

Genetyka w otosklerozie

Genetics in otosclerosis

**Monika Ołdak^{1,2BDEF}, Sara Domagała^{1BDEF}, Dominika Oziębło^{1,3BDEF},
Henryk Skarżyński^{4BDEF}**

¹ Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu, Światowe Centrum Słuchu, Zakład Genetyki, Warszawa/Kajetany

² Warszawski Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Warszawa

³ Warszawski Uniwersytet Medyczny, Studium Medycyny Molekularnej, Warszawa

⁴ Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu, Światowe Centrum Słuchu, Klinika Oto-Ryńko-Laryngochirurgii, Kajetany/Warszawa

Wkład autorów:

- A Projekt badania
- B Gromadzenie danych
- C Analiza danych
- D Interpretacja danych
- E Przygotowanie pracy
- F Przegląd literatury
- G Gromadzenie funduszy

Streszczenie

Wprowadzenie: Otoskleroza jest chorobą o złożonej etiologii. Szereg czynników, takich jak płeć, wiek, rasa czy rodzinne występowanie, wskazuje na istotną rolę uwarunkowań genetycznych w jej powstawaniu. Badania przeprowadzone w celu poznania podłoża genetycznego otosklerozy można podzielić na dwie główne grupy: badania rodzin obciążonych występowaniem otosklerozy (poszukiwanie regionów chromosomowych lub wariantów genetycznych segregujących z chorobą w danej rodzinie) oraz badania asocjacyjne (poszukiwanie wariantów genetycznych częściej występujących w grupie pacjentów w stosunku do grupy kontrolnej).

Cel pracy: Przedstawienie aktualnej wiedzy na temat genetycznych uwarunkowań otosklerozy.

Materiał i metody: Przegląd literatury dotyczącej badań genetycznych u pacjentów z otosklerozą.

Wyniki i wnioski: W rodzinach obciążonych występowaniem otosklerozy na pierwszy plan wysuwają się dwa geny: *SERPINF1* oraz *MEPE*, jednak prawdopodobne warianty sprawcze w tych genach wykryto na razie tylko w kilku badanych rodzinach. Porównywanie pacjentów z otosklerozą do odpowiednich grup kontrolnych wykazało duże zróżnicowanie międzypopulacyjne. Warianty genetyczne, które zidentyfikowano jako predysponujące do rozwoju otosklerozy w jednym badaniu, często nie potwierdzały się w innych badaniach. Uzyskane dotychczas wyniki świadczą o bardzo dużym zróżnicowaniu uwarunkowań genetycznych otosklerozy.

Słowa kluczowe: otoskleroza • gen • locus • wariant patogeniczny • badania rodzin • badania asocjacyjne

Abstract

Background: Otosclerosis is a disease of complex etiology. A number of factors such as sex, age, race or family history indicate that genetic background play an important role in its development. Studies conducted to understand the genetic basis of otosclerosis can be divided into family studies (searching for chromosomal regions or genetic variants segregating with otosclerosis in a given family) and association studies (searching for genetic variants more often occurring in patients as compared to controls).

Aim of the study: Presentation of current knowledge about the genetic background of otosclerosis.

Material and methods: Review of literature on genetic studies in patients with otosclerosis.

Results and conclusions: In families with otosclerosis, two genes appear in the foreground, i.e. *SERPINF1* and *MEPE*, however, the probably causative variants in these genes have been detected in only a few of the examined families. Comparing patients with otosclerosis to corresponding control groups has revealed large interpopulation differences. Genetic variants that were identified as predisposing to otosclerosis development in one study are often not confirmed in other studies. The results obtained up to now show a very large diversity in the genetic factors involved in the pathogenesis of otosclerosis.

Key words: otosclerosis • gene • locus • pathogenic variant • family studies • association studies

Wstęp

Utarta słuchu w wyniku otosklerozy (ang. *otosclerosis*, OTSC) jest spowodowana patologicznym procesem przebudowy kości błędnika, w wyniku której następuje unieruchomienie kosteczek słuchowych. Rzadziej otosklerozą rozpoczyna się w samym ślimaku, wtedy szybko dochodzi do niedosłuchu odbiorczego, a z czasem także do mieszanego. Proces chorobowy związany jest z tworzeniem się kostniny o strukturze podobnej do kości gąbczastej. W wyniku tych zmian często płytka strzemiączka zlewa się z błoną okienka owalnego. Unieruchomienie strzemiączka powoduje, że bodźce dźwiękowe nie mogą być przenoszone przez ucho środkowe do ucha wewnętrznego, pojawia się postępujący niedosłuch oraz szумы uszne, które mogą być pierwszym objawem choroby. Zazwyczaj niedosłuch rozwija się stopniowo, a u większości osób jest obustronny [1]. Obecnie leczenie otosklerozy opiera się głównie na wykonywaniu zabiegów operacyjnych (stapedotomia, stapedektomia) oraz protezowaniu słuchu.

Otosklerozą ujawnia się zazwyczaj w 3 dekadzie życia, chociaż przedział zachorowań obejmuje okres między 1. a 6. dekadą życia [2]. Zdecydowanie częściej otosklerozą występuje u rasy białej, natomiast jest stosunkowo rzadka u Afrykanów, Azjatów czy rdzennych Amerykanów. U Europejczyków częstość otosklerozy waha się od 0,3% do 0,4% [3]. Zarówno stosunek liczby chorych kobiet do mężczyzn (1,5–2:1), jak i możliwość pogłębienia się otosklerozy w trakcie ciąży może wskazywać na związek tej choroby z płcią [4,5]. Wyróżnia się otosklerozę kliniczną, która zostaje rozpoznana u pacjenta, jak również histologiczną, w której objawy choroby nie są obserwowane, a zmiany otosklerotyczne rozpoznawane są w badaniu histopatologicznym po śmierci. Badanie na 236 kościach skroniowych Europejczyków pokazało występowanie otosklerozy histologicznej na poziomie aż 2,5% [3].

Otosklerozą jest chorobą złożoną i pomimo wielu badań jej etiologia wciąż nie jest poznana. Wśród potencjalnych przyczyn otosklerozy wyróżnia się zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe (zwłaszcza immunologiczne, hormonalne czy infekcje wirusowe) [6]. Ze

względu na rodzinne występowanie choroby, jej związek z płcią czy rasą można wysnuć wniosek, że rola genetyki jest bardzo istotna w rozwoju otosklerozy. Zdecydowaną większość stanowią przypadki sporadyczne otosklerozy, jednak znane jest również jej rodzinne występowanie, które charakteryzuje się niepełną penetracją (tzn. choroba nie ujawnia się u wszystkich osób posiadających dany sprawczy czynnik genetyczny) [7]. Na tej podstawie badania nad identyfikacją podłoża genetycznego otosklerozy można podzielić na dwie grupy – badania rodzinne i badania asocjacyjne, które są przeprowadzane u osób niespokrewnionych.

Uwarunkowania genetyczne otosklerozy – badania rodzin

W rodzinach obciążonych występowaniem otosklerozy poszukuje się obszarów genomu, które segregują z chorobą (tzn. są obecne u osób chorych, a nie ma ich u osób zdrowych). W pierwszym etapie badania przeprowadza się genotypowanie markerów molekularnych zlokalizowanych w różnych regionach genomu. Markerami molekularnymi stosowanymi w tego typu analizie są najczęściej krótkie powtórzenia tandemowe (ang. *short tandem repeat*, STR), które charakteryzują się dużą zmiennością liczby powtórzeń. Dzięki zmienności międzyosobniczej markerów możliwe jest określenie częstości rekombinacji fragmentów genomu, śledzenie procesu ich dziedziczenia w badanych rodzinach oraz ocena stopnia ich sprzężenia z chorobą. Etap właściwej analizy sprzężeń jest metodą statystyczną, która określa prawdopodobieństwo powiązania choroby z danym obszarem chromosomowym. Do określenia sprzężenia używa się wskaźnika *lod scores* (ang. *logarithm (base 10) of odds*, LOD), wynik LOD powyżej 3 wskazuje na powiązanie badanych markerów z wystąpieniem choroby, jednak przy mało liczebnej rodzinie wynik ten może być niższy. Identyfikacja *locus* genu stanowi pierwszy krok w kierunku identyfikacji samego genu [8]. W badaniach rodzinnych przypadków otosklerozy zidentyfikowano dotychczas 8 różnych obszarów chromosomowych potencjalnie zaangażowanych w powstawanie tej choroby (tabela 1).

Tabela 1. *Loci* dla otosklerozy zidentyfikowane z wykorzystaniem analizy sprzężeń

Table 1. *Otosclerosis loci* identified in linkage studies

<i>Locus</i>	Lokalizacja	Wielkość	Liczba genów	Pochodzenie rodziny	Wynik LOD	Geny kandydaci	Referencje
OTSC1	15q25-26	14.5 cM	33	Indie	3.4	<i>ACAN</i>	Tomek i wsp., 1998 [9]
OTSC2	7q34-36	16 cM	152	Belgia	3.54	<i>TIF1a, PLOD3</i>	van den Bogaert i wsp., 2001 [12]
OTSC3	6p21.3-22.3	17.4 cM	488	Cypr	3.83	geny HLA	Chen i wsp., 2002 [14]
OTSC4	16q21-23.2	10.5 cM	74	Izrael	3.97	Kilka genów kandydackich	Brownstein i wsp., 2006 [16]
OTSC5	3q22-24	15.5 cM	59	Holandia	3.46	<i>PCOLCE2, CHST2</i>	van den Bogaert i wsp., 2004 [17]
OTSC7	6q13-16.1	13.4 cM	66	Grecja	7.5	<i>COL12A1</i>	Thys i wsp., 2007 [18]
OTSC8	9p13.1-q21.11	34.2 Mpz	24	Tunezja	4.13	<i>TJP2, TRMP3, KLF9</i>	Ali i wsp., 2008 [19]
OTSC10	1q41-44	26.1 Mpz	306	Holandia	3.3	<i>TGFB2, AGT</i>	Weegerink i wsp., 2011 [50]

cM – centymorgany, Mpz – milion par zasad

W 1998 r. Tomek i wsp. jako pierwsi pokazali związek otosklerozy z genetyką. Przeprowadzili badania na wielopokoleniowej hinduskiej rodzinie, czego wynikiem było znalezienie *locus* OTSC1, znajdującego się w obrębie chromosomu 15q25-26. Zidentyfikowany w tym badaniu obszar chromosomowy zawiera 33 geny. Spośród nich najlepszym wytypowanym kandydatem jest gen *ACAN*, którego uszkodzenie może prowadzić do rozwoju otosklerozy [9]. Kodowane przez *ACAN* białko agrekan należy do rodziny proteoglikanów, jest integralną częścią macierzy zewnątrzkomórkowej w tkance chrzęstnej oraz reguluje ściśliwość chrząstki [10]. Warianty patogenne *ACAN* biorą udział w powstawaniu dysplazji kostnych [11].

Trzy lata później kolejny *locus* został zmapowany i powiązany z otosklerozą w badaniach rodziny belgijskiej. Region OTSC2 (7q34-36) zlokalizowany pomiędzy markerem D7S495 i D7S2426 obejmuje obszar TRB (ang. *T cell receptor beta*) zawierający geny dla łańcucha beta receptora limfocytów T (ang. *T-cell receptor β chain*, TCR- β) [12]. Zauważono zredukowaną ekspresję TCR- β na poziomie mRNA oraz zmniejszenie liczby krążących we krwi limfocytów TCR $\alpha\beta^+$, natomiast zwiększoną liczbę limfocytów TCR- $\gamma\delta^+$ u pacjentów z OTSC2 w porównaniu z grupą kontrolną [13].

Locus OTSC3 (chromosom 6p21.3-22.3) został zidentyfikowany w rodzinie cypryjskiej, zawiera on 488 genów dla cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej [14]. Poprzednie badania pod kątem HLA pokazały, że u osób z otosklerozą występuje częściej zestaw HLA-A11, Bw35 i B14 [15].

W badaniach Brownstein i wsp. został zidentyfikowany *locus* OTSC4 znajdujący się w obrębie chromosomu 16q21-23.2. Badania te przeprowadzono wśród członków rodziny izraelskiej, w której u 12 osób otoskleroza była potwierdzona klinicznie [16]. Region OTSC4 zawiera geny zaangażowane w funkcjonowanie układu odpornościowego i homeostazę kości, takie jak geny kodujące białka zawierające palce cynkowe, kadheryny, które uczestniczą w oddziaływaniu między komórkami, czy geny *COG8* i *COG4*, zaangażowane w prawidłowy rozwój struktury aparatu Golgiego w komórce.

Kolejny *locus* OTSC5 został zlokalizowany w obrębie chromosomu 3q22-24. Badania przeprowadzili van den Bogaert i wsp. wśród członków rodziny holenderskiej składającej się z 18 osób [17]. W tym *locus* znajduje się 59 genów, z których *PCOLCE2* i *CHST2* zostały wytypowane jako geny kandydujące do bycia przyczyną otosklerozy.

OTSC7 w obrębie chromosomu 6q13-16.1 został zidentyfikowany w dużej greckiej rodzinie [18], natomiast w 2008 r. w rodzinie tunezyjskiej opisano *locus* OTSC8, w którym występują między innymi geny *TJP2*, *TRPM3* i *KLF9* [19]. Ostatni do tej pory zidentyfikowany *locus* to OTSC10 [20]. W badaniu brała udział duża holenderska rodzina, złożona z 51 osób. Zidentyfikowany region OTSC10 ma wielkość 26.1 Mb i zawiera 306 genów. Nazwy *locus* OTSC6 i OTSC9 zostały zarezerwowane przez badaczy, ale do tej pory nie opublikowano regionów chromosomowych odpowiadających tym *loci*.

W najnowszych badaniach nad genetycznym podłożem otosklerozy przeprowadzono sekwencjonowanie całokomowe (ang. *whole-exome sequencing*, WES) u 10 osób z 4 rodzin obciążonych otosklerozą. Jednocześnie zbadano transkryptom fragmentów strzemiączek pochodzących od osób chorych. Na podstawie zidentyfikowanych wariantów u badanych pacjentów oraz listy genów, posiadających zmienioną ekspresję w strzemiączkach, wytypowano ostatecznie 9 zmian w 9 różnych genach, które w pełni segregowały z chorobą. Obecność tych zmian była następnie sprawdzana w grupie kolejnych 53 niespokrewnionych pacjentów z rodzinną historią otosklerozy. U tych osób nie znaleziono badanych zmian genetycznych, ale w eksonie 5 genu *SERPINF1* wykryto inne rzadkie warianty tego genu. Sekwencjonowanie całego obszaru kodującego genu *SERPINF1* pozwoliło na identyfikację kolejnych prawdopodobnie patogennych zmian.

Łącznie wykryto 6 różnych heterozygotycznych wariantów w genie *SERPINF1*, trzy z nich to warianty patogenne typu zmiany sensu, pozostałe trzy na podstawie predykcji bioinformatycznych wydają się nie mieć wpływu na białko *SERPINF1* powstające z podstawowego transkryptu tego genu (*SERPINF1*-201; ENST00000254722.8). Analiza transkryptomu strzemiączka pozwoliła jednak zauważyć, że zidentyfikowane warianty lokalizują się w obszarze 5' (ang. *untranslated region*, 5'UTR), regulującym ekspresję alternatywnego transkryptu genu *SERPINF1* (*SERPINF1*-209; ENST00000573763.1). Warianty zlokalizowane w obszarze 5'UTR najprawdopodobniej powodują zaburzenia transkrypcji genu *SERPINF1*, prowadząc tym samym do powstania choroby [21].

Gen *SERPINF1* koduje białko *SERPINF1*, inaczej zwane również PEDF (ang. *pigment epithelium-derived factor*), czyli białko wiążące kolagen. *SERPINF1* ulega wysokiej ekspresji w tkankach bogatych w kolagen, w tym w kości, rogówce czy chrząstce. PEDF jest inhibitorem angiogenezy (jedynym z najsilniejszych dotychczas poznanych w organizmie człowieka), karcynogenezy [22] oraz hamuje migrację komórek śródbłonka [23]. Warianty patogenne w genie *SERPINF1* znaleziono u osób z wrodzoną łamliwością kości (ang. *osteogenesis imperfecta*, OI) typu VI. Jego rola w rozwoju choroby dotyczy tworzenia i remodelowania kości. *SERPINF1* posiada ekspresję w osteoblastach, chondrocytach i w mniejszym stopniu w osteoklastach. Kodowane przez ten gen białko wykryto w obszarach aktywnej przebudowy kości [24]. Funkcja PEDF oraz jego udział we wrodzonej łamliwości kości wzmacnia tezę o potencjalnej roli *SERPINF1* w otosklerozie.

Kolejnym ważnym doniesieniem w zakresie genetycznych przyczyn otosklerozy jest powiązanie genu *MEPE* z otosklerozą dzięki zastosowaniu WES. W dużej czteropokoleniowej rodzinie tureckiej, z wrodzonym dziedzicznym porażeniem twarzy (ang. *hereditary congenital facial palsy*, HCFP) oraz przewodzeniową utratą słuchu przypominającą otosklerozę, zidentyfikowano patogenny wariant w genie *MEPE*, który skutkował przedwczesnym zakończeniem translacji mRNA i powstawaniem skróconego białka. *MEPE* zaangażowane jest w inhibicję mineralizacji i resorpcji kości, a myszy posiadające patogenne warianty genu kodującego to białko charakteryzują się zmniejszoną masą kości twarzoczaszki. Poprzez

sekwencjonowanie egzomu u 2 chorych z tej rodziny i analizę wyników udało się zidentyfikować herezygotyczny wariant c.1273delC w genie *MEPE*, kosegregującym z fenotypem choroby, zmiana ta powoduje przesunięcie ramki odczytu. Na podstawie wyników badanej rodziny i dostępnych danych postanowiono następnie przeprowadzić analizy genu *MEPE* u pacjentów z otoskleroza. Celowane analizy genu *MEPE* zostały przeprowadzone w grupach rodzinnych i sporadycznych przypadków otosklerozy oraz w grupie kontrolnej. W grupie osób z obciążonym wywiadem rodzinnym zidentyfikowano 2 rodziny z terminującymi wariantami genu *MEPE*. Kolejne warianty tego typu zostały zidentyfikowane u 19 pacjentów nieposiadających rodzinnej historii otosklerozy oraz w dwóch próbkach kontrolnych. Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że terminujące warianty genetyczne *MEPE* są silnym czynnikiem ryzyka rozwoju otosklerozy. Należy jednak mieć na uwadze, że są one rzadkie i odpowiadają jedynie za niewielką część przypadków tak złożonej choroby, jaką jest otoskleroza [25].

Uwarunkowania genetyczne otosklerozy – badania asocjacyjne

Badania asocjacyjne prowadzone są w grupie pacjentów bez obciążonego wywiadu rodzinnego i ich założeniem jest identyfikacja genetycznych czynników predysponujących do rozwoju otosklerozy. Możemy wyróżnić dwa rodzaje badań asocjacyjnych w zależności od istnienia pierwotnego założenia. Pierwsze podejście zakłada istnienie hipotezy początkowej, dzięki której na podstawie dostępnej literatury oraz baz danych wytypowany zostaje gen potencjalnie zaangażowany w procesy komórkowe istotne dla funkcjonowania ucha środkowego. Z obszaru interesującego genu wybrany zostaje następnie zestaw różnych wariantów genetycznych. Tak wytypowane warianty genotypowane są następnie w grupie pacjentów z otoskleroza oraz w grupie kontrolnej i poszukiwane są różnice istotne statystycznie w częstości badanych zmian [26].

Drugie podejście stanowi genomowe badanie asocjacyjne (ang. *genome-wide association study*, GWAS), które jest wolne od hipotezy początkowej i polega na genotypowaniu wybranych wariantów genetycznych zlokalizowanych w obszarze całego genomu. W przypadku genomowych badań asocjacyjnych również poszukuje się istotnych statystycznie różnic w częstościach badanych wariantów w grupie pacjentów i grupie kontrolnej. Wykrywanie różnic w częstości wariantów między grupą pacjentów z otoskleroza a grupą kontrolną wskazuje na silny związek danego genu lub obszaru chromosomowego z rozwojem choroby [26].

Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań asocjacyjnych wyodrębniono 7 różnych genów powiązanych z występowaniem otosklerozy. Są to geny kodujące łańcuch alfa 1 kolagenu typu I (*COL1A1*), transformujący czynnik wzrostu beta 1 (*TGFβ1*), białka morfogenetyczne kości 2 i 4 (*BMP2*, *BMP4*), konwertazę angiotensyny (*ACE*), angiotensynogen (*AGT*) oraz relinę (*RELN*) (tabela 2). W pierwszej kolejności badania asocjacyjne skupiały się na poszukiwaniu istotnych statystycznie zależności między wariantami genów zaangażowanych

w proces remodelowania kości a powstawaniem otosklerozy. Pierwszym z badanych genów był *COL1A1* i jego powiązanie z otoskleroza zostało po raz pierwszy opisane w amerykańskiej populacji pochodzenia europejskiego przez McKenna [27]. Gen ten został uznany za dobrego kandydata z uwagi na jego zaangażowanie w OI, chorobę, w której często występuje utrata słuchu podobna do tej obserwowanej w otosklerozie (OI i otoskleroza wykazują również podobieństwo w zmianach histopatologicznych i klinicznych). W dalszych badaniach asocjacyjnych przeprowadzanych w innych populacjach wyróżniono kolejne polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (m.in. rs1800012, rs11327935, rs2586498) genu *COL1A1*, które występowały istotnie statystycznie częściej w grupie chorych [28–30]. Wszystkie powiązania zostały niezależnie zreplicowane w kolejnych populacjach (m.in. niemieckiej, egipskiej, tureckiej), ale istnieją również populacje, w których zależności te się nie potwierdziły (m.in. tunezyjskiej, belgijsko-holenderskiej, szwajcarskiej, brytyjskiej) [30–32]. Ze względu na obserwowane rozbieżności w udziale poszczególnych wariantów genu *COL1A1*, Schrauwen i wsp. w 2012 r. przeprowadzili metaanalizę uwzględniającą wcześniejsze badania populacyjne i wykazali istotne statystycznie powiązanie wariantów o numerze rs11327935 (OR = 0,80) oraz rs2586498 (OR = 0,85) z powstawaniem otosklerozy [31].

Kolejnym badaniem genem jest *TGFβ1*, który zaangażowany jest w rozwój błędnika kostnego na poziomie embrionalnym, a następnie odpowiada za jego prawidłowe funkcjonowanie [33]. Wariant c.788C>T zlokalizowany w genie *TGFβ1* (rs1800472) został po raz pierwszy powiązany z otoskleroza w populacjach belgijsko-holenderskiej oraz francuskiej (łącznie OR = 0,377) [34]. Kolejne badania potwierdziły związek tego polimorfizmu z otoskleroza również w populacji tunezyjskiej oraz węgierskiej (OR = 0,274 oraz 0,267) [30,35]. Badania przeprowadzone w 2018 r. w populacji brytyjskiej również potwierdziły znaczącą asocjację między rs1800472 a otoskleroza (OR = 0,51) [32]. Allel alternatywny T występował z większą częstością w grupie kontrolnej w porównaniu do pacjentów, sugerując tym samym jego prawdopodobnie ochronną rolę. Ze względu na zlokalizowanie wariantu w sekwencji kodującej białka przeprowadzono badania funkcjonalne, które wykazały wyższą aktywność biologiczną allelu alternatywnego T. Prawdopodobnym mechanizmem działania tego wariantu jest hamowanie różnicowania osteoklastów i ich aktywacji, co zmniejsza tym samym podatność na otoskleroza. W badaniu na populacji tunezyjskiej wykonano również metalizę, której wynikiem był spójny i dodatkowo wzmocnił powiązanie genu *TGFβ1* z otoskleroza [30].

Kolejne badania pozwoliły stwierdzić, że nie tylko częste warianty, lecz także rzadkie zmiany genetyczne mogą być zaangażowane w powstawanie otosklerozy. Przeprowadzenie sekwencjonowania kodujących regionów genu *TGFβ1* w dużej grupie pacjentów i kontroli pochodzenia belgijsko-holenderskiego oraz francuskiego pozwoliło zidentyfikować rzadkie niesynonimiczne warianty genetyczne u 4 pacjentów z otoskleroza. Wszystkie zidentyfikowane warianty mogą mieć potencjalny wpływ na funkcję i aktywność TGFβ1 (ang. *transforming growth factor β1*) [36].

Tabela 2. Geny i ich warianty genetyczne potencjalnie zaangażowane w powstawanie otosklerozy – zidentyfikowane za pomocą badań asocjacyjnych

Table 2. Genes and genetic variants potentially involved in the development of otosclerosis – identified in association studies

Lokalizacja chromosomowa	Gen	Numer rs	Populacja	
			Związek potwierdzony	Związek niepotwierdzony
17q23.3	<i>ACE</i>	rs1799752	francuska [43]	belgijsko-holenderska? [44]
1q42.2	<i>AGT</i>	rs699	francuska [43]	belgijsko-holenderska? [44] węgierska? [35]
20p12.3	<i>BMP2</i>	rs3178250	belgijsko-holenderska, francuska [39]	niemiecka? [41] węgierska? [35]
14q22.2	<i>BMP4</i>	rs17563	belgijsko-holenderska, francuska [39]	niemiecka? [41] węgierska? [35]
17q21.33	<i>COL1A1</i>	rs2141279	belgijsko-holenderska [31]	
		rs11327935	amerykańska [27]	belgijsko-holenderska? [31]
			niemiecka [28]	tunezyjska? [30]
		rs2586498	(*amerykańska, belgijsko-holenderska, niemiecka, tunezyjska) [31]	
			amerykańska [27]	belgijsko-holenderska? [31]
		rs1800012	(*amerykańska, belgijsko-holenderska, niemiecka, hiszpańska) [31]	hiszpańska? [51]
				niemiecka? [28]
			amerykańska [27]	belgijsko-holenderska? [31]
			niemiecka [28]	szwajcarska? [31] brytyjska? [32]
			egipska [52] turecka [29] węgierska [35]	
		rs2299383	belgijsko-holenderska, francuska [45] niemiecka, włoska, szwajcarska, rumuńska [47]	węgierska? [35]
				tunezyjska? [48]
belgijsko-holenderska, francuska [45] niemiecka, włoska, szwajcarska, rumuńska [47]	węgierska? [35]			
tunezyjska [48]				
7q22.1	<i>RELN</i>	rs39350	belgijsko-holenderska, francuska [45] niemiecka, włoska, szwajcarska, rumuńska [47]	węgierska? [35]
			tunezyjska [48]	
		rs39374	belgijsko-holenderska, francuska [45] niemiecka, włoska, szwajcarska, rumuńska [47]	węgierska? [35]
			tunezyjska [48]	
		rs39395	belgijsko-holenderska, francuska [45]	tunezyjska? [48]
			niemiecka, włoska, szwajcarska, rumuńska [47]	węgierska? [35]
		rs3914132	belgijsko-holenderska, francuska [45]	tunezyjska? [48]
			niemiecka, włoska, szwajcarska, rumuńska [47]	indyjska? [49] węgierska? [35]
		rs39399	brytyjska [32]	belgijsko-holenderska, francuska? [45]
		19q13.2	<i>TGFB1</i>	rs1800472
rs1800469	węgierska [35] brytyjska [32]			
11q13.1	Nieznany	rs494252	belgijsko-holenderska, francuska [45]	
			tunezyjska [48]	

W 2016 r. Priyadarshi i wsp. w badaniu genetycznym przeprowadzonym u pacjentki z otosklerozą zidentyfikowali heterozygotyczny wariant –832G>A zlokalizowany w promotorze genu *TGFBI*. Badania pozostałych członków rodziny pozwoliły stwierdzić, że zmiana –832G>A powstała *de novo* i obecna jest jedynie u córki pacjentki. Ze względu na jej zbyt młody wiek (1,5 r.ż.) nie jest możliwe jednoznaczne określenie statusu choroby i ewentualne wykluczenie możliwości wystąpienia otosklerozy w przyszłości. Potencjalna sprawcza rola zidentyfikowanego wariantu genu *TGFBI* została potwierdzona badaniem aktywności promotora i obserwowanym spadkiem poziomu transkryptu genu *TGFBI* u pacjentki w porównaniu ze zdrowymi rodzicami [37,38].

W kolejnym badaniu przeprowadzonym przez Schrauwen i wsp. wybrano i przeanalizowano 13 nowych genów kandydatów. Wytypowane geny były partnerami molekularnymi zaangażowanymi w sieć interakcji z białkiem TGFβ1, miały kluczową rolę w metabolizmie i chondrogeniezie błędnika kostnego, były zaangażowane w różne formy unieruchomienia strzemiączka lub były kluczowe dla innych hipotez powstawania otosklerozy. Istotne statystycznie powiązanie wykazano dla wariantów genetycznych obecnych w dwóch z nich: rs3178250 w genie *BMP2* (OR = 2,027) i rs17563 w genie *BMP4* (OR = 1,209).

Geny *BMP2* i *BMP4* należą do nadrodziny TGFβ i pełnią rolę w formowaniu tkanki chrzęstnej i kości błędnika. Pierwszy wariant o numerze rs3178250 jest zlokalizowany w regionie 3'UTR genu *BMP2* i może potencjalnie wpływać na ekspresję genu, dotychczas jednak brak jest dowodów eksperymentalnych na takie działanie wykrytego polimorfizmu. Drugi wariant o numerze rs17563 zlokalizowany jest w sekwencji kodującej genu *BMP4* [39]. Prawdopodobny mechanizm działania tego wariantu związany jest z jego wpływem na strukturę mRNA i obniżeniem poziomu mRNA *BMP4* [40]. Zależności pomiędzy wariantami genów *BMP2* i *BMP4* a powstawaniem otosklerozy nie zostały zreplikowane w kolejnych badaniach na populacjach niemieckiej i węgierskiej [35,41]. Pomimo braku asocjacji dla częstych wariantów, Ealy i wsp. przeprowadzili również sekwencjonowanie fragmentów kodujących genów *BMP2* i *BMP4* w populacji niemieckich pacjentów z otosklerozą. Pozwoliło to na zidentyfikowanie 4 kodujących wariantów. Dwa spośród zidentyfikowanych wariantów posiadały funkcjonalny wpływ na obniżenie ścieżki sygnałowej kościotworzenia [41].

W badaniach Imauchi i wsp. poszukiwano istotnych czynników genetycznych na podstawie hipotezy o udziale układu renina-angiotensyna-aldosteron w powstawaniu otosklerozy. Podczas ciąży w osoczu wzrasta stężenie angiotensynogenu (AGT) i aktywacji ulega układ renina-angiotensyna-aldosteron. W wyniku zachodzących zmian w osoczu wzrasta również stężenie angiotensyny II (Ang II). Mając na uwadze możliwy udział Ang II w remodelowaniu kości i innych tkanek łącznych [42] oraz częste ujawnianie się otosklerozy w okresie ciąży, wytypowano kolejne warianty genetyczne zlokalizowane w genach układu renina-angiotensyna-aldosteron, które potencjalnie mogłyby być zaangażowane w powstawanie otosklerozy. Badania na populacji francuskiej pozwoliły zidentyfikować istotne

statystycznie powiązanie między wariantami rs1799752 genu *ACE* (OR = 1,30) i rs699 genu *AGT* (OR = 1,87) a występowaniem otosklerozy [43]. Kolejne badania replikacyjne w populacji belgijsko-holenderskiej nie potwierdziły tej asocjacji [44].

Przeprowadzenie wielkoskalowego badania GWAS na próbkach reprezentujących populacje belgijsko-holenderską oraz francuską pozwoliło zidentyfikować dwa regiony chromosomowe 7q22.1 oraz 11q13.1 potencjalnie zaangażowane w rozwój otosklerozy. W przypadku regionu 7q22.1 najsilniejszy sygnał widoczny był dla wariantów genetycznych zlokalizowanych w regionach niekodujących genu *RELN* [45]. Białko relina kodowane przez *RELN* jest kluczowe dla regulacji migracji i rozmieszczenia neuronów podczas rozwoju mózgu [46]. Shrauwen i wsp. wykazali jednak ekspresję *RELN* w strzemiączku pochodzącym od człowieka, jak również w uchu wewnętrznym myszy w różnych okresach jej życia, wzmacniając tym samym wynik badań GWAS [45]. Warianty genu *RELN* zostały dotychczas potwierdzone w największej liczbie populacji i stanowią obecnie najsilniejszy czynnik ryzyka rozwoju otosklerozy [47,48]. Asocjacja nie została potwierdzona w populacji węgierskiej [35] oraz indyjskiej [49]. Nie wykryto jej również w populacji brytyjskiej, jednak po rozdzieleniu pacjentów na przypadki rodzinne i nierodzinne, tylko w pierwszej grupie zauważono silne powiązanie pomiędzy rs39399 zlokalizowanym w genie *RELN* a otosklerozą (OR = 1,73) [32].

Zidentyfikowanie powiązania między regionem 11q13.1 a otosklerozą zostało zreplikowane w populacji tunezyjskiej dla wariantu rs494252 (OR = 3,015) [48]. W badanym regionie nie można jednoznacznie wskazać genu sprawczego zaangażowanego w rozwój choroby i mechanizm działania badanych wariantów nie jest do końca poznany. Ogólna analiza zidentyfikowanego regionu pozwala jedynie stwierdzić, że zarówno w jego obszarze, jak i w sąsiedztwie zlokalizowane są geny mające udział w metabolizmie kości i chrząstki (*MEN1*, *EHD1*) [45].

Podsumowanie

Otosklerozą jest chorobą o bardzo złożonym podłożu. Czynniki genetyczne wydają się odgrywać istotną rolę w jej powstawaniu, jednak pomimo wielu lat badań, prowadzonych przez różne zespoły na całym świecie, warunkowania genetyczne otosklerozy wciąż pozostają słabo poznane. Nadal nie zidentyfikowano pojedynczego czynnika genetycznego wyjaśniającego w pełni mechanizm powstawania otosklerozy. Obszary chromosomowe i potencjalne geny sprawcze wytypowane w badaniach rodzin z otosklerozą mogą stanowić odpowiedź tylko dla niewielkiej części przypadków występowania choroby. Zidentyfikowane liczne asocjacje genetyczne wymagają pogłębionych badań na kolejnych populacjach chorych z różnych regionów świata. Dotychczas obserwowane różnice wskazywały na prawdopodobne bardzo silne oddziaływanie czynników genetycznych i środowiskowych. Nadzieję na identyfikację nowych czynników genetycznych związanych z powstawaniem otosklerozy stanowi dynamiczny rozwój technologiczny w badaniach genetycznych, który pozwala na wysokoprzepustową analizę całego genomu.

Piśmiennictwo:

1. Glasscock ME, 3rd, Storper IS, Haynes DS, Bohrer PS. Twenty-five years of experience with stapedectomy. *Laryngoscope*, 1995; 105(9 Pt 1): 899–904.
2. Gristwood RE, Venables WN. Otosclerosis and chronic tinnitus. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2003; 112(5): 398–403.
3. Declau F, Van Spaendonck M, Timmermans JP, Michaels L, Liang J, Qiu JP i wsp. Prevalence of otosclerosis in an unselected series of temporal bones. *Otol Neurotol*, 2001; 22(5): 596–602.
4. Gordon MA. The genetics of otosclerosis: a review. *Am J Otol*, 1989; 10(6): 426–38.
5. Lippy WH, Berenholz LP, Schuring AG, Burkey JM. Does pregnancy affect otosclerosis? *Laryngoscope*, 2005; 115(10): 1833–36.
6. Ealy M, Smith RJ. Otosclerosis. *Adv Otorhinolaryngol*, 2011; 70: 122–29.
7. Schrauwen I, Van Camp G. The etiology of otosclerosis: a combination of genes and environment. *Laryngoscope*, 2010; 120(6): 1195–202.
8. Pulst SM. Genetic linkage analysis. *Arch Neurol*, 1999; 56(6): 667–72.
9. Tomek MS, Brown MR, Mani SR, Ramesh A, Srisailapathy CR, Coucke P i wsp. Localization of a gene for otosclerosis to chromosome 15q25-q26. *Hum Mol Genet*, 1998; 7(2): 285–90.
10. Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, Brew K. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem*, 2001; 276(16): 12501–504.
11. Gleghorn L, Ramesar R, Beighton P, Wallis G. A mutation in the variable repeat region of the aggrecan gene (AGC1) causes a form of spondyloepiphyseal dysplasia associated with severe, premature osteoarthritis. *Am J Hum Genet*, 2005; 77(3): 484–90.
12. Van Den Bogaert K, Govaerts PJ, Schatteman I, Brown MR, Caethoven G, Offeciers FE i wsp. A second gene for otosclerosis, OTSC2, maps to chromosome 7q34-36. *Am J Hum Genet*, 2001; 68(2): 495–500.
13. Schrauwen I, Venken K, Vanderstraeten K, Thys M, Hendrickx JJ, Fransen E i wsp. Involvement of T-cell receptor-beta alterations in the development of otosclerosis linked to OTSC2. *Genes Immun*, 2010; 11(3): 246–53.
14. Chen W, Campbell CA, Green GE, Van Den Bogaert K, Komodikis C, Manolidis LS i wsp. Linkage of otosclerosis to a third locus (OTSC3) on human chromosome 6p21.3-22.3. *J Med Genet*, 2002; 39(7): 473–77.
15. Gregoriadis S, Zervas J, Varletzidis E, Toubis M, Pantazopoulos P, Fessas P. HLA antigens and otosclerosis. A possible new genetic factor. *Arch Otolaryngol*, 1982; 108(12): 769–71.
16. Brownstein Z, Goldfarb A, Levi H, Frydman M, Avraham KB. Chromosomal mapping and phenotypic characterization of hereditary otosclerosis linked to the OTSC4 locus. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2006; 132(4): 416–24.
17. Van Den Bogaert K, De Leenheer EM, Chen W, Lee Y, Nurnberg P, Pennings RJ i wsp. A fifth locus for otosclerosis, OTSC5, maps to chromosome 3q22-24. *J Med Genet*, 2004; 41(6): 450–53.
18. Thys M, Van Den Bogaert K, Iliadou V, Vanderstraeten K, Dieltjens N, Schrauwen I i wsp. A seventh locus for otosclerosis, OTSC7, maps to chromosome 6q13-16.1. *Eur J Hum Genet*, 2007; 15(3): 362–68.
19. Bel Hadj Ali I, Thys M, Beltaief N, Schrauwen I, Hilgert N, Vanderstraeten K i wsp. A new locus for otosclerosis, OTSC8, maps to the pericentromeric region of chromosome 9. *Hum Genet*, 2008; 123(3): 267–72.
20. Schrauwen I, Weegerink NJ, Fransen E, Claes C, Pennings RJ, Cremers CW i wsp. A new locus for otosclerosis, OTSC10, maps to chromosome 1q41-44. *Clin Genet*, 2011; 79(5): 495–97.
21. Ziff JL, Crompton M, Powell HR, Lavy JA, Aldren CP, Steel KP i wsp. Mutations and altered expression of SERPINF1 in patients with familial otosclerosis. *Hum Mol Genet*, 2016; 25(12): 2393–403.
22. Rychli K, Huber K, Wojta J. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets*, 2009; 13(11): 1295–302.
23. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W i wsp. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, 1999; 285(5425): 245–48.
24. Becker J, Semler O, Gilissen C, Li Y, Bolz HJ, Giunta C i wsp. Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*, 2011; 88(3): 362–71.
25. Schrauwen I, Valgaeren H, Tomas-Roca L, Sommen M, Altunoglu U, Wesdorp M i wsp. Variants affecting diverse domains of MEPE are associated with two distinct bone disorders, a craniofacial bone defect and otosclerosis. *Genet Med*, 2018. DOI: 10.1038/s41436-018-0300-5.
26. Ealy M, Smith RJ. The genetics of otosclerosis. *Hear Res*, 2010; 266(1-2): 70–74.
27. McKenna MJ, Kristiansen AG, Bartley ML, Rogus JJ, Haines JL. Association of COL1A1 and otosclerosis: evidence for a shared genetic etiology with mild osteogenesis imperfecta. *Am J Otol*, 1998; 19(5): 604–10.
28. Chen W, Meyer NC, McKenna MJ, Pfister M, McBride DJ, Jr., Fukushima K i wsp. Single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 regulatory regions are associated with otosclerosis. *Clin Genet*, 2007; 71(5): 406-14.
29. Ertugay OC, Ata P, Kalaycik Ertugay C, Kaya KS, Tatlipinar A, Kulekci S. Association of COL1A1 polymorphism in Turkish patients with otosclerosis. *Am J Otolaryngol*, 2013; 34(5): 403–406.
30. Khalfallah A, Schrauwen I, Mnejja M, HadjKacem H, Dhoubil L, Mosrati MA i wsp. Association of COL1A1 and TGFB1 polymorphisms with otosclerosis in a Tunisian population. *Ann Hum Genet*, 2011; 75(5): 598–604.
31. Schrauwen I, Khalfallah A, Ealy M, Fransen E, Claes C, Huber A i wsp. COL1A1 association and otosclerosis: a meta-analysis. *Am J Med Genet A*, 2012; 158A(5): 1066–70.
32. Mowat AJ, Crompton M, Ziff JL, Aldren CP, Lavy JA, Saeed SR i wsp. Evidence of distinct RELN and TGFB1 genetic associations in familial and non-familial otosclerosis in a British population. *Hum Genet*, 2018; 137(5): 357–63.
33. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev*, 2005; 26(6): 743–74.
34. Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, Janssens K, Dieltjens N, Van Den Bogaert K i wsp. The coding polymorphism T263I in TGF-beta1 is associated with otosclerosis in two independent populations. *Hum Mol Genet*, 2007; 16(17): 2021–30.
35. Sommen M, Van Camp G, Liktors B, Csomor P, Fransen E, Sziklai I i wsp. Genetic association analysis in a clinically and histologically confirmed otosclerosis population confirms association with the TGFB1 gene but suggests an association of the RELN gene with a clinically indistinguishable otosclerosis-like phenotype. *Otol Neurotol*, 2014; 35(6): 1058–64.
36. Thys M, Schrauwen I, Vanderstraeten K, Dieltjens N, Fransen E, Ealy M i wsp. Detection of rare nonsynonymous variants in TGFB1 in otosclerosis patients. *Ann Hum Genet*, 2009; 73(2): 171–75.
37. Priyadarshi S, Hansdah K, Ray CS, Biswal NC, Ramchander PV. Otosclerosis Associated with a De Novo Mutation -832G > A in the TGFB1 Gene Promoter Causing a Decreased Expression Level. *Sci Rep*, 2016; 6: 29572.

38. Priyadarshi S, Ray CS, Panda KC, Desai A, Nayak SR, Biswal NC i wsp. Genetic association and gene expression profiles of TGFB1 and the contribution of TGFB1 to otosclerosis susceptibility. *J Bone Miner Res*, 2013; 28(12): 2490–97.
39. Schrauwen I, Thys M, Vanderstraeten K, Fransen E, Dieltjens N, Huyghe JR, i wsp. Association of bone morphogenetic proteins with otosclerosis. *J Bone Miner Res*, 2008; 23(4): 507–16.
40. Capasso M, Ayala F, Russo R, Avvisati RA, Asci R, Iolascon A. A predicted functional single-nucleotide polymorphism of bone morphogenetic protein-4 gene affects mRNA expression and shows a significant association with cutaneous melanoma in Southern Italian population. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009; 135(12): 1799–807.
41. Ealy M, Meyer NC, Corchado JC, Schrauwen I, Bress A, Pfister M i wsp. Rare variants in BMP2 and BMP4 found in otosclerosis patients reduce Smad signaling. *Otol Neurotol*, 2014; 35(3): 395–400.
42. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003; 35(6): 881–900.
43. Imauchi Y, Jeunemaitre X, BouSSION M, Ferrary E, Sterkers O, Grayeli AB. Relation between renin-angiotensin-aldosterone system and otosclerosis: a genetic association and in vitro study. *Otol Neurotol*, 2008; 29(3): 295–301.
44. Schrauwen I, Thys M, Vanderstraeten K, Fransen E, Ealy M, Cremers CW i wsp. No evidence for association between the renin-angiotensin-aldosterone system and otosclerosis in a large Belgian-Dutch population. *Otol Neurotol*, 2009; 30(8): 1079–83.
45. Schrauwen I, Ealy M, Huentelman MJ, Thys M, Homer N, Vanderstraeten K i wsp. A genome-wide analysis identifies genetic variants in the RELN gene associated with otosclerosis. *Am J Hum Genet*, 2009; 84(3): 328–38.
46. Jossin Y. Neuronal migration and the role of reelin during early development of the cerebral cortex. *Mol Neurobiol*, 2004; 30(3): 225–51.
47. Schrauwen I, Ealy M, Fransen E, Vanderstraeten K, Thys M, Meyer NC i wsp. Genetic variants in the RELN gene are associated with otosclerosis in multiple European populations. *Hum Genet*, 2010; 127(2): 155–62.
48. Khalfallah A, Schrauwen I, Mnaja M, Fransen E, Lahmar I, Ealy M i wsp. Genetic variants in RELN are associated with otosclerosis in a non-European population from Tunisia. *Ann Hum Genet*, 2010; 74(5): 399–405.
49. Priyadarshi S, Panda KC, Panda AK, Ramchander PV. Lack of association between SNP rs3914132 of the RELN gene and otosclerosis in India. *Genet Mol Res*, 2010; 9(3): 1914–20.
50. Weegerink NJ, Schrauwen I, Huygen PL, Pennings RJ, Cremers CW, Van Camp G i wsp. Phenotype of the first otosclerosis family linked to OTSC10. *Laryngoscope*, 2011; 121(4): 838–45.
51. Rodriguez L, Rodriguez S, Hermida J, Frade C, Sande E, Visedo G i wsp. 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; 128A(1): 19–22.
52. Gezeery AE. Otosclerosis: association of COL1A1 Sp1 binding site polymorphism in Alexandria, Egypt. 2012; 6(5): 747.