Identyfikacja mutacji w mitochondrialnym genie *12S rRNA* u osób z niedosłuchem po leczeniu antybiotykami aminoglikozydowymi

Mutational screening of the mitochondrial 12S rRNA gene in Polish patients with aminoglycoside-induced hearing loss

Małgorzata Rydzanicz

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej
Poznań, 19.04.2011
Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu
Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Szyfter (IGCz PAN Poznań)
Recenzenci: Dr hab. med. Bożena Wiskirska-Woźnica (UM, Poznań)
Prof. dr hab. med. Tadeusz Mazurczak (IMD, Warszawa)

Hasła indeksowe: niedosłuch, antybiotyki aminoglikozydowe, ototoksyczność, mitochondrialny DNA, gen *12S rRNA*, mutacje
Key words: aminoglycoside-induced hearing loss, ototoxicity, mitochondrial DNA, 12S rRNA gene mutations

©by Polskie Towarzystwo Otorynolaryngologów – Chirurgów Głowy i Szyi
PRACA ZGŁOSZONA DO DRUKU PRZEZ ELEKTRONICZNY SYSTEM – EES
Otrzymano/Received: 13.05.2011
Zaakceptowano do druku/Accepted: 29.05.2011
Instytut Genetyki Człowieka PAN
Konflikt interesu/Conflicts of interest: Autor pracy nie zgłasza konfliktu interesów.
Adres do korespondencji/
Address for correspondence:
imię i nazwisko: **Małgorzata Rydzanicz**
adres pocztowy:
Instytut Genetyki Człowieka PAN,
Ul. Strzeszyńska 32,
60-479 Poznań
tel. **(61) 6579 223**
fax **(61) 8233 235**
e-mail **marydz@man.poznan.pl**

Otolaryngol Pol 2011; 65 (4): 297-299

Niedosłuch jest najczęstszą wadą dotyczącą ludzkich narządów zmysłów i stanowi poważny problem społeczno-ekonomiczny. Upośledzenie słuchu może być efektem działania substancji o właściwościach ototoksycznych, np. antybiotyków aminoglikozydowych. Istnieją pacjenci, u których dawka terapeutyczna antybiotyku może doprowadzić do trwałego pogorszenia bądź całkowitej utraty słuchu. Wśród czynników predysponujących do wystąpienia toksycznego upośledzenia słuchu znajdują się uwarunkowania genetyczne.

W przypadku rodzinnie występującego niedosłuchu po terapii aminoglikozydami, wrażliwość na ototoksyczne uszkodzenie słuchu dziedziczona jest wyłącznie w linii żeńskiej, co sugeruje, że genetyczne podłoże tej wrażliwości warunkowane jest przez zmiany w sekwencji mitochondrialnego DNA (mtDNA). Analiza całej sekwencji mtDNA pozwoliła na wskazanie genu *12S rRNA* jako miejsca potencjalnych mutacji warunkujących zwiększoną wrażliwość na toksyczne uszkodzenie słuchu po zastosowaniu antybiotyków aminoglikozydowych.

Celem podjętych badań była identyfikacja mutacji w mitochondrialnym genie *12S rRNA* oraz ocena ich roli w kształtowaniu ryzyka upośledzenia słuchu po leczeniu antybiotykami aminoglikozydowym. Cel ten realizowano poprzez (1) określenie częstości znanych już mutacji i wariantów sekwencji genu *12S rRNA* warunkujących upośledzenie słuchu po leczeniu antybiotykami aminoglikozydowymi, (2) wskazanie nowych, potencjalnie patologicznych zmian w sekwencji genu *12S rRNA* związanych ze zwiększoną wrażliwością na toksyczne uszkodzenia słuchu po terapii antybiotykami aminoglikozydowymi oraz (3) określenie częstości mutacji i wariantów sekwencji genu *12S rRNA* związanych z niedosłuchem izolowanym oraz niedosłuchem wywołanym antybiotykami aminoglikozydowymi w grupie osób reprezentujących ogólną populację polską.

Materiał do badań molekularnych stanowił całkowity DNA wyizolowany z krwi obwodowej lub ze złuszczonego nabłonka jamy ustnej od:

1. Pacjentów z niedosłuchem czuciowo-nerwowym, który ujawnił się na skutek leczenia antybiotykami aminoglikozydowymi (grupa badana). Do badań zakwalifikowano 128 osób, w tym 78 kobiet i 50 mężczyzn (wiek 0,1–81 lat; średnia wieku 12,2 roku, SD ± 15,8), u których uprzednio wykluczono obecności mutacji w genach *GJB2* i *GJB6* najczęściej warunkujących niedosłuch izolowany. Na podstawie wywiadu rodzinnego i analizy rodowodów, pacjentów podzielono na dwie grupy: przypadki sporadyczne (wywiad rodzinny ujemny) – 113 pacjentów (88,3%) i przypadki rodzinnie występującego niedosłuchu (wywiad rodzinny dodatni) – 15 pacjentów (11,7%).

2. Osób z dodatnim wywiadem w kierunku terapii antybiotykami aminoglikozydowymi, u których nie obserwowano efektu ototoksycznego w trakcie i po zakończeniu leczenia, przy czym czas trwania terapii nie był krótszy niż siedem dni (grupa kontrolna). Grupę stanowiło 131 osób, w tym 68 kobiet i 63 mężczyzn

w przedziale wiekowym od 0,1 do 80 lat (średnia wieku 20,3 roku; SD ± 22,9).

3. Wybranych losowo, niespokrewnionych ze sobą 500 osób, u których nie wykonano badania słuchu (grupa populacyjna). Grupę stanowiło 255 kobiet i 245 mężczyzn w wieku od 3 do 83 lat (średnia wieku 40,8 roku; SD ± 15,5).

Mitochondrialny gen *12S rRNA* amplifikowano w reakcji PCR. Jako metodę przesiewową wybrano analizę polimorfizmu konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (SSCP; *Single Strand Conformation Polymorphism*), która pozwala na wstępną selekcję zmienionych fragmentów DNA. Następnie próby, które wskazywały na obecność mutacji w sekwencji *12S rRNA*, sekwencjonowano w celu określenia typu i lokalizacji zmiany. Otrzymane wyniki porównywano z sekwencją referencyjną *rCRS* (GenBank: NC_012920).

Wnioskowanie na temat charakteru wykrytych zmian w sekwencji *12S rRNA* oparto na: (1) porównaniu sekwencji w grupach badanej i kontrolnej, (2) ocenie częstości występowania wariantów sekwencji w ogólnej populacji polskiej, (3) analizie filogenetycznej i ocenie poziomu zakonserwowania sekwencji, (4) analizie struktury II-rzędowej cząsteczki *12S rRNA*, (5) wynikach sekwencjonowania całego genomu mitochondrialnego wyselekcjonowanych pacjentów w celu wykluczenia współwystępowania innych znanych mutacji związanych z niedosłuchem, izolowanych w sekwencji mtDNA oraz określenia haplogrup mitochondrialnych. Ponadto, w badanej grupie osób z niedosłuchem po leczeniu aminoglikozydami, wykonano analizę poziomu heteroplazmii mutacji m.1555 A>G, wykorzystując technikę PCR w czasie rzeczywistym.

W grupie pacjentów z niedosłuchem po leczeniu aminoglikozydami zidentyfikowano dziesięć zmian sekwencji *12S rRNA*, których nie obserwowano w grupie kontrolnej. Wśród nich wykryto homoplazmiczną mutację m.1555 A>G, znaną zmianę o potencjalnie patologicznym charakterze m.827 A>G, dwa neutralne polimorfizmy: m.750 G>A i m.1243 T>C oraz sześć wariantów sekwencji genu *12S rRNA*: m.669 T>C, m.721 T>C, m.813 A>G, m.960 C>insC, m.988 G>A i m.1406 T>C.

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że najczęstszą genetyczną przyczyną niedosłuchu po leczeniu antybiotykami aminoglikozydowymi w badanej grupie pacjentów jest homoplazmiczna mutacja m.1555 A>G (7/128, 5,5%). Na podstawie wywiadu rodzinnego i analizy rodowodów ustalono, że aminoglikozydy są głównym czynnikiem determinującym manifestację fenotypu klinicznego warunkowanego przez obecność tej mutacji (86%). U większości nosicieli substytucji m.1555 A>G, którzy nie byli leczeni antybiotykami aminoglikozydowymi, nie obserwowano problemów ze słuchem.

W oparciu o przeprowadzone analizy, zidentyfikowane w grupie pacjentów substytucje m.669 T>C (3/128, 2,3%) oraz m.827 A>G (1/128, 0,8%) wskazuje się jako potencjalnie patologiczne warianty genu *12S rRNA*, mogące predysponować do zwiększonej wrażliwości na ototoksyczne działanie antybiotyków aminoglikozydowych. Wykazano, że zmiany te zlokalizowane są w silnie zakonserwowanych ewolucyjnie pozycjach nukleotydowych genu (odpowiednio 54% i 94%) i mogą ingerować w strukturę II-rzędową cząsteczki *12S rRNA*, zaburzając tym samym sposób zwijania się cząsteczki. Wydaje się, że ostatecznym potwierdzeniem sprawczego charakteru zmian m.669 T>C oraz m.827 A>G mogą być badania funkcjonalne.

Wyniki badań własnych nie potwierdzają jednoznacznego związku zidentyfikowanych w grupie badanej wariantów sekwencji genu *12S rRNA*: m.721 T>C, m.813 A>G, m.960 C>insC, m.988 G>A oraz m.1406 T>C. ze zwiększoną wrażliwością na ototoksyczne działanie antybiotyków aminoglikozydowych. Zatem zmiany te należy interpretować jako rzadkie warianty sekwencji genu *12S rRNA*.

W badanej grupie 500 osób reprezentujących populację polską zidentyfikowano jedną mutację m.1555 A>G (2/500), dwa znane z doniesień literaturowych potencjalnie patologiczne warianty genu *12S rRNA*: m.827 A>G (1/500) i m.961 T>C (2/500) oraz substytucję m.669 T>C (1/500), którą, na podstawie badań własnych, sugeruje się jako nową zmianę o możliwym patologicznym charakterze. Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że to właśnie te zmiany w genie *12S rRNA* są charakterystyczne dla populacji polskiej i w głównej mierze leżą u podstawy dziedziczonego w linii żeńskiej niedosłuchu izolowanego oraz predyspozycji do ototoksycznego uszkodzenia słuchu w wyniku terapii aminoglikozydami. Częstość tych zmian w grupie populacyjnej określono na poziomie 1,2%, co przewyższa szacowany na mniej niż 1% udział mutacji w mitochondrialnym DNA w genetycznie warunkowanym niedosłuchu. To pozwala przypuszczać, że znaczenie zmian w mtDNA w kształtowaniu genetycznego podłoża niedosłuchu może być większe niż się zakłada.

Ponadto, w toku prac badawczych zidentyfikowano 10 nieopisanych wcześniej wariantów sekwencji mtDNA (w tym genu *12S rRNA*), które zgłoszono do bazy danych MITOMAP (http://www.mitomap.org), poszerzając tym samym wiedzę na temat zmienności genomu mitochondrialnego.

Podsumowując, należy stwierdzić, że potwierdzenie genetycznego podłoża zwiększonej wrażliwości na ototoksyczne działanie antybiotyków aminoglikozydowych stwarza możliwość wykluczenia pacjentów predysponowanych do uszkodzenia słuchu jeszcze przed wdrożeniem terapii. Tym samym, może przyczynić się do obniżenia ryzyka upośledzenia słuchu i poprawy bezpieczeństwa leczenia antybiotykami aminoglikozydowymi.

Praca finansowana w ramach grantu MNiSW N405 054 32/3907.

PIŚMIENNICTWO

1. Rydzanicz M, Wróbel M, Pollak A, Gawęcki W, Brauze D, Kostrzewska-Poczekaj M i wsp. Mutation analysis of mitochondrial *12S rRNA* gene in Polish patients with non-syndromic and aminoglycoside-induced hearing loss. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 395:116–21.
2. Rydzanicz M, Wróbel M, Cywińska K, Froehlich D, Gawęcki W, Szyfter W i wsp. Screening of the general Polish population for deafness-associated mutations in mitochondrial *12S rRNA* and $tRNA^{Ser(UCN)}$ genes. Genet Test Mol Biomarkers. 2009; 13:167–72.
3. Rydzanicz M, Cywińska K, Wróbel M, Pollak A. Gawęcki W, Wojsyk-Banaszak I i wsp. The contribution of the mitochondrial *COI*/$tRNA^{Ser(UCN)}$ gene mutations to non-syndromic and aminoglycoside-induced hearing loss in Polish patients. Mol Genet Metab, 2011, w druku (Epub, May 13).