



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**INVESTIGACIÓN DE LAS CAUSAS MOLECULARES DE LAS
HIPOACUSIAS NO SINDRÓMICAS AUTOSÓMICAS
RECESIVAS Y LIGADAS AL X**

TESIS DOCTORAL

MARTA GANDIA FERRI

Madrid, 2012

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**INVESTIGACIÓN DE LAS CAUSAS MOLECULARES DE LAS
HIPOACUSIAS NO SINDRÓMICAS AUTOSÓMICAS
RECESIVAS Y LIGADAS AL X**

Memoria que, para optar al Título de Doctor,
presenta **Marta Gandia Ferri**,
Licenciada en Biología

Director de Tesis
Dr. Ignacio del Castillo Fernández del Pino
Unidad de Genética Molecular
Hospital Universitario Ramón y Cajal

Unidad de Genética Molecular
Hospital Universitario Ramón y Cajal
Madrid, 2012

Don Ignacio del Castillo Fernández del Pino, Doctor en Ciencias Biológicas,
Investigador de la Unidad de Genética Molecular del Hospital Universitario Ramón y
Cajal de Madrid

CERTIFICA,

Que Doña Marta Gandía Ferri ha realizado bajo su dirección el Trabajo de
Tesis Doctoral que lleva por título “**Investigación de las causas moleculares de las
hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas y ligadas al X**”.

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del
mismo, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a
discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Madrid, a 29 de Mayo de 2012.

Fdo: Dr. Ignacio del Castillo Fernández del Pino
Director de Tesis
Unidad de Genética Molecular
Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid

Vº Bº tutor: Dra. María Belén Peral Fuentes
Profesora honoraria
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría aprovechar estas líneas para mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado en esta aventura, y que de una manera u otra han hecho posible esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quería agradecer al Dr. Ignacio del Castillo, director de esta Tesis, por sus consejos y su inestimable ayuda. Muchas gracias por la confianza, el respeto y la paciencia depositada en mí.

Al Dr. Felipe Moreno, por su amabilidad y confianza, y por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación.

Al Dr. Francisco Javier del Castillo, que ha seguido de cerca el desarrollo de esta Tesis, por su dedicación, apoyo y disponibilidad.

Al Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), al Ministerio de Economía y Competitividad y a la Fundación Ramón Areces, por la financiación concedida para la realización de este trabajo.

A los pacientes y familiares que han participado en este estudio, así como a los doctores que han remitido los casos y nos han proporcionado datos clínicos.

Muchísimas gracias a todos los compañeros de la Unidad por el buen ambiente, por los buenos momentos compartidos y por vuestro cariño. A Rosa, Merche, Romina, Marta, José Luis, Susana, Matías, Fernando, Lucía, Miguel Ángel, Germán, Yolanda, Ana, Nati, Susana, María, Elena, Rafa, Luis, Antonio, Alejandra, Alba, Leti, Ángeles, Silvia, Carmen, Toñi,...

A mis chicas del lab 12: Laura, María, Elena, Gema, Luciana, Montse, Helena y Gloria; por estar siempre ahí y ser más que compañeras, por los momentos de risas (que han sido muchos) y por aguantar mi peculiar sentido del humor; por los desayunos galleteros, por las comidas entretenidas y por los buenos momentos fuera de la Unidad.

A M^a José, por cuidarme, mimarme y por resolver mis dudas de papeleos y pedidos.

A la Dra. Concepción Hernández, por su dirección científica de mis trabajos en el Síndrome de Pendred.

A la Dra. Villamar, por sus consejos, por conseguir datos clínicos y por aceptarme como chica del lab 9 cuando llegué.

A Lolo, por su trabajo con los equipos de secuenciación y genotipador, y por su paciencia.

A M^a Ángeles, por las tardes de cine y de paseo; a Eli, por los cafés al sol y las tardes de actividades extraescolares; a Fran, por su colaboración en algunos experimentos, por su paciencia, porque me conoce muy bien, y porque compartimos sentido del humor. Gracias por estar siempre ahí y por considerarme como algo más que una compañera de lab.

A mis amigos, por todos los buenos momentos, los viajes, los conciertos, por sus consejos y por ser como son. A Sagrario, Assumpta, las Marías, M^a José, Amparo y Cristina. A Mireia y Paula, mis amigas de siempre; Esperanza, Clara y Patricia, mis amigas biólogas. A todas ellas, y a sus respectivos, gracias.

A mis múltiples y variopintas compañeras de piso, por hacer la convivencia fácil, por todos los momentazos compartidos y por ser mis hermanastras. Sobre todo, a Silvia, Lorena, Beatriz, Raquel, Sara, Laura y Paula.

A toda mi familia, por su infinito cariño, su confianza y por creer en mí. Sobre todo, gracias a mis padres por apoyarme en todas las decisiones que he tomado, y especialmente por enseñarme a luchar por lo que quiero.

A Quique, mi hermano, por quererme tanto, por ser único y tan especial y porque sin él saberlo, hizo que me interesase por la genética.

RESUMEN

La hipoacusia es el trastorno neurosensorial más frecuente en humanos, con una elevada heterogeneidad a todos los niveles. Entre las hipoacusias que tienen una base genética, se observan todos los patrones de herencia. Este trabajo se centró sobre varios subtipos de hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas y ligadas al X.

La hipoacusia de tipo DFNB1 es la más frecuente entre las autosómicas recesivas. Está causada por mutaciones en el gen *GJB2* (conexina-26) y por deleciones que eliminan un elemento regulador situado a distancia, aún no identificado. Las deleciones conocidas comparten un intervalo de 95,4 kb. Hemos desarrollado y validado un ensayo MLPA específico para la detección de nuevas deleciones en el intervalo. El ensayo no reveló nuevas deleciones en cohortes de pacientes de España, Holanda, Polonia y Brasil. Por otra parte, en el gen *GJB2* hemos identificado una nueva mutación de *splicing*, c.-22-2A>C. La mutación produce la pérdida del sitio aceptor normal, pero se activa la utilización de un sitio alternativo. La expresión residual resultante se correlaciona con un fenotipo de hipoacusia postlocutiva moderada.

Investigamos también la prevalencia y el espectro mutacional de las hipoacusias de tipos DFNB24, DFNB28, DFNB29 y DFNB49 (genes *RDX*, *TRIOBP*, *CLDN14* y *MARVELD2*, respectivamente). Hemos identificado una mutación nueva en el gen *TRIOBP* (p.R990X). Nuestro trabajo indica que DFNB24, DFNB28, DFNB29 y DFNB49 no contribuyen de forma significativa al conjunto de hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas en la población española.

En hipoacusias ligadas al X, hemos centrado el estudio en los subtipos DFNX1 (gen *PRPS1*) y DFNX4. Hemos encontrado dos nuevas mutaciones patogénicas en el gen *PRPS1* y descrito por primera vez variabilidad fenotípica intrafamiliar, que va desde la hipoacusia aislada hasta un síndrome con alteraciones neurológicas. Finalmente, el resultado más relevante de nuestro trabajo ha sido la identificación del gen responsable de la hipoacusia no sindrómica ligada al X de tipo DFNX4, mediante el hallazgo de mutaciones en los varones afectados. Se trata del gen *SMPX*, que codifica una pequeña proteína componente de los costámeros, adhesiones focales especializadas del músculo estriado. Por analogía con la función desempeñada en el músculo, se hipotetiza que la proteína *SMPX* podría proteger al epitelio sensorial del oído del estrés mecánico derivado de la mecanotransducción auditiva.

SUMMARY

Hearing impairment is the most frequent sensorineural disorder in humans, with a high heterogeneity at all levels. Among hearing disorders with a genetic cause, all patterns of inheritance are observed. This work focused on several subtypes of autosomal recessive and X-linked non-syndromic hearing impairment.

DFNB1 is the most frequent autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. It is caused by mutations in the *GJB2* gene (connexin-26) and by deletions that remove an as yet unidentified regulatory element that is located at a long distance of the gene. The hitherto known deletions share a 95.4-kb interval. We have developed and validated an MLPA assay to detect specifically novel deletions in the interval. The assay did not reveal any novel deletion in cohorts of patients from Spain, the Netherlands, Poland, and Brazil. On the other hand, we have identified a novel splice-site mutation in the *GJB2* gene, c.-22-2A>C. The mutation results in the loss of the standard acceptor splice site, but an alternative site is activated. This residual expression correlates with a phenotype of postlingual moderate hearing loss.

We have also investigated the prevalence and mutational spectrum of other types of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment, namely DFNB24, DFNB28, DFNB29 and DFNB49 (*RDX*, *TRIOBP*, *CLDN14* and *MARVELD2* genes, respectively). We have identified a novel mutation in the *TRIOBP* gene (p.R990X). Our work indicates that DFNB24, DFNB28, DFNB29 and DFNB49 do not contribute significantly to the whole of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment in the Spanish population.

As regards X-linked hearing impairment, we have focused on the DFNX1 (*PRPS1* gene) and DFNX4 subtypes. We have found two novel pathogenic mutations in the *PRPS1* gene, and we have first described an intrafamilial phenotypic variability, ranging from isolated hearing impairment to a syndrome with neurologic alterations. Finally, our most relevant result has been the identification of the gene responsible for DFNX4 hearing impairment, *SMPX*, through the finding of mutations in the affected males. This gene encodes a small protein component of costameres, which are specialized focal adhesions of striated muscle. By analogy with the role played in muscle, we hypothesize that the *SMPX* protein could protect the inner ear sensory epithelium from the mechanical stress caused by auditory mechanotransduction.

ABREVIATURAS	IV
INTRODUCCIÓN	1
1. Hipoacusia: Aspectos generales	2
1.1 Anatomía y fisiología del oído humano	2
1.2 Clasificación de las hipoacusias	4
1.3 Epidemiología de las hipoacusias	5
1.4 Identificación de genes responsables de hipoacusias no sindrómicas....	6
1.5 Diagnóstico molecular	7
2. El locus DFNB1: genes <i>GJB2</i> y <i>GJB6</i>	8
2.1 Conexinas y uniones comunicantes	9
2.2 Conexinas y uniones comunicantes en el oído interno	10
2.3 Mutaciones en los genes <i>GJB2</i> y <i>GJB6</i>	11
3. El locus DFNB24: gen <i>RDX</i>	14
4. El locus DFNB28: gen <i>TRIOBP</i>	15
5. El locus DFNB29: gen <i>CLDN14</i>	17
6. El locus DFNB49: gen <i>MARVELD2</i>	18
7. Hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma X	19
7.1 El locus DFNB1/DFNB2: gen <i>PRPS1</i>	19
7.2 El locus DFNB4/DFNB6	21
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	24
1. Pacientes y Métodos generales	25
1.1 Pacientes	25
1.2 Extracción de ADN	25
1.3 Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)	25
1.4 Secuenciación del ADN	26
1.5 Genotipado de marcadores	26
2. Locus DFNB1	27
2.1 Ensayo para la detección de las mutaciones del(<i>GJB6</i> -D13S1830), del(<i>GJB6</i> -D13S1854) y del(DFNB1-200kb)	27
2.2 Ensayo MLPA (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>) específicamente desarrollado para detectar nuevas deleciones en el locus DFNB1	28
2.2.1 Diseño de sondas sintéticas para MLPA	29

2.2.2 Reacción de MLPA	31
2.3 Secuenciación de la región codificante del gen <i>GJB2</i>	32
2.4 Evaluación de la nueva variante de secuencia c.-22-2A>C (IVS1-2A>C) en el gen <i>GJB2</i>	32
2.4.1 Análisis <i>in silico</i> de las mutaciones de “ <i>splicing</i> ”	32
2.4.2 Ensayo de restricción	32
2.4.3 Detección y caracterización de los transcritos	33
2.4.3.1 Extracción de ARN a partir de saliva	33
2.4.3.2 Retrotranscripción	33
2.4.3.3 Análisis de fragmentos marcados fluorescentemente	33
2.4.3.4 Secuencia de los transcritos generados en individuos con la mutación c.-22-2A>C	34
2.4.3.5 PCR cuantitativa	35
3. Locus DFNB24: gen <i>RDY</i>	37
3.1 Análisis de haplotipos	37
3.2 Secuenciación	37
4. Locus DFNB28: gen <i>TRIOBP</i>	38
4.1 Análisis de haplotipos	38
4.2 Secuenciación	38
5. Locus DFNB29: gen <i>CLDN14</i>	39
5.1 Análisis de haplotipos	39
5.2 Secuenciación	39
6. Locus DFNB49: gen <i>MARVELD2</i>	40
6.1 Análisis de haplotipos	40
6.2 Secuenciación	40
6.3 Ensayo de restricción para la detección de la mutación c.1331+2T>C ..	41
7. Locus DFNX1/DFN2: gen <i>PRPS1</i>	41
7.1 Secuenciación	41
7.2 Análisis de haplotipos	42
7.3 Ensayos de minisequenciación (<i>SNaPshot</i>) para la detección de las mutaciones c.824T>C (p.I275T) y c.917G>A (p.G306E) en <i>PRPS1</i>	42
8. Secuenciación de los genes <i>PRPS2</i>, <i>PRPS1L1</i> y <i>miR-376</i>	43
9. Locus DFNX4/DFN6: gen <i>SMPX</i>	44
9.1 Secuenciación	44

9.2 Análisis de haplotipos	44
RESULTADOS	45
1. Hipoacusia de tipo DFNB1	46
1.1 Ensayo MLPA para detectar nuevas deleciones en el <i>locus</i> DFNB1	46
1.2 Identificación de una nueva mutación en el <i>locus</i> DFNB1	49
1.2.1 Efecto causado por la mutación c.-22-2A>C	50
2. Hipoacusias de tipos DFNB24, DFNB28, DFNB29 y DFNB49	54
2.1 Hipoacusia de tipo DFNB24: gen <i>RDX</i>	54
2.2 Hipoacusia de tipo DFNB28: gen <i>TRIOBP</i>	54
2.3 Hipoacusia de tipo DFNB29: gen <i>CLDN14</i>	56
2.4 Hipoacusia de tipo DFNB49: gen <i>MARVELD2</i>	56
3. Hipoacusia ligada al X de tipo DFNX1/DFN2: gen <i>PRPS1</i>.....	57
4. Hipoacusia ligada al X de tipo DFNX4/DFN6: gen <i>SMPX</i>	60
DISCUSIÓN	64
1. Hipoacusia de tipo DFNB1	65
1.1 Deleciones en el <i>locus</i> DFNB1	65
1.2 Nueva mutación de <i>splicing</i> en el <i>locus</i> DFNB1	68
2. Hipoacusias no sindrómicas de tipos DFNB24, DFNB28, DFNB29 y DFNB49	70
3. Hipoacusia ligada al cromosoma X de tipo DFNX1	74
4. Hipoacusia ligada al cromosoma X de tipo DFNX4	77
CONCLUSIONES	80
BIBLIOGRAFÍA	83
ARTÍCULOS	97

Introducción

1. Hipoacusia: Aspectos generales

La hipoacusia o déficit auditivo es la enfermedad neurosensorial más frecuente en humanos. Abarca un grupo de trastornos de etiología y manifestaciones clínicas muy heterogéneas, que son consecuencia de la gran complejidad estructural y funcional del oído.

1.1 Anatomía y fisiología del oído humano

El oído humano se compone de tres compartimentos anatómicos (Figura 1A): oído externo, constituido por el pabellón auditivo y el conducto auditivo externo; oído medio, constituido por la membrana timpánica y la cadena de osículos (martillo, yunque y estribo); y oído interno, localizado en la porción pétreo del hueso temporal y compuesto por el sistema vestibular (función relacionada con la orientación espacial y el equilibrio) y la cóclea (que media la percepción del sonido).

La cóclea es un conducto enrollado en espiral, que está dividido en tres compartimentos (Figura 1B): escala vestibular, escala media y escala timpánica. La escala vestibular se comunica con el oído medio por la ventana oval, la cual está cerrada por la base del estribo. La escala timpánica termina en la ventana redonda, que está cerrada por la membrana timpánica secundaria. Estas dos escalas contienen perilinfa, cuya composición iónica es similar al líquido cefalorraquídeo (elevada concentración de Na^+ y baja de K^+). La escala media está separada de la escala vestibular por la membrana de Reissner, y de la escala timpánica por la membrana basilar, sobre la cual descansa el órgano de Corti (epitelio sensorial auditivo). La escala media contiene endolinfa, un líquido de composición iónica poco común que se asemeja al fluido intracelular (elevada concentración de K^+ y baja de Na^+). La endolinfa es secretada por la estría vascular, situada en la pared lateral de la escala media.

El órgano de Corti (Figura 2A) contiene células sensoriales (células ciliadas) y células de soporte. Las células ciliadas son los receptores auditivos, encargados de convertir las ondas sonoras de la perilinfa del canal coclear en impulsos eléctricos. A lo largo de toda la cóclea, existen tres filas de células ciliadas externas y una única fila de células ciliadas internas. Cada célula ciliada (Figura 2B) contiene en su extremo apical unas microvellosidades especializadas denominadas estereocilios, que se encuentran anclados al citoesqueleto a través de la placa cuticular. Los estereocilios tienen un esqueleto de actinas y miosinas, y se agrupan formando un paquete (*hair bundle*) finamente estructurado. El paquete de estereocilios es morfológicamente asimétrico, debido a que los estereocilios de cada célula se disponen escalonadamente en hileras de diferente altura, y están interconectados en su parte apical por uniones filamentosas (filamentos apicales o *tip links*). Cada *tip link* está conectado a un canal de

mecanotransducción en uno o en ambos de sus extremos. Las puntas de los estereocilios de las células ciliadas externas contactan con una lámina viscosa y elástica llamada membrana tectoria. Los dos tipos de células ciliadas desempeñan funciones diferentes. Las células ciliadas internas (CCI) son las células sensoriales propiamente dichas y tienen en sus superficies basales la mayoría de los terminales de las neuronas aferentes del órgano de Corti. Por su parte, las células ciliadas externas (CCE) tienen una actividad motora inducida por la mecanotransducción, por medio de la cual contribuyen a la amplificación de la señal (amplificador coclear) y a la resolución de la frecuencia sonora.

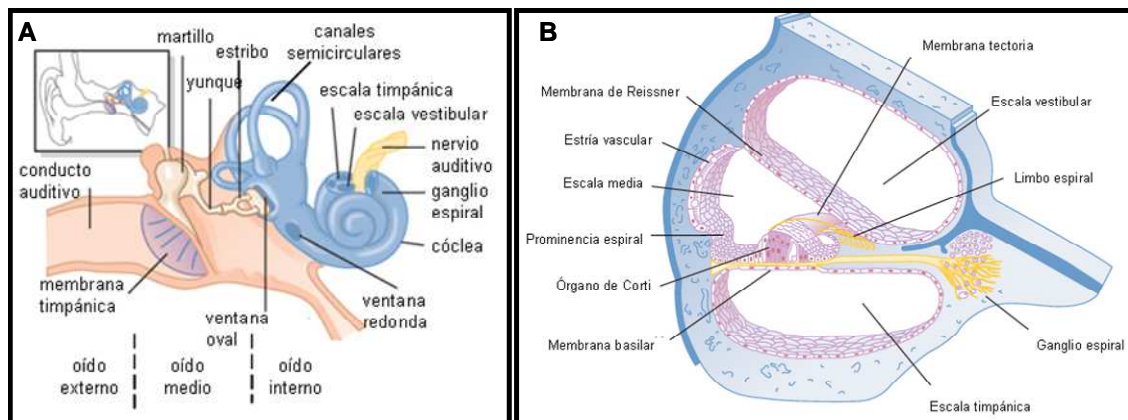


Figura 1. A: Esquema del oído. B: Corte transversal de la cóclea (adaptada del libro Medical Physiology, de Guyton et al., 2011).

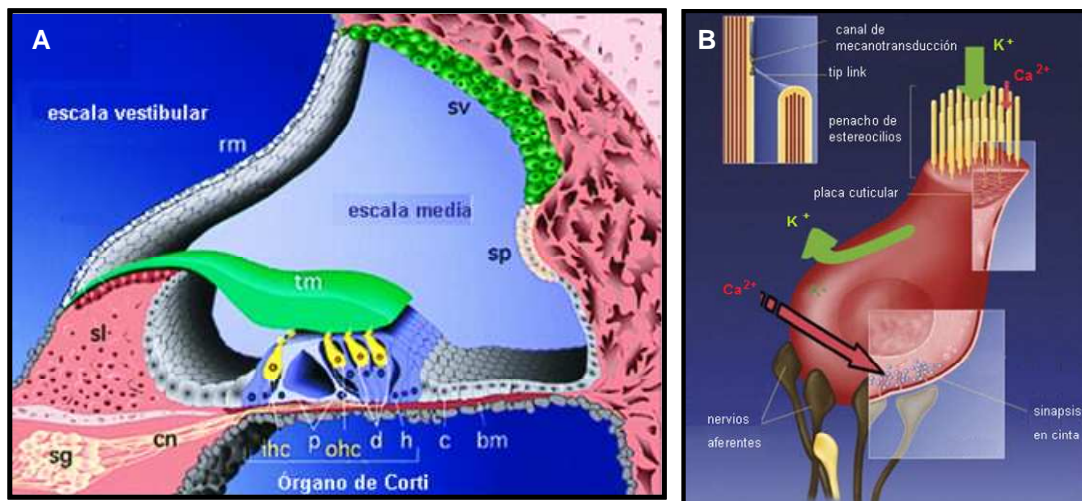


Figura 2. A: Esquema del órgano de Corti: bm (membrana basilar); rm (membrana de Reissner); sv (estria vascular); sp (prominencia espiral); p (células pilares); d (células de Deiters); h (células de Hensen); c (células de Claudius); ohc (CCE); ihc (CCI); tm (membrana tectoria); sg (ganglio espiral); cn (nervio auditivo); sl (limbo espiral) (adaptada de Cohen-Salmon et al., 1997). B: Célula ciliada interna (adaptada de Leibovici et al., 2008).

En el proceso de la audición, las ondas sonoras son captadas por el oído externo y viajan a través del conducto auditivo externo hasta la membrana timpánica. Las vibraciones de la membrana timpánica son transmitidas por la cadena de osículos del

oído medio. Esto ocasiona la vibración de la perilinfa y de la membrana basilar, lo cual provoca a su vez un desplazamiento de los estereocilios de las células ciliadas en interacción con la membrana tectoria, produciendo el estiramiento de los *tip links*. Como consecuencia, se abren los canales de mecanotransducción, que permiten el flujo de K^+ al interior de las células ciliadas, provocando su consiguiente despolarización. La despolarización activa canales de Ca^{2+} en la cara basolateral de las células ciliadas, dirigiendo un flujo de Ca^{2+} que desencadena la liberación de neurotransmisores, y así los impulsos eléctricos son llevados a través del nervio auditivo (octavo par craneal) a múltiples núcleos del sistema auditivo central y finalmente al córtex auditivo en el cerebro.

Las células ciliadas se repolarizan cuando los iones K^+ salen de las mismas a través de canales de K^+ y entran en las células epiteliales de soporte. Luego, los iones K^+ difunden a través de uniones comunicantes formadas por conexinas hasta la estría vascular, donde son secretados de regreso a la endolinfa a través de una compleja red de canales, cotransportadores y ATPasas (Dallos *et al.*, 1996).

1.2 Clasificación de las hipoacusias

Las hipoacusias se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios:

- Localización de la lesión primaria:
 - Conductiva o de transmisión: defectos en el oído externo y/o los osículos del oído medio.
 - Neurosensorial: defectos en el oído interno, nervio auditivo o en centros auditivos corticales del cerebro.
 - Mixta: combinación de hipoacusia conductiva y neurosensorial.
- Edad de inicio (*onset*):
 - Prelocutiva: se presenta antes de la adquisición del habla. Toda hipoacusia congénita es prelocutiva, pero no toda hipoacusia prelocutiva es congénita.
 - Postlocutiva: se presenta después de la adquisición del habla.
- Grado de pérdida auditiva:
 - Leve: pérdidas de 21-40 dB.
 - Moderada: pérdidas de 41-70 dB.
 - Severa: pérdidas de 71-95 dB.
 - Profunda: pérdidas mayores de 95 dB.
- Rango de frecuencias afectadas por la pérdida auditiva:
 - Baja o grave: frecuencias <500 Hz.
 - Media: frecuencias entre 500-2000 Hz.
 - Alta o aguda: frecuencias >2000 Hz.

- Etiología:
 - Adquirida: debida a factores ambientales, como los traumas acústicos, las infecciones bacterianas o víricas y la ototoxicidad de fármacos.
 - Genética: son trastornos mayoritariamente monogénicos.

Clasificación según el fenotipo:

- Síndrónica: la hipoacusia está asociada a otros síntomas o signos clínicos.
- No síndrónica: la hipoacusia aparece aislada.

Clasificación según el tipo de herencia:

- Autosómica dominante.
- Autosómica recesiva.
- Ligada al cromosoma X.
- Ligada al cromosoma Y.
- Materna-mitocondrial.

1.3 Epidemiología de las hipoacusias

La hipoacusia es el trastorno sensorial más frecuente en la especie humana. En Europa se estima que más de 40 millones de personas presentan problemas auditivos que dificultan una comunicación normal. La hipoacusia puede manifestarse en diferentes grados y a cualquier edad. Aproximadamente 1 de cada 500-1000 recién nacidos está afectado por sordera. En los países desarrollados, se estima que menos del 40% de los casos de sordera son de etiología adquirida y más del 60% tienen una base genética. Dentro de este grupo, la sordera síndrónica representa un 30% de los casos y la no síndrónica el 70% restante. Por su parte, la hipoacusia asociada al envejecimiento, la presbiacusia, cuya edad de manifestación y progresión están influenciadas tanto por factores genéticos como por factores ambientales, llega a afectar al 30% de la población mayor de 70 años (Nadol, 1993).

La sordera infantil es un importante problema de salud, dadas las inmediatas repercusiones que tiene sobre el desarrollo intelectual, cognitivo, emocional, lingüístico y social. Los déficits auditivos congénitos o adquiridos en el periodo neonatal constituyen un serio trastorno sensorial que afecta, en los casos más graves, al desarrollo del habla y del lenguaje, ocasionando serias dificultades de comunicación y psicológicas para el niño y su familia. Mediante la detección precoz de la hipoacusia, se logran reducir las consecuencias negativas, mejorando el aprendizaje del lenguaje y la intercomunicación del niño con su entorno. Por esta razón, numerosos países, entre ellos España, han desarrollado protocolos de despistaje universal de la hipoacusia en neonatos. Por otra parte, las hipoacusias postlocutivas y progresivas también

comprometen la calidad de vida de los individuos adultos y pueden llevar a un deterioro de la autoestima y a su aislamiento social.

1.4 Identificación de genes responsables de hipoacusias no sindrómicas

El estudio genético de las hipoacusias no sindrómicas es una tarea muy compleja debido a varios factores. El factor principal es su elevada heterogeneidad genética, que impide la reunión de familias pequeñas para un estudio de ligamiento conjunto. Otros factores son la endogamia dentro del colectivo de individuos afectados, que hace que varios genes de sordera puedan estar segregando en una misma familia, y la existencia de fenocopias, originadas por factores ambientales.

Sin embargo, el análisis de ligamiento realizado sobre familias grandes, consanguíneas, de poblaciones aisladas geográficamente, ha permitido el cartografiado e identificación de genes implicados en hipoacusias no sindrómicas. En la actualidad se han localizado en el mapa 121 *loci* de hipoacusias no sindrómicas. Según el modo de herencia, los *loci* se clasifican en: DFNA (dominantes), DFNB (recesivos), DFNX (ligados al cromosoma X) y DFNY (ligados al cromosoma Y). Cada *locus* se nombra con estas siglas seguidas de un número, que indica el orden cronológico en que han sido identificados. De los 121 *loci* mapeados, 46 son DFNA, 70 DFNB, 4 DFNX y 1 DFNY (<http://hereditaryhearingloss.org>). Por extensión, el nombre del *locus* suele utilizarse también para nombrar a la hipoacusia causada por mutaciones en el mismo.

En relación con estos 121 *loci* se han identificado más de 60 genes de hipoacusias no sindrómicas. Los genes descubiertos hasta ahora codifican productos implicados en funciones muy variadas en el oído interno. La lista incluye proteínas del citoesqueleto (miosinas, actinas, otros componentes de los estereocilios) y de la matriz extracelular (tectorinas, colágenos, coclina); proteínas de uniones intercelulares (conexinas, claudinas, tricelulina); proteínas de adhesión celular (cadherinas, protocadherinas); de membrana (canales iónicos, ATPasas, transportadores, proteasas,...); proteínas implicadas en el tráfico vesicular (otoferlina); reguladores (factores de transcripción, factores de crecimiento, miRNAs), e incluso proteínas con función todavía desconocida (<http://hereditaryhearingloss.org>) (Dror and Avraham, 2010; Richardson *et al.*, 2011).

Los datos aportados por las diferentes pruebas clínicas, ya sean subjetivas u objetivas, aunque son útiles para la clasificación de las sorderas y la identificación de la zona del sistema auditivo afectada, contribuyen poco al conocimiento de las anomalías estructurales (frecuentemente a nivel microscópico) y de las disfunciones debidas específicamente a las mutaciones en cada gen. Por esta razón, los modelos animales son una herramienta fundamental para comprender el funcionamiento del sistema

auditivo humano y para la identificación y caracterización de mutaciones en nuevos genes. Una amplia selección de organismos modelo, entre los que destacamos al pez cebra, la rata y el ratón, han permitido profundizar en el estudio de la función de las proteínas, complementando los estudios obtenidos en el campo de la genética humana. El ratón es el modelo animal más usado, debido a la similitud entre la estructura y función del oído interno del ratón y del hombre, así como a la alta homología entre sus genomas y a las herramientas biotecnológicas que permiten introducir cambios en su genoma. En los últimos años se han establecido numerosas líneas de ratones mutantes como modelos fiables para el estudio de las hipoacusias humanas (Leibovici *et al.*, 2008)

1.5 Diagnóstico molecular

La identificación de los genes implicados en las hipoacusias posibilita su diagnóstico molecular y el desarrollo de nuevas terapias. Aunque en la actualidad no existe un tratamiento curativo para la sordera, la detección precoz de la hipoacusia es esencial para el éxito de los tratamientos paliativos (audífonos, implante coclear) y de la educación especial (lenguaje de signos, logopedia). Se está investigando en diferentes áreas, desde las bases genético-moleculares y mecanismos fisiopatológicos, pasando por el desarrollo de herramientas de diagnóstico precoz, hasta nuevas terapias (farmacológica, génica, celular, protésica) para prevenir su aparición, paliar sus consecuencias o reparar las estructuras dañadas.

Además de los beneficios de la detección precoz, debe tenerse en cuenta que el diagnóstico genético es la herramienta principal para averiguar la causa molecular de la hipoacusia en un paciente concreto, información necesaria para determinar si el paciente puede beneficiarse de los tratamientos específicos que puedan ir apareciendo.

A pesar del gran número de genes identificados, el diagnóstico genético-molecular de rutina de hipoacusias no sindrómicas que se ofrece en la mayoría de los laboratorios, solamente incluye el *locus* DFNB1 (genes *GJB2* y *GJB6*), en sorderas prelocutivas. Esta situación se debe a la combinación de una serie de factores: la difícil aplicación del análisis de ligamiento genético (heterogeneidad genética, familias con pocos afectados, endogamia), el poco conocimiento acerca de las correlaciones genotipo-fenotipo y el conocimiento escaso de la epidemiología genética (espectro de mutaciones, frecuencia, “puntos calientes” de mutación).

Estos factores impiden la orientación del diagnóstico hacia unos pocos genes o mutaciones específicas mediante ensayos rápidos y económicos para su detección de manera rutinaria.

En este trabajo hemos estudiado las hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas de tipos DFNB1, DFNB29 y DFNB49, causadas por mutaciones en genes que codifican proteínas de las uniones intercelulares, y las de los tipos DFNB24 y DFNB28, causadas por mutaciones en genes que codifican componentes del paquete de estereocilios. Por otro lado, hemos estudiado las hipoacusias no sindrómicas ligadas al cromosoma X de tipos DFNX1 y DFNX4.

2. El *locus* DFNB1: genes *GJB2* y *GJB6*

El *locus* DFNB1, situado en 13q12, fue el primer *locus* definido para una hipoacusia no sindrómica de herencia autosómica recesiva (Guilford *et al.*, 1994). Posteriormente se demostró que mutaciones en el gen *GJB2*, situado en DFNB1 y que codifica la conexina-26, una proteína de las uniones comunicantes, eran responsables de esta hipoacusia (Kelsell *et al.*, 1997). Antes de detallar el estado actual de las investigaciones genéticas sobre el *locus* DFNB1, es conveniente presentar brevemente las características generales de esta familia de proteínas.

2.1 Conexinas y uniones comunicantes

Las conexinas son una familia de proteínas transmembranares altamente conservadas y expresadas en todos los vertebrados (Sohl and Willecke, 2004). La función principal de estas proteínas es formar canales hidrofílicos en la membrana plasmática que permiten la comunicación directa entre los citosoles de las dos células en contacto. Esta comunicación intercelular es importante para mantener el correcto funcionamiento de diferentes órganos.

Este grupo de proteínas está codificado por más de 20 genes que se expresan diferencialmente en distintos tipos celulares, pudiendo coexistir varias isoformas de conexina en una misma célula (Sohl and Willecke, 2004). Las conexinas se clasifican, según su peso molecular (en el rango de 23 a 62 kDa) y la similitud de su secuencia, en tres clases principales, α (genes *GJA*), β (genes *GJB*) y γ (genes *GJC*). La mayoría de genes de conexina se encuentran en grupos en el genoma, como el formado por *GJB2* (conexina-26, Cx26), *GJB6* (conexina-30, Cx30) y *GJA3* (conexina-46, Cx46) en el cromosoma 13. La estructura exón-intrón de los genes de las conexinas α y β es muy parecida, la región codificante completa suele estar íntegramente contenida en el último exón.

Las conexinas (Figura 3) presentan cuatro dominios hidrofóbicos transmembranares, dos lazos extracelulares con una secuencia de aminoácidos altamente conservada, y un lazo intracelular altamente variable. Tanto el extremo C-

terminal como el extremo N-terminal suelen encontrarse en la región citoplasmática (Evans and Martin, 2002; Willecke *et al.*, 2002).

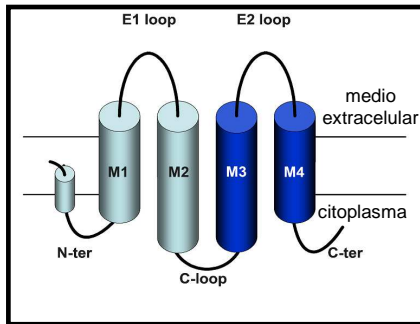


Figura 3. Topología de una conexina tipo α ó β en la membrana plasmática: M1-M4 (dominios transmembranares), E1 y E2 loops: dominios extracelulares, C-loop (lazo intracelular) (adaptado de del Castillo and del Castillo, 2011).

Las conexinas se organizan en una estructura básica formada por la asociación de seis subunidades agrupadas que constituyen un hemicanal (también llamado conexón). Este hemicanal se une a otro hemicanal de una célula adyacente para formar un canal intercelular que conecta directamente los citoplasmas de las dos células (Figura 4A).

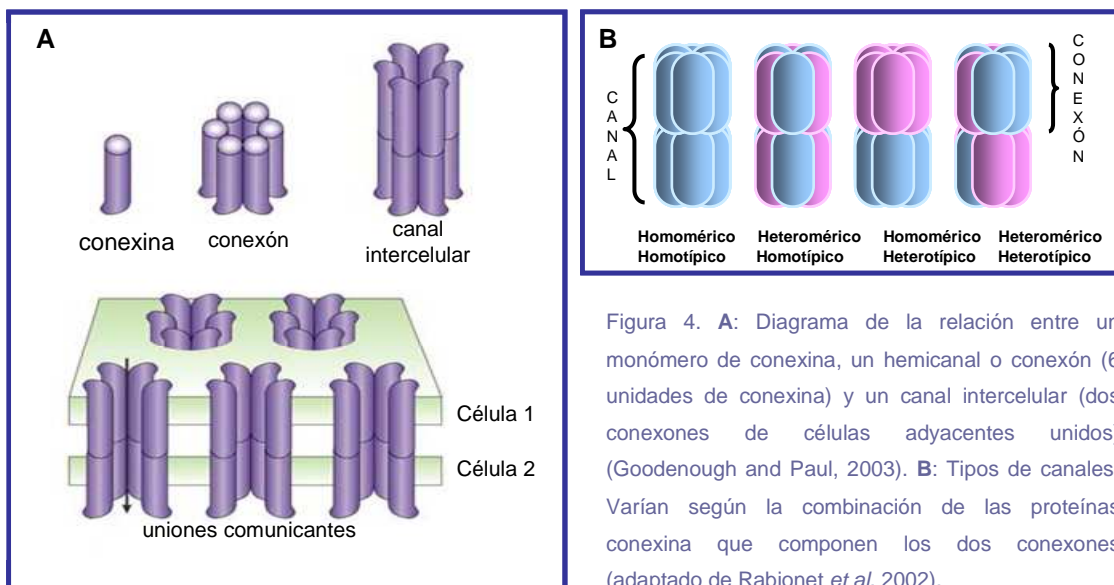


Figura 4. **A:** Diagrama de la relación entre un monómero de conexina, un hemicanal o conexón (6 unidades de conexina) y un canal intercelular (dos conexones de células adyacentes unidos) (Goodenough and Paul, 2003). **B:** Tipos de canales. Varían según la combinación de las proteínas conexina que componen los dos conexones (adaptado de Rabionet *et al.* 2002).

Existen diferentes tipos de uniones comunicantes según el tipo de conexina que las constituye. De este modo, se diferencia entre canales homoméricos o heteroméricos, dependiendo de si el hemicanal está formado por un solo tipo de conexina o por diferentes conexinas, respectivamente. En cuanto a la composición del canal, se diferencia entre canales homotípicos (cuando los dos hemicanales que lo forman están constituidos por el mismo tipo de conexina), y heterotípicos (cuando los dos hemicanales están compuestos por diferentes tipos de conexina) (Goodenough *et al.*, 1996; Kumar and Gilula, 1996) (Figura 4B).

Las uniones comunicantes tienen una elevada permeabilidad (modulada por el tipo de conexina que contengan) y permiten la difusión de moléculas de un tamaño menor a 1 kDa, tales como iones, segundos mensajeros y metabolitos, y también impulsos eléctricos (Goodenough *et al.*, 1996; Kumar and Gilula, 1996). Diversos mecanismos pueden participar en la regulación y cierre de los hemicanales, como los cambios en el potencial de membrana, el pH intracelular, la concentración de calcio y el estado energético, entre otros (Harris, 2002).

Las mutaciones en genes de conexinas afectan a muchos órganos y sistemas, siendo causantes de enfermedades cardíacas, neurológicas, dermatológicas y oculares (cataratas), así como de sordera neurosensorial (Kelsell *et al.*, 2001; Rabionet *et al.*, 2002).

2.2 Conexinas y uniones comunicantes en el oído interno

En la cóclea, la función auditiva depende fundamentalmente del mantenimiento de la composición de la endolinfa y la perilinfa, de la preservación de la función de las células ciliadas y de la producción del potencial endococlear. Estos procesos homeostáticos requieren que existan uniones comunicantes, por lo que éstas abundan en el oído interno. Se encuentran en las células de soporte del órgano de Corti, en la estría vascular, en el ligamento espiral y en el limbo espiral (Kikuchi *et al.*, 2000; Forge *et al.*, 2002). Una de las funciones propuestas para los sistemas de uniones comunicantes en oído interno es la recircularización de iones K^+ desde las células ciliadas hasta las células marginales de la estría vascular, lo que contribuiría al mantenimiento del potencial endococlear (Kikuchi *et al.*, 2000) (Figura 5). Las uniones comunicantes entre las células de soporte podrían estar implicadas también en la transmisión de señales que coordinan y activan la reparación de las células ciliadas dañadas (Forge *et al.*, 2002).

La importancia de las uniones comunicantes para la función auditiva ha sido destacada por el descubrimiento de mutaciones en tres genes diferentes de conexinas, *GJB2* (conexina-26, Cx26), *GJB6* (Cx30), y *GJB3* (Cx31), causantes de hipoacusia neurosensorial. Se ha detectado expresión de al menos seis conexinas diferentes en el oído interno, pero las especies claramente predominantes son Cx26 y Cx30 (Kikuchi *et al.*, 2000; Forge *et al.*, 2002).

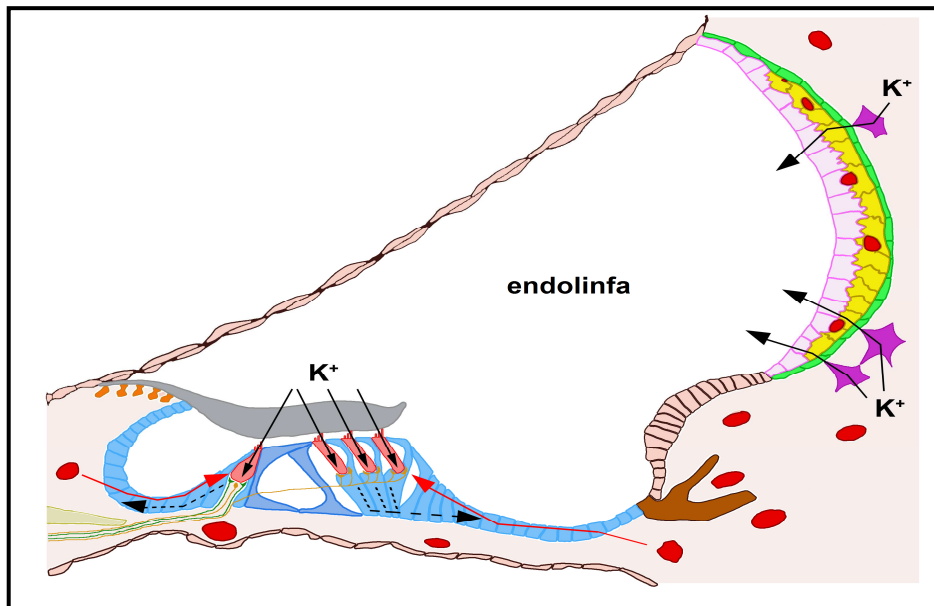


Figura 5. Sección transversal de la cóclea que muestra la ruta propuesta de reciclaje de los iones K^+ , que difunden hasta la estría vascular a través de las uniones comunicantes, y son secretados a la endolinfa (flechas negras). Los iones K^+ y el glutamato liberado durante la estimulación sonora son excitotóxicos, por lo que son recogidos por las células de soporte y dispersados por transporte mediado por uniones comunicantes (flechas discontinuas). Además, la glucosa de los capilares sanguíneos (rojo) llega a las células de soporte mediante uniones comunicantes (flechas rojas) (adaptado de del Castillo and del Castillo, 2011).

2.3 Mutaciones en los genes *GJB2* y *GJB6*

Los genes de las conexinas 26 (*GJB2*) y 30 (*GJB6*) se localizan en 13q12, separados entre sí por 35 kb. *GJB2* y *GJB6* se expresan en los mismos tipos celulares de la cóclea (Lautermann *et al.*, 1998; Lautermann *et al.*, 1999). Las conexinas 26 y 30 comparten un 76% de identidad en su secuencia de aminoácidos, pero Cx30 es de mayor tamaño, con 37 aminoácidos adicionales en su extremo carboxilo (Kelley *et al.*, 1999).

El gen *GJB6* (OMIM 604418) tiene 6 exones, de los cuales los cinco primeros corresponden a la región 5' no traducida (5'-UTR), mientras que el sexto contiene la región codificante completa. Los cuatro primeros exones están sometidos a *splicing* alternativo (Essenfelder *et al.*, 2005). Las mutaciones puntuales en el gen *GJB6* están asociadas con hipoacusias no sindrómicas o con enfermedades dermatológicas. En una familia con hipoacusia no sindrómica autosómica dominante se identificó la mutación p.T5M, responsable de un efecto dominante negativo (Grifa *et al.*, 1999). El resto de mutaciones puntuales encontradas hasta ahora producen trastornos dermatológicos, asociados o no con hipoacusia, tales como la displasia ectodérmica hidrótica (DEH, OMIM 129500, síndrome de Clouston, con manifestaciones en piel, pelo, uñas) (Lamartine *et al.*, 2000), y con una minoría de casos del síndrome de

queratitis-ictiosis-sordera (en inglés KID, OMIM 148210) con manifestaciones en ojo, piel y oído (Jan *et al.*, 2004).

Por su parte, el gen *GJB2* (OMIM 121011) tiene dos exones, de los cuales el primero corresponde a la región 5' no traducida (5'-UTR), mientras que el segundo contiene la región codificante completa (Kiang *et al.*, 1997). Diferentes mutaciones en el gen *GJB2* son responsables de hipoacusia no sindrómica autosómica dominante (Denoyelle *et al.*, 1998) o autosómica recesiva (DFNB1) (Kelsell *et al.*, 1997), así como de trastornos dermatológicos con sordera asociada (Richard *et al.*, 1998; Richard *et al.*, 2002; Richard *et al.*, 2004). Hay que resaltar que el gen *GJB2* sobresale por la elevada frecuencia de sus mutaciones en pacientes con hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva: dan cuenta del 20-40% de los casos en Europa (con porcentajes más altos en el sur que en el norte), en Oriente Medio y en Argentina. En otras regiones, su contribución es menor (12-20% en Estados Unidos, Brasil, Asia Oriental, Irán, India y Australia), pero sigue siendo mayoritaria (Kenneson *et al.*, 2002; del Castillo and del Castillo, 2011). Téngase en cuenta que la contribución de cada uno de los otros genes conocidos no suele superar el 5%, y en muchos de ellos es inferior al 1%.

Se han descrito en *GJB2* más de 100 mutaciones patogénicas que incluyen mutaciones *nonsense*, *missense*, pequeñas deleciones, duplicaciones o inserciones. Entre ellas, la más frecuente en poblaciones caucásicas es la mutación c.35delG (Estivill *et al.*, 1998; Denoyelle *et al.*, 1999), con una frecuencia del 2,5% en la población general (Gasparini *et al.*, 2000). También se han descrito una mutación en el sitio donador del *splicing* del intrón 1 (c.-23+1G>A o IVS1+1G>A) (Denoyelle *et al.*, 1999) y otra en la región promotora (g.-77C>T) (Matos *et al.*, 2007).

Dada la elevada prevalencia de la hipoacusia recesiva de tipo DFNB1, el análisis molecular de *GJB2* se ha convertido en una prueba de referencia en numerosos laboratorios de todo el mundo. Sin embargo, desde el principio pudo observarse que un número relativamente grande de pacientes (entre 10 y el 50%) eran heterocigotos (sólo se había identificado una mutación patogénica en *GJB2*, no se conseguía identificar la segunda mutación en el otro alelo).

Algunos de estos casos heterocigotos no elucidados podrían ser simplemente portadores de las mutaciones *GJB2* más frecuentes; mientras que otros casos podrían llevar otras mutaciones en el *locus* DFNB1, pero en partes no examinadas del gen *GJB2* o incluso fuera del gen. Un buen candidato era el gen *GJB6* (Cx30), localizado a 35 kb de *GJB2* (Kelley *et al.*, 1999). Aunque no se han encontrado mutaciones puntuales en *GJB6* responsables de hipoacusia no sindrómica recesiva, se han detectado deleciones que truncan el gen *GJB6*, dejando intacto *GJB2* (Lerer *et al.*, 2001; del Castillo *et al.*, 2002; Pallares-Ruiz *et al.*, 2002) (Figura 6; Tabla 1).

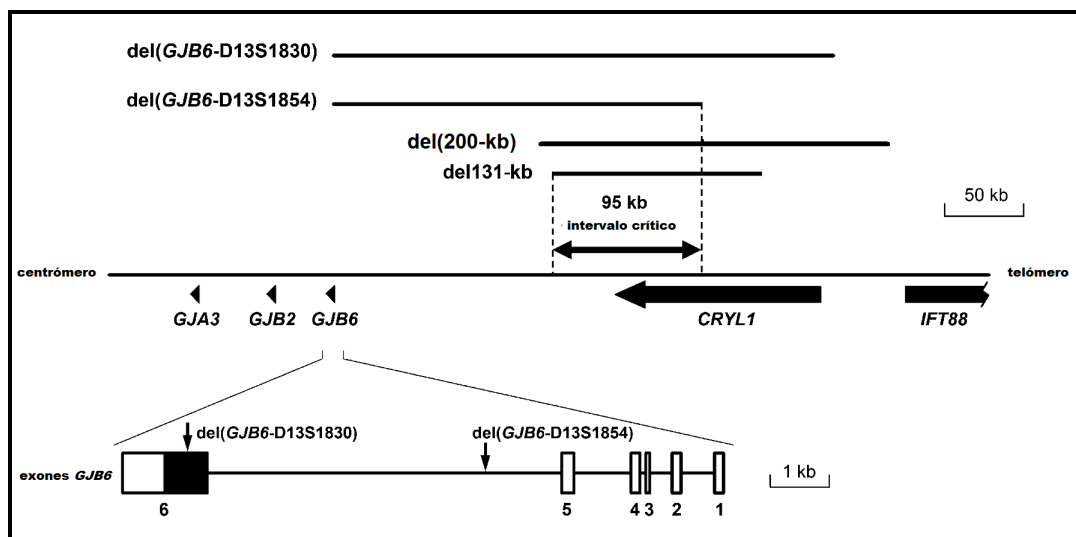


Figura 6. Mapa físico de la región del locus DFNB1 en 13q12. Se muestran las 4 deleciones descritas y el intervalo común de 95,4 kb que comparten. Los límites del intervalo crítico son el punto de rotura proximal de del131-kb, y el punto de rotura distal de del(GJB6-D13S1854). Los genes de la región están representados por puntas de flecha. La estructura del gen *GJB6* se muestra debajo del mapa. Las flechas verticales marcan los puntos de rotura proximales de las mutaciones del(GJB6-D13S1830) y del(GJB6-D13S1854), que están en el gen *GJB6*.

Tabla 1. Deleciones en el locus DFNB1 en 13q12

Nombre de la deleción	Coordenadas (NCBI Build 37.2)	Tamaño del intervalo deletado
del(GJB6-D13S1830)	Chr 13:g.(20,797,177_21,105,945)del	309 kb
del(GJB6-D13S1854)	Chr 13:g.(20,802,727_21,034,768)del	232 kb
del(DFNB1-200kb)	Chr 13:g.(20,935,299_21,135,530)del	200 kb
del(131kb)	Chr 13:g.(20,939,344_21,070,698)del	131 kb

Nuestro laboratorio fue el primero en caracterizar molecularmente una deleción de 309 kb, que denominamos del(GJB6-D13S1830) (del Castillo *et al.*, 2002) (Figura 6). En ese trabajo se observó que esta deleción se encontraba en un 50% de los casos heterocigotos no elucidados de la muestra estudiada, en *trans* con la mutación *GJB2* de cada caso. La mutación da cuenta de más del 8% de los alelos mutantes DFNB1 en la muestra española estudiada hasta la fecha (más de 600 alelos), lo que la convierte en la segunda mutación más frecuente causante de sordera prelocutiva no sindrómica en España (la primera es la ya mencionada c.35delG en *GJB2*). En un estudio multicéntrico, se detectó la deleción en numerosos países, con frecuencias variadas (del Castillo *et al.*, 2003). Poco después, nuestro laboratorio detectó y caracterizó una segunda deleción que, análogamente a del(GJB6-D13S1830), truncaba el gen *GJB6*, dejando intacto *GJB2*. Esta deleción, de menor tamaño (232 kb), fue denominada del(GJB6-D13S1854) (del Castillo *et al.*, 2005) (Figura 6). Se encuentra en una variable proporción (2-25 %) de los casos heterocigotos *GJB2* no elucidados en distintos países europeos.

Más tarde, se caracterizó otra deleción de 131 kb, del(131kb) (Wilch *et al.*, 2006; Wilch *et al.*, 2010) (Figura 6) en la región DFNB1, que deja intactos los genes *GJB2* y *GJB6*, y que es responsable de la pérdida de expresión de los alelos *GJB2* y *GJB6* en *cis*.

Nuestro laboratorio recientemente detectó y caracterizó una tercera deleción de unas 200 kb, del(DFNB1-200kb) (Figura 6), que análogamente a del(131kb), deja intactos *GJB2* y *GJB6*. Se trata de una reorganización compleja, del tipo *indel*, en la cual se elimina un segmento de unas 200 kb, al tiempo que se inserta una pequeña secuencia de 6 pb. Su límite proximal se encuentra a unas 130 kb del extremo 5' del gen *GJB6* (manuscrito en preparación).

Aunque las deleciones proporcionaban una explicación para algunos casos heterocigotos no elucidados, se hizo evidente que debían quedar otras mutaciones en el *locus* DFNB1 pendientes de identificar. Combinando los datos de los puntos de rotura de las deleciones, se obtiene un intervalo común de 95,4 kb localizado a más de 100 kb por delante de *GJB2*. Se hipotetiza que en este intervalo común habría un elemento regulador esencial para la expresión de *GJB2* en el oído interno (Common *et al.*, 2005; Rodriguez-Paris and Schrijver, 2009).

3. El *locus* DFNB24: gen *RDX*

En 2007, Khan y colaboradores estudiaron 3 familias consanguíneas de Pakistán que presentaban hipoacusia no sindrómica, neurosensorial, autosómica recesiva, lo que les permitió situar en el mapa un nuevo *locus*, DFNB24. La investigación del intervalo crítico reveló 3 mutaciones patogénicas en el gen *RDX* (p.Q155X, p.A469GfsX19, p.D578N), cada una en homocigosis en una familia (Khan *et al.*, 2007). Más tarde, Shearer y colaboradores identificaron una mutación en el sitio donador del intrón 7 (c.698+1G>A o IVS7+1G>A) en el mismo gen, en una familia consanguínea de Irán (Shearer *et al.*, 2009) (Figura 7).

El gen *RDX* (OMIM 179410) contiene 14 exones y codifica la radixina, una proteína de 583 aminoácidos que se expresa mayoritariamente en oído y en retina. Pertenece a la familia de proteínas ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) que se caracteriza por tener tres dominios funcionales conocidos: un dominio N-terminal FERM (*band 4.1*, *ERM*, que localiza proteínas en la membrana plasmática), un dominio central α hélice (que tiene un papel en la activación de la radixina) y un dominio CTD (*C-terminal actin-binding domain*, que se une a actina) (Figura 7). La radixina se localiza a lo largo de los estereocilios de las células ciliadas (Kitajiri *et al.*, 2004). Se piensa que tiene un papel en la organización o anclaje de las proteínas de membrana a los filamentos de actina (Pataky *et al.*, 2004).

Kitajiri y colaboradores demostraron que las células ciliadas cocleares y vestibulares de ratón eran ricas en radixina. Los ratones que carecían de *Rdx* eran sordos, pero su función vestibular era normal, por lo que concluyeron que la radixina es indispensable para la función auditiva, pero no para la función vestibular (Kitajiri *et al.*, 2004).

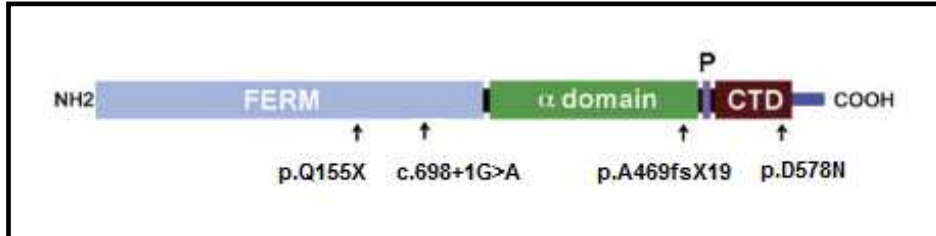


Figura 7. Representación esquemática de la estructura de la proteína radixina en humanos. Organización de los dominios y localización de las mutaciones descritas (adaptada de Khan *et al.*, 2007).

4. El locus DFNB28: gen *TRIOBP*

En el año 2000, Walsh y colaboradores estudiaron, en una familia grande de Palestina, la segregación de un gen responsable de sordera no sindrómica, neurosensorial, severo-profunda y prelocutiva, con herencia autosómica recesiva. Se definió un intervalo de 6.1 Mb para un nuevo locus de hipoacusia no sindrómica, que fue denominado DFNB28, con el intervalo crítico delimitado por los marcadores D22S1045 y D22S282 en 22q13. En el año 2006, dos equipos de investigación determinaron que el gen implicado en la hipoacusia DFNB28 es *TRIOBP* (Shahin *et al.*, 2006; Riazuddin *et al.*, 2006b), también conocido como *TARA* (Seipel *et al.*, 2001).

El gen *TRIOBP* (OMIM 609761) contiene 24 exones y codifica múltiples isoformas de la proteína (Seipel *et al.*, 2001). Las más características se representan en la Figura 8. La mayor de las isoformas, *TRIOBP-6* (2365 aminoácidos y 261 kDa), se expresa predominantemente en oído y retina. Las isoformas *TRIOBP-1* (72 kDa) y *TRIOBP-4* (107 kDa) son más cortas y no comparten ni exones ni secuencia proteica. *TRIOBP-4* corresponde a la parte N-terminal de la proteína completa, y *TRIOBP-1*, a la parte C-terminal. *TRIOBP-1* tiene expresión ubicua, mientras que *TRIOBP-4*, al igual que *TRIOBP-6*, se expresa predominantemente en oído y retina (Kitajiri *et al.*, 2010) (Figura 8).

TRIOBP tiene varias copias de cada uno de los dos motivos repetidos MR1 y MR2, además de un dominio de homología con *pleckstrina* (PH), y cuatro dominios *coiled-coil* en la región C-terminal. La isoforma *TRIOBP-6* contiene todos estos dominios, mientras que la isoforma *TRIOBP-4* carece del dominio PH y de los cuatro dominios *coiled-coil*, y la isoforma *TRIOBP-1* carece de los motivos repetidos MR1 y MR2.

Mediante ensayos de interacción de proteínas (Seipel *et al.*, 2001), se demostró que la región N-terminal de TRIOBP regula la organización del citoesqueleto de actina. La región C-terminal de TRIOBP se asocia con F-actina (actina filamentososa), y podría tener una función en la estabilización de las estructuras de la F-actina, ya que las células que expresan TRIOBP son resistentes a un desestabilizador de la F-actina.

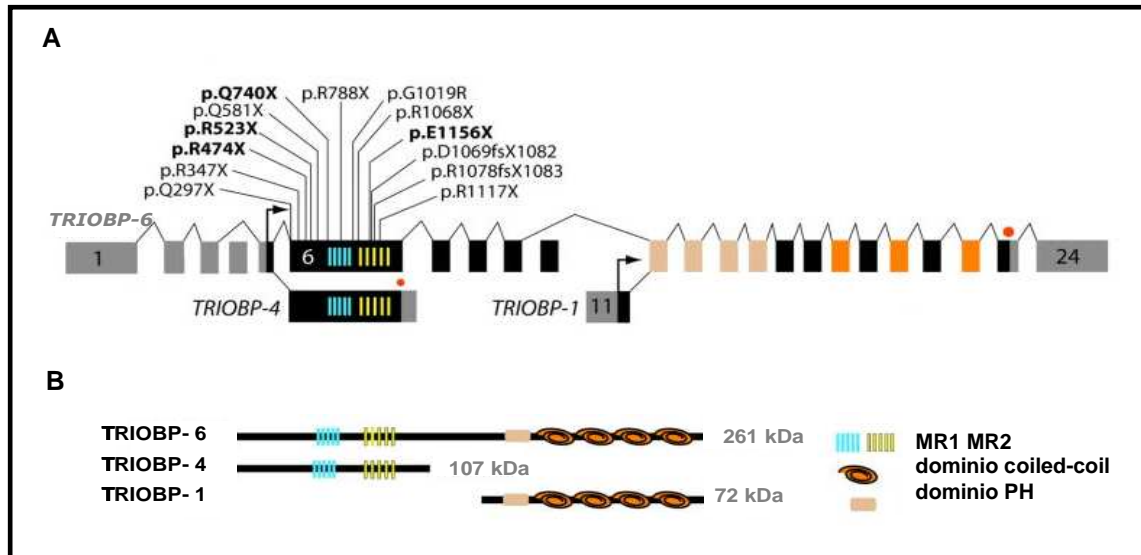


Figura 8. Representación esquemática de la estructura del gen *TRIOBP* y de las correspondientes isoformas proteicas en humanos. **A:** Estructura genómica de *TRIOBP-6*, *TRIOBP-4* y *TRIOBP-1*. Se representan las mutaciones descritas (todas en el exón 6) y las repeticiones. **B:** Estructura de las isoformas proteicas conocidas de *TRIOBP* (adaptada de Riazuddin *et al.*, 2006b).

Se realizaron ensayos de inmunolocalización utilizando anticuerpos específicos de isoforma. *TRIOBP-6* se localiza principalmente en las “raíces” (*rootlets*) de los estereocilios, mientras que *TRIOBP-4* se expresa en las “raíces” y a lo largo de los estereocilios (Kitajiri *et al.*, 2010). Las “raíces” son filamentos de actina condensados en los estereocilios, que se extienden hacia la placa cuticular y permiten el anclaje de cada estereocilio a la malla de actina de las células ciliadas (Flock and Cheung, 1977), proporcionando rigidez y durabilidad al paquete de estereocilios (Kitajiri *et al.*, 2010).

La función de *TRIOBP* en el oído interno podría estar relacionada con la formación o estabilización de los filamentos de actina del citoesqueleto de los estereocilios y/o de la placa cuticular de las células ciliadas (Figura 9).

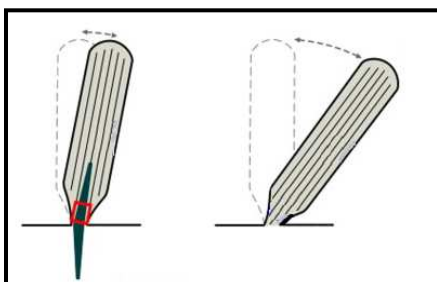


Figura 9. Las CC detectan el sonido mediante la deflexión de los estereocilios. Los estereocilios están anclados mediante filamentos de actina, que se acumulan en la base, formando unas “raíces” que se extienden hacia el cuerpo celular. *TRIOBP* (en el recuadro rojo) se localiza en estas “raíces”. A la izquierda, estereocilio de un ratón silvestre; a la derecha, estereocilio de un ratón KO (*TRIOBP* Δ ex8/ Δ ex8). Los estereocilios se desarrollan de forma normal, pero se observa un cambio en su rigidez (Kitajiri *et al.*, 2010).

Las mutaciones descritas en el gen *TRIOBP*, responsables de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, se encontraron en familias de Palestina, India y Pakistán (Riazuddin *et al*, 2006b; Shahin *et al.*, 2006). Las mutaciones descritas incluyen 12 cambios que generan codones de parada prematuros y un cambio que provoca sustitución de aminoácido. Recientemente, nuestro laboratorio encontró una delección de 25 pb (c.2932_2956del, p.S978RfsX19) en homocigosis, en una familia de origen iraní. Todas las mutaciones descritas se encuentran en el exón 6, que está presente en los transcritos de las isoformas *TRIOBP-6* y *TRIOBP-4* (Figura 8).

5. El locus DFNB29: gen *CLDN14*

En 2001 Wilcox y colaboradores estudiaron, en 2 familias de Pakistán, la segregación de un gen responsable de sordera no sindrómica, neurosensorial, con herencia autosómica recesiva. Se definió un intervalo entre los marcadores D21S1252 y D21S2079 en 21q22.1, correspondiente al locus DFNB29. Estudiaron el gen candidato *CLDN14* en estas dos familias y encontraron mutaciones (Wilcox *et al.*, 2001).

El gen *CLDN14* (OMIM 605608) pertenece a la familia de genes que codifican las claudinas, proteínas que participan en la formación de uniones intercelulares estrechas. *CLDN14* contiene 3 exones y codifica la Claudina-14, una proteína de 239 aminoácidos que se expresa en hígado, riñón y en el epitelio sensorial del órgano de Corti (en las uniones estrechas de las CC y de las células de soporte) (Figura 10).

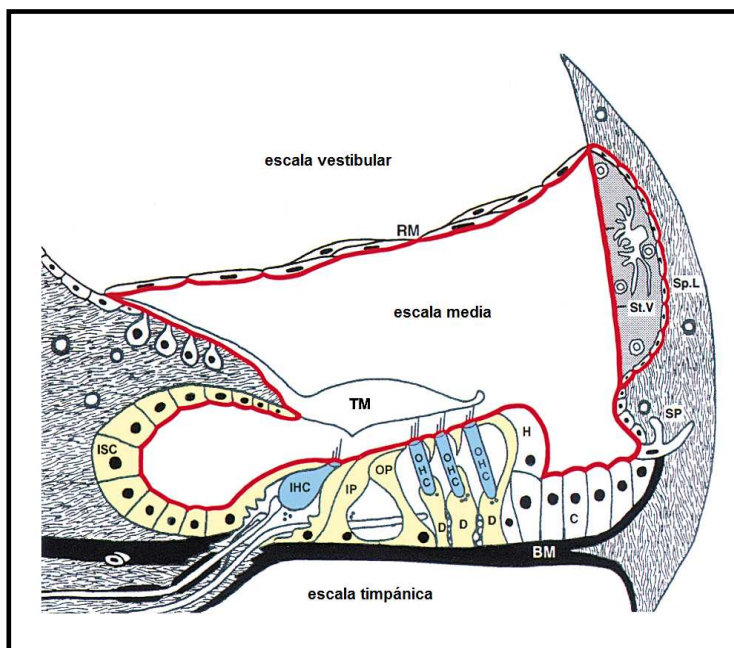


Figura 10. Diagrama de las uniones estrechas en el órgano de Corti de los mamíferos. La línea roja representa la barrera de uniones estrechas que rodea a la escala media. Las células en azul (CC) y amarillo (células de soporte) son aquellas en las que se expresa *Cldn14*. Abreviaturas: IHC, CCI; OHC, CCE; IP/OP, célula pilar interna/externa; D, células de Deiters; H, células de Hensen; C, células de Claudius; BM, membrana basilar; ISC, células del sulco interno; StV, estría vascular; Sp.L, ligamento espiral; SP, prominencia espiral; RM, membrana de Reissner; TM, membrana tectoria (adaptada de Slepecky, 1996).

Para estudiar el papel de la Claudina 14 en el oído interno, Ben-Yosef y colaboradores crearon un modelo murino con una delección de *Cldn14*. El potencial endococlear en estos ratones era normal, pero estaban sordos debido a la degeneración de las CCE y de las CCI (Ben Yosef *et al.*, 2003). Se postuló que la Claudina 14 podría formar parte de un complejo de uniones estrechas que actuaría como barrera restrictiva de cationes, manteniendo el gradiente electroquímico entre la endolinfa y los tejidos de su alrededor (Wilcox *et al.*, 2001).

Las mutaciones descritas en el gen *CLDN14*, responsables de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, se encontraron en varias familias de Pakistán y en 1 familia de Grecia. Las mutaciones descritas incluyen cuatro cambios que provocan sustitución de aminoácido y dos cambios que generan codones de parada prematuros (Wilcox *et al.*, 2001; Wattenhofer *et al.*, 2005; Bashir *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012).

6. El *locus* DFNB49: gen *MARVELD2*

En 2005 Ramzan y colaboradores estudiaron 2 familias consanguíneas de Pakistán que presentaban hipoacusia no sindrómica, neurosensorial, prelocutiva, profunda y de herencia autosómica recesiva. Mediante análisis de ligamiento y análisis de haplotipos se definió un nuevo *locus* de hipoacusia no sindrómica, que fue denominado DFNB49, cuyo intervalo crítico estaba situado entre los marcadores D5S647 y D5S1501 en 5q12.3-q14-1 (Ramzan *et al.*, 2005). En el año 2006, el estudio de 6 familias de Pakistán permitió reducir el intervalo del *locus* DFNB49. Se encontraron mutaciones en homocigosis en el gen *MARVELD2* en estas 6 familias (Riazuddin *et al.*, 2006a) y en otras tres familias consanguíneas de Pakistán (Chishti *et al.*, 2008).

El gen *MARVELD2* (OMIM 610572) tiene 7 exones y codifica la tricelulina, una proteína de 558 aminoácidos que tiene cuatro dominios transmembrana y un dominio C-terminal de tipo Occludin-ELL (*Occludin/RNA polymerase II elongation factor*) que se une a la proteína de andamiaje ZO-1 (OMIM 601009). Este dominio de 103 residuos es similar a la región C-terminal de la ocludina y al factor de elongación ELL (Figura 11).

La tricelulina es una proteína que se concentra en las uniones estrechas entre tres células y contribuye a la estructura y a la función de los contactos tricelulares entre células vecinas. En el epitelio del oído interno, la tricelulina tiene un papel clave en la formación de las barreras epiteliales necesarias para una audición normal, ya que mantienen separados compartimentos de diferente composición iónica (Riazuddin *et al.*, 2006a; Ikenouchi *et al.*, 2005).

Las mutaciones descritas en el gen *MARVELD2*, responsables de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva, se encontraron en familias de Pakistán y en familias de etnia gitana de la República Checa. Las mutaciones descritas incluyen un cambio

que genera un codón de parada prematuro y cuatro mutaciones que afectan a los sitios de *splicing* (Riazuddin *et al.*, 2006a; Chishti *et al.*, 2008; Safka Brozkova *et al.*, 2011) (Figura 11).

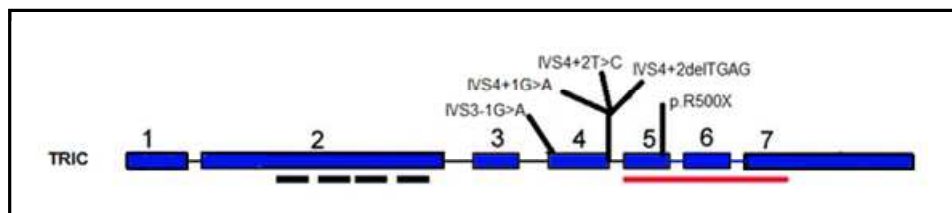


Figura 11. Representación esquemática del gen *MARVELD2* humano. Localización de las mutaciones descritas. Las barras negras indican la posición de los 4 segmentos transmembranares y la barra roja indica el dominio Occludin-ELL (adaptado de Riazuddin *et al.*, 2006a).

7. Hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma X

La gran mayoría de las hipoacusias no sindrómicas están causadas por mutaciones en genes autosómicos. Las hipoacusias no sindrómicas de herencia ligada al cromosoma X son poco frecuentes (1-5%) (Petersen *et al.*, 2008), y solamente han sido cartografiados 4 *loci* implicados en este tipo de sordera: DFNX1 (DFN2), DFNX2 (DFN3), DFNX3 (DFN4) (Pfister and Lalwani, 2002) y DFNX4 (DFN6) (<http://hereditaryhearingloss.org>).

En este trabajo nos centramos en las hipoacusias no sindrómicas ligadas al cromosoma X de tipo DFNX1 y DFNX4.

7.1 El *locus* DFNX1/DFN2: gen *PRPS1*

En 1996 Tyson y colaboradores estudiaron la segregación de un gen responsable de sordera no sindrómica, neurosensorial, congénita y profunda, con herencia ligada al cromosoma X, en una familia americana-británica. El nuevo *locus* fue denominado DFN2, con su intervalo crítico situado entre los marcadores DXS990 y DXS1001 en Xq22 (Tyson *et al.*, 1996). Posteriormente, el estudio de otras dos familias, una americana y otra china, permitió reducir el intervalo crítico (Manolis *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2004).

Liu y colaboradores estudiaron una familia de China que presentaba hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma X. Mediante análisis de ligamiento se definió un intervalo crítico entre los marcadores DXS8022 y DXS8055 que solapaba con el correspondiente al *locus* DFN2. Investigaron 14 de los 119 genes del intervalo crítico y encontraron una mutación en el gen *PRPS1* que segregaba con la sordera en esta familia (Liu *et al.*, 2010). Posteriormente se estudió el gen *PRPS1* en las familias mencionadas anteriormente (Tyson *et al.*, 1996; Manolis *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 2004) y en todos los casos se encontraron mutaciones de sustitución de aminoácido (Figura 12).

Las mutaciones en el gen *PRPS1* son responsables de una variedad de fenotipos: hipoacusia neurosensorial ligada al cromosoma X de tipo DFNX1, superactividad de fosforribosil pirofosfato sintetasa (OMIM 300661), enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ligada al cromosoma X de tipo 5 (CMTX5, OMIM 311070) y síndrome de Arts (OMIM 301835).

El gen *PRPS1* (OMIM 311850) contiene 7 exones. Forma parte de una familia de genes que son muy similares y están altamente conservados: *PRPS1*, *PRPS2* (OMIM 311860) y *PRPS1L1* (OMIM 611566). *PRPS1* es el único implicado en sordera, y codifica la proteína PRS-I (fosforribosil pirofosfato sintetasa-I), de 318 aminoácidos y 34,8 kDa (Roessler *et al.*, 1990) (Figura 12). PRS-I pertenece a la familia de proteínas fosforribosil pirofosfato (PRPP) sintetetasas, que catalizan la síntesis de PRPP a partir de ATP y ribosa-5-fosfato. PRPP es esencial para la síntesis *de novo* de nucleótidos, por lo que mutaciones en *PRPS1* afectan a funciones vitales como la síntesis de ácidos nucleicos, el metabolismo energético y la señalización celular (Roessler *et al.*, 1990). La actividad enzimática de PRS está regulada por iones fosfato, cationes divalentes (fundamentalmente Mg^{2+}) y ADP.

La proteína PRS-I tiene un dominio RibP_PPkin (ribosa-fosfato pirofosfokinasa) y un dominio PRT (fosforribosil transferasa).

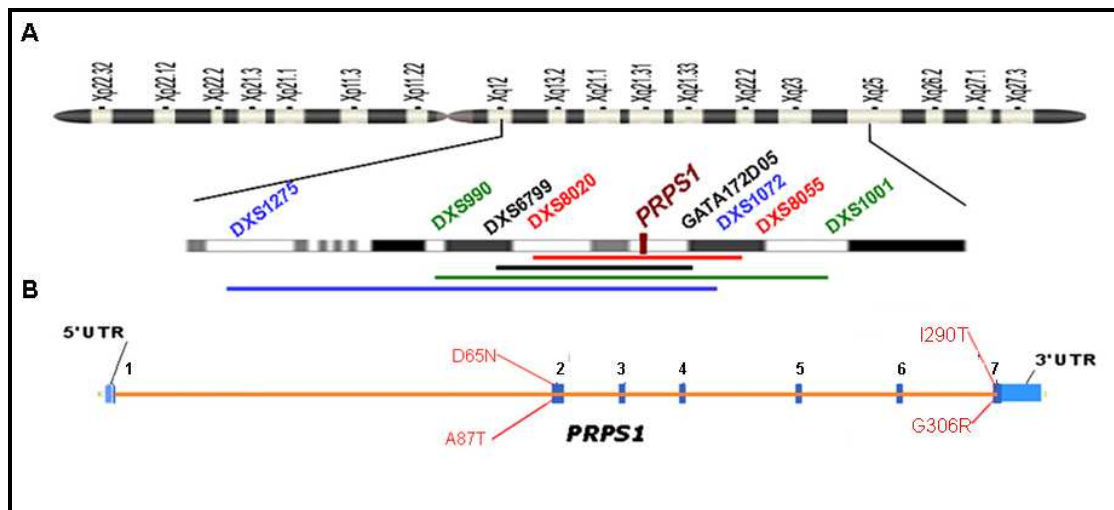


Figura 12. **A:** Representación del cromosoma X y del intervalo del *locus* DFNX1. Los intervalos de ligamiento y los marcadores flanqueantes de las 4 familias DFNX1, se indican en color: rojo (familia de Liu *et al.*), negro (familia de Cui *et al.*), verde (familia de Tyson *et al.*), azul (familia de Manolis *et al.*). **B:** Estructura genómica del gen *PRPS1*. Están representadas las mutaciones DFNX1 descritas (adaptado de Liu *et al.*, 2010).

Mediante hibridación *in situ* en cóclea de ratón (día postnatal 6), se detectó expresión de *PRPS1* en las células ciliadas, células de Claudius y en células del ganglio espiral (Sage *et al.*, 2006).

7.2 El *locus* DFNX4/ DFN6

En 1996, nuestro laboratorio estudió una familia española con numerosos afectados que presentaban hipoacusia no sindrómica de herencia ligada al cromosoma X. La sordera era neurosensorial, postlocutiva y progresiva. En los varones, comenzaba a manifestarse a los 5-7 años y afectaba principalmente a las frecuencias altas; con el tiempo afectaba a todas las frecuencias y se volvía severa o profunda. En el caso de las mujeres, la sordera era moderada, afectaba a las frecuencias altas y aparecía sobre la cuarta década de vida.

Se excluyó ligamiento a los dos *loci* de hipoacusia no sindrómica entonces conocidos en el cromosoma X, DFNX2 y DFNX3. La familia fue genotipada utilizando marcadores microsatélites espaciados a intervalos de unos 10 cM a lo largo del cromosoma X y se encontró evidencia de ligamiento al marcador DXS8036 en Xp22. Utilizando marcadores adicionales en esta región se confirmó el ligamiento y se definió un nuevo *locus* de sordera, DFN6 (DFNX4) (del Castillo *et al.*, 1996).

Se realizó un análisis de haplotipos para acotar el intervalo del *locus*. Dos individuos recombinantes clave determinaron los límites del intervalo, que se expandía unos 15 cM entre los marcadores DXS7108 (distal) y DXS7105 (proximal). En la familia había otro individuo clave, ya que tenía una recombinación que dividía el intervalo de 15 cM en dos partes: una distal de 7 cM y otra proximal de 8 cM. Este individuo no se pudo incluir en el estudio inicial por estar por debajo de la edad de inicio de la sordera. Más tarde, la evaluación del estado clínico de este individuo (finalmente afectado) permitió reducir el tamaño del intervalo a 8 cM.

Objetivos

1. Hipoacusia de tipo DFNB1

1.1.- Desarrollo de un ensayo MLPA específico para la detección de nuevas deleciones patogénicas en el *locus* DFNB1 en individuos afectados que sean heterocigotos para un solo alelo mutante DFNB1 y aplicación del ensayo a cohortes de pacientes de diferentes países.

1.2.- Investigación de los efectos sobre el *splicing* de la nueva mutación c.-22-2A>C en el gen *GJB2*, y de sus efectos fenotípicos.

2. Determinación de la prevalencia de las hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas de tipos DFNB24, DFNB28, DFNB29 y DFNB49 y caracterización de su espectro mutacional en la población española.

3. Determinación de la prevalencia de la hipoacusia ligada al X de tipo DFNX1/DFN2 y caracterización de su espectro mutacional en la población española.

4. Identificación del gen responsable de la hipoacusia ligada al X de tipo DFNX4/DFN6.

Materiales y métodos

1. Pacientes y métodos generales

1.1 Pacientes

Este estudio fue realizado en individuos con hipoacusia neurosensorial no sindrómica, de herencia autosómica recesiva o ligada al X, y en sus familiares afectados o sanos.

Ninguno de los casos índice incluidos en el estudio presentaba otros síntomas o signos asociados que hiciesen sospechar la presencia de un cuadro sindrómico. Se excluyeron además, los individuos cuya hipoacusia podía deberse a causas ambientales.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los individuos participantes en el estudio, previamente a la obtención de una muestra de sangre periférica o de saliva de cada uno de ellos.

1.2 Extracción de ADN

La sangre, extraída por punción venosa, se recolectó en tubos que contenían EDTA (5 mM) como anticoagulante. El ADN se extrajo de las muestras de sangre mediante el robot Chemagic MSM I (*Magnetic Separation Module 1*, CHEMAGEN) (<http://www.chemagen.com>). Este robot utiliza un sistema de partículas magnéticas que permite obtener gran cantidad de ADN y de elevada pureza. Se determinó la concentración y pureza del ADN mediante la medición de la absorbancia a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}) en un espectrofotómetro (UV-VIS NanoDrop 1000, Thermo Scientific).

1.3 Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó en un volumen final de 15 μ L, utilizando 2,5 moles de cada dNTP, 1,5 μ L de tampón de Fast Start Taq DNA Polimerasa 10X (Roche), $MgCl_2$ 1,5 mM, 10 pmoles de cada cebador, 0,75 U de Fast Start Taq DNA Polimerasa (Roche) y 20-40 ng de ADN genómico.

Todas las reacciones de PCR se realizaron en termocicladores Applied Biosystem Gene Amp PCR System 9700, y el programa general utilizado fue: 1) desnaturalización a 95°C (5 min); 2) 30 ciclos de desnaturalización a 94°C (30 seg), hibridación a 60°C (30 seg) y extensión a 72°C (30 seg); 3) extensión final a 72°C (7 min); 4) conservación a 12°C.

Los productos obtenidos fueron comprobados en geles de agarosa al 1,5%.

1.4 Secuenciación del ADN

El producto resultante de la reacción de PCR se purificó con ExoSAP-IT (USB) (según las instrucciones del fabricante) antes de la reacción de secuenciación, en la que se utilizó el *kit* BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

La reacción de secuencia se fundamenta en el método de Sanger y se realizó a volumen final de 20 μL , utilizando 1,75 μL de *premix* BigDye, 4 μL de tampón 5X, 10-15 pmoles de cebador y 2-5 μL del producto de PCR. El programa utilizado fue: 1) desnaturalización a 94°C (3 min); 2) 25 ciclos de desnaturalización a 96°C (10 seg), hibridación a 50°C (5 seg), extensión a 60°C (4 min); 3) conservación a 15°C.

La secuenciación se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 de cuatro capilares (Applied Biosystems), y se analizó con el programa informático Sequencing Analysis v.5.1.1 (Applied Biosystems).

Para visualizar las secuencias se utilizaron los analizadores ChromasPro v1.5 (Technelysium Pty Ltd) y FinchTV v1.4 (Perkin Elmer). La nomenclatura de las nuevas variantes de secuencia descritas en este trabajo fue verificada con el programa informático Mutalyzer (Wildeman *et al.*, 2008).

1.5 Genotipado de marcadores

Para los estudios de segregación se emplearon marcadores genéticos polimórficos (microsatélites) descritos previamente (Dib *et al.*, 1996) o desarrollados en el curso de esta tesis, que se encontrasen próximos a cada uno de los genes estudiados. Un cebador de cada pareja fue marcado con un fluoróforo 6FAM, HEX o TET (Sigma, Roche) en el extremo 5'. Las reacciones PCR se realizaron en un termociclador Applied Biosystem Gene Amp System 9700, y se empleó Fast Start Taq polimerasa (Roche). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1) desnaturalización a 95°C (6 min); 2) 30 ciclos de desnaturalización a 94°C (40 seg), hibridación a 56°C (40 seg); 3) extensión a 72°C (5 min); 4) conservación a 15°C. Se determinó la talla de los productos de amplificación por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 3130.

2. Locus DFNB1

2.1 Ensayo para la detección de las mutaciones del(*GJB6-D13S1830*), del(*GJB6-D13S1854*) y del(*DFNB1-200kb*)

El fundamento del test es la amplificación combinada de los segmentos de ADN que contienen el empalme de los puntos de rotura de cada deleción, así como el segmento que contiene el exón 4 de *GJB6*. Este último se utiliza como control de eficiencia de la PCR y para distinguir los heterocigotos de los homocigotos en las deleciones del(*GJB6-D13S1830*) y del(*GJB6-D13S1854*), ya que ambas lo eliminan.

La amplificación PCR “múltiple” (de los cuatro fragmentos a la vez) se realizó con los cebadores que se muestran en la [Tabla 2](#).

La reacción se realizó en un volumen final de 15 µl, a una concentración final de 1,5 mM de MgCl₂, utilizando Fast Start Taq DNA polimerasa (Roche). Se utilizó el siguiente programa: 1) desnaturalización a 94°C (6 min); 2) 5 ciclos de desnaturalización a 94°C (40 seg), hibridación a 62°C (40 seg) en el primer ciclo, con reducción de 1°C cada ciclo posterior (*touchdown*) y extensión a 72°C (1 min); 3) 25 ciclos de desnaturalización a 94°C (40 seg), hibridación a 58°C (40 seg) y extensión a 72°C (1 min); 4) extensión a 72°C (7 min); 5) conservación a 12°C.

Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% ([Figura 13](#)).

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados en el ensayo para la detección de las mutaciones del(*GJB6-D13S1830*), del(*GJB6-D13S1854*) y del(*DFNB1-200kb*).

Fragmento amplificado	Cebadores	Secuencia (5' → 3')
del(<i>GJB6-D13S1830</i>)	del309A	TTTAGGGCATGATTGGGGTGATTT
	del309B	CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT
del(<i>GJB6-D13S1854</i>)	del232A	TCATAGTGAAGAACTCGATGCTGTTT
	del232B	CAGCGGCTACCCTAGTTGTGGT
del(<i>DFNB1-200kb</i>)	del200A	GCCAGGGCTTGAGCATAGAAC
	del200B	GAATTCTGGCACTCTGAATTAGAAAAC
Exón 4 de <i>GJB6</i>	Cx30Ex4A	CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT
	Cx30Ex4B	CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA

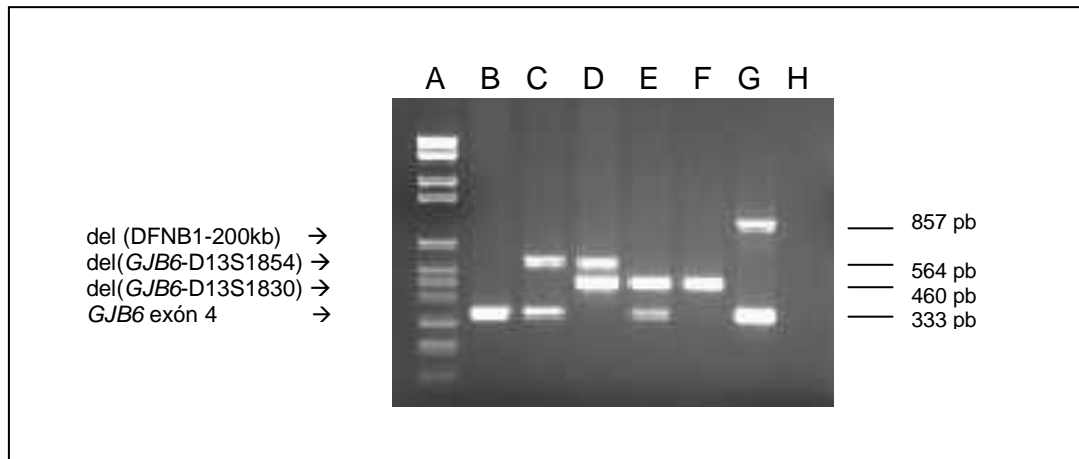


Figura 13. Ensayo de PCR múltiple para la detección combinada de las mutaciones del(*GJB6*-D13S1830), del(*GJB6*-D13S1854) y del(DFNB1-200kb). La posición de los productos de PCR correspondientes a los empalmes de puntos de rotura de las deleciones y al exón 4 de *GJB6* están indicados con flechas a la izquierda y sus tamaños en pares de bases a la derecha. **A:** Patrón de peso molecular VI (Roche). **B:** Individuo silvestre. **C:** Individuo heterocigoto del(*GJB6*-D13S1854)/wt. **D:** Individuo heterocigoto compuesto del(*GJB6*-D13S1830)/del(*GJB6*-D13S1854). **E:** Individuo heterocigoto del(*GJB6*-D13S1830)/wt. **F:** Individuo homocigoto del(*GJB6*-D13S1830). **G:** Individuo heterocigoto del(DFNB1-200kb)/wt. **H:** control sin ADN molde.

2.2 Ensayo MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) específicamente desarrollado para detectar nuevas deleciones en el locus DFNB1.

La técnica de MLPA se basa en las reacciones de hibridación, ligación y amplificación de sondas específicas (Figura 14). Estas sondas consisten en dos oligonucleótidos separados: LPO (*left probe oligo*) y RPO (*right probe oligo*) (Figura 14 A).

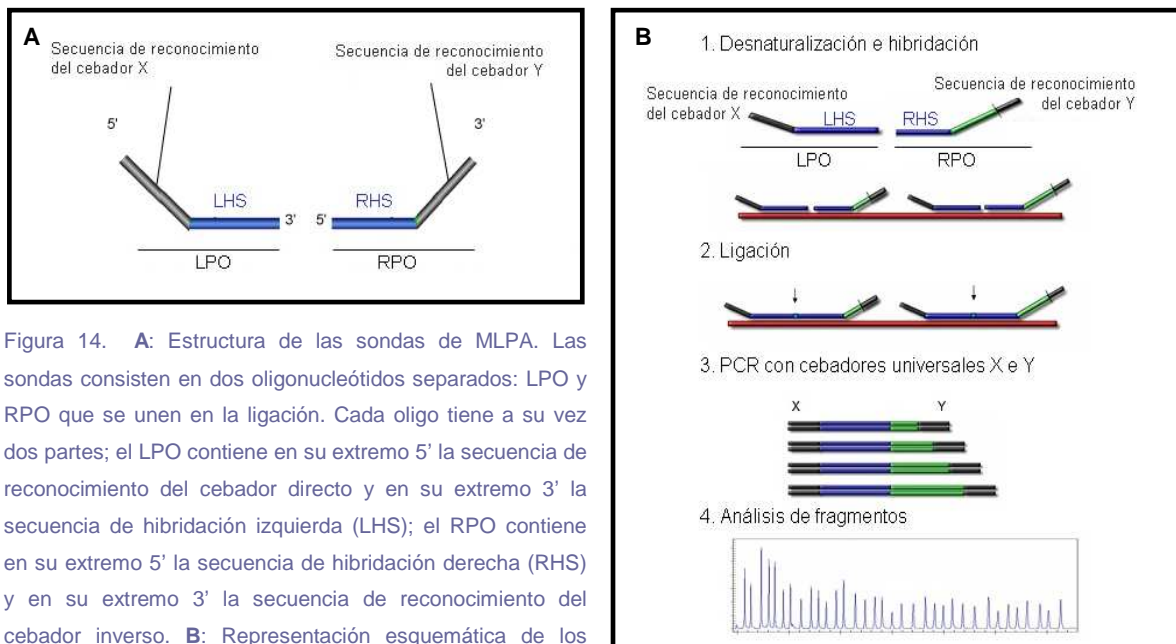


Figura 14. **A:** Estructura de las sondas de MLPA. Las sondas consisten en dos oligonucleótidos separados: LPO y RPO que se unen en la ligación. Cada oligo tiene a su vez dos partes; el LPO contiene en su extremo 5' la secuencia de reconocimiento del cebador directo y en su extremo 3' la secuencia de hibridación izquierda (LHS); el RPO contiene en su extremo 5' la secuencia de hibridación derecha (RHS) y en su extremo 3' la secuencia de reconocimiento del cebador inverso. **B:** Representación esquemática de los pasos de un ensayo de MLPA (adaptada de MRC Holland).

Después de la desnaturalización de las muestras de ADN, los dos oligonucleótidos se hibridan con la secuencia diana de ADN. Sólo aquellos que sean adyacentes serán ligados, convirtiéndose en una única molécula que será amplificada exponencialmente durante la reacción de PCR. En la PCR se utiliza un único par de cebadores para todas las sondas, ya que hibridan con las secuencias de reconocimiento, que son idénticas en todas las sondas. Cada sonda genera un amplicón de PCR con longitud única que es identificada y cuantificada por electroforesis capilar. Las diferencias entre muestras de ADN se detectan por comparación de los patrones de picos obtenidos en las muestras de referencia (Figura 14 B).

Se diseñó un test específico de MLPA para detectar cambios en el número de copias en el intervalo común de 95,4 kb que comparten las cuatro deleciones descritas (Figura 6). Para desarrollar el test se utilizó el *kit* comercial “P300-A1 Human DNA Reference-2” de MRC-Holland. Este *kit* contiene 15 sondas de referencia que son controles internos y que hibridan en diferentes regiones del genoma; y fragmentos de ADN control (1 control de calidad de ADN, 2 controles de desnaturalización, 1 control específico de cromosoma X y 1 control específico de cromosoma Y). El *kit* P300 está preparado para poder añadir sondas MLPA sintéticas diseñadas por los usuarios.

2.2.1 Diseño de sondas sintéticas para MLPA

Para obtener la secuencia sobre la que se diseñaron las sondas, se accedió a la base de datos del genoma humano en el UCSC Genome Browser y se buscó la región cromosómica de interés en la versión del genoma humano GRCh37 “hg19”. En nuestro caso, la región de interés estaba entre las coordenadas 20.939.342 y 21.034.755 del cromosoma 13.

Para diseñar las sondas (preferiblemente en zonas de secuencia única), se cargó en H-MAPD (<http://genomics01.arcan.stonybrook.edu/mlpa/cgi-bin/mlpa.cgi>) la secuencia de ADN en la que queríamos buscar las sondas y se seleccionaron los siguientes parámetros: *Hybridization temperature* (60°C), [Na⁺] (0,35 M), [Mg²⁺] (0), *GC% range* (40-60%), *Min ΔG allowed* (0), *Max perfect matches allowed in genome* (1), *Max repeat sequence match allowed* (15 nt), *No stuffer sequence*. Los cebadores usados por MRC Holland en sus *kits* son: directo, 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3' e inverso, 5'-TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC-3'. La longitud del producto de ligación viene determinada en nuestro caso exclusivamente por la suma de las longitudes de los oligonucleótidos que componen cada sonda (no hemos incluido elementos espaciadores). Para su adecuada resolución se recomienda que las longitudes de los productos de ligación difieran en un mínimo de 4 nucleótidos.

La lista de sondas proporcionada por el programa viene ordenada de mejor (mayor puntuación H-MAPD) a peor para la talla de la sonda establecida. Se seleccionó la sonda que cumplía con los criterios establecidos por MRC Holland: la base 5' de LHS (*Left Probe Oligo*) no ha de ser una A (orden de preferencia C>G>T>>>A), las 5 últimas bases 3' de LHS (*Right Probe Oligo*) han de tener más de 2 (G+C), LHS no ha de tener más de 3 (G+C) inmediatamente adyacentes al final de la secuencia del cebador, RHS no ha de tener más de 3 (G+C) inmediatamente adyacentes al comienzo de la secuencia del cebador. Además, el valor ΔG para cada LPO y RPO ha de ser superior a 0.

Se empleó el programa RAW-OLIGO para calcular los valores de T_m y de porcentaje de (G+C) de LHS y RHS. Se descartaron las sondas en las que el valor de T_m era inferior a 68°C y se comprobó que el porcentaje de (G+C) estuviese comprendido entre 40-60%.

Las sondas diseñadas en este trabajo se presentan en las [Tablas 3 y 4](#).

Tabla 3. Sondas sintéticas de MLPA diseñadas en este estudio. Longitud: las sondas han de ser de 96-144 ó 152-168 nucleótidos, que son los espacios que deja libres el kit comercial. Región: localización de cada sonda en el intervalo crítico. Puntuación "score" (H-MAPD): determina la calidad de la sonda, valores cercanos a 1 indican mejor calidad. T_m y %(G+C) de las secuencias de hibridación: las sondas óptimas son aquellas en las que las secuencias LHS y RHS tienen un valor de T_m superior a 68°C y un valor de (G+C)% entre 40-60%.

SONDA	Longitud (nt)	Región	Score	LHS (RAW)		RHS (RAW)	
			H-MAPD	T_m °C	%(G+C)	T_m °C	%(G+C)
1	124	kb 4	0,9329	80,74	49%	81,57	49%
2	118	kb 24	0,9146	82,83	50%	81,49	50%
3	114	kb 46	0,8411	78,07	44%	80,49	50%
4	134	kb 65	0,9365	82,54	48%	81,76	48%
5	104	kb 77	0,8676	79,86	55%	80,24	55%
6	138	kb 92	0,8309	86,13	50%	79,9	44%
7	152	kb 14	0,8025	91,54	56%	89,67	56%
8	100	kb 36	0,6919	75,27	52%	74,56	52%
9	144	kb 56	0,8895	83,6	43%	85,96	49%

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos de las sondas sintéticas de MLPA. Secuencias LPO: en azul, secuencia de reconocimiento del cebador directo; en rojo, la base 5' de la LHS (orden de preferencia C>G>T>>>A); en verde, las 5 últimas bases de la LHS (máximo 2(G+C)). Secuencias RPO: en azul, secuencia de reconocimiento del cebador reverso. Las sondas en las que la LHS y RHS tengan más de 3(G+C) adyacentes al cebador, no son óptimas.

SONDA	SECUENCIA LPO (<i>Left Probe Oligo</i>)
1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGACTCTGGCTCAGGAGGTGACATTTTCAGACAGTGTAAG
2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAGCAGGATTTGGGCATTCTGACATGGGGAAGGCATTA
3	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACTTTTCAGGGGTGTTGTTTGTAAAAGGAGCCAAAGG
4	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAGACATATGCAGGCTTCACTTTCTCAGGAGGTATGTCACCACAGA

5	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAGGTGTGTGTCCAAAGCGGGGGTCCCTTAAT
6	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAGATTCTGCAGCAGCCTTATGCCCTTGCAAATCTGGTGCCAAAGC
7	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACATCTGTGGCATCTCCTGCTGATGTCTGAGGTTGGCAAGCGGCAGCCTCCAGTTT
8	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAGGGAGAGAAGACATCTGGACTCCAAGA
9	GGGTTCCCTAAGGGTTGGATTGCTAACGCTACAAGGGTTGATTGAACACCACCACATTGAACTGATGCAA

SONDA	SECUENCIA RPO (<i>Right Probe Oligo</i>)
1	GGAGGCTCGGTGATCCATTTGGTTCTGATGTTTAGGATAGGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
2	CCTTCTCCCTTTAGTTGTGTCTGGCACATGGACTCATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
3	CAATGGCACGCTGGCCTCCTGTTTCTCAGAACTATTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
4	AAGCCAGGAGTAAGAATGTTCCCGCTAGCCAGTAACACAATGTCACCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
5	GCTCTCAGTGCAGTGTGCCACCAAATGCATCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
6	AGTCAGCTACATCCATCTGACCAGCAGTTACAACAAAGCAGAGTAGAATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
7	ATCCACTGGTTTGGAGCTCTCTCCCACTACCAGGGCCCCTCTCAAGCTCTTTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
8	CTAGCAGGAAGGAACTGTGTGTGCACTATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
9	GAGGACACTGAATCACACCATAAAACACCCGTCTGTCAAGAGTCTTCCATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC

2.2.2 Reacción de MLPA

Los experimentos de MLPA se llevaron a cabo siguiendo las condiciones descritas por MRC Holland. Se desnaturalizaron 150 ng de cada ADN (resuspendido en TE) a 98°C durante 10 min. En la hibridación se añadieron 1 µL de sondas control (SALSA P300) y 0,5 µL de las sondas sintéticas por reacción de MLPA. La reacción de ligación y la reacción de PCR se realizaron sin variaciones del protocolo estándar. Se mezcló 1 µl del producto de PCR con 8,75 µl de formamida y 0,25 µl de ROX (marcador de peso molecular, Applied Biosystems). Se desnaturalizó durante 5 min a 95°C y se resolvió por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

El análisis de datos se realizó examinando los picos de forma visual (Peak Scanner, Applied Biosystems) y utilizando el programa Coffalyser, versión 9.4. Este programa permite ajustar el tamaño de las sondas y de los fragmentos, ya que siempre existe una desviación entre el tamaño real y el tamaño detectado. El programa, además, nos permite visualizar la información que nos proporcionan los fragmentos control específicos de ADN humano (calidad del ADN, control de ligación, control de desnaturalización, sexo de los individuos), y permite la normalización de los datos basada en las sondas control. Como método de análisis se eligió *Direct analysis (all probes)*, que es un método robusto y preciso, ya que asume que las sondas de referencia entre muestras y controles no varían. Se eligió la mediana para normalizar, por ser más robusta que la media.

2.3 Secuenciación de la región codificante del gen *GJB2*

Para la secuenciación de la región codificante de *GJB2* y de su región intrónica flanqueante, se utilizaron los cebadores: directo, 5'-ACCTGTTTTGGTGAGGTTGTGT-3' e inverso, 5'-TGATCACGGGTTGCCTCATC-3'. En la PCR se utilizó polimerasa Taq (Roche) y MgCl₂ 2,5 mM, con el programa: 1) desnaturalización a 95° C (5 min); 2) 30 ciclos de desnaturalización a 94° C (40 seg), hibridación a 65° C (40 seg) y extensión a 72° C (30 seg); 3) extensión a 72° C (7 min); 4) conservación a 15° C. El producto amplificado se secuenció como se ha indicado en el apartado 1.4.

2.4 Evaluación de la nueva mutación c.-22-2A>C (IVS1-2A>C) en el gen *GJB2*

2.4.1 Análisis *in silico* de las mutaciones de “splicing”

Para predecir sitios aceptores y donadores de *splicing*, se utilizó el programa “NNSplice 0.9” (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), que asigna un valor entre 0 y 1 a cada sitio identificado, para indicar la probabilidad con que puede ser usado.

2.4.2 Ensayo de restricción

Para la detección de la mutación c.-22-2A>C se diseñó un ensayo de restricción utilizando la enzima *Eco88I* (Fermentas). En la digestión, se utilizó como molde el producto de PCR (907 pb) obtenido en el apartado 2.3. La mutación c.-22-2A>C crea un nuevo sitio de restricción, dividiéndose el fragmento de 907 pb en dos, de 770 pb y 137 pb (Figura 15). Las condiciones para la digestión fueron las recomendadas por el fabricante y los productos de la misma fueron separados en un gel de agarosa al 1,5%.

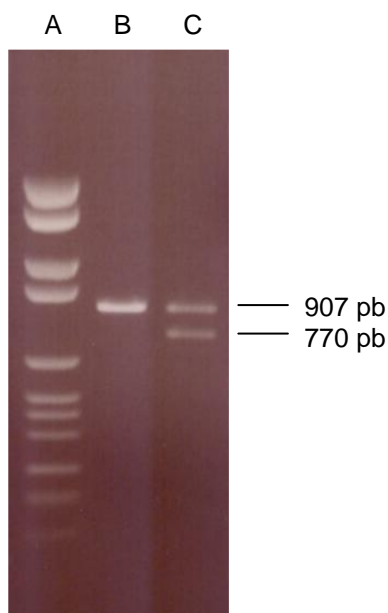


Figura 15. Resultados del ensayo de restricción para la mutación c.-22-2A>C en *GJB2*. **A:** Marcador de peso molecular VI (Roche). **B:** Individuo wt/wt. **C:** Individuo portador c.-22-2A>C/wt.

2.4.3 Detección y caracterización de los transcritos

2.4.3.1 Extracción de ARN a partir de saliva

Se recolectaron 2 mL de saliva en viales del *kit* Oragene-RNA (DNA Genotek), que facilita la liberación del ARN de la saliva y lo estabiliza.

Se incubó la muestra de saliva en un baño a 50°C durante 1 hora. A continuación, se siguieron las instrucciones del protocolo *Oragene-RNA Purification* (DNA Genotek) para realizar una purificación inicial de una alícuota de 1 mL de saliva. Inmediatamente, se siguieron las instrucciones del protocolo de purificación “*Total RNA Isolation from Animal Cells*” del *kit RNeasy Micro kit* (Qiagen). Se obtuvieron 50 µL de ARN de cada muestra.

Se determinó la concentración y pureza del ARN total mediante la medición de la absorbancia a 260 (A_{260}) y 280 (A_{280}) nm en un espectrofotómetro (UV-VIS NanoDrop 1000, Thermo Scientific).

2.4.3.2 Retrotranscripción

Para sintetizar una cadena complementaria de ADN (ADNc) a partir de ARN se utilizó la transcriptasa inversa SuperScript II RT (Lifetech).

La síntesis de ADNc se realizó mezclando 1 µL de cebadores aleatorios (*random*) p(dN)₆ 100 µM (Roche), 500 ng de ARN y 1 µL de dNTPs (10 mM de cada dNTP) (Lifetech), hasta un volumen final de 12 µL. Se calentó la mezcla a 90°C (5 min) y rápidamente se enfrió en hielo. Se añadieron 4 µL de tampón 5X *First Strand*, 2 µL de DTT 0,1 M y 1 µL de RNase OUT (40 UDS/µL) (Lifetech). Se incubó la mezcla a 25°C (2 min) y se añadió 1 µL de SuperScript II RT (200 UDS) (Lifetech). Finalmente, se incubó en un termociclador Applied Biosystem Gene Amp PCR System 9700 utilizando el siguiente programa: 1) 25°C (10 min); 2) 42°C (50 min); 3) 70°C (15 min); 4) conservación a 15°C.

2.4.3.3 Análisis de fragmentos marcados fluorescentemente

Para analizar el efecto de la mutación de *splicing* en el paciente y determinar el tamaño del transcrito se hizo una PCR a partir de los productos de retrotranscripción. Se diseñaron los cebadores que aparecen en la [Tabla 5](#), que son específicos de ADNc para evitar la amplificación de posible ADN genómico (ADNg) contaminante.

El cebador directo se encontraba en el exón 1, y el cebador inverso, marcado con un fluoróforo en el extremo 5', estaba en el exón 2. El marcaje del cebador permitió determinar el tamaño del fragmento amplificado en un analizador genético.

El intrón 1 del gen *GJB2* tiene un tamaño de 3,1 kb, por lo que con el programa de PCR utilizado (que utiliza una extensión de solamente 30 seg), sería prácticamente imposible obtener un producto a partir de un hipotético ADN genómico residual. Solamente se obtendría amplificación del ADNc.

Para la amplificación se utilizó polimerasa Fast Start (Roche), MgCl₂ 1,5 mM y solución GC-RICH, y el programa: 1) desnaturalización a 95° C (5 min); 2) 40 ciclos de desnaturalización a 94°C (30 seg), hibridación a 60°C (30 seg) y extensión a 72°C (30 seg); 3) extensión a 72°C (7 min); 4) conservación a 15°C. Los productos se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Según el rendimiento obtenido, se hizo una dilución del producto de PCR. Se tomó 1 µL de esta dilución y se mezcló con 12 µL de formamida y 0,2 µL de ROX (marcador de peso molecular, Applied Biosystems). Se desnaturalizó durante 5 min a 95°C y se resolvió por electroforesis capilar en un analizador genético ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

Tabla 5. Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar la región del sitio de *splicing* de *GJB2*.

Cebadores	Secuencia (5' → 3')
INI26-A2	CGCGCTCCTCTCCCGACT
INI26-B2	(FAM)-GATCCTCGTTGTGGCTGCAAAGGA

2.4.3.4 Secuencia de los transcritos generados en individuos con la mutación c.-22-2A>C

Se realizó una PCR a partir de los productos de retrotranscripción. Se siguieron las condiciones de PCR descritas en el apartado 2.4.3.3, pero utilizando el cebador inverso INI26-B2 sin marcar. Los productos obtenidos fueron comprobados en un gel de agarosa al 1,5% y fueron extraídos utilizando el *kit* NucleoSpin Extract II Macherey-Nagel, siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto purificado fue secuenciado siguiendo las condiciones descritas en el apartado 1.4.

En paralelo, los productos de PCR obtenidos se clonaron en un vector pCR^R2.1-TOPO^R empleando el *kit* comercial de clonación TOPO TA Cloning (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto obtenido se utilizó para transformar un cultivo de células competentes de *E. coli* estirpe DH5α (Invitrogen) siguiendo el protocolo de transformación de Maniatis *et al*, 1982. Posteriormente las células transformadas se plaquearon en medio Luria Bertani con ampicilina (1µg/mL) y X-Gal (1 mg), y se incubaron a 37°C durante 16 h. Crecieron colonias resistentes a ampicilina de color blanco y azul. Se reestriaron solamente las colonias blancas, que

son aquellas que corresponden a las células transformadas con el vector portador del inserto.

La extracción del plásmido se realizó utilizando el *kit* NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. El inserto del plásmido purificado fue secuenciado utilizando los cebadores INI26-A2 e INI26-B2 sin marcar.

2.4.3.5 PCR cuantitativa

Se diseñó un ensayo de PCR cuantitativa (PCR a tiempo real) para analizar el efecto que tendría la mutación c.-22-2A>C sobre la expresión del gen *GJB2*.

Los ensayos de PCR cuantitativa permiten la amplificación por PCR, la detección del producto (fluorescencia) y la cuantificación del ADN sintetizado. La cantidad de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto y se cuantifica en cada ciclo.

Estos ensayos fueron llevados a cabo utilizando el *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems). La amplificación de este ADNc se realizó utilizando cebadores específicos diseñados por el programa *Primer Express Software* (Applied Biosystems). La secuencia de estos cebadores se muestra en la [Tabla 6](#).

La cuantificación se logra mediante la comparación de la expresión del gen en la muestra problema respecto a la expresión de dicho gen en una muestra control. Además, los valores se normalizan utilizando genes endógenos como control. En nuestro caso se utilizó el gen *GAPDH*.

Tabla 6. Secuencias de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa.

Fragmentos	Cebadores	Secuencia (5' → 3')
<i>GJB2</i> sitio <i>splicing</i> normal	A	TCCCGACGCAGAGCAAAC
	B	TGCAGCGTGCCCAAT
<i>GJB2</i> sitio <i>splicing</i> alternativo 1	A	TCCCGACGCAGCTAGTGAT
	B	GCGGTTTGCTCTGGAAAAGA
<i>GAPDH</i>	A	GGTCGGAGTCAACGGATTTG
	B	AAACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAG

Se prepararon diluciones seriadas de las muestras de los productos de retrotranscripción. Cada reacción se realizó por duplicado para hacer el estudio más robusto.

Se mezclaron 0,8 µL de cada cebador (10 µM), 0,4 µL de ROX Reference Dye (*kit* SYBR Green qPCR, TaKaRa) y 3 µL de H₂O. Después se añadieron 10 µL de SYBR Green. La mezcla se añadió a las diluciones de ADNc.

El programa empleado fue el siguiente: 1) 50°C (2 min); 2) 95°C (10 min); 3) 60 ciclos de desnaturalización a 95°C (15 seg), hibridación a 59°C (30 seg) y extensión a 72°C (30 seg); 4) finalmente se añadió un ciclo de disociación a 95°C (15 seg), 60°C (30 seg), 95°C (15 seg). Se tomó una única medida de fluorescencia una vez finalizada la extensión del paso 3.

Se realizan tres reacciones, partiendo cada una de una cantidad diferente de ADNc (25 ng, 125 ng y 625 ng, respectivamente). Se ensayan a la vez el gen o transcrito en estudio y un gen de referencia. Y se trabaja a la vez con una muestra control y la muestra problema.

Los datos de fluorescencia son procesados mediante el software del termociclador, el cual proporciona directamente los valores necesarios para la cuantificación:

- los valores de umbral de ciclo (CP) de cada reacción. Se define el umbral de ciclo como el punto en el cual la fluorescencia sube apreciablemente por encima del ruido de fondo.
- La pendiente de la recta obtenida al representar los valores de CP en función de la cantidad de ADNc de partida.

Para realizar la cuantificación de la expresión relativa del gen o transcrito en estudio se empleó el método de Pfaffl, 2001, el cual compara la expresión del gen en estudio frente a la expresión de un gen de referencia (gen *GAPDH*) por medio de la siguiente relación:

$$R = \frac{(E_{\text{gen en estudio}})^{\Delta CP_{\text{gen en estudio}}}}{(E_{\text{gen de referencia}})^{\Delta CP_{\text{gen de referencia}}}}$$

$$E_{\text{gen en estudio}} = \text{Eficiencia de la PCR del gen o transcrito en estudio} = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

$$E_{\text{gen de referencia}} = \text{Eficiencia de la PCR del gen de referencia} = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

$$\Delta CP_{\text{gen en estudio}} = \text{CP de la muestra control} - \text{CP de la muestra problema (para el gen en estudio)}$$

$$\Delta CP_{\text{gen de referencia}} = \text{CP de la muestra control} - \text{CP de la muestra problema (para el gen de referencia)}$$

3. Locus DFNB24: gen *RDX*

3.1 Análisis de haplotipos

El estudio se realizó mediante genotipado para 3 marcadores microsatélites próximos al gen *RDX*, en 11q22, en el siguiente orden: cen-D11S1778-D11S927(*RDX*)-D11S1893-tel, siendo el marcador D11S927 intragénico. El genotipado se llevó a cabo como se indica en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la [Tabla 7](#).

Tabla 7. Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los marcadores microsatélites de 11q22.

Microsatélite	Directo (5' → 3')	Inverso (5' → 3')
D11S1778	HEX-TAACCTTCTACACAGTGTCTGTT	GCTTCAGCAGAGAAGCCAT
D11S927	HEX-AGTGAGCCGAGTTCGC	ACCAAAAGCCTGGAATG
D11S1893	HEX-TCCCTGGAACCTGGAT	TGATGTGGGCTTTTTCAA

3.2 Secuenciación

Para la secuenciación de los 14 exones del gen *RDX* y de sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes, se diseñaron los cebadores que se muestran en la [Tabla 8](#). Para la amplificación de los fragmentos de ADN y su posterior secuenciación, se siguieron las condiciones descritas en los apartados 1.3 y 1.4.

Tabla 8. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los exones del gen *RDX*.

Exón	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
1	CTCTCTGGAAGGGCTCGAC	CGCCACCTTAGCGTCTCC
2	GAATGTGCAATGCTAGTAGAAGA	GTATCAGTGCCTTTTTCTTCC
3	GGGCTAAATGAGAGTATGGAA	AAATGTAGGAATGTGAAAGAATAAA
4	TGTGTATGTTGGACTGAAATTGTG	GATGATAAGCTGATGGTGCCTG
5	TCTATTTCACTTCATTTTCTTCCA	AAAAAAAAAAAAACCTGAAAAACG
6	GTTCTATGCAATTTTCATCATGTGT	CCATCATAGAATCCTCCCTGT
7	ACAGGGAGGATTCTATGATGG	TTTACTTACTTGTGTCATGCTC
8	TTTTATTCATTGTTTCCTGCCTTT	AAGCTGACCTATGGAAAGAGAATG
9	ATTAATGGCAAATGGTGTATAAGG	AAGCAAGAAATGAGTCACAAAAAG
10	TTATATTA CTCTGTCTTTGCATCC	TATAAATGAATGTGCCTTAGTG
11	GAGCGAGACCCTGTCTCAAG	GGCAGAAATAAATTTTCTAGGTTTTT
12	GGAAGGCTAAGAAAAACATAAAC	GTCAGCATAATCCTGGGTATAAAA
13	CTCTTTTACCTGTTGACATTCTTT	CCCACAAACCAATCACAAAG
14	TTCCTCCCTTACCACTGCC	GAAAAAAGAAAACCAAGCATGA

4. Locus DFNB28: gen *TRIOBP*

4.1 Análisis de haplotipos

Se estudiaron 4 marcadores microsatélites próximos al gen *TRIOBP*, en 22q13, en el siguiente orden: cen-D22S426-D22S1045-*TRIOBP*-D22S1156-D22S272-tel. El genotipado se llevó a cabo como se indica en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la [Tabla 9](#).

Tabla 9. Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los marcadores microsatélites de 22q13.

Microsatélite	Directo (5' → 3')	Inverso (5' → 3')
D22S426	FAM-TGAAACCAAACAACACCTAA	CCCATCTAGGACCCCA
D22S1045	HEX-GCTAGATTTTCCCCGATGAT	ATGTAAAGTGCTCTCAAGAGTGC
D22S1156	FAM-TGAGGTAGTCACACGAGGCA	AATTCAGTGGGCTCCGAGG
D22S272	HEX-GAGTTTTGTTGCCTGGCAC	AATGCACGACCCACCTAAAG

4.2 Secuenciación

Para la secuenciación de los 24 exones del gen *TRIOBP* y de sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes, se utilizaron cebadores diseñados durante este estudio ([Tabla 10](#)). Para la amplificación de los fragmentos de ADN se siguieron las condiciones descritas en el apartado 1.3, con las siguientes excepciones: para amplificar los exones 3, 7- fragmento 7, 8, 12 y 24- fragmento 5, se empleó MgCl₂ 1,0 mM; el tiempo de hibridación fue de 30 seg para todos los exones excepto para el exón 7- fragmento 2 que fue de 1 min, y para los exones 7- fragmento 1, 7- fragmento 6, 20-21 y 24- fragmento 2, que fue de 45 seg. La reacción de secuencia se realizó siguiendo las condiciones del apartado 1.4.

Tabla 10. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los exones del gen *TRIOBP*.

Exón	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
1	ACGGAAGGACCAGTGGGTAG	GAACCCAACATCCCAAAACAC
2	CCAGCCAGTCATCTGGTCTT	GAGTTAGCGGACACCACAGG
3	AGCTCCTTGAGAAGTGCAGGAT	ATTAGAGACAGGTGCTGCCTTG
4	CCCTGTGTGAGTGAGTGCATA	CTGGCCTGGAGGTTTAGGT
5	GCCCCTCTCATTTGGAGAGTAT	AATGGCCAGTGAGATGGCTA
6- fragmento 1	AGAATATGAGAGCTGCCTGGAC	GCTGGGGAGTACAAGTAGGAAA
6- fragmento 2	CTTCCTCTCCCTCACGAAG	TGGGGTTCTCTTGTGGGA
6- fragmento 3	AACCACCCAACAAGACAGC	GGTCCTGGGATTGTCCTG
6- fragmento 4	CCATCCAACAAGAGAACCTC	GAATTCCTGGGATTGTTCCA
6- fragmento 5	TCATCTCCCCATCGTACTAACA	GTATATAGGGAGGCTCGTGGTG
6- fragmento 6	CTCGCTATTTGCAGCACGAC	CCATGCAGAGAGTCAGTGGAG
6- fragmento 7	GATCCCCCTGGAAGTAGTATGG	CACTTTCTTTTGGCACCCCTAAC
7	GTTGGAGGTGGGAGCAGAG	TTCATAGAGGACCTTCCTGTCC
8- fragmento 1	CCAGAGAGAGAGCCTCACCTAC	GCTCTCCTTGTACTCCCTGGAA

8- fragmento 2	CTGGTGGGGATGTGGAGAG	GAGAAGGCCAAGCAGATCC
8- fragmento 3	CTTGACTGGAGGGATCTGCTT	CTGACTTTCTGGCTACCCTTG
9	GCATGCATCCTGGAGAATAAGT	TCTAGGGCTCTTCTGAGGAATG
10	GCAGTTCTGGGAGGAGAGAA	CCCCTCTCTCTCCTTTGCTTA
12	CACAGGACTTGGGGACAGG	CCCAGGGTTCTCACACCAG
13-14	CCACACAGGACACCTGTACAAT	CCTCTGGGTAAATGAGTGAAGG
15	CATAGTGGGGAGGGAGTCAT	TGAGTACCTAGAAACCCACTCG
16- fragmento 1	AAAGTGCTCATTGTGGGACTG	GTCTGTGGCCTCAAACCACT
16- fragmento 2	CAAGCAGGAGGAGCTGGAG	TGTAGGAGTGCAAGACAAATGC
17	GCTCCTCACTGCCTTCCAC	GATAACACGGCAAGCAGAAATC
18	CCTGAGCCTTCTCCTCTGG	CTAGGAGGAACCTCAGCACAGA
19	CACCAGTACATGTGGCGTCT	TTCCTCAACCCATAACCATCA
20-21	CCTGGGATGCTTTAAGTCTACCT	GCTACTGGATGCACAGTAGGTG
22	ACTATGGGCCAGGGTAGCTCT	AGAGCAGGTGCTCACAGGAT
23	GTATCTGCGGGGAGGTCTG	CTTTTTACAGAACGGGAATTGG
24- fragmento 1	CACCCTTGCTTGGCCTTG	AGCCACCAGGAATTGCTTT
24- fragmento 2	AAAGCAATTCTGGTGGCT	GCTATTTCCACATGCTTCC
24- fragmento 3	TGAAAATCCAAGGTCTCCCTTA	ATGTGGCCTGTTTCTGTGG
24- fragmento 4	CCACAGAAACAGGCCACAT	GGTCTCGAACTCCTGACCTC
24- fragmento 5	TAGCACTTTGGGAGGCCAAG	GGTGGGATGGTGAGGATG
24- fragmento 6	TTCCTAGCCACTGGGAGATG	GGGTGCAACAAAGCACATTT
24- fragmento 7	GGTGGGGATACGGAGAAGAG	TGTGTAGCAGTTGTTTTAAATTGC

5. Locus DFNB29: gen *CLDN14*

5.1 Análisis de haplotipos

El estudio se realizó mediante genotipado para 2 marcadores microsatélites próximos al gen *CLDN14*, en 21q22, en el siguiente orden: cen-D21S1252-*CLDN14*-D21S267-tel. El genotipado se llevó a cabo como se indica en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la [Tabla 11](#).

Tabla 11. Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los marcadores microsatélites de 21q22.

Microsatélite	Directo (5' → 3')	Inverso (5' → 3')
D21S1252	HEX-TCTGTCTTTGTCTCACTATCTG	GCAATGCTCTGTGGCT
D21S267	FAM-ATGGATCTGGATTTCTATCTTC	CCTCCAACCTGGGTGA

5.2 Secuenciación

Para la secuenciación de los exones y regiones intrónicas flanqueantes del gen *CLDN14*, se diseñaron los cebadores que aparecen en la [Tabla 12](#). La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó utilizando las condiciones descritas en el apartado 1.3, con las siguientes excepciones: para amplificar el exón 1- fragmento 2 y el exón 2, se empleó MgCl₂ 2,0 mM y MgCl₂ 1,0 mM, respectivamente; el tiempo de

hibridación fue de 30 seg para todos los exones excepto para el exón 3- fragmento 1 que fue de 45 seg. La reacción de secuencia se realizó siguiendo las condiciones del apartado 1.4.

Tabla 12. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los exones del gen *CLDN14*.

Exón	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
1- fragmento 1	AAAGGCTGAGAAGCTGAGTTAC	GGACGGAGTATTTGAGAGAAAA
1- fragmento 2	AGCCACCTCCTCTCATGCTA	AGGGCTTCCAAAACAGATGA
2	AGGCTTAGGGGAAGCTCTGA	GACGCTCTTGCAGTGTTCTG
3- fragmento-1	AAAACTTGGTTTCGGTGACA	GTTGGTGGTCCAGGAGACG
3- fragmento-2	GGCACCTCTTCATCCTG	GACATTTCTCGCATTACA
3- fragmento-3	AGGGTTCAGCACAAAGTT	AGTGGGCTCTGACTGTGGTT

6. Locus DFNB49: gen *MARVELD2*

6.1 Análisis de haplotipos

Se estudiaron 3 marcadores microsatélites próximos al gen *MARVELD2*, en 5q13, en el siguiente orden: cen-D5S602-D5S1414-*MARVELD2*-D5S1370 -tel. El genotipado se llevó a cabo como se indica en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la [Tabla 13](#).

Tabla 13. Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los marcadores microsatélites de 5q13.

Microsatélite	Directo (5' → 3')	Inverso (5' → 3')
D5S602	HEX-TCTCCCAACCTCTCCAAG	AGAACCACAGCTGAAGAAAC
D5S1414	FAM-CGCGCCATTGCACTCCAG	AGCAGTGTGGACATGACTGATAAGC
D5S1370	HEX-CATGAGCCATATTTAAAACCC	GACGAAATGGTTATATCTACC

6.2 Secuenciación

Para la secuenciación de los 7 exones del gen *MARVELD2* y de sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes, se utilizaron cebadores diseñados durante este estudio ([Tabla 14](#)). Para la amplificación de los fragmentos de ADN se siguieron las condiciones descritas en el apartado 1.3, con las siguientes excepciones: la temperatura de hibridación fue de 58°C para los exones 1, 2- fragmento 1, 2- fragmento 3, 6 y 7- fragmento 1; de 60°C para los exones 3, 4, 5 y 7- fragmento 2; y de 63°C para el exón 2- fragmento 2. La reacción de secuencia se realizó siguiendo las condiciones del apartado 1.4.

Tabla 14. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los exones del gen *MARVELD2*.

Exón	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
1	CTTTCCAAAAGAGCCCAGTG	GGGCTATGGCAGGCTGAG
2- fragmento 1	TGATCCTGTTGGTCTCCTAAATACT	AACGGTGGTTTGGTCTTG
2- fragmento 2	AATGGGATAAGCCGGTGTCTG	GTGATCCAAGCTAATCCAGCAA
2- fragmento 3	GGCAGTATGTATGGGGGCTAT	AACAAGGGAGCAAATAACAGAA
3	AAAGGATGAGAAACACCCGTC	GTAGCTGGGATTACAGGCGTGTG
4	CCACCCACCTGATCTTCTT	ATGGGGCCCTCAACTTCT
5	GTTGAGGGGCCCATTTG	GGTGGAGGTTGCAGCAAG
6	GGGCTTGGGTCTGGTTGCATGT	GGCATCCAGCAGCCATTTTCTCTTA
7- fragmento 1	CCCTGAGTTCAGAATCTGCTGTA	GGGAGGTGGAGGTTGCAGT
7- fragmento 2	CTGGAATGCAGTGGCACA	CACAGATGAAAGATGAACACAGG

6.3 Ensayo de restricción para la detección de la mutación c. 1331+2T>C

Para la detección de la mutación c.1331+2T>C (IVS4+2T>C) se diseñó un ensayo de restricción utilizando la enzima *HhaI* (New England Biolabs). En la digestión se utilizó como molde el producto de PCR (300 pb) obtenido al amplificar el exón 4 y sus zonas intrónicas flanqueantes. Para la amplificación se emplearon los cebadores correspondientes al exón 4 que aparecen en la [Tabla 14](#). La mutación c.1331+2T>C crea un nuevo sitio de restricción, dividiéndose el fragmento de 300 pb en dos de 251 pb y 49 pb. Las condiciones para la digestión fueron las recomendadas por el fabricante y los productos de la misma fueron separados en un gel de agarosa al 1,5%.

7. Locus DFNX1/DFN2: gen *PRPS1*

7.1 Secuenciación

Para la secuenciación del promotor del gen *PRPS1*, de los 7 exones y de sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes, se diseñaron los cebadores que se muestran en la [Tabla 15](#). Para la amplificación de los fragmentos de ADN y su posterior secuenciación, se siguieron las condiciones descritas previamente en los apartados 1.3 y 1.4.

Tabla 15. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los exones del gen *PRPS1*.

Exón	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
1	TCATGCTCTTCACCCAATACC	CGACCCCATCCCTCCTATAC
2	TCCACACTTGGTTGAATCCAT	TTTTGGAATTTATTTGTGATTTGG
3	TTCTGGGTACCATAGTGCCTTT	TTTGGCTTCTCTGCAGTCTTC
4	GAGCAAGTTACTACTTTGTGTTTGC	GCCACTTGGATAGAAAACTTCA
5	CTCCCAAAGTGCTGGGATTA	GGTTCCAAAAGGAATCAGCA
6	TCCTCCCTGACTAAAATTCTGC	TTCAACGTAAGTAACACCTCCT

7- fragmento 1	CTGGCTGCTCATCAGTGTCT	AGTCTGAGCTTCCCCAGTCA
7- fragmento 2	AGCTCAGCTGCTGCAAGATT	GCATGTTTGCTTTCCAGAAGA
7- fragmento 3	TGATCCTTTCTGGCCAAAT	GGACAGCAAGACATCTATCTAAACC
Promotor	AATGGGCAAGCAAACCTCCTT	GCGGCTCTAAATTACCCAAA

7.2 Análisis de haplotipos

Se estudiaron 3 marcadores microsatélites próximos al gen *PRPS1*, en Xq22-q24, en el siguiente orden: cen-DXS8048-*PRPS1*-DXS6797-DXS1210 -tel. El genotipado se llevó a cabo como se indica en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la [Tabla 16](#).

Tabla 16. Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los marcadores microsatélites próximos al gen *PRPS1*.

Microsatélite	Directo (5' → 3')	Inverso (5' → 3')
DXS8048	FAM-CTTGGGGAGCCTGCTAA	TGCTATCAACCAGTTCAGCC
DXS6797	FAM-TTCCCTCTCTCCCTCTGTCT	ACACACACCCAAAACCAGAT
DXS1210	HEX-TCATGTGAAACTCCAGAACCAGTA	GCCCTCAAATCTTCAGAGAGTGTA

7.3 Ensayos de minisequenciación (*SNaPshot*) para la detección de las mutaciones c.824T>C (p.I275T) y c.917G>A (p.G306E) en *PRPS1*

Se utilizó el *kit ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex* (Applied Biosystems) para el genotipado de SNPs, en posiciones predeterminadas del DNA. Este método se basa en la extensión de un cebador no marcado, que termina por su extremo 3' en el nucleótido inmediatamente anterior al interrogado para el SNP en estudio. En presencia de didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados fluorescentemente, la AmpliTaq DNA polimerasa aumenta la longitud del cebador en un nucleótido, añadiendo un solo ddNTP complementario al molde de DNA utilizado. Las diferentes variantes de secuencia obtenidas se van a poder distinguir, mediante electroforesis capilar, por el ddNTP añadido en cada elongación específica y por la longitud del cebador que se haya empleado (reacción de minisequenciación). La electroforesis capilar se realiza en un secuenciador automático ABI PRISM 3100, empleando LIZ® como marcador de peso molecular. El método está concebido para utilizar varios moldes de DNA y varios cebadores, por lo que las reacciones de PCR empleadas suelen ser múltiples.

Se diseñó un ensayo doble para la detección de las mutaciones c.824T>C (p.I275T) y c.917G>A (p.G306E), que se encuentran en los exones 6 y 7 del gen *PRPS1*, respectivamente. Se amplificaron los dos fragmentos (exones 6 y 7) según se describe en el apartado 7.1. Los fragmentos amplificados se utilizaron como molde en la reacción de minisequenciación. Los cebadores empleados en la reacción de minisequenciación para cada una de las mutaciones fueron: 5'-

GGCAGTAGTAGTCACCAATACCA-3' para detectar la mutación c.824T>C (p.I275T), y 5'-AGAAGCCATCAGGAGAACTCACAATG-3' para detectar la mutación c.917G>A (p.G306E).

8. Secuenciación de los genes *PRPS2*, *PRPS1L1* y *miR-376*.

Para la secuenciación de los exones de los genes *PRPS2* y *PRPS1L1* y *miR-376*, se utilizaron cebadores diseñados durante este estudio (Tablas 17-19). Las condiciones para amplificar los fragmentos de ADN y realizar la reacción de secuencia están descritas en los apartados 1.3 y 1.4.

Tabla 17. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los exones del gen *PRPS2*.

Exón	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
1	CTCCCTCTCTGCCCCCTC	GCCTCGGTTTCTTCGCAG
2	GACGCCCAAGATGCAATATG	CATCAAAGGAAAAAGCCAACATT
3	CATGTACGTCTTAGTGGGAGGA	GACAAAAATCCAAGAGAGTAGCC
4	ACAAAACAAAACAAAACCCTGCAA	AATACATCGGAAAAGGAAAAACCAA
5	CTCTCGGGTGTGGTTGCCT	CAATAATCAGGAAAAAAGAGCCCAA
6	CATTTTTCTTTTACGGAGCACACTT	AGGAGCCACACACACACAAGAC
7- fragmento 1	GTCTGTCTCTCAAAAGTGTCTG	TTGGCAACCTCGAAATATATAAACT
7- fragmento 2	TTTGACTTTTAAACAGGTACAGGTGA	CAAAGGTGGGGCTAAATAATGA
7- fragmento 3	GGATATAGGAACCTGCATTGTCAT	CTTTTCTGTAATTTTGTATGCTGGC

Tabla 18. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los exones del gen *PRPS1L1*.

Exón	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
1	GGAGGTGGCAAGCAGAAAT	GGACCGGCTCTTATCCTTCT
2	TTACTGCAGTCATCCCATGC	TGAGTCAAGATAGCATAAACTCTGG
3	TGGCAGACACTTGTGTTACAATC	GCAAGCTGGATCTTCTGCTG

Tabla 19. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación del gene *miR-376*.

Fragmento	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
1	TGCACCTATCCTGTGCTGTC	CCTCACGTCCCTGATGGT
2	TCCGGGATGAAACCTTCTt	ACCCCGTTCATTCAGATACG
3	GTTTCTGGAAGAGACCGTAGG	GTCTGTCCGTCCCTGTACCC

9. Locus DFNX4/DFN6: gen *SMPX*

9.1 Secuenciación

Para la secuenciación de los exones de los genes *SMPX* y *FIGF* y de sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes, se utilizaron cebadores diseñados durante este estudio (Tablas 20-21). Para la amplificación de los fragmentos de ADN y su posterior reacción de secuencia, se siguieron las condiciones descritas en los apartados 1.3 y 1.4.

Tabla 20. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los exones del gen *SMPX*.

Exón	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
1	CAGCGTATGGCTTGTATCAAA	TCACTTCGAGTTAGGTATCAAGGA
2	CCGAGGCATTAGGAAGGAG	GCTTCTCCTGTCTCAGTTGTACC
3	TTCTTCACAACGATTACTGTCTCAG	AGAAGGCAGTGCGTTTCAG
4	GGCTGTCTCAACAACAAGG	TGAAGGCACCTGGTATTTAATG
5	CAATTATGCCTTAATGACTGGA	CTTAGGCAATATGGGTTTCAGC

Tabla 21. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de los exones del gen *FIGF*.

Exón	Cebador directo (5' → 3')	Cebador inverso (5' → 3')
1- fragmento 1	TTTTGGCAAGGCAAAAATAA	ATCTTAGGGGTGGGAGAGA
1- fragmento 2	TCCACCTTCTGATTATTTTGGGA	TGAGGGCAAAGAAAGTCCTC
2	TAGGCACTGGCATACTGTTTC	TCTGCCCTACGCAGACTTTT
3	ATAACCCTGGCACATGTTGG	GCGATTATGCACATAAAGCAT
4	TGACAAAGGCAAAAATTCAGA	TTTTGGCAAGGCAAAAATAA
5	CTCAGGAATTTATTTAATGTTCCAA	AACGGTTGCTGCTATTGTTG
6	TGATCCAATTGCCACTACA	GGCACCAGGGGAAAAATTA
7- fragmento 1	GGAAACTTAATCAAATCAGAGCA	CAGGGACTCCTTAGCTGGTG
7- fragmento 2	TTTGCCAAGTTGCTGTCACT	TCTTCCTGCACCTTCCACTT

9.2 Análisis de haplotipos

Se estudiaron 3 marcadores microsatélites próximos al gen *SMPX*, en Xp22, en el siguiente orden: cen-DXS7592-DXS7101-*SMPX*-DXS7105-tel. El genotipado se llevó a cabo como se indica en el apartado 1.5 y los cebadores correspondientes se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los marcadores microsatélites próximos al gen *SMPX*.

Microsatélite	Directo (5' → 3')	Inverso (5' → 3')
DXS7592	HEX-AGGCAATTCCTAGTGGCTG	ATTGAGCCTAGATCGCACC
DXS7101	FAM-CGGTAACACAGATAACTGGTTT	GGAAGCAAATATGCCAAGAT
DXS7105	FAM-GATACCCAACCTCTACACATGATAAA	CAGGATATTGACATTGATATAATCC

Resultados

1. Hipoacusia de tipo DFNB1

1.1 Ensayo MLPA para detectar nuevas deleciones en el *locus* DFNB1.

Si se combinan los datos de los puntos de rotura de las cuatro deleciones descritas (del Castillo *et al.*, 2002; del Castillo *et al.*, 2005; Wilch *et al.*, 2010; y nuestros resultados no publicados), se obtiene un intervalo común de 95,4 kb, localizado a más de 100 kb por delante de *GJB2*. Se postula que en este intervalo habría un elemento regulador en *cis*, que controlaría la expresión de *GJB2* y *GJB6* en el oído interno. Realizamos un análisis bioinformático del intervalo, utilizando el programa VISTA Enhancer Browser (<http://enhancer.lbl.gov/>). El programa predijo dos hipotéticos elementos reguladores (Figura 16).

A continuación, desarrollamos un test MLPA para la detección de deleciones que afecten al mencionado intervalo crítico. Para ello, se utilizó un *kit* comercial (“P300-A1 Human DNA Reference-2”, de MRC Holland) que contiene 14 sondas control situadas en diferentes cromosomas y una sonda en el exón 3 del gen *GJB6*. Este *kit* permite añadir sondas MLPA sintéticas diseñadas por el usuario.

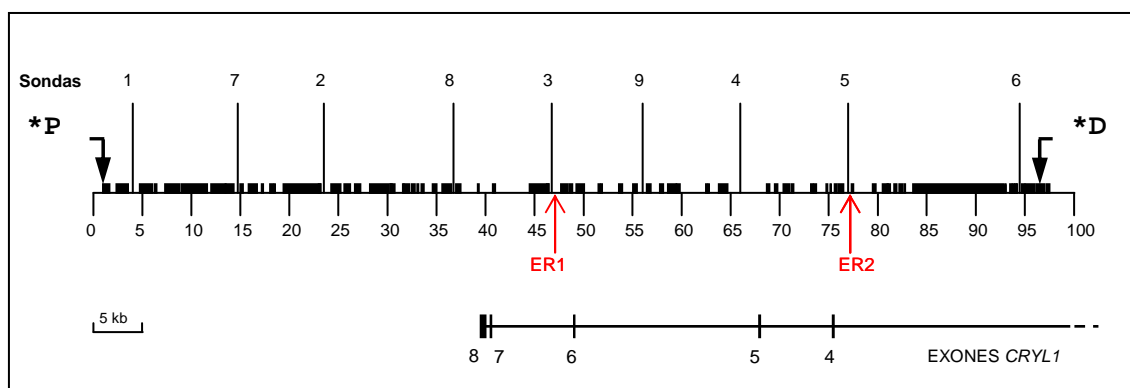


Figura 16. Mapa del intervalo común de 95,4 kb que comparten las cuatro deleciones conocidas. Los límites del intervalo, marcados con flechas, son el punto de rotura proximal de la mutación del(131-kb) (*P) y el punto de rotura distal de la mutación del(*GJB6*-D13S1854) (*D). Las barras negras horizontales indican las secuencias repetidas detectadas por el software *Repeat Masker* (<http://www.repeatmasker.org/>). Las 9 sondas sintéticas diseñadas se localizan en zonas de secuencia única y están indicadas con barras verticales. Las flechas en rojo indican la localización de los hipotéticos elementos reguladores (ER1, ER2). La región incluye los exones 4-8 del gen *CRYL1*, que codifica la proteína λ -cristalina.

Al diseñar las sondas, es importante tener en cuenta los espacios libres que deja el *kit* comercial para que las sondas sintéticas no solapen con las sondas control. En nuestro caso, los espacios libres eran los intervalos de 96 a 144 nucleótidos y de 152 a 168 nucleótidos. La longitud óptima de las sondas sintéticas está entre 100 y 140 nucleótidos, y las sondas han de espaciarse entre ellas un mínimo de 4 nucleótidos. Como se ha indicado en Materiales y métodos, hay que tener en cuenta los valores de

Tm y de porcentaje de (G+C) de las secuencias de hibridación izquierda (LHS) y derecha (RHS).

Diseñamos 9 sondas espaciadas uniformemente (distancia promedio de 10 kb) a lo largo del intervalo de 95,4 kb. Las sondas estaban situadas en zonas de secuencia única (Figura 16). Procuramos colocar dos de las sondas lo más cerca posible de los dos elementos reguladores predichos por el programa. De esta forma, las sondas 3 y 5 de nuestro ensayo MLPA se encuentran a solamente 241 pb y 503 pb, respectivamente, de los dos hipotéticos elementos reguladores.

El ensayo MLPA diseñado en nuestro laboratorio fue puesto a punto utilizando muestras de genotipo conocido: 2 individuos silvestres para el *locus* DFNB1, 1 individuo heterocigoto del(*GJB6-D13S1854*)/wt, 1 individuo heterocigoto del(*DFNB1-200kb*)/wt, 1 individuo homocigoto del(*GJB6-D13S1830*)/del(*GJB6-D13S1830*), y 1 individuo heterocigoto compuesto del(*GJB6-D13S1830*)/del(*GJB6-D13S1854*).

Como cabía esperar, el número de copias de las sondas sintéticas en los dos individuos silvestres era 2 (valor de la razón entre las muestras problema y control igual a 1 en el ensayo), en los individuos heterocigotos del(*GJB6-D13S1854*)/wt y del(*DFNB1-200kb*)/wt era 1 (valor de la razón igual a 0,5 en el ensayo), y en los individuos homocigoto y heterocigoto compuesto era 0. En el caso de la sonda comercial que estaba en el exón 3 de *GJB6*, el número de copias era 2 en los dos individuos silvestres y en el heterocigoto del(*DFNB1-200kb*)/wt (ya que esta delección no elimina dicho exón); era 1 en el individuo que tenía la delección del(*GJB6-D13S1854*) en heterocigosis (ya que esta delección sí elimina este exón de *GJB6*); y 0 en los individuos heterocigoto compuesto y homocigoto para del(*GJB6-D13S1830*).

Estos 6 individuos fueron utilizados como controles en cada uno de los ensayos MLPA llevados a cabo.

En nuestro laboratorio habíamos reunido muestras de 35 individuos españoles no relacionados entre sí, con hipoacusia no sindrómica cuyo modo de herencia era compatible con un patrón autosómico recesivo, que eran heterocigotos para un alelo mutante DFNB1. Todos estos casos portaban alelos considerados inequívocamente patogénicos. De ellos, 21 eran casos familiares (con más de un individuo afectado en la familia) y 14 eran casos esporádicos (con un único individuo afectado, sin antecedentes familiares). En la Tabla 23 se muestran los genotipos que presentaban estos individuos heterocigotos.

Tabla 23. Genotipos de los casos heterocigotos DFNB1 no elucidados de nuestra colección.

Genotipos	Casos	
	Familiares	Esporádicos
c.35delG/?	12	8
p.N206S/?	5	0
del(<i>GJB6-D13S1830</i>)/?	1	1
IVS1+1G>A/?	1	0
p.E147K/?	1	0
p.R184P/?	1	0
p.V37I/?	0	2
p.W24X/?	0	1
p.W77R/?	0	1
p.L90P/?	0	1

Estos 35 casos no elucidados fueron estudiados mediante el ensayo MLPA puesto a punto en nuestro laboratorio, pero no se detectaron nuevas deleciones.

Este resultado no era sorprendente, dado que en nuestra muestra la proporción de casos pendientes de elucidación era ya relativamente baja (las deleciones hasta ahora conocidas en DFNB1 son frecuentes en la población española, por lo que su detección permite aclarar la gran mayoría de casos). Por esta razón, decidimos estudiar otras poblaciones en las que se hubiera descrito un alto porcentaje de casos heterocigotos pendientes de elucidación. Establecimos una colaboración con genetistas de laboratorios en los Países Bajos (Dra. Lies Hoefsloot, Nimega), Polonia (Dr. Rafal Ploski, Varsovia) y Brasil (Dra. Edi Lúcia Sartorato y Dra. Regina C. Mingroni-Netto, Sao Paulo), que tenían un número elevado de casos heterocigotos DFNB1 no elucidados. Estudiamos sus muestras mediante nuestro ensayo MLPA. En total se estudiaron 201 muestras: 25 muestras procedentes de los Países Bajos, 144 de Polonia y 32 de Brasil. En todas las muestras holandesas y en 26 de las muestras brasileñas se había excluido previamente la presencia de las mutaciones del(*GJB6-D13S1830*) y del(*GJB6-D13S1854*). En las polacas se había excluido previamente sólo la mutación del(*GJB6-D13S1830*).

Se analizaron las 201 muestras mediante nuestro ensayo MLPA, y no se detectaron nuevas deleciones en el intervalo crítico. Sin embargo, se identificó en un individuo polaco la deleción del(*GJB6-D13S1854*) en heterocigosis, resultado no sorprendente puesto que la cohorte polaca no había sido cribada previamente para esta deleción (Figura 17).

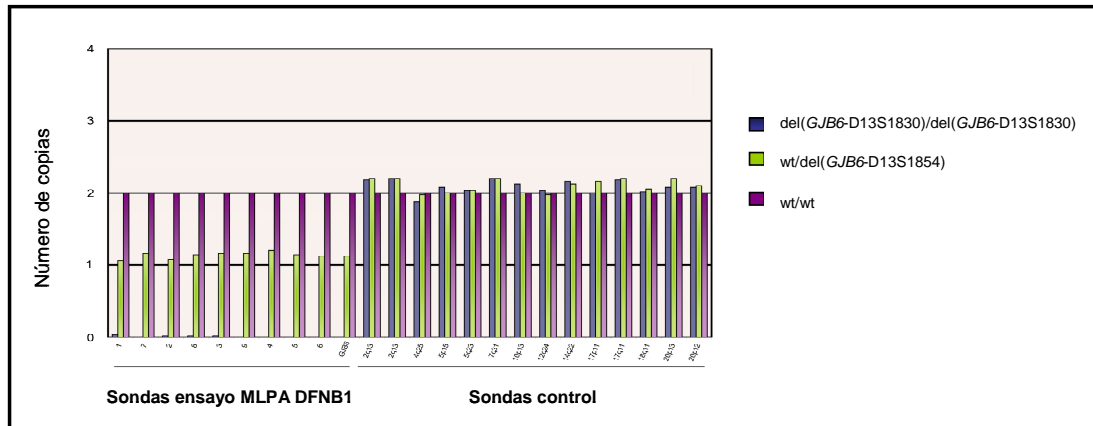


Figura 17. Perfiles del ensayo de MLPA puesto a punto en este estudio. En morado, un individuo silvestre; en verde, el individuo polaco heterocigoto para la mutación $\text{del}(\text{GJB6-D13S1854})$; y en azul un individuo control homocigoto para la mutación $\text{del}(\text{GJB6-D13S1830})$. Las sondas del ensayo MLPA DFNB1 incluyen las 9 sondas sintéticas y la sonda comercial que está en el exón 3 del gen *GJB6*. Esta última sonda es eliminada en las deleciones $\text{del}(\text{GJB6-D13S1854})$ y $\text{del}(\text{GJB6-D13S1830})$.

Para corroborar la presencia de la deleción $\text{del}(\text{GJB6-D13S1854})$ en la muestra polaca mediante otro test diferente, se realizó el ensayo de PCR múltiple para la detección combinada de las tres deleciones. Se confirmó la presencia de la deleción en heterocigosis.

Finalmente, las regiones que contienen los dos elementos reguladores predichos por el análisis informático fueron secuenciadas en 64 individuos de la cohorte polaca, pero no se encontraron mutaciones.

1.2 Identificación de una nueva mutación en el *locus* DFNB1

Se estudió una familia que presentaba hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia aparentemente autosómica dominante y con heterogeneidad clínica (Figura 18). El individuo III:2 tenía una hipoacusia prelocutiva severo-profunda, mientras que su padre y dos de sus tías paternas presentaban una hipoacusia postlocutiva moderada. El estudio genético reveló que se trataba de un caso de pseudo-dominancia. El individuo III:2 era homocigoto para la mutación c.35delG en el gen *GJB2*. Por su parte, el padre y las dos tías paternas afectadas eran heterocigotos compuestos para c.35delG y una nueva mutación en el sitio aceptor de *splicing* del intrón 1, c.-22-2A>C (IVS1-2A>C). Otra tía paterna, normoyente (individuo II:2), solamente era heterocigota portadora de la mutación c.35delG; y el individuo III:1, también normoyente, era heterocigoto portador de c.-22-2A>C. Por lo tanto, se trataba de un caso de hipoacusia autosómica recesiva de tipo DFNB1 con variabilidad fenotípica, estando la hipoacusia postlocutiva moderada asociada con el genotipo c.35delG/c.-22-2A>C.

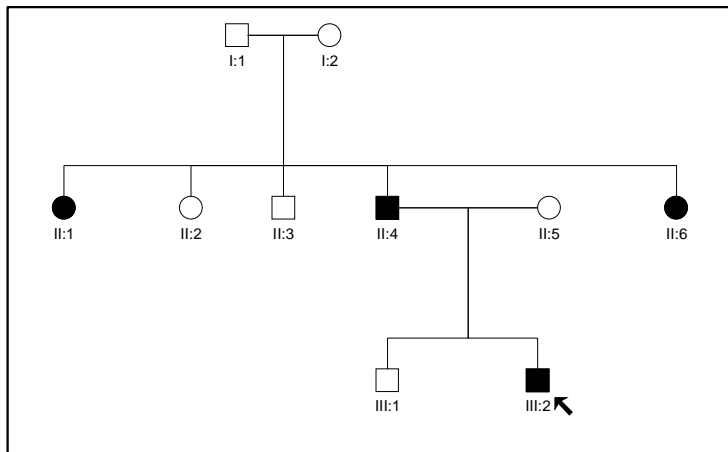


Figura 18. Árbol genealógico de la familia S1599, mostrando la segregación de las mutaciones c.35delG y c.-22-2A>C. La flecha señala al caso índice.

Desarrollamos entonces un ensayo de tipo RFLP (enzima *Eco88I*) para facilitar el cribado de un alto número de muestras. Mediante este ensayo, se investigó la presencia de la mutación c.-22-2A>C en 92 individuos control con audición normal (184 cromosomas). No se encontró la mutación en ninguno de estos casos.

Dado que la hipoacusia asociada a esta mutación parece ser moderada y de aparición tardía, investigamos también 13 individuos con presbiacusia de nuestra colección de laboratorio, no encontrando la mutación en ninguno de ellos.

1.2.1 Efecto causado por la mutación c.-22-2A>C

Se utilizó el programa "NNSplice 0.9" para predecir sitios donadores y aceptores de *splicing* en el gen *GJB2*. El programa asignó un valor de 0,88 (en una escala de 0 a 1) al sitio aceptor de *splicing* normal y, además, predijo otro sitio aceptor de *splicing*. Este sitio alternativo estaba situado a 38 pb por delante del sitio aceptor normal y el programa le asignaba un valor de 0,82 (Figura 19).



Figura 19. Representación en ADN genómico de la localización de los diferentes sitios aceptores de *splicing* detectados en el paciente heterocigoto compuesto c.-22-2A>C/c.35delG: en verde, sitio aceptor de *splicing* alternativo 1 (predicho por el programa NNSplice 0.9), situado a 38 pb por delante del sitio aceptor de *splicing* normal (en morado); en rosa, sitio aceptor de *splicing* alternativo 2, situado a 34 pb por delante del sitio aceptor de *splicing* normal. El nucleótido de adenina marcado en morado y señalado por una flecha morada, es el cambiado en la mutación c.-22-2A>C. El nucleótido de guanina marcado en naranja y señalado por una flecha naranja, es el cambiado en la mutación c.35delG. Las bases en rojo (ATG) indican el codón de inicio de la traducción. Las bases subrayadas corresponden a la secuencia de los cebadores INI26-A2 y INI26-B2.

En el curso de este trabajo pudimos determinar que se pueden obtener productos de RT-PCR del gen *GJB2* a partir de ARN extraído de saliva. Esta propiedad resulta muy útil para la investigación, dada la imposibilidad de obtener muestras de oído interno de individuos vivos. Por consiguiente, para identificar los transcritos del gen *GJB2* generados en los pacientes con genotipo c.-22-2A>C/c.35delG, se llevó a cabo una RT-PCR a partir de ARN extraído de saliva, con cebadores localizados en los exones 1 y 2 del gen *GJB2*. El cebador del exón 2 se marcó con un fluoróforo (Figura 19). El amplicón elegido incluye además el sitio de la mutación c.35delG, a fin de poder distinguir los transcritos generados a partir de uno u otro alelo en el paciente (los productos derivados del alelo c.35delG tienen un nucleótido menos). Los productos de PCR fueron resueltos en un analizador de fragmentos (Figura 20). En el caso del individuo control, se obtuvieron dos picos de tamaños 279 y 317 pb. En el caso del paciente c.-22-2A>C/c.35delG, se obtuvieron 3 picos de tamaños: 278, 313 y 317 pb. En el control, el pico de tamaño de 279 pb se correspondía con el esperado para el transcrito producido al utilizar el sitio aceptor de *splicing* normal; y el de 317 pb, con el del transcrito obtenido al utilizar el sitio aceptor de *splicing* alternativo predicho por el programa. En el paciente, el pico de 278 pb correspondía también al esperado para el transcrito del sitio aceptor normal, pero el hecho de que apareciese con un nucleótido menos indica que se había generado exclusivamente a partir del alelo con la mutación c.35delG.

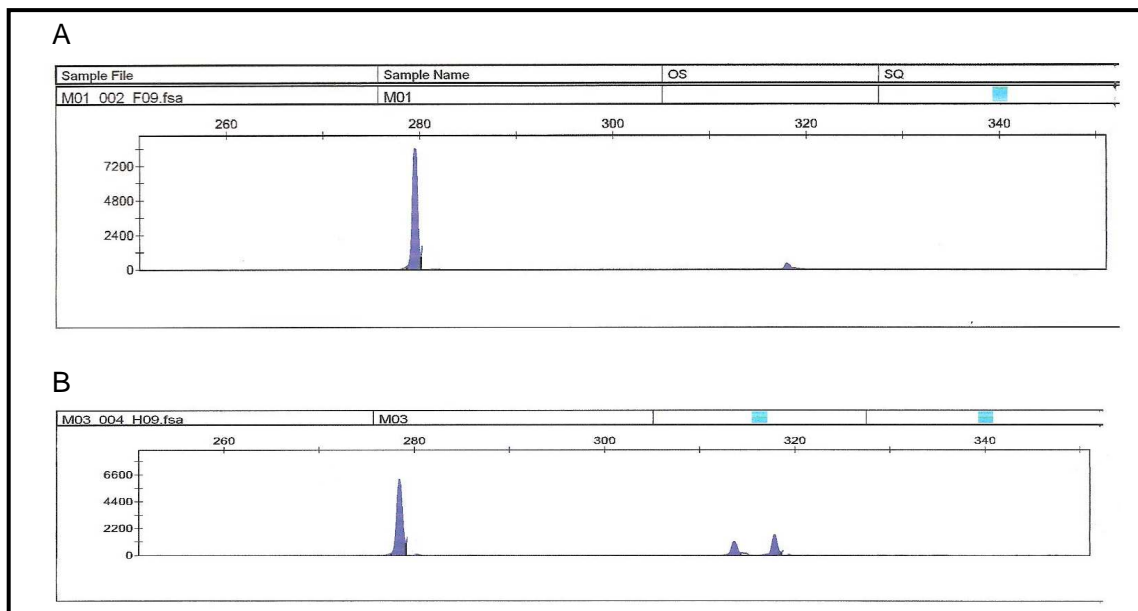


Figura 20. Resultados del ensayo para determinar el patrón de *splicing* en un individuo silvestre y un individuo con la mutación c.-22-2A>C. **A:** individuo silvestre. Se detecta un pico en 279 y otro en 317 pb, correspondientes al sitio de *splicing* normal y a un sitio de *splicing* alternativo, respectivamente. **B:** individuo heterocigoto compuesto c.-22-2A>C/c.35delG. Se detecta un pico en 278, otro en 313 y otro en 317, correspondientes al sitio de *splicing* normal y a sitios de *splicing* alternativos.

Para confirmar esta interpretación de los resultados se repitió la PCR anterior, pero utilizando el cebador inverso sin marcar. Los productos obtenidos se comprobaron en un gel de agarosa. En el caso del individuo control aparecían dos bandas, correspondientes a los picos observados de 279 y 317 pb, mientras que en el heterocigoto compuesto c.-22-2A>C/c.35delG, aparecían tres bandas (las correspondientes a los picos de 278, 313 y 317 pb). Se extrajeron las bandas del gel de agarosa y se purificaron; en el caso del paciente, las bandas de 313 y 317 pb se extrajeron juntas porque su mínima separación en el gel impedía una extracción por separado. Los productos obtenidos fueron secuenciados directamente. En un experimento en paralelo, los productos de la RT-PCR fueron clonados en un vector para su secuenciación por separado.

Los datos de secuencia demostraron que los fragmentos de 278/279 pb y 317 pb se correspondían con los transcritos generados al utilizar los sitios aceptores de *splicing* normal y alternativo predicho por el programa, respectivamente (Figura 21). El fragmento de 313 pb se obtenía mediante utilización de otro sitio aceptor alternativo, no predicho por el programa, que se localizaba a 4 pb por detrás del sitio aceptor de *splicing* alternativo predicho. El sitio aceptor alternativo 1 (predicho por el programa) introducía 38 nucleótidos intrónicos al transcrito, y el sitio aceptor alternativo 2, introducía 34 nucleótidos (Figura 19). Éste se utilizaba en menor grado que el sitio alternativo 1, como se puede observar en el ensayo del analizador de fragmentos (Figura 20).

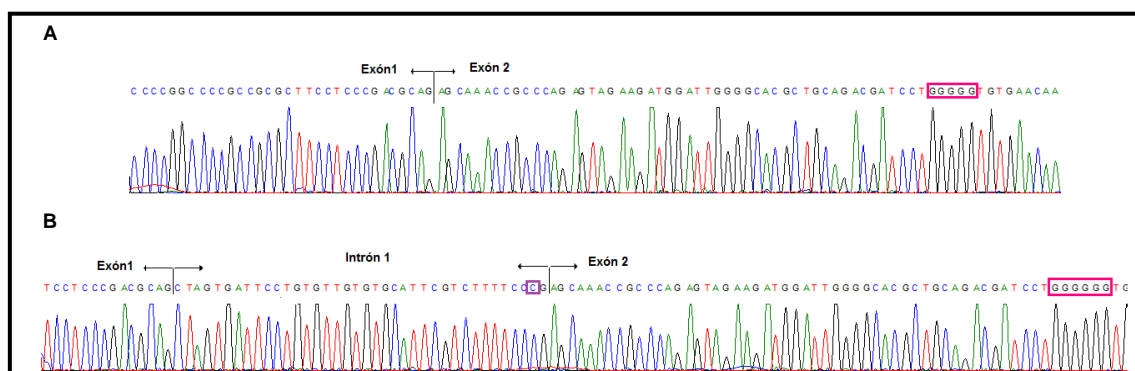


Figura 21. Secuencias específicas de los transcritos del individuo II:4 (c.-22-2A>C/c.35delG) generados al utilizar los sitios aceptores normal y alternativo 1. Recuadrado en rosa, trecho de seis nucleótidos de guanina donde se produce la mutación c.35delG. Recuadrado en morado, sitio de la mutación c.-22-2A>C. Recuadro en negro, codón de inicio (ATG) de la traducción. **A:** secuencia del transcrito generado a partir del alelo que lleva la mutación c.35delG. Se utiliza el sitio aceptor de *splicing* normal. **B:** secuencia del transcrito generado a partir del alelo que lleva la mutación c.-22-2A>C. Al usar el sitio aceptor de *splicing* alternativo 1, se introducen 38 nucleótidos del intrón 1.

Mediante PCR a tiempo real se cuantificaron los niveles de los distintos ADNc del individuo II:4, heterocigoto c.-22-2A>C/c.35delG. Los datos obtenidos se normalizaron comparándolos con los datos de un individuo normoyente, y se normalizaron respecto a los datos obtenidos de un gen control, de expresión ubicua. Los cebadores utilizados en este ensayo fueron diseñados para amplificar específicamente el ADNc de los sitios aceptores normal y alternativo 1.

Para realizar la PCR cuantitativa, se prepararon diluciones seriadas de las muestras de ADNc del individuo control y del individuo heterocigoto compuesto c.-22-2A>C/c.35delG, obtenidas mediante RT-PCR. Se utilizaron 25, 125 y 625 ng de ADNc por amplicón, y cada reacción se hizo por duplicado. Como control interno, se utilizó el gen *GAPDH*. La cuantificación se realizó como se indica en el apartado 2.4.3.5 de Materiales y métodos.

La razón R obtenida para cada uno de los amplicones fue: 0,29 (sitio de *splicing* normal) y 1,68 (sitio de *splicing* alternativo) (Figura 22).

El individuo II:4 tiene en un alelo la mutación c.-22-2A>C, que hace que el sitio aceptor de *splicing* normal se pierda, por lo que se esperaba que la cantidad de transcrito normal estuviese en torno al 50% de la obtenida en el individuo control. Sin embargo, solamente se obtiene un 29%. Esta reducción sugiere que el transcrito con la mutación c.35delG pudiera ser menos estable que el silvestre. Se observa también que, en ausencia del sitio de *splicing* normal, se incrementa el uso del sitio alternativo 1.

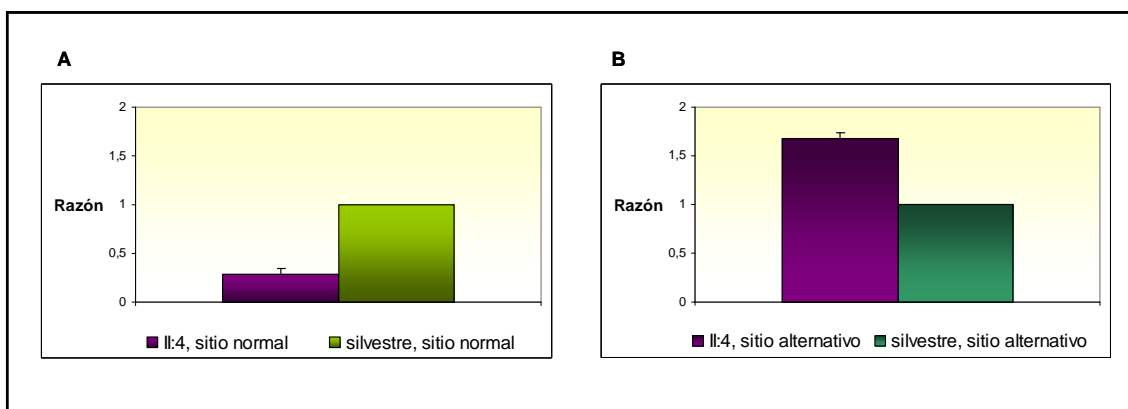


Figura 22. Comparación de la expresión de los transcritos obtenidos al utilizar los diferentes sitios aceptores de *splicing* (A: normal; B: alternativo 1). Los resultados se expresan como niveles de expresión relativos (razón) de un paciente heterocigoto compuesto c.-22-2A>C/c.35delG frente a un individuo control silvestre. Los resultados presentados son la media de 4 ensayos independientes.

2. Hipoacusias de tipos DFNB24, DFNB28, DFNB29 y DFNB49

2.1 Hipoacusia de tipo DFNB24: gen *RDX*

Se estudiaron 69 familias de nuestra colección que presentaban hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica recesiva. En todas ellas se había descartado la presencia de mutaciones en el *locus* DFNB1. El estudio se realizó mediante genotipado para tres marcadores microsatélites próximos al gen *RDX*, en 11q22, en el siguiente orden: cen-D11S1778-D11S927(*RDX*)-D11S1893-tel, siendo el marcador D11S927 intragénico. El análisis de haplotipos reveló compatibilidad de ligamiento o indeterminación en 15 familias. Se secuenciaron los 14 exones del gen en un individuo afecto de cada una de estas 15 familias, pero no se encontró ninguna variante de secuencia.

2.2. Hipoacusia de tipo DFNB28: gen *TRIOBP*

Se estudiaron 52 familias con hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica recesiva de nuestra colección. En todas ellas se había excluido la presencia de mutaciones en el *locus* DFNB1. Todos los individuos de estas familias fueron genotipados para los marcadores microsatélites D22S426, D22S1045 y D22S1156, próximos al gen *TRIOBP*, en 22q13. El análisis de haplotipos indicó compatibilidad de ligamiento o indeterminación en 17 de estas 52 familias.

Se secuenciaron los 24 exones del gen *TRIOBP* en un individuo afecto de cada una de estas 17 familias. Se encontró una nueva variante *nonsense* en el exón 7 (c.2968C>T; p.R990X) en homocigosis en la familia consanguínea S1327, de origen marroquí (Figuras 23 y 24).

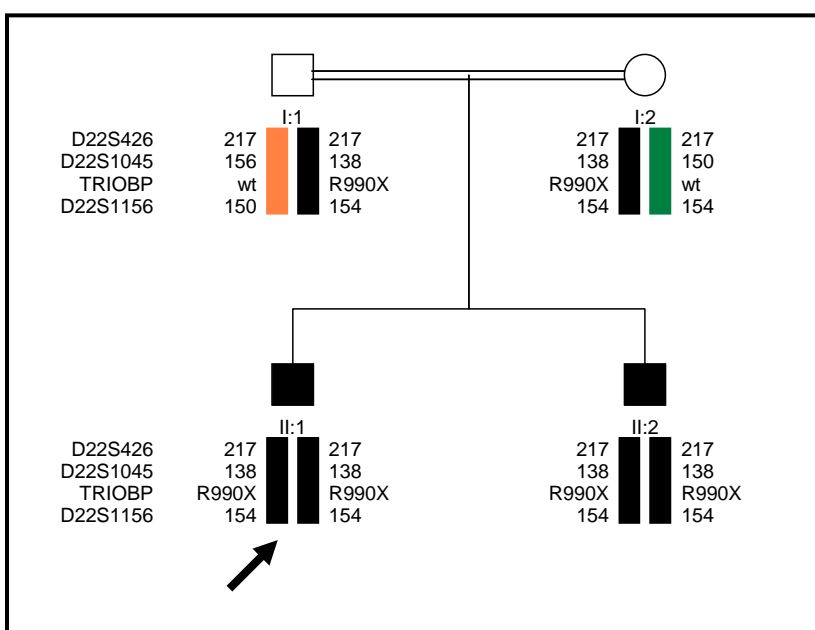


Figura 23. Árbol genealógico de la familia S1327. Los haplotipos se indican con barras verticales. En negro, el haplotipo asociado a la hipoacusia en esta familia. Los progenitores son normoyentes y portadores de la mutación p.R990X. Los 2 hijos son afectados y homocigotos para la mutación p.R990X. La flecha señala al caso índice.

Se comprobó que el cambio segregaba con la sordera en esta familia, ya que estaba presente en heterocigosis en ambos progenitores y en homocigosis en los hijos afectados (Figura 23). Estos resultados eran consistentes con los obtenidos en el análisis de haplotipos, ya que los individuos afectados eran homocigotos para los marcadores utilizados, como cabía esperar dada la consanguinidad existente. Por tratarse de una mutación que causa la aparición de un codón de parada prematuro, debe ser considerada como patogénica. La sordera en esta familia era de grado severo.

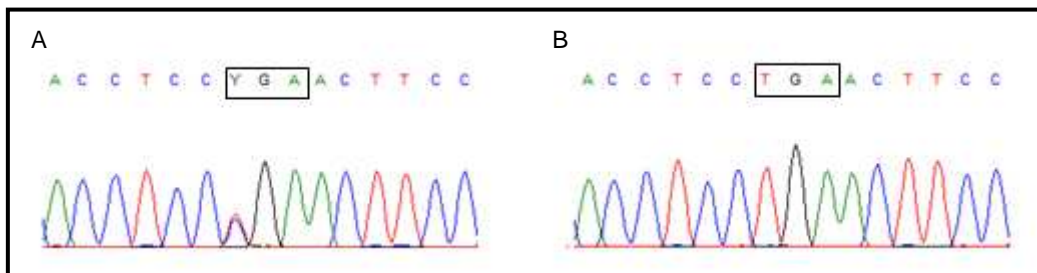


Figura 24. Electroferogramas correspondientes a la nueva mutación encontrada en el gen *TRIOBP* en la familia S1327. Los recuadros indican el codón afectado. **A:** individuo heterocigoto para la mutación p.R990X (c.2968C>T). **B:** individuo homocigoto para la mutación p.R990X (c.2968C>T).

El estudio de la región codificante del gen *TRIOBP* en estos individuos reveló diversas variantes de secuencia no patogénicas (Tabla 24).

Tabla 24. Polimorfismos encontrados al secuenciar el gen *TRIOBP* en un individuo afecto de las 17 familias que presentaban compatibilidad de ligamiento.

Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Localización	Casos	Nº rs (dbSNP)
c.650G>A	p.S217N	Exón 7	7	rs12628603
c.2477C>T	p.S826L	Exón 7	1	rs41296243
c.2589C>A	p.N863K	Exón 7	4	rs9610841
c.3885C>T	p.S1295S	Exón 7	9	rs739137
c.3899A>G	p.H1300R	Exón 7	13	rs739138
c.3975G>A;	p.Q1325Q	Exón 8	9	rs7284476
c.4116G>T	p.E1372D	Exón 9	8	rs8140207
c.4129T>C	p.W1377R	Exón 9	11	rs8140958
c.4735A>G	p.S1579G	Exón 9	17	No descrito*
c.5550G>A	p.V1850V	Exón 14	2	rs11704996
c.6498C>T	p.Y2166Y	Exón 19	9	rs4821708

*Afecta a un residuo poco conservado y se observó en una frecuencia similar en controles normoyentes.

2.3. Hipoacusia de tipo DFNB29: gen *CLDN14*

Se estudiaron 69 familias de nuestra colección con hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica recesiva, en las que no se habían encontrado mutaciones en el *locus* DFNB1. Se realizó el estudio mediante genotipado para dos marcadores microsatélites (D21S1252 y D21S267) próximos al gen *CLDN14*, en 21q22. El análisis de haplotipos mostró compatibilidad de ligamiento o indeterminación en 16 de ellas. Se secuenciaron en estas 16 familias los 3 exones del gen *CLDN14* y no se encontró ninguna variante de secuencia patogénica, solamente se encontraron tres polimorfismos (Tabla 25).

Tabla 25. Polimorfismos encontrados al secuenciar el gen *CLDN14* en un individuo afecto de las 16 familias que presentaban compatibilidad de ligamiento.

Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Localización	Casos	Nº rs (dbSNP)
c.11C>T	p.T4M	Exón 3	2	rs113831133
c.243C>T	p.R81R	Exón 3	7	rs219779
c.687G>A	p.T229T	Exón 3	4	No descrito

2.4. Hipoacusia de tipo DFNB49: gen *MARVELD2*

Se estudiaron 80 familias de nuestra colección con hipoacusia neurosensorial no sindrómica de herencia autosómica recesiva, en las que no se habían encontrado mutaciones en el *locus* DFNB1. Se realizó el estudio mediante genotipado para tres marcadores microsatélites (D5S602, D5S1414 y D5S1370) próximos al gen *MARVELD2*, en 5q13. El análisis de haplotipos indicó compatibilidad de ligamiento o indeterminación en 10 de las 80 familias.

Se secuenciaron los 7 exones del gen en un individuo afecto de cada una de estas 10 familias, y no se encontró ninguna variante de secuencia patogénica. En cambio, se detectaron los polimorfismos que se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26. Polimorfismos encontrados al secuenciar el gen *MARVELD2* en un individuo afecto de las 10 familias que presentaban compatibilidad de ligamiento.

Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Localización	Casos	Nº rs (dbSNP)
c.98C>T	p.T33I	Exón 2	5	rs1185246
c.176CT	p.P59L	Exón 2	1	rs150434290

En un estudio realizado en la República Checa, se encontró que la mutación c.1331+2T>C (IVS4+2T>C) en el gen *MARVELD2* aparecía con cierta frecuencia en familias de etnia gitana con hipoacusia (Safka Brozkova *et al.*, 2011). Decidimos investigar si alguno de los pacientes de etnia gitana de nuestra colección presentaba esta mutación. Seleccionamos 37 casos no relacionados. Se desarrolló un ensayo de restricción con la enzima *HhaI* para la detección de la mutación c.1331+2T>C en un individuo afecto de cada una de estas 37 familias. La aplicación de este ensayo reveló que la mutación no estaba presente en ninguno de estos individuos.

3. Hipoacusia ligada al X de tipo DFNX1/DFN2: gen *PRPS1*

Se seleccionaron 13 familias de nuestra colección en las que la hipoacusia segregaba de modo compatible con un patrón de herencia ligado al X. Se secuenciaron los 7 exones del gen *PRPS1* en un individuo afecto de cada una de estas 13 familias y se encontraron dos nuevas variantes de secuencia en las familias S1583 y S740.

El caso índice de la familia S1583 (Figura 25) presentaba hipoacusia moderada desde los 13 años. Su abuelo materno manifestó la hipoacusia a la edad de 16 años, y tenía dos hermanos varones también sordos. En esta familia encontramos la mutación c.824T>C (p.I275T) en el exón 6 del gen *PRPS1* (Figura 26). Se estudió la segregación de la mutación mediante secuenciación. La mutación estaba presente en el caso índice y en heterocigosis en su madre. No se detectó ni en el padre ni en los dos hermanos varones normoyentes. Por lo tanto, la mutación encontrada segregaba con la hipoacusia en esta familia.

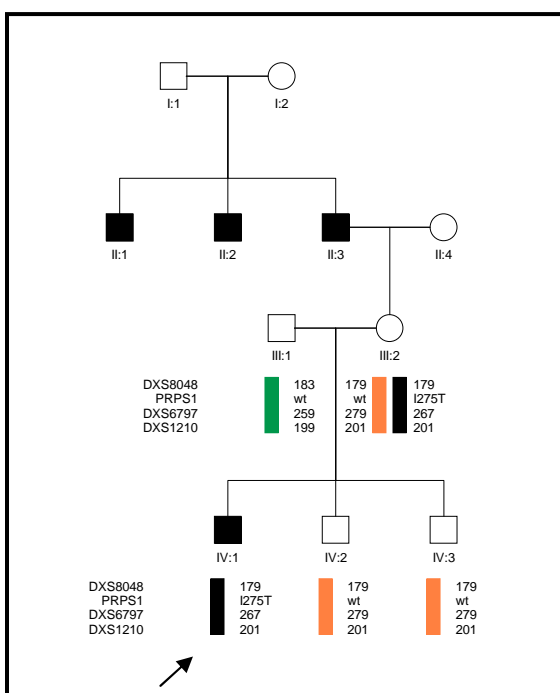


Figura 25. Árbol genealógico de la familia S1583. Los haplotipos se indican con barras verticales. En negro, el haplotipo asociado a la sordera en esta familia. La flecha señala al caso índice.

Los individuos de la familia S1583 fueron genotipados para los 3 marcadores microsatélites cercanos al gen *PRPS1*, en Xq22-q24 en el siguiente orden: cen-DXS8048-*PRPS1*-DXS6797-DXS1210-tel. Los resultados del análisis de haplotipos (Figura 25) eran consistentes con los obtenidos mediante secuenciación.

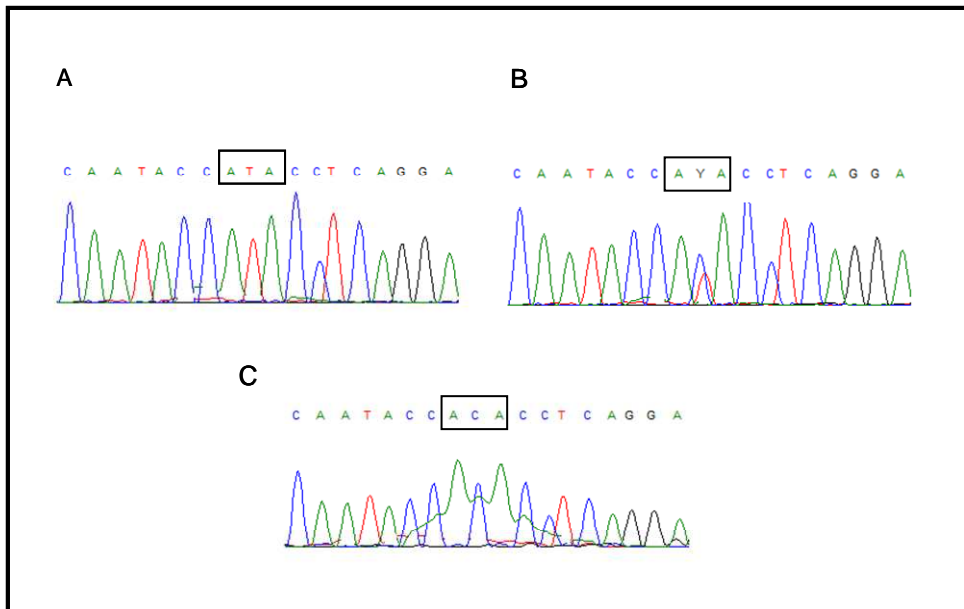


Figura 26. Electroferogramas correspondientes a la nueva mutación encontrada en el gen *PRPS1* en la familia S1583. Los recuadros indican el codón afectado. **A:** individuo IV:2, hemicigoto silvestre. **B:** individuo III:2, mujer portadora de la mutación c.824T>C (p.I275T). **C:** individuo IV:1, hemicigoto con la mutación c.824T>C (p.I275T).

En la familia S740 había tres individuos afectados (Figura 27). El caso índice (III:4) presentaba hipoacusia prelocutiva como único signo clínico. Sin embargo, su hermano (III:5), presentaba hipoacusia, retraso mental, epilepsia y retraso psicomotor. El otro familiar afecto (IV:1) presentaba hipoacusia prelocutiva profunda, ligera hiperactividad con déficit de atención, deambulación con pie en “equino” y acortamiento del tendón de Aquiles izquierdo. En esta familia se encontró la mutación c.917G>A (p.G306E), en el exón 7 del gen *PRPS1* (Figura 28). Se estudió la segregación de la mutación en la familia mediante secuenciación. La mutación estaba presente en los tres individuos afectados y en heterocigosis en sus madres y en la tía materna de IV:1. Por lo tanto, la mutación encontrada segregaba con la hipoacusia en la familia S740, lo que también fue apoyado por el correspondiente análisis de haplotipos (Figura 27).

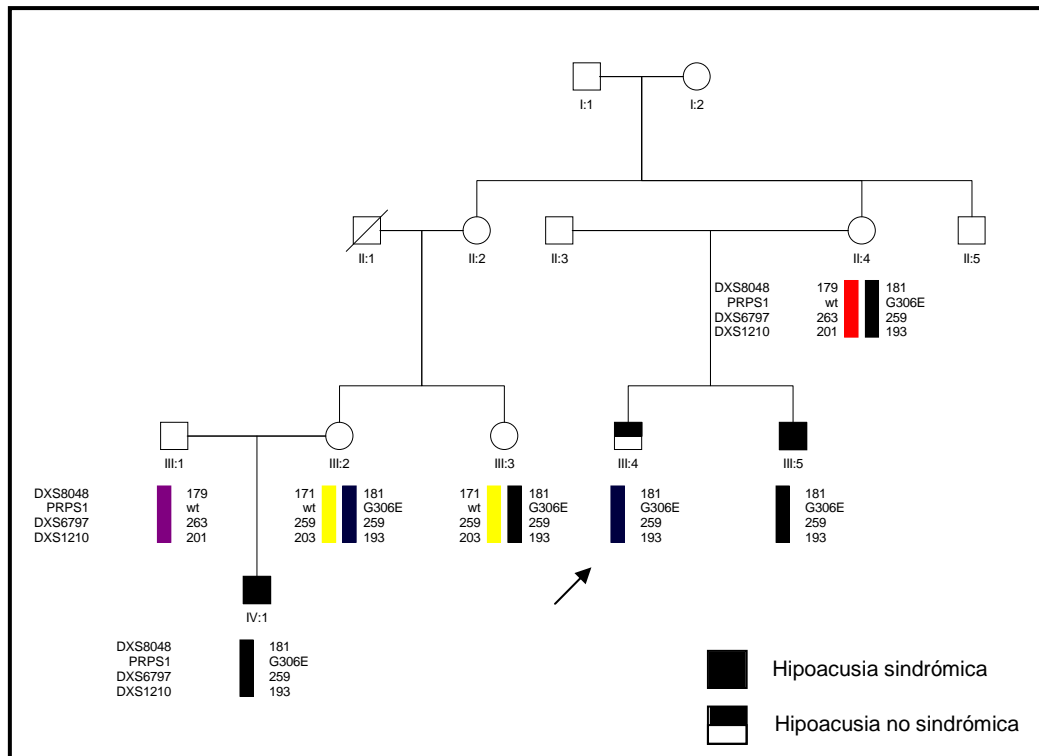


Figura 27. Árbol genealógico de la familia S740. Los haplotipos se indican con barras verticales. En negro, el haplotipo asociado a la sordera en esta familia. La flecha señala al caso índice.

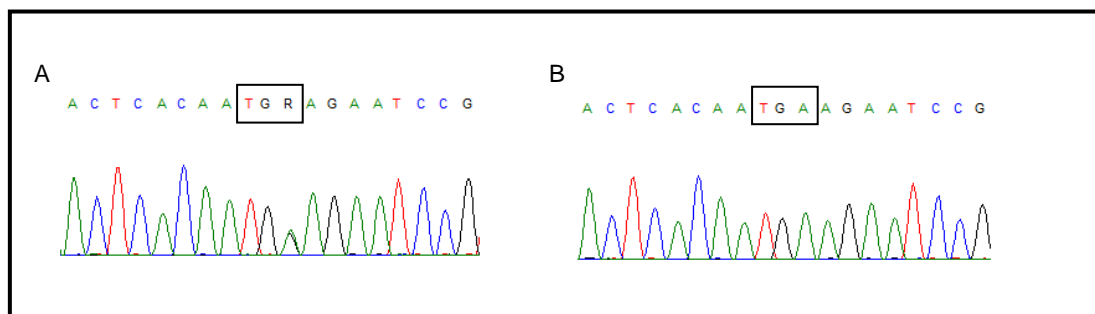


Figura 28. Electroferogramas correspondientes a la nueva mutación encontrada en la familia S740 en el gen *PRPS1*. Los recuadros indican el codón afectado. **A:** individuo III:2, mujer portadora de la mutación c.917G>A (p.G306E). **B:** individuo IV:1, hemicigoto con la mutación c.917G>A (p.G306E).

En la familia S740 se observaba una gran variabilidad fenotípica vinculada a una misma mutación en *PRPS1*. Por ello, se estudiaron otros genes relacionados cuyas variantes pudieran ejercer un efecto modificador.

PRPS1 forma parte de una familia de tres genes muy similares y altamente conservados: *PRPS1*, *PRPS2* y *PRPS1L1*. Se secuenciaron los exones de los genes *PRPS2* y *PRPS1L1* en los individuos IV:1, III:4 y III:5, y solamente se encontró la variante de secuencia c.-76-75delAG en el gen *PRPS1L1*. Esta variante estaba presente en homocigosis en el individuo IV:1, y ausente en los otros dos individuos, de forma que su presencia no se correlaciona con la variación fenotípica. Dado que el

transcrito de *PRPS1* tiene dos sitios de unión al microRNA *miR-376*, que es un regulador de la expresión del gen *PRPS1*, el gen *miR-376* fue también secuenciado, pero no se encontraron mutaciones.

La presencia de las mutaciones c.824T>C (p.I275T) y c.917G>A (p.G306E) en el gen *PRPS1* fue investigada en 50 individuos normoyentes (100 cromosomas). Para ello, diseñamos un ensayo específico de minisequenciación. La aplicación de este ensayo reveló que las mutaciones no estaban presentes en ninguno de estos individuos, lo que apoya su patogenicidad.

4. Hipoacusia de tipo DFNX4/DFN6: gen *SMPX*

En un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio, se había estudiado una familia española (familia S005) con un elevado número de afectados por una hipoacusia no sindrómica ligada al X, lo que permitió definir el *locus* de sordera DFNX4/DFN6 (del Castillo *et al.*, 1996).

El intervalo crítico del *locus* DFNX4, de 8 cM, contenía 56 genes. Nuestro grupo había secuenciado 10 de estos genes (*S100G/CALB3*, *SMS*, *PHEX*, *SCML1*, *AP1S2/SIGMA1B*, *CA5B*, *RBBP7*, *BEND2/Cxorf20*, *Cxorf23* y *PPEF1*), seleccionados por su expresión en el oído interno o por un hipotético papel fisiológico de la proteína codificada en dicho órgano, pero no se encontraron mutaciones patogénicas.

Recientemente, el grupo del Dr. Ingo Kurth (*Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Jena, Alemania*) estudió una familia alemana que presentaba hipoacusia no sindrómica ligada al cromosoma X. Las características audiológicas de los individuos afectados en esta familia eran muy parecidas a las de nuestra familia DFNX4 original. La hipoacusia era postlocutiva. En los varones, la edad de manifestación era a los 3-7 años y la hipoacusia era moderada, afectando principalmente a las frecuencias altas; progresaba con la edad, afectando a todas las frecuencias. Las mujeres portadoras manifestaban la hipoacusia en las décadas segunda o tercera.

El análisis de ligamiento a todo el genoma realizado sobre la familia alemana, confirmó ligamiento a un intervalo de 17,5 Mb en Xp22.12, que solapaba con el *locus* DFNX4. Mediante análisis de haplotipos, refinaron el intervalo a 8.5 Mb. Para identificar el gen mutado en esta familia, se investigaron todos los exones y regiones promotoras de los genes del intervalo crítico mediante secuenciación masiva (NGS). De las variantes de secuencia encontradas en el intervalo, solamente dos de ellas fueron consideradas candidatas por su impacto en la síntesis proteica o por la elevada conservación evolutiva del residuo afectado. Una de ellas era una mutación en el gen

FIGF (c.403C>G; p.P135A), y la otra una mutación en *SMPX* (c.109G>T; p.E37X). Las dos mutaciones segregaban con la hipoacusia en la familia alemana, por lo que cualquiera de ellas podía ser la responsable del trastorno.

Por consiguiente, el estudio de nuestra familia DFNX4 original era clave para resolver esta disyuntiva. Para ello, secuenciamos los exones y regiones intrónicas flanqueantes de los genes *FIGF* y *SMPX* en un individuo afecto de la familia S005. No encontramos ningún cambio en el gen *FIGF*. Sin embargo, sí encontramos una nueva mutación *nonsense* (c.175G>T; p.G59X) en el exón 4 del gen *SMPX* (Figura 29). Estudiamos la segregación de la mutación en la familia mediante secuenciación. La mutación segregaba perfectamente con la hipoacusia en esta familia.

Estos resultados demostraron que mutaciones en el gen *SMPX* son responsables de la hipoacusia de tipo DFNX4 (Huebner *et al.*, 2011).

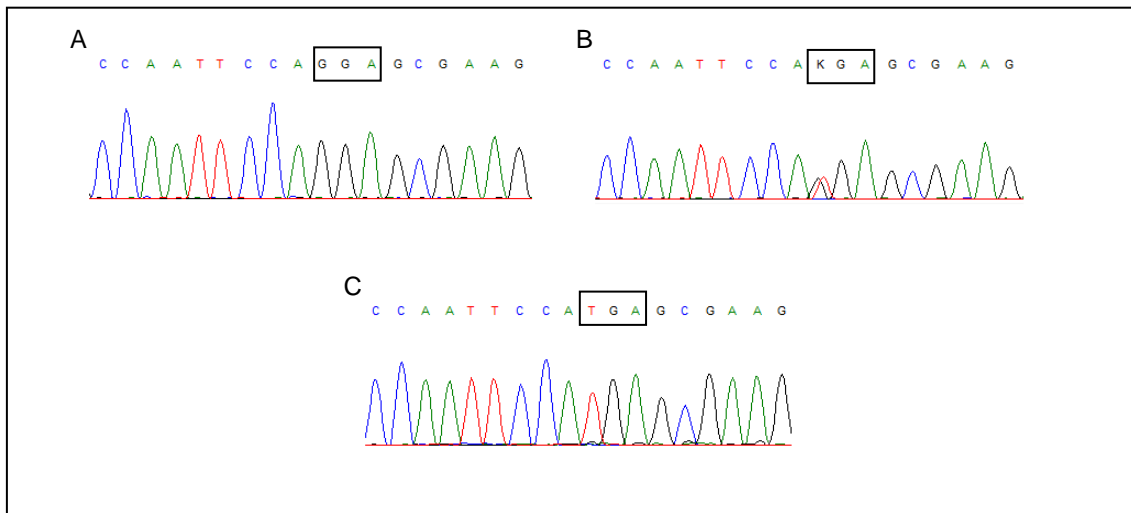


Figura 29. Electroferogramas correspondientes a la nueva mutación encontrada en la familia S005 en el gen *SMPX*. Los recuadros indican el codón afectado. **A:** individuo silvestre. **B:** mujer portadora de la mutación c.175G>T (p.G59X). **C:** individuo hemicigoto con la mutación c.175G>T (p.G59X).

El gen *SMPX* (*Small Muscular Protein X*, OMIM 300226) tiene 5 exones y codifica una proteína de 88 aminoácidos, que no tiene dominios funcionales conocidos. Fue identificada en músculo estriado y se localiza en los costámeros, que son un tipo de adhesiones focales específicas de músculo, los cuales conectan el citoesqueleto a la matriz extracelular, y son sensibles a fuerzas mecánicas.

Se estudiaron 20 familias de nuestra colección en las que la hipoacusia segregaba de modo compatible con un patrón de herencia ligado al X. Se realizó el estudio mediante secuenciación de los 5 exones del gen *SMPX* y de sus correspondientes regiones intrónicas flanqueantes, de 1 de los individuos afectados de cada familia. En la familia S549 se encontró la mutación c.109G>T (p.E37X) en el exón 3. Se estudió la segregación de la mutación en la familia mediante secuenciación del exón 3 (Figura

30). La mutación estaba presente en los 2 individuos afectados y en heterocigosis en la madre portadora. Por lo tanto, la mutación encontrada era responsable de hipoacusia en la familia.

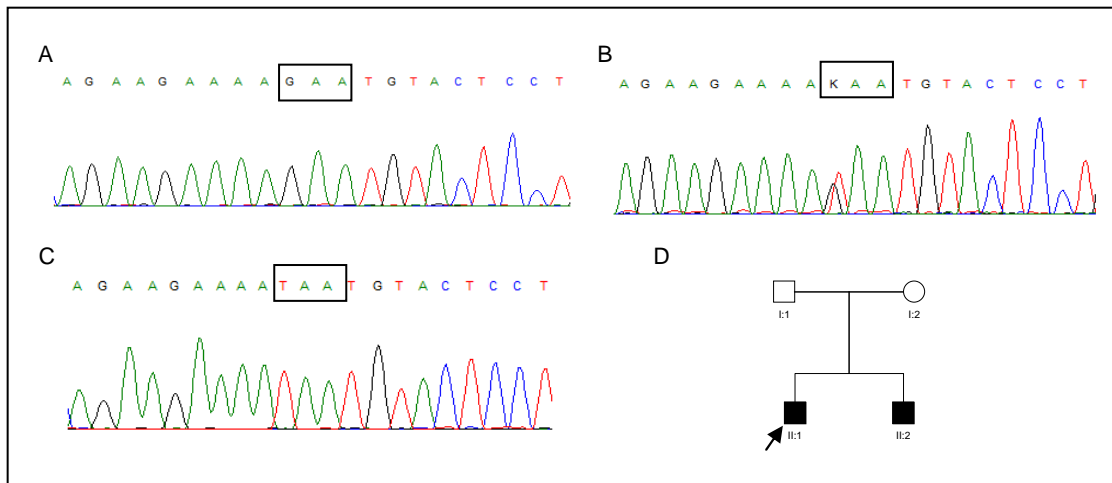


Figura 30. Electroferogramas correspondientes a la nueva mutación encontrada en la familia S549 en el gen *SMPX*. Los recuadros indican el codón afectado. **A:** individuo I:1, hemicigoto silvestre. **B:** individuo I:2, mujer portadora de la mutación c.109G>T (p.E37X). **C:** individuo II:1, hemicigoto con la mutación c.109G>T (p.E37X). **D:** árbol genealógico de la familia S549. La flecha señala al caso índice.

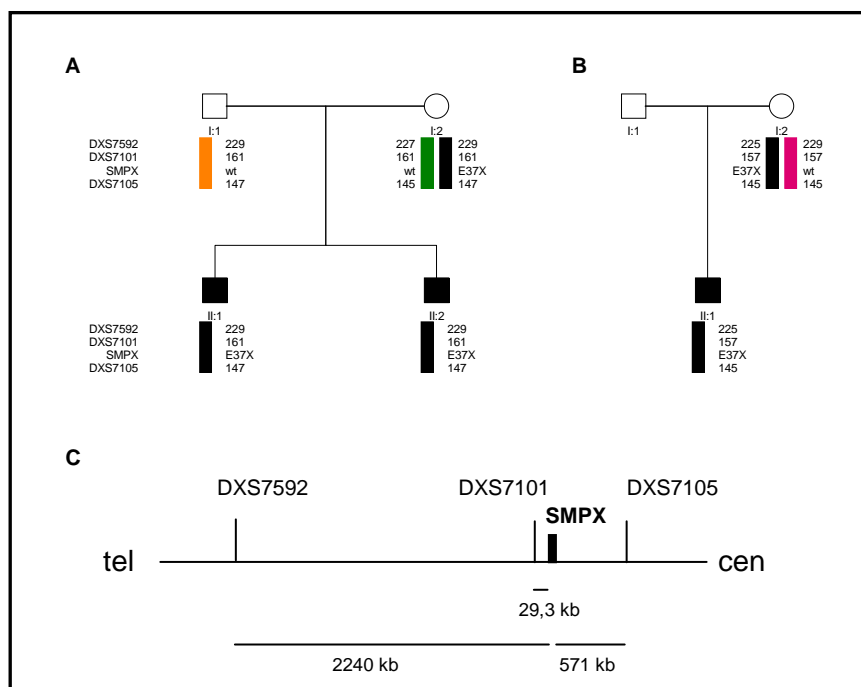


Figura 31. Haplotipos de los individuos de la familia S549 (**A**) y de la familia alemana (**B**), en los que se encontró la mutación p.E37X. Los haplotipos se indican con barras verticales. En negro, el haplotipo asociado a la sordera en estas familias. **C:** Distancia de los marcadores utilizados al gen *SMPX*.

La mutación encontrada en la familia S549 (c.109G>T; p.E37X), era la misma que había encontrado el grupo del Dr. Kurth en la familia alemana. Decidimos estudiar si estas dos familias, aunque separadas geográficamente, compartían haplotipos. Para ello, pedimos al Dr. Kurth una muestra de ADN de 1 individuo afectado y de 1 individuo portador de la mutación c.109G>T; p.E37X. Se hizo un análisis de haplotipos de las dos familias utilizando 3 marcadores microsatélites próximos al gen *SMPX*, en Xp22, en el siguiente orden: tel-DXS7592-DXS7101-*SMPX*-DXS7105-cen. Los haplotipos obtenidos eran completamente diferentes en las 2 familias (Figura 31), por lo que parece que las mutaciones han surgido independientemente.

Discusión

1. Hipoacusia de tipo DFNB1

1.1 Deleciones en el *locus* DFNB1.

La hipoacusia de tipo DFNB1, causada por mutaciones en el gen *GJB2*, es la más frecuente de las hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva, por lo que su diagnóstico molecular se ha incorporado a la cartera asistencial de los laboratorios de Genética en numerosos países. Desafortunadamente, la búsqueda de mutaciones puntuales en el gen *GJB2* en pacientes con hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva suele identificar un número relativamente alto de individuos con un solo alelo mutante, lo cual complica el diagnóstico. Este problema comenzó a resolverse cuando se demostró que muchos de estos pacientes llevan en *trans* distintas deleciones en el locus DFNB1, pero fuera del gen *GJB2* (del Castillo *et al.*, 2002; del Castillo *et al.*, 2005; Wilch *et al.*, 2010). Las cuatro deleciones conocidas comparten un intervalo de 95,4 kb dentro del cual se ha postulado la existencia de un elemento regulador de tipo *enhancer* que sería esencial para la expresión del gen *GJB2* en el oído interno (Common *et al.*, 2005; Rodriguez-Paris and Schrijver, 2009).

De las diferentes deleciones conocidas, del(*GJB6-D13S1830*), la primera en ser encontrada, es también la más frecuente y la más ampliamente distribuida. Da cuenta del 6-8% de los alelos patogénicos DFNB1 en las cohortes de pacientes estudiadas en España, Francia, Reino Unido, Israel y Brasil. Está también presente en cohortes de Bélgica, Italia, Estados Unidos y Australia (1-5% de los alelos patogénicos DFNB1) (del Castillo *et al.*, 2003). Por el contrario, no se han descrito casos en poblaciones asiáticas o africanas. La segunda deleción caracterizada, del(*GJB6-D13S1854*), es menos frecuente y su distribución geográfica es más restringida, habiendo sido descrita en España (2,2% de los alelos patogénicos DFNB1), Reino Unido y Brasil (del Castillo *et al.*, 2005), y ahora también en Polonia (este trabajo). El estudio de los haplotipos asociados a las deleciones del(*GJB6-D13S1830*) y del(*GJB6-D13S1854*) en pacientes de diferentes orígenes geográficos y étnicos sugiere que deben su recurrencia a efectos fundadores, y no a repetición de los eventos mutacionales que las originaron (recombinación ilegítima y recombinación entre secuencias Alu, respectivamente). Las otras dos deleciones descritas hasta la fecha, del(131kb) y del(DFNB1-200kb) son muy infrecuentes. Después de un extenso cribado en distintas poblaciones, del(131kb) solamente se ha encontrado en la familia estadounidense de origen alemán en que originalmente fue descrita (Wilch *et al.*, 2010), y del(DFNB1-200kb) sólo en dos familias españolas, si bien no relacionadas.

Nuestro laboratorio, que fue el primero en caracterizar molecularmente las tres deleciones más frecuentes, desarrolló un ensayo de PCR múltiple para su detección, que está siendo utilizado en el diagnóstico molecular de hipoacusias en numerosos

laboratorios de todo el mundo. Sin embargo, después del cribado para las deleciones conocidas, todavía quedan heterocigotos sin elucidar, aunque en proporciones variables en las distintas poblaciones. En la población española, después de incorporar el cribado para las deleciones, los pacientes heterocigotos para un solo alelo mutante representan en torno al 3% de los casos de hipoacusia no sindrómica recesiva investigados. Si tenemos en cuenta que la mutación mayoritaria en *GJB2* (c.35delG) se encuentra en el 2,5% de la población general, y que a este porcentaje habría que sumar la contribución de las demás mutaciones (para las cuales no se dispone de estimaciones precisas de su frecuencia en la población), las dos cifras estarían ya bastante cercanas. En otras palabras, los casos heterocigotos para un solo alelo patogénico serían en su mayoría simples portadores de ese alelo, pero su hipoacusia tendría otra causa genética diferente. En algunos casos hemos podido corroborar esta hipótesis: ocasionalmente, pacientes con hipoacusias debidas a mutaciones en los genes *OTOF* (otoferlina) o *SLC26A4* (pendrina) son portadores heterocigotos de la mutación c.35delG. En otras poblaciones menos estudiadas que la española, el panorama es diferente. Por ejemplo, en la población polaca, la mutación c.35delG tiene una frecuencia del 2% en la población general, pero los pacientes heterocigotos para c.35delG sin segunda mutación alcanzan el 5% (Pollak *et al.*, 2008). Al iniciar este trabajo, nos planteamos que sería de gran utilidad diagnóstica disponer de un ensayo MLPA específico para la detección de hipotéticas nuevas deleciones en el locus DFNB1. La caracterización de las mismas tendría además el valor añadido de ir acotando la posición del hipotético *enhancer* dentro del intervalo de solapamiento.

El ensayo MLPA que hemos desarrollado contiene 9 sondas dentro del intervalo crítico, separadas entre sí por intervalos de unas 10 kb. Esta separación es suficiente para poder detectar deleciones razonablemente pequeñas, dado que las hasta ahora encontradas tienen tamaños comprendidos entre 131 y 309 kb. El ensayo fue puesto a punto utilizando muestras de genotipo conocido y estos mismos individuos fueron utilizados como controles en cada uno de los ensayos MLPA llevados a cabo, lo que hace el estudio más robusto. La prueba de concepto con controles de genotipo conocido demostró, como cabía esperar, que el ensayo permite detectar las tres deleciones más frecuentes en el locus DFNB1: del(*GJB6*-D13S1830), del(*GJB6*-D13S1854) y del(DFNB1-200kb). No se detectaron falsos negativos ni falsos positivos, lo que implica una alta sensibilidad y una alta especificidad, que lo convierte en una herramienta diagnóstica válida. Estudiamos 236 casos heterocigotos DFNB1 no elucidados procedentes de España, Países Bajos, Polonia y Brasil. No se detectaron nuevas deleciones, pero sí se identificó en un individuo polaco la deleción del(*GJB6*-

D13S1854) en heterocigosis, no investigada previamente, lo que sustenta aún más la validez del método.

Nuestro ensayo MLPA será útil para investigar otras cohortes de pacientes, notablemente las de origen asiático, hasta ahora poco exploradas. Sin embargo, nuestros resultados indican que es poco probable que las mutaciones que faltan por encontrar en los heterocigotos no elucidados sean deleciones, o bien que las deleciones serían lo suficientemente pequeñas (menores de 10 kb) como para no ser detectadas por este ensayo MLPA. Además, hay que tener en cuenta que los elementos reguladores predichos por el análisis bioinformático están muy cerca (241 y 503 pb, respectivamente) de dos de nuestras sondas de MLPA, lo que sugiere que las deleciones serían realmente muy pequeñas (con un punto de rotura entre el elemento regulador y la sonda). También podría ocurrir que ninguno de estos dos elementos predichos sea el que estamos buscando. Hay que resaltar que la secuenciación de dichos elementos no reveló mutaciones en 64 individuos de la cohorte polaca. Nuestros resultados están en concordancia con el estudio realizado por Wilch *et al.*, 2010. Un total de 10 heterocigotos no elucidados (todos portadores de c.35delG) fueron investigados mediante hibridación genómica comparativa (*array CGH*) realizada sobre un segmento de 6,5 Mb de la región 13q11-12, que contiene el locus DFNB1. Se encontraron diversas variaciones del número de copias (CNVs), pero todas estaban también presentes en controles, con frecuencias mayores del 20%.

Con el paso del tiempo, el cribado de rutina del gen *GJB2* ha ido incorporando áreas cada vez mayores del gen: la región codificante, las señales de *splicing*, el promotor, las deleciones del hipotético elemento regulador... Hay que señalar, sin embargo, que no todas las cohortes publicadas han sido cribadas para todas estas partes del gen. Tampoco se han investigado hasta ahora las regiones no traducidas, especialmente la larga región 3'-UTR de *GJB2*. Por otra parte, las mutaciones que buscamos pudieran ser, como ya hemos dicho, deleciones muy pequeñas o mutaciones puntuales en el hipotético elemento regulador de tipo *enhancer*. Otros mecanismos más complejos (inversiones, efectos epigenéticos...) son también posibles.

La no detección de nuevas deleciones que permitan acortar el intervalo crítico que debe contener el *enhancer* dificulta la identificación del mismo. En paralelo a la búsqueda de nuevas mutaciones que puedan aportar luz sobre el problema de los heterocigotos no elucidados, la identificación del *enhancer* postulado requerirá el uso de modelos celulares.

1.2 Nueva mutación de *splicing* en el *locus* DFNB1

Se han descrito más de 100 mutaciones patogénicas en la región codificante del gen *GJB2*. Sin embargo, hasta la fecha se conocía una sola mutación que afectara a los sitios de *splicing*, lo cual se explica por la sencilla estructura del gen, con sólo dos exones. En este trabajo hemos identificado una segunda mutación, que parece ser responsable de un fenotipo de hipoacusia leve o moderada.

La primera mutación de *splicing* que se describió en *GJB2* fue una mutación en el sitio donador del intrón 1 (c.-23+1G>A, IVS1+1G>A). Se encontró en heterocigosis compuesta con otra mutación en la región codificante de *GJB2* (Sirmaci *et al.*, 2006). Debido a que el gen *GJB2* tiene solamente dos exones, y a que el segundo contiene la región codificante completa (Kiang *et al.*, 1997), esta mutación no tiene efecto sobre el marco de lectura. Sin embargo, la secuenciación del ADNc de una línea celular linfoblastoide generada a partir de un individuo heterocigoto no detectó el transcrito correspondiente al alelo c.-23+1G>A. Esto sugería que no se transcribía o que el transcrito era muy inestable (Shahin *et al.*, 2002). Esta mutación es muy frecuente en Mongolia (50% de los cambios patogénicos DFNB1) (Tekin *et al.*, 2010), y relativamente frecuente (2-9,4% de todos los alelos DFNB1 patogénicos) en las poblaciones checa, polaca, turca, kurda y china (Seeman *et al.*, 2006; Pollak *et al.*, 2007; Denoyelle *et al.*, 1999; Mahdieh *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2010).

En esta tesis hemos identificado una nueva mutación en el sitio aceptor de *splicing* del intrón 1 del gen *GJB2* (c.-22-2A>C, IVS1-2A>C). La mutación se encontró en tres hermanos de una misma familia, en heterocigosis compuesta con la mutación c.35delG. Los tres hermanos presentaban una hipoacusia no sindrómica postlocutiva y moderada. Investigamos los efectos de la mutación mediante RT-PCR a partir de ARN extraído de saliva de un individuo heterocigoto compuesto c.-22-2A>C/c.35delG. Los transcritos generados al utilizarse el sitio aceptor de *splicing* normal fueron detectados solamente a partir del alelo c.35delG, indicando que, como cabía esperar, la mutación c.-22-2A>C destruye este sitio aceptor. Sin embargo, sí que se detectaron transcritos correspondientes al alelo c.-22-2A>C. Se trataba de transcritos más largos, que incorporaban secuencias intrónicas de 38 o 34 nucleótidos, debido al uso de dos sitios aceptores alternativos (denominados 1 y 2, respectivamente). El transcrito con 38 nucleótidos adicionales es observable en individuos control, aunque en muy pequeña cantidad. Cuando el sitio aceptor normal es inactivado por la mutación, el uso del sitio alternativo 1 se incrementa (relación 1,68:1); además, se manifiesta el uso del sitio alternativo 2. Como la inserción de los 34 o 38 nucleótidos intrónicos no implica a la región codificante, la expresión residual que se alcanza parece suficiente para retrasar el inicio de la hipoacusia y disminuir la pérdida auditiva.

Los estudios de correlación genotipo-fenotipo en pacientes con hipoacusia de tipo DFNB1 han evidenciado que se trata de una hipoacusia mayoritariamente prelocutiva, con un grado de pérdida auditiva muy variable (de leve a profunda), estable o ligeramente progresiva, y sin malformaciones de oído interno asociadas (Cohn *et al.*, 1999; Denoyelle *et al.*, 1999; Snoeckx *et al.*, 2005). En un estudio multicéntrico realizado sobre datos genéticos y audiológicos de más de 1.500 individuos de 16 países, las mutaciones fueron clasificadas como truncantes o no truncantes para investigar si el tipo de mutación guardaba relación con sus efectos fenotípicos. Entre las truncantes se incluyeron las que generan codones de parada prematuros en *GJB2*, la delección del(*GJB6-D13S1830*) y la mutación de *splicing* c.-23+1G>A. Las no truncantes incluían a las mutaciones *missense* y a las pequeñas delecciones en fase. Se constató que la hipoacusia de tipo DFNB1 es mayoritariamente severa o profunda, aunque también incluye fenotipos leves y moderados, y que la variabilidad en el grado de pérdida auditiva se observaba incluso en pacientes con el mismo genotipo (por ejemplo, homocigotos c.35delG). Pero se descubrió una correlación que había pasado desapercibida hasta entonces: tomando los datos en conjunto, el grado de hipoacusia asociado a la presencia de dos mutaciones truncantes era significativamente más grave que el asociado a dos mutaciones no truncantes, y el grado de hipoacusia asociado a genotipos truncante/no truncante era intermedio entre los dos grupos anteriores (Snoeckx *et al.*, 2005). Aunque un mismo genotipo pudiera dar lugar a pérdidas auditivas de distinta gravedad, se observó que unas pocas mutaciones de sustitución de aminoácido (p.L90P, p.M34T, p.V37I) siempre estaban asociadas con hipoacusias leves o moderadas de manifestación postlocutiva tardía. A este pequeño grupo de alelos hipomórficos parece añadirse ahora la mutación c.-22-2A>C descubierta en el curso de este trabajo. Los tres hermanos portadores del genotipo c.-22-2A>C/c.35delG presentan una hipoacusia postlocutiva moderada. Indudablemente, la correlación es aún débil: el número de individuos que llevan esta mutación es demasiado pequeño, y todos son miembros de la misma familia. Pero es también cierto que no se observa variabilidad fenotípica entre los tres afectados y que los efectos de la mutación a nivel molecular apoyan que se trate de un alelo hipomórfico.

El hallazgo de nuevos casos con esta mutación pondrá a prueba la correlación propuesta. La mutación ha sido encontrada solamente en una familia, por lo que podría ser poco frecuente. Otra posibilidad es que, si la correlación genotipo-fenotipo que proponemos se confirma, la mutación podría estar poco representada en las series de pacientes estudiadas hasta ahora, la mayoría de las cuales presentan un claro sesgo hacia la colección de individuos con pérdidas auditivas graves.

2. Hipoacusias no sindrómicas de tipos DFNB24, DFNB28, DFNB29 y DFNB49

La elevada heterogeneidad genética de las hipoacusias dificulta el diagnóstico genético-molecular de estos trastornos. Este problema se intenta aminorar priorizando la búsqueda de mutaciones en unos pocos genes, lo cual se realiza mediante las pistas proporcionadas por las correlaciones genotipo-fenotipo o simplemente concentrando los esfuerzos sobre los genes en los que se encuentran mutaciones con mayor frecuencia. La optimización del diagnóstico de hipoacusias hereditarias se podrá conseguir mediante la aplicación de las técnicas de secuenciación masiva pero, debido a su todavía elevado coste, no se utiliza como herramienta de rutina.

En la mayoría de laboratorios, el diagnóstico que se ofrece solamente incluye el *locus* DFNB1 (gen *GJB2* y deleciones que implican o no al gen *GJB6*) en hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas. Esto es debido a que mutaciones en estos genes dan cuenta de hasta un 50% de los casos de estas hipoacusias (Kenneson *et al.*, 2002; del Castillo and del Castillo, 2011). Pocos estudios se han publicado que investiguen la contribución de cada uno de los más de 40 genes que se sabe que están implicados en estos trastornos al conjunto de los mismos (Duman *et al.*, 2011). Entre los genes con una contribución mayor (cada uno aporta en torno al 3-10% de los casos) se encontrarían *MYO15A* (miosina 15A, hipoacusia DFNB3), *SLC26A4* (pendrina, hipoacusia DFNB4), *TMC1* (hipoacusia DFNB7/B11), *OTOF* (otoferlina, hipoacusia DFNB9), *CDH23* (cadherina-23, hipoacusia DFNB12) y *MYO7A* (miosina VIIa, hipoacusia DFNB2). No obstante, se observa una gran variabilidad en las contribuciones de cada gen entre las diferentes poblaciones. Es frecuente encontrar efectos fundadores para algunas mutaciones, que elevan enormemente la contribución del gen implicado en una población dada.

Para progresar en el conocimiento de estas materias en la población española, decidimos abordar en este trabajo el estudio de cuatro de los genes implicados en hipoacusias no sindrómicas autosómicas recesivas: *RDX*, *TRIOBP*, *CLDN14* y *MARVELD2*, responsables de las hipoacusias de los tipos DFNB24, DFNB28, DFNB29 y DFNB49, respectivamente.

En el estudio del gen *RDX*, investigamos 69 casos familiares no relacionados y no encontramos ninguna mutación patogénica. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en el cribado de 49 familias turcas, en el que tampoco se encontró ningún caso con mutaciones en *RDX* (Duman *et al.*, 2011). Las 4 mutaciones descritas hasta el momento en *RDX* fueron encontradas en 3 familias consanguíneas de Pakistán y en una familia consanguínea iraní (Khan *et al.*, 2007; Shearer *et al.*, 2009) (Tabla 24). La familia iraní y una de las familias paquistaníes no proporcionan datos con valor epidemiológico, puesto que fueron directamente seleccionadas para análisis de

ligamiento por su elevado número de afectados. Las otras dos familias paquistaníes, en cambio, procedían de un cribado de aproximadamente 600 familias (2/600; es decir, 0,33%) mediante análisis de ligamiento para marcadores próximos al gen (Khan *et al.*, 2007). Estos datos indican que la hipoacusia de tipo DFNB24 es una forma rara de hipoacusia no sindrómica autosómica recesiva en las poblaciones hasta ahora estudiadas (Pakistán, Turquía, España), con una contribución al total de casos menor del 1%.

Tabla 24. Mutaciones causantes de hipoacusia descritas en el gen *RDX*.

Localización	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Dominio	Referencia (origen)
Exón 5	c.463C>T	p.Q155X		Khan <i>et al.</i> , 2007 (Pakistán)
Intrón 7	c.698+1G>A (IVS7+1G>A)			Shearer <i>et al.</i> , 2009 (Irán)
Exón 13	c.1404_1405insG	p.A469GfsX19		Khan <i>et al.</i> , 2007 (Pakistán)
Exón 14	c.1732G>A	p.D578N	CTD	Khan <i>et al.</i> , 2007 (Pakistán)

CTD: dominio C-terminal de unión a actina.

En el estudio del gen *TRIOBP* se incluyeron 52 casos familiares no relacionados y se encontró una nueva mutación patogénica (c.2968C>T, p.R990X) en una familia originaria de Marruecos. Todas las mutaciones descritas hasta el momento se localizan en el exón 6, que es muy grande (3319 pb), y todas menos una tienen como resultado codones de terminación prematuros (Tabla 25). En ningún caso resulta afectada la isoforma *TRIOBP*-1, lo que indica que la presencia de ésta no es suficiente para evitar el daño auditivo.

Las mutaciones descritas por Riazuddin *et al.* (2006b) fueron encontradas en 7 familias consanguíneas originarias de Pakistán y la India, de un total de 600 familias estudiadas (1,17%). Shahin *et al.* (2006) no proporcionan en su artículo datos sobre el total de familias cribadas. En cambio, observaron un curioso efecto en sus familias palestinas: encontraron la mutación p.R347X en 4 familias cristiano-ortodoxas, y la mutación p.Q581X en 3 familias musulmanas, lo que es reflejo de la endogamia que caracteriza a estas dos comunidades. Por su parte, Kitajiri *et al.* no proporcionan datos sobre el número de familias cribadas ni su origen étnico o geográfico. En nuestro laboratorio, hemos encontrado mutaciones patogénicas en *TRIOBP* en dos familias no relacionadas. Una, que nos fue remitida por nuestros colaboradores del Instituto Pasteur de París, era de origen iraní, y había sido seleccionada por su elevado número de individuos afectados, que la hacían apta para análisis de ligamiento. La otra familia, de origen marroquí, forma parte de la cohorte de 52 casos familiares

pertenecientes a nuestra colección de laboratorio (1/52, es decir aproximadamente 2%). Los datos disponibles hasta el momento apuntan a que la contribución de *TRIOBP* al conjunto de las hipoacusias no sindrómicas recesivas sería del 1-2%, aunque hay que destacar que aún no se ha encontrado ningún caso en familias caucásicas europeas. Tampoco se han encontrado mutaciones patogénicas en *TRIOBP* en el cribado de 49 familias turcas (Duman *et al.*, 2011).

Tabla 25. Mutaciones patogénicas descritas en el gen *TRIOBP*.

Localización	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Referencia (origen)
Exón 6	c.889C>T	p.Q297X	Riazuddin <i>et al.</i> , 2006 (India)
Exón 6	c.1039C>T	p.R347X	Shahin <i>et al.</i> , 2006 (Palestina)
Exón 6	c.1420C>T	p.R474X	Kitajiri <i>et al.</i> , 2010
Exón 6	c.1567C>T	p.R523X	Kitajiri <i>et al.</i> , 2010
Exón 6	c.1741C>T	p.Q581X	Shahin <i>et al.</i> , 2006 (Palestina)
Exón 6	c.2218C>T	p.Q740X	Kitajiri <i>et al.</i> , 2010
Exón 6	c.2362C>T	p.R788X	Riazuddin <i>et al.</i> , 2006 (Pakistán)
Exón 6	c.2932_2956del	p.S978RfsX19	Nuestro laboratorio, manuscrito en preparación (Irán)
Exón 6	c.2968C>T	p.R990X	Este trabajo (Marruecos)
Exón 6	c.3055G>A	p.G1019R	Shahin <i>et al.</i> , 2006 (Palestina)
Exón 6	c.3202C>T	p.R1068X	Riazuddin <i>et al.</i> , 2006 (Pakistán)
Exón 6	c.3202_3203del	p.D1069CfsX14	Riazuddin <i>et al.</i> , 2006 (India)
Exón 6	c.3232dup	p.R1078PfsX6	Riazuddin <i>et al.</i> , 2006 (India)
Exón 6	c.3349C>T	p.R1117X	Riazuddin <i>et al.</i> , 2006 (India)
Exón 6	c.3466G>T	p.E1156X	Kitajiri <i>et al.</i> , 2010

En el estudio del gen *CLDN14*, investigamos 69 casos familiares no relacionados y no encontramos variaciones de secuencia patogénicas. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en el cribado de 49 familias turcas, en el que tampoco se encontró ningún caso con mutaciones en *CLDN14* (Duman *et al.*, 2011). Hasta la fecha, se conocen 6 mutaciones del gen *CLDN14* causantes de hipoacusia, cinco de las cuales se han descrito en familias pakistaníes (Tabla 26). En un primer cribado, se encontraron 2 casos positivos entre 100 investigados (2,0%) (Wilcox *et al.*, 2001). En otro estudio de 87 casos pakistaníes, se encontraron dos nuevos positivos (2,3%) (Bashir *et al.*, 2010). Finalmente, un estudio reciente identificó cuatro nuevos casos, pero sin indicar el número total de familias cribadas (Lee *et al.*, 2012). Notablemente, en los tres cribados pakistaníes se encontró la mutación p.V85D, lo que sugiere un efecto fundador para esta mutación en Pakistán. La otra mutación conocida hasta la fecha fue encontrada en una familia griega, en un estudio de 183 pacientes no relacionados (98 procedentes de España y 85 de Grecia) (Wattenhofer *et al.*, 2005)

(Tabla 26). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que las mutaciones en *CLDN14* son una causa poco frecuente de hipoacusia en poblaciones europeas, con una contribución en torno al 1% en Grecia y no habiendo sido encontradas en España en un total de 167 pacientes. Su mayor contribución (alrededor del 2%) en Pakistán puede deberse a un efecto fundador para la mutación p.V85D.

Tabla 26. Mutaciones patogénicas descritas en el gen *CLDN14*.

Localización	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Referencia (origen)
Exón 3	c.167G>A	p.W56X	Lee <i>et al.</i> , 2012 (Pakistán)
Exón 3	c.242G>A	p. R81H	Lee <i>et al.</i> , 2012 (Pakistán)
Exón 3	c.254T>A	p.V85D	Wilcox <i>et al.</i> , 2001 (Pakistán) Bashir <i>et al.</i> , 2010 (Pakistán) Lee <i>et al.</i> , 2012 (Pakistán)
Exón 3	c.301G>A	p.G101R	Wattenhofer <i>et al.</i> , 2005 (Grecia)
Exón 3	c.398delT	p.M133RfsX24	Wilcox <i>et al.</i> , 2001 (Pakistán)
Exón 3	c.694G>A	p.G232R	Lee <i>et al.</i> , 2012 (Pakistán)

Finalmente, en el estudio del gen *MARVELD2*, investigamos 80 casos familiares no relacionados y no encontramos variaciones de secuencia patogénicas. En el cribado de 49 familias turcas, tampoco se encontró ningún caso con mutaciones en *MARVELD2* (Duman *et al.*, 2011). Las mutaciones descritas hasta ahora se encontraron en familias consanguíneas originarias de Pakistán y de la República Checa (Riazuddin *et al.*, 2006; Chishti *et al.*, 2008; Safka Brozkova *et al.*, 2011) (Tabla 27). Entre ellas destaca la mutación c.1331+2T>C, encontrada en varias familias pakistaníes y en familias checas de etnia gitana. Es conocido que el pueblo gitano es originario del subcontinente indio, de donde partió, en sucesivas oleadas migratorias, hacia Europa. En consonancia con este origen, la población gitana europea comparte mutaciones causantes de enfermedad con las poblaciones india y pakistaní. En hipoacusias hereditarias, sabemos que la mutación p.W24X en el gen *GJB2* es frecuente en India y Pakistán y está documentada en las poblaciones gitanas de la República Checa, Eslovaquia y España (Alvarez *et al.*, 2005). Decidimos pues investigar la presencia de esta mutación en 37 pacientes de etnia gitana no relacionados, de nuestra colección de laboratorio, pero no se encontró en ninguno de los casos. El resultado no es sorprendente, puesto que la estructura social del pueblo gitano es un conglomerado de poblaciones fundadoras aisladas genéticamente. De

hecho, la frecuencia de la mutación p.W24X en series de controles de distintas regiones de España y de Eslovaquia es altamente variable (0,0% a 26,1%, según la serie). Es razonable pensar que la mutación c.1331+2T>C en *MARVELD2*, originada en el subcontinente indio y llevada hasta la República Checa, no estaba representada en las oleadas migratorias que alcanzaron a nuestro país.

Tabla 27. Mutaciones patogénicas descritas en el gen *MARVELD2*.

Localización	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Referencia (origen)
Intrón 3	c.1183-1G>A (IVS3-1G>A)		Riazzudin <i>et al.</i> , 2006 (Pakistán)
Intrón 4	c.1331+1G>A (IVS4+1G>A)		Chishti <i>et al.</i> , 2008 (Pakistán)
Intrón 4	c.1331+2T>C (IVS4+2T>C)		Riazzudin <i>et al.</i> , 2006 (Pakistán) Chishti <i>et al.</i> , 2008 (Pakistán) Safka Brozkova <i>et al.</i> , 2011 (Rep. Checa)
Intrón 4	c.1331+2delTGAG (IVS4+2delTGAG)		Riazzudin <i>et al.</i> , 2006 (Pakistán)
Exón 5	c.1498C>T	p.R500X	Riazzudin <i>et al.</i> , 2006 (Pakistán)

En resumen, nuestro trabajo indica que las hipoacusias de tipos DFNB24, DFNB28, DFNB29 y DFNB49, causadas por mutaciones en los genes *RDX*, *TRIOBP*, *CLDN14* y *MARVELD2*, respectivamente, no contribuyen de forma significativa al conjunto de hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva en la población española. Por lo tanto, no sería prioritario incluir estos genes en el diagnóstico molecular de rutina. Los datos bibliográficos sugieren una contribución ligeramente superior (cada gen daría cuenta del 1-2% de los casos) en familias del subcontinente indio. Hay que resaltar que nuestro estudio de epidemiología genética de hipoacusias hereditarias es pionero entre las poblaciones europeas, para las que existe un evidente vacío de información.

3. Hipoacusia ligada al cromosoma X de tipo DFNX1

Entre las hipoacusias no sindrómicas, las de herencia ligada al cromosoma X son poco frecuentes (1-5%) (Petersen *et al.*, 2008). Solamente se conocen cuatro *loci*: DFNX1 (DFN2), DFNX2 (DFN3), DFNX3 (DFN4) (Pfister and Lalwani, 2002) y DFNX4 (DFN6) (<http://hereditaryhearingloss.org>). Los diferentes subtipos manifiestan diferentes características clínicas, como la edad de manifestación y la progresividad de la hipoacusia, el grado de afectación, y la presencia o ausencia de malformaciones en el oído interno. El subtipo DFNX2, causado por mutaciones en el gen *POU3F4*, que codifica el factor de transcripción del mismo nombre, parece ser el más frecuente, dando cuenta del 50% de los casos. Los restantes subtipos parecen ser más raros, pero aún se dispone de pocos datos al respecto.

En este trabajo, hemos investigado la presencia de casos de tipo DFNX1 (DFN2) en nuestra colección de laboratorio. El gen implicado, *PRPS1*, codifica la proteína PRS-I, que cataliza la síntesis de PRPP a partir de ATP y ribosa-5-fosfato, siendo esencial en la ruta de síntesis de nucleótidos. En los últimos años se ha demostrado que las mutaciones en el gen *PRPS1* son responsables de una variedad de trastornos: hipoacusia neurosensorial no sindrómica de tipo DFNX1, superactividad de fosforribosil pirofosfato sintetasa, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ligada al cromosoma X de tipo 5 y síndrome de Arts. Estos trastornos tienen en común la hipoacusia, combinada o no con otros signos clínicos (metabólicos, neurológicos, ópticos). Sobre la base de los casos hasta ahora conocidos, se han propuesto algunas correlaciones genotipo-fenotipo, que revisamos a continuación.

La superactividad de fosforribosil pirofosfato sintetasa se caracteriza por una sobreproducción de purinas que origina un exceso de ácido úrico, lo cual se manifiesta en forma de hiperuricemia e hiperuricosuria. En los casos debidos a mutaciones puntuales del gen *PRPS1* se producen además hipoacusia y neuropatía. Hasta la fecha, han sido descritas 8 mutaciones de sustitución de aminoácido responsables de esta patología (Tabla 28). En todos los casos las mutaciones producen una ganancia de función, ya que la enzima mutante pierde su capacidad de ser inhibida por producto final.

Por su parte, el síndrome de Arts se caracteriza por retraso mental, hipotonía, ataxia, retraso en el desarrollo motor, hipoacusia y atrofia óptica. En los varones afectados, suele manifestarse además una propensión a enfermedades del tracto respiratorio superior, que pueden conducir a la muerte en la infancia. La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ligada al cromosoma X de tipo 5 (CMTX5, también conocida como síndrome de Rosenberg-Chutorian) sería una versión algo más atenuada del síndrome de Arts, ya que no se manifiestan ni el retraso mental ni la propensión a infecciones. Hasta la fecha se conocen dos mutaciones de sustitución de aminoácido responsables del síndrome de Arts y otras dos mutaciones también de sustitución de aminoácido responsables de CMTX5. Afectan al residuo E43 (CMTX5) o a residuos del intervalo 115-152 (CMTX5 y Arts). Estas cuatro mutaciones parecen producir pérdida de función.

Además, han sido descritas 4 mutaciones *missense* responsables de hipoacusia sin otros signos clínicos asociados (Tabla 28). Estas mutaciones aparecen agrupadas en los dos extremos del gen (residuos D65 y A87, y residuos I290 y G306 en la proteína). Parece tratarse también de casos de pérdida de función. En el caso de la mutación p.D65N, la actividad PRS-I en eritrocitos y fibroblastos estaba reducida a la mitad, lo que indicaría una pérdida parcial de función.

Teniendo en cuenta los datos disponibles, se puede hipotetizar que la diferente gravedad de los signos clínicos entre el síndrome de Arts, CMTX5 y la hipoacusia no sindrómica estaría relacionada con el porcentaje de actividad residual de cada proteína mutante.

Nuestro estudio aporta dos nuevas mutaciones. En una familia, que presentaba hipoacusia postlocutiva moderada como único signo clínico, encontramos la mutación c.824T>C (p.I275T), que está cercana a las otras dos mutaciones situadas en el extremo 3' del gen descritas en casos DFNX1, lo que apoya las correlaciones observadas hasta la fecha. En otra familia, encontramos la mutación c.917G>A (p.G306E), que afecta al mismo residuo que la mutación p.G306R descrita en un caso DFNX1, pero que produce una sustitución de aminoácido diferente. En este caso, se observaba una marcada variabilidad fenotípica intrafamiliar vinculada a la misma mutación. Uno de los individuos afectados presentaba hipoacusia prelocutiva como único signo clínico, mientras que su hermano presentaba hipoacusia prelocutiva, retraso mental leve, retraso psicomotor y epilepsia (signos que parecen apoyar un diagnóstico de síndrome de Arts); otro familiar afecto presentaba hipoacusia prelocutiva profunda, ligera hiperactividad con déficit de atención, deambulación con pie en "equino" y acortamiento del tendón de Aquiles izquierdo. Por lo que respecta a *PRPS1*, esta es la primera familia en que la variabilidad fenotípica intrafamiliar combina la presencia de un caso de hipoacusia no sindrómica DFNX1 con otros dos casos sindrómicos con variable expresividad. Nuestros datos ilustran lo arbitrario de la separación entre casos sindrómicos y no sindrómicos, muchas veces fruto de una casuística todavía escasa. El hallazgo de nuevos casos va mostrando un gradiente de signos clínicos, desde la patología más leve hasta la de mayor gravedad, que obliga también a revisar las correlaciones genotipo-fenotipo. Para intentar explicar la variabilidad en esta familia, investigamos otros genes relacionados cuyas variantes pudieran ejercer un efecto modificador del fenotipo. *PRPS1* forma parte de una familia de tres genes muy similares y altamente conservados: *PRPS1*, *PRPS2* y *PRPS1L1*. Estudiamos estos genes en los tres individuos afectados, pero no encontramos cambios correlacionables con las diferencias fenotípicas. Dado que el transcrito de *PRPS1* tiene dos sitios de unión al microRNA *miR-376*, que es un regulador de la expresión del gen *PRPS1*, el gen *miR-376* fue también secuenciado, pero tampoco se encontraron mutaciones.

El progreso en las correlaciones genotipo-fenotipo en los casos con mutaciones en el gen *PRPS1* requerirá ampliar la casuística, avanzar en la caracterización estructural y funcional de las correspondientes proteínas mutantes, e identificar otros posibles candidatos a modificadores del fenotipo.

Tabla 28. Mutaciones patogénicas descritas en el gen *PRPS1*.

Enfermedad	Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Referencia
Superactividad PRS-I	c.154G>C	p.D52H	Becker <i>et al.</i> , 1995
	c.341A>G	p.N114S	Roessler <i>et al.</i> , 1991
	c.385C>A	p.L129I	Becker <i>et al.</i> , 1995
	c.424G>C	p.V142L	Moran <i>et al.</i> , 2012
	c.547G>C	p.D182H	Roessler <i>et al.</i> , 1991
	c.569C>T	p.A189V	Becker <i>et al.</i> , 1995
	c.578A>T	p.H192L	Garcia-Pavia <i>et al.</i> , 2003
	c.579C>G	p.H192Q	Becker <i>et al.</i> , 1995
Síndrome de Arts	c.398A>C	p.Q133P	de Brouwer <i>et al.</i> , 2007
	c.455T>C	p.L152P	de Brouwer <i>et al.</i> , 2007
CMTX5	c.129A>C	p.E43D	Kim <i>et al.</i> , 2007
	c.344T>C	p.M115T	Kim <i>et al.</i> , 2007
DFNX1	c.193G>A	p.D65N	Liu <i>et al.</i> , 2010
	c.259G>A	p.A87T	Liu <i>et al.</i> , 2010
	c.869T>C	p.I290T	Liu <i>et al.</i> , 2010
	c.916G>A	p.G306R	Liu <i>et al.</i> , 2010

4. Hipoacusia ligada al cromosoma X de tipo DFNX4

En este trabajo hemos identificado un nuevo gen de hipoacusia no sindrómica de herencia ligada al X, el gen *SMPX*, responsable del tipo de hipoacusia DFNX4. La forma en que el gen fue identificado ejemplifica la evolución de la metodología para la búsqueda de genes de enfermedad. Mediante análisis de ligamiento genético, habíamos establecido un intervalo crítico de 8 cM en el que residían 56 genes. Debido a la elevada heterogeneidad genética de las hipoacusias no sindrómicas, resulta muy complicado refinar los intervalos críticos, dada la dificultad en encontrar familias adicionales con individuos recombinantes clave. La aproximación clásica de la secuenciación de tipo Sanger, realizada sucesivamente sobre diferentes genes candidatos, priorizados según diversos criterios (en nuestro caso: expresión en el oído, hipotética función del producto codificado en dicho órgano...), es lenta y trabajosa. Los diez genes que parecían a priori mejores candidatos fueron excluidos. Los genes restantes habrían tenido que ser secuenciados sucesivamente sin prioridades claras. La investigación se benefició de la introducción de las modernas técnicas de secuenciación masiva. Estas técnicas permiten el análisis simultáneo de todos los genes del intervalo, sin necesidad de priorizar y en un tiempo breve. El hallazgo del gen *SMPX*, cuya expresión se presumía específica de músculo y al que por tanto habíamos asignado una prioridad baja, ilustra la dificultad de establecer prioridades basadas en los registros de las bases de datos. En los próximos años, la aplicación de las técnicas de secuenciación masiva, en su versión circunscrita a un intervalo crítico o

en su versión dirigida a todo el exoma acelerarán decisivamente la identificación de los genes responsables de las enfermedades hereditarias.

El gen *SMPX* codifica una proteína de pequeño tamaño, sin dominios funcionales conocidos, identificada originalmente en tejido muscular. Se localiza en los costámeros, que son un tipo de adhesiones focales específicas de músculo estriado. Estas estructuras, compuestas por numerosas proteínas diferentes, acoplan físicamente los sarcómeros al sarcolema. Se piensa que una de sus funciones sería actuar como una especie de amortiguador que protegería al sarcolema del estrés mecánico generado por la contracción muscular (Ervasti, 2003). Se ha observado que la proteína *SMPX* humana colocaliza parcialmente con la vinculina, que es un marcador de adhesión focal (Huebner *et al.*, 2011).

Las mutaciones en *SMPX* encontradas en las familias alemana y española producen codones de parada prematuros (Figura 32 A). Estos codones de parada se encuentran en posiciones del transcrito que deberían ser sensibles al mecanismo de degradación de mRNAs que detecta este tipo de mutaciones (*NMD*, *nonsense-mediated decay*). Por consiguiente, es previsible que los alelos con estas mutaciones se comporten como alelos nulos. No obstante, se investigó la localización intracelular de las hipotéticas proteínas truncadas, mediante sobreexpresión en células HeLa. En el caso de la proteína truncada más larga (*SMPX-G59X*), se observó una señal intracelular comparable a la de la proteína silvestre, pero aquélla estaba ausente de la membrana plasmática. En cambio, la proteína truncada *SMPX-E37X* no produjo ninguna señal detectable, indicando baja abundancia o rápida degradación de la misma (Huebner *et al.*, 2011). Por consiguiente, si los transcritos mutantes escapasen a la degradación *NMD*, los polipéptidos truncados que codifican tampoco serían funcionales.

En el músculo, *SMPX* no sería indispensable, ya que ninguno de los pacientes de las familias estudiadas muestra signos de disfunción muscular. Además, estudios previos con ratones con un alelo *knock-out* (KO) condicional de *Smpx* muestran que estos ratones no presentan ninguna patología muscular, sugiriendo una redundancia genética o funcional (Palmer *et al.*, 2001). La función auditiva de los mismos no fue explorada, pero téngase en cuenta que se trataba de KOs condicionales restringidos al músculo.

Ensayos de inmunohistoquímica han revelado la presencia de *SMPX* en diferentes tipos celulares del oído interno: células de Böttcher, células del surco externo, células pilares y células interdentes del limbo espiral. También se detectó marcaje, pero con menor intensidad, en células de Deiters y en células ciliadas (Figura 32 B) (Huebner *et al.*, 2011; Schraders *et al.*, 2011).

Hay que señalar que SMPX presenta interesantes conexiones con otras proteínas implicadas en el desarrollo y la función coclear. Smpx es estimulado por el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1) (Palmer *et al.*, 2001). Las mutaciones en *IGF-1* en humanos se asocian a hipoacusia neurosensorial sindrómica, severa o profunda y congénita o de manifestación temprana (Woods *et al.*, 1996; Bonapace *et al.*, 2003; Sanchez-Calderon *et al.*, 2010). Además, el ratón deficiente en *Igf-1* presenta múltiples disfunciones en la cóclea, incluyendo una diferenciación anormal, una supervivencia reducida de las neuronas del ganglio espiral y una membrana tectoria anormal (Camarero *et al.*, 2001; Camarero *et al.*, 2002). Además, defectos en la ruta Rac1/p38, que es una diana de Smpx (Schindeler *et al.*, 2005), están asociados a una disfunción del oído interno. El ratón *knock-out* condicional de *Rac1* presenta una morfogénesis defectiva del epitelio auditivo y de los estereocilios (Grimsley-Myers *et al.*, 2009).

Los datos actualmente disponibles, considerados en conjunto, sugieren que la proteína SMPX desempeñaría un papel importante en la protección del epitelio sensorial del oído frente al estrés mecánico derivado de la mecanotransducción de la señal auditiva. Hay que resaltar que la hipoacusia observada hasta ahora en todos los pacientes con mutaciones en *SMPX* es postlocutiva y progresiva, características que cabría esperar en caso de un mecanismo patogénico basado en daños al epitelio producidos por la ausencia de amortiguación.

Para profundizar en la función de *SMPX*, será necesario progresar en dos líneas de investigación complementarias. Por un lado, se debería generar un modelo murino cuya función audiológica se podría evaluar en condiciones normales y en condiciones de exposición continuada a ruido. Si la hipótesis del desgaste producido por la ausencia de amortiguación del estrés mecánico es cierta, el proceso debería acelerarse por la exposición a ruido. Por otra parte, habría que continuar explorando la interacción de *SMPX* con otros posibles ligandos en el oído interno. La identificación de dichos ligandos podría proporcionar nuevos genes implicados en hipoacusias neurosensoriales y permitiría precisar la función de *SMPX* en el mecanismo de amortiguación propuesto.

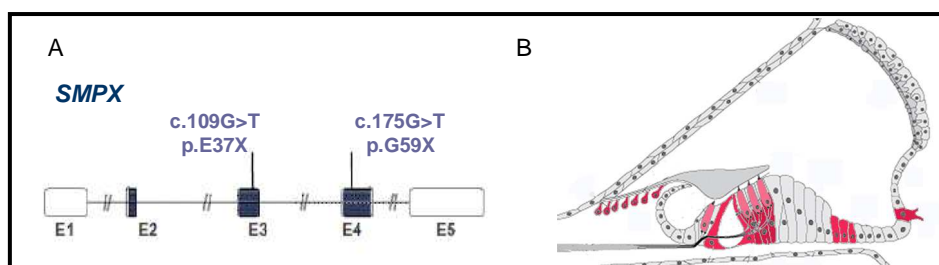


Figura 32. **A:** Representación esquemática del gen *SMPX* y de las mutaciones descritas. **B:** Localización de *SMPX* en la cóclea: células de Böttcher, células del surco externo, células pilares, células interdentes del limbo espiral, células de Deiters y, en menor medida, en células ciliadas.

Conclusiones

1.- Hemos desarrollado un ensayo MLPA específico para la detección de deleciones patogénicas en el locus DFNB1. Además de detectar las tres deleciones más frecuentes hasta ahora conocidas, permite explorar la existencia de otras posibles deleciones en el intervalo crítico de 95,4 kb, donde se piensa que reside un elemento regulador esencial para la expresión del gen *GJB2* en el oído interno. Nuestros resultados obtenidos al utilizar este ensayo MLPA indican que esas hipotéticas deleciones no están presentes o son muy infrecuentes en las poblaciones investigadas (España, Holanda, Polonia, Brasil). Alternativamente, las deleciones podrían ser lo suficientemente pequeñas (<10kb) como para no ser detectadas por este ensayo MLPA.

2.- Hemos identificado una nueva mutación de *splicing*, c.-22-2A>C, en el gen *GJB2* que, en heterocigosis compuesta con una mutación totalmente inactivante, es responsable de una hipoacusia postlocutiva moderada. En el alelo que lleva c.-22-2A>C, se pierde el sitio aceptor de *splicing* normal, pero se estimula la utilización de un sitio aceptor alternativo. La expresión residual resultante parece ser responsable de la manifestación tardía de la hipoacusia y de su intensidad moderada.

3.- Hemos identificado una nueva mutación patogénica en el gen *TRIOBP* en individuos con hipoacusia de una familia originaria de Marruecos. Esta mutación se añade al todavía pequeño espectro de mutaciones conocidas en el gen.

4.- Nuestro trabajo indica que las hipoacusias de tipos DFNB24, DFNB28, DFNB29 y DFNB49, causadas por mutaciones en los genes *RDX*, *TRIOBP*, *CLDN14* y *MARVELD2*, respectivamente, no contribuyen de manera significativa al conjunto de hipoacusias no sindrómicas de herencia autosómica recesiva en la población española. Esta información debe ser tenida en cuenta en el diagnóstico molecular de carácter asistencial.

5.- Hemos identificado dos nuevas mutaciones patogénicas en el gen *PRPS1* en dos familias españolas con hipoacusia. En una de ellas se observa una marcada variabilidad fenotípica intrafamiliar, de modo que la hipoacusia aparece aislada o asociada a diversas alteraciones neurológicas. Hemos descartado un posible efecto modificador de mutaciones en genes relacionados (*PRPS2*, *PRPS1L1*, *miR-376*).

6- Hemos identificado el gen responsable de la hipoacusia no sindrómica ligada al X de tipo DFNX4, mediante el hallazgo de mutaciones que generan codones de parada prematuros en los varones afectados. Se trata del gen *SMPX*, que codifica una proteína de pequeño tamaño, sin dominios conocidos, que se describió originalmente en los costámeros, adhesiones focales especializadas del músculo estriado. Por analogía con la función desempeñada en el músculo estriado, se hipotetiza que la proteína *SMPX* podría desempeñar un papel protector del epitelio sensorial del oído, amortiguando el estrés mecánico derivado del mecanismo de mecanotransducción de la señal auditiva. El desgaste mecánico producido al faltar esta protección podría ser responsable de la progresión de la hipoacusia que se observa en los pacientes.

Bibliografía

Alvarez,A., del Castillo,I., Villamar,M., Aguirre,L.A., Gonzalez-Neira,A., Lopez-Nevot,A., Moreno-Pelayo,M.A., and Moreno,F. (2005). High prevalence of the W24X mutation in the gene encoding connexin-26 (GJB2) in Spanish Romani (gypsies) with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet* 137A, 255-258.

Bashir,R., Fatima,A., and Naz, S. (2010). Mutations in CLDN14 are associated with different hearing thresholds. *J Hum Genet* 55, 767-770.

Becker,M.A., Smith,P.R., Taylor,W., Mustafi,R., and Switzer,R.L. (1995). The genetic and functional basis of purine nucleotide feedback-resistant phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity. *J Clin Invest* 96, 2133-2141.

Ben Yosef,T., Belyantseva,I.A., Saunders,T.L., Hughes,E.D., Kawamoto,K., Van Itallie,C.M., Beyer,L.A., Halsey,K., Gardner,D.J., Wilcox,E.R., Rasmussen,J., Anderson,J.M., Dolan,D.F., Forge,A., Raphael,Y., Camper,S.A., and Friedman,T.B. (2003). Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet* 12, 2049-2061.

Bonapace,G., Concolino,D., Formicola,S., and Strisciuglio,P. (2003). A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency. *J Med Genet* 40, 913–917.

Camarero,G., Avendano,C., Fernandez-Moreno,C., Villar,A., Contreras,J., de Pablo,F., Pichel,J.G., and Varela-Nieto,I. (2001). Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. *J Neurosci* 21, 7630–7641.

Camarero,G., Villar,M.A., Contreras,J., Fernandez-Moreno,C., Pichel,J.G., Avendano,C., and Varela-Nieto,I. (2002). Cochlear abnormalities in insulin-like growth factor-1 mouse mutants. *Hear Res* 170, 2–11.

Chishti,M.S., Bhatti,A., Tamim,S., Lee,K., McDonald,M.L., Leal,S.M., and Ahmad,W. (2008). Splice-site mutations in the TRIC gene underlie autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment in Pakistani families. *J Hum Genet* 53, 101-105.

Cohen-Salmon,M., El-Amraoui,A., Leibovici,M., and Petit,C. (1997). Otogelin: a glycoprotein specific to the acellular membranes of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14450-14455.

Cohn,E.S., Kelley,P.M., Fowler,T.W., Gorga,M.P., Lefkowitz,D.M., Kuehn,H.J., Schaefer,G.B., Gobar,L.S., Hahn,F.J., Harris,D.J., and Kimberling,W.J. (1999). Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1). *Pediatrics* 103, 546-550.

Common,J.E., Bitner-Glindzicz,M., O'Toole,E.A., Barnes,M.R., Jenkins,L., Forge,A., and Kelsell,D.P. (2005). Specific loss of connexin 26 expression in ductal sweat gland epithelium associated with the deletion mutation del(GJB6-D13S1830). *Clin Exp Dermatol* 30, 688-693.

Cui,B., Zhang,H., Lu,Y., Zhong,W., Pei,G., Kong,X., and Hu,L. (2004). Refinement of the locus for non-syndromic sensorineural deafness (DFN2). *J Genet* 83, 35-38.

Dallos,P., Popper,A.N., and Fay,R.R. (1996). The coclea. Springer handbook of auditory research. *Springer*.

de Brouwer,A.P., van Bokhoven,H., Nabuurs,S.B., Arts,W.F., Christodoulou,J., and Duley,J. (2010). PRPS1 mutations: Four distinct syndromes and potential treatment. *Am J Hum Genet* 86, 506–518.

de Brouwer,A.P., Williams,K.L., Duley,J.A., van Kuilenburg,A.B., Nabuurs,S.B., Egmont-Petersen,M., Lugtenberg,D., Zoetekouw,L., Banning,M.J., Roeffen,M., Hamel,B.C., Weaving,L., Ouvrier,R.A., Donald,J.A., Wevers RA, Christodoulou J, and van Bokhoven H. (2007). Arts syndrome is caused by loss-of-function mutations in PRPS1. *Am J Hum Genet* 81, 507-518.

del Castillo,I., Villamar,M., Sarduy,M., Romero,L., Herraiz,C., Hernandez,F.J., Rodriguez,M., Borrás,I., Montero,A., Bellon,J., Tapia,M.C., and Moreno,F. (1996). A novel locus for non-syndromic sensorineural deafness (DFN6) maps to chromosome Xp22. *Hum Mol Genet* 5, 1383-1387.

del Castillo,I., Villamar,M., Moreno-Pelayo,M.A., del Castillo,F.J., Alvarez,A., Telleria,D., Menendez,I., and Moreno,F. (2002). A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 346, 243-249.

del Castillo,I., Moreno-Pelayo,M.A., del Castillo,F.J., Brownstein,Z., Marlin,S., Adina,Q., Cockburn,D.J., Pandya,A., Siemering,K.R., Chamberlin,G.P., Ballana,E.,

Wuyts,W., Maciel-Guerra,A.T., Alvarez,A., Villamar,M., Shohat,M., Abeliovich,D., Dahl,H.H., Estivill,X., Gasparini,P., Hutchin,T., Nance,W.E., Sartorato,E.L., Smith,R.J., Van Camp,G., Avraham,K.B., Petit,C., and Moreno,F. (2003). Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. *Am J Hum Genet* 73, 1452-1458.

del Castillo,F.J., Rodriguez-Ballesteros,M., Alvarez,A., Hutchin,T., Leonardi,E., de Oliveira,C.A., Azaiez,H., Brownstein,Z., Avenarius,M.R., Marlin,S., Pandya,A., Shahin,H., Siemering,K.R., Weil,D., Wuyts,W., Aguirre,L.A., Martin,Y., Moreno-Pelayo,M.A., Villamar,M., Avraham,K.B., Dahl,H.H., Kanaan,M., Nance,W.E., Petit,C., Smith,R.J., Van Camp,G., Sartorato,E.L., Murgia,A., Moreno,F., and del Castillo, I. (2005). A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet* 42, 588-594.

del Castillo,F.J. and del Castillo, I. (2011). The DFNB1 subtype of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment. *Front Biosci* 17, 3252-3274.

Denoyelle,F., Lina-Granade,G., Plauchu,H., Bruzzone,R., Chaib,H., Levi-Acobas,F., Weil,D., and Petit,C. (1998). Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* 393, 319-320.

Denoyelle,F., Marlin,S., Weil,D., Moatti,L., Chauvin,P., Garabedian,E.N., and Petit,C. (1999). Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 353, 1298-1303.

Dib,C., Fauré,S., Fizames,C., Samson,D., Drouot,N., Vignal,A., Millasseau,P., Marc,S., Hazan,J., Seboun,E., Lathrop,M., Gyapay,G., Morissette,J., and Weissenbach,J. (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380, 152-154.

Dror,A.A and Avraham,K.B. (2010). Hearing impairment: a panoply of genes and functions. *Neuron* 68, 293-308.

Duman,D., Sirmaci,A., Cengiz,F.B., Ozdag,H., and Tekin,M. (2011). Screening of 38 genes identifies mutations in 62% of families with nonsyndromic deafness in Turkey. *Genet Test Mol Biomarkers* 15, 29-33.

Ervasti, J.M. (2003). Costameres: The Achilles' heel of Herculean muscle. *J Biol Chem* 278, 13591–13594.

Essenfelder, G.M., Larderet, G., Waksman, G., and Lamartine, J. (2005). Gene structure and promoter analysis of the human GJB6 gene encoding connexin 30. *Gene* 350, 33-40.

Estivill, X., Fortina, P., Surrey, S., Rabionet, R., Melchionda, S., D'Agruma, L., Mansfield, E., Rappaport, E., Govea, N., Mila, M., Zelante, L., and Gasparini, P. (1998). Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351, 394-398.

Evans, W.H. and Martin, P.E. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 19, 121-136.

Flock, A. and Cheung, H.C. (1977). Actin filaments in sensory hairs of inner ear receptor cells. *J Cell Biol* 75, 339-343.

Forge, A., Becker, D., Casalotti, S., Edwards, J., Marziano, N., and Nickel, R. (2002). Connexins and gap junctions in the inner ear. *Audiol Neurootol* 7, 141-145.

García-Pavía, P., Torres, R.J., Rivero, M., Ahmed, M., García-Puig, J., and Becker, M.A. (2003). Phosphoribosylpyrophosphate synthetase overactivity as a cause of uric acid overproduction in a young woman. *Arthritis Rheum* 48, 2036-2041.

Gasparini, P., Rabionet, R., Barbujani, G., Melchionda, S., Petersen, M., Brøndum-Nielsen, K., Metspalu, A., Oitmaa, E., Pisano, M., Fortina, P., Zelante, L., and Estivill, X. (2000). High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet* 8, 19-23.

Goodenough, D.A., Goliger, J.A., and Paul, D.L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 65, 475-502.

Goodenough, D.A., and Paul, D.L. (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 285-294.

Grifa, A., Wagner, C.A., D'Ambrosio, L., Melchionda, S., Bernardi, F., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Arbones, M., Monica, M.D., Estivill, X., Zelante, L., Lang, F., and

Gasparini,P. (1999). Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet* 23, 16-18.

Grimsley-Myers,C.M., Sipe,C.W., Geleoc,G.S., and Lu,X. (2009). The small GTPase Rac1 regulates auditory hair cell morphogenesis. *J Neurosci* 29, 15859–15869.

Guilford,P., Ben Arab, S., Blanchard,S., Levilliers,J., Weissenbach,J., Belkahia,A., and Petit,C. (1994). A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet* 6, 24-28.

Guyton,A.C, and Hall,J.E. (2011). Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology 12th Edition. *Elsevier*.

Harris,A.L. (2002). Voltage-sensing and substate rectification: moving parts of connexon channels. *J Gen Physiol* 119, 165-169.

Huebner,A.K., **Gandia,M.**, Frommolt,P., Maak,A., Wicklein,E.M., Thiele,H., Altmüller,J., Wagner,F., Viñuela,A., Aguirre,L.A., Moreno,F., Maier,H., Rau,I., Giesselmann,S., Nürnberg,G., Gal,A., Nürnberg,P., Hübner,C.A., del Castillo,I., and Kurth,I. (2011). Nonsense mutations in SMPX, encoding a protein responsive to physical force, result in X-chromosomal hearing loss. *Am J Hum Genet* 88, 621-627.

Ikenouchi,J., Furuse,M., Furuse,K., Sasaki,H., Tsukita,S., and Tsukita,S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171, 939-945.

Jan,A.Y., Amin,S., Ratajczak,P., Richard,G., and Sybert,V.P. (2004). Genetic heterogeneity of KID syndrome: identification of a Cx30 gene (GJB6) mutation in a patient with KID syndrome and congenital atrichia. *J Invest Dermatol* 122, 1108-1113.

Kelley,P.M., Abe,S., Askew,J.W., Smith,S.D., Usami,S., and Kimberling,W.J. (1999). Human connexin 30 (GJB6), a candidate gene for nonsyndromic hearing loss: molecular cloning, tissue-specific expression, and assignment to chromosome 13q12. *Genomics* 62, 172-176.

Kelsell,D.P., Dunlop,J., Stevens,H.P., Lench,N.J., Parry,G., Mueller,R.F., and Leigh,I.M. (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387, 80-83.

Kelsell,D.P., Dunlop,J., and Hodgins,M.B. (2001). Human diseases: clues to cracking the connexin code? *Trends Cell Biol* 11, 2-6.

Kenneson,A., Van Naarden,B.K., and Boyle,C. (2002). GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Gene Med* 4, 258-274.

Khan,S.Y., Ahmed,Z.M., Shabbir,M.I., Kitajiri,S., Kalsoom,S., Tasneem,S., Shayiq,S., Ramesh,A., Srisailpathy,S., Khan,S.N., Smith,R.J., Riazuddin,S., Friedman,T.B., and Riazuddin,S. (2007). Mutations of the RDX gene cause nonsyndromic hearing loss at the DFNB24 locus. *Hum Mutat* 28, 417-423.

Kiang,D.T., Jin,N., Tu,Z.J., and Lin,H.H. (1997). Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene* 199, 165-171.

Kikuchi,T., Kimura,R.S., Paul,D.L., Takasaka,T., and Adams,J.C. (2000). Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev* 32, 163-166.

Kim,H.J., Sohn,K.M., Shy,M.E., Krajewski,K.M., Hwang,M., Park,J.H., Jang,S.Y., Won,H.H., Choi,B.O., Hong,S.H., Kim,B.J., Suh,Y.L., Ki,C.S., Lee,S.Y., Kim,S.H., and Kim,J.W. (2007). Mutations in PRPS1, which encodes the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase enzyme critical for nucleotide biosynthesis, cause hereditary peripheral neuropathy with hearing loss and optic neuropathy (cmtx5). *Am J Hum Genet* 81, 552-558.

Kitajiri,S., Fukumoto,K., Hata,M., Sasaki,H., Katsuno,T., Nakagawa,T., Ito,J., Tsukita,S., and Tsukita,S. (2004). Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia. *J Cell Biol* 166, 559-70.

Kitajiri,S., Sakamoto,T., Belyantseva,I.A., Goodyear,R.J., Stepanyan,R., Fujiwara,I., Bird,J.E., Riazuddin,S., Riazuddin,S., Ahmed,Z.M., Hinshaw,J.E., Sellers,J., Bartles,J.R., Hammer,J.A., III, Richardson,G.P., Griffith,A.J., Frolenkov,G.I., and Friedman,T.B. (2010). Actin-bundling protein TRIOBP forms resilient rootlets of hair cell stereocilia essential for hearing. *Cell* 141, 786-798.

Kumar,N.M. and Gilula,N.B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388.

Lamartine,J., Munhoz,E.G., Kibar,Z., Lanneluc,I., Callouet,E., Laoudj,D., Lemaitre,G., Hand,C., Hayflick,S.J., Zonana,J., Antonarakis,S., Radhakrishna,U., Kelsell,D.P., Christianson,A.L., Pitaval,A., Der,K., V, Fraser,C., Blanchet-Bardon,C., Rouleau,G.A., and Waksman,G. (2000). Mutations in GJB6 cause hidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Genet* 26, 142-144.

Lautermann,J., ten Cate,W.J., Altenhoff,P., Grummer,R., Traub,O., Frank,H., Jahnke,K., and Winterhager,E. (1998). Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res* 294, 415-420.

Lautermann,J., Frank,H.G., Jahnke,K., Traub,O., and Winterhager,E. (1999). Developmental expression patterns of connexin26 and -30 in the rat cochlea. *Dev Genet* 25, 306-311.

Lee,K., Ansar,M., Andrade,P.B., Khan,B., Santos-Cortez,R.L., Ahmad,W., and Leal,S.M. (2012). Novel CLDN14 mutations in Paksitani families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Am J Med Genet A* 58, 315-321.

Leibovici,M., Safieddine,S., and Petit,C. (2008). Mouse models for human hereditary deafness. *Curr Top Dev Biol* 84, 385-429.

Lerer,I., Sagi,M., Ben Neriah,Z., Wang,T., Levi,H., and Abeliovich,D. (2001). A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: A novel founder mutation in Ashkenazi Jews. *Hum Mutat* 18, 460.

Liu,X., Han,D., Li,J., Han,B., Ouyang,X., Cheng,J.,Li,X., Jin,Z., Wang,Y., Bitner-Glindzicz,M., Kong,X., Xu,H., and Kantardzhieva,A., Eavey,R.D.,Seidman, C.E., Seidman,J.G., Du,L.L., Chen,Z.Y., Dai,P., Teng,M., Yan,D., and Yuan,H. (2010). Loss-of-function mutations in the PRPS1 gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, DFN2. *Am J Hum Genet* 86, 65-71.

Mahdieh,N., Nishimura,C., Ali-Madadi,J., Riazalhosseini,Y., Yazdan,H., Arzhanghi,S., Jalalvand,K., Ebrahimi,A., Kazemi,S., Smith,R.J.H., and Najmabadi,H. (2004). The frequency of GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) deletion as a cause of autosomal recessive non-syndromic deafness in the Kurdish population. *Clin Genet* 65, 506-508.

Manolis,E.N., Eavey,R.D., Sangwatanaroj,S., Halpin,C., Rosenbaum,S., Watkins,H., Jarcho,J., Seidman,C.E., and Seidman,J.G. (1999). Hereditary postlingual sensorineural hearing loss mapping to chromosome Xq21. *Am J Otol* 20, 621-626.

Matos,T.D., Caria,H., Simoes-Teixeira,H., Aasen,T., Nickel,R., Jagger,D.J., O'Neill,A., Kelsell,D.P., and Fialho,G. (2007). A novel hearing-loss-related mutation occurring in the GJB2 basal promoter. *J Med Genet* 44, 721-725.

Moran,R., Kuilenburg,A.B., Duley,J., Nabuurs,S.B., Retno-Fitri,A., Christodoulou,J., Roelofsen,J., Yntema,H.G., Friedman,N.R., van Bokhoven,H., and de Brouwer,A.P. (2012). Phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity and recurrent infections is caused by a p.Val142Leu mutation in PRS-I. *Am J Med Genet A* 158A, 455-60.

Nadol,J.B., Jr. (1993). Hearing loss. *N Engl J Med* 329, 1092-1102.

Palmer,S., Groves,N., Schindeler,A., Yeoh,T., Biben,C., Wang,C.C., Sparrow,D.B., Barnett,L., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., et al. (2001). The small muscle-specific protein Csl modifies cell shape and promotes myocyte fusion in an insulin-like growth factor 1-dependent manner. *J Cell Biol* 153, 985–998.

Pallares-Ruiz,N., Blanchet,P., Mondain,M., Claustres,M., and Roux,A.F. (2002). A large deletion including most of GJB6 in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *Eur J Hum Genet* 10, 72-76.

Pataky,F., Pironkova,R., and Hudspeth,A.J. (2004). Radixin is a constituent of stereocilia in hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 2601-2606.

Petersen,M.B., Wang,Q., and Willems,P.J. (2008). Sex-linked deafness. *Clin Genet* 73, 14-23.

Pfaffl, MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 2003-2007.

Pfister,M.H. and Lalwani,A.K. (2002). Clinical phenotype of DFN2, DFN4 and DFN6. *Adv Otorhinolaryngol* 61, 168-171.

Pollak,A., Skorka,A., Mueller-Malesinska,M., Kostrzewa, G., Kisiel, B., Waligóra, J., Krajewski, P., Oldak, M., Korniszewski, L., Skarzynski, H., and Ploski,R. (2007). M34T and V37I mutations in GJB2 associated hearing impairment: evidence for pathogenicity and reduced penetrance. *Am J Med Genet* 143A, 2534-2543.

Rabionet,R., Lopez-Bigas,N., Arbones,M.L., and Estivill,X. (2002). Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders. *Trends Mol Med* 8, 205-212.

Ramzan,K., Shaikh,R.S., Ahmad,J., Khan,S.N., Riazuddin,S., Ahmed,Z.M., Friedman,T.B., Wilcox,E.R., and Riazuddin,S. (2005). A new locus for nonsyndromic deafness DFNB49 maps to chromosome 5q12.3-q14.1. *Hum Genet* 116, 17-22.

Riazuddin,S., Ahmed,Z.M., Fanning,A.S., Lagziel,A., Kitajiri,S., Ramzan,K., Khan,S.N., Chattaraj,P., Friedman,P.L., Anderson,J.M., Belyantseva,I.A., Forge,A., Riazuddin,S., and Friedman,T.B. (2006a). Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet* 79, 1040-1051.

Riazuddin,S., Khan,S.N., Ahmed,Z.M., Ghosh,M., Caution,K., Nazli,S., Kabra,M., Zafar,A.U., Chen,K., Naz,S., Antonellis,A., Pavan,W.J., Green,E.D., Wilcox,E.R., Friedman,P.L., Morell,R.J., Riazuddin,S., and Friedman,T.B. (2006b). Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. *Am J Hum Genet* 78, 137-143.

Richard,G., White,T.W., Smith,L.E., Bailey,R.A., Compton,J.G., Paul,D.L., and Bale,S.J. (1998). Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum Genet* 103, 393-399.

Richard,G., Rouan,F., Willoughby,C.E., Brown,N., Chung,P., Ryyananen,M., Jabs,E.W., Bale,S.J., DiGiovanna,J.J., Uitto,J., and Russell,L. (2002). Missense mutations in GJB2 encoding connexin-26 cause the ectodermal dysplasia keratitis-ichthyosis-deafness syndrome. *Am J Hum Genet* 70, 1341-1348.

Richard,G., Brown,N., Ishida-Yamamoto,A., and Krol,A. (2004). Expanding the phenotypic spectrum of Cx26 disorders: Bart-Pumphrey syndrome is caused by a novel missense mutation in GJB2. *J Invest Dermatol* 123, 856-863.

Richardson,G.P, de Monvel,J.B, and Petit,C. (2011). How the genetics of deafness illuminates auditory physiology. *Annu Rev Physiol* 73, 311-334.

Rodriguez-Paris,J. and Schrijver,I. (2009). The digenic hypothesis unraveled: the GJB6 del(GJB6-D13S1830) mutation causes allele-specific loss of GJB2 expression in cis. *Biochem Biophys Res Commun* 389, 354-359.

Roessler,B.J., Bell,G., Heidler,S., Seino,S., Becker,M., and Palella,T.D. (1990). Cloning of two distinct copies of human phosphoribosylpyrophosphate synthetase cDNA. *Nucleic Acids Res* 18, 193.

Safka Brozkova, D., Lastuvkova, J., Stepankova, H., Krutova, M., Trkova, M., Myska, P., and Seeman, P. (2011). DFNB49 is an important cause of non-syndromic deafness in Czech Roma patients but not in the general Czech population. *Clin Genet*.

Sage,C., Huang,M., Vollrath,M.A., Brown,M.C., Hinds,P.W., Corey,D.P., Vetter,D.E., and Chen,Z.Y. (2006). Essential role of retinoblastoma protein in mammalian hair cell development and hearing. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 7345-7350.

Sanchez-Calderon,H., Rodriguez-de la Rosa,L., Milo,M., Pichel,J.G., Holley, M., and Varela-Nieto,I. (2010). RNA microarray analysis in prenatal mouse cochlea reveals novel IGF-I target genes: Implication of MEF2 and FOXM1 transcription factors. *PLoS ONE* 5.

Schindeler,A., Lavulo,L., and Harvey,R.P. (2005). Muscle costameric protein, Chisel/Smpx, associates with focal adhesion complexes and modulates cell spreading in vitro via a Rac1/ p38 pathway. *Exp Cell Res* 307, 367–380.

Schraders, M., Haas, S.A., Weegerink, N.J., Oostrik, J., Hu, H., Hoefsloot, L.H., Kannan, S., Huygen, P.L., Pennings, R.J., Admiraal, R.J., Kalscheuer, V.M., Kunst, H.P., and Kremer, H. (2011). Next-generation sequencing identifies mutations of SMPX, which encodes the small muscle protein, X-linked, as a cause of progressive hearing impairment. *Am J Hum Genet* 88, 628-634.

Seeman,P., and Sakmaryova,I. (2006). High prevalence of the IVS 1 + 1 G to A/GJB2 mutation among Czech hearing impaired patients with monoallelic mutation in the coding region of GJB2. *Clin Genet* 69, 410-413.

Seipel,K., O'Brien,S.P., Iannotti,E., Medley,Q.G., and Streuli,M. (2001). Tara, a novel F-actin binding protein, associates with the Trio guanine nucleotide exchange factor and regulates actin cytoskeletal organization. *J Cell Sci* 114, 389-399.

Shahin,H., Walsh,T., Sobe,T., Lynch,E., King,M.C., Avraham,K.B., and Kanaan,M. (2002). Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum Genet* 110, 284-289.

Shahin, H., Walsh, T., Sobe, T., Sa'ed, J. A., Rayan, A. A., Lynch, E. D., Lee, M. K., Avraham, K. B., King, M.-C., and Kanaan, M. (2006). Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-acting binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet* 78, 144-152.

Shearer,A.E., Hildebrand,M.S., Bromhead,C.J., Kahrizi,K., Webster,J.A., Azadeh,B., Kimberling,W.J., Anousheh,A., Nazeri,A., Stephan,D., Najmabadi,H., Smith,R.J., and Bahlo,M. (2009). A novel splice site mutation in the RDX gene causes DFNB24 hearing loss in an Iranian family. *Am J Med Genet A* 149A, 555-558.

Sirmaci,A., Akcayoz-Duman,D., and Tekin,M. (2006). The c.IVS1+1G>A mutation in the GJB2 gene is prevalent and large deletions involving the GJB6 gene are not present in the Turkish population. *J Genet* 85, 213-216.

Slepecky,N.B (1996). Structure of the mammalian cochlea. In *The Cochlea*, P. Dallos, A.N Popper and R.R Fay. *Springer*, 44-129.

Snoeckx,R.L., Huygen,P.L.M., Feldmann,D., Marlin,S., Denoyelle,F., Waligora,J., Mueller-Malesinska,M., Pollak,A., Ploski,R., Murgia,A., Orzan,E., Castorina,P., Ambrosetti,U., Nowakowska-Szyrwinska,E., Bal,J., Wiszniewski,W., Janecke,A.R., Nekahm-Heis,D., Seeman,P., Bendova,O., Kenna,M.A., Frangulov,A., Rehm,H.L., Tekin,M., Incesulu,A., Dahl,H.H.M., du Sart, D., Jenkins,L., Lucas,D., Bitner-Glindzicz,M., Avraham,K.B., Brownstein,Z., del Castillo,I., Moreno,F., Blin,N., Pfister,M., Sziklai,I., Toth,T., Kelley,P.M., Cohn,E.S., Van Maldergem,L., Hilbert,P., Roux,A.F., Mondain,M Hoefsloot, L.H.,Cremers,C.W.R.J., Löppönen,T., Löppönen,H., Parving,A., Gronskov,K., Schrijver,I., Roberson,J., Gualandi,F., Martini,A., Lina-Granade,G., Pallares-Ruiz,N., Correia,C., Fialho,G., Cryns,K., Hilgert,N., Van de Heyning,P., Nishimura,C.J., Smith,R.J.H., and Van Camp,G. (2005). GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multi-center study. *Am J Hum Genet* 77, 945–957.

Sohl,G. and Willecke,K. (2004). Gap junctions and the connexon protein family. *Cardiovasc Res* 62, 228-232.

Tekin,M., Xia,X.J., Erdenetungalag,R., Cengiz,F.B., White,T.W., Radnaabazar,J., Dangaasuren,B., Tastan,H., Nance,W.E., and Pandya,A. (2010). GJB2 Mutations in Mongolia: complex alleles, low frequency, and reduced fitness of the deaf. *Ann Hum Genet* 74, 155-164.

Tyson,J., Bellman,S., Newton,V., Simpson,P., Malcolm,S., Pembrey,M.E., and Bitner-Glindzicz,M. (1996). Mapping of DFN2 to Xq22. *Hum Mol Genet* 5, 2055-2060.

Wattenhofer,M., Reymond,A., Falciola,V., Charollais,A., Caille,D., Borel,C., Lyle,R., Estivill,X., Petersen,M.B., Meda,P., and Antonarakis,S.E. (2005). Different mechanisms preclude mutant CLDN14 proteins from forming tight junctions in vitro. *Hum Mutat* 25, 543-549.

Wilch,E., Zhu,M., Burkhart,K.B., Regier,M., Elfenbein,J.L., Fisher,R.A., and Friderici,K.H. (2006). Expression of GJB2 and GJB6 is reduced in a novel DFNB1 allele. *Am J Hum Genet* 79, 174-179.

Wilch,E., Azaiez,H., Fisher,R.A., Elfenbein,J., Murgia,A., Birkenhager,R., Bolz,H., Silva-Costa,S.M., del Castillo, I., Haaf,T., Hoefsloot,L., Kremer,H., Kubisch,C., Le Marechal,C., Pandya,A., Sartorato,E.L., Schneider,E., Van Camp,G., Wuyts,W., Smith,R.J., and Friderici,K.H. (2010). A novel DFNB1 deletion allele supports the existence of a distant cis-regulatory region that controls GJB2 and GJB6 expression. *Clin Genet* 78, 267-274.

Wilcox,E.R., Burton,Q.L., Naz,S., Riazuddin,S., Smith,T.N., Ploplis,B., Belyantseva,I., Ben Yosef,T., Liburd,N.A., Morell,R.J., Kachar,B., Wu,D.K., Griffith,A.J., Riazuddin,S., and Friedman,T.B. (2001). Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 104, 165-172.

Wildeman, M., van Ophuizen, E., den Dunnen, JT., and Taschner, PE. (2008). Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Hum Mutat* 29, 6-13.

Willecke,K., Eiberger,J., Degen,J., Eckard,D., Romualdi,A., Guldenagel,M., Deutsch,U., and Sohl,G. (2002). Structural and functional diversity of connexon genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383, 725-737.

Woods,K.A., Camacho-Huebner,C., Savage,M.O., and Clark,A.J. (1996). Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 335, 1363–1367.

Yuan,Y., Yu,F., Wang,G., Huang,S., Yu,R., Zhang,X., Huang,D., Han,D., and Dai,P. (2010). Prevalence of the GJB2 IVS1+1G>A mutation in Chinese hearing loss patients with monoallelic pathogenic mutation in the coding region of GJB2. *J Transl Med* 8, 127.

Artículos

I. Artículos firmados por el doctorando, directamente relacionados con este trabajo de Tesis.

Huebner,A.K., **Gandia,M.**, Frommolt,P., Maak,A., Wicklein,E.M., Thiele,H., Altmüller,J., Wagner,F., Viñuela,A., Aguirre,L.A., Moreno,F., Maier,H., Rau,I., Giesselmann,S., Nürnberg,G., Gal,A., Nürnberg,P., Hübner,C.A., del Castillo,I., and Kurth,I. (2011). Nonsense mutations in SMPX, encoding a protein responsive to physical force, result in X-chromosomal hearing loss. *Am J Hum Genet* 88, 621-627.

Gandia,M., del Castillo,F.J., Rodríguez-Álvarez,F.J., Garrido,G., Moreno-Pelayo,M.A., Villamar,M., Moreno,F., and del Castillo,I. A novel splice-site mutation in the GJB2 gene causing mild postlingual hearing impairment. Manuscrito en preparación.

Gandia,M., Fernández-Toral,J., Villamar,M., Moreno-Pelayo,M.A., Moreno,F. and del Castillo, I. A novel mutation in the *PRPS1* gene resulting in intrafamilial phenotypic variability. Manuscrito en preparación.

Gandía,M., del Castillo,F.J., Pollak,A., Hoefsloot L., Sartorato,E.L., Batissoco,A.C., Mingroni-Netto,R.C., Lechowicz,U., Mueller-Malesinska,M., Skarzynski,H., Skarzynski, P.H., Moreno-Pelayo,M.A., Villamar,M., Moreno,F., Kremer,H., Ploski,R., and del Castillo I. A multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay specifically developed to detect novel deletions causing non-syndromic hearing impairment at the DFNB1 locus. Manuscrito en preparación.

II. Otros artículos firmados por el doctorando, no directamente relacionados con este trabajo de Tesis.

Pera,A., Villamar,M., Viñuela,A., **Gandía,M.**, Medà,C., Moreno,F., and Hernández-Chico,C. (2008). A mutational analysis of the SLC26A4 gene in Spanish hearing-impaired families provides new insights into the genetic causes of Pendred syndrome and DFNB4 hearing loss. *Eur J Hum Genet* 16, 888-896.

Pera, A., Dossena,S., Rodighiero,S., **Gandía,M.**, Bottà,G., Meyer,G., Moreno,F., Nofziger,C., Hernández-Chico,C., and Paulmichl,M. (2008). Functional assessment of allelic variants in the SLC26A4 gene involved in Pendred syndrome and nonsyndromic EVA. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 18608-18613.

Nonsense Mutations in *SMPX*, Encoding a Protein Responsive to Physical Force, Result in X-Chromosomal Hearing Loss

Antje K. Huebner,¹ Marta Gandia,^{2,3,12} Peter Frommolt,^{4,5,12} Anika Maak,¹ Eva M. Wicklein,⁶ Holger Thiele,⁴ Janine Altmüller,⁴ Florian Wagner,⁷ Antonio Viñuela,^{2,3} Luis A. Aguirre,^{2,3} Felipe Moreno,^{2,3} Hannes Maier,⁸ Isabella Rau,⁹ Sebastian Gießelmann,¹ Gudrun Nürnberg,^{4,5,10} Andreas Gal,⁹ Peter Nürnberg,^{4,5,7,10} Christian A. Hübner,¹ Ignacio del Castillo,^{2,3} and Ingo Kurth^{9,11,*}

The fact that hereditary hearing loss is the most common sensory disorder in humans is reflected by, among other things, an extraordinary allelic and nonallelic genetic heterogeneity. X-chromosomal hearing impairment represents only a minor fraction of all cases. In a study of a Spanish family the locus for one of the X-chromosomal forms was assigned to Xp22 (DFNX4). We mapped the disease locus in the same chromosomal region in a large German pedigree with X-chromosomal nonsyndromic hearing impairment by using genome-wide linkage analysis. Males presented with postlingual hearing loss and onset at ages 3–7, whereas onset in female carriers was in the second to third decades. Targeted DNA capture with high-throughput sequencing detected a nonsense mutation in the *small muscle protein, X-linked (SMPX)* of affected individuals. We identified another nonsense mutation in *SMPX* in patients from the Spanish family who were previously analyzed to map DFNX4. *SMPX* encodes an 88 amino acid, cytoskeleton-associated protein that is responsive to mechanical stress. The presence of *Smpx* in hair cells and supporting cells of the murine cochlea indicates its role in the inner ear. The nonsense mutations detected in the two families suggest a loss-of-function mechanism underlying this form of hearing impairment. Results obtained after heterologous overexpression of *SMPX* proteins were compatible with this assumption. Because responsiveness to physical force is a characteristic feature of the protein, we propose that long-term maintenance of mechanically stressed inner-ear cells critically depends on *SMPX* function.

As the most common sensory disorder in humans, hearing loss affects about 1 in 1000 newborns.¹ It is assumed that at least half of the cases have a genetic basis, and more than two-thirds of this subset of cases are classified as nonsyndromic hearing loss (NSHL) because of the absence of additional symptoms. The vast majority of NSHL is caused by mutations in autosomal genes. X-chromosomal inheritance accounts for only 1%–5% of the cases.² To date, four X-chromosomal NSHL loci (DFNX) have been mapped, and two genes have been implicated in this group of disorders (Hereditary Hearing Loss Homepage). X-linked DFNX1 (formerly DFN2 [MIM 304500]) is characterized by postlingual progressive hearing impairment and has a typical age at onset between 5 and 15 years for males and in the fifth decade for females. The gene mutated in DFNX1,³ *PRPS1* (MIM 311850), encodes phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1, which participates in the nucleotide biosynthesis pathway by catalyzing the reaction of ribose-5-phosphate with ATP. Its function in the inner ear remains elusive. Apart from its contribution to NSHL, mutations in *PRPS1* have also been implicated in PRS-I superactivity (MIM 300661), Charcot-Marie-Tooth disease type 5 (CMTX5

[MIM 311070]), and Arts syndrome (MIM 301835), all of which can be accompanied by hearing loss.⁴ *POU3F4* (MIM 300039) encodes a member of the POU family of transcription factors and is mutated in DFNX2 (formerly DFN3 [MIM 304400]),⁵ which is characterized by prelingual sensorineural deafness accompanied by a conductive component because of stapedia fixation.

In the present study, we investigated a large German pedigree with a postlingual NSHL for which age at onset is 3–7 in males. Initially, there is a moderate hearing loss, especially for high frequencies, that progresses with age and affects all frequencies later. Onset of hearing loss in female carriers is in the second to third decades, and patients present with a severe hearing loss after 10–15 years (Figure 1). Vestibular function was normal, and tinnitus was not reported by the affected individuals. No signs of a conductive hearing loss-component (no air-bone gaps) were noticed in pure-tone audiometry; this finding indicates a normal middle-ear function. Computed tomography, magnetic resonance imaging and digital volume tomography showed a normal middle-ear cavity with regular ossicles, a normal mastoid, and no signs

¹University Hospital Jena, Institute of Human Genetics, Jena 07743, Germany; ²Unidad de Genética Molecular, Hospital Universitario Ramon y Cajal, Instituto Ramon y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid 28034, Spain; ³Centro de Investigación Biomedica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid 28034, Spain; ⁴Cologne Center for Genomics (CCG), University of Cologne, Cologne 50931, Germany; ⁵Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne, Cologne 50674, Germany; ⁶Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg 20246, Germany; ⁷ATLAS Biolabs GmbH, Berlin 10117, Germany; ⁸Medical University Hannover, Department of Otolaryngology, Hannover 30625, Germany; ⁹Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg 20246, Germany; ¹⁰Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), University of Cologne, Cologne 50931, Germany; ¹¹University Hospital Jena, Institute of Human Genetics, Functional Genetics Group, Jena 07743, Germany

¹²These authors contributed equally to this work

*Correspondence: ingo.kurth@mti.uni-jena.de

DOI 10.1016/j.ajhg.2011.04.007. ©2011 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

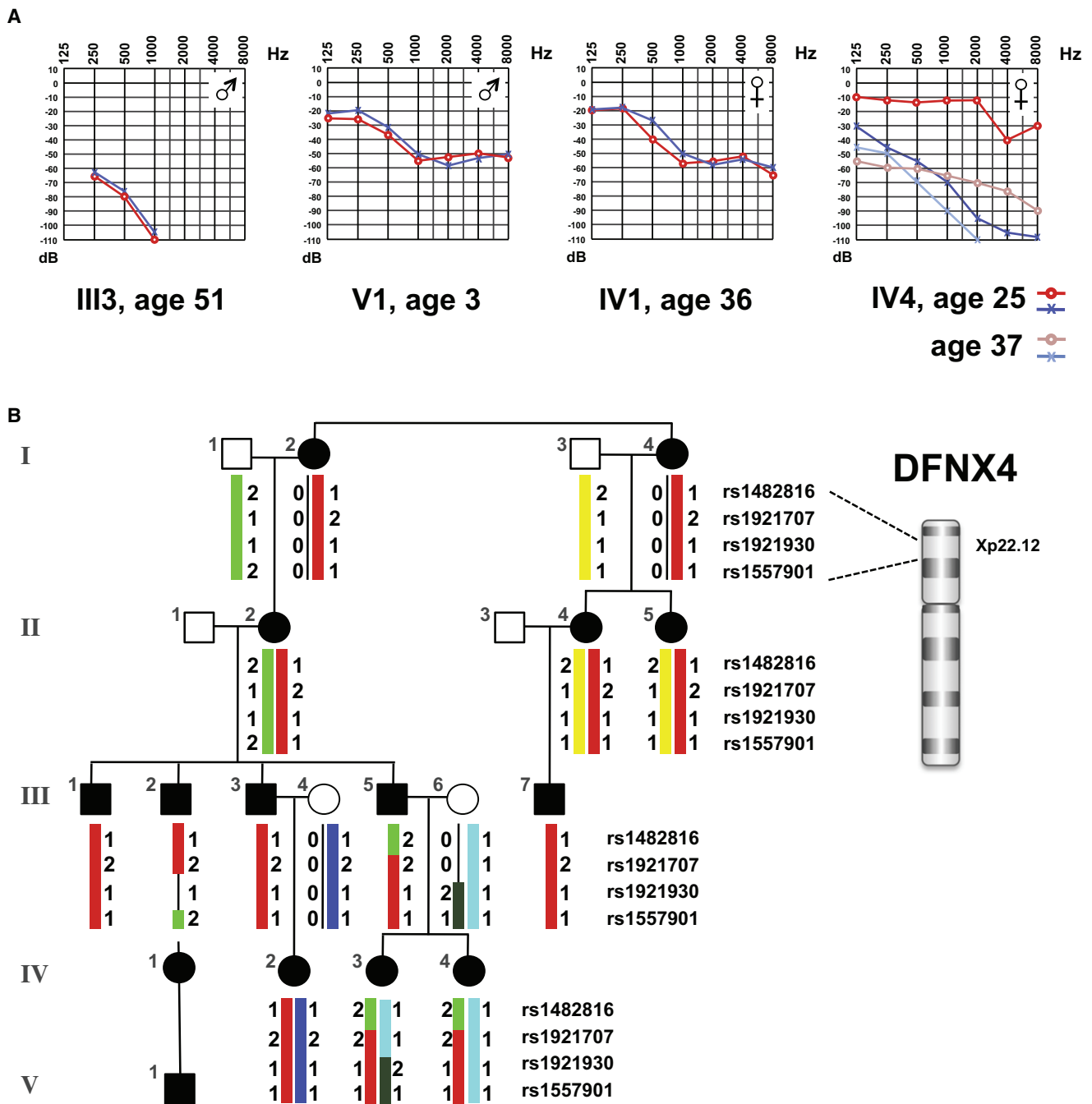


Figure 1. Clinical Phenotype and Segregation Analysis in a German Family Affected by Hereditary Hearing Loss
 (A) Audiograms of selected family members (red indicates the right ear, and blue indicates the left ear). Hearing loss in males typically starts between ages 3–7, whereas hearing loss in females begins in the second to third decades.
 (B) Haplotypes constructed by four Xp22.12 SNP markers mapped the disease locus between rs1482816 (hg19 X: 5746140) and rs1557901 (hg19 X: 23222925). Individuals I-1–I-4, III-4, III-6, IV-1, and V-1 were not subjected to the 10K GeneChip linkage analysis.

of malformation in the affected individuals. The regular inner-ear structures had fluid-filled, normally shaped cochlea that allowed later treatment by cochlear implantation.

Genome-wide linkage analysis (GeneChip Human Mapping 10K Array, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) on 11 affected family members revealed linkage to a 17.5 Mb interval in Xp22.12 and maximum LOD scores of 2.23

(Figure S1, available online). Analysis of multiple informative meioses assigned the disease locus between rs1482816 (hg19 X: 5746140) and rs1557901 (hg19 X: 23222925) (Figure 1). We calculated LOD score by using the ALLEGRO⁶ program and assumed dominant inheritance with full penetrance and a disease allele frequency of 0.0001. Haplotypes were reconstructed with MERLIN⁷ and presented graphically with HaploPainter.⁸

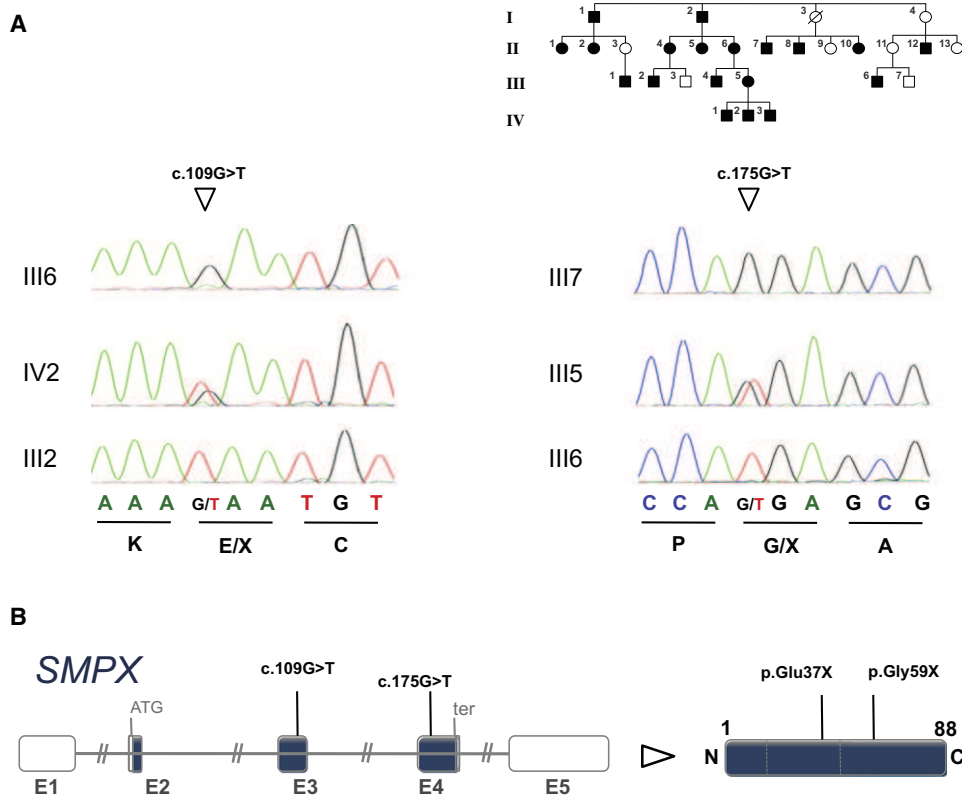


Figure 2. Identification of Nonsense Mutations in *SMPX*

(A) Sequencing of genomic DNA revealed the *SMPX* nonsense mutations c.109G>T in exon 3 in the German family (left) and c.175G>T in exon 4 in the Spanish family¹⁴ (right). Electropherograms of a respective heterozygous female carrier and a hemizygous male are shown in comparison to a reference sequence. No additional mutations have been identified in a cohort of 34 *GJB2*-negative individuals with early-onset hearing loss.

(B) *SMPX* is composed of five exons (left, the coding sequence is given in blue) and encodes an 88 amino acid protein (right) without known functional domains.

To identify the gene mutated in the family, we performed targeted enrichment of all exons and 1 kb of the promoter regions of the 88 protein-coding genes and known miRNAs within the critical interval (GRCh37/hg19) by using the Roche NimbleGen 385K custom sequence capture array. Final coverage of the design was 96.3% and included an offset of 100 bp. DNA of two affected males from the family (individuals III-2 and III-5, see Figure 1B) was subjected to target enrichment and sequencing. We prepared the sequencing library by using standard Illumina protocols including end repair; A-tailing, paired-end adaptor ligation; and amplification by PCR. Enrichment factors (284-fold and 280-fold) were determined by quantitative PCR of four control loci in the array in a comparison of enriched versus nonenriched DNA. The two libraries were subjected to massively parallel sequencing (Illumina GA Iix), resulting in approximately 2828.6 Mb and 2606.0 Mb of raw sequences for the two individuals analyzed. For primary data analysis, a semiautomated data-processing pipeline was established. We first mapped reads to version hg19 of the human reference genome by using the MAQ short-read alignment software⁹ on a large-scale compute cluster. We called single-nucleotide variants (SNVs) by using the MAQ downstream

analysis tools.⁹ For indel calling, we repeated the alignment procedure by using the BWA aligner¹⁰ and the SAMtools¹¹ software for downstream analysis. A total of 3858 and 3443 X-chromosomal variants were called for individuals III-2 and III-5 (Table S1).

At the same time, we collected DNA samples from additional affected males and genotyped them for highly polymorphic microsatellite markers; by doing this we reduced the linkage region to ~8.5 Mb flanked by *DXS987* (hg19 X: 14709303) at the telomeric end. When the refined interval (UCSC Genome Browser hg19 X:14709303-23223175) was taken into account, the number of SNVs remaining was 398 and 347 for the respective patients (Tables S1 and S2). Six variants located to exons and were not annotated as SNPs. We considered these variants for their impact on protein synthesis and the degree of evolutionary conservation by using GERP and PolyPhen.^{12,13} The nonsense mutation c.109G>T (p.Glu37X) in *small muscle protein, X-linked* (*SMPX*) (NM_014332.1, hg19 X:21761891) was considered the best candidate for NSHL in view of the character of the mutation and the GeneRIF entries and was confirmed by Sanger sequencing (Figure 2A, left panel).

Remarkably, the candidate interval included *DFNX4* (MIM 300066, formerly *DFN6*), the locus for one form of

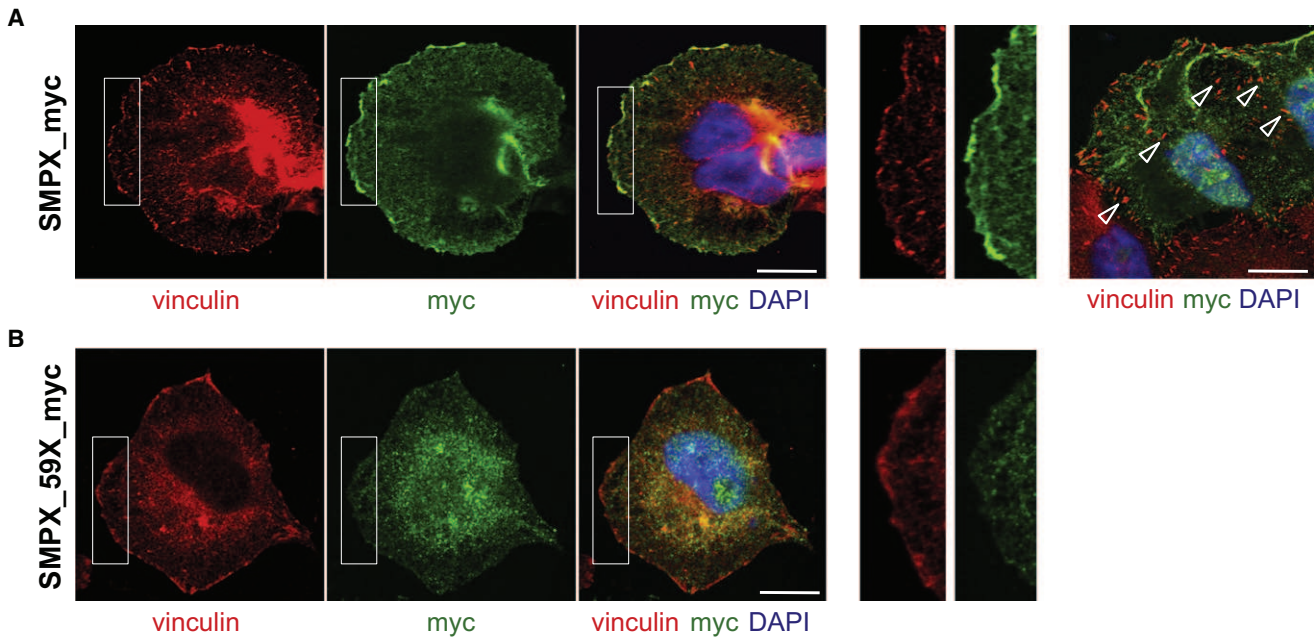


Figure 3. Heterologous Expression of the SMPX Mutant Proteins

(A) C-terminally Myc-tagged human SMPX (SMPX_myc) was overexpressed in HeLa cells. Costaining with Myc (Santa Cruz, A14 sc-789) and vinculin antibodies (Chemikon MAB3574) revealed overlap, especially in the focal adhesion sites of the cell periphery. Enlargements of the cell membrane (white rectangles) are given. Note that SMPX_myc was largely absent from the mature focal adhesions that serve as anchor points for actin stress fibers (right, arrowheads). The scale bar indicates 5 μ m.

(B) Truncated SMPX (SMPX_59X_myc) revealed an intracellular staining in HeLa cells; the signal was largely absent from adhesion sites at the cell membrane, indicating partial mislocalization of the protein. Enlargements of the cell membrane (white rectangles) are given on the right. SMPX_37X_myc, corresponding to the mutation identified in the German family, was not detectable with Myc antibodies after heterologous expression in HeLa cells (not shown). The scale bar indicates 5 μ m.

X-chromosomal NSHL mapped in a Spanish family.¹⁴ The NSHL in this family was bilateral, symmetric, sensori-neural, postlingual, and progressive. In affected males, a high-frequency hearing loss was detected at age 5–7; by adulthood, it had become severe or profound and involved all frequencies. Females manifested a moderate hearing impairment for the high frequencies, and onset was in the fourth decade of life. Subsequent investigation of *SMPX* in this family identified the nonsense mutation c.175G>T (p.Gly59X) (hg19 X:21755773), which segregated with the hearing loss (Figure 2A, right panel). Both the c.109G>T and c.175G>T *SMPX* mutations (Figure 2B) result in transcripts with premature stop codons and are likely to undergo nonsense-mediated mRNA decay (NMD), suggesting loss-of-function as the underlying mechanism of the hearing impairment. These data demonstrate that *SMPX* is the gene mutated in the DFNX4-associated disease. In an independent concurrent study of two additional families with hearing loss, Schraders et al. (in this issue) also identified mutations in *SMPX* and their study provides additional support for our findings.¹⁵ Written informed consent was obtained from all the study participants after approval from the Institutional Review Boards at the participating institutions.

Human *SMPX* encodes a small 88-amino acid protein (NP_055147.1) that has no known functional domains and was initially cloned from muscle.¹⁶ *SMPX* was also iden-

tified in a screening for stretch-responsive skeletal muscle genes and shown to be highly upregulated in response to passive stretch in vivo.¹⁷ In adult striated myocytes, *Smpx* localizes to costamere structures,¹⁸ muscle-specific protein networks that couple the force-generating sarcomeres with the sarcolemma and the surrounding extracellular matrix. This functional unit acts as a buffer to protect the sarcolemmal plasma membrane from damage generated by the mechanical stress of contracting muscle cells. Costameres are believed to represent a striated-muscle-specific elaboration of focal adhesions in nonmuscle cells.¹⁹ These dynamic protein complexes, through which the cytoskeleton of a cell connects to the extracellular matrix, are mechanosensitive in that they respond to force by changing their size, dynamics, and signaling activity.²⁰ In line with this, *Smpx* has been shown to partially colocalize with focal adhesion complexes upon heterologous expression and precipitate with the focal adhesion marker vinculin.²¹ In HeLa cells, heterologously expressed, C-terminally Myc-tagged *SMPX* (SMPX_myc) showed a predominant intracellular staining and enrichment in lamellipodia (Figure 3). A partial overlap with vinculin was observed, especially in adhesion complexes of the cell periphery. Of note, SMPX_myc did not reveal a substantial overlap with the mature focal adhesions that serve as anchor points for actin stress fibers, and this implies a nonexclusive role for the protein in adhesion processes. Staining of the truncated

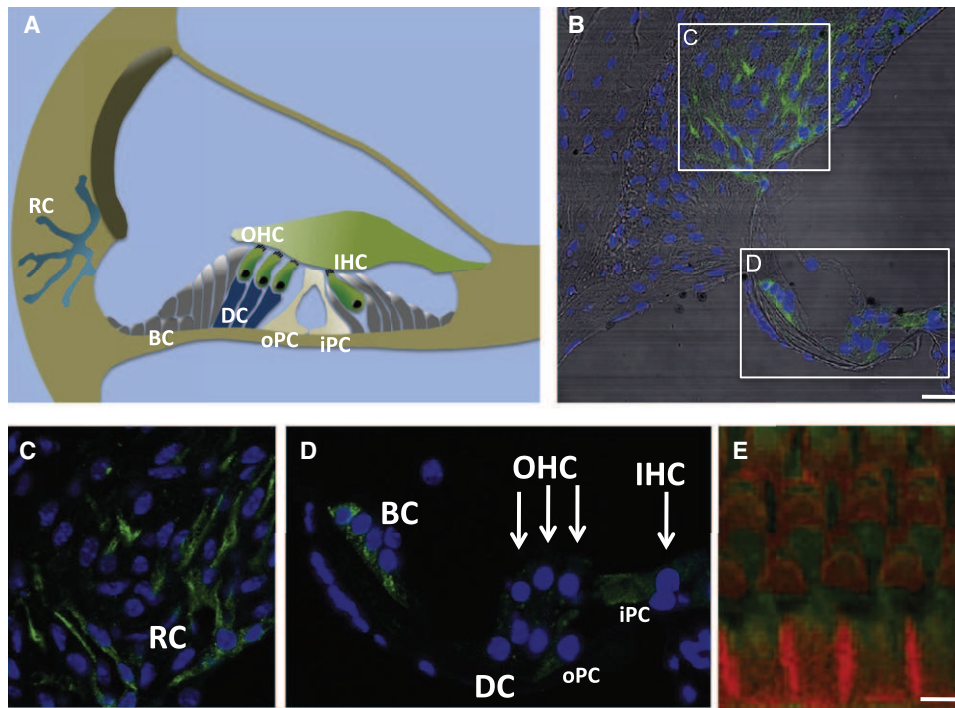


Figure 4. Localization of Smpx in the Mouse Inner Ear

(A) A schematic representation of the cochlea. The sensory epithelium is composed of inner hair cells (IHC) and outer hair cells (OHC). Nonsensory supporting cells include Deiters cells (DC), Böttcher cells (BC), and inner and outer pillar cells (iPC, oPC). Root cells (RC) build up a cellular network in the lateral wall of the cochlea.

(B) Cryosections (7- μ m thickness) from the cochlea of adult C57BL/6J mice were stained with an Smpx antibody (Sigma Aldrich #AV41597, 1:500, green), and DAPI (blue). The overlay with differential interference contrast is shown. The scale bar represents 25 μ m. Stainings of SMPX_myc overexpressing HeLa cells with the Smpx rabbit-antiserum gave the same signal as with the mouse Myc-antibody (data not shown).

(C and D) Enlargements of spiral ligament cells and outer sulcus cells together with root cells (C) and the sensory epithelium with supporting cells (D). Note the Smpx localization in root cells, Böttcher cells, inner and outer pillar cell, and weaker signals in Deiters cells and hair cells (marked by arrows).

(E) Apical basilar membranes of fixed cochleae were dissected and immunostained with an Smpx antibody (green) and conjugated phalloidin (red). Weak Smpx immunoreactivity was detected in inner and outer hair cells. The scale bar indicates 5 μ m.

variant SMPX_59X_myc (p.Gly59X in the Spanish family) with the Myc antibody showed an intracellular signal comparable to wild-type; however, absence of the protein from the cell membrane and thus the vinculin-positive cell periphery indicated partial mistargeting (Figure 3). No specific staining was observed with the Myc antibody after expression of the sequence-verified SMPX_37X_myc variant (p.Glu37X, German family), indicating very low abundance or rapid degradation of newly synthesized polypeptides. These results suggest that the SMPX transcripts with early stop codons are degraded by NMD and represent a functional null allele. Alternatively, transcripts can escape NMD and produce largely truncated and misrouted, that is nonfunctional, polypeptides.

Immunolocalization studies by an Smpx antibody and longitudinal cross-sections of the mouse cochlea revealed staining in different cell types, including Böttcher cells, root cells, pillar cells, and interdental cells of the limbus spiralis. Smpx immunoreactivity was also detected at low levels in hair cells (Figure 4).

In the hearing process, the induction of sound causes fluid to move through the cochlear duct and thereby deflects the

basilar membrane with the sensory epithelium against the tectorial membrane. Thus, chronic mechanical stress is characteristic for the inner ear. The mechanical force on hair cells leads to the transduction of sound into an electrical signal that underlies the hearing process. The tips of hair cells are equipped with mechanical-vibration-sensitive stereocilia that enable mechanosensory transduction. Stereocilia are arranged as a staircase and connected with lateral and tip links on the basis of elaborate actin-based cellular protrusions. Indeed, a significant number of genes in which variation is associated with deafness encode actin or actin-binding proteins, motor proteins of the myosin family, or proteins that are otherwise linked to the cytoskeleton.^{22,23} Given the association of SMPX with the cytoskeleton, the responsiveness to mechanical force, and the detection of Smpx in hair cells in the mouse, it is tempting to speculate that SMPX might play a role in the maintenance of stereocilia, which are permanently exposed to physical forces. SMPX might also contribute to actin turnover and length regulation in stereocilia because these features are tightly regulated by extrinsic biomechanical forces.²⁴ However, the antibody stainings failed to show a selective labeling of

the stereociliar bundles of the inner and outer hair cells, which argues against high abundance of *Smpx* in stereocilia.

Mechanotransduction is not limited to hair cells and is crucial in the maintenance of many mechanically stressed tissues.²⁵ Hence, any changes in normal intracellular-force transmission can result in altered mechanosensitive signals and cellular dysfunction. In addition to hair cells, physical force is also applied to other cells of the organ of Corti. *SMPX* might play a protective role against mechanical stress in different cell types of the organ of Corti, in line with the observed expression pattern, and functional loss of *SMPX* could lead to the progressive hearing impairment in the affected individuals.

Despite its strong expression in muscle cells, *SMPX* appears to be largely dispensable for muscle function because patients from the families studied do not show obvious signs of muscular dysfunction. Interestingly, elevated creatine kinase levels (400 U/l) and myalgias have been repeatedly reported in a 71-year-old male patient from the German family; however, the relation to the *SMPX* mutation is currently unclear. Mice with a targeted disruption of *Smpx* (named *Csl*) did not exhibit an overt muscle phenotype.¹⁸ Breeding of the *Csl* knockout-mouse line has been discontinued, and thus it is not available for hearing tests (R.P. Harvey, personal communication).

Remarkably, defects in the *Rac1/p38* pathway, which is a target of *Smpx*,²¹ have also been shown to be associated with inner-ear dysfunction. *Rac1* belongs to the family of small GTPases. It is activated by biomechanical stress, upon which it is recruited to sites of actin reorganization and integrin-mediated cell adhesions. Intriguingly, conditional ablation of *Rac1* in the otic epithelium of mice resulted in defective morphogenesis of the auditory sensory epithelium and stereociliary bundle.²⁶ *p38* has also been shown to be of relevance for inner-ear function; inhibition of *p38* MAP kinase phosphorylation suspended gentamicin-induced ototoxicity, a side effect of aminoglycoside therapy leading to permanent hair-cell loss and hearing impairment.²⁷ *Smpx* is also stimulated by insulin-like growth factor-1 (IGF-1).¹⁸ *IGF-1* mutations in humans are associated with syndromic sensorineural deafness²⁸ and *Igf-1*-null mice exhibit hearing loss.²⁹

In conclusion, our study identified mutations in *SMPX* in patients with X-chromosomal hearing impairment and suggested that the stress response of mechanically challenged inner-ear cells might critically depend on *SMPX* function.

Supplemental Data

Supplemental Data include one figure and two tables and can be found with this article online at <http://www.cell.com/AJHG/>.

Acknowledgments

We sincerely thank all of the family members for their participation and their constant interest in and support of this study. The

authors also wish to thank Ingelore Bäßmann, Christian Kluck, and Christian Becker for expert technical assistance. Florian Wagner is an employee of ATLAS Biolabs GmbH. Peter Nürnberg is a founder, CEO, and shareholder of ATLAS Biolabs GmbH. ATLAS Biolabs GmbH is a service provider for genomic analyses. This work was supported by grants from the Werner-Otto-Stiftung (to I.K.), Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI 08/0818 to I.d.C.), Fundación Ramón Areces (to I.d.C.), and Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-03216 to F.M.).

Received: February 25, 2011

Revised: April 8, 2011

Accepted: April 11, 2011

Published online: May 5, 2011

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

ENSEMBL, <http://www.ensembl.org>

GeneDistiller, <http://www.genedistiller.org/>

Hereditary Hearing Loss, <http://hereditaryhearingloss.org/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), www.omim.org

Primer Design, <http://portal.ccg.uni-koeln.de/geneexplorer/>

UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>

References

1. Morton, C.C., and Nance, W.E. (2006). Newborn hearing screening—a silent revolution. *N. Engl. J. Med.* *354*, 2151–2164.
2. Petersen, M.B., Wang, Q., and Willems, P.J. (2008). Sex-linked deafness. *Clin. Genet.* *73*, 14–23.
3. Liu, X., Han, D., Li, J., Han, B., Ouyang, X., Cheng, J., Li, X., Jin, Z., Wang, Y., Bitner-Glindzicz, M., et al. (2010). Loss-of-function mutations in the *PRPS1* gene cause a type of nonsyndromic X-linked sensorineural deafness, *DFN2*. *Am. J. Hum. Genet.* *86*, 65–71.
4. de Brouwer, A.P., van Bokhoven, H., Nabuurs, S.B., Arts, W.F., Christodoulou, J., and Duley, J. (2010). *PRPS1* mutations: Four distinct syndromes and potential treatment. *Am. J. Hum. Genet.* *86*, 506–518.
5. de Kok, Y.J., van der Maarel, S.M., Bitner-Glindzicz, M., Huber, I., Monaco, A.P., Malcolm, S., Pembrey, M.E., Ropers, H.H., and Cremers, F.P. (1995). Association between X-linked mixed deafness and mutations in the *POU* domain gene *POU3F4*. *Science* *267*, 685–688.
6. Gudbjartsson, D.F., Jonasson, K., Frigge, M.L., and Kong, A. (2000). Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. *Nat. Genet.* *25*, 12–13.
7. Abecasis, G.R., Cherny, S.S., Cookson, W.O., and Cardon, L.R. (2002). Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat. Genet.* *30*, 97–101.
8. Thiele, H., and Nürnberg, P. (2005). HaploPainter: A tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics* *21*, 1730–1732.
9. Li, H., Ruan, J., and Durbin, R. (2008). Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome Res.* *18*, 1851–1858.
10. Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* *25*, 1754–1760.

11. Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* *25*, 2078–2079.
12. Cooper, G.M., Stone, E.A., Asimenos, G., Green, E.D., Batzoglu, S., and Sidow, A.; NISC Comparative Sequencing Program. (2005). Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res.* *15*, 901–913.
13. Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., and Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* *7*, 248–249.
14. del Castillo, I., Villamar, M., Sarduy, M., Romero, L., Herraiz, C., Hernández, F.J., Rodríguez, M., Borrás, I., Montero, A., Bellón, J., et al. (1996). A novel locus for non-syndromic sensorineural deafness (DFN6) maps to chromosome Xp22. *Hum. Mol. Genet.* *5*, 1383–1387.
15. Schraders, M., Haas, S.A., Weegerink, N.J.D., Oostrik, J., Hu, H., Hoefsloot, L.H., Kannan, S., Huygen, P.L.M., Pennings, R.J.E., Admiraal, R.J.C., et al. (2011). Next-Generation sequencing identifies mutations of SMPX which encodes the small muscle protein, X-linked, as a cause of progressive hearing impairment. *Am. J. Hum. Genet.* *88*, this issue, 628–634.
16. Patzak, D., Zhuchenko, O., Lee, C.C., and Wehnert, M. (1999). Identification, mapping, and genomic structure of a novel X-chromosomal human gene (SMPX) encoding a small muscular protein. *Hum. Genet.* *105*, 506–512.
17. Kemp, T.J., Sadusky, T.J., Simon, M., Brown, R., Eastwood, M., Sassoon, D.A., and Coulton, G.R. (2001). Identification of a novel stretch-responsive skeletal muscle gene (*Smpx*). *Genomics* *72*, 260–271.
18. Palmer, S., Groves, N., Schindeler, A., Yeoh, T., Biben, C., Wang, C.C., Sparrow, D.B., Barnett, L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., et al. (2001). The small muscle-specific protein *Csl* modifies cell shape and promotes myocyte fusion in an insulin-like growth factor 1-dependent manner. *J. Cell Biol.* *153*, 985–998.
19. Ervasti, J.M. (2003). Costameres: The Achilles' heel of Herculean muscle. *J. Biol. Chem.* *278*, 13591–13594.
20. Geiger, B., and Bershadsky, A. (2002). Exploring the neighborhood: Adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell* *110*, 139–142.
21. Schindeler, A., Lavulo, L., and Harvey, R.P. (2005). Muscle costameric protein, *Chisel/Smpx*, associates with focal adhesion complexes and modulates cell spreading in vitro via a Rac1/p38 pathway. *Exp. Cell Res.* *307*, 367–380.
22. Petit, C., and Richardson, G.P. (2009). Linking genes underlying deafness to hair-bundle development and function. *Nat. Neurosci.* *12*, 703–710.
23. Dror, A.A., and Avraham, K.B. (2009). Hearing loss: Mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 411–437.
24. Manor, U., and Kachar, B. (2008). Dynamic length regulation of sensory stereocilia. *Semin. Cell Dev. Biol.* *19*, 502–510.
25. Jaalouk, D.E., and Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 63–73.
26. Grimsley-Myers, C.M., Sipe, C.W., Géléoc, G.S., and Lu, X. (2009). The small GTPase Rac1 regulates auditory hair cell morphogenesis. *J. Neurosci.* *29*, 15859–15869.
27. Wei, X., Zhao, L., Liu, J., Dodel, R.C., Farlow, M.R., and Du, Y. (2005). Minocycline prevents gentamicin-induced ototoxicity by inhibiting p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation. *Neuroscience* *131*, 513–521.
28. Woods, K.A., Camacho-Hübner, C., Savage, M.O., and Clark, A.J. (1996). Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N. Engl. J. Med.* *335*, 1363–1367.
29. Cediël, R., Riquelme, R., Contreras, J., Díaz, A., and Varela-Nieto, I. (2006). Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: A new model of human deafness. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 587–590.

ARTICLE

A mutational analysis of the *SLC26A4* gene in Spanish hearing-impaired families provides new insights into the genetic causes of Pendred syndrome and DFNB4 hearing loss.

Alejandra Pera^{1,2}, Manuela Villamar^{1,2}, Antonio Viñuela^{1,2}, Marta Gandía^{1,2},
Carme Medà^{3,4}, Felipe Moreno^{1,2} and Concepción Hernández-Chico^{*,1,2}

¹Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; ²Centre of Biomedical Research of Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain; ³Servicio de ORL, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁴Unidad de Prevención de Enfermedades del Oído, Conselleria de Salut, Illes Balears, Palma de Mallorca, Spain

Pendred syndrome (PS) and DFNB4, a non-syndromic sensorineural hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA), are caused by mutations in the *SLC26A4* gene. Both disorders are recessive, and yet only one mutated *SLC26A4* allele, or no mutations, are identified in many cases. Here we present the genetic characterization of 105 Spanish patients from 47 families with PS or non-syndromic EVA and 20 families with recessive non-syndromic hearing loss, which segregated with the *DFNB4* locus. In this cohort, two causative *SLC26A4* mutations could be characterized in 18 families (27%), whereas a single mutated allele was found in a patient with unilateral hearing loss and EVA in the same ear. In all, 24 different causative mutations were identified, including eight novel mutations. The novel p.Q514K variant was the most prevalent mutation in *SLC26A4*, accounting for 17% (6/36) of the mutated alleles identified in this study, deriving from a founder effect. We also characterized a novel multiexon 14 kb deletion spanning from intron 3 to intron 6 (g.8091T_22145Cdel). This study also revealed the first case of a *de novo* recessive mutation p.Q413P causing PS that arose in the proband's paternal allele, the maternal one carrying the p.L445W. The relevance of our results for genetic diagnosis of PS and non-syndromic EVA hearing loss is discussed.

European Journal of Human Genetics (2008) 16, 888–896; doi:10.1038/ejhg.2008.30; published online 20 February 2008

Keywords: Pendred syndrome; DFNB4 deafness; *SLC26A4* gene; *de novo* mutation; multiexon deletion

Introduction

Mutations in the *SLC26A4* gene cause Pendred's syndrome¹ (PS; MIM#274600) and DFNB4,² the latter being a non-syndromic form of hearing loss (MIM#600791) presenting

with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA). Pendred syndrome (PS) is an autosomal recessive condition characterized by sensorineural deafness and goitre which may account for up to 10% of profound childhood hearing impairment.³ Patients with PS typically suffer from pre- or peri-lingual hearing loss and they have congenital inner ear malformations ranging from EVA to Mondini malformation. Goitre is not a constant feature in PS and it only occurs in about one-third of patients who typically have abnormal iodide release by the thyroid on the perchlorate

*Correspondence: Dr C Hernández-Chico, Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Carretera Colmenar Km 9, 28034 Madrid, Spain.
Tel: +34 91 336 85 42; Fax: +34 91 336 90 16;
E-mail: chernandez.hrc@salud.madrid.org
Received 20 November 2007; revised 15 January 2008; accepted 17 January 2008; published online 20 February 2008

discharge test. In contrast, other patients with sensorineural hearing loss and EVA do not develop thyroid disease (non-syndromic EVA).

The *SLC26A4* gene (NM_000441) encodes pendrin (780 amino acids), a member of the SLC26 family of anion transporters.¹ Functional analysis showed pendrin is an apical transporter of iodide in thyroid cells,^{4,5} and it is likely to mediate secretion of HCO₃⁻ into the endolymph in the cochlea.⁶ Pendrin also mediates chloride/base exchange in the kidney cortex.⁷ Following the identification of the *SLC26A4* gene, the mutations in *SLC26A4* causing PS and non-syndromic EVA began to be characterized and more than one hundred mutant alleles have now been identified, mostly missense mutations. Some mutations are recurrent and have been identified in several populations, but many others have only been described in one family.^{8–15} Moreover, in many patients with PS or non-syndromic EVA only one mutation has been identified in the *SLC26A4* coding region while in others, no mutations at all have been identified in the coding sequence. Previous studies provide evidence that PS and *DFNB4* hearing loss are phenotypic variants of the same recessive genetic disorder, and other studies indicate non-syndromic EVA is a heterogeneous genetic condition which is often caused by a single mutation in *SLC26A4* in combination with other genetic or environmental factors.¹⁰ Furthermore, non-syndromic EVA was recently shown to segregate with digenic inheritance, in a patient carrying a mutation in the *SLC26A4* gene and another in *FOXI1* (MIM#601093), a gene encoding a transcriptional activator of *SLC26A4*.¹⁶

To gain a better understanding of the genetic basis of PS and non-syndromic EVA, we analysed 67 unrelated Spanish hearing-impaired families. The spectrum of *SLC26A4* mutations in our population involved mostly missense mutations and one multiexon deletion. We report on the prevalence of *SLC26A4* mutations in our cohort as well as the genotype–phenotype associations.

Subjects and methods

Subjects

A total of 105 patients from 67 unrelated families were included in this study that were divided into three groups on the basis of the clinical, audiological and genetic findings as follows: (A) 21 PS patients from 12 different families, all patients in this group display inner ear malformations including EVA or EVA with hypoplasia of the cochlea (Mondini malformation), goitre, and/or a positive result in the perchlorate test; (B) 43 cases with non-syndromic EVA from 35 unrelated families. In this group, 35 patients had EVA and eight had Mondini malformation, none developed goitre and the perchlorate test was normal in the nine cases on whom it was performed; (C) 41 patients from 20 unrelated families with non-syndromic hearing impairment segregating with the

DFNB4 locus, with no other available clinical data. These cases were selected from 115 families after genotype analysis with STR markers linked to the *DFNB4* locus.

Mutations in the *DFNB1* locus, the p.Q829X mutation in the *OTOF* gene and the mitochondrial 1555A>G mutation were ruled out as the genetic cause of deafness in all patients. Blood samples were obtained from all individuals after obtaining their written informed consent. DNA was purified from these by standard procedures.

Clinical examinations

Spanish patients with hearing impairment were referred to our laboratory for molecular diagnosis, having already undergone physical and age-appropriate audiological examinations. Additional clinical examinations included computed tomography of the temporal bones, ultrasonography to detect goitres, functional thyroid tests including serum-free thyroxine and thyrotropin, and the perchlorate discharge test to reach a firm diagnosis of PS. The perchlorate discharge test involved the oral administration of ¹³¹Iodide and the uptake of radioiodide in the thyroid was measured 2 h later, before potassium perchlorate was administered orally. The perchlorate discharge test was considered positive when 1 h after administration of the perchlorate, the amount of radioiodide in the thyroid decreased by more than 10% relative to the initial uptake.

Genotyping

Haplotype analysis was performed with STR markers, linked to the *DFNB4* locus on 7q31 (Cen-*D7S501-D7S2420-D7S496-D7S2459-D7S3312-D7S3074-D7S692-D7S2425*-Tel). *D7S2459* and *D7S3312* are intragenic microsatellites located in intron 10. To exclude alternative paternity in patient E343.1 who carries the *de novo* p.Q413P mutation, the members of the family were genotyped with markers linked to the *DFNB4* locus described above and with 17 STR markers located on chromosomes 2, 3, 10, 13 and 22 (data not shown).

SLC26A4 mutation screening

PCR amplification of the 20 exons coding for pendrin (2–21) and their flanking intronic sequences was performed with primers designed with Oligo v6.67 software (primer sequences and PCR conditions are available on request). PCR products were screened for mutations by DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) on a Wave™ DNA Fragment Analysis System (Transgenomic™, USA). All variant profiles were characterized by sequencing the product of a second PCR amplification using an ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). The two *FOXI1*-binding transcriptional regulatory elements in *SLC26A4* exon 1 were sequenced directly in each PS patient and in the ‘monoallelic’ E595.1 patient. The parental origin of the mutations was ascertained by direct sequencing of the variant PCR

product from the parents' DNA. Each *SLC26A4* sequence variant was tested in 214 unrelated normal-hearing controls by DHPLC, following the same procedure. Sequence variants were also tested in 144–341 Spanish patients with non-syndromic hearing impairment (NSHI). Mutation numbering is based on the *SLC26A4* cDNA sequence from Genbank (NM_000441), with the A of the translation start codon considered as nucleotide number 1.

Cloning of the *de novo* p.Q413P mutation

A *SLC26A4* genomic fragment spanning from exon 10 to exon 11 (4485 pb) was amplified by long-range PCR from the genomic DNA of patient E343.1. The PCR product was purified and cloned into the pSMART-cDNA vector (Lucigen Corporation). Subsequently, several recombinant plasmids were isolated and characterized by genotyping the intronic markers *D7S3312* and *D7S2459*, and sequencing exons 10 and 11.

Characterization of the *SLC26A4* multiexon deletion

Haplotype analysis of family S129 was performed on genomic DNA by PCR amplification of 17 *SLC26A4* single nucleotide polymorphisms located in introns 2–6, 8, 12, 14, 17–21 and taken from the NCBI SNP database. The amplified PCR products were then sequenced directly.

SLC26A4 gene dosage analysis of exons 1–10 was performed by real-time quantitative PCR using the Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Absolute quantification of amplicons was established by comparing the lowest threshold cycle (C_T) of the real-time PCR samples against a standard curve of known copy numbers. To map the deletion breakpoints, long range PCR was performed on genomic DNA using the Expand Long Template PCR System, with primers located at intron 2 and intron 7. A 6 kb PCR product was amplified with DNA from patient S129.2, which was later characterized by restriction mapping with the enzymes *Bam* HI, *Bgl* II and *Cla* I. Since there was a single *Bgl* II site in the PCR product, we performed a novel PCR using an upper primer located upstream of the *Bgl* II site and a lower primer at intron 7. The PCR product of approximately 2 kb was directly sequenced to characterize the breakpoint junction of the deletion. We also designed a test to detect the multiexon deletion by PCR amplification using primers DEL14 Kb-U (5'-AACAACTCCGAGAAGACC-3') and DEL14 Kb-L (5'-AAGATGTCTTAAAAGAAAAATG-3'), which produce a 314 bp fragment from the mutated allele and no PCR product from the wild type (Figure 1).

In silico analysis

The evolutionary conservation of pendrin residues among ten *SLC26A4* orthologues was investigated at the ClustalW EMBL-EBI web site (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). The pathogenicity of the intronic mutations was investigated using the BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project)

Splice Site Prediction program (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). RepeatMasker (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/>) was used to search for repetitive elements in introns 3 and 6. MAR-Wiz (<http://www.futuresoft.org/>) was used to search for scaffold/matrix attachment regions (S/MARs). Palindromic elements were searched for with Palindrome (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/palindrome.html>) and PatSearch (<http://www.ba.itb.cnr.it/BIG/PatSearch/>) was used to search for DNA sequence motifs known to be associated with deletion and translocation breakpoint junctions.¹⁷

Results

SLC26A4 mutation screening

Our cohort of 105 Spanish patients from 67 unrelated families included 12 families with PS, 35 with non-syndromic EVA and 20 families with hearing impairment that segregated with the *DFNB4* locus. In this cohort we identified a total of 26 different sequence variants (Table 1), 9 of which were novel. Most of the sequence variants are missense changes (18/26, 69.2%), six of which have not been described previously: p.V88I; p.P140H; p.Q413P; p.G424D; p.T485R; and p.Q514K. We also identified three frameshift mutations, one of which is the novel c.1238delA mutation that changes the Gln413 to Arg creating a premature stop codon after 54 amino acids. Furthermore, four splice site variants were detected, one of which is novel (c.1001+5G>T). The splice site prediction program used indicated that c.1001+5G>T would significantly affect splicing decreasing the score of the exon 8 splice donor site from 0.98 in the wild type to 0.21 in the mutated variant. None of the novel changes were identified in 214 normal-hearing Spanish controls with the exception of p.V88I (1/214). Furthermore, the novel missense changes p.P140H, p.Q413P, p.G424D, p.T485R and p.Q514K affected residues conserved among all 10 orthologues and thus we assumed that they are pathogenic mutations. By contrast, we considered p.V88I to be a low frequency polymorphism, since Val88 is not conserved and Ile occurs at position 88 in several *SLC26A4* orthologues. Indeed this change arose in *cis* in the maternal chromosome of patient S226.1 along with the p.R409H mutation.¹⁴ The previously reported p.G740V mutation in patient S707.1 was identified in *cis* with the p.T307M mutation, as found in a French patient.¹³ Gly at residue 740 is not conserved in *SLC26A4* orthologues and we found the previously reported p.G740S variant (NCBI SNP database, rs17154353) in one normal-hearing Spanish control. Hence, we concluded that the allelic variants p.G740V and p.G740S are rare polymorphisms.

SLC26A4 mutated alleles were tested in the group of unrelated Spanish patients with NSHI. This analysis detected a patient with the p.Q514K mutation, one with the p.D724G variant, and another carrying the p.G740V

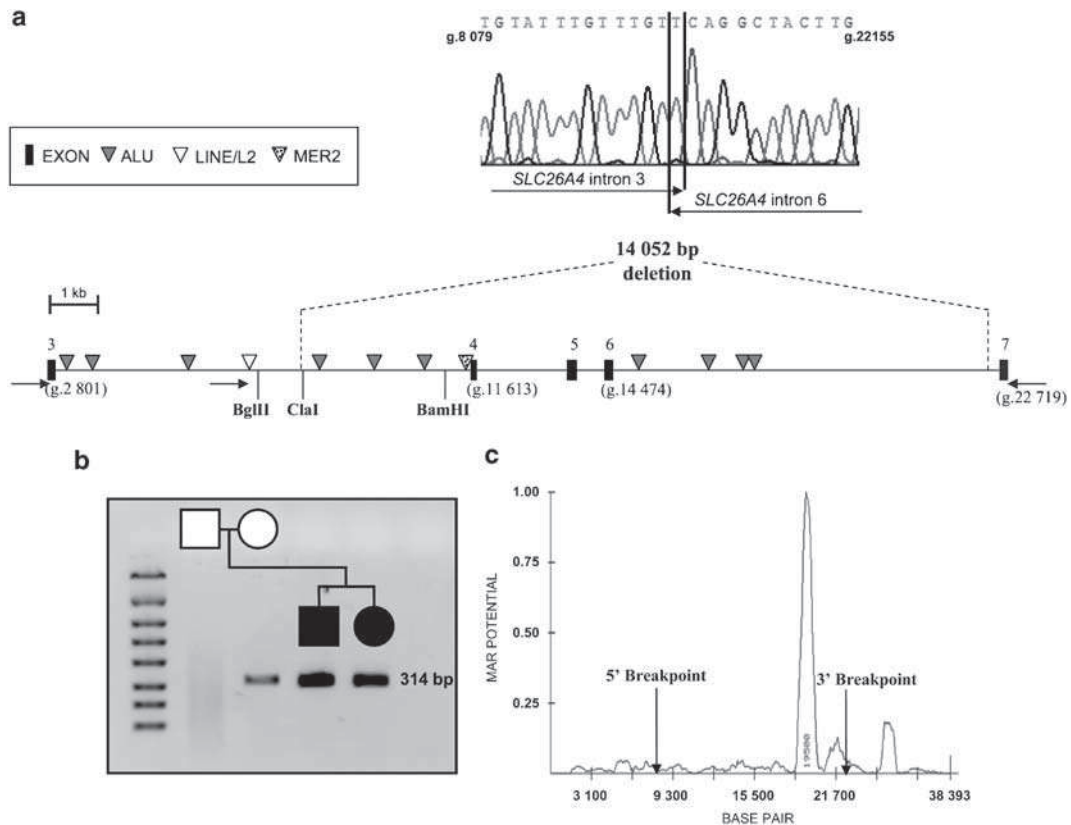


Figure 1 (a) Genomic organization of the *SLC26A4* gene around the deletion breakpoints. Exons, repetitive sequence elements and primers used for PCR amplification of the 6 and 2 kb fragments are indicated. The sequence electropherogram of the deletion junction fragment is shown in the upper panel. (b) PCR assay for testing the novel deletion. The presence of the deleted allele is reflected by a PCR product of 314 bp derived from the mother and the siblings of family S129. (c) MAR potential of *SLC26A4* regions around the deletion breakpoints according to the Mar-Finder algorithm. Coordinate numbering is based on the genomic sequence of *SLC26A4* (NT_007933).

polymorphism (Table 1). In all, 39 independent alleles were identified in this study, 36 of which are pathogenic.

The p.Q514K mutation was identified in six independent alleles (Table 1 and 2) and it was the most prevalent mutation, accounting for 17% (6/36) of the pathogenic alleles identified in this study. All six Spanish p.Q514K chromosomes shared a core haplotype defined by alleles 132, 146, 190 and 182 of markers *D7S496*, *D7S2459*, *D7S3312*, and *D7S3074*, respectively (Table 2). When assessed using a Fisher's exact analysis, the p.Q514K mutation was associated with the core haplotype ($P < 0.001$), suggesting that the p.Q514K chromosomes derived from a common founder.

Our mutational analysis of *SLC26A4* carried out does not detect intragenic deletions of the gene that may occur in the heterozygous state, so we further investigated the presence of exon deletions in family S129, with two PS siblings, in whom only a paternal p.T485R mutation was found. Members of the family were genotyped for a set of 17 single nucleotide polymorphisms along the *SLC26A4* gene and the segregation analysis revealed a loss of heterozygosity for the rs2712212 SNP in intron 6, for

which the siblings did not inherit the maternal allele. Indeed, a quantitative analysis of *SLC26A4* gene dosage, carried out by real-time PCR, confirmed that there was a reduced dose of exons 4 to 6 in the DNA from the mother and her two children. To determine the extent of the deletion, a long PCR assay was performed on the mother's DNA to amplify the *SLC26A4* gene from intron 2 to intron 7. The fragment identified in this assay was only 6 kb, smaller than the 20 kb fragment expected from the wild type allele. Restriction analysis of the PCR product defined the intervals where the breakpoints of the deletion might be located. Thus, we developed a robust PCR assay that produces a fragment of 2 kb and direct sequencing of this fragment revealed the breakpoint junction (Figure 1). Hence, we mapped the 5' and 3' deletion breakpoints at nucleotide positions g.8091 (intron 3) and g.22145 (intron 6) respectively. The novel g.8091T_22145Cdel removes a total of 14052 bp from the *SLC26A4* gene and disrupts the open reading frame, which would result in the truncation of the protein at residue 105. We developed a specific PCR assay to test this multiexon deletion (Figure 1b) and after deletion screening the cohort of 67

Table 1 SLC26A4 allelic variants identified in the Spanish population

Nucleotide change	Exon/intron	aa change	Probands (n = 127)	Mutated alleles ^a		Controls (n = 428)	^b Conservation of the affected residue	Ref
				NSHI				
c.85G>C	Exon 2	p.E29Q	1	0/282		1	9	11
c.262G>A	Exon 3	p.V88I	1	0/372		1	3	—
c.412G>T	Exon 4	p.V138F	2	0/676		0	10	12
c.419C>A	Exon 5	p.P140H	1	0/676		0	10	—
c.626G>T	Exon 6	p.G209V	1	0/676		0	10	18
c.920C>T	Exon 8	p.T307M	1	0/282		0	10	13
c.1003T>C	Exon 8	p.F335L	1	0/282		0	10	11
c.1226G>A	Exon 10	p.R409H	1	0/676		0	10	14
c.1229C>T	Exon 10	p.T410M	1	0/676		0	10	14
c.1238A>C	Exon 10	p.Q413P	1	0/676		0	10	—
c.1246A>C	Exon 10	p.T416P	2	0/676		0	10	14
c.1271G>A	Exon 11	p.G424D	1	0/676		0	10	—
c.1334T>G	Exon 11	p.L445W	2	0/676		0	10	19
c.1454C>G	Exon 13	p.T485R	1	0/676		0	10	—
c.1468G>A	Exon 13	p.G497S	1	0/676		0	10	2
c.1541C>A	Exon 13	p.Q514K	5	1/676		0	10	—
c.2171A>G	Exon 19	p.D724G	1	1/282		2	10	20
c.2221G>T	Exon 19	p.G740V	1	1/282		0	0	13
c.279delT	Exon 3	p.T94WfsX87	1	0/676		0	—	21
c.1197delT	Exon 10	p.C400FfsX67	2	0/676		0	—	1
c.1238delA	Exon 10	p.Q413RfsX54	1	0/676		0	—	—
c.416-TG>A	Intron 4	p.?	1	0/676		0	—	22
c.1001+1G>A	Intron 8	p.?	3	0/676		0	—	14
c.1001+5G>T	Intron 8	p.?	1	0/676		0	—	—
c.1614+1G>A	Intron 14	p.?	1	0/282		0	—	15
g.8091T-22145Cdel	Intron 3-6	p.G102DfsX4	1	0/282		—	—	—

^aNumber of independent alleles identified in Spanish subjects; (n) number of alleles tested; denominator denotes number of alleles tested in the group of patients with NSHI; novel alleles are underlined.

^bEvolutionary conservation affected the residue among *H. sapiens*, *R. norvegicus*, *M. musculus*, *P. troglodytes*, *M. mulata*, *C. familiaris*, *B. taurus*, *M. domestica*, *G. gallus* and *D. rerio* SLC26A4 orthologues (n=10); (Ref) first time published (see references). The Spanish family carrying the p.D724G mutation has been published previously.²³

Table 2 Haplotype analysis of p.Q514K chromosomes

Haplotypes	Microsatellites							Spanish chromosomes	
	D7S501	D7S2420	D7S496	D7S2459	D7S3312	D7S3074	D7S692	p.Q514K (n = 6)	Control (n = 64)
1	170	276	132	146	190	182	164	1	0
2	168	276	132	146	190	182	164	1	0
3	168	276	132	146	190	182	157	3	0
4	172	284	132	146	190	182	164	1	0
Core Haplotype			132	146	190	182		6	0

Allele sizes (bp) are shown. The relative order and physical distance of the STR markers are as follows: Cen-D7S501 (450 kb)-D7S2420 (265 kb)-D7S496 (176 kb)-D7S2459 (0.4 kb)-D7S3312 (260 kb)-D7S3074 (748 kb)-D7S692-Tel. D7S2459 and D7S3312 are intragenic markers.

patients, as well as 144 unrelated Spanish patients with NSHI, no other case carrying the novel deletion was found.

Sequence analysis of the regions surrounding the breakpoints demonstrated an array of repetitive elements with different similarities to the respective consensus sequences (Figure 1a). Also, seven topoisomerase I consensus cleavage sites (CTT, GTT, AAT and GAT) were detected, two of which (GTT and AAT) were located at the 5' and 3' breakpoints,

respectively. However, no extensive sequence homology between the breakpoint regions was found, ruling out unequal homologous recombination as the mechanism responsible for the deletion. Further analysis of the sequence over the entire deleted region indicated that the 3' breakpoint is flanked by an S/MAR (Scaffold attachment/matrix-associated region), with a high MAR potential (Figure 1c).

In the PS patient E343.1, we identified two pathogenic mutations: p.L445W (c.1334T>G in exon 11) and p.Q413P (c.1238A>C in exon 10). However, the haplotype analysis of members of the family did not coincide with a segregation of deafness with the *SLC26A4* locus since the patient and his unaffected sister inherited the same parental haplotypes (Figure 2a). Mutational analysis showed that patient E343.1 inherited p.L445W from his mother; however, p.Q413P was not found in DNA samples from either parent or from the unaffected sister, indicating that p.Q413P was a *de novo* mutation. After excluding alternative paternity, we investigated the parental origin of

the mutation in exon 10 by performing long-range PCR from exon 10–11 on genomic DNA from the patient. Genetic analysis of recombinant clones showed *de novo* mutation p.Q413P (c.1238A>C) occurred in the paternal allele, (Figure 2b). Indeed, the two missense mutations identified in the patient occurred in different parental alleles, in accordance with the recessive pattern of inheritance of PS/DFNB4 hearing loss.

Genotype and phenotype correlation

We screened 21 patients from 12 independent families with a clinical diagnosis of PS for mutations in *SLC26A4*. Within this group, we detected the two parental *SLC26A4* mutations in eight families (60%), while in the remaining four cases no mutation was found (Table 3). It is noteworthy that in the patients from three of the families that carried no mutations (S353, E67, and E412) the values of the discharge in the perchlorate test (12–16%) were close to the normal threshold (10%), while none of them developed goitre or displayed abnormal thyroid function (T4 and thyrotropin test). The fifth patient (S665.1) in whom no mutations were detected, at the age of 7, had a mild unilateral deafness in the right ear and unilateral Mondini malformation on the same side with positive perchlorate test (47%). Unilateral clinical presentation is rare in PS and since no *SLC26A4* mutations were found in patient S665.1, the initial diagnosis of PS may not be accurate.¹⁰

On the other hand, six (17%) of the 35 independent cases with non-syndromic EVA were found to carry two *SLC26A4* mutations while only one mutation was identified in patient E595.1, a sporadic case where unilateral cophosis was observed with EVA. Once again, a unilateral clinical defect was not associated with two mutations. Moreover, two mutated *SLC26A4* alleles were detected in four (20%) of the 20 familial cases (S9, S461, S471 and S707) in which sensorineural hearing loss segregated with the *DFNB4* locus. Clinical revision of several of these patients showed phenotypic traits of PS and non-syndromic EVA (Table 3). Taking all together, in our group of 67 unrelated families, 18 (27%) had two pathogenic mutations and one (1.5%) case carried only one mutated allele. Furthermore, we identified two patients carrying only one mutated allele p.Q514K, p.D724G in the group of patients with NSHI (Table 1). Since none of these patients had inner ear malformations, it is likely that they are coincidental carriers of the *SLC26A4* mutations and that their deafness is caused by mutations at other loci.

No genotype–phenotype correlation could be attributed to different *SLC26A4* mutations. However, if we compare the effect of two different classes of mutations, truncating mutations *versus* missense mutations, we found two patients from the S283 family who carried the c.279delT in homozygous state and had the most severe phenotype with respect to hearing loss (Table 3).

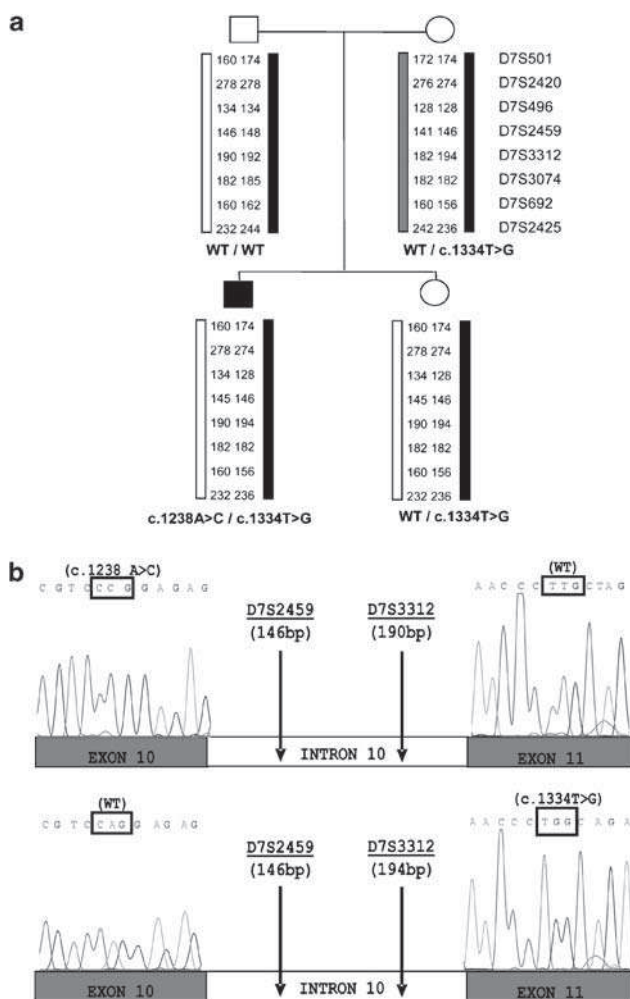


Figure 2 (a) Haplotypes of family E343. Segregation analysis was performed with 8 STR markers linked to the *SLC26A4* locus used to haplotype the families. Numbers indicate the sizes of the alleles in base pairs. (b) Genetic analysis of recombinant clones derived from the patient. Bars represent the cloned *SLC26A4* genomic fragments spanning from exon 10 to exon 11. Allele sizes of the intragenic markers *D7S2459* and *D7S3312* in base pairs (upper panel) are indicated and sequence electropherograms showing the *de novo* c.1238A>C mutation in the allele derived from the father and the c.1334T>G in the maternal allele.

Table 3 SLC26A4 genotypes and phenotypes of Spanish patients

Family	Genotype		Patients	Age	Deafness	Phenotype		Goitre	Perchlorate test ^a
	Paternal allele	Maternal allele				CT	CT		
S129	p.T485R	p.G102DfsX4	S129.3	22	Profound, bilateral	EVA	YES (ET)	P	
S145	p.T485R	p.G102DfsX4	S129.4	17	RE mild, LE moderate	EVA	NO (ET)	ND	
	p.C400FfsX67	p.Q514K	S145.3	21	RE moderate, LE severe	EVA	YES (HT)	ND	
S154 ^C	p.C400FfsX67	p.Q514K	S145.5	18	Profound, bilateral	EVA	YES (HT)	P	
	p.T410M	p.T410M	S154.1	61	Profound, bilateral	EVA	NO (ET)	ND	
	p.T410M	p.T410M	S154.2	53	Profound, bilateral	EVA	NO (ET)	ND	
	p.T410M	p.T410M	S154.3	62	Profound, bilateral	EVA	YES (HT)	P	
	p.T410M	p.T410M	S154.4	59	Profound, bilateral	EVA	YES (ET)	N	
S256	p.T410M	p.D724G	S154.18	14	RE profound, LE severe	MONDINI	NO (ET)	ND	
	p.G424D	p.T416P	S256.4	22	Profound, bilateral	MONDINI	YES (HT)	ND	
	p.G424D	p.T416P	S256.5	24	Profound, bilateral	MONDINI	YES (HT)	ND	
S283 ^C	p.T94WfsX87	p.T94WfsX87	S283.1	69	Cophosis, bilateral	EVA	YES (ET)	P	
	p.T94WfsX87	p.T94WfsX87	S283.2	64	Cophosis, bilateral	EVA	YES (ET)	N	
S670	p.C400FfsX67	p.1001+5G>T	S670.1	3	Severe, bilateral, mixed	MONDINI	NO (ET)	32%	
E343	p.Q413P	p.L445W	E343.1	7	Moderate, bilateral, progressive	MONDINI	NO (ET)	18%	
E697	c.416-1G>A	p.T416P	E697.1	37	Profound, bilateral	MONDINI	YES (HT)	ND	
	—	—	S353.3	8	Moderate, bilateral, mixed	MONDINI (unilateral)	NO (ET)	15%	
S665	—	—	S353.4	8	Moderate, bilateral, mixed	MONDINI	NO (ET)	12%	
	—	—	S665.1	7	RE moderate, LE normal hearing	MONDINI (RE)	NO (ET)	47%	
E67	—	—	E67.2	15	RE severe, LE moderate	EVA	NO (ET)	12%	
E412	—	—	E412.1	17	RE severe, LE moderate	EVA	NO (ET)	16%	
S67	p.G209V	p.Q514K	S67.3	8	Severe, bilateral	EVA	NO	ND	
	p.G209V	p.Q514K	S67.4	4	Severe, bilateral	EVA	NO	ND	
S226	p.E29Q	[p.V88I; p.R409H]	S226.1	44	RE moderate, LE mild	EVA	NO	ND	
	p.F335L	p.L445W	S938.1	6	Moderate, bilateral	EVA	NO	ND	
S938	p.F335L	p.L445W	S938.2	3	Profound, bilateral	EVA	NO	ND	
	p.F335L	p.L445W	S938.2	3	Profound, bilateral	EVA	NO	ND	
S1040	c.1001+1G>A	c.1001+1G>A	S1040.1	14	Profound, bilateral	EVA	NO	ND	
	c.1001+1G>A	c.1001+1G>A	S1040.3	6	Profound, bilateral	EVA	NO	ND	
E22	p.L445W	c.1614+1G>A	E22.2	24	Profound, bilateral	MONDINI	NO	ND	
E224	p.Q514K	p.Q514K	E224.3	2	Profound, bilateral	EVA	NO (ET)	ND	
E595	p.V138F	—	E595.1	New born	LE Cophosis; RE normal hearing	EVA (LE)	NO	ND	
S9	p.P140H	p.G497S	S9.3	6	Profound, bilateral	MONDINI	NO	ND	
	p.P140H	p.G497S	S9.4	4	Profound, bilateral	MONDINI	NO	ND	
S461	p.Q514K	p.V138F	S461.3	22	Profound, bilateral	EVA	NO	ND	
	p.Q514K	p.V138F	S461.4	19	Profound, bilateral	EVA	NO	ND	
S471 ^C	c.1001+1G>A	c.1001+1G>A	S471.2	29	Profound, bilateral	ND	YES	ND	
	c.1001+1G>A	c.1001+1G>A	S471.3	25	Profound, bilateral	ND	NO	ND	
S707	(p.T307M; p.G740V)	p.Q413RfsX54	S707.1	7	Profound, bilateral	ND	NO	ND	

Abbreviations: C, consanguineous families; CT, computed tomography; EVA, enlarged vestibular aqueduct; ET, euthyroid; HT, hypothyroid; LE, left ear; ND, not done; RE, right ear. Age in years at the time of clinical examination.

^aThe percentage indicates the levels of discharge of iodide; P, discharge higher than 10%; N, discharge lower than 10%.

Discussion

Mutational analysis of the *SLC26A4* gene on our cohort of 67 unrelated Spanish families identified 26 different variants (18 missense changes, three frameshift mutations, four splice site variants and one multiexon deletion), nine of which are novel. The pathogenic effect of the missense variants was assessed on the basis of two main criteria: the evolutionary conservation of the affected residue and its occurrence in a large control cohort of 214 normal hearing Spanish subjects. Thus, we concluded that p.V88I and p.G740V are rare, non-pathogenic polymorphisms. Two previously described missense mutations, p.E29Q and p.D724G, were found each one in a Spanish patient with non-syndromic EVA who carried another mutated allele in *trans*. However, one p.E29Q allele and two p.D724G alleles were also found in the 214 normal-hearing control population. Both mutated residues are conserved in all the mammalian orthologues, although the Glu at position 29 is not conserved in *Danio rerio*. The p.E29Q allele has been reported in two French patients^{9,13} and in other three cases of unknown ethnic origin^{11,20,24} and except in one patient, it is accompanied by a second mutation. The p.D724G mutation has only been described in one patient of unknown ethnic origin who also carried a second mutation,²⁰ as well as in our previously published Spanish family.²³ We did not find the p.D724G variant in the first screening of 70 healthy controls, but it was found twice when we augmented the size of the control population to 214 individuals. Although it is possible that the normal-hearing controls carrying these mutations may be heterozygous carriers, it seems advisable to further assess the deleterious effect of these missense changes.

Here we define the breakpoints of an intragenic deletion in the *SLC26A4* gene spanning from intron 3 to intron 6. Other two intragenic deletions (IVS2-IVS3del4 kb⁸ and IVS4-IVS6del²⁵) have been previously described, but the deletion breakpoints were not characterized. Thus, the 14052 bp deletion found in the Spanish patient is a novel occurrence. Characterizing the deletion breakpoints allowed us to design a simple PCR assay to test for the novel multiexon deletion. This test did not detect any other case carrying this deletion in our group of Spanish patients. However, it would be advisable to use this test to screen other populations, especially the patients in whom only one mutated allele has been detected. To investigate the deletion mechanism, we performed an *in silico* analysis of the genomic regions surrounding the breakpoints. No sequence homology between the breakpoint regions was found and hence, unequal homologous recombination seems unlikely to have caused the deletion. Accordingly, it would appear to be more probable that the deletion originated through a non-homologous recombination event mediated by several recombinogenic elements. In this regard, the 3' breakpoint is at the border of a highly destabilized fragment of DNA with a high S/MAR potential

that could be involved in generating the deletion, as reported previously.^{26,27}

With regards to the spectrum of *SLC26A4* mutations in Spain, our results reveal a majority of missense mutations (69.2%). Even though this occurs in other populations, the four mutations most commonly detected among Caucasian patients are not very frequent (p.T416P and c.1001 + 1G > A) or do not appear in our Spanish population (p.E384G and p.L236P).^{12,14} The mutational spectrum in Spain is similar to those of the Italian and French populations, sharing 12 of the *SLC26A4* alleles with the French¹³ and four with the Italian population.¹⁵ However, in our population the most frequent mutation is the novel p.Q514K found in six alleles (17%) that derives from a common founder.

By means of a comprehensive genetic analysis, we have identified the first case of a *de novo* mutation c.1238A > C (p.Q413P) in the proband from a PS family that showed no apparent segregation with the *DFNB4* locus. It is possible that the occurrence of *de novo* mutations may be the underlying reason for the large allelic heterogeneity of PS and non-syndromic EVA described in populations.

Regarding the prevalence of *SLC26A4* mutations in our cohort, the presence of two mutations is significantly higher in PS (8/12, 60%) than in non-syndromic EVA (6/35, 17%) ($P < 0.009$), as previously reported.^{10,28} This difference was evident even though the group of non-syndromic EVA subjects may include some cases of PS. The difference would be even higher if the four PS patients with no *SLC26A4* mutations are excluded from the count. These four patients aged between 8 and 17 years at time of clinical examination, did not show any thyroid alterations, and the discharge in the perchlorate test varied from 12–16%, values that should be considered as normal according to Pryor *et al*.¹⁰

In every PS proband and in the non-syndromic EVA patient E595.1 who carries only one mutated allele, we searched for mutations in both *SLC26A4* exon 1 (containing the binding *FOXII* transcriptional regulatory elements) and the *FOXII* gene. No such mutations were found in any of these patients (data not shown). With respect to the incidence of 'monoallelic' cases, we found only one case (E595.1) who had a unilateral affection (1/49, 2%, taking into account only the PS and non-syndromic EVA cases). In other groups studied, the incidence of 'monoallelic' cases is much higher, even though very different values have been reported. In a cohort of 100 French non-syndromic EVA, 16% were 'monoallelic' cases,¹³ while in other Caucasian groups of non-syndromic EVA or PS/non-syndromic EVA, 44%¹⁰ and 19%²⁸ 'monoallelic' cases were found respectively. To reach a conclusion about the pathogenesis of the single mutated *SLC26A4* alleles, more exhaustive genetic screenings should be performed to detect other *SLC26A4* mutations that might exist, such as intragenic deletions or mutations in the regulatory regions. Besides, functional

studies will be necessary to assess beyond doubt the pathogenic nature of the missense changes.

Acknowledgements

We are grateful to the patients and the clinicians who collaborated in this study. We additionally thank Dolores Telleria for assistance with the DHPLC analysis and sequencing. This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología research project SAF 2002-03966 and by the FP6 Integrated Project EUROHEAR (LSHG-CT-2004-512063).

References

- Everett LA, Glaser B, Beck JC *et al*: Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nature Genet* 1997; **17**: 411–421.
- Li XC, Everett LA, Lalwani AK *et al*: A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1998; **18**: 215–217.
- Fraser GR: Association of congenital deafness with goitre (Pendred's syndrome) a study of 207 families. *Ann Hum Genet* 1965; **28**: 201–249.
- Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP: The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 1999; **21**: 440–443.
- Royaux IE, Suzuki K, Mori A *et al*: Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 2000; **141**: 839–845.
- Wangemann P, Nakaya K, Wu T *et al*: Loss of cochlear HCO₃⁻ secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca²⁺ reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F1345–F1353.
- Royaux IE, Wall SM, Karniski LP *et al*: Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 4221–4226.
- Park HJ, Shaikat S, Liu XZ *et al*: Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J Med Genet* 2003; **40**: 242–248.
- Blons H, Feldmann D, Duval V *et al*: Screening of SLC26A4 (PDS) gene in Pendred's syndrome: a large spectrum of mutations in France and phenotypic heterogeneity. *Clin Genet* 2004; **66**: 333–340.
- Pryor SP, Madeo AC, Reynolds JC *et al*: SLC26A4/PDS genotype phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. *J Med Genet* 2005; **42**: 159–165.
- Campbell C, Cucci RA, Prasad S *et al*: Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations. *Hum Mut* 2001; **13**: 403–411.
- van Hauwe P, Everett LA, Coucke P: Two frequent missense mutations in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 1099–1104.
- Albert S, Blons H, Jonard L *et al*: SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur J Hum Genet* 2006; **14**: 773–779.
- Coyle B, Reardon W, Herbrick JA *et al*: Molecular analysis of the PDS gene in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 1105–1112.
- Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D *et al*: Differential diagnosis between Pendred and pseudo-Pendred syndromes: clinical, radiologic and molecular studies. *Pediatr Res* 2002; **51**: 479–484.
- Yang T, Vidarsson H, Rodrigo-Blomqvist S *et al*: Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and non-syndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). *Am J Hum Genet* 2007; **80**: 1055–1063.
- Abeyasinghe SS, Chuzhanova N, Krawczak M *et al*: Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer I: Nucleotide composition and recombination-associated motifs. *Hum Mutat* 2003; **22**: 229–244.
- Usami S, Abe S, Weston MD *et al*: Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. *Hum Genet* 1999; **104**: 188–192.
- Creemers CW, Admiraal RJ, Huygen PL *et al*: Progressive hearing loss, hypoplasia of the cochlea and widened vestibular aqueducts are very common features in Pendred's syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1998; **45**: 113–123.
- Prasad S, Kolln KA, Cucci RA *et al*: Pendred syndrome and DFNB4-mutation screening of SLC26A4 by denaturing high-performance liquid chromatography and the identification of eleven novel mutations. *Am J Med Genet* 2004; **124A**: 1–9.
- Kopp P, Arseven OK, Sabacan L *et al*: Phenocopies for deafness and goiter development in a large inbred Brazilian kindred with Pendred's syndrome associated with a novel mutation in de PDS gene. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999; **84**: 336–341.
- Palos F, Garcia-Rendueles M, Araujo-Vilar D *et al*: Pendred syndrome in two Galician families: insights into clinical phenotypes through cellular, genetic and molecular studies. *J Clin Endocrin Metab* 2007; **93**: 267–277.
- Arellano B, Pera A, Ramirez-Camacho R *et al*: Pendred's syndrome and non-syndromic DFNB4 deafness associated with the homozygous T410M mutation in the SLC26A4 gene in siblings. *Clin Genet* 2005; **67**: 438–440.
- Shears D, Conlon H, Murakami T *et al*: Molecular heterogeneity in two families with auditory pigmentary syndromes: the role of neuroimaging and genetic analysis in deafness. *Clin Genet* 2004; **65**: 384–389.
- Hao H, Wu L, Feng Y *et al*: Molecular analysis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct in the mainland Chinese: a unique SLC26A4 mutation spectrum. *J Hum Genet* 2007; **52**: 492–497.
- Albrecht P, Bode J, Buiting K *et al*: Recurrent deletion of a region containing exon 24 of the RB1 gene caused by non-homologous recombination between a LINE-1HS and MER21B element. *J Med Genet* 2004; **41**: e122.
- Xie F, Wang X, Cooper DN *et al*: A novel Alu-mediated 61-kb deletion of the von Willebrand factor (VWF) gene whose breakpoints collocate with putative matrix attachment regions. *Blood Cells Mol Dis* 2006; **36**: 385–391.
- Azaiez H, Yang T, Prasad S *et al*: Genotype-phenotype correlations for SLC26A4-related deafness. *Hum Genet* 2007; **122**: 451–457.

Functional assessment of allelic variants in the *SLC26A4* gene involved in Pendred syndrome and nonsyndromic EVA

Alejandra Pera^{a,1}, Silvia Dossena^{b,1}, Simona Rodighiero^c, Marta Gandía^a, Guido Bottà^d, Giuliano Meyer^d, Felipe Moreno^a, Charity Nofziger^b, Concepción Hernández-Chico^{a,2}, and Markus Paulmichl^{b,2}

^aUnidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Centro de Investigación Biomédica de Enfermedades Raras, ISCIII, 28034 Madrid, Spain; ^bInstitute of Pharmacology and Toxicology, Paracelsus Medical University, A-5020 Salzburg, Austria; and ^cCentro Interdisciplinare Materiali e Interfacce Nanostrutturate and ^dDepartment of Biomolecular Sciences and Biotechnology, Università degli Studi di Milano, 20122 Milan, Italy

Edited by David E. Clapham, Harvard Medical School, Boston, MA, and approved September 18, 2008 (received for review June 19, 2008)

Pendred syndrome is an autosomal recessive disorder characterized by sensorineural hearing loss, with malformations of the inner ear, ranging from enlarged vestibular aqueduct (EVA) to Mondini malformation, and deficient iodide organification in the thyroid gland. Nonsyndromic EVA (ns-EVA) is a separate type of sensorineural hearing loss showing normal thyroid function. Both Pendred syndrome and ns-EVA seem to be linked to the malfunction of pendrin (SLC26A4), a membrane transporter able to exchange anions between the cytosol and extracellular fluid. In the past, the pathogenicity of *SLC26A4* missense mutations were assumed if the mutations fulfilled two criteria: low incidence of the mutation in the control population and substitution of evolutionary conserved amino acids. Here we show that these criteria are insufficient to make meaningful predictions about the effect of these *SLC26A4* variants on the pendrin-induced ion transport. Furthermore, we functionally characterized 10 missense mutations within the *SLC26A4* ORF, and consistently found that on the protein level, an addition or omission of a proline or a charged amino acid in the *SLC26A4* sequence is detrimental to its function. These types of changes may be adequate for predicting *SLC26A4* functionality in the absence of direct functional tests.

ion transport physiology | genotype–phenotype correlation

Pendred syndrome (PS) (OMIM#274600) (1) is an autosomal recessive disorder characterized by sensorineural hearing loss (SNHL) and malformations of the inner ear, ranging from enlarged vestibular aqueduct (EVA) (2) to Mondini malformation (3), combined with deficient iodide organification in the thyroid gland, as demonstrated by the positive perchlorate discharge test in affected individuals (4–7). Another form of SNHL associated with EVA, however, showing normal thyroid function, is called nonsyndromic EVA (ns-EVA) (OMIM#600791). The clinical features of PS are the consequence of impaired pendrin function (1), a protein encoded by the *SLC26A4* gene (NM.000441). It is a member of the multifunctional anion transporter family SLC26, which mediates the exchange of anions including Cl^- , HCO_3^- , OH^- , I^- , or formate (8). Pendrin seems to be responsible for the efflux of iodide in thyrocytes (9–11), and for mediating $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in the kidney cortex (12) and inner ear. In the latter, pendrin is involved in the conditioning of endolymphatic fluid, presumably because of HCO_3^- secretion (13), thereby modifying inner ear acid-base homeostasis. A variable feature of PS is the development of goitre (apparent in only about 50% of the affected individuals). At the thyroid level, the role of pendrin is not conclusive. The transporter could act as an iodide transporter at the apical membrane of thyroid cells and impaired function could therefore lead to the iodide organification defect observed in PS patients (10, 11, 14–16). PS seems to be linked to bi-allelic mutations of the *SLC26A4* genes. ns-EVA is genetically more heterogeneous relative to PS, and although some cases show

mono- or bi-allelic *SLC26A4* mutations, other cases are not linked to the *SLC26A4* locus. Since its characterization, (1) more than 160 allelic variants of the *SLC26A4* gene have been described (www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor), all of which are located along the coding sequence, the splice sites, and in the noncoding exon 1 within the *FOXII* binding transcriptional regulatory elements (17). Approximately 62% of all mutations are missense changes, most of which have been described in only one family.

Previously, we identified 26 *SLC26A4* allelic variants, including 18 missense changes in a cohort of hearing-impaired Spanish families (18). In this study, we screened the *SLC26A4* coding sequence in a cohort of normal hearing controls. Using the fast fluorometric method for measuring Cl^-/I^- transport via pendrin as described earlier (19, 20), we performed functional analyses on one mutant in the *SLC26A4* protein found only in our control cohort (L597S), as well as on nine mutants found in our cohort of controls or patients suffering from PS or ns-EVA (18). To further examine the *SLC26A4* structure/function relationship, we also tested two *in silico* designed mutations. The summarized experiments allowed us to rate the mutations in accordance to the respective ion transport. In the future, this approach, combined with an evaluation of *SLC26A4* genetics (mono- or bi-allelic, cis- or trans-position), could permit a more reliable approach for distinguishing PS and ns-EVA-associated mutations from polymorphisms.

Results

Mutations of the *SLC26A4* Gene Found in the Normal-Hearing Spanish Population. In our cohort of 214 normal-hearing Spanish subjects, we identified a total of 17 allelic variants (Table 1). The eight mutations, which did not lead to an amino acid sequence change, were not further investigated (see Table 1, Group A). They include the two silent mutations, L75L and D710D, the five intronic *SLC26A4* polymorphisms, and the mutation in the noncoding region of exon 21. The other nine missense mutations located within the *SLC26A4* open-reading frame (ORF) (see Table 1, Group B), all led to an amino acid sequence change in

Author contributions: S.D. and M.P. designed research; A.P., S.D., and S.R. performed research; S.D., S.R., M.G., G.B., G.M., F.M., and M.P. analyzed data; and S.D., C.N., C.H.-C., and M.P. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

¹A.P. and S.D. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. E-mail: markus.paulmichl@pmu.ac.at or chernandez.hrc@salud.madrid.org.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0805831105/DCSupplemental.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

Table 1. SLC26A4 allelic variants detected in Spanish normal-hearing controls and in a cohort of hearing impaired patients

Group	Nucleotide change	aa change	Exon/ Intron	Controls (n = 428)	*Patients (n = 409)	References
A	225C > G	L75L	Ex 3	1	0	Present study
	2130C > T	D710D	Ex 19	1	1	Present study
	1–32G > A	—	In 1	1	0	Present study
	165–32A > G	—	In 2	1	0	Present study
	601–17C > T	—	In 5	3	0	Present study
	1708–18T > A	—	In 15	16	>3	Present study
	2320–22T > C	—	In 20	5	0	Present study
	2498A > T	—	Ex 21	1	0	Present study
B	85G > C	E29Q	Ex 2	1	1	(4), (5), (17), (22), (36), (37)
	262G > A	V88I	Ex 3	1	1 (V88I/R409H)	[†] (18)
	1061T > C	F354S	Ex 9	3	0	(4), (22)
	1790T > C	L597S	Ex 16	1	0	(4), (5), (17), [†] (22), (34), (35)
	1826T > G	V609G	Ex 17	2	2	(17), (22), [†] (35)
	2000T > G	F667C	Ex 17	1	0	(1)
	2171A > G	D724G	Ex 19	2	2	(36), (38)
	2218G > A	G740S	Ex 19	1	1	(36)
	2326C > T	R776C	Ex 21	1	1	[†] (21), [†] (24), (35)

The mutants which did not (Group A) or did (Group B) lead to a change in amino acid sequence are presented. All mutations were identified in different alleles at the heterozygous state, except for V609G and G740S, which were identified on a single allele. Albert *et al.* (22) referred to the L597S allelic variant as an SNP, whereas others assumed it would have a negative functional effect, as subjects carrying the respective mutation showed PS/ns-EVA (4, 5, 34, 35). Our functional analyses showed that ion transport carried out by L597S mutants is not significantly different from WT SLC26A4. Therefore, our results support the findings by Albert *et al.* *n*, number of alleles tested. The numbers indicate how often the mutant allele was identified in a group of unrelated Spanish patients, including 144 cases with SNHL, 12 with PS, 35 with ns-EVA, and 20 cases with SNHL segregating with the *DFNB4* locus (18).

*Data taken from ref. 18. References denote previous works that consider the variant as pathogenic.

[†]Reports that questioned whether the variant is pathogenic.

SLC26A4. Three of them (F354S, L597S, and F667C) were only found in the normal-hearing cohort and a functional implication of these mutations seemed unlikely. However, the L597S mutation was included in the present study because conflicting assumptions have been made regarding its transport function. The six remaining mutations found in the normal-hearing cohort were also identified in patients suffering from PS or ns-EVA (Table 2, group A). However, two of them (V609G and G740S) were previously described in the National Center for Biotechnology Information database as SNPs. In addition, it was previously shown that R776C did not compromise SLC26A4 transport function (21). Therefore, the transport ability of E29Q, D724G, V88I, and L597S were tested in the present study.

Functional Assay of SLC26A4 Mutations Found in the Spanish Population. For the functional assays, we first selected the four mutations mentioned above (L597S, E29Q, D724G, and V88I). The hearing impaired patient carrying V88I showed a combined mutation in *cis* (V88I/R409H); therefore, this double mutation was tested in addition to the V88I. Finally, we selected five new missense mutations that have only been described in Spanish patients suffering from PS/ns-EVA (P140H, Q413P, G424D, T485R and Q514K) (see Table 2, Group B) (18).

To assay the transport function of the SLC26A4 allelic variants, we used a recently described fast fluorometric method for measuring chloride/iodide (Cl⁻/I⁻) transport (19, 20). With this technique, SLC26A4-mediated anion flux is measured by monitoring I⁻- and Cl⁻-induced quenching of an enhanced-yellow fluorescent protein (EYFP) fluorescence signal (19). In the first set of experiments, the change in fluorescence in cells transfected with both EYFP and pendrin or EYFP alone (the empty vector) were measured after a Cl⁻ to I⁻ (or vice versa) substitution. As seen in Fig. 1, the expression of WT pendrin lead to a marked decrease (Cl⁻ to I⁻ substitution) (see Fig. 1) or increase (I⁻ to Cl⁻ substitution) [supporting information (SI) Fig. S1] in EYFP fluorescence intensity. These data are indicative of a facilitated iodide transport (a more detailed description of the technique is given in *Methods* and *SI Materials and*

Methods). The transport values (ΔF_{\max} %) of WT pendrin described in this study are similar to those described earlier (20).

The fluorescence values of L597S and V88I were not significantly reduced as compared to WT pendrin (see Fig. 1A and Fig. S1a). Four of the mutations tested (E29Q, V88I/R409H, G424D, and T485R) showed a statistically significant reduction in fluorescence values as compared to WT pendrin (Cl⁻ to I⁻ substitution or vice versa), indicating that anion transport carried by these mutants is reduced (see Fig. 1a and Fig. S1a). No iodide transport activity could be observed with P140H, Q413P, Q514K and D724G (see Fig. 1b and Fig. S1b), as evidenced by the fact that the changes in fluorescence were not statistically different from those carried out using the empty vector.

Functional Assay of *in-Silico* Designed SLC26A4 Mutations. It became evident from the experiments mentioned above that a loss-of-function SLC26A4 protein can be observed if amino acids with structural impact (charged amino acids or proline) are deleted from or added to the sequence. To confirm this hypothesis, we used two mutations found in the control cohort that showed no reduction in transport activity. Accordingly, V88I and L597S were transformed into V88P and L597P, respectively. As expected, the insertion of the proline rendered SLC26A4 inactive (Fig. 2).

Discussion

The aim of the present study was, (i) to validate previous criteria used to predict functional implications of SLC26A4 mutations; (ii) to functionally test 10 missense mutations identified in the healthy control population or in patients suffering from PS/ns-EVA; and (iii) to test if the insertion of an amino acid with structural impact alters SLC26A4 function. It is our hope that the results of the experiments summarized will provide an avenue for predicting SLC26A4 activity, especially in cases where functional assays cannot be performed.

The two criteria used so far for assuming pathogenicity of mutations in the SLC26A4 gene are low incidence of the mutation in the control population and substitution of evolu-

Table 2. Comparison of the genotype and phenotype of the patients with hearing loss mentioned in Table 1, and of the patients included in the study whose mutations were not found in the control population

Group	Patient	Genotype		Sex	Age	Phenotype				Origin	
		Allele 1	Allele 2			Deafness	CT	Goitre	PT		
A	S226.1	p.E29Q [†]	[p.V88I; p.R409H] [†]	F	44	R.E. moderate/L.E. mild	EVA	No	ND	Castilla	
	S154.18	p.T410M	p.D724G*	M	14	R.E. Profound/L.E. severe	Mondini	No (ET)	ND	ND	
	E205.3	p.D724G*	—	F	2	Severe, bilateral	Normal	No	ND	Cataluña	
	E206.3	[p.V609G; p.D710D; p.G740S]	—	F	5	Profound, bilateral	Normal	No	ND	Cataluña	
	E277.3	p.V609G	—	F	5	Moderate, bilateral	Normal	No	ND	Cataluña	
	E502.3	p.G740S	—	F	7	Moderate, bilateral	Normal	No	ND	Cataluña	
	S877.1	p.R776C	—	M	14	Profound, bilateral	Normal	No	ND	Castilla/Andalucia	
	B	S9.3	p.P140H*	p.G497S	M	6	Profound, bilateral	Mondini	No	ND	ND
		S9.4	p.P140H*	p.G497S	F	4	Profound, bilateral	Mondini	No	ND	ND
		E343.1	p.Q413P*	p.L445W	M	7	Moderate, bilateral, progressive	Mondini	No (ET)	P	Cataluña
S256.4		p.G424D [†]	p.T416P	F	22	Profound, bilateral	Mondini	Yes (HT)	ND	Aragón	
S256.5		p.G424D [†]	p.T416P	M	24	Profound, bilateral	Mondini	Yes (HT)	ND	Aragón	
S129.3		p.T485R [†]	p.G102DfsX4	F	22	Profound, bilateral	EVA	Yes (ET)	P	Pais Vasco	
S129.4		p.T485R [†]	p.G102DfsX4	M	17	R.E. mild/L.E. moderate	EVA	No (ET)	ND	Pais Vasco	
S145.3		p.C400FfsX67	p.Q514K*	M	21	R.E. moderate/L.E. severe	EVA	Yes (HT)	ND	Castilla	
S145.5		p.C400FfsX67	p.Q514K*	M	18	Profound, bilateral	EVA	Yes (HT)	P	Castilla	
S67.3		p.G209V	p.Q514K*	M	8	Severe, bilateral	EVA	No	ND	ND	
S67.4	p.G209V	p.Q514K*	M	4	Severe, bilateral	EVA	No	ND	ND		
E224.3	p.Q514K*	p.Q514K*	M	2	Profound, bilateral	EVA	No (ET)	ND	Cataluña		
S461.3	p.Q514K*	p.V138F	M	22	Profound, bilateral	EVA	No	ND	ND		
S461.4	p.Q514K*	p.V138F	M	19	Profound, bilateral	EVA	No	ND	ND		
S1206.1	p.Q514K*	—	M	1	Profound, bilateral	Normal	No	ND	Cataluña		

Group A: Patients bearing mutations described also in controls. Group B: Patients bearing mutations described only in hearing impaired individuals. Abbreviations: CT, computed tomography; ET, euthyroid; F, female; HT, hypothyroid; L.E., left ear; M, male; ND, not determined; PT, perchlorate test; R.E., right ear. An iodide discharge higher than 10% is indicated as P. *, †, denote the transport ability of the mutated protein: * no activity, † reduced. Age in years at the time of clinical examination.

tionary conserved amino acids. However, we found that five of the missense changes in healthy individuals (E29Q, F354S, L597S, F667C, and D724G) affect amino acids located in highly conserved regions of the SLC26A4 orthologs (Fig. 3). None of them, except L597S (22), were detected in other normal-hearing Caucasian controls. Two of these mutations—partially active E29Q and completely inactive D724G—have negative functional implications on SLC26A4 transport, and occurred one and two times out of 214 control subjects, respectively (see Tables 1 and 2). The latter two mutants were also identified in PS/ns-EVA patients (see Tables 1 and 2). Therefore, these observations demonstrate that the location of a mutation in a conserved string of amino acids is not a reliable parameter for predicting a functional impairment of SLC26A4, and a high incidence of a mutation in the control population is not a reliable parameter for predicting a lack of functional impairment. This conclusion is further substantiated when estimating the prevalence for hereditary hearing impairments using the aforementioned criteria and the mutations found in the healthy individuals described in this study. Assuming that E29Q, F354S, L597S (conflicting data), F667C, and D724G cause deafness because they occur in a highly conserved string of amino acids, the carrier frequency of SLC26A4 mutated alleles should be 1 in 27 (or 30, excluding L597S). The derived prevalence for SLC26A4 recessive hearing loss should then be 1 in 2,900, which comprises around 68% of hereditary hearing impairments. This figure is much too high and inconsistent with the reported prevalence derived from previous clinical and genetics studies (23, 24). The reason for the apparent high prevalence we obtained is obviously the result of an ill-defined link between hearing impairment and allelic variants found in the SLC26A4 gene, again underlining the fact

that a mutation found in a string of highly conserved amino acids is not a reliable parameter for predicting SLC26A4 functionality.

We next tested six novel mutations described recently (18) in Spanish PS/ns-EVA patients (V88I/R409H, P140H, Q413P, G424D, T485R, and Q514K). The double mutation (V88I/R409H) showed a reduced transport activity, whereas the single V88I mutation did not lead to a functional impairment (see Fig. 1A and S1a). These data indicate that ns-EVA identified in the patient carrying the double mutation V88I/R409H is most likely not related to the V88I mutation, but instead to the partially functional R409H mutation (25). The mutations G424D and T485R resulted in reduced function, whereas the mutations P140H, Q413P, and Q514K showed no transport activity (see Fig. 1, and Fig. S1). It is difficult at the moment to unambiguously link the severity of hearing loss (moderate, severe, and profound) (see Table 2) to individual SLC26A4 mutations. Mutations with no transport activity (P140H, Q413P, Q514K, and D724G) and with reduced activity (E29Q, V88I/R409H, G424D, and T485R) were equally identified in patients with PS and ns-EVA suffering from moderate-to-profound hearing loss. The simplest explanation for the difficulty to correlate a specific SLC26A4 mutation to the clinical symptoms of a patient is that additional genetic, epigenetic, and environmental factors could substantially modify the observed disease phenotype. This explanation is substantiated by the fact that SLC26A4 zero-mutants can show EVA and severe hearing loss, and patients with mono-allelic SLC26A4 mutations (see Table 2) can show severe-to-profound hearing loss without EVA. Despite the fact that it is difficult at the moment to correlate genotype (SLC26A4) and phenotype (moderate-to-profound hearing loss), it is noteworthy mentioning that patient E224.3 (see Table 2), who is homozygous for the Q514K mutation (loss-of-

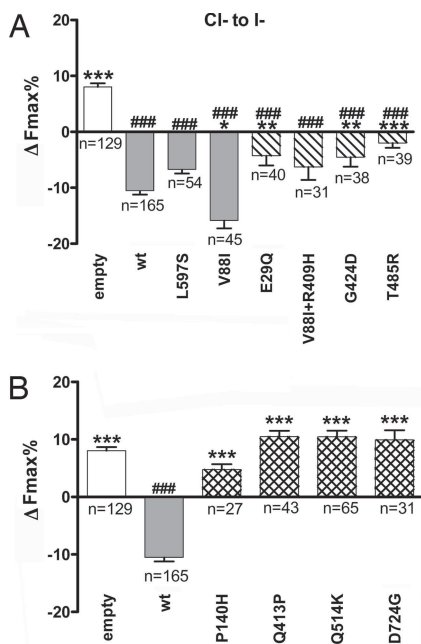


Fig. 1. Change of the fluorescence signal ($\Delta F_{max}\%$) after the Cl^- to I^- switch (for details see *Methods*) in HEK 293 Phoenix-cells expressing solely the EYFP protein (empty), the WT pendrin and EYFP (wt), or the different mutants together with the EYFP protein. The numbers of the experiments are given (*n*). (A) Summary of the experiments using the mutants, which are not reduced if compared to WT (gray), and whose activity is reduced (cross lines). (B) Summary of the experiments using the mutants whose activity is annihilated (crossed lines) compared to WT [the values from cells expressing only EYFP (empty), and WT pendrin are taken from (A)]. The numerical data to all histograms shown in this study are given in *Table S1*. Statistical analysis: ***, $P < 0.001$ vs. WT; **, $P < 0.01$ vs. WT; *, $P < 0.05$ vs. WT; ###, $P < 0.001$ vs. empty; ##, $P < 0.01$ vs. empty; #, $P < 0.05$ vs. empty.

function), had bilateral, sensorineural, profound deafness at the age of 2; whereas patient S226.1, who carries two mutations with only reduced transport activity (E29Q and V88I/R409H), had sensorineural, moderate-to-mild hearing loss at the age of 44.

From data presented here, it is apparent that certain biochemical parameters could act as guide-posts for possible func-

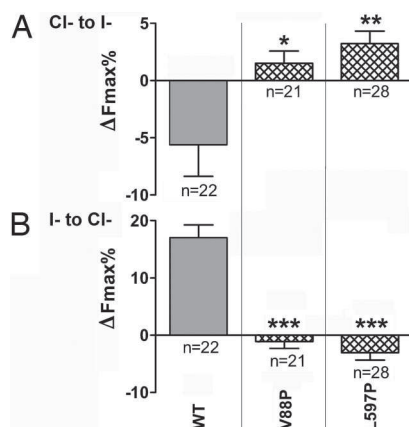


Fig. 2. Change of the fluorescence signal ($\Delta F_{max}\%$) after the respective anion-exchange in HEK 293 Phoenix-cells expressing EYFP and WT pendrin (wt), or the two different *in silico* designed mutants: (A) Cl^- to I^- and (B) I^- to Cl^- . To test the “proline/fixe-charge” role of our hypothesis we mutated V88I and L597S (see Fig. 1) into V88P and L597P, respectively. The insertion of a proline leads to an annihilation of the SLC26A4-induced anion transport. Statistical analysis: ***, $P < 0.001$ vs. WT; **, $P < 0.01$ vs. WT; *, $P < 0.05$ vs. WT.

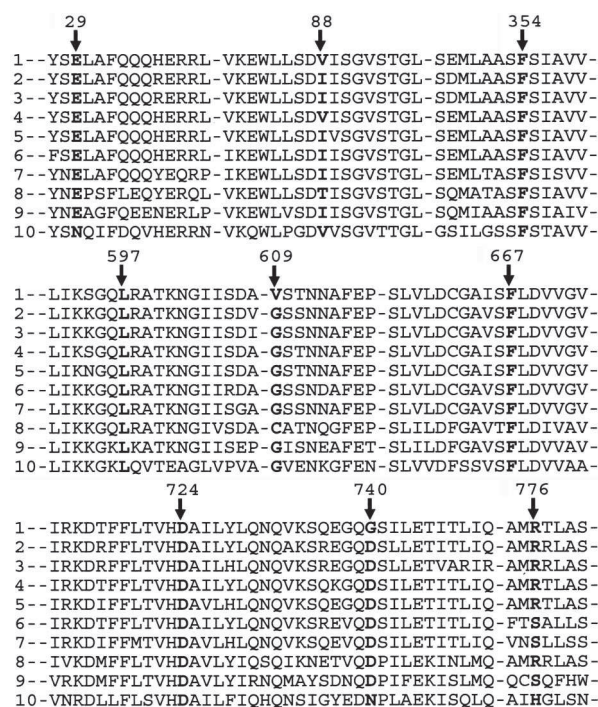


Fig. 3. Protein sequences of 10 *SLC26A4* orthologs, including: (1) *Homo sapiens* (NP.000432), (2) *Rattus norvegicus* (NP.062087), (3) *Mus musculus* (NP.035997), (4) *Pan troglodytes* (XP.519308), (5) *Macaca mulatta* (XP.001094049), (6) *Canis familiaris* (XP.540382), (7) *Bos taurus* (XP.608706), (8) *Monodelphis domestica* (XP.001363598), (9) *Gallus gallus* (XP.425419), and (10) *Danio rerio* (XP.692273). The mutations found in the Spanish control population, which lead to a changed amino acid sequence as summarized in *Table 1*, are given with the position-number and arrows. Some of these mutations (i.e., at positions 29, 88, 609, 724, 740, and 776) are also found in hearing-impaired patients. ‘-’ indicates sequence interruptions. The single letter code for the amino acids is given in *SI Materials and Methods*.

tional impairments. In all mutations tested, an impairment of transport function was found if an amino acid bearing a fixed charge [aspartic-acid: (D^-); single letter code and the sign indicates the fixed charge] or glutamic-acid (E^-), lysine (K^+) or arginine (R^+), and histidine (H^+); the positive charge of histidine depends on the pH] was missing or introduced. Furthermore, the loss or inclusion of a proline (P; proline acts as a structural disruptor of regular secondary structures such as α -helices or β -sheets) in the SLC26A4 sequence was detrimental for transport function. These findings are consistent with the functional data published so far, with one exception. Pfarr *et al.* (21) described an allelic variant (R776C) that, on a functional level, is indistinguishable from controls. However, this particular arginine is located on the extreme C terminus of SLC26A4 (a 780 aa protein). The N terminus and C terminus of a protein are usually not structurally defined. Therefore, it is plausible to assume that mutations occurring in these areas probably have little or no functional implication. Scott *et al.* (26) described two inserted prolines (L236P and T416P, two very common mutations in PS) associated with a loss of function. Furthermore, the same authors described two separate mutations occurring in PS/ns-EVA patients, in which an amino acid with a fixed charge was added or omitted (E384G and V480D). Both mutations showed a loss of or reduced function, respectively. In yet another study performed by Taylor *et al.* (27) on PS/ns-EVA patients, three mutations of the same type (G672E, G102R, and Q446R) were described, and all showed a loss of functionality. We recently described a mutation, S28R, which again, reduced functionality (14, 19). Another mutation, R409H, in which a

fixed charge is altered (the pK_a of histidine is 6.0, and therefore only a minute amount of histidine will be charged at physiological pH of 7.4), also shows a reduced functionality, and therefore follows the proposed role (25). Moreover, the transformation of two allelic variants (V88I and L597S) that were not functionally different compared to WT SLC26A4, into mutations fitting the proline/fixed charge role (i.e., V88P and L597P), resulted in the annihilation of transport activity. Although, it is important to note that mutations that do not enter into this proline/fixed charge role can be functionally detrimental or without functional implication (15, 20, 21, 26, 27). In these cases, only functional tests can unambiguously distinguish between different *SLC26A4* gene mutations in SNPs and those mutations that actually cause a reduced function and ultimately disease symptoms.

In conclusion, we show that the two parameters used so far—(i) low incidence of the mutation in the control population and, (ii) substitution of evolutionary conserved amino acids by the mutation—are not reliable for predicting SLC26A4 transport function. Our functional test using mutations found in healthy and hearing-impaired individuals further reveals that the proline/fixed charge role—that is, the addition or omission of proline, or the addition or omission of charged amino acids in the sequence of SLC26A4—might be a better option for predicting SLC26A4 function in the cases where direct functional tests cannot be performed.

Methods

Subjects. A cohort of 214 normal-hearing individuals of Spanish–Caucasian population, 74 females and 140 males, aged 23 to 75 years, was collected. Auditory capacity was established by evaluating the pure-tone air- and bone-conduction threshold audiometry. Subjects gave written informed consent for genetic testing.

Mutational Analysis of *SLC26A4* Gene. DNA was obtained from blood samples following standard procedures. Mutation screening of the *SLC26A4* gene was performed by PCR amplification of the coding 2–21 exons and the flanking intron sequences as described in detail in *SI Materials and Methods*.

***SLC26A4* Site-Directed Mutagenesis.** The site-directed mutagenesis of SLC26A4 was done as described in detail in (14), and in *SI Materials and Methods*.

Cell Culture and Transient Transfection. HEK 293 Phoenix cells (this is a second generation retrovirus producing cell line for the generation of helper free ectopic and amphotropic retroviruses) (28) were grown as previously described (14, 19). Briefly, cells were grown in Minimum Essential Medium Eagle (Sigma) supplemented with 10% FBS (Cambrex BioScience), 2-mM L-glutamine, 100-units/ml penicillin, 100- μ g/ml streptomycin, and 1-mM pyruvic acid (sodium salt). The cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂, 95% air-humidified incubator; subcultures were routinely established every second to third day seeding cells in Petri dishes (\varnothing 10 cm) after trypsin/EDTA treatment. For *in vivo* functional fluorometric assays, HEK 293 Phoenix cells were transiently transfected with the plasmid expressing WT SLC26A4, the mutant or the empty plasmid (negative control) by calcium-phosphate precipitation. One day before transfection, cells were seeded on six multiwells (\varnothing 35 mm) and grown to 60% to 80% confluency. For each well, 3 μ g of plasmid dissolved in 61.5- μ l H₂O were mixed with 7.5 μ l of buffer A (CaCl₂ 2.5 M), and 75 μ l of buffer B (140-mM NaCl, 1.5-mM Na₂HPO₄, 50-mM Hepes, pH 7 adjusted with NaOH) and incubated 10 to 15 min at room temperature. The transfection mix

was spread over the cells, adding it to the complete growing media; after incubation of 8 to 10 h, the cells were washed twice with fresh medium-containing serum. For the fluorescence measurements, 24 h after transfection cells were split on round, poly-L-lysine-coated coverslips (\varnothing 40 mm), kept in medium containing serum, and fluorescence measurements were performed 48 to 56 h after transfection, in the absence of serum, using the saline solutions described below.

Fluorometric Analyses. The fluorometric method was described previously in detail (19, 20). In brief, the SLC26A4 protein is able to transport chloride (19, 29, 30) as well as iodide (11, 15, 27, 31, 32), and therefore, because the EYFP protein is a fluorescent dye sensitive to intracellular halides, this dye is particularly suitable for sensing changes in the intracellular chloride as well as iodide amount, and therefore to measure the respective ion fluxes across the cell membrane. By changing the extracellular chloride or iodide concentration in cells over-expressing the SLC26A4 protein and comparing the result with the result obtained in cells not over-expressing SLC26A4, the transport contribution of SLC26A4 can be easily determined. To evaluate the pendrin-induced halide transport, HEK 293 Phoenix cells were transfected with pRES2-EYFP plasmid bearing the respective *SLC26A4* or mutant *SLC26A4* cDNA, or with the empty plasmid. The cells were continuously perfused in a laminar-flow chamber (FCS2 System, Biotech Inc.) with “isotonic high Cl⁻” (2-mM KCl, 135-mM NaCl, 1-mM MgCl₂, 1-mM CaCl₂, 10-mM D-glucose, 20-mM Hepes, pH 7.4, 308 mOsm with mannitol) or “isotonic high I⁻” (2-mM KCl, 135-mM NaI, 1-mM MgCl₂, 1-mM CaCl₂, 10-mM D-glucose, 20-mM Hepes, pH 7.4, 308 mOsm with mannitol) solutions. By changing the isotonic high Cl⁻ to isotonic high I⁻ solution, the iodide influx can be measured, whereas by switching back from isotonic high I⁻ to isotonic high Cl⁻ solution, the iodide efflux can be estimated. We define a reduced transport activity if the in- or efflux capacity of a mutant is reduced if compared to WT SLC26A4. The EYFP fluorescence measurements were performed using a Leica TCS SP2 AOBs confocal microscope (Leica Microsystem), using a 515-nm Ar/ArKr laser line for exciting the EYFP fluorescence. Measurements were started after steady-state conditions were reached. Maximal fluorescence variations (ΔF_{\max} %) represent the maximal observed percentage difference with respect to the fluorescence intensity at the moment of the solution substitution (iodide/chloride). Because iodide is able to quench the EYFP signal more efficiently than chloride (33), the slight increase of fluorescence observed in control cells not over-expressing SLC26A4 (see Fig. 2, empty), is pointing to the fact that the chloride exit prevails the iodide influx. Therefore, the transporters or channels able to pass iodide from the extracellular space toward the cytosol are scarcely active in the native HEK 293 Phoenix cell line we use. This cell line is therefore particularly suited to test SLC26A4-induced halide transport activity after the over-expression of the transporter or its mutants. After the expression of WT SLC26A4, however, the exchange of extracellular chloride with iodide leads to a marked reduction of the EYFP fluorescence because of the SLC26A4-driven iodide influx (see Figs. 1 and 2, WT).

Statistical analysis was done by ANOVA–Bonferroni’s multiple comparison test, and statistical significant differences were assumed at P -values ≤ 0.05 .

ACKNOWLEDGMENTS. We thank the normal-hearing subjects who collaborated in this study. We additionally thank Dolores Telleria for assistance with the denaturing high-pressure liquid chromatography analysis and sequencing, and Paolo Beck-Peccoz for suggestions and for reading the manuscript. This study was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología research project SAF 2002–03966 and by the FP6 Integrated Project EUROHEAR (LSHG-CT-2004–512063). This work was further supported by the Italian Ministry of Instruction, University and Research (MIUR, 2003060317), the Austrian Science Fund (P18608-B05), and the Paracelsus Medical University research fund. This work was made possible by the generous support of Helga and Erich Kellerhals. Charity Nofziger is a recipient of the Lise Meitner stipend by the FWF (M1108-B).

1. Everett LA, et al. (1997) Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 17:411–422.
2. Phelps PD, et al. (1998) Radiological malformations of the ear in Pendred syndrome. *Clin Radiol* 53:268–273.
3. Yang JJ, et al. (2005) Hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct and Mondini dysplasia is caused by splice-site mutation in the PDS gene. *Hear Res* 199:22–30.
4. Blons H, et al. (2004) Screening of *SLC26A4* (PDS) gene in Pendred’s syndrome: a large spectrum of mutations in France and phenotypic heterogeneity. *Clin Genet* 66:333–340.
5. Campbell C, et al. (2001) Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* 17:403–411.
6. Masmoudi S, et al. (2000) Pendred syndrome: phenotypic variability in two families carrying the same PDS missense mutation. *Am J Med Genet* 90:38–44.

7. Napiontek U, et al. (2004) Intrafamilial variability of the deafness and goiter phenotype in Pendred syndrome caused by a T416P mutation in the *SLC26A4* gene. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5347–5351.
8. Mount DB, Romero MF (2004) The *SLC26* gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch* 447:710–721.
9. Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Beck-Peccoz P (2001) The role of pendrin in iodide regulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109:18–22.
10. Royaux IE, et al. (2000) Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 141:839–845.
11. Scott DA, Wang R, Kremen TM, Sheffield VC, Karniski LP (1999) The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 21:440–443.
12. Royaux IE, et al. (2001) Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4221–4226.

13. Wangemann P, et al. (2007) Loss of cochlear HCO₃⁻ secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca²⁺ reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1345–F1353.
14. Dossena S, et al. (2006) Functional characterization of wild-type and a mutated form of SLC26A4 identified in a patient with Pendred syndrome. *Cell Physiol Biochem* 17:245–256.
15. Gillam MP, et al. (2004) Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. *J Biol Chem* 279:13004–13010.
16. Wolff J (2005) What is the role of pendrin? *Thyroid* 15:346–348.
17. Yang T, et al. (2007) Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). *Am J Hum Genet* 80:1055–1063.
18. Pera A, et al. (2008) A mutational analysis of the SLC26A4 gene in Spanish hearing-impaired families provides new insights into the genetic causes of Pendred syndrome and DFNB4 hearing loss. *Eur J Hum Genet* 16:888–896.
19. Dossena S, et al. (2006) Fast fluorometric method for measuring pendrin (SLC26A4) Cl⁻/I⁻ transport activity. *Cell Physiol Biochem* 18:67–74.
20. Fugazzola L, et al. (2007) High phenotypic intrafamilial variability in patients with Pendred syndrome and a novel duplication in the SLC26A4 gene: clinical characterization and functional studies of the mutated SLC26A4 protein. *Eur J Endocrinol* 157:331–338.
21. Pfarr N, et al. (2006) Goitrous congenital hypothyroidism and hearing impairment associated with mutations in the TPO and SLC26A4/PDS genes. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2678–2681.
22. Albert S, et al. (2006) SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur J Hum Genet* 14:773–779.
23. Fraser GR (1965) Association of congenital deafness with goitre (Pendred's Syndrome) a study of 207 families. *Ann Hum Genet* 28:201–249.
24. Hutchin T, et al. (2005) Assessment of the genetic causes of recessive childhood non-syndromic deafness in the UK—implications for genetic testing. *Clin Genet* 68:506–512.
25. Gillam MP, Bartolone L, Kopp P, Bevenga S (2005) Molecular analysis of the PDS gene in a nonconsanguineous Sicilian family with Pendred's syndrome. *Thyroid* 15:734–741.
26. Scott DA, et al. (2000) Functional differences of the PDS gene product are associated with phenotypic variation in patients with Pendred syndrome and non-syndromic hearing loss (DFNB4). *Hum Mol Genet* 9:1709–1715.
27. Taylor JP, Metcalfe RA, Watson PF, Weetman AP, Trembath RC (2002) Mutations of the PDS gene, encoding pendrin, are associated with protein mislocalization and loss of iodide efflux: implications for thyroid dysfunction in Pendred syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1778–1784.
28. DiCiommo DP, Duckett A, Burcescu I, Bremner R, Gallie BL (2004) Retinoblastoma protein purification and transduction of retina and retinoblastoma cells using improved alphavirus vectors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:3320–3329.
29. Bazzini C, et al. (2005) Cloning and functional characterization of thhyroid human pendrin. *Biophys J* 88:1(print suppl.), 590A.
30. Scott DA, Karniski LP (2000) Human pendrin expressed in *Xenopus laevis* oocytes mediates chloride/formate exchange. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C207–C211.
31. Rillema JA, Hill MA (2003) Pendrin transporter carries out iodide uptake into MCF-7 human mammary cancer cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 228:1078–1082.
32. Yoshida A, et al. (2002) Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3356–3361.
33. Jayaraman S, Haggie P, Wachter RM, Remington SJ, Verkman AS (2000) Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J Biol Chem* 275:6047–6050.
34. Fugazzola L, et al. (2002) Differential diagnosis between Pendred and pseudo-Pendred syndromes: clinical, radiologic, and molecular studies. *Pediatr Res* 51:479–484.
35. Pryor SP, et al. (2005) SLC26A4/PDS genotype-phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. *J Med Genet* 42:159–165.
36. Prasad S, et al. (2004) Pendred syndrome and DFNB4-mutation screening of SLC26A4 by denaturing high-performance liquid chromatography and the identification of eleven novel mutations. *Am J Med Genet A* 124:1–9.
37. Shears D, et al. (2004) Molecular heterogeneity in two families with auditory pigmentary syndromes: the role of neuroimaging and genetic analysis in deafness. *Clin Genet* 65:384–389.
38. Arellano B, et al. (2005) Pendred's syndrome and non-syndromic DFNB4 deafness associated with the homozygous T410M mutation in the SLC26A4 gene in siblings. *Clin Genet* 67:438–440.