



Identifizierung und Charakterisierung neuer, mit  
Hörstörungen assoziierter Gene und Varianten mittels  
Exom-Sequenzierung

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Julia Doll**

geboren in

Schweinfurt

Würzburg, November 2021

Eingereicht am:

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Haaf

Gutachter: Prof. Dr. Christian Stigloher

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## Eidesstattliche Erklärung

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

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Identifizierung und Charakterisierung neuer, mit Hörstörungen assoziierter Gene und Varianten mittels Exom-Sequenzierung**“, 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: „**Identification and characterization of novel hearing loss associated genes and variants by Exome Sequencing**” 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 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Julia Doll

“Happiness can be found, even in the darkest of times,  
if one only remembers to turn on the light.”

-Albus Dumbledore-

*(J.K. Rowling)*

## Zusammenfassung

---

Laut des aktuellen Reports der Weltgesundheitsorganisation sind ca. 466 Millionen Menschen weltweit von einer Hörstörung (HS) betroffen. Durch die enorme Heterogenität und die klinische Variabilität, die diese Erkrankung ausmacht, und viele bisher nicht mit HS assoziierte Gene, bleibt ein großer Teil der erblich bedingten HS in vielen Familien unaufgeklärt. Die Entwicklung moderner Techniken, wie die Next-Generation Sequenzierung (NGS) und der Fortschritt bei der Untersuchung von Modellorganismen trugen jedoch in den letzten Jahren immens dazu bei, neue Gene zu identifizieren, die innerhalb des auditorischen Signalwegs oder damit assoziierten Strukturen beteiligt sind. Die vorliegende Arbeit umfasst Ergebnisse dreier Veröffentlichungen, in denen iranische und pakistanische Familien und eine deutsche Familie mit erblich bedingter HS untersucht und neue, krankheitsverursachende Varianten identifiziert und funktionell charakterisiert wurden. Im ersten Abschnitt konnten zwei neue rezessive Varianten im *CDC14A*-Gen als krankheitsverursachend identifiziert werden, die zu einem potentiellen Funktionsverlust des kodierten Proteins in einer iranischen und einer pakistanischen Familie führen. Mit Hilfe einer funktionellen Charakterisierung auf RNA-Ebene (Spleiß-Assay und RT-qPCR) konnte der Funktionsverlust beider Varianten bestätigt werden. Der zweite Abschnitt umfasst eine deutsche Familie mit sieben von einer HS betroffenen Familienmitgliedern, in der eine heterozygote missense Variante in *MYO3A* identifiziert wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte somit die erste autosomal dominante Variante in einer europäischen Familie mit einer bilingualen, sensorineuralen Hochtonschwerhörigkeit beschrieben werden und der dominante Charakter von *MYO3A* bestätigt werden. Im dritten Abschnitt konnten die krankheitsverursachenden Varianten in 13 Familien aus einer Kohorte mit 21 pakistanischen Familien mit einer syndromalen und nicht-syndromalen HS ausfindig gemacht werden. Hierbei wurden sowohl bekannte, als auch bisher nicht beschriebene Varianten detektiert. Die Aufklärungsrate innerhalb dieser Kohorte betrug 61,9% und es konnte somit das Spektrum syndromaler und nicht-syndromaler HS erweitert werden. Der letzte Abschnitt dieser Arbeit beschreibt eine iranische Familie mit einer milden HS und milden Intelligenzminderung, in der eine homozygote missense Variante im Kandidatengen *DBN1* ausfindig gemacht wurde. Um die Funktion und die Auswirkungen eines potentiellen Verlusts des codierten Proteins Drebrin zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen und auditorische Messungen an *Dbn1* Knockout (KO)-Mäusen durchgeführt. Hierbei konnte eine Expression innerhalb der Nervenfasern, die innere Haarzellen innervieren, nachgewiesen werden. Eine leicht verlängerte Latenz für die ABR-Welle IV in KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ergab den Hinweis auf einen Defekt innerhalb des zentralen auditorischen Signalwegs, der möglicherweise mit einer Sprachverarbeitungsstörung im Menschen korreliert.

## Summary

---

According to the latest World Health Organization report, approximately 466 million people are affected by hearing loss (HL) worldwide. Due to the enormous heterogeneity and clinical variability that comes with this disorder and the previously unassociated HL genes, a large proportion of hereditary HL remains unexplained in many families. However, the development of modern techniques such as next-generation sequencing (NGS) and constant progress in the study of model organisms contributed immensely to the identification of new genes involved within the auditory pathway or associated structures. This thesis includes results of three publications in which Iranian and Pakistani families and a German family with HL were studied and novel disease-causing variants were identified and characterized. In the first section, two novel recessive variants in the *CDC14A* gene were identified as disease-causing, leading to a loss-of-function of the encoded protein in an Iranian and a Pakistani family. Functional characterization on RNA level (splice assay and RT-qPCR) confirmed the loss of function of both variants. The second section includes a German family with seven family members affected by HL, in which a heterozygous missense variant in *MYO3A* was identified. Thus, the first autosomal dominant variant in a European family with a bilingual sensorineural high-frequency hearing loss could be described in the current work. In the third section, the disease-causing variants were established in 13 families from a cohort of 21 Pakistani families with syndromic and non-syndromic HL. Both known and previously undescribed variants were detected. The detection rate within this cohort was 61.9% and thus the spectrum of syndromic and non-syndromic HL could be expanded. The final section of this work describes an Iranian family with mild HL and mild intellectual disability in which a homozygous missense variant in the candidate gene *DBN1* was detected. To investigate the function and effects of a potential loss of the encoded protein Drebrin, immunohistochemical staining and auditory measurements were performed in *Dbn1* knockout mice. Here, expression within nerve fibers innervating inner hair cells was detected. A slightly prolonged latency for ABR wave IV in the auditory pathway in KO mice compared to wild type mice provided evidence for a defect within the central auditory pathway that might correlate with a speech processing disorder in humans.

# Inhaltsverzeichnis

---

Zusammenfassung.....	5
Summary .....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1. Einleitung.....	13
1.1. Hörstörungen und deren Klassifikation .....	13
1.2. Anatomie des menschlichen Ohrs und auditorischer Signalweg .....	14
1.3. Zentraler auditorischer Signalweg und auditive Hirnstammreaktion.....	17
1.4. Konsanguinität bei iranischen und pakistanischen Familien.....	18
1.5. Charakterisierung von HS-assoziierten Genen und das Kandidatengen <i>DBN1</i> .....	19
1.5.1. <i>CDC14A</i> .....	19
1.5.2. <i>MYO3A</i> .....	19
1.5.3. <i>DBN1</i> .....	20
1.6. Syndromale Hörstörungen .....	20
1.6.1. Usher-Syndrom.....	20
1.6.2. Kongenitale HS mit LAMM-Syndrom.....	21
1.6.3. Myopie und HS.....	21
1.7. Exom-Sequenzierung.....	22
1.8. Zielsetzung der Arbeit.....	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1. Ethikvotum.....	25
2.2. DNA-Isolierung aus humanem Vollblut.....	25
2.3. RNA-Isolierung aus humanem Vollblut.....	25
2.4. PCR und Sanger-Sequenzierung.....	25
2.5. cDNA-Synthese und Reverse Transcription Quantitative Real-time PCR.....	25
2.6. Exom-Sequenzierung.....	26
2.7. In silico Analyse von Varianten.....	27
2.8. Homozygoty mapping und Linkage-Analysen.....	27
2.9. Minigene-Ansatz .....	28
2.10. Protein Vorhersage mit I-TASSER.....	28
2.11. Korrelationsanalyse .....	28
2.12. Analyse der Drebrin Knockout Mäuse (unveröffentlichte Arbeiten).....	28
2.12.1. Messung der auditiven Hirnstammreaktion (ABR) .....	29

2.12.2.	Messung der auditory steady-state response (ASSR).....	29
2.12.3.	Präparation von Gewebe.....	30
2.12.4.	Immunhistochemie.....	30
2.12.5.	Datenanalyse und Statistik.....	31
3.	Ergebnisse und Diskussion der Publikationen.....	32
3.1.	Neue Varianten in <i>CDC144</i> bei iranischen und pakistanischen Patienten und Patientinnen mit einer HS (Anlage I).....	32
3.2.	Eine neue Variante in <i>MYO3A</i> in einer deutschen Familie mit autosomal dominanter HS (Anlage II) .....	42
3.3.	Genetisches Spektrum von syndromalen und nicht-syndromalen Hörstörungen in pakistanischen Familien (Anlage III).....	47
4.	Ergebnisse und Diskussion von nicht veröffentlichten Arbeiten.....	54
5.	Fazit und Ausblick .....	64
6.	Literaturverzeichnis .....	66
7.	Internetquellen und Datenbanken.....	73
7.1.	Internetquellen .....	73
7.2.	Datenbanken .....	74
8.	Verzeichnisse .....	75
8.1.	Abbildungsverzeichnis .....	75
8.2.	Tabellenverzeichnis .....	76
9.	Liste der Publikationen und Kongressbeiträge.....	77
9.1.	Erst-Autorenschaften.....	77
9.2.	Co-Autorenschaften .....	79
9.3.	Kongressbeiträge.....	81
10.	Curriculum vitae.....	82
11.	Präsentierte Publikationen.....	83
11.1.	Anlage I.....	83
11.2.	Anlage II .....	98
11.3.	Anlage III.....	106
11.4.	Eigenanteil der Promovendin .....	123
	Danksagung.....	130



## Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	A	Adenin
	<i>ADGRV1</i>	engl.: Adhesion G-Protein coupled Receptor V1
	Ala	Alanin
	Arg	Arginin
	ARNSHS	autosomal rezessive nicht-syndromale Hörstörung
	Asn	Asparagin
	Asp	Asparaginsäure
	ASSR	engl.: Auditory Steady-State Response
<b>B</b>	<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H I (Restriktions-Enzym)
	bp	Basenpaare
<b>C</b>	C	Cytosin
	CADD	engl.: Combined Annotation Dependent Depletion
	<i>CDC14A</i>	engl.: Cell Division Cycle 14A
	<i>CDH23</i>	Cadherin-23
	CGM	Corpus geniculatum mediale
	<i>CIB2</i>	engl.: Calcium and integrin-binding family member 2
	CN	Nucleus cochlearis
	<b>D</b>	dB
<i>DBN1</i>		Drebrin 1
DNA		Desoxyribonukleinsäure
DRS		Duane-Retraktionssyndrom
DVD		engl.: Deafness Variation Database
<b>E</b>		ES
	Exo	Exonuklease I
<b>F</b>	FFT	engl.: Fast Fourier Transformation
	<i>FGF3</i>	engl.: Fibroblast Growth Factor 3
	fs	Leserasterverschiebung (engl. frameshift)
<b>G</b>	G	Guanin
	GERP	engl.: Genomic Evolutionary Rate Profiling

	<i>GJB2</i>	engl.: Gap Junction Protein Beta 2
	Gln	Glutamin
	Gly	Glycin
	GME	engl.: Greater Middle East Variome Project
<b>H</b>	HEK	engl.: Human Embryonic Kidney Cells
	<i>HGF</i>	Hepatocyte Growth Factor
	HGMD	Human Gene Mutation Database
	HS	Hörstörung
<b>I</b>	IC	Colliculus inferior
	Ile	Isoleucin
<b>K</b>	KO	engl.: Knockout
<b>L</b>	LAMM	Labyrinthische Aplasie, Mikrotie, Mikrodontie
	Leu	Leucin
	LOD	engl.: Logarithm of the Odds
	LOVD	engl.: Leiden Open Variation Database
	LTP	Langzeitpotenzierung
	Lys	Lysin
<b>M</b>	Mb	Megabasen
	ml	Milliliter
	mM	Millimolar
	mRNA	engl.: messenger-RNA
	MT	engl.: MutationTaster
	mV	Millivolt
	<i>MYO3A</i>	Myosin IIIA
	<i>MYO7A</i>	Myosin VIIA
	<i>MYO15A</i>	Myosin XVA
<b>N</b>	NGS	engl.: Next-Generation Sequencing
<b>O</b>	OMIM	engl.: Online Mendelian Inheritance in Man
	<i>OTOF</i>	Otoferlin
<b>P</b>	<i>PCDH15</i>	Protocadherin-15
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)

	Phe	Phenylalanin
	PP	PolyPhen-2
	Pro	Prolin
	PTC	vorzeitiges Stopp-Codon (engl.: Premature Termination Codon)
<b>R</b>	ROH	engl.: Run of Homozygosity
	RP	Retinitis pigmentosa
	RT-qPCR	engl.: Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR
<b>S</b>	SAP	engl.: Shrimp Alkaline Phosphatase
	SBS	engl.: Sequencing by Synthesis
	SEM	engl.: Structural Equation Modeling
	Ser	Serin
	SHIELD	Shared Harvard Inner-Ear Laboratory Database
	<i>SLC26A4</i>	Solute Carrier Family 26 Member 4 (Pendrin)
	<i>SLITRK6</i>	engl.: SLIT- and NTRK-Like Family member 6
	SNP	Einzelnukleotidaustausch (engl.: Single Nucleotide Polymorphism)
	SOC	Nucleus olivaris superior
	SPL	engl.: Sound Pressure Level
<b>T</b>	T	Thymin
	Ter	Termination-Codon
	Thr	Threonin
	<i>TMC1</i>	Transmembrane Channel Like 1
	Trp	Tryptophan
	Tyr	Tyrosin
<b>U</b>	USH1	Usher-Syndrom Typ 1
	<i>USH1C</i>	Usher-Syndrom Typ 1C
	<i>USH1G</i>	Usher-Syndrom Typ 1G
	USH2	Usher-Syndrom Typ 2
	<i>USH2A</i>	Usher-Syndrom Typ 2A
	USH3	Usher-Syndrom Typ 3
<b>V</b>	Val	Valin
<b>W</b>	WHO	engl.: World Health Organization

	<i>WHRN</i>	Whirlin
	WT	Wildtyp
<b>X</b>	<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas bolvicula</i> I (Restriktions-Enzym)

## 1. Einleitung

### 1.1. Hörstörungen und deren Klassifikation

Laut des aktuellen Reports der Weltgesundheitsorganisation sind weltweit ca. 466 Millionen Menschen von einer Hörstörung (HS) betroffen (Internetquelle 1). HS zeichnen sich durch eine extreme Heterogenität aus und gehören zu den häufigsten sensorischen Erkrankungen beim Menschen (Smith et al. 2005) mit einer Prävalenz von 1,33 pro 1000 Neugeborenen (Morton and Nance 2006). Das in Deutschland seit 2009 als Leistung der gesetzlichen Krankenversicherung durchgeführte Neugeborenen-Hörscreening, ermöglicht eine frühe Diagnose von angeborenen Hörstörungen und damit einhergehende frühzeitige Behandlungs- und Therapiemöglichkeiten (Morton and Nance 2006). Da ein eingeschränktes Hörvermögen in den ersten Lebensjahren einen nachteiligen Effekt auf die Sprech- und Sprachentwicklung hat und Entwicklungsstörungen und psychische Erkrankungen zur Folge haben kann, ist eine frühe Diagnose und Intervention von entscheidender Bedeutung (Pimperton and Kennedy 2012; Wroblewska-Seniuk et al. 2017).

HS können anhand verschiedener Klassifikationen genauer spezifiziert werden. Hierbei wird generell zwischen genetisch (ca. 60%) und nicht-genetisch bedingten (ca. 40%) HS unterschieden, wobei nicht-genetische Ursachen z.B. diverse Umwelteinflüsse, eine Infektion mit dem Cytomegalovirus (CMV), erhöhte Lärmexposition oder Komplikationen bei der Geburt sein können (Roizen 2003). Der Großteil aller genetisch-bedingten HS (ca. 70-80%) folgt einem autosomal-rezessivem Erbgang, wohingegen autosomal-dominante HS in ca. 20% der Fälle vorliegen. Ein kleiner Teil wird X-chromosomal (ca. 2-5%) oder mitochondrial (ca. 1%) vererbt (Smith et al. 2005). Die Mehrheit aller HS treten isoliert auf und kommen nicht-syndromal vor (70%). Die restlichen 30% werden als syndromale HS bezeichnet und äußern sich durch das Auftreten in Verbindung mit weiteren Beeinträchtigungen (Angeli et al. 2012). Beispiele für Syndrome, bei denen eine HS Teil des Phänotyps ist, sind das Pendred-Syndrom mit einer zusätzlichen Vergrößerung der Schilddrüse und einem erweiterten vestibulären Aquädukt, das Waardenburg-Syndrom mit Pigmentstörungen der Augen, Haut und Haare oder das Usher-Syndrom mit einer Retinitis Pigmentosa (RP) und ophthalmologischen Auffälligkeiten (Koffler et al. 2015).

Ein weiteres wichtiges Klassifizierungsmerkmal ist der betroffene Schweregrad, welcher in Dezibel (dB) angegeben wird und die HS in mild (20-40 dB), moderat (41-70 dB), schwerwiegend (71-90 dB) und hochgradig (>95 dB) einteilt (Hoefsloot et al. 2014). Die angegebenen dB-Werte geben hierbei, die von Patienten und Patientinnen noch wahrgenommene Lautstärke an. Entscheidend ist hierbei ebenfalls der betroffene Frequenzbereich (kHz), der die HS in eine

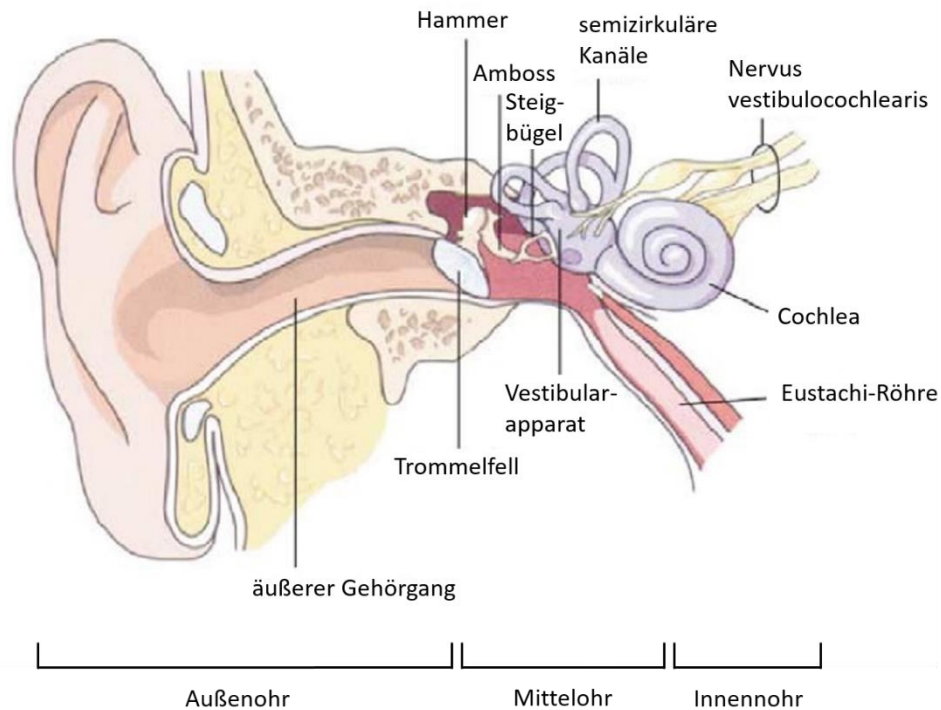
Tiefenschwerhörigkeit ( $\leq 0,5$  kHz), betroffene mittlere Frequenzbereiche ( $> 0,5 \leq 2$  kHz) und eine Hochschwerhörigkeit ( $> 2 \leq 8$  kHz) einteilt. Bei der Lateralität einer HS kann zwischen unilateral (einseitig) und bilateral (beidseitig) unterschieden werden (Mazzoli et al. 2003). Der frequenzabhängige Schweregrad wird mit Hilfe sogenannter Reintonaudiogramme visualisiert. Hierbei wird das subjektive Hörvermögen der Patienten und Patientinnen durch das Abspielen unterschiedlich lauter Töne ermittelt und sowohl die Knochenleitung als auch die Schalleitung des linken und rechten Ohrs innerhalb eines genormten Rasters dargestellt (Davies 2016).

Der Beginn einer HS kann in drei Abschnitte eingeteilt werden und ist abhängig vom Zeitpunkt des Krankheitsbeginns. Während eine kongenitale HS schon bei der Geburt festgestellt wird, äußert sich eine prälinguale HS vor Spracherwerb ( $< 5$  Jahre) und eine postlinguale HS erst nach Spracherwerb ab ca. 5 Lebensjahren. Eine HS, die sich im Verlauf des Lebens verschlechtert, wird als progressiv bezeichnet, ist aber abzugrenzen von einer Altersschwerhörigkeit, auch Presbyakusis genannt (Mazzoli et al. 2003).

Unterscheidbar ist ebenfalls der anatomisch betroffene Teil des Ohrs. Liegt eine Fehlbildung am Außen- und Mittelohr vor, spricht man von einer konduktiven Schwerhörigkeit (Schalleitungsschwerhörigkeit). Fehlbildungen am Innenohr und der damit verbundenen Cochlea, werden als sensorineurale HS (Schallempfindungsschwerhörigkeit) bezeichnet. Eine zentrale Schwerhörigkeit (Schallempfindungsschwerhörigkeit) äußert sich durch Fehlbildungen im zerebralen Cortex oder dem VIII. Hirnnerv und führt zu Problemen innerhalb der Reizweiterleitung an das Gehirn (Holley 2005; Mazzoli et al. 2003).

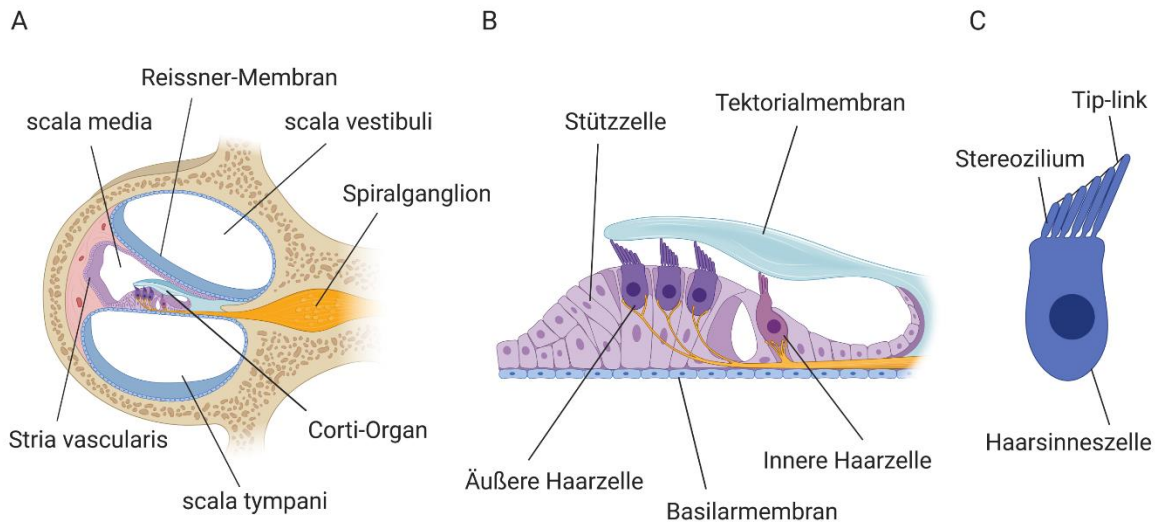
## 1.2. Anatomie des menschlichen Ohrs und auditorischer Signalweg

Um Reize in Form von Geräuschen aus der Umgebung aufnehmen und verarbeiten zu können, ist der Aufbau und die Funktion des Ohrs von entscheidender Bedeutung. Unterteilt wird das menschliche Ohr in drei Bereiche: Außenohr, Mittelohr und Innenohr (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Anatomie des menschlichen Ohrs.** Einteilung in drei Grenzbereiche Außenohr, Mittelohr und Innenohr. Das Außenohr besteht aus der Ohrmuschel und dem äußeren Gehörgang und wird durch das Trommelfell vom Mittelohr getrennt. Dem Mittelohr zugehörig sind die drei Gehörknöchelchen Hammer, Amboss und Steigbügel, der Vestibularapparat und die Eustachi-Röhre. Das Innenohr umfasst die Cochlea und die angrenzenden Nervenfasern, die in den Nervus vestibulocochlearis münden. Erstellt und geändert nach (Smith et al. 2005) Copyright Elsevier.

Geräusche, die in Form von Schallwellen auf das Außenohr treffen, werden mit Hilfe der Ohrmuschel und des äußeren Gehörgangs weiter an das Trommelfell, welches Außen- und Mittelohr trennt, weitergeleitet. Durch die Gehörknöchelchen Hammer, Amboss und Steigbügel wird die Schwingung über das ovale Fenster verstärkt und weiter an das Innenohr, welches die Cochlea enthält, transportiert (Holley 2005). Die Cochlea ist ein ca. 30-35 mm langes, spiralförmiges, knöchernes Rohr und wird in drei mit Flüssigkeit gefüllte, parallele Kammern eingeteilt: scala tympani, scala media und scala vestibuli (Abbildung 2A). Die scala vestibuli und die scala tympani beinhalten Perilymphe, die der cerebrospinalen Flüssigkeit ähnelt und eine höhere Konzentration an Natrium (138 mM) als Kalium (7 mM) besitzt, wohingegen die scala media mit Endolymphe gefüllt ist und eine höhere Konzentration an Kalium (ca. 154 mM) gegenüber Natrium (1 mM) vorweist (Holley 2005).



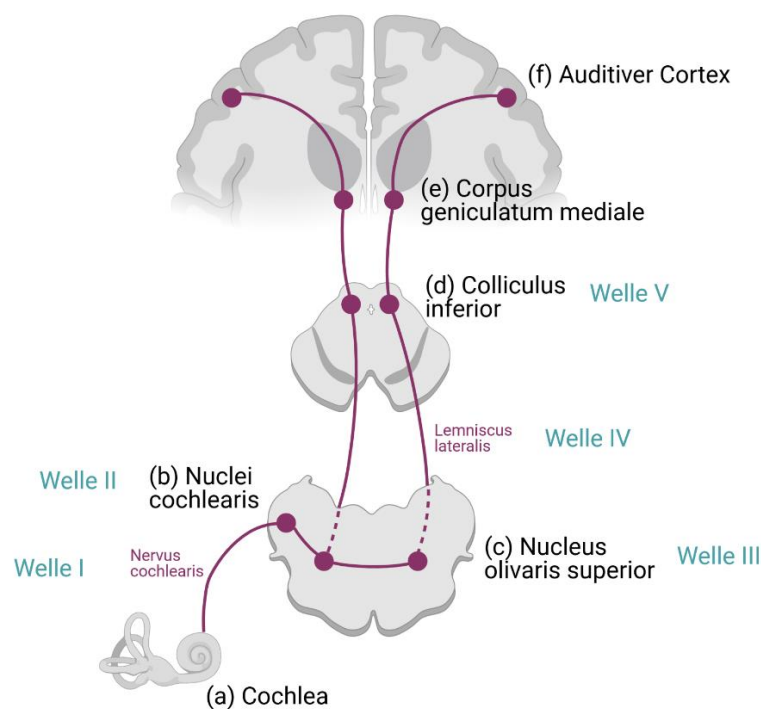
**Abbildung 2: Aufbau des menschlichen Innenohrs.** (A) Querschnitt der Cochlea mit drei parallelen Kammern: scala tympani, scala media und scala vestibuli. Die scala media beinhaltet das Corti-Organ. (B) Aufbau des Corti-Organ mit äußeren und inneren Haarzellen, Stützzellen, Tektorial- und Basilarmembran. (C) Beispielhafte Darstellung einer Haarsinneszelle: einzelne Stereozilien sind mit „Tip-links“ miteinander verbunden. Erstellt mit BioRender.com nach (Heine 2004).

Eingebettet in der scala media liegt das Corti-Organ (Abbildung 2A, B), welches für die mechanoelektrische Transduktion verantwortlich ist und mechanische Reize in Form von Schwingungen mit Hilfe von Haarsinneszellen in elektrische Signale umwandelt (Ekdale 2016). Insgesamt befinden sich ca. 3500 innere Haarzellen und 12.000 äußere Haarzellen innerhalb des Corti-Organ, die von nicht-sensorischen Epithelzellen (Stützzellen) umgeben sind (Abbildung 2B) (Holley 2005). Durch die spezifische Ionenzusammensetzung der Endolymphe gegenüber der Perilymphe, entsteht das sogenannte endocochleäre Potential, das sich durch ein elektrisches Potential von ca. 80 mV auszeichnet (Wangemann 2002). Durch eine von Schallwellen erzeugte Bewegung der Tektorialmembran und der Basilarmembran (Abbildung 2B), kommt es zur Neigung der auf den Haarzellen lokalisierten Stereozilien (Stereovilli) (Abbildung 2C). In Folge dessen werden extrazelluläre Verbindungen, die sogenannten „Tip-links“, welche einzelne Stereozilien miteinander verbinden, bewegt, und es kommt zur Öffnung von mechanoelektrischen Transduktionskanälen (Sakaguchi et al. 2009). Durch die Öffnung dieser Kanäle kommt es zum Einstrom von positiv geladenen Kalium- und Kalzium-Ionen über die Stria vascularis aus der umgebenden Endolymphe in die Haarzelle und folglich zur Depolarisation der Zelle. Die daraus resultierende Ausschüttung von Neurotransmitter an afferenten Nervenfasern bewirkt die Reizweiterleitung über den Hörnerv (Nervus cochlearis) an das zentrale Nervensystem (Kandel 2012).



### 1.3. Zentraler auditorischer Signalweg und auditive Hirnstammreaktion

Der Nervus cochlearis ist zusammen mit dem Nervus vestibularis Teil des Nervus vestibulocochlearis (Abbildung 1), welcher den dorsalen und ventralen Nucleus cochlearis (CN) im Hirnstamm innerviert. Die vorliegenden Nervenfasern verbinden den CN mit dem Nucleus olivaris superior (SOC) im Hirnstamm und leiten das Signal über den Lemniscus lateralis weiter an den Colliculus inferior im Mittelhirn (IC). Dieser ist mit dem Corpus geniculatum mediale (CGM) verbunden und mündet schließlich in den Auditiven Cortex im Temporallappen (Abbildung 3) (Bear 2016; Pickles 2015).



**Abbildung 3: Stationen des zentralen auditorischen Signalwegs im Menschen.** Der Nervus cochlearis (Welle I) verbindet die Cochlea (a) mit den Nuclei cochlearis (b) (Welle II) im Hirnstamm. Über den Nucleus olivaris superior (c) (Welle III) wird der Colliculus inferior (d) (Welle V) im Mittelhirn durch den Lemniscus lateralis (Welle IV) innerviert. Die weitere Verbindung geht über den Corpus geniculatum mediale (e) in den Auditiven Cortex (f). Erstellt mit BioRender.com nach (Bear 2016; Eggermont 2019).

Die Reizweiterleitung innerhalb des zentralen auditorischen Signalwegs beginnend am Spiralganglion in der Cochlea, bis hin zum Auditiven Cortex im Gehirn, kann mit Hilfe der auditiven Hirnstammreaktion (auditory brainstem response, ABR) gemessen werden. Durch akustisch evozierte Signale („Clicks“) und die Erfassung mit Hilfe von Elektroden an drei verschiedenen Stellen des Kopfes, können fünf charakteristische ABR-Wellen (I-V) innerhalb der Hörbahn nachverfolgt werden. Welle I repräsentiert den Hörnerv (Nervus cochlearis), Welle II

den CN, Welle III den oberen Olivenkomplex (SOC) und Welle IV-V bildet die Station zwischen dem Lemniscus lateralis und dem IC ab (Abbildung 3) (Eggermont 2019). Die Wellen IV bis V umfassen sowohl den Lemniscus lateralis, als auch den IC, sind eng miteinander verbunden und lassen sich demnach nicht stringent eingrenzen. Durch die Fehlregulierung einer dieser Komponenten, kann es zu einer sogenannten Latenzverschiebung kommen. Da zwischen den einzelnen Wellen ca. 0,8 Millisekunden liegen, kann die geringste Abweichung dieses Werts ein beeinträchtigtes Hörvermögen oder eine Sprachwahrnehmungsstörung hervorrufen (Eggermont 2019; Hosoya et al. 2018; Kwon et al. 2007).

#### 1.4. Konsanguinität bei iranischen und pakistanischen Familien

Die Heterogenität von HS zeigt sich ebenfalls bei der Untersuchung von verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen. In vielen Populationen, darunter auch Deutschland, sind Varianten in *GJB2*, *STRC* und *SLC26A4* hauptverantwortlich für autosomal-rezessive, nicht-syndromale HS (Sloan-Heggen et al. 2016; Vona et al. 2020a). Auffällig sind jedoch die unterschiedlichen Aufklärungsraten, die für verschiedene Populationen erzielt werden, wobei das Vorkommen von Konsanguinität in einigen Bevölkerungsgruppen hierbei eine tragende Rolle spielt (Vona et al. 2020a). Eine Konsanguinität liegt vor, wenn Kinder geboren werden, deren beide Elternteile derselben Familie angehören. Im Mittleren und Nahen Osten, vor allem in einigen Teilen Pakistans oder dem Iran, ist eine blutsverwandte Ehe, häufig zwischen Cousinsen oder Cousins ersten Grades, kulturell akzeptiert und weit verbreitet. Ca. 40% aller Ehen im Iran und 60% der Ehen in Pakistan werden innerhalb der Familie geschlossen und werden somit als konsanguin bezeichnet (Hussain and Bittles 1998; Saadat et al. 2004). Das dadurch bedingte Risiko einer Homozygotie von pathogenen Varianten, hat eine erhöhte Prävalenz von rezessiven Erkrankungen zur Folge. In der Vergangenheit konnten mit Hilfe dieser konsanguinen Familien viele neue rezessive, krankheitsverursachende Varianten und Gene identifiziert werden, besonders bei Familien, deren Mitglieder an einer HS leiden (Bittles 2001; Hamamy 2012; Zakzouk 2002). In einigen isolierten Regionen und der dort lebenden Populationen ist häufig eine Akkumulation an betroffenen Genen und Varianten erkennbar, zu denen unter anderem die HS-Gene *GJB2*, *MYO15A* und *MYO7A* gehören (Richard et al. 2019; Sloan-Heggen et al. 2015).

## 1.5. Charakterisierung von HS-assoziierten Genen und das Kandidatengen *DBN1*

### 1.5.1. *CDC14A*

*CDC14A* (DFNB32, OMIM #608653) kodiert für eine konservierte Protein Tyrosin Phosphatase und wurde 2016 offiziell mit einer nicht-syndromalen, autosomal rezessiven HS assoziiert (Delmaghani et al. 2016). Einige Jahre später konnten Varianten in *CDC14A* ebenfalls mit dem Hearing impairment infertile male Syndrom (HIIMS) in Verbindung gebracht werden (Imtiaz et al. 2018). *CDC14A* wird in den Kinozilien der Haarsinneszellen, Basalkörper und Stereozilien im Innenohr von Mäusen exprimiert (Delmaghani et al. 2016) und sorgt dort für Teilung des Zentrosoms bei der Zellteilung (Stegmeier and Amon 2004). Es sind sechs verschiedene Transkripte bekannt, die durch alternatives Spleißen gebildet werden und zwischen 330 bis 623 Aminosäuren lang sein können (Delmaghani et al. 2016). Bis heute sind 12 Varianten in *CDC14A* bekannt, die für eine Hörstörung verantwortlich sind (Delmaghani et al. 2016; Doll et al. 2020b; Imtiaz et al. 2018; Mohseni et al. 2020), von denen sechs Varianten mit dem HIIM-Syndrom assoziiert werden konnten und für eine Infertilität bei männlichen Patienten in Kombination mit einer HS verantwortlich sind (Imtiaz et al. 2018). Es wird vermutet, dass die Ausprägung einer nicht-syndromalen Hörstörung oder des HIIM-Syndroms vom betroffenen *CDC14A* Transkript abhängig ist (Mohseni et al. 2020).

### 1.5.2. *MYO3A*

*MYO3A* (OMIM #606808) wird hauptsächlich in der Retina und im Innenohr von Säugetieren exprimiert (Dose and Burnside 2000; Schneider et al. 2006) und ist seit 2002 mit einer autosomal rezessiven HS assoziiert (DFNB30) (T. Walsh et al. 2002). 2016 konnte eine heterozygote missense-Variante in einer afrikanisch-amerikanischen Familie mit einer autosomal dominanten, progressiven HS als krankheitsverursachend identifiziert werden (Grati et al. 2016). Zwei Jahre später assoziierte man eine weitere missense-Variante in *MYO3A* in zwei brasilianischen Familien mit einer spät-manifestierenden, dominanten HS (Dantas et al. 2018). Das kodierte Protein setzt sich aus einer N-terminalen Kinase-Domäne, einer hochkonservierten Motor-Domäne und einer C-terminalen Aktin-bindenden Domäne zusammen (Dose and Burnside 2000; Salles et al. 2009). Knock-out (KO) Mäuse zeigten ebenfalls eine progressive Hochtenschwerhörigkeit, die im weiteren Verlauf auf alle Frequenzen übergreift (V. L. Walsh et al. 2011)

### 1.5.3. *DBN1*

Drebrin (*DBN1*, OMIM #126660) wurde erstmals als zytoplasmatisches Protein im optischen Tektum in Hühnern beschrieben (Shirao and Obata 1985; Shirao et al. 1988) und konnte kurze Zeit später auch im Menschen durch Klonierung von cDNA aus fetalem Gehirn nachgewiesen werden (Toda et al. 1993). Durch alternatives Spleißen können zwei Isoformen (Drebrin A („adult-type“), Drebrin E („embryonic-type“)) entstehen, die sich jeweils durch ihre spezifische Expression in Gewebe unterscheiden (Koganezawa et al. 2017). Drebrin A wird hauptsächlich in dendritischen Dornfortsätzen („spines“) im Gehirn exprimiert, wobei Drebrin E eine ubiquitäre Expression in verschiedenen Zelltypen aufweist (Shirao and Sekino 2017). Eine wichtige Rolle spielt das kodierte Drebrin Protein bei der synaptischen Plastizität und der Ausbildung von dendritischen Dornfortsätzen durch die Bindung an Aktin und der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts (Ishikawa et al. 2007; Ishikawa 2017). Innerhalb dendritischer Dornfortsätze wird die synaptische Plastizität unter anderem durch eine Doppel-Helix aus Aktin-Promotoren, bestehend aus Drebrin und ADF (actin depolymerizing factor)/Cofilin, aufrechterhalten (Shirao and Gonzalez-Billault 2013).

## 1.6. Syndromale Hörstörungen

### 1.6.1. Usher-Syndrom

Das Usher-Syndrom gehört zu den Ziliopathien und ist einer der häufigsten syndromal vorkommenden HS, die durch eine autosomal rezessive Vererbung gekennzeichnet ist. Patienten und Patientinnen weisen begleitend zu einer sensorineuralen HS, charakteristische ophthalmologische Beeinträchtigungen auf (Parker and Bitner-Glindzicz 2015). Eine dieser visuellen Auffälligkeiten ist die RP, die durch eine progressive, retinale Degeneration in Form eines Verlusts von Photorezeptoren und der epithelialen Pigmentfunktion gekennzeichnet ist und zur vollständigen Erblindung führen kann (Pagon 1988). Bis heute sind drei klinische Subtypen bekannt: Usher-Syndrom Typ 1 (USH1) (OMIM #276900), Usher-Syndrom Typ 2 (USH2) (OMIM #276901) und Usher-Syndrom Typ 3 (USH3) (OMIM #276902), die sich jeweils anhand ihrer Variabilität des Schweregrades und der betroffenen Gene unterscheiden (Tsang et al. 2018). Patienten und Patientinnen mit USH1 sind hierbei am schwerwiegendsten betroffen und weisen in der Regel eine schwerwiegende bis hochgradige kongenitale HS auf, die in Verbindung mit einer progressiven RP, beginnend ab der zweiten Lebensdekade, und einer vestibulären Hypofunktion auftritt (Toms et al. 2020). Häufig werden bei Patienten und Patientinnen mit USH1, ursächliche Varianten in den Genen *MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G* und *CIB2* identifiziert. USH2 äußert sich durch eine moderate bis schwerwiegende kongenitale HS und einer progressiven

RP mit intakter Vestibularfunktion, die meist in der dritten Lebensdekade diagnostiziert wird. Krankheitsverursachende Varianten werden oftmals in den Genen *USH2A*, *ADGRV1* und *WHRN* ausgemacht (Toms et al. 2020). Der mildeste klinische Subtyp USH3 äußert sich durch einen sehr variablen Krankheitsverlauf. Die HS beginnt meist erst post-lingual und die RP tritt sehr variabel auf, häufig jedoch in der zweiten Lebensdekade. Bei ca. 50% aller Patienten und Patientinnen, ist eine milde vestibuläre Dysfunktion mit ursächlichen Varianten im Gen *CLRN1* diagnostizierbar (Toms et al. 2020).

### 1.6.2. Kongenitale HS mit LAMM-Syndrom

Das LAMM-Syndrom (Labyrinthische Aplasia, Mikrotie, Mikrodontie) in Kombination mit einer kongenitalen HS (OMIM #610706) wurde erstmals von Tekin et al. (2007) als eine neue Form von syndromaler HS beschrieben und konnte mit rezessiven Varianten im *FGF3*-Gen assoziiert werden. Die identifizierten Patienten aus drei türkischen Familien wiesen eine Mikrotie des Typ 1, eine Mikrodontie, und eine hochgradige HS auf, wobei hier die Strukturen des Innenohrs komplett fehlten (sogenannte Michel-Aplasia). *Fgf3* ist sowohl an der Ausbildung des otischen Vesikels in Mäusen (Wright and Mansour 2003), als auch an der Bildung von Strukturen des Innenohrs bei Zebrafischen beteiligt (Leger and Brand 2002). Riazuddin et al. (2011) konnten eine neue homozygote Variante in *FGF3* (c.283C>T, p.(Arg95Trp)) mit einem variableren Phänotyp assoziieren, bei dem die betroffenen Patienten einen mildereren dentalen und äußerlichen Ohr-Phänotyp aufwiesen und postulierten einen semi-dominanten Effekt und die Beteiligung eines genetischen Modifiers.

### 1.6.3. Myopie und HS

Eine Myopie („Kurzsichtigkeit“) bezeichnet einen Defekt der visuellen Wahrnehmung und kennzeichnet sich durch die Verlängerung des hinteren Augensegments. Eine Kurzsichtigkeit wird durch die Angabe von Dioptrien (negative Werte) eingestuft und kann mild (zwischen -0,5 und -1 Dioptrien), hoch (zwischen -5 und -6 Dioptrien) und extrem (ab -10 Dioptrien und weniger) vorkommen (Wojciechowski 2011). Das Syndrom der Myopie und HS (OMIM #221200) wurde erstmals 2013 bei drei Familien, innerhalb derer drei homozygote nonsense-Mutationen im *SLITRK6*-Gen als krankheitsverursachend identifiziert wurden, beschrieben (Tekin et al. 2013). Die betroffenen Patienten zeigten eine sensorineurale HS und litten an hoher Myopie. Untersuchungen an *Slitrk6* KO-Mäusen konnten eine beeinträchtigte Hirnstammreaktion und ein damit einhergehendes eingeschränktes Hörvermögen im mittleren Frequenzbereich zeigen (Matsumoto et al. 2011). Außerdem wiesen *Slitrk6* KO-Mäuse eine eingeschränkte Synapsen-

Bildung an der Retina auf, was zu Defekten innerhalb der Ausbildung von neuronalen Schaltkreisen und dementsprechend zu einer eingeschränkten visuellen Wahrnehmung führte (Tekin et al. 2013).

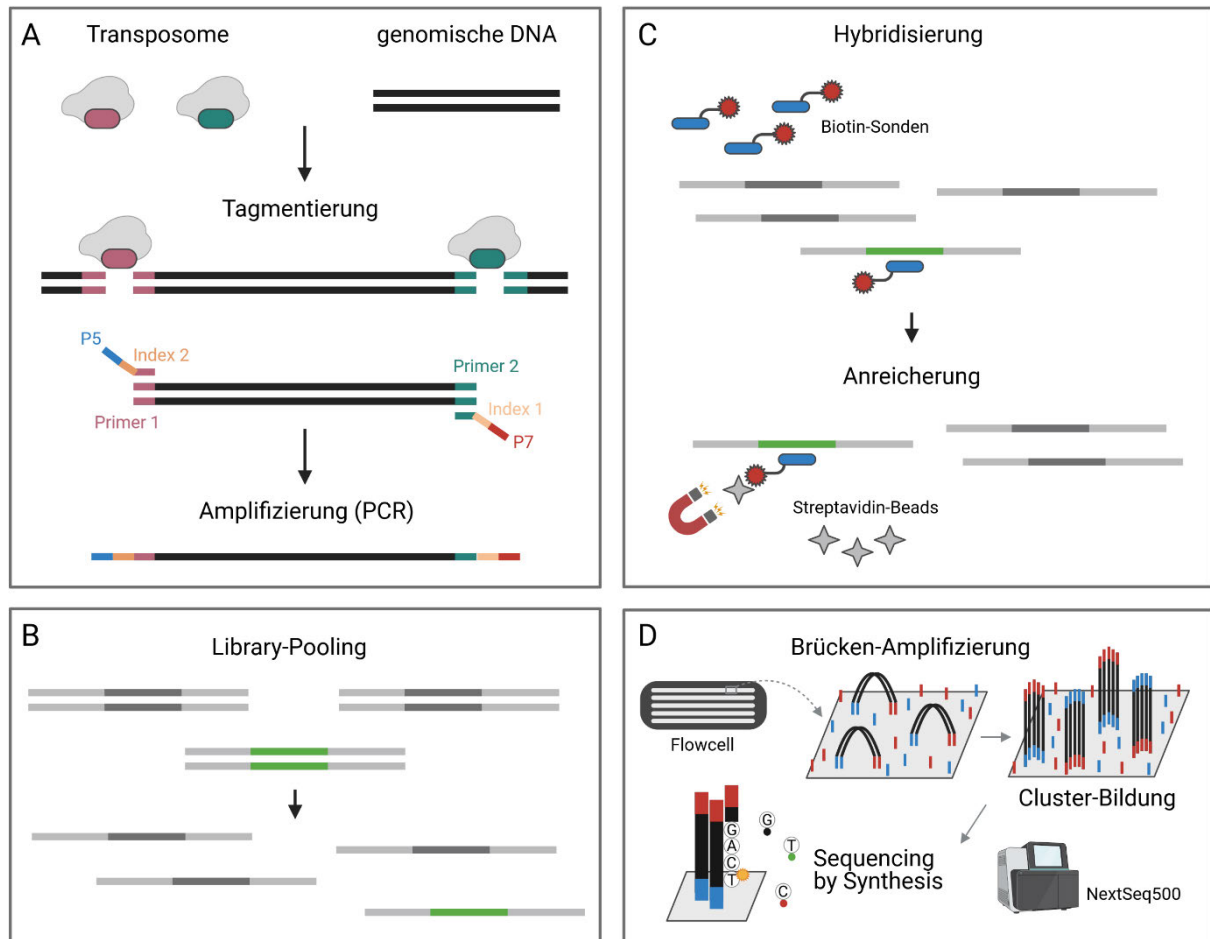
## 1.7. Exom-Sequenzierung

Während des letzten Jahrzehnts wurde die Methode des Next-Generation Sequencings (NGS), zu der auch die Exom-Sequenzierung (ES) nach Illumina gehört, als Methode der Wahl für die Identifikation von zahlreichen neuen Varianten und Genen in einer Vielzahl von Krankheiten etabliert (Sheppard et al. 2018; Vona et al. 2015). Vor allem bei Patienten und Patientinnen mit einer HS, hat sich das NGS neben der Sanger-Sequenzierung sowohl in der Diagnostik als auch innerhalb der Forschung zum Standardverfahren entwickelt (Atik et al. 2015).

Mit Hilfe der ES erfolgt die Sequenzierung und Analyse von Protein-kodierenden Bereichen des Genoms. Für diese Arbeit wurde die Anreicherungs- und Sequenzierungs-Technologie nach Illumina verwendet (Abbildung 4). Es wurden zwei verschiedene Anreicherungsprotokolle (TruSeq Exome Enrichment, Nextera Rapid Capture) verwendet, die sich in der zugrundeliegenden Methodik jedoch nicht unterscheiden. Die genomische DNA wird mit Hilfe von Transposomen enzymatisch in Fragmente geteilt, mit Adapter und Indices versehen und anschließend durch eine PCR amplifiziert (Abbildung 4A). Durch das Anheften der spezifischen Indices können mehrere Proben im nachfolgenden Schritt gepooled werden und sind weiterhin individuell unterscheidbar (Abbildung 4B). Die Verwendung von biotinylierten Sonden während der Hybridisierung und der Einsatz von magnetischen Streptavidin-Beads, gewährleistet die Anreicherung von spezifischen DNA-Fragmenten (Abbildung 4C). Eine weitere PCR, Hybridisierung und Aufreinigung sichert die Anreicherung von hochspezifischen DNA-Fragmenten (Internetquelle 2).

Die eigentliche Sequenzierung der angereicherten DNA-Library erfolgt auf der sogenannten „Flowcell“, die aus mehreren Kanälen besteht, auf deren Oberfläche eine große Anzahl an Oligonukleotiden mit Hilfe ihres 5'-Endes verankert sind. Die angereicherten Fragmente können mit den zuvor angefügten Adaptern an diesen Oligonukleotiden binden und durch die Bildung einer Brücke über mehrere Zyklen hinweg amplifiziert werden (Brücken-Amplifizierung) (Internetquelle 3). Durch diesen Vorgang bilden sich mehrere Millionen an Clustern auf der Flowcell, die aus generierten Amplikons bestehen. Die „Sequencing by Synthesis“ (SBS) Methode von Illumina verwendet zwei fluoreszenzmarkierte Nukleotide (Thymin, grün; Cytosin, rot; Adenin, Überlappung rot/grün; Guanin, keine Fluoreszenz), die komplementär zum Amplikonstrang in mehreren Zyklen eingebaut werden und ein Lichtsignal hervorrufen (Internetquelle 4). Die Messung der Farbintensität und des Lichtsignals wird somit für die Bestimmung der Basenreihenfolge innerhalb eines Clusters genutzt. Die „paired-end“

Sequenzierung definiert sich durch die Sequenzierung des Forward- als auch des Reverse-Strangs und ermöglicht ein akkurateres „Read-Alignment“ und die Detektion von Insertion-Deletion-Varianten (Indels) (Internetquelle 5). Durch einen Waschvorgang nach jedem Zyklus, werden die fluoreszenzmarkierten Nukleotide entfernt und können im nächsten Zyklus recycelt werden (Abbildung 4D).



**Abbildung 4: Arbeitsablauf der Exom-Sequenzierung nach Illumina.** Die Herstellung der zu sequenzierenden DNA-Library gliedert sich in (A) Tagmentierung der genomischen DNA durch enzymatische Fragmentierung, anheften der Adapter und Indices und die darauffolgende Amplifizierung der Fragmente. (B) Denaturierung und Pooling der Library gefolgt von (C) der Hybridisierung mit Hilfe von biotinylierten Sonden und der Anreicherung von Zielregionen durch den Einsatz von Streptavidin-Beads. (D) Auf der Oberfläche der Flowcell findet eine Brücken-Amplifizierung und die anschließende Cluster-Bildung statt. Durch die „Sequencing by Synthesis“-Methode werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingebaut und das erzeugte Lichtsignal detektiert. Erstellt mit BioRender.com nach (Metzker 2010) und Internetquelle (2-4).

Nachdem die Rohdaten in BAM-Dateien („Binary Alignment/Map“) konvertiert wurden, kann das Mapping und Alignment an ein Referenzgenom (hg19, GRCh37) und die anschließende Varianten-Analyse und Validierung durch nachfolgende Methoden, wie der Sanger-Sequenzierung oder RT-qPCR, erfolgen. Das Verfahren der ES weist trotz anerkanntem Routineverfahren auch einige

Nachteile und Limitationen auf. Durch Homopolymere, GC-reiche Regionen oder Pseudogene, kann es zu potenziellen Lücken in der Abdeckung einzelner Abschnitte kommen. Auch größere Deletionen, Insertionen, strukturelle Aberrationen und tief-intronische Varianten können nicht sicher erkannt werden, weshalb das Verfahren der Whole Genome Sequenzierung (WGS) innerhalb der nächsten Jahre sehr wahrscheinlich an Bedeutung gewinnen wird (Sheppard et al. 2018).

### 1.8. Zielsetzung der Arbeit

Es wird vermutet, dass ca. 1% aller menschlichen Gene für Proteine kodiert, die an der Aufrechterhaltung und Strukturen des auditorischen Signalwegs beteiligt sind (Friedman and Griffith 2003), bei der Annahme von ca. 20.000 - 25.000 menschlichen Genen also 200 - 250 Gene. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden ca. 120 Gene beschrieben, deren Funktionsverlust oder Funktionsänderung eine nicht-syndromale HS zur Folge haben (Internetquelle 6). Durch viele bisher noch unbeschriebene Gene und einer hohen Heterogenität innerhalb von HS, ist es oftmals schwierig, die krankheitsverursachende Variante des oder der Betroffenen zu identifizieren. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, unbekannte Varianten und neue Gene in bisher unaufgeklärten Familien mit einer HS zu identifizieren um den Familien damit eine humangenetische Aufklärung zu bieten. Darüber hinaus sollte das Verständnis der Funktion bisher unbekannter Gene, die an der auditiven Wahrnehmung beteiligt sind und Auswirkungen neuer Varianten durch eine funktionelle Charakterisierung erweitert werden. Hierfür wurden Familienmitglieder aus mehreren konsanguinen Familien mit Hilfe einer ES sequenziert, analysiert und die identifizierten Varianten oder Gene nachfolgend mit weiteren Methoden, wie der RT-qPCR, dem Spleiß-Assay, Proteinfaltungs-Tools, Expressionsstudien und auditorischen Messungen an Mäusen untersucht.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Ethikvotum

Alle Versuche innerhalb der untersuchten Familien und deren Blut- und DNA-Proben wurden nach Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt und wurden durch die Ethikkommission der Universität Würzburg (46/15), der Universität Sabsevar (94256), der Universität Augusta (624456-4) und der Universität Kohat (16-25) genehmigt.

### 2.2. DNA-Isolierung aus humanem Vollblut

Die DNA-Isolierung aus Vollblut in Anlage I, II und III erfolgte mit Hilfe des FlexiGene DNA Kits von Qiagen (Qiagen, Venlo, Niederlande) oder einer Ethanol/Isopropanol-Fällung (Green and Sambrook 2016). Es wurden zwischen 2 und 5 ml Vollblut verwendet.

### 2.3. RNA-Isolierung aus humanem Vollblut

Die RNA-Isolierung aus Vollblut in Anlage I erfolgte mit Hilfe des PAXGene Blood RNA Kits und PAXgene Blood RNA-Röhrchen von PreAnalytiX (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Schweiz). Es wurden jeweils 2-5 ml Vollblut verwendet und RNA nach den Angaben des Protokolls von PreAnalytiX isoliert. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

### 2.4. PCR und Sanger-Sequenzierung

Um DNA-Fragmente zu amplifizieren, zu untersuchen und Varianten zu validieren, wird eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Ein anschließender Exo/SAP-Verdau entfernt überschüssige Nukleotide und Primer, um qualitativ hochwertige Sequenzen nach der Sanger-Sequenzierung zu erhalten. Die PCRs, Exo/SAP-Verdau und anschließende Sanger-Sequenzierung in Anlage I-III und der unveröffentlichten Arbeit erfolgte nach Standardprotokollen. Primer wurden mit Hilfe der Website Primer3 (Untergasser et al. 2012) erstellt und über Metabion (Planegg, Deutschland) bestellt. Für die Sanger-Reaktion wurde der BigDye Terminator v.1.1 (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) verwendet. Für die anschließende Kapillarelektrophorese wurde der ABI3130xl (ThermoFisher) genutzt und die Datenanalyse erfolgte mit der Software Gensearch (PhenoSystems SA, Blonay, Schweiz).

### 2.5. cDNA-Synthese und Reverse Transcription Quantitative Real-time PCR

Um veränderte Expressionslevel von Genen zu untersuchen, die durch loss-of-function Varianten in Form von Stopp-, Leserasterverschiebung- oder Spleiß-Varianten beeinflusst werden können, wird häufig eine Reverse Transcription Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR) an RNA durchgeführt. Hierbei wurde RNA von Familienmitgliedern (I.2, II.2) der Familie 2 in Anlage I mit Hilfe des PAXgene Blood RNA Kits (Quiagen) isoliert und in cDNA (nach Protokoll) umgeschrieben. Hierzu wurde das High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) verwendet. Die RT-qPCR wurde durch das ViiA7 Real-time PCR System (ThermoFisher) ausgeführt und ausgewertet. Alle Proben, Kontrollen und Primer-Paare liefen auf einer qPCR-Platte jeweils in Triplikaten mit der HOT FIRE Pol Eva Green Mix Plus Polymerase (Solis BioDyne, Tartu, Estland).

## 2.6. Exom-Sequenzierung

Für alle Exom-Sequenzierungen (ES) wurde die Anreicherung nach Protokollen von Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA) durchgeführt und die DNA-Library am NextSeq500 Sequenziergerät (Illumina) sequenziert. Der Ablauf einer Exom-Sequenzierung nach Illumina gliedert sich grob in Tagmentierung der DNA, gefolgt von einer PCR, Hybridisierung und eine weitere Amplifizierung mit Hilfe einer zweiten PCR. Diverse Aufreinigungen zwischen den einzelnen Schritten wurden mit Beads und Ethanol durchgeführt. Um die Konzentrationen und die Qualität der Proben zu überprüfen, wurden Messungen am Qubit (ThermoFisher) und am Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) durchgeführt.

Die Anreicherung der Exome in Anlage I, II und III und der iranischen Familie (IV.1, IV.2) aus der nicht veröffentlichten Arbeit wurde entweder mit dem TruSeq Exome Enrichment oder dem Nextera Rapid Capture Exome Kit von Illumina durchgeführt (Tabelle 1) und ist unter „Material and Methods“ in allen drei Anlagen (I-III) beschrieben.

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Anreicherungs-Kits von Illumina in Anlage I, II und III und für beide Probanden aus der nicht veröffentlichten Arbeit.**

<b>TruSeq Exome Enrichment (Illumina)</b>	Familie 1, Anlage I
	Iranischer Proband IV.1, unveröffentlicht
<b>Nextera Rapid Capture (Illumina)</b>	Familie 2, Anlage I
	Familie, Anlage II
	Familie 1-13, Anlage III
	Iranischer Proband IV.2, unveröffentlicht

## 2.7. In silico Analyse von Varianten

Die Analyse von ES Patienten und Patientinnen-Daten erfolgte durch die Software GensearchNGS (PhenoSystems). Hierbei wurden die Rohdaten aus dem NextSeq500 (bcl-Dateien) in BAM-Dateien konvertiert und gegen das humane Referenzgenom hg19 (GRChr37) aligniert. Abweichungen von der Referenz wurden mit Filterkriterien (Abdeckung, Minor Allele Frequency (MAF), Frequenz, Qualität), wie in Anlage I-III beschrieben, weiter eingegrenzt. In Anlage I, III und innerhalb der unveröffentlichten Arbeit wurden sowohl homozygote, als auch compound-heterozygote Varianten analysiert. In Anlage II wurden heterozygote Varianten aufgrund eines autosomal-dominanten Stammbaums ausgewertet. Zur Einstufung der Varianten wurde die Plattform Alamut Visual 2.10 (Interactive Biosoftware, Rouen, Frankreich) und die dort eingebetteten Vorhersage-Programme für die Pathogenität und das Spleiß-Verhalten genutzt (beschrieben in Anlage I-III). In Anlage I und III wurde ergänzend zur gnomAD-Populationsdatenbank (Karczewski et al. 2019), die Greater Middle East Variome Project (GME) Datenbank (Scott et al. 2016) und Iranome (Fattahi et al. 2019) verwendet. Für die Bewertung von Varianten in bekannten HS-Genen wurde die Deafness Variation Database (DVD) (Azaiez et al. 2018) genutzt.

Für die Einstufung von unbekanntem Varianten wurden die Standards und Richtlinien der American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) für genetisch bedingten Hörverlust verwendet (Oza et al. 2018). Die Einstufung der Pathogenität einzelner Varianten wurden durch folgende in silico Vorhersage-Programme bestimmt: PolyPhen-2 (PP) (Adzhubei et al. 2010), SIFT (Ng and Henikoff 2006), MutationTaster (MT) (Schwarz et al. 2014), fathmm (Shihab et al. 2013), LRT (Chun and Fay 2009), CADD (Kircher et al. 2014) und GERP (Cooper et al. 2005).

## 2.8. Homozygoty mapping und Linkage-Analysen

Genkartierungen, wie das Homozygoty mapping oder die Linkage-Analyse werden hauptsächlich bei konsanguinen Familien und einer erwartbaren geringen Heterozygotie für Bereiche innerhalb des Genoms angewandt. Beim Homozygoty mapping werden Runs of Homozygoty (ROHs) bestimmt, innerhalb derer die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung der krankheitsverursachenden Variante erhöht ist (Seelow et al. 2009). Durch die Anwendung von genomweiten Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP)-Arrays und den Einsatz einer Linkage-Analyse kann eine chromosomale Region bestimmt werden, die sehr wahrscheinlich das betroffene Gen enthält, das verantwortlich für die Krankheit innerhalb der Familie ist. Beide Methoden

wurden wie in Anlage I und III beschrieben, mit Hilfe des HomozygotyMappers (Internetquelle 7), des Infinium HumanCore-24 v1.0 / v2.0 Bead Chips (Illumina) und Merlin (Abecasis et al. 2002) durchgeführt.

## 2.9. Minigene-Ansatz

Um die Auswirkung von Spleiß-Varianten auf ein Transkript zu überprüfen, wird häufig ein sogenannter Minigene-Ansatz durchgeführt. Da für die Klassifizierung von Varianten häufig nur in silico Vorhersage-Programme (Alamut: SpliceSiteFinder-like (Shapiro and Senapathy 1987), MaxEntScan (Yeo and Burge 2004), NNSPLICE (Reese et al. 1997), Genesplicer (Pertea et al. 2001), Human Splicing Finder (Desmet et al. 2009)) angewendet werden, ist es wichtig, diese Auswirkungen auch in vitro zu verifizieren. Der Minigene-Ansatz wurde wie in Anlage I beschrieben, zur Untersuchung der Spleiß-Variante c.1421+2T>C in Familie 1 durchgeführt.

## 2.10. Protein Vorhersage mit I-TASSER

Eine korrekte Proteinfaltung ist für die Funktion eines Proteins essenziell. Veränderungen in der Aminosäuresequenz haben eine Auswirkung auf die korrekte Faltung und können somit einen Funktionsverlust oder eine Änderung der Proteinfunktion bewirken. Die Sekundärstruktur von MYO3A und Drebrin (Wildtyp (WT) und Sequenz der Varianten) wurde mit Hilfe des in silico Programms I-TASSER (Yang et al. 2015) wie in Anlage II beschrieben, visualisiert. Hierbei wurden pro Protein jeweils fünf Modelle bereitgestellt, die unterschiedliche C-Scores haben (Werte zwischen -5 und 2), wobei ein höherer C-Score für eine höhere Wahrscheinlichkeit des vorhergesagten Modells steht.

## 2.11. Korrelationsanalyse

Um die Progressivität der HS in Anlage II zu bestimmen, wurde eine Korrelationsanalyse mit allen betroffenen Familienmitgliedern der deutschen Familie durchgeführt. Hierbei konnte der Verlauf der HS für hohe, mittlere und niedrige Frequenzen, wie in Anlage II beschrieben, bestimmt werden.

## 2.12. Analyse der Drebrin Knockout Mäuse (unveröffentlichte Arbeiten)

Die untersuchten Drebrin (*Dbn1*) Knockout-Mäuse innerhalb der unveröffentlichten Arbeiten wurden uns von Prof. Dr. Britta Eickholt (Charité Berlin) bereitgestellt und nach (Willmes et al. 2017) erzeugt. Die experimentellen Versuche an Mäusen für das Drebrin-Projekt (auditive Messungen (ABR, ASSR), Gewebe-Präparation, Färbungen und Datenanalyse/Statistik) wurden

an der Universität Tübingen durchgeführt und zuvor durch die Ethikkommission des Veterinäramts Baden-Württemberg genehmigt. Der Eigenanteil der Promovendin (Julia Doll) umfasst die Beteiligung an ersten ABR- und ASSR- Messungen und Analysen in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Barbara Vona und Prof. Marlies Knipper am Hearing Research Centre in Tübingen. Die Präparation der Cochleae und anschließende immunhistochemischen Färbungen, sowie weitere auditive Messungen erfolgten ohne die Mithilfe der Promovendin. Die Versuche und Protokolle befolgten die Richtlinien der Direktive 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Es wurden jeweils männliche und weibliche Knockout (KO)- und Wildtyp (WT)-Mäuse (Alter: 2,6-6,1 Monate) gemessen. Die Tiere wurden mit Hilfe einer intraperitonealen Injektion mit einer Mischung aus Fentanyl (Fentadon; Albrecht GmbH, Aulendorf), Midazolam (Midazolam-hamel, Hameln Pharma plus GmbH, Hameln), Medetomidin (Sedator, Albrecht GmbH, Aulendorf) und Atropinsulfat (B.Braun, Melsungen). Als Antidot wurde eine Mischung aus Naloxon (Naloxon-hamel, Hameln Pharma plus GmbH, Hameln), Flumazenil (Flumazenil, Fresenius Kabi, Bad Homburg) und Atipazemol (Antisedan, VETOQUINOL GmbH, Ravensburg) subkutan verabreicht (10 ml/kg).

#### 2.12.1. Messung der auditiven Hirnstammreaktion (ABR)

Um eine ABR-Messung an WT- und *Dbn1* KO-Mäusen durchzuführen, wurden die Mäuse zuvor anästhesiert und die evozierte elektronische Antwort mit Hilfe von subkutanen kranialen Elektroden in einer schalldichten Kammer (IAC 400-A, Industrial Acoustics Company GmbH, Niederkrüchten) gemessen. Die ABR-Schwellenwerte wurden mit „Click“- (100 ms, FFT Mittelwert von 5,4 kHz), Rauschimpuls- (1 ms, FFT Mittelwert von 7,9 kHz) oder Reinton-Stimuli (3 ms, 1 ms „cosine squared rise and fall envelope“, 2-32 kHz) ausgelöst. Die Intensität der Stimuli (Input/Output-Karte: PCI-6052E/PCI-MIO-16E1, National Instruments, Austin, Texas, USA) wurde schrittweise von 10 auf 100 dB SPL in 5 dB Schritten erhöht. Der SPL wurde durch einen Verstärker und Lautstärkereglern (Wulf Elektronik, Frankfurt) moduliert, die gemessenen Signale gefiltert (6-Pole Butterworth Hardware Filter, Wulf Elektronik, Frankfurt) und mit einem Faktor von 100.000 amplifiziert. Jeder Stimulus wurde bis zu 512-mal (256-mal für Reinton-Frequenzen) wiederholt und gemittelt.

#### 2.12.2. Messung der auditory steady-state response (ASSR)

Um die zeitliche Sensitivität im Zusammenhang mit Geräuschen zu analysieren, wird häufig eine Messung mit Hilfe der „auditory steady-state response“ (ASSR) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um periodische elektrische Schwingungen, die durch akustisch evozierte Reize hervorgerufen

werden und für Amplitude und Frequenz sinusförmig moduliert sind (Picton et al. 2003). Es wird angenommen, dass eine ASSR die synchrone Entladung von auditorischen Neuronen abbildet und mit der Modulationsfrequenz phasengekoppelt ist. Aufgrund dessen wird die ASSR als Metrik für zeitliche Auflösung für die Verarbeitung von Geräuschen herangezogen (Belmadani et al. 1998; Dolphin and Mountain 1992; Kuwada et al. 2002; Parthasarathy and Bartlett 2012).

Die Messung der ASSR wurde mit Hilfe von amplitudenmodulierten sinusoidalen Stimuli durchgeführt (11,31 kHz): 0% (keine Modulation) - 100% (maximale Modulation) und 512 Hz Modulationsfrequenz bei 40 dB relativ zum Schwellenwert. Für die Wachstumsfunktion wurden die Stimuli (100% moduliert, 512 Hz) zwischen 0 und 60 dB (relativ zum Schwellenwert) in 5 dB Schritten ausgelöst. Für die Transferfunktion wurden die Stimuli mit einer Frequenz zwischen 64 und 2048 Hz (100% Modulationstiefe) bei 40 dB relativ zum Schwellenwert moduliert. Für die Mäuse wurde ein Modulations-Index kalkuliert, indem das Verhältnis zwischen dem Maximal-Signal und der „Baseline“ herangezogen wurde.

### 2.12.3. Präparation von Gewebe

Die Gewebe-Präparation wurde nach (Singer et al. 2016) durchgeführt. Hierbei wurde die Maus-Cochlea isoliert, in 4% Paraformaldehyd/125 mM Saccharose in 100 mM Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,4) fixiert, für 15 Minuten auf Eis gehalten und anschließend für die whole-mount Färbungen präpariert. Die Gehirne wurden für 48 Stunden in 2% Paraformaldehyd fixiert und in einer 0,4% Paraformaldehyd-Lösung aufbewahrt, bis sie in einer 4%iger Agarose eingebettet wurden. Das Gewebe wurde mit einem Vibratom (Leica VT 1000S) in 60 µm dünne Schnitte geschnitten und bei -20°C bis zur Färbung in Cryoprotectant (150g Saccharose in 200 ml 1x Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung und 150 ml Ethylenglykol) aufbewahrt.

### 2.12.4. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach (Tan et al. 2008) und (Singer et al. 2016) durchgeführt. Es wurden hierbei Antikörper gegen Drebrin (DBN, Maus, 1:100 verdünnt, ARP GeneTex/BIOZOL, #GTX12350, Eching) und Prestin (Kaninchen, 1:1000 verdünnt, Squarix, #976102#5, Berlin) verwendet. Die Primär-Antikörper wurden mit Hilfe von passenden Zweit-Antikörpern Cy3 (1:1500 verdünnt, Jackson Immuno Research Laboratories, #AB\_2338006, West Grove PA, USA) und Alexa 488 (1:500 verdünnt, Molecular Probes, #A11001, Eugene, USA) gebunden. Alle Proben wurden mit einem Olympus BX61 Mikroskop (Olympus, Hamburg), ausgestattet mit einer Epifluoreszenz-Beleuchtung, nach (Zuccotti et al. 2012) und (Singer et al. 2016) betrachtet und mit der CellSens Dimension Software (OSIS GmbH, Münster) analysiert.

### 2.12.5. Datenanalyse und Statistik

Der Schwellenwert für alle Click-, Noise- und Frequenz-ABR Messungen wurde als die niedrigste Geräusch-Intensität definiert, an dessen Zeitpunkt noch ein klares Signal von der „Baseline“ abgegrenzt werden konnte. Die Maus-Genotypen wurden mit Hilfe des Zweistichproben-*t*-Tests für Click- und Noise-Frequenzen und einer zweifachen Varianzanalyse ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) für Reinton-Frequenzen verglichen. Für eine „Supra-Threshold“-ABR-Analyse wurde der ABR-Schwingungsverlauf analysiert. Hierbei wurde für einzelne Wellen ein negativer (n)- und ein positiver (p) Peak bestimmt und die Latenzen durch den Anfangszeitpunkt des negativen Peaks der dazugehörigen Welle definiert. Die Peak-Amplituden und Latenzen der ABR-Wellen I und IV wurden exzerpiert und als Welle I:  $I_n - I_p$  (0,85-1,9 ms) und Welle IV:  $IV_n - IV_p$  (3,15-6,05 ms) definiert. Durch ein eigenes Computerprogramm (Peak, Universität Tübingen) wurden ABR Peak-Amplituden und Latenzen auf Basis der vorangegangenen Definition extrahiert und daraufhin ABR Peak-zu-Peak-Amplituden und Latenz-Wachstumsfunktionen für einzelne Ohren und erhöhte Stimulus-Level kalkuliert (Burkard 2007). Alle ABR Wellen-Amplituden und Latenz-Wachstumsfunktionen wurden auf Basis der ABR-Schwellenwerte (-10 dB bis 90 dB über dem Schwellenwert für Amplituden; 0 dB bis 90 dB über dem Schwellenwert für Latenzen) normalisiert. Die ABR-Amplituden und Latenz Messungen wurden für die Maus-Genotypen mit dem Zweistichproben-*t*-Test ( $\alpha=0,05$ ) verglichen. F-ABR Messungen wurden in Gruppen mit der zweifachen Varianzanalyse ANOVA ( $\alpha=0,05$ ) analysiert (GraphPad Prism). Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$ SEM dargestellt. Für den einfachen Vergleich wurde der Mittelwert der drei maximalen Amplituden für jedes Ohr kalkuliert. Für die Latenzen wurde der Mittelwert zwischen 20 dB und 60 dB relativ zum Schwellenwert für jedes Ohr kalkuliert. Die Maus-Genotypen wurden wieder mit dem Zweistichproben-*t*-Test ( $\alpha=0,05$ ) für jeden Stimulus verglichen.

### 3. Ergebnisse und Diskussion der Publikationen

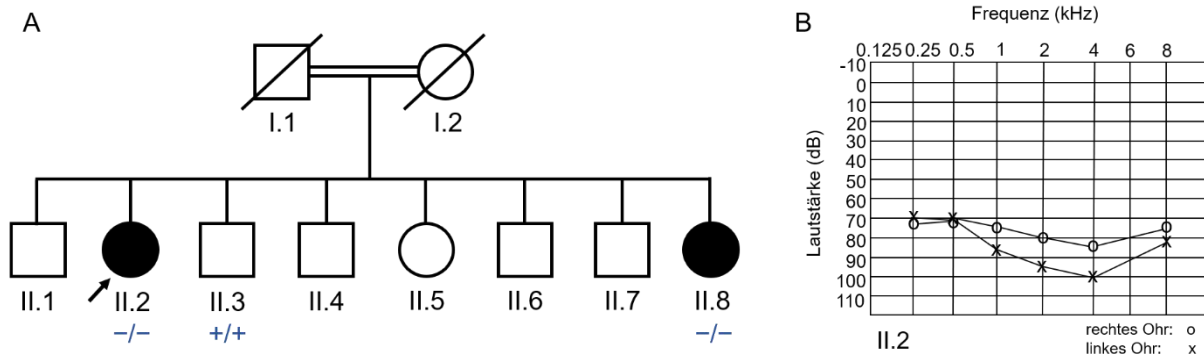
Im Folgenden werden die Ergebnisse aus drei Publikationen, die mit Anlage I, II und III gekennzeichnet sind, zusammengefasst und diskutiert.

#### 3.1. Neue Varianten in *CDC14A* bei iranischen und pakistanischen Patienten und Patientinnen mit einer HS (Anlage I)

In Anlage I (Doll et al. 2020b) werden zwei konsanguine Familien mit einer HS beschrieben, innerhalb derer zwei unterschiedliche, bisher unbeschriebene homozygote Varianten in *CDC14A* identifiziert wurden. Um die Auswirkung und Pathogenität dieser Varianten zu ermitteln, wurde eine funktionelle Charakterisierung mittels Spleiß-Assay und RT-qPCR durchgeführt.

##### Iranische Familie

Die beiden betroffenen iranischen Patientinnen in Familie 1 (II.2, II.8) (Abbildung 5A) wiesen eine kongenitale, sensorineurale, bilaterale, nicht-progressive HS auf. Auffällig war der asymmetrische Verlauf der schwerwiegend bis hochgradigen HS von Patientin II.2 (Alter: 43) (Abbildung 5B). Die ophthalmologische Untersuchung der Patientin II.2 ergab nur einen leichten refraktiven Fehler.

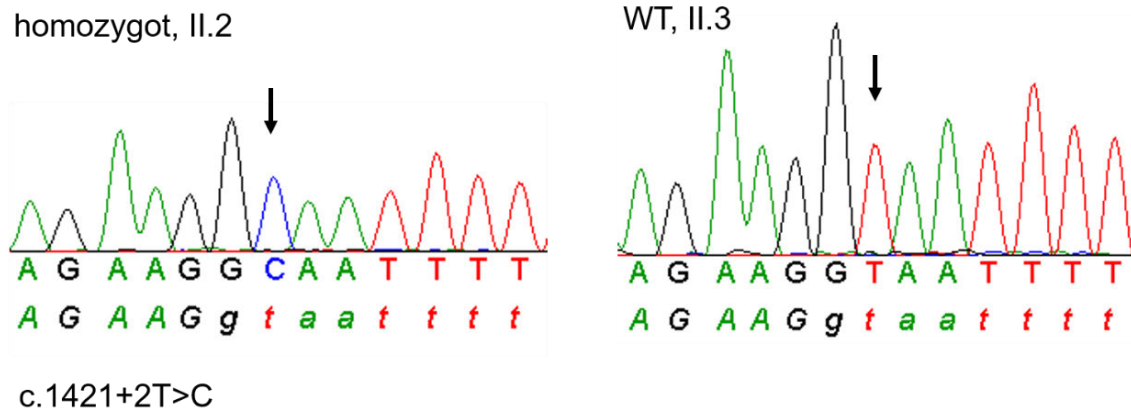


**Abbildung 5: Stammbaum und Audiogramm der iranischen Familie.** (A) Stammbaum der iranischen Familie mit der Index-Patientin II.2 (schwarzer Pfeil), betroffener Schwester II.8 und nicht-betroffenen Familienmitgliedern. (B) Reintonaudiogramm des rechten und linken Ohrs der Index-Patientin II.2. Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020b).

Durch die Analyse von 174 HS Genen (siehe „Supplementary Table S1“ in Anlage I) nach einer ES der Index-Patientin II.2 konnte eine homozygote Spleiß-Variante c.1421+2T>C in Intron 14 des *CDC14A*-Gens (NCBI Referenz-Sequenz: NM\_033312.2) identifiziert werden. Die Variante wurde weder in gnomAD, in der GME Datenbank oder in Iranome gefunden. Alle weiteren Varianten hatten entweder keinen Einfluss auf die mRNA, waren (wahrscheinlich) nicht pathogen oder konnten den Phänotyp der Patientin nicht erklären. Eine Segregationsanalyse innerhalb der



Familie bestätigte die Analyse. So konnte die homozygote Spleiß-Variante c.1421+2T>C ebenfalls in der betroffenen Schwester II.8 nachgewiesen werden. Beim gesunden Bruder II.3 wurde die Variante nicht detektiert (Abbildung 5A).



**Abbildung 6: Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung von c.1421+2T>C.** Links ist ein Ausschnitt aus der Sequenz von II.2 mit der homozygoten Variante c.1421+2T>C abgebildet. Rechts davon ist der WT des Bruders II.3 erkennbar. Die Position c.1421+2 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Referenz-Sequenz (unten) und die Sequenz der Patienten und Patientinnen (oben) ist im unteren Abschnitt der Abbildung dargestellt. Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020b).

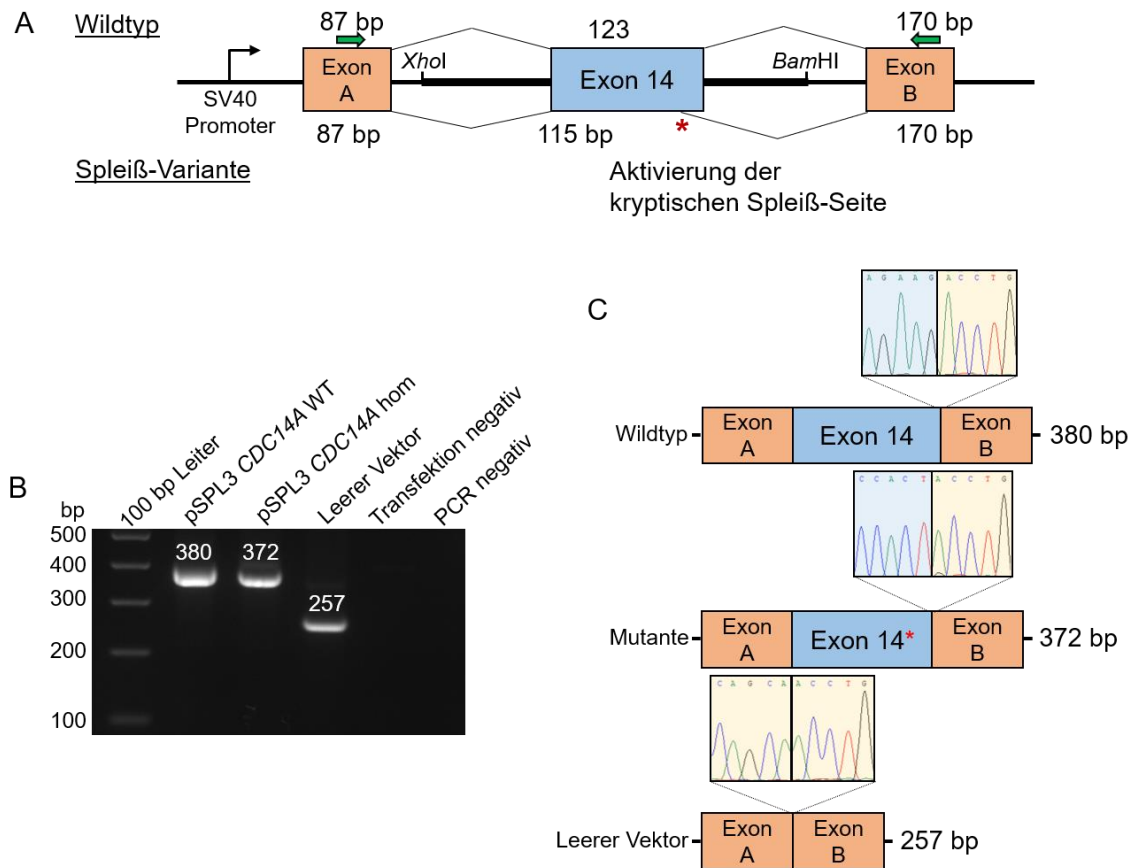
Eine zusätzliche Auswertung durch unsere interne Datenbank, die zu diesem Zeitpunkt ca. 330 Exome beinhaltete, ergab keine zusätzliche pathogenen oder wahrscheinlich pathogenen Varianten und bekräftigte die *CDC14A* Spleiß-Variante in Patientin II.2. Die Analyse von ROHs durch ein Homozygosity mapping in Patientin II.2 ergab eine 22,5 Megabasen (Mb) große Region auf Chromosom 1 mit den Koordinaten chr1: 89.845.926-112.389.040 (hg19). In diesem homozygoten Intervall befindet sich das Gen *CDC14A* (chr1: 100.810.598-100.985.833, hg19).

Die Auswirkung der c.1421+2T>C Variante ergab den Verlust der 5' Spleiß-Donor-Seite an der Exon-Intron Grenze von Exon 14 an Intron 14, was von vier aus fünf in silico Spleiß-Vorhersage Programmen angegeben wurde (MaxEntScan, NNSplice, GeneSplicer, Human Splicing Finder; Alamut). Durch den Verlust der essenziellen Spleiß-Seite, ist die Wahrscheinlichkeit eines Exon-Skipping oder die Aktivierung der naheliegenden kryptischen Spleiß-Seite erhöht, die acht Basenpaare weiter in Exon 14 lokalisiert ist (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Spleiß-Vorhersage der c.1421+2T>C Variante durch Alamut Visual 2.10.** Vier aus fünf Vorhersage-Programmen geben den Verlust der Spleiß-Donor Stelle an der Exon-Intron Grenze von Exon 14 an Intron 14 an (schwarze Umrandung). Durch einen schwarzen Pfeil ist die kryptische Spleiß-Seite, die sich acht Basenpaare weiter in Exon 14 befindet, gekennzeichnet. Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020b).

Diese *in silico* Auswirkung der c.1421+2T>C Variante in der iranischen Familie wurde durch einen *in vitro* Minigene-Ansatz bei der betroffenen Index-Patientin II.2 und deren gesunden Bruder II.3, der als WT Kontrolle diente, überprüft. Die Klonierung von Exon 14 und der flankierenden intronischen Sequenzen 5' und 3' in einen pSPL3 Exon Trapping Vektor mit direkter Amplifizierung und Sanger-Sequenzierung von cDNA der WT Kontrolle und der mutierten Sequenz, ergab zwei unterschiedlich lange Produkte (Abbildung 8).



### Abbildung 8: Charakterisierung der c.1421+2T>C Variante durch einen Minigene-Ansatz.

(A) Schematische Darstellung des pSPL3 Vektors mit kloniertem Exon 14 (blau) aus *CDC14A* und dessen flankierende Regionen mit XhoI und BamHI Schnittstellen. Sowohl die WT (oben) als auch die Spleiß-Variante (unten) und die Aktivierung der kryptischen Spleiß-Seite (roter Stern) sind dargestellt. Exon A und B (rot) entstammen dem Vektor. Primer, die für eine PCR verwendet wurden sind durch grüne Pfeile markiert und befinden sich in Exon A (Spleiß-Donor Region) und Exon B (Spleiß-Akzeptor Region). (B) Agarose-Gelbild nach Elektrophorese der cDNA RT-PCR Produkte nach Transfektion in HEK293T Zellen. Das WT Amplikon (pSPL3 *CDC14A* WT) weist eine Bande bei 380 bp auf und beinhaltet die amplifizierte WT Region von Exon A, B und Exon 14. Das Amplikon mit der homozygoten Spleiß-Variante (pSPL3 *CDC14A* hom) weist eine Bande bei ca. 380 bp auf, was erst nach der Sequenzierung als 372 bp erkennbar wurde. Der leere Vektor wies eine Bande bei 257 bp auf. (C) Schematische Darstellung nach Sanger-Sequenzierung der 5' Spleiß-Grenzen von Exon 14 der RT-PCR Produkte des WT's, der Mutante und des leeren Vektors. Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020b).

Durch den Verlust der Spleiß-Stelle an der Exon-Intron Grenze kommt es zur Aktivierung der kryptischen Spleiß-Stelle in Exon 14 (Abbildung 7), was in einer Trunkierung von acht Basenpaaren (GTAAGAAG) in der mutierten Sequenz (372 bp) im Gegensatz zur WT Sequenz (380 bp) führt. Wie erwartet, wies das sequenzierte cDNA-Amplikon des leeren Vektors (ohne Exon 14) eine Länge von 257 bp auf. Durch die Trunkierung in der mutierten Sequenz, die die homozygote Spleiß-Variante beinhaltete, kommt es zu einer Leserasterverschiebung (c.1414\_1421del,

p.(Val472Leufs\*20) und dem Einbau eines vorzeitigen Stopp-Codons (PTC). Dieses PTC befindet sich 20 Aminosäuren-Positionen weiter stromabwärts („downstream“) und führt zu einer Trunkierung des CDC14A Proteins um ca. 21% (Abbildung 9).

## Wildtyp CDC14A

```

1  MAAESGELIG ACEFMKDRLY FATLRNRPKS TVNTHYFSID EELVYENFYA DFGPLNLAIV
61  YRYCCKLNKK LKSYSLSRKK IVHYTCFDQR KRANAFLIG AYAVIYLKKT PEEAYRALLS
121 GSNPPYLPFR DASFGNCTYN LTILDCLQGI RKGLQHGFDD FETFDVDEYE HYERVENGDF
181 NMIVPGKFLA FSGPHPKSKI ENGYPLHAFE AYFPYFKKHV VTAVRLNKK IYEAKRFTDA
241 GFEHYDLFFI DGSTPSDNIV RRFLNICENT EGAIIVHCKA GLGRTGLIA CYVMKHYRFT
301 HAEIIAWIRI CRPGSIIGPQ QHFLEEKQAS LIWQGDIFRS KLKNRPSSEG SINKILSGLD
361 DHSIGGNLSK TQNMERFGED NLEDDVEMK NGITQGDCLR ALKSQRQPT SPSCAFRSDD
421 TKGHPRAVSQ PFLRSSSLQG SAVTLKTSKM ALSPSATAKR INRTSLSSGA TVRSFINSR
481 LASSLGNLNA ATDDPENKKT SSSSKAGFTA SPFTNLLNGS SQPTRNYPE LNNQYNRSS
541 NSNGGNLNSP PGPHSAKTEE HTTILRPSYT GLSSSSARFL SRSTIPVSAQT PPPGPQNEC
601 NFCALPSQPR LPPKKSNAK EAF*

```

## Mutiertes CDC14A p.(Val472Leufs\*20)

```

1  MAAESGELIG ACEFMKDRLY FATLRNRPKS TVNTHYFSID EELVYENFYA DFGPLNLAIV
61  YRYCCKLNKK LKSYSLSRKK IVHYTCFDQR KRANAFLIG AYAVIYLKKT PEEAYRALLS
121 GSNPPYLPFR DASFGNCTYN LTILDCLQGI RKGLQHGFDD FETFDVDEYE HYERVENGDF
181 NMIVPGKFLA FSGPHPKSKI ENGYPLHAFE AYFPYFKKHV VTAVRLNKK IYEAKRFTDA
241 GFEHYDLFFI DGSTPSDNIV RRFLNICENT EGAIIVHCKA GLGRTGLIA CYVMKHYRFT
301 HAEIIAWIRI CRPGSIIGPQ QHFLEEKQAS LIWQGDIFRS KLKNRPSSEG SINKILSGLD
361 DHSIGGNLSK TQNMERFGED NLEDDVEMK NGITQGDCLR ALKSQRQPT SPSCAFRSDD
421 TKGHPRAVSQ PFLRSSSLQG SAVTLKTSKM ALSPSATAKR INRTSLSSGA TLFHKLPAHQ
481 FSRELECCNR *

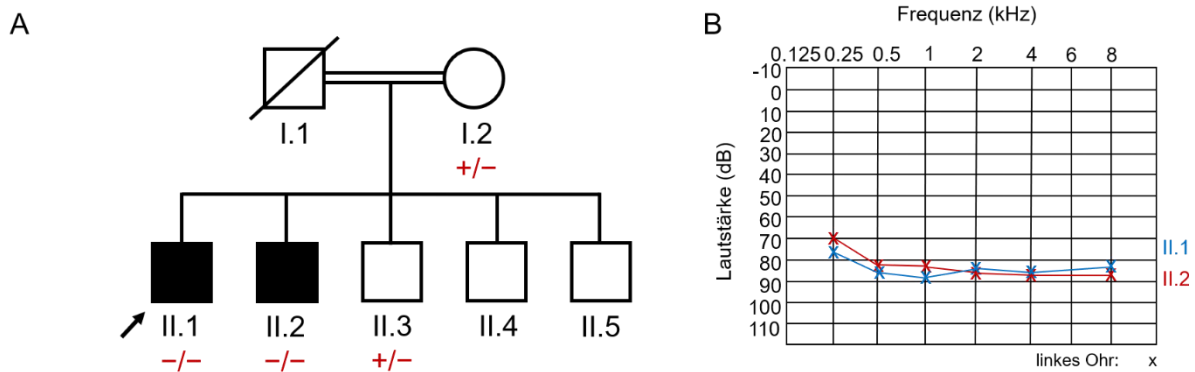
```

**Abbildung 9: Vergleich der Proteinsequenz des wildtypischen und mutierten CDC14A Proteins nach der c.1421+2T>C Variante.** Auf der linken Seite ist die WT Sequenz des CDC14A-Proteins dargestellt. Durch eine Leserasterverschiebung und den dadurch vermittelten Einbau eines PTCs 20 Aminosäuren weiter downstream, kommt es zur Trunkierung von ca. 21% des CDC14A Proteins (rot markierte Aminosäuren). Die Darstellung wurde mit Hilfe der Software Mutalyzer visualisiert (Wildeman et al. 2008). Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020b).

Um eine korrekte Verbindung von benachbarten Exons und die damit verbundene Entfernung von intronischen Sequenzbereichen zu gewährleisten, ist eine fehlerfreie RNA-Spleißung durch den Spleißosom-Komplex nach der Transkription unerlässlich (Wang and Cooper 2007). Durch die Aktivierung von kryptischen Spleiß-Seiten, wie sie bei Betroffenen innerhalb der iranischen Familie vorkommt, kann es zu fehlerhaft gespleißten Transkripten und daraus resultierenden Erkrankungen führen (Lopez-Bigas et al. 2005).

## Pakistanische Familie

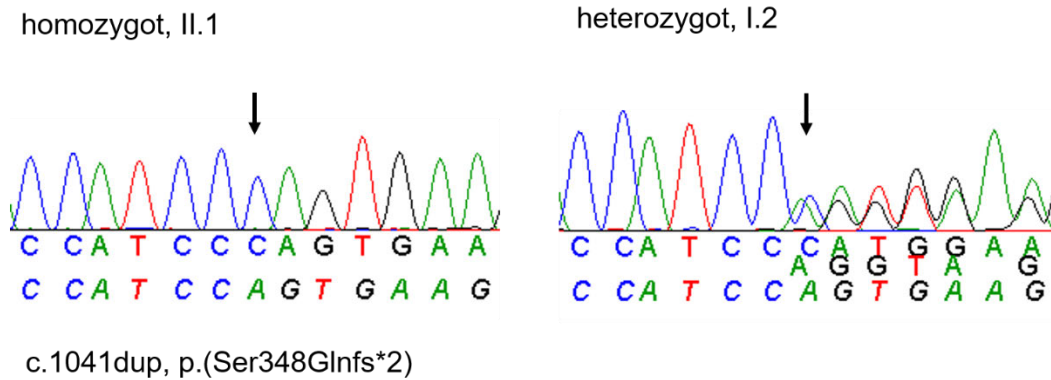
Die beiden betroffenen Patienten in der pakistanischen Familie (II.1, II.2, Familie 2) (Abbildung 10A) zeigten, wie die iranischen Patientinnen eine kongenitale, sensorineurale, bilaterale, nicht-progressive HS auf. Beide Patienten sind von einer hochgradigen HS betroffen (Abbildung 10B). Zur Veranschaulichung wurden nur die Messungen des linken Ohrs abgebildet.



**Abbildung 10: Stammbaum und Audiogramm der pakistanischen Familie.** (A) Stammbaum der pakistanischen Familie mit dem Index-Patienten II.1 (schwarzer Pfeil), dem ebenfalls betroffenen Bruder (II.2) und nicht betroffenen Familienmitgliedern. (B) Reintonaudiogramm des linken Ohrs von beiden betroffenen Patienten (II.1, blau; II.2, rot). Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020b).

Beim älteren Bruder (II.2, Alter: 29) des Index-Patienten wurde mit ca. einem Jahr eine HS diagnostiziert, nachdem seine Mutter Zeichen eines Hörverlusts bemerkte. Die HS des älteren Bruders (II.2) als auch des jüngeren Index-Patienten (II.1, Alter: 27) wird als kongenital beschrieben. Angaben über einen progressiven Verlauf sind nicht verfügbar. Bei beiden Patienten konnte kein Tinnitus und keine vestibuläre Fehlfunktion festgestellt werden. Beide betroffenen Brüder leiden neben einer HS unter kurzsichtigem, zusammengesetztem Astigmatismus (Astigmatismus myopicus compositus). Beide sind nicht verheiratet und haben keine Kinder.

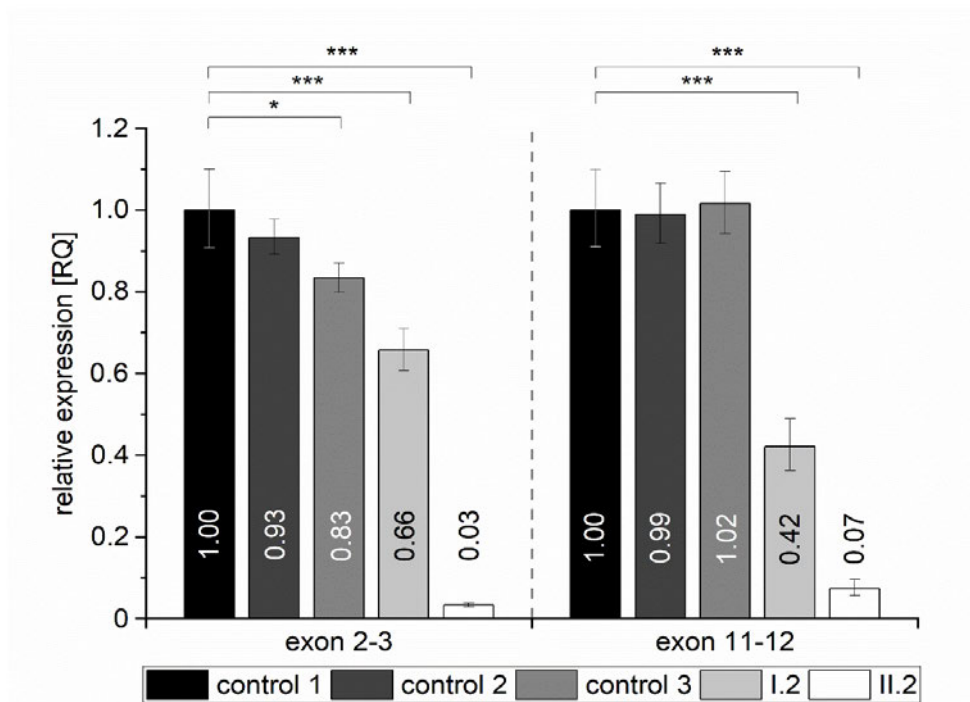
Nach der ES des Index-Patienten und der Analyse unseres HS-Genpanels (174 Gene) konnte eine homozygote Variante c.1041dup in Exon 11 des *CDC144*-Gens identifiziert werden, die durch die Duplikation der Base Cytosin zu einer Verschiebung des Leserasters und dem Einbau eines vorzeitigen Stopp-Codons zwei Aminosäure-Positionen weiter downstream führt (p.(Ser348Glnfs\*2)). Die Variante ist weder in gnomAD oder der GME Datenbank annotiert. Weitere identifizierte Varianten wurden nach ACMG-Standards entweder als (wahrscheinlich) nicht pathogen eingestuft oder konnten den Phänotyp in der Familie nicht erklären. Mit Hilfe der Familienmitglieder II.2, II.3 (gesunder Bruder) und I.2 (gesunde Mutter) konnte die Variante bestätigt werden. So konnte die homozygote Variante ebenfalls im betroffenen Bruder nachgewiesen werden und heterozygot bei der gesunden Mutter des Index-Patienten (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung von c.1041dup.** Links ist ein Ausschnitt aus der Sequenz von II.1 mit der homozygoten Variante c.1041dup, p.(Ser348Glnfs\*2) abgebildet. Rechts davon ist die heterozygote Variante der Mutter I.2 dargestellt. Die Position c.1041dup ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Referenz-Sequenz (unten) und die Sequenz der Patienten und Patientinnen (oben) ist im unteren Abschnitt der Abbildung dargestellt. Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020b).

Durch unsere interne Datenbank und den dort hinterlegten 330 Exome konnte die Variante in Patient II.1 nochmals bestätigt werden. Die Anwendung einer Linkage-Analyse innerhalb der pakistanischen Familie durch einen genomweiten SNP-Array erzielte 15 Regionen, die einen maximalen „Logarithm of the Odds“ (LOD)-Score von 1,927 erreichten. Die größte Region von 13,6 Mb mit den Koordinaten: chr1:88.430.037-102.069.696 beinhaltet das *CDC14A*-Gen.

Da es sich bei der c.1041dup Variante um eine frameshift-Variante, die den Einbau eines PTCs zur Folge hat handelt, wurden relative *CDC14A* mRNA Expressionslevel (aus Vollblut) des vorderen Teils (Exon 2-3) und des hinteren Teils (Exon 11-12) durch eine RT-qPCR des homozygoten Patienten II.2, der heterozygoten Mutter I.2 und WT Kontrollen quantifiziert (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Quantifizierung von relativen *CDC14A* mRNA Expressionslevel durch RT-qPCR.** Für Exon 2-3 ( $F_{(4, 10)} = 150,69$ ) und Exon 11-12 ( $F_{(4, 10)} = 112,84$ ) sind die relativen Expressionslevel der normalisierten Referenz-Proben (WT Kontrollen 1-3), des homozygoten Patienten II.2 und der heterozygoten Mutter I.2 dargestellt, mit  $N = 3$  für jede Gruppe. Alle Werte sind Mittelwerte und Fehlerbalken stehen für die Maximal- und Minimalwerte. Zur Veranschaulichung wurden Signifikanzen nur für paarweise Vergleiche zur normalisierten WT Kontrolle 1 angegeben (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Abbildung geändert nach (Doll et al. 2020b).

Für die RT-qPCR wurden jeweils zwei verschiedene Primer-Paare (siehe Anlage I, „Materials and Methods“) für Exon 2-3 (NM\_033312.2) und Exon 11-12 (NM\_033312.2) verwendet, da sowohl eine Region vor, als auch hinter der c.1041dup Variante, abgedeckt sein sollte um einen nonsense-mediated mRNA decay (NMD) einschätzen zu können. Die Analyse der RT-qPCR konnte zeigen, dass die relativen Expressionslevel für Exon 2-3 und Exon 11-12 gegenüber der WT Kontrollen beim homozygoten Patienten II.2 um ca. 99% signifikant reduziert waren (Abbildung 12). Bei der heterozygoten Probe I.2 konnte im Vergleich zu den verwendeten WT Kontrollen ein Unterschied von 17-34% für Exon 2-3 und ein Unterschied von ca. 57% für Exon 11-12 detektiert werden (Abbildung 12).

Der Einbau des PTCs durch die c.1041dup Variante zwei Aminosäure-Positionen weiter downstream (p.(Ser348Glnfs\*2)), führt zu einer Trunkierung des CDC14A Proteins um ca. 44% (Abbildung 13).

## Wildtyp CDC14A

```

1  MAAESGELIG ACEFMKDRLY FATLRNRPKS TVNTHYFSID EELVYENFYA DFGPLNLAMV
61  YRYCCKLNKK LKSYSLSRKK IVHYTCFDQR KRANAFLIG AYAVIYLKKT PEEAYRALLS
121 GSNPPYLPFR DASFGNCTYN LTILDCLQGI RKGLQHGFDD FETFDVDEYE HYERVENGGF
181 NMIVPGKFLA FSGPHPKSKI ENGYPLHAPE AYFPYFKKHV VTAVVRLNKK IYEAKRFTDA
241 GFEHYDLFFI DGSTPSONIV RRFLNICENT EGAIIVHCKA GLGRTGLIA CYVMKHYRFT
301 HAEIIAWIRI CRPGSIIGPQ QHFLEEKQAS LWVQGDIFRS KLKNRPSSEG SINKILSGLD
361 DMSIGGNLSK TQNMERFGED NLEDDDVEMK NGITQGDKLR ALKSQRQPRT SPSCAFRSDD
421 TKGHPRAVSQ PFRLLSSSLQG SAVTLKTSKM ALSPSATAKR INRTSLSSGA TVRSFSINSR
481 LASSLGNLNA ATDDPENKKT SSSSKAGFTA SPFTNLLNGS SQPTTRNYPE LNNQYVNSR
541 NSNGGNLNSP PGPMSAKTEE HTTILRPSYT GLSSSSARFL SRSIPVSAQT PPPGQVNEC
601 NFCALPSQPR LPPKFFNSAK EAF*

```

## Mutiertes CDC14A p.(Ser348Glnfs\*2)

```

1  MAAESGELIG ACEFMKDRLY FATLRNRPKS TVNTHYFSID EELVYENFYA DFGPLNLAMV
61  YRYCCKLNKK LKSYSLSRKK IVHYTCFDQR KRANAFLIG AYAVIYLKKT PEEAYRALLS
121 GSNPPYLPFR DASFGNCTYN LTILDCLQGI RKGLQHGFDD FETFDVDEYE HYERVENGGF
181 NMIVPGKFLA FSGPHPKSKI ENGYPLHAPE AYFPYFKKHV VTAVVRLNKK IYEAKRFTDA
241 GFEHYDLFFI DGSTPSONIV RRFLNICENT EGAIIVHCKA GLGRTGLIA CYVMKHYRFT
301 HAEIIAWIRI CRPGSIIGPQ QHFLEEKQAS LWVQGDIFRS KLKNRPSQ*

```

**Abbildung 13: Vergleich der Proteinsequenz des wildtypischen und mutierten CDC14A Proteins nach der c.1041dup Variante.** Auf der linken Seite ist die WT Sequenz des CDC14A-Proteins dargestellt. Durch eine Leserasterverschiebung und den dadurch vermittelten Einbau eines PTCs 2 Aminosäuren weiter downstream, kommt es zur Trunkierung von ca. 44% des CDC14A Proteins (rot markierte Aminosäuren). Die Darstellung wurde mit Hilfe der Software Mutalyzer visualisiert (Wildeman et al. 2008). Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020b).

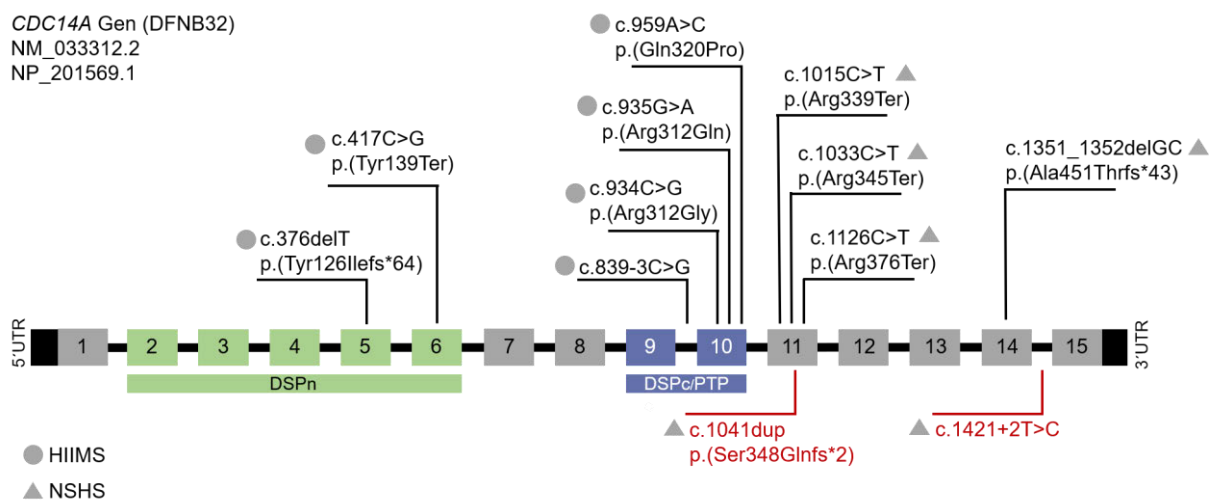
Da es sich bei beiden Varianten um loss-of-function Varianten handelt, welche häufig durch den Einbau eines PTCs bedingt sind, stellte sich die Frage nach einem NMD. Das Ziel dieses Mechanismus ist der Abbau trunkierter Transkripte, die einen toxisch-negativen Effekt haben könnten (Kurosaki et al. 2019). Es ist bekannt, dass der NMD-Komplex zwischen regulärem und trunkiertem Transkript anhand der Position des regulären Stopp-Codons oder des PTCs innerhalb des Transkripts unterscheidet. Hier muss das PTC mindestens 50-55 Nukleotide an der nächstgelegenen Exon-Exon Verbindung in 3'-Richtung positioniert sein, damit ein Abbau durch die NMD Maschinerie initiiert wird (Maquat 2004). Da die Spleiß Variante c.1421+2T>C in der iranischen Familie eine Leserasterverschiebung auslöst (p.(Val472Leufs\*20)) und das dadurch eingebaute PTC im letzten Exon 15 des *CDC14A*-Gens ohne nachfolgende Exon-Exon Verbindung in 3'-Richtung lokalisiert ist, kommt es hier sehr wahrscheinlich nicht zu einem Abbau durch den NMD-Komplex. Somit könnte eine Anhäufung von schädlichen Transkripten die HS in dieser Familie erklären. Die frameshift-Variante c.1041dup in der pakistanischen Familie befindet sich in Exon 11 und führt zu einem PTC-Einbau im selben Exon. Die Position des PTCs liegt dabei mehr als 55 Nukleotide von der nächsten Exon-Exon Grenze in 3'-Richtung entfernt. Gemäß dem zuvor beschriebenen Mechanismus, sollte es also zum Abbau des trunkierten Transkripts kommen. Unsere Analysen der relativen Expressionslevel bei homozygoten und heterozygoten Individuen im vorderen (Exon 2-3), und hinteren Transkriptbereichs (Exon 11-12) von *CDC14A* bestätigten diese Annahme. Die Reduzierung der Expressionslevel um ca. 99% beim homozygoten Patienten, führt demnach höchstwahrscheinlich zu einer ungenügenden Anzahl an funktionellem Transkript und der Ausbildung der HS.

Interessanterweise scheint die Ausbildung einer nicht-syndromalen HS (NSHS, DFNB32) mit fertilen männlichen Betroffenen oder die Ausbildung eines HIIM-Syndroms, transkriptabhängig



zu sein (Mohseni et al. 2020). Dabei ist ein funktionstüchtiges Transkript NM\_033313.2 (11 Exons) wohl essenziell für eine männliche Fertilität, da männliche Betroffene mit bereits bekannten Varianten, die zu einem Abbau des Transkripts NM\_033313.2 führen, infertil sind. Varianten, wie auch die beiden in dieser Arbeit beschriebenen, die die Funktion des kurzen Transkripts NM\_033313.2 nicht beeinflussen, wurden ausschließlich in fertilen männlichen Betroffenen mit NSHS identifiziert. Mohseni et al. haben deshalb daraus geschlossen, dass ein funktionstüchtiges 3'-Ende von längeren *CDC14A* Transkripten, essenziell für eine intakte Hörfunktion ist und der Abbau oder die Trunkierung längerer Transkripte (wie auch NM\_033312.2), für fertile Betroffene mit einer eingeschränkten auditorischen Funktion verantwortlich ist (Mohseni et al. 2020).

Nach Veröffentlichung von Anlage I wurde eine weitere Variante in *CDC14A* (c.1351\_1352delGC, p.(Ala451Thrfs\*43)) beschrieben, die zu einer NSHS (DFNB32) in fertilen männlichen Betroffenen führt. Abbildung 14 (siehe „Figure 4“ in Anlage I) wurde hierfür angepasst und umfasst nun alle 12 beschriebenen Varianten in diesem Gen.

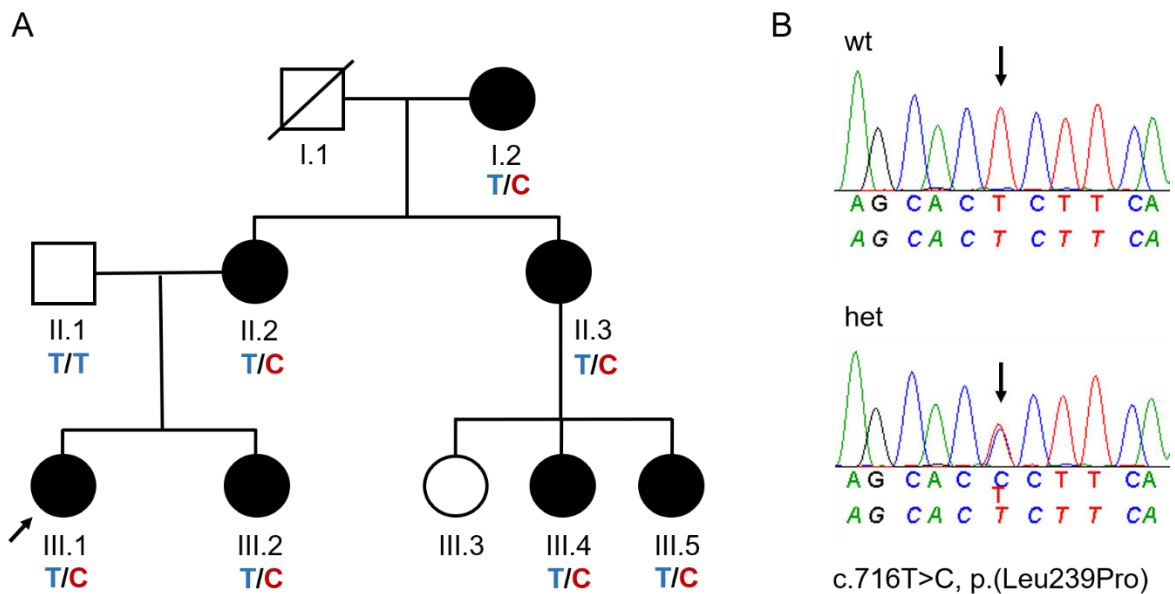


**Abbildung 14: Zusammenfassung aller bisher beschriebenen Varianten in *CDC14A*.** Das Transkript NM\_033312.2, NP\_201569.1 umfasst 15 Exons und besitzt eine „dual-specificity phosphatase domain“ (DSPn; grün) und eine „core dual-specificity phosphatase domain“ (DSPc/PTP; lila). Alle 12 bisher beschriebenen Varianten sind mit ihrer c. und p. Position abgebildet, wobei die in dieser Arbeit identifizierten Varianten in rot markiert sind. Varianten mit einem HIIMS Phänotyp sind mit einem Kreis-Symbol gekennzeichnet und Varianten, die zu einer NSHS führen, sind mit einem Dreieck markiert. Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020b).

### 3.2. Eine neue Variante in *MYO3A* in einer deutschen Familie mit autosomal dominanter HS (Anlage II)

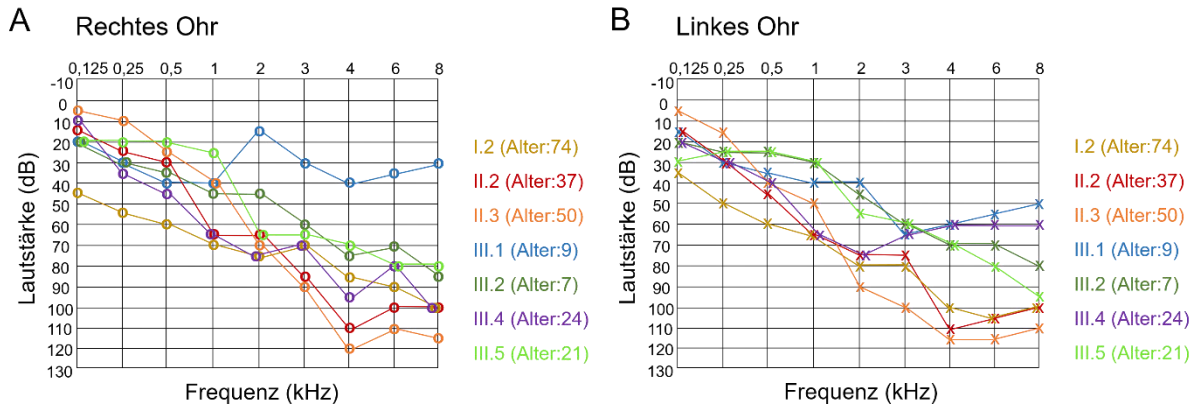
In Anlage II (Doll et al. 2020a) wird eine deutsche Familie mit einer progressiven autosomal dominanten Hochtonschwerhörigkeit beschrieben, in der eine neue heterozygote missense Variante in *MYO3A* identifiziert wurde.

Innerhalb der Familie zeigten sieben Patientinnen eine bilaterale, sensorineurale HS, die einen prälingualen Beginn aufwies (I.2, II.2, II.3, III.1, III.2, III.4, III.5) (Abbildung 15).



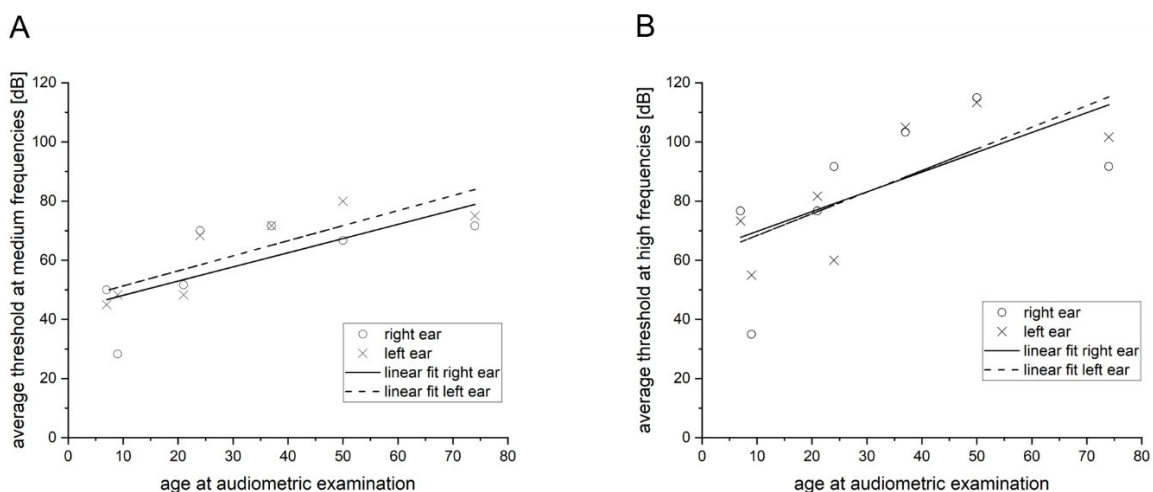
**Abbildung 15: Stammbaum der deutschen Familie und Segregation der *MYO3A* c.716T>C Variante.** (A) Betroffene Index-Patientin III.1 (schwarzer Pfeil) und ebenfalls betroffene (schwarzes Symbol) und gesunde Familienmitglieder (weißes Symbol). Heterozygote Familienmitglieder sind mit „T/C“ und gesunde, wildtypische Familienmitglieder sind mit „T/T“ gekennzeichnet. (B) Elektropherogramm der heterozygoten Variante c.716T>C, p.(Leu239Pro) und wildtypische Sequenz. Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020a).

Die Messung der HS aller betroffenen Patientinnen (I.2, II.2, II.3, III.1, III.2, III.4, III.5) zeigte eine moderate bis schwerwiegende Hochtonschwerhörigkeit in der Familie (Abbildung 16). Das Familienmitglied III.3 wies nach der Messung normale Werte auf und zeigte kein beeinträchtigtes Hörvermögen. Nach einer weiteren Untersuchung wurden keine weiteren Risikofaktoren für eine HS, wie Infektionen, Traumata oder Tinnitus in dieser Familie festgestellt. Alle betroffenen Patientinnen besitzen Hörgeräte, welche gut eingestellt sind und wodurch gute Ergebnisse erzielt werden.



**Abbildung 16: Audiogramme der deutschen Familie.** Reintonaudiogramm des rechten (A) und (B) linken Ohrs aller sieben betroffenen Patientinnen (Luftleitung). Das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der Testung ist jeweils rechts davon abgebildet. Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020a).

Um eine mögliche Progredienz der HS innerhalb dieser Familie festzustellen, wurde eine Korrelationsanalyse mit Hilfe des Alters bei Testung und dem mittleren Schwellenwert (dB) der betroffenen Patientinnen für hohe (4-8 kHz), mittlere (1-3 kHz) und tiefe (0,125-0,5 kHz) Frequenzen durchgeführt. Die Analyse ergab eine eindeutige Korrelation zwischen den durchschnittlichen Schwellenwerten und hohen und mittleren Frequenzen für beide Ohren (Pearson's  $r$  für hohe Frequenzen: 0,62 (rechtes Ohr), 0,76 (linkes Ohr); Pearson's  $r$  für mittlere Frequenzen: 0,71 (rechtes Ohr), 0,83 (linkes Ohr)). Diese Korrelation lässt auf einen progressiven Verlauf und einer erwartbaren Verschlechterung der HS mit dem Alter schlussfolgern (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Korrelationsanalyse für mittlere und hohe Frequenzbereiche.** Korrelation zwischen Alter der Patientinnen bei audiometrischer Datenerhebung und mittleren Schwellenwerten für hohe (A) und mittlere (B) Frequenzbereiche. Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020a).

Da Patienten und Patientinnen mit einer dominanten HS und Varianten in *MYO3A* in der Literatur bisher ausschließlich auch einen progressiven Verlauf aufwiesen, bestätigt die hier beschriebene Familie den Phänotyp einer *MYO3A* assoziierten dominanten HS.

Nach der ES der Index-Patientin III.1, der initialen Analyse von 174 HS-assoziierten Gene und darauffolgender exomweiter Analyse, konnte eine heterozygote missense Variante c.716T>C, p.(Leu239Pro) im *MYO3A*-Gen identifiziert werden, die durch mehrere Vorhersageprogramme als krankheitsverursachend eingestuft wird (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Informationen zur Variante c.716T>C in *MYO3A*.**

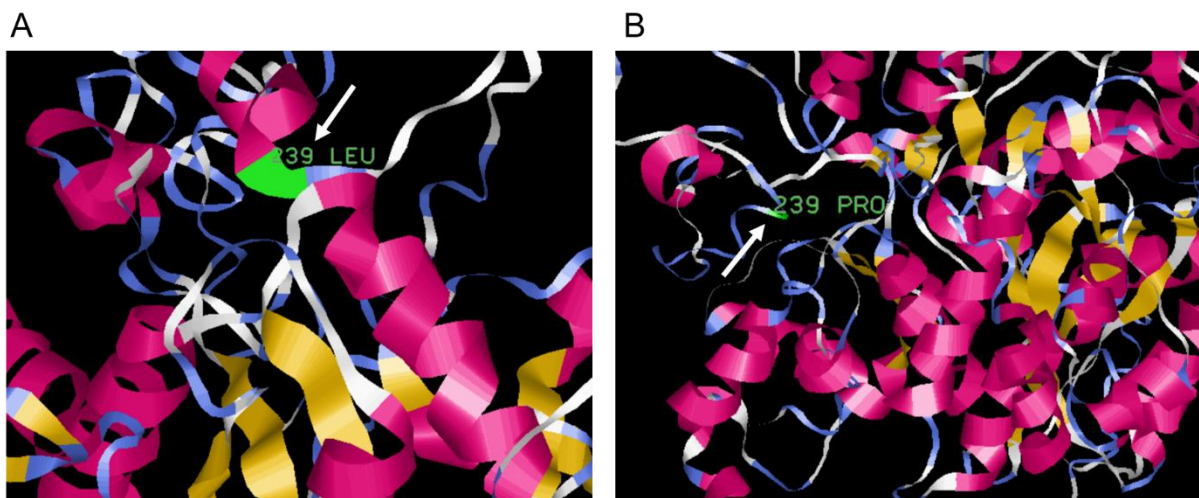
<b>Position und Region</b>	<b>Varianteninformation</b>
Gen	<i>MYO3A</i>
Typus der Variante	missense
Chromosom	10
Exon	8
c. Position (Transkript)	c.716T>C (NM_017433.4, GRCh37)
g. Position	g.26310562T>C
p. Position	p.(Leu239Pro)
Konservierung (AS, Nukleotid)	hochkonserviert (AS, Nukleotid)
Proteindomäne	katalytische Proteindomäne
<b>In silico Vorhersageprogramme</b>	<b>Einstufung</b>
SIFT	Deleterious
MutationTaster	Disease causing
PolyPhen-2	Probably Damaging
<b>Populationsdatenbank</b>	<b>Vorkommen</b>
gnomAD	Variante nicht aufgeführt

Die Variante ist weder in Populationsdatenbanken wie gnomAD annotiert, noch konnte sie laut Human Gene Mutation Database (HGMD) bereits mit einer Erkrankung in Verbindung gebracht werden. Durch die Variante c.716T>C kommt es zum Aminosäure-Austausch von Leucin nach Prolin innerhalb einer hochkonservierten katalytischen Kinase-Domäne des *MYO3A* Proteins. Nach einer Sanger-Sequenzierung aller betroffenen Patientinnen (I.2, II.2, II.3, III.1, III.2, III.4, III.5) und des nicht betroffenen Vaters der Index-Patientin (II.1), konnte die Segregation der Variante innerhalb der Familie validiert und bestätigt werden (Abbildung 15).

Beide bisher beschriebenen dominanten Varianten (Dantas et al. 2018; Grati et al. 2016) in *MYO3A* befinden sich in der Motorkopf-Domäne des kodierten Proteins und führen zu einer Änderung

der ATPase Aktivität des Proteins in den Stereozilien, was in einer nicht-syndromalen, bilateralen und progressiven HS resultiert (Grati et al. 2016). Der Schweregrad und der Beginn der HS innerhalb der Familien ist variabel und liegt zwischen mild und hochgradig mit einem kongenital auftretenden Fall, einem Krankheitsbeginn in der frühen Kindheit oder erst in der dritten Lebensdekade. Auch in der Literatur bekannte homozygote Varianten in *MYO3A*, die für die Ausbildung einer rezessiven HS ursächlich sind, zeigen einen sehr variablen klinischen HS-Phänotyp, mit kongenitalen und spät manifestierenden Fällen und moderatem bis hochgradigen Schweregrad mit einer Verteilung der Varianten über das komplette Gen hinweg (siehe Abbildung 2 und Tabelle S2 in Anlage II).

Da keine kristalline Struktur des MYO3A WT Proteins öffentlich zugänglich war, wurde die Struktur eines Teils des MYO3A WT (p.239Leu) und mutierten Proteins (p.239Pro) durch eine in silico Vorhersage des Onlineservers I-TASSER (Internetquelle 8) bestimmt (siehe „2.10. Protein-Vorhersage mit I-TASSER“). Besonders interessant war hierbei die Position des ausgetauschten Leucins an der Position 239. Das Modell der WT Variante mit dem höchsten C-Score (-1,82), zeigte die Aminosäure Leucin an Position 239 als Teil einer alpha-Helix Struktur (Abbildung 18A).



**Abbildung 18: Protein Vorhersagen für die Position p.239 des MYO3A Proteins durch I-TASSER.** (A) Wildtypisches Modell (C-Score 1,82) mit der Aminosäure Leucin an Position 239. (B) Mutiertes Modell (C-Score -1,93) mit der ausgetauschten Aminosäure Prolin. Rosafarbene Strukturen stellen alpha-Helices dar, beta-Faltblätter sind in gelb verdeutlicht und weiß/blau Bereiche sind nicht Teil einer Sekundärstruktur. Zur Veranschaulichung der Aminosäure-Position 239 wurden unterschiedliche Aufnahmen der Ausrichtung des Modells für (A) und (B) gemacht.

Von allen Modellen mit der Aminosäure Prolin an der Position 239, zeigte das Modell mit dem höchsten C-Score (-1,93) diese Aminosäure nicht als Teil einer Sekundärstruktur (Abbildung 18B). Durch den Vergleich des WT Modells (Leucin) mit dem Aminosäure-Austausch Modell (Prolin) mit den beiden höchsten C-Scores konnte gezeigt werden, dass es beim Einbau von Prolin

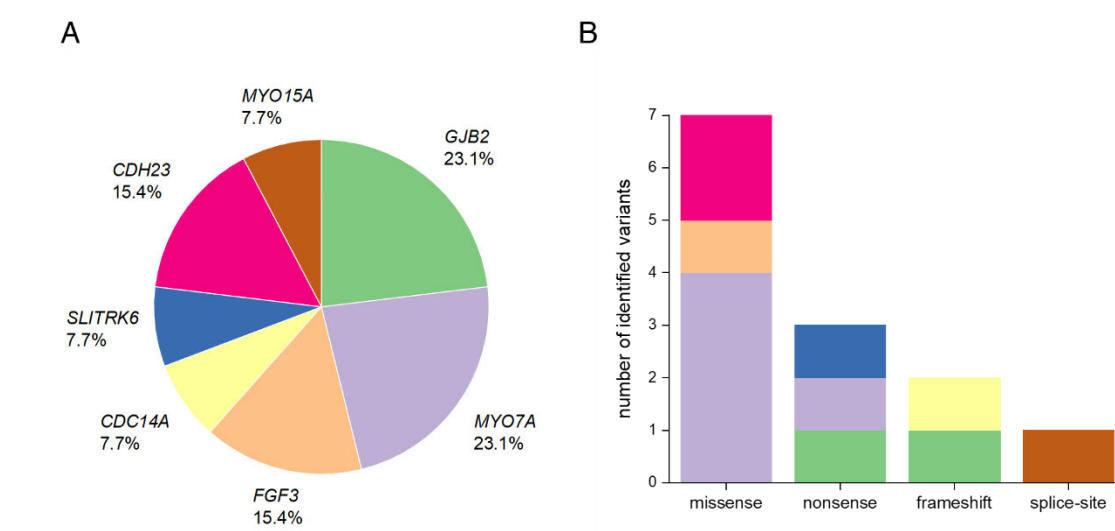
wahrscheinlich zur Brechung der beim WT vorliegenden alpha-Helix kommt (Abbildung 18) (nicht veröffentlichte Daten).

Andere Modelle mit einem niedrigeren C-Score kamen bei den Strukturvorhersagen von WT und mutiertem MYO3A zu unterschiedlichen Einschätzungen. Da es sich bei Prolin aber um eine ringförmige Aminosäure handelt und es oftmals zur Aufbrechung von alpha-Helices durch dessen Einbau kommt (Bajaj et al. 2007; Cordes et al. 2002), könnte dieser Aminosäure-Austausch für eine Strukturänderung des MYO3A Proteins verantwortlich sein. Da keine direkte Testung des Effekts der Aminosäure-Substitution von Leucin nach Prolin in Patientinnen der beschriebenen Familie erfolgte, konnte eine mögliche Auswirkung nur anhand bisher beschriebener Beobachtungen eingeschätzt werden. Dantas et al. konnten beispielsweise nachweisen, dass die heterozygote Variante c.2090T>G, p.(Leu697Trp) in *MYO3A* zu einer Reduzierung der Aktin-abhängigen Initiierung der Protrusion und der Elongations-Aktivität in Stereozilien führt (Dantas et al. 2018). Diesen Effekt begründeten sie durch die Wirkung eines dominant-negativen Effekts, der durch die Ansammlung von wildtypischem und mutiertem Protein auftritt und eine korrekte Proteinfunktion von MYO3A verhindert (Bergendahl et al. 2019). Die hier beschriebene c.716T>C, p.(Leu239Pro) Variante befindet sich in der Kinase-Domäne von MYO3A, welche nachweislich für eine korrekte Regulation und Stabilität der Aktin-Dynamik an Filopodien-Spitzen verantwortlich ist (Quintero et al. 2010). Durch die Annahme eines dominant-negativen Effekt der heterozygoten c.716T>C Variante, könnte es zu einer Einschränkung dieser Funktion durch Anhäufung und Interaktion von wildtypischem und mutiertem Protein kommen und die HS in der hier beschriebenen deutschen Familie erklären.

### 3.3. Genetisches Spektrum von syndromalen und nicht-syndromalen Hörstörungen in pakistanischen Familien (Anlage III)

In Anlage III (Doll et al. 2020c) werden 13 Familien aus Pakistan mit sowohl nicht-syndromalen, als auch syndromalen HS beschrieben. In drei Familien mit einer syndromalen HS konnten zwei bisher nicht veröffentlichte Varianten in den Genen *FGF3* und *SLITRK6* identifiziert werden.

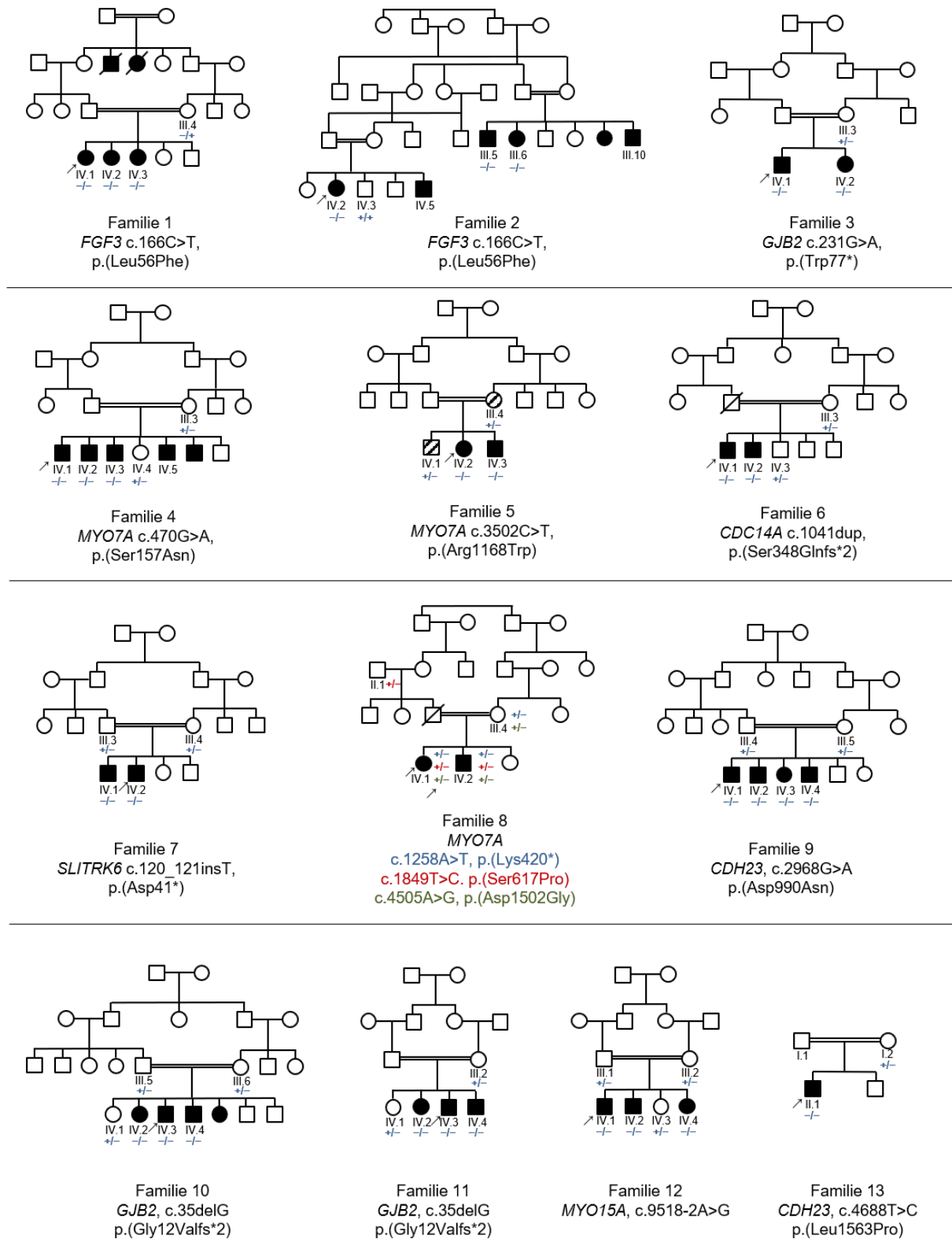
Insgesamt sollte eine pakistanische Kohorte von 21 Familien mit Hilfe der ES eines Index-Patienten aus jeweils einer Familie auf ursächliche Varianten in bereits bekannten und neuen HS-Genen untersucht werden. Nach einer exomweiten Analyse konnten in 13 Familien die genetische Ursache der HS aufgeklärt werden und 13 Varianten in sieben HS-assoziierten Genen identifiziert werden (siehe „Table 1“ in Anlage III). Zwei der 13 Varianten wurden bisher noch nicht in der Literatur beschrieben und machten insgesamt 15,4% aller identifizierten Varianten aus. Die Aufklärungsrate betrug 61,9% und ist vergleichbar mit Studien, die ebenfalls konsanguine Familien untersuchten und eine Aufklärungsrate von 67% zeigten (Sloan-Heggen et al. 2015). Alle Varianten kamen entweder homozygot (92,3%) oder compound heterozygot (7,7%) vor und wurden vorwiegend in autosomal rezessiven HS-Genen detektiert. Insgesamt konnten pathogene und wahrscheinlich pathogene Varianten in folgenden Genen identifiziert werden: *GJB2*, *MYO7A*, *FGF3*, *CDC14A*, *SLITRK6*, *CDH23* und *MYO15A*. Hierbei waren die Gene *GJB2* und *MYO7A* am häufigsten betroffen und machten fast die Hälfte aller betroffenen Gene aus (46,2%) (Abbildung 19A).



**Abbildung 19: Zusammenfassung der betroffenen Gene und die Verteilung von Varianten innerhalb der der pakistanischen Familien.** (A) Prozentanteile der betroffenen Gene in 13 pakistanischen Familien. (B) Anzahl der verschiedenen Varianten-Typen. Der Farbencode stimmt mit den Farben von (A) überein. Die Abbildung wurde übernommen aus (Doll et al. 2020c).

Insgesamt konnten sieben missense Varianten (53,8%), drei nonsense Varianten (23,1%), zwei frameshift Varianten (15,4%) und eine Spleiß Variante (7,7%) gefunden werden (Abbildung 19B) (Abbildung 20).





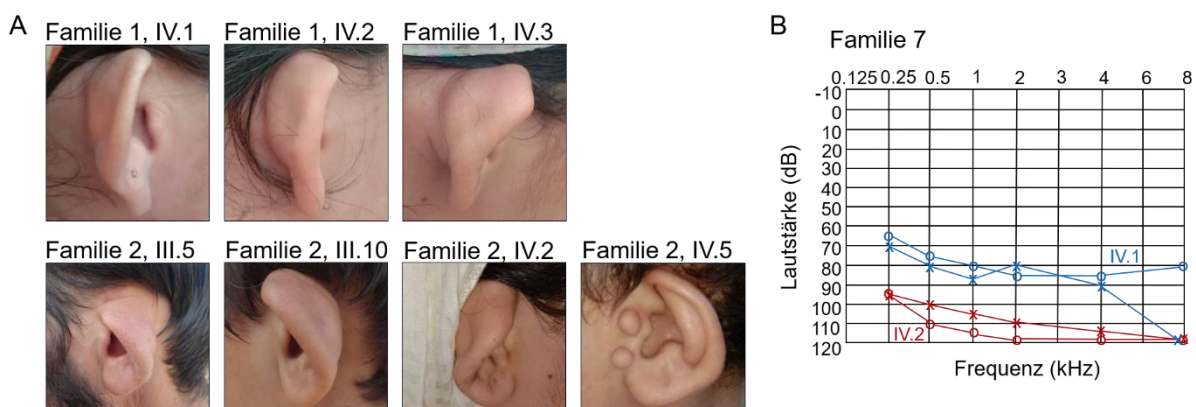
**Abbildung 20: Stammbäume und Segregation aller 13 pakistanischen Familien.** Alle Familien waren konsanguin (Doppellinie). Betroffene Patienten und Patientinnen sind durch ein schwarzes Symbol, und nicht-betroffene durch ein weißes Symbol gekennzeichnet. Exomsequenzierte Index-Patienten und Patientinnen sind durch einen Pfeil markiert. Mutierte Allele zeigen das Symbol “-“ und WT Allele sind durch “+“ gekennzeichnet. Bereits verstorbene Familienmitglieder sind in der Mitte des Symbols durch eine Linie getrennt. Familienmitglieder mit

einer Knochenkrankheit (ohne HS) sind gestreift markiert. Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020c).

## Patienten und Patientinnen mit syndromalen HS

Fünf der 21 Familien zeigten eine syndromale Form der HS (Familie 1, 2, 4, 5, 7), was insgesamt 23,8% der Fälle ausmachte. In zwei Familien (Familie 4, 5) wurden die betroffenen Patienten und Patientinnen mit dem Usher-Syndrom diagnostiziert und zeigten charakteristische, ophthalmologische Auffälligkeiten.

In Familie 1 und 2 konnte eine bisher nicht beschriebene segregierende homozygote missense Variante c.166C>T, p.(Leu56Phe) im Gen *FGF3* (NM\_005247.2) identifiziert werden, die laut ACMG-Richtlinien als wahrscheinlich pathogen eingestuft wurde (Abbildung 20). Betroffene in beiden Familien zeigten eine kongenitale, schwerwiegende HS und sichtbar vorgewölbte Ohrmuscheln („Tassenohr“), mit teilweise erkennbaren Präaurikularanhängen (Familie 2, IV.5) (Abbildung 21A). Bisher bekannte rezessive Varianten in *FGF3* konnten mit dem LAMM-Syndrom in Kombination mit einer kongenitalen HS assoziiert werden (Tekin et al. 2007; Tekin et al. 2008). Hierbei kann es zu unterschiedlich stark ausgeprägten, phänotypischen Merkmalen kommen, die zwischen einem LAMM-Syndrom mit vollständiger Penetranz und mildereren Verlaufsformen variieren (Riazuddin et al. 2011). Familie 1 und 2 weisen einen eher milden Phänotyp auf (HS und leichte Ohrmuschelfehlbildungen) und sind damit mit Familien mit milden syndromalen Merkmalen vergleichbar.



**Abbildung 21: Klinische Fotografien der Familie 1 und 2 und Audiogramm der Familie 7.** (A) Betroffene Patienten und Patientinnen der Familie 1 (IV.1, IV.2, IV.3) und der Familie 2 (III.5, III.10, IV.2, IV.5) mit sichtbar vorgewölbten Ohrmuscheln. Familienmitglied IV.5 der Familie 2 zeigt zusätzlich zwei Präaurikularanhänge am vorderen Ohrmuschelbereich. (B) Reintonaudiogramm des rechten (x) und linken (o) Ohrs von Familienmitglied IV.1 und IV.2 in Familie 7. Die Abbildung wurde geändert nach (Doll et al. 2020c).

Familie 4 und 5 wurden mit dem Usher-Syndrom diagnostiziert. In Familie 4 konnte in betroffenen Familienmitgliedern (IV.1, IV.2, IV.3) eine homozygote pathogene missense Variante c.470G>A, p.(Ser157Asn) (Jaijo et al. 2006) im *MYO7A*-Gen identifiziert werden (Abbildung 20). Eine ophthalmologische Untersuchung in den Patienten IV.3 und IV.5 zeigte eine RP mit einer hohen Kurzsichtigkeit und einem Katarakt (grauer Star) in beiden Augen. Laut in silico Vorhersage Programmen schwächt die Variante und der Aminosäure-Austausch die 5'-Donor Spleiß-Seite an dieser Stelle. Dieser Effekt konnte von Aparisi et al. an nasalen Epithelzellen validiert werden und zeigte ein Exon-Skipping von Exon 5 und ein trunkiertes MYO7A Protein des mutierten Transkripts (Aparisi et al. 2013). Betroffene in Familie 5 (IV.2, IV.3) wurden ebenfalls mit einem Usher-Syndrom diagnostiziert. Eine Untersuchung in Familienmitglied IV.2 zeigte eine Hyperopie, einen Katarakt und eine RP in beiden Augen. Die Mutter (III.4) und der Bruder (IV.1) der Index-Patientin sind von einer Knochen-Erkrankung aber nicht von einer HS betroffen. Die genetische Ursache dieser Erkrankung konnte leider nicht mit Hilfe einer ES identifiziert werden. In der Index-Patientin (IV.2) und deren Bruder (IV.3) mit einer HS wurde eine homozygote pathogene missense Variante c.3502C>T, p.(Arg1168Trp) in *MYO7A* (Le Guedard-Mereuze et al. 2010) als ursächlich identifiziert und mittels Segregationsanalyse in der Familie validiert (Abbildung 20).

Betroffene Familienmitglieder in Familie 7 (IV.1, IV.2) zeigten eine schwerwiegend bis hochgradige HS (Abbildung 21B). Sowohl Patient IV.1 als auch IV.2 zeigte einen myopischen Astigmatismus („compound“) und ein Glaukom (IV.1: 17mmHg; IV.2: 15mmHg). In IV.1 konnte zusätzlich ein Duane-Retraktionssyndrom (DRS) im linken Auge festgestellt werden. IV.2 zeigte zusätzlich Degenerationen an der Makula in beiden Augen. Nach einer ES konnte eine homozygote nonsense Variante c.120\_121insT, p.(Asp41\*) im *SLITRK6*-Gen in IV.1 und IV.2 als ursächlich für die vorliegende syndromale HS identifiziert werden. Beide Eltern zeigten diese Variante nur heterozygot (Abbildung 20). Laut ACMG-Standards wird diese Variante als wahrscheinlich pathogen eingestuft und ist in der Literatur zuvor noch nicht beschrieben worden. Der Einbau eines PTCs an Aminosäureposition 41 (von 841 Aminosäuren) würde ca. 95% des Proteins trunkieren und sehr wahrscheinlich einen NMD zur Folge haben. Rezessive Varianten in *SLITRK6* wurden zuvor mit einer sensorineuralen HS und starker Kurzsichtigkeit assoziiert (Tekin et al. 2013). Patienten und Patientinnen mit einem HS- und Myopie-Syndrom weisen Werte zwischen -6 und -11 Dioptrien auf (Ordonez and Tekin 1993) und sind mit der Kurzsichtigkeit in Familie 7 vergleichbar.

## Patienten und Patientinnen mit nicht-syndromalen HS

Veröffentlichte Studien mit betroffenen konsanguinen Familien aus Pakistan beschrieben die Gene *GJB2*, *SLC26A4*, *MYO15A*, *OTOF*, *CDH23*, *TMC1*, *MYO7A* und *HGF* als häufigste Gene, in denen ursächliche Varianten bei rezessiven HS identifiziert werden konnten (Hilgert et al. 2009; Richard et al. 2019; Schultz et al. 2009). Diese Ergebnisse ließen sich auch bei der hier beschriebenen Patienten- und Patientinnen-Kohorte reproduzieren. So wurden ursächliche Varianten in *GJB2* und *MYO7A* in sechs der 13 Familien ausgemacht (46,2%). In Familie 10 und 11 konnte die pathogene, sehr weit verbreitete kleine Deletion c.35delG, p.(Gly12Valfs\*2) (Zelante et al. 1997) identifiziert werden (Abbildung 20). In Familie 3 segregierte die ebenfalls weit verbreitete pathogene Stopp-Mutation c.231G>A, p.(Trp77\*) (Kelsell et al. 1997) (Abbildung 20). Interessanterweise finden sich Varianten, die sich in bekannten syndromalen Genen wie *MYO7A* (Liu et al. 1997) oder *CDH23* (Bork et al. 2001) befinden, oftmals in pakistanischen Familien, deren Mitglieder von einer HS ohne syndromalen Phänotyp betroffen sind. Im Gegensatz zu Familie 4 und 5 mit einem eindeutigen Usher-Syndrom Phänotyp, zeigte Familie 8 drei verschiedene heterozygote Varianten in *MYO7A* (Tabelle 3) (Abbildung 20).

**Tabelle 3: Drei heterozygote Varianten in *MYO7A* in Familie 8.**

c./p. Position	Familienmitglied (Familie 8)
c.1258A>T, p.(Lys420*) (Cremers et al. 2007) <b>(1)</b>	III.4, IV.1, IV.2
c.1849T>C, p.(Ser617Pro) (Carss et al. 2017) <b>(2)</b>	II.1, IV.1, IV.2
c.4505A>G, p.(Asp1502Gly) (Richard et al. 2019) <b>(3)</b>	III.4, IV.1, IV.2

Eine ophthalmologische Untersuchung der Index-Patientin IV.1 war unauffällig und zeigte keine Abnormalitäten innerhalb der Retina. Im Gegensatz zu beiden Betroffenen IV.1 und IV.2, konnte bei der gesunden Mutter III.4 nur die beiden heterozygoten Varianten **(1)** und **(3)** per Sanger-Sequenzierung nachgewiesen werden. Der Großvater väterlicherseits (II.1) ist Anlageträger der Variante **(2)**. Richard et al. konnten zwei der drei Varianten **(1)**, **(3)** in einer pakistanischen Familie mit rezessiver NSHS identifizieren, wobei sich die dritte dort vorkommende Variante von unserer Variante **(2)** unterscheidet (Richard et al. 2019). Da die Varianten **(1)** und **(3)** beide von der gesunden Mutter und die Variante **(2)** väterlicherseits an beide betroffenen IV.1 und IV.2 vererbt wurden, kann hier ein compound heterozygoter Erbgang der Varianten **(1)** und **(2)** angenommen werden (Abbildung 20). Es bleibt hierbei offen, ob das doppelmutierte Allel der Mutter ein weit verbreitetes Allel in der pakistanischen Bevölkerung ist oder ob Familie 8 und die von Richard et al. beschriebene Familie entfernt verwandt sind.

In den Familien 6, 9, 12 und 13 konnten homozygote segregierende Varianten in den bekannten Genen *CDC14A* (Familie 6), *CDH23* (Familie 9, Familie 13) und *MYO15A* (Familie 12) als krankheitsverursachend identifiziert werden (Abbildung 20). Die Variante c.2968G>A, p.(Asp990Asn) (Bork et al. 2001) in Familie 9 ist mit autosomal rezessivem NSHS (ARNSHS) assoziiert und wurde in Familien aus Süd-Indien mit HS als vermehrt auftretende Variante identifiziert (Vanniya et al. 2018). Die mit einer ARNSHS assoziierte Variante c.4688T>C, p.(Leu1563Pro) (Schultz et al. 2011) in *CDH23* wurde als ursächlich in Familie 13 befunden. Die c.1041dup, p.(Ser348Glnfs\*2) Variante in Familie 6 in *CDC14A* wurde zuvor in Anlage I als pathogen beschrieben (Doll et al. 2020b). Familie 12 zeigte eine segregierende pathogene c.9518-2A>G Spleiß-Variante in *MYO15A*, die im Index-Patienten IV.1 und den betroffenen Geschwistern IV.2 und IV.4 zu einem Verlust der Spleiß-Akzeptor Stelle führt und zuvor in einer pakistanischen Familie mit NSHS beschrieben wurde (Khan et al. 2019).

In allen 13 Familien wurde eine Linkage-Analyse durchgeführt, um Intervalle zu identifizieren, in denen die ursächliche Variante wahrscheinlich lokalisiert ist. In jeder Familie konnte ein mehrere Mb großes Intervall identifiziert werden, welches das jeweils betroffene Gen und die Variante umfasste oder sehr nah am jeweiligen Gen-Lokus lokalisiert war (siehe „Table 3“ in Anlage III). Familie 8 besaß kein Intervall nahe dem *MYO7A*-Gen, was den compound heterozygoten Charakter der hier identifizierten Varianten unterstützte.

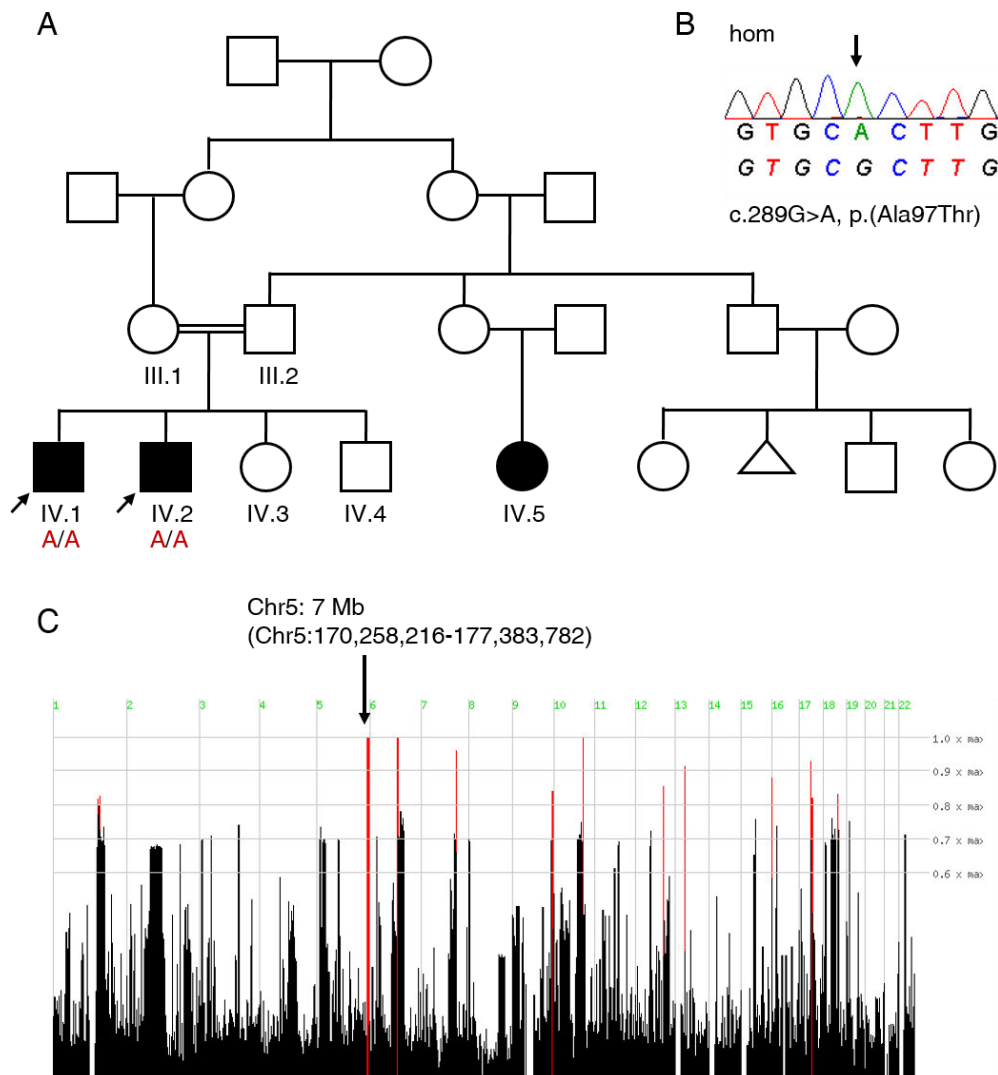
Innerhalb der Studie von 21 pakistanischen Familien mit HS konnte für insgesamt 13 Familien ein genetischer Hintergrund und damit die krankheitsverursachende Variante ausgemacht werden. In acht Familien (38,1%) konnte bisher keine pathogene oder wahrscheinliche pathogene Variante in bekannten HS Genen identifiziert werden. In vier Familien rückten Gene in den Fokus, die bisher nicht mit einer HS assoziiert wurden und als Kandidatengene angesehen werden und in denen eine funktionelle Auswirkung experimentell untersucht wird. Eine Genom-Sequenzierung würde sich in den restlichen vier Familien ohne Hinweis auf ein neues oder bekanntes Gen anbieten, um hier auch tief-intronische und regulatorische Varianten oder mögliche strukturelle Veränderungen zu überprüfen.

#### 4. Ergebnisse und Diskussion von nicht veröffentlichten Arbeiten

Der Verlust von Drebrin hat Auswirkungen auf den zentralen auditorischen Signalweg in der Maus und führt möglicherweise zu einer Sprachverarbeitungsstörung beim Menschen

Im Rahmen dieser Arbeit war es unter anderem das Ziel, in bisher unaufgeklärten iranischen Familien mit einer HS neue Kandidatengene für HS zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Hierfür wurden Familien ausgewählt, die zuvor durch mehrere Analysen, wie klinische Panel (TruSight One, Illumina) oder Exome untersucht wurden und bei denen keine Variante in bisher bekannten HS-Genen gefunden werden konnte. Um die Vielzahl an in Frage kommender Varianten einzugrenzen, wurde für eine exomweite Analyse aller Gene mehr als ein Betroffener oder eine Betroffene Exom-sequenziert und Varianten anschließend per „Sample-Filtering“ in GensearchNGS für eine weitere Analyse ausgewählt. Da die untersuchten iranischen Familien einen konsanguinen Hintergrund hatten und man anhand der betroffenen Patienten und Patientinnen einen autosomal-rezessiven Erbgang vermutete, wurden im ersten Analyse-Durchlauf alle homozygoten und compound heterozygoten Varianten mit Hilfe der ACMG-Richtlinien und diversen Expressionsdatenbanken wie z.B. der Shared Harvard Inner-Ear Laboratory Database (SHIELD) bewertet. Im Anschluss wurden Varianten unklarer Signifikanz oder Varianten, die als wahrscheinlich pathogen eingestuft wurden, per Sanger-Sequenzierung innerhalb der Familien validiert und untersucht. Diese Analyseschritte führten zur Identifizierung einer Variante im *DBN1*-Gen (Tabelle 4). Um die Auswirkungen eines fehlerhaften oder fehlenden Drebrin-Proteins zu verstehen, wurde ein globaler Drebrin-KO an Mäusen mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen der Maus-Cochlea und ABR- und ASSR-Messungen untersucht und mit WT-Mäusen verglichen. Diese Arbeiten wurden in Kollaboration mit dem Tübingen Hearing Research Centre (THRC) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden bisher nicht veröffentlicht und befinden sich momentan in der Manuskript-Vorbereitung.

In einer iranischen, konsanguinen Familie, die ursprünglich mit dem Verdacht auf eine sensorineurale HS und einer milden Intelligenzminderung an uns übermittelt wurde, konnte in beiden Exom-sequenzierten Patienten eine homozygote missense Variante c.289G>A, p.(Ala97Thr) im *DBN1*-Gen (NM\_004395.3) identifiziert werden (Abbildung 22A, B).



**Abbildung 22: Stammbaum, Elektropherogramm und homozygotes Intervall der iranischen Familie. (A)** Stammbaum der Familie und Segregation der c.289G>A, p.(Ala97Thr) Variante. **(B)** Elektropherogramm der homozygoten missense Variante. **(C)** ROHs innerhalb der Familie (rot) in 22 Autosomen und größtes 7 Mb Intervall auf Chromosom 5 (schwarzer Pfeil).

Fünf von sechs Vorhersageprogrammen und ein CADD-Wert von 25,1 stufen diese Variante als krankheitsverursachend („Deleterious“, „Disease causing“, „Damaging“) ein. Der Aminosäureaustausch von Alanin nach Threonin betrifft eine moderat konservierte Aminosäure (GERP-Wert: 3,82) und ist in einer Aktin-bindenden Proteindomäne lokalisiert. In gnomAD ist diese Variante nur 16 x heterozygot mit einer Allel-Frequenz von 0,00008274 bei Gesunden aufgeführt, jedoch nicht homozygot. Für diese Variante gibt es weder in der Iranome noch in der GME Datenbank einen Eintrag (Tabelle 4). Alle weiteren Varianten in beiden betroffenen

Patienten wurden entweder als wahrscheinlich benigne eingestuft oder erklärten nicht den Phänotyp innerhalb der Familie.

**Tabelle 4: Zusammenfassung der Variante c.289G>A, p.(Ala97Thr) in *DBN1*.**

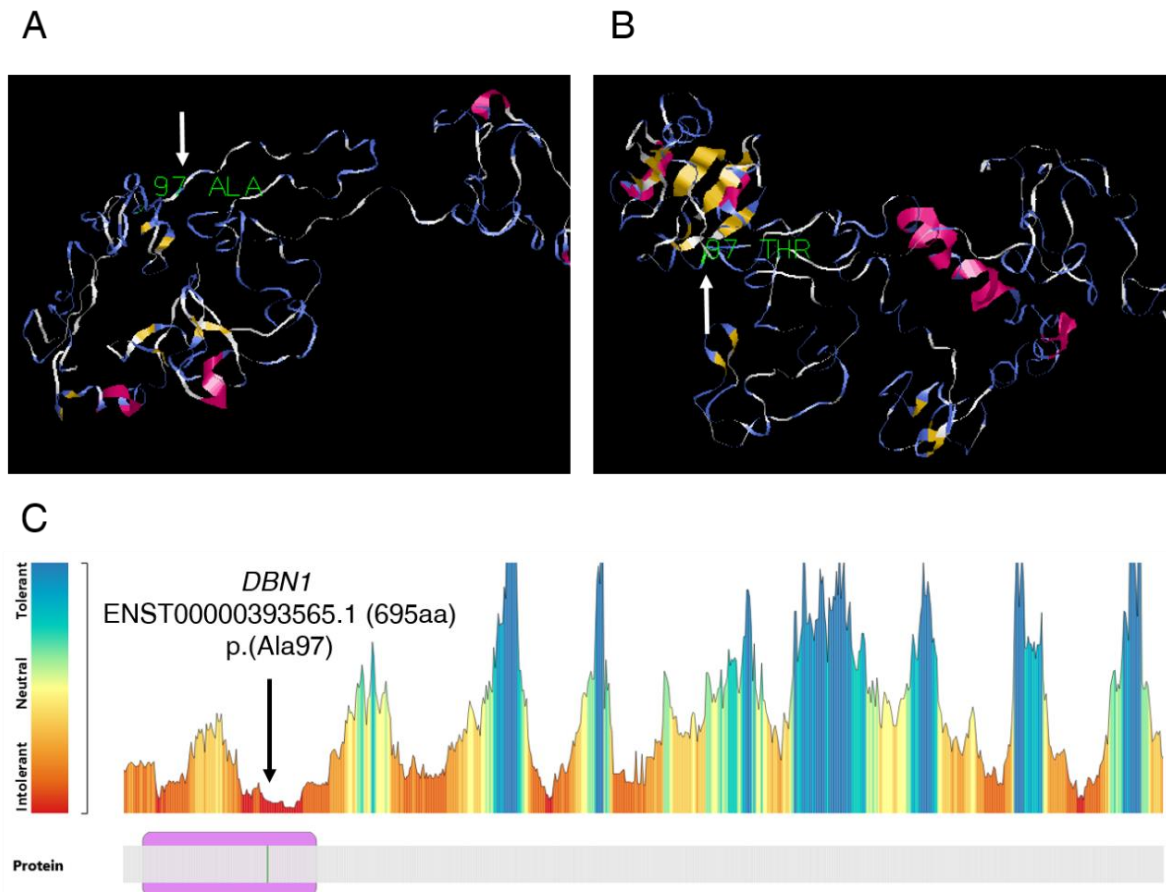
<b>Position und Region</b>	<b>Varianteninformation</b>
Gen	<i>DBN1</i>
Typus der Variante	missense
Chromosom	5
Exon	4
c. Position (Transkript)	c.289G>A (NM_004395.3, GRCh37)
g. Position	g.176894785C>T
p. Position	p.(Ala97Thr)
Konservierung (AS, Nukleotid)	konserviert (AS, Nukleotid)
Proteindomäne	Aktin-bindende Proteindomäne
<b>In silico Vorhersageprogramme</b>	<b>Einstufung</b>
SIFT	Tolerated
MutationTaster	Disease causing
PolyPhen-2	Probably Damaging
fathmm	Damaging
LRT	Deleterious
CADD score	25,1
GERP score	3,82
<b>Populationsdatenbank</b>	<b>Vorkommen</b>
gnomAD	0,00008274 (16 x heterozygot)
Iranome	kein Eintrag
GME	kein Eintrag

Mit beiden betroffenen Patienten der Familie wurde ein Homozygoty mapping durchgeführt und homozygote Bereiche innerhalb der 22 Autosomen bestimmt. Das größte Intervall befand sich auf Chromosom 5 mit den Koordinaten 170.258.216 – 177.383.782 mit 7 Mb und beinhaltet das *DBN1* Gen (Koordinaten: 176.883.609-176.901.402) (Abbildung 22C).

Da auch für das WT Drebrin-Protein keine kristalline Struktur öffentlich zugänglich war, wurde die Struktur eines Teils des Drebrin WT (p.97Ala; Abbildung 23A) und mutierten Proteins (p.97Thr; Abbildung 23B) durch eine in silico Vorhersage des Onlineservers I-TASSER (Internetquelle 8) bestimmt (siehe „2.10. Protein-Vorhersage mit I-TASSER“). Vergleicht man die



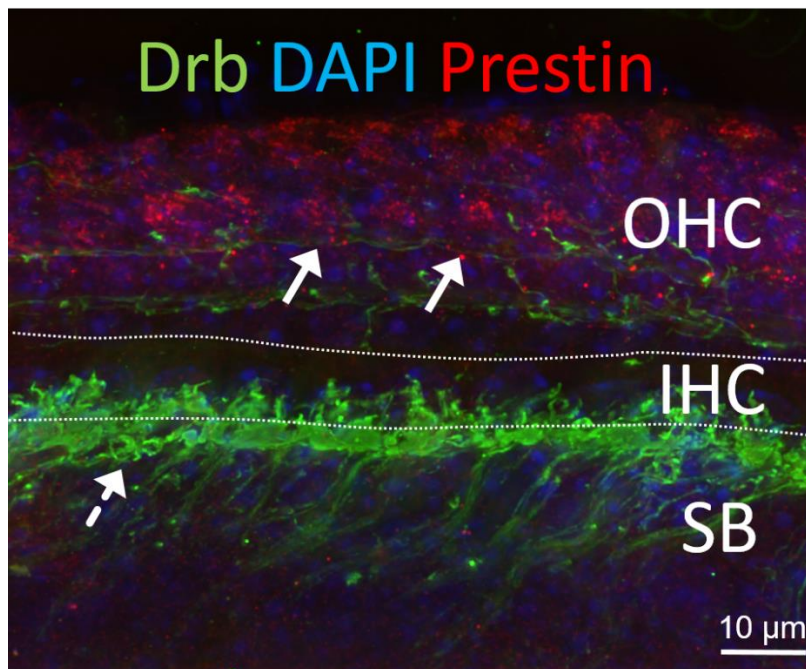
Strukturvorhersagen zwischen den beiden Modellen mit dem jeweils höchsten C-Score, so fällt eine Konformationsänderung der Proteinstruktur im modellierten mutierten Drebrin Protein auf, welche zur Ausbildung eines  $\beta$ -Faltblatts führt (WT C-Score: -3,24; mutiert C-Score: -2,96). In weiteren Modellierungen, welche jedoch alle einen geringeren C-Score und somit eine geringere geschätzte Qualität besaßen, wurde diese Konformationsänderung nicht konsistent vorausgesagt.



**Abbildung 23: Protein-Modellierung von Drebrin mit I-TASSER und gegenüber Varianten intolerante Regionen des *DBN1*-Gens.** (A) Wildtypisches Modell (C-Score -3,24) mit der Aminosäure Alanin an Position 97. (B) Mutiertes Modell (C-Score -2,96) mit der ausgetauschten Aminosäure Threonin. Rosafarbene Strukturen stellen alpha-Helices dar, beta-Faltblätter sind in gelb verdeutlicht und weiß/blau Bereiche sind nicht Teil einer Sekundärstruktur. Die Aufnahmen der beiden Modelle werden hierbei in derselben Ausrichtung gezeigt und im mutierten Modell lässt sich eine Konformationsänderung in Form eines  $\beta$ -Faltblatts erkennen. (C) Bereiche des Drebrin-Proteins, welche gemäß MetaDome (Wiel et al. 2019) intolerant gegenüber Varianten sind, werden in rot dargestellt. Die Region in der sich die nachgewiesene Variante p.(Ala97Thr) (grüne Linie) in der iranischen Familie befindet, ist laut MetaDome (Wiel et al. 2019) höchst intolerant gegenüber Varianten.

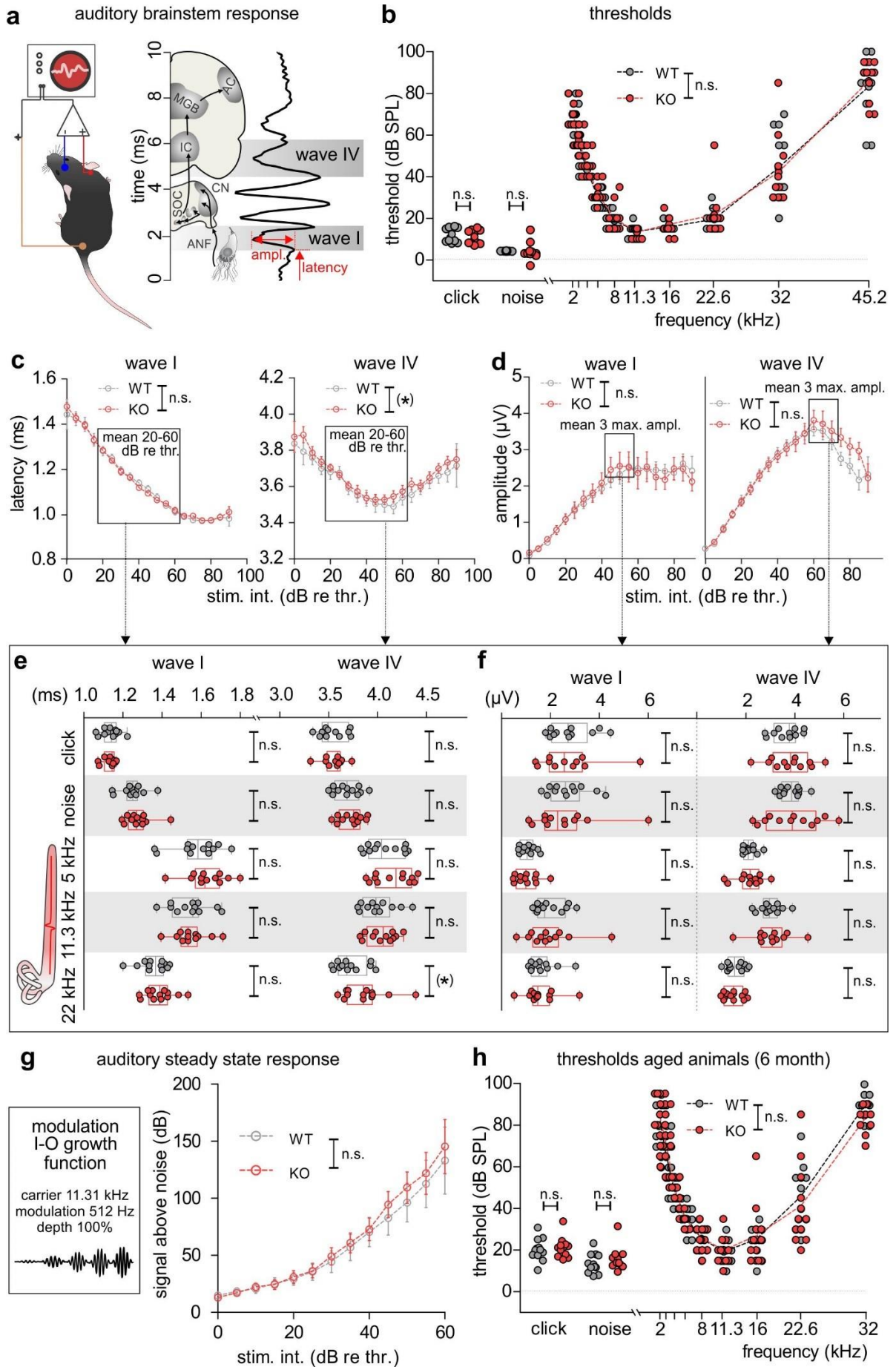
Des Weiteren wird die Region des Drebrin-Proteins, in der die vom Austausch betroffene Aminosäure p.Ala97 lokalisiert ist, laut MetaDome (Internetquelle 9; Wiel et al. (2019)), höchst intolerant gegenüber Varianten eingestuft (Abbildung 23C).

Um die Expression von Drebrin innerhalb auditorischer Strukturen nachzuweisen, wurde eine immunhistochemische Färbung der Cochlea von wildtypischen Mäusen (P7) mit Hilfe eines gegen Drebrin-gerichteten Antikörpers durchgeführt. Nach der Präparation der Cochlea und der immunhistochemischen Färbung konnte eine starke Expression (Drebrin = Drb, grün) an Nervenfasern (Spiralbündel (SB)), die innere Haarzellen (IHC) innervieren, nachgewiesen werden (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung von Drebrin an der Cochlea einer P7-Maus.** Die stärkste Expression von Drebrin (Drb, unterbrochener Pfeil) ist am Übergang von Spiralbündeln (SB) zu inneren Haarzellen (IHC) in der Cochlea von P7-Mäusen erkennbar. Der verwendete Marker Prestin (durchgängiger Pfeil) ist an äußeren Haarzellen (OHC) erkennbar. DAPI färbt Zellkerne in allen drei Bereichen (SB, IHC, OHC) an.

Um die Auswirkungen eines potentiellen Verlusts bzw. eines funktionell eingeschränkten Drebrin-Proteins zu charakterisieren, wurde die Hörfunktion von Mäusen mit globalem Drebrin-KO durch ABR- und ASSR-Messungen bestimmt und mit altersgerechten WT-Mäusen verglichen. Durch die Messung der charakteristischen fünf ABR-Wellen und deren Peaks, die jeweils eine Station innerhalb des auditorischen Signalwegs repräsentieren, können Abweichungen innerhalb der Amplitude (Ausschlag der Schwingung) und der Latenz (Verzögerungszeit) der einzelnen Wellen erfasst werden. Mit Hilfe von subkutan angebrachten Elektroden wurden während der Messung aufgenommene Signale erfasst und auf Unterschiede zwischen WT und *Dbn1* KO-Mäusen hin untersucht (Ruttiger et al. 2017) (Abbildung 25A).



**Abbildung 25: Auditorische Messungen an *Dbn1* KO und WT Mäusen.** (A) Schematische Darstellung des auditorischen Signalwegs. (B) Click- (ungepaarter Student's-*t*-Test,  $t(22)=0,2409$ ,  $p=0,8119$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt), Rauschimpuls- (ungepaarter Student's-*t*-Test,  $t(22)=0,3340$ ,  $p=0,7415$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt), und Reintonfrequenz- (zweifache ANOVA,  $F(1;9)=0,9250$ ,  $p=0,3372$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt) ABRs zeigten keine signifikanten Unterschiede der Schwellenwerte von WT und *Dbn1* KO Mäusen. (C) Die ABR-Latenz der Click-evozierten Welle I zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und *Dbn1* KO Mäusen (zweifache ANOVA,  $F(1;19)=1,746$ ,  $p=0,1873$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt), zeigte aber eine leichte Verlängerung für Welle IV in *Dbn1* KO Mäusen (zweifache ANOVA,  $F(1;19)=3,410$ ,  $p=0,0657$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt). (D) Die ABR-Amplitude der Click-evozierten Welle I (zweifache ANOVA,  $F(1;19)=0,009867$ ,  $p=0,9209$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt) und Welle IV zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und *Dbn1* KO Mäusen in Welle IV (zweifache ANOVA,  $F(1;19)=2,155$ ,  $p=0,1431$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt). (E) Es konnte kein Unterschied für die Latenzen (Mittelwerte) 20-60 dB re thr. zwischen den Genotypen nachgewiesen werden (Welle I: ungepaarter Student's-*t*-Test,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt; Click:  $t(21)=0,3445$ ,  $p=0,7339$ , Noise:  $t(22)=1,108$ ,  $p=0,2798$ , 5 kHz:  $t(22)=1,267$ ,  $p=0,2182$ , 11 kHz:  $t(22)=0,1503$ ,  $p=0,8819$ , 22 kHz:  $t(23)=1,063$ ,  $p=0,2989$ ; Welle IV: ungepaarter Student's-*t*-Test,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt; Click:  $t(21)=0,3803$ ,  $p=0,7075$ , Noise:  $t(22)=0,7237$ ,  $p=0,4769$ , 5 kHz:  $t(22)=1,0515$ ,  $p=0,3209$ , 11 kHz:  $t(22)=0,5024$ ,  $p=0,6204$ . Bei 22 kHz fiel eine Verlängerung der Latenz in Welle IV bei *Dbn1* KO Mäusen auf (ungepaarter Student's-*t*-Test,  $t(22)=1,922$ ,  $p=0,067$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt). (F) Die Amplituden-Stärke zeigte bei keinem Stimulus einen Unterschied in beiden Wellen zwischen den Genotypen (Welle I: ungepaarter Student's-*t*-Test,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt; Click:  $t(21)=0,1690$ ,  $p=0,8674$ , Noise:  $t(22)=0,3432$ ,  $p=0,7347$ , 5 kHz:  $t(22)=0,2003$ ,  $p=0,8431$ , 11 kHz:  $t(22)=0,1214$ ,  $p=0,9045$ , 22kHz:  $t(23)=0,2820$ ,  $p=0,7805$ ; Welle IV: ungepaarter Student's-*t*-Test,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt; Click:  $t(21)=0,5309$ ,  $p=0,6010$ , Noise:  $t(22)=0,1274$ ,  $p=0,8998$ , 5 kHz:  $t(22)=0,05706$ ,  $p=0,9550$ , 11 kHz:  $t(22)=0,1222$ ,  $p=0,9038$ , 22 kHz:  $t(22)=0,6986$ ,  $p=0,4918$ ). (G) *Dbn1* KO Mäuse zeigten keine Veränderung bezüglich der Modulations-Wachstumsfunktion gegenüber WT Mäusen (zweifache ANOVA,  $F(1;14)=0,8962$ ,  $p=0,3445$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt). (H) In älteren WT und *Dbn1* KO Mäusen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied innerhalb von ABR-Schwellenwerten gezeigt werden (Click:  $t(22)=0,4332$ ,  $p=0,6691$ , Noise:  $t(22)=1,010$ ,  $p=0,3235$ , Frequenz: zweifache ANOVA,  $F(1;19)=0,01252$ ,  $p=0,9110$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt). Abkürzungen: ANF=Auditorischer Nerv, CN=Nucleus cochlearis, SOC= Nucleus olivaris superior, IC=Inferior colliculus, MGB= Corpus geniculatum mediale, AC= Auditorischer Cortex, stim. int.=Stimulus-Intensität, re. thr.=relativ zum Schwellenwert, max.=Maximum, I-O= Input/Output, n.s.=nicht signifikant,  $p>0,05$ , (\*)= $p<0,01$ . (B)-(D) und (G)-(H): Mittelwert  $\pm$  SEM. (E)-(F): Boxplot  $\pm$  95%- CI. Die Abbildung wurde von Philine Marchetta (Tübingen) erstellt.

Die gemessenen *Dbn1* KO Mäuse unterschieden sich nach Auswertung der Daten innerhalb der ABR-Schwellenwerte nicht von WT Mäusen, weder für Click (ungepaarter Student's-*t*-Test,  $t(22)=0,2409$ ,  $p=0,8119$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt), noch für Noise (Zweistichproben-*t*-Test,  $t(22)=0,3340$ ,  $p=0,7415$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt) oder Reinton-Frequenz Stimuli zwischen 2 und 32 kHz (zweifache ANOVA,  $F(1;9)=0,9250$ ,  $p=0,3372$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt)

(Abbildung 25B). Da schon feine Abweichungen innerhalb der Hörbahn eine große Auswirkung auf die korrekte zeitliche Verarbeitung haben kann, wurde zusätzlich die Dynamik und Auflösung bestimmt. In Bezug auf die zeitliche auditorische Verarbeitung (Click-Stimuli) wurden Supra-Threshold ABR-Signale für die Latenz für Welle I (auditorischer Nerv, negativer Peak; Abbildung 25A) und Welle IV (Inferior colliculus, negativer Peak; Abbildung 25A) untersucht. Für Welle I konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede für eine Click-evozierte Latenz zwischen *Dbn1* KO und WT Mäusen nachgewiesen werden (zweifache ANOVA,  $F(1;19)=1,746$ ,  $p=0,1873$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt). Für Welle IV war eine Verlängerung der Latenz in *Dbn1* KO Mäusen erkennbar, die jedoch statistisch nicht signifikant war (zweifache ANOVA,  $F(1;19)=3,410$ ,  $p=0,0657$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt) (Abbildung 25C).

Des Weiteren wurden Supra-Threshold ABR Amplituden mittels Peak-zu-Peak Amplituden Wachstumsfunktionen von Welle I (zweifache ANOVA,  $F(1;19)=0,009867$ ,  $p=0,9209$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt) und Welle IV (zweifache ANOVA,  $F(1;19)=2,155$ ,  $p=0,1431$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt) analysiert, um die Prozessierung der Stimuli im auditorischen Nerv und im Colliculus inferior zu untersuchen (Abbildung 25D).

Für eine quantitative Analyse wurde der Mittelwert für Latenzen zwischen 20 und 60 dB (relativ zum Schwellenwert) der Welle I und IV kalkuliert. Hierbei konnte für den Großteil der Stimuli kein Unterschied für *Dbn1* KO und WT Mäusen nachgewiesen werden (Welle I: ungepaarter Student's-*t*-Test,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt; Click:  $t(21)=0,3445$ ,  $p=0,7339$ , Noise:  $t(22)=1,108$ ,  $p=0,2798$ , 5 kHz:  $t(22)=1,267$ ,  $p=0,2182$ , 11 kHz:  $t(22)=0,1503$ ,  $p=0,8819$ , 22 kHz:  $t(23)=1,063$ ,  $p=0,2989$ ; Welle IV: ungepaarter Student's-*t*-Test,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt; Click:  $t(21)=0,3803$ ,  $p=0,7075$ , Noise:  $t(22)=0,7237$ ,  $p=0,4769$ , 5 kHz:  $t(22)=1,0515$ ,  $p=0,3209$ , 11 kHz:  $t(22)=0,5024$ ,  $p=0,6204$ ). Bei 22 kHz konnte eine Verlängerung der Latenz von Welle IV in *Dbn1* KO Mäusen (ungepaarter Student's-*t*-Test,  $t(22)=1,922$ ,  $p=0,067$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt) verzeichnet werden (Abbildung 25E), die jedoch statistisch nicht signifikant war. Auffällig war hierbei außerdem eine erhöhte Variabilität in *Dbn1* KO Mäusen (95%- CI).

Zusätzlich wurde der Mittelwert der drei höchsten Amplituden-Werte für jedes einzelne Ohr für Welle I und Welle IV kalkuliert. Hier konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Welle I: ungepaarter Student's-*t*-Test,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt; Click:  $t(21)=0,1690$ ,  $p=0,8674$ , Noise:  $t(22)=0,3432$ ,  $p=0,7347$ , 5 kHz:  $t(22)=0,2003$ ,  $p=0,8431$ , 11 kHz:  $t(22)=0,1214$ ,  $p=0,9045$ , 22kHz:  $t(23)=0,2820$ ,  $p=0,7805$ ; Welle IV: ungepaarter Student's-*t*-Test,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt; Click:  $t(21)=0,5309$ ,  $p=0,6010$ , Noise:  $t(22)=0,1274$ ,  $p=0,8998$ , 5 kHz:  $t(22)=0,05706$ ,  $p=0,9550$ , 11 kHz:  $t(22)=0,1222$ ,  $p=0,9038$ , 22 kHz:  $t(22)=0,6986$ ,  $p=0,4918$ ) (Abbildung 25F).

Um die zeitliche Sensitivität für die Verarbeitung von Geräuschen zu ermitteln, wurde eine ASSR-Messung an *Dbn1* KO und WT Mäusen durchgeführt. Unter Verwendung der Amplitude einer Träger-Frequenz bei 11,31 kHz, die von einer zweiten, langsameren Frequenz bei 512 Hz (100% Modulationstiefe, Stimulus-Intensität zwischen 0 und 60 dB relativ zum Schwellenwert) moduliert wurde, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WT und *Dbn1* KO Mäusen festgestellt werden (zweifache ANOVA,  $F(1;14)=0,8962$ ,  $p=0,3445$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt) (Abbildung 25G). Um mögliche Alterseffekte zu bestimmen, wurden die ABR-Messungen in den selben Mäusen nach einigen Monaten wiederholt (Alter der Mäuse zu diesem Zeitpunkt: 6,1-6,5 Monate). Es konnten jedoch weder für ABR-Schwellenwerte (Click:  $t(22)=0,4332$ ,  $p=0,6691$ , Noise:  $t(22)=1,010$ ,  $p=0,3235$ , Frequenz: zweifache ANOVA,  $F(1;19)=0,01252$ ,  $p=0,9110$ ,  $n=6/12$  Mäuse/Ohren gesamt), noch für Supra-Threshold Amplituden und Latenz-Analysen und für ASSR (Daten sind hier nicht abgebildet) signifikante Unterschiede zwischen 6 Monaten alten WT und *Dbn1* KO Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 25H).

Zusammenfassend lässt sich in den Analysen der ABR- und ASSR-Messungen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen globalem *Dbn1* KO und WT erkennen. Lediglich die für Welle IV gemessenen Latenzen waren sowohl bei Click-Geräuschen, als auch bei Reintönen mit einer Frequenz von 22 kHz bei *Dbn1* KO Mäusen leicht verlängert im Vergleich zum WT. Auch bei sechs Monate alten Mäusen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen beobachten. Insgesamt konnte also die in den betroffenen Patienten vermutete Hörstörung mittels der nach Willmes et al. (2017) erzeugten, globalen *Dbn1* KO Mäuse nicht in statistisch signifikanten Effekten abgebildet werden. Die leicht verlängerten Latenzen, die in Welle IV des auditorischen Signalwegs beobachtet werden, lassen jedoch einen zentralen Defekt in der Hörbahn der globalen *Dbn1* KO Mäuse vermuten, da hier bereits eine minimale zeitliche Verzögerung einen Einfluss auf die Verarbeitung des ankommenden Signals haben kann.

Des Weiteren sind die unterschiedlichen Auswirkungen auf die synaptische Plastizität im Hippocampus zwischen globalen *Dbn1*-KO Mäusen (Willmes et al. 2017) und den Isoform-spezifischen KO Mäusen (Kojima et al. 2010; Kojima et al. 2016) interessant. Während Kojima et al. (2016) eine Beeinträchtigung der Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus nachweisen konnten, ließen sich diese Effekte in den globalen *Dbn1* KO Mäusen nicht reproduzieren (Willmes et al. 2017). Hierfür diskutieren Willmes et al. (2017) zwei mögliche Ursachen: zum einen könnte die Abwesenheit von *Dbn1* alleine, ohne weitere Faktoren wie Stress, Alter, oder Krankheit, nicht ausreichen um eine synaptische Dysfunktion bei Mäusen hervorzurufen. Zum anderen könnte das sogenannte "genetic buffering", welches vor allem bei Aktin-bindenden Proteinen häufiger

vorkommt, dazu führen, dass der globale Verlust von *Dbn1* durch alternative Signalwege teilweise kompensiert und dessen Funktion somit aufrechterhalten wird (Willmes et al. 2017).

Bei der identifizierten *DBN1* Variante in der hier beschriebenen iranischen Familie handelt es sich allerdings um eine missense Variante, welche sehr wahrscheinlich zu einer funktionellen Änderung des Drebrin Proteins führt und keinen globalen Verlust des Proteins zur Folge hat. Ähnlich wie im Vergleich der globalen *Dbn1* KO Mäuse mit den Isoform-spezifischen *Dbn1* KO Mäusen, könnte also das Vorhandensein eines funktionell veränderten Transkripts eine stärkere Symptomatik zur Folge haben, als ein globaler KO. Zur weiteren Charakterisierung von *DBN1* als Hörstörungs-Gen wäre also eine möglichst exakte Übertragung der missense Mutation in ein Mausmodell, beispielsweise mittels CRISPR/Cas, von besonderem Interesse.

Die untersuchten *Dbn1* KO-Mäuse zeigten keinen klassischen sensorineuralen Hörphänotyp, lieferten jedoch Hinweise auf einen zentralen Hörbahn-Defekt, was mit einer Sprachverarbeitungsstörung im Menschen korrelieren würde. In beiden betroffenen iranischen Patienten konnte mangels klinischer Daten (z.B. Audiogramme) eine sensorineurale HS nicht bestätigt werden. Da bei beiden Patienten zusätzlich eine milde Intelligenzminderung vermutet wird, die oftmals auch Auswirkungen auf die Sprachentwicklung haben kann (McLaughlin 2011), kam der Verdacht eines zentralen Hörbahn-Defekts bei beiden Patienten auf, wofür jedoch keine abschließenden klinischen Nachweise vorlagen. Dieser potenzielle Defekt sollte mit Hilfe von erweiterten Tests, wie z.B. der Sprachaudiometrie auf Verzögerungen innerhalb der Sprachverarbeitung untersucht und bestätigt werden, um die Ergebnisse der ASSR-Messungen an der Maus auch beim Menschen einordnen zu können. Die *Dbn1*-KO Mäuse zeigten zusätzlich zu leicht verlängerten Latenzen in Welle IV auch stereotypische Auffälligkeiten, wie kreisförmige Bewegungen um die eigene Achse im Käfig (engl.: „circling behaviour“) oder ein gesteigertes Aggressionsverhalten. Um diese phänotypischen Auffälligkeiten vergleichen zu können, sind erweiterte klinische Daten der Patienten notwendig und wurden bereits angefordert.

## 5. Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zahlreiche, bisher unbeschriebene Varianten in Familien mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund identifiziert werden und somit das Spektrum angeborener HS mit unterschiedlichster Manifestation (syndromal, nicht-syndromal, dominant, rezessiv) erweitert werden. Die Identifikation einer Variante in *DBN1* und die Untersuchungen an *Dbn1* KO-Mäusen lieferten erste Hinweise auf einen Defekt innerhalb des zentralen auditorischen Signalwegs und der Auswirkung einer Sprachentwicklungsstörung beim Menschen mit einer missense Mutation (c.289G>A) in *DBN1*. Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte das Verständnis über die Funktion und Beteiligung von Drebrin innerhalb auditorischer Strukturen erweitert werden.

Anhand dieser Beispiele wird deutlich, wie wichtig eine funktionelle Charakterisierung einzelner Varianten und die Untersuchung von Kandidatengenen im Tiermodell ist. Die rasante Entwicklung des NGS von klinischem Gen-Panel, über Exom-, bis hin zur Genom-Sequenzierung bedeutet gleichzeitig auch die Anhäufung einer Vielzahl an unbekanntem Sequenz-Varianten und die damit einhergehende Notwendigkeit einer Varianten-Klassifizierung und -Charakterisierung. Die Generierung von großen Datenmengen (engl.: „big data“) und die dadurch erzeugten Herausforderungen, wie die klinische höchst relevante Unterscheidung zwischen Polymorphismus und pathogener Variation, hat ebenso Auswirkungen auf die Diagnostik und die Therapiemöglichkeiten für den einzelnen Patienten oder der Patientin (Vona et al. 2019). Der Effekt dieser Varianten auf das codierte Protein kann zwar durch in silico Anwendungen und der Überprüfung von einer Vielzahl an Populations- und Expressions-Datenbanken bis zu einem gewissen Grad vorhergesagt und eingestuft werden, die endgültige Gewissheit liefert jedoch oftmals erst die Durchführung von in vitro Experimenten oder die Untersuchung eines passenden Tiermodells. Auch hierbei ist es oftmals schwierig, den geeigneten Modellorganismus zu wählen, da viele Gene unterschiedlich hoch über Organismen hin konserviert sind oder unterschiedliche Funktionen besitzen. In den letzten Jahren ist neben der Maus, die knapp 99% aller Gene mit denen im Menschen teilt, auch der Zebrafisch für die funktionelle Untersuchung von HS-Genen vermehrt eingesetzt worden. Bei Betrachtung der neu beschriebenen HS-Gene in den letzten Jahren wird deutlich, dass der Zebrafisch ein exzellentes Tiermodell darstellt und neben dem Mausmodell innerhalb der HS-Forschung eine angesehene Alternative ist (Vona et al. 2020b).

Der Fortschritt der klinischen Diagnostik von HS gelang vor allem auch durch den Übergang von der relativ teuren, arbeitsintensiven und auf eine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation beschränkte Einzelgendiagnostik (z.B. *GJB2*) zur Hochdurchsatzsequenzierung. Trotz enormer genetischer Heterogenität der HS, konnte die Aufklärungsrate damit erhöht und den Patienten und



Patientinnen durch die Identifikation von krankheitsassoziierten Varianten weitere Therapiemöglichkeiten angeboten werden (Vona et al. 2019). Molekulare Therapien wie die Genersatz-Therapie, Antisense-Oligonukleotide, RNA-Interferenz und CRISPR-basierte Methoden wurden in den letzten Jahren vermehrt untersucht, was den Übergang von Grundlagenforschung im Bereich der HS zu klinischen Studien bewirkte (Omichi et al. 2019). Die Genersatz-Therapie zählt hierbei als die geradlinigste Methode und definiert sich durch den Austausch eines defekten Gens durch eine wildtypische Kopie. Eindrückliche Ergebnisse lieferte eine Studie mit der teilweisen Wiederherstellung des Hörvermögens in einem Usher-Syndrom Typ 3A Mausmodell (*CLRN1*) durch den Einsatz eines Adenovirus-assoziierten Kapsids. Mit Hilfe dieses Vektors konnte ebenfalls eine fast vollständige Transduktion von inneren und äußeren Haarzellen in einem Primaten vermittelt werden (Gyorgy et al. 2019).

Die vorliegenden Ergebnisse, der stetige Fortschritt bei der Kandidatengensuche und auch die Entwicklung von Algorithmen für eine Varianten- und Protein-Vorhersage (Jumper et al. 2021) ebnet trotz vielschichtiger Herausforderungen den Weg zur besseren Versorgung von HS Patienten und Patientinnen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abecasis, G. R., et al. (2002), 'Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees', *Nat Genet*, 30 (1), 97-101.
- Adzhubei, I. A., et al. (2010), 'A method and server for predicting damaging missense mutations', *Nat Methods*, 7 (4), 248-9.
- Angeli, S., Lin, X., and Liu, X. Z. (2012), 'Genetics of hearing and deafness', *Anat Rec (Hoboken)*, 295 (11), 1812-29.
- Aparisi, M. J., et al. (2013), 'Study of USH1 splicing variants through minigenes and transcript analysis from nasal epithelial cells', *PLoS One*, 8 (2), e57506.
- Atik, T., et al. (2015), 'Whole-exome sequencing and its impact in hereditary hearing loss', *Genet Res (Camb)*, 97, e4.
- Azaiez, H., et al. (2018), 'Genomic Landscape and Mutational Signatures of Deafness-Associated Genes', *Am J Hum Genet*, 103 (4), 484-97.
- Bajaj, K., et al. (2007), 'Stereochemical criteria for prediction of the effects of proline mutations on protein stability', *PLoS Comput Biol*, 3 (12), e241.
- Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (2016), 'Neuroscience Exploring the Brain ', Fourth Edition, 390.
- Belmadani, A., et al. (1998), 'Subchronic effects of ochratoxin A on young adult rat brain and partial prevention by aspartame, a sweetener', *Hum Exp Toxicol*, 17 (7), 380-6.
- Bergendahl, L. T., et al. (2019), 'The role of protein complexes in human genetic disease', *Protein Sci*, 28 (8), 1400-11.
- Bittles, A. (2001), 'Consanguinity and its relevance to clinical genetics', *Clin Genet*, 60 (2), 89-98.
- Bork, J. M., et al. (2001), 'Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23', *Am J Hum Genet*, 68 (1), 26-37.
- Burkard, R. F., Eggermont, J. J., Don, M. (2007), *The auditory brainstem response* (Lippincott Williams & Wilkins).
- Carss, K. J., et al. (2017), 'Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease', *Am J Hum Genet*, 100 (1), 75-90.
- Chun, S. and Fay, J. C. (2009), 'Identification of deleterious mutations within three human genomes', *Genome Res*, 19 (9), 1553-61.
- Cooper, G. M., et al. (2005), 'Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence', *Genome Res*, 15 (7), 901-13.
- Cordes, F. S., Bright, J. N., and Sansom, M. S. (2002), 'Proline-induced distortions of transmembrane helices', *J Mol Biol*, 323 (5), 951-60.
- Cremers, F. P., et al. (2007), 'Development of a genotyping microarray for Usher syndrome', *J Med Genet*, 44 (2), 153-60.
- Dantas, V. G. L., et al. (2018), 'Characterization of a novel MYO3A missense mutation associated with a dominant form of late onset hearing loss', *Sci Rep*, 8 (1), 8706.
- Davies, R. A. (2016), 'Audiometry and other hearing tests', *Handb Clin Neurol*, 137, 157-76.
- Delmaghani, S., et al. (2016), 'Mutations in CDC14A, Encoding a Protein Phosphatase Involved in Hair Cell Ciliogenesis, Cause Autosomal-Recessive Severe to Profound Deafness', *Am J Hum Genet*, 98 (6), 1266-70.

- Desmet, F. O., et al. (2009), 'Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals', *Nucleic Acids Res*, 37 (9), e67.
- Doll, J., et al. (2020a), 'A novel missense variant in MYO3A is associated with autosomal dominant high-frequency hearing loss in a German family', *Mol Genet Genomic Med*, 8 (8), e1343.
- Doll, J., et al. (2020b), 'Novel Loss-of-Function Variants in CDC14A are Associated with Recessive Sensorineural Hearing Loss in Iranian and Pakistani Patients', *Int J Mol Sci*, 21 (1).
- Doll, J., et al. (2020c), 'Genetic Spectrum of Syndromic and Non-Syndromic Hearing Loss in Pakistani Families', *Genes (Basel)*, 11 (11).
- Dolphin, W. F. and Mountain, D. C. (1992), 'The envelope following response: scalp potentials elicited in the Mongolian gerbil using sinusoidally AM acoustic signals', *Hear Res*, 58 (1), 70-8.
- Dose, A. C. and Burnside, B. (2000), 'Cloning and chromosomal localization of a human class III myosin', *Genomics*, 67 (3), 333-42.
- Eggermont, J. J. (2019), 'Auditory brainstem response', *Handb Clin Neurol*, 160, 451-64.
- Ekdale, E. G. (2016), 'Form and function of the mammalian inner ear', *J Anat*, 228 (2), 324-37.
- Fattahi, Z., et al. (2019), 'Iranome: A catalog of genomic variations in the Iranian population', *Hum Mutat*, 40 (11), 1968-84.
- Friedman, T. B. and Griffith, A. J. (2003), 'Human nonsyndromic sensorineural deafness', *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 4, 341-402.
- Grati, M., et al. (2016), 'MYO3A Causes Human Dominant Deafness and Interacts with Protocadherin 15-CD2 Isoform', *Hum Mutat*, 37 (5), 481-7.
- Green, M. R. and Sambrook, J. (2016), 'Precipitation of DNA with Ethanol', *Cold Spring Harb Protoc*, 2016 (12).
- Gyorgy, B., et al. (2019), 'Gene Transfer with AAV9-PHP.B Rescues Hearing in a Mouse Model of Usher Syndrome 3A and Transduces Hair Cells in a Non-human Primate', *Mol Ther Methods Clin Dev*, 13, 1-13.
- Hamamy, H. (2012), 'Consanguineous marriages : Preconception consultation in primary health care settings', *J Community Genet*, 3 (3), 185-92.
- Heine, P. A. (2004), 'Anatomy of the ear', *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 34 (2), 379-95.
- Hilgert, N., Smith, R. J., and Van Camp, G. (2009), 'Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics?', *Mutat Res*, 681 (2-3), 189-96.
- Hoefsloot, L. H., et al. (2014), 'Genotype phenotype correlations for hearing impairment: approaches to management', *Clin Genet*, 85 (6), 514-23.
- Holley, M. C. (2005), 'Keynote review: The auditory system, hearing loss and potential targets for drug development', *Drug Discov Today*, 10 (19), 1269-82.
- Hosoya, M., et al. (2018), 'Elongated EABR wave latencies observed in patients with auditory neuropathy caused by OTOF mutation', *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 3 (5), 388-93.
- Hussain, R. and Bittles, A. H. (1998), 'The prevalence and demographic characteristics of consanguineous marriages in Pakistan', *J Biosoc Sci*, 30 (2), 261-75.
- Imtiaz, A., et al. (2018), 'CDC14A phosphatase is essential for hearing and male fertility in mouse and human', *Hum Mol Genet*, 27 (5), 780-98.
- Ishikawa, R. (2017), 'Biochemistry of Drebrin and Its Binding to Actin Filaments', *Adv Exp Med Biol*, 1006, 37-47.

- Ishikawa, R., et al. (2007), 'Drebrin attenuates the interaction between actin and myosin-V', *Biochem Biophys Res Commun*, 359 (2), 398-401.
- Jaijo, T., et al. (2006), 'Mutation profile of the MYO7A gene in Spanish patients with Usher syndrome type I', *Hum Mutat*, 27 (3), 290-1.
- Jumper, J., et al. (2021), 'Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold', *Nature*, 596 (7873), 583-89.
- Kandel, E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M. (2012), 'Principles of Neural Science', *McGraw-Hill Education*, 5th Edition, 654-70.
- Karczewski, K.J., et al. (2019), 'Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes', *bioRxiv*.
- Kelsell, D. P., et al. (1997), 'Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness', *Nature*, 387 (6628), 80-3.
- Khan, A., et al. (2019), 'Sequence variants in genes causing nonsyndromic hearing loss in a Pakistani cohort', *Mol Genet Genomic Med*, 7 (9), e917.
- Kircher, M., et al. (2014), 'A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants', *Nat Genet*, 46 (3), 310-5.
- Koffler, T., Ushakov, K., and Avraham, K. B. (2015), 'Genetics of Hearing Loss: Syndromic', *Otolaryngol Clin North Am*, 48 (6), 1041-61.
- Koganezawa, N., et al. (2017), 'The role of drebrin in dendritic spines', *Mol Cell Neurosci*, 84, 85-92.
- Kojima, N., et al. (2010), 'Genetic disruption of the alternative splicing of drebrin gene impairs context-dependent fear learning in adulthood', *Neuroscience*, 165 (1), 138-50.
- Kojima, N., et al. (2016), 'Drebrin A regulates hippocampal LTP and hippocampus-dependent fear learning in adult mice', *Neuroscience*, 324, 218-26.
- Kurosaki, T., Popp, M. W., and Maquat, L. E. (2019), 'Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20 (7), 406-20.
- Kuwada, S., et al. (2002), 'Sources of the scalp-recorded amplitude-modulation following response', *J Am Acad Audiol*, 13 (4), 188-204.
- Kwon, S., et al. (2007), 'Electrophysiologic assessment of central auditory processing by auditory brainstem responses in children with autism spectrum disorders', *J Korean Med Sci*, 22 (4), 656-9.
- Le Guedard-Mereuze, S., et al. (2010), 'Ex vivo splicing assays of mutations at noncanonical positions of splice sites in USHER genes', *Hum Mutat*, 31 (3), 347-55.
- Leger, S. and Brand, M. (2002), 'Fgf8 and Fgf3 are required for zebrafish ear placode induction, maintenance and inner ear patterning', *Mech Dev*, 119 (1), 91-108.
- Liu, X. Z., et al. (1997), 'Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness', *Nat Genet*, 16 (2), 188-90.
- Lopez-Bigas, N., et al. (2005), 'Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease?', *FEBS Lett*, 579 (9), 1900-3.
- Maquat, L. E. (2004), 'Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5 (2), 89-99.
- Matsumoto, Y., et al. (2011), 'Impaired auditory-vestibular functions and behavioral abnormalities of Slitrk6-deficient mice', *PLoS One*, 6 (1), e16497.
- Mazzoli, M., et al. (2003), 'Recommendations for the description of genetic and audiological data for families with nonsyndromic hereditary hearing impairment', *Audiol Med*, 1, 148-50.

- McLaughlin, M. R. (2011), 'Speech and language delay in children', *Am Fam Physician*, 83 (10), 1183-8.
- Metzker, M. L. (2010), 'Sequencing technologies - the next generation', *Nat Rev Genet*, 11 (1), 31-46.
- Mohseni, M., et al. (2020), 'When transcripts matter: delineating between non-syndromic hearing loss DFNB32 and hearing impairment infertile male syndrome (HIIMS)', *J Hum Genet*, 65 (7), 609-17.
- Morton, C. C. and Nance, W. E. (2006), 'Newborn hearing screening--a silent revolution', *N Engl J Med*, 354 (20), 2151-64.
- Ng, P. C. and Henikoff, S. (2006), 'Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function', *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 7, 61-80.
- Omichi, R., et al. (2019), 'Gene therapy for hearing loss', *Hum Mol Genet*, 28 (R1), R65-R79.
- Ordonez, J. L. and Tekin, M. (1993), 'Deafness and Myopia Syndrome', in M. P. Adam, et al. (eds.), *GeneReviews*(R) (Seattle (WA)).
- Oza, A. M., et al. (2018), 'Expert specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss', *Hum Mutat*, 39 (11), 1593-613.
- Pagon, R. A. (1988), 'Retinitis pigmentosa', *Surv Ophthalmol*, 33 (3), 137-77.
- Parker, M. and Bitner-Glindzicz, M. (2015), 'Genetic investigations in childhood deafness', *Arch Dis Child*, 100 (3), 271-8.
- Parthasarathy, A. and Bartlett, E. (2012), 'Two-channel recording of auditory-evoked potentials to detect age-related deficits in temporal processing', *Hear Res*, 289 (1-2), 52-62.
- Pertea, M., Lin, X., and Salzberg, S. L. (2001), 'GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction', *Nucleic Acids Res*, 29 (5), 1185-90.
- Pickles, J. O. (2015), 'Auditory pathways: anatomy and physiology', *Handb Clin Neurol*, 129, 3-25.
- Picton, T. W., et al. (2003), 'Human auditory steady-state responses', *Int J Audiol*, 42 (4), 177-219.
- Pimperton, H. and Kennedy, C. R. (2012), 'The impact of early identification of permanent childhood hearing impairment on speech and language outcomes', *Arch Dis Child*, 97 (7), 648-53.
- Quintero, O. A., et al. (2010), 'Intermolecular autophosphorylation regulates myosin IIIa activity and localization in parallel actin bundles', *J Biol Chem*, 285 (46), 35770-82.
- Reese, M. G., et al. (1997), 'Improved splice site detection in Genie', *J Comput Biol*, 4 (3), 311-23.
- Riazuddin, S., et al. (2011), 'Variable expressivity of FGF3 mutations associated with deafness and LAMM syndrome', *BMC Med Genet*, 12, 21.
- Richard, E. M., et al. (2019), 'Global genetic insight contributed by consanguineous Pakistani families segregating hearing loss', *Hum Mutat*, 40 (1), 53-72.
- Roizen, N. J. (2003), 'Nongenetic causes of hearing loss', *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 9 (2), 120-7.
- Ruttiger, L., Zimmermann, U., and Knipper, M. (2017), 'Biomarkers for Hearing Dysfunction: Facts and Outlook', *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 79 (1-2), 93-111.
- Saadat, M., Ansari-Lari, M., and Farhud, D. D. (2004), 'Consanguineous marriage in Iran', *Ann Hum Biol*, 31 (2), 263-9.
- Sakaguchi, H., et al. (2009), 'Tip links in hair cells: molecular composition and role in hearing loss', *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 17 (5), 388-93.
- Salles, F. T., et al. (2009), 'Myosin IIIa boosts elongation of stereocilia by transporting espin 1 to the plus ends of actin filaments', *Nat Cell Biol*, 11 (4), 443-50.

- Schneider, M. E., et al. (2006), 'A new compartment at stereocilia tips defined by spatial and temporal patterns of myosin IIIa expression', *J Neurosci*, 26 (40), 10243-52.
- Schultz, J. M., et al. (2009), 'Noncoding mutations of HGF are associated with nonsyndromic hearing loss, DFNB39', *Am J Hum Genet*, 85 (1), 25-39.
- Schultz, J. M., et al. (2011), 'Allelic hierarchy of CDH23 mutations causing non-syndromic deafness DFNB12 or Usher syndrome USH1D in compound heterozygotes', *J Med Genet*, 48 (11), 767-75.
- Schwarz, J. M., et al. (2014), 'MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age', *Nat Methods*, 11 (4), 361-2.
- Scott, E. M., et al. (2016), 'Characterization of Greater Middle Eastern genetic variation for enhanced disease gene discovery', *Nat Genet*, 48 (9), 1071-6.
- Seelow, D., et al. (2009), 'HomozygosityMapper--an interactive approach to homozygosity mapping', *Nucleic Acids Res*, 37 (Web Server issue), W593-9.
- Shapiro, M. B. and Senapathy, P. (1987), 'RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression', *Nucleic Acids Res*, 15 (17), 7155-74.
- Sheppard, S., et al. (2018), 'Utility and limitations of exome sequencing as a genetic diagnostic tool for children with hearing loss', *Genet Med*, 20 (12), 1663-76.
- Shihab, H. A., et al. (2013), 'Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models', *Hum Mutat*, 34 (1), 57-65.
- Shirao, T. and Obata, K. (1985), 'Two acidic proteins associated with brain development in chick embryo', *J Neurochem*, 44 (4), 1210-6.
- Shirao, T. and Gonzalez-Billault, C. (2013), 'Actin filaments and microtubules in dendritic spines', *J Neurochem*, 126 (2), 155-64.
- Shirao, T. and Sekino, Y. (2017), 'General Introduction to Drebrin', *Adv Exp Med Biol*, 1006, 3-22.
- Shirao, T., et al. (1988), 'Molecular cloning of a cDNA for the developmentally regulated brain protein, drebrin', *Brain Res*, 464 (1), 71-4.
- Singer, W., et al. (2016), 'Detection of Excitatory and Inhibitory Synapses in the Auditory System Using Fluorescence Immunohistochemistry and High-Resolution Fluorescence Microscopy', *Methods Mol Biol*, 1427, 263-76.
- Sloan-Heggen, C. M., et al. (2016), 'Comprehensive genetic testing in the clinical evaluation of 1119 patients with hearing loss', *Hum Genet*, 135 (4), 441-50.
- Sloan-Heggen, C. M., et al. (2015), 'Characterising the spectrum of autosomal recessive hereditary hearing loss in Iran', *J Med Genet*, 52 (12), 823-9.
- Smith, R. J., Bale, J. F., Jr., and White, K. R. (2005), 'Sensorineural hearing loss in children', *Lancet*, 365 (9462), 879-90.
- Stegmeier, F. and Amon, A. (2004), 'Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation', *Annu Rev Genet*, 38, 203-32.
- Tan, J., et al. (2008), 'Cochlear implants stimulate activity-dependent CREB pathway in the deaf auditory cortex: implications for molecular plasticity induced by neural prosthetic devices', *Cereb Cortex*, 18 (8), 1799-813.
- Tekin, M., et al. (2007), 'Homozygous mutations in fibroblast growth factor 3 are associated with a new form of syndromic deafness characterized by inner ear agenesis, microtia, and microdontia', *Am J Hum Genet*, 80 (2), 338-44.

- Tekin, M., et al. (2008), 'Homozygous FGF3 mutations result in congenital deafness with inner ear agenesis, microtia, and microdontia', *Clin Genet*, 73 (6), 554-65.
- Tekin, M., et al. (2013), 'SLITRK6 mutations cause myopia and deafness in humans and mice', *J Clin Invest*, 123 (5), 2094-102.
- Toda, M., et al. (1993), 'Molecular cloning of cDNA encoding human drebrin E and chromosomal mapping of its gene', *Biochem Biophys Res Commun*, 196 (1), 468-72.
- Toms, M., Pagarkar, W., and Moosajee, M. (2020), 'Usher syndrome: clinical features, molecular genetics and advancing therapeutics', *Ther Adv Ophthalmol*, 12, 2515841420952194.
- Tsang, S. H., Aycinena, A. R. P., and Sharma, T. (2018), 'Ciliopathy: Usher Syndrome', *Adv Exp Med Biol*, 1085, 167-70.
- Untergasser, A., et al. (2012), 'Primer3--new capabilities and interfaces', *Nucleic Acids Res*, 40 (15), e115.
- Vanniya, S. P., et al. (2018), 'Recurrence of reported CDH23 mutations causing DFNB12 in a special cohort of South Indian hearing impaired assortative mating families - an evaluation', *Ann Hum Genet*, 82 (2), 119-26.
- Vona, B., et al. (2020a), 'Non-syndromic hearing loss: clinical and diagnostic challenges', *medizinische genetik*, 32 (2), 117-29.
- Vona, B., et al. (2015), 'Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future', *Mol Cell Probes*, 29 (5), 260-70.
- Vona, B., et al. (2020b), 'Small fish, big prospects: using zebrafish to unravel the mechanisms of hereditary hearing loss', *Hear Res*, 397, 107906.
- Vona, B., et al. (2019), 'A Big Data Perspective on the Genomics of Hearing Loss', *Laryngorhinootologie*, 98 (S 01), S32-S81.
- Walsh, T., et al. (2002), 'From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (11), 7518-23.
- Walsh, V. L., et al. (2011), 'A mouse model for human hearing loss DFNB30 due to loss of function of myosin IIIA', *Mamm Genome*, 22 (3-4), 170-7.
- Wang, G. S. and Cooper, T. A. (2007), 'Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery', *Nat Rev Genet*, 8 (10), 749-61.
- Wangemann, P. (2002), 'K<sup>+</sup> cycling and the endocochlear potential', *Hear Res*, 165 (1-2), 1-9.
- Wiel, L., et al. (2019), 'MetaDome: Pathogenicity analysis of genetic variants through aggregation of homologous human protein domains', *Hum Mutat*, 40 (8), 1030-38.
- Wildeman, M., et al. (2008), 'Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker', *Hum Mutat*, 29 (1), 6-13.
- Willmes, C. G., et al. (2017), 'Investigation of hippocampal synaptic transmission and plasticity in mice deficient in the actin-binding protein Drebrin', *Sci Rep*, 7, 42652.
- Wojciechowski, R. (2011), 'Nature and nurture: the complex genetics of myopia and refractive error', *Clin Genet*, 79 (4), 301-20.
- Wright, T. J. and Mansour, S. L. (2003), 'Fgf3 and Fgf10 are required for mouse otic placode induction', *Development*, 130 (15), 3379-90.
- Wroblewska-Seniuk, K. E., et al. (2017), 'Universal newborn hearing screening: methods and results, obstacles, and benefits', *Pediatr Res*, 81 (3), 415-22.

- Yang, J., et al. (2015), 'The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction', *Nat Methods*, 12 (1), 7-8.
- Yeo, G. and Burge, C. B. (2004), 'Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals', *J Comput Biol*, 11 (2-3), 377-94.
- Zakzouk, S. (2002), 'Consanguinity and hearing impairment in developing countries: a custom to be discouraged', *J Laryngol Otol*, 116 (10), 811-6.
- Zelante, L., et al. (1997), 'Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans', *Hum Mol Genet*, 6 (9), 1605-9.
- Zuccotti, A., et al. (2012), 'Lack of brain-derived neurotrophic factor hampers inner hair cell synapse physiology, but protects against noise-induced hearing loss', *J Neurosci*, 32 (25), 8545-53.



## 7. Internetquellen und Datenbanken

### 7.1. Internetquellen

- (1) “Addressing the rising prevalence of Hearing loss” (WHO 2018), URL:  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss> (aufgerufen am 10.02.2021)
- (2) Illumina, Nextera Rapid Capture Exomes (2015), URL:  
[https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet\\_nextera\\_rapid\\_capture\\_exome.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_nextera_rapid_capture_exome.pdf) (aufgerufen am 15.02.2021)
- (3) Illumina, Illumina Sequencing Technology (2010), URL:  
[https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight\\_sequencing.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf) (aufgerufen am 15.02.2021)
- (4) Illumina, Illumina Two-Channel SBS Technology (2016), URL:  
[http://www.well.ox.ac.uk/ogc/wp-content/uploads/2017/09/techspotlight\\_two-channel\\_sbs.pdf](http://www.well.ox.ac.uk/ogc/wp-content/uploads/2017/09/techspotlight_two-channel_sbs.pdf) (aufgerufen am 15.02.2021)
- (5) Illumina, An introduction to Next-Generation Sequencing Technology (2017), URL:  
[https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf) (aufgerufen am 15.02.2021)
- (6) Hereditary Hearing Loss Homepage, URL: <https://hereditaryhearingloss.org/> (aufgerufen am 18.02.2021)
- (7) HomozygosityMapper, URL: <http://www.homozygositymapper.org/> (aufgerufen am 19.02.2021)
- (8) I-TASSER Online Server, URL: <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> (aufgerufen am 02.03.2021)
- (9) MetaDome Online Server, URL: <https://stuart.radboudumc.nl/metadome/> (aufgerufen am 27.08.2021)

## 7.2. Datenbanken

ClinVar	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</a>
Deafness Variation Database	<a href="https://deafnessvariationdatabase.org/">https://deafnessvariationdatabase.org/</a>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
gnomAD	<a href="https://gnomad.broadinstitute.org/">https://gnomad.broadinstitute.org/</a>
Greater Middle East Variome Project	<a href="http://igm.ucsd.edu/gme/">http://igm.ucsd.edu/gme/</a>
Hereditary Hearing Loss Homepage	<a href="https://hereditaryhearingloss.org/">https://hereditaryhearingloss.org/</a>
HGMD	<a href="https://portal.biobase-international.com">https://portal.biobase-international.com</a>
HomozygosityMapper	<a href="http://www.homozygositymapper.org/">http://www.homozygositymapper.org/</a>
InterVar	<a href="http://wintervar.wglab.org">http://wintervar.wglab.org</a>
Iranome	<a href="http://www.iranome.ir/">http://www.iranome.ir/</a>
OMIM	<a href="https://omim.org/">https://omim.org/</a>
PubMed	<a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
SHIELD	<a href="https://shield.hms.harvard.edu/">https://shield.hms.harvard.edu/</a>

## 8. Verzeichnisse

## 8.1. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Anatomie des menschlichen Ohrs. ....	15
<b>Abbildung 2:</b> Aufbau des menschlichen Innenohrs. ....	16
<b>Abbildung 3:</b> Stationen des zentralen auditorischen Signalwegs im Menschen. ....	17
<b>Abbildung 4:</b> Arbeitsablauf der Exom-Sequenzierung nach Illumina. ....	23
<b>Abbildung 5:</b> Stammbaum und Audiogramm der iranischen Familie. ....	32
<b>Abbildung 6:</b> Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung von c.1421+2T>C. ....	33
<b>Abbildung 7:</b> Spleiß-Vorhersage der c.1421+2T>C Variante durch Alamut Visual 2.10. ....	34
<b>Abbildung 8:</b> Charakterisierung der c.1421+2T>C Variante durch einen Minigene-Ansatz. ....	35
<b>Abbildung 9:</b> Vergleich der Proteinsequenz des wildtypischen und mutierten CDC14A Proteins nach der c.1421+2T>C Variante. ....	36
<b>Abbildung 10:</b> Stammbaum und Audiogramm der pakistanischen Familie. ....	37
<b>Abbildung 11:</b> Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung von c.1041dup. ....	38
<b>Abbildung 12:</b> Quantifizierung von relativen CDC14A mRNA Expressionslevel durch RT-qPCR. ....	39
<b>Abbildung 13:</b> Vergleich der Proteinsequenz des wildtypischen und mutierten CDC14A Proteins nach der c.1041dup Variante. ....	40
<b>Abbildung 14:</b> Zusammenfassung aller bisher beschriebenen Varianten in <i>CDC14A</i> . ....	41
<b>Abbildung 15:</b> Stammbaum der deutschen Familie und Segregation der <i>MYO3A</i> c.716T>C Variante. ....	42
<b>Abbildung 16:</b> Audiogramme der deutschen Familie. ....	43
<b>Abbildung 17:</b> Korrelationsanalyse für mittlere und hohe Frequenzbereiche. ....	43
<b>Abbildung 18:</b> Protein Vorhersagen für die Position p.239 des <i>MYO3A</i> Proteins durch I-TASSER. ....	45
<b>Abbildung 19:</b> Zusammenfassung der betroffenen Gene und die Verteilung von Varianten innerhalb der der pakistanischen Familien. ....	47
<b>Abbildung 20:</b> Stammbäume und Segregation aller 13 pakistanischen Familien. ....	49
<b>Abbildung 21:</b> Klinische Fotografien der Familie 1 und 2 und Audiogramm der Familie 7. ....	50
<b>Abbildung 22:</b> Stammbaum, Elektropherogramm und homozygotes Intervall der iranischen Familie. ....	55
<b>Abbildung 23:</b> Protein-Modellierung von Drebrin mit I-TASSER und gegenüber Varianten intolerante Regionen des <i>DBN1</i> -Gens. ....	57

**Abbildung 24:** Immunhistochemische Färbung von Drebrin an der Cochlea einer P7-Maus. ....58

**Abbildung 25:** Auditorische Messungen an *Dbn1* KO und WT Mäusen.....60

## 8.2. Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Übersicht der verwendeten Anreicherungs-Kits von Illumina in Anlage I, II und III und für beide Probanden aus der nicht veröffentlichten Arbeit. ....26

**Tabelle 2:** Informationen zur Variante c.716T>C in *MYO3A*. ....44

**Tabelle 3:** Drei heterozygote Varianten in *MYO7A* in Familie 8. ....52

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der Variante c.289G>A, p.(Ala97Thr) in *DBN1*. ....56

## 9. Liste der Publikationen und Kongressbeiträge

### 9.1. Erst-Autorenschaften

#### Anlage I

##### **Novel loss-of-function variants in *CDC14A* are associated with recessive sensorineural hearing loss in Iranian and Pakistani patients\***

Julia Doll, Susanne Kolb, Linda Schnapp, Aboufazel Rad, Franz Rüschemdorf, Imran Khan, Abolfazl Adli, Atefeh Hasanzadeh, Daniel Liedtke, Sabine Knaup, Michaela AH Hofrichter, Tobias Müller, Marcus Dittrich, Il-Keun Kong, Hyung-Goo Kim, Thomas Haaf, Barbara Vona.

International Journal of Molecular Sciences (IJMS), January 2020, 21, 311;

doi:10.3390/ijms21010311

Geleisteter Eigenanteil: Verfassung und Finalisierung des Manuskripts, Exom-Analyse, Segregationsanalyse, Homozygotie mapping, RNA-Isolierung, Durchführung und Auswertung der RT-qPCR.

#### Anlage II

##### **A novel missense variant in *MYO3A* is associated with autosomal dominant high-frequency hearing loss in a German family\***

Julia Doll, Michaela AH Hofrichter, Paulina Bahena, Alfred Heihoff, Dennis Segebarth, Tobias Müller, Marcus Dittrich, Thomas Haaf, Barbara Vona

Molecular Genetics & Genomic Medicine (MGGM), May 2020, 8, e1343;

doi:10.1002/mgg3.1343

Geleisteter Eigenanteil: Verfassung und Finalisierung des Manuskripts, Exom-Analyse, Segregationsanalyse, Auswertung der klinischen Daten, beteiligt an Korrelationsanalyse, Protein-Modellierung

Anlage III

**Genetic spectrum of syndromic and non-syndromic hearing loss in Pakistani families\***

Julia Doll, Barbara Vona, Linda Schnapp, Franz Rüschen-dorf, Imran Khan, Saadullah Khan, Noor Muhammad, Sher Alam Khan, Hamed Nawaz, Ajmal Khan, Naseer Ahmad, Susanne M Kolb, Laura Kühlewein, Jonathan DJ Labonne, Lawrence C Layman, Michaela AH Hofrichter, Tabea Röder, Marcus Dittrich, Tobias Müller, Tyler D Graves, Il-Keun Kong, Indrajit Nanda, Hyung-Goo Kim, Thomas Haaf

Genes, November 2020, 11, 1329; doi:10.3390/genes11111329

Geleisteter Eigenanteil: Verfassung und Finalisierung des Manuskripts, Exom-Sequenzierung, Exom-Analyse, Segregationsanalyse

**\*Diese Publikationen sind aus der hier vorgestellten Arbeit hervorgegangen.**

## 9.2. Co-Autorenschaften

### **The conserved p.Arg108 residue in *S1PR2* (DFNB68) is fundamental for proper hearing: evidence from a consanguineous Iranian family**

Michaela AH Hofrichter, Majid Mojarad, Julia Doll, Clemens Grimm, Atiye Eslahi, Neda Sadat Hosseini, Mohsen Rajati, Tobias Müller, Marcus Dittrich, Reza Maroofian, Thomas Haaf, Barbara Vona

BMC Medical Genetics, Mai 2018, 19(1):81; doi:10.1186/s12881-018-0598-5

### **Exome-wide copy number variation analysis identifies a *COL9A1* in frame deletion that is associated with hearing loss**

Michaela AH Hofrichter, Julia Doll, Haleh Habibi, Samaneh Enayati, Mohammad Yahya Vahidi Mehrjardi, Tobias Müller, Marcus Dittrich, Thomas Haaf, Barbara Vona

European Journal of Medical Genetics, Oktober 2019, 62(10):103724; doi:10.1016/j.ejmg.2019.103724

### **Non-syndromic hearing loss: Clinical and Diagnostic challenges**

Barbara Vona, Julia Doll, Michaela AH Hofrichter, Thomas Haaf

Medizinische Genetik, September 2020, 32(2):117–129, doi:10.1515/medgen-2020-2022

### **Small fish, big prospects: using zebrafish to unravel the mechanisms of hereditary hearing loss**

Barbara Vona, Julia Doll, Michaela AH Hofrichter, Thomas Haaf, Gaurav K Varshney

Hearing Research, November 2020, 397:107906; doi:10.1016/j.heares.2020.107906

**Unraveling the genetic complexities of combined retinal dystrophy and hearing impairment**

Paulina Bahena, Narsis Daftarian, Reza Maroofian, Paola Linares, Daniel Villalobos, Mehraban Mirrahimi, Aboufazel Rad, Julia Doll, Michaela AH Hofrichter, Asuman Koparir, Tabea Röder, Seungbin Han, Hamideh Sabbaghi, Hamid Ahmadieh, Hassan Behboudi, Cristina Villanueva-Mendoza, Vianney Cortés-Gonzalez, Rocio Zamora-Ortiz, Susanne Kohl, Laura Kühlewein, Hossein Darvish, Elham Alehabib, Maria de la Luz Arenas-Sordo, Fatemeh Suri, Barbara Vona, Thomas Haaf

Human Genetics, Juni 2021, doi:10.1007/s00439-021-02303-1



### 9.3. Kongressbeiträge

März 2018

**Identification of a patient with CAPOS syndrome and auditory neuropathy**

Julia Doll, Barbara Vona, Michaela AH Hofrichter, Linda Schnapp, Beat Wolf, Tobias Müller, Marcus Dittrich, Anne Läßig, Oliver Bartsch, Thomas Haaf

**Poster-Präsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Münster, Deutschland**

März 2019

**Novel autosomal recessive loss-of-function variants in *CDC14A* are associated with sensorineural hearing loss in Iranian and Pakistani patients**

Julia Doll, Susanne M Kolb, Linda Schnapp, Aboufazel Rad, Michaela AH Hofrichter, Reza Maroofian, Marcus Dittrich, Tobias Müller, Hyung-Goo Kim, Barbara Vona, Thomas Haaf

**Poster-Präsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik (GfH), Weimar, Deutschland**

Juni 2020

**Further evidence of involvement of *CDC14A* in autosomal recessive non-syndromic hearing loss**

Julia Doll, Susanne M Kolb, Linda Schnapp, Aboufazel Rad, Franz Rüschenhof, Imran Khan, Abolfazl Adli, Atefeh Hasanzadeh, Daniel Liedtke, Sabine Knaup, Michaela AH Hofrichter, Tobias Müller, Marcus Dittrich, Il-Keun Kong, Hyung-Goo Kim, Thomas Haaf, Barbara Vona

**Virtuelle Poster-Präsentation, European Society of Human Genetics (ESHG): “Live in your living room”, Berlin, Deutschland**

## 10. Curriculum vitae

## 11. Präsentierte Publikationen

### 11.1. Anlage I

Novel loss-of-function variants in *CDC14A* are associated with recessive sensorineural hearing loss in Iranian and Pakistani patients.



Article

# Novel Loss-of-Function Variants in *CDC14A* are Associated with Recessive Sensorineural Hearing Loss in Iranian and Pakistani Patients

Julia Doll <sup>1</sup>, Susanne Kolb <sup>1</sup>, Linda Schnapp <sup>1</sup>, Abolfazl Rad <sup>2,3</sup> , Franz Rüschemann <sup>4</sup>, Imran Khan <sup>5</sup>, Abolfazl Adli <sup>2</sup>, Atefeh Hasanzadeh <sup>2</sup>, Daniel Liedtke <sup>1</sup> , Sabine Knaup <sup>1</sup>, Michaela AH Hofrichter <sup>1</sup>, Tobias Müller <sup>6</sup>, Marcus Dittrich <sup>1,6</sup>, Il-Keun Kong <sup>7</sup> , Hyung-Goo Kim <sup>8</sup>, Thomas Haaf <sup>1</sup> and Barbara Vona <sup>1,3,\*</sup>

- <sup>1</sup> Institute of Human Genetics, Julius Maximilians University, 97074 Würzburg, Germany; julia.doll@uni-wuerzburg.de (J.D.); susi\_kolb@yahoo.de (S.K.); schnapp-linda@web.de (L.S.); liedtke@biozentrum.uni-wuerzburg.de (D.L.); sabine.knaup@uni-wuerzburg.de (S.K.); michaela.hofrichter@uni-wuerzburg.de (M.A.H.); marcus.dittrich@biozentrum.uni-wuerzburg.de (M.D.); thomas.haaf@uni-wuerzburg.de (T.H.)
- <sup>2</sup> Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar 009851, Iran; rad6790@yahoo.com (A.R.); abolfazl\_adli@yahoo.com (A.A.); atefeh.hasanzadeh5@gmail.com (A.H.)
- <sup>3</sup> Tübingen Hearing Research Centre, Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Eberhard Karls University, 72076 Tübingen, Germany
- <sup>4</sup> Max Delbrück Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association, 13125 Berlin, Germany; fruesch@mdc-berlin.de
- <sup>5</sup> Department of Chemistry, Bacha Khan University, Charsadda, Khyber Pakhtunkhwa 24420, Pakistan; imrangnu@gmail.com
- <sup>6</sup> Institute of Bioinformatics, Julius Maximilians University, 97074 Würzburg, Germany; tobias.mueller@uni-wuerzburg.de
- <sup>7</sup> Department of Animal Science, Division of Applied Life Science (BK21plus), Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea; ikong7900@gmail.com
- <sup>8</sup> Neurological Disorders Research Center, Qatar Biomedical Research Institute, Hamad Bin Khalifa University, Doha 34110, Qatar; hkim@hbku.edu.qa
- \* Correspondence: barbara.vona@uni-tuebingen.de; Tel.: +49-7071-29-88154

Received: 12 December 2019; Accepted: 31 December 2019; Published: 2 January 2020



**Abstract:** *CDC14A* encodes the Cell Division Cycle 14A protein and has been associated with autosomal recessive non-syndromic hearing loss (DFNB32), as well as hearing impairment and infertile male syndrome (HIIMS) since 2016. To date, only nine variants have been associated in patients whose initial symptoms included moderate-to-profound hearing impairment. Exome analysis of Iranian and Pakistani probands who both showed bilateral, sensorineural hearing loss revealed a novel splice site variant (c.1421+2T>C, p.?) that disrupts the splice donor site and a novel frameshift variant (c.1041dup, p.Ser348Glnfs\*2) in the gene *CDC14A*, respectively. To evaluate the pathogenicity of both loss-of-function variants, we analyzed the effects of both variants on the RNA-level. The splice variant was characterized using a minigene assay. Altered expression levels due to the c.1041dup variant were assessed using RT-qPCR. In summary, cDNA analysis confirmed that the c.1421+2T>C variant activates a cryptic splice site, resulting in a truncated transcript (c.1414\_1421del, p.Val472Leufs\*20) and the c.1041dup variant results in a defective transcript that is likely degraded by nonsense-mediated mRNA decay. The present study functionally characterizes two variants and provides further confirmatory evidence that *CDC14A* is associated with a rare form of hereditary hearing loss.

**Keywords:** *CDC14A*; DFNB32; autosomal recessive hearing loss; exome sequencing; splicing; frameshift; non-sense mediated mRNA decay

## 1. Introduction

Hearing loss (HL) is a highly heterogeneous disorder and belongs to one of the most common sensory disorders in humans with a prevalence of 1–2 in 1000 newborns. Approximately 120 genes responsible for non-syndromic HL have been identified so far [1,2]. Since 2016, the gene *CDC14A* (OMIM: \*603504, ENSG00000079335) has been associated with autosomal recessive non-syndromic deafness-32 (DFNB32, OMIM: #608653) [3]. Two years later, it was recognized as causing hearing impairment and infertile male syndrome (HIIMS) [4]. *CDC14A* is located on chromosome 1p21.2 and encodes an evolutionarily conserved protein tyrosine phosphatase (Cell Division Cycle 14A) that is important for centrosome separation and productive cytokinesis during cell division [5]. It is present in the kinocilia of hair cells, as well as basal bodies and sound-transducing stereocilia of the mouse inner ear [3]. Homozygous *Cdc14a* mutant mice showed postnatal degeneration of hair cells but normal length kinocilia. Additionally, degeneration of seminiferous tubules and spermiation defects resulted in infertile male mice [4]. Alternative splicing of *CDC14A* yields six different transcripts, with the largest protein encoding 623 amino acids [3]. To date, only nine homozygous genetic variants in 10 different families with a Middle Eastern background have been associated with hearing impairment (Table 1). Five of these variants with one additional presumed variant also caused male infertility [3,4]. Patients with biallelic *CDC14A* variants present variable degrees of HL that range from moderate to profound in severity [4].

Exome sequencing and gene mapping approaches revealed a homozygous splice variant in a 22.5 Mb homozygous interval on chromosome 1 in two hearing impaired patients from an Iranian family (family 1). Additionally, a homozygous frameshift variant in a 13.6 Mb homozygous interval on chromosome 1 was identified in two Pakistani patients (family 2). Both families had a consanguineous background and both genetic variants were novel. We subsequently evaluated the functional effects of the two variants by assessing aberrant splicing and abnormal gene expression. Our findings widen the spectrum of clinically relevant *CDC14A* mutations that are associated with hearing impairment and reinforce its role within the auditory system.

Table 1. Summary of previously described and newly identified families with homozygous variants in *CDC14A*.

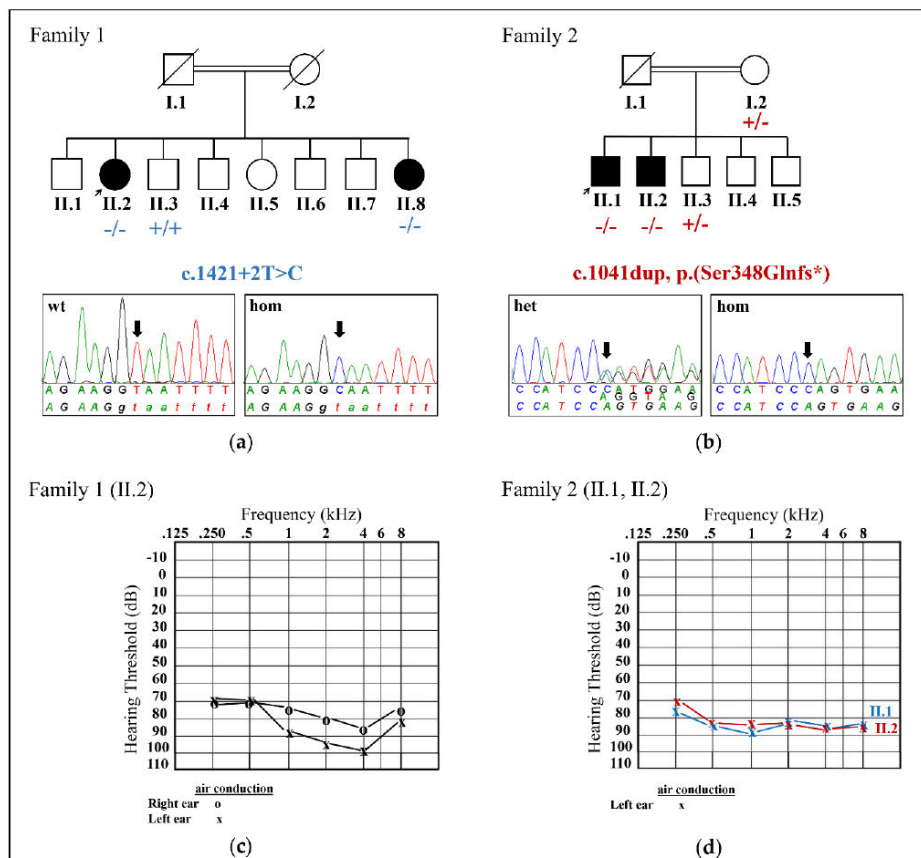
Family ID	Variant	Sex	HL Onset	HL Severity	Male Infertility	Ethnicity	Reference
HLRB11	c.376delT	Male	Congenital	moderate-to-profound, progressive	Yes	Pakistani	Imtiaz et al. [4]
HLAI24	p.Tyr126Ilefs*64 c.417C>G	Female	Congenital	moderate-to-profound, progressive	Yes	Pakistani	Imtiaz et al. [4]
FT1	p.Tyr139Ter c.935G>A	Male	Congenital	moderate-to-severe, progressive	n.a.	Tunisian	Imtiaz et al. [4]
HPK1	p.Arg312Gln c.839-3C>G	Female	Congenital	moderate-to-profound, progressive	Yes	Pakistani	Imtiaz et al. [4]
MORL1	p.? c.934C>G	Male	Congenital	severe-to-profound, progressive	Yes	Iranian	Imtiaz et al. [4]
PKDF539	p.Arg312Gly c.959A>C	Female	Congenital	severe-to-profound, progressive	Yes	Pakistani	Imtiaz et al. [4]
Mauritanian family	p.Gln320Pro c.1015C>T	Male	Congenital	Profound	No	Mauritanian	Delmaghani et al. [3]
PKSN10	p.Arg339Ter c.1033C>T	Male	Congenital	moderate-to-profound, progressive	No	Pakistani	Imtiaz et al. [4]
MORL2	p.Arg345Ter c.1126C>T	Female	Congenital	moderate-to-profound	No	Iranian	Imtiaz et al. [4]
Iranian family	p.Arg376Ter c.1126C>T	Male	Congenital	severe-to-profound	No	Iranian	Delmaghani et al. [3]
Family 1	p.Arg376Ter c.1421+2T>C	Female	Congenital	severe-to-profound	No	Iranian	Present study
Family 2	p.Val472Leufs*20 c.1041dup p.Ser348Glnfs*2	Male	Congenital	Profound	n.a.	Pakistani	Present study

Abbreviations: n.a., not available.

2. Results

2.1. Clinical Presentation

All patients reported congenital, bilateral, sensorineural HL (Figure 1). The affected individuals in family 1 reported severe-to-profound HL (II.2 (asymmetrical HL, age 43), II.8; Figure 1a,c), whereas the affected individuals in family 2 (II.1 (age 29), II.2 (age 27)) showed profound HL (Figure 1b,d). A diagnosis of clinical HL of the older sibling in family 2 (II.2) was secured at 1 year of age after his mother recognized signs of hearing impairment. However, HL was suspected since birth and was the case with his younger sibling. Furthermore, the HL in the proband of family 1 can be described as non-progressive. Information about progression is unavailable from the affected individuals in family 2. There were no complaints of vestibular dysfunction or tinnitus in the affected individuals of family 2. The ophthalmic examination of family 1 was normal apart from mild refractive error. In addition to HL, the affected individuals in family 2 (II.1, II.2) suffer from compound myopic astigmatism. Both affected individuals in family 2 (II.1, II.2) are unmarried and have no children.



**Figure 1.** Pedigree, segregation of the *CDC14A* variants in families 1 and 2 and pure-tone audiometry. (a,b) An Iranian ((a) family 1) and Pakistani family ((b) family 2) with a consanguineous background, each showing two affected individuals ((a), II.2, II.8; (b) II.1, II.2) who are shown in black symbols. Unaffected parents and siblings are shown in white symbols. The probands are marked with arrows. The mutated allele is marked with a "-". The wild type allele is displayed with a "+". Sanger sequence chromatograms of the *CDC14A* *c.1421+2T>C* variant in wild type (WT; (a), left) and homozygous ((a), right) orientation and the *CDC14A* *c.1041dup* variant in heterozygous ((b), left) and homozygous ((b), right) orientation. (c,d) Audiograms showing pure-tone air conduction thresholds of II.2 ((c), family 1) and II.1, II.2 ((d), family 2). Air conduction thresholds for right and left ears are represented with circles and crosses, respectively. Abbreviations: het, heterozygous; hom, homozygous; wt, wild type.

## 2.2. Identification of Two Novel *CDC14A* Variants

Exome sequencing and bioinformatics analysis of 174 HL-associated genes (Supplementary Table S1) ensued using the genomic DNA of the probands of each family. The proband from family 1 (II.2) revealed a homozygous *CDC14A* (NCBI Reference Sequence: NM\_033312.2) splice variant c.1421+2T>C that abolished the donor splice site in intron 14 out of 15 encoded exons and was consistent with segregation analysis within family 1 (Figure 1a). Both affected individuals II.2 and II.8 were homozygous for the c.1421+2T>C variant, while an unaffected brother (II.3) was wild type (WT). A homozygous frameshift variant c.1041dup (p.Ser348Glnfs\*) in exon 11 out of 15 exons was detected in the proband from family 2 (II.1) after exome sequencing and bioinformatics analysis, which also co-segregated within family 2 (Figure 1b). The affected individuals II.1 and II.2 were homozygous for the c.1041dup, while the mother (I.2) and unaffected brother (II.3) were heterozygous. Both variants were absent from all applied population databases. All other variants that were identified by bioinformatics analysis of the in silico gene panel were prioritized as benign or could not explain the HL phenotype. Bioinformatic screening of the gene *CDC14A* in our in-house exome database that includes approximately 330 individuals with HL did not reveal additional potentially pathogenic variants. Copy number variations were excluded in the 174 HL-associated genes.

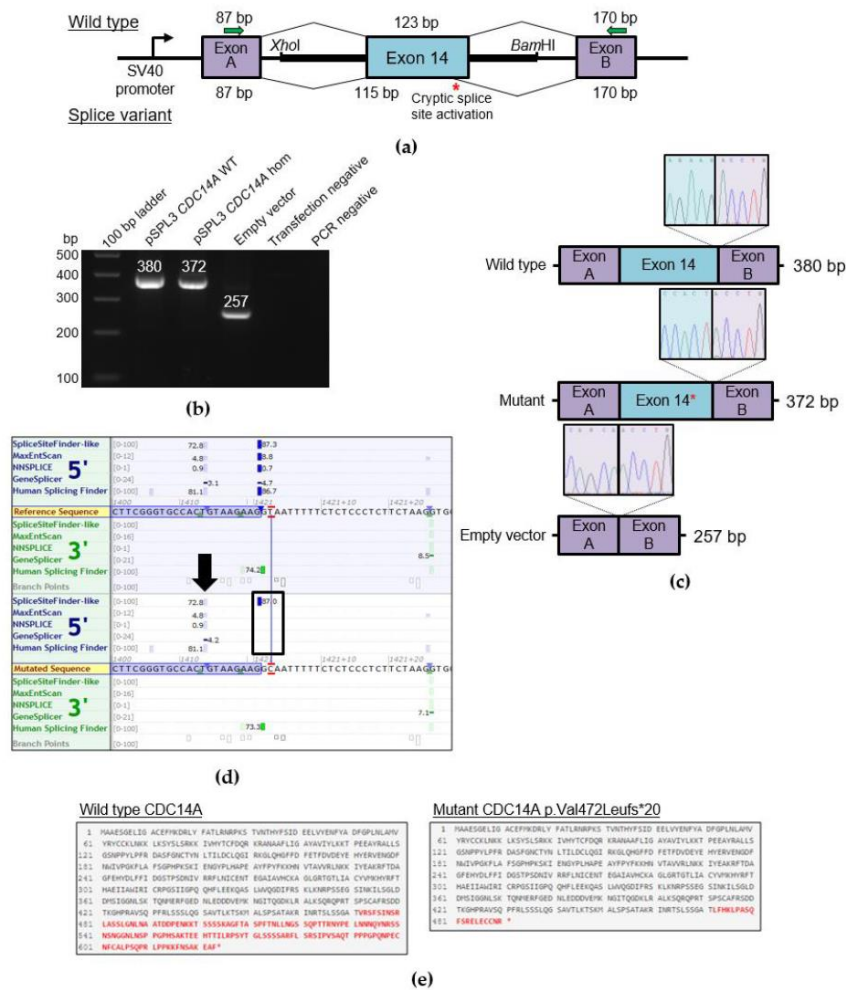
Homozygosity mapping disclosed a 22.5 Mb (chr1: 89,845,926-112,389,040; all subsequent coordinates reported in GRCh37) homozygous interval on chromosome 1 including the *CDC14A* gene (coordinates chr1: 100,810,598-100,985,833) in the Iranian proband (II.2, family 1). The Pakistani family 2 was genotyped with a genome-wide SNP array and homozygosity mapping, identical by descent (IBD), with linkage analysis revealed 15 regions reaching the maximal logarithm of the odds (LOD) score of 1.927. The longest region (chr1: 88,430,037-102,069,696) of 13.6 Mb spans the *CDC14A* gene.

According to four out of five in silico prediction tools (MaxEntScan, NNSplice, GeneSplicer and Human Splicing Finder; Alamut visual, version 2.10), the homozygous c.1421+2T>C variant is predicted to disrupt the exon 14 to intron 14/15 splice donor site (Figure 2d). That loss would likely mediate exon skipping or the use of an alternative cryptic splice site nearby. The duplication c.1041dup (p.Ser348Glnfs\*2) in family 2 leads to a frameshift and the incorporation of a premature stop codon two triplicate bp positions downstream.

## 2.3. Functional Characterization of the Splice Variant c.1421+2T>C

The effect of the splice variant (c.1421+2T>C) in intron 14 was subjected to testing using a minigene assay that included cloning of exon 14, as well as the 5' and 3' flanking intronic sequences into an exon trapping vector (Figure 2a). PCR amplification and Sanger sequencing of WT and mutant cDNA revealed two products of different sizes (Figure 2b,c) that is the result of a truncation of eight nucleotides (GTAAGAAG) in the mutated sequence (372 bp) compared to the WT control (380 bp) due to activation of a cryptic splice site in exon 14 (Figure 2d). The 257 bp sequence in the empty vector control appeared as expected. The eight nucleotide deletion leads to a frameshift c.1414\_1421del, p.Val472Leufs\*20 (NM\_033312.2) and the incorporation of a premature stop codon 20 triplicate bp positions downstream (Figure 2e). Assuming that a protein is translated, it is expected that the full protein would be truncated by approximately 21%.

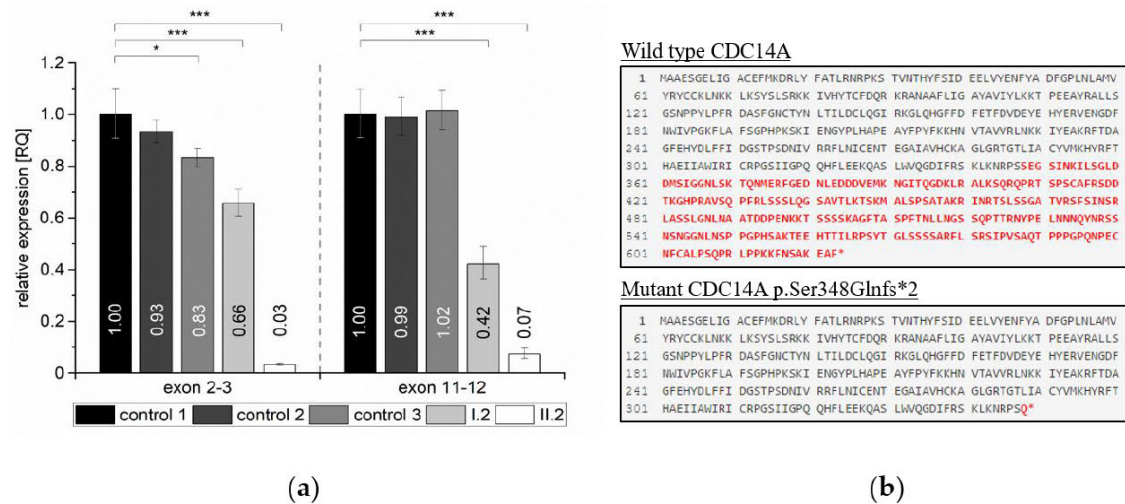




**Figure 2.** Characterization of the *CDC14A* c.1421+2T>C exchange via a minigene assay. **(a)** A schematic of the pSPL3 exon trapping vector with cloned *CDC14A* exon 14 (blue) and flanking sequence containing *XhoI* and *BamHI* restriction sites that was directly amplified from proband and wild type genomic DNA. Exons A and B (purple) originate from the vector. A schematic of the resulting splice products is shown, with the wild type splicing profile (top) and splice variant sequence that activates a cryptic splice site (bottom, red asterisk). The PCR primers that were used to amplify the Exon A splice donor region (SD6) and Exon B splice acceptor region (SA2) are depicted by green arrows. **(b)** Electrophoretic visualization of cDNA RT-PCR products amplified from constructs after transfection into HEK293T cells. Amplicons were resolved on a 1% agarose gel. Wild type splicing (lane: pSPL3 *CDC14A* WT) yields a 380 bp product that constitutes the Exon A, exon 14 and Exon B amplified regions. The homozygous mutant amplicon (lane: pSPL3 *CDC14A* hom) shows a band around 380 bp that, when sequenced, indicates a cryptic splice site activation. The empty vector shows the expected 257 bp product. **(c)** Sequencing electropherograms of the exon 14 5' splice site boundaries for the RT-PCR products for wild type (top), mutant showing cryptic splice site activation (middle) and empty vector (bottom). **(d)** In silico splice prediction tools for the c.1421+2T>C exchange that is marked with red lines visualized with Alamut visual (2.10). The upper panel shows the reference sequence splice scores and the lower panel shows the splice scores for the c.1421+2T>C exchange with multiple in silico prediction tools estimating the loss of the native exon 14 5' donor splice site that is due to the variant (shown with a black box). In the mutant panel, the splice scores of an adjacent cryptic 5' donor site are either unchanged or strengthened and marked with a black arrow. **(e)** Effect of the splice variant on the protein, comparing wild type (top) and the truncated protein resulting from the aberrantly spliced product (visualized with Mutalyzer). The amino acid residues marked in red are those that are altered due to the variant.

2.4. Quantification of Relative Expression Levels for *CDC14A*

To investigate whether the premature termination codon (PTC) induced by the c.1041dup (p.Ser348Glnfs\*2) variant triggers nonsense-mediated mRNA decay (NMD) of *CDC14A* in family 2, we quantified relative *CDC14A* mRNA expression. RT-qPCR was performed utilizing whole blood of homozygous (II.2) and heterozygous (I.2) individuals with two different primer pairs targeting a region at the anterior part of the gene (exon 2–3, NM\_033312.2) and a region posterior to the frameshift variant in exon 11 (exon 11–12, NM\_033312.2). The RT-qPCR analysis showed that the relative expression levels of *CDC14A* were significantly reduced by approximately 99% relative expression for both targeted regions for the homozygous individual (II.2) relative to WT controls. We could observe a difference of 17%–34% (exon 2–3) and approximately 57% (exon 11–12) relative expression for the heterozygous individual I.2 when compared relative to WT controls (Figure 3a). In principle, the introduction of a PTC directly after p.348 would truncate 44% of the amino acid residues in full length *CDC14A* (Figure 3b).



**Figure 3.** Quantification of the RT-qPCR relative expression values for the *CDC14A* c.1041dup variant in homozygous, heterozygous and wild type control individuals. (a) Relative expression levels are shown for exon 2–3 ( $F_{(4, 10)} = 150.69$ ) and exon 11–12 ( $F_{(4, 10)} = 112.84$ ) for the normalized reference samples (wt controls 1, 2 and 3), and both tested individuals in family 2 (I.2, heterozygous for c.1041dup and II.2, homozygous for c.1041dup).  $N = 3$  for each group. Values are represented as means and error bars extend to the respective minimal and maximal values. To improve readability, significant differences are only indicated for pairwise comparisons to the normalized reference sample (wt control 1). See Supplementary Table S2 for extended information. \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.001$ . (b) Effect of the c.1041dup variant on the protein, comparing wild type (top) and the truncated (bottom) protein resulting from the aberrantly spliced product (visualized with Mutalyzer). The amino acid residues marked in red are those that are altered due to the variant.

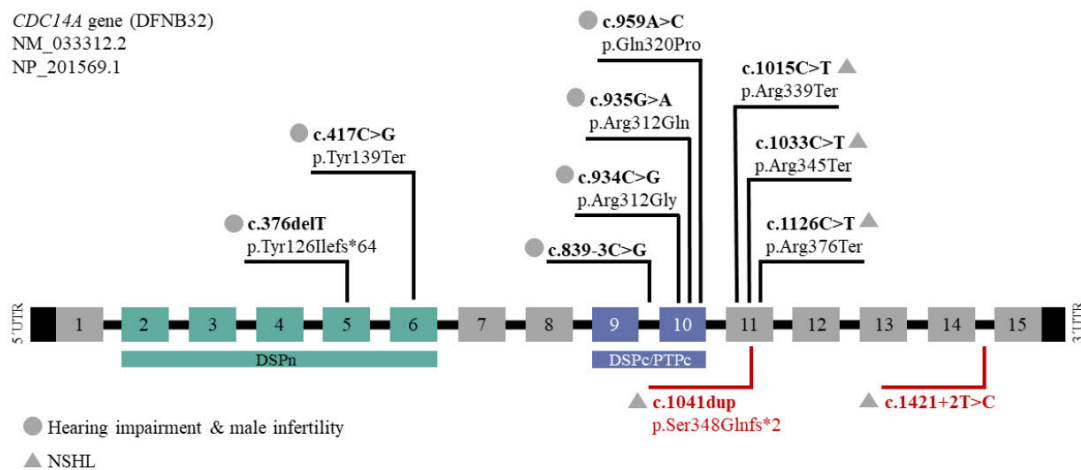
Both variants have been submitted to LOVD v 3.0 under the accession IDs 00269609 and 00269610.

3. Discussion

The *CDC14A* gene encodes a protein that is a member of the highly conserved dual specificity protein-tyrosine phosphatase family existing in a wide range of organisms from yeast to human [6]. Their ability to dephosphorylate serine, threonine, as well as tyrosine residues of different proteins is required for the regulation of essential signaling pathways and biological processes such as protein–protein interactions, cell-cycle progression or apoptosis [7]. The encoded protein *CDC14A* is thought to be involved in the conservation of hair cells in mice and is essential both for normal hearing and male fertility in humans according to nine previously described mutations [3,4]. Furthermore,

in mice, *CDC14A* appears to be advantageous for perinatal survival [4]. The paralogue *CDC14B* may compensate for the loss of some *CDC14A* functions in vivo, but does not compensate for male infertility and hearing impairment with loss of *CDC14A* [4].

Interestingly, there is a noticeable accumulation of pathogenic variants that are responsible for a distinct hearing impaired phenotype in exon 11 (NM\_033312.2) and variants that are responsible for HIIMS in exon 10, containing the core dual-specificity phosphatase domain (DSPc/PTPc; Figure 4). Patients who have thus far been identified with C-terminal truncating variants have moderate-to-profound hearing impairment and males with apparently normal fertility, whereas patients with truncating variants in exons encoding two protein domains (exon 10 encodes part of the DSPc/PTPc domain and exons 5 and 6 encode the dual-specificity phosphatase domain (DSPn)) have HIIMS that includes moderate-to-profound hearing impairment (Figure 4, Table 1). It is thought that transcripts with truncating mutations in exon 11 probably avoid NMD since a short isoform containing only 11 exons (NM\_003672) also exists compared to the longest isoform (NM\_0033312.2) that has 15 exons [4].



**Figure 4.** Summary of all variants in the gene *CDC14A* (NM\_033312.2, NP\_201569.1) that is composed of 15 exons. The dual-specificity phosphatase domain (DSPn) and the core dual-specificity phosphatase domain (DSPc/PTPc) are represented in green and blue bars, respectively. Indicated are the nine previously described mutations (above) and the two newly identified variants in the affected individuals from family 1 and 2 (red, below). The two different phenotypes are indicated with a circle (hearing impairment and male infertility) or triangle (NSHL).

The congenital, sensorineural HL phenotype in our patients that ranged from severe-to-profound in the Iranian family (family 1) and profound in the Pakistani family (family 2) can be compared to already presented HL patients with mutations in *CDC14A* that showed prelingual severe-to-profound deafness (Table 1) [3]. Most of the families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) come from the ‘consanguinity belt’ that includes regions of North Africa, the Middle East and India and uncovered unique signatures of variants in the past [8]. All previously described variants in *CDC14A* were found in families originating from this specific region such as Pakistan, Iran, Tunisia and Mauritania and show a comparable ethnicity as the two families (Iranian and Pakistani) presented in this study.

In contrast to some of the already described HIIMS patients that showed signs of progressive moderate-to-profound HL [4], progression was unreported in our families. Since both affected individuals in family 1 are female and the unmarried status of both affected males in family 2, we cannot exclude that the newly identified *CDC14A* variants would also cause male infertility.

The process of RNA splicing is an essential post-transcriptional mechanism ensuring the correct junction of neighboring exons by the removal of intermediate intronic sequences through the

spliceosome complex [9]. Sequence variants in regions critical for correct splicing can consequently lead to exon-skipping or the activation of cryptic splice sites and are responsible for a variety of different diseases [10]. Cryptic splice sites are normally repressed by stronger splice sites that are located nearby, competing for selection by the splicing machinery [11]. One possible consequence of the splice variant c.1421+2T>C in family 1 that is located in intron 14 was exon skipping of exon 14 due to a disruption and consequently weakening of the splice donor site. We verified the activation of an alternative cryptic splice site located eight base pairs upstream within exon 14 (Figure 2d) that results in a frameshift and a truncated protein (p.Val472Leufs\*20; Figure 2e) instead of exon skipping and postulate that this variant is responsible for the hearing impaired phenotype within this family.

The vital process of eukaryotic gene expression such as transcription, translation and degradation of mRNA and proteins is essential to ensure a functional gene product [12]. There are several different pathways that are involved in the decay of defectively transcribed gene products most often starting with poly(A) shortening by the Ccr4-Not deadenylase complex followed by either 5' end decapping (Dcp1/2) and Xrn1 mediated decay [13] or 3' end exonucleolytic decay mediated by an exosome [14]. Frameshift or nonsense mutations are often responsible for NMD, a crucial process that prevents the production of truncated or potentially toxic dominant-negative proteins [15]. The c.1041dup frameshift variant in family 2 is responsible for the incorporation of a premature stop-codon likely resulting in a truncated transcript. If translated, over >40% of the transcript would be missing that is likely degraded by NMD. We could confirm significantly decreased relative *CDC14A* expression levels for both the unaffected heterozygous and the affected homozygous individual including both the anterior and the posterior part of the mRNA transcript (Figure 3a). Since we only investigated total mRNA levels isolated from whole blood, targeting distinct transcripts of the *CDC14A* gene, we cannot rule out the possibility of compensatory mechanisms such as upregulation of different gene transcripts in other human tissues [16]. Nevertheless, we have experimentally shown that the truncated *CDC14A* product by the c.1041dup frameshift variant is likely targeted by the mechanism of NMD resulting in insufficient levels of functional transcript for the homozygous proband (Figure 3).

Both variants are anticipated to produce a loss-of-function, either through possible truncated protein from the c.1421+2T>C variant, or NMD that is anticipated to occur as a result of the c.1041dup variant.

In order to distinguish between a regular stop codon and a PTC, the NMD machinery recognizes the position of the PTC within newly produced mRNAs. If the PTC is located at least 50–55 nucleotides upstream of the 3'-most exon–exon junction, degradation by the NMD machinery is likely induced to avoid unfavorable transcripts [17]. Since the PTC of the *CDC14A* frameshift variant c.1041dup is located in exon 11 and is followed by a 3' exon–exon junction more than 55 nucleotides downstream, NMD is likely triggered. Our results showing reduced relative expression levels for *CDC14A* in patients also confirmed this hypothesis. The PTC that originates from the aberrantly spliced transcript (p.Val472Leufs\*20) due to the c.1421+2T>C variant is located in the last exon (exon 15) of *CDC14A*. Since there is no 3' exon–exon junction further downstream of the PTC, a transcript is likely produced to subsequently escape the NMD machinery.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Patient Recruitment and Clinical Assessment

Informed written consent was obtained from the families. This study was performed under the tenets of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Commission of the University of Würzburg (46/15, approval date: 31 March 2015).

We recruited an Iranian (family 1) and Pakistani (family 2) family who both showed a history of parental consanguinity for a total of four affected individuals, as well as unaffected parents and siblings (Figure 1a,b). The affected individuals (family 1: II.2, II.8; family 2: II.1, II.2) underwent audiological assessment and were tested by pure-tone audiometry adhering to recommendations described in

Mazzoli et al. (2003) [18]. Ophthalmic examination of the proband in family 1, as well as both affected individuals from family 2 was performed.

#### 4.2. Exome Sequencing

Genomic DNA (gDNA) from the two affected individuals was extracted from whole blood. Diagnostic screening of *GJB2*, the most frequently implicated gene in non-syndromic hearing loss, excluded putative pathogenic variants. gDNA of the probands were exome sequenced. Exome library preparation was performed with the TruSeq Exome Enrichment (family 1) and the Nextera Rapid Capture Exome (family 2) kits (Illumina, San Diego, CA, USA) according to manufacturer's instructions and paired-end sequenced (2 × 76 bp) with the NextSeq500 sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA). A v2 high output reagent kit (Illumina) was used and the data were aligned to the human reference genome GRCh37 (hg19).

#### 4.3. In Silico Variant Analysis

Data analysis was performed with GensearchNGS software (PhenoSystems SA, Wallonia, Belgium) and an in-house bioinformatics pipeline. Variant filtering was done with a minor allele frequency <0.01 and alternate allele present at >20%. The pipeline data were analyzed based on the GATK toolkit [19] and BWA based read alignment to the human genome (hg19) following GATK best practice recommendations [20,21]. Quality filtering was performed based on the VQSLOD score. Data from the Greater Middle East Variome Project [22], the Iranome Database [23] and gnomAD [24] were used for population-specific filtering. Variant analysis was done with the use of PolyPhen-2 [25], SIFT [26] and MutationTaster [27], as well as variant information annotated in the Deafness Variation Database (DVD) [28]. Exome CNV analysis was performed using the eXome Hidden MarkovModel (XHMM, version 1.0) approach [29]. Splice-site variants were classified on the basis of in-silico splice predictors such as SpliceSiteFinder-like [30], MaxEntScan [31], NNSPLICE [32], Genesplicer [33] and Human Splicing Finder [34]. Homozygosity mapping was done and visualized with HomozygosityMapper [35]. Mutalyzer was used to assess the effect of the variants on the protein in silico [36].

#### 4.4. Gene Mapping Approaches

The exome data of the proband from family 1 was subjected to homozygosity mapping that was performed using HomozygosityMapper [35]. The gDNA from individuals (I.2, II.1, II.2, II.3) from family 2 were subjected to genome-wide genotyping using the Infinium HumanCore-24 v1.0 Bead Chip (Illumina) using manufacturer's protocols.

Data conversion to linkage format files and quality control (QC) was managed with ALOHOMORA software [37]. Up to 258,000 biallelic SNPs after QC were used for linkage analysis with Merlin [38]. Linkage analysis was done with a recessive genetic model with complete penetrance, a rare disease allele frequency of 0.001 and a pedigree with a consanguinity loop (cousin marriage of parents I.1 and I.2). As genetic coordinates, we used the physical position (1 cM  $\Leftrightarrow$  1 Mb, hg19). Linkage regions where the LOD score reached the maximal value of 1.927 for this family, indicate homozygous (autozygous) stretches for the two affected individuals (II.1 and II.2) and where the unaffected brother (II.3) is not homozygous. Linkage analysis was repeated with a linkage disequilibrium (LD) reduced marker set to verify that LOD score peaks are not inflated by LD.

Genomic coordinates are reported using the GRCh37 human genome assembly.

#### 4.5. Validation of The *CDC14A* Variants and Segregation Analysis

Validation of the *CDC14A* frameshift and splice variants was carried out by Sanger sequencing from PCR-amplified gDNA from the probands and available family members using standard cycling conditions and primers (F: 5'-TCCGCAAAGATTAAGTTCATCCC-3' and R: 5'-TCTGGATCACACTAAGCCAGC-3') to validate the c.1421+2T>C and (F:

5'-CTGAGGACTTCAGCAGTCAA-3' and R: 5'-AACTTGGTACTCGTGGCATC-3') c.1041dup variants (Metabion, Martinsried, Germany). Primers were designed with Primer3 [39]. The amplicons were sequenced with an ABI 3130xl 16-capillary sequencer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and the data were analyzed with Gensearch 4.3 software (PhenoSystems SA, Wallonia, Belgium).

#### 4.6. Minigene Assay

To test the in silico splice predictions, an in vitro splicing assay was carried out using a modified protocol from Tompson and Young [40]. Briefly, wild-type and mutant *CDC14A* exon 14 (123 bp) were directly PCR amplified from a control individual and the proband with specific primers containing an additional *XhoI* and *BamHI* restriction site (forward primer with *XhoI* restriction site: 5'-aattctcgagCCGCTGCTGTCATCACTATTA-3' and reverse primer with *BamHI* restriction site: 5'-attgatccACCATTCCTCCACAACCTT-3'). The PCR reaction amplified the entire exon 14 sequence plus an additional 133 bp (5') and 193 bp (3') from the flanking intronic regions. After PCR amplification, PCR clean-up, restriction enzyme digestion of the PCR fragments and pSPL3 exon trapping vector was performed prior to cloning of exon A and exon B fragments into the linearized pSPL3-vector and DH5 $\alpha$  competent cells (NEB 5-alpha, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA. The WT and mutant-containing vector sequences were Sanger sequence confirmed.

Vectors containing either homozygous or WT sequence were transfected into HEK 293T cells (ATCC) at a density of  $2 \times 10^5$  cells per mL. Of the respective pSPL3 vector 2  $\mu$ g was transiently transfected using 6  $\mu$ L of FuGENE 6 Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA. An empty vector and negative transfection reactions were included as controls. The transfected cells were harvested 24 h after transfection for RNA extraction. Total RNA was prepared using miRNAeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). Approximately 1  $\mu$ g of RNA was reverse transcribed using a High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's protocols. The cDNA was PCR amplified using vector-specific SD6 forward (5'-TCTGAGTCACCTGGACAACC-3') and reverse SA2 (5'-ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC-3') primers. The amplified fragments were visualized on a 1% agarose gel and subsequently Sanger sequenced.

#### 4.7. Expression Analysis Using Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR)

To examine altered expression levels in *CDC14A* due to the loss-of-function variant in family 2, total RNA was extracted from whole blood of probands I.2 and II.2 (family 2) using PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. cDNA was synthesized using High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems). We performed RT-qPCR using a ViiA7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Each sample and primer pair was analyzed in triplicates on a single qPCR plate using HOT FIRE Pol Eva Green Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Estonia). Relative expression levels were calculated using the QuantStudio Real-Time PCS Software v1.3 by  $\Delta\Delta C_t$  method. Control samples were either used as reference samples or for relative expression comparison. Combined cT values of housekeeping genes *GAPDH*, *IPO8* and *HPRT1* were used for endogenous cDNA controls. Used primer pairs are listed in Table 2.

**Table 2.** Primer sequences for RT-qPCR.

Exon	5'-3' Primer Sequence (Forward)	5'-3' Primer Sequence (Reverse)
<i>CDC14A</i> Ex2_3	CCCACTATTTCTCCATCGATGA	GTACACCATTGCCAAGTTCAG
<i>CDC14A</i> Ex11_12	TGGCCTAGATGATATGCTATTG	CTTCTAAGTTATCCTCTCCAAATC
<i>GAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<i>IPO8</i>	CGAGCTAGATCTTGCTGGGT	CGCTAATTCAACGGCATTCTT
<i>HPRT1</i>	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

#### 4.8. Statistical Data Collection

The results of RT-qPCR are represented as relative quantification (RQ) means. Statistical analysis was performed using OriginPro 2018G. Normality (Shapiro–Wilk) and equality of variances (Levene’s) were calculated and a one-way ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons was subsequently conducted. A *p*-value of less than 0.05 is considered statistically significant.

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/1/311/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, T.H., B.V.; Manuscript drafting, J.D., T.H., B.V.; Ascertained families and obtained clinical data, A.A., H.-G.K., A.H., A.R., I.K.; Supervision, T.H., B.V., I.-K.K.; Exome sequencing and segregation analysis, J.D., M.A.H., S.K. (Susanne Kolb), L.S., B.V.; Homozygosity mapping, J.D.; Linkage analysis, F.R.; Bioinformatics support, T.M., M.D.; Minigene analysis, B.V.; RT-qPCR analysis, J.D., D.L., S.K. (Sabine Knaup). All authors participated in final review and editing of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by Intramural Funding (fortune) at the University of Tübingen (2545-1-0 to B.V.)

**Acknowledgments:** The authors would like to express their sincere gratitude to the families for their participation in this study. We would also like to thank Larissa Haertle at the Department of Internal Medicine, Würzburg, Indrajit Nanda at the Institute of Human Genetics, Würzburg and Dennis Segebarth at the Institute of Clinical Neurobiology, Würzburg for their expert advice. We thank Stuart W. Tompson at the University of Wisconsin-Madison for sharing the pSPL3 vector.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### Abbreviations

ARNSHL	Autosomal Recessive Non-Syndromic Hearing Loss
CDC14A	Cell Division Cycle 14A
DFNB32	Deafness B32
DSPc/PTPc	Dual-specificity phosphatase domain
DSPn	Dual-specificity phosphatase domain
GJB2	Gap Junction Protein Beta 2
HIIMS	Hearing Impairment and Infertile Male Syndrome
HL	Hearing Loss
LD	Linkage Disequilibrium
LOD	Logarithm of the Odds
NMD	Nonsense-Mediated mRNA Decay
PTC	Premature Termination Codon
QC	Quality Control
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RQ	Relative Quantification
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
WT	Wild Type

#### References

1. Vona, B.; Nanda, I.; Hofrichter, M.A.; Shehata-Dieler, W.; Haaf, T. Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future. *Mol. Cell. Probes* **2015**, *29*, 260–270. [CrossRef]
2. Van Camp, G.; Smith, R.J.H. Hereditary Hearing Loss Homepage. Available online: <https://hereditaryhearingloss.org/> (accessed on 10 December 2019).
3. Delmaghani, S.; Aghaie, A.; Bouyacoub, Y.; El Hachmi, H.; Bonnet, C.; Riahi, Z.; Chardenoux, S.; Perfettini, I.; Hardelin, J.P.; Houmeida, A.; et al. Mutations in *CDC14A*, Encoding a Protein Phosphatase Involved in Hair Cell Ciliogenesis, Cause Autosomal-Recessive Severe to Profound Deafness. *Am. J. Hum. Genet.* **2016**, *98*, 1266–1270. [CrossRef] [PubMed]
4. Imtiaz, A.; Belyantseva, I.A.; Beirl, A.J.; Fenollar-Ferrer, C.; Bashir, R.; Bukhari, I.; Bouzid, A.; Shaukat, U.; Azaiez, H.; Booth, K.T.; et al. *CDC14A* phosphatase is essential for hearing and male fertility in mouse and human. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 780–798. [CrossRef]
5. Stegmeier, F.; Amon, A. Closing mitosis: The functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu. Rev. Genet.* **2004**, *38*, 203–232. [CrossRef] [PubMed]

6. Mociaro, A.; Schiebel, E. Cdc14: A highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions? *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 2867–2876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Patterson, K.I.; Brummer, T.; O'Brien, P.M.; Daly, R.J. Dual-specificity phosphatases: Critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem. J.* **2009**, *418*, 475–489. [[CrossRef](#)]
8. Hilgert, N.; Smith, R.J.; Van Camp, G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat. Res.* **2009**, *681*, 189–196. [[CrossRef](#)]
9. Wang, G.S.; Cooper, T.A. Splicing in disease: Disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 749–761. [[CrossRef](#)]
10. Lopez-Bigas, N.; Audit, B.; Ouzounis, C.; Parra, G.; Guigo, R. Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 1900–1903. [[CrossRef](#)]
11. Kapustin, Y.; Chan, E.; Sarkar, R.; Wong, F.; Vorechovsky, I.; Winston, R.M.; Tatusova, T.; Dibb, N.J. Cryptic splice sites and split genes. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 5837–5844. [[CrossRef](#)]
12. Balagopal, V.; Fluch, L.; Nissan, T. Ways and means of eukaryotic mRNA decay. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1819*, 593–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Jinek, M.; Coyle, S.M.; Doudna, J.A. Coupled 5' nucleotide recognition and processivity in Xrn1-mediated mRNA decay. *Mol. Cell* **2011**, *41*, 600–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Meola, N.; Domanski, M.; Karadoulama, E.; Chen, Y.; Gentil, C.; Pultz, D.; Vitting-Seerup, K.; Lykke-Andersen, S.; Andersen, J.S.; Sandelin, A.; et al. Identification of a Nuclear Exosome Decay Pathway for Processed Transcripts. *Mol. Cell* **2016**, *64*, 520–533. [[CrossRef](#)]
15. Kurosaki, T.; Popp, M.W.; Maquat, L.E. Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 406–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. El-Brolosy, M.A.; Stainier, D.Y.R. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet.* **2017**, *13*, e1006780. [[CrossRef](#)]
17. Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay: Splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 89–99. [[CrossRef](#)]
18. Mazzoli, M.G.; Van Camp, G.U.; Newton, V.; Giarbini, N.; Declau, F.; Parving, A. Recommendations for the description of genetic and audiological data for families with nonsyndromic hereditary hearing impairment. *Audiol. Med.* **2003**, *1*, 148–150. [[CrossRef](#)]
19. 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 Res.* **2010**, *20*, 1297–1303. [[CrossRef](#)]
20. DePristo, M.A.; Banks, E.; Poplin, R.; Garimella, K.V.; Maguire, J.R.; Hartl, C.; Philippakis, A.A.; del Angel, G.; Rivas, M.A.; Hanna, M.; et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 491–498. [[CrossRef](#)]
21. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 589–595. [[CrossRef](#)]
22. Scott, E.M.; Halees, A.; Itan, Y.; Spencer, E.G.; He, Y.; Azab, M.A.; Gabriel, S.B.; Belkadi, A.; Boisson, B.; Abel, L.; et al. Characterization of Greater Middle Eastern genetic variation for enhanced disease gene discovery. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 1071–1076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Fattahi, Z.; Beheshtian, M.; Mohseni, M.; Poustchi, H.; Sellars, E.; Nezhadi, S.H.; Amini, A.; Arzhang, S.; Jalalvand, K.; Jamali, P.; et al. Iranome: A catalog of genomic variations in the Iranian population. *Hum. Mutat.* **2019**, *40*, 1968–1984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Karczewski, K.J.; Francioli, L.C.; Tiao, G.; Cummings, B.B.; Alföldi, J.; Wang, Q.; Collins, R.L.; Laricchia, K.M.; Ganna, A.; Birnbaum, D.P.; et al. Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *bioRxiv* **2019**. [[CrossRef](#)]
25. Adzhubei, I.A.; Schmidt, S.; Peshkin, L.; Ramensky, V.E.; Gerasimova, A.; Bork, P.; Kondrashov, A.S.; Sunyaev, S.R. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 248–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ng, P.C.; Henikoff, S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* **2001**, *11*, 863–874. [[CrossRef](#)]
27. Schwarz, J.M.; Cooper, D.N.; Schuelke, M.; Seelow, D. MutationTaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 361–362. [[CrossRef](#)]



28. Azaiez, H.; Booth, K.T.; Ephraim, S.S.; Crone, B.; Black-Ziegelbein, E.A.; Marini, R.J.; Shearer, A.E.; Sloan-Heggen, C.M.; Kolbe, D.; Casavant, T.; et al. Genomic Landscape and Mutational Signatures of Deafness-Associated Genes. *Am. J. Hum. Genet.* **2018**, *103*, 484–497. [[CrossRef](#)]
29. Fromer, M.; Purcell, S.M. Using XHMM Software to Detect Copy Number Variation in Whole-Exome Sequencing Data. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **2014**, *81*, 7–23. [[CrossRef](#)]
30. Shapiro, M.B.; Senapathy, P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: Sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 7155–7174. [[CrossRef](#)]
31. Yeo, G.; Burge, C.B. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J. Comput. Biol.* **2004**, *11*, 377–394. [[CrossRef](#)]
32. Reese, M.G.; Eeckman, F.H.; Kulp, D.; Haussler, D. Improved splice site detection in Genie. *J. Comput. Biol.* **1997**, *4*, 311–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Pertea, M.; Lin, X.; Salzberg, S.L. GeneSplicer: A new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1185–1190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Desmet, F.O.; Hamroun, D.; Lalande, M.; Collod-Beroud, G.; Claustres, M.; Beroud, C. Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Seelow, D.; Schuelke, M.; Hildebrandt, F.; Nurnberg, P. HomozygosityMapper—An interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, W593–W599. [[CrossRef](#)]
36. Wildeman, M.; van Ophuizen, E.; den Dunnen, J.T.; Taschner, P.E. Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Hum. Mutat.* **2008**, *29*, 6–13. [[CrossRef](#)]
37. Ruschendorf, F.; Nurnberg, P. ALOHOMORA: A tool for linkage analysis using 10K SNP array data. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 2123–2125. [[CrossRef](#)]
38. Abecasis, G.R.; Cherny, S.S.; Cookson, W.O.; Cardon, L.R. Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 97–101. [[CrossRef](#)]
39. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e115. [[CrossRef](#)]
40. Tompson, S.W.; Young, T.L. Assaying the Effects of Splice Site Variants by Exon Trapping in a Mammalian Cell Line. *Bio Protoc* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 11.2. Anlage II

A novel missense variant in *MYO3A* is associated with autosomal dominant high-frequency hearing loss in a German family.





Received: 27 April 2020 | Revised: 16 May 2020 | Accepted: 19 May 2020

DOI: 10.1002/mgg3.1343

## CLINICAL REPORT

Molecular Genetics & Genomic Medicine  WILEY

# A novel missense variant in *MYO3A* is associated with autosomal dominant high-frequency hearing loss in a German family

Julia Doll<sup>1</sup>  | Michaela A. H. Hofrichter<sup>1</sup> | Paulina Bahena<sup>1</sup> | Alfred Heihoff<sup>2</sup> | Dennis Segebarth<sup>3</sup>  | Tobias Müller<sup>4</sup> | Marcus Dittrich<sup>1,4</sup> | Thomas Haaf<sup>1</sup>  | Barbara Vona<sup>1,5</sup> <sup>1</sup>Institute of Human Genetics, Julius Maximilians University, Würzburg, Germany<sup>2</sup>Joint Practice of Pediatrics, Regensburg, Germany<sup>3</sup>Institute of Clinical Neurobiology, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany<sup>4</sup>Institute of Bioinformatics, Julius Maximilians University, Würzburg, Germany<sup>5</sup>Tübingen Hearing Research Centre, Department of Otolaryngology - Head and Neck Surgery, Eberhard Karls University, Tübingen, Germany**Correspondence**Barbara Vona, Institute of Human Genetics, Julius Maximilians University Würzburg, Biozentrum, Am Hubland, 97074 Würzburg, Germany.  
Email: barbara.vona@uni-wuerzburg.de, barbara.vona@uni-tuebingen.de**Abstract****Background:** *MYO3A*, encoding the myosin IIIA protein, is associated with autosomal recessive and autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. To date, only two missense variants located in the motor-head domain of *MYO3A* have been described in autosomal dominant families with progressive, mild-to-profound sensorineural hearing loss. These variants alter the ATPase activity of myosin IIIA.**Methods:** Exome sequencing of a proband from a three-generation German family with prelingual, moderate-to-profound, high-frequency hearing loss was performed. Segregation analysis confirmed a dominant inheritance pattern. Regression analysis of mean hearing level thresholds per individual and ear was performed at high-, mid-, and low-frequencies.**Results:** A novel heterozygous missense variant c.716T>C, p.(Leu239Pro) in the kinase domain of *MYO3A* was identified that is predicted in silico as disease causing. High-frequency, progressive hearing loss was identified.**Conclusion:** Correlation analysis of pure-tone hearing thresholds revealed progressive hearing loss, especially in the high-frequencies. In the present study, we report the first dominant likely pathogenic variant in *MYO3A* in a European family and further support *MYO3A* as an autosomal dominant hearing loss gene.**KEYWORDS**autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, *MYO3A*, myosin IIIA, progressive hearing loss, sensorineural hearing loss

## 1 | INTRODUCTION

Hearing loss (HL) belongs to the most common sensory disorders in humans and shows a prevalence of 1–3 in 1,000 newborns (Vona, Nanda, Hofrichter, Shehata-Dieler, & Haaf, 2015). Nonsyndromic autosomal dominant hearing loss (DFNA) was first described in 1997 in a Caucasian family with profound

deafness caused by a mutation in *GJB2* (Kelsell et al., 1997). Since then, approximately 50 autosomal dominant HL genes have been identified, with 13 genes showing both dominant and recessive inheritance patterns (<http://hereditaryhearingloss.org>). *MYO3A* (OMIM #606808), a 33-exon gene on chromosome 10p12.1, was first associated with autosomal recessive HL (DFNB30) in 2002. Affected individuals from a Jewish family

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals LLC.

showed bilateral, progressive, high-frequency HL beginning in the second decade of life caused by three different recessive loss-of-function variants in *MYO3A* (Walsh et al., 2002). Since then, several additional recessive loss-of-function and missense variants with a wide range of HL characteristics were identified in patients with nonsyndromic HL (Choi et al., 2013; Miyagawa, Naito, Nishio, Kamatani, & Usami, 2013; Qu et al., 2016; Sommen et al., 2016; Wu et al., 2015). In 2016, the inheritance pattern of HL due to variants in *MYO3A* expanded with the discovery of a missense variant in an African-American family with progressive, postlingual childhood onset HL (Grati et al., 2016). Later, in 2018, two Brazilian families with late-onset nonsyndromic HL were identified with the same segregating missense variant (Dantas et al., 2018). To date, only three autosomal dominant families with mild-to-profound, progressive HL have been identified with two different segregating missense variants in *MYO3A* (Dantas et al., 2018; Grati et al., 2016).

In vertebrates, two different isoforms have been identified; the longer Myo3A isoform (209 kDa) and a shorter Myo3B isoform (155 kDa), that are both expressed in the retina and testis (Dose et al., 2003). The encoded myosin IIIA protein consists of a N-terminal kinase domain, a highly conserved motor-head domain, followed by three calmodulin binding (IQ) motifs and a C-terminal actin-binding domain (3THD-II) (Dose & Burnside, 2000; Salles et al., 2009). Both previously described dominant variants in *MYO3A* are located in the motor-head domain and are thought to affect the ATPase activity of the gene (Dantas et al., 2018; Grati et al., 2016). Expression is present in the retina (Dose & Burnside, 2000) and the inner ear of mammals (Schneider et al., 2006; Walsh et al., 2002), specifically at the tips of both inner and outer hair cells in all stereocilia rows, as well as in vestibular hair cell stereocilia in mice (Walsh et al., 2011). Mutant mice homozygous for a nonsense allele, show progressive, high-frequency HL, advancing to all frequencies over time (Walsh et al., 2011).

We describe the first European family with dominant, moderate-to-profound, high-frequency sensorineural HL with a novel heterozygous missense variant c.716T>C, p.(Leu239Pro) in *MYO3A* (NM\_017433.4). This finding supports and consolidates the association of autosomal dominant HL due to variants in this gene. Due to a relative lack of studies on the genetic basis of autosomal dominant HL and the challenging occurrence of a typical later age of onset, characterization of large families is important for unraveling the distinction between autosomal recessive and dominant alleles in the personalized medicine era.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Ethical compliance

Written informed consent was obtained from the family and all procedures were approved by the Ethics Commission of

the University of Würzburg (46/15, approval date: 31 March 2015).

### 2.2 | Clinical evaluation

We recruited the genomic DNA from a three-generation German family with seven affected (I.2, II.2, II.3, III.1, III.2, III.4, III.5) and one unaffected individual (II.1). Audiological testing, including pure-tone audiometry, was done for all affected family members and the unaffected family member III.3 complying with guidelines described by Mazzoli et al. (2003).

### 2.3 | Genomic analysis and exome sequencing

Genomic DNA from participating affected and unaffected individuals was extracted from whole blood. We excluded pathogenic variants in the most common gene, *GJB2*, by diagnostic Sanger sequencing of the index patient. Exome sequencing of the index patient (III.1) was performed. Exome library preparation was performed with the Nextera Rapid Capture Exome kit (Illumina) according to manufacturer's instructions and paired-end sequenced ( $2 \times 76$  bp) with a v2 high-output reagent kit with the NextSeq500 sequencer (Illumina). The human reference genome GRCh37 (hg19) was used for data alignment.

### 2.4 | Exome analysis

Single nucleotide variants (SNVs) and small indels (<15bp) were analyzed using GensearchNGS software (PhenoSystems SA) and our in-house bioinformatics pipeline. Variant filtering followed an alternate allele frequency present at >20% and a minor allele frequency <0.01. Reads were aligned to hg19 using BWA (Li & Durbin, 2010) and the GATK toolkit according to GATK best practice (DePristo et al., 2011). Variants were filtered by quality based on the VQSLOD score that indicates the log odds ratio of the probability that each variant is true (McKenna et al., 2010). Population-specific allele frequencies were assessed using gnomAD (Karczewski et al., 2019). PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010), MutationTaster (Ng & Henikoff, 2001) and SIFT (Schwarz, Cooper, Schuelke, & Seelow, 2014) were used to analyze the effects of SNVs, as well as the Deafness Variation Database (DVD) (Azaiez et al., 2018) and the Human Gene Mutation Database (HGMD) (Stenson et al., 2003) for variant interpretation. Potential splicing effects of variants were classified by in silico prediction tools such as SpliceSiteFinder-like (Shapiro & Senapathy, 1987), MaxEntScan (Yeo & Burge, 2004),

NNSPLICE (Reese, Eeckman, Kulp, & Haussler, 1997), Genesplicer (Perte, Lin, & Salzberg, 2001), and Human Splicing Finder (Desmet et al., 2009). CNVs were investigated using the eXome Hidden Markov Model (XHMM, version 1.0) approach (Fromer & Purcell, 2014).

## 2.5 | Sanger validation and segregation of the *MYO3A* c.716T>C variant

PCR amplification and Sanger sequencing of the genomic DNA of the index patient, as well as affected and unaffected family members was performed to validate the c.716T>C missense variant in *MYO3A* (NM\_017433.4). Primers were designed with Primer3 (Untergasser et al., 2012) (F: 5'-TACTAGGTGATTGCATGTGAACAG-3', and R: 5'-TGAAGAGCATGATGAACACTTGG-3') and standard cycling conditions were used. An ABI 3130xl 16-capillary sequencer (Life Technologies) was used for amplicon sequencing and the data were analyzed with the Gensearch 4.3 software (PhenoSystems SA).

## 2.6 | Protein modeling prediction of wild type *MYO3A*

The secondary protein structure at amino acid position 239 (Leu) of wild type *MYO3A* was predicted in silico with I-TASSER (Yang et al., 2015). C-scores ranging from -5 to 2 indicate the confidence of the predicted models, where a C-score of a higher value indicates a model with a higher confidence.

## 2.7 | Correlation analysis

We calculated the mean hearing level threshold per patient and ear at high- (4–8 kHz), mid- (1–3 kHz), and low- (0.125–0.5 kHz) frequencies. Pearson's correlation between age at audiometric examination and mean hearing level threshold was calculated using OriginPro 2019b (OriginLab Corporation) (Figure S1).

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Clinical presentation of the German family

We present a three-generation German family with prelingual, bilateral, sensorineural HL (Figure 1a). All affected individuals (I.2, II.2, II.3, III.1, III.2, III.4, III.5) showed high-frequency HL ranging from moderate to profound in

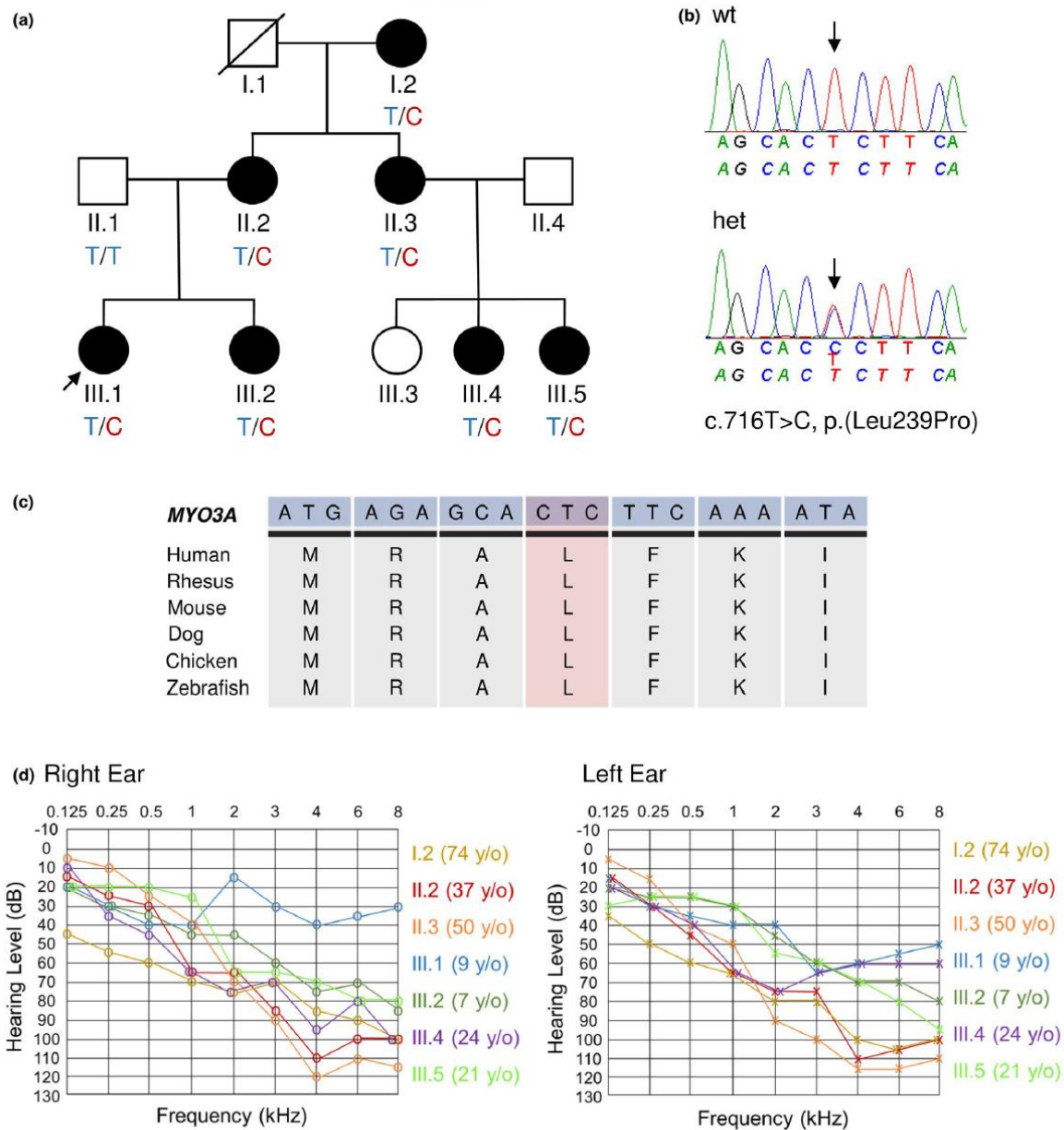
severity (Figure 1d). Individual III.3 underwent audiometry and revealed normal hearing (data not shown). Our data show a clear correlation between the average thresholds at high- (4–8 kHz) and mid- (1–3 kHz) frequencies and the age at audiometric examination for both ears, indicating a progressive HL (Pearson's  $r$ : 0.62 (right ear), 0.76 (left ear) for high-frequencies; 0.71 (right ear), 0.83 (left ear) for mid-frequencies) (Figure S1). All affected individuals use hearing aids and show a good hearing outcome. After clinical examination, additional symptoms and risk factors for hearing loss such as infections and trauma were excluded. Tinnitus was not reported for all affected individuals.

### 3.2 | Identification and analysis of a novel missense variant in *MYO3A*

The index patient (III.1) underwent exome sequencing and bioinformatics analysis that included 174 deafness-associated genes (Table S1) as an initial approach to screen variants in clinically relevant hearing loss-associated genes that was followed by an exome-wide analysis. A novel heterozygous missense variant c.716T>C, p.(Leu239Pro) in exon 8 of the gene *MYO3A* (NCBI Reference Sequence: NM\_017433.4) was identified that was predicted in silico as disease causing and resulted in a putative pathogenic amino acid exchange according to several in silico tools (PolyPhen-2, MutationTaster, and SIFT). The variant is classified as "likely pathogenic" according to the ClinGen hearing loss working group expert specification (Oza et al., 2018). The variant affects a highly conserved nucleotide and amino acid (Figure 1c) that is part of the catalytic kinase domain of the encoded *MYO3A* protein. Protein modeling prediction of wild type *MYO3A* indicated an alpha-helix at amino acid position 239 (Leu), based on the two predicted models with the highest C-score (-1.82, -2.00). Segregation testing of the c.716T>C variant followed a dominant inheritance pattern (Figure 1a,b). Bioinformatics analysis in 174 HI genes excluded additional potentially disease-causing variants and copy number variations (CNVs) that could resolve the phenotype of the family. The c.716T>C variant has been submitted to the Leiden Open Variation Database version 3 (LOVD v.3.0) under variant ID 0000660455.

## 4 | DISCUSSION

*MYO3A* belongs to the unconventional myosins (class III) of the large myosin superfamily (Dose & Burnside, 2000). They mediate crucial cellular functions such as signal transduction, cell movement, and vesicle trafficking (Mermall, Post, & Mooseker, 1998). Grati et al. described the first autosomal dominant mutation (p.(Gly488Glu), Figure 2)

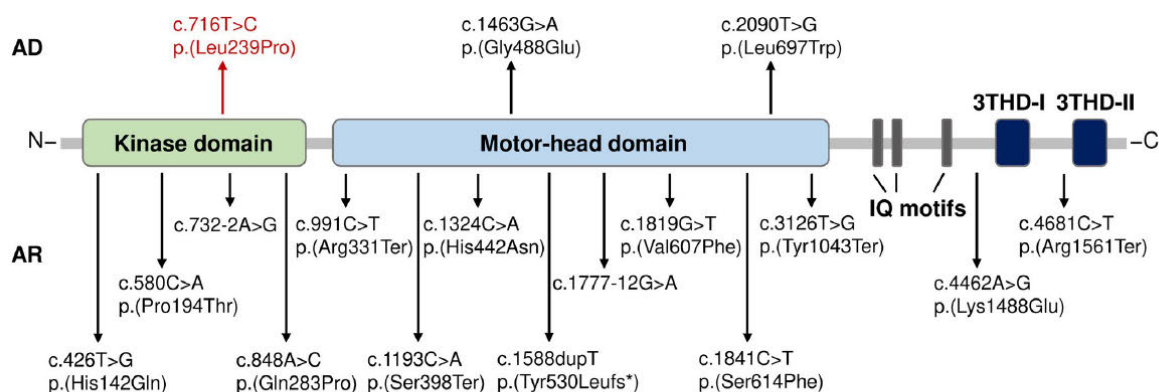


**FIGURE 1** Pedigree of the German family, segregation, and conservation of the novel missense variant, and audiograms of affected family members. (a) A three-generation German family with seven affected individuals are marked with black symbols and the index patient marked with an arrow. The two unaffected family members are marked with white symbols. Heterozygous, affected individuals with the c.716T>C, p.(Leu239Pro) variant are marked with “T/C”. The wild type, unaffected individual is marked with “T/T”. (b) Chromatograms showing the wild type Sanger sequence (wt, top) and the heterozygous sequence (het, below) of the c.716T>C variant. (c) Conservation of the amino acid position 239 (L) and flanking regions across different species. (d) Right and left ear pure-tone audiogram thresholds (air conduction) of affected family members (I.2, II.2, II.3, III.1, III.2, III.4, III.5) and the age at the time of examination

resulting in an amino acid substitution in the motor-head domain that modifies the ATPase activity of *MYO3A* at the hair cell stereocilia tips. These authors also showed that *MYO3A* interacts with *PCDH15* (protocadherin 15),

a crucial component of the mechano-electrical transduction (MET) complex (Grati et al., 2016). The two previously described dominant variants in an African-American (c.1463G>A, p.(Gly488Glu)) and two Brazilian families

*MYO3A*  
NM\_017433.4  
NP\_059129.3



**FIGURE 2** Summary of all identified recessive and dominant HL variants in *MYO3A* (NM\_017433.4, NP\_059129.3). The encoded myosin IIIA protein is composed of a N-terminal catalytic kinase domain, a motor-head domain, three calmodulin binding (IQ) motifs, a C-terminal domain containing a N-terminal unit (3THD-I) and an actin-binding domain (3THD-II). Previously described autosomal dominant (AD) missense variants are shown above in black and the newly identified variant c.716T>C, p.(Leu239Pro) is marked in red. Already identified autosomal recessive (AR) variants are shown below

(c.2090T>G, p.(Leu697Trp)) are both located in the motor-head domain of the myosin IIIa protein (Figure 2). The affected individuals showed nonsyndromic, bilateral, progressive HL, ranging from mild to profound in severity. The age of onset varied between early childhood (postlingual) and an average age of onset of 30 to 32 years (Table S2) (Dantas et al., 2018; Grati et al., 2016). Furthermore, one congenital case was reported in one of the Brazilian families (Dantas et al., 2018). Interestingly, there is a great variability regarding the age of onset and HL severity in families with previously described recessive variants in *MYO3A*, ranging from congenital to late-onset HL and a moderate-to-profound degree of severity. Additionally, there is no apparent clustering of recessive and dominant variants in a certain protein domain, such as the kinase or motor-head domain (Table S2).

The affected individuals in the German family we describe, all showed nonsyndromic, prelingual, progressive HL (Figure 1b,c), especially impacting high- (4–8 kHz) and mid- (1–3 kHz) frequencies (Figure S1). Progressive HL is observed in other autosomal dominant *MYO3A* families. As previously described, *MYO3A* variants that are implicated in an autosomal dominant inheritance confer a dominant-negative effect, reducing actin protrusion initiation, and elongation activity of the encoded protein in inner ear hair cell stereocilia (Dantas et al., 2018). Dominant-negative effects are characterized by the adverse assembly of wild type and mutant protein subunits, preventing correct protein functionality and are frequently involved in various human diseases (Bergendahl et al., 2019;

Herskowitz, 1987; Marziano, Casalotti, Portelli, Becker, & Forge, 2003). The c.716T>C, p.(Leu239Pro) missense variant in the German family is the first dominant variant that is located in the kinase domain of the gene (Figure 2). In vitro analysis suggests that a functional kinase domain of the *MYO3A* protein is important for proper regulation of actin dynamics and stability of actin bundles at filopodial tips (Quintero et al., 2010). The heterozygous variant results in an amino acid exchange from leucine to proline that is predicted to be disease causing in silico. The exchange from a branch-chain leucine to a cyclic proline possibly mediates the disruption of the present alpha-helix at amino acid position 239 (Roy, Kucukural, & Zhang, 2010; Yang et al., 2015; Zhang, 2008) and results in a structural protein change (Bajaj et al., 2007; Cordes, Bright, & Sansom, 2002). Although it was not directly tested, it is suspected that the potentially defective *MYO3A* protein also interacts with the existing wild type protein via a dominant-negative mechanism and is responsible for the HL phenotype in the German family.

Compared to its recessive counterpart, many dominant forms of HL lack in-depth clinical characterization. Clinical data from large families are essential to discriminate progression, which is of high interest to directing current and future treatment modalities. Several genes, including *MYO3A*, lack substantial clinical validity through lack of replication evidence. Here, we describe the first European family with a novel dominant variant in *MYO3A*, thus, providing further evidence for the association of this gene with an autosomal dominant HL phenotype.

**ACKNOWLEDGMENT**

The authors would like to express their sincere gratitude to the family for their participation in this study.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**


Conceptualization, T.H., B.V.; Manuscript drafting, J.D., T.H., B.V.; Ascertained family and obtained clinical data, M.A.H.H., P.B., A.H., J.D., B.V.; Supervision, T.H., B.V.; Exome sequencing and segregation analysis, J.D., M.A.H.H., B.V.; Bioinformatics support, T.M., M.D.; Protein modeling, J.D., B.V.; Correlation analysis, D.S., J.D.; All authors participated in final review and editing of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**DATA AVAILABILITY STATEMENT**

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions. The variant was deposited in LOVD3 under variant ID 0000660455.

**ORCID**

Julia Doll  <https://orcid.org/0000-0002-0037-9079>

Dennis Segebarth  <https://orcid.org/0000-0002-3806-9324>

Thomas Haaf  <https://orcid.org/0000-0002-0737-0763>

Barbara Vona  <https://orcid.org/0000-0002-6719-3447>

**REFERENCES**

- Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., ... Sunyaev, S. R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Azaiez, H., Booth, K. T., Ephraim, S. S., Crone, B., Black-Ziegelbein, E. A., Marini, R. J., ... Smith, R. J. H. (2018). Genomic landscape and mutational signatures of deafness-associated genes. *American Journal of Human Genetics*, 103(4), 484–497. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.08.006>
- Bajaj, K., Madhusudhan, M. S., Adkar, B. V., Chakrabarti, P., Ramakrishnan, C., Sali, A., & Varadarajan, R. (2007). Stereochemical criteria for prediction of the effects of proline mutations on protein stability. *PLoS Computational Biology*, 3(12), e241. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030241>
- Bergendahl, L. T., Gerasimavicius, L., Miles, J., Macdonald, L., Wells, J. N., Welburn, J. P. I., & Marsh, J. A. (2019). The role of protein complexes in human genetic disease. *Protein Science*, 28(8), 1400–1411. <https://doi.org/10.1002/pro.3667>
- Choi, B. Y., Park, G., Gim, J., Kim, A. R., Kim, B.-J., Kim, H.-S., ... Park, W.-Y. (2013). Diagnostic application of targeted resequencing for familial nonsyndromic hearing loss. *PLoS One*, 8(8), e68692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068692>

- Cordes, F. S., Bright, J. N., & Sansom, M. S. (2002). Proline-induced distortions of transmembrane helices. *Journal of Molecular Biology*, 323(5), 951–960. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(02\)01006-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(02)01006-9)
- Dantas, V. G. L., Raval, M. H., Ballesteros, A., Cui, R., Gunther, L. K., Yamamoto, G. L., ... Mingroni-Netto, R. C. (2018). Characterization of a novel MYO3A missense mutation associated with a dominant form of late onset hearing loss. *Scientific Reports*, 8(1), 8706. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26818-2>
- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., ... Daly, M. J. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, 43(5), 491–498. <https://doi.org/10.1038/ng.806>
- Desmet, F. O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Beroud, G., Claustres, M., & Beroud, C. (2009). Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research*, 37(9), e67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215>
- Dose, A. C., & Burnside, B. (2000). Cloning and chromosomal localization of a human class III myosin. *Genomics*, 67(3), 333–342. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6256>
- Dose, A. C., Hillman, D. W., Wong, C., Sohlberg, L., Lin-Jones, J., & Burnside, B. (2003). Myo3A, one of two class III myosin genes expressed in vertebrate retina, is localized to the calycal processes of rod and cone photoreceptors and is expressed in the sacculus. *Molecular Biology of the Cell*, 14(3), 1058–1073. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-06-0317>
- Fromer, M., & Purcell, S. M. (2014). Using XHMM software to detect copy number variation in whole-exome sequencing data. *Current Protocols in Human Genetics*, 81(1), <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0723s81>
- Grati, M., Yan, D., Raval, M. H., Walsh, T., Ma, Q. I., Chakchouk, I., ... Liu, X. Z. (2016). MYO3A causes human dominant deafness and interacts with protocadherin 15-CD2 isoform. *Human Mutation*, 37(5), 481–487. <https://doi.org/10.1002/humu.22961>
- Herskowitz, I. (1987). Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature*, 329(6136), 219–222. <https://doi.org/10.1038/329219a0>
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alfoldi, J., Wang, Q., ... MacArthur, D. G. (2019). Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/531210>
- Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., ... Leigh, I. M. (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature*, 387(6628), 80–83. <https://doi.org/10.1038/387080a0>
- Li, H., & Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26(5), 589–595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>
- Marziano, N. K., Casalotti, S. O., Portelli, A. E., Becker, D. L., & Forge, A. (2003). Mutations in the gene for connexin 26 (GJB2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. *Human Molecular Genetics*, 12(8), 805–812. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg076>
- Mazzoli, M., Van camp, G., Newton, V., Giarbini, N., Declau, F., & Parving, A. (2003). Recommendations for the description of genetic and audiological data for families with nonsyndromic hereditary hearing impairment. *Audiological Medicine*, 1, 148–150. <https://doi.org/10.1080/16513860301713>
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., ... DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis



- Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>
- Mermall, V., Post, P. L., & Mooseker, M. S. (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*, 279(5350), 527–533. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.527>
- Miyagawa, M., Naito, T., Nishio, S. Y., Kamatani, N., & Usami, S. (2013). Targeted exon sequencing successfully discovers rare causative genes and clarifies the molecular epidemiology of Japanese deafness patients. *PLoS One*, 8(8), e71381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071381>
- Ng, P. C., & Henikoff, S. (2001). Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Research*, 11(5), 863–874. <https://doi.org/10.1101/gr.176601>
- Oza, A. M., DiStefano, M. T., Hemphill, S. E., Cushman, B. J., Grant, A. R., Siegert, R. K., ... Abou Tayoun, A. N. (2018). Expert specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss. *Human Mutation*, 39(11), 1593–1613. <https://doi.org/10.1002/humu.23630>
- Pertea, M., Lin, X., & Salzberg, S. L. (2001). GeneSplicer: A new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Research*, 29(5), 1185–1190. <https://doi.org/10.1093/nar/29.5.1185>
- Qu, R., Sang, Q., Xu, Y., Feng, R., Jin, L., He, L., & Wang, L. (2016). Identification of a novel homozygous mutation in *MYO3A* in a Chinese family with DFNB30 non-syndromic hearing impairment. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 84, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.02.036>
- Quintero, O. A., Moore, J. E., Unrath, W. C., Manor, U., Salles, F. T., Grati, M., ... Yengo, C. M. (2010). Intermolecular autophosphorylation regulates myosin IIIa activity and localization in parallel actin bundles. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35770–35782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.144360>
- Reese, M. G., Eeckman, F. H., Kulp, D., & Haussler, D. (1997). Improved splice site detection in Genie. *Journal of Computational Biology*, 4(3), 311–323. <https://doi.org/10.1089/cmb.1997.4.311>
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Salles, F. T., Merritt, R. C., Manor, U., Dougherty, G. W., Sousa, A. D., Moore, J. E., ... Kachar, B. (2009). Myosin IIIa boosts elongation of stereocilia by transporting espin 1 to the plus ends of actin filaments. *Nature Cell Biology*, 11(4), 443–450. <https://doi.org/10.1038/ncb1851>
- Schneider, M. E., Dose, A. C., Salles, F. T., Chang, W., Erickson, F. L., Burnside, B., & Kachar, B. (2006). A new compartment at stereocilia tips defined by spatial and temporal patterns of myosin IIIa expression. *Journal of Neuroscience*, 26(40), 10243–10252. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2812-06.2006>
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods*, 11(4), 361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
- Shapiro, M. B., & Senapathy, P. (1987). RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: Sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Research*, 15(17), 7155–7174. <https://doi.org/10.1093/nar/15.17.7155>
- Sommen, M., Schrauwen, I., Vandeweyer, G., Boeckx, N., Corneveaux, J. J., van den Ende, J., ... Van Camp, G. (2016). DNA diagnostics of hereditary hearing loss: A targeted resequencing approach combined with a mutation classification system. *Human Mutation*, 37(8), 812–819. <https://doi.org/10.1002/humu.22999>
- Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A., Thomas, N. S., ... Cooper, D. N. (2003). Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Human Mutation*, 21(6), 577–581. <https://doi.org/10.1002/humu.10212>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vona, B., Nanda, I., Hofrichter, M. A., Shehata-Dieler, W., & Haaf, T. (2015). Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future. *Molecular and Cellular Probes*, 29(5), 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2015.03.008>
- Walsh, T., Walsh, V., Vreugde, S., Hertzano, R., Shahin, H., Haika, S., ... Avraham, K. B. (2002). From flies' eyes to our ears: Mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7518–7523. <https://doi.org/10.1073/pnas.102091699>
- Walsh, V. L., Raviv, D., Dror, A. A., Shahin, H., Walsh, T., Kanaan, M. N., ... King, M.-C. (2011). A mouse model for human hearing loss DFNB30 due to loss of function of myosin IIIA. *Mammalian Genome*, 22(3–4), 170–177. <https://doi.org/10.1007/s00335-010-9310-6>
- Wu, C.-C., Lin, Y.-H., Liu, T.-C., Lin, K.-N., Yang, W.-S., Hsu, C.-J., ... Wu, C.-M. (2015). Identifying children with poor cochlear implantation outcomes using massively parallel sequencing. *Medicine (Baltimore)*, 94(27), e1073. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001073>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yeo, G., & Burge, C. B. (2004). Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *Journal of Computational Biology*, 11(2–3), 377–394. <https://doi.org/10.1089/1066527041410418>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9, 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Doll J, Hofrichter MAH, Bahena P, et al. A novel missense variant in *MYO3A* is associated with autosomal dominant high-frequency hearing loss in a German family. *Mol Genet Genomic Med*. 2020;8:e1343. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1343>

### 11.3. Anlage III

Genetic spectrum of syndromic and non-syndromic hearing loss in Pakistani families.

## Article

# Genetic Spectrum of Syndromic and Non-Syndromic Hearing Loss in Pakistani Families

Julia Doll <sup>1</sup> , Barbara Vona <sup>1,2,\*</sup> , Linda Schnapp <sup>1</sup>, Franz Rüschen-dorf <sup>3</sup> , Imran Khan <sup>4</sup>, Saadullah Khan <sup>5</sup>, Noor Muhammad <sup>5</sup>, Sher Alam Khan <sup>5</sup> , Hamed Nawaz <sup>5</sup>, Ajmal Khan <sup>6</sup>, Naseer Ahmad <sup>7</sup>, Susanne M. Kolb <sup>1</sup>, Laura Kühlewein <sup>8</sup> , Jonathan D. J. Labonne <sup>9</sup>, Lawrence C. Layman <sup>9,10</sup>, Michaela A. H. Hofrichter <sup>1</sup>, Tabea Röder <sup>1</sup>, Marcus Dittrich <sup>1,11</sup>, Tobias Müller <sup>11</sup>, Tyler D. Graves <sup>9</sup>, Il-Keun Kong <sup>12</sup> , Indrajit Nanda <sup>1</sup>, Hyung-Goo Kim <sup>13,\*</sup> and Thomas Haaf <sup>1</sup> 

- <sup>1</sup> Institute of Human Genetics, Julius Maximilians University Würzburg, 97074 Würzburg, Germany; julia.doll@uni-wuerzburg.de (J.D.); schnapp-linda@web.de (L.S.); susi\_kolb@yahoo.de (S.M.K.); michaela.hofrichter@uni-wuerzburg.de (M.A.H.H.); tabea.roeder@uni-wuerzburg.de (T.R.); marcus.dittrich@biozentrum.uni-wuerzburg.de (M.D.); nanda@biozentrum.uni-wuerzburg.de (I.N.); thomas.haaf@uni-wuerzburg.de (T.H.)
  - <sup>2</sup> Tübingen Hearing Research Centre, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Eberhard Karls University, 72076 Tübingen, Germany
  - <sup>3</sup> Max Delbrück Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association, 13125 Berlin, Germany; fruesch@mdc-berlin.de
  - <sup>4</sup> Department of Chemistry, Bacha Khan University Charsadda, Khyber Pakhtunkhwa 24420, Pakistan; imrangnu@gmail.com
  - <sup>5</sup> Department of Biotechnology and Genetic Engineering, Kohat University of Science and Technology, Kohat, Khyber Pakhtunkhwa 24420, Pakistan; saadkhanwazir@gmail.com (S.K.); noormwazir@yahoo.com (N.M.); sakmarwat79@gmail.com (S.A.K.); hamedwazir@gmail.com (H.N.)
  - <sup>6</sup> Department of Biotechnology, Bacha Khan University Charsadda, Khyber Pakhtunkhwa 24420, Pakistan; ajmalkhanbbt@gmail.com
  - <sup>7</sup> District Eye Specialist, Police and Services Hospital Peshawar, Khyber Pakhtunkhwa 24420, Pakistan; na\_safi1982@yahoo.com
  - <sup>8</sup> Department of Ophthalmology, Eberhard Karls University, 72076 Tübingen, Germany; laura.kuehlewein@med.uni-tuebingen.de
  - <sup>9</sup> Section of Reproductive Endocrinology, Infertility & Genetics, Department of Obstetrics and Gynecology, Medical College of Georgia, Augusta University, Augusta, GA 30912, USA; molgenetics\_and\_epigenetics@hotmail.com (J.D.J.L.); lalayman@augusta.edu (L.C.L.); tylergraves14@hotmail.com (T.D.G.)
  - <sup>10</sup> Department of Neuroscience and Regenerative Medicine, Medical College of Georgia, Augusta University, Augusta, GA 30912, USA
  - <sup>11</sup> Department of Bioinformatics, Julius Maximilians University Würzburg, 97074 Würzburg, Germany; tobias.mueller@biozentrum.uni-wuerzburg.de
  - <sup>12</sup> Department of Animal Sciences, Division of Applied Life Science (BK21 Four), Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea; ikong7900@gmail.com
  - <sup>13</sup> Neurological Disorders Research Center, Qatar Biomedical Research Institute, Hamad Bin Khalifa University, 34110 Doha, Qatar
- \* Correspondence: barbara.vona@uni-tuebingen.de (B.V.); hkim@hbku.edu.qa (H.-G.K.); Tel.: +49-7071-298-8154 (B.V.); +974-4454-5856 (H.-G.K.)

Received: 14 September 2020; Accepted: 9 November 2020; Published: 11 November 2020



**Abstract:** The current molecular genetic diagnostic rates for hereditary hearing loss (HL) vary considerably according to the population background. Pakistan and other countries with high rates of consanguineous marriages have served as a unique resource for studying rare and novel forms of recessive HL. A combined exome sequencing, bioinformatics analysis, and gene mapping approach for 21 consanguineous Pakistani families revealed 13 pathogenic or likely pathogenic variants in the

genes *GJB2*, *MYO7A*, *FGF3*, *CDC14A*, *SLITRK6*, *CDH23*, and *MYO15A*, with an overall resolve rate of 61.9%. *GJB2* and *MYO7A* were the most frequently involved genes in this cohort. All the identified variants were either homozygous or compound heterozygous, with two of them not previously described in the literature (15.4%). Overall, seven missense variants (53.8%), three nonsense variants (23.1%), two frameshift variants (15.4%), and one splice-site variant (7.7%) were observed. Syndromic HL was identified in five (23.8%) of the 21 families studied. This study reflects the extreme genetic heterogeneity observed in HL and expands the spectrum of variants in deafness-associated genes.

**Keywords:** genetic diagnosis; consanguinity; genome-wide linkage analysis; hearing loss; Pakistan; exome sequencing

## 1. Introduction

In parts of the world where consanguinity is prevalent, it is not uncommon to see a high prevalence of genetic diseases. The consanguineous marriage rates in Pakistan are among the highest worldwide [1]. Approximately 60% of marriages in Pakistan are consanguineous, with roughly 80% of these marriages being between first cousins [2]. The prevalence of autosomal recessive diseases associated with a monogenic background, such as profound hearing loss (HL), is high in countries where consanguineous marriages are common [3].

Hereditary HL is one of the most prevalent sensory disorders that affects 1 to 2 per 1000 live births worldwide. Genetic factors are responsible for over half of all HL [4]. Studies describing genetic variants in Pakistani families with HL show evidence of the extreme clinical and genetic heterogeneity of this sensory disease and support the importance of investigating and characterizing families from this region of the world [5–7]. Over 120 genes have been identified as causing non-syndromic hearing loss (NSHL), which comprises approximately 70% of all forms of hereditary HL (<http://hereditaryhearingloss.org>). Autosomal recessive HL (ARHL) is the most commonly observed inheritance pattern. There are presently over 600 syndromic forms of deafness [8], which appear in approximately 30% of patients with genetic HL. Many of these deafness syndromes mimic non-syndromic deafness at onset [9]. Hearing impairment profoundly complicates speech and language development in prelingual children and can negatively impact education and employment prospects [10].

Exome sequencing (ES) allows for the parallel sequencing of all coding regions of the human genome and has accelerated the process of identifying causally associated variants in patients with HL [11]. In 13 consanguineous families with diverse forms of HL, we identified 13 variants in 7 HL-associated genes using ES and gene mapping approaches in 21 Pakistani families. Two of the 13 variants were not previously described in the literature. The present study underscores the importance of genetically characterizing consanguineous families with HL to expand the spectrum of clinically relevant variants in genetically diverse populations, thus improving our understanding of the alleles involved in ARHL and enhancing genetic counseling.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Clinical Evaluation

This study was approved by the Ethics Committees of Augusta University (624456-4), Kohat University of Science and Technology (16–25), and the University of Würzburg (46/15). Fully informed written consent was obtained prior to initiating our study. Informed written consent from minors was provided from parent(s) or legal guardians. We recruited 21 consanguineous Pakistani families with congenital, bilateral, and severe-to-profound HL. The affected individuals in family 6 and 7 were audiologically tested by pure-tone audiometry, conforming with the established guidelines described by Mazzoli et al. [12]. Hearing thresholds were measured at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, and 8 kHz. HL was

self-reported in all other families but clearly noted as severe-to-profound. Ophthalmic examinations of families 4, 5, 6, 7, and 8 were performed.

## 2.2. *Autozygosity Mapping and Linkage Analysis*

### 2.2.1. Genotyping and Quality Control

The Illumina Infinium HumanCore-24 v1.0 Bead Chip array (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) was used for genotyping. From the 306,670 markers on the array, we filtered out indels, MT- and Y-chromosomal SNPs, and variations without physical positions, resulting in 259,460 biallelic SNPs for quality control (QC) and linkage analysis. Data conversion to linkage format files and QC was managed with ALOHOMORA software [13]. The sex of individuals was estimated by counting heterozygous genotypes on the X-chromosome and compared to the upraised pedigree data. The relationships between family members were verified with the program GRR [14]. PedCheck [15] was used to detect Mendelian errors (ME) and SNPs with ME were removed from the data set. Unlikely genotypes—e.g., double recombinants—were identified with Merlin [16] and deleted in the individuals.

### 2.2.2. Linkage Analysis

Linkage analysis was performed with Merlin using an autosomal recessive mode of inheritance and complete penetrance. We assumed 0.001 as the mutant allele frequency. We executed Merlin twice, once with a full marker set of around 258,000 SNPs after QC. This calculation was used to obtain the best positions for recombination events. The second analysis was conducted with a reduced marker set (~119,000 SNPs), where a minimal distance of 10,000 bases between markers was used. This calculation, where the linkage disequilibrium (LD) between markers is reduced, identifies linkage peaks which were inflated by markers in LD. We removed the linkage regions where the LOD score broke down more than 0.3 in the LD-reduced analysis. In summary, we selected regions where the LOD score reached the maximal LOD score of a family and where the LOD score was stable in the less dense, LD-reduced marker set. Under the given inheritance model (recessive) and the pedigree structure with a consanguinity loop, this linkage analysis is called autozygosity mapping.

## 2.3. *Exome Sequencing*

Genomic DNA (gDNA) was extracted from peripheral blood lymphocytes using a standard phenol/chloroform [17] and ethanol precipitation [18]. A total of 50 ng of gDNA from the proband from each family was subjected to ES with the Nextera Rapid Capture Exome or the TruSeq Exome Enrichment kits (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. An additional family member (IV.1) of family 5 was exome sequenced due to the presence of two distinct phenotypes in the family—namely, HL and a suspected bone disorder. A 2 × 76 bp paired-end read sequencing was performed using a v2 high-output reagent kit with the NextSeq500 sequencer (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Raw bcl sequencing files were converted with the bcl2fastq software (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) and the data were aligned to the human reference genome GRCh37 [19] (hg19).

## 2.4. *Variant Analysis and Prioritization*

Single-nucleotide variants (SNVs) and small indels (<15 bp) were analyzed with the GensearchNGS software (PhenoSystems SA, Wallonia, Belgium). Analysis was supported using an established in-house bioinformatics pipeline based on the GATK toolkit including Burrows-Wheeler (BWA)-based read alignment, base quality score recalibration, indel realignment, duplicate removal, and SNP and indel discovery, with subsequent score recalibration according to the GATK Best Practice recommendations [19–21]. Variant filtering and prioritization were performed using a conservative minor allele frequency <0.01 based on population databases and an alternate allele frequency present at >20% referring to reads. Additional variants not removed by minor allele frequency filtering were

subjected to an in-house allele count filter ( $n = 300$ ) that removed variants appearing  $>2\%$ , as these are too common in our exome dataset to enter manual analysis. Variant prioritization included the tools PolyPhen-2 (PP) [22], SIFT [23], MutationTaster (MT) [24], fathmm [25], LRT [26], and GERP [27]. The Deafness Variation Database [28] was also integrated into our pipeline to permit the quick assessment of variants in known deafness genes. Frequency-based filtering was performed according to a population-specific manner that includes The Greater Middle East Variome Project [29] and gnomAD [30] to account for varying allele frequencies across ethnicities. CNV analysis was performed for 19 out of 21 families using the eXome Hidden MarkovModel (XHMM, version 1.0) approach [31].

### 2.5. Variant Validation and Segregation Testing

The candidate variants remaining after filtering were amplified by PCR using primers designed from the Primer3 software [32]. The primer sequences are shown in Table S1. PCR products were bidirectionally sequenced with an ABI 3130xl 16-capillary sequencer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Sequence reactions were completed with 5× sequencing buffer and big dye terminator (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). DNA sequence analysis was performed using the Gensearch software (Phenosystems SA, Wallonia, Belgium).

## 3. Results

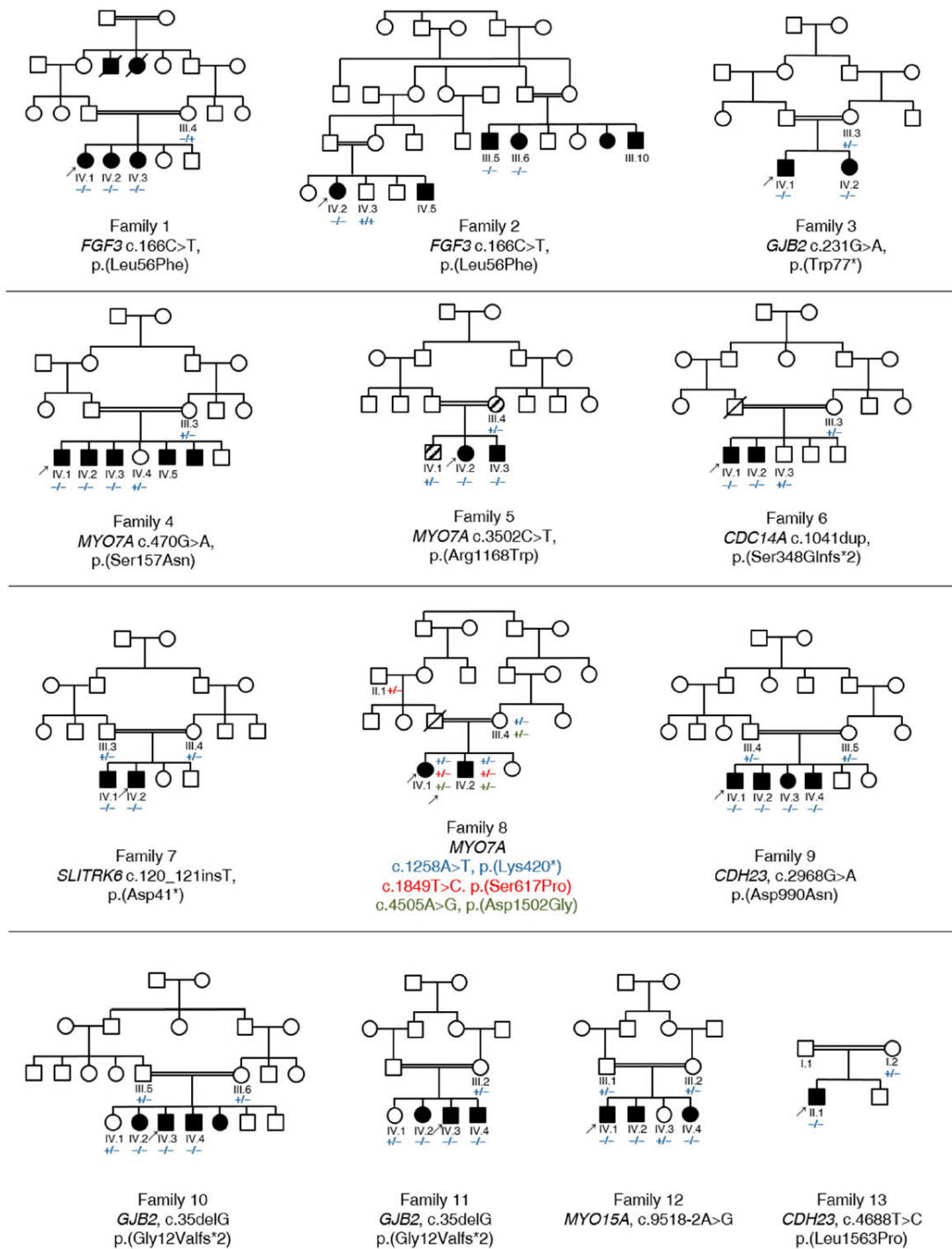
### 3.1. Summary of Affected Genes and Genetic Context

Using ES and bioinformatics analysis, 13 different variants in seven HL-associated genes were identified, including two that have not been previously described in the literature (15.4%). In aggregate, these variants are likely causally associated in 13 out of 21 (61.9%) consanguineous Pakistani families. Pathogenic and likely pathogenic variants were identified in the genes *GJB2*, *MYO7A*, *FGF3*, *CDC14A*, *SLITRK6*, *CDH23*, and *MYO15A* (Table 1). *GJB2* and *MYO7A* were implicated in the genetic diagnosis of almost half of all cases (46.2%). Among the different variant types observed, seven were missense (53.8%), three were nonsense (23.1%), two were frameshift (15.4%), and one was a splice-site variant (7.7%). All the variants were either homozygous or compound heterozygous, showed an autosomal recessive inheritance pattern, and were validated by segregation testing (Figure 1, Figure S1).

**Table 1.** Likely causal variants identified in Pakistani families with hearing loss (HL).

ID	Gene	DFN locus	Transcript	Nucleotide	Protein	Zygoty	MT	PP	SIFT	GERP	LRT	DVD
Family 1	<i>FGF3</i>	–	<b>NM_005247.2</b>	<b>c.166C&gt;T</b>	<b>p.(Leu56Phe)</b>	1/1	DC	PrD	D	C	U	U
Family 2	<i>FGF3</i>	–	<b>NM_005247.2</b>	<b>c.166C&gt;T</b>	<b>p.(Leu56Phe)</b>	1/1	DC	PrD	D	C	U	U
Family 3	<i>GJB2</i>	DFNB1	NM_004004.5	c.231G>A	p.(Trp77*)	1/1	DC	–	–	C	D	P [33]
Family 4	<i>MYO7A</i>	DFNB2	NM_000260.3	c.470G>A	p.(Ser157Asn)	1/1	DC	PrD	D	C	D	P [34]
Family 5	<i>MYO7A</i>	DFNB2	NM_000260.3	c.3502C>T	p.(Arg1168Trp)	1/1	DC	PrD	D	C	D	LP [35]
Family 6	<i>CDC14A</i>	DFNB32	NM_033312.2	c.1041dup [36]	p.(Ser348Glnfs*2) [36]	1/1	–	–	–	–	–	–
Family 7	<b><i>SLITRK6</i></b>	–	<b>NM_032229.2</b>	<b>c.120_121insT</b>	<b>p.(Asp41*)</b>	1/1	–	–	–	–	–	–
Family 8	<i>MYO7A</i>	DFNB2	NM_000260.3	c.1258A>T	p.(Lys420*)	0/1	DC	–	–	C	D	P [37]
				c.1849T>C	p.(Ser617Pro)	0/1	DC	PrD	D	C	D	U [38]
				c.4505A>G	p.(Asp1502Gly)	0/1	DC	PrD	D	C	D	U [6]
Family 9	<i>CDH23</i>	DFNB12	NM_022124.5	c.2968G>A	p.(Asp990Asn)	1/1	DC	PrD	D	C	D	P [39]
Family 10	<i>GJB2</i>	DFNB1	NM_004004.5	c.35delG	p.(Gly12Valfs*2)	1/1	–	–	–	–	–	P [40]
Family 11	<i>GJB2</i>	DFNB1	NM_004004.5	c.35delG	p.(Gly12Valfs*2)	1/1	–	–	–	–	–	P [40]
Family 12	<i>MYO15A</i>	DFNB3	NM_016239.3	c.9518-2A>G		1/1	DC	–	–	C	–	U [5]
Family 13	<i>CDH23</i>	DFNB12	NM_022124.5	c.4688T>C	p.(Leu1563Pro)	1/1	DC	PrD	D	C	D	P [41]

1/1 homozygous; 0/1 heterozygous. Previously undescribed variants are marked in bold. Abbreviations: LRT, Likelihood Ratio Test; MT, MutationTaster; PP, PolyPhen-2; SIFT, Sorting Intolerant from Tolerant; GERP, Genomic Evolutionary Rate Profiling; DVD, Deafness Variation Database; C, conserved; D, deleterious; DC, disease causing; P, pathogenic; LP, likely pathogenic; PrD, probably damaging; U, unknown significance.



**Figure 1.** Pedigree and segregation analysis of known and previously undescribed variants in 13 Pakistani families with HL. All the families have a consanguineous background, marked with double lines. Affected individuals are shown in black symbols, and unaffected parents and siblings are shown in unfilled symbols. Individuals with a bone disorder, but without HL, are shown in striped symbols. Proband who were exome sequenced are marked with an arrow. Deceased individuals are marked with a diagonal line. The mutated and wild type alleles are illustrated with “-” (mutated) and “+” (wild type) symbols, respectively.



### 3.2. Clinical Features and Genetic Spectrum of Patients with Syndromic HL

#### *FGF3*, *MYO7A* and *SLITRK6*

All the affected individuals were clinically diagnosed with congenital, bilateral HL and have a consanguineous background. Five of 21 families (23.8%) revealed a syndromic form of HL. Two of the 21 families were clinically diagnosed with Usher syndrome, one of the most common forms of syndromic HL [8].

The affected individuals who were available for testing in families 1 and 2 reported severe HL and cupped ears (Figure 2A, Table 2) (IV.1, IV.2, IV.3, family 1; III.5, III.6, III.10, IV.2, IV.5, family 2). A homozygous missense c.166C>T, p.(Leu56Phe) variant was identified in *FGF3* (NM\_005247.2; Figure S2) in families 1 and 2 that co-segregated with HL in both families (Figure 1). The variant is predicted to be disease causing (MT, PP, SIFT), involves the substitution of a conserved amino acid (aa), and was not previously published in the literature. The variant is classified as likely pathogenic according to the ClinGen HL working group expert specification [41]. Homozygous variants in *FGF3* have been associated with deafness, accompanied by inner ear agenesis, microtia, and microdontia [42].



**Figure 2.** Clinical aspects of patients with previously unreported variants. (A) Affected individuals in family 1 (IV.1, IV.2, IV.3) and family 2 (only III.5, III.10, IV.2, IV.5 were available for photographs) show cupped ears and report severe HL. (B) Pure-tone audiogram for affected family members IV.1 (blue) and IV.2 (red) in family 7. Left-ear measurements are represented as “x” and right-ear measurements are shown with “o”.

The proband (IV.1) in family 4 and his affected siblings (IV.2, IV.3, IV.5) were diagnosed with Usher syndrome and revealed a homozygous pathogenic missense c.470G>A, p.(Ser157Asn) variant [34] in *MYO7A*. Ophthalmological examination of the proband IV.3 revealed high myopia, cataract, and retinitis pigmentosa in both eyes. Visual acuity was reduced to 5/60 (Snellen equivalent, 20/250), with corrective lenses of  $-12.00/0/0^\circ$  in both eyes. Ophthalmological examination of the proband IV.5 revealed high myopia, cataract, and retinitis pigmentosa in both eyes. Visual acuity was reduced to light perception in the right eye, and 1/60 (Snellen equivalent, worse than 20/1000) in the left eye. Thus, the patient was legally blind. Cataract was more pronounced in the right eye. Ultrasonographic findings of the right eye were within normal limits. The aa substitution weakens the 5' donor splice-site predicted by several in silico prediction tools. A previously published minigene assay that was conducted using nasal epithelial cells proved the skipping of exon 5 in the mutant transcript, which likely results in a truncated protein [43] (Figure 1). Two individuals in family 5 (III.4, IV.1) suffer from a bone disorder but have normal hearing in contrast to the affected family members (IV.2, IV.3), who show a distinct Usher syndrome phenotype (Table 2). The ophthalmological examination of proband IV.2 revealed hyperopia in both eyes ( $+9/0/0^\circ$  in the right eye, and  $+11/0/0^\circ$  in the left eye) and lenticular opacity (cataract) in both eyes. Retinitis pigmentosa was confirmed with indirect ophthalmoscopy with a 20 Diopter power lens. We identified a homozygous pathogenic missense c.3502C>T, p.(Arg1168Trp)

variant [35] in the gene *MYO7A* in affected individuals (IV.2, IV.3) that segregated in family 5. An ES analysis of III.3 and IV.1 did not uncover any variants in genes associated with bone disorders or neuropathies. Both variants that have been identified in family 4 and family 5 are known to cause Usher syndrome type 1 [34,35].

The affected individuals in family 7 (IV.1, IV.2) reported severe-to-profound HL (Table 2, Figure 2B). Ophthalmological examination in IV.1 revealed compound myopic astigmatism and grossly cupped discs diagnosed as glaucoma in both eyes. The macula appeared normal in both eyes. Visual acuity was reduced to 0.5 logMAR in both eyes (Snellen equivalent: 20/63), with corrective lenses of  $-5.50/-2.50/90^\circ$  in the right eye and  $-6.50/-1.00/60^\circ$  in the left eye. Intraocular pressure was 17 mmHg in both eyes. Additionally, Duane retraction syndrome (a congenital neuromuscular dysfunction of the eye movement caused by a failure of the sixth cranial nerve) was diagnosed in the left eye. Other data (e.g., axial length, status of lens, macula/retina, visual field, treatment of glaucoma) were not available. Ophthalmological examination in IV.2 revealed compound myopic astigmatism and myopic alterations with macular degeneration in both eyes. Visual acuity was reduced to count fingers with corrective lenses of  $-5.00/-2.50/90^\circ$  in the right eye and  $-4.00/-3.00/90^\circ$  in the left eye. Intraocular pressure was 15 mmHg in both eyes. Thus, the patient was legally blind. Other data (e.g., axial length, status of lens, macula/retina, visual field, treatment of glaucoma) were not available. Family 7 revealed a segregating novel homozygous nonsense variant c.120\_121insT, p.(Asp41\*) in the gene *SLITRK6* (NM\_032229.2; Figure S2) that was present in both affected family members (IV.1, IV.2) (Figure 1) and was absent in population databases. The variant is classified as likely pathogenic according to the ClinGen HL working group expert specification [41]. Homozygous variants in this gene are known to cause sensorineural deafness and high myopia in humans [44].

Both previously unreported variants have been submitted to the Leiden Open Variation Database (LOVD) v3.0 under the accession IDs 00307903 (*FGF3* c.166C>T, p.(Leu56Phe)) and 00307904 (*SLITRK6* c.120\_121insT, p.(Asp41\*)).

### 3.3. Identification of Causative Variants in Patients with NSHL

#### 3.3.1. *GJB2*

Variants in the gene *GJB2* (NM\_004004.5; DFNB1A, DFNA3A) were identified in three families (3, 10, 11). The proband (IV.1) and his affected sibling (IV.2) in family 3 revealed a common homozygous pathogenic nonsense variant c.231G>A, p.(Trp77\*) [33] that was consistent with the familial segregation analysis (Figure 1). The probands in families 10 (IV.3) and 11 (IV.3) revealed a prevalent homozygous pathogenic frameshift variant c.35delG, p.(Gly12Valfs\*2) [40] that segregated in both families (Figure 1). In this study, variants in *GJB2* accounted for 23.1% of the 13 resolved families and comprised 14.3% (3 out of 21) of the total diagnostic yield.

#### 3.3.2. *MYO7A*

Family 8 revealed three different heterozygous *MYO7A* variants: c.1258A>T, p.(Lys420\*) [37], c.1849T>C, p.(Ser617Pro) [38], and c.4505A>G, p.(Asp1502Gly) [6]. All three heterozygous variants were identified exclusively in the affected individuals (IV.1, IV.2). The unaffected mother (III.4) revealed only two of the variants (c.1258A>T, p.(Lys420\*); c.4505A>G, p.(Asp1502Gly)) and the unaffected paternal grandfather (II.1) was confirmed with the third variant c.1849T>C, p.(Ser617Pro), confirming a compound heterozygosity of p.(Lys420\*) and p.(Ser617Pro) (Figure 1). Vision was normal in all the affected individuals, and Usher syndrome was not confirmed. Ophthalmological examination in proband IV.1 revealed no significant ocular problems in either eye. Visual acuity was 6/6 (Snellen equivalent, 20/20) in both eyes. Photographs of the central retina showed the optic disc, macula, and vessels within normal limits in both eyes.

In aggregate, *MYO7A* (NM\_000260.3; DFNA11, DFNB2, USH1B) was affected in three families, accounting for 23.1% of the overall diagnostic yield.

**Table 2.** Clinical information for Pakistani families.

ID	Phenotype	Affected Family Members	Unaffected Family Members
Family 1	HL, cupped ears	IV.1, IV.2, IV.3	III.4
Family 2	HL, cupped ears	III.5, III.6, III.10 <sup>1</sup> , IV.2, IV.5 <sup>1</sup>	IV.3
Family 3	HL	IV.1 (25 y/o), IV.2 (10 y/o)	III.3
Family 4	Usher syndrome	IV.1 (35 y/o), IV.2 (33 y/o), IV.3 (32 y/o), IV.5 (33 y/o) <sup>1</sup>	III.3, IV.4
Family 5	Usher syndrome <sup>2</sup> , bone disorder <sup>2</sup>	IV.2 (30 y/o), IV.3 (18 y/o); Usher syndrome	III.4, IV.1; bone disorder
Family 6	severe-to-profound HL, compound myopic astigmatism	IV.1 (30 y/o), IV.2 (28 y/o)	III.3, IV.3
Family 7	severe-to-profound HL, compound myopic astigmatism, glaucoma	IV.1 (26 y/o), IV.2 (23 y/o)	III.3, III.4
Family 8	HL	IV.1 (13 y/o), IV.2 (12 y/o)	II.1, III.4
Family 9	HL	IV.1 (33 y/o), IV.2 (32 y/o), IV.3 (20 y/o), IV.4 (18 y/o)	III.4, III.5
Family 10	HL	IV.2 (14 y/o), IV.3 (13 y/o), IV.4 (12 y/o)	III.5, III.6, IV.1
Family 11	HL	IV.2 (16 y/o), IV.3 (14 y/o), IV.4 (12 y/o)	III.2, IV.1
Family 12	HL	IV.1 (15 y/o), IV.2 (15 y/o), IV.4 (10 y/o)	III.1, III.2, IV.3
Family 13	HL	II.1 (11 y/o)	I.2

Abbreviations: HL, hearing loss; y/o, years old available ages for affected individuals; <sup>1</sup> no DNA available for testing, only clinical photographs (Figure 2A) or ophthalmological examination; <sup>2</sup> two distinct phenotypes within the family.

### 3.3.3. *CDC14A*, *CDH23* and *MYO15A*

Family 6 reported severe-to-profound HL and suffers from compound myopic astigmatism (IV.1, IV.2). A frameshift variant (c.1041dup, p.(Ser348Glnfs\*2)) was identified in the deafness gene *CDC14A* (NM\_033312.2, DFN32) in affected family members of family 6 (IV.1, IV.2) and co-segregated with HL in this family (Figure 1). Both affected individuals are unmarried and have no children. This variant was described as disease causing supported by functional RT-qPCR validation [36].

We identified two families with variants in the gene *CDH23*. The proband of family 9 (IV.1) revealed a homozygous pathogenic *CDH23* (NM\_022124.5, DFN12) missense variant c.2968G>A, p.(Asp990Asn) [39] that was validated via Sanger sequencing and was also present in three affected siblings (IV.2, IV.3, IV.4) (Figure 1). The affected proband in family 13 showed a segregating homozygous pathogenic missense variant c.4688T>C, p.(Leu1563Pro) [45] in the gene *CDH23* (Figure 1).

Furthermore, we identified a homozygous splice-site variant c.9518-2A>G in *MYO15A* (NM\_016239.3, DFN3) in the proband (IV.1) and affected siblings (IV.2, IV.4) in family 12 (Figure 1). This variant likely mediates the loss of the canonical splice acceptor site predicted by several in silico prediction tools and was previously reported in another Pakistani family with NSHL [5].

### 3.4. Autosomal Recessive HL Loci

Genome-wide genotyping and autozygosity mapping that were performed for 13 Pakistani families revealed loci for autosomal recessive HL (hg19) (Table 3).

The homozygous c.166C>T, p.(Leu56Phe) variant in *FGF3* was identified and supported by linkage intervals spanning 33.5 Mb and 6.1 Mb for families 1 and 2 (Table 3), respectively. The 19.4 Mb interval in family 4 (Table 3) included the homozygous c.470G>A, p.(Ser157Asn) variant in *MYO7A*. Family 5 revealed a 3.7 Mb interval that contained the c.3502C>T, p.(Arg1168Trp) variant in *MYO7A*. The longest interval (13.6 Mb) of the mapping data in family 6 (Table 3) was concordant with the homozygous c.1041dup, p.(Ser348Glnfs\*2) variant in *CDC14A* detected by exome analysis. Family 7 revealed a 15.9 Mb interval (Table 3) on chromosome 13, encompassing *SLITRK6* and its homozygous c.120\_121insT, p.(Asp41\*) variant. The longest interval in family 9 (13.9 Mb, Table 3) included the homozygous *CDH23* c.2968G>A, p.(Asp990Asn) variant. Both intervals in families 10 (3.3 Mb, Table 3) and 11 (4.4 Mb, Table 3) included *GJB2*. Family 12 revealed a 7.7 Mb interval (Table 3) that was consistent with the exome data and includes *MYO15A*. The longest interval in family 13 (29.0 Mb) contained the homozygous *CDH23* c.4688T>C, p.(Leu1563Pro) variant (Table 3).

The most significant linkage intervals in families 3 and 8 did not include the affected genes *GJB2* and *MYO7A*. However, the longest interval in family 3 is located slightly outside of the *GJB2* gene coordinates.

**Table 3.** Loci for autosomal recessive HL in 13 Pakistani families.

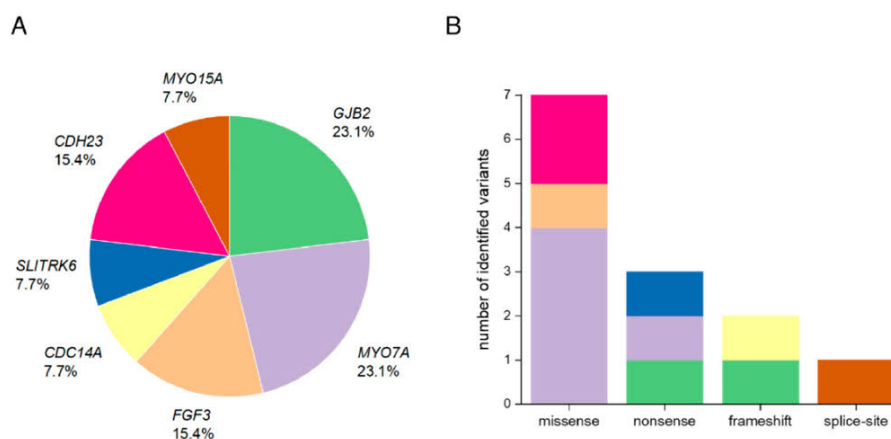
Family ID	Chromosomal Band	Region of Autozygosity Identified by Linkage Analysis (hg19)	Length (Mb)	LOD	Causal Gene in Locus	Gene Coordinates (hg19)
Family 1	11p12-q13.4	39,536,493–73,025,971	33.5	2.529	<i>FGF3</i>	chr11:69,624,736–69,634,192
Family 2	11q13.1-q13.3	63,870,810–69,964,525	6.1	3.73	<i>FGF3</i>	chr11:69,624,736–69,634,192
Family 3 *	13q12.11-q14.11	22,661,666–41,063,028	18.4	1.927		
Family 4	11q13.3-q14.3	69,063,393–88,489,081	19.4	2.529	<i>MYO7A</i>	chr11:76,839,310–76,926,284
Family 5	11q13.5-q14.1	76,792,431–80,457,784	3.7	1.927	<i>MYO7A</i>	chr11:76,839,310–76,926,284
Family 6	1p22.2-p21.2	88,430,037–102,069,696	13.6	1.927	<i>CDC14A</i>	chr1:100,810,598–100,985,833
Family 7	13q22.1-q31.3	74,995,660–90,925,494	15.9	1.2	<i>SLITRK6</i>	chr13:86,366,925–86,373,554
Family 8	No interval close to <i>MYO7A</i>					
Family 9	10q21.2-q22.3	64,059,261–78,005,230	13.9	3.006	<i>CDH23</i>	chr10:73,156,691–73,575,702
Family 10	13q11-q12.11	19,121,950–22,395,049	3.3	2.529	<i>GJB2</i>	chr13:20,761,609–20,767,037
Family 11	13q11-q12.12	19,121,950–23,534,670	4.4	2.529	<i>GJB2</i>	chr13:20,761,609–20,767,037
Family 12	17p12-p11.2	13,801,016–21,539,613	7.7	2.529	<i>MYO15A</i>	chr17:18,012,020–18,083,116
Family 13	10q21.2-q23.31	61,998,060–91,002,927	29.0	1.2	<i>CDH23</i>	chr10:73,156,691–73,575,702

Abbreviations: LOD, logarithm of the odds. \* Family 3 revealed a homozygous interval outside but near the *GJB2* gene locus.

#### 4. Discussion

Geographically or culturally isolated populations that have high rates of consanguinity, such as the Pakistani families included in this study, have proven valuable for novel HL gene identification studies and for contributing to a greater understanding of the alleles implicated in HL [46–48]. Although our patient cohort was relatively small, the overall resolve rate in this study of 61.9% is nonetheless comparable to other studies with consanguineous families that have showed a resolve rate of 67% [49]. As expected, most of the families revealed variants that were homozygous (92.3%) and compound heterozygous (7.7%) and were primarily found in ARHL-associated genes.

We identified causative variants in seven HL-associated genes. Many of these variants were missense (53.8%, Figure 3B), which is consistent with the mutational characteristics of deafness genes [50]. Unlike previous studies investigating the genetic spectrum of hearing-impaired Pakistani patients that have described *SLC26A4* as a frequent cause of HL in this population, causal variants in this gene were not present in our cohort. This is likely explained due to the restricted geographical region from which our families were recruited and the existence of prevalent founder variants in this gene, especially in the Pakistani population, that were absent in our relatively small cohort [51].



**Figure 3.** Overview of the affected genes and the distribution of different variant types in Pakistani families with HL. (A) Overall percentage of each affected gene in 13 Pakistani families. (B) Number of identified variants by type (missense, nonsense, frameshift, splice-site). The color code refers to the genes that are marked in (A).

Genes that are most frequently implicated in autosomal recessive NSHL (ARNSHL) in consanguineous families from Pakistan are *GJB2* (MIM \*121011), *SLC26A4* (MIM \*605646), *MYO15A* (MIM \*602666), *OTOF* (MIM \*603681), *CDH23* (MIM \*605516), *TMC1* (MIM \*606706), *MYO7A*

(MIM \*276903), and *HGF* (MIM \*142409) [6,52,53]. Variants in the genes *MYO7A* and *GJB2* accounted for a combined 46.2% of all diagnoses in the present study which is consistent with previously published rates from Pakistani cohort studies (Figure 3A) [5–7]. We also identified the c.231G>A, p.(Trp77\*) variant in one family that has been reported as one of the most common *GJB2* alleles in Pakistani HL patients [54].

Interestingly, disease-causing variants in Pakistani patients with NSHL often involved genes that were also associated with syndromic HL, such as *MYO7A* [55] or *CDH23* [39]. For example, patients with a diagnosis of Usher syndrome type 1B (MIM \*276900) show profound congenital hearing impairment, retinitis pigmentosa, vestibular dysfunction, and biallelic causal variants in *MYO7A* [56]. In this study, pathogenic variants of *MYO7A* were identified in three families (4, 5, 8). Affected individuals in family 4 and family 5 were confirmed with Usher syndrome, which is characterized by severe auditory and ophthalmic symptoms. Both of the homozygous variants that have been identified in family 4 (c.470G>A, p.(Ser157Asn)) and 5 (c.3502C>T, p.(Arg1168Trp)) are known to cause Usher syndrome type 1 [34,35].

Family 8 revealed three different heterozygous variants in *MYO7A*, with all three of them exclusively present in both affected siblings (IV.1, IV.2), in whom Usher syndrome was excluded. Interestingly, two of the three identified variants (c.1258A>T, c.4505A>G) were previously described in a Pakistani family reporting ARNSHL [6]. Richard et al. [6] also described a third heterozygous variant (c.3502C>T) that differs from the third variant in the present study (c.1849T>C). In family 8, the two c.1258A>T and c.4505A>G variants were inherited from the maternal allele (III.4), and the c.1849T>C variant was an inferred paternally inherited allele, thus confirming compound heterozygosity in both affected patients (IV.1, IV.2) of c.1258A>T, p.(Lys420\*) and c.1849T>C, p.(Ser617Pro) (Figure 1). The absent homozygous interval in a region that contains *MYO7A* supports a suspected compound heterozygosity for the variants in this family. It remains to be determined if the double mutated maternal allele is either a broadly segregating allele in the Pakistani population or if the two families are possibly distantly related.

The homozygous c.2968G>A, p.(Asp990Asn) missense variant in *CDH23* segregating in family 9 was identified as a recurrent variant in South Indian families with HL [57] and is known to cause ARNSHL [39]. The second pathogenic homozygous missense variant in *CDH23* (c.4688T>C, p.(Leu1563Pro)), which is known to cause non-syndromic deafness, has been identified in family 13 [45].

We identified two unrelated families (1, 2) with the same c.166C>T, p.(Leu56Phe) variant in the gene *FGF3*. Recessive variants in *FGF3* have been described in patients diagnosed with LAMM syndrome, which is characterized by congenital deafness with labyrinthine aplasia (LA), microtia (M) and microdontia (M) (MIM \*610706) [42]. The phenotypic characteristics in patients can vary from fully penetrant LAMM syndrome to milder forms with less severe syndromic features [58]. Probands from families 1 and 2 show HL and cupped ears (Figure 2A), which overlap with milder phenotypic characteristics such as minor dental and external ear phenotypes that were previously described in the literature. We cannot exclude an inner ear malformation in the affected individuals due to absent temporal bone CTs.

Three nonsense variants were found in the genes *GJB2*, *SLITRK6*, and *MYO7A* (Figure 3). While the c.231G>A, p.(Trp77\*) variant in *GJB2* and the c.1258A>T, p.(Lys420\*) variant in *MYO7A* were previously described as pathogenic, the nonsense variant c.120\_121insT, p.(Asp41\*) in *SLITRK6*, segregating in family 7, was novel. The effect of the induced stop-codon at amino acid position 41 out of 841 amino acids encoding *SLITRK6* would truncate 95% of the protein and likely be targeted by nonsense-mediated mRNA decay (NMD) [59]. To date, only five variants are known to cause the associated autosomal recessive deafness and myopia syndrome [44,60,61] that is consistent with the phenotype in family 7. Myopia in deafness and myopia syndrome has been reported to range between –6 and –11 diopters [44,62]. Findings in both siblings (IV.1, IV.2) in family 7 and affected individuals (IV.3, IV.5) in family 4, who had undergone ophthalmological examination were consistent with high myopia. Additionally, IV.3 and IV.5 in family 4, and IV.2 in family 5 showed findings typical for retinitis

pigmentosa. Interestingly, all the previously identified variants are also either nonsense or frameshift variants, suggesting loss-of-function as an underlying mechanism. Consistently, *Slitrk6* knock-out mice showed distinct reduction in cochlear innervation and a defective auditory brainstem response [44].

Family 12 revealed a homozygous splice-site variant c.9518-2A>G in intron 57 of *MYO15A* [5]. This variant likely mediates the complete loss of the 3' acceptor site according to several in silico prediction tools, and possibly results in the skipping of exon 58. Variants that occur in important consensus sequences at the exon-intron boundaries, thus disrupting the actual splicing process, are known to be the cause of a variety of human diseases [63].

## 5. Conclusions

The present study of 21 Pakistani families identified two novel alleles causing HL and emphasizes the importance of investigating different populations and their heterogeneous genetic background. The fact that 38.1% of the 21 examined families are still considered unresolved highlights a possible area in which the further application of advanced sequencing and analysis methods could uncover currently unrecognized genetic changes due to technical limitations. Candidate genes have been identified in four families that are presently undergoing functional analysis. In families without candidate genes identified, genome sequencing would support uniform copy number variation analysis and the analysis of deep intronic or regulatory variants that are difficult to ascertain by ES. Some of the limitations of the study include potentially insufficient coverage of homopolymeric or GC-rich regions and the existence of mapping difficulties for regions containing pseudogenes or larger deletions, insertions, or structural rearrangements, as listed in previous ES studies, and may diagnose some of the unresolved families [64]. Nevertheless, an ES approach is still the method of choice for elucidating genetic variants in a large portion of heritable human disorders, including HL.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4425/11/11/1329/s1>: Figure S1: Sanger-sequencing chromatograms of 13 Pakistani families with HL. Figure S2: Overview of previously undescribed and known HL-related variants in *FGF3* and *SLITRK6*. Table S1: Primer sequences for identified variants in 13 Pakistani families with HL.

**Author Contributions:** Conceptualization, T.H., H.-G.K., B.V.; Manuscript drafting, J.D., B.V.; Ascertained families and obtained clinical data, S.K., N.M., S.A.K., H.N., A.K., N.A., L.C.L., I.K., I.-K.K., H.-G.K.; Supervision, T.H., I.N., B.V.; Exome sequencing and segregation analysis, J.D., L.S., S.M.K., M.A.H.H., T.R., T.D.G., J.D.J.L., B.V.; Autozygosity mapping and linkage analysis, F.R.; Interpretation of ophthalmological data, L.K.; Bioinformatics support, T.M., M.D. All the authors participated in final review and editing of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** The authors would like to express their sincere gratitude to the families for their participation in this study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Hamamy, H. Consanguineous marriages: Preconception consultation in primary health care settings. *J. Community Genet.* **2012**, *3*, 185–192. [CrossRef] [PubMed]
2. Hussain, R.; Bittles, A.H. The prevalence and demographic characteristics of consanguineous marriages in Pakistan. *J. Biosoc. Sci.* **1998**, *30*, 261–275. [CrossRef] [PubMed]
3. Zakzouk, S. Consanguinity and hearing impairment in developing countries: A custom to be discouraged. *J. Laryngol. Otol.* **2002**, *116*, 811–816. [CrossRef] [PubMed]
4. Morton, C.C.; Nance, W.E. Newborn hearing screening—a silent revolution. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 2151–2164. [CrossRef] [PubMed]
5. Khan, A.; Han, S.; Wang, R.; Ansar, M.; Ahmad, W.; Zhang, X. Sequence variants in genes causing nonsyndromic hearing loss in a Pakistani cohort. *Mol. Genet. Genom. Med.* **2019**, *7*, e917. [CrossRef] [PubMed]

6. Richard, E.M.; Santos-Cortez, R.L.P.; Faridi, R.; Rehman, A.U.; Lee, K.; Shahzad, M.; Acharya, A.; Khan, A.A.; Imtiaz, A.; Chakchouk, I.; et al. Global genetic insight contributed by consanguineous Pakistani families segregating hearing loss. *Hum. Mutat.* **2019**, *40*, 53–72. [[CrossRef](#)]
7. Shafique, S.; Siddiqi, S.; Schraders, M.; Oostrik, J.; Ayub, H.; Bilal, A.; Ajmal, M.; Seco, C.Z.; Strom, T.M.; Mansoor, A.; et al. Genetic spectrum of autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Pakistani families. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e100146. [[CrossRef](#)]
8. Parker, M.; Bitner-Glindzicz, M. Genetic investigations in childhood deafness. *Arch. Dis. Child.* **2015**, *100*, 271–278. [[CrossRef](#)]
9. Bademci, G.; Cengiz, F.B.; Foster Ii, J.; Duman, D.; Sennaroglu, L.; Diaz-Horta, O.; Atik, T.; Kirazli, T.; Olgun, L.; Alper, H.; et al. Variations in Multiple Syndromic Deafness Genes Mimic Non-syndromic Hearing Loss. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31622. [[CrossRef](#)]
10. Sajjad, M.; Khattak, A.A.; Bunn, J.E.; Mackenzie, I. Causes of childhood deafness in Pukhtoonkhwa Province of Pakistan and the role of consanguinity. *J. Laryngol. Otol.* **2008**, *122*, 1057–1063. [[CrossRef](#)]
11. Vona, B.; Nanda, I.; Hofrichter, M.A.; Shehata-Dieler, W.; Haaf, T. Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future. *Mol. Cell Probes* **2015**, *29*, 260–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Mazzoli, M.; Van Camp, G.; Newton, V.; Giarbini, N.; Declau, F.; Parving, A. Recommendations for the description of genetic and audiological data for families with nonsyndromic hereditary hearing impairment. *Audiol. Med.* **2003**, *1*, 148–150.
13. Ruschendorf, F.; Nurnberg, P. ALOHOMORA: A tool for linkage analysis using 10K SNP array data. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 2123–2125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Abecasis, G.R.; Cherny, S.S.; Cookson, W.O.; Cardon, L.R. GRR: Graphical representation of relationship errors. *Bioinformatics* **2001**, *17*, 742–743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. O'Connell, J.R.; Weeks, D.E. PedCheck: A program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**, *63*, 259–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Abecasis, G.R.; Cherny, S.S.; Cookson, W.O.; Cardon, L.R. Merlin-rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 97–101. [[CrossRef](#)]
17. Sambrook, J.; Russell, D.W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: Chloroform. *CSH Protoc.* **2006**, *2006*. [[CrossRef](#)]
18. Green, M.R.; Sambrook, J. Precipitation of DNA with Ethanol. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *2016*. [[CrossRef](#)]
19. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 589–595. [[CrossRef](#)]
20. DePristo, M.A.; Banks, E.; Poplin, R.; Garimella, K.V.; Maguire, J.R.; Hartl, C.; Philippakis, A.A.; del Angel, G.; Rivas, M.A.; Hanna, M.; et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 491–498. [[CrossRef](#)]
21. 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 Res.* **2010**, *20*, 1297–1303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Adzhubei, I.A.; Schmidt, S.; Peshkin, L.; Ramensky, V.E.; Gerasimova, A.; Bork, P.; Kondrashov, A.S.; Sunyaev, S.R. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 248–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ng, P.C.; Henikoff, S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2006**, *7*, 61–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Schwarz, J.M.; Cooper, D.N.; Schuelke, M.; Seelow, D. MutationTaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 361–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shihab, H.A.; Gough, J.; Cooper, D.N.; Stenson, P.D.; Barker, G.L.; Edwards, K.J.; Day, I.N.; Gaunt, T.R. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum. Mutat.* **2013**, *34*, 57–65. [[CrossRef](#)]
26. Chun, S.; Fay, J.C. Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res.* **2009**, *19*, 1553–1561. [[CrossRef](#)]
27. Cooper, G.M.; Stone, E.A.; Asimenos, G.; Green, E.D.; Batzoglu, S.; Sidow, A. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res.* **2005**, *15*, 901–913. [[CrossRef](#)]

28. Shearer, A.E.; Eppsteiner, R.W.; Booth, K.T.; Ephraim, S.S.; Gurrola, J., II; Simpson, A.; Black-Ziegelbein, E.A.; Joshi, S.; Ravi, H.; Giuffre, A.C.; et al. Utilizing ethnic-specific differences in minor allele frequency to recategorize reported pathogenic deafness variants. *Am. J. Hum. Genet.* **2014**, *95*, 445–453. [[CrossRef](#)]
29. Scott, E.M.; Halees, A.; Itan, Y.; Spencer, E.G.; He, Y.; Azab, M.A.; Gabriel, S.B.; Belkadi, A.; Boisson, B.; Abel, L.; et al. Characterization of Greater Middle Eastern genetic variation for enhanced disease gene discovery. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 1071–1076. [[CrossRef](#)]
30. Karczewski, K.J.; Francioli, L.C.; Tiao, G.; Cummings, B.B.; Alfoldi, J.; Wang, Q.; Collins, R.L.; Laricchia, K.M.; Ganna, A.; Birnbaum, D.P.; et al. Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *bioRxiv* **2019**. [[CrossRef](#)]
31. Fromer, M.; Purcell, S.M. Using XHMM Software to Detect Copy Number Variation in Whole-Exome Sequencing Data. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **2014**, *81*, 7–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kelsell, D.P.; Dunlop, J.; Stevens, H.P.; Lench, N.J.; Liang, J.N.; Parry, G.; Mueller, R.F.; Leigh, I.M. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* **1997**, *387*, 80–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jaijo, T.; Aller, E.; Oltra, S.; Beneyto, M.; Najera, C.; Ayuso, C.; Baiget, M.; Carballo, M.; Antinolo, G.; Valverde, D.; et al. Mutation profile of the MYO7A gene in Spanish patients with Usher syndrome type I. *Hum. Mutat.* **2006**, *27*, 290–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Le Guedard-Mereuze, S.; Vache, C.; Baux, D.; Faugere, V.; Larrieu, L.; Abadie, C.; Janecke, A.; Claustres, M.; Roux, A.F.; Tuffery-Giraud, S. Ex vivo splicing assays of mutations at noncanonical positions of splice sites in USHER genes. *Hum. Mutat.* **2010**, *31*, 347–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Doll, J.; Kolb, S.; Schnapp, L.; Rad, A.; Ruschendorf, F.; Khan, I.; Adli, A.; Hasanzadeh, A.; Liedtke, D.; Knaup, S.; et al. Novel Loss-of-Function Variants in CDC14A are Associated with Recessive Sensorineural Hearing Loss in Iranian and Pakistani Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 311. [[CrossRef](#)]
37. Cremers, F.P.; Kimberling, W.J.; Kulm, M.; de Brouwer, A.P.; van Wijk, E.; te Brinke, H.; Cremers, C.W.; Hoefsloot, L.H.; Banfi, S.; Simonelli, F.; et al. Development of a genotyping microarray for Usher syndrome. *J. Med. Genet.* **2007**, *44*, 153–160. [[CrossRef](#)]
38. Carss, K.J.; Arno, G.; Erwood, M.; Stephens, J.; Sanchis-Juan, A.; Hull, S.; Megy, K.; Grozeva, D.; Dewhurst, E.; Malka, S.; et al. Comprehensive Rare Variant Analysis via Whole-Genome Sequencing to Determine the Molecular Pathology of Inherited Retinal Disease. *Am. J. Hum. Genet.* **2017**, *100*, 75–90. [[CrossRef](#)]
39. Bork, J.M.; Peters, L.M.; Riazuddin, S.; Bernstein, S.L.; Ahmed, Z.M.; Ness, S.L.; Polomeno, R.; Ramesh, A.; Schloss, M.; Srisailpathy, C.R.; et al. Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene CDH23. *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, *68*, 26–37. [[CrossRef](#)]
40. Zelante, L.; Gasparini, P.; Estivill, X.; Melchionda, S.; D'Agruma, L.; Govea, N.; Mila, M.; Monica, M.D.; Lutfi, J.; Shohat, M.; et al. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum. Mol. Genet.* **1997**, *6*, 1605–1609. [[CrossRef](#)]
41. Schultz, J.M.; Bhatti, R.; Madeo, A.C.; Turriff, A.; Muskett, J.A.; Zalewski, C.K.; King, K.A.; Ahmed, Z.M.; Riazuddin, S.; Ahmad, N.; et al. Allelic hierarchy of CDH23 mutations causing non-syndromic deafness DFNB12 or Usher syndrome USH1D in compound heterozygotes. *J. Med. Genet.* **2011**, *48*, 767–775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Oza, A.M.; DiStefano, M.T.; Hemphill, S.E.; Cushman, B.J.; Grant, A.R.; Siegert, R.K.; Shen, J.; Chapin, A.; Boczek, N.J.; Schimmenti, L.A.; et al. Expert specification of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for genetic hearing loss. *Hum. Mutat.* **2018**, *39*, 1593–1613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Tekin, M.; Hisimi, B.O.; Fitoz, S.; Ozdag, H.; Cengiz, F.B.; Sirmaci, A.; Aslan, I.; Inceoglu, B.; Yuksel-Konuk, E.B.; Yilmaz, S.T.; et al. Homozygous mutations in fibroblast growth factor 3 are associated with a new form of syndromic deafness characterized by inner ear agenesis, microtia, and microdontia. *Am. J. Hum. Genet.* **2007**, *80*, 338–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Aparisi, M.J.; Garcia-Garcia, G.; Aller, E.; Sequedo, M.D.; de la Camara, C.M.-F.; Rodrigo, R.; Armengot, M.; Cortijo, J.; Milara, J.; Diaz, L.M.; et al. Study of USH1 splicing variants through minigenes and transcript analysis from nasal epithelial cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



45. Tekin, M.; Chioza, B.A.; Matsumoto, Y.; Diaz-Horta, O.; Cross, H.E.; Duman, D.; Kokotas, H.; Moore-Barton, H.L.; Sakoori, K.; Ota, M.; et al. SLITRK6 mutations cause myopia and deafness in humans and mice. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 2094–2102. [[CrossRef](#)]
46. Yan, D.; Kannan-Sundhari, A.; Vishwanath, S.; Qing, J.; Mittal, R.; Kameswaran, M.; Liu, X.Z. The Genetic Basis of Nonsyndromic Hearing Loss in Indian and Pakistani Populations. *Genet. Test. Mol. Biomark.* **2015**, *19*, 512–527. [[CrossRef](#)]
47. Heutink, P.; Oostra, B.A. Gene finding in genetically isolated populations. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 2507–2515. [[CrossRef](#)]
48. Friedman, T.B.; Griffith, A.J. Human nonsyndromic sensorineural deafness. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2003**, *4*, 341–402. [[CrossRef](#)]
49. Sloan-Heggen, C.M.; Babanejad, M.; Beheshtian, M.; Simpson, A.C.; Booth, K.T.; Ardalani, F.; Frees, K.L.; Mohseni, M.; Mozafari, R.; Mehrjoo, Z.; et al. Characterising the spectrum of autosomal recessive hereditary hearing loss in Iran. *J. Med. Genet.* **2015**, *52*, 823–829. [[CrossRef](#)]
50. Azaiez, H.; Booth, K.T.; Ephraim, S.S.; Crone, B.; Black-Ziegelbein, E.A.; Marini, R.J.; Shearer, A.E.; Sloan-Heggen, C.M.; Kolbe, D.; Casavant, T.; et al. Genomic Landscape and Mutational Signatures of Deafness-Associated Genes. *Am. J. Hum. Genet.* **2018**, *103*, 484–497. [[CrossRef](#)]
51. Anwar, S.; Riazuddin, S.; Ahmed, Z.M.; Tasneem, S.; Ateequl, J.; Khan, S.Y.; Griffith, A.J.; Friedman, T.B.; Riazuddin, S. SLC26A4 mutation spectrum associated with DFNB4 deafness and Pendred’s syndrome in Pakistanis. *J. Hum. Genet.* **2009**, *54*, 266–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Hilgert, N.; Smith, R.J.; Van Camp, G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat. Res.* **2009**, *681*, 189–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Schultz, J.M.; Khan, S.N.; Ahmed, Z.M.; Riazuddin, S.; Waryah, A.M.; Chhatre, D.; Starost, M.F.; Ploplis, B.; Buckley, S.; Velasquez, D.; et al. Noncoding mutations of HGF are associated with nonsyndromic hearing loss, DFNB39. *Am. J. Hum. Genet.* **2009**, *85*, 25–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Anjum, S.; Azhar, A.; Tariq, M.; Baig, S.M.; Bolz, H.J.; Qayyum, M.; Naqvi, S.M.S.; Raja, G.K. GJB2 Gene Mutations Causing Hearing Loss in Pakistani Families. *Pak. J. Life Soc. Sci.* **2014**, *12*, 126–131.
55. Liu, X.Z.; Walsh, J.; Mburu, P.; Kendrick-Jones, J.; Cope, M.J.; Steel, K.P.; Brown, S.D. Mutations in the myosin VIIA gene cause non-syndromic recessive deafness. *Nat. Genet.* **1997**, *16*, 188–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Weil, D.; Blanchard, S.; Kaplan, J.; Guilford, P.; Gibson, F.; Walsh, J.; Mburu, P.; Varela, A.; Levilliers, J.; Weston, M.D.; et al. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* **1995**, *374*, 60–61. [[CrossRef](#)]
57. Vanniya, S.P.; Chandru, J.; Pavithra, A.; Jeffrey, J.M.; Kalaimathi, M.; Ramakrishnan, R.; Karthikeyan, N.P.; Srikumari, C.R.S. Recurrence of reported CDH23 mutations causing DFNB12 in a special cohort of South Indian hearing impaired assortative mating families—An evaluation. *Ann. Hum. Genet.* **2018**, *82*, 119–126. [[CrossRef](#)]
58. Riazuddin, S.; Ahmed, Z.M.; Hegde, R.S.; Khan, S.N.; Nasir, I.; Shaukat, U.; Riazuddin, S.; Butman, J.A.; Griffith, A.J.; Friedman, T.B.; et al. Variable expressivity of FGF3 mutations associated with deafness and LAMM syndrome. *BMC Med. Genet.* **2011**, *12*, 21. [[CrossRef](#)]
59. Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay: Splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 89–99. [[CrossRef](#)]
60. Salime, S.; Riahi, Z.; Elrharchi, S.; Elkhatabi, L.; Charoute, H.; Nahili, H.; Rouba, H.; Kabine, M.; Bonnet, C.; Petit, C.; et al. A novel mutation in SLITRK6 causes deafness and myopia in a Moroccan family. *Gene* **2018**, *659*, 89–92. [[CrossRef](#)]
61. Van Beeck Calkoen, E.A.; Engel, M.S.D.; van de Kamp, J.M.; Yntema, H.G.; Goverts, S.T.; Mulder, M.F.; Merkus, P.; Hensen, E.F. The etiological evaluation of sensorineural hearing loss in children. *Eur. J. Pediatr.* **2019**, *178*, 1195–1205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ordonez, J.L.; Tekin, M. Deafness and Myopia Syndrome. In *GeneReviews(R)*; Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J.H., Stephens, K., Amemiya, A., Eds.; University of Washington: Seattle, WA, USA, 1993.
63. Anna, A.; Monika, G. Splicing mutations in human genetic disorders: Examples, detection, and confirmation. *J. Appl. Genet.* **2018**, *59*, 253–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

64. Sheppard, S.; Biswas, S.; Li, M.H.; Jayaraman, V.; Slack, I.; Romasko, E.J.; Sasson, A.; Brunton, J.; Rajagopalan, R.; Sarmady, M.; et al. Utility and limitations of exome sequencing as a genetic diagnostic tool for children with hearing loss. *Genet. Med.* **2018**, *20*, 1663–1676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 11.4. Eigenanteil der Promovendin

**Description of the specific contributions of the PhD-candidate to a publication with several co-authors and confirmation by the co-authors**Julia Doll, Institute of Human Genetics

PhD-student and department

Title of the publication:

**“Novel loss-of-function variants in *CDC14A* are associated with recessive sensorineural hearing loss in Iranian and Pakistani patients”**

Names of Co-Authors:

**Julia Doll**, Susanne Kolb, Linda Schnapp, Aboufazel Rad, Franz Rüschenhoff, Imran Khan, Abolfazl Adli, Atefeh Hasanzadeh, Daniel Liedtke, Sabine Knaup, Michaela AH Hofrichter, Tobias Müller, Marcus Dittich, Il-Keun Kong, Hyung-Goo Kim, Thomas Haaf, Barbara Vona

Publication details	Description of the own contribution
<b>Writing of the article</b> Which parts of the article have been written to which extent by the candidate?	Drafting and finalizing the manuscript
<b>Performed research</b> Which experimental procedures have been conducted by the candidate?	Segregation analysis  Homozygosity Mapping  RNA isolation and RT-qPCR
<b>Conceptual design of the research</b> To which extent did the candidate contribute to the conceptional design of the research project?	
<b>Data analysis</b> To which extent did the candidate contribute to the data analysis?	Exome analysis  RT-qPCR analysis
<b>Overall contribution of the candidate (in %)</b>	65%

## Confirmation by co-authors:

Name Co-author	Signature	Date
Julia Doll		17.02.2021
Susanne Kolb		01.03.2021
Linda Schnapp		19.02.2021
Aboufazel Rad		17.02.2021
Franz Rüschen-dorf		17.02.2021
Imran Khan		22.02.2021
Abolfazl Adli		01.03.2021
Atefeh Hasanzadeh		01.03.2021
Daniel Liedtke		17.02.2021
Sabine Knaup		01.03.2021
Michaela AH Hofrichter		17.02.2021
Tobias Müller		17.02.2021
Marcus Dittrich		26.02.2021
Il-Keun Kong		17.02.2021
Hyung-Goo Kim		18.02.2021
Thomas Haaf		17.02.2021
Barbara Vona		18.02.2021

Title of the publication:

**“A novel missense variant in *MYO3A* is associated with autosomal dominant high-frequency hearing loss in a German family”**

Names of Co-Authors:

**Julia Doll**, Michaela AH Hofrichter, Paulina Bahena, Alfred Heihoff, Dennis Segebarth, Tobias Müller, Marcus Dittrich, Thomas Haaf, Barbara Vona

Publication details	Description of the own contribution
<b>Writing of the article</b> Which parts of the article have been written to which extent by the candidate?	Drafting and finalizing the manuscript
<b>Performed research</b> Which experimental procedures have been conducted by the candidate?	Segregation analysis Protein modelling
<b>Conceptual design of the research</b> To which extent did the candidate contribute to the conceptual design of the research project?	
<b>Data analysis</b> To which extent did the candidate contribute to the data analysis?	Exome analysis Clinical data analysis Correlation analysis
<b>Overall contribution of the candidate (in %)</b>	75%

**Confirmation by co-authors:**

<b>Name Co-author</b>	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
Julia Doll		17.02.2021
Michaela AH Hofrichter		17.02.2021
Paulina Bahena		17.02.2021
Alfred Heihoff		17.02.2021
Dennis Segebarth		22.02.2021
Tobias Müller		17.02.2021
Marcus Dittrich		26.02.2021
Thomas Haaf		17.02.2021
Barbara Vona		18.02.2021

Title of the publication:

**“Genetic spectrum of syndromic and non-syndromic hearing loss in Pakistani families”**

Names of Co-Authors:

**Julia Doll**, Barbara Vona, Linda Schnapp, Franz Rüschen-dorf, Imran Khan, Saadullah Khan, Noor Muhammad, Sher Alam Khan, Hamed Nawaz, Ajmal Khan, Naseer Ahmad, Susanne M Kolb, Laura Kühlewein, Jonathan DJ Labonne, Lawrence C Layman, Michaela AH Hofrichter, Tabea Röder, Marcus Dittich, Tobias Müller, Tyler D Graves, Il-Keun Kong, Indrajit Nanda, Hyung-Goo Kim, Thomas Haaf

Publication details	Description of the own contribution
<b>Writing of the article</b> Which parts of the article have been written to which extent by the candidate?	Drafting and finalizing the manuscript
<b>Performed research</b> Which experimental procedures have been conducted by the candidate?	Exome sequencing Segregation analysis
<b>Conceptual design of the research</b> To which extent did the candidate contribute to the conceptional design of the research project?	
<b>Data analysis</b> To which extent did the candidate contribute to the data analysis?	Exome analysis
<b>Overall contribution of the candidate (in %)</b>	65%

## Confirmation by co-authors:

Name Co-author	Signature	Date
Julia Doll		12.10.2020
Barbara Vona		12.10.2020
Linda Schnapp		13.10.2020
Franz Rüschenndorf		13.10.2020
Imran Khan		12.10.2020
Saadullah Khan		13.10.2020
Noor Muhammad		13.10.2020
Sher Alam Khan		13.10.2020
Hamed Nawaz		13.10.2020
Ajmal Khan		12.10.2020
Naseer Ahmad		12.10.2020
Susanne M Kolb		12.10.2020
Laura Kühlewein		12.10.2020
Jonathan DJ Labonne		12.10.2020
Lawrence C Layman		13.10.2020
Michaela AH Hofrichter		12.10.2020
Tabea Röder		12.10.2020
Marcus Dittrich		12.10.2020



Tobias Müller	12.10.2020
Tyler D Graves	13.10.2020
Il-Keun Kong	13.10.2020
Indrajit Nanda	12.10.2020
Hyung-Goo Kim	13.10.2020
Thomas Haaf	12.10.2020

Danksagung