

# **A DFNA9 típusú öröklődő hallásvesztés molekuláris biológiai vizsgálata**

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

**Nagy Ildikó**

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,  
Biológia Doktori Iskola, Klasszikus és molekuláris genetika program

Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Programvezető: Dr. Orosz László

Témavezető: Dr. Patthy László

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ, Enzimológiai Intézet  
Budapest, 2009

# Bevezetés

A hallásvesztés a leggyakrabban előforduló érzékelő funkciót érintő betegség. A különböző típusú hallásvesztések kialakulása nagyobb részben genetikai eredetű. Az öröklődő hallásvesztések kb. 70 %-ban egyetlen gén hibájára vezethetők vissza és nagy részük nem jár együtt más tünetekkel. Az elmúlt években intenzív kutatómunka eredményeként számos lokuszt térképeztek és sok hallásvesztés kialakulásáért felelős gént azonosítottak. Újabb gének azonosítása és a gének által kódolt még ismeretlen funkciójú fehérjék megismerése tovább segíti a hallás folyamatának megértését, lehetővé teszi a hatékonyabb genetikai diagnosztikát, és a terápiás lehetőségek tervezését.

Az SZBK Enzimológiai Intézetének Funkcionális Genomika munkacsoportja 2000-ben definiálta önálló szerkezettel rendelkező doménként az LCCL modult, amelyet különböző multidomén fehérjék építőelemeként egyre több fehérjében azonosítanak. E domén típust először a *Limulus polyphemus* C faktorában, a Coch-5b2 (cochlin) fehérjében, és az Lgl1 (late gestation lung) fehérjében azonosították és jellemezték, innen származik az LCCL elnevezés. A belső fül extracelluláris mátrixának fő komponense a cochlin fehérje, amely egy LCCL domént és két A típusú von Willebrand faktor domént (vWFA1 és vWFA2) tartalmaz.

Kimutatták, hogy a cochlin LCCL doménjében lokalizálódó mutációk DFNA9 típusú, autoszomális domináns öröklődésű, nem-szindrómás hallásvesztést okoznak. Mivel az LCCL domén mutációi fontos szerepet játszanak a betegség kialakulásában, munkacsoportunkban részletes szerkezet-funkció vizsgálatok kezdődtek. Külföldi munkacsoporttal együttműködésben 2001-ben meghatározták az LCCL domén NMR szerkezetét és kimutatták, hogy a DFNA9-et okozó mutációk az LCCL domén konzervatív szerkezeti elemeit károsítják és a fehérje aggregációját okozzák.

## Célkitűzések

1. A kutatásokba bekapcsolódva doktori munkám egyik célja további mutációk keresése és azonosítása volt a magyar populációban, abban a reményben, hogy új típusú mutációk vizsgálata segítségünkre lesz a betegség patomechanizmusának tisztázásában.

1.1. A DFNA9 klinikai tünetei alapján halláskárosodott személyek kiválasztása genetikai analízisre

1.2. Új mutációk keresése és azonosítása a *COCH* gén LCCL domént kódoló régiójában.

1.3. A mutáns LCCL domének expressziója és doménszerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálata.

2. A cochlin fehérje pontos funkciójának meghatározása, hallásban betöltött szerepének megismerése is fontos feladat, hiszen erről máig keveset tudunk. Ezért célul tűztem ki a cochlin különböző doménjei és a belső fül extracelluláris mátrixának komponensei között kialakuló kölcsönhatások vizsgálatát, amelyek elősegítik a cochlin biológiai funkciójának megértését.

2.1. A cochlin fehérje LCCL és A típusú von Willebrand faktor doménjeinek expressziója, szerkezeti jellemzése.

2.2. A cochlin fehérje LCCL, vWFA1, és vWFA2 doménjei és különböző extracelluláris mátrix fehérjék közötti kölcsönhatások vizsgálata, a kölcsönhatások kinetikai paramétereinek meghatározása.

## **Alkalmazott módszerek**

**Genetikai analízis:** A Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Fül-Orr-Gégészeti, Fej- és Nyaksebészeti Klinikán cochleáris implantációs listáról választottam ki azokat a betegeket, akik megfeleltek a DFNA9 diagnosztikai kritériumainak. 14 különböző családból 17 érintett személy és 50 egészséges kontroll személy genomális DNS mintájának elemzésével kerestem mutációkat a *COCH* gén LCCL domént kódoló régiójában. A *COCH* gén LCCL doménjét kódoló 4. és 5. exonját amplifikáltam, és dideoxi szekvenálással meghatároztam a szekvenciát. Annál a betegnél, akinél eltérést találtam a szekvenciában, az érintett DNS szakasz klónozásával, majd szekvenálásával meghatároztam a mutáció pontos helyét és típusát.

**Klónozás:** A COCH/LCCL\_V104del és COCH/LCCL\_I109N mutáns doméneket kódoló DNS szakaszt tartalmazó pMed23, valamint a COCH/LCCL, COCH/LCCL\_I109N, COCH/vWFA1, és COCH/vWFA2 doméneket kódoló DNS szakaszt tartalmazó pPICZA expressziós vektor konstrukciókat standard rekombináns DNS technológiai módszerekkel állítottam elő.

**A fehérjék expressziója és tisztítása:** A rekombináns fehérjék expressziója *Escherichia coli* JM109 és *Pichia pastoris* GS115 sejtekben történt. Az expresszált fehérjék tisztítását nikkel-Sepharose affinitás kromatográfiával és gélfiltrálással végeztem.

**SDS poliakrilamid gélelektroforézis:** A fehérje minták összetételének elemzéséhez 11-22 %-os lineáris poliakrilamid grádiens géleket használtam, redukáló és nem-redukáló körülmények között.

**Fehérje szekvenálás:** A megtisztított fehérjék N-terminális szekvenálását egy Applied Biosystems471A fehérje szekvenáló készülékkel végeztük.

**Spektrofotometria:** A rekombináns fehérjék koncentrációját spektrofotometriásan határoztam meg a következő extinkciós koefficienseket használva: coch/LCCL,  $10930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; coch/vWFA2,  $13075 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia:** A rekombináns cochlin/vWFA2 domén CD spektrumait 195-250 nm közötti hullámhossz tartományban, JASCO J-720 spektropolariméterrel vettem fel. A méréseket 0,2 mg/ml koncentrációjú fehérje oldattal, 25 mM Tris/HCl pH:8,0 pufferben, 25 °C-on végeztem. A rekombináns fehérje hődenaturációját 222 nm-en követtem, 25-85 °C közötti tartományban, majd az olvadási hőmérsékletet a görbék elsőrendű deriváltjaiból határoztam meg, a spektropolariméter spektrum analízis programjával.

**Szekvencia elemzések:** A különböző fajokból származó cochlin/LCCL domének aminosav szekvenciáinak többszörös illesztéséhez a CLUSTAL W programot használtam.

**Kölcsönhatás vizsgálatok:** A coch/vWFA2 domén, valamint a coch/LCCL domén és a humán I., II. és IV. típusú kollagének közötti kölcsönhatások vizsgálatát felületi plazmon rezonancia (SPR) analízissel végeztem BIAcore X készülékkel. A kinetikai paraméterek meghatározásához a BIAevaluation 4.0 szoftvert használtam.

A különböző kétértékű fémionok hatását a coch/vWFA2 domén és a kollagének kölcsönhatására szintén SPR-rel vizsgáltam.

## Eredmények

### 1. Új LCCL domént érintő mutációk azonosítása és a mutációk hatásának vizsgálata

1.1. Magyar populációból a süket betegek genomiális DNS-ének szekvencia elemzése során, egy beteg személynél azonosítottam a *COCH* gén LCCL domént kódoló régiójában egy új

típusú, heterozigóta formában megjelenő mutációt, amely DFNA9 típusú hallásvesztést eredményez. Ez a magyar populációban azonosított első, a világon a hetedik azonosított *COCH* gént érintő mutáció típus, amely a DFNA9 hallásvesztéshez köthető.

1.2. A mutációval érintett DNS szakasz klónozásával meghatároztam a mutáció pontos helyét és típusát: egy, az 5. exonban, a 367-369. nukleotidokat érintő deléció, amely a cochlin fehérje LCCL doménjében a 104. pozícióban lévő valin delécióját eredményezte, a leolvadási keret eltolódása nélkül. A többi DFNA9 betegnél és a vizsgált kontroll személyeknél nem találtam mutációt az LCCL domént kódoló régióban.

1.3. A beteg személy DNS-ét templátként használva rekombináns úton, bakteriális expressziós rendszerben előállítottam a V104del mutáns LCCL domént, valamint kétlépéses PCR mutagenézis technikával a korábban azonosított I109N mutáns LCCL domént.

1.4. A munkacsoportunk által korábban expresszált mutánsok többségével egyezően, a vad típusú LCCL domén esetében sikerrel alkalmazott refoldálási protokollt használva, az általam expresszált Val104del és I109N mutáns LCCL domén esetében sem alakult ki a fehérje natív szerkezete, hanem oldhatatlan aggregátum formájában kicsapódott.

1.5. Az LCCL domén meglévő szerkezeti információinak alapján e két mutáns fehérje esetében megállapítottam, hogy a mutációk konzervált aminosavakat érintenek és káros hatásuk az LCCL domén szerkezetének kialakításában esszenciális  $\beta$ -struktúrák destabilizálásában nyilvánul meg.

## **2. A humán cochlin C terminális A típusú von Willebrand faktor (vWFA2) doménjének szerkezeti jellemzése**

2.1. A munkám második részében rekombináns úton előállítottam a humán cochlin fehérje C-terminális A típusú von Willebrand faktor doménjét (vWFA2).

2.2. A coch/vWFA2 domén CD-spektuma alapján megállapítottam, hogy a domén a vWFA-domén család többi tagjához hasonló szerkezettel rendelkezik. Hődenaturáció során a rekombináns fehérje kooperatív módon omlik össze, olvadáspontja 52 °C.

## **3. Fehérje kölcsönhatások vizsgálata**

3.1. Felszíni plazmon rezonancia (SPR) mérésekkel megállapítottam, hogy a rekombináns humán coch/vWFA2 domén kötődik a humán I., II., és IV. típusú kollagénekhez, míg a

rekombináns humán coch/LCCL domén nem mutat affinitást egyik kollagén típushoz sem. A szenzorgramok elemzéséből meghatároztam, hogy a coch/vWFA2 domén I., II., és IV. típusú kollagénekkel kialakított kölcsönhatásának egyensúlyi disszociációs állandói:  $7,97 \times 10^{-8}$  M,  $9,45 \times 10^{-8}$  M, és  $1,1 \times 10^{-7}$  M.

3.2. 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 1mM  $\text{Mg}^{2+}$ , vagy 100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  jelenlétében végzett felszíni plazmon rezonancia mérésekkel megállapítottam, hogy a különböző fémionok nincsenek hatással a humán coch/vWFA2 domén különböző típusú kollagénekkel kialakított kölcsönhatására.

## Következtetések

1. A mutációk hatásának vizsgálatai megerősítették a DFNA9 patomechanizmusára vonatkozó korábbi feltevéseket, amely szerint a mutációk funkciónyeres mechanizmus által hatnak: a mutáns fehérje jelenléte és nem elégtelen működése okozza a betegséget. A betegek belső fülében megtalálható nem sejtes eredetű lerakódás, a hibás szerkezetű LCCL doménnel rendelkező cochlin fehérjék aggregátuma, amely évek alatt, lassan felhalmozódva a belső fül szöveteiben, a neuronok progresszív degenerációját okozza. Erre utal a betegség kései kezdete és progresszív jellege is.

2. Kimutattam, hogy a cochlin fehérje nagy affinitással kötődik a II-es típusú kollagénhez, megerősítve a korábbi feltevést, hogy a cochlin és a II-es típusú kollagén kölcsönhatása kulcsszerepet játszik a cochlea és vesztibulum szerkezeti homeosztázisának fenntartásában. A coch/vWFA2 domén az I-es és IV-es típusú kollagéneket is erősen köti, e kölcsönhatások fiziológiai jelentősége azonban nem ismert.

A fémek jelenlétében történt mérések alapján feltételezhető, hogy a cochlin vWFA2 doménje általi kollagén felismerési mechanizmus különbözik a fémkötő motívummal (metal ion dependent adhesion site, MIDAS) rendelkező vWFA domént tartalmazó fehérjékétől pl. az integrinekétől.

A kölcsönhatás vizsgálatok alapján lehetséges továbbá, hogy a cochlin extracelluláris mátrix komponensekkel kialakítandó kölcsönhatását gátló mutációk akadályozzák a normális cochlin fehérje működését a belső fülben, elősegítve a hallásvesztés kialakulását.

# Közlemények

## Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

**Nagy, I.**, Horváth, M., Trexler, M., Répássy, G., and Patthy, L. (2004) A novel COCH mutation, V104del, impairs folding of the LCCL domain of cochlin and causes progressive hearing loss.

*J. Med. Genet.* **41**:e9. IF: 4.112

**Nagy, I.**, Trexler, M., and Patthy, L. (2008) The second von Willebrand type A domain of cochlin has high affinity for type I, type II, and type IV collagens.

*FEBS Letters.* **582**, 4003-7. IF:3.263

## Előadások

**Ildikó Nagy**, Mária Trexler, Edvards Liepinsh, Andrei Kaikkonen, Johan Weigelt, László Bányai, Miklós Horváth, Gábor Répássy, Gottfried Otting, László Patthy.

„COCH gene mutations impair folding of the LCCL domain of cochlin and cause progressive hearing loss.”

30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference, Budapest, Hungary, 2005.

**Nagy Ildikó**, Trexler Mária, Edvards Liepinsh, Andrei Kaikkonen, Johan Weigelt, Bányai László, Horváth Miklós, Répássy Gábor, Gottfried Otting, Patthy László.

„Az LCCL domén. A térszerkezet meghatározása és a domént érintő mutációk szerepének vizsgálata a DFNA9 típusú öröklődő halláskárosodás kialakulásában.”

A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 9. Munkaértekezlete, Sopron, 2004.

## Idézettség

1. Street, VA, Kallman, JC, Robertson, NG, Kuo, SF, Morton, CC and Phillips, JO. (2005) A novel DFNA9 mutation in the vWFA2 domain of COCH alters a conserved cysteine residue and intrachain disulfide bond formation resulting in progressive hearing loss and site-specific vestibular and central oculomotor dysfunction. *Am. J. Med. Genet. A*, 139A, 86-95.
2. Makishima, T, Rodriguez, CI, Robertson, NG, Morton, CC, Stewart, CL and Griffith, AJ. (2005) Targeted disruption of mouse Coch provides functional evidence that DFNA9 hearing loss is not a COCH haploinsufficiency disorder. *Hum. Genet.*, 118, 29-34.
3. Kemperman, MH, De leenheer, EMR, Huygen, PLM, van duijnhoven, G, Morton, CC, Robertson, NG, Cremers, FPM, Kremer, H and Cremers, CWRJ. (2005) Audiometric, vestibular, and genetic aspects of a DFNA9 family with a G88E COCH mutation. *Otol. Neurotol.*, 26, 926-33.
4. Collin, RWJ, Pauw, RJ, Schoots, J, Huygen, PLM, Hoefsloot, LH, Cremers, CWRJ and Kremer, H. (2006) Identification of a novel COCH mutation, G87W, causing autosomal dominant hearing impairment (DFNA9). *Am. J. Med. Genet. A*, 140A, 1791-4.
5. Robertson, NG, Cremers, CWRJ, Huygen, PLM, Ikezono, T, Krastins, B, Kremer, H, Kuo, SF, Liberman, MC, Merchant, SN, Miller, CE, Nadol, JB, Sarracino, DA, Verhagen, WIM and Morton, CC. (2006) Cochlin immunostaining of inner ear pathologic deposits and proteomic analysis in DFNA9 deafness and vestibular dysfunction. *Hum. Mol. Genet.*, 15, 1071-85.
6. Yan, D, Ke, X, Blanton, SH, Ouyang, XM, Pandya, A, Du, LL, Nance, WE and Liu, XZ. (2006) A novel locus for autosomal dominant non-syndromic deafness, DFNA53, maps to chromosome 14q11.2-q12. *J. Med. Genet.*, 43, 170-4.
7. Bischoff, AMLC, Pauw, RJ, Huygen, PLM, Aandekerker, AL, Kremer, H, Cremers, CWRJ and Cruysberg, JRM. (2007) Vertical corneal striae in families with autosomal dominant hearing loss DFNA9/COCH. *Am. J. Ophthalmol.*, 143, 847-52.
8. Pauw, RJ, Huygen, PLM, Collin, RWJ, Cruysberg, JRM, Hoefsloot, LH, Kremer, H and Cremers, CWRJ. (2007) Phenotype description of a novel DFNA9/COCH mutation, I109T. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 116, 349-57.
9. Pauw, RJ, Collin, RWJ, Huygen, PLM, Hoefsloot, LH, Kremer, H and Cremers, CWRJ. (2007) Clinical characteristics of a Dutch DFNA9 family with a novel COCH mutation, G87W. *Audiol. Neurootol.*, 12, 77-84.
10. Kommareddi, PK, Nair, TS, Raphael, Y, Telian, SA, Kim, AH, Arts, HA, El-kashlan, HK and Carey, TE. (2007) Cochlin isoforms and their interaction with CTL2 (SLC44A2) in the inner ear. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, 8, 435-46.
11. Picciani, R, Desai, K, Guduric-fuchs, J, Cogliati, T, Morton, CC and Bhattacharya, SK. (2007) Cochlin in the eye. Functional implications. *Prog. Retin. Eye Res.*, 26, 453-69.
12. Yuan, HJ, Han, DY, Sun, Q, Yan, D, Sun, HJ, Tao, R, Cheng, J, Qin, W, Angeli, S, Ouyang, XM, Yang, SZ, Feng, L, Cao, J, Feng, GY, Wang, YF, Dai, P, Zhai, SQ, Yang, WY, He, L and Liu, XZ. (2008) Novel mutations in the vWFA2 domain of COCH in two Chinese DFNA9 families. *Clin. Genet.*, 73, 391-4.



13. Williamson, RE, Darrow, KN, Giersch, ABS, Resendes, BL, Huang, M, Conrad, GW, Chen, ZY, Liberman, MC, Morton, CC and Tasheva, ES. (2008) Expression studies of osteoglycin/mimecan (OGN) in the cochlea and auditory phenotype of Ogn-deficient mice. *Hear. Res.*, 237, 57-65.
14. Robertson, NG, Jones, SM, Sivakumaran, TA, Giersch, ABS, Jurado, SA, Call, LM, Miller, CE, Maison, SF, Liberman, MC and Morton, CC. (2008) A targeted Coch missense mutation: a knock-in mouse model for DFNA9 late-onset hearing loss and vestibular dysfunction. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 3426-34.
15. Street, VA, Kallman, JC, Strombom, PD, Bramhall, NF and Phillips, JO. (2008) Vestibular function in families with inherited autosomal dominant hearing loss. *J. Vestib. Res.*, 18, 51-8.

### **Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó közlemény**

**Nagy, I.,** Trexler, M., and Patthy, L. (2003) Expression and characterization of the olfactomedin domain of human myocilin.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 554-61. IF: 2.836

### **Poszter**

**Nagy Ildikó,** Trexler Mária, Patthy László.

„A humán myocilin olfactomedin doménjének szerkezete és mutációinak szerepe a glaucoma kialakulásában.”

A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztályának 8. Munkaértekezlete, Tihany, 2003.

### **Idézettség**

- 1 Kanagavalli, J, Krishnadas, SR, Pandaranayaka, E, Krishnaswamy, S and Sundaresan, P. (2003) Evaluation and understanding of myocilin mutations in Indian primary open angle glaucoma patients *Mol Vis*, 9, 606-14.
2. Zenga, LC, Han, ZG and Ma, WJ. (2005) Elucidation of subfamily segregation and intramolecular coevolution of the olfactomedin-like proteins by comprehensive phylogenetic analysis and gene expression pattern assessment. *FEBS Lett.*, 579, 5443-53.
3. Aroca-aguilar, JD, Sanchez-sanchez, F, Ghosh, S, Coca-prados, M and Escribano, J. (2005) Myocilin mutations causing glaucoma inhibit the intracellular endoproteolytic cleavage of myocilin between amino acids Arg(226) and Ile(227). *J. Biol. Chem.*, 280, 21043-51.
4. Ando, K, Nagano, T, Nakamura, A, Konno, D, Yagi, H and Sato, M. (2005) Expression and characterization of disulfide bond use of oligomerized A2-pancortins: Extracellular matrix constituents in the developing brain. *Neuroscience*, 133, 947-57.
5. Liu, WL, Chen, L, Zhu, JC and Rodgers, GP. (2006) The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins. *Exp. Cell. Res.*, 312, 1785-97.

6. Gobeil, S, Letartre, L and Raymond, V. (2006) Functional analysis of the glaucoma-causing TIGR/myocilin protein: Integrity of amino-terminal coiled-coil regions and olfactomedin homology domain is essential for extracellular adhesion and secretion. *Exp. Eye Res.*, 82, 1017-29.
7. Vollrath, D and Liu, YH. (2006) Temperature sensitive secretion of mutant myocilins. *Exp. Eye Res.*, 82, 1030-6.
8. Park, BC, Shen, X, Fautsch, M, Tibudan, M, Johnson, D and Yue, BYJT. (2006) Optimized bacterial expression of myocilin proteins and functional comparison of bacterial and eukaryotic myocilins. *Mol. Vis.*, 12, 832-40.
9. Hillier, BJ, Sundaresan, V, Stout, CD and Vacquier, VD. (2006) Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the olfactomedin domain from the sea urchin cell-adhesion protein amassin. *Acta Crystallogr. F-Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 62, 16-9.
10. Hillier, BJ and Vacquier, VD. (2007) S 5a8; structural features and functional domains of amassin-1, a cell-binding olfactomedin protein. *Biochem. Cell Biol.*, 85, 552-62.
11. Maertens, B, Hopkins, D, Franzke, CW, Keene, DR, Bruckner-tuderman, L, Greenspan, DS and Koch, M. (2007) Cleavage and oligomerization of gliomedin, a transmembrane collagen required for node of Ranvier formation. *J. Biol. Chem.*, 282, 10647-59.
12. Sakai, H, Shen, X, Koga, T, Park, BC, Noskina, Y, Tibudan, M and Yue, BYJT. (2007) Mitochondrial association of myocilin, product of a glaucoma gene, in human trabecular meshwork cells. *J. Cell Physiol.*, 213, 775-84.
13. Coca-prados, M and Escribano, J. (2007) New perspectives in aqueous humor secretion and in glaucoma: The ciliary body as a multifunctional neuroendocrine gland. *Prog. Retin. Eye Res.*, 26, 239-62.
14. Kurgan, L. (2008) On the relation between the predicted secondary structure and the protein size *Protein J.*, 27, 234-9.
15. Mackay, EO, Kallberg, ME and Gelatt, KN. (2008) Aqueous humor myocilin protein levels in normal, genetic carriers, and glaucoma Beagles. *Vet. Ophthalmol.*, 11, 177-85.
16. Pandaranayaka, PJE, Kanagavalli, J, Krishnadas, SR, Sundaresan, P and Krishnaswamy, S. (2008) Over expression and purification of recombinant human myocilin. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24, 903-7.