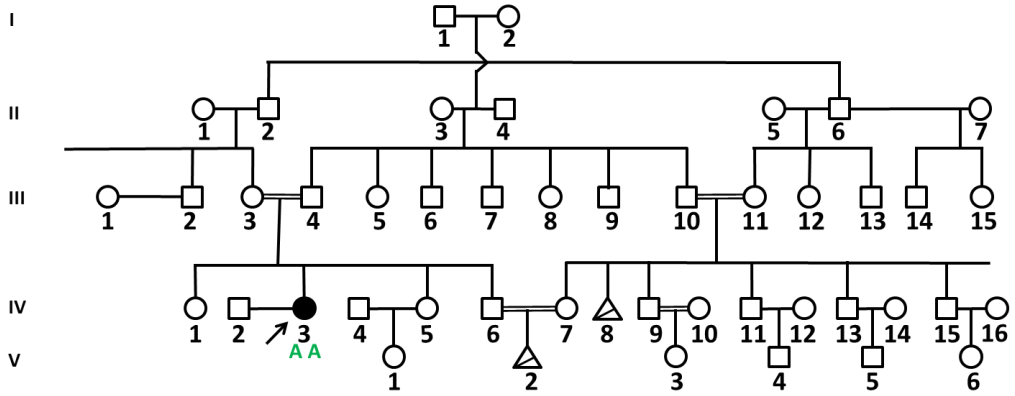
**E40**

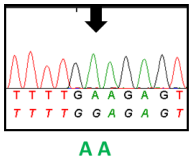



*OTOA* c.1939G>C, p.Gly647Arg

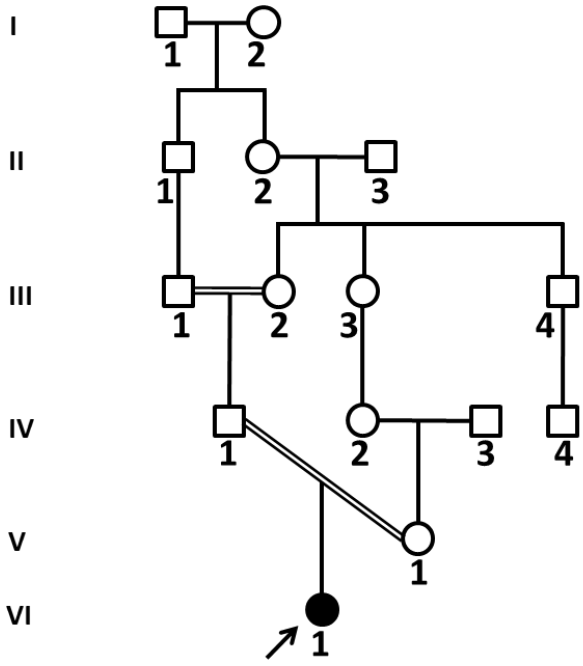
**E41**



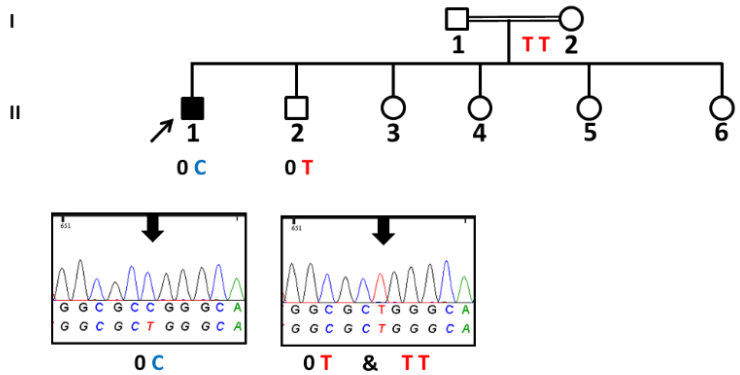




*LOXHD1* c.593G>A, p.Gly198Glu

**E42**

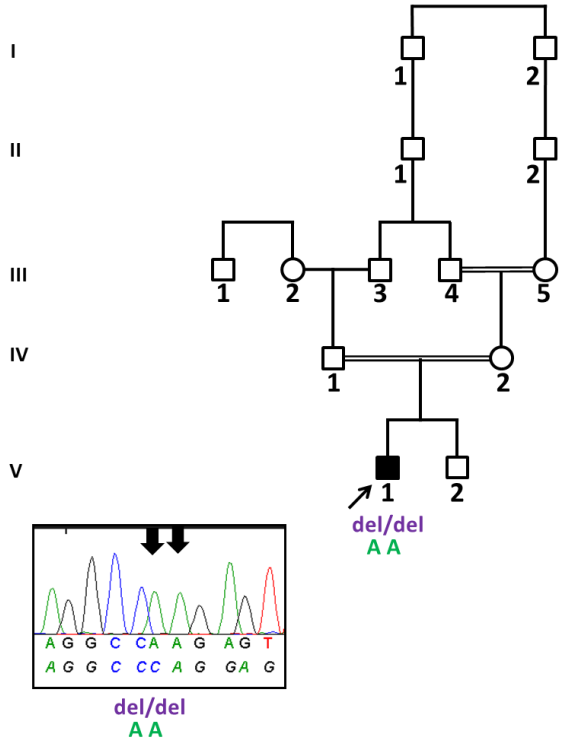


**E43**




*POU3F4* c.656T>C, p.Leu219Pro

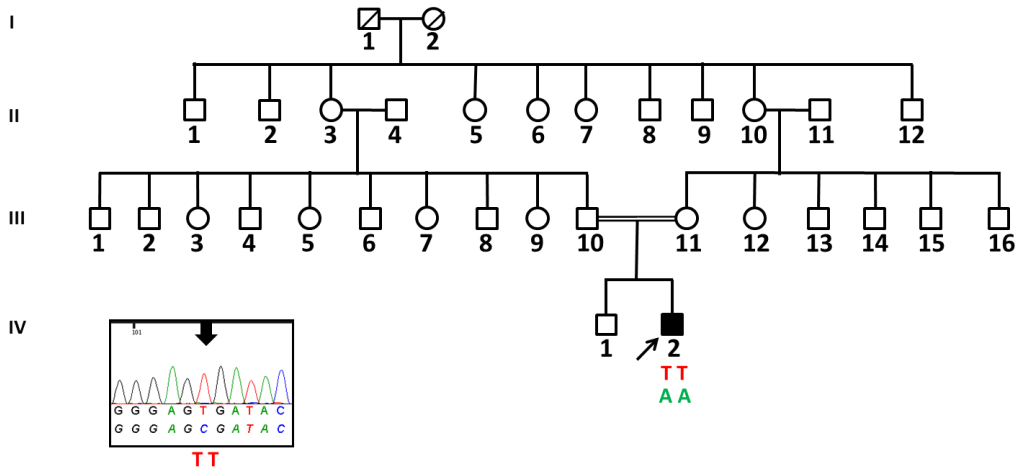
**E44**




*CLPP* c.706del, p.Gln236Argfs*6 + *CLPP* c.708G>A, p.Gln236Gln

**E45**

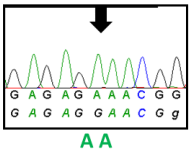
**E46**





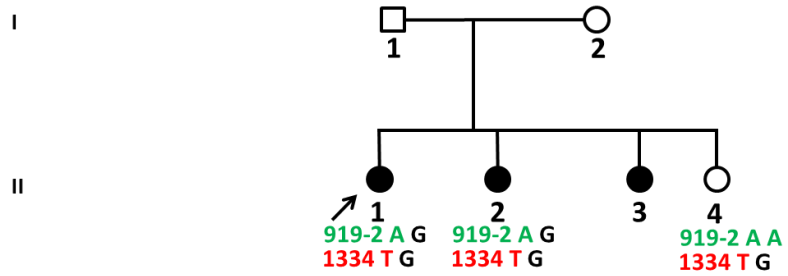


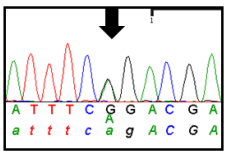
*LOXHD1* c.4480C>T, p.Arg1494*

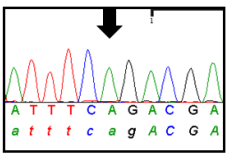



*LOXHD1* c.4526G>A, p.Gly1509Glu

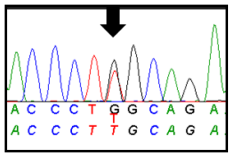
**E47**



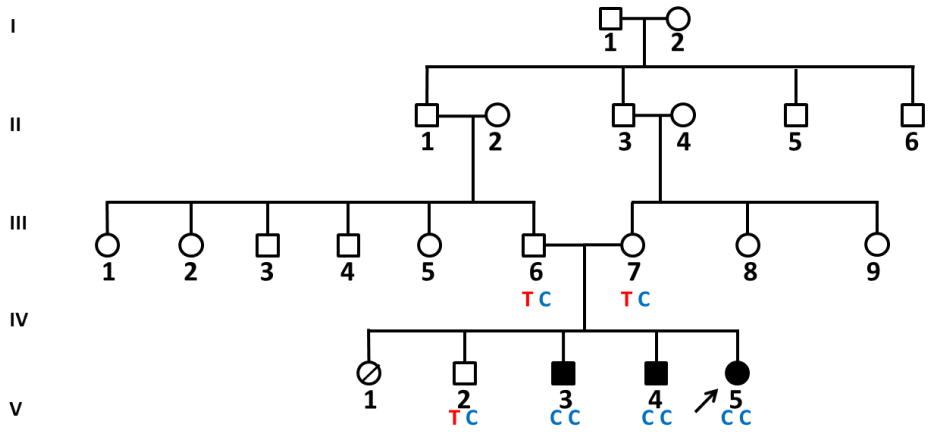



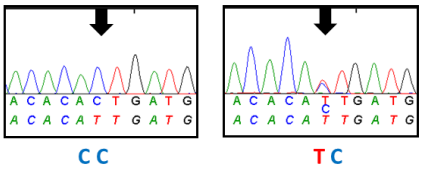

*SLC26A4* c.919-2A>G, p.?




*SLC26A4* c.1334T>G, p.Leu445Trp

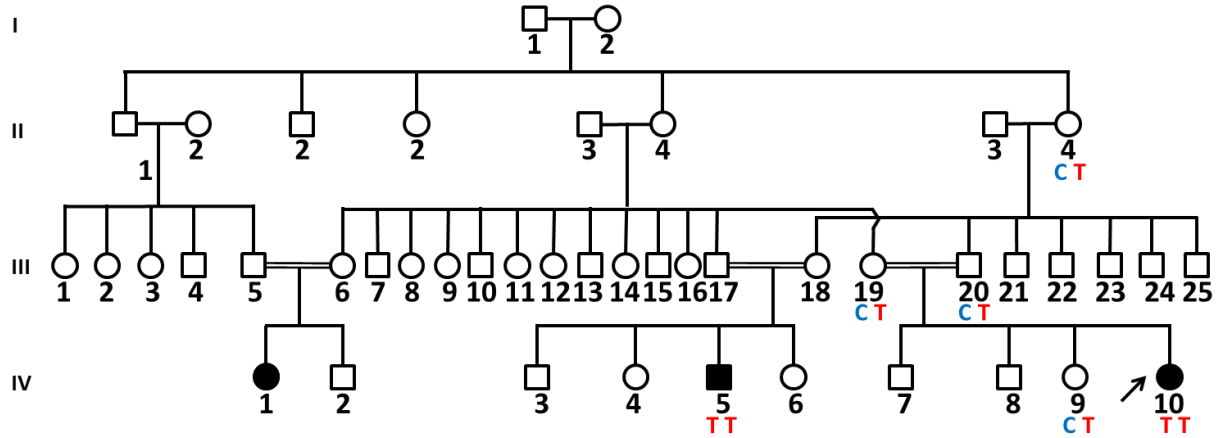
**E48**

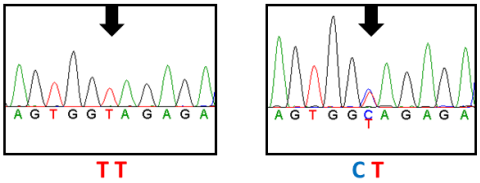



*OTOA* c.1727T>C, p.Ile576Thr

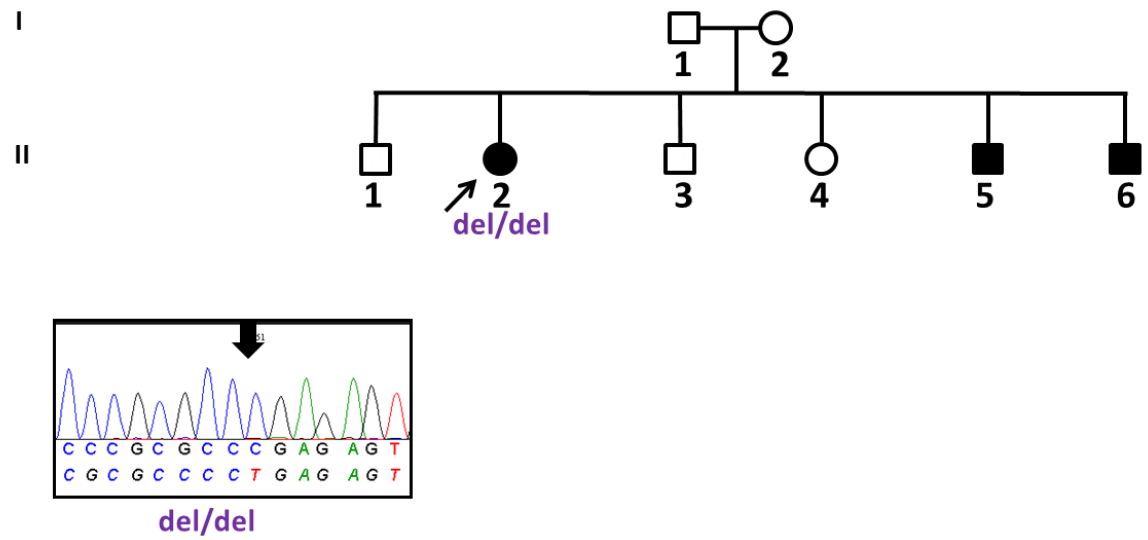
**E49**



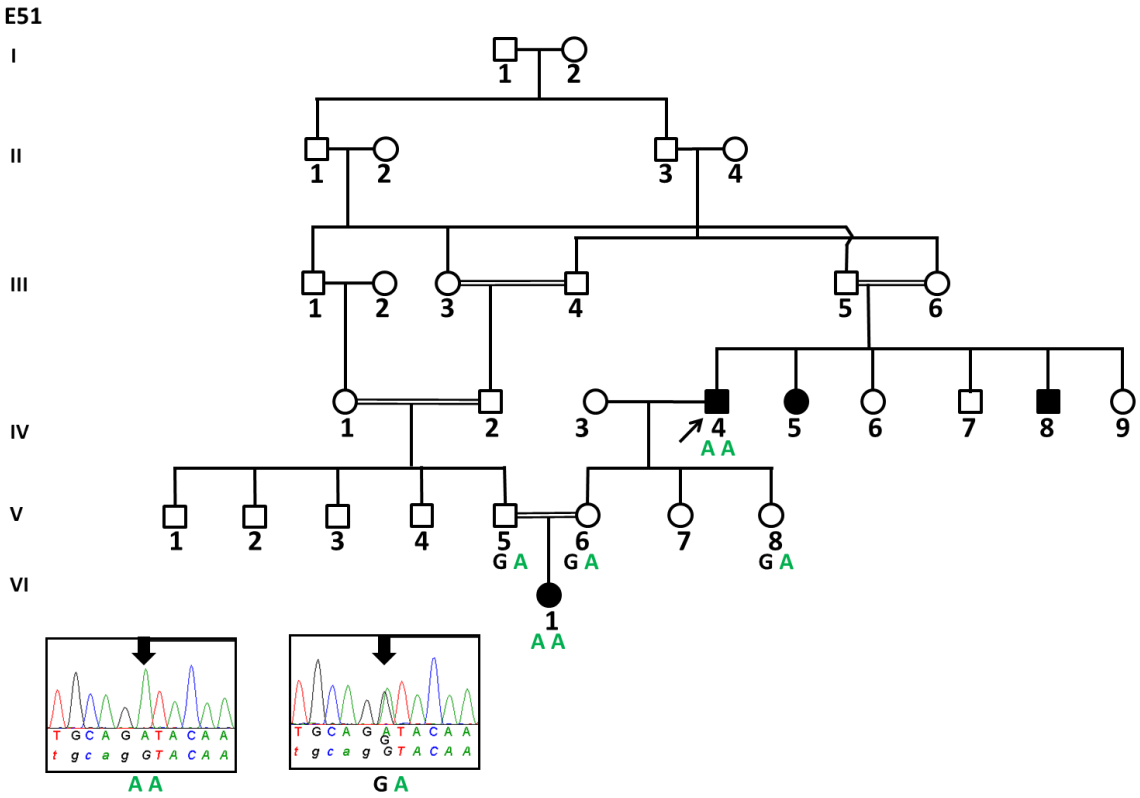

*PCDH15* c.*21519C>T, p.Gln1576Stop

**E50**

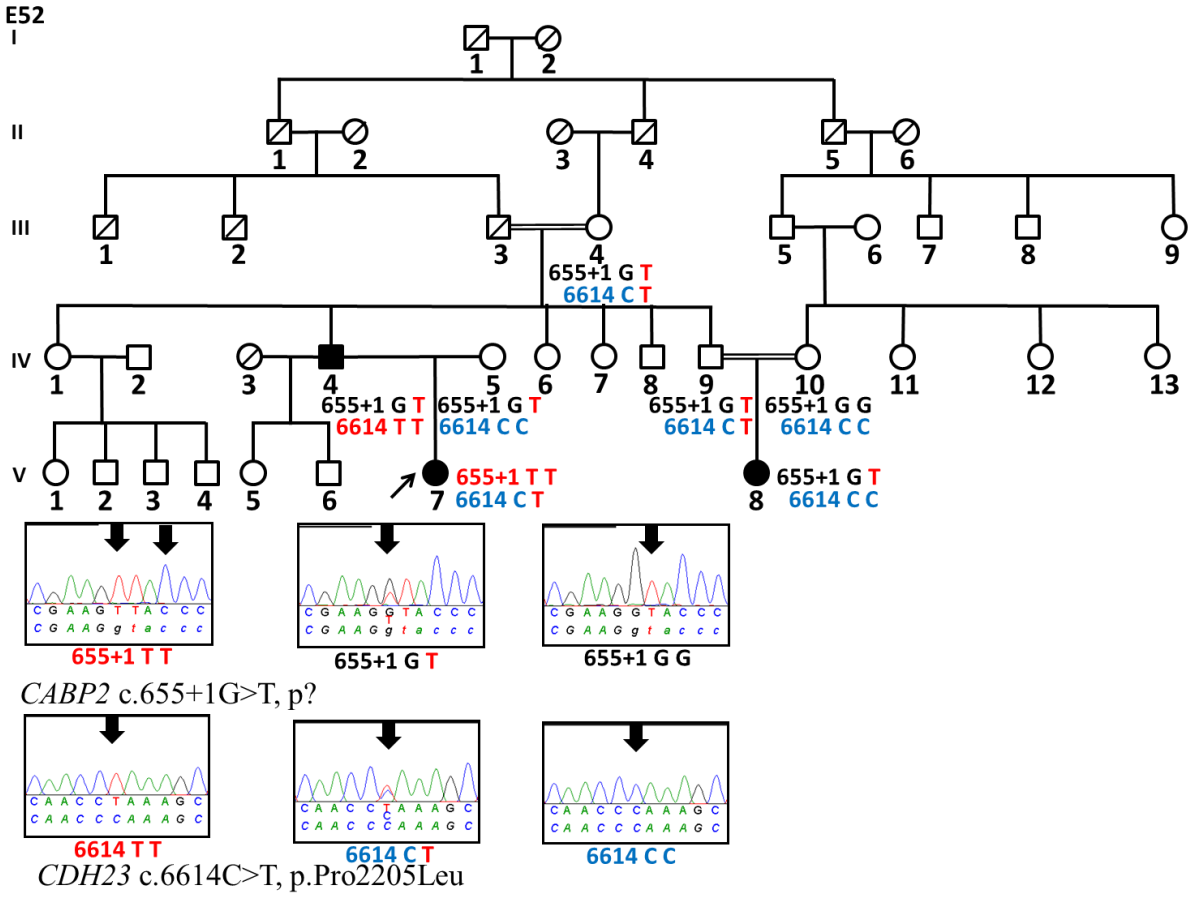


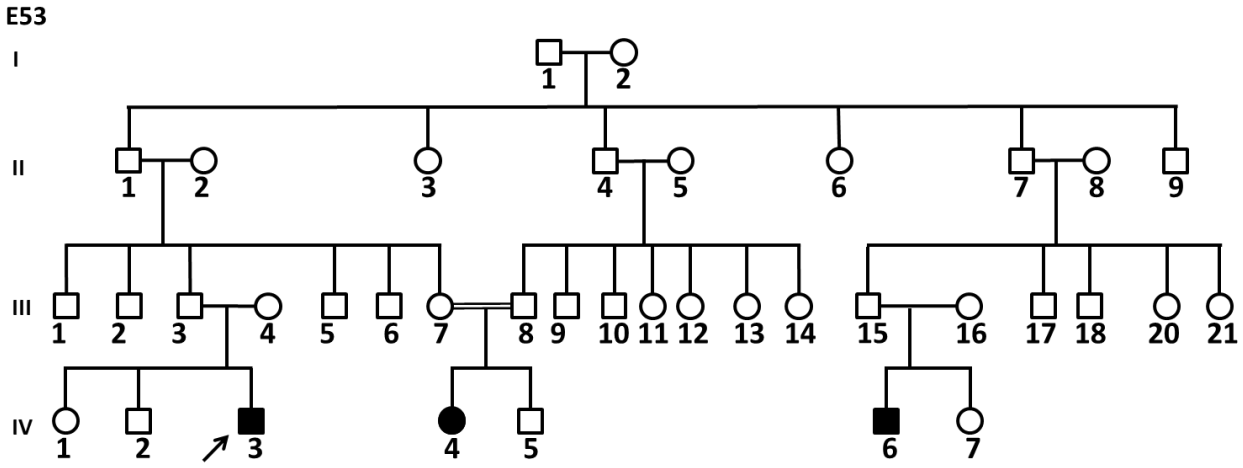

*TRIOBP* c.3140_3141del, p.Pro1047Argfs*3

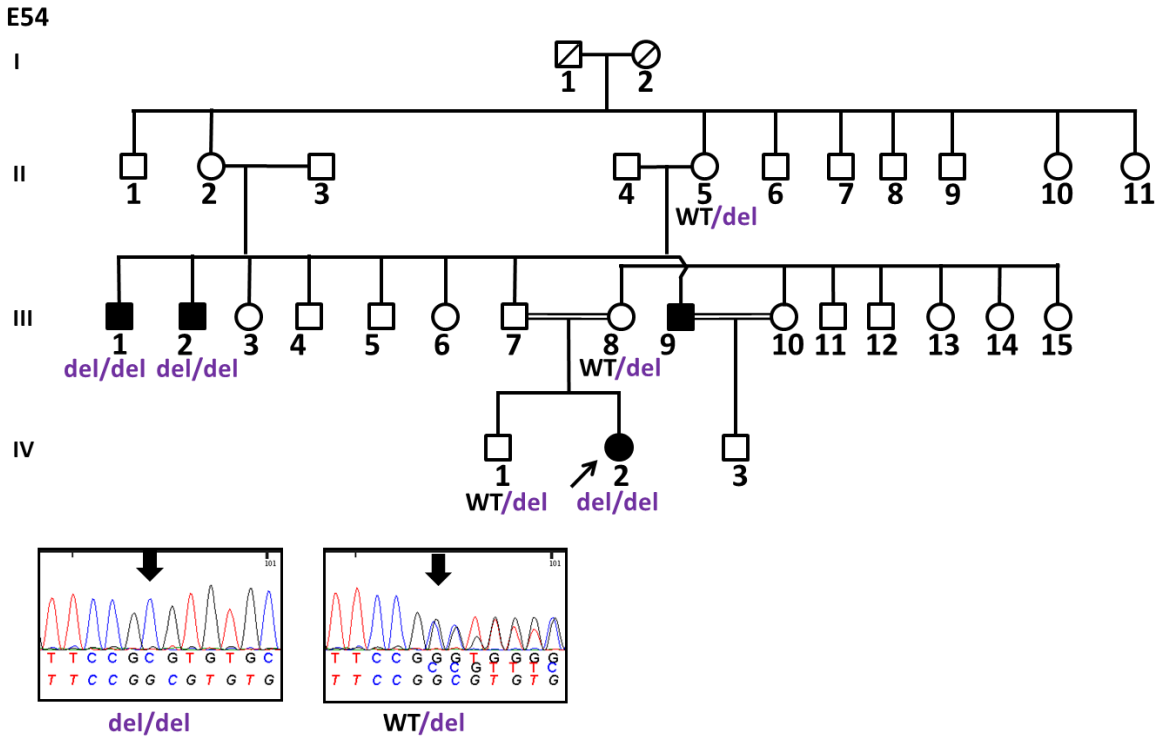
**E51**



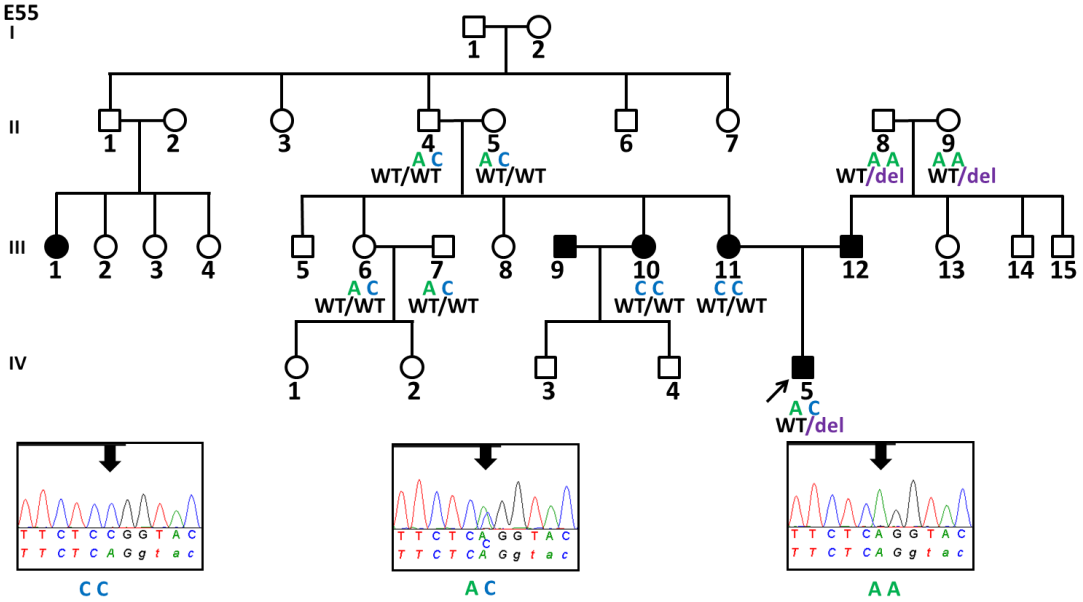

*PCDH15* c.173G>A, p.Gly58Asp


E52
I
II
III
IV
V
655+1 G T
6614 C T
655+1 G T
6614 T T
655+1 G T
6614 C C
655+1 G T
6614 C T
655+1 G G
6614 C C
655+1 T T
6614 C T
655+1 G T
6614 C C
655+1 T T
655+1 G T
655+1 G G
CABP2 c.655+1G>T, p?
6614 T T
6614 C T
6614 C C
CDH23 c.6614C>T, p.Pro2205Leu

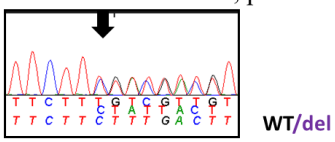

E53
I
II
III
IV




*MYO15A* c.9882delG, p.Arg3295Valfs*16

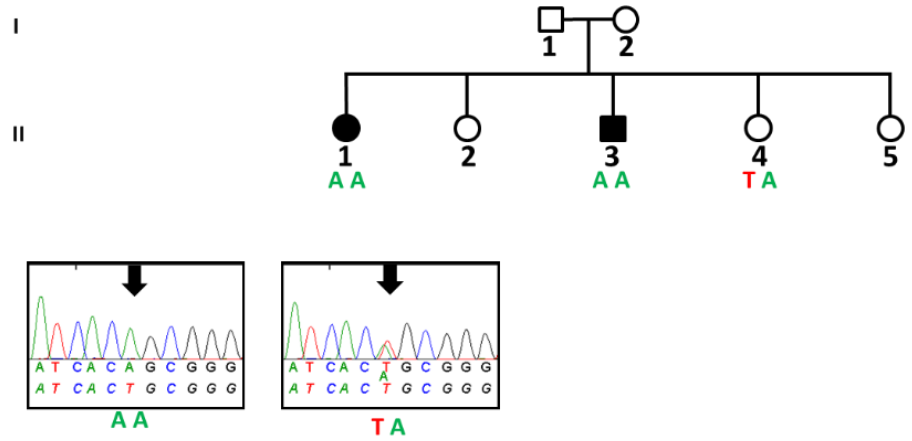



*MYO7A* c.4440A>C, p.Ser1480Ser



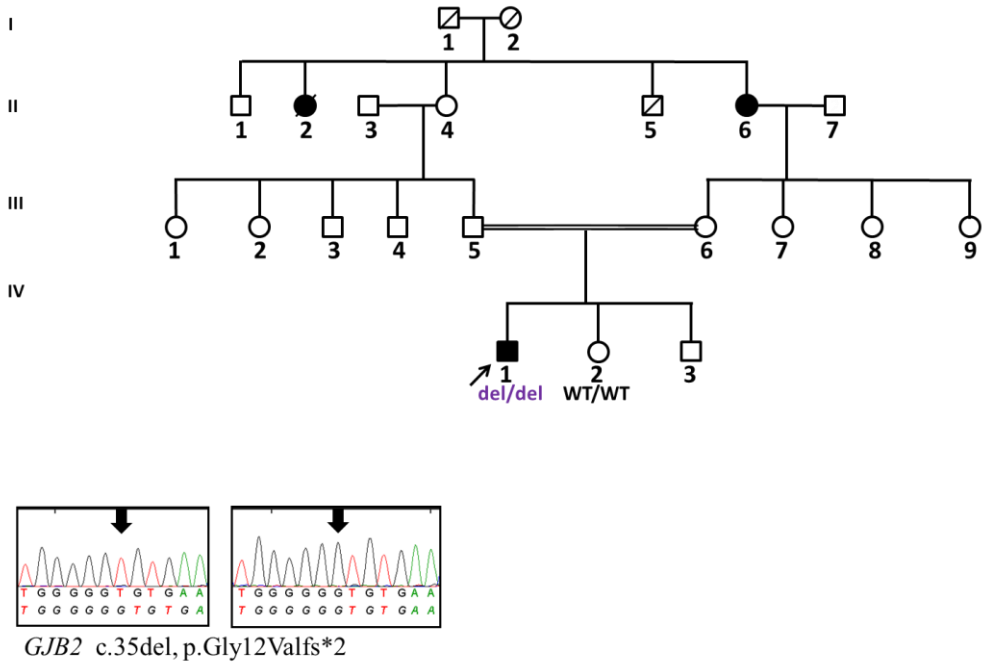

*MYO7A* c.5886_5888del, p.Phe1963del

**E56**



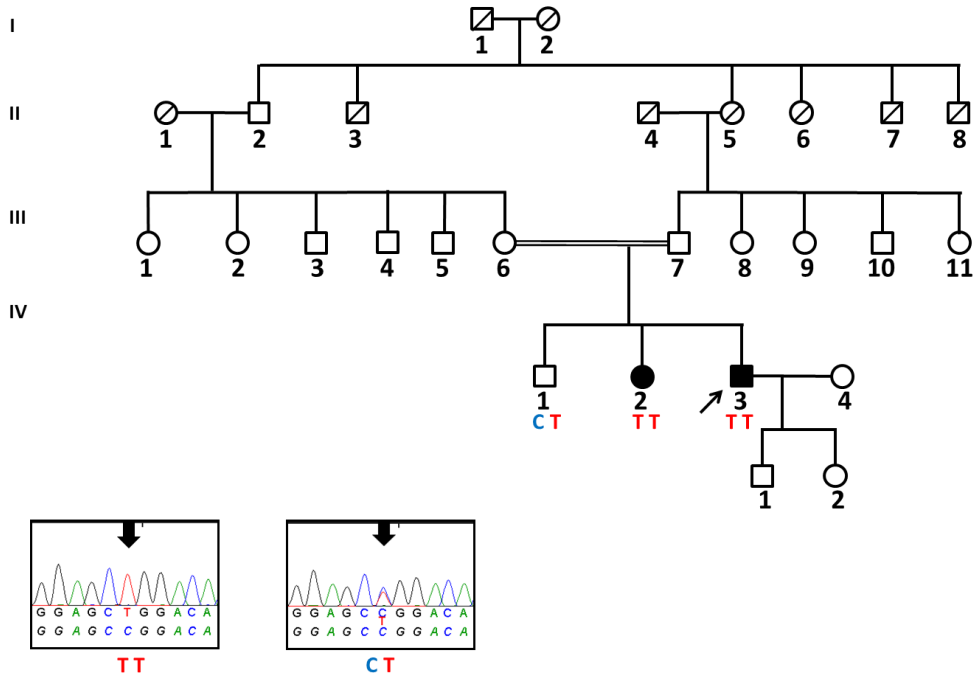

*SLC26A4* c.2027T>A, p.Leu676Gln

**E57**



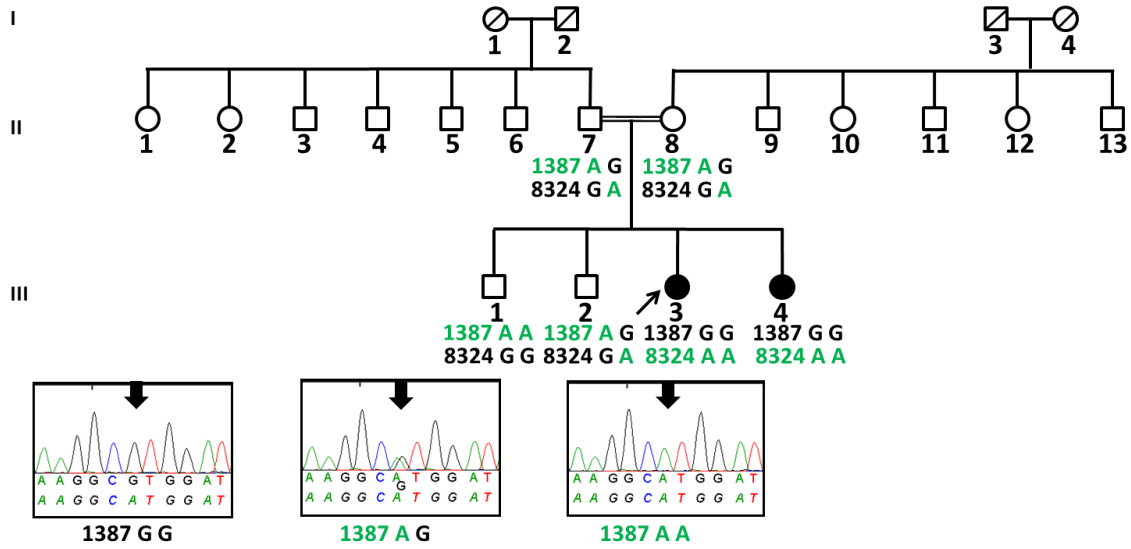

*GJB2* c.35del, p.Gly12Valfs*2

**E58**

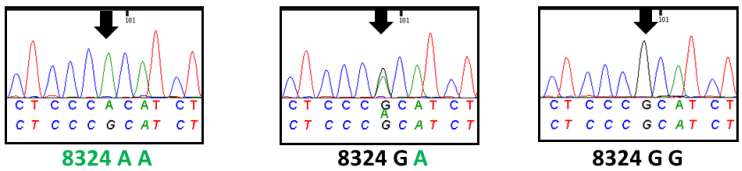



*MYO15A* c.5203C>T, p.Arg1735Trp

**E59**

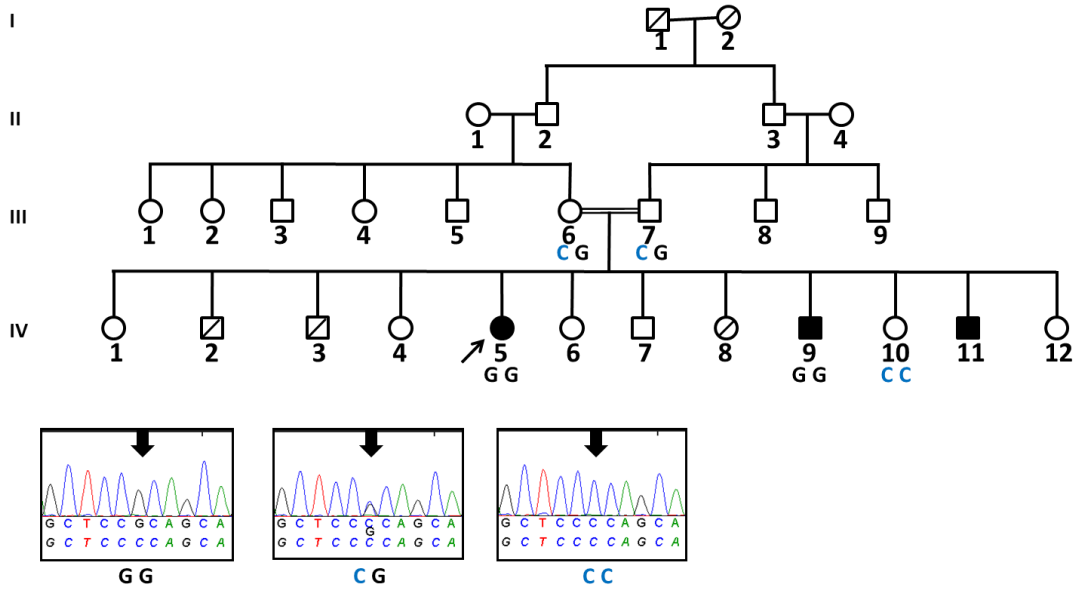



*MYO15A* c.1387A>G, p.Met463Val



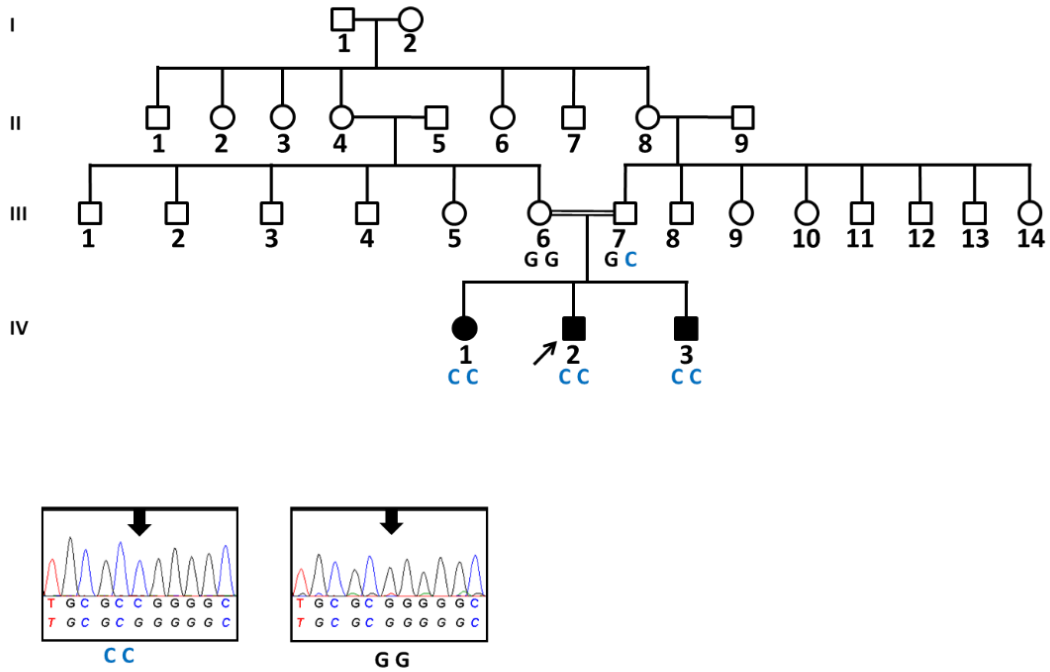

*MYO15A* c.8324G>A, p.Arg2775His

**E60**



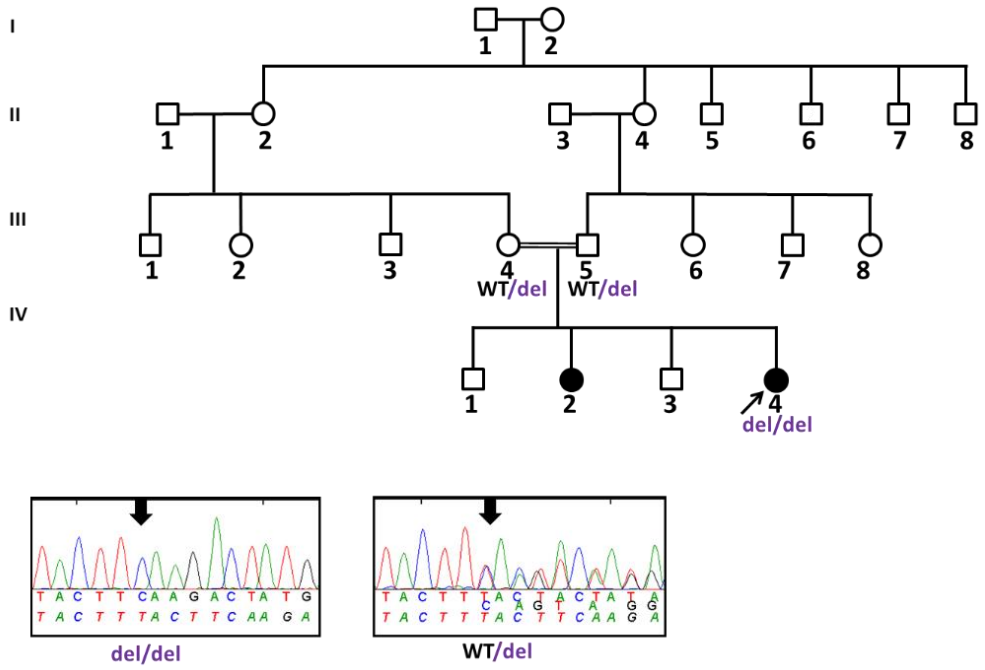

*MYO15A* c.9584C>G, p.Pro3195Arg

**E61**



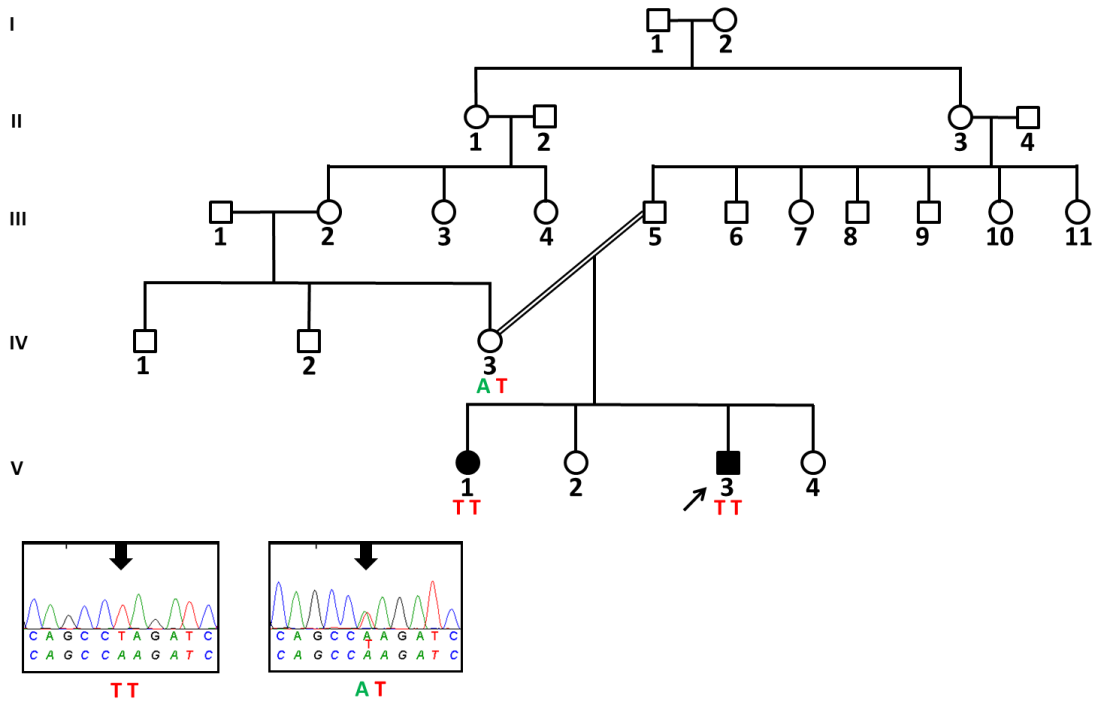

*PDZD7* c.307G>C, p.Gly103Arg

**E62**



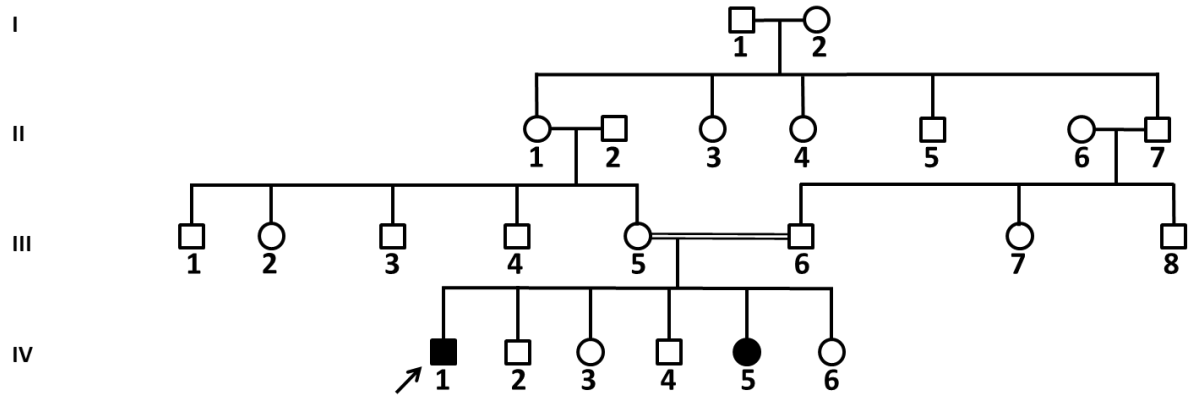

*GPSM2* c.881_885del, p.Leu294Serfs*4

**E63**

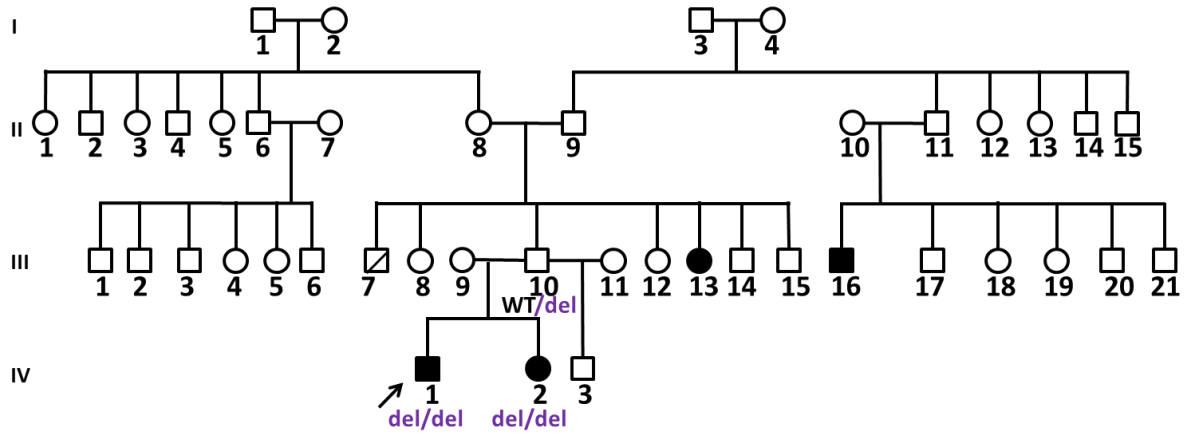


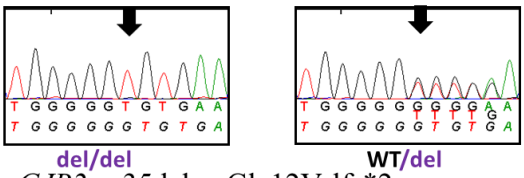

*LHFPL5* c.34A>T, p.Lys12*

**E64**

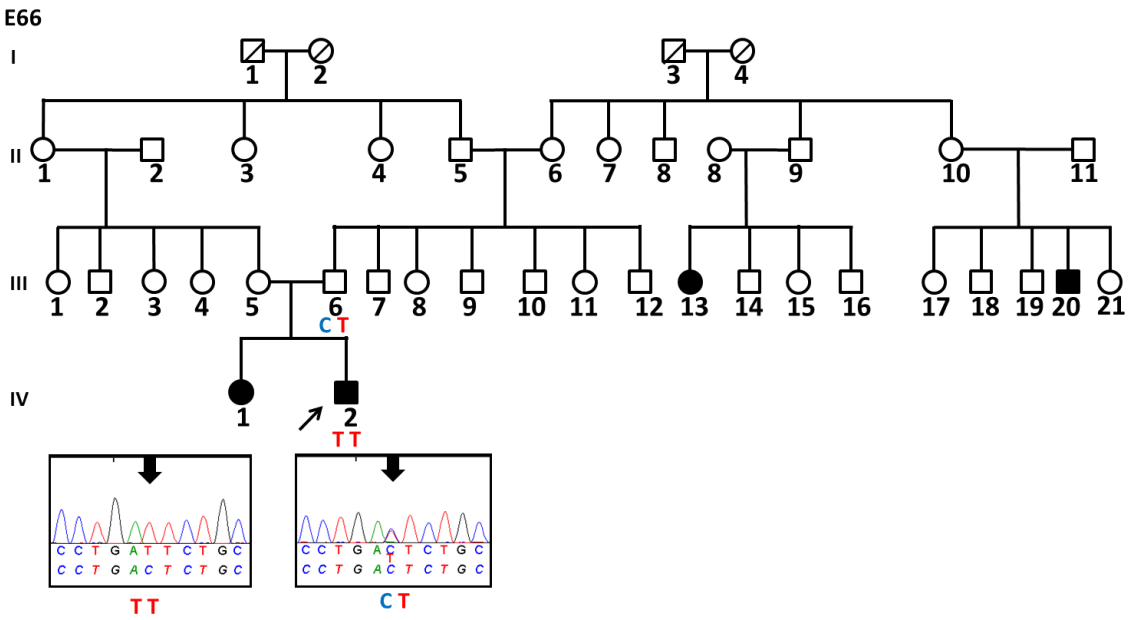



**E65**

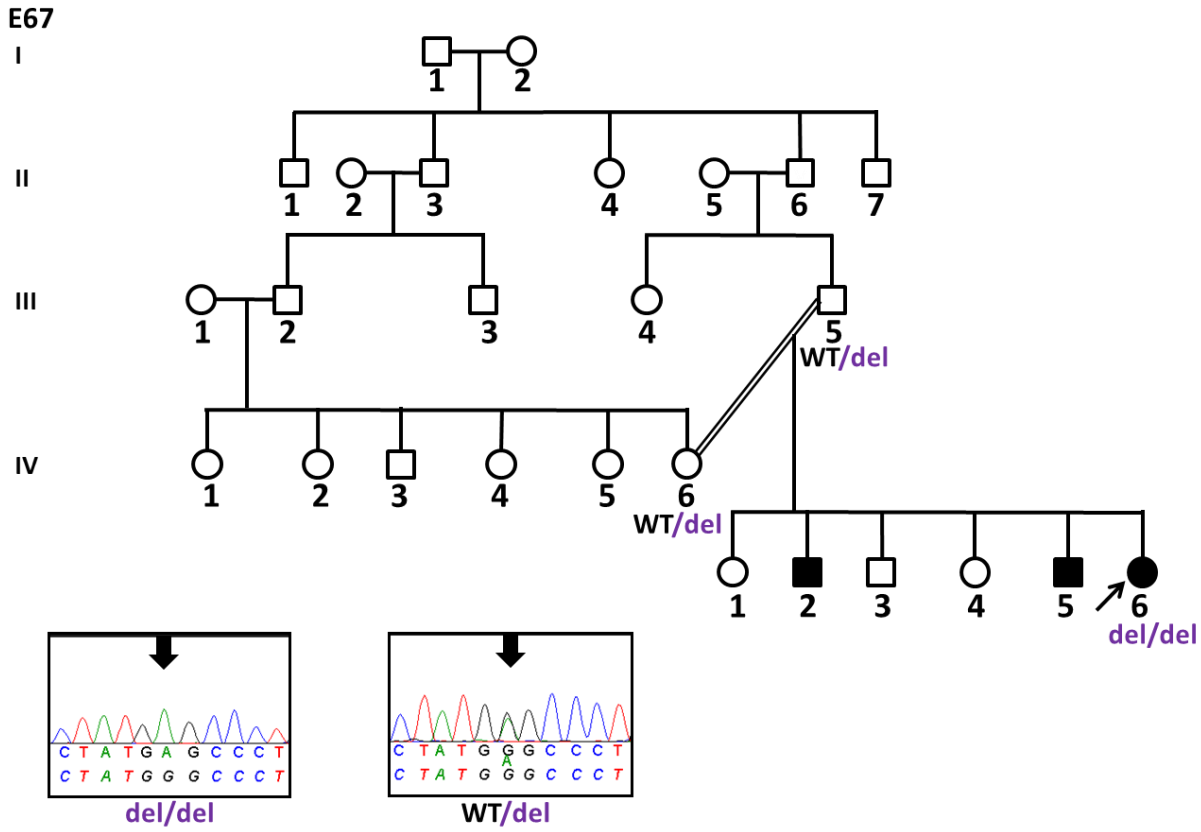


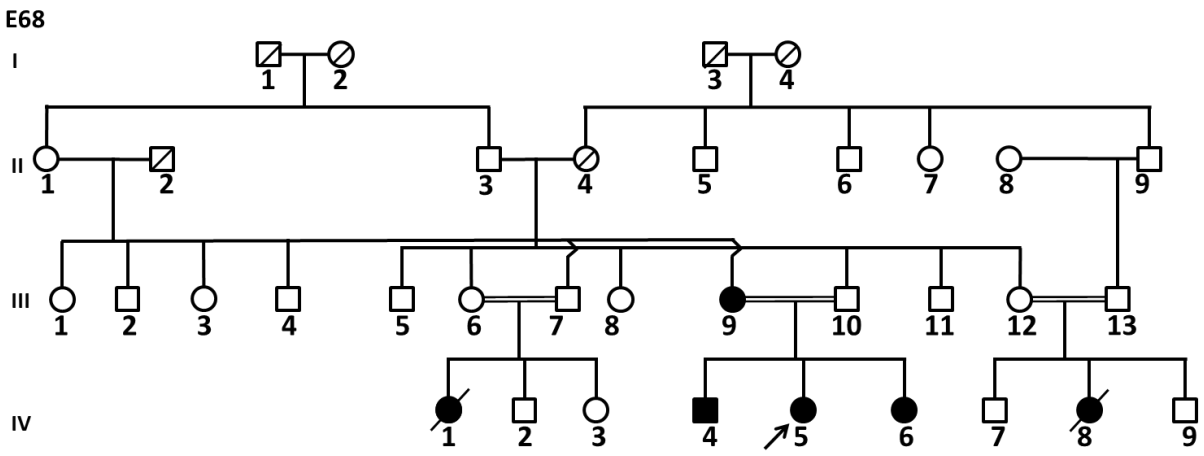

*GJB2* c.35del, p.Gly12Valfs*2

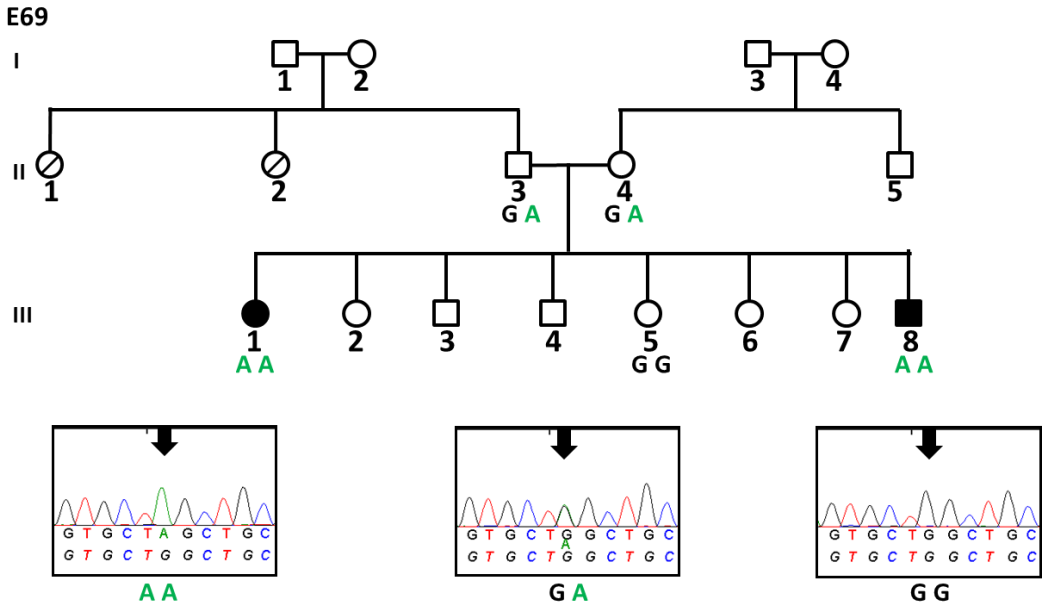



*SLC26A4* c. 578C>T, p.Thr193Ile

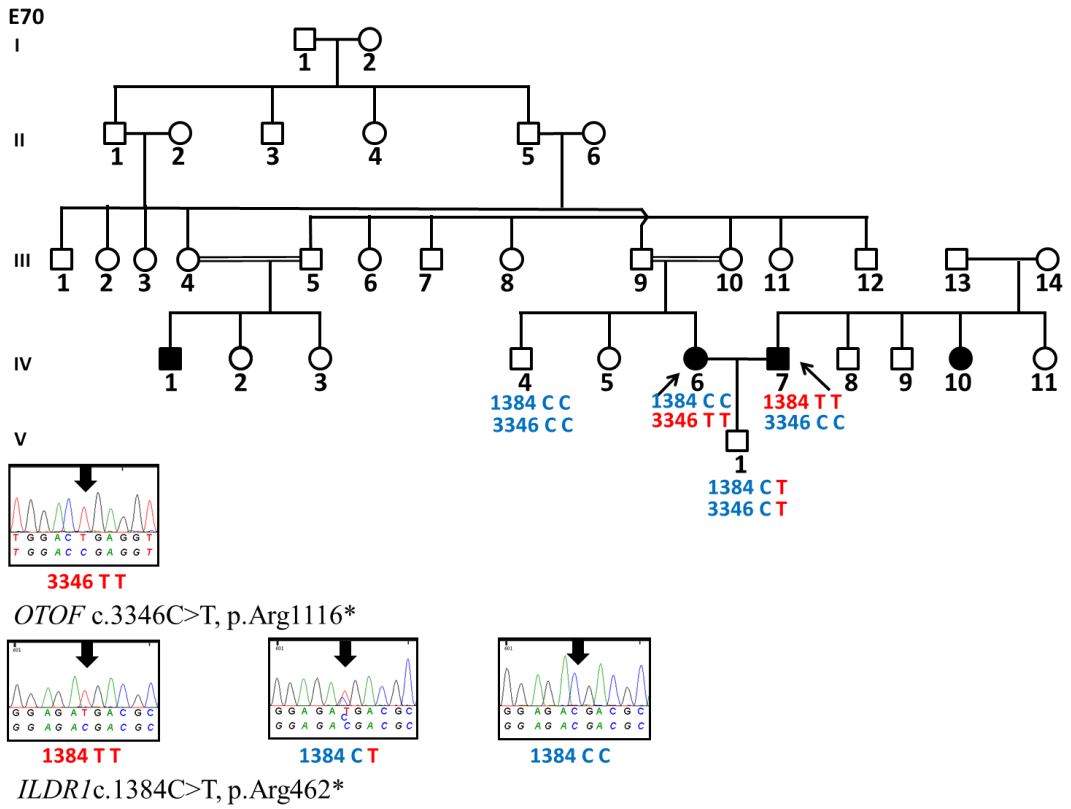



*GJB2* c.231G>A, p.Trp77*



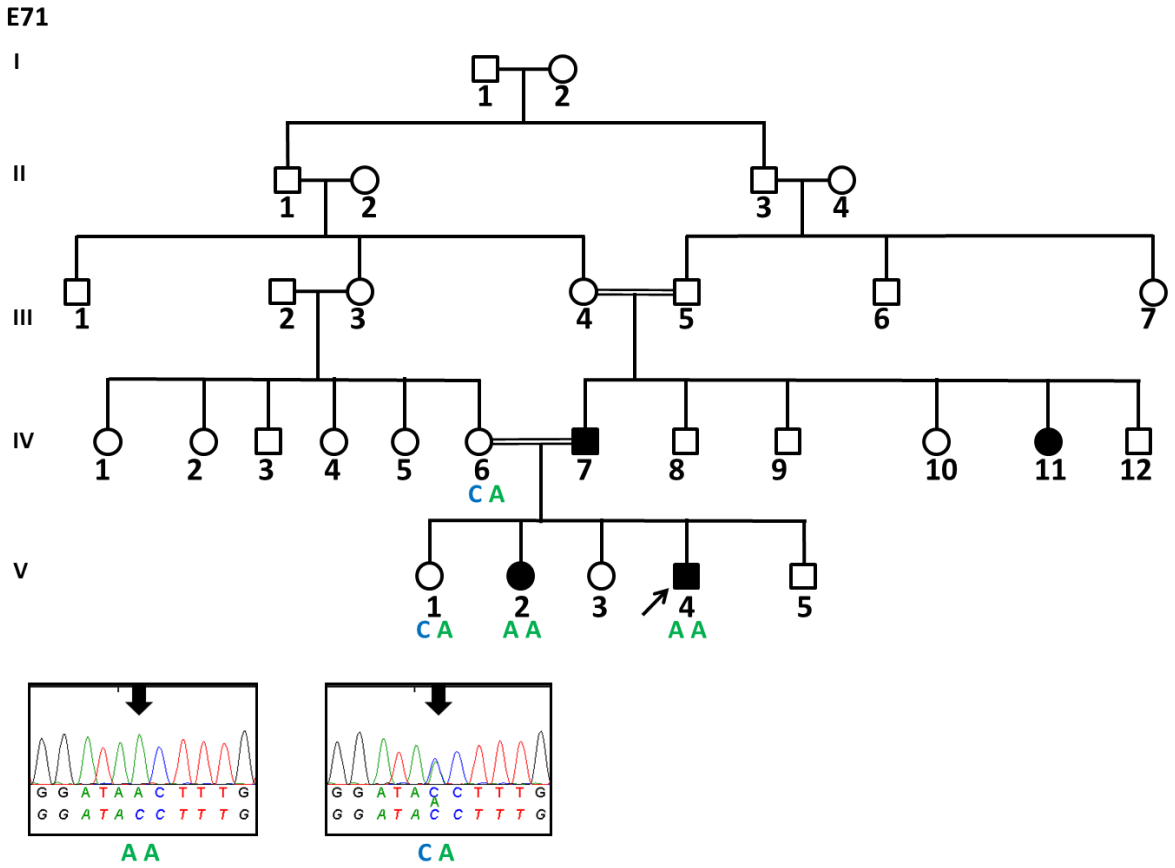

*MYO15A* c.8725G>A, p.Gly2909Ser



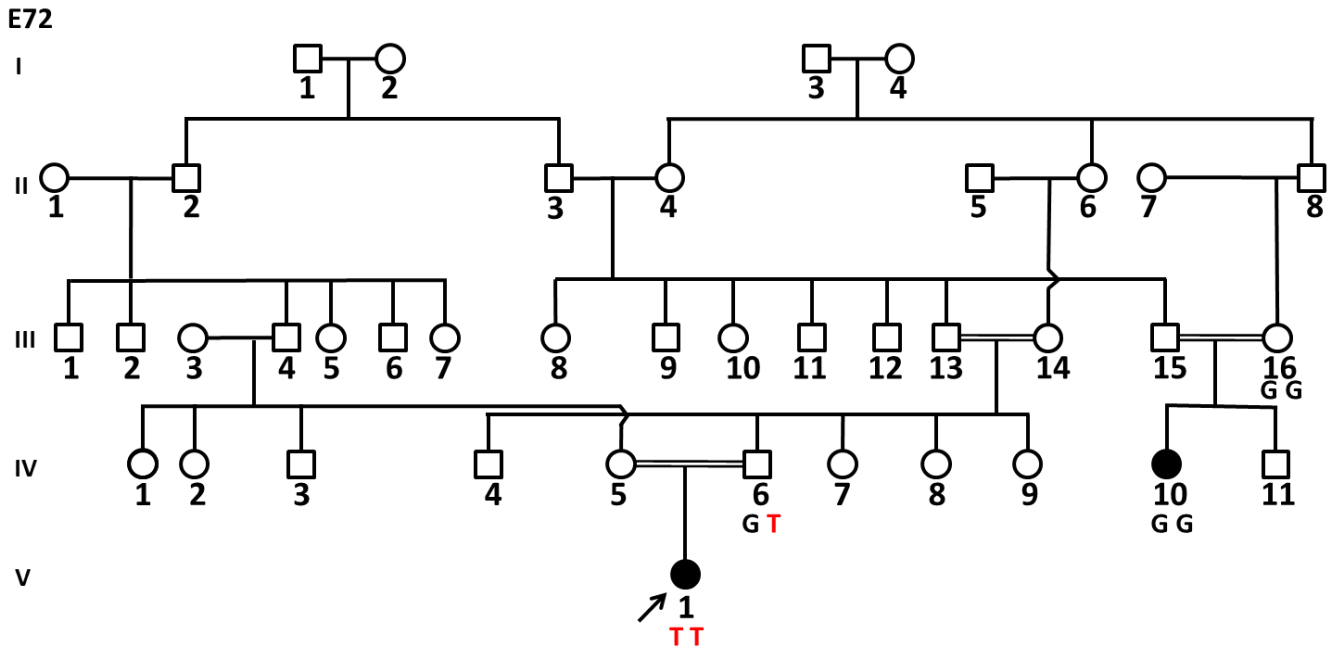

*OTOF* c.3346C>T, p.Arg1116*

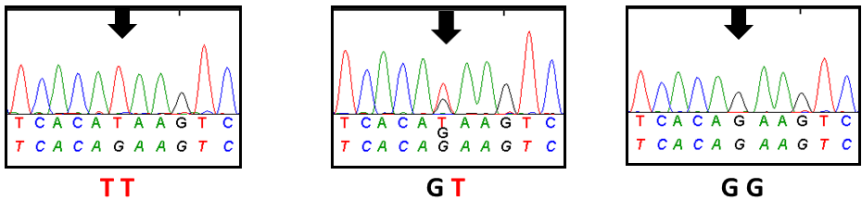



*ILDR1*c.1384C>T, p.Arg462*



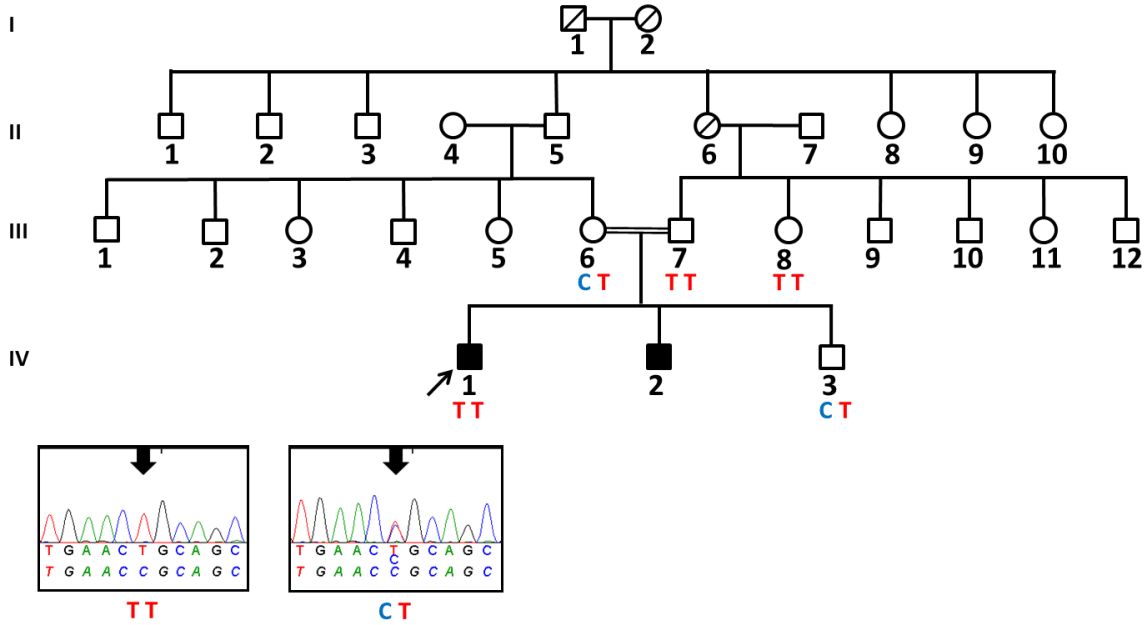

*LARS2* c.1565C>A, p.Thr522Asn



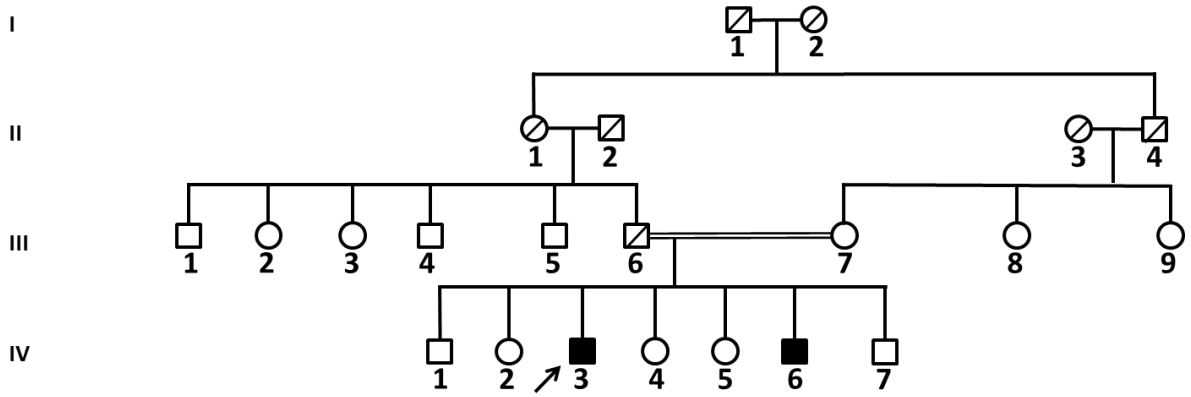

*TMIE* c.349G>T, p.Glu117*

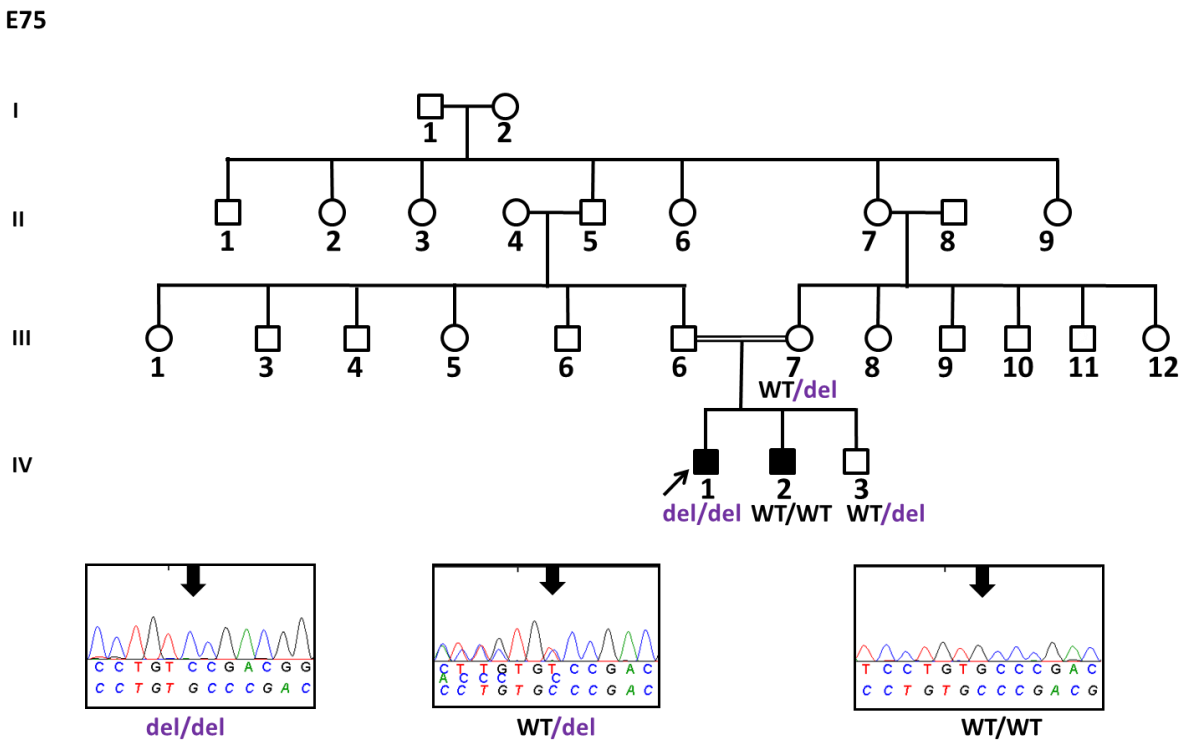
**E73**



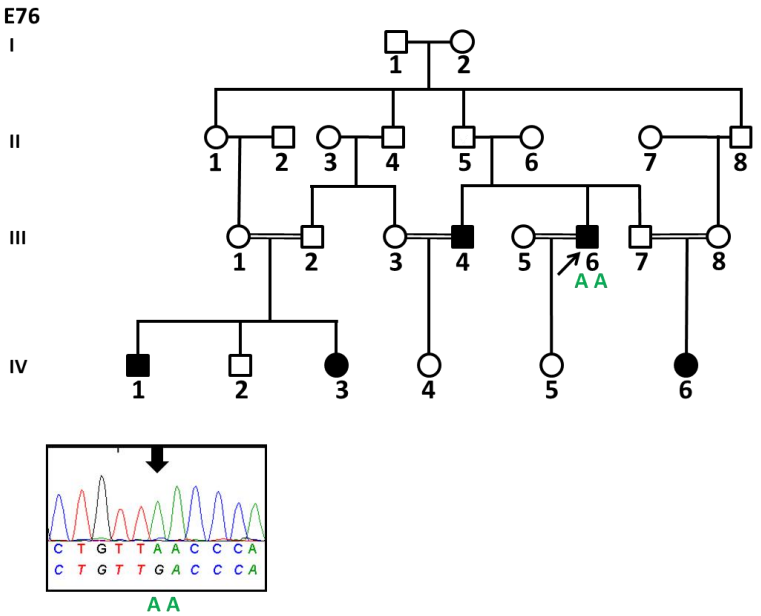

*OTOA* c.469C>T, p.Arg157Cys

**E74**



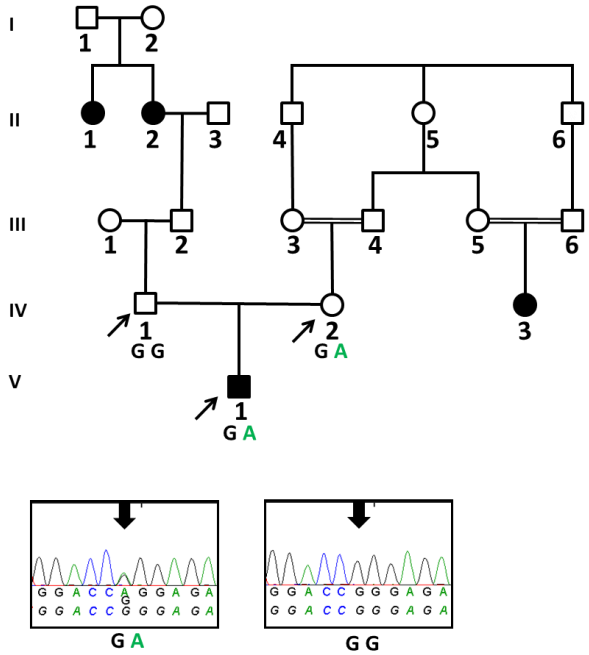



*TRIOBP* c. 2173_2174del, p.Ala725Porfs*35



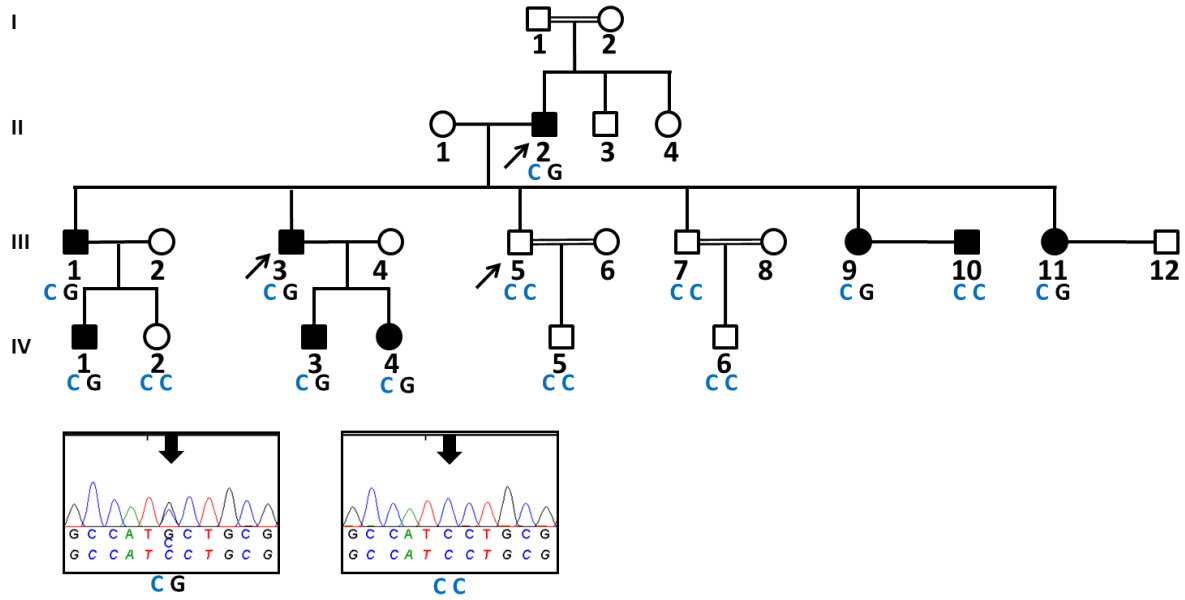

*CDH23* c.2410G>A, p.Asp804Asn

**E77**



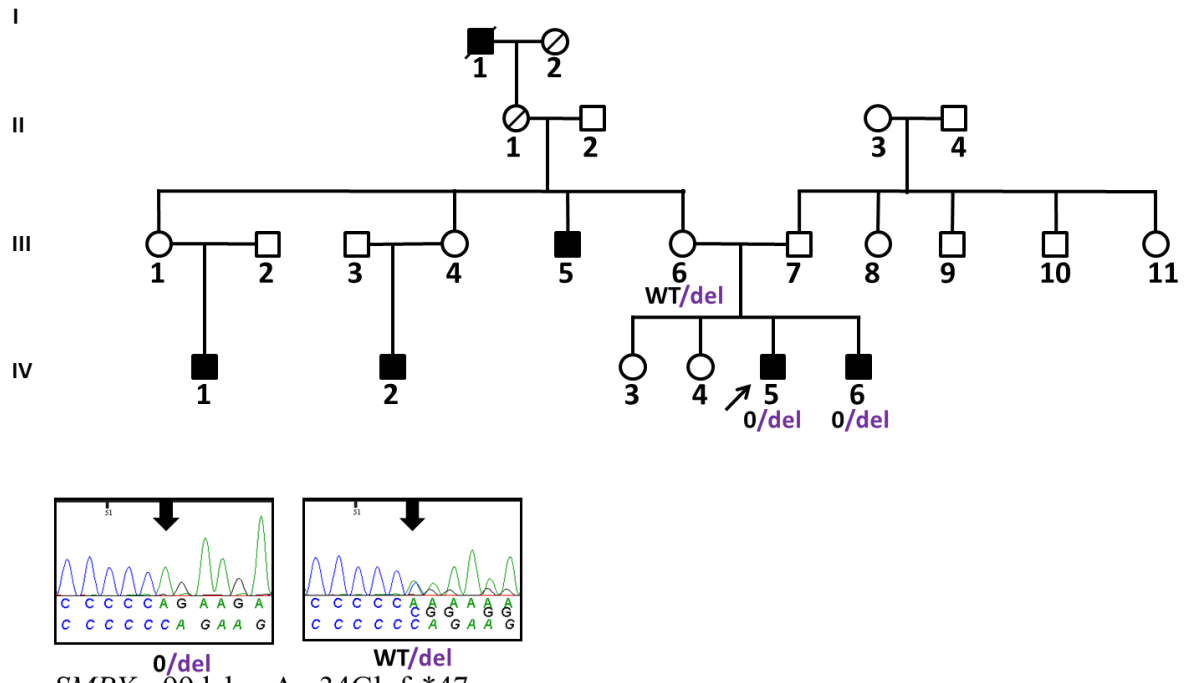

*CDH23* c.902G>A, p.Arg301Gln

**E78**

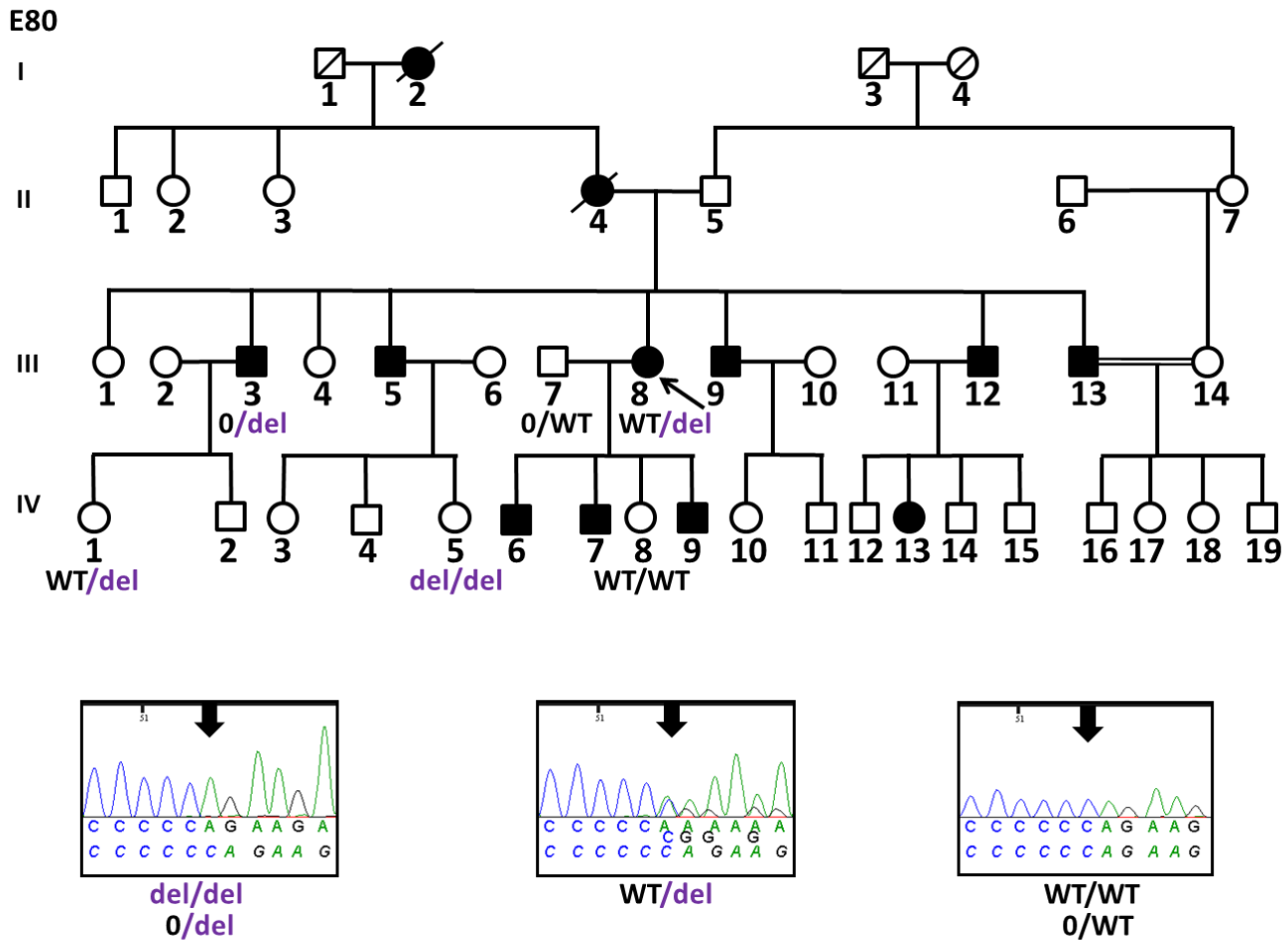



*ACTG1* c.525C>G, p.Ile175Met

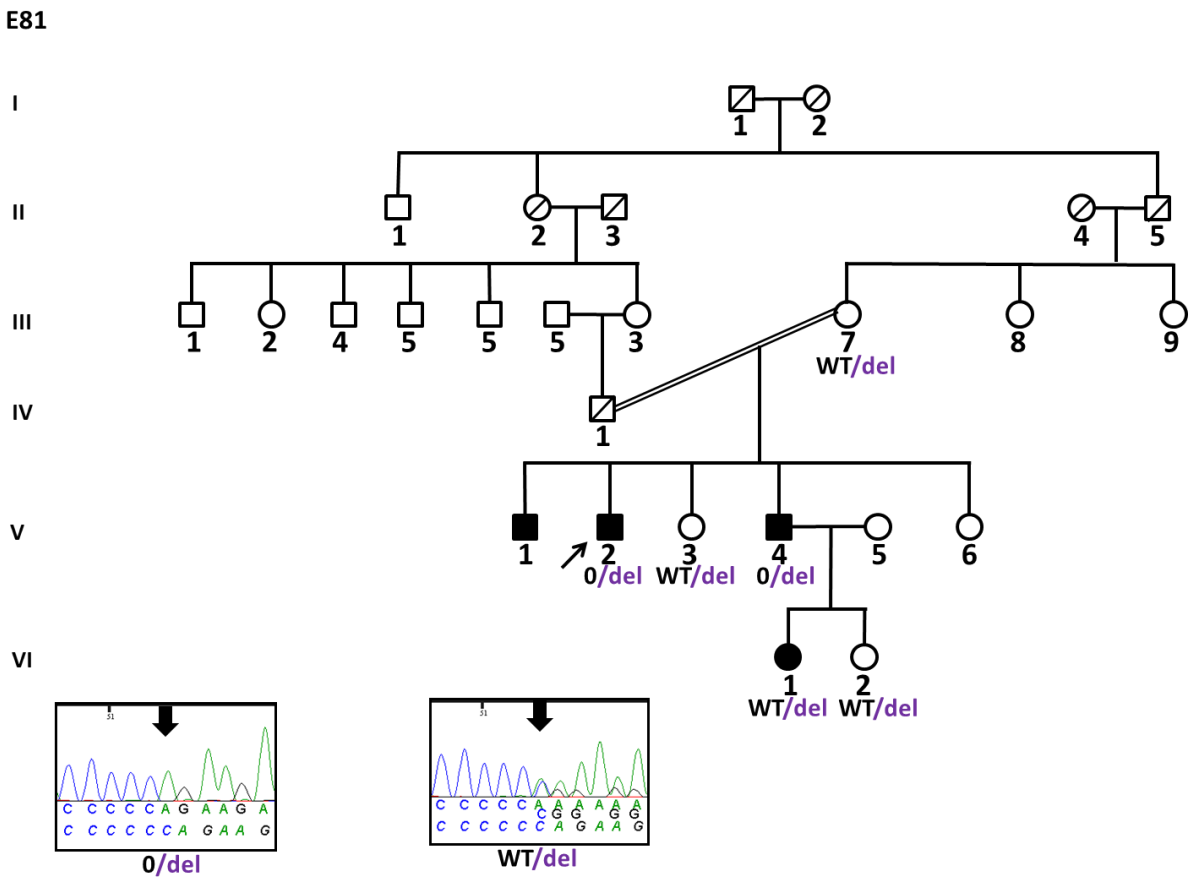
**E79**




*SMPX* c.99del, p.Arg34Glufs*47




*SMPX* c.99del, p.Arg34Glufs*47




*SMPX* c.99del, p.Arg34Glufs*47

## 9.3 Auflistung aller Hörstörungsgene mit OMIM Nummer und allen zusätzlichen Phänotypen

*Tab. 10: Hörstörungsgene, eingeteilt nach Vererbungsmuster, OMIM Nummer, Charakterisierung und zusätzlichen Assoziation mit Syndromen.*

| Locus | Gen | OMIM Nummer | ensemble Nummer | Charakterisierung des Gens | Zusatzsymptome, die mit diesem Gen zusätzlich zur Hörstörung assoziiert sein können |
|---|---|---|---|---|---|
| **USH3** | ABHD12 | * 613599 | ENSG00000100997 | Usher Syndrom Typ 3, rezessiv | Retinitis pigmentosa und Gleichgewichtsprobleme |
| **DFNA20/26** | ACTG1 | * 102560 | ENSG00000184009 | NSHL, dominant, Baraitser-Winter Syndrom 2, dominant | mentale Retardierung, Herzfehler, Gesichtsdismorphien, Krämpfe, Skelettauffälligkeiten |
| **DFNB44** | ADCY1 | * 103072 | ENSG00000164742 | NSHL, rezessiv | |
| **USH2C** | ADGRV1 | * 602851 | ENSG00000164199 | Usher Syndrom Typ 2, rezessiv | Retinitis pigmentosa (Auftritt ab Pubertät) |
| **DFNX5** | AIFM1 | * 300169 | ENSG00000156709 | NSHL, x-chromosomal, Cowchock Syndrom, combined oxidative phosphorylation deficiency 6 | Muskelschwäche, Hypotonie, Krämpfe, |
| | ARSG | * 610008 | ENSG00000141337 | Usher Syndrom, Typ 4, rezessiv | Retinitis pigmentosa (später Auftritt) |
| | ATP1A3 | * 182350 | ENSG00000105409 | COPOS Syndrom mit auditorischer Neuropathie, dominant, alternating hemiplegia of childhood 2, | Entwicklungsverzögerung, Ataxie, Krämpfe, Nystagmus, geistige Behinderung, Pes cavus, Hypotonie, halbseitige Lähmung, Dystonie, usw. |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Dystonia-12 | |
| **DFNA** | ATP2B2 | * 108733 | ENSG00000157087 | NSHL, dominant und Modifier | |
| | ATP6V1B1 | * 192132 | ENSG00000116039 | Renale tubuläre Azidose mit Taubheit, rezessiv | Renale tubuläre Azidose |
| **DFNB49** | BDP1 | * 607012 | ENSG00000145734 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB73** | BSND | * 606412 | ENSG00000162399 | NSHL, rezessiv & Bartter Syndrom, Typ 4A | Nierenfunktionsstörung, Hyopotonie, mentale Retardierung |
| | BTD | * 609019 | ENSG00000169814 | Biotinidase Mangel, rezessiv | Entwicklungsverzögerung, Ataxie, Hypotonie, Krämpfe,Optikusathropie, Sehstörungen, Hautanomalien |
| | C2orf71 | * 613425 | ENSG00000179270 | Assoziation mit Usher Syndrom | Retinitis pigmenotsa |
| **DFNB93** | CABP2 | * 607314 | ENSG00000167791 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNA44** | CCDC50 | * 611051 | ENSG00000152492 | NSHL, dominant | |
| **DFNA66** | CD164 | * 603356 | ENSG00000135535 | NSHL, dominant | |
| **DFNB32/105** | CDC14A | * 603504 | ENSG00000079335 | NSHL, rezessiv, Deafness Infertility Syndrom bei Männern | Infertiltiät bei Männern |
| **DFNB12, USH1D** | CDH23 | * 605516 | ENSG00000107736 | NSHL, rezessiv und Usher Syndrom Typ 1 | Retinitis pigmentosa (bei Geburt) und Gleichgewichtsproblem |
| **DFNA4B/ auch rezessiv** | CEACAM16 | * 614591 | ENSG00000213892 | NSHL, dominant und rezessiv | |
| | CEP250 | * 609689 | ENSG00000126001 | Assoziation mit Usher Syndrom | Zäpfchen-Stäbchen Dystrophie |
| | CEP78 | * 617110 | ENSG00000148019 | Usher Syndrom, rezessiv | Retinitis pigmentosa |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | CHD7 | * 608892 | ENSG00000171316 | Dominant CHARGE/Kallmann syndrome, mimics non-syndromic deafness | Kolombom, Herzdefekte, Choanalatresie, Entwicklungsverzögerung, Abnormalität der Genitalien |
| | CHST3 | * 603799 | ENSG00000122863 | Spondyloepiphysäre Dysplasie mit angeborenen Gelenksluxationen und Hörstörung, rezessiv | Herzfehler, Skelettdysplasie, |
| **DFNB48, USH1J** | CIB2 | * 605564 | ENSG00000136425 | NSHL, rezessiv & Usher Syndrom Typ 1 | Retinitis pigmentosa (bei Geburt) und Gleichgewichtsprobleme |
| | CISD2 | * 611507 | ENSG00000145354 | Wolfram syndrome, type 2 | Diabetes, Optikusathropie |
| **DFNB29** | CLDN14 | * 605608 | ENSG00000159261 | NSHL & Perrault Syndrom rezessiv | Infertilität bei Frauen |
| **DFNB103** | CLIC5 | * 607293 | ENSG00000112782 | NSHL, rezessiv | |
| **PRLTS3/DFNB81** | CLPP | * 601119 | ENSG00000125656 | Perrault Syndrom, rezessiv | Infertilität bei Frauen, Funktionsstörung der Eierstöcke |
| **USH3A** | CLRN1 | * 606397 | ENSG00000163646 | Usher Syndrom Typ 3, rezessiv, Retinitis pigmentosa 61 | Retinitis pigmentosa und Gleichgewichtsprobleme |
| | CLRN2 | | ENSG00000249581 | Kandidat, | |
| **DFNA9** | COCH | * 603196 | ENSG00000100473 | NSHL, dominant | |
| **DFNA37/STL2** | COL11A1 | * 120280 | ENSG00000060718 | NSHL, dominant & Stickler Syndrom dominant, Fibrochondrogenesis 1, Marshall Syndrom | Anomalien der Augen, Gaumenspalte, milde spondyloepiphyseale Dysplasie und / oder vorzeitige Arthritis, Kleinwuchs, Gesichtsauffälligkeiten, Gaumenspalte |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **DFNA13/ DFNB53/ STL3** | COL11A 2 | * 120290 | ENSG00000204 248 | NSHL, rezessiv und dominant & Stickler Syndrom Typ 3, Fibrochondrog enesis 2, | milde spondyloepiphyseale Dysplasie und / oder vorzeitige Arthritis, Gesichtsauffälligkeite n |
| **STL1** | COL2A1 | 120140 | ENSG00000139 219 | Stickler Syndrome, rezessiv und weitere skeletale Syndrome | Anomalien der Augen, Gaumenspalte, milde spondyloepiphyseale Dysplasie und / oder vorzeitige Arthritis |
| | COL4A3 | * 120070 | ENSG00000169 031 | Alport Syndrome, dominant und rezessiv | mikroskopische Hämaturie, Augenläsionen |
| | COL4A4 | * 120131 | ENSG00000081 052 | Alport Syndrome, rezessiv | mikroskopische Hämaturie, Augenläsionen |
| | COL4A5 | * 303630 | ENSG00000188 153 | Alport Syndrom, x-chromosomal | mikroskopische Hämaturie, Augenläsionen |
| **DFNX6** | COL4A6 | * 303631 | ENSG00000197 565 | NSHL, x-chromosomal | |
| **STL4** | COL9A1 | * 120210 | ENSG00000112 280 | Stickler Syndrom, rezessiv, Epiphyseal dysplasia, multiple, 6, dominant | Anomalien der Augen, Gaumenspalte, milde spondyloepiphyseale Dysplasie und / oder vorzeitige Arthritis |
| **STL5** | COL9A2 | * 120260 | ENSG00000049 089 | Stickler Syndrome, rezessiv, Epiphyseal dysplasia, multiple, 2 dominant | Anomalien der Augen, Gaumenspalte, milde spondyloepiphyseale Dysplasie und / oder vorzeitige Arthritis |
| **STL6** | COL9A3 | * 120270 | ENSG00000092 758 | Stickler Syndrome, rezessiv, Epiphyseal dysplasia, multiple, 3, with or without myopathy, dominant | Anomalien der Augen, Gaumenspalte, milde spondyloepiphyseale Dysplasie und / oder vorzeitige Arthritis |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **DFNA40** | CRYM | * 123740 | ENSG00000103 316 | NSHL, dominant | |
| **DFNB66** | DCDC2 | * 605755 | ENSG00000146 038 | NSHL, rezessiv, Nephronophthise 19, sklerosierende Cholangitis | Nierenfunktionsstörung, Lebererkrankung |
| **DFNA64** | DIABLO | * 605219 | ENSG00000184 047 | NSHL, dominant | |
| **DFNA1** | DIAPH1 | * 602121 | ENSG00000131 504 | NSHL, dominant, Seizures, cortical blindness, microcephaly syndrome | Kleinwuchs, Mikrozephalie, Opikusathropie, Entwicklungsverzögerung, Krämpfe |
| **AUNA1** | DIAPH3 | * 614567 | ENSG00000139 734 | NSHL, auditiorische Neuropathie | |
| **DFNA** | DMXL2 | * 612186 | ENSG00000104 093 | NSHL, dominant, Polyendokrines Polyneuropathie-Syndrom, rezessiv | Kleinwuchs, mentale Retardierung, Dystonie, Ataxie, |
| **WS4B** | EDN3 | * 131242 | ENSG00000124 205 | Waardenburg Syndrom dominant und rezessiv (Type 4B) | Heterochromatie und Pigementationsstörung |
| **WS4A** | EDNRB | * 131244 | ENSG00000136 160 | Waardenburg Syndrom dominant und rezessiv (Type 4A); einseitige Hörstörung | Heterochromatie und Pigementationsstörung |
| **DFNB88** | ELMOD3 | * 615427 | ENSG00000115 459 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB102** | EPS8 | * 600206 | ENSG00000151 491 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB106** | EPS8L2 | * 614988 | ENSG00000177 106 | NSHL, rezessiv | |
| **PRLTS6** | ERAL1 | * 607435 | ENSG00000132 591 | Perrault syndrome, rezessiv | Infertilität bei Frauen, Funktionsstörung der Eierstöcke |
| **DFNB36** | ESPN | * 606351 | ENSG00000187 017 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB** | ESRP1 | * 609245 | ENSG00000104 | NSHL, rezessiv | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 413 | | |
| **DFNB35** | ESRRB | * 602167 | ENSG00000119715 | NSHL, rezessiv | |
| | EXOSC2 | * 602238 | ENSG00000130713 | Kleinwuchs, Hörverlust, Retinitis pigmentosa und Gesichtsauffälligkeiten | Kleinwuchs, Retinitis pigmentosa, Gesichtsauffälligkeiten, Entwicklungsverzögerung |
| **BOR1** | EYA1 | * 601653 | ENSG00000104313 | Branchio-oto-renal Syndrom, Branchiootisches Syndrom 1, Otofaciocervical syndrome | Anomalie der Ohrmuschel, des Mittelohrs, auditorischen Kanals oder Innenohr, Kimenspalten/Fisteln, Nierenfehlbildungen, milde mentale Retardierung |
| **DFNA10** | EYA4 | * 603550 | ENSG00000112319 | NSHL, dominant, Cardiomyopathy, dilated, 1J | Herzfehler |
| **DFNB104** | FAM65B | * 611410 | ENSG00000111913 | NSHL, rezessiv | |
| | FDXR | * 103270 | ENSG00000161513 | Auditorische Neuropathie und Optikusathrophie mit Hörstörung, rezessiv | Optikusathropie |
| | FGF3 | * 164950 | ENSG00000186895 | angeborene Gehörlosigkeit mit Innenohrangenesie, Mikrotie und Mikrodontie, rezessiv | Verlust des Innenohrs, Anomalie des Außenohrs, Anomalien der Zähne |
| | FGFR1 | * 136350 | ENSG00000077782 | Pfieffer syndrome type 1, Pfeiffer syndrome type 2, Pfeiffer syndrome type 3 | skeletale Auffälligkeiten, Augenhypertelorismus, Proptose, Mittelgesichtshypoplasie, kleine Schnabelnase und Prognathismus, |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Sehstörungen einschließlich Strabismus, Entwicklungsverzögerungen und / oder geistiger Behinderung, Hydrozephalus, Kraniosynostose |
| | FGFR2 | * 176943 | ENSG00000066468 | Apert-Syndrom, Beare-Stevenson-Syndrom, Crouzon-Syndrom, isolierte koronale Synostose, Jackson-Weiss-Syndrom, Pfeiffer-Syndrom Typ 1, Pfeiffer-Syndrom Typ 2, Pfeiffer-Syndrom Typ 3 | skeletale Auffälligkeiten, Augenhypertelorismus, Proptose, Mittelgesichtshypoplasie, kleine Schnabelnase und Prognathismus, Sehstörungen einschließlich Strabismus, Entwicklungsverzögerungen und / oder geistiger Behinderung, Hydrozephalus, Kraniosynostose |
| | FITM2 | * 612029 | ENSG00000197296 | Taubheit-Dystonie-Syndrom, rezessiv | Ichthyose, sensorischer Neuropathie, |
| **DFNB** | FOXF2 | * 603250 | ENSG00000137273 | NSHL, rezessiv | |
| | FOXI1 | * 601093 | ENSG00000168269 | Pendred Syndrome, rezessiv, vergrößertes vestibuläres Aquädukt, | vergrößertes vestibuläres Aquädukt, vestibuäre Dysfunktion,Hypertyreose, Kropfbildung, |
| **DFNX** | FRMPD4 | * 300838 | ENSG00000169933 | NSHL, x-chromosomal, Mental retardation, X-linked 104 | mentale Retardierung |
| **DFNB26** | GAB1 | * 604439 | ENSG00000109458 | NSHL, rezessiv | |
| | GATA3 | * 131320 | ENSG00000107485 | Hypoparathyreoidismus, | Unterfunktion der Nebenschilddrüse, |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | sensorineurale Taubheit und Nierendysplasie, dominant | Nierendysplasie |
| **DFNB15/ 72/95** | GIPC3 | * 608792 | ENSG00000179855 | NSHL, rezessiv und Chudley-McCullough Syndrom | |
| **DFNA3A/ DFNB1A** | GJB2 | * 121011 | ENSG00000165474 | NSHL, dominant, Bart-Pumphrey-Syndrom, Hystrix-artige Ichthyose mit Taubheit, Keratitis-Ichthyosis-Taubheit-Syndrom , Keratodermie palmoplantar mit Taubheit, Vohwinkel-Syndrom | Ichthyose, Hyperkeratose der Hände und Füße, pes cavus, Blindheit, Autoamputation, |
| **DFNA2B/ DFNB** | GJB3 | 603324 | ENSG00000188910 | NSHL, dominant und rezessiv, mit peripherer Neuropathie, Erythrokeratodermia variabilis et progressiva 1 | periphere Neuropathie, Hyperkeratose und erythematöse Bereiche |
| **DFNA3B/ DFNB1B** | GJB6 | * 604418 | ENSG00000121742 | NSHL, rezessiv, Ektodermale Dysplasie 2, Typ Clouston | Kleinwuchs, Katarakt, Strabismus, Hyperkeratose |
| | GPRASP2 | * 300969 | ENSG00000158301 | X-linked HL gene | Gesichtsanomalien, Ptosis, Telekanthus |
| **DFNB32/ 82** | GPSM2 | * 609245 | ENSG00000121957 | NSHL, rezessiv, Chudley-McCullough Syndrom | Hydrozephalus, Veränderungen des corpus callosum, |
| **DFNB** | GRAP | * 604330 | ENSG00000154016 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNA28** | GRHL2 | * 608576 | ENSG00000083307 | NSHL, dominant, | Sehstörungen, Kleinwuchs, |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Hornhautdystrophie, posterior polymorph, 4, Ektodermale Dysplasie / Kurzwuchs-Syndrom | verzögerte Zahnentwicklung, Hyperkeratose |
| **DFNB25** | GRXCR1 | * 613283 | ENSG00000215203 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB101** | GRXCR2 | * 615762 | ENSG00000204928 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNA5** | GSDME | * 608798 | ENSG00000105928 | NSHL, dominant | |
| **USH3B** | HARS | * 142810 | ENSG00000170445 | Usher Syndrom Typ 3, rezessiv, Charcot-Marie-Tooth-Krankheit, axonal, Typ 2W, dominant | Retinitis pigmentosa und Gleichgewichtsprobleme, pes cavus, Muskelschwäche, distale sensorische Beeinträchtigung |
| **PRLTS2** | HARS2 | * 600783 | ENSG00000112855 | Perrault Syndrom, rezessiv | Infertilität bei Frauen, Funktionsstörung der Eierstöcke |
| **DFNB39** | HGF | * 142409 | ENSG00000019991 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNA68** | HOMER 2 | * 60479 | ENSG00000103942 | NSHL, dominant | |
| **PRLTS1** | HSD17B 4 | * 601860 | ENSG00000133835 | Perrault Syndrom, rezessiv, D-bifunktioneller Proteinmangel, rezessiv | Infertilität bei Frauen, Funktionsstörung der Eierstöcke, Makrozephalie, Gesichtsauffälligkeiten, Sehbehinderung, Strabismus, Nystagmus, Leberfunktionsstörungen, Hypotonie, Krämpfe, Entwicklungsverzögerung usw. |
| **DFNA2C** | IFNLR1 | * 607404 | ENSG00000185436 | NSHL, dominant | |
| **DFNB42** | ILDR1 | * 609739 | ENSG00000145103 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB89** | KARS | * 601421 | ENSG00000065427 | NSHL, rezessiv, Charcot-Marie-Tooth- | Entwicklungsverzögerung, pes cavus, Muskelschwäche |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Krankheit, Intermediat B, rezessiv | |
| **JLNS2** | KCNE1 | * 176261 | ENSG00000180509 | Jervel-LangeNielson Syndrome, rezessiv | longQT Syndrom, isoliertes QT Syndrom bei heterozygoten Mutationen |
| | KCNJ10 | * 602208 | ENSG00000177807 | Pendred Syndrome, rezessiv | vergrößertes vestibuläres Aqueduct, vestibuäre Dysfunktion,Hypertyreose, Kropfbildung, |
| **JLNS1** | KCNQ1 | * 607542 | ENSG00000053918 | Jervel-langeNielson Syndrome, rezessiv | longQT Syndrom, isoliertes QT Syndrom bei heterozygoten Mutationen |
| **DFNA2A** | KCNQ4 | * 603537 | ENSG00000117013 | NSHL,dominant | |
| | KIAA0391 | * 609947 | ENSG00000258790 | Perrault Syndrom Gen, Munro, Taylor | |
| | KIT | * 164920 | ENSG00000157404 | Waardenburg syndrome, Gastrointestinaler Stromatumor, familiär, Keimzelltumore, somatisch, Leukämie, akut myeloisch, Mastozytose, kutane, Mastozytose, systemisch, somatisch, Piebaldismus | Krebs, Pigmentierungsstörungen |
| **DFNA69** | KITLG | * 184745 | ENSG00000049130 | NSHL Gen, dominant einseitig, oder assymentrisch, auch mit Waardenburg Syndrom assoziiert, Hyperpigmentierung mit oder ohne | Heterochromatie und Pigementationsstörung |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Hypopigmentierung | |
| | KMT2D | * 602113 | ENSG00000167548 | Kabuki Syndrom, Typ 1, dominant | mentale Retardierung, Herzfehler, Gesichtsdismorphien, Skelettauffälligkeiten |
| **PRLTS4** | LARS2 | * 604544 | ENSG00000011376 | Perrault Syndrom, rezessiv, Hydrops, Laktatazidose und sideroblastische Anämie | Infertilität bei Frauen, Funktionsstörung der Eierstöcke, Herzfehler, Leberdysfunktion, Krämpfe, Laktatazidose |
| **DFNB66/ DFNB67** | LHFPL5 | * 609427 | ENSG00000197753 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNA7** | LMX1A | * 600298 | ENSG00000162761 | NSHL, dominant | |
| **DFNB77** | LOXHD1 | * 613072 | ENSG00000167210 | NSHL, rezessiv | |
| | LOXL3 | * 607163 | ENSG00000115318 | Stickler Syndrom, dominant | Kurzsichtigkeit, Kleinwuchs, retinale Veränderung, Gaumenspalte, abgeflachtes Gesicht, Mikrognathie |
| **DFNB** | LRP5 | * 603506 | ENSG00000162337 | NSHL, rezessiv, Exsudative Vitreoretinopathie 4, Hyperostose, endosteal, Osteopetrose, autosomal-dominant 1, Osteoporose-Pseudogliom-Syndrom, Osteosklerose, polyzystische Lebererkrankung 4 mit oder ohne Nierenzysten, Morbus van Buchem, Typ 2 | Sehstörung, verminderte Knochendichte, skeletale Auffälligkeiten, Osteoporose, Mikrozephalie, Kleinwuchs, Herzfehler, Leberzysten usw. |
| **DFNB63** | LRTOMT | * 612414 | ENSG00000184 | NSHL, rezessiv | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 154 | | |
| **DFNB49** | MARVELD2 | * 610572 | ENSG00000152939 | NSHL, rezessiv | |
| | MASP1 | * 600521 | ENSG00000127241 | Taubheit mit fehlenden Cochlea-Nerven,rezessiv, 3MC Syndrom 1 rezessiv, | Mikrozephalie, Sehstörungen, Gaumen-Lippen-Spalte, Herzfehler, Kraniosynostose, skeletale Auffälligkeiten, milde mentale Retardierung |
| **DFNA70** | MCM2 | * 116945 | ENSG00000073111 | NSHL, dominant | |
| **DFNB97** | MET | * 164860 | ENSG00000105976 | NSHL, rezessiv, Hepatozelluläres Karzinom, Kindertyp, somatisch, Nierenzellkarzinom, papillär, 1, familiär und somatisch | Krebs |
| **DFNM1** | METTL13 | * 617987 | ENSG00000010165 | Modifier von DFNB26, dominant | |
| **DFNA50** | MIR96 | * 611606 | ENSG00000199158 | NSHL, dominant | |
| **WS2A** | MITF | * 156845 | ENSG00000187098 | Waardenburg Syndrom dominant (Type 2A); einseitige Hörstörung, COMMAD-Syndrom, Tietz-Albinismus-Taubheitssyndrom, Waardenburg-Syndrom / okulärer Albinismus, digenisch | Heterochromatie und Pigementationsstörung, Makrozephalie, Kolomba, Sehstörung, Osteopetrose, Albinismus, vestubiläre Unterfunktion, |
| **DFNB** | MPZL2 | * 604873 | ENSG00000149573 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB74** | MSRB3 | * 613719 | ENSG00000174099 | NSHL, rezessiv | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | MT-RNR1 | * 561000 | ENSG00000211459 | Mitochondrial NSHL | |
| | MT-TS1 | * 590080 | ENSG00000210151 | Mitochondrial NSHL | |
| **DFNA4/4A** | MYH14 | * 608568 | ENSG00000105357 | NSHL, dominant, Periphere Neuropathie, Myopathie, Heiserkeit und Hörverlust | Deformität der Füße, Muskelschwäche, Areflexie, Heiserkeit, Hypoflexie |
| **DFNA17** | MYH9 | * 160775 | ENSG00000100345 | NSHL, dominant, Makrothrombozytopenie und Granulozyteneinschlüsse mit oder ohne Nephritis oder sensorineuralem Hörverlust | Herzinfarkt als Folge von Thrombose, Thrombozytopenie, Riesenplättchen |
| **DFNB3** | MYO15A | * 602666 | ENSG00000091536 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNA/DFNB30** | MYO3A | * 606808 | ENSG00000095777 | NSHL, dominant und rezessiv | |
| **DFNA22/DFNB37** | MYO6 | * 600970 | ENSG00000196586 | NSHL, rezessiv und dominant, mit hypertrophischer Kardiomyopathie | Herzmuskelverdickung |
| **DFNA11/DFNB2, USH1B** | MYO7A | * 276903 | ENSG00000137474 | NSHL, rezessiv und dominant | Retinitis pigmentosa (bei Geburt) und Gleichgewichtsprobleme |
| **DFNB94** | NARS2 | * 612803 | ENSG00000137513 | NSHL, rezessiv, Kombinierter Mangel an oxidativer Phosphorylierung 24 | Muskelschwäche, faziale Muskelschwäche, Nystagmus, Optikusathropie, Sehstörung, Muskelschwäche, Hypotonie, Krämpfe, Entwicklungsverzögerung |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **NDP1** | NDP | * 300658 | ENSG00000124479 | Norrie-Syndrom, Exudative Vitreoretinopathie 2, x-chromosomal | Blindheit bei Geburt, Entwicklungsverzögerung, Sehstörung, Nystagmus, |
| | NISCH | * 615507 | ENSG00000010322 | Mittelohrentzündungsgen | |
| **DFNA34** | NLRP3 | * 606416 | ENSG00000162711 | NSHL, dominant, CINCA-Syndrom, Familiäres Erkältungs-Entzündungssyndrom 1, Keratoendothelitis fugax hereditaria, Muckle-Wells-Syndrom | Wachstumsretardierung, Sehstörung, Meningitis, Gelenksentzündungen, Nierenamyloidose (spät einsetzend), episodisches Fieber, Nierenversagen, Schmerzen |
| **DFNA67** | OSBPL2 | * 606731 | ENSG00000130703 | NSHL, dominant | |
| **DFNB22** | OTOA | * 607038 | ENSG00000155719 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB9** | OTOF | * 603681 | ENSG00000115155 | NSHL, rezessiv, auditorische Neuropathie | |
| **DFNB18B** | OTOG | * 604487 | ENSG00000188162 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB84** | OTOGL | * 614925 | ENSG00000165899 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNA41** | P2RX2 | * 600844 | ENSG00000187848 | NSHL, dominant | |
| **WS1/WS3** | PAX3 | * 606597 | ENSG00000135903 | Waardenburg Syndrom dominant (Type 1 & 3); einseite Hörstörung, Kraniofazial-Taubheit-Hand-Syndrom, Rhabdomyosarkom 2, Alveolar | Heterochromatie und Pigementationsstörung, ulunare Abweichung der Hände, flaches Gesichtsprofil, Hyperteleroismus, fehlende oder kleine Nasenknochen, kleiner Oberkiefer, Krebs |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **DFNB23, USH1F** | PCDH15 | * 605514 | ENSG00000150275 | NSHL, rezessiv | Retinitis pigmentosa (bei Geburt) und Gleichgewichtsprobleme |
| **DFNA** | PDE1C | * 602987 | ENSG00000154678 | NSHL, dominant | |
| **DFNB57** | PDZD7 | * 612971 | ENSG00000186862 | NSHL, rezessiv und Modifier für Usher Gene | |
| | PEX1 | * 602136 | ENSG00000127980 | Heimler-Syndrom 1, Peroxisomen-Biogenese-Störung 1A (Zellweger), Peroxisomenbiogenesestörung 1B | Pigmentabnormalitäten der Netzhaut, Amelogenesis imperfecta, Beau-Linien, Große Fontanellen, Makrozephalie, Micrognathia, Sehstörung, Nystagmus, Herzfehler, Heptomegalie, genitale Auffälligkeiten, Nierenfunktionsstörung, skeletale Veränderungen, Hyoptonie, mentale Retardierung, Krampfanfälle, Retinitis pigmentosa, Entwicklungsverzögerung usw. |
| | PEX6 | * 601498 | ENSG00000124587 | Heimler-Syndrom 2, Peroxisomen-Biogenese-Störung 4A (Zellweger), Peroxisomen-Biogenese-Störung 4B | Pigmentabnormalitäten der Netzhaut, Zahnfehlbildungen, pes planus, schwere Asphyxie, Sehstörung, Heptomegalie, skeletale Veränderungen, Hyoptonie, Wachstumsverzögerung, großer Kopf, Nystagmus, Nierenprobleme, mentale Retardierung, |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Krampfanfälle, Retinitis pigmentosa, Entwicklungsverzögerung usw. |
| | PEX7 | * 601757 | ENSG00000112357 | Peroxisomen-Biogenese-Störung 9B, Rhizomelische Chondrodysplasie punctata Typ 1, Refsum Syndrom | Renitis pigementosa, Polyneuropathie, zerebelläre Ataxie, Nystagmus, Ichthyose, Katarakt, Anosomie, pes cavus, Muskelschwäche, Kleinwuchs, Mikrozephalie, Mikrognathia, Gaumenspalte, skeletale Auffälligkeiten, mentale Retardierung usw. |
| | PHYH | * 602026 | ENSG00000107537 | Refsum Syndrom | Renitis pigementosa, Polyneuropathie, zerebelläre Ataxie, Nystagmus, Ichthyose, Katarakt, Herzfehler, Anosomie, pes cavus |
| **DFNB59** | PJVK | * 610219 | ENSG00000204311 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB70** | PNPT1 | * 610316 | ENSG00000138035 | NSHL, rezessiv, Kombinierter Mangel an oxidativer Phosphorylierung 13 | schlechtes Wachstum, Nystagmus,Katarakt, Hypertonie, Muskelathropie, Dystonie, usw. |
| | POLD1 | * 174761 | ENSG00000062822 | Unterkieferhypoplasie, Taubheit, Progeroidmerkmale und Lipodystrophie-Syndrom, dominant | Unterkieferhypoplasie, Leberveränderungen, Hautatrophie, Kyphose, Skoliose, Osteoporose, Lipodystrophie |
| | POLD3 | * 611415 | ENSG00000077514 | Bindegewebsstörung und | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Hörstörung | |
| **TCOF3** | POLR1C | * 610060 | ENSG00000171 45 | Treacher Collins Syndrom, dominant, Leukodystroph y, hypomyelinati ng, 11 | Kolobom, Mikrognathie, Mikrotie, Hypoplasie der Jochbögen, Makrostomie, Zahnabnormalität, Entwicklungsverzöger ung, Ataxie, Leukodystrophie |
| **TCOF2** | POLR1D | * 613715 | ENSG00000186 184 | Treacher Collins Syndrom, dominant | Kolobom, Mikrognathie, Mikrotie, Hypoplasie der Jochbögen, Makrostomie, |
| **DFNX2 (DFN3)** | POU3F4 | * 300039 | ENSG00000196 767 | NSHL, x-chromosomal | |
| **DFNA15** | POU4F3 | * 602460 | ENSG00000091 010 | NSHL, dominant | |
| **DFNB100** | PPIP5K2 | * 611648 | ENSG00000145 725 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNX1 (DFN2)** | PRPS1 | * 311850 | ENSG00000147 224 | NSHL, x-chromosomal, Arts-Syndrom, Charcot-Marie-Tooth-Krankheit, X-chromosomal-rezessiv, 5, Gicht, PRPS-bezogen, Superaktivität von Phosphoribosyl pyrophosphat-Synthetase | schlechtes Wachstum, Optikusathropie, Nystagmus, Sehstörung, progressive Muskelschwäche, Hypotonie, mentale Retardierung, Krampfanfälle, Ataxie, schlaffe Tetraplegie, Areflexie,pes cavus, Retinitis pigmentosa, periphere Neuropathie, Gicht, sekundäre Niereninsuffizienz, Harnsäure Urolithiasis, usw. |
| | PSIP1 | * 603620 | ENSG00000164 985 | Hörstörung und Blindheit, dominant | Blindheit |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | PTPN11 | * 176876 | ENSG00000179295 | LEOPARD Syndrom 1, gleicht NSHL, Leukämie, juvenile Myelomonozyten, somatisch, Metachondromatose, Noonan-Syndrom 1 | Kleinwuchs, Wachstumsretardierung, faziale Auffälligkeiten, Ptosis, Strabismus, Hyposomie, Gaumenspalte, Kardiomyopathie, fehlende Rippen, skeletale Auffälligkeiten, Spina befidia occulta, Cafe au lait Flecken, milde mentale Retardierung, Lentigines, EKG-Abnormalitäten, Augenhypertelorismus, obstruktive Kardiomyopathie, Lungenstenose, Abnormalitäten von Genitalien, Wachstumsverzögerung und Taubheit, Leukämie, Multiple Enchondromatose |
| **DFNA73/ DFNB84** | PTPRQ | * 603317 | ENSG00000139304 | NSHL, dominant und rezessiv | |
| **DFNB** | RAI1 | * 607642 | ENSG00000108557 | NSHL, rezessiv & Smith-Magenis-Sydrom, dominant | Brachyzephalie, Herzfehler, Strukturelle Nierenanomalien, Skoliose, Brachydaktylie, geistige Behinderung, periphere Neuropathie, Hyperaktivität, Verhaltensprobleme |
| **DFNB24** | RDX | * 179410 | ENSG00000137710 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNA27** | REST | * 600571 | ENSG00000084093 | NSHL, dominant, Fibromatose, Zahnfleisch, 5 | Fibromatose des Zahnfleischs |
| **DFNB108** | ROR1 | * 602336 | ENSG00000185 | NSHL und | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 483 | auditiorsiche Neuropathie, sowie Innenohranomalien | |
| **DFNB68** | S1PR2 | * 605111 | ENSG00000267534 | NSHL, rezessiv | |
| | SEMA3E | * 608166 | ENSG00000170381 | CHARGE Syndrom, dominant | Kolombom, Herzdefekte, Choanalatresie, Entwicklungsverzögerung, Abnormalität der Genitalien |
| | SERAC1 | * 614725 | ENSG00000122335 | 3-Methylglutaconsäure-Azidurie mit Taubheit, Enzephalopathie und Leigh-like-Syndrom | Optikusatrophie, Leberfunktionsstörung, Hypotonie, mentale Retardierung, Dystonie, Gehirnathropie, Kleinhirnatrophie, Leigh Syndrom |
| **DFNB91** | SERPINB6 | * 173321 | ENSG00000124570 | NSHL, rezessiv | |
| | SERPINF1 | * 172860 | ENSG00000132 38 | Hörstörung mit Otosklerose | Otosklerose, ostogenesis imperfecta |
| | SGO2 | * 612425 | ENSG00000163535 | Perrault Syndrom, rezessiv | Infertilität bei Frauen, Funktionsstörung der Eierstöcke |
| **DFNA23/ BOR3** | SIX1 | * 601205 | ENSG00000126778 | NSHL, dominant und Assoziation mit Brachio-oto-renal Syndrom Typ 3 | Anomalie der Ohrmuschel, des Mittelohrs, auditorischen Kanals oder Innenohr, Nierenfehlbildungen |
| **BOR2** | SIX5 | * 600963 | ENSG00000177045 | Brancho-oto-renal syndrome | Anomalie der Ohrmuschel, des Mittelohrs, auditorischen Kanals oder Innenohr, Nierenfehlbildungen |
| **DFNA25** | SLC17A8 | * 607557 | ENSG00000179520 | NSHL, dominant | |
| **DFNB60** | SLC22A4 | * 604190 | ENSG00000197208 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB4** | SLC26A4 | * 605646 | ENSG00000091137 | NSHL, rezessiv und | vergrößertes vestibuläres |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Assoziation mit Pendred Syndrom | Aqueduct, vestibuäre Dysfunktion,Hypertyreose, Kropfbildung, |
| **DFNB61** | SLC26A5 | * 604943 | ENSG00000170615 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNA** | SLC44A4 | * 606107 | ENSG00000204385 | NSHL, dominant | |
| | SLC7A8 | * 604235 | ENSG00000092068 | Altersbedingte Hörstörung | |
| | SLITRK6 | * 609681 | ENSG00000184564 | Taubheit und Myopia | Myopia und auditorische Neuropathie |
| **DFNX4 (DFN6)** | SMPX | * 300226 | ENSG00000091482 | NSHL, x-chromosomal | |
| **WS2D** | SNAI2 | * 602150 | ENSG00000019549 | Waardenburg Syndrom rezessiv (Type 2D); einseitige Hörstörung, Piebaldism, dominant | Heterochromatie und Pigementationsstörung |
| **WS2E/4C** | SOX10 | * 602229 | ENSG00000100146 | Waardenburg Syndrom dominant (Types 2E and 4C); mit oder ohne neurologische Beteiligung, PCWH Syndrom | Heterochromatie und Pigementationsstörung, Anomalie der Cochlea, Nystagmus, Anosomie, Hirschsprung-Krankheit, langes Segment, Intestinale Aganglionose, Kryptorchismus, Pes cavus, Entwicklungsverzögerung, Mentale Behinderung, Ataxie, Areflexie, usw. |
| **DFNB16** | STRC | * 606440 | ENSG00000242866 | NSHL, rezessiv und Deafness-Infertility Syndrom | Deletionen mit CATSPER2 führen zu Infertilität bei Männern |
| **DFNB76** | SYNE4 | * 615535 | ENSG00000181392 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNA65/ DFNB86** | TBC1D24 | * 613577 | ENSG00000162065 | NSHL, dominant und rezessiv, DOORS-Syndrom, Epileptische | Mikrozephalie, Blindheit, Optikusathropie, Katarakte, Herzfehler, zystische Nierendysplasie, |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Enzephalopathie, frühkindlich, 16, Myoklonische Epilepsie, infantil, familiär | kleine oder fehlende Phalangen an Hände und Füße, fehlende Nägel, mentale Retardierung, Hypotonie, Krampfanfälle, periphere Neuropathie, Hyporeflexie, usw. |
| **DFN** | TBL1Y | * 400033 | ENSG00000092377 | Syndromale Taubheit | Prostata Hyperplasie |
| | TBX1 | * 602054 | ENSG00000184058 | Conotruncal anomaly face syndrome, DiGeorge-Syndrom, Fallot-Tetralogie, Velocardiofacial-Syndrom | Anomalien des Herzen, faziale Auffälligkeiten, Minderwuchs, Adipositas, Mikrognathia, Hypertelorismus, Strabismus, Gaumenspalte, bifida Uvulva, Herzfehler, Skoliose, verzögerte psychomotorische Entwicklung, bipolare Störung, Hypothyreose, Mikrozephalie, Pierre Robin Syndrom, Leistenbruch, mentale Retardierung usw. |
| **TCOF1** | TCOF1 | * 606847 | ENSG00000070814 | Treacher Collins Syndrom, dominant | Kolobom, Mikrognathie, Mikrotie, Hypoplasie der Jochbögen, Makrostomie, |
| **DFNA8/12/DFNB21** | TECTA | * 602574 | ENSG00000109927 | NSHL, dominant und rezessiv | |
| **DFNA** | TECTB | * 602653 | ENSG00000119913 | NSHL, dominant | |
| | TIMM8A | * 300356 | ENSG00000126953 | Mohr-Tranebjaerg-Syndrom | Photophobie, Kurzsichtigkeit, kortikale Blindheit, Skelettfrakturen, Dystonie, Hyperreflexie, |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | geistige Verschlechterung, |
| **DFNA51** | TJP2 | * 607709 | ENSG00000119139 | NSHL, dominant, Cholestase, progressives familiäres intrahepatisches 4, Hypercholanämie, familiär | Leberfehler, Hypercholanämie |
| **DFNA36/ DFNB7/11** | TMC1 | * 606706 | ENSG00000165091 | NSHL, dominant und rezessiv | |
| **DFNB99** | TMEM132E | * 616178 | ENSG00000181291 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB6** | TMIE | * 607237 | ENSG00000181585 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB8/10** | TMPRSS3 | * 605511 | ENSG00000160183 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNA** | TMTC2 | * 615856 | ENSG00000179104 | NSHL, dominant | |
| **DFNA56** | TNC | * 187380 | ENSG00000041982 | NSHL, dominant | |
| **DFNB79** | TPRN | * 613354 | ENSG00000176058 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB28** | TRIOBP | * 609761 | ENSG00000100106 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNB98** | TSPEAR | * 612920 | ENSG00000175894 | NSHL, rezessiv, Ektodermale Dysplasie 14, Haar- / Zahntyp mit oder ohne Hypohidrose | |
| **PRLTS5** | TWNK | * 606075 | ENSG00000107815 | Perrault Syndrom, rezessiv, Mitochondriales DNA-Depletion-Syndrom 7 (hepatocerebraler Typ), Progressive externe Ophthalmople | Infertilität bei Frauen, Funktionsstörung der Eierstöcke, Nystagmus, Optikusatrophie, Hypergonadotropher Hypogonadismus (bei Frauen), Hypotonie, Muskelschwäche, Ataxie, Verlust der Gehfähigkeit, Hirnstammatrophie, |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | gie mit mitochondrialen DNA-Deletionen, autosomal-dominant 3 | Kleinhirnatrophie, sensorische axonale Neuropathie, Somnolenz, Psychose, Geistige Behinderung, mild bis mäßig, Müdigkeit, Kardiomyopathie, Demenz, Hypo-/Areflexi, usw. |
| **DFNB18A, USH1C** | USH1C | * 605242 | ENSG00000006611 | NSHL, dominant und rezessiv, Assoziation mit Usher Syndrom Typ 1 | Retinitis pigmentosa (bei Geburt) und Gleichgewichtsprobleme |
| **DFNB, USH1G** | USH1G | * 607696 | ENSG00000182040 | NSHL, rezessiv und Assoziation mit Usher Syndrom Typ 1 | Retinitis pigmentosa (bei Geburt) und Gleichgewichtsprobleme |
| **USH2A** | USH2A | * 608400 | ENSG00000042781 | Usher Syndrom Typ 2, rezessiv, Retinitis pigmentosa 39 | Retinitis pigmentosa (Auftritt ab Pubertät) |
| **DFNB** | WBP2 | * 606962 | ENSG00000132471 | NSHL, rezessiv | |
| **DFNA6/14/38** | WFS1 | * 606201 | ENSG00000109501 | NSHL, dominant und Assoziation mit Wolfram Syndrom 1, rezessiv, Katarakt 41, Wolfram-ähnliches Syndrom, autosomal dominant | Katarakt, Opikusathropie, Ptosis, Nystagmus, Kardiomyopathie, Hodenatrophie, Hydronephrose, geistige Behinderung (in einigen Fällen), Krampfanfälle, Ataxie, Tremor, Dysphagie, Psychische Störungen, Diabetes Mellitus, Diabetes insipidus, Hypothyreose, Depression, Glaukom (in einigen Fällen) |
| **DFNB31, USH2D** | WHRN | * 607928 | ENSG00000095397 | NSHL, rezessiv und Assoziation mit | Retinitis pigmentosa (Auftritt ab Pubertät) |

| | |
|---|---|
| | Usher Syndrom Typ 2 |

## 9.4 AUFLISTUNG ALLER PATHOGENER VARIANTEN IN ZUSAMMENHANG MIT DEN FAMILIEN

*Tab. 11: Tabelle mit einzelnen Familien und zugehörige Klassifizierung der Varianten. Die Tabelle enthält die jeweilige Familie, die erwartete Vererbung, die betroffenen Gene, die Transkripte, das betroffenen Exon die c.DNA Position der Variante, die Allelfrequenz, die Proteinposition, die Abdeckung, sowie die Aussagen der drei Vorhersageprogrammen SIFT, MutationTaster, Polyphen und Splice Vorhersage aufgelistet. Zusätzlich sind noch die Annotation der Datenbanken DVD und gnomAD in die Tabelle integriert.*

| **Num-mer** | **Ver-erbung** | ***Gene*** | **Transkript** | **Exon** | **db SNP** | **cDNA** | **Allel-frequenz** | **Protein** | **Abdeckung** | **SIFT** | **Mutation-taster** | **PolyPhen** | **DVD** | **gnomAD** | **Splice-prediction** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G1** | AD | | | | | | | | | | | | | | |
| **G2** | AR | *ADGRV1* | NM_032119.3 | 30 | | c.6518A>G | 49.2 | p.Asp2173Gly | 120 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 1.0) | wahrscheinlich pathogen, unbekannt Signifikanz | keine Info | |
| | | *ADGRV1* | NM_032119.3 | 83 | | c.17759T>G | 40.7 | p.Leu5920Arg | 211 | Deleterious (score: 0.01) | Disease causing (p-value: 0.999) | probably damaging (Score 0.971) | Unbekannt Signifikanz | keine Info | |
| **G3** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G4** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G5** | unbekannt | *CEACAM16* | NM_001039213.3 | 6 | | c.1094T>G | 45.4 | p.Leu365Arg | 454 | Deleterious (score: 0.02) | Disease causing (p-value 0.707) | keine Info | keine Info | keine Info | |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G6** | AR | *USH2A* | NM_206933.2 | 61 | rs111033364 | c.11864G>A | 47 | p.Trp3955* | 270 | | | | Reclassifzier t als benign, wieder reclassifziert als pathogen | 13 x het, 0 x hom |
| | | *USH2A* | NM_206933.2 | 63 | | c.12889T>C | 51.2 | p.Ser4297Pro | 86 | Deleterious (Score 0.04) | polymorphism | probably damaging (Score 0.971) | keine Info | keine Info |
| | | *USH1G* | NM_173477.4 | 2 | rs149529031 | c.310A>G | 98.7 | p.Met104Val | 395 | keine Info | keine Info | benign (0.081) | pathogen - hearing loss | 14 x het, 0 x hom |
| **G7** | AD | *TECTB* | NM_058222.2 | 8 | | c.853C>T | 52.2 | p.Arg285Cys | 85 | Deleterious (Score 0.02) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 1.0) | keine Info | keine Info |
| **G8** | AD | *ATP11A* | NM_032189.3 | 14 | | c.1546G>A | 58.9 | p.Glu516Lys | | Deleteriou s (Score 0)) | Disease causing (p-value: 1) | Possibly damaging (Score 0.606) | Keine Info | 3 x het, 0 x hom |
| **G9** | AD | *TECTA* | NM_005422.2 | 13 | | c.4437C>G | 0.52 | p.Cys1479Trp | 219 | Deleterious (Score:0) | Disease causing (p-value 1) | probably damaging 1.0 | keine Info | keine Info |
| | | *USH1C* | NM_153676.3 | 24 | rs372227474 | c.2377C>T | 48.6 | p.His793Tyr | 173 | Tolerated (Score 0.31) | disease causing (p-value: 0.988) | probably damaging 0.991 | Unbekannte Signifikanz | 6 x het, 0 xhom |
| | | *MYO6* | NM_004999.3 | 4 | | c.224A>G | 46.2 | p.His75Arg | 65 | Tolerated (score: 0.06) | Disease causing (p-value: 1) | possibly damaging(Score: 0.788) | keine Info | keine Info |
| | | *MITF* | NM_198159.2 | 14 | rs202020443 | c.1132G>A | 51.7 | p.Ala378Thr | 116 | Tolerated (score: 0.54) | Disease causing (p-value: 1) | possibly damaging(Score: 0.724) | Unbekannte Signifikanz | 9 x het, 0 x hom |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *SLC26A5* | NM_198999.2 | Intron 2 | rs116900495 | c.-53-2A>G | 43.1 | p.? | 56 | | | | reclassifiziert benign | 257 x het, 2 x hom. | loss of Splice Site |
| **G10** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G11** | unbekannt | *MYO15A* | NM_016239.3 | 52 | | c.9061C>T | 45.6 | p.Arg3021* | 158 | | | | keine Info | keine Info | |
| | | *MYO15A* | NM_016239.3 | 63 | rs200249886 | c.10181C>T | 42.4 | p.Ala3394Val | 224 | Deleterious (Score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 1.0) | Unbekannt Signifikanz | 110 x het, 0 x hom | |
| | | *MYO7A* | NM_00260.3 | 23 | rs200641606 | c.2886G>C | 46.7 | p.Gln962His | 92 | Tolerated (Score 0.13) | Disease causing (p-value: 1) | possibly damaging 0.904 | Unbekannt Signifikanz | 188 x het, 0 xhom | |
| **G12** | unbekannt | *DIAPH3* | NM_001042517.1 | 25 | rs200189161 | c.3125G>A | 46.7 | p.Arg104His | 139 | Deleterious (Score 0) | disease causing (p-value: 0.954) | probably damaging (Score 0.998) | Unbekannt Signifikanz | 58 x het, 0 x hom | |
| **G13** | unbekannt | *SLC26A4* | NM_000441.1 | Intron 8 | rs80338849 | c.1001+1G>A | 59.8 | p? | 92 | | | | pathogen - Pendred syndrome | 58 x het, 0 xhom | loss of Splice Site |
| | | *SLC26A4* | NM_000441.1 | 11 | rs111033307 | c.1334T>G | 51.4 | p.Leu445Trp | 146 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 0.999) | probably damaging (Score 1.0) | pathogen - Pendred syndrome | 28 x het, 0 x hom | |
| **G14** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G15** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G16** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G17** | unbekannt | *SLC26A4* | NM_000441.1 | 4 | rs111033199 | c.412G>T | 57.1 | p.Val138Phe | 84 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 0.996) | pathogen - Pendred syndrome | 46 x het, 0 x hom | |
| | | *SLC26A4* | NM_000441.1 | Intron 11 | rs376653349 | c.1341+1G>C | 60.6 | p.? | 94 | | | | pathogen, Enlarged vestibular aqueduct and Mondini dysplasia | 4x het, 0 xhom | Loss of Splice Site |
| **G18** | AD&AR | | | | | | | | | | | | | | |
| **G19** | AD | *EYA1* | NM_000503.5 | 18 | rs397517920 | c.1748T>C | 44.9 | p.Leu583Pro | 138 | Deleterious (score: 0.01) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 1.0) | wahrscheinlich pathogen, branchio-oto-renal syndrome | keine Info | |
| **G20** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G21** | AD | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G22** | unbekannt | *THSB2* | NM_003247.3 | 8 | | c.1104G>A | 56 | p.Glu369Lys | 73 | Deleterious (Scor 0.03) | Disease causing (p-value: 0,999) | Possibly damaging (Score 0,818) | Keine Info | 11 x het, 0 hom | |
| | | *THSB2* | NM_003247.3 | 11 | | c.1585G>A | 32,9 | p.Gly529Arg | 94 | Deleterious | Disease causing (p-value: 0,999) | Probably damaging (1,0) | Keine Info | 2 x het, 0 x hom | |
| **G23** | AD | | | | | | | | | | | | | | |
| **G24** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G25** | AR | *CDH23* | NM_022124.5 | Intron 29 | | c.3431-2A>G | 50 | p.? | 116 | | | | keine Info | keine Info | Splice Site loss |
| | | *CDH23* | NM_022124.5 | 35 | | c.4273del | 60.2 | p.Ala1425Argfs *91 | 146 | | | | keine Info | keine Info | |
| **G26** | unbekannt | *TMC1* | NM_138691.2 | 7 | rs121908073 | c.100C>T | 99 | p.Arg34* | 150 | | | | pathogen, deafness | 14 x het, 0 x hom | |
| **G27** | AD | | | | | | | | | | | | | | |
| **G28** | AD | | | | | | | | | | | | | | |
| **G29** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G30** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G31** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G32** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G33** | AD | | | | | | | | | | | | | | |
| **G34** | unbekannt | PEX6 | NM_001316313.1 | Exon 13 | rs61753229 | c.2171G>A | 44.6 | p.Arg724Gln | 92 | Deleterious (score: 0) | | probably damaging 1.0 | Zellweger syndromic pathogen | 5 x het, 0 x homozygote | |
| | | PEX6 | NM_001316313.1 | Exon 8 | rs34324426 | c.1538G>A | 45.3 | p.Arg513Gln | 86 | Deleterious (score: 0) | | probably damaging 0.995 | pathogen | 821 x het, 7 x homozygote | |
| **G35** | AD | *WFS1* | NM_006005.3 | 8 | | c.1037dup | 41.1 | Leu347Alafs*196 | 168 | | | | keine Info | keine Info | |
| | | *SLC17A8* | NM_139319.2 | 3 | | c.1156A>G | 40.9 | p.Thr386Ala | 127 | tolerated (score: 0.14) | disease causing (p-value: 1) | possibly damaging (Score 0.868) | keine Info | keine Info | splicing |
| **G36** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G37** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G38** | unbekannt | *CDH23* | NM_022124.5 | 54 | | c.7597G>A | 97.4 | p.Ala2533Thr | 39 | deleterious (Score 0) | | prob. damaging 1.0 Score | keine Info | keine Info | |
| **G39** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G40** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | |
| **G41** | | *HUWE1* | NM_031407.5 | 61 | | c.8429G>T | 96 | p.Gly2810Val | 25 | Deleterious (score: 0.01) | | benign | HUWE1 not in the database | 3 x heterozygot, 0 x homozygot |
| **G42** | unbekannt | MYO7A | NM_000260.3 | 28 | | c.3546C>A | 45.2 | p.Asn1182Lys | 62 | Deleterious (score: 0.04) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (score: 1.0) | keine Info | keine Info |
| **G43** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | |
| **G44** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | |
| **G45** | unbekannt | *COL11A2* | NM_080680.2 | 57 | rs121912950 | c.4135C>T | 44.9 | p.Arg1379* | 185 | | | | pathogen (Stickler syndrome III) | keine Info |
| **G46** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | |
| **G47** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G48** | AD | MYH14 | NM_001145809.1 | 4 | | c.573C>G | 42.7 | p.Asp191Glu | 82 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 0.988) | keine Info | keine Info | |
| **G49** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G50** | unbekannt | MYO15A | NM_016239.3 | 11 | | c.4235_4237del | 39.4 | p.Phe1412del | 132 | | | | keine Info | keine Info | |
| | | MYO15A | NM_016239.3 | 12 | rs374320243 | c.4430G>A | 49.3 | p.Arg1477His | 75 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 1.0) | Unknwon Signifikanz | 10 x het & 0 x hom | |
| | | MYO15A | NM_016239.3 | 44 | rs377378942 | c.8104G>A | 51 | p.Asp2702Asn | 102 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 0.998) | Unbekannt Signifikanz | 1 x het & 0 x hom | |
| | | COL11A2 | NM_080680.2 | 21 | rs121912952 | c.1861C>A | 61.5 | p.(Pro621Thr) | | Deleterious (Score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 0.974) | pathogen, non-syndromic HL aut rez | 24 x het & 0 x hom | |
| **G51** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G52** | unbekannt | *MARVELD2* | NM_001038603.2 | Intron 4 | rs772048719 | c.1331+2T>C | 100 | p.Lys445fsX449 | 142 | | | | pathogen, deafness | 10 het / 0 homo | Splice site loss |
| **G53** | | *OTOG* | NM_001277269.1 | Exon 35 | | c.5850_5856del | 40.7 | p.Ser1951Leufs*26 | 27 | | | | keine Info | 5 x het, 0 x hom | |
| | unbekannt | OTOG | NM_001277269.1 | Exon 15 | rs530874854 | c.1702C>T | 38.1 | p.Gln568* | 42 | | | | Unbekannt Signifikanz | keine Info | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G54** | AD | *KCNQ4* | NM_004700.3 | 5 | | c.746T>C | 36.5 | p.Leu249Pro | 137 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 1.0) | keine Info | keine Info | |
| **G55** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G56** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G57** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G58** | unbekannt | *CDH23* | NM_022124.5 | Intron 58 | | c.8308+7C>T | 54.5 | p.? | 11 | | | | keine Info | keine Info | new Splice Site |
| | | *CDH23* | NM_022124.5 | 61 | | c.8809C>G | 43.8 | p.Leu2937Val | 96 | Deleterious (score: 0) | | benign | keine Info | 2 x het, 0 x hom | |
| **G59** | unbekannt | *GJB2* | NM_004004.5 | Intron 1 | rs80338940 | c.-23+1G>A | homozygot | p. ? | | | | | Deafness, autosomal recessive 1, pathogen | 6 x het, 0 x hom | loss of Splice Site |
| **G60** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G61** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G62** | unbekannt | *TECTA* | NM_005422.2 | 9 | | c.2858T>A | 33.9 | p.Leu953His | 56 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 1.0) | keine Info | keine Info | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G63** | unbekannt | *POU3F4* | NM_000307.4 | 1 | | c.632C>T | 100 | p.Thr211Met | 83 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging | pathogen, X-linked deafness | keine Info | |
| **G64** | unbekannt | *HUWE1* | NM_031407.5 | 30 | | c.3221G>T | 100 | p.Cys1074Phe | 56 | Deleterious | | Porbably damaging (0,996) | Keine Info | Keine Info | |
| **G65** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G66** | unbekannt | *TMPRSS3* | NM_024022.2 | Intron 4 | rs374793617 | c.323-6G>A | 98 | p.Cys107fsX132 | 149 | | | | pathogen, childhood onset deafness | 14 x het & 0 x hom | new Splice site |
| **G67** | unbekannt | *DFNA5* | NM_004403.2 | Intron 7 | | c.991-2A>G | 35.3 | p.? | 51 | | | | pathogen non-syndromic HL | keine Info | loss of Splice Site and new Splice Site |
| **G68** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **G69** | unbekannt | *LRTOMT* | NM_001145309.3 | Intron 6 | | c.83+2T>A | 93.8 | p.? | 16 | | | | keine Info | keine Info | loss of Splicesite |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G70** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | |
| **G71** | AD | *PAX3* | NM_181459.3 | 2 | | c.291dup | 47.5 | p.Pro98Serfs*16 | 80 | | | | pathogen | keine Info |
| **G72** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | |
| **G73** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | |
| **G74** | unbekannt | *CIB2* | NM_006383.3 | Exon 3 &4 | | Deletion | | | | | | | | |
| | | *CIB2* | NM_006383.3 | Exon 4 | rs765741202 | c.300_309delGGGAGCCGAC | 81.8 | p.Glu100AspfsX28 | 11 | | | | pathogen | 17 het / 0 homo |
| **E1** | AR | *LHFPL5* | NM_182548 | 2 | No | c.575T>C | 0,991 | p.Leu192Pro | 112 | deleterious | disease causing | probably damaging | keine Info | keine Info |
| **E2** | AR | *SLC26A4* | NM_000441 | 10 | rs397516413 | c.1198delT | 0,987 | p.Cys400Valfs*32 | 75 | | | | pathogen | 7 x het, 0 hom |
| **E3** | AR | | | | | | | | | | | | | |
| **E4** | AR | *OTOF* | NM_195248 | 26 | ? | c.3269C>A | 0,898 | p.Ala1090Glu | 59 | deleterious | disease causing | probably damaging 0,988 | pathogen | 4 x het, 0 xhom |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E5** | AR | *MYO15A* | NM_016239.3 | 11 | | c.4310A>G | 100 | p.Phe708_Asp710 | 44 | deleterious | disease causing | probably damaging | wahrscheinlich pathogen | 3 x het + 0 x homozygote |
| **E6** | AR | *SLC26A4* | NM_000441 | 19 | ? | c.2121_2129del GTTCTTTGA | 0,901 | p.Gly707Argfs*72 | 71 | | | | keine Info | keine Info |
| **E7** | AR | | | | | | | | | | | | | |
| **E8** | AR | *CDH23* | NM_022124.5 | 11 | ? | c.1043T>C | 0,959 | p.Phe348Ser | 345 | deleterious | disease causing | probably damaging 0.999 | keine Info | keine Info |
| **E9** | AR | *TMIE* | NM_147196.2 | 3 | rs28942097 | c.250C>T | 0,979 | p.Arg84Trp | 97 | deleterious | disease causing | probably damaging 1,0 | pathogen deafness | 6 x het + 0 hom |
| **E10** | AR | *SLC26A4* | NM_000.441.1 | 19 | ? | c.2106del | 0,931 | p.Lys702Asnfs*19 | 58 | | | | pathogen | 2 x het, 0 x hom |
| **E11** | unbekannt | *GJB2* | NM_004004.5 | 2 | rs80338939 | c.35del | 85.7 | p.Gly12Valfs*2 | 7 | | | | pathogen | 1737 x het, 10 x homozygote |
| **E12** | AR | *MYO15A* | NM_016239.3 | 17 | ? | c.4909_4911del | 0,987 | p.Glu1637del | 155 | | | | Wahrscheinlich pathogen | keine Info |
| **E13** | AR | *MYO15A* | NM_016239.3 | 2 | | c.2552dup | 100 | p.Leu853Alafs*127 | 6 | | | | keine Info | keine Info |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | NM_016239.3 | 33 | rs114274755 | c.6796G>A | 97.4 | p.Val2266Met | 77 | deleterious (0) | disease causing (p-value 1) | probably damaging (1.0) | benign (reclassified) | 1240 x het, 5 x homozygote | |
| | | | NM_016239.3 | 49 | rs752873001 | c.8644G>A | 98.7 | p.Asp2882Asn | 229 | tolerated (score 0.17) | disease causing (p-value 1) | probably damaging (0.957.0) | unbekanntSignifikanz | 5 x het, 0 x homozygote | |
| | | | NM_016239.3 | 60 | | c.9785G>C | 98.9 | p.Arg3262Pro | 190 | deleterious (0.01) | disease causing (p-value 0.999) | possibly damaging (0.911) | wahrscheinlich benign | 5 x het, 0 homozygote | |
| **E14** | AR | *TECTA* | NM_005422.2 | Intron 15 | | c.5272+5G>C | 95 | p.? | 60 | | | | nof info | keine Info | loss of Splicesite |
| **E15** | AR | *OTOF* | NM_194248.2 | 47 | rs201326023 | c.*20G>A | 97.6 | p.? | 123 | deleterious (0) | disease causing (p-value 1) | probably damaging (1.0) | unbekanntSignifikanz | 9 x het, 0 x homozygote | |
| **E16** | AR | *TMC1* | NM_138691.2 | 17 | | c.1535G>A | 100 | p.Arg512Gln | 78 | tolerated (score 0.07) | disease causing (p-value 1) | probably damaging (1.0) | keine Info | 1 x het, 0 x hom | |
| **E17** | AR | *MYO15A* | NM_016239.3 | 24 | rs374183624 | c.5810G>A | 50.8 | p.Arg1937His | 311 | deleterious (0) | disease causing (p-value 1) | probably damaging (1.0) | wahrscheinlich pathogen | 7 x het, 0 x homozygote | |
| | | *MYO15A* | NM_016239.3 | 47 | | c.8446_8449del | 45.4 | p.Leu2816Valfs*11 | 183 | | | | keine Info | keine Info | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *MYO15A* | NM_016239.3 | 62 | rs765670344 | c.9997C>T | 45.9 | p.Arg3333Trp | 386 | deleterious (0) | polymorphism | probably damaging 0.995 | unbekanntSignifikanz | 8 x het, 0 x homozygote | |
| **E18** | AR | | | | | | | | | | | | | | |
| **E19** | AR | *SLC26A4* | NM_000441.1 | 10 | | c.1229C>T (het) | 53.9 | p.Thr410Met | 89 | deleterious | disease causing, (p-value: 1) | probably damaging (1.0) | pathogen | 48 x heterozygot, | |
| **E20** | AR | | | | | | | | | | | | | | |
| **E21** | AR | *MYO15A* | NM_016239.3 | Intron 18 | | c.5133+1G>A | 100 | p.? | 56 | | | | keine Info | keine Info | loss of Splice site |
| | | *USH2A* | NM_206933.2 | 40 | | c.7489G>A | 28. Apr | p.Val2497Met | 74 | deleterious | disease causing (p-value 0.718) | probably damaging (score 0.968) | keine Info | keine Info | |
| | | *USH2A* | NM_206933.2 | 61 | rs146264950 | c.11815G>A | 45.4 | p.Glu3939Lys | 174 | deleterious | disease causing (p-value 0.995) | benign | benign | 131 x het, 1homozygote | |
| **E22** | AR | | | | | | | | | | | | | | |
| **E23** | AR | | | | | | | | | | | | | | |
| **E24** | AR | *OTOA* | NM_1446723 | 1-16 | | c.1-c.1806 | | p.? | 0 | | | | Keine Info | Keine Info | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *OTOA* | NM_ | 21 | | c.2302-c.2431 | | | 0 | | | | Keine Info | Keine Info | |
| **E25** | AR | | | | | | | | | | | | | | |
| | | *TRIOBP* | NM_001039141.2 | 7 | | c.2521C>T | 98.0 | p.Arg841* | 246 | | | | keine Info | 2 x het, 0 x homozygote | |
| **E26** | AR | | | | | | | | | | | | | | |
| | | *COL9A1* | NM_001851.4 | Ex 6-33 | | c.697-3754_2112+769del | | p.Phe233_Ser704del | 0 | | | | Keine Info | Keine Info | |
| **E27** | AR | *no* | | | | | | | | | | | | | |
| **E6** | AR | *CIB2* | NM_006383.3 | 5 | | c.507C>G | 99.0 | p.Phe169Leu | 103 | deleterious | disease causing | probably damgaing 1,0 | Unbekannte Signifikanz | keine Info | |
| **E28** | | *TECTA* | NM_005422.2 | Intron 15 | | c.5272+5G>C | 96.7 | p.? | | | | | nof info | keine Info | loss of Splicesite |
| **E29** | unbekannt | *LOXHD1* | NM_144612.6 | 39 | rs774836161 | c.6136G>A | 48.1 | p.Glu2046Lys | 156 | deleterious | disease causing | probably damging, 0,910 | Unbekannte Signifikanz | 1 x het, 0 x homozygote | |
| | | *LOXHD1* | NM_144612.6 | 32 | | c.4903A>G | 53.7 | p.Thr1635Ala | 164 | deleterious | disease causing | probably damging, 0,996 | not info | keine Info | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E30** | AR | *S1PR2* | NM_004230.3 | 2 | | c.323G>A | 98.8 | p.Arg108Gln | 84 | Deleterious (Score 0) | disease causing | probably damaging 1.0 | keine Info | keine Info | |
| **E31** | AR | *MYO7A* | NM_000260.3 | 29 | rs111033178 | c.3719G>A | 100 | p.Arg1240Gln | 59 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | Probably Damaging (score 1.000) | Pathogen (Usher syndrome) | 14 x het, 0 x hom | |
| **E32** | AR | *LHFPL5* | NM_182548 | 2 | rs753739358 | c.472C>T | 97.1 | p.Arg158Trp | 69 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 0.997) | Probably Damaging (score 0.990) | Unbekannte Signifikanz | 17 x het, 0 x homozygote | |
| **E33** | AR | *no* | | | | | | | | | | | | | |
| **E34** | AR | *no* | | | | | | | | | | | | | |
| **E35** | unbekannt | *no* | | | | | | | | | | | | s | |
| **E36** | unbekannt | *KCNQ4* | NM_000218.2 | 6 | | c.912G>A | 95 | p.Trp304* | 62 | | | | Keine Info | Keine Info | |
| **E37** | unbekannt | *PDZD7* | NM_001195263.1 | Intron 11 | rs747536638 | c.1750-2A>G | 100 | p.? | 36 | | | | pathogen modifier in usher syndrome | not in | loss of Splice site |
| **E38** | unbekannt | *no* | | | | | | | | | | | | | |
| **E39** | AR | *ILDR1* | NM_00119979.1 | Exon 2 | | c.59-5_89del | 95 | p.? | 80 | | | | close to another deletion in exon which is known for recessive hearing loss | keine Info | loss of Splice |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E40** | unbekannt | *OTOA* | NM_144672.3 | 18 | | c.1939G>C | 99.3 | p.Gly647Arg | 148 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | Probably Damaging (score 0.989) | Pathogen (HL, AR) | 3 x het, 0 x hom | |
| **E41** | AR | *LOXHD1* | NM_144612.6 | 5 | | c.593G>A | 100 | p.Gly198Glu | 44 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | Probably Damaging (score 1.000) | keine Info | keine Info | |
| **E42** | unbekannt | | | | | | | | | | | | | | |
| **E43** | unbekannt | *POU3F4* | NM_000307.4 | 1 | | c.656T>C | 96.3 | p.Leu219Pro | 54 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 1.000) | keine Info | keine Info | |
| **E44** | unbekannt | *CLPP* | NM_006012.2 | 6 | | c.706del | 88 | p.Gln236Argfs *6 | 83 | | | | keine Info | keine Info | |
| **E45** | unbekannt | *no* | | | | | | | | | | | | | |
| **E46** | unbekannt | *LOXHD1* | NM_144612.6 | 29 | rs201587138 | c.4480C>T | 100 | p.Arg1494* | 39 | | | | hearing loss autosomal recessive 77, pathogen | 124 x het, 1 x homozygote | *LOXHD1* |
| | | *LOXHD1* | NM_144612.6 | 29 | rs187587197 | c.4526G>A | 96.7 | p.Gly1509Glu | 30 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging (Score 1.000) | reclassified benign | 1621 x het + 35 x homozygotes | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E47** | AR | *SLC26A4* | NM_000441 | Intron 7 | rs111033313 | c.919-2A>G | 50.4 | p.? | 113 | | | | Pendred syndrome<br><br>pathogen | 103 x het | loss of Splice site |
| | | *SLC26A4* | NM_000441 | Exon 11 | rs111033307 | c.1334T>G | 40.6 | p.Leu445Trp | 170 | Deleterious (Score : 0) | Disease causing (p-value: 0.999) | probably damaging (score 1.0) | Pendred syndrome<br><br>pathogen | 28 x het | |
| **E48** | AR | *OTOA* | NM_144672.3 | Exon 16 | rs755291566 | c.1727T>C | 99.4 | p.Ile576Thr | 166 | Deleterious (Score : 0) | Disease causing (p-value: 0.998) | probably damaging (score 0.998) | Unbekannte Signifikanz | 9 x het, 0 homozygote | |
| **E49** | AR | *PCDH15* | NM_001142763.1 | downstream | | c.*21519C>T | 97.5 | p.Gln1576Stop | 121 | | | | hearing loss, non syndromic, autosomal recessive, pathogen | keine Info | |
| **E50** | AR | *TRIOBP* | NM_001039141.2 | Exon 7 | | c.3140_3141del | 91.5 | p.Pro1047Argfs*3 | 47 | | | | keine Info | keine Info | |
| **E51** | AR | *PCDH15* | NM_001142763.1 | Exon 5 | | c.173G>A | 95.8 | p.Gly58Asp | 95 | Deleterious (Score: 0.03) | | probably damaging (score 1.0) | keine Info | keine Info | |
| **E52** | unbekannt | *CABP2* | NM_001318496.1 | Intron 6 | rs149712664 | c.655+1G>T | 95.5 | p.? | 22 | | | | pathogen, hearing impairment autosomal recessive | 291 x het, 0 x homozygote | loss of Splice site |
| | | *CDH23* | NM_022124.5 | Exon 48 | rs397517349 | c.6614C>T | 52.9 | p.Pro2205Leu | 17 | Deleterious (Score 0) | Disease causing (p-value 1) | probably damaging (Score | wahrscheinlich pathogen | 1 x het, 0 x hom | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | | | 0.999) | | | |
| **E53** | AR | *no* | | | | | | | | | | | | | |
| **E54** | AR | *MYO15A* | NM_016239.3 | Exon 61 | | c.9882delG | 93.6 | p.Arg3295Valfs*16 | 156 | | | | keine Info | keine Info | |
| **E55** | unbekannt | *MYO7A* | NM_000260.3 | Exon 33 | | c.4440A>C | 38.5 | p.Ser1480Ser | 39 | | | | keine Info | keine Info | loss of Splice Site |
| | | *MYO7A* | NM_000260.3 | Exon 43 | rs745646247 | c.5886_5888del | 45.6 | p.Phe1963del | 68 | | | | Usher Syndrom 1<br><br>pathogen | 12 x heterozygot, 0 x homozygot | |
| **E79** | x-linked | *SMPX* | NM_014332.2 | Exon 3 | rs398122930 | c.99del | 95.8 | p.Arg34Glufs*47 | 48 | | | | pathogen, progressive hearing loss | keine Info | |
| **E56** | AR | *SLC26A4* | NM_000441 | Exon 17 | rs111033318 | c.2027T>A | 96.3 | p.Leu676Gln | 27 | Deleterious (Score: 0) | Disease causing (p-value 1.0) | probably damaging (score 0.999) | pathogen, deafness, non-syndromic, autosomal recessive | keine Info | |
| **E57** | AR | *GJB2* | NM_004004.5 | 2 | rs80338939 | c.35del | | p.Gly12Valfs*2 | | | | | pathogen | 1737 x het, 10 x homozygote | |
| **E80** | AR | *SMPX* | NM_014332.2 | Exon 3 | rs398122930 | c.99del | 36.7 | p.Arg34Glufs*47 | 49 | | | | pathogen, progressive hearing loss | keine Info | |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E81** | AR | *SMPX* | NM_014332.2 | Exon 3 | rs398122930 | c.99del | 95.9 | p.Arg34Glufs*47 | 74 | | | | pathogen, progressive hearing loss | keine Info |
| **E58** | AR | *MYO15A* | NM_016239.3 | Exon 19 | rs778354646 | c.5203C>T | 97.6 | p.Arg1735Trp | 83 | Deleterious (Score: 0) | Disease causing (p-value 0.863) | probably damaging (score 1.0) | unbekanntSignifikanz | 4 x heterozygot, 0 x homozygot |
| **E59** | AR | *MYO15A* | NM_016239.3 | Exon 2 | rs201794569 | c.1387A>G | 100 | p.Met463Val | 48 | Deleterious (Score 0) | polymorphism | benign | unbekanntSignifikanz | 345 x het, 1 x homoygot |
| | | *MYO15A* | NM_016239.3 | Exon 46 | rs773476384 | c.8324G>A | 99.4 | p.Arg2775His | 177 | Deleterious (Score 0) | Disease causing (p-value 1.0) | probably damaging (score 1.0) | pathogen | 2 x heterozygot, 0 x homozygot |
| **E60** | AR | *MYO15A* | NM_016239.3 | Exon 58 | | c.9584C>G | 100 | p.Pro3195Arg | 152 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging 1.0 | keine Info | 1 x het, 0 x hom |
| **E61** | AR | *PDZD7* | NM_001195263.1 | Exon 3 | rs148695069 | c.307G>C | 97.6 | p.Gly103Arg | 127 | Deleterious (score: 0) | | probably damaging 1.0 | pathogen, non-syndromic HL, recessive | 4 x heterozygot, 0 x homozygot |
| **E62** | AR | *GPSM2* | NM_001321039.1 | Exon 8 | | c.881_885del, | 100 | p.Leu294Serfs*4 | 58 | | | | keine Info | keine Info |
| **E63** | AR | *LHFPL5* | NM_182548.3 | Exon 1 | | c.34A>T | 98.4 | p.Lys12* | 64 | | | | keine Info | keine Info |
| **E64** | AR | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E65** | unbekannt | *GJB2* | NM_004004.5 | Exon 2 | rs80338939 | c.35del | | p.Gly12Valfs*2 | | | | | pathogen | 1737 x het, 10 x homozygote |
| **E66** | AR | *SLC26A4* | NM_000441.1 | Exon 5 | rs111033348 | c.578C>T | 96.8 | p.Thr193Ile | 95 | Tolerated (score: 0.06) | Disease causing (p-value: 0.986) | possibly damaging (0.929) | pathogen, deafness, non-syndromic autosomal recessive | 5 x het, 0 x homozygote |
| **E67** | AR | *GJB2* | NM_004004.5 | Exon 2 | rs80338944 | c.231G>A | | p.Trp77* | | | | | pathogen | 35 x het, 0 x homozygote |
| **E68** | AR | | | | | | | | | | | | | |
| **E69** | AR | *MYO15A* | NM_016239.3 | Exon 50 | rs768364759 | c.8725G>A | 96 | p.Gly2909Ser | 126 | Deleterious (score: 0.04) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging 1.0 | Pathogen Hearing loss, non-syndromic, autosomal recessive | 1 x het, 0 x homozygote |
| **E70** | unbekannt | *OTOF* | NM_195248 | Exon 27 | | c.3346C>T | 98.8 | p.Arg1116* | 84 | | | | keine Info | 1 x het, 0 x hom |
| | | *ILDR1* | NM_001199799.1 | Exon 7 | rs775062249 | c.1384C>T | | p.Arg462* | | | | | Unbekannt Signifikanz | 9 x heterozygot, 0 x homozygote gnomAd |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E71** | unbekannt | *LARS2* | NM_015340.3 | Exon 14 | rs199589947 | c.1565C>A | 97.2 | p.Thr522Asn | 36 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging 1.0 | Pathogen, perrault syndrome | 80 x heteterozygote, 0 x homozygote |
| **E72** | AR | *TMIE* | NM_147196.2 | Exon 3 | | c.349G>T | 94.7 | p.Glu117* | 132 | | | | keine Info | keine Info |
| **E73** | unbekannt | *OTOA* | NM_144672.3 | Exon 7 | rs759241745 | c.469C>T | 98.7 | p.Arg157Cys | 79 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging 1.0 | Unbekannt Signifikanz | 6 x het, 0 x homozygote |
| **E74** | AR | | | | | | | | | | | | | |
| **E75** | AR | *TRIOBP* | NM_001039141.2 | Exon 7 | | c. 2173_2174del | | p.Ala725Porfs*35 | | | | | keine Info | keine Info |
| **E76** | AR | *CDH23* | NM_022124.5 | Exon 23 | | c.2410G>A | 100 | p.Asp804Asn | 19 | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 1) | probably damaging 1.0 | keine Info | keine Info |
| **E77** | AR | *CDH23* | NM_022124.5 | Exon 10 | rs121908355 | c.902G>A | 47.5 | p.Arg301Gln | | Deleterious (score: 0) | | probably damaging 1.0 | hearing loss, pathogen | 3 x het, 0 x homozyote |
| **E78** | AD | *ACTG1* | NM_001199954.1 | 4 | | c.525C>G | 48 | p.Ile175Met | 150 (52) | Deleterious (score: 0) | Disease causing (p-value: 0.998) | Benign (score 0.039) | keine Info | keine Info |

hom = homozygot, het = heterozygot

## 9.5 PHÄNOTYP DER FAMILIEN

*Tab. 12: Auflistung der einzelnen familiären Hörstörung. Die Tabelle enthält die jeweilige Familie und die Einstufung der Hörstörung nach Art, Auftritt Schweregrad, betroffenen Frequenzen, Lateralität und zusätzlichen Symptomen. Leere Spalten bedeuten, dass keine Information zum Phänotyp in dieser Familie vorliegt.*

| Num mer | Art der HS | Auftritt der HS | Schwere-grad der HS | betroffene Frequen-zen | Pro-gres-sivität | Laterali-tät | zusätzliche Symptome |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G1** | sensorineural | postlingual (ab 21 Jahre) | moderat - schwer | mittlere und hohe Frequenzen | | bilateral | keine |
| **G2** | sensorineural | congenital/prelingual | moderat | mittlere und hohe Frequenzen | stabil | bilateral | keine |
| **G3** | sensorineural | prelingual (Diagnose mit 2 Jahren) | mild - moderat | alle Frequenzen | stabil | bilateral | keine |
| **G4** | sensorineural | prelingual (im Kindergarten) | schwer-taubheit grezend | hohe Frequenzen links, rechts alle Frequenzen | stabil | bilateral/assym etrisch | keine |
| **G5** | sensorineural | postlingual (9 Jahre) | moderat | alle Frequenzen (bis auf 0,125kHz) | stabil | bilateral | Migräne, Allergie, Neurodermatitis, Asthma |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G6** | sensorineural | prelingual/Bruder postlingual | moderat | mittlere und hohe Frequenzen | stabil | bilateral | keine - Bruder leichter betroffen, Lebensmittelallergie |
| **G7** | sensorineural | postlingual | mild | tiefe Frequenzen | stabil | bilateral | keine |
| **G8** | sensorineural | prelingual (Diagnose innerhalb 2-4 Jahren) | schwer | mittlere Frequenzen | stabil | bilateral | Tinnitus, Untererregbarkeit der Vestibularorgane |
| **G9** | sensorineural | postlingual | moderat -schwer | hohe Frequenzen | progressiv | bilateral | keine |
| **G10** | sensorineural | postlingual (Diagnose mit 6,5 Jahren) | schwer - taubheit grenzend | vor allem mittlere Frequenzen | progressiv | bilateral | keine |
| **G11** | sensorineural | postlingual (Diagnose mit 6 Jahren) | moderat | mittlere und hohe Frequenzen | progressiv | unilateral | keine |
| **G12** | sensorineural | prelingual (Diagnose mit 3 Jahren) | rechts: mild, links | hohe Frequenzen | stabil | bilateral/assym | keine |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | moderat | | | etrisch | |
| **G13** | sensorineural | prelingual | moderat - schwer | Tieftonfrequenzen links, all Frequenzen rechts | stabil | bilateral/assymetrisch | keine |
| **G14** | sensorineural | postlingual | moderat | mittlerere und hohe Frequenzen | progressiv | bilateral | Asthma |
| **G15** | sensorineural | congenital | taub | alle Frequenzen | | bilateral | Verdacht auf Waardenburg Syndrom a.g. von wie0en Wimpern, weißen Flecken auf Armen und zentraler Felck an Stirn, sowie helle Haare, kein Mundschluss |
| **G16** | sensorineural | prelingual | schwer - taubheit grenzend | alle Frequenzen, links vor allem hohe Frequenzen | | bilateral/assymetrisch | Tinnitus, Thrombose |
| **G17** | sensorineural | | schwer - taubheit grenzend | alle Frequenzen | | bilateral | Gehirnzyste, Asthma, Haustaubmilbenallergie, Hörstürze |
| **G18** | Sensorineural | congenital | mild | tiefe und mittlere | | bilateral | keine |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Frequenzen | | | |
| | sensorineural | postlingual | mild | | | bilateral | keine |
| | sensorineural | postlingual | moderat | tiefe und mittlere Frequenzen | progressiv | bilateral | keine |
| **G19** | gemischt | prelingual | moderat- schwer | mittlere und hohe Frequenzen links, rechts alle Frequenzen, aber v.a. hohe | | bilateral/ assymetrisch | Mittelohrfehlbildungen, präauriculäre Fisteln, Asthma,erweitertes Nierenbecken |
| **G20** | sensorineural | prelingual | moderat -schwer | alle Frequenzen | progresssiv | bilateral/ assymetrisch | Entwicklungsverzögerung, Verhaltensauffälligkeiten, Sprachentwicklungsverzögerung |
| **G21** | sensorineural | variable Auftritt, postlingual | schwer - taubheit grenzend | alle Frequenzen | progressiv | bilateral | Tinnitus, Asthma, Lebensmittelallergie, |
| **G22** | sensorineural | postlingual (Diagnose 8 Jahre) | moderat | hohe Frequenzen, teil mittlere Fequenzen | stabil | bilateral | Rötelinfektion, Windpocken |
| **G23** | sensorineural | prelingual (7 Monate) | mild | alle Frequenzen | stabil | bilateral | keine |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **G24** | sensorineural | congenital | schwer- taubheit grenzend | alle Freuquenzen | bilateral | Herzfehler |
| **G25** | sensorineural | congenital- prelingual | taub | alle Frequenzen | bilateral | keine |
| | sensorineural (Vater) | postlingual | moderat | hohe Frequenzen | bilateral | keine |
| **G26** | sensorineural | congenital | schwer - an Taubheit grenzend | | bilateral | CMV-Infektion |
| **G27** | sensorineural | postlingual (10. Lebensjahr) | schwer - an Taubheit grenzend | mittlere und hohe progressiv Frequenzen | bilateral | Asthma, Allergien, |
| **G28** | sensorineural | prelingual | mild - moderat | | bilaeral | |
| **G29** | sensorineural | prelingual | moderat-schwer | mittlere und hohe Frequenzen | bilateral | keine |
| **G30** | sensorineural | postlingual | sehr mild | hohe Frequenzen | bilateral | keine |
| **G31** | sensorineural | | mild-moderat rechts, links schwer | mittlere Frequenzen progressiv rechts, links alle Frequenzen | bilateral/ assymetrisch | keine |
| **G32** | sensorineural | prelingual (Diagnose bei Vorschuluntersuchung) | moderat | alle Frequenzen | unilateral, links | keine |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G33** | | | | | | bilateral | Mikrotie |
| **G34** | sensorineural | prelingual (ca. 5 Jahre) | moderat | hohe Freuqenzen | | bilateral | keine |
| **G35** | sensorineural | prelingual | links: mild - moderat, rechts: mild | prelingual | nicht progressiv | bilateral/assymetrisch | leichte Entwicklungsverzögerung, Sehschwäche |
| **G36** | sensorineural | congenital | moderat - schwer | mittlere und hohe Frequenzen | progressiv | bilateral | keine |
| **G37** | sensorineural/möglicherweise gemischt | prelingual | schwer (70-91 dB) | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | generelle Entwicklungsverzögerung |
| **G38** | Sensorineural | prelingual (Diagnose mit 5 Jahren) | taub (>91dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **G39** | Sensorineural | postlingual (Diagnose mit 6,5 Jahren) | moderat - schwer | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **G40** | konduktiv | prelingual (Diagnose mit 5-6 Jahren) | moderat | mittlere Frequenzen | nicht progressiv | unilateral/rechts | keine |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G41** | sensorineural | Prelingual (ca. 5-6 Jahre) | schwer (70-91 dB) | mittlere und hohe Frequenzen | ? | unilateral/rechts | VACTERAL Syndrom: Syndaktylie von Zeh 2 und 3, sowie distal rotierte Ohren, Hautpigementstörung, Sprachverzögerung, Astigmatismus |
| **G42** | Sensorineural | prelingual (ca. 0-2 Jahre) | taub (>91dB) | | progressiv | bilateral | Schwindel und Tinnitus |
| **G43** | Sensorineural | congenital | schwer- taubheit grenzend | alle Frequenzen | progressiv - links | bilateral | Missbildung der Cochlea |
| **G44** | Sensorineural | prelingual (Diagnose mit ca. 5 Jahren) | rechts: taub, links moderat - schwer | alle Frequenzen | progressiv rechts, stabil links | bilateral/assymetrisch | vergrößertes vestibulares Aquädukt, Gleichgewichtsprobleme, Nervöse Tiks, Asperger- Autismus, Gelbsucht bei Geburt, Verhaltensauffälligkeiten (aggressiv) Balkenagenesie |
| **G45** | | | | | | | |
| **G46** | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G47** | Sensorineural | prelingual | taub | alle Frequenzen | | unilateral/links | keine |
| **G48** | Sensorineural | congenital | moderat - schwer | Tieftonfrequenzen/alle Frequenzen | | bilateral | keine |
| **G49** | Sensorineural, | congenital | links: mild, rechts: moderat | Tieftonfrequenzen | | bilateral/assymetrisch | keine |
| **G50** | Sensorineural, | prelingual (ca. 3 Jahren) | moderat - schwer, Tendenz zu taub | mittlere und hohe Frequenzen | progressiv | bilateral | Sichelfüße, Sehschwäche |
| **G51** | Sensorineural | prelingual | moderat | mittlere und hohe Frequenzen | | unilateral/rechts | keine |
| **G52** | Sensorineural | prelingual, wahrscheinlich congenital | taub (>91dB) | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **G53** | Sensorineural | congenital | mild - moderat | alle Frequenzen | | bilateral | keine |
| **G54** | Sensorineural | congenital | mild-moderat | alle Frequenzen | progressiv | bilateral | keine |
| **G55** | | | | | | | |
| **G56** | | | | | | | |
| **G57** | sensorineural, evtl | prelingual | taub (>91dB) | alle Frequenzen | progressiv | unilateral/links | keine |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | konduktiv | | | | | | |
| **G58** | | | | | | | |
| **G59** | Sensorineural | congenital | schwer - taubheit grenzend | mittlere und hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **G60** | auditorische synaptische Neuropathie, milde Mittelohrhörstörung | congenital | links: moderat - schwer, rechts: moderat - taub | mittlere und hohe Frequenzen | progressiv | bilateral/ assymetrisch | Dünndarm atresie |
| **G61** | Sensorineural | prelingual (6 Monate) (Neugborenenscreenign war normal) | schwer | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | auffällige Ohren, Mutter zeigt submuköse Gaumenspalte und HS |
| **G62** | Sensorineural | congenital | rechts: schwer, links: moderat - schwer | mittlere und hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral/ assymetrisch | keine |
| **G63** | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G64** | Sensorineural, möglicherweise neural | congenital | taub (>91dB) | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | Dandy-Walker Syndrom, Hydrocephalus, bilateral Fibrolipoma, spina bifida, muskuläre Hypotonie, Strabismus, Mondini Fehlbildung |
| **G65** | Sensorineural | prelingual (Diagnose mit 4-5 Jahre) | DPOAEs: absent | alle Frequenzen | progressiv | unilateral/rechts | keine, vergrößertes Aquädukt rechts |
| **G66** | Sensorineural | prelingual (Diagnose 4-5 Jahre) | taub (>91dB) | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **G67** | Sensorineural | prelingual | mild -moderat | mittlere und hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | Gelbsucht bei Geburt |
| **G68** | Sensorineural | prelingual (Diagnose mit 5 Jahren) | rechts: moderat - schwer, links: moderat | mittlere und hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral/assymetrisch | Strabismus |
| **G69** | | | | | | | |
| **G70** | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **G71** | sensorineural | prelingual | taub | | | unilateral/rechts | Nachtblindheit, weiße Haarlocke, Heterochromie, Waardenburg Syndrom |
| **G72** | Sensorineural | congenital | schwer | | | bilateral | psychomotorische Verzögerung, Hüftdysplasie, generelle Entwicklungsverzögerung |
| **G73** | Sensorineural | prelingual (Diagnose mit 3 Jahren) | mild | mittlere Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **G74** | sensorineural | congenital | schwer | alle Frequenzen | | bilateral | keine |
| **E1** | | | | | | | |
| **E2** | sensorineural | prelingual ( 1 Jahr) | moderat - schwer | | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E3** | | | | | | | keine |
| **E4** | | | | | | | keine |

| | |
|---|---|
| **E5** | |
| **E6** | |
| **E7** | |
| **E8** | |
| **E9** | |
| **E10** | |
| **E11** | |
| **E12** | taub |
| **E13** | |

| | |
|---|---|
| **E14** | |
| **E15** | |
| **E16** | |
| **E17** | |
| **E18** | |
| **E19** | |
| **E20** | |
| **E21** | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E22** | | | | | | | |
| **E23** | | | | | | | sehr milde mentale Retardierung |
| **E24** | | | mild | | | unilateral | |
| **E25** | | | | | | | |
| **E26** | sensorineural | | moderat-schwer | mittlere und hohe Frequenzen | | bilateral | keine |
| **E27** | sensorineural | congenital | schwer | mittlere und hohe Frequenzen | | bilateral | keine |
| **E6** | sensorineural | congenital | schwer-taubheit grezend | | progressiv | bilateral | keine |
| **E28** | | | | | | | |
| **E29** | | | taub | | | | |
| **E30** | sensorineural/gemischt | congenital/prelingual | taub | | | bilateral | keine |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **E31** | | taub | |
| **E32** | | | |
| **E33** | | | |
| **E34** | | | |
| **E35** | | | |
| **E36** | | | |
| **E37** | | | |
| **E38** | | | |
| **E39** | | | |
| **E40** | | | |
| **E41** | | | |
| **E24** | sensorineural | mild - moderat | bilateral |
| **E42** | | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E43** | | | | | | | |
| **E44** | | | | | | | |
| **E45** | | | | | | | |
| **E46** | | | | | | | |
| **E47** | | | | | | | Pendred Syndrom |
| **E48** | sensorineural | congenital | moderate - schwer +T165:T190(56-70dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E49** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E50** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E51** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E52** | sensorineural | congenital | moderate - schwer (56-70dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E53** | gemischt | congenital | schwer (70-91 dB) | hohe Frequenzen | fluktuierend | bilateral | keine |
| **E54** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E55** | sensorineural | congenital | an taubheit grenzend (>91 dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E79** | sensorineural | congenital | moderat | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E56** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E57** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E80** | sensorineural | congenital | schwer | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E81** | sensorineural | congenital | mild | hohe Freuqenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E58** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E59** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E60** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E61** | sensorineural | congenital | moderate - schwer (56-70dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E62** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E63** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E64** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E65** | sensorineural | congenital | moderate - schwer (56-70dB) | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | syndromial/keine weiteren Angaben |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E66** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E67** | sensorineural | congenital | moderate - schwer (56-70dB) | hohe Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E68** | sensorineural | congenital | moderate (41-55dB) | alle Frequenzen | nicht progressiv | bilateral | keine |
| **E69** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | alle Frequenzen | progressiv | bilateral | keine |
| **E70** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | alle Frequenzen | progressiv | bilateral | keine |
| **E71** | sensorineural | congenital | schwer (70-91 dB) | links: tiefe Frequenzen, rechts: mittlere Freuqenzen | progressiv | bilateral/assymetrisch | keine |
| **E72** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | alle Frequenzen | progressiv | bilateral | keine |
| **E73** | sensorineural | congenital | schwer (70-91 dB) | hohe Frequenzen | progressiv | bilateral | keine |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **E74** | sensorineural | congenital | taub (>91dB) | alle Frequenzen | progressiv | bilateral | keine |
| **E75** | sensorineural | congenital | schwer (70-91 dB) | alle Frequenzen | progressiv | bilateral | syndromial/keine weiteren Angaben |
| **E76** | | | taub (>91dB) | | | | |
| **E77** | | | | | | | |
| **E78** | | | | | | | |