

# Az otosclerosisra jellemző kanyaróvírusreceptor (cd46) variánsok fehérjeszintű kimutatása – az otosclerosis genetikai modellje

Karosi Tamás dr.<sup>1</sup>, Liktor Balázs dr.<sup>2</sup>, Csomor Péter MSc<sup>1</sup>, Szalmás Anita MSc<sup>3</sup>, Szekanecz Zoltán dr.<sup>4</sup>, Sziklai István dr.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEBRECENI EGYETEM, ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM, FÜL-ORR-GÉGÉSZETI ÉS FEJ-NYAKSEBÉSZETI KLINIKA, DEBRECEN

<sup>2</sup>BAJCSY-ZSILINSZKY KÓRHÁZ, FÜL-ORR-GÉGE OSZTÁLY, BUDAPEST

<sup>3</sup>DEBRECENI EGYETEM, ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM, ORVOSI MIKROBIOLÓGIAI INTÉZET, DEBRECEN

<sup>4</sup>DEBRECENI EGYETEM, ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM, REUMATOLÓGIAI TANSZÉK, DEBRECEN

## ÖSSZEFOGLALÁS

**Háttér és célok:** Tanulmányunk célja a CD46-fehérje izoformák koexpressziós mintázatának meghatározása a szövettanilag igazolt otoscleroticus stapes talpakban. Az otosclerosis genetikai meghatározottsága évtizedek óta intenzív kutatás tárgya, azonban jelenleg sem teljesen tisztázott. A CD46-típusú kanyaróvírusreceptorok egyedi izoformákban történő kifejeződése az *oticus capsulán* és a *stapes talpon* belül az otosclerosis, mint kanyaróvírus-asszociált betegség genetikai hátteréről szolgálhat.

**Módszerek:** A CD46 otosclerosisban betöltött patogenetikai szerepének igazolása végett, három reprezentatív szövettani mintacsoporthoz alakítottunk ki:

1. *otoscleroticus*,
2. *nem-otoscleroticus* és
3. *normális stapes minták* (n=166).

Az egyes csoportokban párhuzamosan kórszövettani és CD46-specifikus real-time RT-PCR valamint western-blot vizsgálatokat végeztünk.

**Eredmények:** A normális és a szövettanilag nem-otoscleroticus stapes talpak mindegyikében a CD46-fehérje konvencionális izoformáinak (c, d, e, f és l) együttes expresszióját tapasztaltuk. Ezzel szemben az otoscleroticus mintákban, a konvencionális izoformákon túl, négy új intakt fehérjeként transzlálódott izoformát azonosítottunk: *os1*, *os2*, *os3* és *os4*.

**Következtetések:** Eredményeink igazolják, hogy a szövettanilag otoscleroticus stapes talpakban a CD46-típusú kanyaróvírusreceptorok a betegségekre jellemző, sajátos koexpressziós mintázatot mutatnak. Ez a megfigyelés egy összetett genetikai modell alapjául szolgálva, alátámaszthatja az otosclerosis szervspecifikus, vírus-asszociált és autoimmun-gyulladásos patogenezisét. Eddigi ismereteink alapján, ez az első tanulmány, amely négy új CD46-fehérje izoforma betegség-specifikus jelenlétét igazolja.

## KULCSSZAVAK

ALTERNATÍV SPLICING, CD46, KANYARÓVÍRUS, OTOSCLEROSIS, OTOSCLEROSIS-GÉNEK

Levelező szerző:

Dr. Karosi Tamás PhD,

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, Debrecen, Nagyerdei Krt. 98., 4032

Tel.: 0036 (52) 255-805, Fax: 0036 (52) 255-809 Mobil: 0036 (20) 969-0590

Email: karositam@gmail.com, Web: www.earpathology.eu

## Detection of otosclerosis associated measles virus receptor (cd46) isoforms at protein level – genetic model for otosclerosis

### SUMMARY

**Background and aims:** To investigate the CD46 isoform co-expression pattern in histologically confirmed otosclerotic stapes footplates. Genetic predisposition for otosclerosis has long been suspected, but unclarified. Unique co-expression pattern of measles virus receptor (CD46) splicing isoforms in the human otic capsule is assumed, since otosclerosis is a measles virus-associated organ-specific disease.

**Methods:** In order to identify CD46 involved in the pathogenesis of otosclerosis, we used representative groups of histologically diagnosed otosclerotic, non-otosclerotic and normal stapes footplates (n=166). Consecutive histopathological examinations and CD46-specific real-time PCR and western blot analysis were performed.

**Results:** Normal and non-otosclerotic stapes footplates showed consistent expression of the conventional c, d, e, f and l CD46 isoforms. In contrast, four novel isoforms (*os1-4*) translated as intact proteins were additionally detected in otosclerosis.

**Conclusions:** The study herein presented provides evidence for the otosclerosis-associated expression pattern of CD46. This finding might explain the organ-specific, virus-associated and autoimmune-inflammatory pathogenesis of otosclerosis. Regarding to our current knowledge, this is the first report that confirms the presence of four new disease-specific protein variants of CD46.

### KEYWORDS

ALTERNATIVE SPLICING, CD46, MEASLES VIRUS, OTOSCLEROSIS, OTOSCLEROSIS-GENES

Az otosclerosis összetett gyulladáshoz vezető csontátépítési zavar, amely az *oticus capsulában* és a *stapes talpban* megjelenő osteolyticus góccok révén progresszív vezetési – és sok esetben – szenzorineurális halláscsökkenést okoz (1). A klinikai tüneteket okozó otosclerosis kifejezetten a kaukázusi fehér populációra jellemző betegség (1, 2). A *klinikai otosclerosis* általános prevalenciája becslés adatok alapján 0,3-0,4%, a halláscsökkenésben szenvedők között 5-9%, míg a vezetési halláscsökkenések között 18-22% (1, 2). Az úgynevezett néma otoscleroticus góccok lényegesen gyakoribbak: a szövettanilag igazolható, de klinikai tüneteket nem okozó otosclerosis (*szövettani otosclerosis*) nem-selektált boncolási adatok alapján 8-11%-ban fordulhat elő (2). Az otosclerosis kizárólag az emberre jellemző betegség, amelynek nincs ismert állatmodellje (3, 4). Az otosclerosis mindemellett szervspecifikus betegség: az osteolyticus góccok kizárólag az *oticus capsulában* jelennek meg, a *stapes* szuperstruktúra, az

incus, a malleus, a temporális csont és egyéb csontok sosem érintettek (2, 4, 5). A következményes halláscsökkenéssel járó stapes ankylosis esetek mintegy kétharmadát otosclerosis okozza, a fennmaradó egyharmadban nem-otosclerosisos stapes fixáció a kiváltó ok (6). Jelenleg úgy tűnik, hogy az otosclerosisos és a nem-otosclerosisos stapes fixációk klinikai elkülönítése teljes biztonsággal nem lehetséges, ezért a (tudományos igényű) differenciáldiagnózisban továbbra is elsődleges szerepet kap a sebészileg eltávolított stapes talpak kórszövettani vizsgálata (3, 4, 7).

Az elmúlt évtizedek intenzív kutatásai ellenére, az otosclerosis etiopatogenezise tisztázatlan maradt. Több *etiopatogenetikai modell* is született, amelyek virális, autoimmun-gyulladásos, valamint endokrin tényezők önálló vagy együttes szerepét hangsúlyozzák (3, 8, 9, 10). Mindemellett az otosclerosis patogenezisében genetikai faktorok is szerepet játszhatnak annak ellenére, hogy a betegség pontos öröklésmenete egyetlen genetikai modellel sem írható le (3, 5, 10).

A kanyaróvírus etiológiai szerepét 25 évvel ezelőtt vetették fel az otosclerosis kialakulásában, amely az elmúlt években inkább csak betegség-specifikus asszociációvá módosult (8, 9). Feltételezések szerint az emberi oticus capsula bizonyos esetekben sajátos kanyaróvírus (Paramyxovirus)-receptor expressziós mintázatot mutathat, amely szerepet játszhat az otosclerosis vírus-aszociált patogenezisében és magyarázatot adhat az otosclerosisban tapasztalt csökkent kanyaróvírus-ellenes humorális immunválasz jelenségére is (3, 6, 7).

A kanyaróvírus emberi celluláris receptora a CD46, amelyet membrán kofaktor proteinként (MCP, Membrane Cofactor Protein) is említene (11). A CD46 minden sejtmaggal rendelkező emberi sejt felszínén kifejeződik, azonban nem játszik elsődleges szerepet a kanyaróvírus fertőzés során kialakuló primer viraemiában, ugyanis a fertőzés ezen fázisában a lymphocyták felszínén kifejeződő CD150 (SLAM) a kanyaróvírus receptora (11). A CD46 mindemellett, kofaktor aktivitással bír a szérumfaktor I (SF-I, Serum Factor I) funkciójában, amelynek során a C3b és C4b komplement komponensek inaktíválódnak (11). A CD46 ezzel alapvető szerepet játszik a gazdasejtek védelmében a komplement rendszer túlzott aktiválódásával szemben (11). A CD46 közvetítette molekuláris szignálok nagy hatással bírnak a T-sejt aktivációra (11, 12). A CD46 közvetve szerepet játszhat különböző *autoimmun-gyulladásos* betegségek patogenezisében is. Ebből kiindulva, a CD46 terápiás célpont lehet egyes patológiai értelemben vett gyulladásoz betegségekből. A szisztémás lupus erythematosus (SLE) egyes különösen agresszív, rapidan progrediáló eseteiben emelkedett CD46 szérum szinteket találtak (13). Irodalmi adatok alapján, állatmodellekben alkalmazva, a

rekombináns szolubilis CD46 hatásos szer lehet különböző autoimmun-gyulladásos betegségek kezelésében (14). Példaként, a parenterális CD46 kezelés nagy hatékonysággal gátolta a szívtranszplantációt követő akut transzplantátum kilökődést inkompatibilis allograft transzplantáció során (14). Ennek megfelelően, a rekombináns CD46 klinikai alkalmazása a jövőben igéretes lehet az autoimmun betegségek és a transzplantációs szövödmények kezelésében, valamint megelőzésében (3, 14).

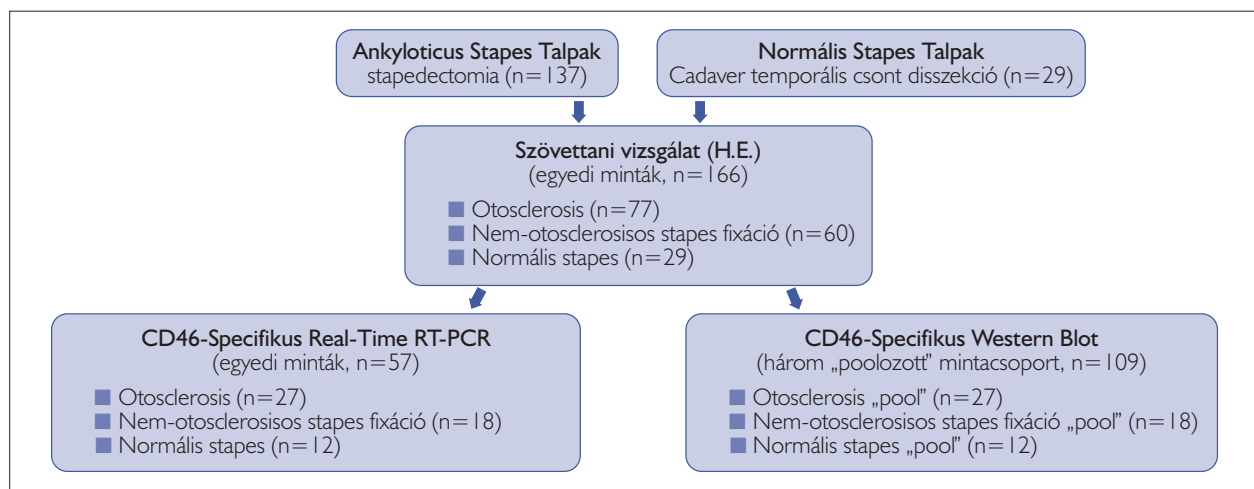
A CD46 mRNS az 1. kromoszóma q32 régiójában elhelyezkedő egyetlen génről íródik át, azonban az mRNS molekula az *alternatív splicing* során jelentős poszttranszkripció módosításon esik (eshet) át, amely végül 14 ismert *splicing mRNS variáns* (a továbbiakban a variáns az mRNS-re vonatkozik – szerző megj.) és párhuzamosan 14 *fehérje izoforma* (a továbbiakban az izoforma a fehérjére vonatkozik – szerző megj.) megjelenését eredményezi (6, 11, 12). Ahogy a fentiekben már említettük, a CD46 minden sejtmaggal rendelkező emberi sejt felszínén kifejeződik, azonban sejt- és szövettípustól függően, az egyes CD46 izoformák igen változatos intra- és interindividuíalis expressziós mintázatot követnek, amely egy egyénre az ujjlenyomatnál is jobban jellemző, és az élet során végig megmarad (11). Azonban az egyes CD46 izoformák koexpressziójához eddig nem sikerült specifikus immunológiai funkciót (inkább fenotípust) vagy egyértelmű betegség-asszociációt kapcsolni (6, 11). Egyes meg nem erősített tanulmányok mégis felvetették a CD46 potenciális etiológiai szerepét a HUS (haemolyticus uraemias syndrome) és a testicularis infertilitás patogenezisében (6, 11).

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján felvetette a CD46 potenciális szerepét az otosclerosis patogenezisében: 2008-ban Karosi és mtsai négy új otosclerosis-asszociált CD46 mRNS variánst írtak le, azonban az mRNS-ről transzlálódott fehérjék létezéséről eddig nem született megerősítő kísérletes adat, illetve közlemény (6). Jelen tanulmányunk a CD46-fehérje izoformák koexpressziós mintázatát vizsgálja a szövettanilag igazolt otosclerosisos, nem-otosclerosisos és normális stapes mintákban annak érdekében, hogy igazoljuk a CD46-típusú kanyaróvírusreceptorok szervspecifikus és otosclerosis-asszociált alternatív splicing mechanizmusát, amely az otosclerosis genetikai hátterének alapjául szolgálhat.

## Anyagok és módszerek

### A betegek és a kontroll minták

Tanulmányunkban összesen 166 stapes talp mintát (férfiak=69, nők=97) vizsgáltunk (1. ábra). A vizsgálati csoportban 137



I. ábra: A tanulmány felépítésének vázlatos bemutatása

stapes minta ankyloticus volt, ezeket stapedectomy során távolítottuk el. A betegek átlagéletkora 41,7 év volt (életkor tartomány: 21–72 év). A vizsgálatban szereplő ankyloticus stapes talp mintákat egy nagyobb és folyamatosan bővülő mintacsoporthoz (n=419) válogattuk ki a szövettani diagnózisok áttekintését követően, annak érdekében, hogy a további vizsgálatok során az otosclerosis és a nem-otosclerosis stapes talpkból reprezentatív csoportokat alakíthassunk ki. A részlegesen eltávolított és összetört stapes talpakat kizártuk a tanulmányból, mert a fixációt eredményező elváltozást magukban foglaló elülső, illetve hátsó stapes talp pólusok az ovális ablakban maradtak. Azonban az összetört, de utólag teljes mértékben rekonstruálható stapes talpak a tanulmányban maradtak. A hallócsontláncolati fixáció műtét előtti diagnózisát az otomikroszkópos vizsgálat negativitása, a tisztahang küszöbaudiometria és a tympanometria támasztotta alá. Az 1000 Hz-es frekvencián mért csont-léggöz minden esetben legalább 30 dB volt. Az érintett oldalra a Rinné-vizsgálat minden esetben negatív volt. A klinikailag stapes fixációnak imponáló esetekben, a preoperatív tympanometria a mérések 67,4%-ában As-, míg 32,6%-ában A-típusú tympanogramot eredményezett. Tizennyolc beteg esetén, a műtét előtt nagyfelbontású CT-vizsgálatot (High Resolution Computed Tomography, HRCT) végeztünk, amely 11 esetben a stapes talp megvastagodását véleményezte, azonban nem igazolt az otosclerosisra jellemző hipodenzitást sem a stapes talpban, sem az oticus capsulában. Negatív kontrollként 29 cadaver stapes talp mintát állítottunk be, amelyeket eseménytelen fülészeti anamnézissel rendelkező elhunytakból távolítottunk el a temporális csontok disszekciója során (n=29, férfiak=18, nők=11). A negatív kontroll mintákat minden esetben a halál beálltát követő 20 órán belül távolítottuk el. A negatív kontrollok átlagéletkora 53,5 év volt (életkor tartomány: 49–69 év). A stapes mintákat (ankyloticus és kontroll) összességében 2008 januárja és 2009 márciusa között gyűjtöttük (DE OEC, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-nyaksebészeti Klinika; PTE ÁOK, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika; SZTE ÁOK, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika; Bajcsy-Zsilinszky Kórház, Fül-Orr-Gége Osztály). A vizsgálat elvégzését az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos Kutatásaitikai Bizottsága az 84-227/2008-1018EKU nyilvántartási számon engedélyezte. A vizsgálatot minden részletre kiterjedően a Helsinki Egyezmény (1975) emberi jogokra vonatkozó normáinak megfelelően végeztük el.

### Szövettani vizsgálat

A szövettani vizsgálatba bevont, összesen 166 stapes mintát a feldolgozásig  $-79^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékleten tároltuk, majd dekalcinálás történt: 0,5 M Na-EDTA oldat, amely 0,02% (w/v) nátrium-azidot tartalmazott (72 óra,  $4^{\circ}\text{C}$ ). A dekalcinált mintákat 15%-os (w/v) tisztított zselatinba ágyztuk (24 óra,  $56^{\circ}\text{C}$ ), majd 4%-os (w/v) paraformaldehid oldattal újrafixálást végeztünk (24 óra,  $20^{\circ}\text{C}$ ). A szövettani blokkokat krioprotekció céljából 20%-os (w/v) szacharóz oldatba helyeztük (2 óra,  $4^{\circ}\text{C}$ ), majd  $-25^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékleten, 10  $\mu\text{m}$  metszetvastagságot alkalmazva, lemetstettük (MNT-200, Slee, Mainz, Németország). Az így nyert úszó metszeteket 0,1 M, 0,03% (w/v) nátrium-azid tartalmú PBS-oldatban (Phosphate Buffered Saline) tároltuk  $4^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékleten. A szövettani metszeteket a továbbiakban minden minta esetén 3 párhuzamosan vizsgált csoportra osztottuk:

- hagyományos hematoxylin-eozin festés (HE),
- CD46-specifikus real-time RT-PCR,
- „poolozás” és CD46-specifikus western blot vizsgálat.

Az aktív és az inaktív otosclerosisos esetek szövettani megkülönböztetésére, a korábbiakban már részletesen leírt kritériumok

mellett, fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatot végeztünk. A szövettani vizsgálatok eredményeit két kutató egymástól függetlenül elemezte és véleményezte: Cs. P. elvégezte a HE-festést, majd a metszetekről előzetes véleményt adott, ezt követően K. T. áttekintette az előzetes leleteket és véglegesítette a szövettani diagnózisokat.

### RNS extrakció

A homogenizált úszó metszetekből (n=57) *TRI Reagent™* oldat segítségével, a gyártó utasításait betartva, a teljes RNS-tartalmat kivontuk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Egyesült Államok). A metszeteket desztillált vízzel alaposan átöblítettük annak érdekében, hogy eltávolíthassuk a formalint, a paraformaldehidet és az egyéb szennyeződések. Ezt követően a mintákat, folyékony nitrogénben fagyasztva, homogenizáltuk. A *Tri Reagent™* oldatot és a szuszpendált szerves anyagot összeráztuk (vortex), majd 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. A szuszpenziókhöz kloroformot adtunk (100  $\mu\text{l}$ ; Sigma-Aldrich), majd a mintákat ismételtén összeráztuk és további 10 percen keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk. A mintákat  $4^{\circ}\text{C}$ -on, 13.000/perc (rpm) fordulatszámon, 15 percig centrifugáltuk. A felső vizes fázist leszívtuk és eltávolítottuk. A mintákhoz ezután izopropanolt (250  $\mu\text{l}$ ; Sigma-Aldrich) adtunk és az RNS-t úgy precipitáltuk, hogy a szuszpenziókat egy éjszakán át  $-70^{\circ}\text{C}$ -os hőmérsékleten tároltuk. Ezt követően  $4^{\circ}\text{C}$ -on 30 percen keresztül ismételt centrifugálást végeztünk 13.000/perc (rpm) fordulatszámot alkalmazva. A centrifugacsövek fenekén megjelenő RNS-pelyheket (pellet) 70%-os (v/v) etanolal mostuk, majd meleg levegővel szárítottuk. A kiszáradt, víz- és alkoholmentes RNS-t 20  $\mu\text{l}$  dietilpirokarbonáttal kezelt (DEPC), hősterilizált, desztillált vízben újraoldottuk, majd azonnal elkezdtük a reverz transzkriptáz reakciót.

### CD46-specifikus real-time PCR

Az egyes CD46-variánsok egymáshoz viszonyított relatív expressziójának kvantifikációját real-time RT-PCR vizsgálattal végeztük el. A CD46-variánsok kimutatásához 2  $\mu\text{l}$  cDNS PCR amplimert (6) használtunk, amely végül 20  $\mu\text{l}$  reakcióterfogatot eredményezett a *TaqMan Gene Expression Master Mix™* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Egyesült Államok), ROX és 900 nM koncentrációjú specifikus-primer hozzáadásával. A real-time RT-PCR-t az *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System™* készülékén végeztük el. Az egyes ciklusok profílját a következő volt:

- előzetes denaturáció: 10 perc,  $95^{\circ}\text{C}$ ,
- 40 amplifikáció ciklus: 15 másodperc,  $94^{\circ}\text{C}$  denaturáció és 1 perc  $60^{\circ}\text{C}$  annealáció és extenzió, majd adatgyűjtés és automatikus leolvasás.

Az amplifikáció adatokat a *Software package 7500 System SDS Software RQ Study Application version 1.4.0.25™* (Applied Biosystems) számítógépes program segítségével elemeztük. A korábban leírt négy otosclerosis-specifikus CD46-variáns (6) kimutatása és elkülönítése végett a Q-PCR primereket és az MGB próbákat a *Primer Express Software for Real-Time PCR Version 3.0™* (Applied Biosystems) számítógépes program segítségével terveztük meg. A CD46-specifikus reakciókban ugyanazt a „forward” primert és próbát alkalmaztuk minden esetben (1. táblázat). A reverz primereket úgy terveztük, hogy a CD46 mRNS variábilis régiójának különböző exon határaihoz kapcsolódjanak, amelyek kizárólag az adott otosclerosis-specifikus variánsra jellemzőek (1. táblázat). Minden PCR reakció tripletben (3 párhuzamos reakció) történt. Az abszorbanciaváltozás (delta Ct) relatív kvantifikációját és a referenciagén (gapdh, MIM 138 400) expressziós adatainak normalizációját az SDS 1.4.0.25™ (Applied Biosystems) számítógépes program segítségével

I. táblázat: A CD46-specifikus real-time RT-PCR primerek jellemzői

Primer	Szekvencia 5'-3'	T <sub>m</sub> (°C) <sup>a</sup>	Célzott exon <sup>b</sup>	Kapcsolódási hely <sup>c</sup>
osfor (+)	CCTCGATGGCAGCGACA	59	6.	+1468 - +1485
os1rev (-)	TGTCGTTACTGGGTTTGTAGAAA	58.5	14.	+3351 - +3374
os2rev (-)	TGACGTTGAGGTTGTTGAAACCT	59.7	14.	+3367 - +3390
os3rev (-)	GGAGGAACTTCTATAGAAACCTTGA	58.4	14.	+3390 - +3416
os4rev (-)	GAGGTGGTAGACGAAAGGAAAC	59.7	14.	+3342 - +3365

<sup>a</sup>olvadási hőmérséklet

<sup>b</sup>a CD46 mRNS exonja

<sup>c</sup>a CD46 mRNS nukleotidja

gével végeztük el. Minden egyes stapes mintát két párhuzamos reakciós elegyben vizsgáltunk, emellett a cDNS-mentes negatív kontrollok elemzése is duplikátumban történt.

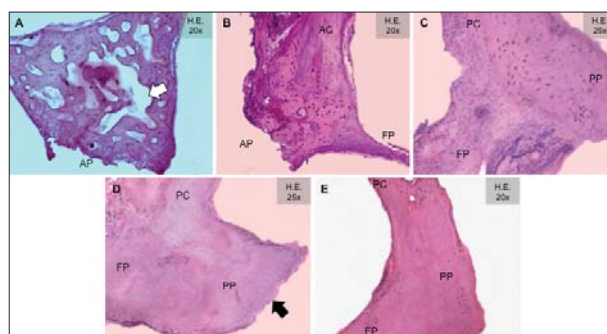
### CD46-specifikus Western blot

A szövettanilag vizsgált stapes minták harmadik sorozatát (n=109) három „poolozott”, tehát összesített csoportba osztottuk: otosclerosis csoport (n=50), nem-otosclerosis stapes fixációs csoport (n=42) és normális stapes talpak csoportja (n=17). A „poolozott” mintákat steril PBS pufferrel háromszor átmostuk annak érdekében, hogy eltávolíthassuk a western blotot zavaró szennyeződések. A tisztított mintákat folyékony nitrogénben porítottuk. Az elmorzsolts mintákat RIPA pufferben lizáltuk (150 mM NaCl, 1% [w/v] NP40, 50 mM Tris-HCl, 5% [w/v] Na-deoxikolat, 0,1% [w/v] SDS, 0,01% [w/v] nátrium-azid, 1 mM EDTA), amelyet EDTA-mentes Protease Inhibitor Cocktail™ (Roche, Basel, Svájc) hozzáadásával egészítettünk ki. A fehérjekoncentrációt Bradford-reagens segítségével határoztuk meg. A teljes fehérje extraktumokat (10-15 µg) SDS „loading” pufferben forraltuk, majd 7% (w/v) SDS-poliakrilamid gélek elektroforézis során (SDS-PAGE) szeparáltuk. A szeparátumokat elektroblot során nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat 5%-os (w/v) zsírszegény tejpor oldattal blokkoltuk, amit előzetesen Tris-pufferelt sós Tween-oldatban szuszpendáltunk (TBST: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% [w/v] Tween20; pH=7,9). A blottolt fehérjéket anti-CD46 (1:200; R&D Systems, Minneapolis, MN, Egyesült Államok) és anti-β-actin (1:1000; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Németország) antitestekkel azonosítottuk. Az elsődleges antitesteket 5%-os (w/v) zsírszegény tejpor TBST-s oldatában szuszpendáltuk. A blottolt nitrocellulóz membránokat 3 alkalommal TBST pufferrel mostuk, majd torna-peroxidáz (HRP, Horse Radish Peroxidase)-jelölt másodlagos szamár (R&D Systems) és kecske (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, Egyesült Államok) antitestek 1:1000 koncentrációjú oldatával inkubáltuk. A nitrocellulóz membránokat ismételtelen mostuk, majd Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate™ (Pierce, Rockford, IL, Egyesült Államok) oldattal kezeltük. Az előhívás röntgenfilmre történt (Kodak, London, Egyesült Királyság). A CD46-specifikus western blot pozitív kontrolljaként THP-1, C33A és HeLa sejtvonalakat alkalmaztunk.

### Eredmények

Az ankyloticus stapes talpak között 77 esetben (56,2%) szövettanilag is igazoltuk az otosclerosisos góc jelenlétét (2. ábra). A fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján, szövettanilag 51 (66,23%) aktív és 26 (33,76%) inaktív otosclerosisist

találtunk (2. ábra). Az aktív otosclerosisist megvastagodott és deformált stapes talp jellemezte, amelyen belül a cementvonalak szabálytalan, fonatos és örvénylő szerkezetet mutattak. Ezekben az esetekben az otosclerosisos góc festődése kifejezetten bazofil volt. A csontalapállományban hipervaszkuarizáció, számos többmagvú osteoclast, hipercelluláris fibrózus stroma és nagyszámú, felfújtt, szabálytalan alakú osteoblast volt jelen (2. ábra). Az inaktív otosclerosisist eozinofil festődés és elsősorban lamellaris cementvonal-elrendeződés jellemezte. Az osteoclastok teljesen, az osteoblastok nagyrészt hiányoztak, a vaszkuláris és pszeudovaszkuláris úrok eltűntek (2. ábra). A 60 (43,8%) nem-otosclerosisos stapes fixáció esetén, a szövettani vizsgálat egyrészt ún. annularis calcificatiót (n=57, 95%), másrészt lokalizált haemosiderosist (n=3,5%) igazolt (2. ábra).



2. ábra: Ankyloticus és normális stapes minták szövettani vizsgálata (HE)

- A: Aktív, obliteratív otosclerosis. A pszeudovaszkuláris tereteket fehér nyíl jelöli.
- B: Inaktív otosclerosisos góc a stapes talp elülső pólusában.
- C: Haemosiderosis a stapes talp hátsó pólusában.
- D: Annularis calcificatio. A stapes talp megvastagodott, a hátsó pólus szögletes törési vonalat mutat (fekete nyíl).
- E: Normális stapes. Rövidítések: AP: elülső pólus, PP: hátsó pólus, AC: elülső szár, PC: hátsó szár, FP: stapes talp

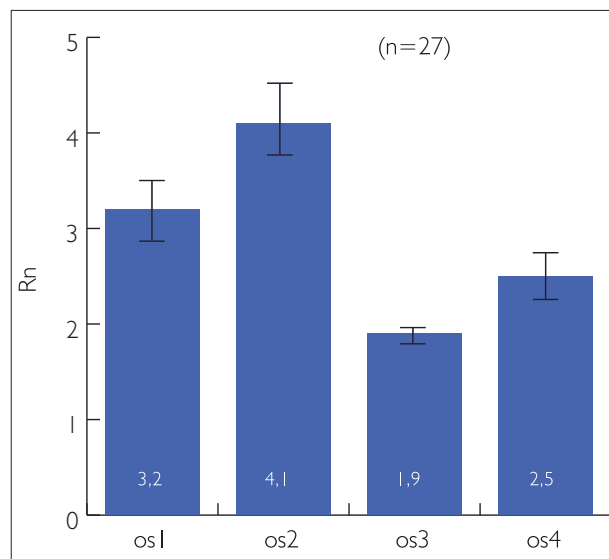
Az új CD46-variánsok expressziós mintázatának összehasonlító elemzése során azt találtuk, hogy az os1-4 mRNS variánsok kizárólag a szövettanilag is megerősített otosclerosisos stapes talpakban fejeződnek ki, ennek megfelelően otosclerosis-specifikusnak tekinthetőek (3. ábra). A negatív kontrollként alkalmazott normális stapes talpakban és a nem-otosclerosisos stapes mintákban nem találtunk os1-4 mRNS expressziót. Az új variánsok között az os2 rendelkezett a legnagyobb átlagos kópiaszámmal (expressziós szinttel), amelyet csökkenő sorrendben az os1, os4 és végül az os3 mRNS-variánsok követtek (3. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy az otosclerosis-specifikus CD46-variánsok egy-

máshoz viszonyított expressziós szintje és mintázata az egyes mintákban relatíve állandó volt és nem függött az otosclerosis szövettani aktivitásától.

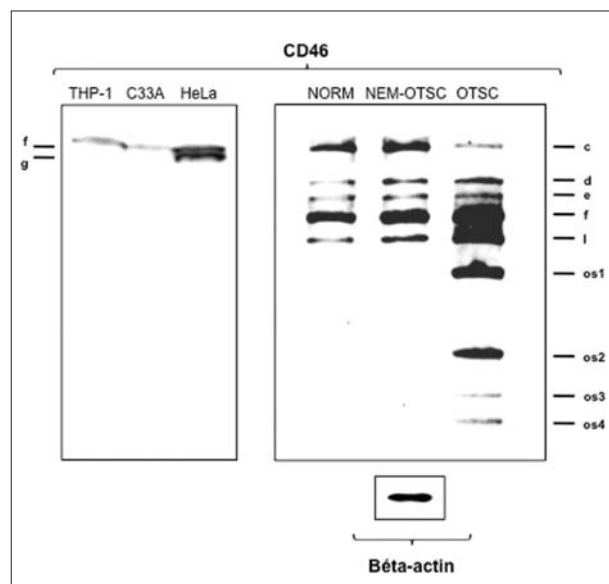
A western blot analízis során a normális (n=17) és a nem-otosclerosisos stapes talpakban (n=42) csak a CD46 konvencionálisan transzlálódó fehérje izoformákat (c [89 kDa], d [78 kDa], e [61 kDa], f [51 kDa] és l [37 kDa]) sikerült kimutatnunk (4. ábra). Ezzel szemben, az otosclerosisos stapes mintákban (n=50) további négy CD46 izoformát azonosítottunk: os1, os2, os3 és os4 (27 kDa, 20 kDa, 17 kDa és 14 kDa) (4. ábra). Az os1-4 izoformák western blot alapján becült molekulatömege pontos korrelációt adott az előző tanulmányunkban kimutatott otosclerosis-specifikus mRNS-variánsok szekvencia adatai alapján számított várható molekulatömegekkel (6).

### Megbeszélés

Az otosclerosis genetikai meghatározottságát az elmúlt évtizedekben több tanulmány is felvetette, de eddig nem sikerült egyetlen célgént, illetve otosclerosis-specifikus genetikai mutációt sem azonosítani (3, 10, 15). Korábban több tanulmány is bemutatott populációs szintű genetikai asszociációkat, olyan betegcsoportokban, illetve családokban, akik klinikai otosclerosisban, pontosabban stapes fixációban szenvedtek (10, 15). Noha a betegek sok esetben átestek stapeditomián, a stapes talpak szövettani vizsgálata technikai okból egyetlen esetben sem történt meg, ezért ezen tanulmányok nem specifikusak sem az otosclerosisra, sem a nem-otosclerosisos stapes fixációkra nézve (10, 15). A halmozottan előforduló stapes fixációban szenvedő családokban és a nem válogatott nagy populációkban végzett genetikai tanulmányok és génasszociációs vizsgálatok autoszomális domináns öröklésmenetet találtak, ahol a betegség penetranciája inkomplett és kb. 40-45%-ra tehető (10, 15). A genetikai kapcsoltságot vizsgáló tanulmányok eddig nyolc „otosclerosis-specifikus” lókuszt találtak: OTSC1-OTSC8, amelyek rendre a 15q, 7q, 6p, 16q, 3q, 6q és 9p kromoszómákon helyezkednek el (3, 10, 15). Annak ellenére, hogy ezeket a kromoszómarégiókat feltérképezték és szekvenálták, az otosclerosisos csontátépüléssel ok-okozati kapcsolatban lévő géneket, illetve fehérjetermékeket nem sikerült azonosítani, sőt a lókuszek egy része nem kódoló régiót érintett (3, 10, 15). A későbbi tanulmányok már túlmutattak a génasszociációs, illetve kapcsoltsági vizsgálatokon és konkrét, néha meglehetősen egzotikus géneket vettek célba: COL1A1 (I-típusú kollagén A1 allél), COL1A2 (I-típusú kollagén A2 allél), BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2), BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4), TGFB1 (Transforming Growth Factor Beta 1) és RELN (16, 17, 18, 19). Később igazolódt, hogy ezek a gének nem játszanak közvetlen etiológiai szerepet az otosclerosis kialakulásában, azonban az otosclerosisos csontátépülés különböző szakaszaiban fehérjetermékeiknek fontos szabályozó szerepe lehet (16, 17, 18, 19). Összefoglalva, a korábban leírt genetikai asszociációk és „otosclerosis-specifikus” gének nem adnak magyarázatot az otosclerosis sajátos jellemvonásaira, mint a specifikus emberi betegség, a női dominancia, a felnőttkori betegségkezdés, a szervspecifitás és a gyulladási csontremodellációs zavar (3, 4). Korábbi eredményeink alapján, egy aktív otosclerosisos góccs átlagos élettartama kb. 5-7 év lehet a szövettani inaktivációig, ezért egy dinamikus genetikai modell szükséges ezen „gyógyulási” folyamat magyarázatára (20). Az otosclerosis patogenezisében bizonyított szerepet játszó T-sejtek, gyulladási citokinek, illetve egyéb csontanyagcsere-mediátorok a fentiekén túl felvetik az autoimmun-gyulladásos folyamat lehetőségét is, amely a maga komplexitásában hasonlóan komplex magyarázatot igényel (3, 20).



3. ábra: CD46-specifikus real-time RT-PCR. Az otosclerosis asszociált CD46 splicing mRNS-variánsok relatív expressziós szintjeinek átlaga otosclerosisos stapes talpakban. A szórásvonalak a standard hiba medián értékét jelölik



4. ábra: A CD46-fehérje expressziós mintázatának western blot analízise a stapes talp minták különböző szövettani csoportjaiban. A CD46 expresszió és a western blot vizsgálat kontrolljaként alkalmazott THP-1, C33A és HeLa sejtvonalakat az f-variáns kizárólagos, (THP-1, C33A) valamint az f- és g-variánsok (HeLa) együttes expressziója jellemezte. A béta-aktint a CD46-variánsok koexpressziójának „housekeeping” kontrolljaként használtuk minden egyes stapes talp csoportban. Fehérjeszinten a normális és a nem-otosclerosisos stapes talpakat a c-, d-, e-, f- és l-izoformák együttes expressziója jellemezte. Ezzel szemben, a szövettanilag is megerősített otosclerosisos stapes talpakban a fentiekén kívül, négy új fehérje izoformát mutattunk ki (os1-4)

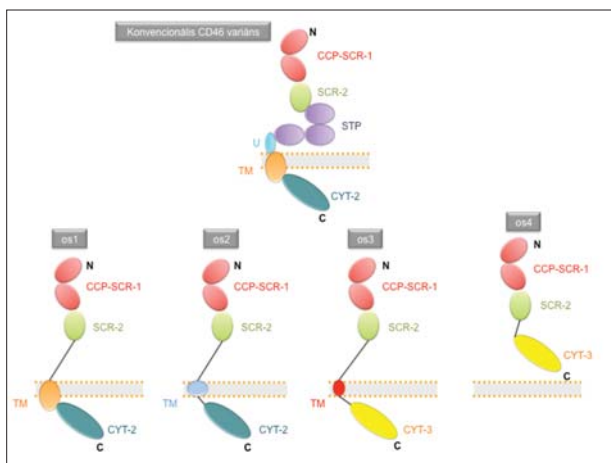
Az otosclerosis csontátépülési zavarnak jelenleg sincs állatmodellje, amelynek egyik oka az, hogy a gerincesek (*vertebratae*), illetve ezen belül az emlősök (*mammaliae*) nem rendelkeznek kanyaróvírusreceptorokkal (3, 4). A kanyaróvírust morfológiailag – és molekuláris biológiai módszerekkel – genomikus szinten is kimutatták az otosclerosis góccokban (8, 9). Ezek a megfigyelések hívták fel kutatócsoportunk figyelmét a CD46 molekulára, amely a kanyaróvírus általános, és kizárólag az emberben kifejeződő receptora (6, 11, 12). Az CD46 izoformák sajátos koexpressziós mintázatával kapcsolatban még nem sikerült egyetlen betegséget sem azonosítani. Újabb tanulmányok azonban felvetik a CD46 etiológiai szerepét a HUS (haemolyticus uraemiás szindróma) és a testicularis infertilitás patogenezisében is (11, 12). Az otosclerosis összetett és dinamikus genetikai modelljének alapját a CD46 splicing variánsok változatos expressziós mintázatának lehetősége képezi (6). Korábbi eredmények alapján úgy tűnik, hogy ez a változatos expressziós mintázat az otosclerosis esetén nagyon is állandó és a jól ismert variánsok mellett, betegségspecifikus variánsok megjelenése is jellemzi (6). Az mRNS szekvencia adatokkal összevetve, az újonnan leírt CD46-fehérje izoformákat rövidebb vagy hiányzó transzmembrán domén és szokatlan citoplazmatikus domének jellemzik, azonban a víruskötő domének változatlanok maradnak (6) (5. ábra). A CD46 fehérjemolekula transzmembrán és szolubilis izoformáit mind az emberben, mind a CD46 transzgenikus egerekben leírták (6, 11, 12). A szolubilis izoformák létrejöttében azonban a transzgenikus egerek és az ember között jelentős különbség mutatkozik (11, 12). Az egérben egy alternatív úton kivágódó mRNS exon hiánya teszi lehetővé a szolubilis citoplazmatikus variáns expresszióját, ezzel szemben az emberben a szolubilis CD46 izoformát csak fehérjedegradációs terméknek tekintik, amelynek nincs genetikai alapja (11). Tanulmányunk egyik érdekessége, hogy felveti a szolubilis os4 CD46 izoforma alternatív splicing úton történő létrejöttének lehetőségét (3., 5. ábra). A transzmembrán és a citoplazmatikus szignáltranszdukciós domének szintjén létrejövő változások valószínűleg (nem bizonyítottan) érintik a jelátviteli folyamatokat is, amelyek magyarázhatják a kanyaróvírus perzisztáló – és lényegében zavartalan – replikációját (lassúvírus fertőzés).

A kanyaróvírus-ellenes szérumban IgG-szint jellemzően csökkent otosclerosisban, amely a humorális immunválasz egy szegmensének latenciájára utalhat (6, 7). Mindez független a védőoltástól vagy korábbi kanyaróvírusfertőzéstől. A fenti jellemvonást legáltalában magyarázhatja az otosclerosis-specifikus CD46 izoformák szervspecifikus kifejeződése (6, 7). Úgy gondoljuk,

hogy a CD46 új variánsai a szignáltranszdukció szintjén lehetővé teszik a kanyaróvírus sejtekbe történő internalizációját anélkül, hogy aktiválódna a TCR-dependens (TCR: T-cell Receptor; T-sejt receptor) CD4+ T-helper-sejt útvonal és a következményes B-sejt dependens immunoglobulinválasz (6, 7, 11, 12). A fentiekben túl azt is feltételezzük, hogy az otosclerosis patogenezisének egyik legfontosabb eleme az a következményes autoimmun gyulladásos reakció, amelyet a kanyaróvírus antigének az új CD46 variánsokhoz kötődve közvetítenek a természetes ölősejtek (NK-sejtek) és a CD8+ T-sejtek aktivációja révén (6, 11, 12). Ebben a folyamatban számos gyulladásos citokin (TNF-alfa, IL-1, TGF- $\beta$ ) és csontspecifikus szabályozó fehérje (osteoprotegerin, BMP) rendkívül fontos, de a betegség lényegét tekintve csak másodlagos szerepet játszik (4, 17, 18, 20).

Azok a fehérjék, amelyek különböző splicing izoformákban expresszálódnak, képesek utánozni a hagyományosan elfogadott, szabályos Mendeli-öröklésmenetet (3, 6, 10, 11). Az otosclerosis családirag halmozódó és inkomplett penetranciával jellemzett, autoszomális domináns öröklésmenetet mutató eseteit genetikailag magyarázhatja a CD46-típusú kanyaróvírusreceptorok oticus capsulán belüli betegségspecifikus alternatív splicingja (10, 15). Eredményeink ugyanakkor felvetnek egy jelenleg nehezen megválaszolható kérdést: vajon a kanyaróvírusfertőzés maga indukálja az új CD46-variánsok megjelenését vagy a már létező (és a betegségre hajlamosító) új variánsok teszik lehetővé a vírussal szembeni szervspecifikus fogékonyságot és a sajátos lassúvírusfertőzést (6, 11, 12)? A válasz nagy valószínűséggel a génextpressziót és az alternatív splicingot szabályozó fehérjék expressziójában rejlik, amelyek egyedileg teszik lehetővé (metiláció, acetiláció stb.) a CD46 új variánsainak otosclerosisban tapasztalt kifejeződését (4, 6, 11, 12). A kérdés megválaszolása természetesen számos további vizsgálatot igényel a jövőben.

Összefoglalva, szoros összefüggést találtunk az új CD46-fehérje izoformák expressziója és a szövettanilag megerősített otosclerosis között. Jelen eredményeink összhangban állnak a korábban már mRNS szinten közölt adatokkal: az új fehérje izoformák becsült molekulatömege megegyezik a szekvenenciaanalízisből számított, várt molekulatömeg értékekkel (6). Hangsúlyozzuk azonban, hogy tanulmányunk *deskriptív jellegű*, ezért jelenleg nem bizonyítja, hogy az otosclerosis vírus-asszociált patogenezisében az újonnan leírt CD46 izoformák oki szerepet játszanának. Hipotézisünk, miszerint a CD46 izoformák szervspecifikus alternatív splicingja és betegségspecifikus expressziós mintázata jelenti az otosclerosis genetikai alapját, további bizonyítást igényel.



5. ábra: A konvencionális és a négy új otosclerosis-asszociált CD46-variáns vázlatos szerkezete

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk dr. Liktör Bálint Főorvos Úrnak és dr. Z. Szabó László professzor úrnak (Bajcsy-Zsilinszky Kórház, Fül-Orr-Gége Osztály, Budapest), dr. Pytel József professzor úrnak (PTE, ÁOK, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, Pécs) és végül, de nem utolsósorban dr. Jóri József professzor úrnak (SZTE, ÁOK, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, Szeged) a stapes minták gyűjtése során nyújtott önzetlen segítségükért.

Munkánk az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA PD75371, K81480, OTKA-NKTH K68476) és a Debreceni Egyetem Mecenatúra Pályázatának (DE OEC Mec 17/2008) anyagi támogatásával készült.

Rövidítések: N: a CD46-fehérje N-terminálisa, C: A CD46-fehérje C-terminálisa, CCP: Complement Control Protein Region, SCR-1 és SCR-2: Short Consensus Repeats 1 és 2, STP: Serine-Threonine-Proline Rich Region, U: Region of Unknown Significance, TM: Transzmembrán domén, CYT2 és CYT3: 2-es és 3-as citoplazmatikus domén.

## Irodalom

1. Schuknecht HF, Barber W. Histologic variants in otosclerosis. *Laryngoscope* 1985; 95: 1307–1317.
2. Declau F, Van Spaendonck M, Timmermans JP et al. Prevalence of otosclerosis in an unselected series of temporal bones. *Otol Neurotol* 2001; 22: 596–602.
3. Karosi T, Szekanez Z, Sziklai I. Otosclerosis: an autoimmune disease? *Autoimmun Rev* 2009; 9: 95–101.
4. Chole RA, McKenna M. Pathophysiology of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2001; 22: 249–257.
5. Linthicum FH. Histopathology of otosclerosis. *Otolaryngol Clin North Am* 1993; 26: 335–352.
6. Karosi T, Szalmas A, Csomor P, et al. Disease-associated novel CD46 splicing variants and pathologic bone remodeling in otosclerosis. *Laryngoscope* 2008; 118: 1669–1676.
7. Karosi T, Konya J, Petko M, et al. Antimeasles immunoglobulin G for serologic diagnosis of otosclerotic hearing loss. *Laryngoscope* 2006; 116: 488–493.
8. McKenna MJ, Mills BG, Galey FR, et al. Filamentous structures morphologically similar to viral nucleocapsids in otosclerotic lesions in two patients. *Am J Otol* 1986; 7: 25–28.
9. Arnold W, Friedmann I. Otosclerosis - an inflammatory disease of the otic capsule of viral aetiology? *J Laryngol Otol* 1988; 102: 865–871.
10. Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, De Leenheer EM, et al. Otosclerosis: a genetically heterogeneous disease involving at least three different genes. *Bone* 2002; 30: 624–630.
11. Dhiman N, Jacobson RM, Poland GA. Measles virus receptors: SLAM and CD46. *Rev Med Virol* 2004; 14: 217–229.
12. Karp CL, Wysocka M, Wahl LM, et al. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* 1996; 273: 228–231.
13. Kawano M, Seya T, Koni I, et al. Elevated serum levels of soluble membrane cofactor protein (CD46, MCP) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 542–546.
14. Lanteri MB, Powell MS, Christiansen D, et al. Inhibition of hyperacute transplant rejection by soluble proteins with the functional domains of CD46 and FcγRIII. *Transplantation* 2000; 69: 1128–1136.
15. Bel Hadj Ali I, Thys M, Beltaief N, et al. A new locus for otosclerosis, OTSC8, maps to the pericentromeric region of chromosome 9. *Hum Genet* 2008; 123: 267–272.
16. Chen W, Meyer NC, McKenna MJ, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 regulatory regions are associated with otosclerosis. *Clin Genet* 2007; 71: 406–414.
17. Schrauwen I, Thys M, Vanderstraeten K, et al. Association of bone morphogenetic proteins with otosclerosis. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 507–516.
18. Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, et al. The coding polymorphism T263I in TGF-β1 is associated with otosclerosis in two independent populations. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 2021–2030.
19. Schrauwen I, Ealy M, Huentelman MJ, et al. A genome-wide analysis identifies genetic variants in the RELN gene associated with otosclerosis. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 328–338.
20. Csomor P, Sziklai I, Karosi T. TNF-α receptor expression correlates with histologic activity of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2009; 30: 1131–1137.