
ARTÍCULOS ORIGINALES

Análisis genético molecular de las mutaciones c.2299delG y c.2276C>G en el gen USH2A en pacientes cubanos con síndrome Usher tipo 2.

Genetic analysis of c.2299delG and c.2276C>G mutations in USH2A gene in Cuban patients with Usher syndrome type 2.

*Antonio Alejandro Esperón Álvarez,^I Ileana Rosado Ruíz-Apodaca,^{II}
Elayne Santana Hernández,^{III} Beatriz Dyce Gordon,^{IV} Lidice Reyes Navarro.^V*

Resumen

El síndrome Usher tipo 2 (USH2) es una entidad clínica con herencia autosómica recesiva, caracterizada por una pérdida auditiva neurosensorial moderada a severa sin alteración vestibular, y pérdida visual progresiva debido a retinosis pigmentaria. Alteraciones en tres genes pueden causar la enfermedad, siendo la mutación c.2299delG, en el gen USH2A, la más frecuente en varios países. La mutación c.2276C>G (p.C759F), también localizada en USH2A, ha sido descrita en pacientes con retinosis pigmentaria recesiva no sindrómica o con USH2. El espectro de mutaciones para los genes implicados en el síndrome Usher en los pacientes cubanos aún no ha sido establecido. Este trabajo tuvo como objetivo analizar la presencia de las mutaciones c.2299delG y c.2276C>G en pacientes cubanos con sospecha clínica de USH2. Fueron estudiados 40 individuos no emparentados. El análisis genético molecular se realizó mediante el método de PCR-digestión enzimática, seguido de electroforesis. La mutación c.2299delG estuvo presente en 7 de los 40 casos estudiados (17,5%); tres resultaron homocigóticos y cuatro heterocigóticos. La mutación c.2276C>G no fue detectada en ninguno de los pacientes estudiados. La introducción del diagnóstico molecular de estas mutaciones al servicio asistencial, contribuye al mejoramiento del asesoramiento genético a las familias cubanas donde se segrega la enfermedad. Se deben continuar los estudios moleculares para identificar otras mutaciones presentes en los genes implicados en el USH2 en la población cubana.

Palabras clave: Síndrome Usher tipo 2, gen USH2A, PCR-digestión enzimática, 2299del G, C759F.

Abstract

Usher syndrome type 2 (USH2) is a clinical entity with autosomal recessive inheritance, characterized by moderate to severe sensorineural hearing loss without vestibular alteration, and progressive visual loss due to retinitis pigmentosa. Variations in three genes can cause the disease, being the mutation c.2299delG, in the USH2A gene, the most frequent in several countries. The c.2276C>G mutation (p.C759F), also localized in USH2A, has been described in patients with non-syndromic recessive retinitis pigmentosa or with USH2. The spectrum of mutations for genes involved in Usher's syndrome in Cuban patients has not yet been established. This study aimed to analyze the presence of mutations c.2299delG and c.2276C>G in Cuban patients with clinical suspicion of USH2. Forty unrelated individuals were studied. Molecular genetic analysis was performed using the PCR-enzymatic digestion method, followed by electrophoresis. The c.2299delG mutation was present in 7 of the 40 studied cases (17.5%); 3 were homozygous and 4 were heterozygous. The c.2276C>G mutation was not detected in any of the studied patients. The introduction of the molecular diagnosis of these mutations to the care service contributes to the improvement of genetic counseling to Cuban families where the disease is segregated. Molecular studies should be continued to identify other mutations present in genes involved in USH2 in the Cuban population.

Keywords: Usher syndrome type 2, USH2A Gene, PCR-enzymatic digestion, 2299del G, C759F.

^I Licenciado en Biología. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. Email: alejandroea@infomed.sld.cu

^{II} Licenciada en Bioquímica. Doctora en Ciencias Veterinarias. Investigadora Titular. Centro Nacional de Genética Médica.

^{III} Doctora en Medicina. Especialista de Primer y Segundo Grado en Medicina General Integral y en Genética Clínica. Centro Provincial de Genética Médica de Holguín.

Introducción

El síndrome Usher (USH) es un trastorno autosómico recesivo caracterizado por discapacidad auditiva neurosensorial congénita, pérdida visual progresiva debido a retinosis pigmentaria (RP) y en algunos casos disfunción vestibular. Esta entidad clínica está presente en aproximadamente el 50% de los casos de sordo-ceguera. Su prevalencia se ha estimado, en poblaciones de países desarrollados, entre 3,5 y 16,7 casos por cada 100 000 individuos¹⁻⁴ mientras que en Cuba la forma sindrómica de la RP es la reportada como más frecuente.⁵

El USH es clínica y genéticamente heterogéneo, y ha sido dividido en tres subtipos (USH1-3) en base a la severidad de la discapacidad auditiva, a la presencia o ausencia de disfunción vestibular y a la edad de comienzo de la RP.⁶ Un cuarto subtipo ha sido propuesto para agrupar los casos llamados atípicos, que presentan pérdida auditiva y/o disfunción vestibular progresivas en lugar de estables,^{7,8} aunque esta clasificación es controversial todavía.⁹

El síndrome Usher tipo 2 (USH2) es la forma clínica más frecuente de esta ciliopatía,^{3,10} lo cual ha sido corroborado también para Cuba.¹¹ Este subtipo fenotípico se caracteriza por pérdida auditiva congénita de moderada a severa, no progresiva; RP con debut peri- o postpuberal, función vestibular normal y lenguaje inteligible.¹² Hasta el momento, 14 genes han sido asociados con el USH, y de ellos, tres, USH2A, ADGRV1 y WHRN, se han relacionado específicamente con el desarrollo del USH2⁹. El gen PDZD7, se ha reportado como un modificador del fenotipo retiniano en pacientes con mutaciones bialélicas en USH2A; además contribuye a la herencia digénica junto con el gen ADGRV1.¹³

USH2A es el gen más frecuentemente mutado en el USH2, lo que acontece para alrededor del 82% de los casos.¹⁴ Mutaciones en este gen también son responsables de casos de síndrome Usher atípico y de RP recesiva no sindrómica.^{15,16} Este gen se localiza en 1q41, se expande por 800 kb y comprende 72 exones, con intrones que varían entre 127 pb y 78 kb de longitud.¹⁷ USH2A tiene dos transcriptos alternativos; el mayor de ellos codifica la isoforma b de la proteína usherina, una compleja proteína transmembranal de aproximadamente 580 kDa, que está constituida por 5202 aminoácidos, y que presenta un largo dominio extracelular.¹⁴ Esta isoforma es

parte de una red proteica denominada el interactoma Usher, el cual juega un papel esencial en el desarrollo de los estereocilios de las células ciliadas que forman parte del órgano de Corti. En los fotorreceptores, el interactoma Usher se localiza en la región periciliar y podría estar involucrado en el transporte de moléculas entre el segmento interior y el exterior.¹⁸

Hasta la fecha más de 1000 variantes del gen USH2A han sido documentadas en Leiden Open Variation Database (LOVD).¹⁹ Estas variantes son de todos los tipos e incluyen mutaciones con pérdida de sentido y con cambio de sentido, pequeñas inserciones y deleciones, grandes reordenamientos, y variantes que afectan los sitios de empalme.^{9,14,20-22} Una gran mayoría de estas mutaciones están presentes en unas pocas familias, sin embargo, una mutación prevalente localizada en el exón 13 de USH2A, denominada c.2299delG (p.Glu767Serfs*21 o E767fs), es frecuentemente hallada en pacientes europeos y estadounidenses, y también en casos aislados de Sudamérica, África del Sur y Asia.¹⁸ Esta mutación causa USH2, pero también conduce a USH atípico.⁷ Otro cambio frecuente en el exón 13, la mutación c.2276C>G (p.Cys759Phe o C759F), causa USH2²³ y RP sin pérdida auditiva.¹⁵

Hasta la realización del presente estudio no se disponía en Cuba de estudios moleculares que contribuyeran al diagnóstico del USH. Por tanto, teniendo en cuenta el componente español en el origen étnico de la población cubana, y como una primera aproximación a la elucidación de las bases genéticas de esta enfermedad en los pacientes cubanos, nos propusimos realizar el análisis de las mutaciones c.2299delG y c.2276C>G, que han sido reportadas como las más frecuentes en los pacientes con USH2 en España.^{20,24}

Método

Las muestras de sangre periférica de 40 individuos no emparentados, con diagnóstico clínico de USH2 fueron tomadas en el Centro de Referencia Nacional de Retinosis Pigmentaria del Hospital Clínico-Quirúrgico “Dr. Salvador Allende” de La Habana, así como en las consultas de la Red Nacional de Genética, a partir la remisión de los pacientes desde los centros provinciales de Retinosis Pigmentaria. El diagnóstico clínico se estableció en base a la historia clínica, el examen visual y de fondo de ojo, el estudio neurofisiológico, y las pruebas de audiología

^{IV} Doctora en Medicina. Especialista de Primer Grado en Medicina General Integral y en Genética Clínica. Hospital Clínico-Quirúrgico “Dr. Salvador Allende”.

^V Técnico en Química Analítica. Centro Nacional de Genética Médica.

y función vestibular. Las muestras se enviaron para su análisis genético al Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), donde se procesaron mediante el método de precipitación salina de aislamiento de ADN²⁵.

El análisis molecular de las mutaciones c.2299delG y c.2276C>G se realizó mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y digestión enzimática, seguido de electroforesis. Para la amplificación del ADN, fueron empleados los oligonucleótidos reportados por Dreyer y colaboradores.²³

La reacción de PCR se llevó a cabo en volúmenes de 25 µL conteniendo: de 50 a 100 ng de ADN genómico; 1,2 y 0,6 µM de los oligonucleótidos, para c.2299delG y c.2276C>G respectivamente; 0,08 mM de dNTP; 1x de solución tampón de la polimerasa; 1,5 mM de MgCl₂ y 2,5 U de Taq ADN Polimerasa.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento por 30 segundos a 64°C, para c.2299delG, y a 60°C, para c.2276C>G, y polimerización a 72°C por 45 segundos. Los 30 ciclos fueron seguidos de una extensión final a 72°C por 5 minutos.

La digestión enzimática para la detección de la mutación c.2299delG se realizó en un volumen de 50 µL, conteniendo: 25 U de la enzima BfaI, 1x de solución tampón de la endonucleasa y 20 µL del producto del PCR (amplicón), purificado previamente mediante estuche comercial (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN). Para la detección de la mutación c.2276C>G la digestión enzimática se realizó en un volumen de 35 µL, que contenía: 20 U de la enzima PstI, 1x de la solución tampón de la enzima y 15 µL del amplicón. En ambos casos se realizó la incubación de la reacción durante toda la noche a 37 °C.

Los productos digeridos fueron analizados mediante electroforesis de ADN, a 180 V durante 1 hora, en gel de Agarosa MS (Roche) al 3%. El gel fue teñido con bromuro de etidio y fotografiado sobre un transiluminador de luz ultravioleta.

Este estudio formó parte de un proyecto de investigación que fue aprobado por el Comité de Ética del CNGM y para su realización se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes.

Resultados

La mutación c.2299delG fue detectada en 7 de los 40 pacientes estudiados (17,5%). En tres casos se halló en homocigocidad y en cuatro en heterocigocidad, lo que significa que 10 de los 80 cromosomas

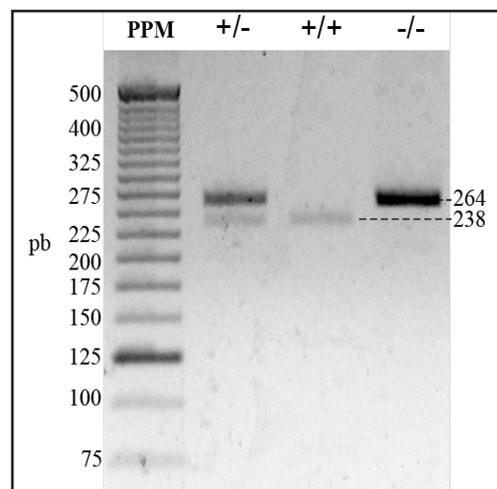
analizados (12,5%) portan esta mutación. La mutación c.2276C>G no se encontró en ninguno de los pacientes incluidos en el estudio. En la tabla 1 se resumen los resultados obtenidos mediante el análisis genético molecular.

Tabla 1. Resultados del análisis de las mutaciones c.2299delG y c.2276C>G en pacientes cubanos con síndrome Usher tipo 2.

Genotipo	Mutación 1	Mutación 2	No. de pacientes
Homocigótico	c.2299delG	c.2299delG	3
	c.2276C>G	c.2276C>G	0
Heterocigótico Compuesto	c.2299delG	c.2276C>G	0
	c.2299delG	ND	4
	c.2276C>G	ND	0
Desconocido	ND	ND	33

ND: mutación no determinada

La figura 1 muestra la imagen de un corrida electroforética de productos de PCR digeridos con enzima endonucleasa para la detección de la mutación c.2299delG. Se observan los patrones de bandas obtenidos para tres muestras con diferentes genotipos.



Análisis de la mutación c.2299delG. Electroforesis en gel de agarosa al 3% del producto de PCR digerido con la endonucleasa BfaI. La digestión enzimática para el alelo normal genera fragmentos de 264 y 17 pb, y para el alelo mutado de 238, 25 y 17 pb (no se observan los fragmentos de 25 y 17 pb). PPM: patrón de peso molecular; +/-: paciente con genotipo heterocigótico; +/+ : paciente con genotipo homocigótico para c.2299delG; -/-: paciente negativo para c.2299delG.

Discusión

Con excepción de algunas poblaciones endogámicas en las cuales una o dos mutaciones están presentes en la mayor parte de los casos sindrómicos, las mutaciones responsables del USH son halladas en una o en unas pocas familias.²⁴ Solo las mutaciones c.2299delG y c.2276C>G están relacionadas con una alta proporción de casos de USH2,²⁴ encontrándose siempre c.2276C>G en heterocigocidad con otras mutaciones.^{20,24,26}

Este estudio, el primer análisis genético molecular del gen USH2A en pacientes cubanos con síndrome Usher tipo 2, permitió confirmar la presencia en la población cubana de la mutación de mayor prevalencia en poblaciones caucásicas de origen europeo, c.2299delG, cuyas frecuencias alélicas se reportan entre el 15 y el 50%.^{18,24,27} Estudios basados en análisis de haplotipos han confirmado un origen ancestral en poblaciones del sur de Europa para esta mutación.^{18,28} Con relación a su presencia en territorios con una historia de colonización europea, tales como América y África del Sur, se ha señalado que las oleadas recientes de migrantes provenientes del Viejo Continente la habrían diseminado por el llamado Nuevo Mundo, y por otros países.²⁸

En nuestro trabajo la frecuencia alélica de c.2299delG (17,5%) en los 40 pacientes analizados, resultó inferior a lo reportado en Europa, y en España en particular,¹⁸ y no se identificó la segunda mutación más frecuente del gen USH2A en las poblaciones de origen europeo, c.2276C>G,^{15,24,26} lo que podría estar relacionado con el propio mestizaje de la población cubana y la presencia de un espectro de mutaciones más amplio, o al menos diferente, al de las poblaciones del Viejo Continente. El análisis de un mayor número de individuos y la caracterización completa del gen USH2 permitiría esclarecer este punto.

Tanto la variante alélica c.2299delG como c.2276C>G, se localizan en el exón 13 del gen USH2A y afectan, a nivel proteico, el quinto dominio *laminin-type EGF-like* (Lam EGF), de la proteína usherina. La mutación c.2299delG provoca un corrimiento del marco de lectura, que genera un codón de parada corriente abajo, a 20 residuos aminoacídicos del ácido glutámico de la posición 767, lo cual conduce a un producto proteico severamente truncado.²⁷ A nivel de ARN, se plantea también, que la mutación c.2299delG desestabiliza un potenciador exónico del empalme y crea un silenciador del empalme dentro del exón 13.²⁹

La mutación c.2276C>G (p.C759F) por su parte, desestabiliza la formación del puente bisulfuro entre la cisteína 759 y la cisteína 747, lo que conduce a

un plegamiento anormal del dominio Lam EGF y de esta forma afecta las propiedades funcionales de la proteína. Los dominios Lam EGF, 10 en total, se piensa que funcionan como un rígido espaciador mecánico que mantienen separadas las regiones N- y C-terminal de la usherina.²³ En adición, los dominios Lam EGF pudieran estar involucrados directamente en interacciones moleculares. Así, la alteración de la rigidez, lo mismo que la pérdida de las propiedades de unión, pudieran explicar la pérdida de función de la proteína debido a esta mutación.²³ No obstante, recientemente González-del Pozo y colaboradores³⁰ han puesto en duda la patogenicidad de p.C759F, debido a que fue encontrada en estado homocigótico en dos hermanos sanos de una familia española. Posteriores análisis en los familiares de estos individuos demostraron la presencia de una mutación en el gen PDE6B segregándose con la enfermedad.³⁰ El presente trabajo permitió identificar tres pacientes homocigóticos para c.2299delG. Se ha reportado que los pacientes con dos mutaciones que generan proteínas truncadas, incluyendo los homocigóticos para c.2299delG, desarrollan una discapacidad auditiva significativamente más severa que pacientes con otras combinaciones de mutaciones.³¹ Por tal motivo, resulta muy importante la atención temprana y el asesoramiento a estos individuos y a sus familiares. En 70 de los 80 cromosomas analizados en este estudio, la detección de la variante patogénica aún está pendiente. Debido a la heterogeneidad genética del USH2, el tamaño de los genes involucrados, además que en ocasiones se reportan pacientes con mutaciones en más de un gen, o estas se identifican en genes relacionados con otros subtipos del USH,⁹ el diagnóstico molecular de esta enfermedad se complejiza enormemente. Recientemente se han reportado mejoras en el análisis molecular del USH, con el empleo de la secuenciación masiva paralela^{9,14,22} y de técnicas para la detección de grandes reordenamientos,^{9,21} pero estas aún no se encuentran a nuestra disposición.

Conclusiones

La introducción del diagnóstico molecular de las mutaciones c.2299delG y c.2276C>G al servicio asistencial, contribuye al mejoramiento del asesoramiento genético a las familias cubanas donde se segrega la enfermedad. Se deberán continuar los estudios moleculares, en colaboración con otras instituciones, para ampliar el espectro de mutaciones identificadas en los genes implicados en el USH en la población cubana.

Referencias bibliográficas

1. Boughman JA, Vernon M, Shaver KA. Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *J Chronic Dis.* 1983;36(8):595-603.
2. Grondahl J. Estimation of prognosis and prevalence of retinitis pigmentosa and Usher syndrome in Norway. *Clin Genet.* 1987;31(4):255-64.
3. Rosenberg T, Haim M, Hauch AM, Parving A. The prevalence of Usher syndrome and other retinal dystrophy-hearing impairment associations. *Clin Genet.* 1997;51(5):314-21.
4. Kimberling WJ, Hildebrand MS, Shearer AE, Jensen ML, Halder JA, Trzuppek K, et al. Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations: Implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children. *Genet Med.* 2010;12(8):512-6.
5. Sarmiento JA. Algunas variaciones epidemiológicas de la retinosis pigmentaria en Cuba. In: Peláez O, editor. *Retinosis pigmentaria Experiencia cubana.* La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1997;35-47.
6. Bonnet C, El-Amraoui A. Usher syndrome (sensorineural deafness and retinitis pigmentosa): pathogenesis, molecular diagnosis and therapeutic approaches. *Curr Opin Neurol.* 2012;25:42-9.
7. Liu XZ, Hope C, Liang CY, Zou JM, Xu LR, Cole T, et al. A mutation (2314delG) in the Usher syndrome type IIA gene: high prevalence and phenotypic variation. *Am J Hum Genet.* 1999;64(4):1221-5.
8. Otterstedde CR, Spandau U, Blankenagel A, Kimberling WJ, Reisser C. A new clinical classification for Usher's syndrome type I. *Laryngoscope.* 2001;111:84-6.
9. Bonnet C, Riahi Z, Chantot-Bastarud S, Smagghe L, Letexier M, Marcaillou C, et al. An innovative strategy for the molecular diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(12):1730-8.
10. Jaijo T, Aller E, Beneyto M, Najera C, Millan JM. [Molecular genetic study of Usher syndrome in Spain]. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2005;56(7):285-9.
11. Dyce B, Mejías J, Copello M, Hernández R, Horrach I. Aspectos genéticos y clínicos del síndrome de Usher. *Rev Cubana Oftalmol.* 2000;13(2):79-83.
12. Millán JM, Aller E, Jaijo T, Blanco-Kelly F, Gimenez-Pardo A, Ayuso C. An update on the genetics of Usher syndrome. *J Ophthalmol.* 2011; 2011:417217.
13. Ebermann I, Phillips JB, Liebau MC, Koenekoop RK, Schermer B, López I, et al. PDZD7 is a modifier of retinal disease and a contributor to digenic Usher syndrome. *J Clin Invest.* 2010;120:1812-23.
14. Liquori A, Vache C, Baux D, Blanchet C, Hamel C, Malcolm S, et al. Whole USH2A Gene Sequencing Identifies Several New Deep Intronic Mutations. *Hum Mutat.* 2016;37(2):184-93.
15. Rivolta C, Sweklo EA, Berson EL, Dryja TP. Missense mutation in the USH2A gene: association with recessive retinitis pigmentosa without hearing loss. *Am J Hum Genet.* 2000;66(6):1975-8.
16. Mendez-Vidal C, Gonzalez-Del Pozo M, Vela-Boza A, Santoyo-Lopez J, Lopez-Domingo FJ, Vazquez-Marouschek C, et al. Whole-exome sequencing identifies novel compound heterozygous mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 2013;19:2187-95.
17. van Wijk E, Pennings RJ, te Brinke H, Claassen A, Yntema HG, Hoefsloot LH, et al. Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type 2A (USH2A) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II. *Am J Hum Genet.* 2004;74(4):738-44.
18. Aller E, Larrieu L, Jaijo T, Baux D, Espinos C, Gonzalez-Candelas F, et al. The USH2A c.2299delG mutation: dating its common origin in a Southern European population. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(7):788-93.
19. LOVD. Retinal and hearing impairment genetic mutation database: Usher syndrome 2A (USH2A) [en línea] [Fecha de acceso 3 de octubre de 2016]. URL disponible en: https://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher_montpellier/home.php?select_db=USH2A.
20. Garcia-Garcia G, Aparisi MJ, Jaijo T, Rodrigo R, Leon AM, Avila-Fernandez A, et al. Mutational screening of the USH2A gene in Spanish USH patients reveals 23 novel pathogenic mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:65.
21. Steele-Stallard HB, Le Quesne Stabej P, Lenassi E, Luxon LM, Claustres M, Roux AF, et al. Screening for duplications, deletions and a common intronic mutation detects 35% of second mutations in patients with USH2A monoallelic mutations on Sanger sequencing. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:122.
22. Chen X, Sheng X, Liu X, Li H, Liu Y, Rong W, et al. Targeted next-generation sequencing reveals novel USH2A mutations associated with diverse disease phenotypes: implications for clinical and molecular diagnosis. *PLoS One.* 2014;9(8):e105439.
23. Dreyer B, Tranebjaerg L, Rosenberg T, Weston MD, Kimberling WJ, Nilssen O. Identification of novel USH2A mutations: implications for the structure of USH2A protein. *Eur J Hum Genet.* 2000;8(7):500-6.

24. Blanco-Kelly F, Jaijo T, Aller E, Avila-Fernandez A, Lopez-Molina MI, Gimenez A, et al. Clinical aspects of Usher syndrome and the USH2A gene in a cohort of 433 patients. *JAMA Ophthalmol.* 2015;133(2):157-64.
25. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
26. Bernal S, Ayuso C, Antinolo G, Gimenez A, Borrego S, Trujillo MJ, et al. Mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa: high prevalence and phenotypic variation. *J Med Genet.* 2003;40(1):e8.
27. Yan D, Ouyang X, Patterson DM, Du LL, Jacobson SG, Liu XZ. Mutation analysis in the long isoform of USH2A in American patients with Usher Syndrome type II. *J Hum Genet.* 2009;54(12):732-8.
28. Dreyer B, Tranebjaerg L, Brox V, Rosenberg T, Moller C, Beneyto M, et al. A common ancestral origin of the frequent and widespread 2299delG USH2A mutation. *Am J Hum Genet.* 2001;69(1):228-34.
29. Lenassi E, Saihan Z, Bitner-Glindzicz M, Webster AR. The effect of the common c.2299delG mutation in USH2A on RNA splicing. *Exp Eye Res.* 2014;122:9-12.
30. González-del Pozo M, Bravo-Gil N, Mendez-Vidal C, Montero-de-Espinosa I, Millan JM, Dopazo J, et al. Re-evaluation casts doubt on the pathogenicity of homozygous USH2A p.C759F. *Am J Med Genet A.* 2015;167(7):1597-600.
31. Hartel BP, Lofgren M, Huygen PL, Guchelaar I, Lo ANKN, Sadeghi AM, et al. A combination of two truncating mutations in USH2A causes more severe and progressive hearing impairment in Usher syndrome type IIa. *Hear Res.* 2016;339:60-8.