



VILNIAUS UNIVERSITETO  
MEDICINOS FAKULTETO  
ŽMOGAUS IR MEDICININĖS GENETIKOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

*TRIOBP GENO TYRIMAS LIETUVOS POPULIACIJOS SERGANČIŲJŲ NESINDROMINIŲ  
KLAUSOS SUTRIKIMU GRUPĖJE*

Magistrantė

MARIJA ŠALČIŪTĖ

\_\_\_\_\_

(parašas)

Darbo vadovai

Dr. EGLĖ PREIKŠAITIENĖ

\_\_\_\_\_

(parašas)

Dokt. VIOLETA MIKŠTIENĖ

\_\_\_\_\_

(parašas)

VU MF Žmogaus ir medicininės  
genetikos katedros vedėjas

prof. (HP) dr. ALGIRDAS UTKUS

leidžiama ginti

\_\_\_\_\_

(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_

Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

Vilniaus universiteto studijuojančiojo,  
teikiančio baigiamąjį darbą,  
GARANTIJA

WARRANTY  
of Vilnius University Student Thesis

Vardas, pavardė: Marija Šalčiūtė  
Padalinys: VU MF Žmogaus ir medicininės  
genetikos katedra  
Studijų programa: Medicinos genetika  
Darbo pavadinimas: *TRIOBP* geno tyrimas  
Lietuvos populiacijos sergančiųjų nesindrominiu  
klausos sutrikimu grupėje  
Darbo tipas: Magistro darbas

Name and Surname: Marija Šalčiūtė  
Faculty: VU MF Department of Human and  
Medical Genetics  
Study programme: Medical genetics  
Thesis topic: The Analysis of *TRIOBP* Gene in  
Lithuanian Group of Patients Affected With Non-  
Syndromic Hearing Loss  
Thesis type: Master thesis

Garantuoju, kad mano baigiamasis darbas yra  
parengtas sąžiningai ir savarankiškai, kitų asmenų  
indėlio į parengtą darbą nėra. Jokių įstatymų  
nenumatytų mokėjimų už šį darbą niekam nesu  
mokėjęs.  
Šiame darbe tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos  
kitų šaltinių citatos yra pažymėtos literatūros  
nuorodose.

I guarantee that my thesis is prepared in good faith  
and independently, there is no contribution to this  
work from other individuals. I have not made any  
illegal payments related to this work.  
Quotes from other sources used in this thesis,  
directly or indirectly, are indicated in literature  
references.

Aš, Marija Šalčiūtė, patvirtinu (pažymėti)   
*I, Marija Šalčiūtė, confirm (check)*

Patvirtinu, kad baigiamasis darbas yra pateiktas į Vilniaus universiteto studijų informacinę sistemą.  
*I declare that this thesis is submitted to the Vilnius University Study Information System.*

---

(vardas, pavardė / name,  
surname)

(parašas / signature)

(data / date)

**Embargo laikotarpis / Embargo**

Prašau nustatyti šiam baigiamajam darbui toliau nurodytos trukmės embargo laikotarpį:  
*I am requesting an embargo of this thesis for the period indicated below:*

embargo laikotarpis nereikalingas / *no embargo requested;*

\_\_\_\_\_ mėnesių / *months [embargo laikotarpis negali viršyti 60 mėn. /an embargo period shall not exceed 60 months].*

Embargo laikotarpio nustatymo priežastis / *reason for embargo:*  
.....

---

(vardas, pavardė / name,  
surname)

(parašas / signature)

(data / date)

**Darbo vadovo patvirtinimas:**

Patvirtinu, kad baigiamasis darbas atitinka reikalavimus ir leidžiu darbą ginti:

*I confirm that this thesis has been prepared in accordance with the requirements of students' theses of Vilnius University and can be defended.*

---

(vardas, pavardė / name,  
surname)

(parašas / signature)

(data / date)

Katedros (Padalinio) patvirtinimas, kad atspausdintas baigiamasis darbas buvo pateiktas ir užregistruotas:

---

(vardas, pavardė)

(parašas)

# TURINYS

SANTRAUKA.....	5
SUMMARY.....	6
SANTRUMPOS.....	7
PADĖKA.....	8
ĮVADAS.....	9
DARBO TIKSLAS IR DARBO UŽDAVINIAI.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
1.1 Klausos sutrikimas.....	11
1.1.1 Klausos sutrikimų epidemiologija.....	11
1.2 Klausos sistemos mechanizmas.....	12
1.3 Klausos sutrikimo etiologija.....	14
1.4 Paveldimas klausos sutrikimas.....	14
1.4.1 Autosominiu recesyviu būdu paveldimas nesindrominis klausos sutrikimas ir jį lemiantys genai.....	15
1.5 <i>TRIOBP</i> genas.....	16
1.5.1 <i>TRIOBP</i> baltymas.....	16
1.5.2 <i>TRIOBP</i> tyrimai modeliniuose organizmuose.....	18
1.5.3 <i>TRIOBP</i> geno tyrimų apžvalga.....	19
2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS.....	20
2.1 Tyrimo organizavimas ir eiga.....	20
2.2 Tiriamieji asmenys.....	21
2.3 Tyrimo objektas ir metodai.....	21
2.3.1 DNR gryninimas iš kraujo.....	21
2.3.2 DNR koncentracijos ir švarumo įvertinimas spektrofotometru.....	21
2.3.3 Pradmenų kūrimas.....	21
2.3.4 Polimerazės grandininė reakcija (PGR).....	22
2.3.5 Horizontalioji agarozės gelio elektroforezė.....	25
2.3.6 PGR produkto valymas egzozonukleazėmis (Exo-SAP reakcija).....	26

2.3.7 Ciklinė sekoskaitos PGR .....	27
2.3.8 Sekoskaitos reakcijos produkto valymas etanoliu ir natrio acetatu .....	28
2.3.9 Tiesioginės nukleotidų sekos nustatymas frakcionuojant automatizuotos kapiliarinės elektroforezės metodu.....	28
2.4 Duomenų analizės metodai.....	29
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	30
3.1 Nustatyti <i>TRIOBP</i> geno koduojančios sekos variantai.....	30
3.2 Nustatytų <i>TRIOBP</i> geno koduojančios sekos variantų bioinformacinė analizė.....	32
3.3 Nustatytų <i>TRIOBP</i> geno variantų paplitimas Lietuvos populiacijos tiriamųjų, sergančiųjų klausos sutrikimu, grupėje.....	33
IŠVADOS .....	41
LITERATŪROS SARAŠAS .....	42

# SANTRAUKA

**Autorius:** Marija Šalčiūtė.

**Darbo pavadinimas:** *TRIOBP* geno tyrimas Lietuvos populiacijos sergančiųjų nesindrominiu klausos sutrikimu (KS) grupėje.

**Tyrimo tikslas:** Įvertinti *TRIOBP* geno patogeninių variantų reikšmę KS etiopatogenezeje Lietuvos populiacijos sergančiųjų nesindrominiu KS grupėje.

**Temos aktualumas:** KS – tai dažniausias jutimo funkcijos sutrikimas pasaulyje, kurį lemia tiek genetiniai, tiek aplinkos veiksniai. Žinoma daugiau nei 150 genetiinių sričių ir 95 genai, atsakingi už nesindrominio KS etiologiją. Nustatyta, kad *TRIOBP* geno koduojamas baltymas svarbus plaukuotųjų ląstelių, esančių ausies sraigėje stereocilijų pagrindo formavimuisi. Tam tikri *TRIOBP* geno koduojančios sekos variantai, lemia stereocilijų vystymosi sutrikimą ir yra siejami su autosominiu recesyviniu būdu paveldimu KS. Šiuo metu trūksta išsamių *TRIOBP* geno tyrimų Lietuvos populiacijoje, siekiant įvertinti patogeninių variantų reikšmę KS etiopatogenezeje.

**Tyrimo objektas ir metodai:** Buvo ištirti 55 asmenys, sergantys paveldimu nesindrominiu KS. Tyrimo objektas – tiriamųjų asmenų DNR. Norint nustatyti koduojančią *TRIOBP* geno seką, buvo atlikta naujos kartos ir *Sanger* sekoskaita. Nustatytiems *TRIOBP* geno koduojančios sekos variantams buvo atlikta bioinformacinė analizė, siekiant nustatyti galimai patogeninę variantų įtaką koduojam baltymui.

**Tyrimo rezultatai ir išvados:** Atlikta *TRIOBP* geno (NM\_001039141) egzonų (7, 8, 9, 16 ir 17) *Sanger* sekoskaita 55 tiriamiesiems, sergantiems nesindrominiu KS Lietuvos populiacijoje. Įvykdyta apie 900 *TRIOBP* geno koduojančios sekos sekoskaitos reakcijų. Išanalizuoti *TRIOBP* geno koduojančios sekos naujos kartos ir *Sanger* sekoskaitos duomenys. Identifikuoti 24 *TRIOBP* geno koduojančios sekos variantai 7–tame, 8–tame, 9–tame, 14–tame ir 19–tame egzonuose. Atlikta nustatytų variantų biostatistinė analizė. Nustatyti dažniausi *TRIOBP* geno variantai: rs8140958 (c.4129T>C, C=0,727) ir rs739138 (c.3899A>G, G=0,7). Nustatyti rečiausi *TRIOBP* geno variantai: rs778331588, (c.2555A>T), rs771996937 (c.3978C>A) ir rs200045032 (c.5014G>T), retojo alelio dažnis lygus 0,009. Įvertintas identifikuotų *TRIOBP* variantų patogeniškumas. Remiantis bioinformaciniais įrankiais, duomenų bazėmis ir moksline literatūra, nustatytas 1 variantas (rs200045032, c.5014G>T, p.(Gly1672Ter)), patogeniškai veikiantis koduojamo baltymo struktūrą.

## SUMMARY

**Author:** Marija Šalčiūtė.

**Title:** The analysis of *TRIOBP* gene in Lithuanian group of patients affected with non-syndromic hearing loss.

**Research object:** To evaluate the importance of the *TRIOBP* gene pathogenic variants in etiopathogenesis of hearing impairment in Lithuanian group of patients affected with non-syndromic hearing loss.

**Subject relevance:** Hearing loss – the most common congenital sensory impairment in the world, which is determined by genetic and the environmental factors. To date, more than 150 loci and 95 genes responsible for non-syndromic hearing loss etiology are known. The protein encoded by the *TRIOBP* gene is essential for formation of stereocilia's rootlets in the inner ear cochlea. Particular *TRIOBP* gene coding sequence variants interfere the dedevelopment of rootlets and are associated with autosomal recessive inherited hearing loss. *TRIOBP* gene studies in Lithuanian population have never been performed earlier, so it's important to assess significance of pathogenic variants in etiopathogenesis of hearing impairment in Lithuanian population.

**Research subject and methods:** Were investigated 55 individuals with hereditary non-syndromic hearing loss. The object of research – patient's DNA. *TRIOBP* gene coding sequence was analyzed using new generation and Sanger sequencing methods. Bioinformatic analysis was performed to identified *TRIOBP* gene coding sequence variants to determine the possible pathogenic effects of the variants to coding protein.

**Results and conclusions:** Were sequenced *TRIOBP* gene exons (7, 8, 9, 16 and 17) by Sanger sequencing in Lithuanian group of 55 patients affected with non-syndromic hearing loss. About 900 *TRIOBP* gene sequencing reactions were performed and *TRIOBP* gene new generation and Sanger sequencing data analyzed. 24 different *TRIOBP* gene coding sequence variants were identified in the 7th, 8th, 9th, 14th and 19th exons. Most common variants rs8140958 (c.4129T>C, C=0.727), rs739138 (c.3899A>G, G=0.7) and rarest variants rs778331588 (c.2555A>T), rs771996937 (c.3978C>A) and rs200045032 (c.5014G>T) were determined with minor allele frequency 0.009. Based on bioinformatics tools, databases and scientific literature, 1 variant (rs200045032, c.5014G>T p.(Gly1672Ter)) was identified pathogenetically influencing the coding structure of the protein.

## SANTRUMPOS

bp – bazių pora

dB – decibelas

ddNTP – dideoksinukleotidtrifosfatas

DFNB – autosominiu recesyviniu būdu paveldimas nesindrominis klausos sutrikimas

DMSO – dimetilsulfoksidas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

dNTP – deoksinukleotidtrifosfatas

EDTA – etilendiamino tetraacetatas

ExoI – egzozonukleazė I

GJB – tarpląstelines plyšines jungtis sudarantis koneksino baltymas (angl. *gap junction protein*)

IGV – integruota genomo vaizduoklė

K<sup>+</sup> – kalis

KS – klausos sutrikimas

MAF – retojo alelio dažnis (angl. *minor allele frequency*)

MF – Medicinos fakultetas

MgCl<sub>2</sub> – magnio chloridas

Na<sup>+</sup> – natris

NKS – naujos kartos sekoskaita

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PSO – pasaulio sveikatos organizacija

SAP – krevečių šarminė fosfatazė

TBE – buferis, sudarytas iš Tris, boro rūgšties ir EDTA

TRIOBP – TRIO ir prie filamentinio aktino besijungiantis baltymas (angl. *TRIO and F-actin binding protein*)

VšĮ – Viešoji įstaiga

VU – Vilniaus Universitetas

VUL – Vilniaus Universiteto ligoninė

ŽMGK – Žmogaus ir medicininės genetikos katedra

## **PADĖKA**

Noriu padėkoti magistro baigiamojo darbo vadovei dokt. Violetai Mikštienei už duotas pastabas, pagalbą, kantrybę ir palaikymą.

Dėkoju magistro baigiamojo darbo vadovei dr. Eglei Preikšaitienei ir Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Žmogaus ir medicininės genetikos katedros darbuotojams už suteiktą galimybę rašyti darbą, už duotus patarimus ir atsakymus į iškilusius klausimus.



## ĮVADAS

Klausa – viena iš svarbiausių žmogaus organizmo sistemų, atliekanti jutimo ir sąsajos su supančia aplinka funkcijas. Klausos sutrikimas (KS) – dažniausias įgimtas jutimo funkcijos sutrikimas pasaulyje, kurį lemia tiek genetiniai, tiek aplinkos veiksniai.

Daugiau nei pusė, sergančiųjų ikikalbiniu KS išsivysčiusiose pasaulio šalyse, atvejų – paveldimi, o didžioji dalis jų – nesindrominiai ir paveldimi autosominiu recesyviniu būdu (1). Kitų priežasčių KS prevencija vykdoma skiepais ir antibiotikais.

Naujausių technologijų pagalba, buvo identifikuoti dar nežinomi molekuliniai mechanizmai, lemiantys KS etiologiją, o tuo pačiu ir patobulinti ligos diagnostikos metodai. Molekulinis-genetinis tyrimas, šiuo metu yra įprastas diagnostinio ištyrimo etapas norint nustatyti sutrikimo priežastį, parinkti tinkamą gydymą ar tiesiog patvirtinti ligos diagnozę.

Nesindrominis KS pasižymi heterogeninėmis savybėmis – tą patį ligos fenotipą gali lemti daug genų ir skirtingi jų variantai. Pastarųjų metų mokslinių-eksperimentinių studijų duomenimis, nustatyta daugiau nei 150 genetinių sričių ir 95 genai, atsakingi už nesindrominio KS etiologiją (2, 3). Vienas tokių – pasaulyje dažnai tiriamas *TRIOBP* (angl. *TRIO and F-actin binding protein*) genas (MIM #609761). Nustatyta, kad *TRIOBP* geno koduojamas baltymas svarbus plaukuotųjų ląstelių, esančių ausies sraigėje stereocilijų pagrindo formavimuisi. Tam tikri geno koduojančios sekos variantai siejami su retu autosominiu recesyviniu būdu paveldimo KS tipu (DFNB28; MIM #609823) (4).

Lietuvoje iki šiol atlikti tik su KS siejamo tarpląstelines plyšines jungtis sudarančio koneksino baltymo 2 (angl. *gap junction protein, GJB2*) geno koduojančios sekos tyrimai (5), o europiečių populiacijoje *TRIOBP* geno tyrimas, sergantiems nesindrominiu KS, atliktas visai neseniai (6). Tad trūksta išsamių *TRIOBP* geno tyrimų Lietuvos populiacijoje, siekiant patobulinti KS diagnostikos metodus.

Tikrinant hipotezę ar *TRIOBP* geno koduojančios sekos variantai gali turėti įtakos susirgti nesindrominiu KS Lietuvos populiacijoje, buvo atliekamas *TRIOBP* geno sekoskaita, naudojant naujos kartos ir *Sanger* sekoskaitos metodus.

**Raktiniai žodžiai:** nesindrominis klausos sutrikimas, *TRIOBP*.

**Darbo tikslas:** Įvertinti *TRIOBP* geno patogeninių variantų reikšmę klausos sutrikimo etiopatogenezeje Lietuvos populiacijos sergančiųjų nesindrominiu klausos sutrikimu grupėje.

# DARBO TIKSLAS IR DARBO UŽDAVINIAI

## Darbo tikslas:

Įvertinti *TRIOBP* geno patogeninių variantų reikšmę klausos sutrikimo etiopatogenezeje Lietuvos populiacijos sergančiųjų nesindrominiu klausos sutrikimu grupėje.

## Darbo uždaviniai:

1. Atlikti *TRIOBP* geno egzonų, kurie nebuvo nusekvenuoti naujos kartos sekoskaitos metodu, *Sanger* sekoskaitą, išanalizuoti *TRIOBP* geno koduojančios sekos sekoskaitos duomenis ir identifikuoti variantus, sergančiųjų nesindrominiu klausos sutrikimu grupėje.
2. Atlikti gautų duomenų biostatistinę analizę, apskaičiuoti genotipų ir alelių dažnius, sergančiųjų nesindrominiu klausos sutrikimu grupėje Lietuvos populiacijoje.
3. Atlikti nustatytų *TRIOBP* geno variantų bioinformacinę analizę, įvertinti jų patogeniškumą, remiantis bioinformaciniais įrankiais, duomenų bazėmis, moksline literatūra.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Klausos sutrikimas

Klausa – vienas svarbiausių žmogaus jutimų. Ji apima garso aptikimo, jutimo, garsų skyrimo, jungimo ir garso šaltinio vietos nustatymo funkcijas. Taip pat garso sklidimo krypties (iš kairės ar dešinės) nustatymo, kalbos garsų jutimo ir skyrimo nuo kitų garsų funkcijas (7).

KS – bendras terminas, kuris apima kurtumo ir neprigirdėjimo sąvokas. Kurtumas – KS, kai negalima sėkmingai apdoroti lingvistinės informacijos, gaunamos per klausą, net ir naudojantis klausos aparatu. Tuo tarpu neprigirdėjimas – tai KS, kai likusi klausa leidžia naudoti klausos aparatus, kurių pagalba galima gan sėkmingai apdoroti lingvistinę informaciją, gaunamą per klausą (8).

Garso stiprumas yra matuojamas decibelais (dB). Šiuo matu yra apibrėžiamas KS laipsnis. Nulis decibelų reiškia mažiausią garso stiprumą, kurį žmogus gali suvokti (9). Normalaus pokalbio garso stiprumas yra 60–65 dB, tuo tarpu skausmą gali sukelti 130 dB stiprumo garsas. Atsižvelgiant į geriau girdinčios ausies klausos slenksčių vidurkį, apibrėžiami KS laipsniai :

1. Lengvas (20–40 dB);
2. Vidutinio sunkumo (41–70 dB);
3. Sunkus (71–90 dB);
4. Ypač sunkus (gilus) (>91dB) kurtumas (10).

### 1.1.1 Klausos sutrikimų epidemiologija

KS yra dažniausia įgimta liga ir dažniausia neurosensorinė liga išsivysčiusiose šalyse. Maždaug 1 iš 1000 vaikų Jungtinėse Amerikos Valstijose gimsta su KS, šis rodiklis padidėja iki 3,5 iš 1 000 sulaukus paauglystės, daugiau nei pusė šių atvejų yra dėl genetinių faktorių (11). Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, apie 5 % populiacijos – 360 mln. (iš jų 328 mln. suaugusiųjų ir 32 mln. vaikų) turi įvairaus laipsnio KS, ribojantį asmens gebėjimą išgirsti ir suvokti garsus (12). Žvelgiant pasaulio mastu – pastebimas didesnis sergamumas Pietų ir Rytų Azijoje, mažiausias fiksuojamas – Vidurinių Rytų ir Šiaurės Afrikos regionuose (13).

Remiantis Higienos instituto Sveikatos informacijos centro 2015 m. duomenimis, sergamumas vidinės ausies ligomis Lietuvoje buvo 9 iš 1000 gyventojų, tuo tarpu kurtumu ir neprigirdėjimu Lietuvoje sirgo 12 iš 1000 gyventojų. Didesnę sergančiųjų dalį vidinės ausies

ligomis sudarė moterys (75 %), o sergamumas kurtumu ir neprigirdėjimu tarp lyčių yra panašus – vyrų 56 %, moterų 44 %. (14).

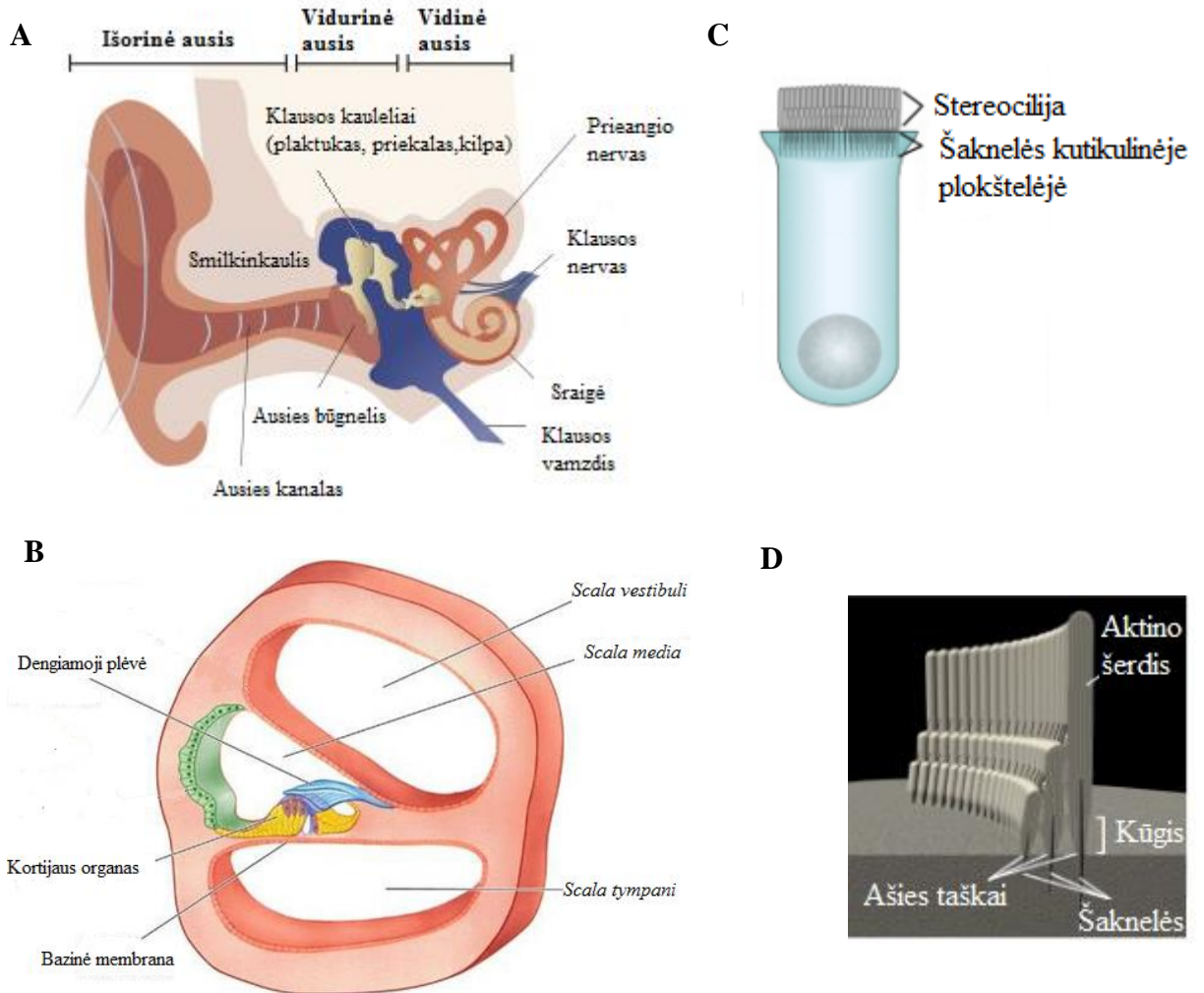
## 1.2 Klausos sistemos mechanizmas

Klausos sistema yra viena iš sudėtingiausių žmogaus jutimų mechanizmų. Ji susideda iš trijų anatominių dalių: išorinės, vidurinės ir vidinės ausies. Išorinė ausis pagauna sklindančias garso bangas ir perduoda jas būgneliui per išorinį girdimąjį kanalą. Toliau garso bangos iš vidurinės ausies perduodamos į vidinę ausį (1 pav., A).

Vidinė ausis – tai skysčiu užpildytas organas, atsakingas už garso bangų mechaninės energijos vertimą į nervinius impulsus, kurie galų gale bus perduodami į galvos smegenis. Vidinėje ausyje yra klausos ir pusiausvyros jutimo organai. Vienas iš jų, vidinėje ausyje esanti sraigė. Tai skysčiu užpildytas spiralės formos vamzdis, padalintas į tris dalis: *scala media*, *scala tympani* ir *scala vestibuli*. *Scala media* – endolimfa užpildyta kanalo dalis, esanti tarp kitų dviejų dalių. *Scala media* dalyje yra sraigės sensorinis epitelis – Kortijaus organas, esantis ant bazinės membranos, skiriančios *scala media* ir *scala tympani*. Kortijaus organą sudaro specializuotos sensorinės ląstelės – plaukuotosios ląstelės, išsidėsčiusios viena vidine eile ir trimis išorinėmis eilėmis, taip pat dengiamoji plėvė (1 pav., B) (15). Plaukuotosios ląstelės atlieka mechaninių bangų vertimo nerviniais impulsais funkciją. Viršutiniame ląstelių paviršiuje yra ataugėlės (plaukeliai) – stereocilijos, kuriose gausu baltymo aktino. Jos sudaro gerai organizuotą laiptelių pavidalo struktūrą. Plaukuotųjų ląstelių stereocilijos bei ypatingai jų ašies taškai turi atlaikyti nuolatinius garso sukeltus nuokrypius. Dėl to, jų stabilumas ir tvirtumas yra apsaugoti šaknelių – lanksčių struktūrų, kurios pritvirtina prie stereocilijos pagrindo kutikulinėje plokštelėje (1 pav., C) (16). Šaknelės sudarytos iš tankiai supakuotų aktino siūlų, kurie suformuoja kūgio struktūrą, kiekvienos stereocilijos pagrinde (1 pav., D) (17).

Skirtingai nuo kitų fiziologinių skysčių žmogaus organizme, endolimfa turi unikalią elektrolitų sudėtį: su aukšta kalio (K<sup>+</sup>) ir žema natrio (Na<sup>+</sup>) koncentracija (18). Atėjus mechaninei garso bangai iš vidurinės ausies, stereocilijos pradeda aktyviai judėti, dėl į plaukuotąsias ląsteles patekusių K<sup>+</sup> jonų, sukeliama jų membranų depoliarizaciją – aktyvuojamas mechanoelektrinis impulso perdavimo procesas (19). Plaukuotųjų ląstelių depoliarizacija sukelia neurosiuntiklių sekreciją į sinapsinį plyšį, esantį tarp plaukuotosios ląstelės ir neurono galūnėlės. Nerviniu impulsu signalas perduodamas į galvos smegenis (20).

Galima daryti išvadą, kad didelę reikšmę klausos procesui ir garso perdavimui turi plaukuotųjų ląstelių, esančių ausies sraigėje išsivystymas ir tinkama funkcija. Svarbus jų sudėtyje esantis baltymas aktinas, dėl savo specializuotos struktūros vidinėje ausyje yra būtinas įvairioms ląstelinėms funkcijoms, ląstelės formai ir stereocilijų judėjimui (21).



### 1 paveikslas. Žmogaus klausos jutimo sandara

- (A) Žmogaus ausies struktūra. Klausos sistema sudaryta iš išorinės, vidurinės ir vidinės ausies (15).
- (B) Sraigės struktūros skersinis pjūvis. Pavaizduotos sraigės užpildą 3 sudarančios dalys: *scala vestibuli*, *scala media* ir *scala tympani*. *Scala media* yra ant bazinės membranos išsidėstęs Kortijaus organas (22).
- (C) Plaukuotosios ląstelės struktūra. Stereocilijos išsidėstę trejomis eilėmis, didėjančia tvarka pagal aukštį ir šaknelėmis prisitvirtinę prie kutikulinės plokštelės (23).
- (D) Stereocilijų struktūra. Aktino siūlai kutikulinėje plokštelėje tampa tankesni, sudaro smailėjančią struktūrą (panašią į kūgį) ir formuoja šakneles (23).

### 1.3 Klausos sutrikimo etiologija

KS priežastys gali būti įgimtos (kai KS nustatomas gimus arba ankstyvame vaiko amžiuje, kai dar nesusiformavusi kalba) arba įgytos – klausa sutrinka vėliau, kai kalbos įgūdžiai jau susiformavę.

Pagrindinės KS priežastys:

- Genetinės – sudaro apie 60 % ligos atvejų.
- Infekcija ir virusinės ligos – gripas, tymai, skarlatina, raudonukė, meningitas ir pan.
- Intoksikacija – gyvsidabris, švinas, fosforas ir pan.
- Trauma – gimdymo komplikacija, akustinė trauma, galvos smegenų trauma, ausies sužalojimas.
- Vidaus organų susirgimai – širdies kraujagyslių sistemos ligos, kraujos, inkstų ligos.
- Centrinės nervų sistemos susirgimai – galvos smegenų išeminė liga, kraujagyslių spazmai, encefalitai, epilepsija, išsėtinė sklerozė.
- Klausos organo ligos besikomplikuojančios kurtumu – ūmus ir lėtinis otitas, otosklerozė.
- Ausies pažeidimai – vidinės, vidurinės ir išorinės ausies pažeidimai.
- Nežinomos priežastys – sudaro apie 30 % ligos atvejų, kai kuriais atvejais yra sudėtinga nustatyti KS priežastį (24).

### 1.4 Paveldimas klausos sutrikimas

Paveldimas KS gali būti nesindrominis – izoliuotas, arba susijęs su kitais požymiais – sindrominis (10).

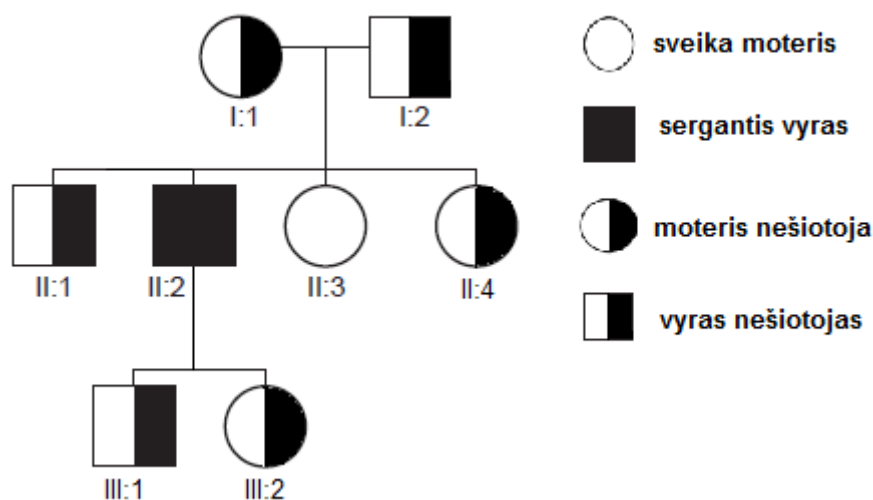
Atsižvelgiant į klausos mechanizmo sudėtingumą, yra aktualu ieškoti genų atsakingų už KS. Šiuo metu identifikuota per 150 genetinių sričių siejamų nesindrominiu KS (25). Norint standartizuoti nomenklatūrą, buvo sukurta bendra klasifikacija genetinėms sritims, atsakingoms už KS (26). Genetinės sritys ir genai, susiję su paveldimu nesindrominiu KS, buvo suklasifikuoti pagal KS paveldėjimo būdą ir pavadinti DFN (*angl.* „DeaFNess“) (27):

1. DFNA – lemia KS, paveldimą autosominiu dominantiniu būdu;
2. DFNB – lemia KS, paveldimą autosominiu recesyviu būdu;
3. DFNX – lemia KS, paveldimą X recesyviu būdu;
4. DFNY – sukibę su Y chromosoma;
5. DFNM – lemia KS, paveldimą mitochondrinu būdu.

Kiekvienai genetinei sričiai priskirtas simbolis yra su skaičiumi greta, jis reiškia, kokia chronologine tvarka ji buvo identifikuota (25).

### 1.4.1 Autosominiu recesyviu būdu paveldimas nesindrominis klausos sutrikimas ir jį lemiantys genai

Autosominiu recesyviu būdu paveldimą nesindrominį KS (DFNB) lemia abi mutavusios geno kopijos, šeimos genealogijoje ligos atvejų gali ir nebūti – sporadiniai atvejai, tačiau pastebima, jog giminingose santuokose vaikų su šiuo KS gimsta dažniau (20). DFNB paveldėjimo genealogijos pavyzdys pavaizduotas 2 paveiksle.



2 paveikslas. DFNB paveldėjimo genealogijos pavyzdys

Žmogus serga, kai abi geno kopijos yra mutavusios, o individai su vienu recesyviu aleliu – nešiojai. Dviejų nešiojų palikuonys turės 25 % tikimybę paveldėti abu patogeninius variantus ir sirgti.

Genai, kurių patogeniniai variantai lemia KS patogenezę, dalyvauja daugelyje klausos proceso ir garso perdavimo mechanizmo etapų, jų raiška vyksta įvairiose klausos organų sistemos dalyse ir įvairiais gyvenimo periodais (20). KS siejami su pakitimais didelėje grupėje genų, koduojančių skirtingų funkcijų baltymus:

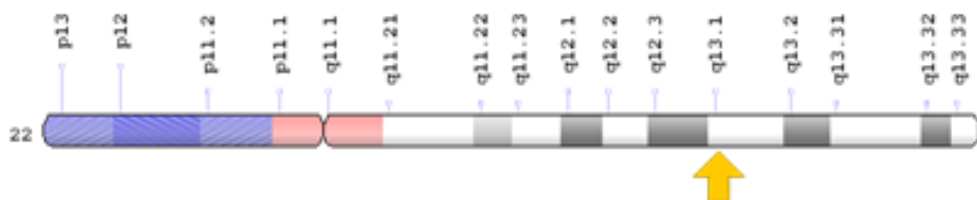
1. Transkripcijos faktorių (*ESRRB*) (28).
2. Įvairių nešiklių ir jonų kanalų, ypač K<sup>+</sup> jonų, kurių funkcija palaikyti normalią skystosios vidinės ausies terpės jonų homeostazę (*SLC26A4*) (29).

3. Sandariųjų jungčių (*CLDN14*, *TRIC*) ir tarpląstelių jungčių (*GJB2*, *GJB6*) baltymų, koduojančių genų pakitimai (15).
4. Įvairūs miozinas koduojantys genai (*MYO3A*, *MYO6*, *MYO7A*, *MYO15A*), susiję su aktino siūlų judėjimu (30).
5. Pakitimai su aktinu besijungiančiuose (*TRIOBP*) ar reikalinguose aktino siūlų prisitvirtinimui prie ląstelės membranos (*RDX*) baltymus koduojančiuose genuose pakitimai (4, 31).

Daugelyje pasaulio populiacijų sergantiems DFNB dažniausiai (apie 50 %) nustatomi *GJB2* geno patogeniniai variantai. Likusi dalis patogeninių variantų, lemianti DFNB – daugiau pavieniai pakitimai kituose genuose (32). Maždaug 85 % su liga siejamų patogeninių variantų buvo rasti baltymą koduojančioje geno srityje (egzonuose ir kirpimo vietose), nors ši dalis sudaro tikrai apie 1 % žmogaus genomo (33).

### 1.5 *TRIOBP* genas

DFNB28 srityje aptinkamas *TRIOBP* genas randamas 22-os chromosomos 22q13.1 regione (3 paveikslas). Pakitimai šiame gene siejami su autosominiu recesyviniu būdu paveldimu nesindrominiu KS (34).



3 paveikslas. *TRIOBP* geno vieta 22-oje chromosomoje (35)

#### 1.5.1 *TRIOBP* baltymas

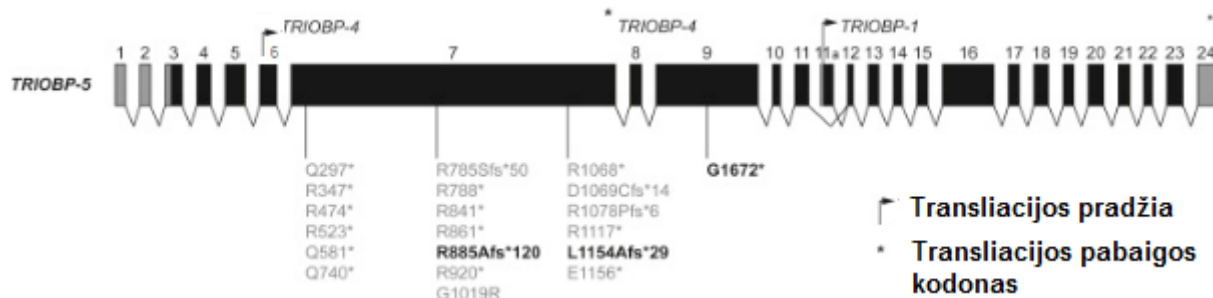
*TRIOBP* apibūdinamas kaip TRIO (angl. *triple functional domain protein*) ir prie filamentinio aktino (angl. *F-actin*) besijungiantis baltymas. TRIO – guanino nukleotido pakeitimo faktorius, gebantis keisti ląstelių funkcijų įvairovę – kartu ir aktino remodeliavimą, kuris yra svarbus ląstelių judėjimui ir augimui. Tuo tarpu, prie filamentinio aktino besijungiantis baltymas atlieka svarbų vaidmenį palaikant plaukuotųjų ląstelių stereocilijų stabilumą ir tvirtumą vidinėje ausyje (36).



Atliktais tyrimais įrodyta, kad skirtingos TRIOBP izoformos produkuojamos dviejų alternatyvių promotorių, yra svarbios stereocilijų šaknelių formavimuisi (23). TRIOBP izoformos yra suskirstytos į tam tikras tris klases (4 paveikslas):

- Pirma klasė – koduojama ilgiausio transkripto, nuo 1–ojo egzono iki 24–tojo egzono, translacijos iniciacijos vieta 3–iame egzone. Produktas – žmogaus TRIOBP–5 (~218-kDa) (NM\_001039141) baltymas.
- Antra klasė – koduojama nuo 2–ojo iki 7–ojo egzono. Translacija vyksta nuo 6–to egzono. Produkuojamas trumpesnis baltymo produktas – TRIOBP–4 (DQ228004) (~107–kDa).
- Trečia klasė – TRIOBP–1 (NM\_007032) (~72–kDa) koduojama nuo 11a egzono iki 24–tojo ir translacijos iniciacija vyksta nuo 11–to egzono (6).

Žmogaus *TRIOBP* geno struktūra, vaizduojanti tris TRIOBP transkriptų klases pavaizduota 4 paveiksle.



**4 paveikslas. Žmogaus *TRIOBP* geno struktūra, vaizduojanti tris *TRIOBP* transkriptų klases (*TRIOBP-5*, *TRIOBP-4* ir *TRIOBP-1*)**

Išvardinti 20 pokyčių, galimai sukeliančių DFNB28 kurtumą. Dauguma lokalizuojasi 7–ame egzone (6). Tokiu būdu, TRIOBP–1 ir TRIOBP–4 neturi bendrų egzonus ar amino rūgštis koduojančių sekų.

Atliktos studijos, teigia, kad TRIOBP–1 baltymas jungiasi ir stabilizuoja aktino citoskeletą HeLa<sup>1</sup> ląstelėse (37). Šio baltymo raiška būdinga visam žmogaus organizmui, tuo tarpu TRIOBP–4 ir TRIOBP–5 raiška daugiausia vyksta akies ir vidinės ausies audiniuose (4, 38). Remiantis baltymų lokalizacijos tyrimų rezultatais – TRIOBP–4 aptinkamas stereocilijos aktino siūluose (išilgai jų), o TRIOBP–5 stereocilijų šaknelėse. *In vitro* tyrimai rodo, kad TRIOBP–4 baltymas formuoja aktino siūlus į didelio tankumo ryšulius – panašius į *in vivo* stereocilijų šakneles

<sup>1</sup> Nemirtingų ląstelių linijos, ląstelių tipas, naudojamas moksliniuose tyrimuose (39).

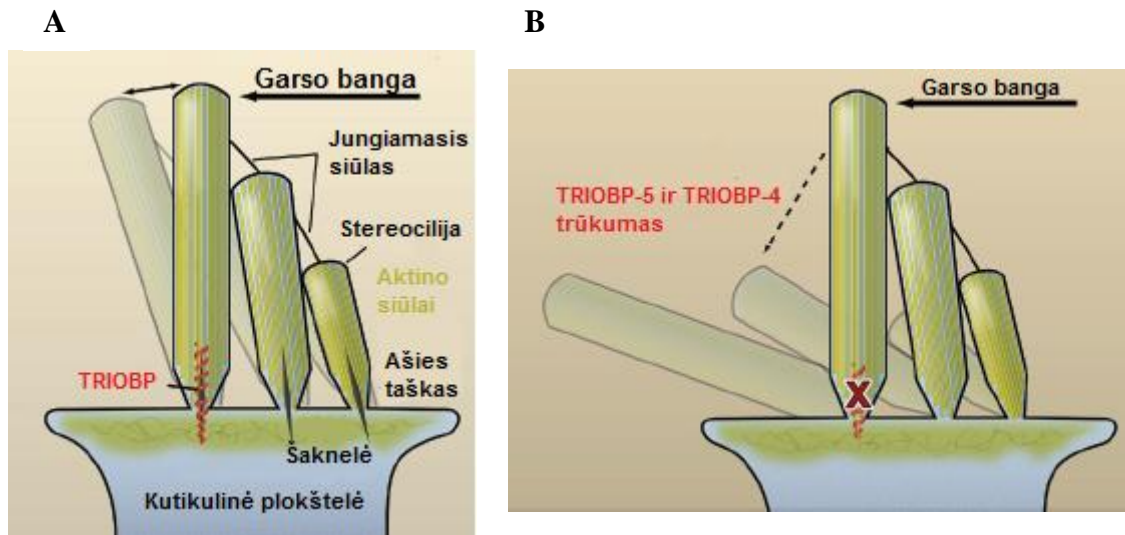
(23). Taigi, TRIOBP–4 ir TRIOBP–5 atlieka svarbų vaidmenį, kruopščiai formuojant stereocilijų šakneles ir palaikant jų struktūrą.

### 1.5.2 *TRIOBP* tyrimai modeliniuose organizmuose

Gyvūnų modeliai – neįkainojamas įrankis, studijuojant sudėtingą klausos mechanizmą. Modelinių organizmų, tokių kaip zebražuvė, viščiukas, pelė ir t.t. naudojimas, jų baltymų funkcijos supratimas, papildė žmogaus genetikos žinias daugeliu aspektų. Nustatytas didelis panašumas tarp žmogaus ir pelės vidinės ausies struktūros ir funkcijos. Dėl šios priežasties pelės organizmas buvo apibrėžtas, kaip tinkamas gyvūno modelis žmogaus KS tirti (40). Šis fenotipu paremtas modelis ne tik praturtino KS genų sąrašą, bet ir atvėrė galimybę suprasti sudėtingą baltymų mechanizmą klausos sistemoje (15).

Remiantis mokslininkų atliktais tyrimais nustatyta, kad pelės *Triobp* baltymas turi labai panašią struktūrą į žmogaus TRIOBP baltymą. Nagrinėjant paveldimo KS priežastis, kaip vienas iš taikinių buvo ištirti *Triobp* geno seką pelės organizme. Aprašytos trys *Triobp* baltymo izoformos – ilgiausia – *Triobp*–5 bei dvi trumpesnės ir nepersidengiančios – *Triobp*–4 ir *Triobp*–1. Kaip žmogaus TRIOBP–4 ir TRIOBP–5 7-to egzono, taip ir pelių – *Triobp*–4 ir *Triobp*–5 izoformos turi vienodus 8 egzono motyvus. Taip pat, nustatyta, jog pelės 8 egzonas identiškas žmogaus TRIOBP–4 ir TRIOBP–5 izoformų 7-tam egzonui, kaip jau minėta, šis egzonas ypatingas, tuo, kad dauguma literatūroje aprašytų patogeninių variantų *TRIOBP* gene, siejamos su DFNB28, buvo identifikuoti šioje genomo vietoje (4, 38).

Naudojant genų inžinerijos technologijas, norint atkartoti žmogaus DFNB28 kurtumą bei nustatyti ar TRIOBP–4 ir TRIOBP–5 izoformos yra būtinos stereocilijų šaknelių formavimuisi, buvo sukurtos mutantinės pelės (*Triobp*<sup>Δex8</sup>), stokojančios 8-to egzono sekos. Tokiu būdu yra sutrikdomas normalus stereocilijų šaknelių formavimasis, tačiau likusios stereocilijų dalies vystymasis nėra pakitęs. Stimuliuojant mutantinės pelės (*Triobp*<sup>Δex8/Δex8</sup>) stereocilijas, buvo pastebėta jog ašies taškai tapo trapūs ir nebe tokie elastingi. Tai galimai sukėlė progresyvi stereocilijos degeneracija. Dėl šios priežasties *Triobp*<sup>Δex8/Δex8</sup> pelės nuo ankstyvo amžiaus yra visiškai kurčios (6). Tai įrodo, kad TRIOBP vykdomas aktino siūlų surišimas būtinas stereocilijų šaknelių biogenezei (23).



**5 paveikslas. Stereocilių šaknelių judėjimo mechanizmas (41)**

(A) Laukinio tipo plaukuotoji ląstelė. Ją sudaro stereocilijos, išsidėsčiusios 3–4–iomis eilėmis ir sudarančios kylančių laiptų struktūrą. Kiekviena stereocilija yra užpildyta tankių aktino siūlų. TRIOBP baltymas (pavaizduotas raudonai) tvirtai jungia aktino siūlus į ryšulį, suformuojant šaknelių struktūrą. Atėjus garso bangai, stereocilijos ašies taškai padeda lanksčiai ją atlaikyti ir sugrįžti į pradinę poziciją.

(B) Mutantinės (*Triobp*<sup>Δex8/Δex8</sup>) pelės plaukuotoji ląstelė. Šios pelės organizmas stokoja TRIOBP–5 ir TRIOBP–4 baltymo izoformų, arba kitaip 8–to egzono sekos. Tai sąlygoja nesusiformavusią šaknelių struktūrą ir praradusius elastingumą ašies taškus. Plaukuotosios ląstelės nebegali atlaikyti pasikartojančių garso bangų, todėl išsivysto kurtumas.

### 1.5.3 *TRIOBP* geno tyrimų apžvalga

Tobulėjant naujos kartos sekoskaitos metodų galimybėms, vis dažniau atliekami viso genomo ar egzomo tyrimai, norint rasti DNR variantų sąsajas su tam tikromis ligomis. Vienas tokių pavyzdžių, plataus masto viso genomo studija, siekianti identifikuoti genetines sritis, siejamas su negrižtamo aklumo išsivystymu. Paskelbtoje meta-analizėje, nustatyta 20 statistiškai patikimų genolinių sričių, atsakingų už optinio nervo morfologiją, vienas iš jų *TRIOBP* genas (42). Tačiau tokio tipo studijų rezultatai reikalauja tolimesnių tyrimų, siekiant išaiškinti kandidatinių sričių įtaką ligos patogenezei.

Kiek kitokio tipo tyrimai buvo atlikti Vokietijoje, norint įrodyti TRIOBP–1 baltymo svarbą šizofrenijos patogenezei. Remiantis baltymų raiškos nerviniame audinyje rezultatais, daroma išvada, kad TRIOBP–1 baltymas yra pagrindinis monokloninių antikūnių substratas,

turintis aukštą specifiškumą netirpioms smegenų baltymų frakcijoms, sergantiems psichiatrinėmis ligomis (43).

Kaip buvo aptarta 1.5 skyriuje, viena iš priežasčių, sukeliančių autosominiu recesyviniu būdu paveldimą klausos KS, yra *TRIOBP* geno pokyčiai. Pirmieji tai aprašė *Shahin* su kolegomis (2006 m.), kai 9–iom palestiniečių šeimom nustatė dvi priešlaikinio stop kodono susidarymo (angl. *nonsense*) (rs118204026, c.1039C>T, p.Arg347Ter ir rs118204027, c.1741C>T, p.Gln581Ter) ir vieną aminorūgščių pakaitą sąlygojančius (angl. *missens*) patogeninius variantus (rs549095193, c.3055G>T, p.Gly1019Trp) (4). Šiuo metu, nustatyta apie 35 patogeninius *TRIOBP* geno variantus (34) įvairiose etninių grupių populiacijose, tokiose kaip japonų (44), kinų (45), turkų (33), amerikiečių (2), indų (38), pakistaniečių (46) ir iraniečių (47). Dauguma aprašytų variantų lokalizuojasi 7–tame geno egzone.

*TRIOBP* geno tyrimai europiečių populiacijoje atlikti visai neseniai. Mokslininkai identifikavo 3 naujus, dar literatūroje neaprašytus patogeninius variantus (c.2653del, p.Arg885Alafs\*120; c.3460\_3461del, p.Leu1154Alafs\*29 ir rs200045032, c.5014G>T, p.Gly1672Ter), vokiečių tautybės asmenims, kuriems diagnozuotas įgimtas KS. Straipsnio autorių teigimu, svarbu atkreipti dėmesį, kuriame geno egzone aptiktas variantas, kaip jis paveikia kiekvieną iš baltymo izoformų. Taip pat pabrėžia, kad svarbu kuo išsamiau ištirti sergančiųjų fenotipą (atlikti toninę audiometriją, įvertinti vestibuliarinės sistemos funkciją) ir pateikti šiuos duomenis, kadangi mokslininkai neretai pamiršta galimą genotipo-fenotipo koreliaciją (6).

## 2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

### 2.1 Tyrimo organizavimas ir eiga

Tiriamųjų kraujo bandiniai yra Vilniaus Universiteto (VU) Medicinos fakulteto (MF) Žmogaus ir medicininės genetikos katedros (ŽMGK) vykdomo mokslinio projekto „DEAFGEN“ dalis ir buvo atliktas gavus biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimą (2014–06–10 Nr.158200–14–739–225).

Tyrimo etapai:

1. *TRIOBP* geno NKS duomenų analizė;
2. Nenusekvenotų egzonų *Sanger* sekoskaita buvo atlikta VU MF ŽMGK molekulinės genetikos laboratorijoje.

## 2.2 Tiriamieji asmenys

Tiriamąją grupę sudarė 55 asmenys, sergantys paveldimu nesindrominiu KS. Tiriamieji buvo įtraukti į tyrimą gavus raštišką jų sutikimą.

## 2.3 Tyrimo objektas ir metodai

Tyrimo objektas – tiriamųjų asmenų DNR išgryninta iš periferinio kraujo leukocitų.

### 2.3.1 DNR gryninimas iš kraujo

DNR buvo išgryninta Viešosios įstaigos (VŠĮ) Vilniaus Universiteto ligoninės (VUL) Santaros klinikų Medicininės genetikos centro darbuotojų fenolio-chloroformo metodu pagal patvirtintą darbo protokolą.

### 2.3.2 DNR koncentracijos ir švarumo įvertinimas spektrofotometru

DNR koncentracijos matavimas ir švarumo įvertinimas ultravioletinių spindulių (UV) absorbcijos būdu buvo atliktas bekiuvečiu *NanoDrop ND 1000* spektrofotometru („Thermo Scientific“, JAV).

DNR mėginiai buvo tiriami spektrofotometru 260 nm ir 280 nm ilgio bangomis. Optinių tankių 260 nm/280 nm santykis rodo DNR mėginių švarumą. Jei jis svyruoja tarp 1,8–2,0 – tirpale nėra baltymų priemaišų.

Paruošti DNR darbiniai mėginiai (100 ng/μl) iki tyrimų saugoti –20 °C temperatūroje.

### 2.3.3 Pradmenų kūrimas

Siekiant pagausinti koduojančias *TRIOBP* geno sritis ir atlikti tolimesnius tyrimo etapus, pirmiausia buvo sukurti pradmenys. Naudonant referentinę *TRIOBP* geno koduojančią seką, gautą iš *Ensembl* duomenų bazės ir *Primer-BLAST* programą. Nenuosekvenuotiems NKS geno egzonams buvo sukurtos 9–ios pradmenų poros. Kadangi 7 egzonas yra labai ilgas – sudarytas iš 3 319 bazių

porų (bp), jis buvo padalintas į penkis trumpesnius amplikonus (7–1, 7–2, 7–3, 7–4, 7–5). Pradmenų sekos, gausinamų fragmentų ilgiai ir pradmenų prilydimo temperatūros pateikiami 1-oje lentelėje.

Kuriant pradmenis buvo laikomasi pagrindinių pradmenų kūrimo kriterijų – pradmenų ilgis svyruoja tarp 20–25 nukleotidų ilgio, pradmenų lydymosi temperatūra apie 58–60°C, o bendras guanino ir citozino nukleotidų porų kiekis tiriamojoje sekoje yra 40–60 %.

**1 Lentelė. Sukurti *TRIOBP* geno pradmenys**

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka	T <sub>m</sub> , (°C)	Fragmento ilgis, (bp)
<i>TRIOBP_7-1F</i>	TCAGCCTTGGTCAGAGAGGT	60,18	746
<i>TRIOBP_7-1R</i>	CTGGAATTCTCTCGTTGAGTGG	61,06	
<i>TRIOBP_7-2F</i>	CCTACTTGTACTCCCCAGCG	59,54	840
<i>TRIOBP_7-2R</i>	GGGGCTGTCTTGTGGGT	59,48	
<i>TRIOBP_7-3F</i>	CCAGAGCCTCCAGAACCTCC	61,62	871
<i>TRIOBP_7-3R</i>	TGGGGAGATGAATTCCTGGG	58,77	
<i>TRIOBP_7-4F</i>	GACCGCACACAGTCCTTTTTC	59,41	852
<i>TRIOBP_7-4R</i>	TAAGAGGGAAGGCTCTGGGG	60,33	
<i>TRIOBP_7-5F</i>	CGAGCATCAGTGTGAGTCCC	60,46	735
<i>TRIOBP_7-5R</i>	AACCCITCACCTGTCCTGCT	61,06	
<i>TRIOBP_8F</i>	TGTCCACATCTCCTCCTGT	59,88	309
<i>TRIOBP_8R</i>	GACCTTCCTGTCCAAGCCC	60,03	
<i>TRIOBP_9F</i>	TTGACTCTCTGGGGGCCTAA	59,88	1293
<i>TRIOBP_9R</i>	GTTTGGTGATCGGGATGGGT	60,03	
<i>TRIOBP_16F</i>	CAAGAGGTGGAGCTGGGATG	60,11	799
<i>TRIOBP_16R</i>	GTGCAAGACAAATGCCAGGG	60,04	
<i>TRIOBP_17F</i>	GCTGCTTGCCCTTCTCAAAC	60,04	388
<i>TRIOBP_17R</i>	TCAAATGCCCCACACAGGTT	60,11	

T<sub>m</sub> – pradmens lydymosi temperatūra

### 2.3.4 Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

Norint nustatyti *TRIOBP* koduojančią seką – atliekama PGR, gausinant pasirinktus fragmentus. Pirmiausiai buvo optimizuojamos PGR sąlygos, sukurtoms pradmenų poroms. 2 lentelėje pateikiami PGR etapai ir sąlygos jas optimizavus.

2 lentelė. PGR etapai ir sąlygos

Etapas	Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija	94 °C *7-5 – 95 °C	4 min **7-5 – 10 min	1
Denatūracija	94 °C *7-5 – 95 °C	45 s **7-5 – 1 min	30  ***7-5 – 35
Pradmenų prilydimas	*7-1 – 55 °C *7-2 – 56 °C *7-3 – 57 °C *7-4 – 58 °C *7-5 – 64 °C; -0,2 °C kiekviename cikle *8 – 58 °C *9 – 55 °C *16 – 55 °C *17 – 58 °C	45 s	
Sintezė	72 °C	**7-1 – 45 s **7-2 – 1 min **7-3 – 1 min **7-4 – 1 min **7-5 – 1 min 20 s **8 – 45 s **9 – 1 min **16 – 1 min **17 – 45 s	
Papildoma sintezė	72 °C	10 min **7-5 – 7 min	1
Pabaiga	4 °C	→ ∞	1

\* – Reakcijos temperatūros atitinkamai pradmenų porai; \*\* – Etapų trukmės atitinkamai pradmenų porai; \*\*\* – Reakcijos ciklų skaičius atitinkamai pradmenų porai.

#### Metodo atlikimo eiga:

- Mėginiai ruošiami traukos spintoje, naudojant UV šviesą, paviršius nuvalomas 70° etanolio tirpalu.
- PGR reakcijos komponentai, nurodyti 3 lentelėje, išimami iš -20°C ir atšildomi kambario temperatūroje. Atšilus, prieš naudojant supurtomi, sumaišomi – centrifuguojant ir laikomi šaldomajame stovelyje.
- Gaminamas tirpalas pagal 4 lentelėje pateiktą protokolą. PGR mišinio kiekis (n+1, n – pavyzdžių skaičius) paruošiamas 0,5 ml talpos mėgintuvėlyje, laikytame šaldomajame stovelyje. Reakcijos mišinys supurtomas ir centrifuguojamas.
- PGR reakcijos mišinys perkeliamas po 24 μl į 0,2 ml talpos mėgintuvėlius ir įnešama po 1 μl tiriamosios genomines DNR. Į vieną mėgintuvėlį įnešama neigiama kontrolė (K) – vietoje

DNR pridedamas 1 µl vandens. Mėgintuvėliai supurtomi, centrifuguojami, sudedami į termociklerį.

5. Termociklerio *Mastercycler pro Vapo.protect* („Eppendorf AG“, Vokietija) programoje nustatomos reakcijos sąlygos, kurios nurodytos 2 lentelėje.
6. Po reakcijos mėginiai laikomi +4 °C temperatūroje.

**3 lentelė. Reagentai ir techninės priemonės skirtos PGR metodui**

Reakcijos komponentai	Techninės priemonės
Vanduo be nukleazių („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva)	Automatinės pipetės 0,5–1000 µl
Deoksিনukleotidtrifosfatų (dNTP) mišinys 2M („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva)	Sterilūs mėgintuvėliai 0,2–0,5 ml
10X PGR buferis + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva)	Sterilūs antgaliai 0,5–1000 µl
Magnio chlorido (MgCl <sub>2</sub> ) tirpalas („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva)	Šaldomasis stovėlis
Tiesioginis (angl. <i>Forward</i> ) pradmuo („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva)	Purtyklė <i>Vortex-T Genie 2</i> („Scientific Industries“, JAV)
Atvirkštinis (angl. <i>Reverse</i> ) pradmuo („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva)	Mikrocentrifugos 0,2 ir 0,5 ml mėgintuvėliams („Carl Roth GmbH+ Co.KG“, Taivanas)
Dimetilsulfoksidas (DMSO) („Carl Roth GmbH+ Co.KG, Vokietija“)	Termocikleris <i>Mastercycler pro vapo protect</i> („Eppendorf AG“, Vokietija)
<i>Taq</i> polimerazė („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva)	Traukos spinta

**4 lentelė. PGR mišinio sudėtinės dalys *TRIOBP* geno egzonų amplifikacijai**

Reagentas	Tūris, µl (vienam mėginiui)	Tūris, µl (vienam mėginiui)	Tūris, µl (vienam mėginiui)
<b>Pradmenų pora</b>	<b>7–1</b>	<b>7–5, 8, 9, 16, 17</b>	<b>7–2, 7–3, 7–4</b>
Dejonizuotas vanduo	15,4	14,4	13,4
dNTP	2,5	2,5	2,5
10x PGR buferis + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5	2,5	2,5
10x PGR buferis + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> tirpalas	1,5	1,5	1,5
Tiesioginis pradmuo	1,0	1,0	1,0
Atvirkštinis pradmuo	1,0	1,0	1,0
DMSO	0	1,0	2,0
<i>Taq</i> polimerazė	0,1	0,1	0,1
<b>Viso:</b>	<b>24,0</b>	<b>24,0</b>	<b>24,0</b>



### 2.3.5 Horizontalioji agarozės gelio elektroforezė

Atlikus PGR, reakcijos produktas tikrinamas vykdant elektroforezę 1,5 % agarozės gelyje, siekiant įvertinti jo specifiskumą, kiekį ir ilgį. Horizontaliajai agarozės gelio elektroforezei atlikti reikalingi reagentai, cheminės medžiagos ir techninės priemonės išvardintos 5 lentelėje.

**5 lentelė. Agarozės gelio elektroforezės metodui reikalingos medžiagos ir techninės priemonės**

Reagentai ir cheminės medžiagos	Techninės priemonės
Agarozės milteliai („Lonza Group Ltd“, JAV)	Stiklinė kolba
Etidžio bromidas („Carl Roth GmbH + Co.KG“, Vokietija)	Mikrobangų krosnelė
1X TBE buferis (0,09M Tris-borato, 0,002M etilendiamino tetraacetatas (EDTA)) („Carl Roth GmbH + Co.KG“, Vokietija)	Gelio liejimo rėmelis, šukutės, parafino juostelė
3x įvedimo dažas, (angl. 3x DNA Loading Dye) („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva)	Automatinės pipetės ir antgaliai 0,5 µl – 10 µl
Molekulinės DNR masės ir ilgio standartas 100 bp (angl. <i>GeneRuler™ 100bp DNA Ladder</i> ) („Thermo Fisher Scientific“, Lietuva)	Horizontali gelio elektroforezės sistema <i>EC Midicell Primo EC-330</i> („E-C Apparatus Corp.“, JAV)
Pagausintas PGR produktas	UV transiliuminatorius <i>UVT-28 ME</i> („Herolab GmbH“, Vokietija)

#### Metodo atlikimo eiga:

1. Paruošiama forma elektroforezės geliui, įdedamos šukutės, kurios suformuos takelius.
2. Stiklinėje kolboje paruošiamas 1,5 % agarozės tirpalas, agarozės miltelius (1,5 g) užpylus 100 ml 1x TBE buferiu.
3. Agarozė tirpinama kaitinant mikrobangų krosnelėje. Tirpalui atvėsus iki 60 °C temperatūros, įpilama 2 µl etidžio bromido tirpalo.
4. Agarozės tirpalas pilamas į paruoštą formą ir paliekamas sustingti kambarioje temperatūroje apie 30 min.
5. Geliui sustingus, atsargiai ištraukiamos šukutės, jis perkeliamas į horizontalios elektroforezės sistemą, pripildyta 1x TBE buferio.
6. Ant parafino juostelės sumaišoma 2 µl įvedimo dažo su 4 µl PGR produkto ir automatine pipete leidžiami į suformuotus gelio šulinėlius.
7. Į pirmąjį šulinėlį leidžiamas DNR molekulinės masės ir dydžio standartas, o į paskutiniąjį – neigiamos kontrolės mėginys (K), sumaišytas su įvedimo dažu.
8. Elektroforezės sistema uždengiama, prijungiamas srovės šaltinis. Nustatoma 120 V įtampa ir vykdoma 20 min.

- Pasibaigus elektroforezei, gelis vizualizuojamas, naudojant UV transiliuminatorių. Gelis analizuojamas kompiuterine programa *Gel Capture*, fotografuojamas, ir vertinami gauti rezultatai.

### 2.3.6 PGR produkto valymas egzozonukleazėmis (Exo-SAP reakcija)

Prieš atliekant sekoskaitą, PGR produktas fermentų pagalba turi būti išvalomas nuo nepanaudotų pradmenų ir dNTP pertekliaus.

#### Metodo atlikimo eiga:

- Gaminamas Exo-SAP reakcijos mišinys, pagal 6 lentelėje pateiktą protokolą, 0,5 ml talpos mėgintuvėlyje. Mišinys supurtomas ir centrifuguojamas.
- Į 0,2 ml talpos mėgintuvėlius po 2 µl supilstomas Exo-SAP reakcijos mišinys.
- Į kiekvieną mėgintuvėlį su mišiniu įdedama po 5 µl PGR produkto. Mėgintuvėliai supurtomi, centrifuguojami ir sudedami į termociklerį.
- Termociklerio *Mastercycler pro Vapo.protect* („Eppendorf AG“, Vokietija) programoje nustatomos reakcijos sąlygos, kurios nurodytos 7 lentelėje.
- Po reakcijos mėginiai laikomi +4 °C temperatūroje.

6 lentelė. *Exo-SAP mišinio sudėtinės dalys*

Exo-SAP reakcijos komponentai	Tūris, µl (vieno mėginio)
TE buferis (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), („AppliChem GmbH“, Vokietija)	1,80
Krevečių šarminė fosfatazė (SAP) („Thermo Fisher Scientific Baltics“, Lietuva)	0,15
Egzozonukleazė I (ExoI) („Thermo Fisher Scientific Baltics“, Lietuva)	0,05
<b>Bendras mišinio tūris</b>	<b>2,00</b>

7 lentelė. *PGR produkto valymo Exo-SAP mišiniu reakcijos etapai ir sąlygos*

Valymo Exo-SAP etapai	Temperatūra, °C	Trukmė
1. Inkubacija	37	40 min
2. ExoI-SAP inaktyvacija	80	20 min
3. Pabaiga	4	→ ∞

### 2.3.7 Ciklinė sekoskaitos PGR

Vykdoma ciklinė sekoskaitos PGR, kuri paremta terminuojančių fluoroforais žymėtų dideoksinukleotidtrifosfatų (ddNTP) naudojimu, kuriems prisijungus prie amplifikuojamos grandinės, tolesnis fragmento ilgėjimas nevyksta. Reakcijos metu sintetinant DNR grandinę, be įprastų dNTP įjungiami skirtingi ddNTP su skirtingomis fluorescuojančiomis žymėmis, kurios, sužadintos lazerio, skleidžia skirtingų bangos ilgių šviesą.

#### Metodo atlikimo eiga:

1. Sekoskaitos PGR mišinys, pagal 8 lentelėje pateiktą protokolą, 0,5 ml talpos mėgintuvėlyje. Mišinys supurtomas ir nucentrifuguojamas.
2. Į 0,2 ml talpos mėgintuvėlius įpilama po 5 µl mišinio.
3. Į kiekvieną mėgintuvėlį su mišiniu įdedama po 2 µl išvalyto PGR produkto. Mėgintuvėliai supurtomi, nucentrifuguojami ir sudedami į termociklerį.
4. Termociklerio *Mastercycler pro Vapo.protect* programoje nustatomos reakcijos sąlygos, kurios nurodytos 9 lentelėje.

8 lentelė. Sekoskaitos PGR mišinio sudėtinės dalys

Sekoskaitos reakcijos mišinys	Tūris, µl (vieno mėginiui)
Dejonizuotas vanduo	3,15
5X sekoskaitos buferis <i>Big Dye® terminator</i> („Applied Biosystems™“, JAV)	1,40
Terminacijos mišinys <i>BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i> („Applied Biosystems™“, JAV)	0,25
Pradmuo (tiesioginis arba atvirkštinis)	0,20
<b>Bendras mišinio tūris</b>	<b>5,00</b>

9 lentelė. Sekoskaitos PGR etapai ir sąlygos

Ciklas	Temperatūra (°C)	Trukmė (s)	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija	96	60	1
Denatūracija	96	11	48
Pradmens prilydimas	52	11	
Sintezė	60	240	
Pabaiga	4	∞	1

### 2.3.8 Sekoskaitos reakcijos produkto valymas etanoliu ir natrio acetatu

Valymas atliekamas naudojant druskų išsodinimo metodą. Šis etapas reikalingas, norint išvalyti mėginius nuo likusių neprisijungusių pradmenų ir fluorescuojančių ddNTP.

#### Metodo atlikimo eiga:

1. Į 1,5 ml tūrio mėgintuvėlį paruošiamas valymui skirtas mišinys, pagal 10 lentelėje pateiktą protokolą. Mišinys supurtomas ir nucentrifuguojamas.
2. Mišinys išpilstomas po 80 µl į 0,5 ml mėgintuvėlius su sekoskaitos reakcijos produktu.
3. Mėgintuvėliai inkubuojami 10 min tamsoje, kambarioje temperatūroje.
4. Po inkubacijos centrifuguojama 5 min 13 000 aps/min.
5. Supernatantas nupilamas, mėgintuvėliai greitai ir kruopščiai išpurtomi ant rankšluostinio popieriaus.
6. Į išpurtytus mėgintuvėlius pilama po 300 µl 70 % šalto etanolio. Purtoma 2 min.
7. Centrifuguojama 5 min 13 000 aps/min.
8. Supernatantas nupilamas, mėgintuvėliai greitai ir kruopščiai išpurtomi ant rankšluostinio popieriaus.
9. Mėginiai 5 min džiovinami 37 °C temperatūroje.
10. Iki atliekant tolimesnius žingsnius mėginiai laikomi –20 °C temperatūroje.

10 lentelė. Valymo etanoliu ir natrio acetatu mišinio protokolas

Valymo etanoliu ir natrio acetatu mišinys	Tūris, µl (vieno mėginio)
3M natrio acetatas („Applichem GmbH“, Vokietija)	3,0
96 % etanolis (AB „Vilniaus degtinė“, Lietuva)	62,5
Dejonizuotas vanduo	14,5
<b>Bendras mišinio tūris</b>	<b>80,0</b>

### 2.3.9 Tiesioginės nukleotidų sekos nustatymas frakcionuojant automatizuotos kapiliarinės elektroforezės metodu

Kapiliarinės elektroforezės pagalba, yra nustatomos tiesioginės viengrandžių DNR fragmentų sekos. Optinis detektorius fiksuoja fluorochromu žymėto ddNTP skleidžiamą šviesos bangos ilgį.

### Metodo atlikimo eiga:

1. Mėgintuvėliai, su išvalytais sausais mėginiais yra užpilami 8μl formamido („Thermo Fisher Scientific Baltics“, Lietuva), supipetuojami ir perkelti į sekoskaitos plokštelę.
2. Plokštelė centrifuguojama 1 minutę 1500 aps/min greičiu.
3. Sekoskaitos plokštelė su mėginiais dedama į genetinį analizatorių *3130xl Genetic Analyzer* („Applied Biosystems™“, JAV), *3130xl Data Collection v3.0* kompiuterinėje programoje sukuriama plokštelės analizės protokolas:

➤ Plokštelės analizės protokolo ruošimo vadovo (*Plate manager*) skiltyje, pasirenkama *New*, nurodomas:

- Analizės pavadinimas;
- Analizės taikymas (*Application*) – *Sequencing Analysis*;
- Plokštelės tipas (*Plate type*) – 96-Well;
- Atlikimo vieta (*Owner*) – MGC;
- Tyrėjas (*Operator*) – MS.

Įvedus reikiamą informaciją, spaudžiama *OK*.

➤ Atsidariusiame lange *Sequencing Analysis Plate Manager Editor*, nurodomas:

- Mėginio pavadinimas (*Sample Name*) – pvz. *TRIOBP\_9F\_1*
- Rezultatų grupė (*Results group 1*) – *Ausra*;
- Instrumento operacijų protokolas (*Instrument Protocol 1*) – *SEQ\_STD*;
- Analizės protokolas (*Analysis Protocol 1*) – *3130POP7\_BDTv3-KB-Denovo\_v5.2*.

Pasirinkus reikiamą informaciją, spaudžiama *OK*.

- Skiltyje *Run Scheduler* paspaudus *Find all* surandamas sukurtas plokštelės analizės protokolas, jis susiejamas su analizatoriumi naudojant *Link* funkciją.
- Paspaudus *Run* pradedama vykdyti kapiliarinė elektroforezė.

## 2.4 Duomenų analizės metodai

Po kapiliarinės elektroforezės duomenys apdorojami pasitelkus kompiuterinę programą *Sequencing Analysis 5.2* („Applied biosystems™, Life technologies“, JAV). Elektroforegramos vertinamos su laisvos prieigos *Chromas lite 2.1* („Technelysium Pty Ltd“) kompiuterine programa. Nusekvenuotos sekos lyginamos su referentine seka (naudojama *Ensembl* duomenų bazėje

pateikiama *TRIOBP* geno seka (*Ensembl release 87 - Dec 2016 © EMBL-EBI*) naudojant internetinę programą *Cell Biology Unit Web Server. Sequence Alignment: Align*.

NKS duomenys analizuoti pasitelkiant integruotą genomo vaizduoklę (IGV, angl. *The Integrative Genomics Viewer*) (48).

Norint nustatyti galimą variantų įtaką koduojam baltymui, atlikta bioinformacinė analizė, naudoti anotaciniai įrankiai: *PolyPhen-2* (angl. *Polymorphism Phenotyping v2*), *SIFT* (angl. *Sorting Intolerant from Tolerant*) ir *MutationTaster*. Taip pat duomenų bazės: *Deafness variation database*, *National Center for Biotechnology Information*, *Ensembl* ir *The human gene mutations database*.

Statistinė duomenų analizė ir grafinis rezultatų atvaizdavimas atliktas naudojant „*Microsoft Office 2016*“ „*Excel*“ programą ir laisvos preigos skaičiuoklę *GraphPad*. Nustatyti *TRIOBP* geno variantų genotipų ir alelių dažniai apskaičiuoti pagal Hardžio-Veinbergo (angl. *Hardy-Weinberg*) pusiausvyrą. Identifikuotų genotipų pasiskirstymo, alelių dažnių bei statistinio patikimumo parametrams (reikšmingumo lygmuo  $p < 0,05$ ) apskaičiuoti taikytas Pirsono (angl. *Pearson*) Chi kvadrato ( $\chi^2$ ) testas.

### 3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1 Nustatyti *TRIOBP* geno koduojančios sekos variantai

Šio tyrimo metu naujos kartos ir *Sanger* sekoskaitos metodais buvo nusekvenuota koduojanti *TRIOBP* geno sritis 55 tiriamiesiems, sergantiems nesindrominiu KS. Nustatyti 24 *TRIOBP* geno koduojančios sekos variantai: 7 iš jų sinoniminės (angl. *synonymous*) pakaitos – nekeičiančios aminorūgšties, 15 aminorūgščių pakaitą sąlygojančių variantų, 1 trijų nukleotidų delecija ir 1 pakaita, lemianti priešlaikinio stop kodono susidarymą. 19 iš jų *ClinVar* ir *Deafness variation database* duomenų bazėse pateikiami kaip nepatogeniniai, 1 – galimai nepatogeninis, o 4 – kaip neaiškios klinikinės reikšmės.

Vienas iš nustatytų variantų (rs200045032, c.5014G>T, p.Gly1672Ter) esantis 9-tame geno egzone, literatūroje aprašytas kaip patogeninis ir susijęs su nesindrominiu KS. Autoriai variantą laiko ligą sukeliančiu dėl: 1) Priešlaikinio stop kodono susidarymo – tai žalingas veiksnys baltymo struktūrai; 2) Labai žemo retojo alelio dažnio populiacijose; 3) Jis yra *trans* padėtyje; 4) Buvo nustatytas kitiems šeimos nariams. Tai vienintelis identifikuotas patogeninis variantas, kuris nepaveikia *TRIOBP-4*, o paveikia tik *TRIOBP-5*. Tai reiškia, jog tik vienos geno kopijos nepakanka koduoti laukiniam *TRIOBP-4* baltymo tipui ir formuoti normalias stereocilijų

šaknelės. Taip pat reikalinga mažiausiai viena geno kopija koduoti laukiniam TRIOBP–5 baltymo tipui ir išsivystyti sveikai klausos sistemai. Tai atitinka su skirtingų TRIOBP baltymo izoformų išsidėstymu ląstelėje: TRIOBP–4 randamas per visa stereocilijos ilgį, kai TRIOBP–5 – tik stereocilijos šaknelėse (6).

Identifikuoti variantai, jų lokalizacija gene, retojo alelio dažniai (MAF, angl. *minor allele frequency*) ir variantų klinikinė reikšmė pateikti 11 lentelėje.

**11 lentelė. Tiriamojoje grupėje nustatyti TRIOBP koduojančios sekos variantai, jų identifikaciniai numeriai, TRIOBP geno egzonas, MAF ir variantų klinikinė reikšmė**

Nr.	Variantas ir jo identifikacinis numeris*	TRIOBP egzonas	MAF**	Klinikinė reikšmė
1.	<u>rs12628603</u> c.650G>A, p.Ser217Asn	7	G=0,473	Nepatogeninis <sup>1</sup>
2.	<u>rs116964444</u> , c.1158C>T, p.Asp386=		T=0,0048	Nepatogeninis <sup>1</sup>
3.	<u>rs67890459</u> c.1192_1194delCAA, p.Gln398del		- =0,3363	Nepatogeninis <sup>1</sup>
4.	<u>rs75659869</u> c.1306G>A, p.Asp436Asn		A=0,0248	Nepatogeninis <sup>1</sup>
5.	<u>rs35105846</u> c.1331G>A, p.Ser444Asn		A=0,00004	Galimai nepatogeninis <sup>1</sup>
6.	<u>rs79945262</u> c.1740C>A, p.Ala580=		A=0,058	Nepatogeninis <sup>1,2</sup>
7.	<u>rs142024473</u> c.1979C>T, p.Ala660Val		T=0,048	Nepatogeninis <sup>1</sup>
8.	<u>rs41302575</u> c.2450C>G, p.Thr817Ser		G=0,0577	Nepatogeninis <sup>1</sup>
9.	<u>rs41296243</u> c.2477C>T, p.Ser826Leu		T=0,0070	Nepatogeninis <sup>1</sup>
10.	<u>rs778331588</u> c.2555A>T, p.Asp852Val		T= 0,00008	Neaiškios klinikinės reikšmės <sup>1,2</sup>
11.	<u>rs9610841</u> c.2589C>A, p.Asn863Lys		A=0,3363	Nepatogeninis <sup>1</sup>
12.	<u>rs193043234</u> c.3089C>G, p.Pro1030Arg		G=0,0036	Nepatogeninis <sup>1</sup>
13.	<u>rs200359708</u> c.3232C>T, p.Arg1078Cys		T=0,0012	Nepatogeninis <sup>1,2</sup>
14.	<u>rs5756795</u> c.3559T>C, p.Phe1187Leu		C=0,34	Nepatogeninis <sup>1</sup>
15.	<u>rs739137</u> c.3885T>C, p.Ser1295=		T=0,34	Nepatogeninis <sup>1,2</sup>
16.	<u>rs739138</u> c.3899A>G, p.His1300Arg		A=0,4	Nepatogeninis <sup>1,2</sup>
17.	<u>rs7284476</u> c.3975G>A, p.Gln1325=	8	A=0,3373	Nepatogeninis <sup>1,2</sup>

### 11 lentelės tęsinys.

Nr.	Variantas ir jo identifikacinis numeris*	TRIOBP egzonas	MAF**	Klinikinė reikšmė
18.	<u>rs771996937</u> c.3978C>A, p.Ala1326=	8	A=0,00002	Neaiškios klinikinės reikšmės <sup>1</sup>
19.	<u>rs8140207</u> c.4116G>T, p.Glu1372Asp	9	T=0,2640	Nepatogeninis <sup>1,2</sup>
20.	<u>rs8140958</u> c.4129T>C, p.Trp1377Arg		T=0,0347	Nepatogeninis <sup>1,2</sup>
21.	<u>rs751575180</u> c.4160G>A, p.Arg1387Gln		A=0,00004	Neaiškios klinikinės reikšmės <sup>1</sup>
22.	<u>rs200045032</u> c.5014G>T, p.Gly1672Ter		T= 0,00019	Neaiškios klinikinės reikšmės <sup>1,2</sup>
23.	<u>rs11704996</u> c.5550G>A, p.Val1850=	14	A=0,040	Nepatogeninis <sup>2</sup>
24.	<u>rs4821708</u> c.6498C>T, p.Tyr2166=	19	T= 0,265	Nepatogeninis <sup>2</sup>

\*NM\_001039141.2, NP\_001034230.1; \*\*MAF (angl. *minor allele frequency*) – retojo alelio dažnis, remiantis 1000 genome projekto ir ExAC (angl. *The Exome Aggregation Consortium*) duomenimis; n – tiriamųjų skaičius; NI – nėra informacijos; <sup>1</sup> – remiantis *Deafness variation database* duomenų bazės duomenimis; <sup>2</sup> – remiantis *ClinVar* duomenų bazės duomenimis.

### 3.2 Nustatytų *TRIOBP* geno koduojančios sekos variantų bioinformacinė analizė

Visi identifikuoti koduojančios sekos variantai, kurių pokytis sąlygoja aminorūgščių pakaitą, buvo tikrinami *SIFT*, *PolyPhen-2* ir *MutationTaster* anotaciniais įrankiais.

Įvertinus visų identifikuotų *TRIOBP* geno koduojančios sekos variantų įtaką koduojamam baltymui, nustatyti du variantai, galimai patogeniškai veikiantys baltymo struktūrą:

1. rs200359708 – visi trys anotacinių įrankių įverčiai nurodo, kad pakaita neigiamai veikia koduojamo baltymo struktūrą. *ClinVar* duomenų bazėje variantas pateikiamas, kaip nepatogeninis. Remiantis *American College of Medical Genetics* nustatytų sekos variantų interpretacijos standartais ir rekomendacijomis (49), variantas buvo vertinamas atsižvelgiant į tam tikrus kriterijus ir priskiriamas kategorijai, atspindinčiai patogeniškumo arba nepatogeniškumo laipsnį. Šiuo atveju – variantas rs200359708 laikomas, kaip galimai nepatogeninis (atitiko du patvirtinamosios (angl. *supporting*) kategorijos kriterijus).
2. rs200045032 – įvertintas, kaip lemiantis ligą, pasitelkus tik vieną iš anotacinių įrankių (*MutationTaster*), dėl kitų įrankių duomenų stokos. Kaip jau minėta 3.1 skyriuje, šis variantas taip pat identifikuotas Vokietijos mokslininkų, KS turintiems žmonėms. Atlikus bioinformacinę analizę – variantas įvertintas kaip patogeninis (6).



12 lentelėje pateikti, tie variantai ir jų įverčiai, kurių bent 1 iš 3 yra apibrėžiamas, kaip neigiamai veikiantis baltymo struktūrą, naudojant minėtus anotacinius įrankius.

**12 lentelė. SIFT, PolyPhen-2 ir MutationTaster anotacinių įrankių įverčių reikšmės identifikuotiems *TRIOBP* geno variantams**

Nr.	Identifikacinis nr.	SIFT	Polyphen-2	MutationTaster
1.	rs12628603	0 (D)	0,384 (B)	0,999 (P)
8.	rs41302575	0,13 (T)	0,798 (PD)	0,999 (P)
9.	rs41296243	0,002 (D)	0,063 (B)	0,999 (P)
10.	rs778331588	0 (D)	0,838 (PD)	0,999 (P)
12.	rs193043234	0 (D)	1 (PRD)	0,955 (P)
13.	rs200359708	0 (D)	1 (PRD)	0,987 (DC)
14.	rs5756795	0 (D)	0,006 (B)	0,998 (P)
21.	rs751575180	0,003 (D)	0,287 (B)	0,999(P)
22.	rs200045032	-	-	1 (DC)

Nr. atitinka variantų identifikacinius nr. pateiktus 11 lentelėje. D (angl. *damaging*) – žalingas; B (angl. *benign*) – nepatogeninis; P (angl. *polymorphism*) – nežalingas; T (angl. *tolerated*) – toleruotinas; PD (angl. *possibly damaging*) – galimai žalingas; PRD (angl. *probably damaging*) – tikriausiai žalingas; DC (angl. *disease causing*) – lemiantis ligą.

### 3.3 Nustatytų *TRIOBP* geno variantų paplitimas Lietuvos populiacijos tiriamųjų, sergančių klausos sutrikimu, grupėje

Apskaičiuojami nustatytų variantų santykiniai genotipų ir alelių dažniai. Tarp nustatytų variantų, didžiausią dažnį (0,727) turėjo variantas rs8140958 ir jo alelis C. Toliau atliekant tyrimą buvo nustatyta, kad šis variantas yra nepusiausvyroje pagal Hardžio-Veinbergo dėsnį.

Taip pat didelis dažnis (0,7) tiriamojame grupėje nustatytas variantui rs739138 ir jo aleliui G. 7–iems asmenims nustatyti heterozigotiniai genotipai, o 35–iems alternatyvaus alelio homozigotiniai genotipai. Šis variantas taip pat neatitiko Hardžio-Veinbergo dėsnio.

Nustatyti 3 rečiausi variantai: rs778331588 (c.2555A>T), rs771996937 (c.3978C>A) ir rs200045032 (c.5014G>T). Kiekvieno iš variantų, heterozigotinį genotipą turi po vieną tiriamąjį (alternatyvaus alelio dažnis lygus 0,009), o alternatyvaus alelio homozigotinis genotipas neužfiksuotas nei vienam iš tiriamųjų. Lyginant šių variantų alelių dažnius su retojo alelių dažniais kitose populiacijose (pateiktais 11 lentelėje) – taip pat stebimas mažas retojo alelio dažnis (<0,01).

Apskaičiuoti identifikuotų *TRIOBP* geno variantų genotipų ir alelių dažniai pateikti 13 lentelėje, o 6 paveikslas vaizduoja alternatyvių alelių dažnių paplitimą nustatytuose *TRIOBP* geno variantuose tiriamojame grupėje.

13 lentelė. Identifikuotų *TRIOBP* geno variantų genotipų ir alelių dažniai tiriamojoje grupėje

Nr.	Varianto identifikacinis nr.	Genotipas*	GD	SGD	Aleliai	AD	SAD
1.	rs12628603	c.[650G=];[650G=] p.[(Ser217=)];[(Ser217=)]	23	0,418	G	65	0,591
		c.[650G>A];[650G=] p.[(Ser217Asn)];[(Ser217=)]	19	0,346			
		c.[650G>A];[(650G>A)] p.[(Ser217Asn)];[(Ser217Asn)]	13	0,236	A	45	0,409
2.	rs116964444	c.[1158C=];[1158C=] p.[(Asp386=)];[(Asp386=)]	52	0,945	C	107	0,973
		c.[1158C>T];[1158C=] p.[(Asp386=)];[(Asp386=)]	3	0,055			
		c.[1158C>T];[(1158C>T)] p.[(Asp386=)];[(Asp386=)]	0	0	T	3	0,027
3.	rs67890459	c.[1192_1194CAA=];[1192_1194CAA=] p.[(Gln398=)];[(Gln398=)]	28	0,509	CAA	72	0,655
		c.[1192_1194delCAA];[1192_1194CAA=] p.[(Gln398del)];[(Gln398=)]	16	0,291			
		c.[1192_1194delCAA];[1192_1194delCAA] p.[(Gln398del)];[(Gln398del)]	11	0,200	-	38	0,345
4.	rs75659869	c.[1306G=];(1306G=] p.[(Asp436=)];[(Asp436=)]	47	0,855	G	102	0,927
		c.[1306G>A];[1306G=] p.[(Asp436Asn)];[(Asp436=)]	8	0,145			
		c.[1306G>A];[1306G>A] p.[(Asp436Asn)];[(Asp436Asn)]	0	0	A	8	0,073
5.	rs35105846	c.[1331G=];[1331G=] p.[(Ser444=)];[(Ser444=)]	38	0,691	G	90	0,818
		c.[1331G>A];[1331G=] p.[(Ser444Asn)];[(Ser444=)]	14	0,255			
		c.[1331G>A];[1331G>A] p.[(Ser444Asn)];[(Ser444Asn)]	3	0,054	A	20	0,018
6.	rs79945262	c.[1740C=];[1740C=] p.[(Ala580=)];[(Ala580=)]	51	0,927	C	106	0,964
		c.[1740C>A];[1740C=] p.[(Ala580=)];[(Ala580=)]	4	0,073			
		c.[1740C>A]; [1740C>A] p.[(Ala580=)];[(Ala580=)]	0	0	A	4	0,036
7.	rs142024473	c.[1979C=];[1979C=] p.[(Ala660=)];[(Ala660=)]	52	0,945	C	107	0,973
		c.[1979C>T];[1979C=] p.[(Ala660Val)];[(Ala660=)]	3	0,055			
		c.[1979C>T];[1979C>T] p.[(Ala660Val)];[(Ala660Val)]	0	0	T	3	0,027

13 lentelės tęsinys.

Nr.	Varianto identifikacinis nr.	Genotipas*	GD	SGD	Aleliai	AD	SAD
8.	rs41302575	c.[2450C=];[2450C=] p.[(Thr817=)];[(Thr817=)]	50	0,909	C	102	0,927
		c.[2450C>G];[2450C=] p.[(Thr817Ser)];[(Thr817=)]	2	0,036			
		c.[2450C>G];[2450C>G] p.[(Thr817Ser)];[(Thr817Ser)]	3	0,055	G	8	0,073
9.	rs41296243	c.[2477C=];[2477C=] p.[(Ser826=)];[(Ser826=)]	52	0,945	C	107	0,973
		c.[2477C>T];[2477C=] p.[(Ser826Leu)];[(Ser826=)]	3	0,055			
		c.[2477C>T];[2477C>T] p.[(Ser826Leu)];[(Ser826Leu)]	0	0	T	3	0,027
10.	rs778331588	c.[2555A=];[2555A=] p.[(Asp852=)];[(Asp852=)]	54	0,982	C	109	0,991
		c.[2555A>T];[2555A=] p.[(Asp852Val)];[(Asp852=)]	1	0,018			
		c.[2555A>T];[2555A>T] p.[(Asp852Val)];[(Asp852Val)]	0	0	A	1	0,009
11.	rs9610841	c.[2589C=];[2589C=] p.[(Asn863=)];[(Asn863=)]	22	0,4	C	65	0,591
		c.[2589C>A];[2589C=] p.[(Asn863Lys)];[(Asn863=)]	21	0,382			
		c.[2589C>A];[2589C>A] p.[(Asn863Lys)];[(Asn863Lys)]	12	0,218	A	45	0,409
12.	rs193043234	c.[3089C=];[3089C=] p.[(Pro1030=)];[(Pro1030=)]	52	0,945	C	107	0,973
		c.[3089C>G];[3089C=] p.[(Pro1030Arg)];[(Pro1030=)]	3	0,055			
		c.[3089C>G];[(3089C>G)] p.[(Pro1030Arg)];[(Pro1030Arg)]	0	0	T	3	0,027
13.	rs200359708	c.[3232C=];[3232C=] p.[(Arg1078=)];[(Arg1078=)]	52	0,945	C	107	0,973
		c.[3232C>T];[3232C=] p.[(Arg1078Cys)];[(Arg1078=)]	3	0,055			
		c.[3232C>T];[(3232C>T)] p.[(Arg1078Cys)];[(Arg1078Cys)]	0	0	T	3	0,027
14.	rs5756795	c.[3559T=];[3559T=] p.[(Phe1187=)];[(Phe1187=)]	20	0,364	T	64	0,582
		c.[3559T>C];[3559T=] p.[(Phe1187Leu)];[(Phe1187=)]	24	0,436			
		c.[3559T>C];[3559T>C] p.[(Phe1187Leu)];[(Phe1187Leu)]	11	0,2	C	46	0,418

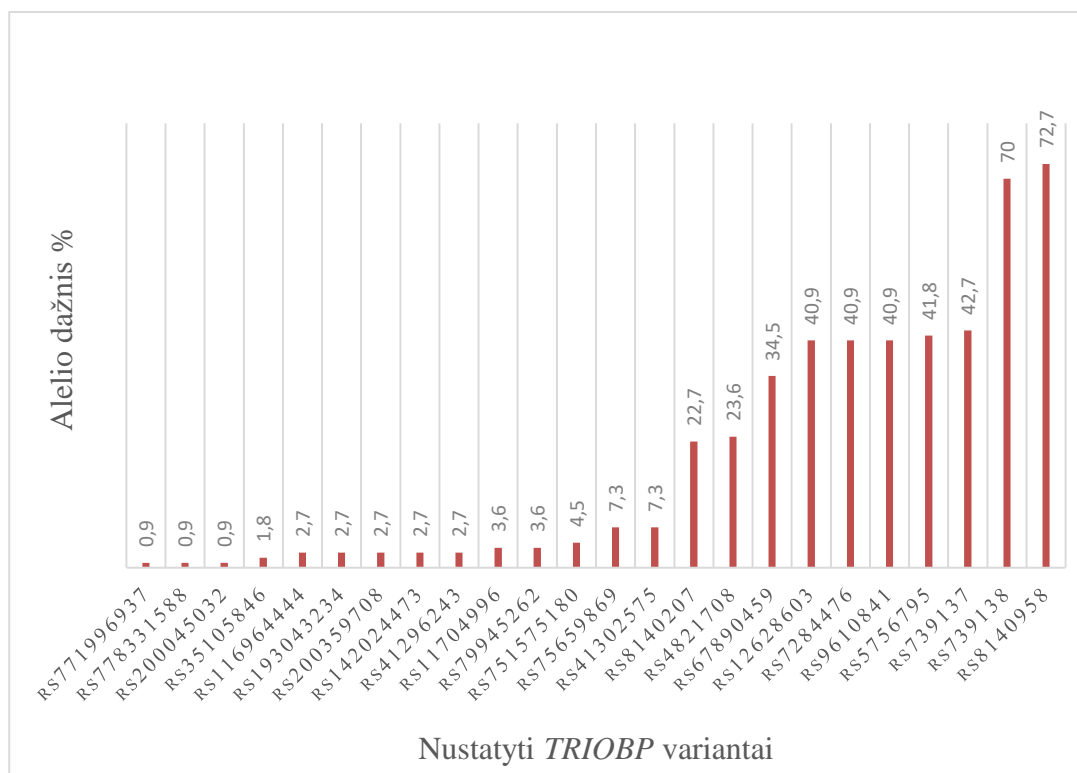
13 lentelės tęsinys.

Nr.	Varianto identifikacinis nr.	Genotipas*	GD	SGD	Aleliai	AD	SAD
15.	rs739137	c.[3885T=];[3885T=] p.[(Ser1295=)];[(Ser1295=)]	20	0,364	T	63	0,573
		c.[3885T>C];[3885T=] p.[(Ser1295=)];[(Ser1295=)]	23	0,418			
		c.[3885T>C];[3885T>C] p.[(Ser1295=)];[(Ser1295=)]	12	0,218	C	47	0,427
16.	rs739138	c.[3899A=];[3899A=] p.[(His1300=)];[(His1300=)]	13	0,237	A	33	0,3
		c.[3899A>G];[3899A=] p.[(His1300Arg)];[(His1300=)]	7	0,127			
		c.[3899A>G];[3899A>G] p.[(His1300Arg)];[(His1300Arg)]	35	0,636	G	77	0,7
17.	rs7284476	c.[3975G=];[3975G=] p.[(p.Gln1325=)];[(Gln1325=)]	26	0,473	G	65	0,591
		c.[3975G>A];[3975G=] p.[(Gln1325=)];[(Gln1325=)]	13	0,236			
		c.[3975G>A];[(3975G>A)] p.[(Gln1325=)];[(Gln1325=)]	16	0,291	A	45	0,409
18.	rs771996937	c.[3978C=];[3978C=] p.[(Ala1326=)];[(Ala1326=)]	54	0,982	C	109	0,991
		c.[3978C>A];[3978C>=] p.[(Ala1326=)];[(Ala1326=)]	1	0,018			
		c.[3978C>A];[(3978C>A)] p.[(Ala1326=)];[(Ala1326=)]	0	0	A	1	0,009
19.	rs8140207	c.[4116G=];[4116G=] p.[(Glu1372=)];[(Glu1372=)]	32	0,582	G	85	0,773
		c.[4116G>T];[4116G=] p.[(Glu1372Asp)];[(Glu1372=)]	21	0,382			
		c.[4116G>T];[(4116G>T)] p.[(Glu1372Asp)];[(Glu1372Asp)]	2	0,036	T	25	0,227
20.	rs8140958	c.[4129T=];[4129T=] p.[(Trp1377=)];[(Trp1377=)]	15	0,273	T	30	0,273
		c.[4129T>C];[4129T=] p.[(Trp1377Arg)];[(Trp1377=)]	0	0			
		c.[4129T>C];[(4129T>C)] p.[(Trp1377Arg)];[(Trp1377Arg)]	40	0,727	C	80	0,727
21.	rs751575180	c.[4160G=];[4160G=] p.[(Arg1387=)];[(Arg1387=)]	50	0,909	G	105	0,955
		c.[4160G>A];[4160G=] p.[(Arg1387Gln)];[(Arg1387=)]	5	0,091			
		c.[4160G>A];[(4160G>A)] p.[(Arg1387Gln)];[(Arg1387Gln)]	0	0	A	5	0,045

13 lentelės tęsinys.

Nr.	Varianto identifikacinis nr.	Genotipas*	GD	SGD	Aleliai	AD	SAD
22.	rs200045032	c.[5014G=];[5014G=] p.[(Gly1672=)];[(Gly1672=)]	54	0,982	C	109	0,991
		c.[5014G>T];[5014G=] p.[(Gly1672Ter)];[(Gly1672=)]	1	0,018			
		c.[5014G>T];[5014G>T] p.[(Gly1672Ter)];[(Gly1672Ter)]	0	0	A	1	0,009
23.	rs11704996	c.[5550G=];[5550G=] p.[(Val1850=)];[(Val1850)]	51	0,927	G	106	0,964
		c.[5550G>A];[5550G=] p.[(Val1850=)];[(Val1850)]	4	0,073			
		c.[5550G>A];[5550G>A] p.[(Val1850=)];[(Val1850)]	0	0	A	4	0,036
24.	rs4821708	c.[6498C=];[6498C=] p.[(Tyr2166=)];[(Tyr2166=)]	30	0,546	C	84	0,764
		c.[6498C>T];[6498C=] p.[(Tyr2166=)];[(Tyr2166=)]	24	0,436			
		c.[6498C>T];[6498C>T] p.[(Tyr2166=)];[(Tyr2166=)]	1	0,018	T	26	0,236

\* NM\_001039141.2, NP\_001034230.1; GD – genotipo dažnis; SGD – santykinis genotipo dažnis; AD – alelio dažnis; SAD – santykinis alelio dažnis.



6 paveikslas. Nustatytų *TRIOBP* geno variantų alternatyvaus alelio dažnis tiriamojame grupėje

Siekiant patikrinti ar identifikuoti variantai lietuvių populiacijoje yra pusiausvyroje, t.y atitinka Hardžio-Veinbergo dėsnį, buvo atliekamas Pirsono  $\chi^2$  testas. Jei identifikuotų variantų genotipai ir alelių dažniai yra Hardžio-Veinbergo pusiausvyroje, vadinasi, pasiskirsto pagal dėsnį:  $p^2+2pq+q^2=1$  ir  $p+q=1$ , kai  $p$  – laukinio tipo alelio dažnis,  $q$  – alternatyvaus alelio dažnis,  $p^2$  – laukinio tipo alelio homozigotų dažnis,  $q^2$  – alternatyvaus alelio homozigotų dažnis,  $2pq$  – heterozigotų dažnis. Apskaičiuoti tikėtini genotipų dažniai populiacijoje buvo lyginami su tyrimo metu gautais identifikuotų variantų genotipų dažniais. Skirtumas yra laikomas statistiškai reikšmingu, kuomet  $p<0,05$ .

Nustatyta, kad tiriamoji grupė yra nepusiausvyroje – neatitinka Hardžio-Veinbergo dėsnio ( $p<0,05$ ) – pagal 6 identifikuotus *TRIOBP* geno variantus (rs12628603, rs67890459, rs41302575, rs739138, rs7284476 ir rs8140958). Rezultatų statistinio reikšmingumo trūkumą sąlygoja per mažas tiriamosios grupės skaičius. Šių variantų atveju, tiriamojoje grupėje nustatytas didesnis alternatyvaus alelio homozigotinio genotipo dažnis, lyginant su heterozigotinio genotipo dažniu.

Visi kiti identifikuoti *TRIOBP* geno koduojančios sekos variantai yra pusiausvyroje pagal Hardžio-Veinbergo dėsnį – gauti ir tikėtini genotipų dažniai tarpusavyje statistiškai reikšmingai nesiskiria.

Esami ir tikėtini genotipų dažniai,  $\chi^2$  ir  $p$  reikšmės pateiktos 14 lentelėje (variantai neatitikę Hardžio-Veinbergo dėsnio, paryškinti kita spalva).

**14 lentelė. Nustatytų *TRIOBP* geno variantų esami, tikėtini genotipų dažniai,  $\chi^2$  ir  $p$  reikšmės**

Nr.	Varianto identifikacinis nr.	Esami genotipų dažniai (AA, Aa, aa)	Tikėtini genotipų dažniai (AA, Aa, aa)	$\chi^2$	$p$ reikšmė
1.	<u>rs12628603</u>	23	19,2	4,48	0,034
		19	26,59		
		13	9,2		
2.	rs116964444	52	52,04	0,04	0,841
		3	2,92		
		0	0,04		
3.	<u>rs67890459</u>	28	23,56	7	0,008
		16	24,87		
		11	6,56		
4.	rs75659869	47	47,29	0,34	0,559
		8	7,42		
		0	0,29		
5.	<u>rs35105846</u>	38	36,82	1,15	0,284
		14	16,36		
		3	1,82		

14 lentelės tęsinys.

Nr.	Varianto identifikacinis nr.	Esami genotipų dažniai (AA, Aa, aa)	Tikėtini genotipų dažniai (AA, Aa, aa)	$\chi^2$	p reikšmė
6.	<u>rs79945262</u>	51	51,07	0,08	0,777
		4	3,85		
		0	0,07		
7.	<u>rs142024473</u>	52	52,04	0,04	0,841
		3	2,92		
		0	0,04		
8.	<u>rs41302575</u>	50	47,29	29,34	<0,00001
		2	7,42		
		3	0,29		
9.	<u>rs41296243</u>	52	52,04	0,04	0,841
		3	2,92		
		0	0,04		
10.	<u>rs778331588</u>	54	54	0	1
		1	0,99		
		0	0		
11.	<u>rs9610841</u>	22	19,2	2,43	0,119
		21	26,59		
		12	9,2		
12.	<u>rs193043234</u>	52	52,04	0,04	0,841
		3	2,92		
		0	0,04		
13.	<u>rs200359708</u>	52	52,04	0,04	0,841
		3	2,92		
		0	0,04		
14.	<u>rs5756795</u>	20	18,62	0,59	0,442
		24	26,76		
		11	9,62		
15.	<u>rs739137</u>	20	18,04	1,17	0,279
		23	26,92		
		12	10,04		
16.	<u>rs739138</u>	13	4,95	26,72	<0,00001
		7	23,1		
		35	26,95		
17.	<u>rs7284476</u>	26	19,2	14,37	0,00015
		13	26,59		
		16	9,2		
18.	<u>rs771996937</u>	54	54	0	1
		1	0,99		
		0	0		
19.	<u>rs8140207</u>	32	32,84	0,42	0,517
		21	19,32		
		2	2,84		
20.	<u>rs8140958</u>	15	4,09	55	<0,00001
		0	21,82		
		40	29,09		

14 lentelės tęsinys.

Nr.	Varianto identifikacinis nr.	Esami genotipų dažniai (AA, Aa, aa)	Tikėtini genotipų dažniai (AA, Aa, aa)	$\chi^2$	p reikšmė
21.	<u>rs751575180</u>	50	50,11	0,12	0,729
		5	4,77		
		0	0,11		
22.	<u>rs200045032</u>	54	54	0	1
		1	0,99		
		0	0		
23.	<u>rs11704996</u>	51	51,07	0,08	0,777
		4	3,85		
		0	0,07		
24.	<u>rs4821708</u>	30	32,07	2,4	0,121
		24	19,85		
		1	3,07		

AA – referentinio alelio homozigotų genotipo dažnis; Aa – heterozigotų genotipo dažnis; aa – alternatyvaus alelio homozigotų genotipo dažnis; p – reikšmingumo lygmuo.



## IŠVADOS

1. Atlikta *TRIOBP* geno egzonų (7, 8, 9, 16 ir 17) *Sanger* sekoskaita 55 tiriamiesiems, sergantiems nesindrominiu klausos sutrikimu. Įvykdyta apie 900 *TRIOBP* geno koduojančios sekos sekoskaitos reakcijų. Išanalizuoti *TRIOBP* geno koduojančios sekos naujos kartos ir *Sanger* sekoskaitos duomenys. Identifikuoti 24 *TRIOBP* geno koduojančios sekos variantai 7–tame, 8–tame, 9–tame, 14–tame ir 19–tame egzonuose.
2. Atlikta nustatytų variantų biostatistinė analizė. Apskaičiuoti 55 asmenų, sergančių nesindrominiu klausos sutrikimu, identifikuotų *TRIOBP* variantų genotipų ir alelių dažniai. Nustatyti dažniausi *TRIOBP* geno variantai: rs8140958 (c.4129T>C, C alelio dažnis lygus 0,727) ir rs739138 (c.3899A>G, G alelio dažnis lygus 0,7). Nustatyti rečiausi *TRIOBP* geno variantai: rs778331588, (c.2555A>T), rs771996937 (c.3978C>A) ir rs200045032 (c.5014G>T), retojo alelio dažniai lygūs 0,009.
3. Atlikta nustatytų variantų bioinformacinė analizė. Įvertintas identifikuotų *TRIOBP* variantų patogeniškumas. Remiantis bioinformaciniais įrankiais, duomenų bazėmis ir moksline literatūra nustatytas 1 variantas (rs200045032, c.5014G>T, p.(Gly1672Ter)), kuris patogeniškai veikia koduojamo baltymo struktūrą.

## LITERATŪROS SARAŠAS

1. Babanejad M, Fattahi Z, Bazazzadegan N, Nishimura C, Meyer N, Nikzat N, Sohrabi E, Najmabadi A, Jamali P, Habibi F, Smith RJH, Kahrizi K, Najmabadi H. A comprehensive study to determine heterogeneity of autosomal recessive nonsyndromic hearing loss in Iran. *Am J Med Genet.* 2012;158:2485–2492.
2. Yan D, Tekin D, Bademci G, Foster J, Cengiz FB, Kannan-Sundhari A, Kabahuma RI. Spectrum of DNA variants for non-syndromic deafness in a large cohort from multiple continents. *Hum Genet.* 2016;135(8):953–961.
3. Beheshtian M, Babanejad M, Azaiez H, Bazazzadegan N, Kolbe D, Sloan-Heggen C, Arzhangi S, Booth K, Mohseni M, Frees K, Azizi MH, Daneshi A, Farhadi M, Kahrizi K, Smith RJH, Najmabadi H. Heterogeneity of hereditary hearing loss in Iran: a comprehensive review. *Arch Iran Med.* 2016;19(10):720–728.
4. Shahin H, Walsh T, Sobe T, Rayan AA, Lynch ED, Lee MK, Kanaan M. Mutations in a novel isoform of TRIOBP that encodes a filamentous-actin binding protein are responsible for DFNB28 recessive nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet.* 2016;78(1):144–152.
5. Mikštienė V, Jakaitienė A, Byčkova J, Gradauskienė E, Preikšaitienė E, Burnytė B, Tumienė B, Matulevičienė A, Ambrozaitytė L, Uktverytė I, Domarkienė I, Rančelis T, Cimbalistienė L, Lesinskas E, Kučinskas V, Utkus U. The high frequency of *GJB2* gene mutation c.313\_326del14 suggests its possible origin in ancestors of Lithuanian population. *BMC Genetics.* 2016;17(1):45.
6. Wesdorp M, van de Kamp JM, Hensen EF, Schraders M, Oostrik J, Yntema HG, Kanaan M. Broadening the phenotype of DFNB28: Mutations in *TRIOBP* are associated with moderate, stable hereditary hearing impairment. *Hear Res.* 2017;347:56–62.
7. Pasaulinė sveikatos organizacija. 2004. Tarptautinė funkcionavimo, negalumo ir sveikatos klasifikacija (TFK). VU Specialiosios psichologijos laboratorija. ISBN 9986–9357–9–2.
8. Hallahan DP ir Kauffman JM. 2003. Ypatingieji mokiniai. Specialiojo ugdymo įvadas. Vilnius: Alma littera.
9. Kisnierienė V. 1999. Kurčias vaikas šeimoje. Vilnius: Charibde, p. 20–28. ISBN 9986–745–28–4.
10. Vaikų klausos tyrimų poskyris. Vaikų klausos sutrikimų priežastys. Prieiga internete: [http://www.vaikuligonine.lt/wpcontent/uploads/doc/pacientui/LOR\\_Vaiku\\_klausos\\_sutrikimo\\_priežastys.pdf](http://www.vaikuligonine.lt/wpcontent/uploads/doc/pacientui/LOR_Vaiku_klausos_sutrikimo_priežastys.pdf).

11. Marazita ML, Ploughman LM, Rawlings B, Remington E, Arnos KS, Nance WE. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the US school-age population. *Am J Med Genet.* 1993;46:486–491.
12. WHO [duomenų bazė internete]. World Health Organization, Geneva (Switzerland). [cituota 2017 m. vasario 2 d.]. Prieiga internete: <http://www.who.int/en/>.
13. World Health Organization. WHO global estimates on prevalence of hearing loss. Mortality and Burden of Diseases and Prevention of Blindness and Deafness. 2012. Prieiga internete: [http://www.who.int/pbd/deafness/WHO\\_GE\\_HL.pdf](http://www.who.int/pbd/deafness/WHO_GE_HL.pdf).
14. Higienos instituto Sveikatos informacijos centras. 2015. [cituota 2017 m. kovo 20 d.]. Prieiga internete: <http://sic.hi.lt/>.
15. Dror AA, and Avraham KB. Hearing impairment: a panoply of genes and functions. *Neuron.* 2010;68(2):293–308.
16. Furness DN, Mahendrasingam S, Ohashi M, Fettiplace R, Hackney CM. The dimensions and composition of stereociliary rootlets in mammalian cochlear hair cells: comparison between high and low frequency cells and evidence for a connection to the lateral membrane. *J Neurosci.* 2008;28:6342–6353.
17. Tilney LG, Derosier DJ, Mulroy MJ. The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlear hair cells. *J Cell Biol.* 1980;86:244–259.
18. Wangemann P ir Schacht J. 1996. The cochlea. Springer, p. 130–185.
19. Zhao B and Muller U. The elusive mechanotransduction machinery of hair cells. *Curr Opin Neurobiol.* 2015;34:172–179.
20. Mikštienė V, Preikšaitienė E, Utkus A. Paveldimas klausos sutrikimas. Genetiniai veiksniai kurtumo etiopatogenezėje. *Medicinos teorija ir praktika.* 2015;21(1):55–64.
21. Hudspeth AJ. Mechanical amplification of stimuli by hair cells. *Curr Opin Neurobiol.* 1997;7: 480–486.
22. Lippincott Williams and Wilkin. Wolters Kluwer Health. 2007.
23. Kitajiri S, Sakamoto T, Belyantseva IA, Goodyear RJ, Stepanyan R, Fujiwara I, Hinshaw JE. Actin-bundling protein TRIOBP forms resilient rootlets of hair cell stereocilia essential for hearing. *Cell.* 2010;141(5):786–798.
24. Lietuvos neprigirdinčiųjų asociacija [internetinė svetainė]. [cituota 2017 m. vasario 20 d.]. Prieiga internete: <http://www.lna.lt>.
25. Hereditary hearing loss [internetinė svetainė]. [atnaujinta 2016 m. liepos 7d.; cituota 2017 m. vasario 3 d.]. Prieiga internete: <http://hereditaryhearingloss.org/>.
26. HUGO Gene Nomenclature Committee [internetinė svetainė]. [cituota 2017 m. vasario 21 d.]. Prieiga internete: <http://www.genenames.org/>.

27. Smith RJH, Shearer AE, Hildebrand MS, Van Camp G. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. *GeneReviews*. 1999. Prieiga internete: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/>.
28. Mencía Á, Modamio-Høybjør S, Redshaw N, Morín M, Mayo-Merino F, Olavarrieta L, Moreno F. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nat Genet*. 2009;41(5):609–613.
29. Zdebik AA, Wangemann P, Jentsch TJ. Potassium ion movement in the inner ear: Insights from genetic disease and mouse models. *Physiology*. 2009;24:307–316.
30. Petit C, Richardson GP. Linking genes underlying deafness to hair-bundle development and function. *Nat Neurosci*. 2009;12(6):703–710.
31. Khan SY, Ahmed ZM, Shabbir MI, Kitajiri SI, Kalsoom S, Tasneem S, Smith RJ. Mutations of the *RDX* gene cause nonsyndromic hearing loss at the DFNB24 locus. *Hum Mutat*. 2007;28(5):417–423.
32. Duman D, Tekin M. Autosomal recessive nonsyndromic deafness genes: a review. *Front Biosci*. 2012;17:2213–2236.
33. Diaz-Horta O, Duman D, Foster J, Sirmacı A, Gonzalez M, Mahdieh N, Ulloa RH. Whole-exome sequencing efficiently detects rare mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *PLoS ONE*. 2012;7(11):e50628.
34. The human gene mutation database [duomenų bazė internete]. [sukurta 2007 m.; cituota: 2017 m. kovo 3 d.]. Prieiga internete: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
35. Ensembl [duomenų bazė internete]. [sukurta 2001 liepos mėn.; cituota: 2017 m. vasario 20 d.]. Prieiga internete: <http://www.ensembl.org/index.html>.
36. Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(2):167–180.
37. Seipel K, O'Brien SP, Iannotti E, Medley QG, Streuli M. Tara, a novel F-actin binding protein, associates with the Trio guanine nucleotide exchange factor and regulates actin cytoskeletal organization. *J Cell Sci*. 2001;114(2):389–399.
38. Riazuddin S, Khan SN, Ahmed ZM, Ghosh M, Caution K, Nazli S, Kabra M, Zafar AU, Chen K, Naz S, Antonellis A, Pavan WJ, Green ED, Wilcox ER, Friedman PL, Morell RJ, Riazuddin S, Friedman TB. Mutations in TRIOBP, which encodes a putative cytoskeletal-organizing protein, are associated with nonsyndromic recessive deafness. *Am J Hum Genet*. 2006;78:137–142.
39. Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *BioTechniques*. 2009;46(4):277–284.

40. Leibovici M, Safieddine S, Petit C. Mouse models for human hereditary deafness. *Curr Top Dev Biol.* 2008;84:385–429.
41. Boutet de Monvel J and Petit C. Wrapping up stereocilia rootlets. *Cell.* 2010;141:748–750.
42. Springelkamp H, Mishra A, Hysi PG, Gharahkhani P, Höhn R, Khor CC, Koh V. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel loci associated with optic disc morphology. *Genet Epidemiol.* 2015;39(3):207–216.
43. Bradshaw NJ, Bader V, Prikulis I, Lueking A, Müllner S, Korth C. Aggregation of the protein TRIOBP-1 and its potential relevance to schizophrenia. *PloS one.* 2014;9(10):e111196.
44. Miyagawa M, Naito T, Nishio SY, Kamatani N, Usami S. Targeted exon sequencing successfully discovers rare causative genes and clarifies the molecular epidemiology of Japanese deafness patients. *PloS One.* 2013;8:e71381.
45. Gu X, Guo L, Ji H, Sun S, Chai R, Wang L, Li H. Genetic testing for sporadic hearing loss using targeted massively parallel sequencing identifies 10 novel mutations. *Clin Genet.* 2015;87:588–593.
46. Naz S, Imtiaz A, Mujtaba G, Maqsood A, Bashir R, Bukhari I, Khan MR, Ramzan M, Fatima A, Rehman AU, Iqbal M, Chaudhry T, Lund M, Brewer CC, Morell RJ, Friedman TB. Genetic causes of moderate to severe hearing loss point to modifiers. *Clin Genet.* 2017;91.4:589–598.
47. Fardaei M, Sarrafzadeh S, Ghafouri-Fard S, Miryounesi M. Autosomal recessive nonsyndromic hearing loss: a case report with a mutation in *TRIOBP* gene. *Int J Mol Cell Med.* 2015;4:245–247
48. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 2013;14:78–192.
49. Richards S, Aziz N, Bale S. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–424.

Naudotos duomenų bazės ir internetinės programos:

1. 1000 genomes project [duomenų bazė internete]. Prieiga internete: <http://www.1000genomes.org/>.
2. Cell Biology Unit Web Server. Sequence Alignment: Align [internetinė programa]. Prieiga internete: <http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi/>.
3. ClinVar [duomenų bazė internete]. Prieiga internete: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
4. dbSNP [duomenų bazė internete]. Prieiga internete: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

5. Deafness variation database [duomenų bazė internete]. Prieiga internete: <http://deafnessvariationdatabase.org/>.
6. ExAC [duomenų bazė internete]. Prieiga internete: <http://exac.broadinstitute.org/>.
7. GraphPad [internetinė skaičiuoklė]. Prieiga internete: <https://graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>
8. Mutation taster [internetinė programa]. Prieiga internete: <http://www.mutationtaster.org/>.
9. National Center for Biotechnology Information [duomenų bazė internete]. Prieiga internete: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
10. OMIM [duomenų bazė internete]. Prieiga internete: <http://www.omim.org/>.
11. PolyPhen-2 [internetinė programa]. Prieiga internete: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.
12. Primer-BLAST [internetinė programa]. Prieiga internete: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
13. SIFT [internetinė programa]. Prieiga internete: <http://sift.jcvi.org/>.
14. UniProt [duomenų bazė internete]. Prieiga internete: <http://www.uniprot.org/>.