

Identifizierung modifizierender Faktoren bei der Schwerhörigkeit von Mensch und Maus

Andreas Janecke

Department für Medizinische Genetik, Molekulare und Klinische Pharmakologie, Medizinische Universität Innsbruck

Zusammenfassung

Einer syndromalen Form von Innenohrschwerhörigkeit bei C57BL/6T-Mäusen liegen homozygote Mutationen im *tubby*-Gen zugrunde. *Tub/tub*-Mäuse zeigen allerdings keine Schwerhörigkeit, wenn sie ein *Mtap1a*-Allel von AKR/J, CAST/Ei oder 129/Ola-Mäusen tragen. Ein weiteres Beispiel stellen in diesem Zusammenhang *Alp2b2* und *Cdh23* dar. Homozygote *Atp2b2*-Mutationen verursachen eine angeborene Schwerhörigkeit bei BALB/cBy-Mäusen (*deaf waddler*, *dfw*). Heterozygote *dfw*-Mäuse entwickeln eine altersbedingte Schwerhörigkeit. Ein einziges CAST-Allel an einem Modifier-Lokus, *mdfw*, kann die altersbedingte Schwerhörigkeit verhindern. Ein einziger synonyme SNP in *Cdh23*, der zu *in-frame skipping* von Exon 7 führt, stellt den Unterschied zu dem protektivem „Wildtyp-Allel“ am Modifierlokus dar. Umgekehrt ist beim Menschen das Vorliegen einer heterozygoten Missense-Mutation im *ATP2B2*-Gen mit einem höheren Grad der Schwerhörigkeit bei Vorliegen homozygoter *CDH23*- oder *MYO6*-Mutationen, und auch bei umweltbedingter Schwerhörigkeit assoziiert. Es wurde von zwei weiteren Modifiern von Schwerhörigkeit beim Menschen berichtet: Ein Allel am *DFNMI*-Lokus ist ausreichend, um den Effekt von homozygoten Mutationen am Schwerhörigkeits-Lokus *DFNB26* zu unterdrücken. Ein Locus auf Chromosom 8 modifiziert die Wirkung der mitochondrialen 12S-RNA-Gen-Mutation A1555G.

Schlüsselwörter: Innenohr-/Altersschwerhörigkeit, *TUBBY*, *Cadherin23*, *ATP2B2*

Summary

Homozygous *tubby* mutations cause a syndromic form of sensorineural hearing loss in C57BL/6J mice. One *Mtap1a* allele from either AKR/J, CAST/Ei, or 129/Ola protects C57BL/6J *tub/tub* mice from hearing loss. Another example of a hearing-loss gene and its modifier in mice represent *Atp2b2* and *Cdh2S*. Homozygous *Atp2b2* mutations in BALB/cBy mice cause profound early-onset hearing loss (*deaf waddler*, *dfw*). A heterozygous *dfw* allele causes age-related hearing loss in BALB/cBy mice whereas a *GAST* allele of a modifier gene protects *dfw/+* mice from hearing loss. A synonymous single-nucleotide polymorphism of *Cdh23*, which causes *in-frame skipping* of exon 7 was identified as the modifier of *dfw* (*mdfw*). Conversely in Man, a heterozygous missense mutation in *ATP2B2* increases the hearing loss due to either homozygous *CDH23* or *MYO6* mutations, and due to noise exposure. Two further human modifiers of hearing have been reported. One allele at the *DFNMI* locus completely suppresses hearing loss among individuals homozygous for *DFNB26* mutations. A locus on chromosome 8 modifies maternally inherited deafness associated with a mutation (A1555G) in the mitochondrial 12S ribosomal RNA.

Keywords: Sensorineural deafness, age-related hearing loss, *TUBBY*, *Cadherin23*, *ATP2B2*

Einleitung

Der Identifizierung von modifizierenden genetischen und umweltbedingten Faktoren beim Menschen stehen u. a. die starke genetische Heterogenität und die Variabilität der Umweltbedingungen im Wege. So wurden beispielsweise – wie bei vielen anderen Erkrankungen auch – unterschiedliche Schweregrade in der Ausprägung der Innenohrschwerhörigkeit sowohl bei verwandten als auch bei nichtverwandten Personen gefunden, die durch dieselben Mutation verursacht wird.

Mausmodelle können hier helfen, die Wirkungsweise modifizierender Faktoren zu erklären. Die effizienteste Methode zur Identifizierung von Modifier-Genen bei der Maus ist die Kreuzung von Inzucht-Stämmen, die eine Mutation tragen und sich phänotypisch unterscheiden. Man findet bei Mäusen nach Kreuzung innerhalb der F2-Generation Tiere, die homozygot für Mutationen sind, die eine Schwerhörigkeit verursachen und die ein Modifier-Gen tragen müssen, da sie einen veränderten Phänotyp zeigen. Der Effekt eines Modifiers kann in einer Verstärkung oder Abschwächung des monogenen Krankheitsbildes bestehen. Er kann als Spezialfall einer Abschwächung auch zu einer Reduktion der Pleiotropie eines Geneffektes führen. Dies ist im Fall der *tubby*-Maus gegeben.

Tubby-Maus und Modifier Mtap1

Ein durch Fettsucht, Insulinresistenz, Netzhautdegeneration und Innenohrschwerhörigkeit charakterisiertes Syndrom bei C57BL/6J-Mäusen wird durch homozygote Mutationen im *tubby*-Gen verursacht. Beim Menschen ist das homologe Protein zum *tubby*-Protein Mitglied einer Familie von vier Proteinen (TUBBY, TULP1-3), die eine charakteristische *tubby*-Domäne besitzen und DNA binden können. Das Protein wird im paraventriculären Kern des Hypothalamus und anderen Gehirnanlagen hoch exprimiert. Wirkungen des *tubby*-Proteins als intrazelluläres Signalmolekül, Transkriptionsfaktor, im intrazellulären Transport und in der RNA Synthese werden diskutiert, seine Funktion ist bis jetzt jedoch nicht klar charakterisiert worden (Boggon, 1999; Ikeda, 2002). Mutationen im menschlichen homologen TUBBY-Protein wurden bisher nicht beschrieben, Mutationen im TULP1-Gen hingegen sind Ursache einer bestimmten Form der autosomal-rezessiven, nicht-syndromalen Retinitis Pigmentosa (RP14).

Das Auftreten sowohl der Schwerhörigkeit als auch der Netzhautdegeneration bei *tubby*-Mäusen ist von der genetischen Ausstattung abhängig. Eine Kreuzung von B6-*tub/tub*-Mäusen mit AKR/J-, CAST/Ei- oder 129P2/Ola-Mäusen kann die Schwerhörigkeit verhindern. Der Grad der Schwerhörigkeit bei den untersuchten Mäusen, also ein quantitativ messbares Merkmal (quantitativ trait) wurde entsprechend dem Schwellenwert in der Hirnstamm-Audiometrie ermittelt. Für den Grad der Schwerhörigkeit konnte ein „Quantitative Trait Locus“ (QTL) mittels Kopplungsanalysen kartiert werden. Mittels Positionsklonierung wurde das *Mtap1a*-Gen als Modifier der Schwerhörigkeit gefunden.

Ein *Mtap1a*-Allel von einem der genannten Mausstämmen schützt *tub/tub*-Mäuse vor Schwerhörigkeit. Dies wurde durch das Einbringen des protektiven Allels als Transgen in *tubby*-Mäuse experimentell bestätigt (Ikeda, 2002). Zehn Aminosäure-Austausche und ein Alanin-Prolin-Repeat-Polymorphismus unterscheiden die *Mtap1a*-Allele von B6- und von

protektiven Mausstämmen. Das *Mtap1a*-Protein ist bei der Assemblierung und Stabilisierung von Mikrotubuli beteiligt – einem essentiellen Schritt in der Neurogenese. Außerdem spielt es vermutlich eine Rolle beim Transport von Komponenten der Synapse vom Zytosol zur Synapse (Haider, 2002). Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass die genannten Aminosäureaustausche die Bindungseigenschaften zu PSD95, einem wichtigen Bestandteil der Architektur der Synapse, änderten (Ikeda, 2002).

ATP2B2-bedingte Schwerhörigkeit

Ein weiteres Beispiel für eine genetisch bedingte Schwerhörigkeit und einen genetischen Modifier stellen Mutationen in den ATPase Typ 2-Kalzium Transportpumpe (*Atp2b2*)- und Cadherin 23 (*Cdh23*)-Genen bei der Maus bzw. den Homologen, *ATP2B2*- und *CDH23*-Genen, beim Menschen dar.

Zwei spontan entstandene Mutationen im *Atp2b2*-Gen führen jeweils zu hochgradiger Schwerhörigkeit bei Mäusen aus C3H/HeJ- und BALB/cBy-Linien (*deaf waddler*, *dfw* und *dfw^{2j}*) (Street, 1998). Eine Hirnstamm-Audiometrie im Alter von 3 Wochen zeigt bei 100dB Stimulus keine Antwort von *dfw^{2j}/dfw^{2j}*-Mäusen. Heterozygote BALB/cBy-*dfw^{2j}/+*-Mäuse zeigen einen im Alter von vier Wochen beginnenden und mit 12 Wochen vollständigen Hörverlust, also eine Form von altersbedingter Schwerhörigkeit. Ein Allel aus einer CAST-Linie an einem Modifier-Lokus verhindert das Auftreten der altersbedingten Schwerhörigkeit.

Ein genomweiter Scan führte zur Kartierung dieses Modifier-Lokus (*mdfw*, modifier of deaf waddler) auf Mausechromosom 10 (Street, 1998). Zahlreiche Loci, die mit Hörfunktionen assoziiert sind, kartieren in derselben Region, wie z.B. die Maus-Mutanten *waltzer* und *Jackson circler*. Die menschlichen Erkrankungen Usher-Syndrom Typ 1D (USH1D) und DFNB12 kartieren in die Region auf Chromosom 10q21, die homolog zu der *mdfw*-Region der Maus ist. Nachdem Mutationen im Cadherin 23-Gen (*CDH23*) bei USH1D beschrieben

wurden (Bolz, 2001), zeigte sich, dass die altersbedingte Schwerhörigkeit bei BALB/cBy-*dfw^{2j}/+*-Mäusen mit Homozygotie für einen Single-Nucleotide-Polymorphismus (SNP) in Exon 7 des *Cdh23*-Gens einhergeht. Während dieser SNP keinen Aminosäureaustausch bedingt, kommt es jedoch zu einem in-frame-Herauspleißen von Exon 7 im Transkript. Heterozygotie für diesen SNP (c.753G>A), wie er z. B. aus dem CAST-Hintergrund erhalten wird, führt zu einer ausreichenden Menge normalen *Cdh23*-Transkriptes und verhindert die Schwerhörigkeit bei BALB/cBy-*dfw^{2j}/+*-Mäusen (Noben-Trauth, 2003). Weitere Mäuse mit Altersschwerhörigkeit aus 26 von 31 verschiedenen Mausstämmen waren ebenfalls homozygot für c.753G>A (Noben-Trauth, 2003). Dies weist darauf hin, dass Homozygotie für c.753G>A im *Cdh23*-Gen der häufigste Grund für eine genetisch bedingte Altersschwerhörigkeit bei Mäusen im Sinne einer Veranlagung ist. Jedoch müssen jeweils ein oder mehrere Faktoren zusätzlich auftreten, wie etwa Heterozygotie für eine *Atp2b2*-Mutation, damit die Altersschwerhörigkeit auftritt. Mäuse, die das c.753A-Allel in trans mit einer bei USH1D vorkommenden Mutation, einer Insertion (c.834-835insG) im *Cdh23*-Gen tragen, zeigen einen noch höhergradigen Hörverlust als Mäuse, die homozygot für c.753G>A sind.

Bei heterozygoten *Atp2b2*-Nullmutationen wurde eine genetische Prädisposition gegenüber der Entwicklung von Schwerhörigkeit bei Lärmbelastung vermutet (Kozel, 2002).

Das Protein *Atp2b2* ist in Stereozilien und der basolateralen Wand von Haarzellen des Innenohrs lokalisiert und ist vermutlich wichtig für die Reduktion von Kalzium-Ionen aus den entsprechenden subzellulären Strukturen in cochleären und vestibulären Haarzellen. Im Hinblick auf die Funktion von *Atp2b2* im Kalzium-Stoffwechsel stellt die Tatsache, dass Cadherine Kalzium für ihre Funktion benötigen, einen plausiblen funktionellen Zusammenhang zwischen *Atp2b2*- und *Cdh23*-Proteinen, respektive *mdfw*, her.

CDH23-bedingte Schwerhörigkeit

Kürzlich wurde von einer Familie berichtet (Schultz, 2005), in der fünf erwachsene Kinder blutsverwandter Eltern schwerhörig waren. Zwei Kinder hatten eine Hochtonschwerhörigkeit, drei Kinder zeigten eine schwere bis hochgradige Innenohrschwerhörigkeit. Alle fünf Kinder waren homozygot für eine Punktmutation in Exon 42 (c.5663T>C) des CDH23-Gens (F1888S). Die Mutation segregierte mit der Schwerhörigkeit in der Familie und wurde nicht in 108 europäischen Kontroll-Personen gefunden. In Anbetracht der oben genannten Kenntnisse über die Atp2b2- und Cdh23-Gene und -proteine, erbrachte eine Untersuchung des ATP2B2-Gens das zusätzliche Vorliegen der heterozygoten Mutation V586M (c.2075G>A in Exon 12) bei den drei schwerer betroffenen Kindern. Diese Mutation betrifft eine hochkonservierte Aminosäure. In-silico-Untersuchungen lassen einen Effekt der Mutation auf die ATP-Bindungsdomäne des Proteins erwarten (Schultz, 2005). Funktionelle Studien des mutierten Proteins zeigten etwa 50% der Aktivität der Wildtyp-ATPase in vitro.

Die ATP2B2-Mutation V586M wurde außerdem als verstärkender Faktor einer MYO6-Gen-bedingten Schwerhörigkeit in einer Familie beschrieben (Schultz, 2005). Darüber hinaus identifizierten dieselben Autoren drei Heterozygote für V586M in einer Stichprobe von 128 Familienmitgliedern von Familien mit verschiedenen Schwerhörigkeitsphänotypen. Bei einer von diesen drei Personen wurde eine Hochtonschwerhörigkeit nach Berufs- und Freizeitlärmbelastung gefunden.

Kartierung weiterer Modifizier-Gene

Im folgenden Beispiel wurde in derselben Familie eine Form von Innenohrschwerhörigkeit kartiert und ein Gen als Modifizier dieser Schwerhörigkeit gefunden. In dieser Familie aus Pakistan konnte aufgrund ihres umfangreichen Stammbaums mittels Homozygotie-Mapping ein weiterer Locus für autosomal-rezessiv erbliche Schwerhörigkeit (DFNB26) auf Chromosom 4q31 kartiert werden (Riazuddin, 2000). Auch bei sieben hörgesun-

den Familienmitgliedern wurde das Vorliegen des homozygoten Risiko-Haplotyps beobachtet. Die Kopplungsanalysedaten wurden im Hinblick auf die Existenz eines Modifizier-Lokus interpretiert. Dort reichte ein Allel aus, um die Wirkung der homozygoten DFNB26-Mutation zu unterdrücken. Der Modifizier-Lokus konnte in derselben Familie auf Chromosom 1q24 kartiert werden (Riazuddin, 2000). Weder das DFNM1-Gen noch das DFNB26-Gen wurden allerdings bisher kloniert, so dass eine Bestätigung dieser Befunde noch aussteht.

Ein anderes Beispiel für eine Form genetischer Schwerhörigkeit und die Ermittlung modifizierender Faktoren des Phänotyps betrifft die Mutation A1555G im mitochondrialen 12S-RNA-Gen. Die mitochondriale Mutation A1555G ist die häufigste mitochondriale Mutation, die zu nicht-syndromaler Schwerhörigkeit führt. Eine reduzierte Penetranz der Mutation wurde beobachtet, viele Träger der Mutation zeigen bis ins hohe Alter keine Zeichen einer Schwerhörigkeit. Die Mutation stellt in vielen Fällen eine Veranlagung für eine Schwerhörigkeit dar, die durch Einnahme von Antibiotika aus der Gruppe der Aminoglykoside ausgelöst wird. Während die Einnahme von hohen Dosen von Aminoglykosiden über längere Zeit vermutlich bei den meisten Menschen ototoxisch wirkt, entwickeln Träger der A1555G-Mutation bereits nach kurzer oder niedrig dosierter Einnahme eine Schwerhörigkeit. In vielen Familien ist diese Mutation jedoch auch ohne Aminoglykosid-Einnahme mit einer Schwerhörigkeit assoziiert, welche bei verschiedenen Familienmitgliedern unterschiedlich ausgeprägt sein kann (Fischel-Ghodsian, 2003).

Um die unterschiedliche Ausprägung der A1555G-Mutation zu erklären, begaben sich Bykhovskaya und Mitarbeiter (2000) auf die Suche nach modifizierenden genetischen Faktoren und kartierten mittels genomweiter Analyse von insgesamt 11 Familien einen Modifizier-Lokus auf Chromosom 8p23.1. Eine Klonierung des Gens wurde allerdings bisher nicht berichtet.

Ausblick

Die Kartierung und Identifizierung von Modifizier-Genen am Beispiel der genetisch bedingten Schwerhörigkeit und ansatzweise auch der umweltbedingten Schwerhörigkeit beim Menschen zeigen erste Erfolge bei der Aufklärung komplexer Erkrankungen.

Die Erforschung von Modifizier-Genen ermöglicht darüber hinaus, pathophysiologische Ursachenforschung einer Erkrankung aus einem anderen Blickwinkel zu betreiben. Die Identifizierung von ursächlicher und modifizierender Mutation derselben Schwerhörigkeit könnten dabei wesentlich zu einem besseren Verständnis der Innenohrfunktion führen.

Die Beobachtung, dass Altersschwerhörigkeit und Empfindlichkeit gegenüber der Auslösung von Schwerhörigkeit durch Lärm bei verschiedenen Labor-Mausstämmen sehr unterschiedlich ausgeprägt sind, weist darauf hin, dass in Zukunft noch weitere, zahlreiche genetische Modifizier gefunden werden dürften. Die Untersuchung weiterer Personen mit vermutterter lärmbedingter Schwerhörigkeit im Hinblick auf das Vorliegen von ATP2B2-Mutationen dürfte hierbei die Bedeutung dieses Gens klären.

Literatur

- Boggon TJ, Shan WS, Santagata S, Myers SC, Shapiro L (1999) Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis. *Science* 286:2119-2125.
- Bolz H, von Brederlow B, Ramirez A, Bryda EC, Kutsche K, Nothwang HG, Seeliger M, del C-Salcedo Cabrera M, Vila MC, Molina OP, Gal A, Kubisch C (2001) Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Genet* 27:108-12.
- Bykhovskaya Y, Estivill X, Taylor K, Hang T, Hamon M, Casano RA, Yang H, Rotter JI, Shohat M, Fischel-Ghodsian N (2000) Candidate locus for a nuclear modifier gene for maternally inherited deafness. *Am J Hum Genet* 66:1905-10.
- Fischel-Ghodsian N (2003) Mitochondrial deafness. *Ear Hear* 24:303-13.
- Haider NB, Ikeda A, Naggert JK, Nishina PM (2002) Genetic modifiers of vision and hearing. *Hum Mol Genet* 11:1195-206.
- Ikeda A, Zheng QY, Rosenstiel P, Maddatu T, Zuberi AR, Roopenian DC, North MA, Naggert JK, Johnson KR, Nishina PM (1999) Genetic modifi-

cation of hearing in tubby mice: evidence for the existence of a major gene (moth1) which protects tubby mice from hearing loss. *Hum Mol Genet* 8:1761-1767.

Ikeda, A.; Zheng, Q. Y.; Zuberi, A. R.; Johnson, K. R.; Naggert, J. K.; Nishina, P. M. (2002) Microtubule-associated protein 1A is a modifier of tubby hearing (moth1). *Nature Genet* 30: 401-405.

Kozel PJ, Davis RR, Krieg EF, Shull GE, Erway LC (2002) Deficiency in plasma membrane calcium ATPase isoform 2 increases susceptibility to noise-induced hearing loss in mice. *Hear Res* 164:231-9.

Noben-Trauth K, Zheng QY, Johnson KR (2003) Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Nat Genet* 35:21-3.

Riazuddin S, Castelein CM, Ahmed ZM, Lalwani AK, Mastroianni MA, Naz S, Smith TN, Liburd NA, Friedman TB, Griffith AJ, Riazuddin S, Wilcox ER (2000) Dominant modifier DFNM1 suppresses recessive deafness DFNB26. *Nature Genet.* 26: 431-434.

Schultz JM, Yang Y, Caride AJ, Filoteo AG, Penheiter AR, Lagziel A, Morell RJ, Mohiddin SA, Fananapazir L, Madeo, AC, Penniston JT, Griffith AJ (2005) Modification of human hearing loss by plasma-membrane calcium pump PMCA2. *New Eng J Med* 352:1557-1564.

Street VA, McKee-Johnson JW, Fonseca RC, Tempel BL, Noben-Trauth K (1998) Mutations in a plasma membrane Ca²⁺-ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice. *Nat Genet* 19:390-4.

Korrespondenzadresse

Dr. med. Andreas Janecke
 Department für Medizinische Genetik,
 Molekulare und Klinische Pharmakologie
 Medizinische Universität Innsbruck
 A-6020 Innsbruck
 Schöpfstraße 41
 Österreich
 Tel. (+43) 512 507-3469, -3461
 Fax (+43) 512 507-2861
 Andreas.Janecke@uibk.ac.at