



Nincs bizonyíték a COL1A1 és A2 allélek kóros expressziójára otosclerosisban

Csomor Péter dr.¹, Liktör Balázs dr.², Liktör Bálint dr.², Sziklai István dr.¹, Karosi Tamás dr.¹

¹DEOEC, FÜL-ORR-GÉGÉSZETI ÉS FEJ-NYAKSEBÉSZETI KLINIKA, DEBRECEN

²BAJCSY-ZSILINSZKY KÓRHÁZ, FÜL-ORR-GÉGE OSZTÁLY, BUDAPEST

ÖSSZEFOGLALÁS

Az otosclerosis az emberi otikus kapszula komplex csontremodellációs zavara, amely kapcsolatba hozható az I-es típusú kollagén A1 és A2 alléljeinek különféle mutációival. Az alábbiakban prezentált tanulmány az I-es típusú kollagén lehetséges közreműködését vizsgálja a szövettanilag igazolt otosclerosis patogenezésében. Összesen 55 ankylotikus stapedalpat, negatív kontrollként használt kortikális csontfragmentumokat (n=30) és hallócsont mintákat (n=5) dolgoztunk fel. A csontokat két csoportra osztottuk, amelyek közül az elsőt COL1A1 és A2 specifikus RT-PCR-rel vizsgáltuk. Ezalatt a második csoportot hagyományos hematoxylin-eosin (H.E.) festéssel és I-es típusú kollagén-specifikus immunfluoreszcens próbával (IFA) analizáltuk. Az otoszklerotikus (n=31) és nem-otoszklerotikus (n=9) stapedalpat, valamint a kortikális csontok (n=20), incus (n=2) és malleus (n=1) minták IFA vizsgálata szabályos és egymáshoz kifejezetten hasonló A1 és A2 allél expressziós mintázatot mutatott. Az RT-PCR analízis az összes minta mindkét alléljében normális mennyiségű és konzisztens mRNA expressziót tárt fel. A COL1A1/A2 allélek expressziós szintjei és mintázatai nem korrelálnak szignifikáns módon az otosclerosis szövettani diagnózisával. Az I-es típusú kollagén egy evolúciónálisan változatlan struktúrféherje, amely alapvető szerepet játszik a különböző kötőszövetek integritásában. Az A1 és A2 allélek mutációi a csontváz, a bőr és az inak súlyos szisztémás zavarát idézik elő. Azonban az otosclerosis egy szervspecifikus betegség, így nehezen magyarázható a genetikai kapcsolat az I-es típusú kollagénnel. Összegzésképpen megállapítható, hogy nem találtunk bizonyítékot az otosclerosis és a COL1A1/A2 allélek feltételezett kapcsolatának alátámasztására.

KULCSSZAVAK

COL1A1, COL1A2, SZÖVETTAN, IMMUNFLUORESCENS PRÓBA, OTOSCLEROSIS, RT-PCR

There is no evidence of abnormal expression of COL1A1, COL1A2 alleles in otosclerosis

SUMMARY

Otosclerosis is a complex bone remodeling disorder of the human otic capsule that might be associated to various mutations of A1 and A2 alleles of type-I collagen. This study herein presented, investigates the possibility of the genetic involvement of type-I collagen in the pathogenesis of histologically confirmed otosclerosis. A total of 55 ankylotic stapes footplates were analyzed. Cortical bone fragments (n=30), incus (n=3) and malleus (n=2) specimens were employed as negative controls. Specimens were divided into two groups. The first group was processed to conventional hematoxylin-eosin (H.E.) staining and type-I collagen-specific immunofluorescent assay (IFA), while the second group was examined by COL1A1 and A2-specific RT-PCR. Otosclerotic (n=31) and non-otosclerotic stapes footplates (n=9) as well as cortical bones (n=20), incus (n=2) and malleus specimens (n=1) showed normal and quite similar A1 and A2 allele expression confirmed by IFA. RT-PCR analysis revealed normal and consistent mRNA expression of both alleles in each specimen. Expression levels and patterns of COL1A1/A2 alleles did not show significant correlation with the histological diagnosis of otosclerosis. Type-I collagen is a highly conserved structure protein, which plays a fundamental role in the integrity of various connective tissues. Mutations of A1 and A2 alleles result in serious systemic disorders of the skeleton, tendons and skin. Since otosclerosis is an organ-specific disease, it is difficult to explain its genetic association with type-I collagen. In conclusion, we found no evidence supporting the putative link of COL1A1 and COL1A2 alleles with otosclerosis.

KEYWORDS

COL1A1, COL1A2, HISTOLOGY, IMMUNOFLUORESCENT ASSAY, OTOSCLEROSIS, RT-PCR

Levelező szerző:

Karosi Tamás dr.

DEOEC, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika
4032 Debrecen, Nagyterdei Krt. 98.

Telefon: +36/52-255-805, Fax: +36/52-255-809

Mobil: +36/20-969-0590

Web: www.fulorrggege.deoec.hu, www.rcmm.dote.hu

E-mail: karositamás@gmail.com

Az otosclerosis a humán otikus kapszula kórosan megnövekedett csontátépülésével járó betegség, amely a kaukázusi rasszban aránylag gyakran (0,3-0,4%) okoz hallászavart (1-3). Korábbi megfigyelések alapján a vezetékes halláscsökkenéshez vezető stapes ankylosis esetek körülbelül kétharmadát képviseli otosclerosis (4). A klinikai tünetek manifesztációja nélküli (hisztológiai) otosclerosis sokkal gyakrabban fordul elő: széles körű körbonctani vizsgálatok tanúsága szerint 8-11%-ban (5). Az otoszklerotikus fókuszok az otikus kapszulához tartozó stapedalpat-



hoz, a pericochleáris és a perilabyrinth csonthoz kifejezett organotropizmust mutatnak. Az emberi fülön kívül otosclerosis-szerű csontlézióról még nem számoltak be az irodalomban (1, 2). Az otosclerosis kialakulásának magyarázatoként számos hipotézis vet fel virális, autoimmun és genetikai faktorokat, azonban a betegség etiopatogenezise mindmáig tisztázatlan (6–8).

Az utóbbi évtizedekben megannyi genetikai hajlamossító faktorról tudósítottak (8, 9). Kapcsoltsági tanulmányok tíz otosclerosis-asszociált lókuszt (OTSCI-10) meglétét bizonyították, amelyeket feltérképezésük után az otosclerosis hoztak összefüggésbe, annak ellenére, hogy specifikus gén vagy fehérje nem került felismerésre (10–12). Felvetődött azonban, hogy a COL1A1 (I-es típusú kollagén A1 allélje), COL1A2 (I-es típusú kollagén A2 allélje), BMP2, 4 és 7 (bone morphogenetic protein 2, 4 és 7), TGF- β 1 (transforming growth factor-beta 1), CD46 (kanyaróvírus receptor) és RELN (Reelin) gének is közreműködhetnek az otosclerosis kifejlődésében (13–17). A fent említett genetikai asszociációkkal képtelenség magyarázni a női dominanciát, a felnőttkori kezdetet, a szervspecifitást és a gyulladásos csontátépülési zavart (1, 2).

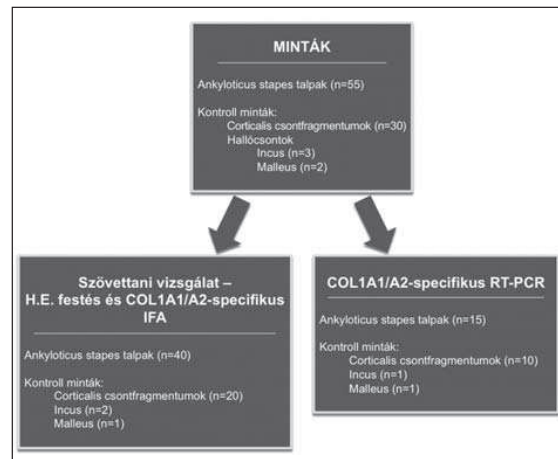
Az otosclerosis kollagén hipotézise az I-es típusú kollagén A1 és A2 alléljeinek promóter régióiban bekövetkező mutációin és SNP-in (egy pontos nukleotid-polimorfizmus) alapulnak (13, 18). A teória szerint az otosclerosis a humán otikus kapszulában korlátozottan manifesztálódó osteogenesis imperfectának vagy csonttrikulásnak tartják (13, 18, 19). Az A1 allél a 17-es kromoszómán helyezkedik el (17q21.33), és az I-es típusú kollagén pro-alpha-1 láncát kódoló két transzkripciósi variánsal is bír (20, 21). Az A2 allél kódolja a pro-alpha-2 láncot, amely a 7q22.1 lókusztban található. Az A2 allélnek három transzkripciósi variánsa létezik, amelyek váltakozó polyadenilációs szignálok eredményeképpen alakulnak ki (20–22). Az I-es típusú kollagén két alpha-1 és egy alpha-2 láncból álló hármas hélixet alkot (20). Az I-es típusú kollagén egy evolúciónálisan változatlan, fibrillumképző molekula, amely nélkülözhetetlen a csont, a bőr, az ínak és a cornea fiziológiás integritásához (20, 21). Jelen allélek mutációi kapcsolatban állnak az I-IV-es típusú osteogenesis imperfectával, a VIIA és VIIB típusú Ehlers–Danlos-szindrómával, a klasszikus típusú Ehlers–Danlos-szindrómával, idiopátiás osteoporosis-sal, atípusos Marfan-szindrómával és a Caffey-betegséggel (20, 21, 23). A 17-es (COL1A1) és 22-es – platelet-derived growth factor beta (PDGF- β) génje helyezkedik itt el – kromoszómák közötti reciprok transzlokációk a növekedési faktor fokozott és szabályozatlan expresszióját eredményezik, így szoros összefüggésben állnak a dermatofibrosarcoma protuberans-szal (24). Úgy tűnik, hogy az A2 allél izolált mutációi kevésbé súlyos tüneteket okoznak, mint az A1 allél. Ez is az alpha-1 és alpha-2 láncok különböző szerepét tükrözi az I-es típusú kollagén integritásában (20, 21).

Jelen beszámoló az I-es típusú kollagén A1 és A2 alléljeinek expressziós szintjeit és mintázatát vizsgálja humán ankylotikus stapestalpokban, hallócsontokban és kortikális csont-fragmentumokban, hogy tisztázhassa a COL1A1/A2 tényleges szerepét az otosclerosis patogenezisében.

Anyagok és módszerek

Betegek és kontroll minták

Az 1. ábra a tanulmány kivitelezésének tervét jeleníti meg. Stapedectomia során összesen 55 ankylotikus stapestalpat ($n=55$, nő=34, férfi=21) távolítottunk el analízis céljából. A páciensek átlagéletkora 39,47 évnél (23 és 71 év között) bizonyult. A hal-



1. ábra: A tanulmány felépítésének sematikus reprezentációja

lócsont-láncolati fixáció diagnózis klinikai, audiológiai és tympanometriai vizsgálatok alapján történt. Tisztahang audiometriával a csont-légtűz 1000 Hz-en legalább 30 dB-nek mutatkozott. A stapesfixációs esetek preoperatív tympanogramja 67,27%-ban „As” típusú és 32,73%-ban „A” típusú tympanogramot eredményezett. 23 esetben klinikailag bilaterális stapesfixáció állt fenn. Minden betegből csak 1 stapesmintát nyertünk, ugyanis a vizsgálati periódus lefolytatása alatt csak féldolali stapessebészet végezhető. A részlegesen eltávolított stapestalpakat nem vettük be a vizsgálatba, mert a mellső vagy a hátsó pólusban fixációt okozó lézió visszamaradhatott az ovális ablak fülkájában. A darabjaira tört, majd rekonstruált talpak nem lettek kizárva. A stapestalpak COL1A1/A2 expressziójának szövetspecifikus kontrolljaként 30 kortikális csontfragmentumot gyűjtöttünk össze a külső hallójáratból laterális atticotomia során, 3 incus és 2 malleus mintát távolítottunk el CWD mastoidectomia kapcsán. Minden kortikális csontminta stapes ankylosisban, míg minden hallócsont középfül cholesteatomában szenvedő betegből származik. Ezek a minták a stapestalpaknak nem igazi negatív kontrolljai, csupán a középfül más részeiben előforduló I-es típusú kollagén expressziót reprezentálják. A stapestalpak és a kontroll minták összegyűjtése 2009. december és 2011. február között zajlott (DE OEC Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, Debrecen, Magyarország; Bajcsy-Zsilinszky Kórház Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Osztály, Budapest, Magyarország). Minden páciens írásos tájékozott beleegyezését adta a tanulmányhoz. A Magyar Tudományos Kutatás Etikai Bizottsága (ETT-TUKEB/2008-113-547/89) és a Helyi Intézményi Etikai Tanács is jóváhagyta a vizsgálatot. A tanulmány a Helsinki Deklaráció etikai normái szerint ment végbe.

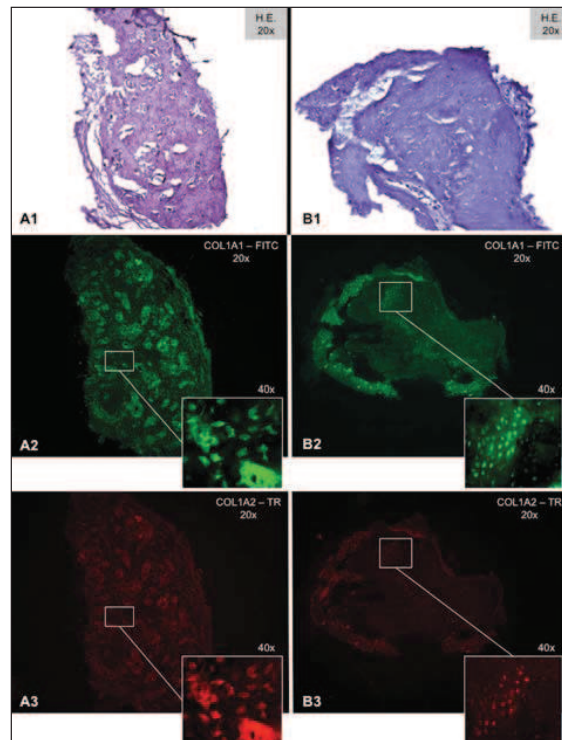
I-es típusú kollagén A1 és A2 allél specifikus real-time PCR (RT-PCR)

Az ankylotikus stapestalpak első sorozatát ($n=15$), kortikális csont ($n=10$), malleus ($n=1$) és incus ($n=1$) mintákat steril csövekben tároltuk -70°C -os hőmérsékleten (1. ábra). A szövetmintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, és steril, száraz gumicsészében porrá zúztuk. A porlasztott mintákat dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kezelt desztillált vízben oldottuk fel. A homogenizált szövetet tartalmazó oldatból a teljes RNS tartalmat TRI ReagentTM oldattal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

USA) vontuk ki a gyártó instrukciói alapján. A reverz transzkripciót 1 µg RNS-en 20 µl-es térfogatban High Capacity cDNA Reverse Transcription KitTM-tel végeztük hexagonális random primerekkel a gyártó utasítása szerint. A COL1A1/A2 specifikus primereket online Primer-BLASTTM szoftver (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) segítségével hoztuk létre, felhasználva a COL1A1 és COL1A2 transzkripció variánsainak mRNS szekvenciáit (COL1A1: NM_000088.3, GI: 110349771; és COL1A2: NM_000089.3, GI: 48762933). A COL1A1 és A2 mRNS 3' végét áthidaló RT-primereket (COL1A1for 5'-3': CCC TCC CCA GCC ACA AAG AGT CT, GC%=60,87, Tm=59,86, aC és COL1A1rev 5'-3': GGG TGA CTC TGA GCC GTC GG, GC%=70, Tm=58,88, aC; és COL1A2for 5'-3': GAG GGC GGA GGT ATG CAG ACA AC, GC%=60,87, Tm=59,33, aC és COL1A2rev 5'-3': TGG GTC ACC GGC GGA GGT ATC, GC%=66,67, Tm=60,04, aC) alkalmaztunk a cDNS PCR-ben (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A termék becslült mérete a COL1A1 esetében 348 bázispárnak, míg a COL1A2 tekintetében 374 bázispárnak mutatkozott. Az amplifikációs reakciót 25 µl-es térfogatban végeztük, ami 1 x PCR puffert, 1,5 mM MgCl₂-ot, minden dNTP-ből 100 µM-t, mindkét primerből 0,2 µM-t, 2,5 U AccuTaq LA DNA PolymeraseTM-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 2 µl cDNS-t tartalmazott. Az ideális PCR feltételekhez előzetesen 2 percig denaturáltunk 94°C-on. Ezt követően 35 ciklusban 15 másodperc denaturációt 94°C-on, 30 másodperc annealációt 60°C-on, 1 perc extenziót 68°C-on és a végső extenziót 5 percig 68°C-on végeztük. A negatív kontroll RT-PCR-ek minden kísérletben DNS-mentes vízzel készültek. Az így kivont RNS minták alkalmazását h36B4 + (5'-3': AGA TGC AGC AGA TCC GCA T) és h36B4 - (5'-3': ATA TGA GGC AGG AGT TTC TCC AG) primer humán riboszómális RNS használatával teszteltük. A humán riboszómális RNS specifikus háztartási kontroll RT-PCR-t minden mintánál elvégeztük.

I-es típusú kollagén A1 és A2 allél specifikus immunfluoreszcens próba (IFA)

Az ankylotikus stapesz talpak második sorozatát (n=40), kortikális csont-fragmentumokat (n=20), incus (n=2) és malleus (n=1) mintákat 10%-os (w/v) formalinban fixáltuk (1. ábra). A stapesz talpakat és a kontroll csontokat 0,02%-os (w/v) nátrium-azidot (72 h, 4 °C) tartalmazó 0,5 M-os Na-EDTA oldatban dekalciáltuk. A mintákat 15%-os (w/v) analitikai tisztaságú zselatinba ágyasztuk (24 h, 56 °C), majd 4%-os (w/v) paraformaldehid oldatban újrafixáltuk (24 h, 20 °C). A szövettani blokkok krioprotekciójáról 20%-os (w/v) szacharóz oldat (2 h, 4 °C) gondoskodott. A blokkokból -25 °C-on 10 µm vastagságú szeleteket metszettünk (MNT-200, Slee, Mainz, Németország). A szeleteket 0,1 M-os PBS (foszfát-pufferolt szaline) és 0,03%-os (w/v) nátrium-azide oldatban 4 °C-os hőmérsékleten tároltuk. Három egymást követő 10 µm vastagságú fagyasztott metszetet a következőképpen vizsgáltunk: (1) hematoxilin-eozin festés (H.E.); (2) COL1A1 specifikus (Fluorescein-isothiocyanate, FITC, zöld) és (3) COL1A2 specifikus (Texas Red, TR, piros) immunfluoreszcens próba (IFA). Az első metszeteket minden egyes mintából hagyományos H.E. festéssel dolgoztuk fel. A második és harmadik sorozatot minden egyes mintából átmostuk, és a fehérjéket számár normál szérumot (SC-2044, Santa Cruz, CA, USA) tartalmazó 0,2 M-os PBS oldattal blokkoltuk. A blokkolt metszeteket 1:200 poliklonális kecske anti-humán COL1A1 primer antitest oldattal (20 °C, 48 h, folyamatos rázás) (SC-8784, Santa Cruz, CA, USA) és 1:200 monoklonális egér anti-humán



2. ábra: A különböző szövettani aktivitású otosklerotikus léziók COL1A1 és A2 expressziójának immunfluoreszcens bemutatása

A1: Az otosclerosis aktív fókusza hypercelluláris oszteoid háttérrel és számtalan pszeudovaszkuláris térrel (H.E., jobb fül).
A2: Az előző metszet COL1A1 specifikus immunfluoreszcens festése (FITC). A léziót alkotó sejtek erős, granuláris COL1A1 specifikus immunreakciót adnak.
A3: A korábbi metszet COL1A2 specifikus immunfluoreszcens próbája (TR). Az oszteoblasztok és az oszteoklasztok intenzív alpha-2 lánc expressziót mutatnak.
B1: A stapesz talp hátsó pólusából származó inaktív otosklerotikus góc (H.E., jobb fül). A lézió hypocellularitással és üres halo sejtekkel írható le.
B2: Az előző metszet COL1A1 specifikus immunfluoreszcens festése. A léziót képző sejtek maradványai meglehetősen heves citoplazmatikus immunreakciót adnak.
B3: A COL1A2 specifikus immunreakció a korábbi metszethez hasonló mintázatú.

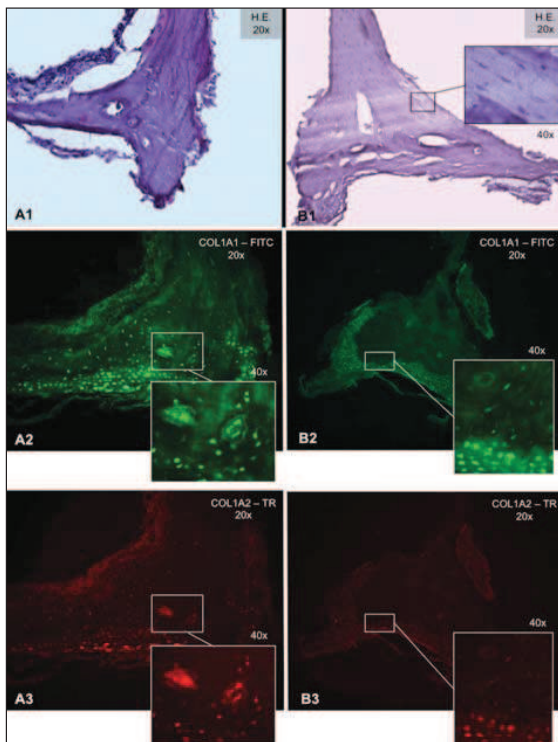
COL1A2 primer antitest oldattal (20 °C, 48 h, folyamatos rázás) (SC-166865, Santa Cruz, CA, USA) inkubáltuk. A primer antitesteket 0,2 M-os PBS-sel mostuk ki és 1:300 számár anti-kecske FITC-jelölt IgG oldattal (20 °C, 12 h, folyamatos rázás) (SC-2042, Santa Cruz, CA, USA) és 1:300 kecske anti-egér TR-jelölt IgG oldattal (20 °C, 12 h, folyamatos rázás) (SC-2983, Santa Cruz, CA, USA) inkubáltuk. A metszeteket UV-transzparens médiummal fedtük (VectashieldTM, Vector Laboratories, CA, USA). A képfeldolgozást 510 nm-es és 470 nm-es hullámhosszon, 69-87 ms-os expozíciós idővel, UV-fény alatt végeztük, és a fényképeket jpeg formátumban archiváltuk (Axioskop2 MOTTM, Axiovision 3.0TM, Zeiss, Jena, Németország). A szövettani vizsgálatokat két különböző kutató elemezte: C.P. a H.E. festéssel készült, míg K.T. az immunfluoreszcens módon előállított metszeteket értelmezte. Az otosclerosis szövettani aktivitásának vizsgálata a cellularitáson és a cement vonalak szerkezetén alapult a H.E. metszeten. Minthogy az otosclerosis multifokális betegség a stapediális lézió hisztopatológiai aktivitása nem felel meg teljes mérték-



1. táblázat: -+Az ankyloticus stapestalpak és a szövetspecifikus kontroll minták fehérje- és mRNS szintű COLIA1 és COLIA2 expressziója

Minták (n=90)	COLIA1 IFA*	COLIA2 IFA	COLIA1 RT-PCR	COLIA2 RT-PCR	CC RT-PCR**
Szövettani csoport					
Aktív otosclerosis (n=23)	++++	++++	n/a***	n/a	n/a
Inaktív otosclerosis (n=8)	+++	+++	n/a	n/a	n/a
Nem-otosclerosisos stapesfixáció (n=9)	++	++	n/a	n/a	n/a
Kortikális csont (n=20)	++	++	n/a	n/a	n/a
Incus (n=2)	++	++	n/a	n/a	n/a
Malleus (n=1)	++	++	n/a	n/a	n/a
RT-PCR csoport					
Ankylotikus stapestalp (n=15)	n/a	n/a	15	15	15
Kortikális csont (n=10)	n/a	n/a	10	10	10
Incus (n=1)	n/a	n/a	1	1	1
Malleus (n=1)	n/a	n/a	1	1	1

*Az immunfluoreszcens reakciók intenzitása (IFA): +: gyenge gyűrűszerű immunreaktivitás; ++: gyenge homogén immunreaktivitás; +++: erős homogén vagy gyenge szemcsézett immunreaktivitás; ++++: erős konfluáló és masszív szemcsézett reakció. **Sejt-kontroll (cellular control) RT-PCR. ***Nem áll rendelkezésre



3. ábra: A nem-otoszklerotikus stapesfixációk COLIA1 és A2 expressziójának immunfluoreszcens demonstrációja

A1: A stapestalp nem-otoszklerotikus, annuláris kalcifikációja hypocelluláris és sarkos hátsó pólussal (H.E., bal fül).
 A2: Az előző metszet COLIA1 specifikus immunfluoreszcens festése. Az oszteociták intenzív immunreakciót adnak.
 A3: A COLIA2 specifikus immunfluoreszcens próba hasonlóan erős immunreakciója.
 B1: A stapestalp nem-otoszklerotikus, annuláris kalcifikációja hypocelluláris oszteoiddal, sarkos és terjedelmes hátsó pólussal (H.E., jobb fül). Az apró beillesztett ábrák a normál oszteoid struktúra nagy nagyítású képei.
 B2: A korábbi metszet COLIA1 specifikus immunfluoreszcens festése. Az oszteociták és a hyalinporc réteg vesztibuláris felszíne intenzív citoplazmatikus festődésben nyilvánul meg (kis ábra).
 B3: A COLIA2 kifejezetten hasonló expressziós mintázatot mutat az oszteocitákban és a kondrocitákban.

ben az otosclerosis klinikai aktivitásának (1, 2). Az aktív otosclerosisist széles pszeudovaszkuláris terek jellemzik, amelyeket emelkedett számú és alakatlan oszteoklasztok töltenek ki. A cementvonalak fonott mintázatot mutatnak. Az inaktív otosclerosis eltömődött vaszkuláris terekkel és reszorpciós lakúnakkal definiálható, amelyek csökkent számú oszteoklasztot (üres halo sejtek) tartalmaznak. Az oszteoid szerkezet általában lemezes mintázatba rendeződik.

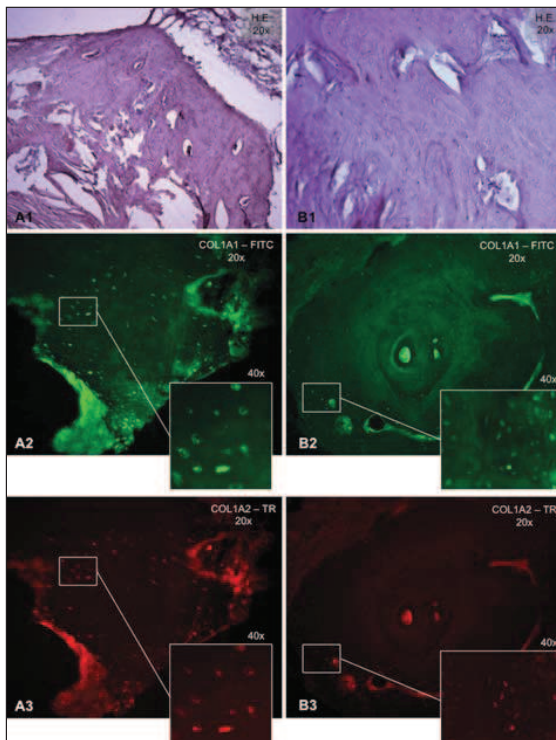
Eredmények

Ankylotikus stapestalpakat (n=55), kortikális csont-fragmentumokat (n=30) és hallócsontokat (n=5) egyenként analizáltunk COLIA1 és A2 specifikus RT-PCR-rel és immunfluoreszcens próbával (1. ábra). Hagyományos H.E. festéssel 31 esetben mutattunk ki otosclerosisist az ankylotikus stapestalpból (2. ábra; 1. táblázat). Ezek közül 23 stapestalpban az otoszklerotikus lézió aktívnak és 8 esetben inaktívnak mutatkozott (2. ábra; 1. táblázat). A 9 nem-otoszklerotikus stapestalp szövettani vizsgálata annuláris, stapediovestibuláris kalcifikációt tárt fel jellegzetes stapestalp megvastagodással (4) (3. ábra; 1. táblázat).

Az otoszklerotikus és a nem-otoszklerotikus stapestalpakban is normális mennyiségű és egyenletes eloszlású COLIA1 (alpha-1 lánc) és COLIA2 (alpha-2 lánc) expresszió figyelhető meg (2. és 3. ábra; 1. táblázat). Az alpha-1 és alpha-2 lánc specifikus immunreakció intenzitása teljesen függetlennek bizonyult a stapesfixáció szövettani diagnózisától. Az immunreaktivitás mértéke nem változott a stapes minták különböző részei között. A szuperstruktúrák, a talpak és a vesztibuláris felszínnek hyalinporc rétegei rendkívül hasonló expressziós mintázatot mutattak (2. és 3. ábra). A stapesfixáció negatív kontrolljaként igénybe vett kortikális csontok, incus és malleus minták átlagos I-es típusú kollagén expressziót reprezentáltak (4. ábra; 1. táblázat). A COLIA1/A2 allélek expressziós mintázata nem mutatott szignifikáns korrelációt az otosclerosis szövettani diagnózisával.

Humán sejtes RNS-t mutattunk ki 15 ankylotikus stapestalpban és az összes negatív kontrollban (n=12), alátámasztva ezzel az mRNS extrakciós folyamat optimális működését (5. ábra; 1. táblázat). Az A1 és A2 allél specifikus mRNS kimutatása minden stapes talp mintából sikerült RT-PCR-rel (5. ábra). A negatív





4. ábra: A csontspecifikus kontrollokban a COL1A1 és A2 expresszió immunfluoreszcens demonstrációja

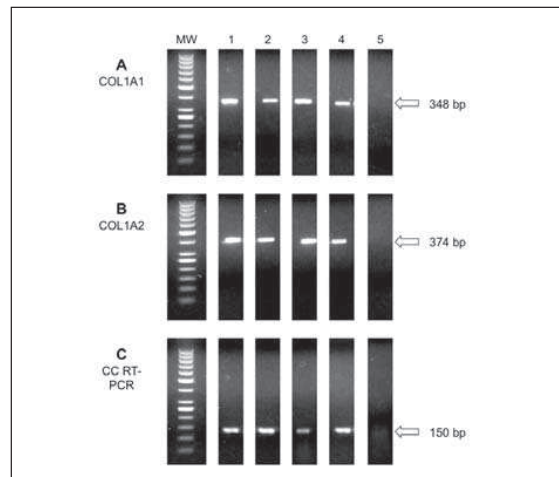
A1: Az incus teste normál szerkezetű cementvonalakat és ereket reprezentál (H.E., jobb fül). A2: Az előző metszet pozitív COL1A1 specifikus immunreakciója. A3: Az oszteociták intenzív COL1A2 specifikus immunfluoreszcens festést mutatnak.
B1: A külső hallójárat hátsó falából begyűjtött kortikális csont (H.E., bal fül). B2: A korábbi metszet pozitív COL1A1 specifikus immunreakciója. B3: Az oszteociták által normál módon expresszált I-es típusú kollagén alpha-2 láncának demonstrációja.

kontrollként használt kortikális és hallócsontok is normális COL1A1/A2 allél expressziót mutattak RT-PCR-rel (5. ábra).

Megbeszélés

Jelen tanulmány elkészítésének célja az I-es típusú kollagén és a COL1A1/A2-derivált mRNS szövetspecifikus expressziójának precíz leírása humán ankylotikus stapedalpakban. Számos vizsgálat számolt be az otosclerosis etiológiájára és az I-es típusú kollagén A1/A2 alléljeinek mutációi és SNP-i közötti lehetséges genetikai összefüggésről (25–27). Eredményeink valós értéke abban nyilvánul meg, hogy ezek a tanulmányok az otosclerosis diagnózisát az anamnézis és az audiológiai leletek alapján állították fel, a sebészileg eltávolított stapedalpak szövettani analízise nélkül (25–27). Ez gyaníthatóan a sebészeti technikával magyarázható, mivel a stapedotomia nem alkalmas módszer a fixációt okozó lézió kinyerésére.

Okvetlenül hangsúlyozandó, hogy az I-es típusú kollagén-specifikus immunfluoreszcens reakció pozitivitása független a különböző fajta stapes fixációk szövettani diagnózisától. Ezzel szemben teljes összhangot mutatott az oszteoid mátrix cellularitásával. Mivel az aktív otosclerosis megnövekedett számú oszteoblasztal és oszteoklasztal jellemezhető, az aktív fókuszok a legintenzívebb kollagén-specifikus immunreakciót reprezentálták.



5. ábra: Az RT-PCR amplimerok szeparációja agaróz gél-elektroforézissel

A: COL1A1 derivált mRNS RT-PCR amplifikációja ankylotikus stapedalpakban (1), kortikális csontfragmentumban (2), malleus (3) és incus (4) mintákban, amelyeket negatív kontrollként használtunk. Minden minta pozitív reakciót adott 348 bp-s amplimerre. Az RNS-negatív kontrollból (5) COL1A1 mRNS-t nem tudunk kimutatni.

B: A korábbi minták COL1A2 derivált mRNS-ének amplifikációja RT-PCR-rel. Minden minta pozitív reakciót mutatott 374 bp-s amplimerre. Az RNS negatív kontrollból COL1A2 mRNS-t nem tudunk kimutatni.

C: A korábbi minták sejtes kontrollja (CC) RT-PCR-rel. Minden minta pozitívítást jelzett humán riboszómális RNS-en (150bp). Az RNS negatív kontroll nem adott reakciót.

Úgy tűnik, hogy egy másik jelentős tényező a léziót képező sejtek metabolikus aktivitása. Érett, jól differenciált csontban az oszteociták elenyésző mennyiségű alpha-1 és alpha-2 láncot expresszálnak, mivel a csontremodelling majdnem teljesen hiányzik. Az otosclerosis aktív stádiumában a kórosan fokozott csontforgalom metabolikusan aktív oszteoblasztokkal és megnagyobbodott, sokmagvú oszteoklasztokkal jellemezhető. Az IFA protokollunk kizárólag a normál alpha láncokat képes detektálni, ezért a megnövekedett I-es típusú kollagén expresszióját patológiás variánsok nem befolyásolhatják. Továbbá ebben a tanulmányban alkalmazott RT-PCR protokoll a COL1A1 és COL1A2 allélek normál és patológiás mRNS transzkripció variánsainak kimutatására szolgál. Az IFA eredmények egybehangoznak az RT-PCR-rel, amelyek csak vad-típusú COL1A1 és COL1A2 mRNS szekvenciákat detektáltak. Jelen eredmények szerint megállapítható, hogy az otoszklerotikus és nem-otoszklerotikus stapesfixációk az I-es típusú kollagén normál alpha-1 és alpha-2 láncának expressziójával jellemezhetőek.

Úttörőként McKenna és munkatársai (13) vetették fel, hogy az otosclerosis kapcsolatban áll az I-es típusú kollagén genetikai hibája miatt létrejövő enyhe és lokalizált oszteogenezis imperfekcióval. Szignifikáns összefüggést találtak a klinikai otosclerosis és a COL1A1 allél mutációi között az SNP három különböző markerének használatával (13). Később ez a kutatócsoport mérte fel klinikai otosclerosisos betegek bőréből származó fibroblaszt sejt kultúrák COL1A1 mRNS expressziós szintjét abnormalitás után kutatva (25). A pácienseknek egy kis csoportja bírt alacsonyabb COL1A1 allél expresszióval, míg a legtöbb esetben az egészségesekhez hasonlóan normál COL1A1 allél expresszió mutatkozott (25). Szintén McKenna és munkatársai (26,27) vetették fel lehetséges kapcsolatot az otosclerosis és az idiopátiás osteoporosis között. Szignifikáns összefüggésre bukkantak az



otosclerosis és a COL1A1 első intronjának Sp1 része között (26, 27). Otosclerosisban az Sp1 régió allél gyakorisága hasonló az oszteoporózisban találtakhoz (27). Ezekkel a biztató tanulmányokkal szemben *Rodríguez és munkatársai* (28) nem találtak bizonyítékot a COL1A1 és COL1A2 feltételezett szerepére az otosclerosis etiopatogenezisében. Később *Chen és munkatársai* (19) azonosítottak hajlamosító és protektív COL1A1 gén haplotípusokat, amelyek szignifikáns összefüggésben álltak az otosclerosisral a kaukázusi fehér populációban.

Az ígéretes eredmények ellenére kiemelendő, hogy az I-es típusú kollagén evolúciónálisan meglehetősen konzervatív struktúrféherje, amelynek mutációi a csontváz számos szisztémás rendellenességéhez vezethetnek (20, 21). Ráadásul a transzkripció, a mRNS splicing és a féherje transláció számtalan szabályzó mechanizmusa fiziológiásan akadályozza az A1 és A2 allélek expresszióját (22). Az otosclerosis kollagén-hipotézisét alátámasztó korábbi megfigyelések nem képesek magyarázni a csontremodelling zavar organotropizmusát, ami kizárólag a humán otikus kapszulára korlátozódik (1, 2). Másrészt az otosclerosis lokális oszteogenezis imperfekta-hipotézise nem bizonyítható kizárólag genetikai tanulmányokkal (8, 9). A COL1A1 gén polimorfizmusok és mutációk kapcsolatban állnak az otosclerosisral, emiatt a legtöbb klinikai otoszklerotikus eset más genetikai faktorokkal is összefüggést mutathat (1, 8, 9, 11). Eredményeink alapján a COL1A1/A2 allélek mutációi és SNP-i gyaníthatóan hozzájárulnak az otosclerosis patogeneziséhez, azonban nem akadályozzák az I-es típusú kollagén expressziójának manifesztációját.

Befejezésül, normál COL1A1 és A2 allél expressziót találtunk otoszklerotikus és nem-otoszklerotikus stapesfixációkban. Ezekben az I-es típusú kollagén alpha-1 és alpha-2 láncainak expressziós szintje és mintázata kifejezetten hasonlóknak bizonyult a negatív kontrollokéhoz. Mivel ez a módfelett konzervatív struktúrféherje az otosclerosis szövettani diagnózisától és más stapes rendelleneségtől függetlenül expresszálódott, így nem tudjuk megerősíteni az otosclerosisral vélelmezett összefüggést. Eredményeink fényében úgy gondoljuk, hogy további vizsgálatok szükségesek az I-es típusú kollagén szerepének meghatározására az otosclerosis patogenezisében.

Köszönetnyilvánítás

Tanulmányunk az Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (OTKA PD75371, K81480), a Debreceni Egyetem Mecenatúra Pályázata (DEOEC Mec 17/2008) és az Európai Unió Kutatási Pályázata (TÁMOP 4.2.1.B) támogatásával jött létre. Jelen közlemény másodközlés, amelyet a Springer Kiadó 3063731278483 licenc számmon engedélyezett.

Irodalom

1. Karosi T, Szekanez Z, Sziklai I. Otosclerosis: an autoimmune disease? *Autoimmun Rev* 2009; 9: 95–101.
2. Chole RA, McKenna M. Pathophysiology of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2001; 22: 249–257.
3. Schuknecht HF, Applebaum EL. Surgery for hearing loss. *N Engl J Med*

- 1969; 280: 1154–1160.
4. Karosi T, Csomor P, Petkó M, et al. Histopathology of nonotosclerotic stapes fixations. *Otol Neurotol* 2009; 30: 1058–1066.
5. 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.
6. 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.
7. Arnold W, Friedmann I. Otosclerosis – an inflammatory disease of the otic capsule of viral aetiology? *J Laryngol Otol* 1988; 102: 865–871.
8. Ealy M, Smith RJ. Otosclerosis. *Adv Otorhinolaryngol* 2011; 70: 122–129.
9. Thys M, Van Camp G. Genetics of otosclerosis. *Otol Neurotol* 2009; 30: 1021–1032.
10. Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, Schatteman I, et al. A second gene for otosclerosis, OTSC2, maps to chromosome 7q34-36. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 495–500.
11. 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.
12. Schrauwen I, Weegerink NJ, Fransen E, et al. A new locus for otosclerosis, OTSC10, maps to chromosome 1q41-44. *Clin Genet* 2011; 79: 495–497.
13. McKenna MJ, Kristiansen AG, Bartley ML, et al. Association of COL1A1 and otosclerosis: evidence for a shared genetic etiology with mild osteogenesis imperfecta. *Am J Otol* 1998; 19: 604–610.
14. Lehnerdt G, Unkel C, Metz KA, et al. Immunohistochemical evidence of BMP-2, -4 and -7 activity in otospongiosis. *Acta Otolaryngol* 2008; 128: 13–17.
15. Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, et al. The coding polymorphism T263I in TGF-beta1 is associated with otosclerosis in two independent populations. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 2021–2030.
16. Karosi T, Szalmás A, Csomor P, et al. Disease-associated novel CD46 splicing variants and pathologic bone remodeling in otosclerosis. *Laryngoscope* 2008; 118: 1669–1676.
17. 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.
18. Srivastava TP, Gupta OP. Otosclerosis and osteogenesis and imperfecta. *J Laryngol Otol* 1969; 83: 1195–1204.
19. 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.
20. van Dijk FS, Huizer M, Kariminejad A, et al. Complete COL1A1 allele deletions in osteogenesis imperfecta. *Genet Med* 2010; 12: 736–741.
21. Bodian DL, Chan TF, Poon A, et al. Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype-phenotype relationships. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 463–471.
22. Karsenty G, Park RW. Regulation of type I collagen genes expression. *Int Rev Immunol* 1995; 12: 177–185.
23. Maslen CL, Corson GM, Maddox BK, et al. Partial sequence of a candidate gene for the Marfan syndrome. *Nature* 1991; 352: 334–337.
24. Nakanishi G, Shirai M, Kato T, et al. Detection of COL1A1-PDGFB fusion transcripts in dermatofibrosarcoma protuberans. *Eur J Dermatol* 2010; 20: 528–529.
25. McKenna MJ, Kristiansen AG, Tropitzsch AS. Similar COL1A1 expression in fibroblasts from some patients with clinical otosclerosis and those with type I osteogenesis imperfecta. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111: 184–189.
26. Clayton AE, Mikulec AA, Mikulec KH, et al. Association between osteoporosis and otosclerosis in women. *J Laryngol Otol* 2004; 118: 617–621.
27. McKenna MJ, Nguyen-Huynh AT, Kristiansen AG. Association of otosclerosis with Sp1 binding site polymorphism in COL1A1 gene: evidence for a shared genetic etiology with osteoporosis. *Otol Neurotol* 2004; 25: 447–450.
28. Rodríguez L, Rodríguez S, Hermida J, et al. Proposed association between the COL1A1 and COL1A2 genes and otosclerosis is not supported by a case-control study in Spain. *Am J Med Genet A* 2004; 128: 19–22.