



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

XXXI CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO

**Analisi mediante metodiche di sequenziamento di nuova generazione di soggetti
affetti da sordità genetica, finalizzata all'individuazione di alterazioni genomiche
patogenetiche, non descritte in precedenza.**

Settore scientifico-disciplinare: MED/03

DOTTORANDO
DIEGO VOZZI

COORDINATORE
PROF. PAOLO GASPARINI

SUPERVISORE DI TESI

PROF. ADAMO PIO D'ADAMO

INDICE

ABSTRACT.....	pag. 3
INTRODUZIONE.....	pag. 5
SCOPO DELLA TESI.....	pag. 8
MATERIALI E METODI.....	pag. 9
RISULTATI.....	pag. 19
DISCUSSIONE.....	pag. 37
CONCLUSIONI.....	pag. 42
BIBLIOGRAFIA.	pag. 44

ABSTRACT

I difetti della funzione uditiva sono piuttosto frequenti nella popolazione generale interessando fino a 3 bambini su 1000 nati. Tale fenomenologia ha un livello di eterogeneità rilevante dovuto all'elevata complessità della funzione uditiva. Difatti nello sviluppo della sordità o, più genericamente, nell'insorgenza della limitazione della funzione uditiva, sono implicati molti geni e, non da meno, molti fattori ambientali. L'individuazione di una diagnosi molecolare corretta è fondamentale in quanto permette di stabilire una prognosi adeguata nonché consente di definire il rischio di ricorrenza per i pazienti; inoltre conoscere i meccanismi molecolari che sottendono il quadro patologico permette di ampliare il livello di conoscenza circa i meccanismi della funzione uditiva. Con lo scopo di aumentare le conoscenze a riguardo della complessità ed eterogeneità genetica proprie della sordità, il presente lavoro sperimentale si pone l'obiettivo di analizzare una serie di famiglie, affette da sordità non sindromica, provenienti dall'Italia e dal Qatar. Le realtà socio-culturali in cui esiste una diffusa accettazione culturale dei matrimoni tra individui consanguinei sono dei modelli di studio molto informativi circa lo studio di patologie a trasmissione autosomica recessiva. Ciò vale anche per la sordità neurosensoriale e, parimenti, vale per una società come quella del Qatar. In questo lavoro di tesi analizziamo pertanto: 1) una coorte di soggetti appartenenti a 18 famiglie qatarine affette da sordità non sindromica con ipotesi di trasmissione autosomica recessiva; 2) una coorte di soggetti appartenenti a 7 famiglie italiane affette da sordità non sindromica, con

modalità di trasmissione di tipo autosomica dominante; i membri di tali famiglie italiane sono stati precedentemente analizzati con un pannello di sequenziamento in grado di analizzare 96 geni e tutti i soggetti analizzati sono risultati negativi alla ricerca di mutazioni a carico di tali geni. I dati di questo lavoro sperimentale hanno permesso di caratterizzare da un punto di vista molecolare, 9 delle 18 famiglie qatarine, individuando variazioni patogenetiche nei geni *CDH23*, *MYO6*, *GJB6*, *OTOF*, *TMC1* e *OTOA*. In particolare abbiamo descritto 4 nuovi alleli e individuato 5 varianti precedentemente riportate in letteratura (1). Quanto alle famiglie italiane, queste sono state analizzate mediante il sequenziamento massivo dell'esoma (*WES*) con due diverse piattaforme (*Illumina Inc.* e *Ion Proton™ System -Thermo Fisher Scientific-*) e ciò ha consentito di individuare un gene (*SPATCIL*) che ipotizziamo possa avere un ruolo nella funzione uditiva e che, pertanto, suoi difetti possano essere coinvolti nella perdita uditiva (2).

INTRODUZIONE

-Perdita uditiva

La sordità rappresenta il difetto sensoriale più comune nelle società occidentali rappresentando un quadro patologico caratterizzato da notevole complessità ed eterogeneità. Circa 3 soggetti su 1000 nati, manifestano difetti della funzione uditiva (3).

La sordità è classificata in numerose modalità a seconda di quale aspetto viene preso in considerazione; la Tabella 1 riassume le molteplici e possibili classificazioni esistenti.

Classificazione	Descrizione
Eziologia	Genetica/Acquisita
Manifestazione	Sindromica/Non-sindromica
Lateralità	Unilaterale/bilaterale
Insorgenza	Alla Nascita/pre-linguale/post-linguale
Tipo	Conduttiva/Neurosensoriale/Mista/Disfunzione del sistema uditivo centrale
Simmetria	Simmetrica/Asimmetrica
Stabilità	Progressiva/Non-Progressiva/Fluttuante
Livello (in Decibel - dB-)	Leggera (26-40dB) Moderata(41-55dB) Severa(71-90dB) Profonda(>90dB)
Frequenze Affette	Basse (<500hz)/Medie(501-2000hz)/Alte(>2000Hz)

TABELLA 1

-Sequenziamento massivo di nuova generazione o *Next Generation Sequencing (NGS)*

La definizione di una corretta diagnosi molecolare è di fondamentale importanza per consentire un'appropriate consulenza genetica, per stimare il rischio di ricorrenza, per definire una prognosi attendibile a favore dei pazienti, ma anche per ampliare le conoscenze relative ai complessi meccanismi molecolari alla base della funzione uditiva.

La sordità non-sindromica è caratterizzata da un elevato livello di eterogeneità genetica in quanto riconducibile a difetti a carico di un numero elevato di geni; tutto ciò rende la definizione di una corretta diagnosi molecolare molto complessa. In questo contesto il miglior approccio tecnologico, in termini di efficacia, risulta essere il sequenziamento massivo del DNA, cosiddetto *Next Generation Sequencing (NGS)*. Esso infatti, grazie all'elevata processività, permette di analizzare simultaneamente la sequenza di molteplici geni (10) e di superare la scarsa efficacia dell'approccio analitico basato sul sequenziamento *Sanger*, caratterizzato invece da una tale bassa processività e tali costi elevati da consentire l'analisi simultanea di uno o, al massimo, pochi geni (tipicamente *GJB2*, *SLC26A4* e *OTOF*). Ad oggi la tecnologia del sequenziamento di nuova generazione (*NGS*) è in grado di generare una quantità di dati pari a circa 7-8000 Gigabasi in una singola corsa di sequenziamento della durata di 48 ore.

Per malattie a trasmissione mendeliana caratterizzate da un livello di eterogeneità genetica medio-basso (coinvolgimento di decine o un centinaio di geni) è indicato un approccio di sequenziamento *NGS* di tipo *target (target re-sequencing, TRS)*, in grado di

analizzare la sequenza di un numero limitato di geni, ma pur sempre nell'ordine di molte decine. Il *target* può essere rappresentato da una selezione di geni già noti per essere causativi di patologia oltre a geni candidati. Nella sua interpretazione più ampia il sequenziamento *target* può interessare l'intera porzione codificante del genoma (*whole exome sequencing, WES*). Entrambi gli approcci *target* sono adeguati per lo studio della sordità genetica (11). Un approccio analitico di *TRS* offre costi contenuti, alta processività ed elevata accuratezza di sequenziamento grazie ad un alto livello di copertura delle zone selezionate. Tuttavia questo approccio lascia inesplorate le restanti porzioni codificanti del genoma e di conseguenza risulta non essere appropriato allo scopo di individuare alterazioni a carico di geni non precedentemente descritti come associati a sordità. In questo senso il *WES* risulta essere certamente un approccio più esaustivo e, inoltre, "imparziale" perché non soggetto alla selezione discrezionale del *pool* dei geni *target* (12).

SCOPO DELLA TESI

La determinazione di una corretta diagnosi molecolare è di enorme rilevanza sia ai fini clinici che scientifici. Essa permette, infatti, di definire per il paziente un preciso rischio di ricorrenza e di assicurargli una prognosi attendibile; inoltre essa è di fondamentale importanza per investigare le cause molecolari alla base della malattia e per ipotizzare eventuali interventi terapeutici.

Lo scopo di questa tesi è quello di analizzare, mediante metodica *TRS* e *WES*, una coorte di probandi e loro congiunti, affetti e/o sani, provenienti: 1) dal Qatar, una regione del Medio Oriente in cui il livello di accettazione culturale dei matrimoni tra consanguinei è elevato, costituendo perciò un modello ottimale per l'analisi di patologie con modalità di trasmissione intergenerazionale di tipo recessiva; 2) dall'Italia, soggetti appartenenti a sette famiglie affette da sordità non sindromica con ipotesi di trasmissione autosomica dominante, negative ad una precedente analisi di *TRS* e, in quanto tali, qui analizzati mediante *WES*.

La definizione di un procedimento di laboratorio e bioinformatico in grado di definire una corretta diagnosi molecolare a favore dei pazienti in studio è lo specifico scopo di questo lavoro sperimentale. Il sequenziamento massivo del DNA o *NGS* è la tecnica di elezione in quanto in grado di far fronte sia all'elevata eterogeneità genetica della sordità e sia all'eterogeneità dovuta alle differenti provenienze delle due coorti di pazienti in studio (9).

MATERIALI E METODI

Reclutamento dei pazienti e raccolta dei campioni

I pazienti sono stati reclutati presso l'Ospedale "Hamad Medical Corporation", Doha (Qatar) e presso l'Ospedale Pediatrico "Burlo Garofolo", Trieste (Italia). Ciascun membro delle famiglie dei pazienti è stato caratterizzato da un punto di vista clinico e anamnestico. Ogni informazione è stata raccolta in una specifica cartella clinica. Possibili relazioni di consanguineità sono state ricostruite con particolare attenzione soprattutto per le famiglie di provenienza qatarina. Per ciascun paziente è stata esclusa qualsiasi forma di sordità di natura non genetica (dovuta ad infezioni, traumi, ecc.). Sono inoltre stati esclusi pazienti affetti da sordità sindromica. Ogni paziente è stato analizzato mediante audiometria tonale pura e potenziali evocati del tronco encefalico.

Un totale di 18 famiglie qatarine è stato reclutato (80 individui di cui 27 probandi); dei 27 probandi, 14 sono maschi e 13 femmine. Per tutti i pazienti sono state escluse varianti patogenetiche a carico dei geni *GJB2* e *MTRNR1*.

Un totale di 7 famiglie di origine italiana (IT1, IT2, IT3, IT4, IT5, IT6, IT7), affette da sordità neurosensoriale bilaterale non sindromica a trasmissione autosomica dominante, è stato incluso nello studio. Tali famiglie sono state precedentemente analizzate, con esito negativo, mediante *TRS* in grado di analizzare la porzione codificante di 96 geni (10); in conseguenza di tale dato, le famiglie in questione sono state quindi analizzate mediante *WES* con l'obiettivo di individuare eventuali difetti a carico di geni non precedentemente

associati a sordità e, in quanto tali, non inclusi nella selezione dei 96 geni del pannello *TRS*.

Un consenso informato è stato raccolto per ogni partecipante e lo studio è stato approvato dal Comitato Etico sia dell'*Hamad Medical Corporation* che dell'Ospedale Pediatrico "Burlo Garofolo".

È stato raccolto un campione di sangue o saliva da ciascuno dei partecipanti. Il DNA genomico è stato estratto dai campioni biologici utilizzando i kits *Promega Maxwell® 16 Blood DNA* o *Norgen Biotek's Saliva DNA Collection Preservation and Isolation*. La qualità e quantità del DNA è stata valutata mediante *NanoDrop1000* e *Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific)*, rispettivamente. Almeno 3 soggetti per ogni famiglia sono stati sequenziati e analizzati.

Pannello di sequenziamento target (*TRS*)

Un pannello di 81 geni è stato realizzato utilizzando l'*Ion AmpliSeq™ Designer v1.2 (Life Technologies, CA, USA)*. La selezione dei geni è stata effettuata in accordo con la letteratura scientifica più aggiornata e interrogando i seguenti *databases*: *Deafness Variation Database* (<http://deafnessvariationdatabase.org/>) ed *Hereditary Hearing Loss Database* (<http://hereditaryhearingloss.org/>). Il dettaglio dei geni è riportato nella Tabella 2. Il pannello in questione contiene 18 geni noti per essere causativi di forme recessive di sordità e 24 geni coinvolti in forme dominanti. Inoltre esso include 7 geni descritti per

essere coinvolti in forme di sordità sia recessive che dominanti e 1 gene *X-linked*. I restanti 31 geni sono candidati poiché noti per avere un ruolo nella funzione uditiva o per essere espressi nell'orecchio interno del topo; in quanto tali, eventuali difetti di tali geni potrebbero essere coinvolti in alterazioni della funzione uditiva. La regione *target* del pannello in questione include la regione codificante di ciascuno degli 81 geni e 50 basi fiancheggianti ciascun esone, utili questi ultimi per valutare variazioni che possano influire sullo *splicing*. L'intero *target* del pannello di sequenziamento ammonta a 317 kilobasi.

GENE	LOCUS SORDITA'	MODALITA' DI TRASMISSIONE
<i>ACTB</i>	-	CANDIDATO
<i>ACTG1</i>	DFNA20/26	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>ATP6V1B1</i>	-	CANDIDATO
<i>BCS1L</i>	-	CANDIDATO
<i>BDP1</i>	DFNB49	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>BSND</i>	DFNB73	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>CATSPER2</i>	-	CANDIDATO
<i>CCDC50</i>	DFNA44	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>CDH23</i>	DFNB12	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>CLDN14</i>	DFNB29	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>COCH</i>	DFNA9	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>COL11A2</i>	DFNA13; DFNB53	AUTOSOMICO_RECESSIVO/AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>COL9A3</i>	-	CANDIDATO
<i>CRYM</i>	DFNA40	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>DFNA5</i>	DFNA5	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>DFNB31</i>	DFNB31	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>DFNB59</i>	DFNB59	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>DIAPH1</i>	DFNA1	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>DSPP</i>	DFNA39	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>ERCC2</i>	-	CANDIDATO

<i>ERCC3</i>	-	CANDIDATO
<i>ESPN</i>	DFNB36	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>ESRRB</i>	DFNB35	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>EYA4</i>	DFNA10	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>FGF3</i>	-	CANDIDATO
<i>GATA3</i>	-	CANDIDATO
<i>GJA1</i>	DFNB38	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>GJB1</i>	-	CANDIDATO
<i>GJB2</i>	DFNA3A; DFNB1A	AUTOSOMICO_RECESSIVO/AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>GJB3</i>	DFNA2B	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>GJB4</i>	-	CANDIDATO
<i>GJB6</i>	DFNA3B; DFNB1B	AUTOSOMICO_RECESSIVO/AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>GRHL2</i>	DFNA28	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>GSTP1</i>	-	CANDIDATO
<i>JAG1</i>	-	CANDIDATO
<i>KCNE1</i>	-	CANDIDATO
<i>KCNJ10</i>	-	CANDIDATO
<i>KCNQ4</i>	DFNA2A	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>LHFPL5</i>	DFNB66/67	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>LHX3</i>	-	CANDIDATO
<i>LRTOMT</i>	DFNB63	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>MARVELD2</i>	DFNB49	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>MTAP</i>	-	CANDIDATO
<i>MYH14</i>	DFNA4A	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>MYH9</i>	DFNA17	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>MYO1A</i>	DFNA48	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>MYO1C</i>	-	CANDIDATO
<i>MYO1F</i>	-	CANDIDATO
<i>MYO3A</i>	DFNB30	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>MYO6</i>	DFNA22; DFNB37	AUTOSOMICO_RECESSIVO/AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>MYO7A</i>	DFNA11; DFNB2	AUTOSOMICO_RECESSIVO/AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>MYO15A</i>	DFNB3	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>NR2F1</i>	-	CANDIDATO
<i>OTOA</i>	DFNB22	AUTOSOMICO_DOMINANTE

<i>OTOF</i>	DFNB9	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>OTOR</i>	-	CANDIDATO
<i>PAX3</i>	-	CANDIDATO
<i>PCDH15</i>	DFNB23	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>PDZD7</i>	-	CANDIDATO
<i>PMP22</i>	-	CANDIDATO
<i>POU3F4</i>	DFNX2	X-LINKED
<i>POU4F3</i>	DFNA15	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>RDX</i>	DFNB24	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>SLC4A11</i>	-	CANDIDATO
<i>SLC17A8</i>	DFNA25	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>SLC26A4</i>	DFNB4	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>SLC26A5</i>	DFNB61	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>SOX2</i>	-	CANDIDATO
<i>SPINK5</i>	-	CANDIDATO
<i>STRC</i>	DFNB16	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>TBLIX</i>	-	CANDIDATO
<i>TCF21</i>	-	CANDIDATO
<i>TECTA</i>	DFNA8/12; DFNB21	AUTOSOMICO_RECESSIVO/AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>TIMM8A</i>	-	CANDIDATO
<i>TMC1</i>	DFNA36; DFNB7/11	AUTOSOMICO_RECESSIVO/AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>TMIE</i>	DFNB6	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>TMPRSS3</i>	DFNB8/10	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>TMPRSS5</i>	-	CANDIDATO
<i>TRIOBP</i>	DFNB28	AUTOSOMICO_DOMINANTE
<i>USH1C</i>	DFNB18A	AUTOSOMICO_RECESSIVO
<i>WFS1</i>	DFNA6/14/38	AUTOSOMICO_RECESSIVO

TABELLA 2

Sequenziamento del pannello target (TRS)

Le librerie sono state costruite utilizzando il kit *Ion Ampliseq Library Kit (Thermo Fisher Scientific)*. 10 nanogrammi di DNA genomico sono stati impiegati per la costruzione di ciascuna libreria. L'arricchimento delle regioni *target* è stato effettuato mediante PCR *multiplex* e le librerie sono state indicizzate per poter essere sequenziate simultaneamente.

La quantificazione delle librerie è stata effettuata mediante il kit *KAPA Library Quantification Kits- Ion Torrent Universal (Kapa Biosystem)* e lo strumento *7900HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystem)*. Le librerie sono state sequenziate ad una concentrazione finale di 10pM mediante la piattaforma *Ion Torrent Personal Machine PGM™ System su chip Ion™ 318 v2 (Thermo Fisher Scientific)*.

Sequenziamento dell'esoma (WES)

Il WES relativo alle famiglie IT1, IT2, IT3, IT4 è stato effettuato presso il Centro di Sequenziamento *Life Technologies Ion AmpliSeq™ Exome Certified Service Providers, CRIBI Sequencing Core*, Università di Padova, Italia. Le librerie sono state preparate utilizzando l'*Ion AmpliSeq™ Exome Kit (Thermo Fisher Scientific)* e sequenziate su piattaforma *Ion Proton™ System (Thermo Fisher Scientific)* in modalità *paired-end* 150bpX2. Il protocollo di preparazione delle librerie prevede un arricchimento della regione *target* mediante PCR per un totale di circa 58 Megabasi.

Il WES relativo alle restanti 3 famiglie, IT5, IT6, IT7, è stato eseguito con piattaforma *NextSeq550* (*Illumina, Inc.*), in modalità *paired-end* 150bpX2. L'arricchimento del target (esoma) e la preparazione delle librerie di sequenziamento sono stati effettuati con *kit Truseq Exome kit* (*Illumina, Inc.*); la dimensione del *target* è pari a 45Mbase

Analisi dei dati di sequenziamento TRS e WES

Sia i dati di *TRS Ion Torrent™* che i dati di *WES Ion Proton™* sono stati analizzati mediante il *software Ion Torrent Suite™ v4.4* (*Life Technologies, USA*) con parametri *standard*, secondo i seguenti passaggi: trasformazione del dato grezzo di sequenziamento e generazione dei *files fastq*, allineamento delle *reads* contenute nel *fastq* verso il genoma di riferimento (*GRch37/hg19*) con generazione dei *files BAM*, individuazione delle varianti a singolo nucleotide (*SNVs*) e piccole inserzioni/delezioni (*INDELs*).

È stato valutato il “*Coverage Analysis Report*” di *Ion Torrent Suite™ v4.4* con lo scopo di individuare cadute di coperture di sequenziamento potenzialmente suggestive di delezioni esoniche in eterozigosi o omozigosi.

Le *reads* prodotte con piattaforma *Illumina* sono state allineate verso il genoma di riferimento (*hg38*) mediante *Burrows-Wheeler Aligner (BWA) mem* (13), con parametri *standard* e il relativo *BAM file* è stato generato con *Samtools* (14). Il *BAM file* è stato processato, al fine di fare un *sorting*, per mezzo di *Picard SortSam* (<http://picard.sourceforge.net/>) e sono stati marcati i duplicati con *Picard MarkDuplicates*. È stata effettuata una ricalibrazione delle basi con *GATK BaseRecalibrator* e *GATK ApplyBQSR* (15). La chiamata delle varianti è stata effettuata con *GATK HaplotypeCaller* in modalità *gvcf*. I singoli *vcf* sono stati uniti mediante *GATK*

CombineGVCFs. Il genotipo di ogni variante è stato rifinito con *GATK GenotypeGVCFs*, *GATK VariantRecalibrator* e *GATK ApplyVQSR*.

Le varianti identificate sia dal *TRS* che dal *WES* sono state raccolte nel formato *standard VCF* versione 4.1 (16), annotate con *ANNOVAR* (17) e visualizzate con *Integrative Genomics Viewer (IGV, Broad institute)* al fine di effettuare un'ispezione manuale delle singole varianti candidate con lo scopo di eliminare eventuali falsi positivi dovuti ad evidenti difetti dell'allineamento delle *reads*.

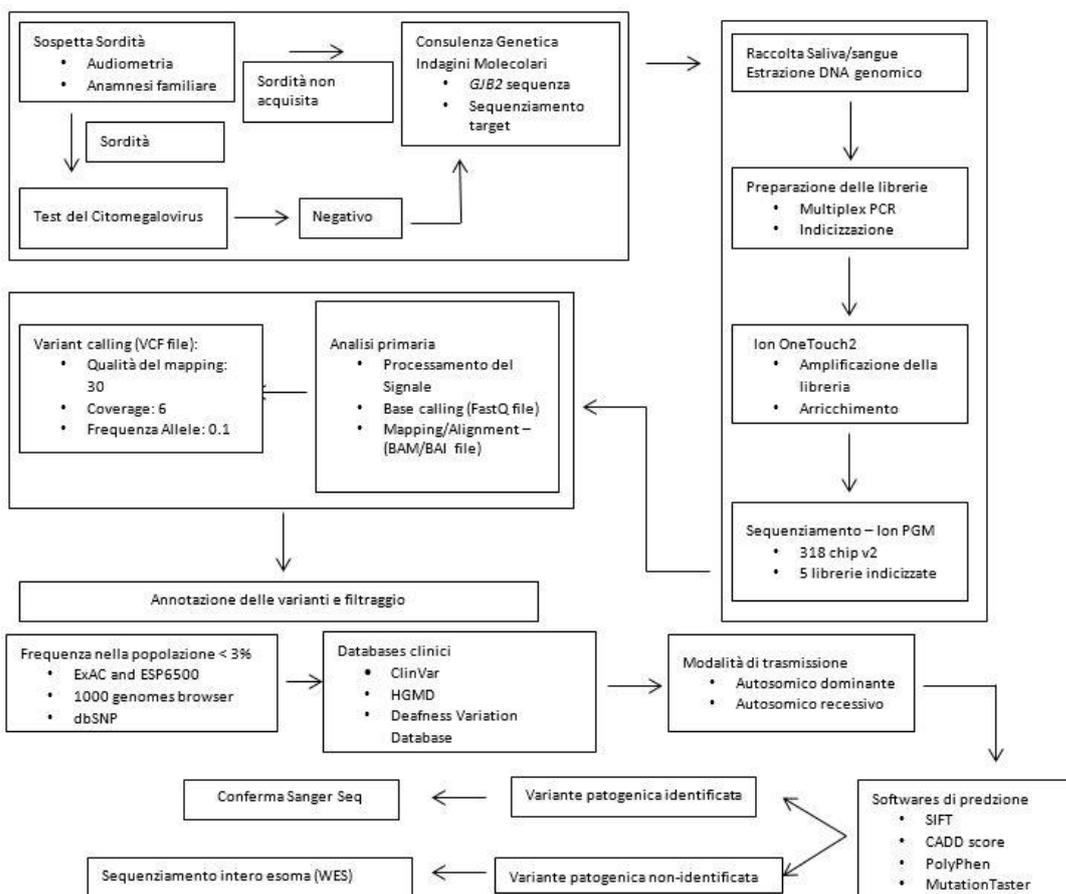
Il successivo processo di filtraggio delle varianti ha visto l'eliminazione di *SNVs* sinonime, di *SNVs/INDELs* con un punteggio di qualità (*QUAL*) inferiore a 30 e di *SNVs/INDELs off-target* (individuate cioè nelle regioni esterne al *target* in studio). Inoltre sono state eliminate tutte le varianti con una frequenza dell'allele minore (*MAF*) superiore a 0.01 e 0.001 per le forme recessive e dominanti, rispettivamente. I dati di frequenza (*MAF*) di ciascuna variante sono stati recuperati dai seguenti *databases*: *NCBI dbSNP build142* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), *1000 Genomes Project* (<http://www.1000genomes.org/>), *NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server* (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), *ExAC browser* (<http://exac.broadinstitute.org/>).

È stato inoltre applicato un filtro finalizzato all'eliminazione degli errori ricorrenti di sequenziamento, escludendo da ulteriori analisi tutte quelle varianti che ricorrono in almeno il 90% dei soggetti in esame.

La patogenicità delle varianti così individuate è stata valutata interrogando i seguenti *databases*: *ClinVar* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), *Deafness Variation Database* (<http://deafnessvariationdatabase.org/>) and *The Human Gene Mutation Database* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

Con lo scopo di avere una predizione *in silico* dell'impatto sulla struttura della proteina delle varianti individuate, nonché valutare il livello di conservazione filogenetica degli aminoacidi coinvolti nelle sostituzioni missenso, sono stati considerati i seguenti algoritmi: PolyPhen-2 (18), *SIFT* (19), *MutationTaster* (20), *PhyloP* (21), *GERP++* (22) e *CADD score* (23).

Una rappresentazione schematica dell'intero flusso di analisi clinico e informatico è riportato nello schema seguente.



Le varianti candidate sono quindi state validate con sequenziamento *Sanger* su sequenziatore *3500 Dx Genetic Analyzer (Applied Biosystem)*. Per ogni variante candidata (confermata al sequenziamento *Sanger*) è stata fatta un'analisi di segregazione all'interno della famiglia relativa.

Analisi strutturale delle proteine

In collaborazione con il Dr Navaneeth Krishnamoorthy (*Sidra Medical Research Hospital-Qatar*) è stata condotta un'analisi sulla modifica conformazionale della struttura delle proteine indotta dalle mutazioni più frequentemente rilevate nella coorte in esame. Per la proteina cdh23 e tmc1 non esistono strutture 3D disponibili, perciò è stata utilizzata la struttura cristallografica della proteina cdh23 di topo (PDB ID: 3Q2W) che condivide il 42% di omologia con la proteina cdh23 umana. Per la proteina tmc1 è stata utilizzata la struttura cristallografica della proteina del fungo (*Nectria haematococca*) (PDB ID: 4WIS) che ha il 26% di omologia con la proteina umana.

RISULTATI

Coorte di pazienti reclutati in Qatar

Il sequenziamento *TRS* della coorte di pazienti qatarini ha garantito che il 95.48% della regione *target* fosse coperto con almeno 20 *reads*. La copertura media totale del *target* è pari a 270X, cioè in media ogni punto della regione *target* è supportato da 270 *reads*. Tra tutti i soggetti sono state individuate un totale di 763 varianti; nello specifico, 170 sostituzioni sinonime, 178 non-sinonime, 43 *frameshifts* piccole delezioni/inserzioni (*INDELS*), 3 *non-frameshifts INDELS*; le restanti sono varianti introniche e localizzate negli *UTRs*.

La totalità delle varianti individuate ha subito un processo di filtraggio, come descritto in Materiali e Metodi e, a valle di tale processo, sono state identificate 6 mutazioni puntiformi a carico di *CDH23*, *MYO6*, *GJB6*, *OTOF*, *TMC1* e una delezione in *OTOA*, tutti geni già riportati in letteratura scientifica come associati a sordità. Queste varianti sono state identificate in 9 delle 18 famiglie in studio. I dati in questione sono riportati nella Tabella 3.

ID Famiglia	Locus	Gene	cambio cDNA	Sostituzione aa	Frequenza		GERP++	PhyloP	Polyphen-2	SIFT	Mutation Taster	CADD	Referenze	Fenotipo
					ExAC	1000g2014oct								
1	DFNB12	CDH23 (NM_022124)	c.6614C>T	p.P2205L	NA	NA	5,06	7,786	0,999	0,06	1	26,7	NA	severa-profonda
9														
22														
23	DFNB1B	GJB6 (NM_006783)	c.209C>T	p.P70L	0,00001651	NA	5,38	9,807	1	0	1	21,6	NA	severa-profonda
4	DFNB37	MYO6 (NM_001300899)	c.178G>C	p.E60Q	0,00006059	NA	5,92	9,444	0,994	0,01	1	32	NA	severa-profonda
28	DFNB9	OTOA (NM_194248)	c.2239G>T	p.E747X	NA	NA	4,83	7,637	.	0,91	1	43	Rodriguez-Ballesteros et al., 2008	severa
12	DFNB7/DFNB11	TMC1 (NM_138691)	c.1334G>A	p.R445H	0,000008238	NA	5,93	9,789	0,998	0	1	32	Kalay et al., 2005; Santos et al., 2005	profonda
13			c.1808T>A	p.L603H	NA	NA	5,72	6,263	1	0	0,988	27	NA	
15	DFNB22	OTOA (NM_144672)	Delezione chr16:21,689,514-21,747,721										Shahin et al., 2010	severa

TABELLA 3. ID Famiglia: identificativo della famiglia; **Sostituzione aa:** cambio aminoacidico; **Frequenza:** frequenza della variante riportata nei database ExAC e 1000g; **GERP++:** misura della conservazione filogenetica dell'aminoacido sostituito, maggiore di zero è indicativo di aminoacido conservato; **PhyloP:** misura della conservazione filogenetica dell'aminoacido sostituito, > 0.95 conservato, < 0.95 non conservato; **Polyphen-2:** misura di patogenicità della sostituzione aminoacidica, > 0.85 probabilmente patogenetica, 0.85-0.15 possibilmente patogenetica, < 0.15 benigno; **SIFT:** misura di patogenicità della sostituzione aminoacidica, più si avvicina a 0 più probabile è la patogenicità della variante; **Mutation Taster:** MutationTaster, misura di patogenicità della sostituzione aminoacidica, più si avvicina ad 1 più probabile è la patogenicità della variante; **CADD:** misura di patogenicità della sostituzione aminoacidica, > 10 predice la sostituzione come patogenetica; **Referenze:** referenza bibliografica; **Fenotipo:** livello del fenotipo patologico, S/P: da severo a profondo, S: severo). **NA:** dato non disponibile.

Le caratteristiche cliniche dei soggetti appartenenti alle 9 famiglie positive allo *screening* mutazionale, sono riportati nella seguente Tabella 4.

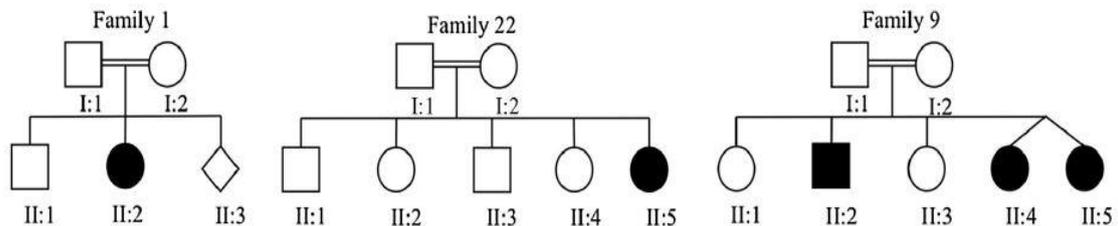
ID famiglia	Membri affetti	Sesso	Età insorgenza	Fenotipo
1	II.2	Femmina	1 anno	severa-profonda
22	II.5	Femmina	1 anno	severa-profonda
9	II.2	Maschio		severa-profonda
	II.4	Femmina		moderata-severa
	II.5	Femmina		
4	II.1	Femmina		severa-profonda
	II.2	Femmina		
23	II.1	Femmina	1 anno	profonda
28	II.2	Maschio	alla nascita	severa-profonda
12	II.1	Maschio		profonda

	II.2	Maschio		
13	II.1	Maschio		profonda
15	II.1	Maschio		severa
	II.2	Femmina		
	II.3	Femmina		

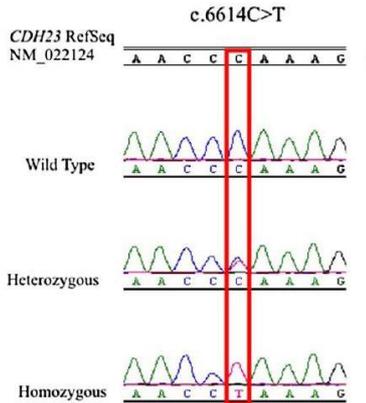
TABELLA 4

CHD23

Sono molte le mutazioni a carico di *CDH23* responsabili di sordità recessiva, sia non-sindromica che sindromica (24). La mutazione missenso p.P2205L, riportata in questo lavoro di tesi, non è mai stata descritta in precedenza e, allo stesso tempo, non è mai stata riportata nei *databases* pubblici di varianti della popolazione generale, quali *1000g*, *dbSNP* o *ExAC*. Abbiamo identificato la p.P2205L in ben tre famiglie (famiglie 1, 9 e 22) della nostra coorte, per le quali, come evidente dai *pedigree* sottostanti, è riportata consanguineità tra i genitori dei probandi.



La variante in oggetto è stata validata con metodica di sequenziamento *Sanger* come riportato nell'elettroferogramma sottostante.

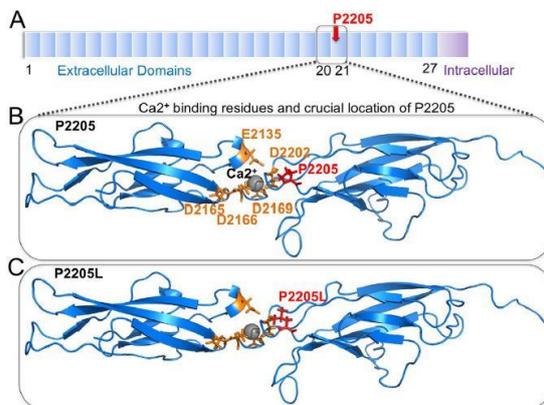


Questa mutazione interessa un aminoacido altamente conservato nella filogenesi come evidenziato dai valori di GERP++ (5.06) e PhyloP (7.786). Inoltre gli algoritmi di predizione di patogenicità *in silico* classificano questa variante come “patogenetica”. L’individuazione di una variante così rara e allo stesso tempo condivisa tra tre diverse famiglie ci ha portato a ipotizzare che questa possa appartenere ad un aplotipo comune e condiviso. In effetti l’analisi degli *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorfism*) adiacenti la variante p.P2205L ha rilevato che ben 18 *SNPs* distribuiti su 70kbasi sono comuni a tutti e 4 i soggetti affetti, confermando l’ipotesi di un aplotipo condiviso tra le famiglie 1, 9 e 22; ciò è suggestivo dell’ipotesi di un comune antenato o di un effetto del fondatore.

I pazienti portatori di questa mutazione in omozigosi sono affetti da una sordità neurosensoriale prelinguale, bilaterale, severa.

Abbiamo inoltre analizzato l’impatto di questa variante sulla struttura della relativa proteina mediante la metodica della predizione della conformazione proteica, come descritto in Materiali e Metodi. Il modello 3D dei domini 20 e 21 della *CDH23* mostra come la p.P2205L sia localizzata vicino ad un sito funzionale di legame del Ca^{2+} . Questo sito è altamente impacchettato con 5 residui aminoacidici carichi negativamente (4 di acido aspartico e 1 di acido glutammico). La p.P2205L è posizionata in prossimità dell’aminoacido p.D2202 ed entrambe sono coinvolte nella definizione del sito attivo di

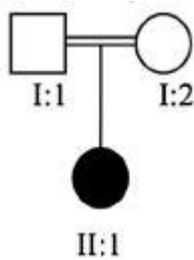
legame cationico. Proprio nella posizione p.D2202 è stata descritta la variante patogenetica p.D2202N, a conferma del ruolo funzionale dell'aminoacido p.P2205 (Prolina) per la funzione uditiva (25). La variazione p.P2205L rappresenta la sostituzione di una Prolina, aminoacido con catena laterale ciclica, con una Leucina, aminoacido con catena laterale lineare; questo cambio sterico è plausibile che interferisca strutturalmente nella regione *loop* (vedi figura sotto riportata, in cui la freccia rossa indica la regione mutata; B modello strutturale per P2205; C modello strutturale per P2205L; in arancione sono indicati i residui funzionali attorno al sito di legame del Ca^{2+} ; la sfera grigia rappresenta lo ione Ca^{2+}). Questi risultati, nel loro complesso, indicano come l'aminoacido P2205 giochi un ruolo chiave nell'organizzazione strutturale del sito funzionale di legame cationico della proteina cdh23 e come la sua sostituzione con un aminoacido a catena laterale lineare possa interferire con la funzionalità del sito stesso.



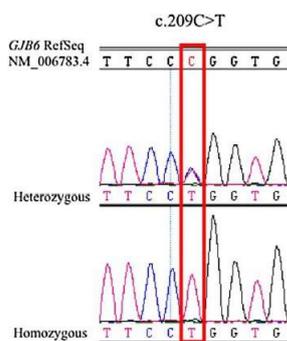
GJB6

Il gene *GJB6* è stato ampiamente descritto come coinvolto, se mutato, in sordità neurosensoriali con modalità di trasmissione intergenerazionali sia recessiva che dominante. Sono state descritte molte mutazioni a carico di questo gene in soggetti provenienti da Siria e Israele (26). In questo lavoro di tesi abbiamo identificato la

mutazione missenso p.P70L nella famiglia 23, in omozigosi nella figlia affetta e in eterozigosi nei due genitori consanguinei.

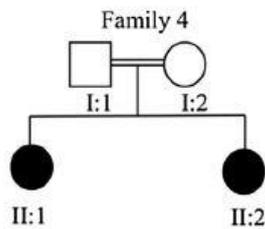


La mutazione agisce su un aminoacido altamente conservato nella filogenesi (GERP++ 5.38, PhyloP 9.8). I predittori di patogenicità indicano la sostituzione aminoacidica in questione come altamente deleteria per la funzione della proteina (CADD = 21.6). La p.P70L non è mai stata associata a sordità neurosensoriale ed è riportata nel *database* ExAc con una frequenza dello 0.00001651, frequenza compatibile con un fenotipo patologico recessivo (infatti la frequenza dell'omozigote di tale variante è ampiamente inferiore alla frequenza della malattia in esame). La variazione p.P70L è stata validata con sequenziamento *Sanger*, come evidente dall'elettroferogramma sottostante.

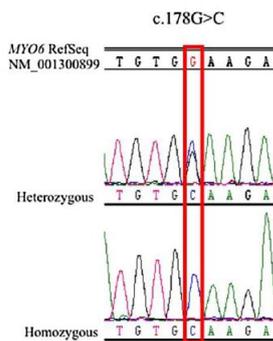


MYO6

Mutazioni a carico di questo gene sono state associate a sordità genetiche sia autosomiche recessive (27) che autosomiche dominanti (28). In questo lavoro sperimentale, nella famiglia 4, è stata identificata la variante missenso p.E60Q, in omozigosi in due sorelle affette e in eterozigosi nei genitori consanguinei.

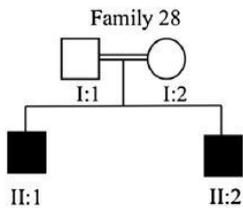


L'aminoacido sostituito è altamente conservato durante la filogenesi (GERP++ 5.92) ed è localizzato in una regione altamente conservata della proteina Miosina VI. I predittori di patogenicità predicono la p.E60Q altamente deleteria per la funzione della Miosina VI (CADD = 32); questa non è mai stata riportata in letteratura scientifica come causa di perdita uditiva. La p.E60Q non è presente in *1000g* mentre è riportata in *ExAC* con una frequenza di 0.00006059; sono stati individuati due soggetti su 60.706, che sono portatori della variante in eterozigosi. La p.E60Q è stata validata con sequenziamento *Sanger*.



OTOF

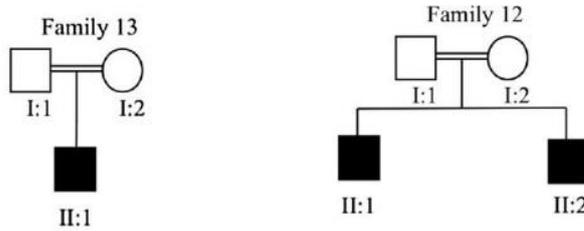
Mutazioni in *OTOF* sono state associate a forme autosomiche recessive di sordità genetica neurosensoriale (29). Nella famiglia 28 abbiamo individuato la variazione *loss-of-function* p.E747X in omozigosi nei due figli affetti e in eterozigosi nei genitori consanguinei.



Questa variante genera un codone di stop prematuro nella proteina, producendo pertanto una proteina trunca. La mutazione p.E747X è già stata descritta a carico di un paziente affetto da sordità neurosensoriale prelinguale e profonda, originario delle Libia (30). Il paziente II:2 della famiglia 28 è affetto da sordità neurosensoriale bilaterale prelinguale e profonda, in concordanza con il fenotipo descritto da M. Rodriguez-Ballesteros et al. (30).

TMCI

Ad oggi numerose mutazioni sono state descritte a carico di *TMCI*, responsabili sia di sordità neurosensoriale a trasmissione autosomica dominante che recessiva. Sono state descritte mutazioni in soggetti di origine turca, pachistana e cinese. Nel presente lavoro sperimentale abbiamo identificato due diverse varianti missenso a carico di *TMCI*, le p.R445H e la p.L603H, rispettivamente nelle famiglie 12 e 13.

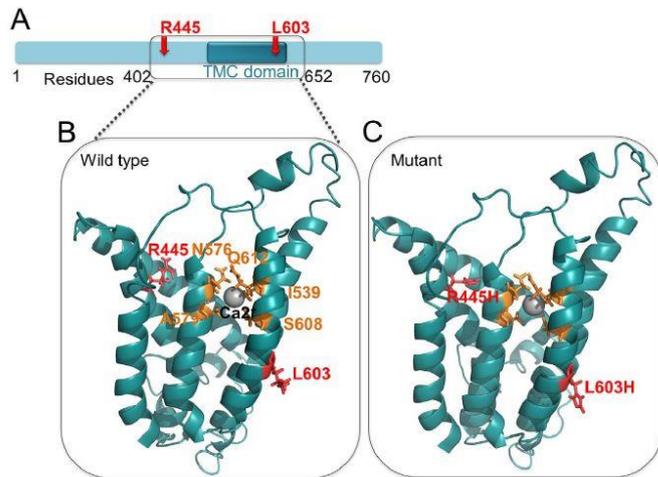


Il probando della famiglia 13 porta la mutazione p.L603H in omozigosi; questa variante non è mai stata descritta in precedenza, è assente da qualsiasi *database* pubblico e non è mai stata associata a sordità. L'aminoacido p.L603 è altamente conservato (GERP++ 5.72) e la sostituzione p.L603H è predetta come altamente patogenetica per la funzione proteica (CADD = 27). Il probando è affetto da sordità profonda ad esordio precoce.

I soggetti II:1 e II:2 della famiglia 12, entrambi affetti da sordità neurosensoriale pre-linguale e profonda, portano la mutazione p.R445H in omozigosi. La mutazione p.R445H è già stata descritta come responsabile di sordità neurosensoriale in pazienti appartenenti a famiglie turche e pachistane (31).

Abbiamo ulteriormente analizzato il ruolo potenzialmente patogenetico delle due mutazioni in questione mediante un'analisi di modellamento molecolare, come descritto in Materiali e Metodi. Il tratto della proteina interessato da entrambe le mutazioni, p.R445H e la p.L603H (residui 402-652), costituisce un dominio di legame dello ione Ca^{2+} e le posizioni p.R445 e la p.L603 sono entrambe nella tasca di legame cationica.

Vedi Figura sotto riportata.



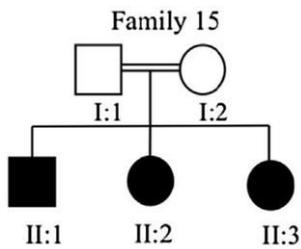
Le frecce rosse indicano le posizioni delle mutazioni. I siti dei residui aminoacidici funzionali sono indicati in arancione e concorrono alla formazione del sito di legame del Ca^{2+} indicato da una sfera grigia.

Il sito di legame cationico ha aminoacidi con catene laterali polari (S, N e Q) e idrofobiche (A e I) (Riquadro B della figura). Entrambe le mutazioni missenso p.R445H e la p.L603H sostituiscono dei residui aminoacidici con catena laterale lineare (R e L) con un aminoacido (H) caratterizzato da una catena ciclica. Ciò ha l'effetto di destabilizzare fortemente il sito di legame cationico di *tmc1*.

OTOA

Nel 2010 Shahin H et al. descrissero un'ampia delezione (chr16: 21,678,514-21,760,729) a carico di *OTOA*, in una famiglia palestinese affetta da sordità neurosensoriale non

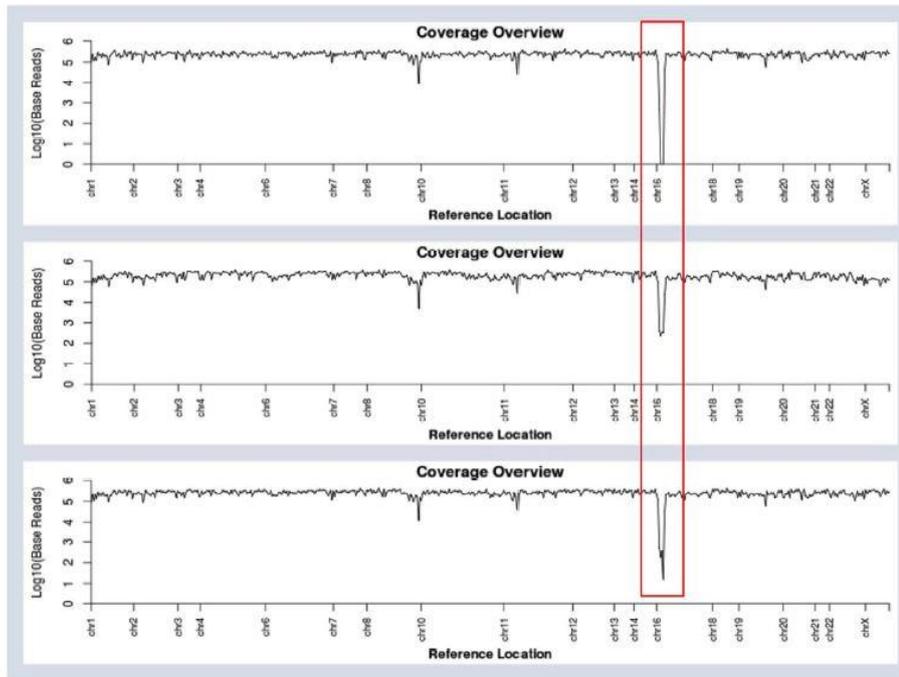
sindromica (32). I soggetti affetti della famiglia 15 mostrano una sensibile caduta di copertura a livello di *OTOA*, indicativa di una delezione in omozigosi.



Tale delezione si estende per circa 58 kilobasi, in posizione chr16:21,689,514 to 21,747,721, sovrapponendosi in parte con la delezione già descritta da Shahin H et al. (32).

La figura sottostante mostra i dati copertura globale, per i 3 fratelli affetti della famiglia 15, come riportati dal “*Coverage analysis Report*” di *Ion Torrent SuiteTM*. Sull’asse X sono riportate le regioni genomiche; sull’asse Y è riportata la copertura di ciascuna posizione genomica, in scala \log_{10} . Il rettangolo rosso indica l’evidente caduta di copertura, indicativa di una regione deleta in omozigosi.

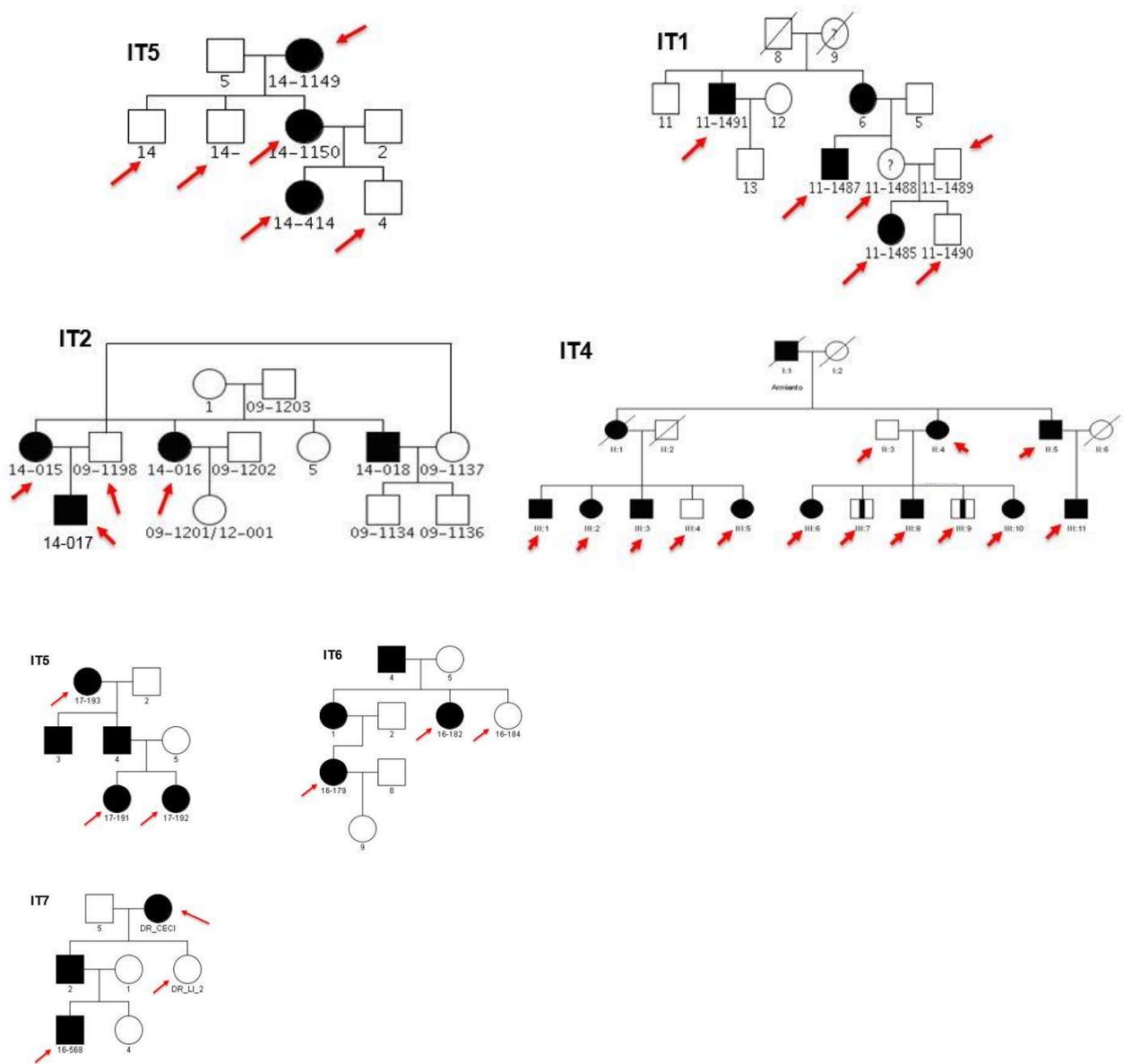
II:1



Coorte di pazienti reclutati in Italia

Le famiglie di origine italiana (IT1, IT2, IT3, IT4, IT5, IT6, IT7), tutte affette da sordità non sindromica con ipotesi di trasmissione autosomica dominante, sono state preventivamente analizzate mediante *TRS*, con un pannello in grado di analizzare 96 geni (10), risultando negative a tale analisi. In ragione di ciò, in questo lavoro sperimentale, si è ritenuto opportuno approfondire l'analisi di queste famiglie mediante un approccio di *WES* in grado di ampliare l'analisi di sequenziamento a tutte le regioni codificanti del genoma, il cosiddetto "esoma". A tale scopo i soggetti appartenenti alle famiglie IT1, IT2, IT3, IT4, IT5, IT6, IT7 sono stati sequenziati mediante due differenti piattaforme, *Illumina Inc.* e *Ion Proton™ System (Thermo Fisher Scientific)*. In particolare le famiglie IT1, IT2, IT3, IT4 sono state sequenziate con la piattaforma *Ion Proton™* in numero di

6, 4, 14 e 6 soggetti, rispettivamente; tre membri per ciascuna delle famiglie IT5, IT6 e IT7 sono state analizzate mediante sequenziamento con piattaforma *NextSeq550* (*Illumina Inc*). Di seguito sono riportati i *pedigree* delle famiglie in analisi; le frecce rosse indicano i soggetti selezionati per l'analisi di *WES*.



Il *WES* è stato eseguito ad un *coverage* teorico di 100X ed è risultato in un *coverage* medio effettivo di 98X con, in media, l'86% dell'esoma coperto da almeno 20 *reads*. Tra tutti i 37

soggetti in studio, appartenenti alle 7 famiglie, sono state individuate un totale 14.649 varianti con MAF < 0.03, In particolare 4.808 sostituzioni sinonime, 9.445 non-sinonime, 156 *frameshifts* piccole delezioni/inserzioni (*INDELS*). Queste varianti hanno subito un processo di filtraggio, come descritto in Materiali e Metodi e, a valle di tale processo e in considerazione della modalità di trasmissione autosomica, sono state individuate le varianti in eterozigosi, riportate nella

Tabella5.

DAL	Chr	Start	End	Ref	Alt	Gene.refGene	AAChange.refGene
	chr1	24401325	24401325	G	A	STPG1	STPG1:NM_001199012:exon2:c.C64T:p.Q22X,STPG1
	chr2	36893912	36893912	T	C	STRN	STRN:NM_003162:exon7:c.A917G:p.D306G
	chr2	119372299	119372299	A	G	DBI	DBI:NM_001079862:exon4:c.A245G:p.K82R,DBI
	chr2	216100261	216100261	T	G	TMEM169	TMEM169:NM_001142311:exon3:c.T613G:p.S205A
	chr7	64521654	64521654	C	A	ZNF680	ZNF680:NM_178558:exon4:c.G1100T:p.R367I
	chr7	64521687	64521687	C	A	ZNF680	ZNF680:NM_178558:exon4:c.G1067T:p.G356V
	chr9	3937045	3937045	G	A	GLIS3	GLIS3:NM_152629:exon4:c.C1390T:p.R464W
	chr12	40488095	40488095	A	G	MUC19	UNKNOWN
	chr17	21415749	21415749	T	C	KCNJ12	KCNJ12:NM_021012:exon3:c.T407C:p.F136S
	chr18	14105127	14105127	C	A	ZNF519	ZNF519:NM_145287:exon3:c.G1413T:p.W471C
	chr20	45222827	45222827	T	C	SEMG2	SEMG2:NM_003008:exon2:c.T1195C:p.Y399H
	chrX	101884267	101884267	C	T	ZMAT1	ZMAT1:NM_001011657:exon7:c.G1160A:p.R387K
	chrX	143712112	143712112	G	T	SPANXN2	SPANXN2:NM_001009615:exon2:c.C466A:p.P156T
FER	chr2	169636938	169636938	C	G	PPIG	PPIG:NM_004792:exon14:c.C1680G:p.S560R
	chr2	218281960	218281960	T	G	TMBIM1	TMBIM1:NM_001321428:exon2:c.A182C:p.H61P
	chr3	63979978	63979978	T	C	ATXN7	ATXN7:NM_001128149:exon2:c.T128C:p.F43S
	chr3	73062685	73062685	T	C	EBLN2	EBLN2:NM_018029:exon1:c.T604C:p.C202R
	chr4	42414698	42414698	A	G	ATP8A1	ATP8A1:NM_001105529:exon35:c.T3281C:p.L1094P
	chr4	151650272	151650272	C	T	FAM160A1	FAM160A1:NM_001348694:exon10:c.C2231T:p.A744V
	chr5	93740663	93740663	C	A	POU5F2	POU5F2:NM_153216:exon1:c.G901T:p.D301Y
	chr8	23317024	23317024	A	C	LOXL2	LOXL2:NM_002318:exon9:c.T1561G:p.C521G
	chr8	28351653	28351653	T	A	ZNF395	ZNF395:NM_018660:exon7:c.A1075T:p.M359L
	chr9	7799574	7799574	G	C	TMEM261	TMEM261:NM_001318058:exon1:c.C161G:p.S54C
	chr9	7799577	7799577	A	C	TMEM261	TMEM261:NM_001318058:exon1:c.T158G:p.L53R
	chr11	64360294	64360294	T	G	RPS6KA4	RPS6KA4:NM_001006944:exon3:c.T259G:p.S87A
	chr11	67207555	67207555	G	A	KDM2A	KDM2A:NM_012308:exon6:c.G353A:p.G118D
	chr12	6317903	6317903	G	A	PLEKHG6	PLEKHG6:NM_001144857:exon9:c.G968A:p.R323H
	chr13	52119331	52119331	T	A	NEK5	NEK5:NM_199289:exon4:c.A202T:p.N68Y
	chr14	23393050	23393050	C	T	MYH6	MYH6:NM_002471:exon24:c.G3113A:p.G1038E
	chr16	1790971	1790971	G	A	IGFALS	IGFALS:NM_001146006:exon2:c.C1561T:p.R521W
	chr16	15608295	15608295	A	C	MARF1	MARF1:NM_001184998:exon21:c.T4178G:p.V1393G

	chr17	3198265	3198265	A	T	OR1A2	OR1A2:NM_012352:exon1:c.A747T:p.L249F
	chr19	50007812	50007812	G	C	VRK3	VRK3:NM_001025778:exon4:c.C154G:p.P52A
	chr22	25039583	25039583	C	T	KIAA1671	KIAA1671:NM_001145206:exon3:c.C2453T:p.P818L
	chr1	3411429	3411429	G	A	PRDM16	PRDM16:NM_022114:exon9:c.G1232A:p.R411Q
GUA	chr1	161362482	161362482	C	T	SDHC	SDHC:NM_001278172:exon4:c.C293T:p.P98L
	chr2	200812440	200812440	C	A	BZW1	BZW1:NM_001207068:exon1:c.C33A:p.S11R
	chr4	5615456	5615456	C	G	EVC2	EVC2:NM_001166136:exon16:c.G2555C:p.C852S
	chr7	1746908	1746908	G	A	ELFN1	ELFN1:NM_001128636:exon2:c.G2312A:p.R771Q
	chr7	149224000	149224000	G	T	ZNF282	ZNF282:NM_003575:exon8:c.G1369T:p.G457W
	chr13	110478059	110478059	C	T	COL4A2	COL4A2:NM_001846:exon30:c.C2482T:p.P828S
	chr14	100292312	100292312	G	A	SLC25A29	SLC25A29:NM_152333:exon3:c.C685T:p.P229S
	chr14	102431840	102431840	G	C	TECPR2	TECPR2:NM_001172631:exon8:c.G1129C:p.V377L
	chr18	46962955	46962955	T	C	ELOA3B;ELOA3D	ELOA3B:NM_001100817:exon1:c.A1454G:p.K485R
	chr19	57291245	57291245	G	A	ZNF460	ZNF460:NM_001330622:exon3:c.G581A:p.R194H
	chr20	58854053	58854053	C	T	GNAS	GNAS:NM_001077490:exon1:c.C601T:p.R201W
	chrX	16946889	16946900	GCGGCAGCGGCA	-	REPS2	REPS2:NM_001080975:exon1:c.28_39del:p.A14_A17del
	chrX	53247104	53247104	C	T	IQSEC2	IQSEC2:NM_001111125:exon8:c.G2614A:p.V872M
	chrX	67546515	67546517	GGC	-	AR	AR:NM_000044:exon1:c.1369_1371del:p.G473del
	chr11	1629364	1629364	C	A	KRTAP5-3	KRTAP5-3:NM_001012708:exon1:c.G252T:p.K84N
	chr2	132237997	132237997	T	C	TUBA3D	TUBA3D:NM_080386:exon4:c.T731C:p.P244S
BER	chr2	132241638	132241638	G	A	MZT2A	MZT2A:NM_001085365:exon3:c.C473T:p.T158I
	chr3	4847791	4847791	G	T	ITPR1	ITPR1:NM_002222:exon51:c.G6923T:p.C2308F
CAT	chr5	108523148	108523148	G	C	FER	FER:NM_001308031:exon11:c.G1234C:p.A412P
	chr5	123980216	123980216	G	A	ZNF608	ZNF608:NM_020747:exon5:c.C3844T:p.P1282S
	chr5	127627233	127627233	G	A	FBN2	FBN2:NM_001999:exon49:c.C6280T:p.R2094W
	chr6	30890987	30890987	T	A	VARS2	VARS2:NM_001167733:exon23:c.T1872A:p.F624L
	chr6	30890988	30890988	G	C	VARS2	VARS2:NM_001167733:exon23:c.G1873C:p.V625L
	chr6	30890989	30890989	T	C	VARS2	VARS2:NM_001167733:exon23:c.T1874C:p.V625A
	chr6	32015537	32015537	C	A	TNXB	TNXB:NM_019105:exon30:c.G10292T:p.G3431V
	chr8	144662370	144662370	C	T	EEF1D	EEF1D:NM_001130056:exon6:c.G547A:p.D183N
	chr10	123673318	123673318	T	A	ATE1	ATE1:NM_001288735:exon2:c.A36T:p.K12N
	chr10	132944783	132944783	A	T	TCERG1L	TCERG1L:NM_174937:exon7:c.T1175A:p.L392Q
	chr12	48359632	48359632	T	A	TMEM106C	TMEM106C:NM_001143841:exon4:c.T263A:p.V88D
	chr15	43815263	43815263	T	G	MAP1A	MAP1A:NM_002373:exon4:c.T1592G:p.L531R
	chr19	53762485	53762485	T	C	VN1R2	VN1R2:NM_173856:exon1:c.T857C:p.L286S
	chr20	33451264	33451264	C	A	GGT7	GGT7:NM_001351702:exon2:c.G257T:p.R86L
NOT	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
IAV	chr1	103540302	103540302	T	G	COL11A1	COL11A1:NM_001190709:exon4:c.A523C:p.T175P
	chr11	64110666	64110666	T	G	CCDC88B	CCDC88B:NM_032251:exon11:c.T1078G:p.S360A
	chr12	14792840	14792840	G	A	GUCY2C	GUCY2C:NM_004963:exon19:c.C2113T:p.R705C
	chr13	77629767	77629767	C	T	MYCBP2	MYCBP2:NM_015057:exon80:c.G13573A:p.V4525M
	chr18	74649238	74649238	C	G	ZNF236	ZNF236:NM_007345:exon26:c.C4715G:p.A1572G
	chr19	54780731	54780731	T	-	LILRB2	LILRB2:NM_001278404:exon9:c.1065delA:p.L355fs
	chr20	7963043	7963043	G	T	TMX4	TMX4:NM_021156:exon8:c.C905A:p.P302Q
	chr21	47581470	47581470	G	C	SPATC1L	SPATC1L:NM_032261:exon4:c.C384G:p.Y128X

chr3	48677918	48677918	C	T	CELSR3	CELSR3:NM_001407:exon34:c.G9100A:p.A3034T
chr3	52395778	52395778	A	G	DNAH1	DNAH1:NM_015512:exon30:c.A4976G:p.Q1659R
chr4	162459343	162459343	A	C	FSTL5	FSTL5:NM_001128427:exon10:c.T1284G:p.F428L
chr7	30325431	30325431	A	G	ZNRF2	ZNRF2:NM_147128:exon1:c.A458G:p.H153R

TABELLA 5

Per la famiglia IT3 non è emersa alcuna variante dopo analisi di segregazione e di filtraggio.

Le varianti in tabella sono state valutate singolarmente, studiando il ruolo e il significato dei geni in elenco e cercando in letteratura scientifica evidenze di associazione di ciascun gene con la perdita uditiva o con la funzione uditiva, sia direttamente riportata che riconducibile per funzione del gene. Dei geni in tabella abbiamo selezionato *SPATCIL*, mutato nella famiglia IT4, come gene candidato; esso codifica per una proteina che sembra essere implicata nella formazione delle giunzioni cellulari, strutture ampiamente descritte come aventi un ruolo chiave nella funzione uditiva (33). La variante trovata in questo gene è una *loss-of-function*, cioè una *stopgain*, p.Y128X che porta ad un codone di stop prematuro, in grado di interrompere prematuramente la sintesi della proteina, causandone la perdita di 58 aminoacidi, altamente conservati durante l'evoluzione (vedi figura sottostante).

(MGI: 1923823) nella coclea di topo e pare che i livelli di espressioni incrementino da P3 a P12, proprio la finestra temporale che corrisponde allo sviluppo del sistema uditivo (2). Queste evidenze suggeriscono in definitiva un ruolo di *SPATCIL* nella funzione uditiva e, pertanto, sue alterazioni come possibilmente coinvolte nella perdita uditiva.

DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi abbiamo caratterizzato, mediante la metodologia del *TRS*, 18 famiglie di origine qatarina, affette da sordità neurosensoriale non-sindromica con ipotesi di trasmissione intergenerazionale di tipo autosomica recessiva; questi soggetti appartengono ad un contesto socio-culturale in cui esiste un elevato grado di accettazione dei matrimoni tra consanguinei, fatto che li rende particolarmente interessanti per lo studio di patologie a trasmissione recessiva. Abbiamo inoltre caratterizzato 7 famiglie di origine italiana, affette da sordità neurosensoriale, con ipotesi di trasmissione dominante e, precedentemente, analizzate mediante *TRS*, tutte con esito negativo.

L'impiego del pannello di sequenziamento *target* descritto in questa tesi ha permesso di giungere ad una diagnosi molecolare per 9 delle 18 famiglie qatarine, quindi con una *discovery rate* del 50%. Abbiamo identificato sia varianti descritte in letteratura scientifica come patogenetiche, che varianti mai descritte in precedenza per le quali le evidenze raccolte in questo lavoro di tesi sembrano attribuirgli un ruolo patogenetico. I geni interessati dalle mutazioni in questione sono: *CDH23*, *GJB6*, *MYO6*, *OTOF*, *TMC1* e *OTOA*.

In particolare, i geni *CDH23* e *TMC1* ricorrono con molta frequenza nella nostra coorte, essendo mutati in tre e due famiglie, rispettivamente, sulle 18 complessivamente analizzate. Ad oggi, in letteratura scientifica, sono state descritte 14 mutazioni missenso a carico di *CDH23* in soggetti provenienti dal Medio Oriente e non (Algeria, Palestina,

Turchia, Iran e Pakistan) (24, 25, 35). La mutazione p.P2205L di *CDH23* è molto prossima ad una mutazione già descritta in precedenza, la p.P2202N (24). In effetti l'analisi di modellamento molecolare indica una forte interazione spaziale tra i siti p.P2202 e p.2205, entrambi partecipano alla formazione di un *loop* localizzato in un sito funzionale di legame di Ca^{2+} ; tutto ciò è in linea con l'ipotesi circa un ruolo patogenetico della p.P2205L. Nella fattispecie, la p.P2205L sostituisce una Prolina con una Leucina, cioè un aminoacido a catena laterale ciclica con un aminoacido a catena laterale lineare, andando perciò ad alterare profondamente la conformazione del sito funzionale. Ben cinque pazienti, appartenenti a famiglie diverse, condividono lo specifico e comune aplotipo patogenetico di *CDH23* caratterizzato da p.P2205L, suggerendo pertanto un effetto del fondatore o un antenato comune.

Due famiglie della coorte in studio hanno mutazioni a carico del gene *TMCI*, ampiamente riportato in letteratura scientifica come gene associato alla perdita uditiva e con più di 50 mutazioni già descritte. In questo lavoro identifichiamo la mutazione p.R445H già descritta in famiglie originarie della Cina, Turchia e Pakistan e, inoltre, una mutazione mai descritta in precedenza, la p.L603H e localizzata in un dominio della proteina altamente conservato. Per entrambe le mutazioni, il modello molecolare ne predice la patogenicità in quanto localizzate in un sito di legame cationico funzionalmente attivo. Nel 2015 è stata descritta una mutazione in *TMCI*, la p.R604G, localizzata in stretta prossimità della p.L603H, per la quale il modello molecolare predice un ruolo

patogenetico (36), in analogia con quanto riportato dal nostro studio di modellamento molecolare.

Descriviamo, inoltre, la prima mutazione di *GJB6* nella popolazione qatarina (p.P70L), mai riportata in precedenza. La mutazione p.E60Q, trovata nel gene *MYO6*, è localizzata in un dominio ATPasico, noto come *MYS*c, in cui sono state descritte altre varianti patogenetiche (37).

La mutazione *loss-of-function* p.E747X a carico del gene *OTOF*, è stata precedentemente descritta in un paziente libico (30) ed in effetti la clinica dei pazienti della nostra coorte e quella descritta da M. Rodriguez-Ballesteros et al. (30) sono del tutto sovrapponibili.

Infine, individuiamo un'ampia delezione di circa 58 kilobasi a carico del gene *OTOA*, che si sovrappone alla delezione patogenetica già descritta da H. Shahin et al (32) in una famiglia palestinese. Sarebbe interessante caratterizzare questa delezione in una più ampia coorte di pazienti di origine araba per definirne l'epidemiologia.

Durante gli anni precedenti a questo studio, abbiamo caratterizzato mediante *NGS* ben 108 famiglie provenienti dal Qatar e i relativi risultati sono stati pubblicati (9,10).

Complessivamente abbiamo individuato la causa genetica per 26 casi di famiglie affette da sordità neurosensoriale non sindromica, descrivendo mutazioni e delezioni, alcune delle quali nuove ed altre precedentemente descritte, come riportato nella Tabella 6.

Gene	Locus	N°families	c.DNA changes	aa changes
<i>GJB2</i> (NM_004004)	DFNB1A	6	c.G506A	p.C169Y
		3	c.35delG	Frameshift mutation
		1	c.T299C	p.W77R
		4	c.IVSI + 1G > A	Splice site mutation
<i>GJB6</i> (NM_006783)	DFNB1B	1	c.C209T	p.P70L
<i>LOXHD1</i> (NM_144612)	DFNB77	1	c.G1588T	p.E530X
<i>TMC1</i> (NM_138691)	DFNB7/DFNB11	1	c.G1334A	p.R445H
		1	c.T1808A	p.L603H
<i>OTOF</i> (NM_194322)	DFNB9	1	c.G2239T	p.E747X
<i>MYO15A</i> (NM_016239)	DFNB3	1	c.453_455delCGAinsTGGACGCCTGGTCGGGCAGTGG	p.E152GfsX81
<i>MYO6</i> (NM_001300899)	DFNB37	1	c.G178C	p.E60Q
<i>BDP1</i> (NM_018429)		1	c.T7873G	p.*2625Ext*11
<i>CDH23</i> (NM_022124)	DFNB12	3	c.C6614T	p.P2205L
<i>OTOA</i> (NM_144672)	DFNB22	1	Deletion chr16:21,689,514-21,747,721	

TABELLA 6

In particolare, 14 famiglie (13% del totale) hanno mutazioni in *GJB2* mentre 3 famiglie condividono la stessa mutazione in *CDH23*. Quattro differenti mutazioni sono state individuate a carico di *GJB2*, essendo quindi al momento il gene con la maggiore eterogeneità nella nostra coorte qatarina.

Circa le sette famiglie di origine italiana, analizzare mediante *WES*, per sei di esse non è emersa alcuna alterazione a carico di geni noti (coerentemente all'esito negativo della precedente analisi condotta con *TRS*) né altresì alcuna ipotesi circa possibili geni candidati come coinvolti nella funzione uditiva. Per una delle sette famiglie in discussione, la famiglia IT4, abbiamo avanzato l'ipotesi del gene *SPATCIL* quale gene candidato, in quanto abbiamo trovato evidenze circa il suo coinvolgimento nella funzione uditiva. In particolare, nella famiglia IT4 abbiamo individuato una mutazione *loss-of-function*, una *stopgain*, la p.Y128X, che introduce nella proteina un codone di stop prematuro, in grado di interrompere prematuramente la sintesi della proteina, causandone la perdita di 58 aminoacidi, proprio in una regione altamente conservata

durante l'evoluzione. *SPATCIL* codifica per una proteina *speriolin-like* la cui funzione è ancora ignota; tuttavia sembra che questa proteina abbia un ruolo nella formazione delle giunzioni cellulari. È noto come una particolare e molto rappresentata classe di giunzioni cellulari, le giunzioni *gap*, abbiano un ruolo fondamentale nell'omeostasi ionica a livello della coclea e che quindi loro difetti siano coinvolti nelle perdite uditive (33). Grazie alla collaborazione con la dott.ssa Anna Morgan, la dott.ssa Dragana Vuckovic e la dott.ssa Giorgia Girotto siamo riusciti a portare evidenze circa il coinvolgimento di *SPATCIL* nella funzione uditiva. Il prodotto di *SPATCIL* sembra infatti avere un'espressione molto abbondante nella coclea di topo, in particolare durante le fasi che corrispondono allo sviluppo del sistema uditivo, da P3 a P12 (2). Alterazioni di *SPATCIL* sono inoltre state individuate a carico di pazienti presbiacusici, in cui sono state individuate due mutazioni, una *frameshift* e una *missenso* (2). Inoltre, uno studio statistico condotto su due coorti di popolazione generale ha evidenziato un'associazione statisticamente significativa tra *SPATCIL* e la normale funzione uditiva alle basse e medie frequenze uditive (2).

Le evidenze raccolte a riguardo di *SPATCIL* suggeriscono un suo possibile ruolo nella funzione uditiva e, pertanto, un suo potenziale coinvolgimento nella perdita uditiva.

CONCLUSIONI

Con questo studio si conferma l'efficacia della metodica del sequenziamento *TRS*, che in questo lavoro di tesi ha permesso la caratterizzazione, con una precisa diagnosi molecolare, di 9 famiglie qatarine sulle 18 analizzate. L'efficacia di questa metodologia produce un beneficio concreto per i pazienti che possono così avere accesso ad un'appropriata definizione del rischio di ricorrenza della malattia, ad una prognosi precisa e, una volta chiarito il meccanismo molecolare, ad un eventuale approccio terapeutico.

Il risultato negativo dell'analisi con *TRS*, per le restanti famiglie, si potrebbero spiegare con possibili alterazioni a livello di geni non inclusi nel pannello di sequenziamento *target* o in regioni non coperte da dati di *TRS* o, ancora, in regioni introniche profonde. L'analisi di *WES* si propone come un approccio in grado di superare alcuni dei limiti del *TRS*, in quanto in grado di analizzare l'intera porzione codificante del genoma e, pertanto, esente dall'arbitrarietà della selezione di geni.

L'analisi delle 7 famiglie di origine italiana, tutte negative ad una precedente analisi di *TRS*, mediante *WES*, ha permesso di individuare una mutazione *loss-of-function* a carico di *SPATCIL*, un gene non associato precedentemente alla funzione uditiva.

In uno studio statistico di tipo gene-candidato basato su due coorti di popolazioni Caucasiche e Asiatiche, si è individuata un'associazione statisticamente significativa tra *SPATCIL* e la normale funzione uditiva alle basse e medie frequenze uditive (2); inoltre

uno studio mediante analisi di *TRS* (46 geni candidati come coinvolti nella presbiacusia) su una coorte di 464 pazienti presbiacusici italiani, di età superiore a 50, ha portato all'identificazione di due mutazioni di *SPATC1L* (c.343_344insTTCA;p.K115fs*12 e c.A656C:p.Y219S), non presenti in alcun *database* e predette come deleterie, a carico di due pazienti non imparentati (2). Queste evidenze insieme all'osservazione di elevati livelli di espressione di *SPATC1L* nella coclea di topo, proprio durante lo sviluppo di questa, indicano una possibile relazione tra *SPATC1L* e la funzione uditiva e, pertanto, un suo possibile coinvolgimento nella perdita uditiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Alkowari MK, Vozzi D, Bhagat S, Krishnamoorthy N, Morgan A, Hayder Y, Logendra B, Najjar N, Gandin I, Gasparini P, Badii R, Girotto G, Abdulhadi K. Targeted sequencing identifies novel variants involved in autosomal recessive hereditary hearing loss in Qatari families. *Mutat Res.* 2017 Aug;800-802:29-36
2. Morgan A, Vuckovic D, Krishnamoorthy N, Rubinato E, Ambrosetti U, Castorina P, Franzè A, Vozzi D, La Bianca M, Cappellani S, Di Stazio M, Gasparini P, Girotto G. Next-generation sequencing identified SPATC1L as a possible candidate gene for both early-onset and age-related hearing loss. *Eur J Hum Genet.* 2019 Jan;27(1):70-79
3. Ječmenica,J., Bajec-Opančina,A. and Ječmenica,D. (2015) Genetic hearing impairment. *Childs. Nerv. Syst.*, 31, 515–9.
4. Petit,C. and Weil,D. (2003) Deafness. In *Encyclopedia of Life Sciences.* John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK
5. Stelma,F. and Bhutta,M.F. (2014) Non-syndromic hereditary sensorineural hearing loss: review of the genes involved. *J. Laryngol. Otol.*, 128, 13–21
6. A. Bittles, Consanguinity and its relevance to clinical genetics, *Clin. Genet.* 60(2001) 89–98.
7. A. Bener, A.A. Eihakeem, K. Abdulhadi, Is there any association between consanguinity and hearing loss, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 69 (2005) 327–333.
8. R.L. Snoeckx, P.L. Huygen, et al, GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study, *Am. J. Hum. Genet.* 77 (2005) 945–957.

9. M. Khalifa Alkowari, G. Giroto, K. Abdulhadi, S. Dipresa, R. Siam, N. Najjar, R. Badii, P. Gasparini, GJB2 and GJB6 genes and the A1555G mitochondrial mutation are only minor causes of nonsyndromic hearing loss in the qatari population, *Int. J. Audiol.* 51 (2012) 181–185.
10. D. Vozzi, A. Morgan, D. Vuckovic, A. D'Eustacchio, K. Abdulhadi, E. Rubinato, R. Badii, P. Gasparini, G. Giroto, Hereditary hearing loss: a 96 gene targeted sequencing protocol reveals novel alleles in a series of italian and qatari patients, *Gene* 542 (2014) 209–216.
11. Shearer, A.E. and Smith, R.J.H. (2015) Massively Parallel Sequencing for Genetic Diagnosis of Hearing Loss: The New Standard of Care. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.*, 153, 175– 82.
12. Atik, T., Bademci, G., Diaz-Horta, O., Blanton, S.H. and Tekin, M. (2015) Whole-exome sequencing and its impact in hereditary hearing loss. *Genet. Res. (Camb)*, 97, e4.
13. Li H. and Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, 25:1754-60.
14. Li H.*, Handsaker B.*, Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009) The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078-9.
15. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K,

- Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA, 2010
GENOME RESEARCH 20:1297-303.
16. Danecek,P., Auton,A., Abecasis,G., Albers,C.A., Banks,E., DePristo,M.A., Handsaker,R.E.,Lunter,G., Marth,G.T., Sherry,S.T., et al. (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27, 2156–2158.
 17. Wang,K., Li,M. and Hakonarson,H. (2010) ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, 38, e164–e164.
 18. I.Adzhubei, D.M. Jordan, S.R. Sunyaev, Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2, (2013) *Curr. Protoc. Hum. Genet.*
 19. P. Kumar, S. Henikoff, P.C. Ng, Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 1073–1081.
 20. J.M. Schwarz, C. Rodelsperger, M. Schuelke, D. Seelow, MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations, *Nat. Methods* 7 (2010) 575–576.
 21. K.S. Pollard, M.J. Hubisz, K.R. Rosenbloom, A. Siepel, Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies, *Genome Res.* 20 (2010) 110–121.
 22. G.M. Cooper, E.A. Stone, G. Asimenos, NISC Comparative Sequencing Program, E.D. Green, S. Batzoglou, A. Sidow, Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence, *Genome Res.* 15 (2005) 901–913.
 23. M. Kircher, D.M. Witten, P. Jain, B.J. O’Roak, G.M. Cooper, J. Shendure, A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants, *Nat. Genet.* 46 (2014) 310–315.

24. L.M. Astuto, J.M. Bork, M.D. Weston, J.W. Askew, R.R. Fields, D.J. Orten, S.J. Ohliger, S. Riazuddin, R.J. Morell, S. Khan, S. Riazuddin, H. Kremer, P. van Hauwe, C.G. Moller, C.W. Cremers, C. Ayuso, J.R. Heckenlively, K. Rohrschneider, U. Spandau, J. Greenberg, R. Ramesar, W. Reardon, P. Bitoun, J. Millan, R. Legge, T.B. Friedman, W.J. Kimberling, CDH23 mutation and phenotype heterogeneity: a profile of 107 diverse families with usher syndrome and nonsyndromic deafness, *Am. J. Hum. Genet.* 71 (2002) 262–275.
25. J.M. Bork, L.M. Peters, S. Riazuddin, S.L. Bernstein, Z.M. Ahmed, S.L. Ness, R. Polomeno, A. Ramesh, M. Schloss, C.R. Srisailpathy, S. Wayne, S. Bellman, D. Desmukh, Z. Ahmed, S.N Khan, V.M. Kaloustian, X.C. Li, A. Lalwani, S. Riazuddin, M. Bitner-Glindzicz, W.E. Nance, X.Z. Liu, G. Wistow, R.J. Smith, A.J. Griffith, E.R. Wilcox, T.B. Friedman, R.J. Morell, 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 (2001) 26–37.
26. W. Al-Achkar, B. Al-Halabi, B. Ali, F. Moassass, First report of prevalence c.IVS1 + 1G > A an del (GJB6-13S1854) mutations in syrian families with nonsyndromic sensorineural hearing loss, *Int. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 92 (2017) 82–87.
27. Z.M. Ahmed, R.J. Morell, S. Riazuddin, A. Gropman, S. Shaukat, M.M. Ahmad, S.A. Mohiddin, L. Fananapazir, R.C. Caruso, T. Husnain, S.N. Khan, S. Riazuddin, A.J. Griffith, T.B. Friedman, E.R. Wilcox, Mutations of MYO6 are associated with recessive deafness, DFNB37, *Am. J. Hum. Genet.* 72 (2003) 1315–1322.

28. S. Melchionda, N. Ahituv, L. Bisceglia, T. Sobe, F. Glaser, R. Rabionet, M.L. Arbones, A. Notarangelo, E. Di Iorio, M. Carella, L. Zelante, X. Estivill, K.B. Avraham, P. Gasparini, MYO6 the human homologue of the gene responsible for deafness in snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss, *Am. J. Hum. Genet.* 69 (2001) 635–640.
29. H. Chaib, C. Place, N. Salem, S. Chardenoux, C. Vincent, J. Weissenbach, E. El-Zir, J. Loiselet, C. Petit, A gene responsible for a sensorineural nonsyndromic recessive deafness maps to chromosome 2p22–23, *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 155–158.
30. M. Rodriguez-Ballesteros, R. Reynoso, M. Olarte, M. Villamar, C. Morera, R. Santarelli, E. Arslan, C. Meda, C. Curet, C. Volter, M. Sainz-Quevedo, P. Castorina, U. Ambrosetti, S. Berrettini, K. Frei, S. Tedin, J. Smith, M. Cruz Tapia, L. Cavalle, N. Gelvez, P. Primignani, E. Gomez-Rosas, M. Martin, M.A. Moreno-Pelayo, M. Tamayo, J. Moreno-Barral, F. Moreno, I. del Castillo, A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy, *Hum. Mutat.* 29 (2008) 823–831.
31. E. A. Kalay, R. Karaguzel, A. Caylan, F.P. Heister, C.W. Cremers, H.G. Cremers, Brunner, A.P. de Brouwer, H. Kremer, Four novel TMC1 (DFNB7/DFNB11) mutations in turkish patients with congenital autosomal recessive nonsyndromic hearing loss, *Hum. Mutat.* 26 (2005) 591) (R.L. Santos, M. Wajid, M.N. Khan, N. McArthur, T.L. Pham, A. Bhatti, K. Lee, S. Irshad, A. Mir, K. Yan, M.H. Chahrour, M. Ansar, W. Ahmad, S.M.

- Leal, Novel sequence variants in the TMC1 gene in pakistani families with autosomal recessive hearing impairment, *Hum. Mutat.* 26 (2005) 396.
32. H. Shahin, T. Walsh, A.A. Rayyan, M.K. Lee, J. Higgins, D. Dickel, K. Lewis, J. Thompson, C. Baker, A.S. Nord, S. Stray, D. Gurwitz, K.B. Avraham, M.C. King, M. Kanaan, Five novel loci for inherited hearing loss mapped by SNP-based homozygosity profiles in palestinian families, *Eur. J. Hum. Genet.* 18 (2010) 407–413.
33. Wingard JC, Zhao H-B. Cellular and deafness mechanisms underlying connexin mutation-induced hearing loss - A common hereditary deafness. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:202.
34. Lecat,S., Matthes,H.W.D., Pepperkok,R., Simpson,J.C. and Galzi,J.-L. (2015) A Fluorescent Live Imaging Screening Assay Based on Translocation Criteria Identifies Novel Cytoplasmic Proteins Implicated in G Protein-coupled Receptor Signaling Pathways. *Mol. Cell. Proteomics*, 14, 1385–99.
35. C.M. Sloan-Heggen, M. Babanejad, M. Beheshtian, A.C. Simpson, K.T. Booth, F. Ardalani, K.L. Frees, M. Mohseni, R. Mozafari, Z. Mehrjoo, L. Jamali, S. Vaziri, T. Akhtarkhavari, N. Bazazzadegan, N. Nikzat, S. Arzhang, F. Sabbagh, H. Otukesh, S.M. Seifati, H. Khodaei, M. Taghdiri, N.C. Meyer, A. Daneshi, M. Farhadi, K. Kahrizi, R.J. Smith, H. Azaiez, H. Najmabadi, Characterising the spectrum of autosomal recessive hereditary hearing loss in iran, *J. Med. Genet.* 52 (2015) 823–829.

36. A. Bakhchane, H. Charoute, H. Nahili, R. Roky, H. Rouba, M. Charif, G. Lenaers, A. Barakat, A novel mutation in the TMC1 gene causes non-syndromic hearing loss in a moroccan family, *Gene* 574 (2015) 28–33.
37. T.J. Kwon, S.K. Oh, H.J. Park, O. Sato, H. Venselaar, S.Y. Choi, S. Kim, K.Y. Lee, J. Bok, S.H. Lee, G. Vriend, M. Ikebe, U.K. Kim, J.Y. Choi, The effect of novel mutations on the structure and enzymatic activity of unconventional myosins associated with autosomal dominant non-syndromic hearing loss, *Open Biol.* 4 (2014).