HALLÁSKÁROSODÁSBAN RÉSZT VEVŐ GÉNEK POLIMORFIZMUSAI ÉS MUTÁCIÓI ROMA ÉS MAGYAR POPULÁCIÓKBAN

Doktori (PhD) értekezés

Mátyás Petra

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Klinkai Központ, Orvosi Genetikai Intézet

Programvezető és témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Pécs, 2019

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4

1. Bevezetés 5
    1.1. Halláskárosodás genetikája 5
    1.2. Roma populáció bemutatása, főbb jellemvonásai 8
    1.3. *NAT2* gén 11
    1.4. *GRM7* gén 12
    1.5. *GRHL2* gén 13
    1.6. *GJB2* gén 14
    1.7. *MARVELD2* gén 16
    1.8. Halláskárosodásra hajlamosító mitokondriális DNS polimorfizmusok 18
2. Célkitűzések 21
3. Anyagok és módszerek 22
    3.1. Vizsgált populációk 22
    3.2. Molekuláris biológiai módszerek 24
        3.2.1. DNS izolálás 24
        3.2.2. Polimeráz láncreakció 24
        3.2.3. Restrikciós fragmenthossz analízis 26
        3.2.4. Direkt szekvenálás 27
    3.3. Statisztikai elemzés 27
4. Eredmények 28
    4.1. *NAT2* rs1799930 28
    4.2. *GRM7* rs11928865 29
    4.3. *GRHL2* rs10955255, rs13263539, rs1981361, 30
    4.4. GJB2 rs104894396 34
    4.5. MARVELD2 c.1331+2 T>C 35
    4.6. Mitokondriális DNS polimorfizmusok 39
5. Eredmények megbeszélése és következtetések 40
6. Eredmények összefoglalása 46

7. Közlemények jegyzéke 47
7.1. Értekezés alapjául szolgáló közlemények 47
7.2. Egyéb közlemények 48
7.3. Idézhető absztraktok 50
8. Irodalomjegyzék 52
9. Köszönetnyilvánítás 69

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ARHI	age-related hearing imapirment (időskori halláskárosodás)
DFN	nem szindrómás halláskárosodás
DFNA	autoszómális domináns nem szindrómás halláskárosodás
DFNB	autoszómális recesszív nem szindrómás halláskárosodás
DFNX	X-hez kötött nem szindrómás halláskárosodás
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etilén-diamin-tetra-acetát
GJB2	gap junction protein, béta-2
GRHL2	grainyhead-like 2
GRM7	metabolikus glutamát receptor 7
KSS	Kearns-Sayre szindróma
MARVELD2	MAL and Related proteins for Vesicle trafficking and membrane Link Domain containing 2
MELAS	mitokondriális encephalopathia, laktát-acidózis, stroke-szerű epizódok
MERFF	myoclonusos epilepszia „ragged red fibers”
MIDD	maternally inherited diabetes and deafness (anyai öröklődésű diabétesz és siketség)
mtDNS	mitokondriális DNS
NAT2	N-acetiltranszferáz 2
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PEO	progresszív externális ophthalmoplegia
RFLP	restriction fragment length polymorphism (restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus)
SNP	single nucleotide polymorphism (egypontos nukleotid polimorfizmus)
ROS	reactive oxygen species, reaktív oxigén gyök

1. BEVEZETÉS

Amikor egy-egy humángenetikai hátterű betegségért, elváltozásért felelős mutációt keresnek a kutatók, akkor főként a génekre és azok közvetlen szabályozó-elemeire helyezik a hangsúlyt. Az utóbbi időszak eredményei szerint azonban a géneket nem kódoló régiók szerepe is igen fontos a betegségek kialakításában: az ilyen régiókban bekövetkező mutációk ugyanúgy okozhatnak genetikai rendellenességeket, hajlamosíthatnak, vagy éppen védőek lehetnek egy adott betegségre nézve. A populáció genetikai változatosságának egyik jellemzője a genetikai polimorfizmus. Ezek a polimorfizmusok teszik ki a humán genetikai variációk 90%-át, és minden 100-300 bázispáronként megjelennek a humán genomban. Az SNP-k olyan pontmutációk, melyek nagy segítséget jelentenek az orvosi kutatásokban, gyógyszerek kifejlesztésében, mivel ezek nem sokat változnak generációról generációra, azaz a populációkban való SNP követés lineáris következtetéseket tesz lehetővé. A polimorfizmusok ezen tuljdonsága populációgenetikai vizsgálatokat tesz lehetővé. Genetikai eredetű betegségek előfordulását lehet vizsgálni különböző populációkban, többek között a halláskárosodás esetében is.

1.1 Halláskárosodás genetikája

A halláskárosodás az egyik leggyakoribb érzékszervi megbetegedés, mely befolyásolja a normál kommunikációt és több mint 350 millió embert érint világszerte. Kialakulásának helye szerint 3 nagy csoportját különböztetjük meg. Vezetéses hallászcsökkenésről akkor beszélünk, amikor a hangvezető rendszerben, azaz a hallójáratban, dobhártyában, hallócsontokban, vagy a labirintusszervben jön létre megbetegedés. Másik nagy csoportja az idegi típusú vagy más néven percepciós hallásvesztés, amikor a hangfelfogó rendszert, azaz a belső fület, a hallóideget, a hallópályákat vagy a hallókérget érinti a megbetegedés. Harmadik nagy csoportja pedig a kevert típusú halláskárosodás, amikor a vezetéses és az idegi hallás csökkenés kombinációja áll fent (Pytel és mtsai 1996). A legtöbb esetben a halláskárosodás multifaktoriális betegség, amit genetikai és környezeti tényezők, illetve ezen faktorok kombinációja vált ki (Willems és mtsai 2000). Azonban egyetlen gén mutációja is képes lehet kialakítani a betegséget. Ebben az esetben a halláskárosodás egy monogénes betegség, ami autoszómális domináns, autoszómális recesszív, X-hez kötött

vagy mitokondriális öröklődést mutat. Ezek a monogénes formák lehetnek szindrómásak és nem szindrómásak. A szindrómás halláskárosodás során a betegség más rendellenességekkel jár együtt, a nem szindrómás halláskárosodás azonban nincs összefüggésben más tünetekkel. A halláskárosodást többféle szempont alapján is lehet csoportosítani. Genetikai vagy nem genetikai eredetű; szindrómás vagy nem szindrómás; prelingvális (normális beszédelsajátítás befejezése előtt) vagy posztlingvális (beszélt nyelvelsajátítás befejeződése után kb. 3. életév) (Willems és mtsai 2000). A szindrómás hallásvesztésre leggyakoribb példák a Waardenburg, Usher, Pendred és az Alport szindróma (Gorlin és mtsai 1995). Halláskárosodást okozhatnak környezeti tényezők, mint például perinatális fertőzések, akusztikus vagy agyi traumák, amik a cochleát érintik, ototoxikus drogok, mint például az aminoglikozidok vagy antibiotikumok (Willems és mtsai 2000). Az esetek 50%-ában genetikai okok, azok közül is a monogénes formák miatt alakul ki a betegség, és a másik 50%-ban pedig perinatális tényezők, trauma vagy fertőzés felelős a kialakulásáért (Fraser 1970; Morton és mtsai 1991). Minden 1000-dik szülésből 1 csecsemő prelingvális halláskárosodással születik, akiknek körülbelül a fele genetikailag meghatározott hallásvesztéssel rendelkezik (Morton és mtsai 1991; Davis és mtsai 1994). Feltehetően 200 gén felelős a hallásért, melyből eddig 30-at ismerünk. Az egyik legismertebb gén, aminek mutációja siketséget okoz, a *GJB2* gén. Továbbá a halláskárosodást okozhatnak a *MARVELD2, NAT2, GRM7*, *GRHL2* génekben, valamint a mitkondriális DNS-ben létrejött változások is. Irodalmi adatok szerint a monogénes prelingvális halláskárosodás 75%-ban autoszómális recesszív, 20%-ban autoszómális domináns, 5%-ban X-hez kötött és 1%-ban mitokondriális eredetű (Marazita és mtsai 1993). Azonban a posztlingvális halláskárosodás sokkal gyakoribb, mint a prelingvális, 60 éves kor felett a populáció 10%-át, 80 év felett az 50%-át érinti (Petit és mtsai 1996; Davis és mtsai 1989).

A nem szindrómás halláskárosodás kialakulását nehéz összefüggésbe hozni egyetlen génnel, ezért fontos a gének kapcsoltságát vizsgálni a hallásvesztésben érintett családokon belül. A kapcsoltsági vizsgálatok több gént is feltérképeztek, amik okozhatnak nem szindrómás hallásvesztést. Ezek a gének különböző kromoszómákon helyezkednek el. A nem szindrómás halláskárosodási formák kialakulásáért felelős gén lókuszokat DFN-nek nevezik és felfedezésük kronológiai sorrendjében számozzák. Az autoszómális domináns

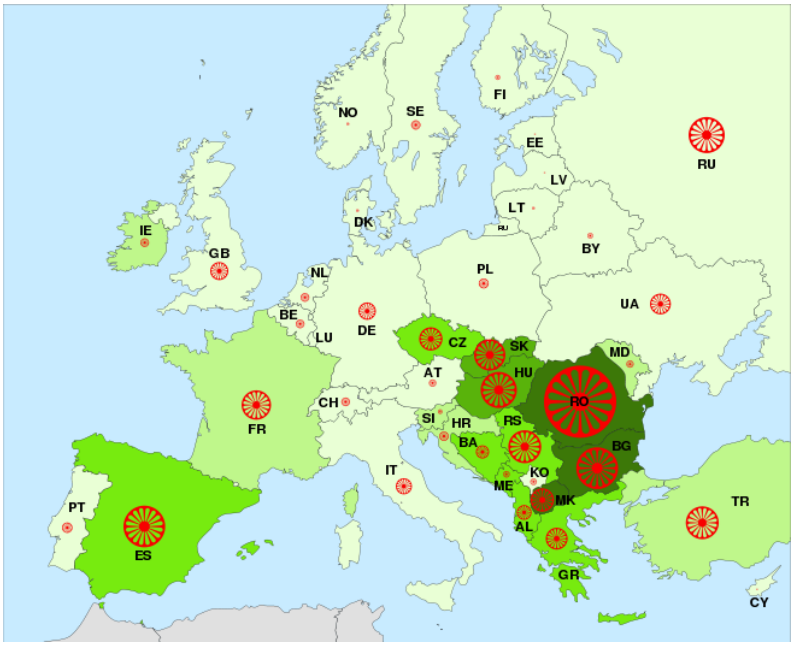
lókuszt DFNA-nak, a recesszívet DFNB-nek az X-hez kötöttet DFNX-nek nevezzük. A DFNB lókusz génmutációinak a gyakorisága a legnagyobb a monogénes hallásvesztéses megbetegedéseknél, ezek felelősek az autoszómális recesszív prelingvális halláskárosodásos esetek több mint 50%-áért. Az autoszómális domináns lókuszok esetében a DFNA9-es az X-hez kötött lókusz esetében a DFNX3-as a mitokondriális lókuszok esetében pedig riboszómális 12S rRNS a leggyakoribb lókuszok. A többi lókusz csak néhány család esetében áll összefüggésben a halláskárosodással (Willems és mtsai 2000).

Az időskori halláskárosodás (ARHI) vagy más néven presbycusis az egyik leggyakoribb típusa a hallásvesztésnek, ami egy komplex magas frekvenciájú halláscsökkenés, melyet az öregedés során a belső fülben létrejövő degeneratív elváltozások okoznak.

Az öregedés, a zajok és a gyógyszerek roncsolhatják a belső fül szöveteit, reaktív oxigéngyökök (ROS) által kiváltott sejtkárosodás útján (Staecker és mtsai 2001; Cruickshanks és mtsai 1998; Seidman és mtsai 2002). A ROS a természetes melléktermék az aerob anyagcsere folyamatoknak, és ezeknek a felhalmozódása okozza az oxidatív stresszt. Az antioxidáns enzimekben lévő polimorfizmusok és a megnövekedett ROS-ok, továbbá az oxidatív stressz a belső fülben hajlamossá tehet a presbycusisra. Az időskori halláskárosodás különböző korcsoportokban eltérő mértékben alakul ki. A genetikai tényezők összefüggésben állnak a degeneratív mechanizmusokkal. Napjainkig már több gént felfedeztek, melyek felelősek lehetnek az időskori halláskárosodás kialakulásáért (Bared és mtsai 2010; Unal és mtsai 2005; Yamasoba és mtsai 2013).

1.2 Roma populáció bemutatása, főbb jellemvonásai

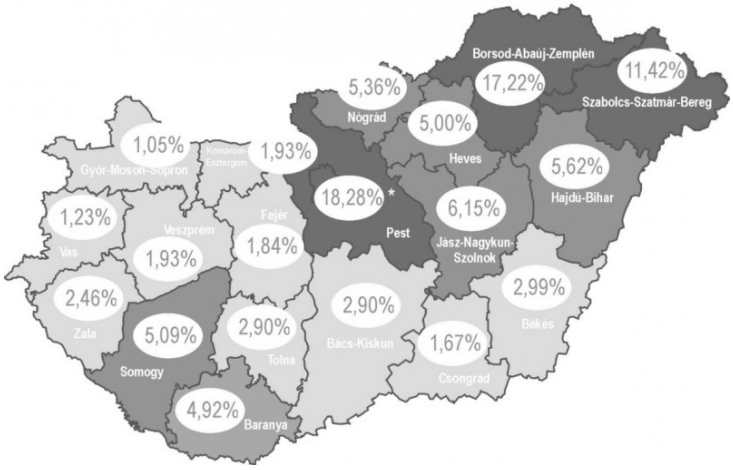
A roma populációnak körülbelül 1000 évvel ezelőtt kezdődött meg a vándorlása az indiai szubkontinensről északnyugat felé. A 11-12. században érkezhettek meg Bizáncba, és az Európában való szétszóródásuk a 15. századra tehető (Fraser és mtsai 1992; Marushiakova és mtsia 1997). Roma populáció több országban is megtalálható, nagyságát 12-15 millió körüli értékre becsülik a világon, ebből nagyjából 10 millió él Európában (Morar és mtsai 2004b, Gresham és mtsai 2001a). Magyarországon hozzávetőlegesen 700 000-1 millióan vannak, ezáltal a 4-ik helyre kerültünk a legtöbb romák által lakott országok között Európában. Hazánkat Románia, Bulgária és Szerbia előzi meg (**1. ábra**).



1. Ábra: Roma populációk eloszlása Európában

(Forrás: http://romateaching.eu/index.php/en/roma-education)

Magyarországon a roma lakosság számát illetően nem állnak rendelkezésre pontos információk, mivel a népszámlálási adatok önbevalláson alapulnak, és a magukat románok vallók aránya a tényleges értéknek mindössze harmadát, negyedét teszi ki. Azonban ezek az adatok is jó megközelítési lehetőséget adnak a roma lakosság térbeli elrendeződéséről. A legtöbb roma Pest megyében él (18.28%), a romák által legkevésbé lakott megyénk pedig Győr-Moson-Sopron (1.05%). Területi eloszlásukat a **2. ábra** mutatja be.



2. Ábra: Roma lakosság területi megoszlása Magyarországon
(Forrás: http://cimok.hu/node/16)

Európába való érkezésükkor egy nagyobb csoportjuk megtelepedett a Balkánon a Dunától délre. Őket „balkáni cigányoknak" nevezik. Egy másik nagy csoportjuk az úgy nevezett „oláh cigányok", északra a Havasföldre (mai Románia területére) telepedett le, míg a maradék folytatta útját a kontinens további részeire. A magyarországi romák 3 nagy csoportba sorolhatók történelmük és nyelvük alapján: romrungó (71%), oláh (21%) és beás (8%) (Crowe és mtsai 1991; Juhász és mtsai 2012).

A roma populáció tagjai egy zárt genetikai rendszert őriznek, azért mert a populáción belül általában a saját közösségükből választanak párt maguknak (Popov és mtsai 1999). Mivel a magyarok Ázsiából származnak a romák pedig az indiai szubkontinensről jöttek, eltérő az eredetük, ezért a genetikai szerkezetük is eltérő lehet. A romákról szóló kulturális antropológiai, nyelvészeti és korlátozott történelmi feljegyzésekből valamint a viszonylag

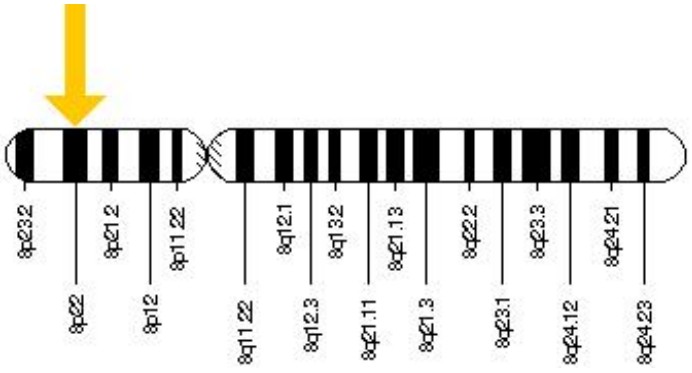
erősen konzervált génállományukból arra következtetünk, hogy Indiából származnak. A romák társadalmi szerkezete nagyon hasonló az endogám indiaiakéhoz, mivel a romák számos csoportja űzi a hagyományos indiai mesterségeket. A csoport identitása a hagyományaikon, szokásaikon, nyelvükön, migrációs történelmükön és a vallásukon alapszik (Petulengro és mtsai 1915-1916; Fraser és mtsai 1992; Liegeois és mtsai 1994; Marushiakova és mtsai 1997).

A roma populációban a halálozási ráta folyamatosan növekszik, a csecsemőhalandóság a négyszeresére emelkedett és a születéskor várható élettartamuk 10 évvel kevesebb a Közép- és Kelet-Európai populációkhoz képest (Fraser és mtsai 1992).

A földrajzilag elszórt és társadalmilag valamint nyelvileg eltérő roma csoportokban egyedülálló Mendeli és alapító mutációkat (Kalaydjieva és mtsai 1996, 2000; Piccolo és mtsai 1996; Abicht és mtsai 1999; Rogers és mtsai 2000; Varon és mtsai 2003), valamint ősi Y kromoszómát és mtDNS leszármazást mutattak ki (Gresham és mtsai 2001; Kalaydjieva és mtsai 2001*a*). A leszármazás eloszlásának és változatosságának vizsgálata a romák genetikai profiljának karakterizálását eredményezte (Gresham és mtsai 2001; Kalaydjieva és mtsai 2003). A fertőző betegségek gyakrabban fordulnak elő náluk és terjedésük is gyorsabb. Eltérések mutatkoznak más populációkhoz képest az egyes, gyermekkorban jelentkező megbetegedések gyakoriságában, és a veleszületett betegségek típusaiban is (Hajioff és mtsai 2000, Gresham és mtsai 2001, Kalaydjieva és mtsai 2001, Morar és mtsai 2004). Mindezek alapján feltételezzük, hogy a roma populáció bizonyos betegségekre nézve védettebbnek bizonyulhat, vagy éppen ellenkezőleg hajlamosabb lehet, mindehhez azonban genetikai háttér feltérképezésére van szükség.

1.3 *NAT2* gén

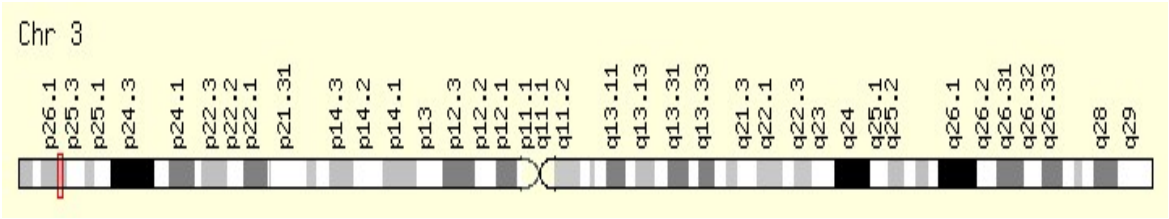
A metabolikus enzimek közé tartozó N-acetiltranszferáz (NAT) felelős az exogén szubsztrátok N-acetilációval vagy O-acetilációval való detoxifikációjáért, az oxidatív státusz egyensúlyban tartásáért, valamint részt vesz a káros xenobiotikumok detoxifikációjában, amik közül több a belső fülben is megtalálható, mint például a glutation-peroxidáz, kataláz-szuperoxiddizmutáz, glutation-S-transzferáz. (Unal és mtsai 2005). A nem megfelelő módon acetilált vegyületek akkumulálódhatnak és oxidatív enzimekkel együtt reaktív metabolitokká alakulhatnak át. A NAT enzim feladata csökkenteni a lehetőségét annak, hogy ezek a reaktív metabolitok kialakulhassanak. NAT1 és NAT2 izoenzimeket tudunk megkülönböztetni, melyek génjei rendkívül polimorfak. A NAT2 acetilációja 3 fenotípusba sorolható: gyors, közepes és lassú acetiláció, amelyek Mendeli öröklésmenetet mutatnak és mindegyik betegség megjelenéséhez vezet (Unal és mtsai 2005; Van Eyken és mtsai 2007). A mutáns allélra heterozigóták acetiltranszferáz aktivitása csökken, és lassú acetilációra képesek. A homozigóta genotípusú egyedek nem képesek a metabolitokat vagy a toxinokat az enzimre specifikusan konjugálni, így náluk nő a hajlam az oxidatív szabadgyökök okozta sejtkárosodásra. A NAT lassú acetiláló állapota kockázati tényezője lehet az időskori halláskárosodásnak, amit több különböző tanulmányban leírtak már (Bared és mtsai 2010). Ez a gén a 8p22 kromoszóma régióban található (**3. ábra**), 2 exont tartalmaz, ami 290 aminosavból álló fehérjét kódol. A *NAT2* a reaktív oxigéngyökök (ROS) metabolizmusában játszik fontos szerepet. Unal és munkatársai 2005-ben szignifikáns összefüggést mutattak ki az ARHI és a *NAT2* gén rs1799930 polimorfizmusa között.



3. Ábra: A 8. kromoszóma sematikus rajza melyen a *NAT2* gén pozícióját nyíl jelöli (Forrás: http://ghr.nlm.nih.gov/gene/NAT2)

1.4 *GRM7* gén

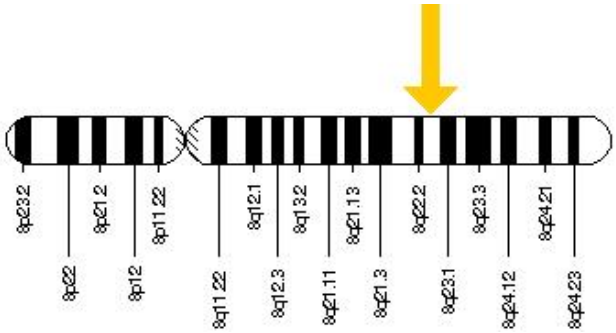
A metabotróp glutamát receptorokat az L-glutamát aktiválja, ami az elsődleges aminosav neurotranszmitter az emlősök központi idegrendszerében. A metabotróp receptorok általában G-fehérjéket aktiválnak és indirekt módon másodlagos messengerek és jelátviteli kaszkádok révén változtatják meg az ioncsatornák működését. Ezek a receptorok rendelkeznek egy glutamát kötőhellyel, egy cisztein gazdag régióval, 7 transzmembrán doménnal és egy intracelluláris C terminális régióval (Makoff és mtsai 1996). A GRM7 (mGluR7) a metabolikus glutamát receptorok III-as csoportjának egy tagja. A glutamát metabolikus receptor 7 a 3p26.1-p25.1 kromoszóma régión helyezkedik el (**4. ábra**), 10 exont tartalmaz, ami egy 915 aminosavból álló fehérjét kódol. A *GRM7*-nek központi szerepe van az emlős cochleán belül a szőrsejtek és az afferens hallóidegrostok közötti szinapszisokban lévő homeosztázis és szinaptikus glutamát transzmisszió fenntartásában. A glutamát toxicitás többféleképpen játszik szerepet a halláskárosodás kialakulásában beleértve a zaj okozta illetve az időskori halláskárosodást (Pujol és mtsai 1993; Heyning és mtsai 2000). Ha túl sok glutamát van jelen, akkor az neurotoxicitást okoz a halló-neuronokban, serkentő tulajdonsága miatt. Mivel a mGluR7 csökkenti a glutamát kibocsátását, előfordulhat, hogy a *GRM7* egy hibás allélja megváltoztatja a glutamát szinaptikus autoregulációját a halló neuronok és szőrsejtek szinaptikus résében, ami idővel glutamát felhalmozódáshoz vezet, melynek következtében pedig sejthalál következik be (Friedman és mtsai 2009).



4. Ábra: A 3. kromoszóma sematikus rajza melyen a *GRM7* gén pozícióját piros téglalap jelöli
(Forrás: http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GRM7)

1.5 *GRHL2* gén

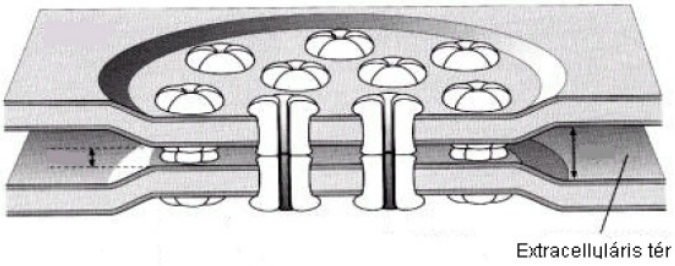
Az emlősökben található *GRHL2* gén a Drosophila *GRH* (greany head) génjével homológ, a *GRHL* család egyik tagja, és *GRHL1*-el és *GRHL3*-al együtt a hámsejtek adhézióját szabályozzák (Venkatesan és mtsai 2003; Stramer és mtsai 2005). A transzkripciós faktorok ezen családja a többsejtű hám fejlődését és differenciálódását irányítják a sejtek kialakításával és proliferációjával a génszabályozásnak megfelelően (Werth és mtsai 2010; Varma és mtsai 2012). A *GRHL2* egy transzkripciós faktor, mely különböző epiteliális sejtekben fejeződik ki (Wilanowski és mtsai 2002). A belső fülben a cochleáris csatorna nyálkahártyasejtjeiben expresszálódik nagyobb mennyiségben az embrionális fejlődés során, valamint kisebb mennyiségben a születés utáni fejlődési szakaszban. A *GRHL2* a hámsejtek működéséért felelős egy egész életen át. Biológiailag hozzájárul az epiteliális barrier kialakulásához és a sebgyógyuláshoz, valamint lezárja a neutrális tubust, karbantartja a mukociliáris légúti epiteliumot és a tumor szupressziót (Bray és mtsai 1991; Narashima és mtsai 2008; Cieply és mtsai 2013; Werner és mtsai 2013; Varma és mtsai 2014; Mlacki és mtsai 2014; Xiang és mtsai 2013). Továbbá kimutatták, hogy szabályozza a TRET (MIM 187270) expresszióját és fokozza az epidermális keratinociták proliferációját (Chen és mtsai 2012). Mutációit összefüggésbe hozták már autoszómális domináns öröklődésű hallásvesztéssel (DFNA28 [MIM608641]), illetve számos polimorfizmusát zaj indukálta és időskori halláskárosodással (Peters és mtsa 2002; Vona és mtsai 2013; Van Laer és mtsai 2008; Han és mtsai 2011; Li és mtsai 2013). Az első három exonja kódolja a transzkripciós aktivációs domént. A *GRHL2* gén a 8q22.3 kromoszóma régión található (**5. ábra**), 16 exont tartalmaz, ami egy 625 aminosavból álló fehérjét kódol (Peters és mtsai 200)



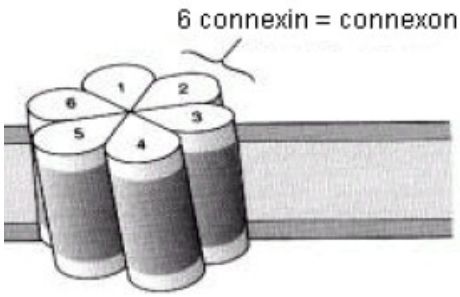
5. Ábra: A 8. kromoszóma sematikus rajza melyen a *GRHL2* gén pozícióját nyíl jelöli
(Forrás: http://ghr.nlm.nih.gov/gene/GRHL2)

1.6 *GJB2* gén

A *GJB2* gén egy 226 aminosavból álló fehérjét, a connexin 26-ot kódolja, amely egy sejt-sejt közötti csatorna, és feladata megkönnyíteni a kisebb molekulák és ionok transzportját a sejtek között. Ez a csatorna 2 szomszédos sejt connexonjából épül fel, egy connexon pedig 6 connexin molekulából áll (**6. és 7. ábra**) (Kikuchi és mtsai 2000). Ez az oka annak, hogy a GJB2 fehérjét más néven Connexin 26-nak (CX26) is nevezik (Apps és mtsai 2007).



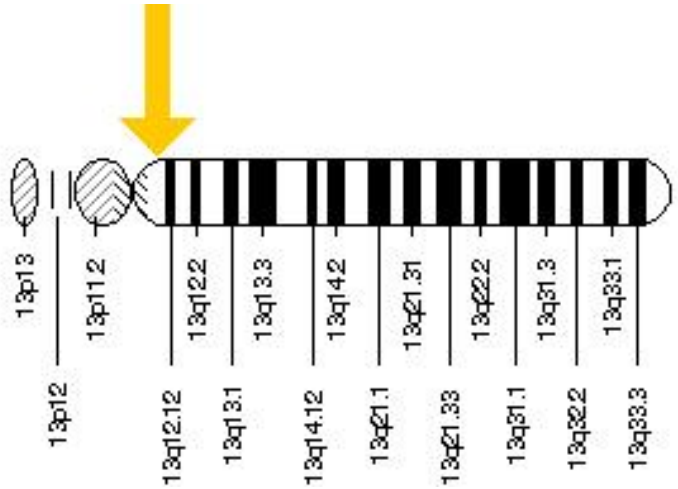
6. Ábra: 2 sejt connexonjából felépülő csatorna
(Forrás: Bruzzone, 1996)



7. Ábra: 6 db connexin molekulából felépülő connexon szerkezete
(Forrás: Bruzzone, 1996)

A *GJB2* génnek csupán egy kódoló exonja van, ezért a kis gének csoportjába tartozik. A *GJB2* gén a 13q11-q12 kromoszóma pozícióban helyezkedik el (**8. ábra**). Több mutációját azonosították világszerte, amit halláskárosodással összefüggésbe hoztak, vagy genetikailag siketséget okoznak (Padma és mtsai 2009; Estivill és mtsai 1998). Ezek az eltérések interetnikus különbségeket mutatnak. A legismertebb mutációja a 35delG mutáció, melyre autoszómális recesszív öröklésmenet jellemző (Denoyelle és mtsai 1997). A mutáció során egy guanin deléciója miatt a leolvasási keret eltolódik, azaz egy frameshift

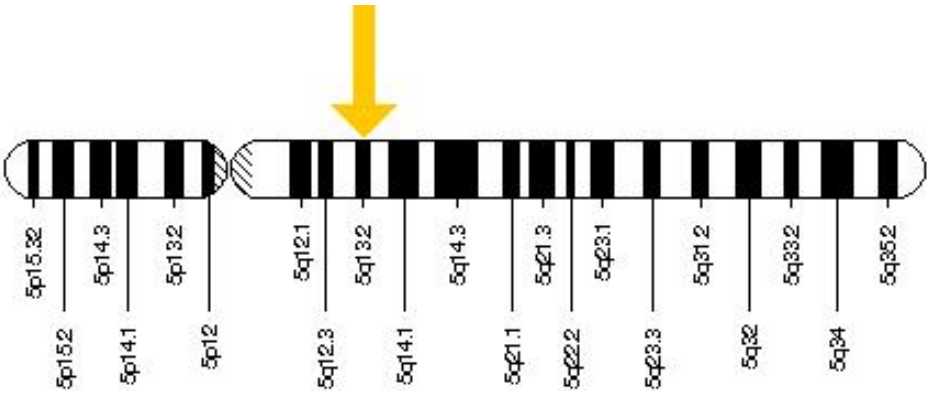
jön létre, így a 226 aminosavból álló fehérje helyett csak egy 12 aminosavat tartalmazó polipeptidlánc keletkezik, ami zavart okoz a káliumion cirkulációjában a Corti szerven belül. Ma már több mint 6 autoszómális domináns és 70 autoszómális recesszív öröklődésű genetikai eltérés vált ismertté a *GJB2* génben. A W24X egy recesszív formában siketséget okozó nonsense mutáció, melyet eddig csak indiai populációban találtak meg (Maheshwari és mtsai 2003). 45 indiai család vizsgálata során azt figyelték meg, hogy ez az eltérés a felelős a halláskárosodásos megbetegedések 13,3%-ért (Maheshwari és mtsai 2003). A *GJB2* c.71G (rs104894396, W24X) mutáció esetében a mutáns A allél frekvenciája igen magasnak (32,5%) bizonyult egy indiai populáció nem szindrómás halláskárosodással rendelkező betegeiben (Joseph és mtsai 2009). Egy másik indiai populáció vizsgálata során 303 nem szindrómás halláskárosodott beteg *GJB2* génjét vizsgálták meg, ahol a leggyakoribb mutációnak a W24X bizonyult 87%-os előfordulással (Padma és mtsai 2009). Más populációkban élő roma populációs vizsgálatok azt mutatták, hogy ez az eltérés is egy elterjedt molekuláris hiba a romákban (Bouwer és mtsai 2007). A *GJB2* gén 2 legismertebb mutációját (c.35delG és c.167delT) megvizsgálták 3 különböző populációban Magyarországon, a romákban, a magyarokban és az askenáziaiakban (Bors és mtsai 2004). Azonban a W24X mutációt az indiaiakban való magas előfordulása ellenére sem nézték még ez idáig Magyarországon élő romákban (Joseph és mtsai 2009).



8. Ábra: A 13. kromoszóma sematikus rajza melyen a *GJB2* gén pozícióját nyíl jelöli (Forrás: http://ghr.nlm.nih.gov/gene/GJB2)

1.7 *MARVELD2* gén

A *MARVELD2* (MAL and Related proteins for Vesicle trafficking and membrane Link Domain containing 2) vagy más néven *TRIC* gén az 5q13.2 kromoszóma régióban helyezkedik el (**9. ábra**) és a DFNB49-es lókuszhoz kapcsolódik. A humán *MARVELD2* gén kódolja a MARVLED2/tricellulin fehérjét, ami 588 aminosavból épül fel (Shaikh és mtsai 2005; Riazuddin és mtsai 2006). Ez a transzmembrán fehérje főleg az epiteliális sejtek tricelluláris tight junction-eiben (tTj) koncentrálódik minden szövetben, mint például a cochleáris sejtekben, szőrsejtekben, és kisebb mennyiségben van jelen a bicelluláris tight junction-ökben (bTj). A tricelluláris tight junction-ben a tricellum kapcsolatot képez 3 epiteliális sejt között, így szerepet játszik az epiteliális barrier kialakításában, amin keresztül azok az ionok és molekulák áramolnak, amik nélkülözhetetlenek a belső fül ionösszetételének fenntartásához (Ikenouchi és mtsai 2005). Emberekben a *MARVELD* gén mutációi nem szindrómás, kétoldalú, prelingvális, mérsékelt vagy súlyos siketséget okoznak (Riazuddin és mtsai 2006; Chisthi és mtsai 2008). Ugyanakkor, a *MARVELD2* knock-in egerekben a szőrsejt degenerációt gyors halláscsökkenés követi, bár a stria vascularis endocochleáris potenciálja és funkciója nem változik. A belső fül szenzoros hámjában a tight junction-ök ultrastruktúrális változásai megváltoztathatják az ionok és kisebb molekulák paracelluláris permeábilitását, toxikus mikrokörnyezetet okozva ezzel a szőrsejteknek (Nayak és mtsai 2013).

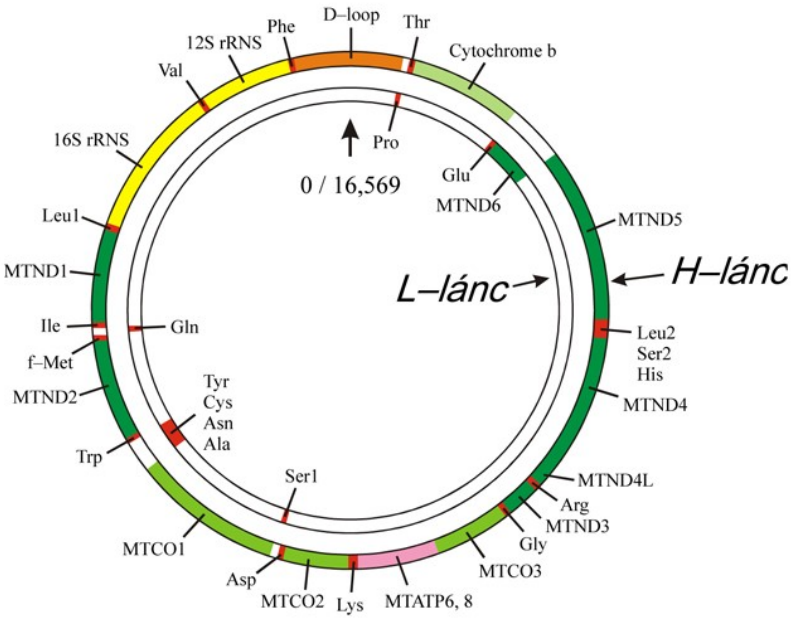


9. Ábra: Az 5. kromoszóma sematikus rajza melyen a *MARVELD2* gén pozícióját nyíl jelöli. (Forrás: http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MARVELD2)

A mai napig összesen 6 recesszív mutációt azonosítottak a *MARVELD2* génben világszerte összesen 15 családban, ami siketséget okoz (Riazuddin és mtsai 2006; Chisthi és mtsai 2008; Babanejad és mtsai 2012; Safka és mtsai 2015). Kezdetben ezeket a mutációkat csak pakisztáni eredetű betegekben azonosították (Riazuddin és mtsai 2006; Chisthi és mtsai 2008). Azonban újabban a c.1331+2 T>C (IVS4+2T>C) mutációt megtalálták európai roma populációban is (Safka és mtsai 2015). A *MARVELD2* gén mutációinak ezért fontos a vizsgálata mindkét populációban, hiszen rendelkeznek közös őssel (Masindova és mtsai 2015).

1.8 Halláskárosodásra hajlamosító mitokondriális DNS polimorfizmusok

A mitokondrium az eukarióta sejtekben kiemelt szerepet játszik a metabolikus energia előállításában, melynek során az oxidatív foszforilácó mechanizmusával szénhidrátok és a zsírsavak lebontásával ATP keletkezik. A citoplazma sejtorganellumaként egyedi sajátsága, hogy a nukleáris genomtól elkülönülő és eltérő prokarióta típusú cirkuláris örökítőanyaggal rendelkezik, amely két eltérő bázisösszetételű szálból épül fel. A nehéz szál (H=heavy) guaninban, a könnyű szál (L=light) pedig citozinban gazdag. A mitokondriális DNS 16569 bázisból épül fel, 13 db elektrontranszportláncban részt vevő polipeptid molekulát, továbbá 22 db tRNS-t, 2 db RNS-t a 16S és a 12S rRNS-t kódol, amelyek nélkülözhetetlenek a fehérjék transzlációjához (**10. ábra**). A fehérjéi egyrészt a saját genomjáról íródnak át és ezeknek a fehérjéknek a transzlációs folyamatai is a mitokondriumon belül zajlanak, másrészt a nukleáris genom is kódol mitokondriális fehérjéket, amelyek a transzlációt követően transzportálódnak a mitokondriumba (Cooper és mtsai 2000).



10. Ábra: Mitokondriális DNS felépítése

(Forrás: http://vilagbiztonsag.hu/keptar/displayimage.php?pid=21994.html)

A mitokondriális rendellenességek egy heterogén csoportját képezik a betegségeknek, amelyek hátterében a mitokondriális légzési lánc nem megfelelő működése áll.

Mitokondriális betegségek sokféle tünettel, bármely életkorban és többféle öröklődési mintázattal jelentkezhetnek. Okozhatják a mitokondriális DNS-en belüli mutációk, vagy a nukleáris DNS-ben bekövetkező változások is (Chinnery és mtsai 2014). Öröklődése lehet anyai eredetű, melynek során a nők és a férfiak egyaránt érintettek lehetnek, azonban csak a betegséget okozó mutációt hordozó nők képesek betegség továbbadására az utódoknak, továbbá lehet autoszómális recesszív, autoszómális domináns és X-hez kötött öröklődésű is (Bonczonady és mtsai 2014).

Különböző mitokondriális DNS mutációkat hoztak már összefüggésbe a halláskárosodással. Mivel a mitokondriumnak kulcsszerepe van a szervezet energiaellátásában, a legtöbb mtDNS mutáció okozhat például MELAS szindrómát (mitokondriális encephalopathia, laktát-acidózis, stroke-szerű epizódok), KSS-t (Kearns-Sayre szindróma), MERFF-et (Myoclonusos epilepszia „ragged red fibers") MIDD-t (anyai öröklődésű diabétesz és siketség), PEO-t (progresszív externális ophthalmoplegia), ataxiát valamint halláskárosodást is. Néhány mtDNS mutáció a 12S rRNS és a tRNS Ser génekben vezethet nem szindrómás halláskárosodáshoz, amit okozhat az aminoglikoziddal való kitettség, de attól függetlenül is kialakulhat. Az aminoglikozid tartalmú antibiotikumok, mint például a gentamicin, streptomicin és a tobramicin klinikailag fontos gyógyszerek. A fejlett országokban ezeket a gyógyszereket elsősorban Gram-negatív baktériumok okozta fertőzések kezelésére, különösen a krónikus fertőzések ellen használják, mint például a cisztás fibrózis vagy tuberkulózis (Sande és mtsai 1990; Lortholary és mtsai 1995). Azonban a fejlődő országokban ezeket az antibiotikumokat rutinszerűen használják még a relatíve kisebb fertőzések esetében is (Davis és mtsai 1968). Ezeknek a gyógyszereknek a használata gyakran vezet toxicitáshoz, érintve a vesét, valamint a halló és egyensúlyozó rendszert is (Sande és mtsai 1990; Lortholary és mtsai 1995). A vesekárosodás általában reverzibilis, de a halló és egyensúlyozó szervet ért károk irreverzibilisek.

A mitokondriális 12S rRNS génben, az 1555-ös pozícióban G>A mutációt azonosítottak homoplazmiás formában aminoglikozid indukálta halláscsökkent betegekben, valamint nem szindrómás halláscsökkent betegekben is (Prezant és mtsai 1993; Usami és mtsai 1997; Estivill és mtasi 1998). Ugyanebben génben, a m.1494 T>C mutációt megtalálták egy nagy kínai család (Zhao és mtsai 2004), valamint 3 spanyol család aminoglikozid-indukálta halláskárosodott tagjaiban (Rodriguez-Ballesteros és mtsai 2006).

Mindkét mutáció a mitokondriális 12S rRNS gén egy erősen konzervált régiójában található, ami szerepet játszik az aminoglikozid-kötő baktériumokban. Azt feltételezik, hogy a mutációk úgy változtatják meg a 12S rRNS másodlagos szerkezetét, hogy az jobban hasonlít az aminoglikozid-kötő baktériumokéhoz, ami pedig megnövekedett aminoglikozid fogékonysághoz vezet (Prezant és mtsai 1993). További 7 mutációt azonosítottak a 12S rRNS génben (m.827 A>G, m.961delTinsC, m.961 T>C, m.961 T>G, m.1005 T>C és m.1095 T>C, m.1116 A>G) mint mitokondriális nem szindrómás halláscsökkenést okozó mutációk. Ezek patogenitása azonban továbbra is ellentmondásos (Bacino és mtsai 1995; Tessa és mtsai 2001; Li és mtsai 2005). További genetikai és funkcionális vizsgálatok fényt deríthetnek ezen mutációk patogén természetére. A mitokondriális DNS okozta halláskárosodásra nagy fenotipikus variabilitás jellemző. A halláscsökkenés megjelenhet aminoglikozid nélkül is vagy csak aminoglikozidnak való kitettség után. Továbbá változik a halláskárosodás variabilitása még családon belül is. Sőt, néhány mitokondriális DNS mutáció nem vált ki halláskárosodást saját magától, csak akkor, ha jelen van más genetikai vagy környezeti faktor, ami megváltoztatja ezen halláskárosodással összefüggő mutációk változékonyságát és penetranciáját (Rodriguez-Ballesteros és mtsai 2006; Young és mtsai 2006). Ezért ezek az eltérések inkább mondhatók alapvető kockázati tényezőknek, mint patogén mutációknak (Konings és mtsai 2008).

2. Célkitűzések

Kutatásaink során célunk volt meghatározni bizonyos, a halláskárosodás hátterében álló hajlamosító polimorfizmusok és mutációk gyakoriságát és eloszlását roma és magyar populációban, valamint vizsgálni kívántuk, hogy a két népcsoport tekintetében mutatkoznak-e jelentős genetikai eltérések, melyek hajlamosítottabbá vagy éppen védettebbé tehetik az adott populációt a halláskárosodásra nézve.

1. Vizsgálataink célja a *NAT2* rs1799930*,* a *GRM7* rs11928865 és a *GRHL2* rs10955255, rs13263539 és rs198161 valamint a *GJB2* rs104894396 variánsok gyakoriságának meghatározása volt a roma és magyar populációkban, továbbá, hogy következtetéseket vonjunk le arra vonatkozólag, hogy a *GRHL2* génben vizsgált variánsok különböző együttállásai milyen haplocsoportokat határoznak meg és milyen frekvenciával vannak jelen roma és magyar populációs mintákban.

2. Munkánk további célja volt megállapítani a *MARVELD2* c.1331 + 2 T>C mutációjának prevalenciáját és klinikai hatását Magyarországból és Szlovákiából származó roma siket betegekben, valamint elemezni kívántuk ezen eltérés lehetséges közös eredetét a mutációt hordozó roma és pakisztáni betegekben.

3. Célunk volt továbbá, hogy a mitokondriális DNS-ben előforduló hajlamosító polimorfizmusok (m.827 A>G, m.961 T>C, m.961 T>G, m.1005 T>C és m.1095 T>C, m.1116 A>G, m.1494 T>C és m.1555G>A) eloszlását meghatározzuk roma és magyar populációs mintákban.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Vizsgált populációk

Nagyszámú magyar és roma DNS mintával dolgoztunk, valamennyi a Pécsi Tudományegyetem központi biobankjából származott, amely a Páneurópai Nemzetközi Biobankhálózatnak (BBMRI; Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure) részét képezi. A biobank vezetésében és fenntartásában az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKEB) által jóváhagyott elveket követtük, a minták gyűjtésében és tárolásában pedig az 1975-ben az Orvos-világszövetség által megalkotott Helsinki deklarációban megfogalmazott etikai alapelvek voltak irányadók. Továbbá a *MARVELD2* gén vizsgálata során alkalmazott DNS-ek egy része DIABGENE IEE SAS laboratóriumból, a Pozsonyi Egyetemi Kórház ORL osztályáról, valamint a Pozsonyi Egyetem Természettudományi karának Molekuláris Biológia tanszékéről (Szlovákia) származott.

A *NAT2* gén rs1799930, a *GRM7* gén rs11928865, a *GRHL2* gén rs10955255, rs13263539 és rs1981631 SNP-k esetében 298 egészséges roma (118 férfi, 180 nő; átlag életkor 42.33 ± 15,51) és 298 egészséges magyar (168 férfi, 130 nő; átlag életkor 37,43 ± 12,53) személy DNS mintáját használtuk fel. Továbbá a *NAT2* gén rs1799930, *GRHL2* gén rs13263539 és rs1981631 SNP-k esetében 113 halláskárosodott roma (57 férfi, 56 nő) egyén DNS mintáját vizsgáltuk.

A *GJB2* gén rs104894396 polimorfizmus esetében 493 egészséges roma (250 férfi, 243 nő; átlag életkor 50 ± 19) és 498 egészséges magyar (268 férfi, 230 nő; átlag életkor 36 ± 12) személy DNS mintáját vizsgáltuk.

A *MARVELD2* gén c.1331+2 T>C variánsának vizsgálata során 85 halláskárosodott magyarországi roma és 502 egészséges roma személy DNS mintáját használtuk fel. Továbbá 143 halláskárosodott szlovák roma, 200 egészséges szlovák roma, valamint 375 halláskárosodott szlovák személy DNS-ét vizsgáltuk. Ezen kívül további 21 polimorfizmust (rs542778, rs4699896, rs4976108, rs67911569, rs10059317, rs56103849, rs4252228, rs1168405, rs1168402, rs299086, rs299093, rs2434507, rs299075, rs299078, rs28652974, rs28409706, rs468467, rs188123810, rs467880, rs466930, and rs2133729) genotipizáltunk 5,34 megabázissal a c313 + 2T> C mutáció körül, 5 szlovákai, 7 magyarországi, 5

csehországi roma és 4 pakisztáni beteg esetében. A polimorfizmusokat a dbSNP adatbázisból választottuk kromoszóma pozíciójuk és kisebb allélfrekvencia (MAF) értékük alapján. A kontroll csoportban a c.1331+2 T>C mutációtól független 20 halláskárosult és 36 egészséges roma egyént genotipizáltunk a kiválasztott SNP markerek genetikai variabilitásának meghatározására.

A mitokondriális hajlamosító SNP-k esetében 200 egészséges roma (72 férfi, 123 nő; átlag éltkor 43.65 ± 16.21) és 200 egészséges magyar személy (106 férfi, 94 nő; átlag éltkor 37.15 ± 11.93) DNS mintáját használtuk fel.

3.2 Molekuláris biológiai módszerek

3.2.1 DNS izolálás

A DNS-izolálást EDTA-val alvadásgátolt 5-10 ml vérmintákból végeztük az alább részletezett kisózásos technika segítségével. A vérmintákat 50 ml-es centrifugacsőbe öntöttük, melyeket 40 ml hideg (4°C-os) RBC lízispufferrel egészítettünk ki, majd 30 perces jeges inkubáció következett, miközben 5-6 alkalommal meg lettek forgatva. Ezután 30 percig 5000 rpm-en és 4°C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót gondosan eltávolítottuk. A térfogathoz ismét öntöttünk 40 ml hideg lízispuffert és a fenti folyamatot még 3-4 alkalommal megismételtük. Utolsó lépésként az üledékhez 500 µl 10%-os SDS-t, 5 ml SE puffert (pH=8, 4,39g (75mmol) nátrium-klorid + 8,41g (25 mmol) Na-EDTA), valamint 25 µl proteináz-K-t (10mg/ml) adtunk, majd a minták vortexelését követően 37°C-os hőmérsékleten egy éjszakán át 200 rpm-en rázógépen inkubáltuk. Másnap 3 ml telített nátrium-klorid-oldatot (6 M) adtunk hozzá, és 15 másodpercig vortexeltük, majd ezt követően 15 percig 3000 RPM-en centrifugáltuk. Ezután a DNS-t tartalmazó felülúszót egy másik 50 ml térfogatú csőbe óvatosan átöntöttük és 40 ml térfogatra kiegészítettük 96%-os etanollal, melyet ezután óvatosan kevergettünk addig, amíg a DNS ki nem csapódott. A kivált DNS-t egy Eppendorf-csőbe helyeztük, majd 200 µl 70%-os etanolt adtunk hozzá és 10-30 percig inkubáltuk, később az etanolt pipettával eltávolítottuk. Ezt követően a DNS-t 10-30 percig száradni hagytuk szobahőmérsékleten, majd hozzáadtunk 500 µl TE puffer oldatot (pH=8, 0,78 g Tris-HCl + 0.14 EDTA) és egy éjszakán át 37°C-os hőmérsékleten inkubáltuk, így lehetővé tettük a DNS teljes beoldódását.

3.2.2 Polimeráz láncreakció

A DNS-analízis kiindulópontja a polimeráz láncreakcióval (PCR) végzett amplifikáció volt, mely standard módon az adott szekvenciára specifikus, szintetikus oligonukleotid primerek, dNTP, Taq polimeráz, puffer és DNS-templát alkalmazásával zajlott. Az amplifikáció MJ Research PTC 200 thermal cycler PCR készülékkel valósult meg. Az egyes vizsgálatokhoz használt, általunk tervezett primerek szekvenciáit a **1. táblázat** foglalja össze. PCR reakciók kondíciói a következők voltak a *GRHL2, NAT2*, *GRM7*, *GJB2* és *MARVELD2* gének variánsainak vizsgálatánál: elődenaturáció 2 min 95ºC-on, ezt

követte 35 cikluson keresztül a denaturáció 30s 95ºC-on. Az annealing hőmérséklete az rs10955255 és 13263539 SNP-k esetén 58ºC volt 30s-ig, az rs1981361, rs179930 és rs11928865 polimorfizmusoknál 60ºC volt 30s-ig, valamint az rs104894396 variáns esetében 52ºC volt 30s-ig, a c.1331+2T>C eltérésnél pedig 53ºC volt 30s-ig. Az annealing után a primer extenzió 30s volt 72ºC-on és a végső lánchosszabbítás 72ºC-on 5 percig tartott minden vizsgált polimorfizmus esetében. A keletkezett PCR termékek detektálása gélelektroforézissel (2%-os agaróz gélben), etídium-bromidos festéssel és UV megvilágítással történt.

1. Táblázat: Primer szekvenciák

Gén	SNP	Primer	Primerek (5'-3')
NAT2	rs1799930	forward	CATCTCCTGCCAAAGAAGAAAC
		reverse	TAGAAGGGATCCATCACCAGG
GRM7	rs11928865	forward	GGTATCTGTCTCCACTCCCAAC
		reverse	CCCAAAATGTTAAGCTTTATCTCC
GRHL2	rs10955255	forward	GGTTAAGGTAGTAGCTGCCAGG
		reverse	GATGGGAACAAAGGCTAAAAAG
	rs13263539	forward	CGAGCATAGCCATCCTTAAC
		reverse	GCTTTCAGCAATATCCCTCC
	rs1981361	forward	GATGGTTCCTCAGCTCACTTTG
		reverse	CAGGGTGTTTTCTCATGTATTCC
GJB2	rs104894396	forward	TCTTTTCCAGAGCAAACCGC
		reverse	GGGCAATGCGTTAAACTGGC
MARVELD2	c.1331+2 T>C	forward	CAGCAAAAATGAAACCTGAACTAC
		reverse	GTCTTGGAACACAGCTTTATCG

3.2.3 Restrikciós fragmenthossz analízis

A polimeráz láncreakciót követően, restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) vizsgálatot végeztünk a *NAT2*, *GRM7*, *GRHL2*, *GJB2*, és a *MARVELD2* polimorfizmusok esetében. A módszer tervezésekor és a restrikciós endonukleáz kiválasztásakor minden esetben fontos szempont volt, hogy az amplifikált target szekvencia tartalmazzon egy obligát hasító helyet is a keresett polimorfizmusokon kívül a módszer hatékonyságának ellenőrzése szempontjából. A vizsgálatok során alkalmazott restrikciós endonukleázok, hasítási mintázatuk és a hozzá tartozó genotípusok a **2. táblázat**ban kerültek feltüntetésre. A restrikciós enzimmel történő hasítás után az emésztett PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk szét. A genotípusok elkülönítése 3%-os agaróz gélben etídium-bromid festéssel, UV megvilágítással történt standard DNS létra mellett.

2. Táblázat: A vizsgált polimorfizmusok genotipizálásához használt restrikciós endonukleázok és hasítási mintázatuk.

Gén	SNP	PCR termék	Endonukleáz	Fragmentek	Genotípus
NAT2	rs1799930	334bp	TaqI	54, 110, 170	GG
				54, 110, 170, 224	GA
				110, 224	AA
GRM7	rs11928865	397bp	MunI	94, 127, 176	AA
				94, 127, 176, 303	AT
				94, 303	TT
GRHL2	rs10955255	413bp	Hin1II	35, 134, 244	AA
				35, 134, 244, 378	AG
				35, 378	GG
	rs13263539	140bp	BseGI	9, 131	GG
				9, 26, 105, 131	GA
				9, 26, 105	AA
	rs1981361	334bp	BseNI	114, 220	GG
				34, 114, 186, 220	GA
				34, 114, 186	AA
GJB2	rs104894396	723bp	BfaI	300, 423	GG
				101, 199, 300, 423	GA
				101, 199, 423	AA
MARVELD2	c.1331+2 T>C	392bp	Bsh1236I	22, 396	TT
				22, 85, 284, 396	TC
				22, 85, 284	CC

3.2.4 Direkt szekvenálás

Valamennyi, általunk tervezett PCR-RFLP módszer specificitását és eredményeink konfirmálását Sanger-féle bidirekcionális szekvenálással végeztük random módon BigDye Terminator v.1.1 cycle sequencing kit alkalmazásával, ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems CA, USA) szekvenátor segítségével. Továbbá a mitokondriális hajlamosító polimorfizmusok esetében alkalmaztunk Sanger-féle szekvenálási módszert.

3.2.4 Statisztikai elemzés

A populációk és a vizsgált genetikai variánsok között fennálló összefüggések feltárására $\chi 2$-tesztet alkalmaztunk SPSS 20.0 programcsalád felhasználásával és a szignifikancia szintet $p<0,05$-nél húztuk meg. A haplotípus vizsgálathoz Phase 2.1 programot, a kapcsoltsági vizsgálat elvégzéséhez pedig Haploview 3.3 szoftvert használtunk.

4. Eredmények

Valamennyi genotípus- és allélmegoszlás - a mitkonodriális polimorfizmusok és a *GJB2* gén rs104894396 kivételével - a Hardy-Weinberg egyensúlyt tükrözte.

4.1 *NAT2* rs1799930

A *NAT2* rs1799930 AA hajlamosító genotípus frekvenciája jelentős szignifikáns különbséget mutatott a roma és magyar populációk összehasonlítása során. A roma csoport esetében majdnem kétszer nagyobb a homozigóták aránya (14%) a magyarokhoz képest (7,7%). Az A minor allél frekvencia szintén szignifikánsan emelkedettebb volt a roma populációban a magyarokkal való összevetés során (38% vs. 26,7%, $p<0,05$). Azonban az egészséges és halláskárosodott roma populációk összehasonlítása során szignifikáns különbséget nem találtunk. Az eredmények a **3-4 táblázat**ban láthatóak.

3. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *NAT2* gén rs1799930 polimorfizmus esetében

***NAT2* rs1799930**	**Roma (n=298)**	**Magyar (n=298)**
GG	114 (38,20%)	162 (54,30%)
GA	142 (47,60%)	113 (38,00%)
AA	42 (14,00%)*	23 (7,70%)
A allél frekvencia	38,00%*	26,70%

* $p<0,05$

4. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *NAT2* gén rs1799930 polimorfizmus esetében egészséges és halláskárosodott roma csoportokban

***NAT2* rs1799930**	**Egészséges roma (n=298)**	**Halláskárosodott roma (n=113)**
GG	114 (38,20%)	45 (39,80%)
GA	142 (47,60%)	56 (49,50%)
AA	42 (14,00%)	12 (10,60%)
A allél frekvencia	38,00%	35,40%

4.2 *GRM7* rs11928865

A *GRM7* rs11928865 TT hajlamosító genotípus frekvenciája nem mutatott szignifikáns különbséget a roma és a magyar csoportokban (6,7% vs.7,0%), valamint a T minor allél frekvenciák szintjén sem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között (25,6% vs. 25,8%), a genotípus és allélfrekvencia eloszlása majdnem teljesen megegyezik a 2 populáció között. Az eredményeket a **5. táblázat** foglalja össze.

5. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *GRM7* gén rs11928865 polimorfizmus esetében

***GRM7* rs11928865**	**Roma (n=298)**	**Magyar (n=298)**
AA	165 (55,70%)	165 (55,70%)
AT	113 (37,90%)	112 (37,50%)
TT	20 (6,70%)	21 (7,00%)
T allél frekvencia	25,60%	25,80%

4.3 *GRHL2* rs10955255 rs13263539 és rs1981361

A *GRHL2* rs10955255 GG hajlamosító genotípus frekvenciája nem mutatott szignifikáns különbséget a roma és a magyar csoportokban (23,7% vs. 21,0%), valamint a G minor allél frekvenciák szintjén sem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között (50,8% vs. 47,0%). Azonban, az rs13263539 és a rs1981361 polimorfizmusok esetében mind a homozigóták, mind pedig az A allélfrekvenciák szintjén találtunk szignifikáns különbséget a 2 populáció között, a magyaroknál nagyobb arányban. Vizsgáltuk az rs13263539 és a rs1981361 polimorfizmusokat egészséges és halláskárosodott romákban, ahol azonban szignifikáns különbséget nem találtunk. Az eredmények az **6-7. táblázat**ban találhatóak. A 3 polimorfizmus haplotípus analízise során 8 haplotípust tudtunk megkülönböztetni egymástól, melyek százalékos eloszlását mindkét populáció esetében a **8. táblázat**ban tüntettük fel. A táblázatból azt is megfigyelhetjük, hogy a 6. 7. és a 8. haplotípusok szignifikánsan emelkedettebb értéket mutatnak a magyar populációban a romákhoz képest. A **12. ábra A (Roma) és B (Magyar)** részén 3 polimorfizmus kapcsoltsági térképei láthatóak, melyekről az olvasható le, hogy a roma populáció esetében a *GRHL2* gén 3 polimorfizmusa erősebben kapcsolt egymással, mint a magyar populáció esetében. Ezeket az adatok összevetve az európiai illetve az ázsiai kapcsoltsági térképekkel (**12. ábra C: Ázsia, D: Európa**), azt láthatjuk, hogy minimálisan ugyan, de eltérnek az értékek egymástól a roma és ázsiai, valamint a magyar és európai kapcsoltsági térképeken. Ez alól kivételt képez az rs10955255 és az rs13263539 polimorfizmusok kapcsoltsága mivel, ez az európai populációkban jóval erősebb, mint a vizsgált magyar populációban.

Továbbá mindhárom gén polimorfizmusait összevetettük különböző európai és ázsiai populációkkal, melynek során azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a *GRHL2* rs10955255 és a *GRM7* rs11928865 polimorfizmusok esetében a roma populáció allélfrekvenciái nagyjából megegyeznek az európai populációkban megfigyelt értékekkel. Azonban a másik 2 gén polimorfizmusai esetében *NAT2* 1799930, *GRHL2* rs13263539 és rs1981361 a roma populáció allélfrekvenciái inkább az ázsiai populációkhoz hasonlítanak. Ezekből a megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy az Indiából származó roma populáció az évszázadok során bizonyos mértékig összekeveredett a magyar populációval. A különböző európai és ázsiai populációk adatait a **9. táblázat** foglalja össze.

6. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *GRHL2* gén rs10955255, rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok esetében

GRHL2	**Roma (n=298)**	**Magyar (n=298)**
	rs10955255	
AA	66 (22,30%)	81 (27,00%)
AG	161 (54,00%)	154 (51,60%)
GG	71 (23,70%)	63 (21,00%)
G allél frekvencia	50,80%	47,00%
	rs13263539	
GG	102 (34,20%)	69 (23,20%)
GA	157 (52,30%)	153 (51,30%)
AA	39 (13,00%)	76 (25,30%)*
A allél frekvencia	37,90%	51,00%*
	rs1981361	
GG	87 (29,00%)	59 (19,80%)
GA	162 (54,40%)	143 (48,00%)
AA	49 (16,50%)	96 (32,30%)*
A allél frekvencia	43,60%	56,20%*

* $p<0,05$

7. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *GRHL2* gén rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok esetében egészséges és halláskárosodott roma csoportokban

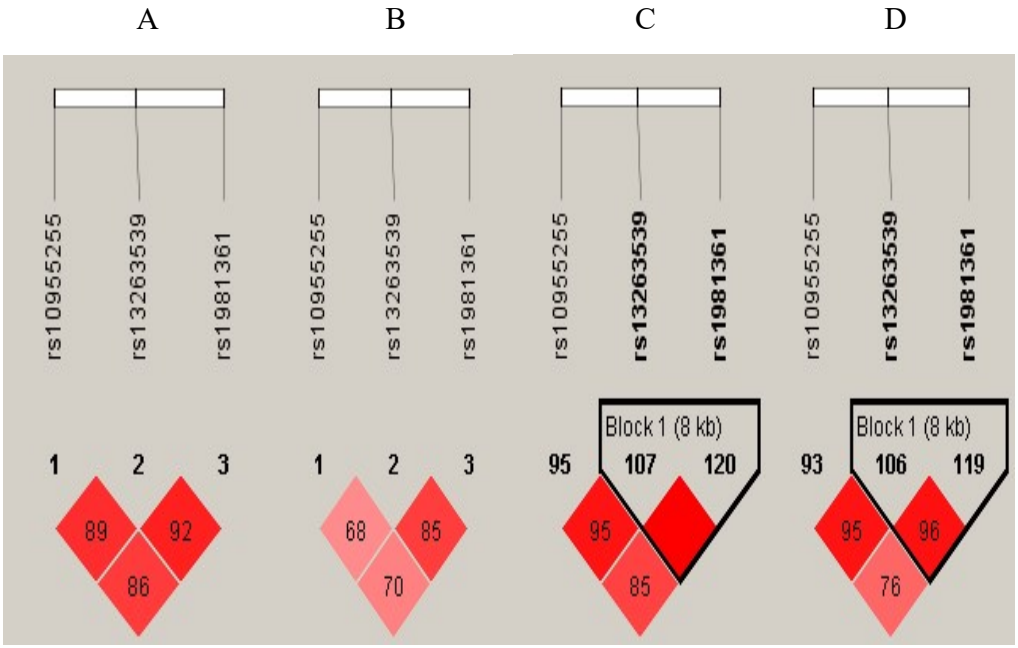
GRHL2	**Egészségees roma (n=298)**	**Halláskárosodott roma (n=113)**
rs13263539		
GG	102 (34,20%)	33 (29,20%)
GA	157 (52,30%)	64 (56,60%)
AA	39 (13,00%)	16 (14,20%)
A allél frekvencia	37,90%	42,50%
rs1981361		
GG	87 (29,00%)	23 (20,40%)
GA	162 (54,40%)	73 (64,60%)
AA	49 (16,50%)	17 (15,00%)
A allél frekvencia	43,60%	47,40%

8. Táblázat: A *GRHL2* gén rs1095525, rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok főbb haplotípusai és azok eloszlása magyar és roma populációk esetében.

rs10955255	**rs13263539**	**rs1981361**	**Haplocsoportok**	**Roma (%)**	**Magyar (%)**
A	G	C	ht1	7,66	5,80
A	G	T	ht2	3,17	3,97
A	A	C	ht3	0,69	0,99
A	A	T	ht4	37,60	44,20
G	G	C	ht5	46,90	34,90
G	G	T	ht6	1,87	4,47*
G	A	C	ht7	0,91	2,07*
G	A	T	ht8	1,15	5,51*

* $p<0,05$

12. Ábra: A *GRHL2* gén rs1095525, rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusainak kapcsoltsági térképe roma (A) és magyar (B) valamint ázsiai (C) és európai (D) populációs mintákkal



9. Táblázat: A *NAT2* rs1799930, *GRM7* rs11928865 és *GRHL2* rs10955255, rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok allélfrekvencia értékeinek összehasonlítása a már korábban publikált európai és ázsiai populációs adatokkal, www.ensembl.org adatai alapján.

Populációk	n	*NAT2* rs1799930		*GRM7* rs11928865		*GRHL2* rs10955255		*GRHL2* rs13263539		*GRHL2* rs1981361	
		G af (%)	A af (%)	A af (%)	T af (%)	A af (%)	G af (%)	A af (%)	G af (%)	C af (%)	T af (%)
EUR	1006	71,80	28,20	72,20	27,80	41,20	58,80	47,10	53,00	40,30	59,70
HUN	**298**	**73,30**	**26,70**	**74,20**	**25,80**	**53,00**	**47,00**	**49,00**	**51,00**	**43,80**	**56,20**
Roma	**298**	**62,00**	**38,00**	**74,40**	**25,60**	**49,20**	**50,80**	**62,10**	**37,90**	**56,40**	**43,60**
CEU	198	70,20	29,80	70,70	29,30	42,90	57,10	49,00	51,00	43,90	56,10
FIN	198	73,70	26,30	65,70	34,30	31,80	68,20	37,40	62,20	34,80	65,20
GBR	182	72,50	27,50	70,90	29,10	42,30	57,70	47,80	52,20	39,00	61,00
IBS	214	70,60	29,40	73,80	26,20	64,30	53,70	51,90	48,10	43,50	56,50
TSI	214	72,00	28,00	79,00	21,00	73,00	57,90	49,10	50,90	39,70	60,30
SAS	978	64,00	36,00	78,00	22,00	73,00	27,00	74,90	25,10	74,10	25,90
BEB	172	73,30	26,70	76,70	23,30	72,10	27,90	72,10	27,90	69,80	30,20
GIH	176	61,20	38,80	74,80	25,20	69,90	30,10	71,80	28,20	72,30	27,70
ITU	204	65,70	34,30	80,90	19,10	79,40	20,60	82,80	17,20	82,40	17,60
PJL	192	63,50	36,50	80,20	19,80	69,30	30,70	70,30	29,70	69,30	30,70
STU	204	57,80	42,20	77,50	22,50	74,00	26,00	77,00	23,00	76,00	24,00

n= elemszám, af=allélfrekvencia, EUR: európai, HUN: Magyar, CEU: Észak- és Nyugat-Európa, FIN: Finn, GBR: Bri, IBS: Ibériai, TSI: Toszkán, SAS: Dél-Ázsiai, BEB: Bengáli, GIH: Gujarati, ITU: Indiai Telugu, PJL: Punjabi, STU: Sri Lankai Tamur populáció az Egyesült Királyságból

4.4 *GJB2* W24X *(*rs104894396)

A *GJB2* gén rs104894396 polimorfizmus esetében a vizsgált minták között nem találtunk AA homozigóta egyéneket, ezért szignifikáns különbséget ebben az esetben nem tudtunk megfigyelni. Azonban az A alléfrekvencia esetében szignifikáns különbséget találtunk a 2 populáció között a romákban nagyobb arányban (1,62%) a magyarokhoz képest (0,20%). Az eredményeket a **10. táblázat** foglalja össze.

10. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *GJB2* gén rs104894396 polimorfizmus esetében

***GJB2* rs104894396**	**Roma (n=493)**	**Magyar (n=498)**
GG	485 (98,40%)	497 (99,80%)
GA	8 (1,62%)	1 (0,20%)
AA	0 (0,00%)	0 (0,00%)
A allél frekvencia	0,008%*	0,001%

* $p<0,05$

4.5 *MARVELD2* c.1331+2 T>C

A 143 szlovákiai roma hallássérült egyén esetében 5 betegben találtuk meg homozigóta formában és 1 egyén esetében pedig heterozigóta formában a *MARVELD2* c.1331+2 T>C mutációt. A 200 normál hallású szlovákiai romák közül 9 heterozigóta egyént találtunk a mutációra nézve, homozigóta eltérés nem volt megfigyelhető. A szlovákiai roma hallássérültek esetében a C allélfrekvencia 3,85%, míg a normál hallású szlovákiai roma csoport esetében 2,25%.

A 375 nem roma szlovákiai hallássérültek esetében a mutációra nézve nem azonosítottunk sem homozigóta, sem pedig heterozióta egyéneket.

A 85 magyarországi roma hallássérült esetében 7 homozigóta és 3 heterozigóta egyént azonosítottunk. Az egészséges magyarországi romák esetében pedig 5 darab heterozigóta esetet találtunk, homozigótát azonban egyet sem. A két magyarországi populációt összehasonlítva azt tapasztaljuk, hogy szignifikáns különbség van a C allélfrekvencia szintjén. A magyarországi hallássérült roma populáció esetében a C allélfrekvencia 10,0%, ami közel háromszor annyi, mint a szlovákiai siket populációban megfigyelt érték (3,85%). Másrészt a magyarországi egészséges roma populációban talált 0,5%-os C allélfrekvencia mintegy négyszer kisebb, mint a szlovákiai egészséges roma populációban megfigyelt érték (2,25%). Az eredményeket a **11-15 táblázat**ok foglalják össze. A vizsgálatban résztvevő

betegek c.1331 + 2T> C mutáció közös eredetének meghatározásához (amit először pakisztáni betegekben fedeztek fel) 21 további polimorfizmust vizsgáltunk. 18 SNP megtalálható volt mind a magyarországi mind a szlovákiai roma betegekben homozigóta formában, ami a közép-európai roma betegek közös ősét jelzi erre a mutációra nézve. Továbbá a kiválasztott polimorfizmusokat 56, a c.1331 + 2T> C mutációt nem hordozó egyénben vizsgáltuk. A 18 SNP-t lefedő haplotípus homozigóta állapotban nem volt kimutatható az elemzett kontroll mintákban, alátámasztva ezzel a mutáció közös eredetének hipotézisét e betegek között. Az eredményeket a **13. ábra** foglalja össze.

11. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *MARVELD2* c.1331+2 T>C eltérés esetében, halláskárosodott szlovákiai roma és egészséges szlovákiai roma populációk vizsgálatánál

***MARVELD2* c.1331+2 T>C**	**Halláskárosodott szlovákiai roma (n=143)**	**Egészséges szlovákiai roma (n=200)**
TT	137 (95,80%)	191 (95,50%)
TC	1 (0,69%)	9 (4,50%)
CC	5 (3,49%)	0 (0,00%)
C allél frekvencia	3,85%	2,25%

12. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *MARVELD2* c.1331+2 T>C eltérés esetében, halláskárosodott szlovákiai roma és halláskárosodott szlovákiai populációk vizsgálatánál

***MARVELD2* c.1331+2 T>C**	**Halláskárosodott szlovákiai roma (n=143)**	**Halláskárosodott szlovákiai (n=375)**
TT	137 (95,80%)	375 (100%)
TC	1 (0,69%)	0 (0,00%)
CC	5 (3,49%)	0 (0,00%)
C allél frekvencia	3,85%	0,00%

13. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *MARVELD2* c.1331+2 T>C eltérés esetében, halláskárosodott magyarországi roma és egészséges magyarországi roma populációk vizsgálatánál

***MARVELD2* c.1331+2 T>C**	**Halláskárosodott magyarországi roma (n=85)**	**Egészséges magyarországi roma (n=502)**
TT	75 (88,23%)	497 (99,00%)
TC	3 (3,53%)	5 (0,99%)
CC	7 (8,23%)	0 (0,00%)
C allél frekvencia	10,00%*	0,50%

* $p<0.05$

14. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *MARVELD2* c.1331+2 T>C eltérés esetében, halláskárosodott magyarországi roma és halláskárosodott szlovákiai Roma populációk vizsgálatánál

***MARVELD2* c.1331+2 T>C**	**Halláskárosodott magyarországi roma (n=85)**	**Halláskárosodott szlovákiai roma (n=143)**
TT	75 (88,23%)	137 (95,80%)
TC	3 (3,53%)	1 (0,69%)
CC	7 (8,23%)*	5 (3,49%)*
C allél frekvencia	10,00%*	3,85%*

* $p<0.05$

15. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *MARVELD2* c.1331+2 T>C eltérés esetében, egészséges magyarországi roma és egészséges szlovákiai roma populációk vizsgálatánál

***MARVELD2* c.1331+2 T>C**	**Egészséges magyarországi roma (n=502)**	**Egészséges szlovákiai roma (n=200)**
TT	497 (99,0%)	191 (95,5%)
TC	5 (0,99%)	9 (4,5%)
CC	0 (0,00%)	0 (0,00%)
C allél frekvencia	0,50%*	2,25%

* $p<0,05$

13. Ábra: A szlovákiai, csehországi és magyarországi romák valamint a pakisztáni betegek közös ősi haplotípusai

	Vizsgált betegek	Vizsgált polimorfizmusok																								
		rs542778	rs4699896	rs4976108	rs67911569	rs10059317	rs56103849	rs4252228	rs1168405	rs1168402	rs299086	rs299093	rs2434507	c.1183-1G>A	c.1331+2T>C	rs299075	rs299078	rs28652974	rs28409706	rs468467	rs188123810	rs467880	rs466930	rs2133729
		[C/T]	[A/G]	[C/T]	[A/G]	[A/G]	[A/T]	[C/T]	[A/T]	[A/T]	[A/G]	[A/G]	[C/T]	[G/A]	[T/C]	[C/T]	[A/T]	[G/T]	[C/T]	[C/T]	[C/T]	[A/G]	[A/G]	[C/T]
A c.1331+2T>C mutációt hordozó betegek	Szlovák 1	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Szlovák 2	Y	R	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Szlovák 3	C	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Szlovák 4	T	G	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	Y
	Szlovák 5	C	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Cseh 1	Y	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Cseh 2	T	R	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Cseh 3	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	C
	Cseh 4	Y	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Cseh 5	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	C
	Magyar 1	T	R	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Magyar 2	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Magyar 3	Y	R	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	Y
	Magyar 4	T	R	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Magyar 5	T	G	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Magyar 6	T	R	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Magyar 7	T	G	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	Pakisztáni 1	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	T	A	A	G	C
	Pakisztáni 2	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	T	A	A	G	C
A c.1331+2T>C mutációt nem hordozó kontrollok	Szlovák 6	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	R	A	C
	Szlovák 7	C	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	C	T	A	R	Y
	Szlovák 8	Y	A	C	R	G	W	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	Y	T	R	R	C
	Szlovák 9	Y	A	T	G	A	W	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	T	Y	T	A	G	C
	Szlovák 10	Y	A	C	G	G	W	C	A	T	A	G	C	G	C	C	A	G	Y	Y	T	A	G	Y
	Pakisztáni 3	C	G	C	G	G	A	C	A	T	A	G	C	A	C	C	A	G	C	T	A	A	G	C
	Pakisztáni 4	C	G	C	G	G	A	C	A	T	A	G	C	A	C	C	A	G	C	T	A	A	G	C

4.6 Mitokondriális polimorfizmusok

A mitokondriális hajlamosító polimorfizmusok vizsgálata során a vizsgált minták között nem találtunk szignifikáns különbséget egyik polimorfizmus esetében sem. Sőt azt is elmodhatjuk, hogy a 200 roma DNS minták mindegyike normál genotípusú volt. A magyar minták esetében 3 polimorfizmusnál találtunk homoplazmiás egyéneket, az m.961 T>G esetében 1 homoplazmiás, az m.961 T>C esetében 5 homoplazmiás valamint az m.1555 A>G esetében pedig 2 homoplazmiás eltérés volt megfigyelhető. Heteroplazmiát egyetlen esetben sem találtunk. Az eredményeket a **16. táblázat** foglalja össze.

16. Táblázat: Genotípus eloszlás a mitokondriális polimorfizmusok esetében

mtDNS	Roma (n=200)	Magyar (n=200)
A827G		
A	200 (100%)	200 (100%)
G	0 (0,00%)	0 (0,00%)
T961G		
T	200 (100%)	199 (99,50%)
G	0 (0,00%)	1 (0,5%)
T1095C		
T	200 (100%)	200 (100%)
C	0 (0,00%)	0 (0,00%)
T961C		
T	200 (100%)	195 (97,50%)
C	0 (0,00%)	5 (2,50%)
T1005C		
T	200 (100%)	200 (100%)
C	0 (0,00%)	0 (0,00%)
A1116G		
A	200 (100%)	200 (100%)
G	0 (0,00%)	0 (0,00%)
C1494T		
C	200 (100%)	200 (100%)
T	0 (0,00%)	0 (0,00%)
A1555G		
A	200 (100%)	198 (54,30%)
G	0 (0,00%)	2 (1,00%)

5. Eredmények megbeszélése és következtetések

A *NAT2*, *GRM7* és *GRHL2* gének polimorfizusairól az irodalomból tudjuk, hogy részt vehetnek az időskori halláskárosodás kialakulásában. Az ARHI vagy más néven időskori halláskárosodás fokozatosan alakul ki az öregedés folyamán, ha nem is az összes, de a legtöbb embernél élete során. Az öregedést molekuláris fiziológiai és biokémiai változások, csökkent mitokondriális funkció, progresszív DNS károsodás, csökkent celluláris víz koncentrációja, a sejtmembrán rugalmasságának csökkenése, ionos változások és a vaszkuláris elégtelenség okozzák (Seidman és mtsai 1996; Gates és mtsai 1999). Számos tényező képes elősegíteni az öregedést, többek között, genetikai mutációk melyek környezeti kölcsönhatásokkal társulhatnak, vagy a reaktív oxigéngyökök nagymértékű felhalmozódása. Kimutatták, hogy az öregedés során a belső fül keringési rendszerében, ezen belül pedig a cochleában is csökkent a véráramlás (Seidman és mtsai 1996; Coling és mtsai 2003). A cochlea számos szövete eltérő módon reagál a ROS-ok károsító hatására (Unal és mtsai 2005). A szövet glutation tartalmának csökkenése a legfontosabb tényező, amely károsíthatja a sejtek védettségét a ROS toxikus hatásai ellen, és peroxidatív sejtkárosodást okozhat (Ates és mtsai 2005). Több gént is felfedeztek már, ami hozzájárulhat az időskori halláskárosodás kialakulásához (Yamasoba és mtsai 2013). Ezek közül az egyik az N-acetiltranszferáz enzim, mely részt vesz a káros xenobiotikumok detoxifikációjában, amelyek közül több a belső fülben is megtalálható (Unal és mtsai 2005). A glutamát, stimuláló tulajdonsága miatt nagy mennyiségben neurotoxikus. Toxikus hatása az időskori halláskárosodás kialakulásában is kifejeződik. A metabotróp glutamát receptor (mGLURs) csökkenti a glutamát keletkezését. A *GRM7* variánsa megváltoztatja a glutamát szinaptikus autoregulációját a halló neuronok és szőrsejtek szinaptikus résében, ami idővel glutamát felhalmozódáshoz vezet, aminek eredményeként sejthalál következik be (Steinbach és matsai 2007). Kimutatták, hogy az eltérést hetero- illetve homozigóta genotípus formában hordozó egyéneknek rosszabb a hallása, mint a vad genotípusú embereknek (Seidman és mtsai 2002).

Jelen dolgozatban arra törekedtünk, hogy felfedjük az interetnikus genetikai különbségeket, az időskori halláskárosodásra hajlamosító *NAT2*, *GRM7* és *GRHL2* gének genotípusában és a variáns allélfrekvenciájában roma és magyar populációs mintákon. A

vizsgált *NAT2* rs1799930 illetve *GRHL2* rs13263539, és rs1981361 polimorfizmusok esetében szignifikáns különbségeket tudtunk megfigyelni a két populáció között. Ezen polimorfizmusok jelenléte az időskori halláskárosodás kialakulásának megnövekedett kockázatával jár. A vizsgálat során ki tudtuk mutatni, hogy *NAT2* rs1799930 mutáns allél hordozása a roma populáció esetében szignifikánsan emelkedett értéket mutatott, mint a magyar populációban, mind a homozigóták mind pedig az allélfrekvencia esetében is. Ezzel szemben, a *GRHL2* rs13263539 és rs1981361 mutáns alléljainak jelenléte a magyar populációban volt emelkedettebb a roma populációhoz képest a homozigóták és az allélfrekvenciák szintjén is. Továbbá, a vizsgált *GRHL2* gén 3 polimorfizmusának adataiból kapcsoltsági térképet tudtunk készíteni, melyből azt az eredményt kaptuk, hogy a 3 polimorfizmus a roma populáció esetében erősebben kapcsolt, mint a magyar populációban. Ezen kívül, a *GRHL2* gén polimorfizmusait vizsgálva 8 haplotípust azonosítottunk, melyek közül GGT, GAC és GAT haplotípusok frekvenciája szignifikánsan magasabb volt a magyar populációban, mint a roma csoportban. A *GRM7* rs11928865 és a *GRHL2* rs10955255 polimorfizmusok esetében a magyar és roma populációban, továbbá az *NAT2* rs1799930 és *GRHL2* rs13263539, és rs1981361 polimorfizmusok esetében az egészséges és halláskárosodott roma csoportok között nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. Következtetésként elmondható, ha etnikai különbségek állnak fent az allélfrekvenciában, a jövőben e variánsoknak fontos szerepe lehet a prevenciós és terápiás kezelésekben, azonban további vizsgálatok szükségesek nagyobb populációs mintákon, hogy meghatározzuk a pontos szerepét ezeknek a hajlamosító polimorfizmusoknak.

A *GJB2* génmutációk számos különböző fenotípusát okozzák a siketségnek, mint például a Wolfram-szindróma (MIM 222300), a Bart-Pumphrey-szindróma (MIM 149200), az autosomális domináns 3A (MIM 601544) és az autoszómális recesszív 1A (MIM 220290) siketség (MIM 602540), Keratitis-ichthyosis Siketség szindróma (MIM 148210), és a Vohwinkel szindróma (MIM 124500) (www.omim.org) (Snoeckx és mtsai 2005; Nance és mtsai 2003). A *GJB2* gén mutációi legtöbb esetben etnikai külnöbséget mutatnak. A legtöbb kaukázusi populációban a *GJB2* gén 35delG mutációja a gyermekkori nem szindrómás hallásvesztés kialakulásának 50%-áért felelős és ez a mutáció a leginkább vizsgált eltérés (Minarik és mtsai 2003). Ez egy frameshift mutáció, ami egy stop kodont

eredményez. Nem európai etnikai háttérrel rendelkező populációkban más *GJB2* génmutációk dominálnak a hallássérülteknél, mint például Indiában a W24X (83-96%) (Sipeky és mtsai 2009), az askenázi zsidókban a 167delT (76–81 %) (Morell és mtsai1998; Lerer és mtsai 2000; Sobe és mtsai 1999, 2000), az afrikaiakban R143W (pl. Ghana 93 %) (Brobby és mtsai 1998; Hamelmann és mtsai 2001), a kínaiakban (58–96 %) (Wang és mtsai 2002; Hwa és mtsai 2003; Liu és mtsai 2002), kóreaikaban (56 %) (Minarik és mtsai 2003), valamint japánokban pedig (34–74 %) (Abe és mtsai 2000; Kudo és mtsai 2000; Ohtsuka és mtsai 2003) a 235delC.

Mivel a *GJB2* gén domináns mutációja a del35G etnikai különbséget mutat, a *GJB2* W24X mutáns allél frekvenciája szintén különbözik az etnikumok között. A *GJB2* W24X mutáció allélfrekvenciájának előfordulási gyakoriságát a magyar és roma populációkban összehasonlították korábban közzétett más, különböző földrajzi elhelyezkedésű populációk adataival. A 71G>A (W24X) variánst ugyan megfigyelték az európaiaknál, de ehhez képest az előfordulási gyakorisága körülbelül háromszorosa pakisztániakban és legalább 20-szor magasabb az indiaiaknál (Maheshwari és mtsai 2003; Roux és mtsai 2004; RamShankar és mtsai 2003; Pampanos és mtsai 2002). Az rs104894396 polimorfizmus interetnikai különbségeinek összehasonlításával megállapítható, hogy a *GJB2* W24X mutáció nem található meg az egészséges indiai kontroll mintákban (Padma és mtsai 2009; Bhalla és mtsai 2009) és Délkelet-Brazíliában érintett emberekben (Cordeiro-Silva és mtsai 2011). Azonban a legmagasabb mutáns allélfrekvenciát Dél-Nyugat-régióbeli indiaiakban találták (32,5 %) (Joseph és mtsai 2009). Az rs104894396 SNP viszonylag gyakori Indiában a halláskárosultak esetében, valamint az indiai szubkontinensről származó populációkban, mint például a romák (Kelet-Szlovákia) (23,2%) (Minarik és mtsai 2003) és a brit bangladesi emberek körében (14,2%) (Bajaj és mtsai 2008). A magyar (0,10%) és roma (0,81%) populációkban talált *GJB2* W24X mutáns allélfrekvenciája a vizsgált populációkban megfigyelt tartománynak nagyon alacsony része volt (0,00-32,5%). Fontos megemlíteni azonban, hogy az egészséges indiaiak mutáns allélfrekvenciája sokkal alacsonyabb, mint a siket betegeké (Joseph és mtsai 2009; RamShankar és mtsai 2003). Továbbá a magyarországi egészséges romák mutáns allélfrekvenciája összehasonlítható a nem érintett indiaik allélfrekvenciájának gyakoriságával. Következtetésképpen elmondható, hogy a magyarországi roma populációban vizsgált adatok hasonlítanak az indiai

populációkban mért adatokhoz és szignifikánsan különböznek a magyar populációtól. Mivel az A allél jelenléte nagyobb valószínűséggel társul a halláskárosodáshoz, így a romáknál nyolcszor nagyobb az esélye a halláskárosodás kialakulásának.

Eddig az irodalomban 11 pakisztáni, 3 roma és 1 iráni eredetű családban azonosítottak *MARVELD2* génnel asszociált halláskárosodást (Shaikh és mtsai 2005; Riazuddi és mtsai 2006; Chishti és mtsai 2008; Babanejad és mtsai 2012; Safka és mtsai 2012). A leggyakoribb mutáció a c.313 + 2T> C, amelyet kilenc családban fedeztek fel. (Riazuddi és mtsai 2006; Chishti és mtsai 2008; Safka és mtsai 2012). Vizsgálataink során ezt a mutációt homozigóta formában találtuk meg tizenkét további roma családban, amelyek két közép-európai országból származtak (Szlovákia és Magyarország). A *MARVELD2* génhez tartozó halláskárosodás előfordulási gyakorisága a siket szlovákiai roma egyének csoportjában 3,5% volt, míg a siket magyarországi roma egyéneknél 8,23%. Hasonló ellentétet fedeztünk fel a c.313 + 2T> C mutáció C allélfrekvenciájában a szlovákiai (3,85%) és a magyarországi siket roma (10,0%) csoportok között. Ugyanakkor 4,5%-kal nagyobb eltérést figyeltünk meg a *MARVELD2* mutációt hordozó egészséges szlovákiai és a magyarországi roma egyének kontrollcsoportjai között. Nehéz meghatározni a c.313 + 2T> C homozigóták előfordulási gyakoriságát mivel Szlovákiában hiányoznak az adatok a siket romák számáról. Becslések szerint szlovákiai teljes népességből 10.200 egyénnek van kétoldali siketsége (Kabatov és mtsai 2007). Univerzális újszülött-kori hallásszűrő progam 2009-2011 között mért adatai alapján Szlovákiában a veleszületett siketség előfordulása 1000 újszülött esetében 1,2%. Sőt, feltételezik, hogy 1000 újszülöttből további 2-3 esetnél enyhébb veleszületett hallászcsökkenés figyelhető meg. Továbbá, úgy véljük, hogy ha a szlovákiai roma népesség a teljes népesség mintegy 7,45% -át teszi ki (Musinka és mtsa 2014), és a c.331 + 2T> C homozigóta előfordulási gyakorisága a *GJB2* negatív hallássérült romák esetében 3,5%, akkor a *MARVELD2* génhez kapcsolatos siketség Szlovákiában akár 80 családot is érinthet. Ez a számítás nem veszi figyelembe a beltenyésztési arányt, amely Szlovákiában fordul elő a legmagasabb arányban az európai roma népességnél (Ferak és mtsai 1987). Így a tényleges előfordulási gyakorisága e mutációnak még magasabb lehet, és további szűrések szükségesek a roma alpopulációkban, különösen Kelet-Szlovákiában. Magyarországra vonatkozó pontos adatok nem állnak rendelkezésre, bár a betegek hasonló száma várható az ország lakosságához igazítva. A *MARVELD2* gén további öt patogén

mutációját (c.1183-1G> A, c.1498C> T, c.1331 + 1G> A és c.331 + 2delTGAG), eddig csak a pakisztáni (Riazuddin és mtsai 2006; Chishti és mtsai 2008) és a 1543delA eltérést pedig csak iráni populációkban fedezték fel, melyek nem voltak kimutathatók a 143 vizsgált siket szlovákiai roma egyénnél. Azonban egy eddig ismeretlen patogenitású elétérést azonosítottunk (c.950G>A), ami Arginin-Glutamin aminosavcserét eredményezett a 317-es fehérje pozícióban. Ez a változat öt egyénben heterozigóta formában volt kimutatható. A c.950G> A szubsztitúció szerkezet-függő viszonya vagy klinikai hatása még nem ismert. In silico programokban a PolyPhen2, a SIFT és a MutationTaster előrejelzése szerint a c.950G> A eltérés valószínűleg patogén, ami hatással lehet a fehérje tulajdonságaira vagy az mRNS splicing-ra. További vizsgálatok szükségesek ennek az ismeretlen eltérésnek az értékelésére. A 375 hallássérült szlovák kaukázusi kontroll csoportban végzett c.1331 + 2T> C eltérés elemzése azt mutatja, hogy ez a mutáció Európában valószínűleg csak a roma népességre korlátozódik, és még mindig nem ismert a szláv kaukázusi etnikumban. Eddig, a *MARVELD2* homozigóta betegeket Európában csak Csehországban, Szlovákiában és Északkelet-Magyarországon figyeltek meg (Safka és mtsai 2012). Ezen populációk földrajzi eloszlása különböző régiókat foglal magába. Két cseh család az északnyugati régióból (Ústí nad Labem) és a harmadik pedig Dél-Csehországból (České Budějovice), három szlovák család a keleti (Prešov megye) és kettő a nyugati (Nyitra és Trencsén megye) országrészből, a homozigóta magyar egyének pedig Északkelet-Magyarországból (Borsod-Abaúj-Zemplén megye) származnak. De ez valójában annak a ténynek köszönhető, hogy a hallássérült magyarországi roma betegek DNS-mintái csak ezen a régióban voltak elérhetők. A lehetséges közös ős megkeresése során figyelembe kell venni a közép-európai roma népességre vonatkozó legfontosabb történelmi eseményeket. Csehországban a romák teljes eredeti lakosságát a II. Világháborús időszakban a náci koncentrációs táborokban megsemmisítették. Ezt követően a kommunista rezsim a romákat Szlovákia keleti részéből Cseh városokba költöztette (Koupilová és mtsai 2001; Lassuthova és mtsai 2014). Következésképpen a jelenlegi csehországi romák túlnyomó többsége Szlovákiából származik. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a c.313 + 2T> C mutációval rendelkező betegek közös ősi haplotípussal rendelkeznek-e. Tizenhét roma betegben (5 szlovák, 5 cseh és 7 magyar) genotipizáltunk 21 biallelikus polimorfizmust a c.313 + 2T> C eltérés körül 5,34 Mb-al. A

haplotípus-analízis során 18 polimorfizmus közös haplotípusát figyeltük meg, ami minden a c.313 + 2T> C eltérésre homozigóta roma egyénben megfigyelhető volt, de az 56 kontroll roma egyén közül egyikben sem. Ezek az adatok alátámasztják a közös ős eredetét az összes vizsgált c.1331+2T>C mutációval rendelkező szlovákiai, csehországi és magyarországi roma esetében.

Mitokondriális vizsgálataink során 200 egészséges magyar és 200 egészséges roma egyén mintáját vizsgáltuk Sanger-féle bidirekcionális szekvenálás módszerével, melynek eredményeképpen szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni a két populáció között. Feltételezhető, hogy sokkal nagyobb mintaszámmal kellene dolgozni ahhoz, hogy különbséget tudjunk kimutatni a populációk között. Azonban ez nem csak időigényes, hanem nagyon költséges munkafolyamat amitől vizsgálataink során eltekintettünk.

6 . Eredmények összefoglalása

1. Szignifikánsan emelkedett értéket mutat a *NAT2* rs1799930 mutáns allél hordozása a roma populáció esetében mind a homozigóták mind pedig az allélfrekvencia esetében is.

2. A *GRM7* rs11928865 és a *GRHL2* rs10955255 polimorfizmusok esetében nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a két populáció között.

3. *GRHL2* rs13263539 és rs1981361 mutáns alléljainak jelenléte a magyar populációban emelkedettebb a homozigóták és az allélfrekvencia szintjén is.

4. *GRHL2* gén rs132635393, rs1981361 és rs10955255 polimorfizmusok kapcsoltsági térképéből kiderül, hogy a 3 polimorfizmus a roma populáció esetében erősebben kapcsolt.

5. *GRHL2* gén 3 polimorfizmusát vizsgálva 8 haplotípust azonosítottunk, melyek közül GGT, GAC és GAT haplotípusok frekvenciája szignifikánsan magasabb a magyar populációban.

6. *GJB2* gén rs104894396 polimorfizmus vizsgálatánál szignifikáns különbséget figyelhetünk meg a roma és magyar populációk között a mutáns A allél frekvencia szintjén. A romáknál nyolcszor nagyobb lehet az esélye a halláskárosodás kialakulásának.

7. A *MARVELD2* c.1331+2 T>C eltérés C allélferkvencia szintjén nagyobb arányban fordul elő a halláskárosodott magyarországi romákban, mint az egészséges magyarországi romákban. A halláskárosodott magyarországi romákban a mutáns allél hordozása mind a homozigóta mind az allélfrekvencia szintjén szignifikánsan magasabb a siket szlovákiai romákhoz képest. Azonban az egészséges szlovákiai romákban a C allél frekvenciája szignifikánsan emelkedettebb az egészséges magyarországi romákhoz képest. Továbbá kimutattuk a közös ős eredetét az összes vizsgált c.1331+2T>C mutációval rendelkező szlovákiai, csehországi és magyarországi roma esetében.

8. A mitokondriális polimorfizmusok esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a két populáció között.

7. Közlemények jegyzéke

7.1 Értekezés alapjául szolgáló közlemények

Matyas P, Postyeni E, Komlosi K, Szalai R, Bene J, Magyari L, Melegh B, Hadzsiev K. 2018.

Age-related hearing impairment associated *NAT2*, *GRM7* and *GRHL2* susceptibility gene polymorphisms and haplotypes in Roma and Hungarian populations.

Pathology & Oncology Research

IF: 1.736

Matyas P, Postyeni E, Komlosi K, Szalai R, Bene J, Magyari L, Melegh B, Hadzsiev K. 2018.

Halláskárosodásban részt vevő *NAT2*, *GRM7* és *GRHL2* hajlamosító polimorfizmusok és haplotípusok Roma és Magyar populációban.

Népegészségügy 96: (1) pp. 51-58.

Mašindová I, Šoltýsová A, Varga L, **Matyas P**, Ficek A, et al. 2015.

***MARVELD2* (*DFNB49*) Mutations in the Hearing Impaired Central European Roma Population - Prevalence, Clinical Impact and the Common Origin.**

PLoS ONE 10(4): e0124232.

IF: 3.234

Sipeky C, **Matyas P**, Melegh M, Janicsek I, Szalai R, Szabo I, Varnai R, Tarlos G, Ganczer A, Melegh B. 2014.

Lower carrier rate of *GJB2* W24X ancestral Indian mutation in Roma samples from Hungary: implication for public health intervention.

Molecular Biology Reports 41(9):6105-10

IF: 2.024

7.2 Egyéb közlemények

Fekete A, Hadzsiev K, Bene J, Naszai A, **Matyas P**, Till A, Melegh B. 2017.
A8344G mitchondrial DNA mutation observed in two generation.
Orvosi Hetilap 158(12):468-471
IF: 0,349

Bene J, Hadzsiev K, Komlosi K, Kovesdi E, **Matyas P**, Melegh B 2015.
De novo *SCN1A* gene deletion in therapy-resistant Dravet syndrome.
Orvosi Hetilap 6;156(49):2009-12

Weber A, Szalai R, Sipeky C, Magyari L, Melegh M, Jaromi L, **Matyas P**, Duga B, Kovesdi E, Hadzsiev K, Melegh B. 2015
Increased prevalence of functional minor allele variants of drug metabolizing CYP2B6 and CYP2D6 genes in Roma population samples.
Pharmacological Reports 67(3):460-4.
IF: 2.165

Sumegi K, Jaromi L, Magyari L, Kovesdi E, Duga B, Szalai R, Maasz A, **Matyas P**, Janicsek I, Melegh B. 2015
Functional Variants of Lipid Level Modifier MLXIPL, GCKR, GALNT2, CILP2, ANGPTL3 and TRIB1 Genes in Healthy Roma and Hungarian Populations.
Pathology & Oncology Research 21(3):743-9
IF: 1.81

Nagy A, Sipeky C, Szalai R, Melegh B I, **Matyas P**, Ganczer A, Toth K, Melegh B. 2015
Marked differences in frequencies of statin therapy relevant SLCO1B1 variants and haplotypes between Roma and Hungarian populations.
BMC Genetics 3;16:108
IF: 2.40

Szalai R, Ganczer A, Magyari L, **Matyas P**, Bene J, Melegh B. 2015

Interethnic differences of cytochrome P450 gene polymorphisms may influence outcome of taxane therapy in Roma and Hungarian Population.

Drug metabolism and Pharmacokinetics 30(6):453-6.

IF: 2.558

Sipeky C, Weber A, Melegh BI, **Matyas P**, Janicsek I, Szalai R, Szabo I, Varnai R, Tarlos G, Ganczer A, Melegh B. 2015

Interethnic variability of CYP4F2 (V433M) in admixed population of Roma and Hungarians.

Environal Toxicology and Pharmacology 40(1):280-3.

IF: 2.084

Magyari L, Varszegi D, Sarlos P, Jaromi L, Melegh BI, Duga B, Kisfali P, Kovesdi E, **Matyas P**, Szabo A, Szalai R, Melegh B. 2014

Marked differences of haplotype tagging SNP distribution, linkage, and haplotype profile of IL23 receptor gene in Roma and Hungarian population samples.

Cytokine 65(2):148-52.

IF: 2.87

Szalai R, Magyari L, **Matyas P**, Duga B, Banfai Z, Szabo A, Kovesdi E, Melegh B. 2014

Genetic polymorphisms in promoter and intronic regions of CYP1A2 gene in Roma and Hungarian population samples.

Environtal Toxicology and Pharmacology 38(3):814-20.

IF: 1.862

Szalai R, **Matyas P**, Varszegi D, Melegh M, Magyari L, Jaromi L, Sumegi K, Duga B, Kovesdi E, Hadzsiev K, Melegh B. 2014.

Admixture of beneficial and unfavourable variants of GLCCI1 and FCER2 in Roma samples can implicate different clinical response to corticosteroids.

Molecular Biology Reports 41(11):7665-9.

IF: 1.958

Safrany E, Szabo M, Szell M, Kemeny L, Sumegi K, Melegh BI, Magyari L, **Matyas P**, Figler M, Weber A, Tulassay Z, Melegh B. 2013

Difference of interleukin-23 receptor gene haplotype variants in ulcerative colitis compared to Crohn's disease and psoriasis.

Inflammation Research 62(2):195-200.

IF: 2.143

7.3 Idézhető absztraktok

P. Matyas, R. Szalai, L. Magyari, B. Duga, E. Kovesdi, Z. Banfai, A. Szabo, B. Melegh

Asthma related FCER2 variant in Roma and Hungarian populations

Eur J Hum Genet. 2014;22 Suppl. 1, 501.

R. Szalai, C. Sipeky, L. Jaromi, L. Magyari, **P. Matyas**, J. Bene, B. Duga, E. Kovesdi, A. Szabo, B. Melegh.

Polymorphisms of CYP2B6 and CYP2D6 genes associated with drug metabolism in Roma population samples

Eur J Hum Genet. 2013;21 Suppl. 2, 383.

J. Bene, K. Sumegi, L. Jaromi, L. Magyari, E. Kovesdi, B. Duga, R. Szalai, **P. Matyas**, A. Szabo, Z. Banfai, B. Melegh.

Distribution of eight SNPs of lipid level modifier genes in healthy Roma and Hungarian population samples

Eur J Hum Genet. 2013;21 Suppl. 2, 404.

L. Magyari, D. Varszegi, P. Sarlos, L. Jaromi, J. Bene, B. Duga, K. Hadzsiev, P. Kisfali, K. Komlosi, E. Kovesdi, **P. Matyas**, A. Szabo, R. Szalai, B. Melegh

Marked differences of haplotype tagging SNP distribution, linkage and haplotype profile of IL23 receptor gene in Roma population samples

Eur J Hum Genet. 2013;21 Suppl. 2, 565.

R. Szalai, **P. Matyas**, L. Magyari, J. Bene, B. Duga, Z. Banfai, A. Szabo, B. Melegh
CYP1A2 gene non-coding region polymorphisms in Roma and Hungarian population samples
Eur J Hum Genet. 2014;22 Suppl. 1, 298.

A. Szabo, Z. Banfai, B. Duga, R. Szalai, L. Magyari, **P. Matyas**, E. Kovesdi, K. Sumegi, B. Melegh
Genetic relationship of European Roma people and eight ethnic groups from the Caucasus area which suggest Romas probably admixed with during their migration
Eur J Hum Genet. 2014;22 Suppl. 1, 320.

Z. Banfai, A. Szabo, K. Sumegi, B. Duga, L. Magyari, E. Kovesdi, **P. Matyas**, R. Szalai, B. Melegh
Admixture of Turks, Hungarians and Romas in the Carpathian Basin
Eur J Hum Genet. 2014;22 Suppl. 1, 509.

L. Magyari, R. Szalai, E. Kovesdi, Z. Banfai, B. Duga, **P. Matyas**, A. Szabo, B. Melegh
CYP1A1 variant in Roma population samples
Eur J Hum Genet. 2014;22 Suppl. 1, 303.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: **6,994**
Egyéb közlemények összesített impakt faktora: **20.199**
Összesített impakt faktor: **27.193**

8. Irodalomjegyzék

1. Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. (2000). Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J. Med. Genet.* 37(1):41–43.

2. Abicht A, Stucka R, Karcagi V, Herczegfalvi A, Horvath R, MortierW, Schara U, Ramaekers V, JostW, Brunner J, Janssen G, Seidel U, Schlotter B, Muller-Felber W, Pongratz D, Rudel R, Lochmuller H. (1999). A common mutation (epsilon1267delG) in congenital myasthenic patients of Gypsy ethnic origin. *Neurology.* 53(7):1564-9.

3. Apps SA, Rankin WA, Kurmis AP. (2007). Connexin 26 mutations in autosomal recessive deafness disorders: a review. *Int. J. Audiol.* 46(2):75–81.

4. Ates NA, Unal M, Tamer L, Derici E, Karakas S, Ercan B, Pata YS, Akbas Y, Vayisoglu Y, Camdeviren H (2005) Glutathione S-transferase gene polymorphisms in presbycusis. *Otol. Neurotol.* 26 (3):392-7.

5. Babanejad M, Fattahi Z, Bazazzadegan N, Nishimura C, Meyer N, Nikzat N, et al. (2012). A comprehensive study to determine heterogeneity of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in Iran. *Am. J. Med. Genet. Part. A*. 158A(10):2485–92.

6. Bacino C, Prezant T.R, Bu X, Fournier P, Fischel-Ghodsian N. (1995). Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. *Pharmacogenetics* 5(3):165-72.

7. Bajaj Y, Sirimanna T, Albert DM, Qadir P, Jenkins L, Bitner-Glindzicz M. (2008). Spectrum of GJB2 mutations causing deafness in the British Bangladeshi population. *Clin. Otolaryngol.* 33(4):313–8.

8. Bared A, MD, Ouyang X, Angeli S, Li Lin Du, Hoang K, Yan D, and Liu X. (2010). Antioxidant enzymes, presbycusis, and ethnic variability. *Otolaryngol. Head. Neck. Surg*. 143(2):263–8.

9. Bhalla S, Sharma R, Khandelwal G, Panda NK, Khullar M. (2009). Low incidence of GJB2, GJB6 and mitochondrial DNA mutations in North Indian patients with non-syndromic hearing impairment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*. 385(3):445–8.

10. Boczonadi V, Horvath R. (2014). Mitochondria: impaired mitochondrial translation in human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 48:77-84.

11. Bors A, Andrikovics H, Kalmar L, Erdei N, Galambos S, Losonczi A, Furedi S, Balogh I, Szalai C, Tordai A (2004) Frequencies of two common mutations (c.35delG and c.167delT) of the connexin 26 gene in different populations of Hungary. *Int. J. Mol. Med.* 14(6):1105–8.

12. Bouwer S, Angelicheva D, Chandler D, Seeman P, Tournev I, Kalaydjieva L. (2007). Carrier rates of the ancestral Indian W24X mutation in GJB2 in the general Gypsy population and individual subisolates. *Genet. Test.* 11(4):455–8.

13. Bray SJ, and Kafatos FC. (1991). Developmental function of Elf-1: an essential transcription factor during embryogenesis in Drosophila. *Genes. Dev*. 5(9):1672-83.

14. Brobby GW, Muller-Myhsok B, Horstmann RD. (1998). Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *N. Engl. J. Med.* 338(8):548–550.

15. Bruzzone R, White TW, Paul DL. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem*. 238(1):1-27

16. Chen W, Xiao Liu Z, Oh JE, Shin KH, Kim RH, Jiang M, Park NH, and Kang MK. (2012). Grainyhead-like 2 (GRHL2) inhibits keratinocyte differentiation through epigenetic mechanism. *Cell. Death. Dis*. 3:e450.

17. Chinnery PFI, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiga A (2014). Mitochondrial Disorders Overview. *Gene. Reviews*.

18. Chishti MS, Bhatti A, Tamim S, Lee K, McDonald ML, Leal SM, Ahmad W. (2008). Splice-site mutations in the TRIC gene underlie autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment in Pakistani families. *J. Hum. Genet*. 53(2):101–5.

19. Cieply B, Farris J, Denvir J, Ford HL, Frisch SM. (2013). Epithelial-mesenchymal transition and tumor suppression are controlled by a reciprocal feedback loop between ZEB1 and Grainyhead-like-2. *Cancer. Res*. 73(20): 6299–309.

20. Coling DE, Yu KC, Somand D, Satar B, Bai U, Huang TT, Seidman MD, Epstein CJ, Mhatre AN, Lalwani AK (2003). Effect of SOD1 overexpression on age- and noise-related hearing loss. *Free. Radic. Biol. Med.* 34(7):873-80.

21. Cooper GM. (2000).The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. *Sunderland (MA): Sinauer Associates.*

22. Cordeiro-Silva Mde F, Barbosa A, Santiago M, Provetti M, Dettogni RS, Tovar TT, Rabbi-Bortolini E, Louro ID. (2011). Mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes in Southeastern Brazilians with hereditary nonsyndromic deafness. *Mol. Biol. Rep.* 38(2):1309–13.

23. Crowe D. (1991). The gypsies of Eastern Europe. *Armonki: M.E. Sharpe*.

24. Cruickshanks KJ, Wiley TL, Tweed TS, et al. (1998). Prevalence of hearing loss in older adults in Beaver Dam, Wisconsin. The Epidemiology of Hearing Loss Study. *Am. J. Epidemiol*. 148(9):879–86.

25. Davis AC. (1989). The prevalence of hearing impairment and reported hearing disablilty among adults in Great Britain. *Int. J. Epidemiol*. 18(4):911-7.

26. Davis A, Parving A. (1994). Towards appropriate epidemiology data on childhood hearing disability: a comparative European study of birth-cohorts 1982-1988. *J. Audiol. Med*. 3:35-47.

27. Davis J, Davis BD (1968). Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. *J. Biol. Chem.* 243(12):3312–16.

28. Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl HH, Middleton A, Houseman MJ, Dodé C, Marlin S, Boulila-ElGaïed A, Grati M, Ayadi H, BenArab S, Bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M, Loiselet J, El-Zir E, Aubois A, Joannard A, Levilliers J, Garabédian EN, Mueller RF, Gardner RJ, Petit C, et al.(1997). Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Mol. Genet.* 6(12):2172-7.

29. Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, Govea N, Mila M, Zelante L, Gasparini P (1998). Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet.* 351(9100):394–8.

30. Estivill X, Govea N, Barcelo E, Badenas C, Romero E, Moral L, Scozzri R, D'Urbano L, Zeviani M, Torroni A, (1998b). Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am.. J. Hum. Genet*. 62(1):27–35.

31. Ferak V, Sivakova D, Sieglova Z. (1987). The Slovak gyspsies (Romany) – a population with the highest coefficient og inbreeding in Europe. *Bratisl. Lek. Listy*. 87(2):168-75

32. Fraser AM. (1992). The Gypsies. *Blackwell*.

33. Fraser GR. (1970). The casues of profound deafness in childhood. In: Sensorineural hearing loss. *Cyba. Found. Symp*. 1970:5-40.

34. Friedman RA, Van Laer L, Huentelman MJ, Sheth SS, Van Eyken E, Corneveaux JJ, Tembe WD, Halperin RF, Thorburn AQ, Thys A, Bonneux S, Fransen E, Huyghe J, Pyykko I, Cremers C, Kremer H, Dhooge I,Stephens D, Orzan E, Pfister M, Bille M, Parving A, Sorri M, Van de Fraser A. (1992). The Gypsies. *Blackwell Publishers*.

35. Gates GA, Couropmitree NN, Myers RH. (1999) Genetic associations in age-related hearing thresholds. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* 125(6):654-9.

36. Gorlin RJ, Torellio HV, Cohen MM Jr. (1995) Hereditary hearing loss and its syndromes. Oxford monographs on medical genetics. No.28. New York: *Oxford University Press*.

37. Gresham D, Morar B, Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Wise C, Angelicheva D, Calafell F, Oefner PJ, Shen P, Tournev I, de Pablo R, Kucinskas V, Perez-Lezaun A, Marushiakova E, Popov V, Kalaydjieva L. (2001a). Origins and divergence of the Roma (gypsies). *Am. J. Hum. Genet*. 69(6):1314-31.

38. Hamelmann C, Amedofu GK, Albrecht K, Muntau B, Gelhaus A, Brobby GW, Horstmann RD. (2001). Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. *Hum. Mutat.* 18(1):84–5.

39. Han Y, Mu Y, Li X, Xu P, Tong J, Liu Z, Ma T, Zeng G, Yang S, Du J, and Meng A. (2011). Grhl2 deficiency impairs otic development and hearing ability in a zebrafish model of the progressive dominant hearing loss DFNA28. *Hum. Mol. Genet*. 20(16): 3213–26.

40. Hajioff S, McKee M. (2000). The health of the Roma people: a review of the published literature. *J. Epidemiol Community Health*. 54(11):864–9.

41. Heyning P, Makmura P, Ohmen JD, Linthicum FH, Fayad JN, Pearson J, Craig DW, Stephan DA,Van Camp G. (2009).GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Human Molecular Genetics*. 18(4):785-96.

42. Hwa HL, Ko TM, Hsu CJ, Huang CH, Chiang YL, Oong JL, Chen CC, Hsu CK. (2003). Mutation spectrum of the connexin 26 (GJB2) gene in Taiwanese patients with prelingual deafness. *Genet. Med.* 5(3):161–5.

43. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell. Biol*. 171 (6):939–45.

44. Joseph AY, Rasool TJ (2009) High frequency of connexin26 (GJB2) mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the population of Kerala. *India. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 73(3):437–43.

45. Juhász E, Béres J, Kanizsai S, Nagy K. (2012). The consequence of a founder effect: CCR5-32, CCR2-54I and SDF1-3A polymorphism in Vlach gypsy population in Hungary. *Pathol. Oncol. Res*. 18(2):177-82.

46. Kabatov Z, Profant M. (2007). Deafness and cochlear implantation. *Via pract.* 4:76-8.

47. Kalaydjieva L, Calafell F, Jobling MA, Angelicheva D, de Knijff P, Rosser ZH, Hurles ME, Underhill P, Tournev I, Marushiakova E, Popov V. (2001*a*). Patterns of inter- and intragroup genetic diversity in the Vlax Roma as revealed by Y chromosome and mitochondrial DNA lineages. *Eur. J. Hum. Genet.* 9(2):97–104.

48. Kalaydjieva L, Gresham D, Gooding R, Heather L, Baas F, de Jonge R, Blechschmidt K, Angelicheva D, Chandler D,Worsley P, Rosenthal A, King RH, Thomas PK. (2000). N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy–Lom. *Am. J. Hum. Genet.* 67(1):47–58.

49. Kalaydjieva L, Hallmayer J, Chandler D, Savov A, Nikolova A, Angelicheva D, King RH, Ishpekova B, Honeyman K, Calafell F, Shmarov A, Petrova J, Turnev I, Hristova A, Moskov M, Stancheva S, Petkova I, Bittles AH, Georgieva V, Middleton L, Thomas PK (1996) Gene mapping in Gypsies identifies a novel demyelinating neuropathy on chromosome 8q24. *Nat. Genet.* 14(2):214–7

50. Kalaydjieva L, Morar B. (2003). Roma (Gypsies): genetic studies. In: Cooper DN (ed) Nature encyclopedia of the human genome. *Nature Publishing Group*. pp 160–5.

51. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC. (2000). Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain. Res. Rev.* 32(1):163–6.

52. Konings A, Guy Van Camp G, Goethals A, Van Eyken E, Vandevelde A, Ben Azza J, Peeters N, Wuyts W, Smeets H, Van Laer L. (2008). Mutation analysis of mitochondrial DNA 12 SrRNA and tRNASer(UCN) genes in non-syndromic hearing loss patients. *Mitochondrion.* 8(5-6):377–82.

53. Koupilová I, Epstein H, Holcik J, Hajihoff S, McKee M. (2001). Health needs of the Roma population in the Czech and Slovak Republics. *Soc. Sci. Med*. 53(9):1191-204.

54. Kudo T, Ikeda K, Kure S, Matsubara Y, Oshima T, Watanabe K, Kawase T, Narisawa K, Takasaka T. (2000). Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. *Am. J. Med. Genet.* 90(2):141–5.

55. Laasuthova P, Sisková D, Haberlová J, Sakmaryová I, Filous A, Seeman P. (2014). Congenital cataract, facial dysmorphism and demyelinating neutropathy (CCFDN) in 10 Czech gypsy children – frequent and underestimated cause of disabilityamong Czech gypsies. *Orphanet. J. Rare. Dis*. 9:46.

56. Lerer I, Sagi M, Malamud E, Levi H, Raas-Rothschild A, Abeliovich D. (2000). Contribution of connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT. *Am. J. Med. Genet.* 95(1):53–6.

57. Li X, Huo X, Liu K, Li X, Wang M, Chu H, Hu F, Sheng H, Zhang Z, and Zhu B. (2013). Association between genetic variations in GRHL2 and noise-induced hearing loss in Chinese high intensity noise exposed workers: a case-control analysis. *Ind. Health.* 51(6):612–21.

58. Liegeois J-P (1994) Roma, Gypsies, travellers. Council of Europe Press, Strasbourg Li Z, Li R, Chen J, Liao Z, Zhu Y, Quian Y, Xiong S, Heman-Ackah S, Wu J, Choo DI, Guan MX. (2005). Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. *Hum. Genet.* 117(1): 9–15

59. Liu XZ, Xia XJ, Ke XM, Ouyang XM, Du LL, Liu YH, Angeli S, Telischi FF, Nance WE, Balkany T, Xu LR. (2002). The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population. *Hum. Genet.* 111(4–5):394–7.

60. Lortholary O, Tod M, Cohen Y, Petitjean O. (1995). Aminoglycosides. *Med. Clin. North. Am.* 79(4):761–98.

61. Maheshwari M, Vijaya R, Ghosh M, Shastri S, Kabra M, Menon PS. (2003). Screening of families with autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment (ARNSHI) for mutations in GJB2 gene: Indian scenario. *Am. J. Med. Genet*. 120(2):180–4.

62. Makoff A, Pilling C, Harrington K, and Emson P. (1996). Human metabotropic glutamate receptor type 7: molecular cloning and mRNA distribution in the CNS. *Brain Res. Mol. Brain. Res*. 40(1):165–70.

63. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. (1993). Genetic epidemilogical studeis of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am. J. Med. Genet.* 46(5):486-91.

64. Marushiakova E, Popov V. (1997). Gypsies (Roma) in Bulgaria. In: Studien zur Tsiganologie und Folkloristik. *Peter Lang Publishing*. pp 15–122.

65. Minarik G, Ferak V, Ferakova E, Ficek A, Polakova H, Kadasi L.(2003). High frequency of GJB2 mutation W24X among SlovakvRomany (Gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). *Gen. Physiol. Biophys.* 22(4):549–56.

66. Mlacki M, Darido C, Jane S.M, and Wilanowski T. (2014). Loss of Grainy head-like 1 is associated with disruption of the epidermal barrier and squamous cell carcinoma of the skin. *PLoS ONE.* 9(2):e89247.

67. Morar B, Gresham D, Angelicheva D, Tournev I, Gooding R, Guergueltcheva V, Schmidt C, Abicht A, Lochmuller H, Tordai A, Kalmar L, Nagy M, Karcagi V, Jeanpierre M, Herczegfalvi A, Beeson D, Venkataraman V, Warwick C K, Reeve J, de Pablo R, Kucinskas V, Kalaydjieva L. (2004b). Mutation history of the roma/gypsies. *Am. J. Hum. Genet*. 75(4):596-609.

68. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB. (1998). Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N. Engl. J. Med.* 339(21):1500–5.

69. Morton NE. (1991.) Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 630:16-31.

70. Musinka A, Skobla D, Hurrle J, Matlovicova K, Kling J. (2014). Atlas of Roma communities in Slovakia 2013. *UNDP.*

71. Nance WE. (2003). The genetics of deafness. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev*. 9(2):109–19.

72. Narasimha M, Uv, Krejci A, Brown N.H, and Bray S.J. (2008). Grainy head promotes expression of septate junction proteins and influences epithelial morphogenesis. *J. Cell. Sci*. 121(6): 747–52.

73. Nayak G, Lee SI, Yousaf R, Edelmann SE, Trincot C, Van Itallie CM, Shina Gp, Rafeeg M, Jones SM, Belyantseva IA, Anderson JM, Forge A, Frolenkov GI, Riazuddin S. (2013). Tricellulin deficiency affects tight junction architecture and cochlear hair cells. *J. Clin. Invest.* 123(9):4036–49.

74. Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S, Namba A, Abe S, Van Laer L, Van Camp G, Usami S. (2003). GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. *Hum. Genet.* 112(4):329–33.

75. Padma G, Ramchander PV, Nandur UV, Padma T. (2009). GJB2 and GJB6 gene mutations found in Indian probands with congenital hearing impairment. *J. Genet.* 88(3):267–72.

76. Pampanos A, Economides J, Iliadou V, Neou P, Leotsakos P, Voyiatzis N, Eleftheriades N, Tsakanikos M, Antoniadi T, Hatzaki A, Konstantopoulou I, Yannoukakos D, Gronskov K,Brondum-Nielsen K, Grigoriadou M, Gyftodimou J, Iliades T, Skevas A, Petersen MB. (2002). Prevalence of GJB2 mutations in prelingual deafness in the Greek population. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 65(2):101–8.

77. Peters LM, Anderson DW, Griffith AJ, Grundfast KM, San Agustin TB, Madeo AC, Friedman TB, and Morell RJ. (2002). Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. *Hum. Mol. Genet*. 11(23): 2877–85.

78. Petit C. (1996). Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat. Genet*. 14(4):385-91.

79. Petulengro G. (1915–1916) Report on the Gypsy tribes of north-east Bulgaria. *J. Gypsy. Lore. Soc.* 9:1–109.

80. Piccolo F, Jeanpierre M, Leturcq F, Dode C, Azibi K, Toutain A, Merlini L, Jarre L, Navarro C, Krishnamoorthy R, Tome FM, Urtizberea JA, Beckmann JS, Campbell KP, Kaplan JC. (1996). A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum. Mol. Genet.* 5(12):2019–22.

81. Pytel J. Audiológia, *Viktória Kiadó*. Pécs 1996.

82. Popov I, Khristova I, Stoĭkov S. (1999). Sex behavior and contraception among the population of Romany origin. *Akush. Ginekol*. 38(4):25-7.

83. Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, Shohat M, Fischer-Ghodsian N. (1993). Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat. Genet*. 4(3):289–94.

84. Pujol R, Puel J.L, Gervais d'Aldin C, Eybalin M. (1993). Pathophysiology of the lutamatergic synapses in the cochlea. *Acta. Otolaryngol*. 113(3):330–4.

85. RamShankar M, Girirajan S, Dagan O, Ravi Shankar HM, Jalvi R, Rangasayee R, Avraham KB, Anand A. (2003). Contribution of connexin26 (GJB2) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India. *J. Med. Genet.* 40(5):e68.

86. Shaikh RS, Ramzan K Nazli S, Sattar S, Khan SN, Riazuddin S, Ahmed ZM , Riazuddin S. (2005). A new locus for nonsyndromic deafness DFNB49 maps to chromosome 5q12.3-q14.1. *Hum. Genet*. 116(1-2):17–22.

87. Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, Khan SN, Chattaraj P, Friedman PL, Anderson JM, Belyantseva IA, Forge A, Riazuddin S, Friedman TB. (2006). Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am. J. Hum. Genet*. 79(6):1040–51

88. Rodriguez-Ballesteros M, Olarte M, Aguirre LA, Galan F, Galan R, Vallejo LA, Navas C, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, Moreno F, del Castillo I. (2006). Molecular and clinical characterisation of three Spanish families with maternally inherited non-syndromic hearing loss caused by the 1494C>T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene. *J. Med. Genet*. 43(11):e54.

89. Rogers T, Chandler D, Angelicheva D, Thomas PK, Youl B, Tournev I, Gergelcheva V, Kalaydjieva L. (2000). A novel locus for autosomal recessive peripheral neuropathy in the EGR2 region on 10q23. *Am. J. Hum. Genet.* 67(3):664–71.

90. Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugere V, Templin C, Leprevost D, Artieres F, Lina G, Molinari N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M. (2004). Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC. Med. Genet.* 5:5.

91. Šafka Brožková D, Laštůvková J, Štěpánková H, Krůtová M, Trková M, Myška P, Seeman P. (2012). DFNB49 is an important cause of non-syndromic deafness in Czech Roma patients but not in the general Czech population. *Clin. Genet*. 82(6):579–82.

92. Sande MA, Mandell GL. (1990). Antimicrobial agents. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds) Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, 8th edn. *Pergamon. Press*. pp 1098–116.

93. Seidman MD, Khan MJ, Dolan DF, Quirk WS. (1996). Age-related differences in cochlear microcirculation and auditory brain stem response. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg*. 122(11):1221–6.

94. Sipeky C, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Polgar N, Lakner L, Szabo M, Takacs I, Melegh B. (2009). Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) haplotypes in healthy Hungarian and Roma population samples. *Pharmacogenomics.* 10(6):1025–32.

95. Snoeckx RL, Huygen PL, 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 AR, Nekahm-Heis D, Seeman P, Bendova O, Kenna MA, Frangulov A, Rehm HL, Tekin M, Incesulu A, Dahl HH, du Sart D, Jenkins L, Lucas D, Bitner-Glindzicz M, Avraham KB, Brownstein Z, del Castillo I, Moreno F, Blin N, Pfister M, Sziklai I, Toth T, Kelley PM, Cohn ES, Van Maldergem L, Hilbert P, Roux AF, Mondain M, Hoefsloot LH, Cremers CW, Lopponen T, Lopponen 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 CJ, Smith RJ, Van Camp G. (2005). GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *A.m J. Hum. Genet.* 77(6):945–57.

96. Sobe T, Erlich P, Berry A, Korostichevsky M, Vreugde S, Avraham KB, Bonne-Tamir B, Shohat M. (1999). High frequency of the deafness-associated 167delT mutation in the connexin 26 (GJB2) gene in Israeli Ashkenazim. *Am. J. Med. Genet.* 86(5):499–500

97. Sobe T, Vreugde S, Shahin H, Berlin M, Davis N, Kanaan M, Yaron Y, Orr-Urtreger A, Frydman M, Shohat M, Avraham KB. (2000). The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum. Genet*. 106(1):50–7

98. Staecker H, Zheng QY, van de Water T. (2001). Oxidative stress in aging in the C57B16/J mouse cochlea. *Acta. Otolaryngol*. 121(6):666–72.

99. Steinbach S, Lutz J. (2007). Glutamate induces apoptosis in cultured spiral ganglion explants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357(1):14-9.

100. Stramer B, Martin P. (2005). Cell biology: master regulators of sealing and healing. *Curr. Biol*. 15(11):R425–R427.

101. Tessa A, Giannotti A, Tieri L, Vilarinho L, Marotta G, Santorelli FM. (2001). Maternally inherited deafness associated with a T1095C mutation in the mDNA. *Eur. J. Hum. Genet*. 9(2):147–9.

102. Unal M, Tamer L, Dogruer ZN, Yildirim H, Vayisoglu Y, Camdeviren H. (2005).N-acetyltransferase 2 gene polymorphism and presbycusis. *Laryngoscope*. 115(12):2238–41.

103. Usami S, Abe S, Kasai M, Shinkawa H, Moeller B, Kenyon JB, Kimberling WJ. (1997). Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *Laryngoscope.* 107(4):483–90.

104. Van Eyken E, Van Camp G, Fransen E, Topsakal V, Hendrickx JJ, Demeester K, Van de Heyning P, Mäki-Torkko E, Hannula S, Sorri M, Jensen M, Parving A, Bille M, Baur M, Pfister M, Bonaconsa A, Mazzoli M, Orzan E, Espeso A, Stephens D, Verbruggen K, Huyghe J, Dhooge I, Huygen P, Kremer H, Cremers CW, Kunst S, Manninen M, Pyykkö I, Lacava A, Steffens M, Wienker TF, Van Laer L. (2007). The N-acetyltransferase 2 polymorphism NAT2* 6A is a causative factor for age related hearing impairment. *J. Med. Genet.* 44(9):570–8.

105. Van Laer L, van Eyken E, Fransen E, Huyghe JR, Topsakal V, Hendrickx JJ, Hannula S, Maki-Torkko E, Jensen M, Demeester K, Baur M, Bonaconsa A, Mazzoli M, Espeso A, Verbruggen K, Huyghe J, Huygen P, Kunst S, Manninen M, Konings A, Diaz-Lacava AN, Steffens M, Wienker TF, Pyykko¨ I, Cremers CWRJ, Kremer H, Dhooge I, Stephens D, Orzan E, Pfister M, Bille M, Parving A, Sorri M, van de Heyning PH, van Camp G. (2008). The grainyhead like 2 gene (GRHL2), alias TFCP2L3, is associated with age-related hearing impairment. *Hum. Mol. Genet.* 17(2):159–69.

106. Varma S, Cao Y, Tagne JB, Lakshminarayanan M, Li J, Friedman TB, Morell RJ, Warburton D, Kotton DN, and Ramirez MI. (2012). The transcription factors Grainyhead-like 2 and NK2-homeobox 1 form a regulatory loop that coordinates lung epithelial cell morphogenesis and differentiation. *J. Biol. Chem*. 287(44):37282–95.

107. Varma S, Mahavadi P, Sasikumar S, Cushing L, Hyland T, Rosser AE, Riccardi D, Lu J, Kalin TV, Kalinichenko VV, Guenther A, Ramirez MI, Pardo A, Selman M, Warburton D. (2014). Grainyhead-like 2 (GRHL2) distribution reveals novel pathophysiological differences between human idiopathic pulmonary fibrosis and mouse models of pulmonary fibrosis. *Am J. Physiol. Lung. Cell. Mol.Physiol*. 306(5):L405–19.

108. Varon R, Gooding R, Steglich C, Marns L, Tang H, Angelicheva D, Yong KK, Ambrugger P, Reinhold A, Morar B, Baas F, Kwa M, Tournev I, Guerguelcheva V, Kremensky I, Lochmüller H, Müllner-Eidenböck A, Merlini L, Neumann L, Bürger J, Walter M, Swoboda K, Thomas PK, von Moers A, Risch N, Kalaydjieva L. (2003). Partial deficiency of the Cterminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nat. Genet.* 35(2):185–9.

109. Venkatesan K, McManus HR, Mello CC, Smith TF, Hansen U. (2003). Functional conservation between members of an ancient duplicated transcription factor family, LSF/Grainyhead. *Nucleic Acids Res*. 31(15):4304–16.

110. Vona B, Nanda I, Neuner C, Muller T, and Haaf T. (2013). Confirmation of GRHL2 as the gene for the DFNA28 locus. *Am. J. Med. Genet*. *A.* 161A(8):2060–5.

111. Wang YC, Kung CY, Su MC, Su CC, Hsu HM, Tsai CC, Lin CC, Li SY. (2002). Mutations of Cx26 gene (GJB2) for prelingual deafness in Taiwan. *Eur. J. Hum. Genet.* 10(8):495–8.

112. Werner S, Frey S, Riethdorf S, Schulze C, Alawi M, Kling L, Vafaizadeh V, Sauter G, Terracciano L, Schumacher U, Pantel K, Assmann V. (2013). Dual roles of the transcription factor rainyheadlike 2 (GRHL2) in breast cancer. *J. Biol. Chem*. 288(32):22993–23008.

113. Werth M, Walentin K, Aue A, Schonheit J, Wuebken A, Pode-Shakked N, Vilianovitch L, Erdmann B, Dekel B, Bader M, Barash J, Rosenbauer F, Luft FC, Schmidt-Ott KM. (2010). The transcription factor grainyheadlike 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development.* 137(22):3835–45.

114. Wilanowski T, Tuckfield A, Cerruti L, O'Connell S, Saint R, Parekh V, Tao J, Cunningham J.M, Jane SM. (2002). A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to Drosophila grainyhead. *Mech. Dev*. 114(1-2):37–50.

115. Willems PJ. (2000). Genetic causes of hearing Loss. *New England journal of Medicine.* 342(15):1101-9

116. Xiang J, Fu X, Ran W, Chen X, Hang Z, Mao H, and Wang, Z (2013). Expression and role of grainyhead-like 2 in gastric cancer. *Med. Oncol*. 30(4):714.

117. Yamasoba Tatsuya, Frank R. Lin, Shinichi Someya, Akinori Kashio, Takashi Sakamoto, Kenji Kondo. (2013). Current concepts in age-related hearing loss: Epidemiology and mechanistic pathways. *Hearing research*. 303:30-8.

118. Young WY, Zhao L, Qian Y, Li R, Chen J, Yuan H, Dai P, Zhai S, Han D, Guan MX. (2006). Variants in mitochondrial tRNAGlu, tRNAArg, and tRNAThr may influence the phenotypic manifestation of deafness-associated 12S rRNA A1555G mutation in three Han Chinese families with hearing loss. *Am. J. Med. Genet. A.* 140(20):2188–97.

119. Zhao H, Li R, Wang Q, Yan Q, Deng J.H, Han D, Bai Y, Young WY, Guan MX. (2004). Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am. J. Hum. Genet*. 74(1):139–52.

9. Köszönetnyilvánítás

A doktori disszertációm alapjául szolgáló kutatómunkát a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán az Orvosi Genetikai Intézetben végeztem Dr. Melegh Béla Professzor Úr témavezetésével, aki lehetővé tette számomra, hogy részt vegyek a kutatásban, szakmai tevékenységemet mindvégig figyelemmel kísérte, kutató munkámat irányította és segítette. Hasznos útmutatásai, meglátásai tették lehetővé közleményeim megjelenését.

Köszönöm továbbá Dr. Berenténé Dr. Bene Juditnak a szakmai és emberi segítséget, valamint az Intézet összes dolgozójának azt a támogatást, amit munkám során kaptam.

Végül köszönöm családom megértő türelmét, szeretetét és bátorítását.

Pathology & Oncology Research
https://doi.org/10.1007/s12253-018-0388-6

ORIGINAL ARTICLE

Age-Related Hearing Impairment Associated *NAT2*, *GRM7*, *GRHL2* Susceptibility Gene Polymorphisms and Haplotypes in Roma and Hungarian Populations

Petra Matyas[1,2] · Etelka Postyeni[1,2] · Katalin Komlosi[1,2] · Renata Szalai[1,2] · Judit Bene[1,2] · Lili Magyari[1,2] · Bela Melegh[1,2] · Kinga Hadzsiev[1,2]

Received: 29 March 2017 / Accepted: 5 February 2018
© Arányi Lajos Foundation 2018

Abstract
Age-related hearing impairment (ARHI) is the most frequent sensory disease in the elderly, which is caused by an interaction between genetic and environmental factors. Here we examined the ethnic differences, allele and genotype frequencies of the *NAT2*, *GRM7*, and *GRHL2* genes pooled samples of healthy Hungarian and healthy and hearing impaired Roma people. Study populations of healthy Hungarian and Roma subjects were characterized for the rs1799930 *NAT2,* rs11928865 *GRM7*, rs10955255, rs13263539, and rs1981361 *GRHL2* polymorphisms and deaf Roma subjects were characterized for the rs1799930 *NAT2,* rs13263539, and rs1981361 *GRHL2* using a PCR-RFLP method. We found significant differences in minor allele frequencies for *GRHL2* rs13263539 and rs1981361 polymorphism between healthy Roma and Hungarian samples (37.9% vs. 51.0% and 43.6% vs. 56.2%, respectively; $p < 0.05$). The differences of homozygous genotype of *GRHL2* rs13263539 and rs1981361 variants, values were also significantly different (13.0% vs. 25.3% and 16.5 vs. 32.3%; $p < 0.05$). The *NAT2* rs1799930 homozygous genotype was 14.0% in healthy Romas and 7.7% in Hungarians, while the minor A allele frequency was 38.0% and 26.7% in Roma and Hungarian population, respectively ($p < 0.05$). Furthermore, the frequency of GGT, GAC and GAT haplotypes was significantly higher in the Hungarian population than in healthy Roma (1.87 vs. 4.47%, 0.91 vs. 2.07% and 1.15 vs. 5.51%, respectively; $p < 0.008$). Present study revealed significant interethnic differences in allele polymorphisms of *NAT2*, *GRM7* and *GRHL2* exhibit quite marked ethnic differences in Roma populations that might have important implications for the preventive and therapeutic treatments in this population.

Keywords *NAT2* · *GRM7* · *GRHL2* · ARHI · Roma · Hungarian

Introduction

Several studies have shown that age-related hearing impairment (ARHI) is one of the most common types of hearing disorders and it is a complex of high-frequency hearing loss (HL) caused by degenerative changes in the inner ear with aging [1, 2]. Age-related hearing loss develops in different age groups with various degree, and it is known that

✉ Bela Melegh
melegh.bela@pte.hu

Petra Matyas
matyas.petra@pte.hu

Etelka Postyeni
etelka14@gmail.com

Katalin Komlosi
komlosi.katalin@pte.hu

Renata Szalai
szalai.renata@pte.hu

Judit Bene
bene.judit@pte.hu

Lili Magyari
magyari.lili@pte.hu

Kinga Hadzsiev
hadzsiev.kinga@pte.hu

[1] Department of Medical Genetics, University of Pecs, Medical School, Szigeti 12, Pecs H-7624, Hungary

[2] Human Genetic and Pharmacogenomic Research Group, Janos Szentagothai Research Centre, Ifjusag 20, Pecs H-7624, Hungary

Published online: 17 February 2018

genetic host factors associate with the degenerative mechanisms [3, 4].

There is raising evidence that aging, noise exposure and medications may impair the inner ear tissues by way of reactive oxygen species (ROS) induced cellular injury [1, 5]. ROS are natural byproducts of aerobic metabolism; and oxidative stress is the result of the accumulation of reactive oxygen species. Bared A. et al. hypothesized that oxidative stress in the inner ear increases ROS production by polymorphisms of antioxidant enzymes making them susceptible to ARHI.

There is a significant correlation between age-related hearing loss and polymorphism in the gene for Nacetyltransferase 2 (*NAT2*) enzyme that has an antioxidant role in the cochlea [3, 6]. *NAT2* is an isoenzyme of N-acetyltransferase (NAT) enzyme, which is a susceptibility gene for age-related hearing impairment. N-acetyltransferases are also known to be responsible for the detoxification of exogenic substrates by N-acetylation or O-acetylation, to be involved in the detoxification of harmful xenobiotics, and NAT are important for the balance of the oxidative status. The enzyme N-acetyltransferase 2 (NAT2) is involved in the formation of reactive oxygen species (ROS). A large amount of ROS contributes to the aging of the inner ear. It is well known from previous studies that certain *NAT2* genotypes may be associated with the risk of age-related hearing impairment [6, 7].

The glutamate metabotropic receptor7 (*GRM7*) gene is located on chromosome 3, and contains 10 exons which translate into a 915 amino acid protein. *GRM7* has a central role in glutamate synaptic transmission and homeostasis in the cochlea at the synapses between the dendrites and hair cells of afferent auditory nerve fibers. The presence of glutamate in large quantity causes neurotoxicity in auditory neurons [8]. The rs11928865 polymorphism of *GRM7* is associated with ARHI and particularly with speech detection in elderly [9].

The grainyhead-like 2 (*GRHL2*) gene is also known as *TFCP2L3* (transcription factor cellular promoter 2-like 3) and *BOM* (brother of mammalian grainyhead). This gene is on chromosome 8q22.3, and is composed of 16 exons which encode a protein of 625 amino acids. *GRHL2* is a transcription factor which is expressed in different epithelial cells, and not only plays a central role in embryonic development, but is also responsible for the maintenance of epithelial cells [10, 11]. In the *GRHL2* gene several SNPs have been associated with age-related hearing loss susceptibility and we selected three of these polymorphisms, rs10955255, rs13263539, and rs1981361 for our study [12].

The size of the Roma population is about 12–15 million in the world and from this 10–12 million Roma people live in Europe. In Hungary there are circa 700.000–1 million Romas [13, 14]. In the Roma population the general morbidity rate is increased, the infant mortality is fourfold elevated, and their lifetime expectance is ten years less compared to Central and Eastern European populations. The relatively highly conserved gene pool of the Roma people is derived from India [15].

The aim of the study was to investigate the *NAT2, GRM7* and *GRHL2* gene polymorphisms as a putative causative factor for ARHI in healthy Roma and Hungarian population samples to assess genetic distribution and interethnic differences between the two groups.

Methods

Study Population

A total of 298 healthy Roma (118 males, 180 females; mean age 42.33 ± 15,51 years) and 298 healthy Hungarian subjects (168 males, 130 females; mean age 37,43 ± 12,53 years) were investigated in case of each polymorphisms. 113 deaf Roma people (57 males and 56 females) were characterized for the rs1799930 *NAT2,* rs13263539, and rs1981361 *GRHL2.* DNA samples with accompanying personal and clinical data were derived from healthy Caucasian and Roma subjects from Hungary. Roma people declared their Roma origin. Written informed consent was obtained from all subjects. The DNA samples of the Roma and the Hungarian population originated from the central Biobank governed by the University of Pecs, as part of the National Biobank Network of Hungary (www.biobanks.hu), which belongs also to the pan-European Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure project (http://bbmri.eu/bbmri/). The maintenance and governance principles of the Biobank have been approved by the National Scientific Research Ethics Committee (ETT TUKEB, Budapest, Hungary). The collection and usage of DNA samples and management of data followed the Helsinki Declaration of 1975.

Molecular Methods

Genomic DNA was isolated from peripheral EDTA-anticoagulated blood samples using a standard desalting method. Genotyping was carried out using polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction endonuclease digestion (RFLP). For detection of the *NAT2* rs1799930 polymorphism the following primers were used: 5′- CATCTCCTGCCAAA GAAGAAAC -3′ and 5′- TAGAAGGGATCCATCACCAGG -3′. For the amplification of the target sequence of the *GRM7* rs11928865 the 5′- GGTATCTGTCTCCACTCCCAAC -3′ and 5′- CCCAAAATGTTAAGCTTTATCTCC -3′ primers were utilized. For determination of the *GRHL2* rs10955255 the following primers were used: 5′- GGTTAAGGTAGTAG CTGCCAGG -3′, and 5′- GATGGGAACAAAGGCTAAAA AG -3′; to test the rs13263539 SNP the 5′- CGAGCATA GCCATCCTTAAC -3′ and 5′- GCTTTCAGCAATAT CCCTCC -3′ oligonucleotides were used. and for the

detection of rs1981361 SNP: 5′- GATGGTTCCTCAGC TCACTTTG -3′, and 5′- CAGGGTGTTTTCTCATGTAT TCC -3′ were used.

The PCR amplification was carried out in a final volume of 50 μl containing 200 μM of each dNTP, 1 U of Taq polymerase, 5 μl of reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, containing 500 mM KCl, 14 mM $MgCl_2$), 0.2 mM of each primers and 1 μg extracted DNA. The PCR amplifications were performed on MJ Research PTC 200 thermal cyclers. PCR conditions were as follows: predenaturation for 2 min at 95 °C, followed by 35 cycles of denaturation for 30 s at 95 °C, annealing for 30 s at 60 °C for rs1799930 (*NAT2*) and for rs11928865 (*GRM7*), and 58 °C for rs10955255 and for rs1981361 (*GRHL2*), and 55 °C for rs13263539 (*GRHL2*) primer extension for 30 s at 72 °C, the final extension at 72 °C for 5 min. Digested PCR products were separated by electrophoresis using a 1% agarose gel stained with ethidium-bromide and visualized by UV illumination. The amplicon was digested by allele-specific restriction endonuclease. The amplicon of the *NAT2* rs1799930 SNP was digested with TaqI endonuclease. The MunI was used to cleave of the *GRM7* rs11928865 variant. The PCR product of the *GRHL2* rs10955255, rs13263539 and rs1981361 primers were digested by Hin1II, BseGI and BseNI restriction enzymes, respectively The digested PCR products were separated by electrophoresis using a 3% agarose gel. The amplicon contained an obligatory cleavage site to enable us to control the efficacy of the digestion. Direct sequencing was performed by ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems [CA, USA]) on random samples to confirm our results.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS Statistics 20.0 package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). We applied the Chi-square test to compare the differences between the studied groups, $p \leq 0.05$ value was considered as statistically significant. For haplotype analysis we used the Phase Program Version 2.1. For linkage disequilibrium analyses we used Haploview software v.3.3.

Results

All allele frequencies and genotype rates were in Hardy-Weinberg equilibrium in both the Hungarian, and Roma groups in the three genes. The genotypes and minor allele frequencies of the examined genes are presented in Table 1.

In the investigated polymorphism of the *NAT2* gene we found significant differences, the AA homozygous genotype ($p = 0.013$) had a higher prevalence in the Roma population (14.1%) compared to the Hungarian cohorts (7.7%). There is an almost two-fold higher incidence of carrying *NAT2* variant allele in Romas than in Hungarians. Furthermore, the minor allele frequency was shown to be significantly higher in the Roma population samples than in Hungarians (38.0% and 26.7%, respectively, $p < 0.05$). We did not find significant differences between healthy Hungarian and Roma subjects neither in the homozygous genotype nor in the minor allele frequency in case of rs11928865 (*GRM7*) and rs10955255 (*GRHL2*). However, we found significant differences for rs13263539 and rs1981361 of *GRHL2* in the minor allele frequency and the homozygous genotype too. The homozygous genotypes in both cases have a lower prevalence in the Roma population than in Hungarians. Furthermore, we did not find significant differences between healthy and deaf Roma populations in case of rs1799930 (*NAT2*), rs13263539 and rs1981361 (*GRHL2*) (Table 2).

Haplotype analysis was performed using the detected SNPs of *GRHL2*. Table 3 summarizes the determined eight haplotypes (ht) and their SNPs and the frequencies of the detected

Table 1 Genotypes and minor allele frequencies of *NAT2* rs1799930; *GRM7* rs11928865; *GRHL2* rs10955255, rs13263539 and rs1981361 polymorphisms in case of healthy Roma and Hungarian populations

NAT2	Roma ($n = 298$)	Hungarian (n = 298)
rs1799930		
GG	114 (38.3%)	162 (54.3%)
GA	142 (47.6%)	113 (38.0%)
AA	42 (14.1%)*	23 (7.7%)
A allele frequency	38%*	26.7%
GRM7	Roma (n = 298)	Hungarian (n = 298)
rs11928865		
AA	165 (55.4%)	165 (55.4%)
AT	113 (37.9%)	112 (37.6%)
TT	20 (6.7%)	21 (7.0%)
T allele frequency	25.6%	25.8%
GRHL2	Roma (n = 298)	Hungarian (n = 298)
rs10955255		
AA	66 (22.3%)	81 (27.2%)
AG	161 (54.0%)	154 (51.7%)
GG	71 (23.7%)	63 (21.1%)
G allele frequency	50.8%	47.0%
rs13263539		
GG	102 (34.2%)	69 (23.2%)
GA	157 (52.7%)	153 (51.3%)
AA	39 (13.1%)*	76 (25.5%)
A allele frequency	37.9%*	51%
rs1981361		
GG	87 (29.1%)	59 (19.8%)
GA	162 (54.4%)	143 (48.0%)
AA	49 (16.5%)*	96 (32.2%)
A allele frequency	43.6%*	56.2%

*$p < 0.05$ vs. Hungarians

Table 2 Genotypes and minor allele frequencies of *NAT2* rs1799930; *GRHL2* rs13263539 and rs1981361 polymorphisms in case of healthy and hearing impaired Roma populations

NAT2	Roma (n = 298)	Hearing impaired Roma (*n* = 113)
rs1799930		
GG	114 (38.3%)	45 (39.8%)
GA	142 (47.6%)	56 (49.5%)
AA	42 (14.1%)	12 (10.6%)
A allele frequency	38.0%	35.4%
GRHL2	Roma (n = 298)	Hearing impaired Roma (n = 113)
rs13263539		
GG	102 (34.2%)	33 (29.2%)
GA	157 (52.7%)	64 (56.6%)
AA	39 (13.1%)	16 (14.2%)
A allele frequency	37.9%	42.5%
GRHL2	Roma (n = 298)	Hearing impaired Roma (n = 113)
rs1981361		
GG	87 (29.2%)	23 (20.4%)
GA	162 (54.4%)	73 (64.6%)
AA	49 (16.4%)	17 (15.0%)
A allele frequency	43.6%	47.4%

*$p < 0.05$ vs. Hungarians

haplotypes in healthy Roma and Hungarian samples. The statistical analysis revealed significant differences in the prevalence rates of GGT, GAC and GAT haplotypes between the Roma and Hungarian populations ($p < 0.008$). The occurrence of GGT and GAC haplotypes were two-fold higher in Hungarian than in Roma samples. In addition, the presence of GAT haplotype was almost five-fold higher in Hungarian than in Roma populations.

Linkage analysis was performed using the detected SNPs. Figure 1 shows the linkage disequilibrium (LD) plot of *GRHL2* rs10955255, rs13263539 and rs1981361 polymorphisms in healthy Roma (A) and Hungarian (B) populations. The LD values were denoted as (|D'|×100). The linkage between the examined SNPs was stronger in Roma populations than in Hungarian samples. The LD values were 68, 70 and 85 in Hungarians and 98, 86 and 92 in Roma samples, respectively.

Discussion

ARHI is the loss of hearing that gradually occurs in most individuals as they grow older. Aging is caused by molecular physiological and biochemical changes, a decrease in mitochondrial function, progressive DNA deterioration, lower concentration of cellular water, reduced cellular membrane elasticity, ionic changes and vascular insufficiency [16, 17]. Many factors redound to aging inter alia genetic mutations with environmental interactions or a significant presence of ROS. It has been shown that in the aging cochlea, blood flow

Table 3 Major haplotypes (ht) and observed frequencies of the detected haplotypes in Roma and Hungarian populations

Haplotypes	SNP			Population	
	rs10955255	rs13263539	rs1981361	Roma (%)	Hungarian (%)
ht1	A	G	C	7.66	5.8
ht2	A	G	T	3.17	3.97
ht3	A	A	C	0.69	0.99
ht4	A	A	T	37.6	44.2
ht5	G	G	C	46.9	34.9
ht6	G	G	T	1.87*	4.47
ht7	G	A	C	0.91*	2.07
ht8	G	A	T	1.15*	5.51

*$p < 0.05$ vs. Hungarians

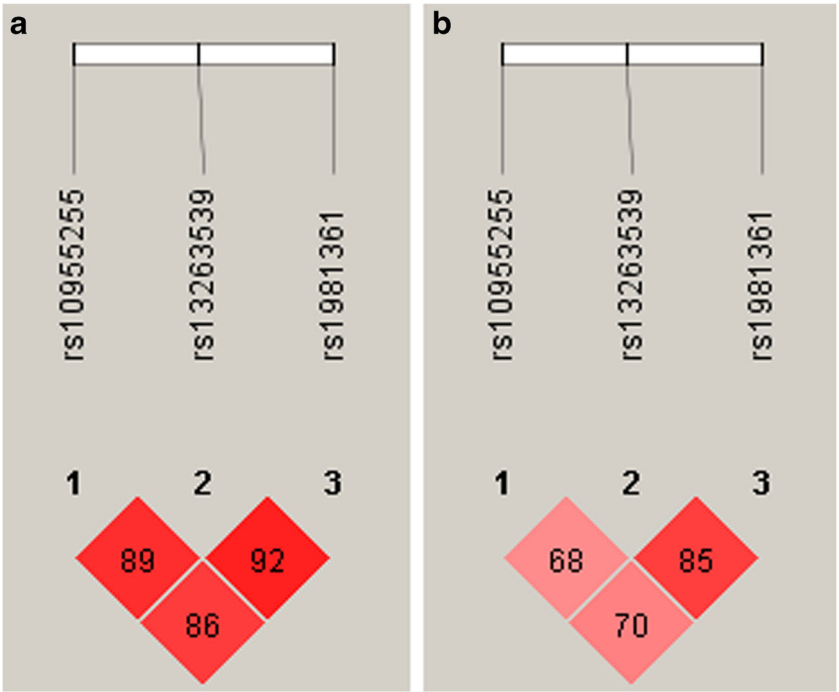


Fig. 1 Linkage disequilibrium analysis for the *GRHL2* rs10955255 (1), rs13263539 (2) and rs1981361 (3) polymorphisms in Roma (**a**) and Hungarian (**b**) populations

is reduced in the inner ear circulatory system [16, 18]. Several tissues in the cochlea react differently to the damaging effect of ROS [3]. Lautermann et al. stated that aging may cause changes in all tissues, but the enzyme activity does not change, and the quantity of glutathione was influenced in the auditory nerve only. Reducing tissue glutathione is a main factor that can damage cellular protection against the toxic effects of ROS and may cause peroxidative cell damage [19].

There are many genes which may contribute to presbycusis [4]. N-acetyltransferase (NAT) enzymes are known to be active in detoxifying xenobiotic toxins. There are 3 types of *NAT2* enzyme metabolism, fast, intermediate, and slow acetylator phenotypes. The mutant allele carriers have decreased acetyltransferase activity and are slow acetylators [3]. The NAT slow-acetylator status appears to be a risk factor of ARHI, several studies propose a significant association [7].

Table 4 Major and minor allele frequencies (af) of *NAT2* rs1799930; *GRM7* rs11928865; *GRHL2* rs10955255, rs13263539 and rs1981361 polymorphisms in case of different populations

Populations	n	NAT2 rs1799930		GRM7 rs11928865		GRHL2 rs10955255		GRHL2 rs13263539		GRHL2 rs1981361	
		G af (%)	A af (%)	A af (%)	T af (%)	A af (%)	G af (%)	A af (%)	G af (%)	C af (%)	T af (%)
EUR	1006	71,8	28,2	72,2	27,8	41,2	58,8	47,1	53,0	40,3	59,7
HUN	298	73,3	26,7	74,2	25,8	53,0	47,0	49,0	51,0	43,8	56,2
Roma	298	62,0	38,0	74,4	25,6	49,2	50,8	62,1	37,9	56,4	43,6
CEU	198	70,2	29,8	70,7	29,3	42,9	57,1	49,0	51,0	43,9	56,1
FIN	198	73,7	26,3	65,7	34,3	31,8	68,2	37,4	62,2	34,8	65,2
GBR	182	72,5	27,5	70,9	29,1	42,3	57,7	47,8	52,2	39,0	61,0
IBS	214	70,6	29,4	73,8	26,2	64,3	53,7	51,9	48,1	43,5	56,5
TSI	214	72,0	28,0	79,0	21,0	73,0	57,9	49,1	50,9	39,7	60,3
SAS	978	64,0	36,0	78,0	22,0	73,0	27,0	74,9	25,1	74,1	25,9
BEB	172	73,3	26,7	76,7	23,3	72,1	27,9	72,1	27,9	69,8	30,2
GIH	176	61,2	38,8	74,8	25,2	69,9	30,1	71,8	28,2	72,3	27,7
ITU	204	65,7	34,3	80,9	19,1	79,4	20,6	82,8	17,2	82,4	17,6
PJL	192	63,5	36,5	80,2	19,8	69,3	30,7	70,3	29,7	69,3	30,7
STU	204	57,8	42,2	77,5	22,5	74,0	26,0	77,0	23,0	76,0	24,0

A high rate of glutamate is neurotoxic, because of its stimulant properties. Glutamate toxicity is involved in different forms of hearing loss, for example in ARHI [20]. *GRM7* variants likely play a role in ARHI through excytotoxicity. Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) reduce the release of glutamate. The autoregulation of the glutamate changes in the synaptic gap of the auditory neurons and inner hair cells, which leads to cell death because of the variant of *GRM7* [21].

Results of Bared et al. [7] showed that people with the high-risk genotype (heterozygous and homozygous genotypes) had worse hearing than those individuals with the low-risk (wild type) genotype. In the current study we aimed to reveal the interethnic differences in genotypes and variant allele frequencies of the *NAT2, GRM7* and *GRHL2* genes in the Roma population as compared to the Hungarian population. We observed differences in allele profiles of the examined *NAT2* rs1799930, *GRHL2* rs13263539, and rs1981361 variants between the Hungarian and Roma samples. Our study showed that the prevalence of carrying a mutant allele with an increased risk of ARHI is higher among Romas than among Hungarians in case of *NAT2* polymorphism. However, in case of *GRHL2* rs13263539 and rs1981361 the prevalence of the mutant allele is higher in Hungarian controls compared with Roma samples. Furthermore, the frequency of GGT, GAC and GAT haplotypes was significantly higher in the Hungarian population than in Roma (1.87 vs. 4.47%, 0.91 vs. 2.07% and 1.15 vs. 5.51%, respectively; $p < 0.008$).

The observed Roma and Hungarian major and minor allele frequency of all polymorphisms compared to previously published data from www.ensembl.org in various European and South Asian populations are shown in Table 4. In case of rs10955255 and rs11928865 we can detect, that the allele frequencies of Roma population are almost the same in all European populations. However, in case of rs1799930, rs13263539 and rs1981361 of Roma populations, the allele frequencies are more similar to in South African populations. These observations suggest, that the Roma population which originate from India, is mixed with the Hungarian population during the centuries. The observed populations are the following: European (EUR), Hungarian (HUN), Roma, Utah resident with Northern and Western European ancestry (CEU) , Finnish in Finland (FIN), British in England and Scotland (GBR), Iberian populations ins Spain (IBS), Toscani in Italy (TSI), South Asian (SAS), Bengali in Bangladesh (BEB), Gujarati Indian in Huston, TX (GIH), Indian Telugu in the UK (ITU), Punjabi in Lahore, Pakistan (PJL) and Sri Lankan Tamil in the UK (STU).

It is known from previous examples that a significant difference in minor allele frequency can be observed in Hungarian and Roma population samples of the *GJB2* gene rs104894396, which causes hearing impairment. The significant difference between the Roma and the Hungarian population may initiate personalized medical diagnostics and effective treatments [22].

Conclusion

NAT2, GRM7 and GRHL2 gene polymorphisms are known to be involved in age related hearing loss. Ethnic differences in the allele frequencies of the predisposing variants have important implications for the preventive and therapeutic treatments in different populations in the future. To determine the exact role of this susceptibility SNPs more studies are needed on larger population samples.

Acknowledgments This work was supported by the grant of the Hungarian Science Foundation NKFIH 119540.

This present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Staecker H, Zheng QY, Van De Water TR (2001) Oxidative stress in aging in the C57B16/J mouse cochlea. Acta Otolaryngol 121(6): 666–672
2. Cruickshanks KJ, Wiley TL, Tweed TS, Klein BE, Klein R, Mares-Perlman JA, Nondahl DM (1998) Prevalence of hearing loss in older adults in beaver dam, Wisconsin. The epidemiology of hearing loss study. Am J Epidemiol 148(9):879–886
3. Unal M, Tamer L, Dogruer ZN, Yildirim H, Vayisoglu Y, Camdeviren H (2005) N-acetyltransferase 2 gene polymorphism and presbycusis. Laryngoscope 115(12):2238–2241
4. Yamasoba T, Lin FR, Someya S, Kashio A, Sakamoto T, Kondo K (2013) Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. Hear Res 303:30–38
5. Seidman MD, Khan MJ, Tang WX, Quirk WS (2002) Influence of lecithin on mitochondrial DNA and age-related hearing loss. Otolaryngol Head Neck Surg 127(3):138–144
6. Van Eyken E, Van Camp G, Fransen E, Topsakal V, Hendrickx JJ, Demeester K, Van de Heyning P, Maki-Torkko E, Hannula S, Sorri M, Jensen M, Parving A, Bille M, Baur M, Pfister M, Bonaconsa A, Mazzoli M, Orzan E, Espeso A, Stephens D, Verbruggen K, Huyghe J, Dhooge I, Huygen P, Kremer H, Cremers CW, Kunst S, Manninen M, Pyykko I, Lacava A, Steffens M, Wienker TF, Van Laer L (2007) Contribution of the N-acetyltransferase 2 polymorphism NAT2*6A to age-related hearing impairment. J Med Genet 44(9):570–578
7. Bared A, Ouyang X, Angeli S, Du LL, Hoang K, Yan D, Liu XZ (2010) Antioxidant enzymes, presbycusis, and ethnic variability. Otolaryngol Head Neck Surg 143(2):263–268
8. Pujol R, Rebillard G, Puel JL, Lenoir M, Eybalin M, Recasens M (1990) Glutamate neurotoxicity in the cochlea: a possible consequence of ischaemic or anoxic conditions occurring in ageing. Acta Otolaryngol Suppl 476:32–36

9. Friedman RA, Van Laer L, Huentelman MJ, Sheth SS, Van Eyken E, Corneveaux JJ, Tembe WD, Halperin RF, Thorburn AQ, Thys S, Bonneux S, Fransen E, Huyghe J, Pyykko I, Cremers CW, Kremer H, Dhooge I, Stephens D, Orzan E, Pfister M, Bille M, Parving A, Sorri M, Van de Heyning PH, Makmura L, Ohmen JD, Linthicum FH, Jr., Fayad JN, Pearson JV, Craig DW, Stephan DA, Van Camp G (2009) GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. Hum Mol Genet 18 (4):785–796
10. Vona B, Nanda I, Neuner C, Muller T, Haaf T (2013) Confirmation of GRHL2 as the gene for the DFNA28 locus. Am J Med Genet A 161A(8):2060–2065
11. Peters LM, Anderson DW, Griffith AJ, Grundfast KM, San Agustin TB, Madeo AC, Friedman TB, Morell RJ (2002) Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. Hum Mol Genet 11(23):2877–2885
12. Van Laer L, Van Eyken E, Fransen E, Huyghe JR, Topsakal V, Hendrickx JJ, Hannula S, Maki-Torkko E, Jensen M, Demeester K, Baur M, Bonaconsa A, Mazzoli M, Espeso A, Verbruggen K, Huyghe J, Huygen P, Kunst S, Manninen M, Konings A, Diaz-Lacava AN, Steffens M, Wienker TF, Pyykko I, Cremers CW, Kremer H, Dhooge I, Stephens D, Orzan E, Pfister M, Bille M, Parving A, Sorri M, Van de Heyning PH, Van Camp G (2008) The grainyhead like 2 gene (GRHL2), alias TFCP2L3, is associated with age-related hearing impairment. Hum Mol Genet 17(2):159–169
13. Morar B, Gresham D, Angelicheva D, Tournev I, Gooding R, Guergueltcheva V, Schmidt C, Abicht A, Lochmuller H, Tordai A, Kalmar L, Nagy M, Karcagi V, Jeanpierre M, Herczegfalvi A, Beeson D, Venkataraman V, Warwick Carter K, Reeve J, de Pablo R, Kucinskas V, Kalaydjieva L (2004) Mutation history of the roma/gypsies. Am J Hum Genet 75(4):596–609
14. Gresham D, Morar B, Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Wise C, Angelicheva D, Calafell F, Oefner PJ, Shen P, Tournev I, de Pablo R, Kucinskas V, Perez-Lezaun A, Marushiakova E, Popov V, Kalaydjieva L (2001) Origins and divergence of the Roma (gypsies). Am J Hum Genet 69(6):1314–1331
15. Hajioff S, McKee M (2000) The health of the Roma people: a review of the published literature. J Epidemiol Community Health 54(11):864–869
16. Seidman MD, Khan MJ, Dolan DF, Quirk WS (1996) Age-related differences in cochlear microcirculation and auditory brain stem response. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 122(11):1221–1226
17. Gates GA, Couropmitree NN, Myers RH (1999) Genetic associations in age-related hearing thresholds. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 125(6):654–659
18. Coling DE, Yu KC, Somand D, Satar B, Bai U, Huang TT, Seidman MD, Epstein CJ, Mhatre AN, Lalwani AK (2003) Effect of SOD1 overexpression on age- and noise-related hearing loss. Free Radic Biol Med 34(7):873–880
19. Ates NA, Unal M, Tamer L, Derici E, Karakas S, Ercan B, Pata YS, Akbas Y, Vayisoglu Y, Camdeviren H (2005) Glutathione S-transferase gene polymorphisms in presbycusis. Otol Neurotol 26(3):392–397
20. Pujol R, Puel JL, Gervais d'Aldin C, Eybalin M (1993) Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea. Acta Otolaryngol 113(3):330–334
21. Steinbach S, Lutz J (2007) Glutamate induces apoptosis in cultured spiral ganglion explants. Biochem Biophys Res Commun 357(1): 14–19
22. Sipeky C, Matyas P, Melegh M, Janicsek I, Szalai R, Szabo I, Varnai R, Tarlos G, Ganczer A, Melegh B (2014) Lower carrier rate of GJB2 W24X ancestral Indian mutation in Roma samples from Hungary: implication for public health intervention. Mol Biol Rep 41(9):6105–6110

NÉPEGÉSZSÉGÜGY

A NÉPEGÉSZSÉGÜGYI KÉPZŐ- ÉS KUTATÓHELYEK ORSZÁGOS EGYESÜLETÉNEK TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATA
PUBLIC HEALTH RESEARCH JOURNAL OF THE HUNGARIAN ASSOCIATION OF PUBLIC HEALTH TRAINING AND RESEARCH INSTITUTIONS

96. évfolyam 1. szám
2018
Volume 96. No. 1.

Tartalom – Contents

EREDETI KÖZLEMÉNYEK

Egypontos nukleotid-polimorfizmusok vizsgálatára alapozott kockázatbecslés alkalmazhatósága a szív- és érrendszeri betegségre való fokozott genetikai fogékonyság kimutatására – irodalmi áttekintés 3
Application of single nucleotide polymorphism-related risk estimates in identification of increased genetic susceptibility to cardiovascular diseases – a literature review
Fiatal Szilvia, Ádány Róza

Összefüggés az AIRE gén polimorfizmusai és a rheumatoid arthritis között: szisztematikus irodalmi áttekintés és eset-kontroll vizsgálatok meta-analízise 23
Association between AIRE gene polymorphism and rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis of case-control studies
Bérczi Bálint, Gerencsér Gellért, Farkas Nelli, Hegyi Péter, Veres Gábor, Bajor Judit, Czopf László, Hussain Alizadeh, Rakonczay Zoltán, Vigh Éva, Erőss Bálint, Szemes Kata, Gyöngyi Zoltán

A csökkent HDL-koleszterin szint a roma lakosság körében tapasztalt magas prevalenciájában szerepet játszó genetikai tényezők 39
Genetic factors exist behind the high prevalence of reduced high-density lipoprotein cholesterol levels in the Roma population
Pikó Péter, Fiatal Szilvia, Kósa Zsigmond, Sándor János, Ádány Róza

Halláskárosodásban részt vevő NAT2, GRM7 és GRHL2 hajlamosító polimorfizmusok és haplotípusok roma és magyar populációban 51
Age-related hearing impairment associated NAT2, GRM7, GRHL2 susceptibility gene polymorphisms and haplotypes in Roma and Hungarian populations
Mátyás Petra, Pöstyéni Etelka, Komlósi Katalin, Szalai Renáta, Bene Judit, Magyari Lili, Melegh Béla, Hadzsiev Kinga

A sztatin használat és a társadalmi-gazdasági státusz kapcsolata Magyarországon 59
Relationship between statin utilization and socioeconomic deprivation in Hungary
Boruzs Klára, Juhász Attila, Nagy Csilla, Ádány Róza, Bíró Klára

A népegészségügyi szakemberek és intézmények feladatai a teljeskörű iskolai egészségfejlesztés szakmai segítésében 69
Furthering role of public health experts and institutions in holistic school health promotion
Somhegyi Annamária

ALAPÍTÁS ÉVE:
1920

FŐSZERKESZTŐ:
Ádány Róza

MEGHÍVOTT SZERKESZTŐ:
Kiss István

SZERKESZTŐBIZOTTSÁG:
Balázs Margit
Barcs István
Betlehem József
Bíró Klára
Boncz Imre
Füzesi Zsuzsanna
Horváth Ildikó
Kósa Karolina
Kósa Zsigmond
Moizs Mariann
Orosi Piroska
Paulik Edit
Pándics Tamás
Repa Imre
Rurik Imre
Sáfrány Géza
Sándor János
Sántha Ágnes
Somhegyi Annamária
Szilárd István
Tarkó Klára
Veres-Balajti Ilona
Vokó Zoltán
Wilhelm Márta

FELELŐS KIADÓ:
Debreceni Egyetem
Népegészségügyi Kar

SZERKESZTŐ:
Oravecz Attila

SZERKESZTŐSÉG:
4028 Debrecen, Kassai út 26/b
TEL./FAX:
(52) 512 764

E-MAIL:
nepegeszsegugy@sph.unideb.hu

Megjelenik negyedévente.
Egy példány ára: 1200 Ft
Előfizetési díj egy évre: 4800 Ft

HU-ISSN 0369-3805

NYOMDAI MUNKÁK:
Alföldi Nyomda Zrt.
4027 Debrecen, Böszörményi út 6.
TEL.: (52) 515 715

MÁTYÁS PETRA[1,2]
PÖSTYÉNI ETELKA[1]
KOMLÓSI KATALIN[1,2]
SZALAI RENÁTA[1,2]
BENE JUDIT[1,2]
MAGYARI LILI[1,2]
MELEGH BÉLA[1,2]
HADZSIEV KINGA[1,2]

Halláskárosodásban részt vevő NAT2, GRM7, GRHL2 hajlamosító polimorfizmusok és haplotípusok roma és magyar populációban

Age-related hearing impairment associated NAT2, GRM7, GRHL2 susceptibility gene polymorphisms and haplotypes in Roma and Hungarian populations

[1] *Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Orvosi Genetikai Intézet –7624 Pécs, Szigeti u. 12. – Tel.: (72) 536 427*
E-mail: matyas.petra@pte.hu
[2] *Szentágothai János Kutatóközpont, Klinikai genetikai és genomikai kutatócsoport – 7624 Pécs, Ifjúság u. 20.*

Összefoglalás: A korral összefüggő halláskárosodás az idősek egyik leggyakoribb érzékszervi megbetegedése, amelyet genetikai és környezeti tényezők közötti kölcsönhatások okoznak. Munkánk során etnikai különbségeket, valamint allél és genotípus frekvenciákat vizsgáltunk a NAT2 rs1799930, GRM7 rs11928865 valamint GRHL2 rs10955255, rs13263539, és rs1981361 génpolimorfizmusok esetében roma és magyar populáció DNS mintáin PCR-RFLP módszert alkalmazva. A GRHL2 rs13263539 és az rs1981361 polimorfizmusok esetében szignifikáns különbséget figyeltünk meg, mind a minor allélfrekvenciánál (37,9% vs. 51,0% és 43,6% vs. 56,2%; p<0,05) mind pedig a homozigóta genotípusnál (13,0% vs. 25,3% és 16,5 vs. 32,3%; p<0,05) a két populáció között. A NAT2 rs1799930 polimorfizmus esetében a homozigóta genotípus az egészséges romáknál 14,1% volt, míg a magyaroknál 7,7%. A minor A allél gyakorisága 38,0% volt a roma populációban, míg a magyaroknál 26,7% (p<0,05). Továbbá, a GGT, GAC és GAT haplotípusok gyakorisága szignifikánsan magasabb volt a magyar populációnál, mint az egészséges romáknál (4,47% vs. 1,87, 2,07% vs. 0,91 és 5,51% vs. 1,15; p<0,008). Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a NAT2, GRM7 és GRHL2 gén polimorfizmusok összehasonlításánál szignifikáns interetnikus különbségek mutatkoznak a két populáció között, amelyek jelentős hatással lehetnek a populáció preventív és terápiás kezeléseire egyaránt.
Kulcsszavak: NAT2, GRM7, GRHL2, időskori halláskárosodás, roma, magyar

Summary: Age-related hearing impairment (ARHI) is the most frequent sensory disease in the elderly, which is caused by an interaction between genetic and environmental factors. Here we examined the ethnic differences, allele and genotype frequencies of the NAT2, GRM7, and GRHL2 genes pooled samples of healthy Hungarian and healthy and hearing impaired Roma people. Study populations of healthy Hungarian and Roma subjects were characterized for the rs1799930 NAT2, rs11928865 GRM7, rs10955255, rs13263539, and rs1981361 GRHL2 polymorphisms and deaf Roma subjects were characterized for the rs1799930 NAT2, rs13263539, and rs1981361 GRHL2 using a PCR-RFLP method. We found significant differences in minor allele frequencies for GRHL2 rs13263539 and rs1981361 polymorphism between healthy Roma and Hungarian samples (37.9% vs. 51.0% and 43.6% vs. 56.2%, respectively; p<0.05). The differences of homozygous genotype of GRHL2 rs13263539 and rs1981361 variants, values were also significantly different (13.0% vs. 25.3% and 16.5 vs. 32.3%; p<0.05). The NAT2 rs1799930 homozygous genotype was 14.0% in healthy Romas and 7.7% in Hungarians, while the minor A allele frequency was 38.0% and 26.7% in Roma and Hungarian population, respectively (p<0.05). Furthermore, the frequency of GGT, GAC and GAT haplotypes was significantly higher in the Hungarian population than in healthy Roma (1.87 vs. 4.47%, 0.91 vs. 2.07% and 1.15 vs. 5.51%, respectively; p < 0.008). Present study revealed significant interethnic differences in allele polymorphisms of NAT2, GRM7 and GRHL2 exhibit quite marked ethnic differences in Roma populations that might have important implications for the preventive and therapeutic treatments in this population.
Keywords: NAT2, GRM7, GRHL2, ARHI, Roma, Hungarian

BEVEZETÉS

Számos tanulmány kimutatta, hogy a korral összefüggő halláskárosodás az egyik leggyakoribb magas frekvenciás hallászavar, amit a belső fülben végbemenő degeneratív változások okoznak az öregedés során [1, 2]. A korral összefüggő halláskárosodás különböző életkorban alakul ki eltérő mértékben, és ismert, hogy a genetikai tényezők összefüggésben állnak a degeneratív mechanizmusokkal [3, 4].

Az öregedés, a különböző gyógyszerek, a zajok valamint a reaktív oxigéngyökök sejtkárosodást okoznak amik a belső fül szöveteit roncsolhatják [1, 5]. A reaktív oxigéngyökök (ROS) az aerob metabolikus folyamatok természetes melléktermékei, és ezek felhalmozódása váltja ki az oxidatív stresszt. Bared és munkatársai azt feltételezik, hogy az antioxidáns enzimek polimorfizmusai hajlamosítanak a halláskárosodásra a ROS-ok számának növekedésével, ami oxidatív stresszt vált ki a belső fülben.

Szignifikáns összefüggést figyeltek meg a korral összefüggő hallásvesztés és az N-acetiltranszferáz-2 enzim (NAT2) génpolimorfizmusa között [3, 6]. Az N-acetiltranszferázok az oxidatív státusz egyensúlyban tartásáért, az exogén szubsztrátok N-acetilációval vagy O-acetilációval való detoxifikációjáért felelősek, valamint részt vesznek a káros xenobiotikumok detoxifikációjában. A NAT2 enzim az N-acetiltranszferáz enzim egy izoenzimje, melynek antioxidáns szerepe van a cochleában és részt vesz a reaktív oxigéngyökök kialakításában. A ROS-ok nagyszámú jelenléte hozzájárul az öregedéshez a belső fülben. Korábbi tanulmányokból kiderült, hogy bizonyos NAT2 genotípusok összefügghetnek a korral járó halláskárosodás kialakulásával [7, 6].

A glutamát metabolikus receptor-7 (GRM7) a 3-as kromoszómán helyezkedik el, 10 exont tartalmaz, ami egy 915 aminosavból álló fehérjét kódol. A GRM7-nek központi szerepe van az afferens hallóidegrostok és a szőrsejtek közötti szinapszisokban lévő homeosztázis és szinaptikus glutamát transzmisszió fenntartásában a cochleán belül. A glutamát jelenléte nagy mennyiségben neurotoxicitást okoz a halló-neuronokban [8]. A GRM7 rs11928865 polimorfizmusa összefüggést mutat az időskori halláskárosodás létrejöttével különösen az idősek beszédfelismerésében bekövetkező romlás kialakulásával [9].

A GRHL2 gén úgy is ismert, mint TFCP2L3 vagy BOM gén, a 8-as kromoszómán helyezkedik el, 16 exonból áll és egy 625 aminosavból álló fehérjét kódol. A GRHL2 egy transzkripciós faktor ami különböző hámsejtekben expresszálódik és nemcsak az embrionális fejlődésben játszik fontos szerepet, hanem felelős az epiteliális sejtek fenntartásáért [10, 11]. A GRHL2 génben számos polimorfizmust felfedeztek, amik hajlamosíthatnak az időskori halláskárosodás kialakulására. Ezek közül az rs10955255, rs1981361 és rs13263539 polimorfizmusokat választottuk ki munkánkhoz [12].

A roma populáció nagysága nagyjából 12–15 millió a világon, ebből 10–12 millióan élnek Európában, Magyarországon hivatalos adatok alapján 700 000–1 000 000 közötti a számuk [13, 14]. A romák viszonylag erősen konzervált génállománya Indiából származik [15].

Munkánk célja a NAT2, GRM7 és GRHL2 génpolimorfizmusok, mint időskori halláskárosodásra hajlamosító polimorfizmusok genetikai eloszlásának és internetnikai különbségeinek vizsgálata az egészséges magyar, valamint egészséges és halláskárosodott roma populációs mintákon.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgált populációk

298 egészséges roma (118 férfi, 180 nő), és 298 egészséges magyar (168 férfi, 130 nő) egyén DNS mintáját vizsgáltuk a NAT2 rs1799930, GRM7 rs11928865, valamint GRHL2 rs10955255, rs13263539, és rs1981361 polimorfizmusok esetében. 113 halláskárosodott roma (57 férfi, 56 nő) DNS mintáját vizsgáltuk a NAT2 rs1799930, GRHL2 rs13263539, és rs1981361 polimorfizmusok esetében. Valamennyi DNS minta a Pécsi Tudományegyetem központi biobankjából származott, amely a Páneurópai Nemzetközi Biobankhálózatnak (BBMRI; Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure) részét képezi. A biobank vezetésében és fenntartásában az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKEB) által jóváhagyott elveket követtük, a minták gyűjtésében és tárolásában pedig az 1975-ben az Orvos-világszövetség által megalkotott Helsinki deklarációban megfogalmazott etikai alapelvek voltak irányadók.

Vizsgálati módszerek

A DNS-izolálást EDTA-val alvadásgátolt vérmintákból végeztük kisózásos technika segítségével. A geno-

I. táblázat
Primer szekvenciák

Gén	SNP	Primer	Primerek (5'–3')
NAT2	rs1799930	forward	CATCTCCTGCCAAAGAAGAAAC
		reverse	TAGAAGGGATCCATCACCAGG
GRM7	rs11928865	forward	GGTATCTGTCTCCACTCCCAAC
		reverse	CCCAAAATGTTAAGCTTTATCTCC
GRHL2	rs10955255	forward	GGTTAAGGTAGTAGCTGCCAGG
		reverse	GATGGGAACAAAGGCTAAAAAG
	rs13263539	forward	CGAGCATAGCCATCCTTAAC
		reverse	GCTTTCAGCAATATCCCTCC
	rs1981361	forward	GATGGTTCCTCAGCTCACTTTG
		reverse	CAGGGTGTTTTCTCATGTATTCC

tipizálás során polimeráz láncreakciót (PCR) majd restrikciós endonukleázokkal végzett emésztéses (RFLP) módszert alkalmaztunk. A PCR reakció során alkalmazott primerek szekvenciáit az I. táblázat foglalja össze. A PCR reakció végtérfoga 50 µl, ami minden dNTP-ből 200 mM-t, 1 U Taq polimerázt, 5 µl reakciópuffert (10 mM Tris-HCL, pH 9.0), 0.2 mM forward és reverese Primert valamint 1 µg DNS-t tartalmazott. A Reakció az MJ Research PTC 200 thermal cycler PCR készülékkel valósult meg, és kondíciói a következők voltak: előde naturáció 2 min 95°C-on, ezt követte 35 cikluson keresztül a denaturáció 30s 95°C-on. Az annealing hőmérséklete a GRHL2 rs10955255 és 13263539 SNP-k esetén 58°C volt 30s-ig, a GRHL2 rs1981361, NAT2 rs1799930 és GRM7 rs11928865 polimorfizmusoknál 60°C volt 30s-ig. A primer extenzió 30s volt 72°C-on és a végső lánchosszabbítás 72°C-on 5 percig tartott minden vizsgált polimorfizmus esetében. A keletkezett PCR termékeket gélelektroforézissel (2%-os agaróz gélben), etídium-bromidos festéssel és UV megvilágítással detektáltuk. A PCR termékeket ezután allélspecifikus restrikciós endonukleázzal emésztettük. NAT2 rs1799930 polimorfizmus esetében a Taq1 enzimet, GRM7 rs11928865 esetében a MunI enzimet, a GRHL2 rs10955255, rs13263539, valamint rs1981361 polimorfizmusok esetében a Hin1II, BseGI, illetve BseNI enzimeket alkalmaztuk. Az emésztett PCR termékeket gélelektroforézissel választottuk szét 3%-os agaróz gélen. A módszer hatékonyságának ellenőrzése végett az amplifikált target szekvencia egy obligát hasító helyet is tartalmazott. A módszer specificitását és eredményeink konfirmálását Sanger-féle bidirekcionális szekvenálással végeztük ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems CA, USA) szekvenátor segítségével.

Statisztikai analízis

A statisztikai analízis során $\chi 2$-tesztet alkalmaztunk a populációk és a vizsgált genetikai variánsok között fennálló összefüggések feltárására SPSS 20.0 programcsalád felhasználásával, az eredményeinket $p<0,05$ értéknél tekintettük szignifikánsnak. A haplotípus vizsgálathoz Phase 2.1 programot, a kapcsoltsági vizsgálat elvégzéséhez pedig Haploview 3.3 szoftvert használtunk.

EREDMÉNYEK

Valamennyi genotípus- és allélmegoszlás a Hardy-Weinberg egyensúlyt tükrözte mind a magyar mind a roma csoportoknál mindhárom gén polimorfizmusainak esetében.

A NAT2 rs1799930 polimorfizmus esetében szignifikáns különbséget találtunk a két populáció között, az AA homozigóta genotípus előfordulása jóval magasabb a roma populációban (14,1%) mint a magyaroknál (7,7%). A NAT2 variáns allélnak csaknem kétszer nagyobb előfordulási aránya van a romákban mint a magyarokban. Továbbá, a minor allél frekvencia előfordulása is szignifikánsan magasabb a roma populációs mintákban, mint a magyarban (38,0% és 26,7%,

II. táblázat
NAT2 rs1799930, GRM7 rs11928865, GRHL2 rs10955255, rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok genotípus és minor allél frekvenciái egészséges roma és magyar populációban

NAT2	Roma (n=298)	Magyar (n=298)
rs1799930		
GG	114 (38,3%)	162 (54,3%)
GA	142 (47,6%)	113 (38,0%)
AA	42 (14,1%)	23 (7,7%)
A allél frekvencia	38%	26,7%
GRM7	Roma (n=298)	Magyar (n=298)
rs11928865		
AA	165 (55,4%)	165 (55,4%)
AT	113 (37,9%)	112 (37,6%)
TT	20 (6,7%)	21 (7,0%)
T allél frekvencia	25,6%	25,8%
GRHL2	Roma (n=298)	Magyar (n=298)
rs10955255		
AA	66 (22,3%)	81 (27,2%)
AG	161 (54,0%)	154 (51,7%)
GG	71 (23,7%)	63 (21,1%)
G allél frekvencia	50,8%	47,0%
rs13263539		
GG	102 (34,2%)	69 (23,2%)
GA	157 (52,7%)	153 (51,3%)
AA	39 (13,1%)	76 (25,5%)
A allél frekvencia	37,9 %	51%
rs1981361		
GG	87 (29,1%)	59 (19,8%)
GA	162 (54,4%)	143 (48,0%)
AA	49 (16,5%)	96 (32,2%)
A allél frekvencia	43,6%	56,2%

$p<0.05$). A GRM7 rs11928865 és GRHL2 rs10955255 polimorfizmusoknál nem találtunk szignifikáns különbséget sem a homozigóta genotípus, sem pedig a minor allél frekvencia szintjén a két populáció között. Azonban a GRHL2 rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok esetében mind a homozigóta genotípusnál mind pedig a minor allél frekvenciánál szignifikáns különbség volt megfigyelhető a két populáció között a magyaroknál nagyobb előfordulási arányban. Az egészséges, valamint halláskárosodott roma populációk között egyik vizsgált polimorfizmus estében sem találtunk szignifikáns különbséget. A genotípus és minor allél frekvenciákat a II. és III. táblázatok foglalják össze.

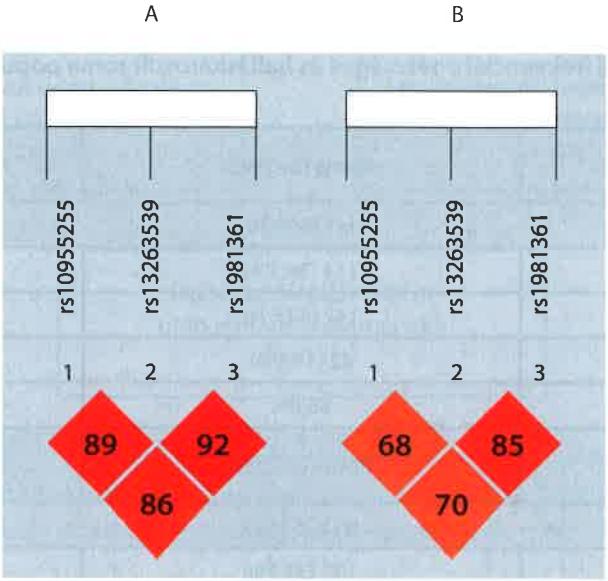
A GRHL2 három polimorfizmusánál haplotípus-analízist végeztünk, melynek eredményeit a IV. táblázatban tüntettünk fel. Az analízis során 8 haplotípust

III. táblázat
NAT2 rs1799930, GRHL2 rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok genotípus és minor allél frekvenciái egészséges és halláskárosult roma populációkban

NAT2	Roma (n=298)	Halláskárosult roma (n=113)
rs1799930		
GG	114 (38,3%)	45 (39,8%)
GA	142 (47,6%)	56 (49,5%)
AA	42 (14,1%)	12 (10,6%)
A allél frekvencia	38,0%	35,4%
GRHL2	Roma (n=298)	Halláskárosult roma (n=113)
rs13263539		
GG	102 (34,2%)	33 (29,2%)
GA	157 (52,7%)	64 (56,6%)
AA	39 (13,1%)	16 (14,2%)
A allél frekvencia	37,9 %	42,5%
GRHL2	Roma (n=298)	Halláskárosult roma (n=113)
rs1981361		
GG	87 (29,2%)	23 (20,4%)
GA	162 (54,4%)	73 (64,6%)
AA	49 (16,4%)	17 (15,0%)
A allél frekvencia	43,6%	47,4%

IV. táblázat
A GRHL2 gén rs1095525, rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok főbb haplotípusai és azok eloszlása magyar és roma populációk esetében

Haplotípus	SNP			Populáció	
	rs10955255	rs13263539	rs1981361	Roma (%)	Magyar (%)
ht1	A	G	C	7,66	5,8
ht2	A	G	T	3,17	3,97
ht3	A	A	C	0,69	0,99
ht4	A	A	T	37,6	44,2
ht5	G	G	C	46,9	34,9
ht6	G	G	T	1,87	4,47
ht7	G	A	C	0,91	2,07
ht8	G	A	T	1,15	5,51



1. ábra
A GRHL2 gén rs1095525, rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusainak kapcsoltsági térképe a roma (A) és a magyar (B) populációs mintákon

tudtunk megkülönböztetni. A GGT, GAC és GAT haplotípusok szignifikánsan emelkedettebb értéket mutatnak a magyar populációban a romákhoz képest ($p<0,008$). A GGT és GAC haplotípusok kétszer nagyobb, míg a GAT majdnem ötször nagyobb arányban fordulnak elő a magyar populációban, mint a romában.

Kapcsoltsági vizsgálat történt a GRHL2 rs10955255, rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok esetében, melynek eredménye az 1. ábráról olvasható le. A kapcsoltság mindhárom polimorfizmusnál erősebb a roma populációban, mint a magyarban. Az LD értékek a magyaroknál 68, 70 és 85, míg a romáknál 98, 86 és 92.

DISZKUSSZIÓ

Az időskori halláskárosodás fokozatosan alakul ki a legtöbb emberben az öregedés során. Az öregedést biokémiai és molekuláris fiziológiai változások, progresszív DNS károsodás, csökkent mitokondriális funkció, csökkent celluláris vízkoncentráció, a sejtmembrán rugalmasságának csökkenése, ionos változások és az érrendszeri elégtelenségek okozzák [16, 17]. Számos faktor képes elősegíteni az öregedést: többek között a reaktív oxigéngyökök felhalmozódása genetikai mutációk következtében, melyek környezeti faktorokkal is társulhatnak. Kimutatták, hogy az öregedés során a belső fül keringési rendszerében, ezen belül pedig a cochleában is csökkent a véráramlás [16,18]. A cochlea számos szövete eltérő módon reagál a ROS-ok károsító hatására [3]. Lautermann és munkatársai azt állítják, hogy az öregedés változásokat okozhat minden szövetben, míg az enzimaktivitás nem változik, és a glutation mennyiségét csak a hallóidegben befolyásolja. A szövet glutation tartalmának csökkenése a legfontosabb tényező, amely károsíthatja a sejtek védettségét a ROS toxikus hatásai ellen, és peroxidatív sejtkárosodást okozhat [19].

Több gént is felfedeztek már, ami hozzájárulhat az időskori halláskárosodás kialakulásához [4]. Az N-acetiltranszferáz enzim részt vesz a káros xenobiotikumok detoxifikációjában, amelyek közül több a belső fülben is megtalálható. A NAT2 acetilációja 3 fenotípusba sorolható: gyors, közepes és lassú [3]. A mutáns allél hordozói lassú acetilálók és csökkent az acetiltranszferáz aktivitásuk. A NAT lassú acetiláló állapota kockázati tényezője lehet az időskori halláskárosodásnak, amit több különböző tanulmányban leírtak már [7].

A glutamát stimuláló tulajdonsága miatt nagy mennyiségben neurotoxikus. Toxikus hatása az időskori halláskárosodás kialakulásában is kifejeződik. A metabotróp glutamát receptor (mGLURs) csökkenti a glutamát keletkezését. A GRM7 variánsa megváltoztatja a glutamát szinaptikus autoregulációját a halló neuronok és

szőrsejtek szinaptikus résében, ami idővel glutamát felhalmozódáshoz vezet, aminek eredményeként sejthalál következik be [21].

Bared és munkatársai kimutatták, hogy az eltérést hetero-, illetve homozigóta genotípus formában hordozó egyéneknek rosszabb a hallása, mint a vad genotípusú embereknek [7]. Munkánk célja az volt, hogy rávilágítsunk az etnikai különbségekre a genotípus és minor allél frekvencia szintjén a NAT2, GRM7, valamint a GRHL2 polimorfizmusok esetében a roma és magyar populációs minták között. Megfigyeltük, hogy a NAT2 rs1799930 polimorfizmus előfordulása magasabb a romáknál mint a magyaroknál, ellentétben a GRHL2 rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusokkal, melyek előfordulása a magyar populációban magasabb. Továbbá, a GGT, GAC és GAT haplotípusok jelenléte is magasabb a magyar populációban mint a romában (4,47% vs. 1,87%, 2,07% vs. 0,91%, és 5,51% vs. 1,15%; $p<0,008$).

A magyar és roma populációban vizsgált polimorfizmusok major és minor allélfrekvenciáit összehasonlítottuk korábban a www.ensembl.org adatai alapján publikált különböző európai és dél-ázsiai populációkéval is, melynek eredményeit az V. táblázatban foglaltuk össze. A táblázatból megfigyelhető, hogy a GRHL2 rs10955255 és GRM7 rs11928865 polimorfizmusok allélfrekvenciája a roma populációban nagyon hasonló az európai populációkban leírtakhoz. Azonban, a NAT2 rs1799930, GRHL2 rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok allélfrekvenciái a roma populációban inkább a dél-ázsiai populációk adataihoz hasonlítanak. Ezen megfigyelésekből arra lehet következtetni, hogy az Indiából származó roma populáció összekeveredett a magyar populációval az évszázadok során. A megfigyelt populációk a következők voltak: európai (EUR), magyar (HUN), roma, észak- és nyugat európai (CEU), finn (FIN), brit (GBR), ibériai (IBS), toszkán (TSI), dél-ázsiai (SAS), bengáli (BEB), gujarati (GIH), telugu (ITU), punjabi (PJL) és sri lankai (STU).

Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a halláskárosodást kiváltó GJB rs104894396 eltérés esetében a minor allél frekvencia szignifikáns különbséget mutat. A roma és a magyar populációk közötti szignifikáns különbség személyre szabott orvoslást és hatékony kezelést indíthat el [22].

V. táblázat
A NAT2 rs1799930, GRM7 rs11928865 és GRHL2 rs10955255, rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok allélfrekvencia értékeinek összehasonlítása a már korábban leközölt európai és ázsiai populációs adatokkal (www.ensembl.org adatai alapján)

Populációk	n	NAT2 rs1799930		GRM7 rs11928865		GRHL2 rs10955255		GRHL2 rs13263539		GRHL2 rs1981361	
		G af (%)	A af (%)	A af (%)	T af (%)	A af (%)	G af (%)	A af (%)	G af (%)	C af (%)	T af (%)
EUR	1006	71,8	28,2	72,2	27,8	41,2	58,8	47,1	53,0	40,3	59,7
HUN	298	73,3	26,7	74,2	25,8	53,0	47,0	49,0	51,0	43,8	56,2
Roma	298	62,0	38,0	74,4	25,6	49,2	50,8	62,1	37,9	56,4	43,6
CEU	198	70,2	29,8	70,7	29,3	42,9	57,1	49,0	51,0	43,9	56,1
FIN	198	73,7	26,3	65,7	34,3	31,8	68,2	37,4	62,2	34,8	65,2
GBR	182	72,5	27,5	70,9	29,1	42,3	57,7	47,8	52,2	39,0	61,0
IBS	214	70,6	29,4	73,8	26,2	64,3	53,7	51,9	48,1	43,5	56,5
TSI	214	72,0	28,0	79,0	21,0	73,0	57,9	49,1	50,9	39,7	60,3
SAS	978	64,0	36,0	78,0	22,0	73,0	27,0	74,9	25,1	74,1	25,9
BEB	172	73,3	26,7	76,7	23,3	72,1	27,9	72,1	27,9	69,8	30,2
GIH	176	61,2	38,8	74,8	25,2	69,9	30,1	71,8	28,2	72,3	27,7
ITU	204	65,7	34,3	80,9	19,1	79,4	20,6	82,8	17,2	82,4	17,6
PJL	192	63,5	36,5	80,2	19,8	69,3	30,7	70,3	29,7	69,3	30,7
STU	204	57,8	42,2	77,5	22,5	74,0	26,0	77,0	23,0	76,0	24,0

KONKLÚZIÓ

A NAT2, GRM7 és GRHL2 gén polimorfizmusok szerepet játszanak a korral összefüggő halláskárosodásban. A jövőben a hajlamosító polimorfizmusok allélfrekvenciáiban meglévő etnikai különbségeknek fontos szerepe lehet a preventív és terápiás kezelések kialakításában. Ahhoz, hogy a pontos szerepét meg tudjuk határozni ezen polimorfizmusoknak, további vizsgálatokra van szükség kiterjedtebb populációs mintákon.

IRODALOM

1. *Staecker, H., Zheng, Q. Y., Van De Water, T. R.: Oxidative stress in aging in the C57B16/J mouse cochlea. Acta Otolaryngol., 6:666-672, 2001*
2. *Cruickshanks, K. J., Wiley, T. L., Tweed, T. S., Klein, B. E, Klein, R., Mares-Perlman, J. A., Nondahl, D. M.: Prevalence of hearing loss in older adults in Beaver Dam, Wisconsin. The Epidemiology of Hearing Loss Study, Am. J. Epidemiol., 9:879-886, 1998*
3. *Unal, M., Tamer, L., Dogruer, Z. N., Yildirim, H., Vayisoglu, Y., Camdeviren, H.: N-acetyltransferase 2 gene polymorphism and presbycusis. Laryngoscope, 12:2238-2241, 2005*
4. *Yamasoba, T., Lin, F. R., Someya, S., Kashio, A., Sakamoto, T., Kondo, K.: Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. Hear. Res., 303:30-38, 2013*
5. *Seidman, M. D., Khan, M. J., Tang, W. X., Quirk, W. S.: Influence of lecithin on mitochondrial DNA and agerelated hearing loss. Otolaryngol. Head Neck Surg. 3:138-144, 2002*
6. *Van Eyken, E., Van Camp, G., Fransen, E., Topsakal, V., Hendrickx, J. J., Demeester, K., Van de Heyning, P., Maki-Torkko, E., Hannula, S., Sorri, M., Jensen, M., Parving, A., Bille, M., Baur, M., Pfister, M., Bonaconsa, A., Mazzoli, M., Orzan, E., Espeso, A., Stephens, D., Verbruggen, K., Huyghe, J., Dhooge. I., Huygen, P., Kremer, H., Cremers, C. W., Kunst, S., Manninen, M., Pyykko, I., Lacava, A., Steffens, M., Wienker, T. F., Van Laer, L.: Contribution of the Nacetyltransferase 2 polymorphism NAT2*6A to age-related hearing impairment. J Med. Genet., 9:570-578, 2007*
7. *Bared, A., Ouyang, X., Angeli, S., Du, L. L., Hoang, K., Yan, D., Liu, X. Z.: Antioxidant enzymes, presbycusis, and ethnic variability. Otolaryngol. Head Neck Surg., 2:263-268, 2010*
8. *Pujol, R., Rebillard, G., Puel, J. L., Lenoir, M., Eybalin, M., Recasens, M.: Glutamate neurotoxicity in the cochlea: a possible consequence of ischaemic or anoxic conditions occurring in ageing. Acta Otolaryngol., Suppl. 476:32-36, 1990*
9. *Friedman, R. A., Van Laer, L., Huentelman, M. J., Sheth, S. S., Van Eyken, E., Corneveaux, J. J., Tembe, W. D., Halperin, R. F., Thorburn, A. Q., Thys, S., Bonneux, S., Fransen, E., Huyghe, J., Pyykko, I., Cremers, C. W., Kremer, H., Dhooge, I., Stephens, D., Orzan, E., Pfister, M., Bille, M., Parving, A., Sorri, M., Van de Heyning, P. H., Makmura, L., Ohmen, J. D., Linthicum, F. H. Jr., Fayad, J. N., Pearson, J. V., Craig, D. W., Stephan, D. A., Van Camp, G.: GRM7 variants confer susceptibility toage-related hearing impairment. Hum. Mol. Genet., 4:785-796, 2009*
10. *Vona, B., Nanda, I., Neuner, C., Muller, T., Haaf, T.: Confirmation of GRHL2 as the gene for the DFNA28 locus. Am. J. Med. Genet., 8:2060-2065, 2013*
11. *Peters, L. M., Anderson, D. W., Griffith, A. J., Grundfast, K. M., San Agustin, T. B., Madeo, A. C., Friedman, T. B., Morell, R. J.: Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28. Hum. Mol. Genet., 23:2877-2885, 2002*
12. *Van Laer, L., Van Eyken, E., Fransen, E., Huyghe, J. R., Topsakal, V., Hendrickx, J. J., Hannula, S., Maki-Torkko. E., Jensen, M., Demeester, K., Baur, M., Bonaconsa, A., Mazzoli, M., Espeso, A., Verbruggen, K., Huyghe, J., Huygen, P., Kunst, S., Manninen, M., Konings, A., Diaz-Lacava, A. N., Steffens, M., Wienker, T. F., Pyykko, I., Cremers, C. W., Kremer, H., Dhooge, I., Stephens, D., Orzan, E., Pfister, M., Bille, M., Parving, A., Sorri, M., Van de Heyning, P. H., Van Camp, G.: The grainyhead like 2 gene (GRHL2), alias TFCP2L3, is associated with age-related hearing impairment. Hum. Mol. Genet., 2:159-169, 2008*
13. *Morar, B., Gresham, D., Angelicheva, D., Tournev, I., Gooding, R., Guergueltcheva, V., Schmidt, C., Abicht, A., Lochmuller, H., Tordai, A., Kalmar, L., Nagy, M., Karcagi, V., Jeanpierre, M., Herczegfalvi, A., Beeson, D., Venkataraman, V., Warwick Carter, K., Reeve, J., de Pablo, R., Kucinskas, V., Kalaydjieva, L.: Mutation history of the roma/gypsies. Am. J. Hum. Genet., 4:596-609, 2004*
14. *Gresham, D., Morar, B., Underhill, P. A., Passarino, G., Lin, A. A., Wise, C., Angelicheva, D., Calafell, F., Oefner, P. J., Shen, P., Tournev, I., de Pablo, R., Kucinskas, V., Perez-Lezaun, A., Marushiakova, E., Popov, V., Kalaydjieva, L.: Origins and divergence of the Roma (gypsies). Am. J. Hum. Genet., 6:1314-1331, 2001*
15. *Hajioff, S., McKee, M.: The health of the Roma people: a review of the published literature. J. Epidemiol. Community Health, 11:864-869, 2000*
16. *Seidman, M. D., Khan, M. J., Dolan, D. F., Quirk, WS.: Age-related differences in cochlear microcirculation and auditory brain stem response. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 11:1221-1226, 1996*
17. *Gates, G. A., Couropmitree, N. N., Myers, R. H.: Genetic associations in age-related hearing thresholds. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 6:654-659, 1999*
18. *Coling, D. E., Yu, K. C., Somand, D., Satar, B., Bai, U., Huang, T. T., Seidman, M. D., Epstein, C. J., Mhatre, A. N., Lalwani, A. K.: Effect of SOD1 overexpression on age- and noise-related hearing loss. Free Radic. Biol. Med., 7:873-880, 2003*
19. *Ates, N. A., Unal, M., Tamer, L., Derici, E., Karakas, S., Ercan, B., Pata, Y. S., Akbas, Y., Vayisoglu, Y., Camdeviren, H.: Glutathione S-transferase gene polymorphisms in presbycusis. Otol. Neurotol., 3:392-397, 2005*
20. *Pujol, R., Puel, J. L., Gervais d'Aldin, C., Eybalin, M.: Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea. Acta Otolaryngol., 3:330-334, 1993*
21. *Steinbach, S., Lutz, J.: Glutamate induces apoptosis in cultured spiral ganglion explants. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1:14-19, 2007*
22. *Sipeky, C., Matyas, P., Melegh, M., Janicsek, I., Szalai, R., Szabo, I., Varnai, R., Tarlos, G., Ganczer, A., Melegh, B.: Lower carrier rate of GJB2 W24X ancestral Indian mutation in Roma samples from Hungary: implication for public health intervention. Mol. Biol. Rep., 9:6105-6110, 2014*

Mol Biol Rep (2014) 41:6105–6110
DOI 10.1007/s11033-014-3488-8

Lower carrier rate of GJB2 W24X ancestral Indian mutation in Roma samples from Hungary: implication for public health intervention

Csilla Sipeky · Petra Matyas · Marton Melegh · Ingrid Janicsek · Renata Szalai · Istvan Szabo · Reka Varnai · Greta Tarlos · Alma Ganczer · Bela Melegh

Received: 17 October 2013 / Accepted: 17 June 2014 / Published online: 27 June 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract The purpose of this work was to characterise the W24X mutation of the *GJB2* gene in order to provide more representative and geographicaly relevant carrier rates of healthy Roma subisolates and the Hungarian population. 493 Roma and 498 Hungarian healthy subjects were genotyped for the *GJB2* c.71G>A (rs104894396, W24X) mutation by PCR–RFLP assay and direct sequencing. This is the first report on *GJB2* W24X mutation in geographically subisolated Roma population of Hungary compared to local Hungarians. Comparing the genotype and allele frequencies of *GJB2* rs104894396 mutation, significant difference was found in GG (98.4 vs. 99.8 %), GA (1.62 vs. 0.20 %) genotypes and A (0.8 vs. 0.1 %) allele between the Roma and Hungarian populations, respectively ($p < 0.02$). None of the subjects of Roma and Hungarian samples carried the *GJB2* W24X AA genotype. Considerable result of our study, that the proportion of *GJB2* W24X GA heterozygotes and the A allele frequency was eight times higher in Roma than in Hungarians. Considering the results, the mutant allele frequency both in Roma (0.8 %) and in Hungarian (0.1 %) populations is lower than expected from previous results, likely reflecting local differentiated subisolates of these populations and a suspected lower risk for *GJB2* mutation related deafness. However, the significant difference in *GJB2* W24X carrier rates between the Roma and Hungarians may initiate individual diagnostic investigations and effective public health interventions.

Keywords *GJB2* c.71G>A (rs104894396W24X) · Roma · Hungarian · Interethnic differences

C. Sipeky (✉) · P. Matyas · M. Melegh · I. Janicsek · R. Szalai · I. Szabo · G. Tarlos · A. Ganczer · B. Melegh
Department of Medical Genetics, Clinical Centre, University of Pecs, Szigeti 12, Pecs 7624, Hungary
e-mail: csilla.sipeky@aok.pte.hu; csilla.sipeky@gmail.com

C. Sipeky · I. Janicsek · B. Melegh
János Szentágothai Research Centre, Human Genetic and Pharmacogenomic Research Group, Ifjusag 20, Pecs 7624, Hungary

R. Varnai
Institute of Family Medicine, University of Pecs, Akac str. 1, Pecs 7632, Hungary
e-mail: rekavarnai@yahoo.com

Introduction

Gap junction protein, beta-2 (*GJB2*, MIM*121011) encodes a 26 kDa cell-to-cell protein channel with 226 aminoacids, that facilitate the transfer of ions and small molecules between cells. The single channel is composed of two hemichannels called connexons, which are hexamers of connexin monomers [1]. This is the reason because they also known as connexions, thus the alternative name of the GJB2 protein is CONNEXIN 26 (CX26) [2]. *GJB2* gene is located at 13q11-q12 chromosomal region [3, 4].

Several mutations in the *GJB2* gene have been identified worldwide in patients with hearing impairment or genetically caused deafness [5–9]. These mutations in *GJB2* gene show interethnic differences. The W24X is a nonsense mutation causing recessive deafness phenotype, detected mostly in Indian populations [10]. In the study of 45 Indian families with they found that the involvement of GJB2 W24X mutation as the cause of hearing impairment is 13.3 % [10]. The *GJB2* c.71G>A (rs104894396, W24X) mutation draw our attention because of high A mutant allele frequency (32.5 %) reported from non-syndromic deaf patients in Indian population of Kerala [11]. Based on

the estimation of haplotype frequency, a founder effect of W24X mutation in Indian population is suggested [11]. In another study of Indian population (cosmopolitan city of Hyderabad with people of different Indian ancestry) 303 nonsyndromic hearing-impaired patients were screened for GJB2 gene and the most frequent mutation was the p.W24X, accounting for 87 % [5].

As the Romani population, residing in different part of Europe, thought to be originated from the Indian subcontinent, it could be of major importance to study the GJB2 mutant allele frequencies of different subisolates around the world. The Romany population of Hungary, about 250,000 people according to Hungarian census in 2001 (www.ksh.hu), represents a genetically isolated population, characteristic with high frequency of consanguinity. According to several sources, Roma may make up even an estimated 8–10 % of Hungary's population (Population Census in Hungary 2001—Summary data; www.ksh.hu). Previous studies of Roma/Gypsies in other population subisolates like Slovakia, the Czech Republic and Spain have shown that W24X, the most common GJB2 mutation in India, is also the prevalent molecular defect in studied Gypsy populations so far. W24X is spread across subisolates, as expected for an ancestral founder mutation. While variation between subisolates does exist, the average carrier rates, overall and in the major linguistic/migrational categories of Balkan Gypsies, Vlax Roma, and west European Gypsies, are consistently in the 4–5 % range. The results classify them as one of the high-risk populations for prelingual deafness [12].

The frequencies of two common mutations (c.35delG and c.167delT) of the connexin 26 gene were analyzed also in three different populations of Hungary, the Hungarian, the Gypsy and the Ashkenazi [13]. However, the W24X mutation, despite of the reported high prevalence in Indians [11], has not been analyzed in Gypsies living in Hungary until yet. In slovak patients with non-syndromic hearing loss (NSHL) the W24X mutation [14]. Fifty-four unrelated NSHL patients from endogamous and inbred population of Slovak Roms (Gypsies) from Eastern Slovakia were screened for GJB2 mutations.

Several pharmacogenes were already studied by our research group in Roma population of Hungary [15–17]. Pharmacogenetic studies of *GJB2* gene surched for genetic variants and mutations, that predispose to cisplatin-induced susceptibility to hearing loss [18, 19]. However, no mutatnt allele was found in a small group of patients ($n = 11$) diagnosed with osteosarcoma, soft tissue sarcoma and central nervous system tumors, who received cisplatin chemotherapy and developed severe hearing loss.

The aim of our study was to evaluate the ethnic difference of *GJB2* W24X mutation between the Roma and Hungarian population living in Hungary.

Materials and methods

Study population

The DNA samples were from the central Biobank of the University of Pecs that is part of the National Biobank Network of Hungary (www.biobank.hu), as well as the pan-European Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI) (http://www.bbmri.eu/bbmri/). The governance principles and maintenance management of the Biobank had been approved by the Hungarian National Research Ethics Committee. During the collection and analysis of DNA samples and processing of the accompanying clinical and personal data the guidelines and regulations of the Helsinki Declaration in 1975 and the currently operative National regulations were followed. DNA of total of 493 healthy Roma samples (250 males and 243 females, mean age 50 ± 19 years, range 19–82 years) and 498 healthy Hungarian (268 males and 230 females, mean age 36 ± 12 years, range 19–62 years) were used in the study.

Molecular methods

Genomic DNA was isolated from peripherial leukocytes using routine salting out method, and was stored with patients informed consent. The c.71G>A (rs104894396, W24X) mutation of the *GJB2* (MIM 121011, Chr 13) gene was analyzed. For primer design the sequences deposited into the GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) were used.

Genotyping was carried out using polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction endonuclease digestion (RFLP). For detection of the GJB2 W24X mutation the following forward and reverse primers were used: 5′-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC-3′ and 5′-GGGCAATGCGTTAAACTGGC-3′. PCR amplification was carried out in a final volume of 50 µl on an MJ Research PTC 200 thermal cycler. PCR conditions were as follows: predenaturation for 2 min at 96 °C, followed by 35 cycles of denaturation for 30 s at 95 °C, annealing for 30 s at 52 °C, primer extension for 30 s at 72 °C, the final extension at 72 °C for 5 min.

10 µl PCR product of the GJB2 rs104894396 primer was digested by BfaI restriction enzyme. The digested PCR product was separated by electrophoresis using 4 % agarose gel stained with ethidium bromide and visualized by an UV transilluminator. In the samples with c.71G>A GG homozygote healthy genotype the BfaI cleaves the 723-bp long PCR product in 300- and 423-bp fragments. While in AA homozygote mutants the 101-, 199-, 423-bp fragments could be detected. In order to verify the genotyping accuracy of the PCR–RFLP assay 10 % of the analysed samples

Table 1 Genotype and allele frequencies of GJB2 W24X mutation in the healthy Roma and Hungarian population

GJB2 W24X mutation	Genotype and allele	Roma $n = 493$ (%)	Hungarian $n = 498$ (%)
c.G71A (rs104894396)	GG*	485 (98.4)	497 (99.8)
	GA*	8 (1.62)	1 (0.20)
	AA	0 (0.00)	0 (0.00)
	A allele frequency*	0.008	0.001

n number of subjects

* Roma population is compared with Hungarians; $p < 0.02$

were direct sequenced with the same primers utilizing an ABI PRISM 3100 AVANT genetic analyser.

Statistical analysis of data

Statistical significance ($p < 0.05$) was assessed by χ^2 test to compare the differences between studied groups. Statistical analyses were performed applying Excel for Windows and SPSS 11.5 package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

The allele and genotype frequencies of the GJB2 c.71G>A (rs104894396, W24X) mutation in Roma and Hungarian populations are shown in Table 1. The allele and genotype frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium both in Roma and Hungarian subjects.

Significant differences were found comparing the frequencies of the *GJB2* rs104894396 GG, GA genotypes and A allele between the Roma population (98.4, 1.62 and 0.8 %) and the Hungarians (99.8, 0.20 and 0.1 %), respectively ($p < 0.02$). None of the subjects in our study populations of Roma and Hungarian samples was found to carry the *GJB2* W24X AA genotype.

Considerable result of our study, that the frequency of the A allele, which is responsible for different deafness phenotype, was eight times higher in Roma than in Hungarians. Furthermore, the prevalence of the heterozygote carriers of A allele were also more than eight times higher in Roma than in Hungarian population.

Discussion and conclusions

GJB2 gene mutations are related to several different deafness phenotypes, like Wolfram syndrome (MIM 222300), Bart-Pumphrey syndrome (MIM 149200), autosomal dominant 3A (MIM 601544) and autosomal recessive 1A (MIM 220290) deafness, Hystrix-like ichthyosis with deafness (MIM 602540), Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome (MIM 148210), Keratoderma, palmoplantar, with deafness (MIM 148350), Vohwinkel syndrome (MIM 124500) (www.omim.org). Mutations in *GJB2* gene are responsible for as much as 50 % of prelingual, recessive deafness [20, 21].

The predominate *GJB2* mutation is ethnicity dependent. In most Caucasian populations, the 35delG mutation in GJB2 gene was found to account for up to 50 % of cases of the genetic non-syndromic childhood deafness and it has been the most studied variant [14]. It is a frameshift mutation which creates a stop codon right to the next codon after mutation (13th codon). In a homozygous state, no functional C × 26 monomers are present in cells [14]. A few other alleles have a moderate frequency, and many are private mutations, having been reported in only one or a few pedigrees. In populations of non-European ethnic background, other *GJB2* gene mutations predominate in patients with hearing impairment, like W24X in India (83–96 %) [10], 167delT in Ashkenazi Jews (76–81 %) [22–25], R143W in Africans (e.g. Ghana 93 %) [26, 27] and 235delC in Chinese (58–96 %) [28–30], in Koreans (56 %) [14] and in Japanese (34–74 %) [31–33].

As the predominante mutation of GJB2 gene differs according to the ethnicity, the mutant allele frequency of *GJB2* W24X shows also ethnic differences. The prevalence of GJB2 W24X allele frequency in Roma and Hungarian populations was compared to previously published data of different populations residing in different geographic areas (Table 2).

The 71G>A(W24X) variant has been observed in Europeans, but its prevalence is about three times higher in Pakistanis and at least 20 times higher in Indians [10, 34–36] (16,17,23,35). Comparing the interethnic differences of rs104894396 polymorphisms it can be concluded, that the GJB2 W24X mutation can not be found in healthy control population of India [5, 37] amd in South-East Brazilian affected people [38]. However, the highest mutant allele frequency can be found also in Indians from South-West region (32.5 %) [11]. The rs104894396 SNP is relatively common in affected populations with hearing impairment from India (18.1 % [35], 16.3 % [39], 8.62 % [37], 8.58 % [5]) and also in people tought to be originated from Indian subcontinent, like the Roma (Eastern Slovakia) (23.2 %) [14] and in British Bangladeshi (14.2 %) people [40]. Noteworthy, that the Roma from Spain, the Andalusian Gypsies, have only 4.00 % W24X mutant allele frequency, which could mean a higher level of interethnic marriages with European populations [41]. Also remarkable, that non-affected people of India have also much lower (1.79, 2.4 % [11, 35]) mutant allele frequencies than deaf patients. Lower mutant allele frequency was found also in

Table 2 Overview and interethnic comparison of GJB2 W24X mutant allele frequency reported by previous studies

Population	Number of subjects		Mutant A allele frequency of GJB2 W24X (%)		Reference
	Affected people/ families	Healthy controls	Affected people	Control	
Roma	–	493	–	0.81	Current study
Hungarian	–	498	–	0.10	Current study
Hungarian (North-East)	92	500	4.30	1.40	[42]
Roma (Eastern Slovakia)	54	–	23.2	–	[14]
Roma (Spanish, Andalusian Gypsies)	34 families	–	4.00	–	[41]
India (Chandigarh, North)	58	35	8.62	0.00	[37]
India	530	–	16.3	–	[39]
India (Kerala) (South-West India)	86	168	32.5	1.79	[11]
India (Several parts of the country, South and West)	215	205	18.1	2.40	[35]
India (Hyderabad)	303	200	8.58	0.00	[5]
British Bangladeshi	67	–	14.2	–	[40]
Turkish	93	–	3.23	–	[43]
Turkish (Istanbul)	60	–	2.50	–	[44]
Brazilia (South-East)	77	–	0.00	–	[38]
Thai	17	–	2.94	–	[45]
Romania	75	–	5.33	–	[47]
Iran	168	–	0.89	–	[46]
Greek	210	–	0.50	–	[36]

Hungarians (4.30 % in affected, 1.40 % in control) [42], in affected Turkish (3.23, 2.50 % [43, 44]), Thai (2.94 %) [45], Iranian (0.89 %) [46], Greek (0.50 %) [36] people. The mutant allele frequency of *GJB2* W24X found in the Hungarian (0.10 %) and the Roma populations (0.81 %) was in the very low part of the range observed in studied populations until now (0.00–32.5 %).

Furthermore, the minor allele frequency of the studied mutation in healthy Roma from Hungary is comparable to the frequency of non-affected Indians.

Conclusion of our study, that samples of the Roma population were similar to Indian populations, and differed significantly from Hungarians studied also by others. As the A allele is associated with higher probability of hearing impairment, thus Roma people can be at eight times higher risk to develop deafness. In near future it would be relevant to implement this study design in affected Roma patient with hearing impairment. Identifying the allele frequencies of ethnic populations from different geographic regions can contribute to develop molecular diagnostic protocols well suited for that specific population.

Acknowledgments This work was supported by the Hungarian National Science Foundation Grant (OTKA K 103983), the SROP-4.2.2/08/1/2008-0011 Science, Please! Research Team on Innovation, the SROP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0002, Developing the South Transdanubian Regional University Competitiveness and the János Szentágothai Research Centre (Ifjusag str. 20, 7624-Pecs).

References

1. Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC (2000) Gap junction systems in the mammalian cochlea. Brain Res Brain Res Rev 32(1):163–166
2. Apps SA, Rankin WA, Kurmis AP (2007) Connexin 26 mutations in autosomal recessive deafness disorders: a review. Int J Audiol 46(2):75–81. doi:10.1080/14992020600582190
3. Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Mila M, Monica MD, Lutfi J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S, Fortina P (1997) Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. Hum Mol Genet 6(9):1605–1609
4. Rabionet R, Gasparini P, Estivill X (2000) Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. Hum Mutat 16(3):190–202. doi:10.1002/1098-1004(200009)16:3<190:AID-HUMU2>3.0.CO;2-I
5. Padma G, Ramchander PV, Nandur UV, Padma T (2009) GJB2 and GJB6 gene mutations found in Indian probands with congenital hearing impairment. J Genet 88(3):267–272
6. Lee JR, White TW (2009) Connexin-26 mutations in deafness and skin disease. Expert Rev Mol Med 11:e35. doi:10.1017/S1462399409001276

7. Duman D, Tekin M (2012) Autosomal recessive nonsyndromic deafness genes: a review. Front Biosci 17:2213–2236
8. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. Nature 387(6628):80–83. doi:10.1038/387080a0
9. Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, Govea N, Mila M, Zelante L, Gasparini P (1998) Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. Lancet 351(9100):394–398. doi:10.1016/S0140-6736(97)11124-2
10. Maheshwari M, Vijaya R, Ghosh M, Shastri S, Kabra M, Menon PS (2003) Screening of families with autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment (ARNSHI) for mutations in GJB2 gene: Indian scenario. Am J Med Genet A 120A(2):180–184. doi:10.1002/ajmg.a.20014
11. Joseph AY, Rasool TJ (2009) High frequency of connexin26 (GJB2) mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the population of Kerala. India Int J Pediatr Otorhinolaryngol 73(3):437–443. doi:10.1016/j.ijporl.2008.11.010
12. Bouwer S, Angelicheva D, Chandler D, Seeman P, Tournev I, Kalaydjieva L (2007) Carrier rates of the ancestral Indian W24X mutation in GJB2 in the general Gypsy population and individual subisolates. Genet Test 11(4):455–458. doi:10.1089/gte.2007.0048
13. Bors A, Andrikovics H, Kalmar L, Erdei N, Galambos S, Losonczi A, Furedi S, Balogh I, Szalai C, Tordai A (2004) Frequencies of two common mutations (c.35delG and c.167delT) of the connexin 26 gene in different populations of Hungary. Int J Mol Med 14(6):1105–1108
14. Minarik G, Ferak V, Ferakova E, Ficek A, Polakova H, Kadasi L (2003) High frequency of GJB2 mutation W24X among Slovak Romany (Gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). Gen Physiol Biophys 22(4):549–556
15. Sipeky C, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Maasz A, Takacs I, Beres J, Fodor L, Szabo M, Melegh B (2011) Genetic variability and haplotype profile of MDR1 (ABCB1) in Roma and Hungarian population samples with a review of the literature. Drug Metab Pharmacokinet 26(2):206–215
16. Sipeky C, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Polgar N, Lakner L, Szabo M, Takacs I, Melegh B (2009) Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) haplotypes in healthy Hungarian and Roma population samples. Pharmacogenomics 10(6):1025–1032. doi:10.2217/pgs.09.46
17. Sipeky C, Lakner L, Szabo M, Takacs I, Tamasi V, Polgar N, Falus A, Melegh B (2009) Interethnic differences of CYP2C9 alleles in healthy Hungarian and Roma population samples: relationship to worldwide allelic frequencies. Blood Cells Mol Dis 43(3):239–242. doi:10.1016/j.bcmd.2009.05.005
18. Mukherjea D, Rybak LP (2011) Pharmacogenomics of cisplatin-induced ototoxicity. Pharmacogenomics 12(7):1039–1050. doi:10.2217/pgs.11.48
19. Knoll C, Smith RJ, Shores C, Blatt J (2006) Hearing genes and cisplatin deafness: a pilot study. Laryngoscope 116(1):72–74. doi:10.1097/01.mlg.0000185596.20207.d2
20. Snoeckx RL, Huygen PL, 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 AR, Nekahm-Heis D, Seeman P, Bendova O, Kenna MA, Frangulov A, Rehm HL, Tekin M, Incesulu A, Dahl HH, du Sart D, Jenkins L, Lucas D, Bitner-Glindzicz M, Avraham KB, Brownstein Z, del Castillo I, Moreno F, Blin N, Pfister M, Sziklai I, Toth T, Kelley PM, Cohn ES, Van Maldergem L, Hilbert P, Roux AF, Mondain M, Hoefsloot LH, Cremers CW, Lopponen T, Lopponen 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 CJ, Smith RJ, Van Camp G (2005) GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. Am J Hum Genet 77(6):945–957. doi:10.1086/497996
21. Nance WE (2003) The genetics of deafness. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 9(2):109–119. doi:10.1002/mrdd.10067
22. Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB (1998) Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. N Engl J Med 339(21):1500–1505. doi:10.1056/NEJM199811193392103
23. Lerer I, Sagi M, Malamud E, Levi H, Raas-Rothschild A, Abeliovich D (2000) Contribution of connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in Ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT. Am J Med Genet 95(1):53–56
24. Sobe T, Vreugde S, Shahin H, Berlin M, Davis N, Kanaan M, Yaron Y, Orr-Urtreger A, Frydman M, Shohat M, Avraham KB (2000) The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. Hum Genet 106(1):50–57
25. Sobe T, Erlich P, Berry A, Korostichevsky M, Vreugde S, Avraham KB, Bonne-Tamir B, Shohat M (1999) High frequency of the deafness-associated 167delT mutation in the connexin 26 (GJB2) gene in Israeli Ashkenazim. Am J Med Genet 86(5):499–500
26. Brobby GW, Muller-Myhsok B, Horstmann RD (1998) Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. N Engl J Med 338(8):548–550. doi:10.1056/NEJM199802193380813
27. Hamelmann C, Amedofu GK, Albrecht K, Muntau B, Gelhaus A, Brobby GW, Horstmann RD (2001) Pattern of connexin 26 (GJB2) mutations causing sensorineural hearing impairment in Ghana. Hum Mutat 18(1):84–85. doi:10.1002/humu.1156
28. Wang YC, Kung CY, Su MC, Su CC, Hsu HM, Tsai CC, Lin CC, Li SY (2002) Mutations of Cx26 gene (GJB2) for prelingual deafness in Taiwan. Eur J Hum Genet 10(8):495–498. doi:10.1038/sj.ejhg.5200838
29. Hwa HL, Ko TM, Hsu CJ, Huang CH, Chiang YL, Oong JL, Chen CC, Hsu CK (2003) Mutation spectrum of the connexin 26 (GJB2) gene in Taiwanese patients with prelingual deafness. Genet Med 5(3):161–165. doi:10.1097/01.GIM.0000066796.11916.94
30. Liu XZ, Xia XJ, Ke XM, Ouyang XM, Du LL, Liu YH, Angeli S, Telischi FF, Nance WE, Balkany T, Xu LR (2002) The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population. Hum Genet 111(4–5):394–397. doi:10.1007/s00439-002-0811-6
31. Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ (2000) Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. J Med Genet 37(1):41–43
32. Kudo T, Ikeda K, Kure S, Matsubara Y, Oshima T, Watanabe K, Kawase T, Narisawa K, Takasaka T (2000) Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. Am J Med Genet 90(2):141–145
33. Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S, Namba A, Abe S, Van Laer L, Van Camp G, Usami S (2003) GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. Hum Genet 112(4):329–333. doi:10.1007/s00439-002-0889-x
34. Roux AF, Pallares-Ruiz N, Vielle A, Faugere V, Templin C, Leprevost D, Artieres F, Lina G, Molinari N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M (2004) Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. BMC Med Genet 5:5. doi:10.1186/1471-2350-5-5

35. RamShankar M, Girirajan S, Dagan O, Ravi Shankar HM, Jalvi R, Rangasayee R, Avraham KB, Anand A (2003) Contribution of connexin26 (GJB2) mutations and founder effect to non-syndromic hearing loss in India. J Med Genet 40(5):e68
36. Pampanos A, Economides J, Iliadou V, Neou P, Leotsakos P, Voyiatzis N, Eleftheriades N, Tsakanikos M, Antoniadi T, Hatzaki A, Konstantopoulou I, Yannoukakos D, Gronskov K, Brondum-Nielsen K, Grigoriadou M, Gyftodimou J, Iliades T, Skevas A, Petersen MB (2002) Prevalence of GJB2 mutations in prelingual deafness in the Greek population. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 65(2):101–108
37. Bhalla S, Sharma R, Khandelwal G, Panda NK, Khullar M (2009) Low incidence of GJB2, GJB6 and mitochondrial DNA mutations in North Indian patients with non-syndromic hearing impairment. Biochem Biophys Res Commun 385(3):445–448. doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.083
38. Cordeiro-Silva Mde F, Barbosa A, Santiago M, Provetti M, Dettogni RS, Tovar TT, Rabbi-Bortolini E, Louro ID (2011) Mutation analysis of GJB2 and GJB6 genes in Southeastern Brazilians with hereditary nonsyndromic deafness. Mol Biol Rep 38(2):1309–1313. doi:10.1007/s11033-010-0231-y
39. Mani RS, Ganapathy A, Jalvi R, Srikumari Srisailapathy CR, Malhotra V, Chadha S, Agarwal A, Ramesh A, Rangasayee RR, Anand A (2009) Functional consequences of novel connexin 26 mutations associated with hereditary hearing loss. Eur J Hum Genet 17(4):502–509. doi:10.1038/ejhg.2008.179
40. Bajaj Y, Sirimanna T, Albert DM, Qadir P, Jenkins L, Bitner-Glindzicz M (2008) Spectrum of GJB2 mutations causing deafness in the British Bangladeshi population. Clin Otolaryngol 33(4):313–318. doi:10.1111/j.1749-4486.2008.01754.x
41. Alvarez A, del Castillo I, Villamar M, Aguirre LA, Gonzalez-Neira A, Lopez-Nevot A, Moreno-Pelayo MA, 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 A 137A(3):255–258. doi:10.1002/ajmg.a.30884
42. Toth T, Kupka S, Haack B, Riemann K, Braun S, Fazakas F, Zenner HP, Muszbek L, Blin N, Pfister M, Sziklai I (2004) GJB2 mutations in patients with non-syndromic hearing loss from Northeastern Hungary. Hum Mutat 23(6):631–632. doi:10.1002/humu.9250
43. Kalay E, Caylan R, Kremer H, de Brouwer AP, Karaguzel A (2005) GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. Hear Res 203(1–2):88–93. doi:10.1016/j.heares.2004.11.022
44. Uyguner O, Emiroglu M, Uzumcu A, Hafiz G, Ghanbari A, Baserer N, Yuksel-Apak M, Wollnik B (2003) Frequencies of gap- and tight-junction mutations in Turkish families with autosomal-recessive non-syndromic hearing loss. Clin Genet 64(1):65–69
45. Kudo T, Ikeda K, Oshima T, Kure S, Tammasaeng M, Prasansuk S, Matsubara Y (2001) GJB2 (connexin 26) mutations and childhood deafness in Thailand. Otol Neurotol 22(6):858–861
46. Najmabadi H, Cucci RA, Sahebjam S, Kouchakian N, Farhadi M, Kahrizi K, Arzhangi S, Daneshmandan N, Javan K, Smith RJ (2002) GJB2 mutations in Iranians with autosomal recessive non-syndromic sensorineural hearing loss. Hum Mutat 19(5):572. doi:10.1002/humu.9033
47. Lazar C, Popp R, Trifa A, Mocanu C, Mihut G, Al-Khzouz C, Tomescu E, Figan I, Grigorescu-Sido P (2010) Prevalence of the c.35delG and p. W24X mutations in the GJB2 gene in patients with nonsyndromic hearing loss from North-West Romania. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 74(4):351–355. doi:10.1016/j.ijporl.2009.12.015

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

MARVELD2 (*DFNB49*) Mutations in the Hearing Impaired Central European Roma Population - Prevalence, Clinical Impact and the Common Origin

Ivica Mašindová[1☯], Andrea Šoltýsová[2,3☯], Lukáš Varga[1,4☯], Petra Mátyás[5], Andrej Ficek[2], Miloslava Hučková[1,6], Martina Sůrová[1], Dana Šafka-Brožková[7], Saima Anwar[8], Judit Bene[5,9], Slavomír Straka[10], Ingrid Janicsek[5], Zubair M. Ahmed[8], Pavel Seeman[7], Béla Melegh[5,9], Milan Profant[4], Iwar Klimeš[1], Saima Riazuddin[8], Ľudevít Kádasi[2,3], Daniela Gašperíková[1,6]*

1 Laboratory of Diabetes and Metabolic Disorders & DIABGENE, Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia, **2** Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Slovakia, **3** Institute of Molecular Physiology and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia, **4** Department of Otorhinolaryngology—Head and Neck Surgery, Faculty of Medicine and University Hospital, Comenius University, Bratislava, Slovakia, **5** Department of Medical Genetics, University of Pécs, Clinical Centre, Pécs, Hungary, **6** Center for Molecular Medicine, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia, **7** DNA Laboratory, Department of Paediatric Neurology, Charles University 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic, **8** Department of Otorhinolaryngology Head & Neck Surgery, School of Medicine, University of Maryland, Baltimore, Maryland, United States of America, **9** Szentagothai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary, **10** Department of Otorhinolaryngology—Head and Neck Surgery, Faculty Hospital of J. A. Reiman, Prešov, Slovakia

☯ These authors contributed equally to this work.
* daniela.gasperikova@savba.sk

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Mašindová I, Šoltýsová A, Varga L, Mátyás P, Ficek A, Hučková M, et al. (2015) *MARVELD2* (*DFNB49*) Mutations in the Hearing Impaired Central European Roma Population - Prevalence, Clinical Impact and the Common Origin. PLoS ONE 10(4): e0124232. doi:10.1371/journal.pone.0124232

Academic Editor: Dror Sharon, Hadassah-Hebrew University Medical Center, ISRAEL

Received: September 25, 2014

Accepted: February 27, 2015

Published: April 17, 2015

Copyright: © 2015 Mašindová et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: Slovak Research and Development Agency under the contract no. APVV-0148-10 to MP and IK, project implementation (ITMS 26240220071) supported by the OPRaD (Operation Program Research and Development) funded by ERDF (European Regional Development Fund) to IK and DG, OTKA (Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok) K103983 grant to BM and János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian academy of Sciences to JB and by National Institute

Abstract

Background

In the present study we aimed: 1) To establish the prevalence and clinical impact of *DFNB49* mutations in deaf Roma from 2 Central European countries (Slovakia and Hungary), and 2) to analyze a possible common origin of the c.1331+2T>C mutation among Roma and Pakistani mutation carriers identified in the present and previous studies.

Methods

We sequenced 6 exons of the *MARVELD2* gene in a group of 143 unrelated hearing impaired Slovak Roma patients. Simultaneously, we used RFLP to detect the c.1331+2T>C mutation in 85 Hungarian deaf Roma patients, control groups of 702 normal hearing Romanies from both countries and 375 hearing impaired Slovak Caucasians. We analyzed the haplotype using 21 SNPs spanning a 5.34Mb around the mutation c.1331+2T>C.

on Deafness and Other Communication Disorders (NIDCD/NIH) research grants (R01 DC011748 and DC011803) to SR. This contribution is also the result of the project implementation (ITMS 26240120027) supported by the OPRaD (Operation Program Research and Development) funded by ERDF (European Regional Development Fund). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Results

One pathogenic mutation (c.1331+2T>C) was identified in 12 homozygous hearing impaired Roma patients. Allele frequency of this mutation was higher in Hungarian (10%) than in Slovak (3.85%) Roma patients. The identified common haplotype in Roma patients was defined by 18 SNP markers (3.89 Mb). Fourteen common SNPs were also shared among Pakistani and Roma homozygotes. Biallelic mutation carriers suffered from prelingual bilateral moderate to profound sensorineural hearing loss.

Conclusions

We demonstrate different frequencies of the c.1331+2T>C mutation in hearing impaired Romanies from 3 Central European countries. In addition, our results provide support for the hypothesis of a possible common ancestor of the Slovak, Hungarian and Czech Roma as well as Pakistani deaf patients. Testing for the c.1331+2T>C mutation may be recommended in *GJB2* negative Roma cases with early-onset sensorineural hearing loss.

Introduction

Hearing impairment is one of the most common birth defects in humans. Approximately 50% of all congenital deafness cases are attributable to genetic causes [1]. To date, nonsyndromic sensorineural hearing loss (SNHL) is known to be associated with 30 genes with autosomal dominant inheritance and more than 50 genes with autosomal recessive inheritance [2]. The *MARVELD2* gene (MAL and Related proteins for Vesicle trafficking and membrane Link Domain containing 2), also known as *TRIC* and included in the autosomal recessive group, is located on the chromosome 5q13.2 and linked to the *DFNB49* locus [3, 4]. Human *MARVELD2* gene encodes the MARVELD2/tricellulin protein composed of 558 amino acids [4]. This transmembrane protein is mainly concentrated in tricellular tight junctions (tTJ) in the epithelial cells of all tissues, including cochlear supporting cells, hair cells and marginal cells of stria vascularis, and also weakly present in bicellular tight junctions (bTJ) [5, 6]. In the tTJ, tricellulin provides connection between three epithelial cells, thus playing a critical role in forming an epithelial barrier against paracellular flux of ions and solutes, which is essential to maintain the ion composition of inner ear fluids and proper hearing function [5]. In humans, mutations in the *MARVELD2* gene lead to nonsyndromic, bilateral, prelingual moderate to profound deafness [4, 7]. However, the *Marveld2* knock-in mice (ortholog mutation to human c.1498C>T, p.Arg500*) had progressive hair cell degeneration accompanied by rapidly progressing hearing loss, although the endocochlear potential and function of *stria vascularis* were unaffected. Ultrastructural changes of TJ's in the sensory epithelium of the inner ear may selectively change the paracellular permeability of ions or small molecules, resulting in a toxic microenvironment for cochlear hair cells [8].

The nonsyndromic autosomal recessive deafness locus *DFNB49* was initially mapped by Ramzan et al. (2005) in two Pakistani families. To date, six deafness causing recessive mutations in this gene have been identified in 15 families worldwide [4, 7, 9, 10]. Initially, these mutations were only found in patients of Pakistani origin [4, 7]. But more recently, the mutation c.1331+2 T>C (IVS4+2T>C) has also been identified in the European Roma population, possibly contributing significantly to the deafness etiology within this ethnic group [10]. Mutations

in the *MARVELD2* gene may therefore represent an important cause of nonsyndromic hearing loss in both of these populations with a possible common ancestry.

The Romanies are a unique population that according to many relevant historical studies migrated from South Asia into Europe between the 5th and 10th century [11, 12]. Genome-wide studies estimate that the initial founder Roma population originated from Northwest India approximately 1.5 thousand years ago. They migrated through the Middle East and spread into Europe about 850–900 years ago [12, 13]. Here, the Roma population forms a conglomerate of genetically isolated founder subpopulations [14], characterized by high inbreeding rate [15] and increased frequency of multiple autosomal recessive disorders compared to the majority Caucasian population.

Studies on several hereditary disorders occurring in Roma populations from Central Europe have been performed, including congenital glaucoma [16–18], phenylketonuria [19], hereditary thrombophilia [20] and hemochromatosis [21] in Slovakia; pontocerebellar hypoplasia type 1 [22] and Charcot-Marie-Tooth disease type 4 [23] in the Czech Republic; carnitine-responsive cardiomyopathy [24] and galactokinase deficiency [25] in Hungary. The most frequent genetic cause of hearing loss identified so far in the Slovak Roma population is the c.71G>A (p.Trp24*) mutation in *GJB2* gene [26]. This corresponds to data from several other European countries [27–29].

In our present study, the previously detected prevalence of the *MARVELD2* mutation in Czech Roma patients is taken into account with the above mentioned unique geographic and demographic history of the Roma population in Europe, and with respect to the common geopolitical history shared by three neighboring countries (Slovakia and Czech Republic in former Czechoslovakia twenty years ago or Slovakia, Czech Republic and Hungary in Austro-Hungarian Empire one hundred years ago). Thus, we sought to determine: 1) The prevalence of *MARVELD2* mutations in the Slovak and Hungarian hearing impaired Roma patients, 2) whether mutations found in the Roma population of the three Central European countries have a common origin, and 3) evaluate a possible linkage to the presumed common ancestor with the Pakistani population.

Patients and Methods

Study source population and inclusion criteria

Slovakia. One hundred forty-three unrelated hearing impaired Roma individuals without biallelic *GJB2/GJB6* mutations were selected for *MARVELD2* analysis. Of these, DNA samples from 86 patients came from DIABGENE Laboratory, IEE SAS. They were collected at boarding schools for hard of hearing located throughout Slovakia (Bratislava, Kremnica, Lučenec, Krásnohorské Podhradie, Levoča, Prešov) and at the ORL department of the University Hospital in Bratislava in the frame of nation-wide screening for hereditary hearing loss in Slovakia (2010–2013). Another 57 samples originated from Dept. of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Bratislava and were selected from a DNA repository containing samples from previous studies on nonsyndromic deafness and samples sent by clinical geneticists.

A control group of 200 unrelated normal hearing Roma individuals was selected and tested for presence of the c.1331+2T>C mutation to assess its frequency in the general Roma population.

To screen for the c.1331+2T>C mutation in Slovak patients of non-Roma origin, a control group of 375 *GJB2* negative unrelated Slovak (Caucasian) patients, matched for the hearing loss phenotype (nonsyndromic severe to profound bilateral sensorineural hearing loss of prelingual onset), was also tested.

All participants provided their written informed consent to participate in this study. This study has been approved by the Ethics Committee of the University Hospital in Bratislava, Slovakia.

Hungary. Eighty-five unrelated hearing impaired Roma patients, irrespective of their *GJB2* status, were analyzed for the presence of the identified c.1331+2T>C mutation in *MARVELD2* gene. They originated from Northeastern Hungary (Borsod-Abaúj-Zemplén County), near the Slovakian border.

The control group composed of 502 unrelated normal hearing Roma individuals was used to estimate the mutation frequency in the Hungarian Roma population. Approximately half of the controls also came from the Northeast Borsod-Abaúj-Zemplén County, and the other half from the Baranya County in the southern part of Hungary.

Czech Republic. Five *MARVELD2*, c.1331+2T>C homozygous DNA samples from 3 families, identified in a previous study [10], were genotyped for common haplotype determination analysis.

Pakistan. Four homozygous patients with *MARVELD2* related deafness from two families, one family harbouring the c.1331+2T>C mutation and the other with the c.1183-1G>A mutation, were analyzed for a common haplotype. Family PKDF800 was enrolled from the Punjab province, while family PKDF941 was originated from the Khyber Pakhtunkhwa province of Pakistan. All patients were analyzed for a common haplotype.

MARVELD2 gene sequencing and detection of the c.1331+2T>C mutation

Direct sequencing of the six exons and intron-exon boundaries of the *MARVELD2* gene was performed using previously published primers [10]. PCR products were sequenced according to standard procedures (Big Dye Terminator Sequencing Kit v3.1, Life Technologies, USA) and analyzed on the ABI 3500 genetic analyzer (Life Technologies, USA). Sequences were compared with reference sequence from GenBank NG_017201.1 using the SeqScape software (version 2.7; Life Technologies, USA).

The identified c.1331+2T>C mutation was subsequently screened in population samples by restriction digest detection after PCR amplification. DNA samples were amplified using 5 ′CCC ACC TGA TCT TCT TCC TC 3′ (forward) and 5′AAA GCC AGA TTT TAT TCA TCC TCT A 3′ (reverse) primers and digested with Bsh1236I (BstUI) (Thermo Fisher Scientific, USA) to yield fragments of 727bp for the wild type allele and 480bp and 247bp for the mutant allele.

In silico analysis of the novel variant

PolyPhen2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml) [accessed 20 April 2014], SIFT (http://sift.jcvi.org) [accessed 20 April 2014] and MutationTaster (mutationtaster.org) [accessed 20 April 2014] software were used to assess the potential pathogenicity of the novel variant.

Haplotype analysis

Twenty one single nucleotide polymorphisms (rs542778, rs4699896, rs4976108, rs67911569, rs10059317, rs56103849, rs4252228, rs1168405, rs1168402, rs299086, rs299093, rs2434507, rs299075, rs299078, rs28652974, rs28409706, rs468467, rs188123810, rs467880, rs466930, and rs2133729) spanning 5.34 megabases around the c.1331+2T>C mutation were genotyped. Polymorphisms were selected from the dbSNP database with respect to their chromosomal position and minor allele frequency (MAF) value. Haplotype analysis was performed in seventeen

c.1331+2T>C homozygous patients: 5 Slovak probands, 7 Hungarian probands, 5 Czech (3 probands, 2 relatives) and 4 Pakistani patients from 2 families (2 relatives homozygous for c.1331+2T>C mutation and 2 relatives with homozygous mutation c.1183-1G>A).

A control group of 20 unrelated hearing impaired Roma patients and 36 unrelated normal hearing Roma individuals without the c.1331+2T>C mutation was genotyped along to determine genetic variability of the selected SNP markers. All markers were genotyped by Sanger sequencing using ABI BigDye v3.1 chemistry after standard PCR amplification (5 PRIME master mix; 5 PRIME, D) and ExoSAP (Affymetrix, USA) purification.

Audiological evaluation

Hearing thresholds were recorded by pure tone audiometry (PTA) or auditory steady state responses (ASSR), depending on the subject's age and cooperation.

Results

DNA analysis of the *MARVELD2* gene in Slovak patients

Screening of 143 unrelated hearing impaired Roma individuals from Slovakia detected the c.1331+2T>C mutation in a homozygous state in five (3.5%) and in a heterozygous state in one affected individual. Subsequent sequencing of *MARVELD2* did not reveal any other pathogenic mutations. Additionally, five polymorphisms (c.98C>T, c.898T>A, c.1146+105G>A, c.1147-9T>G, c.1331+42G>A) were identified in homozygous state in five individuals and one variant of unknown pathogenicity (c.950G>A) (rs148416461) was found in heterozygous form. Bioinformatic tools predicted the c.950G>A variant to be probably pathogenic (PolyPhen2 score = 1.000; SIFT score = 0; MutationTaster score = 43).

Screening of 200 unrelated normal hearing Romanies revealed nine individuals heterozygous for the c.1331+2T>C mutation. However, this mutation was not found in the group of 375 hearing impaired non-Roma (Caucasian) patients.

DNA analysis of the *MARVELD2* gene in Hungarian Roma patients

Analysis of the c.1331+2T>C mutation in the group of 85 unrelated deaf Hungarian Romanies identified seven homozygous and three heterozygous patients. In this group, the prevalence of c.1331+2T>C homozygotes was 8.23%. In the control group of 502 normal hearing Hungarian Romanies, the c.1331+2T>C mutation was found in 5 heterozygous individuals.

Frequency of the c.1331+2T>C mutation

The observed frequency of the c.1331+2T>C allele in Slovak Roma hearing impaired patients was 3.85% (95% CI = 1.6–6.1%), while in unaffected Slovak Roma population the frequency was 2.25% (95% CI = 0.8–3.7%). The allele frequency of the mutation in the sample of Hungarian hearing impaired Roma patients was 10.0% (95% CI = 5.5–14.5%), which is nearly three times as much as in the Slovak deaf study group. On the other hand, the 0.5% (95% CI = 0.45–1.70%) allele frequency in the Hungarian healthy Roma population was approximately four times lower than in Slovak healthy Romanies. In the sample of 375 non-Roma Slovak patients with hearing loss, the c.1331+2T>C mutation was not detected.

Haplotype analysis

To confirm the common ancestry of the c.1331+2T>C mutation in all patients from our study, as well as among the Pakistani and Czech subjects where the mutation was first detected, we analyzed 21 SNPs located within approximately 5.34 megabase region around the mutation.

Study Groups	SNP/ mutation Position on the 5th chr. Genotype	rs542778 66312923 [C/T]	rs4699896 66462069 [A/G]	rs4976108 66949370 [C/T]	rs67911569 66949558 [A/G]	rs10059317 66949633 [A/G]	rs56103849 67782556 [A/T]	rs4252228 68662136 [C/T]	rs1168405 68705204 [A/T]	rs1168402 68707372 [A/T]	rs299086 68709509 [A/G]	rs299093 68717939 [A/G]	rs2434507 68725810 [C/T]	c.1183-1G>A 68728353 [G/A]	c.1331+2T>C 68728504 [T/C]	rs299075 68728544 [C/T]	rs299078 68741342 [A/T]	rs28652974 68790440 [G/T]	rs28409706 70308251 [C/T]	rs468467 70848506 [C/T]	rs188123810 70848507 [C/T]	rs467880 70848514 [A/G]	rs466930 70848683 [A/G]	rs2133729 71655183 [C/T]
Patients with the c.1331+2T>C mutation	SK1	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	SK2	Y	R	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	SK3	C	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	SK4	T	G	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	Y
	SK5	C	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	CZ1	Y	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	CZ2	T	R	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	CZ3	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	C
	CZ4	Y	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	CZ5	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	C
	HU1	T	R	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	HU2	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	HU3	Y	R	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	Y
	HU4	T	R	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	HU5	T	G	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	HU6	T	R	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	HU7	T	G	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	C	T	A	G	T
	PK1	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	T	A	A	G	C
	PK2	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**C**	C	A	G	T	T	A	A	G	C
Individuals without the c.1331+2T>C mutation	SK7[a]	T	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**T**	C	A	G	T	C	T	R	A	C
	SK8[a]	C	A	C	G	G	T	C	A	T	A	G	C	G	**T**	C	A	G	T	C	T	A	R	Y
	SK9[a]	Y	A	C	R	G	W	C	A	T	A	G	C	G	**T**	C	A	G	T	Y	T	R	R	C
	SK10[a]	Y	A	T	G	A	W	C	A	T	A	G	C	G	**T**	C	A	G	T	Y	T	A	G	C
	SK11[a]	Y	A	C	G	G	W	C	A	T	A	G	C	G	**T**	C	A	G	Y	Y	T	A	G	Y
	PK3[b]	C	G	C	G	G	A	C	A	T	A	G	C	**A**	**T**	C	A	G	C	T	A	A	G	C
	PK4[b]	C	G	C	G	G	A	C	A	T	A	G	C	**A**	**T**	C	A	G	C	T	A	A	G	C

Fig 1. Common ancestral haplotypes of Slovak, Hungarian and Czech Romanies, and Pakistani patients. The haplotypes in Slovak (SK), Czech (CZ), Hungarian (HU) Roma and Pakistani patients with the c.1331+2T>C mutation, and haplotypes in Slovak Roma controls without the c.1331+2T>C mutation. The c.1331+2T>C mutation is shown in bold. The common haplotype is highlighted in light grey.[a]The most similar haplotypes found in 5 out of 56 control individuals. In the remaining 51 control individuals, haplotypes were significantly distinguishable.[b]The haplotype in Pakistani patients with c.1183-1G>A mutation.

doi:10.1371/journal.pone.0124232.g001

The identified common haplotype defined by 18 SNP markers (approx. 3.89 megabases), was shared by all Czech, Slovak and Hungarian Roma patients in a homozygous state, suggesting a common ancestor for this mutation in Central European Roma patients (Fig 1). To determine presence of the identified haplotype in the population sample, a selected subset of SNPs was also genotyped in 56 unrelated Roma individuals without the mutation. The haplotype spanning 18 SNPs was not detected in a homozygous state in any of the analyzed control samples, supporting the hypothesis of a common ancestry of this mutation among these patients. However, in five of control samples (showed in Fig 1), a shorter haplotype in homozygous state was detected. The rest of genotyped control samples did not possess homozygous haplotypes similar to the identified disease haplotype. To further support the existence of the common risk haplotype, the cosegregation of the identified haplotype with the c.1331+2T>C mutation was analyzed within a single family. As shown in the Fig 2, alleles forming the risk haplotypes are present in the affected and carrier individuals.

Fourteen common SNPs shared among two members of one Pakistani family and all Roma patients carrying the homozygous c.1331+2T>C mutation were found. In contrast, members of the second family of Pakistani origin harboring the c.1183-1G>A mutation possessed an identical homozygous region with the both the Pakistani and Roma patients of only nine SNPs wide (Fig 1).

Hearing loss phenotype in the homozygotes

Relevant audiological data were only available for Slovak hearing impaired subjects (n = 6) from five families. The age of these patients ranged between 6–23 years. All of them suffered from prelingual non-progressive bilateral moderate to profound sensorineural hearing loss (Fig 3), with a downsloping audiometric curve in most of the affected individuals. The hearing loss was partially compensated by conventional hearing aids in all but one subject with profound hearing loss. None of the tested cochlear implant users carried mutation in the *MARVELD2* gene.

In the Hungarian subgroup, all homozygous probands had bilateral severe to profound deafness with minimal residual hearing. The hearing loss onset was also in the prelingual period (diagnosed between 0–12 years).

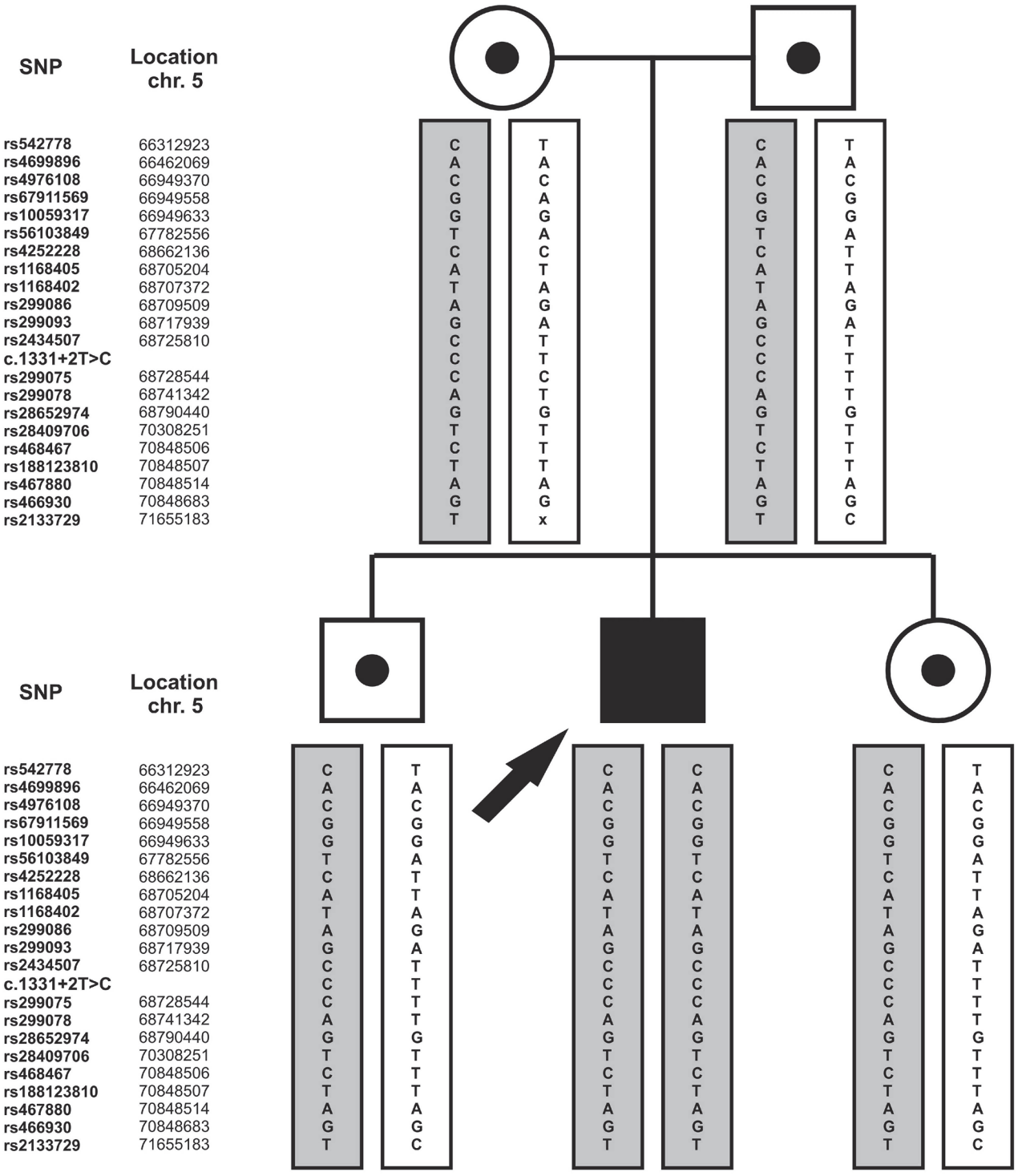


Fig 2. Cosegregation of haplotypes in a Slovak Roma family (SK5) with DFNB49 related deafness caused by the c.1331+2T>C mutation. The filled symbol represents the proband with hearing impairment; symbols with dot represent normal hearing carriers. Alleles forming the risk haplotype are shown in grey boxes.

doi:10.1371/journal.pone.0124232.g002

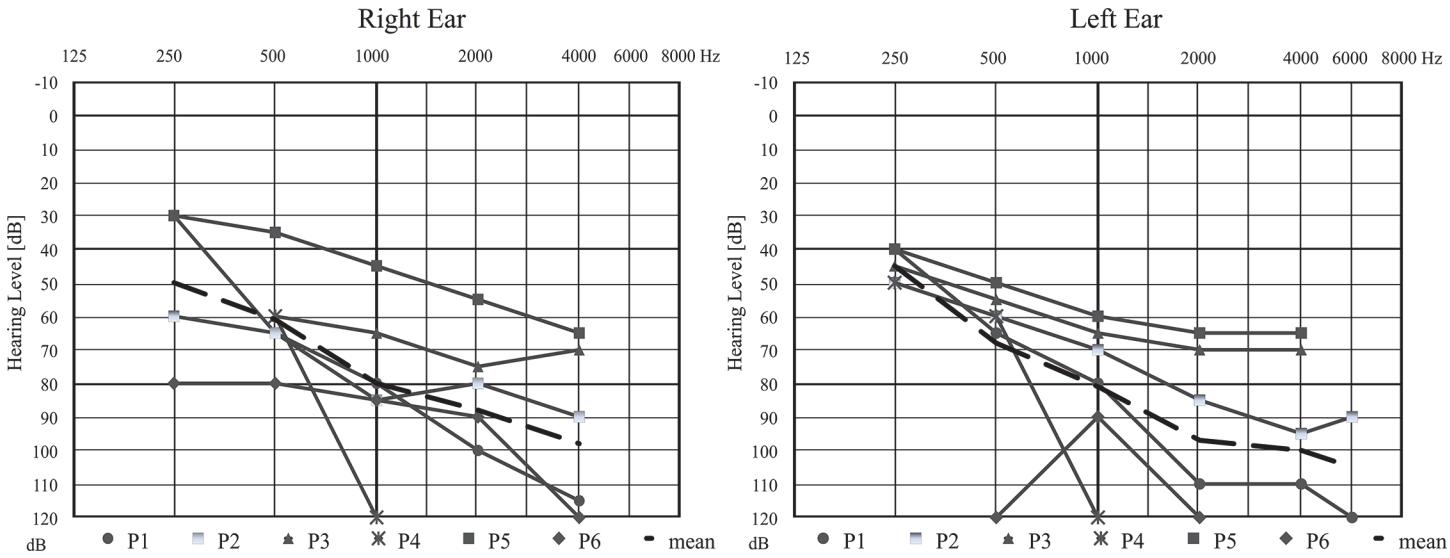


Fig 3. Hearing thresholds recorded by PTA in Slovak homozygous subjects. P1, P2, P3, P5, P6—positive probands and P4—a family member. Dashed line represents the calculated mean audiogram.

doi:10.1371/journal.pone.0124232.g003

Discussion

Prevalence and epidemiology of *MARVELD2* mutations

To date, only eleven families of Pakistani, three of Roma and one of Iranian origin with *MARVELD2*-associated deafness are known in the existing literature [3, 4, 7, 10, 9]. The most frequent mutation is the c.1331+2T>C, identified in nine families [4, 7, 10]. In our study, this mutation was found in homozygous form in twelve additional Roma families originating from two Central European countries (Slovakia and Hungary). The prevalence of *MARVELD2* related hearing loss was 3.5% in the group of deaf Slovak Roma individuals and 8.23% in deaf Hungarian Roma individuals. In contrast to our initial expectations, these prevalences, particularly in Slovakia, are lower than previously reported for the Roma population in the Czech Republic (15.8%) [10]. The difference could be explained by the small sample size of the Czech study (3 positive of 19 tested families) [10], or by the effect of genetic drift between populations. In Pakistani population, the prevalence of *MARVELD2* deafness in the hearing impaired subjects has been estimated at 1.30% [7, 30], which more closely resembles the data acquired in Slovakia.

When we look at the allele frequency of the c.1331+2T>C mutation, we can see a similar contrast between the groups of Slovak (3.85%) and Hungarian (10.0%) deaf Romanies. However, a 4.5 times higher difference in opposite direction was detected in the carrier rate of the *MARVELD2* mutation between control groups of healthy Slovak 4.5% (1:23) and Hungarian 1% (1:100) Roma individuals. The carrier rate in the Czech Romanies has been established at 2% (1:48) [10].

It is difficult to determine the exact prevalence of the c.1331+2T>C homozygotes in Slovakia due to missing data describing the number of deaf Romanies in the country. There are estimates that approximately 10,200 individuals of the total population in Slovakia counting about 5.5 million are bilaterally deaf [31]. According to data from Universal Newborn Hearing Screening Program gathered between 2009 and 2011, the incidence of congenital deafness in Slovakia is 1.20 per 1000 newborns (unpublished data). Moreover, it is believed a further 2–3 cases per 1000 newborns have congenital hearing loss to a milder degree [32]. Furthermore, if we consider that the Roma population in Slovakia represents about 7.45% of the total

population [33] and the prevalence of c.1331+2T>C homozygotes in *GJB2* negative hearing impaired Romanies was shown to be 3.5%, we may estimate that *MARVELD2* related deafness in Slovakia may affect up to approximately 80 families. This calculation does not take into account the inbreeding rate, which in Slovakia is the highest recorded for a European Roma population [15]. Thus, the actual prevalence may be even higher and further screening in Roma subpopulations particularly in Eastern Slovakia will be required. Exact input data for Hungary and Czech Republic are not available, although similar numbers of patients (adjusted to the country populations) could be expected.

The other five pathogenic mutations of the *MARVELD2* gene, (c.1183-1G>A, c.1498C>T, c.1331+1G>A and c.1331+2delTGAG), to date only found in Pakistani [4, 7] and c.1543delA in Iranian population [9], were not detected by sequencing of the six coding regions in any of the 143 unrelated deaf Slovak Roma tested subjects. However, we have identified one variant with unknown pathogenicity (c.950G>A) leading to amino acid exchange (Arginine to Glutamine) at protein position 317. This variant was detected in five individuals in heterozygous form. It was not present in the 1000 Genomes project Phase 1 release (www.ncbi.nlm.nih.gov/variaton/tools/1000genomes/) [accessed 20 April 2014], but was detected in the NHLBI GO Exome Sequencing Project in one of 6502 individuals in heterozygous form (http://evs.gs.washington.edu/EVS/) [accessed 20 April 2014]. The structure-function relationship or clinical effect of the c.950G>A substitution are not yet known. The *In silico* programs PolyPhen2, SIFT and MutationTaster predicted c.950G>A to be probably pathogenic, with possible impact on protein features or splicing of mRNA. Further studies are required to evaluate the impact of this unknown variant.

By analyzing the c.1331+2T>C mutation in a Non-Roma (Caucasian) population (in a control group of 375 hearing impaired Slovak Caucasians), we have confirmed previous findings that occurrence of this mutation in Europe is probably restricted to the Roma population, and is still not known in Slavic Caucasian ethnicity [10].

Haplotype analysis

Until now, *MARVELD2* homozygous patients in Europe have only been detected in Czech Republic [10], Slovakia and Northeastern Hungary (Fig 4). Their geographic distribution includes different regions, despite a presumed isolation of certain Roma subpopulations (clans) in these countries. Two Czech families are from the Northwest region (Ústí nad Labem) and one from South Bohemia (České Budějovice). Three Slovak families come from the Eastern (Prešov County) and two from the Western (Nitra and Trenčín County) part of the country. All Hungarian homozygous individuals originate from Northeastern Hungary (Borsod-Abaúj-Zemplén County). But this is actually due to the fact that DNA samples of hearing impaired Hungarian Roma patients were only available from this particular region.

When looking for the possible common ancestry, key historical events concerning the Central European Roma population must be taken into account. These 3 neighboring countries were inhabited by different Roma subpopulations. In the Czech Republic, nearly the entire original population of Bohemian Romanies was exterminated during the World War II holocaust in the Nazi concentration camps. Subsequently, according to the communist regime's social engineering projects in former Czechoslovakia, Roma were moved from their original rural settlements in Slovakia (particularly from its eastern parts) to tenement blocks in Czech cities [35, 36]. Consequently, the vast majority of current Czech Romanies also originate from Slovakia. Dominant Roma subpopulations in the Slovak Republic include Romungro (Carpathian Roma) and Valachian (Olah) Roma. In Hungary, three major Roma groups, the Romungro

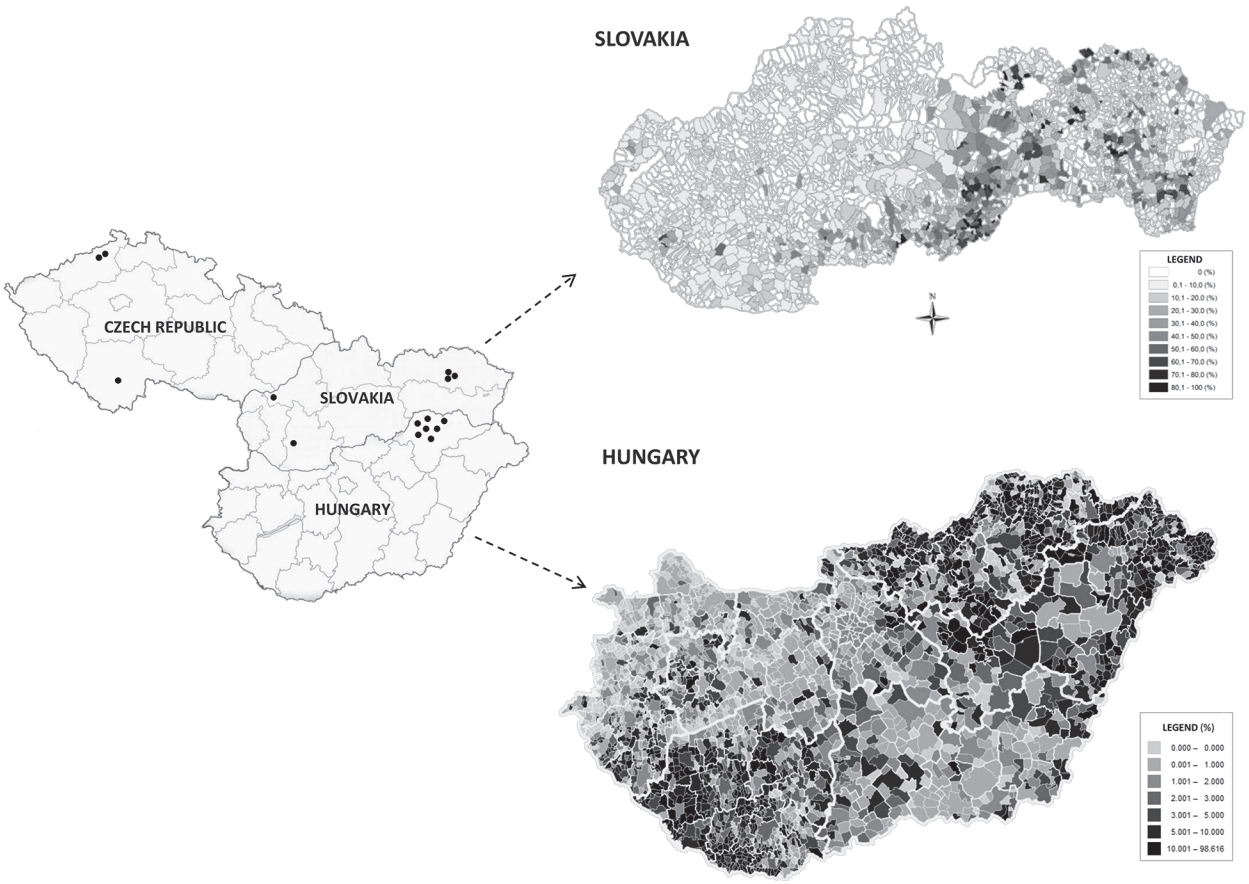


Fig 4. Distribution of the *MARVELD2* positive families in Slovakia and Hungary. Black points on the left hand side of the map represent c.1331+2T>C homozygous probands in the Czech Republic, Slovakia and Hungary. The maps of Slovakia and Hungary on right hand side show proportion rate of the Roma ethnicity at the municipality level [33, 34]. This data is not available for the Czech Republic.

doi:10.1371/journal.pone.0124232.g004

(inhabiting most of the country), Valachian (in Northern Hungary) and Boyash (mostly in Southern Hungary) are recognized [37].

In the present study, we tested whether patients with the c.1331+2T>C mutation share a common ancestral haplotype. In seventeen Roma patients (5 Slovak, 5 Czech and 7 Hungarian), we genotyped 21 biallelic polymorphisms spanning approxximately 5.34 Mb around the mutation. Haplotype analysis revealed a common haplotype of 18 SNPs (approx. 3.9 Mb) which was present in the homozygous state in all Roma c.1331+2T>C patients but none of the 56 control Roma individuals. These data support the hypothesis of common ancestor for the c.1331+2T>C mutation in all analyzed Slovak, Czech and Hungarian Roma patients.

The origin of the founder Roma population is considered to be in Northwest India [12]. So far, *MARVELD2* positive deafness cases are only known from Pakistan, Iran and Czech Republic (Central Europe) [4, 7, 9, 10], not from India. Studies on two other diseases (Neuronal ceroid lipofuscinosis and Congenital myasthenia syndrome) have already revealed a presumed common ancestor for Roma and Pakistani populations [38, 39]. We therefore additionally analyzed two c.1331+2T>C Pakistani patients, whose haplotype was identical to European Roma patients and consists of fourteen SNPs (approx. 3.36Mb). This may indicate the same origin of c.1331+2T>C mutation in Roma and Pakistani patients. When we compared two Pakistani

families, each containing different *MARVELD2* mutations, we only found 9 shared SNP markers (Fig 1).

Hearing loss phenotype in c.1331+2T>C homozygous carriers

The phenotypes of six Slovak patients with *MARVELD2* related deafness (Fig 3) correspond to available literature data. Although most of the patients carrying biallelic c.1331+2T>C mutation suffer from profound deafness, hearing loss resulting from this mutation may range from moderately-severe to profound, with certain inter- and intrafamilial variability [3, 4, 7, 10]. The mean audiograms calculated from hearing thresholds in our six patients show a milder degree of hearing loss compared to all previous studies. Patients in whom serial audiograms were available, seemed to have a stable, non-progressive hearing loss. It may indicate that the severity of hearing impairment is fixed in the early prelingual period and the interindividual variability is not much affected by postnatal environmental factors. Unfortunately, exact audiological data (pure tone thresholds) from Hungarian patients were not available as only severity and age of onset of hearing loss were noted in the accessible clinical files. Based on these data, hearing loss associated with *MARVELD2* mutations is not known to develop in children older than 2–3 years, and may be considered congenital in vast majority of the cases.

Conclusions

Our study provides the first record of *MARVELD2* related deafness in Slovakia and Hungary. It is also only the second study dealing with *MARVELD2* mutations in SNHL in Europe, as well as in the Roma population in general. We demonstrate distinct variability in prevalence of the c.1331+2T>C mutation in different Central European Roma populations, which is currently the only mutation of the tricellulin gene identified in this ethnicity. Haplotype analysis of the c.1331+2T>C mutation supports the hypothesis of a common ancestry for Slovak, Czech and Hungarian Roma patients, as well as a common origin of the mutation in Roma and Pakistani patients. From clinical point of view, we recommend testing for the c.1331 +2T>C mutation in *GJB2* negative Roma cases with early-onset SNHL. However, in contrast to the previous study in Czech Roma, our results did not provide as much support to regard it as one of the most important genetic causes of nonsyndromic deafness in Romanies. Future studies focused on other Roma subpopulations throughout Europe (particularly in the Mediterranean area) may further illuminate the relative importance of *MARVELD2* gene as a deafness cause in Roma. According to recent data and our opinion, its testing is not necessary in the majority (Caucasian) population.

Acknowledgments

We are indebted to our patients, their families and primary care physicians for their cooperation in this study. We are thankful to Lucia Valentínová for preparing some of the figures.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LV DG. Performed the experiments: IM AS PM MS SS IJ SA LV. Analyzed the data: IM AS PM IJ MH MS SA AF DG LV. Contributed reagents/materials/analysis tools: IM AS LV AF MH MS DSB SA JB SS IJ ZMA PS BM MP IK SR LK DG. Wrote the paper: IM AS LV AF DSB ZMA PS BM MP IK SR LK DG.

References

1. Schrijver. I Hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss: transforming silence to sound. J Mol Diagn. 2004; 6:275–84. PMID: 15507665

2. Van Camp G, Smith RJ. Hereditary hearing loss homepage. Accessed 10 Sept 2014. Available: http://hereditaryhearingloss.org/
3. Ramzan K, Shaikh RS, Ahmad J, Khan SN, Riazuddin S, Ahmed ZM, et al. A new locus for nonsyndromic deafness DFNB49 maps to chromosome 5q12.3-q14.1. Hum Genet. 2005; 116:17–22. PMID: 15538632
4. Riazuddin S, Ahmed ZM, Fanning AS, Lagziel A, Kitajiri S, Ramzan K, et al. Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. Am J Hum Genet. 2006; 79:1040–51. PMID: 17186462
5. Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. J Cell Biol. 2005; 171:939–45. PMID: 16365161
6. Mariano C, Silva SL, Pereira P, Fernandes A, Brites D, Brito MA. Evidence of tricellulin expression by immune cells, particularly microglia. Biochem Biophys Res Commun. 2011; 409:799–802. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.093 PMID: 21624353
7. Chishti MS, Bhatti A, Tamim S, Lee K, McDonald ML, Leal SM, et al. Splice-site mutations in the TRIC gene underlie autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment in Pakistani families. J Hum Genet. 2008; 53:101–5. PMID: 18084694
8. Nayak G, Lee SI, Yousaf R, Edelmann SE, Trincot C, Van Itallie CM, et al. Tricellulin deficiency affects tight junction architecture and cochlear hair cells. J Clin Invest. 2013; 123:4036–49. doi: 10.1172/JCI69031 PMID: 23979167
9. Babanejad M, Fattahi Z, Bazazzadegan N, Nishimura C, Meyer N, Nikzat N, et al. A comprehensive study to determine heterogeneity of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in Iran. Am J Med Genet Part A. 2012; 158A: 2485–92. doi: 10.1002/ajmg.a.35572 PMID: 22903915
10. Šafka Brožková D, Lašt vková J, Št pánková H, Kr tová M, Trková M, Myška P, et al. DFNB49 is an important cause of non-syndromic deafness in Czech Roma patients but not in the general Czech population. Clin Genet. 2012; 82:579–82. doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01817.x PMID: 22097895
11. Fraser AM. The gypsies: The Peoples of Europe. 2nd ed. Oxford, UK & Cambridge, USA: Blackwell. 1995.
12. Moorjani P, Patterson N, Loh PR, Lipson M, Kisfali P, Melegh BI, et al. Reconstructing Roma history from genome-wide data. PLoS One. 2013; 8:e58633. doi: 10.1371/journal.pone.0058633 PMID: 23516520
13. Mendizabal I, Lao O, Marigorta UM, Wollstein A, Gusmão L, Ferak V, et al. Reconstructing the population history of European Romani from genome-wide data. Curr Biol. 2012; 22:2342–9. doi: 10.1016/j.cub.2012.10.039 PMID: 23219723
14. Kalaydjieva L, Gresham D, Calafell F. Genetic studies of the Roma (Gypsies): a review. BMC Med Genet. 2001; 2:5. PMID: 11299048
15. Ferak V, Sivakova D, Sieglova Z. [The Slovak gypsies (Romany)—a population with the highest coefficient of inbreeding in Europe]. Bratisl Lek Listy. 1987; 87:168–75. PMID: 3580917
16. Plásilová M, Stoilov I, Sarfarazi M, Kádasi L, Feráková E, Ferák V. Identification of a single ancestral CYP1B1 mutation in Slovak Gypsies (Roms) affected with primary congenital glaucoma. J Med Genet. 1999; 36:290–4. PMID: 10227395
17. Gencik A. Epidemiology and genetics of primary congenital glaucoma in Slovakia. Description of a form of primary congenital glaucoma in gypsies with autosomal-recessive inheritance and complete penetrance. Dev Ophthalmol. 1989; 16:76–115. PMID: 2676634
18. Plásilová M, Feráková E, Kádasi L, Poláková H, Gerinec A, Ott J. et al. Linkage of autosomal recessive primary congenital glaucoma to the GLC3A locus in Roms (Gypsies) from Slovakia. Hum Hered. 1998; 48:30–3. PMID: 9463798
19. Kalanin J, Takarada Y, Kagawa S, Yamashita K, Ohtsuka N, Matsuoka A. Gypsy phenylketonuria: a point mutation of the phenylalanine hydroxylase gene in Gypsy families from Slovakia. Am J Med Genet. 1994; 49:235–9. PMID: 8116675
20. Bôžiková A, Gabriková D, Sovičová A, Behulová R, Mačeková S, Boro ová I, et al. The frequency of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Slovak and Roma (Gypsy) ethnic group of Eastern Slovakia. J Thromb Thrombolysis. 2012; 34:406–9. PMID: 22562116
21. Gabriková D, Bernasovská J, Mačeková S, Bôžiková A, Bernasovský I, Bališinová A, et al. Unique frequencies of HFE gene variants in Roma/Gypsies. J Appl Genet. 2012; 53:183–7. doi: 10.1007/s13353-012-0088-y PMID: 22354660
22. Schwabova J, Brozkova DS, Petrak B, Mojzisova M, Pavlickova K, Haberlova J, et al. Homozygous EXOSC3 mutation c.92G—>C, p.G31A is a founder mutation causing severe pontocerebellar hypoplasia type 1 among the Czech Roma. J Neurogenet. 2013; 27:163–9. doi: 10.3109/01677063.2013.814651 PMID: 23883322

23. Baránková L, Sisková D, Hühne K, Vyhnálková E, Sakmaryová I, Bojar M, et al. A 71-nucleotide deletion in the periaxin gene in a Romani patient with early-onset slowly progressive demyelinating CMT. Eur J Neurol. 2008; 15:548–51. doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02104.x PMID: 18410371

24. Melegh B, Bene J, Mogyorósy G, Havasi V, Komlósi K, Pajor L, et al. Phenotypic manifestations of the OCTN2 V295X mutation: sudden infant death and carnitine-responsive cardiomyopathy in Roma families. Am J Med Genet A. 2004; 131:121–6. PMID: 15487009

25. Hunter M, Heyer E, Austerlitz F, Angelicheva D, Nedkova V, Briones P, et al. The P28T mutation in the GALK1 gene accounts for galactokinase deficiency in Roma (Gypsy) patients across Europe. Pediatr Res. 2002; 51:602–6. PMID: 11978884

26. Minárik G, Ferák V, Feráková E, Ficek A, Poláková H, Kádasi L. High frequency of GJB2 mutation W24X among Slovak Romany (Gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). Gen Physiol Biophys. 2003; 22:549–56. PMID: 15113126

27. Seeman P, Malíková M, Rasková D, Bendová O, Groh D, Kubálková M, et al. Spectrum and frequencies of mutations in the GJB2 (Cx26) gene among 156 Czech patients with pre-lingual deafness. Clin Genet. 2004; 66:152–7. PMID: 15253766

28. Alvarez A, del Castillo I, Villamar M, Aguirre LA, González-Neira A, López-Nevot A, et al. 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 A. 2005; 137A:255–8. PMID: 16088916

29. Bouwer S, Angelicheva D, Chandler D, Seeman P, Tournev I, Kalaydjieva L. Carrier rates of the ancestral Indian W24X mutation in GJB2 in the general Gypsy population and individual subisolates. Genet Test. 2007; 11:455–8. doi: 10.1089/gte.2007.0048 PMID: 18294064

30. Riazuddin S, Belyantseva IA, Giese AP, Lee K, Indzhykulian AA, Nandamuri SP, et al. Alterations of the CIB2 calcium- and integrin-binding protein cause Usher syndrome type 1J and nonsyndromic deafness DFNB48. Nat Genet. 2012; 44:1265–71. doi: 10.1038/ng.2426 PMID: 23023331

31. Kabatova Z, Profant M. [Deafness and cochlear implantation]. Via pract. 2007; 4:76–8.

32. National Institute of Deafness and other Communication Disorders. Accessed 20 May 2014. Available: www.nidcd.nih.gov/health/statistics/Pages/quick.aspx

33. Musinka A, Skobla D, Hurrle J, Matlovicova K, Kling J. Atlas of Roma communities in Slovakia 2013. Bratislava: UNDP, 2014.

34. Hungarian Central Statistical Office. Census 2011. Accessed 02 Dec. 2014. Available: http://www.ksh.hu/interaktiv/terkepek/mo/nemz_eng.html

35. Koupilová I, Epstein H, Holcík J, Hajioff S, McKee M. Health needs of the Roma population in the Czech and Slovak Republics. Soc Sci Med. 2001; 53:1191–204. PMID: 11556609

36. Lassuthova P, Sišková D, Haberlová J, Sakmaryová I, Filouš A, Seeman P. Congenital cataract, facial dysmorphism and demyelinating neuropathy (CCFDN) in 10 Czech gypsy children—frequent and underestimated cause of disability among Czech gypsies. Orphanet J Rare Dis. 2014; 9:46. doi: 10.1186/1750-1172-9-46 PMID: 24690360

37. Juhász E1, Béres J, Kanizsai S, Nagy K. The Consequence of a Founder Effect: CCR5-32, CCR2-64I and SDF1-3'A Polymorphism in Vlach Gypsy Population in Hungary. Pathol Oncol Res. 2012; 18:177–82. doi: 10.1007/s12253-011-9425-4 PMID: 21667221

38. Sharp JD, Wheeler RB, Parker KA, Gardiner RM, Williams RE, Mole SE. Spectrum of CLN6 mutations in variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Hum Mutat. 2003; 22:35–42. PMID: 12815591

39. Morar B, Gresham D, Angelicheva D, Tournev I, Gooding R, Guergueltcheva V, et al. Mutation history of the roma/gypsies. Am J Hum Genet. 2004; 75:596–609. PMID: 15322984