

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Kuulmislangusega seotud mitokondri RNR1 geenimutatsioonide re-sekveneerimine
rakuvabast DNA-st**

Magistritöö

30 EAP

Benelote Uusküla

Juhendajad PhD Kaarel Krjutškov

PhD Margus Leppik

TARTU 2025

INFOLEHT

Kuulmislangusega seotud mitokondri RNR1 geenimutatsioonide re-sekveneerimine rakuvabast DNA-st

Kuulmislangust põhjustavad kolm mutatsiooni mitokondri RNR1 geenis: m.1095T>C, m.1494C>T ja m.1555A>G. Need mutatsioonid muudavad 12S rRNA järjestuse mitokondris sarnaseks prokarüoodi 16S rRNA järjestusele, mis põhjustab aminoglükosiidide paremat seondumist ning ototoksilisust. Käesolevas töös uuriti mitteinvasiivse prenataalse testimise (NIPT) tulemustes mutatsioonide esinemissagedust täiendava PCR-amplifikatsiooni ja re-sekveneerimise läbi. Mutantne alleel kinnitati, kui selle osakaal kõigist lugemitest sekveneerimistulemustes ületas 50%. Kolme mutatsiooni kumulatiivne esinemissagedus oli 0,23%. Re-sekveneerimise kinnituse abil oli võimalik NIPT tulemustest eemaldada valepositiivsed tulemused ja kinnitada tõelised mutatsiooniga proovid 100% spetsiifilisusega. Mutatsiooni kajastamine elektroonilistes terviseandmetes aitab vältida aminoglükosiidide manustamisest põhjustatud kuulmislanguse teket riskialleelidega patsientidel.

MT-RNR1, aminoglükosiidid, ototoksilisus, NIPT

CERCS: B790 Kliiniline geneetika

Re-sequencing of mitochondrial RNR1 variants linked to hearing loss using cell-free DNA

Three specific mutations in the MT-RNR1 gene, m.1095T>C, m.1494C>T, and m.1555A>G, are known to cause hearing loss. These mutations alter the mitochondrial 12S rRNA sequence to resemble the prokaryotic 16S rRNA, increasing the binding affinity of aminoglycoside antibiotics and thereby causing ototoxicity. This study investigated the prevalence of these mutations using non-invasive prenatal testing (NIPT) data, followed by targeted PCR amplification and re-sequencing for validation. A mutation was confirmed if over 50% of sequencing reads carried the mutant allele. The combined frequency of the three mutations was found to be 0.23%. Re-sequencing allowed for the elimination of false positives from the NIPT results and ensured 100% specificity in confirming true positive samples. Integrating mutation information into electronic health records enables clinicians to avoid prescribing aminoglycosides to at-risk individuals, reducing the likelihood of preventable hearing loss.

MT-RNR1, aminoglycosides, ototoxicity, NIPT

CERCS: B790 Clinical genetics

SISUKORD

| | |
|--|----|
| INFOLEHT..... | 2 |
| SISUKORD | 3 |
| KASUTATUD LÜHENDID | 5 |
| SISSEJUHATUS | 6 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 7 |
| 1.1. Aminoglükosiidid ja nende kasutamine neonatoloogias | 7 |
| 1.2. Kõrva anatoomia ja aminoglükosiidide põhjustatud kahjustused..... | 8 |
| 1.3. Mutatsioonid MT-RNR1 geenis ja aminoglükosiidide mõju | 9 |
| 1.4. CfDNA ja selle kasutamine kliinilises praktikas | 10 |
| 1.5. Mitteinvasiivne prenataalne testimine (NIPT)..... | 11 |
| 1.6. NIPT-i laiendamine MT-RNR1 genotüpiseerimiseks | 11 |
| 1.7. Suunatud tehnoloogiad MT-RNR1 mutatsioonide tuvastamiseks..... | 12 |
| 1.8. Ennetav sekkumine aminoglükosiidide ototoksilisuse vähendamiseks..... | 13 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA | 14 |
| 2.1. Töö eesmärgid..... | 14 |
| 2.2. Materjal ja meetodika | 14 |
| 2.2.1. NIPT analüüsi tulemused | 14 |
| 2.2.2. cfDNA eraldamine ja loote päritolu cfDNA rikastamine | 15 |
| 2.2.3. Praimerite disainimine | 15 |
| 2.2.4. Mitokondriaalse 12S rRNA re-sekveneerimine | 16 |
| 2.2.5. Sekveneerimisandmete analüüsimine | 18 |
| 2.3. Tulemused ja arutelu..... | 19 |
| 2.3.1. Praimeripaari valimine | 19 |
| 2.3.2. Mitokondriaalse 12S rRNA re-sekveneerimise tulemused | 21 |
| 2.3.3. Kliiniline olulisus..... | 24 |

| | |
|---------------------------|----|
| KOKKUVÕTE | 26 |
| SUMMARY | 27 |
| TÄNUAVALDUSED..... | 29 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 30 |
| LIHTLITSENTS..... | 37 |

KASUTATUD LÜHENDID

| | |
|----------------|--|
| cfDNA | <i>cell-free DNA</i> ; rakuvaba DNA |
| cffDNA | <i>cell-free fetal DNA</i> ; loote päritolu rakuvaba DNA |
| ctDNA | <i>circulating tumor DNA</i> ; tsirkuleeriv kasvaja DNA |
| MT-RNR1 | MITOCHONDRIAL RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE 1 |
| mtDNA | <i>mitochondrial DNA</i> ; mitokondriaalne DNA |
| NIPT | <i>non-invasive prenatal testing</i> ; mitteinvasiivne prenataalne testimine |
| rRNA | <i>ribosomal RNA</i> ; ribosomaalne DNA |
| T _m | <i>melting temperature</i> ; praimerisulamistemperatuur |

SISSEJUHATUS

Kuulmine on inimese igapäevase toimimise ja elukvaliteedi oluline osa, mille kahjustus toob kaasa märkimisväärse sotsiaalse ja majandusliku koormuse. Üks kuulmislanguse põhjustaja on mitokondriaalses genoomis esinevad variatsioonid, eriti mitokondri RNR1 (MITOCHONDRIAL RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE 1, MT-RNR1) geenis, mis muudavad inimese vastuvõtlikuks aminoglükosiid-antibiootikumide ototoksilisele toimele. Teaduslikult on kinnitatud, et mutatsioonid m.1555A>G, m.1494C>T ja m.1095T>C suurendavad riski pöördumatuks kuulmislanguseks pärast aminoglükosiidide manustamist (McDermott, Wolf, *et al.*, 2022).

Kuna aminoglükosiidide manustamine on kliiniliselt levinud, eriti neonatoloogias, kus ravi tuleb sageli alustada enne täielikku diagnostilist selgust, on riskirühma kuuluvatel patsientidel mutatsiooni eelnev tuvastamine oluline. Farmakogeneetiline lähenemine võimaldab tuvastada indiviide, kellel on suurenenud risk ravimite kõrvaltoimete tekkeks. Kui mutatsioonikandja on eelnevalt teada, saab vältida sobimatu antibiootikumi kasutamist ja sellega seotud tüsistusi.

Käesolevas magistritöös uuriti kolme MT-RNR1 geenimutatsiooni esinemissagedust mitteinvasiivse prenataalse testimise (NIPT) andmetes. Mutatsiooniposiitivsete leidude valideerimiseks töötati välja cfDNA-põhine töövoog, mis võimaldas läbi viia PCR-amplifikatsiooni ja mitokondri DNA re-sekveneerimist. Töö eesmärk oli rakendada farmakogeneetiline testimine kliinilisse praktikasse.

Käesoleva töö tulemuste põhjal on valminud ka teaduspublikatsiooni käsikiri.

Töö teostati ettevõttes Celvia CC.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Aminoglükosiidid ja nende kasutamine neonatoloogias

Aminoglükosiid-antibiootikume (gentamüsiin, tobramüsiin, amikatsiin, netilmitsiin, plasomitsiin, kanamüsiin, streptomüsiin, paromomüsiin, neomüsiin) kasutatakse aeroobsete gramnegatiivsete bakterite poolt põhjustatud infektsioonide raviks (MacDougall & Schooley, 2023). Aminoglükosiidid pärsivad valgusünteesi, seondudes prokarüootide 30S ribosoomi 16S ribosomaalse RNA (rRNA) A-saidiga, muutes sellega bakteriaalse valgusünteesi ebatäpseks ja bakterirakule toksiliseks (Kotra *et al.*, 2000).

Aminoglükosiidide jaotumine organismis on ebaühtlane, mis selgitab nende nefrotoksilist ja ototoksilist potentsiaali. Nimelt on aminoglükosiidide manustamisel antibiootikumi kontsentratsioon kõrge just neerukoos ja sisekõrva endo- ja perilümfis (MacDougall & Schooley, 2023) ning madal kudedes ja sekreetides (Panidis *et al.*, 2005).

Kliinilises praktikas rakendatakse aminoglükosiidide manustamiseks kahte peamist skeemi: üks suur annus kord päevas või mitme väiksema annuse manustamine 24 tunni vältel. Ühe korra päevas manustamine on efektiivne aminoglükosiidide farmakokineetika tõttu – nende bakteritsiidne toime on parem kõrgematel kontsentratsioonidel ja post-antibiootiline efekt võimaldab säilitada terapeutilist toimet ka siis, kui ravimikontsentratsioon veres langeb alla minimaalse inhibeeriva taseme (MacDougall & Schooley, 2023). Mitme väikse annuse manustamisel ei tõuse aminoglükosiidide kontsentratsioon sama kõrgele, kui ühekordsel manustamisel, kuid langeb alla toksilisuse lävendi ainult lühikeseks perioodiks enne uue doosi manustamist (MacDougall & Schooley, 2023).

Rasedatel, lastel ja vastsündinutel on eelistatud suure doosi manustamine korra 24 tunni jooksul, sest see aitab vältida aminoglükosiidide kumulatsiooni neerudes ja sisekõrvas. (Contopoulos-Ioannidis *et al.*, 2004; Nestaas *et al.*, 2005). Ühekordse suure annuse aminoglükosiidi manustamise puhul jääb ravimi kontsentratsioon plasmas pikemat aega alla toksilisuse lävendi, võimaldades efektiivset ravi väiksemate kõrvaltoimete riskiga (MacDougall & Schooley, 2023).

Vastsundinutel kasutatakse sepsise ravimiseks aminoglükosiidide kombinatsioonis teiste antimikroobsete ravimitega, et katta laiemat patogeenide spektrit (Chattopadhyay, 2002; Shane *et al.*, 2017).

1.2. Kõrva anatoomia ja aminoglükosiidide põhjustatud kahjustused

Inimese kõrva jaotatakse kolmeks osaks: väliskõrv, keskkõrv ja sisekõrv. Väliskõrv püüab ja suunab helilained keskkõrva ning hõlmab kõrvalesta, väliskuulmekanalit ja kuulmekilet. Kuulmekile võnkumised kanduvad edasi keskkõrvas paiknevatele kuulmeluukestele, mis võimendavad heli ning suunavad selle ovaalakna kaudu sisekõrva. (Bruss & Shohet, 2023)

Sisekõrv täidab lisaks kuulmise võimaldamisele ka tasakaalu- ehk vestibulaarelundi funktsiooni. Sisekõrva struktuur koosneb kahest osast – luulisest labürindist ja selle sees paiknevast membraansest labürindist, mis on omavahel eraldatud perilümfiga. Membraanse labürindi moodustab tigu, poolringjuhad, mõik ja kotike ning selle sees on endolümf. Poolringjuhad, mõik ja kotike vastutavad tasakaalu eest. Tigu on spiraalne torukujuline õõs ning on kuulmiselundiks. Tigu koosneb kolmest osast: esikuastrik, trummiastrik ja teojuha. Esikuastrik ja trummiastrik on täidetud perilümfiga ning teojuha endolümfiga. Esikuastrikut ja trummiastrikut eraldab basilaarmembraan, millel asetseb Corti elund. (Bruss & Shohet, 2023)

Ovaalaknalt tulevad vibratsioonid panevad perilümfi sisekõrvas liikuma ning selle kaudu liiguvad basilaarmembraanil karvarakud. Corti elund koos karvarakkudega transformeerivad mehaanilised perilümfist tulenevad võnked närvierutuseks. Kuulmisnärv kiud viivad impulsid edasi ajju. (Bruss & Shohet, 2023)

Käesoleva töö kontekstis on oluline just sisekõrv, sest seal avaldub aminoglükosiidide kuulmiskahjustav toime.

Aminoglükosiidid läbivad vere-labürindi barjääri ja sisenevad endolümfist karvarakkudesse (H. Li & Steyger, 2011). Aminoglükosiidid inhibeerivad mitokondris valgusünteesi, suurendavad mitokondri sisemise membraani läbilaskvust, põhjustavad fosfatidüülseriini paiknemist karvarakkude pinnale ning reaktiivsete hapnikuühendite tootmist, mis põhjustavad karvarakkude surma (Hutchin & Cortopassi, 1994; Dehne *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2006; Rybak & Ramkumar, 2007; Goodyear *et al.*, 2008). Kahjustus on tavaliselt pöördumatu ning viib sensorineuraalse kuulmislanguseni.

1.3. Mutatsioonid MT-RNR1 geenis ja aminoglükosiidide mõju

Mitokondri ribosoom koosneb 28S ja 39S subühikust ning neile vastavad 12S ja 16S rRNA-d (Amunts *et al.*, 2015; Greber *et al.*, 2015). Need rRNA-d on vajalikud mRNA transleerimiseks mitokondri valkudeks (Yang *et al.*, 2014). Mitokondri RNR1 geen kodeerib 12S rRNA subühikut, mis on struktuurilt väga sarnane prokarüoodi 16S rRNA-ga, mistõttu on oht, et prokarüoodi-spetsiifilised antibiootikumid mõjuvad ka mitokondri ribosoomidele (McDermott, Wolf, *et al.*, 2022). MTRNR1 geenis teadaolevate mutatsioonide tõttu muutub 12S rRNA järjestus veel sarnasemaks 16S rRNA järjestusele, mis põhjustab aminoglükosiidi efektiivsuse tõusu mitokondri ribosoomi vastu (Hamasaki & Rando, 1997; Qian & Guan, 2009; Rando & others, 2002).

Erinevatest uuringutes on leitud kolm mitokondri 12S rRNA mutatsiooni, m.1095T>C, m.1494C>T ja m.1555A>G, mis mõjutavad aminoglükosiidide ototoksilist toimet. m.1555A>G esinemissagedus erinevates populatsioonides on kuni 0,5%, olles kolmest uuritavast mutatsioonist kõige sagedasem (Usami & Nishio, 2004). m.1494C>T levimus on kuni 0,25% (Usami & Nishio, 2004). Kõige vähem uuritud ja harvem mutatsioon on m.1095T>C. Mutatsioonid m.1494C>T ja m.1555A>G võivad muuta 12S rRNA sekundaarstruktuuri nii, et aminoglükosiididele tekib seondumiskoht rRNA A-saiti, mis viib mitokondri valgusünteesi inhibeerimisele antibiootikumi poolt (Guan *et al.*, 1996; H. Zhao *et al.*, 2004). m.1095T>C mutatsiooni puhul on näidatud defekte valgusünteesi initsiatsioonis (Thyagarajan *et al.*, 2000).

McDermott *et al.* (2022) artiklis on välja toodud mitmed uuringud, mis tõestavad, et kolm huvipakkuvat mitokondri mutatsiooni võimaldavad paremat aminoglükosiidide seondumist 12S rRNA-ga kui metsiktüüpi 12S rRNA-ga, mis on seotud suurema aminoglükosiidide põhjustatud kuulmislanguse riskiga.

30. eluaastaks on aminoglükosiid-antibiootikume saanud ja m.1555A>G mutatsiooniga inimesel tõenäosus kurdiks jääda 96,5%, võrreldes 39,9% tõenäosusega sama mutatsiooniga inimesel, kellele pole manustatud aminoglükosiide (Estivill *et al.*, 1998). Ühes uuritud perekonnas oli aminoglükosiididega kokkupuutel kurtuse penetrantus 80% ning ainult 40% patsientide seas, kellele ei manustatud aminoglükosiide (Wu *et al.*, 2018). Kümnest mutatsiooni m.1555A>G kandvast imikust, kes said ka aminoglükosiide, oli kolmel häireid kuulmiskontrollis (Göpel *et al.*, 2014). Kuigi mutatsiooni m.1555A>G kandjatel inimestel, kellele ei oldud manustatud AG, oli kuulmine suurte kohortuuringute kohaselt normaalne

(Bitner-Glindzicz *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2012), selgus teistes uuringutes, et aminoglükosiid-antibiootikumide vältimine m.1555A>G mutatsiooniga inimestel ei ennetanud kurdiks jäämist (Estivill *et al.*, 1998; Usami *et al.*, 1997, 2000). Aminoglükosiidide manustamine m.1555A>G mutatsiooniga inimestele suurendas kuulamislanguse tekke riski ning taset.

Aminoglükosiidide manustamine m.1095T>C, m.1494C>T ja m.1555A>G mutatsioonidega patsientidele põhjustas neil kerget kuni sügavat kuulmislangust. Mutatsiooni m.1555A>G kandev patsient sai 21-aastasena aminoglükosiid gentamütsiini 5 mg/kg/doos, mille tagajärjel avaldus tal kahe nädala pärast kuulmislangus (Wu *et al.*, 2018). Antud patsiendi ja tema perekonnas aminoglükosiide saanud m.1555A>G mutatsiooni kandjate kuulmislävi, ehk helitugevus, millest tasasemaid helisid inimene ei kuule, oli paremini kuulvas kõrvas: 90 dB, 35 dB, 85 dB ja 55 dB ehk varieerus kergest sügavani (Wu *et al.*, 2018). Ühekordne doos 40 mg gentamütsiini põhjustas kerget kuulmislangust viieaastasel patsiendil, kes kandis mitokondri 12S rRNA-s mutatsiooni m.1095T>C (L. Zhao *et al.*, 2004). Mutatsiooni m.1494C>T kandvas perekonnas läbi viidud uuringus leiti, et aminoglükosiidide manustamine alla kümneaastastele patsientidele põhjustas sügava kuulmislanguse, kuid 20-aastastel patsientidel hinnati kuulmislangust kergeks kuni raskeks (H. Zhao *et al.*, 2004).

Mutatsioone m.1095T>C, m.1494C>T ja m.1555A>G kandvad patsiendid võiksid vältida aminoglükosiidide tarvitamist, kuigi see ei pruugi täielikult ära hoida kuulmislangust. Aminoglükosiidide toimel võib nimetatud mutatsioonidega patsientidel välja kujuneda kõrgema raskusastmega kuulmislangus või toimub kahjustus kuulmisele varasemas eas võrreldes olukorraga, kus aminoglükosiide poleks manustatud.

1.4. CfDNA ja selle kasutamine kliinilises praktikas

CfDNA on vabalt kehavedelikes ringlevad DNA fragmendid. Esimest korda kirjeldasid cfDNA-d Mandel & Metais (1948). CfDNA vabaneb rakkude apoptoosis ja nekroosis. cfDNA fragmentide pikkus on 160–180 bp (Kustanovich *et al.*, 2019). CfDNA muutub ja ringleb kehas kiirelt, mis on kliinilise praktika vaatenurgast on oluline, sest võimaldab reaajas organismi kohta infot saada (Volik *et al.*, 2016).

1989. aastal kinnitasid Stroun *et al.*, et vähipatsientidel on cfDNA hulgas kasvajaspetsiifiline ctDNA. CtDNA on osutunud onkoloogias kasulikuks tööriistaks nii vähi diagnoosimisel, ravi jälgimisel kui ka prognoosimisel (Cheng *et al.*, 2016; Chen & Zhao, 2019).

Teine oluline avastus 1989. aastal tehti Lo *et al.* poolt, kui rasedate veres leiti suur osakaal cffDNA-d. See avastus lõi aluse NIPT testimisele. CffDNA pärineb platsenta trofoblasti rakkudest (Taglauer *et al.*, 2014) ning eemaldatakse seega kiirelt ema verest peale sünnitamist (Lo *et al.*, 1999).

1.5. Mitteinvasiivne prenataalne testimine (NIPT)

NIPT on meetod loote geneetiliste kõrvalekallete tuvastamiseks, mis põhineb ema verest eraldatud cfDNA analüüsil. Raseduse ajal ema vereringes olevast cfDNA-st on 3,4–20,4% loote päritolu, lootest pärineva cffDNA proportsioon kasvab raseduse arenemisega (Lo *et al.*, 1998; Lun *et al.*, 2008). CffDNA osakaal ema cfDNA-st on määrav tegur NIPT testi tundlikkuse ja täpsuse seisukohalt.

NIPT analüüs võimaldab tuvastada mitmeid kromosoomhaigusi, mikrodeletsioone ning sugukromosoomide anomaaliaid (van der Meij *et al.*, 2019; Paluoja *et al.*, 2025). Kuna analüüs põhineb ema vereproovil, on tegemist ohutu ja mitteinvasiivse alternatiiviga invasiivsetele protseduuridele, nagu amniotsentees või koorionbiopsia.

1.6. NIPT-i laiendamine MT-RNR1 genotüpiseerimiseks

Huang *et al.* (2023) viisid läbi suuremahulise uuringu Hiinas, kus analüüsiti 77 328 NIPT-proovi, et hinnata mutatsioonide m.1555A>G ja m.1494C>T esinemist loote cfDNA-st. Analüüsi kaasati 76 842 proovi, mille puhul naise vereproov oli võetud raseduse erinevates trimestrites: 10 893 proovi 9.–13. nädalal, 65 553 proovi 14.–27. nädalal ja 416 proovi 28. nädalal või hiljem. Mutatsioonide tuvastamise aluseks oli kaks kriteeriumit: vähemalt kaks mutantset lugemist huvipakkavas positsioonis ja mutantse alleeli osakaal üle 10% või üks mutantne lugemine, kui mutantse alleeli osakaal oli vähemalt 30%.

Tulemuste põhjal leiti, et mutatsioon m.1555A>G esines 0,215% ja m.1494C>T 0,021% analüüsitud raseduse puhul. Positiivsete leidude ennustav väärtus (*positive predictive value*,

PPV) oli 90,73%, mis viitab testimeetodi kõrgele usaldusväärsusele. See kinnitab, et NIPT tehnoloogiat saab edukalt laiendada ka farmakogeneetilisse konteksti, võimaldades tuvastada ravimitundlikkusega seotud mutatsioone enne ravimi määramist.

1.7. Suunatud tehnoloogiad MT-RNR1 mutatsioonide tuvastamiseks

Mutatsioonide genotüpiseerimiseks on välja töötatud mitmeid molekulaarbioloogilisi tehnoloogiaid, mis erinevad nii tundlikkuse, kulukuse kui ka ajakulu poolest erinevateks kliinilisteks rakendusteks.

Restriktaasi põhine meetod PCR-RFLP on üks lihtsamaid viise mutatsioonide tuvastamiseks. Meetodis kasutatakse restriktasensüüme, mis lõikavad DNA-d kindlatest järjestustest. Mutatsioonid muudavad restriktasioonimustrit ja sellega tekivad erineva pikkusega DNA fragmendid (Chuang *et al.*, 2008). Meetod on odav ja tehniliselt lihtne, kuid selle täpsus on piiratud ning see ei sobi kõigi mutatsioonide tuvastamiseks.

Sangeri sekveneerimine on kuldstandard mutatsioonide genotüpiseerimisel, kuna see võimaldab ligi 100% täpsusega tuvastada SNP-sid DNA järjestuses. Meetod on aeganõudev ja kulukas, eriti suure proovide hulga korral.

qPCR-põhine genotüpiseerimine võimaldab mutatsioonide kiiret ja kvantitatiivset määramist. Selle puhul kasutatakse alleelispetsiifilisi probe'e, mis tuvastavad erinevaid allelele reaajas PCR tsükli jooksul. Meetod on kiire, täpne ja sobib hästi juba teada olevate mutatsioonide tuvastamiseks.

Tagmentatsioon on järgmise põlvkonna sekveneerimise (NGS) raamatukogude valmistamise meetod, kus kasutatakse Tn5 transposasensüümi, mis samaaegselt fragmenteerib DNA ja lisab sellele adapterjärjestused (Adey, 2021). Tagmentatsioon võimaldab cfDNA-põhistes proovides luua kiirelt ja efektiivselt sekveneerimiseks sobivaid raamatukogusid. Meetodi eeliseks on kiirus ja võime töödelda väikest hulka DNA-d. Käesolevas töös kasutati tagmentaasil põhinevat meetodit.

1.8. Ennetav sekkumine aminoglükosiidide ototoksilisuse vähendamiseks

Aminoglükosiide manustades on suur risk kuulmislanguse tekkeks m.1095T>C, m.1494C>T ja m.1555A>G mutatsioonidega patsientidel. Sellise genotüübiga patsientidel on kuulmislanguse tekkimise ennetamiseks oluline vältida aminoglükosiidide manustamist.

Bitner-Glindzicz *et al.* (2009) uurisid Euroopa laste populatsiooni ning leidsid, et valitud populatsioonis esines m.1555A>G mutatsioon 0,19% lastes, kuid neil ei olnud tekkinud kuulmislangust, kuna neile ei olnud kunagi aminoglükosiide manustatud. See näitab, et antud mutatsioon üksinda ei põhjusta kuulmiskahju, vaid haigusrisk realiseerub alles aminoglükosiidide kasutamisel. Autorid rõhutasid 12S rRNA mutatsioonide genotüüpiseerimise olulisust enne ravikuuri alustamist, et vältida pöördumatut, kuid ennetatavat kuulmiskahjustust.

Geneetiline testimine enne aminoglükosiidravi algust võimaldab tuvastada kõrge riskiga isikud ning vältida neile aminoglükosiidide manustamist, välja arvatud juhul, kui puudub sellele ravile alternatiiv. Aminoglükosiide tuleks vältida, välja arvatud olukordades, kus potentsiaalne eluohtlik infektsioon kaalub üles kuulmiskahjustuse riski (MacDougall & Schooley, 2023). Kui aminoglükosiid on ainus efektiivne ravim, peab ravivalik olema teadlikult kaalutletud, arvestades nii nakkuse raskust kui ka alternatiivide puudumist.

Kliinilisse praktikasse integreerituna võib MT-RNR1 genotüübi põhine antibiootikumi määramine oluliselt vähendada kuulmislanguse all kannatavate arvu. Selleks on oluline arendada digitaalseid vahendeid ja patsiendikeskseid ravijuhendeid, mis integreerivad geneetilise info elektroonilistesse terviseandmetesse ja toetavad raviotsuseid.

Ennetusel on ka laiem majanduslik ja sotsiaalne mõju. Kuulmislangus mõjutab oluliselt elukvaliteeti, suhtlemisvõimet ja haridusteed ning võib vajada püsivaid abivahendeid, sealhulgas kuulmisimplantaate, mille maksumus on kõrge (Sinnathuray *et al.*, 2003). Seetõttu on kasulik juba varakult tuvastada riskikandjad ja vältida ototoksilist ravi.

Geneetiline testimine enne aminoglükosiidide määramist ei ole mitte ainult teaduslikult põhjendatud, vaid ka eetilise ja sotsiaalselt vastutustundlik tegevus, millel on potentsiaal ennetada eluaegset kuulmiskahjustust.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärk oli kaardistada mitokondriaalse DNA (mtDNA) mutatsioonide m.1095T>C, m.1494C>T ja m-1555A>G esinemissagedus NIPT teenuslabori proovidest ja töötada välja sõltumatu cfDNA põhine töövoog NIPT-is tuvastatud mutatsioonide re-sekveneerimiseks ja tulemuste kvantifitseerimiseks.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. NIPT analüüsi tulemused

Käesolevas töös kasutati andmeid, mis pärinesid Celvia CC teenuslaboris juba varem teostatud NIPT proovidest. Kokku analüüsiti 5529 proovi, mis olid kogutud alates 2023. aasta märtsist kuni 2024. aasta juunini. Proovid pärinesid üksikrasedusega patsientidelt, kellele teostati NIPT test 10.–20. rasedusnädalal.

Proovide sekveneerimiseks järgiti protokoll, mis hõlmas 36 proovist koosneva DNA raamatukogu valmistamist, sekveneerimist ja sekveneerimisandmete töötlust. Kasutusel olid N2 ja N3 sekveneerimise protokollid. N3 protokoll eristab N2 protokollist DNA raamatukogu suurusseleksioon cfDNA fragmentide rikastamiseks. Analüüsitud 5529 uuringuproovist töödeldi 5291 proovi N3 protokollil alusel. N3 protokolliga töödeldud proovidest sekveneeriti 4162 proovi Illumina NextSeq 500 ja 1129 proovi Illumina NextSeq 1000 instrumendiga. Lisaks töödeldi 238 proovi N2 protokollil järgi, mis ei sisalda suurusseleksiooni sammu, ning need sekveneeriti NextSeq 500 instrumendiga.

Sekveneerimine viidi läbi Illumina NextSeq 500 ja NextSeq 1000 instrumentidega, kasutades 85 bp pikkuseid üheotsalisi lugemeid, mis sobivad hästi lühikeste cfDNA fragmentide analüüsiks. Sekveneerimistulemused laaditi alla Illumina BaseSpace'i platvormilt ning andmetöötlus viidi läbi Tartu Ülikooli kõrgjõudlusega andmetöötluse (HPC) serverikeskkonnas. Sekveneerimisandmetes esinesid ka mtDNA järjestused, mis võimaldasid käesoleva töö raames kolme huvipakkuva mitokondri mutatsiooni analüüsi (m.1095T>C, m.1494C>T ja m.1555A>G). Täiendavale valideerimisele PCR ja re-sekveneerimise abil

suunati ainult need proovid, kus kõigi kolme sihtpositsiooni katvus oli vähemalt üks lugem ja mutatsioonilise alleeli sagedus oli $\geq 20\%$.

Käesoleva töö autor ei osalenud proovide kogumise ega laboratoorse töötuse protsessides kuni NIPT testi tulemuste genereerimiseni ning sai ligipääsu ainult anonüümsete andmete analüütilisele väljundile.

2.2.2. cfDNA eraldamine ja loote päritolu cfDNA rikastamine

NIPT testi eelduseks on patsiendi täisverest cfDNA eraldamine ning sellest loote päritolu cfDNA rikastamine.

Vereproove tsentrifugeeriti esmalt 20 minutit 2000 g juures ning seejärel eraldatud plasmafraktsiooni 10 minutit 16 000 g juures, tsentrifugeerimise eesmärk oli eemaldada rakud ja raku fragmendid. Edasiseks töötuseks kasutati puhastatud plasmafraktsiooni.

CfDNA eraldus viidi läbi Celia CC teenuslabori standardiseeritud laboriprotokolli alusel rutiinis NIPT analüüsi läbiviivate laborispetsialistide poolt. Eralduse käigus töödeldi plasma proove 20% SDS lahuse ning proteinaas K-ga ning inkubeeriti 60 °C juures 30 minutit. CfDNA isoleerimiseks kasutati automaatset KingFisher Apex süsteemi (Thermo Fisher Scientific), rakendades magnetkerade põhist puhastusmeetodit.

Eraldatud cfDNA-st cffDNA rikastamiseks teostati proovidele suurusseleksioon (Liang *et al.*, 2018). Eelistati lühemaid fragmente, mis teadaolevalt on peamiselt lootelist päritolu (*Y. Li et al.*, 2004). Selline lähenemine tagas analüüsiks piisava katvuse ka cffDNA-st pärinevatel mtDNA järjestustel.

2.2.3. Praimerite disainimine

CfDNA-st vastava mtDNA järjestuse amplifitseerimiseks disainis töö autor esmalt spetsiifilised PCR-praimerid. Mutatsioonid m.1095T>C, m.1494C>T ja m.1555A>G asuvad MT-RNR1 geenis, seega hangiti vastav mitokondri järjestus Ensembl'i andmebaasist ((Dyer *et al.*, 2025). Analüüsiks sobivad praimeripaarid disainiti Primer3 veebipõhise tööriista abil (<https://primer3.ut.ee/>, (Koressaar & Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar *et al.*, 2018). Praimerite disainimisel seati järgmised parameetrid: praimeri pikkus 20–27 bp, praimeri

sulamistemperatuur (T_m) 58–64 °C, maksimaalne praimerite T_m erinevus 5 °C, praimerite GC-sisaldus 30–70%. Genereeriti kaks *forward* ja kaks *reverse* praimerit (tabel 1).

Tabel 1. Disainitud praimerite sulamistemperatuur (T_m) ja GC osakaal (100 μ M, Metabion)

| Praimeri nimetus | Järjestus | T_m (°C) | GC% |
|------------------|----------------------------|------------|-------|
| For1 | GATTAACCCAAGTCAATAGAAGCCG | 59.99 | 44.00 |
| For2 | AGTGGCTTTAACATATCTGAACACAC | 59.85 | 38.46 |
| Rev1 | TTCATAGTAGAAGAGCGATGGTGAG | 59.99 | 44.00 |
| Rev2 | TGTAAGTTGGGTGCTTTGTGTTAAG | 60.16 | 40.00 |

Erinevate *forward* ja *reverse* praimerite kombineerimisel amplifitseeriti mtDNA piirkond ja võrreldi nelja erinevat ampliconi agarosgeelelektroforeesil. PCR-produktid lahutati 1% agarosgeelelektroforeesil 0,5 \times TAE puhvris pingel 100V 20 minutit. Agarosgeelil visualiseeriti DNA fragmente etiidumbromiidiga UV-valguses ning hinnati amplifikatsiooni efektiivsust ja produkti oodatavat suurus. Lõplik otsus kasutatava praimeripaari valiku kohta põhines tulemuste sektsioonis kirjeldatud sekveneermise katvuse ja kvaliteedi hinnangul.

2.2.4. Mitokondriaalse 12S rRNA re-sekveneerimine

Eelnevalt disainitud praimeritest valiti üks *forward* ja *reverse* praimer (tabel 1), mida kasutades viidi läbi esimene samm mitokondri re-sekveneerimises, milleks oli PCR-reaktsioon kolme uuritava mutatsiooniga mitokondriaalse piirkonna amplifitseerimiseks. *Forward* ja *reverse* praimer segati kokku ning viidi 10 μ M kontsentratsioonini. PCR-segusse, mille lõppruumala oli 10 μ l, lisati 5 μ l Phusion HF Master Mixi (Thermo Fisher Scientific, 2 \times), 1 μ l *forward* ja *reverse* praimerite segu (Metabion, 10 μ M) ning 4 μ l uuritavat cfDNA-d (0,1–0,5 ng/ μ l).

PCR-reaktsioon viidi läbi Mastercycler Nexus SX1 (Eppendorf) termotsükleris järgmise programmiga:

98 °C 30 sekundit,

*98 °C 10 sekundit,

*68 °C 30 sekundit,

72 °C 10 minutit.

Tärniga tähistatud etappe korrati 30 tsüklit.

PCR-produkte puhastati magnetkeradega (Mag-Bind® TotalPure NGS, Omega Bio-tek). Magnetkeradega puhastusel lisati PCR-produktile sellega samas ruumalas magnetkerasid, inkubeeriti proove 5 minutit toatemperatuuril ning järgnevalt 5 minutit magnet-plaadil. Selle ajaga tõmbusid magnetkerad magnet-plaadi vastu ning tuubist eemaldati supernatant. Magnetkerad suspendeeriti 50 µl MQ vees. DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati Qubit 4 fluoromeetrit (Thermo Fisher Scientific) koos Qubit dsDNA HS Assay Kit'iga (Thermo Fisher Scientific). Qubit töölahus valmistati värvaine ja puhvri seguna vahekorras 1:200 ning mõõtmiseks lisati 198 µl töölahusele 2 µl PCR-produkti. Qubit mõõtmistulemuste põhjal lahjendati proove MQ veega, et kontsentratsioonid ühtlustada ja saavutada ligikaudu 1 ng/µl kontsentratsioon.

Proovi ettevalmistamisel sekveneerimiseks fragmenteeriti DNA tagmentaasi toimel. Tagmenteerimise reaktsioonisegu, lõppruumalaga 10 µl, oli järgnev: 6 µl MQ vett, 1 µl DNase I reaktsioonipuhvrit (Thermo Fisher Scientific, 10×), 2 µl tagmentaasi (Diagenode), 1 µl PCR-produkti (1 ng/µl). Tagmenteerimiseks inkubeeriti proovi termotsükleris 37 °C juures 10 minutit. Tagmenteeritud proov puhastati uuesti magnetkeradega.

Järgnevalt viidi läbi teine PCR, mille käigus lisati igale DNA fragmendile unikaalsed indeksjärjestused. 11 µl reaktsioonisegu moodustas: 5 µl phusion HF Master Mix (Thermo Fisher Scientific, 2×), 1 µl indeks praimeride segu (Metabion, 2 µM), 5 µl tagmenteeritud produkti. PCR programm indekse lisamiseks oli järgnev:

72 °C 5 minutit,

98 °C 30 sekundit,

*98 °C 10 sekundit,

*63 °C 30 sekundit,

*72 °C 10 sekundit,

72 °C 5 minutit.

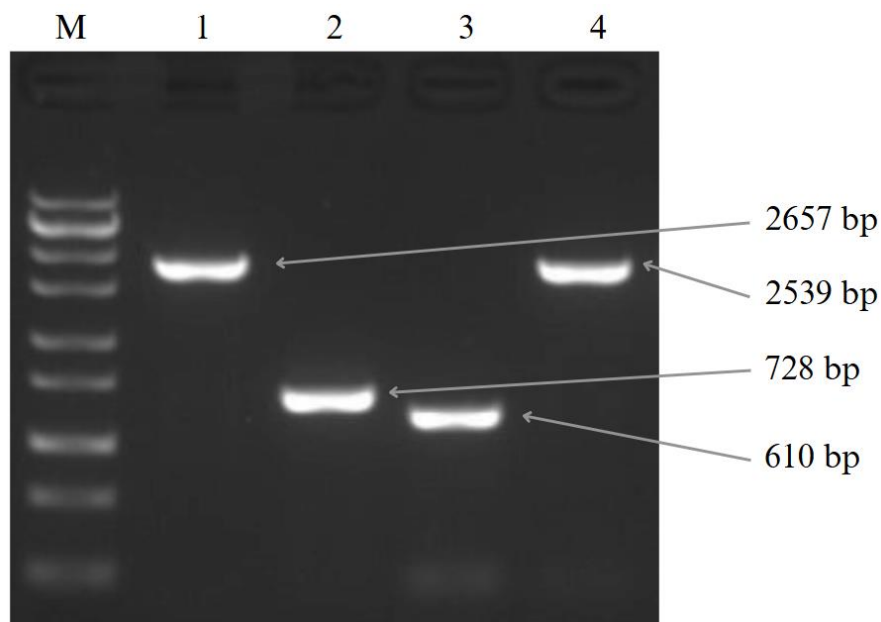
Tärniga tähistatud etappe korrati 10 tsükli.

Viimaks puhastati proovid magnetkeradega ning mõõdeti nende kontsentratsioon Qubit 4 fluoromeetriga (Thermo Fisher Scientific). Kontsentratsioonid ühtsustati, et kõigi proovide kontsentratsioonid oleksid 1 nM ning segati kokku raamatukoguks. Sekveneerimiseks valmis raamatukogu kontsentratsiooni kontrolliti TapeStation masinaga (4150 TapeStation System, Agilent Technologies). Vajadusel lahjendati raamatukogu MQ veega, et DNA lõppkontsentratsioon oleks 0,7–1,0 nM.

2.2.5. Sekveneerimisandmete analüüsimine

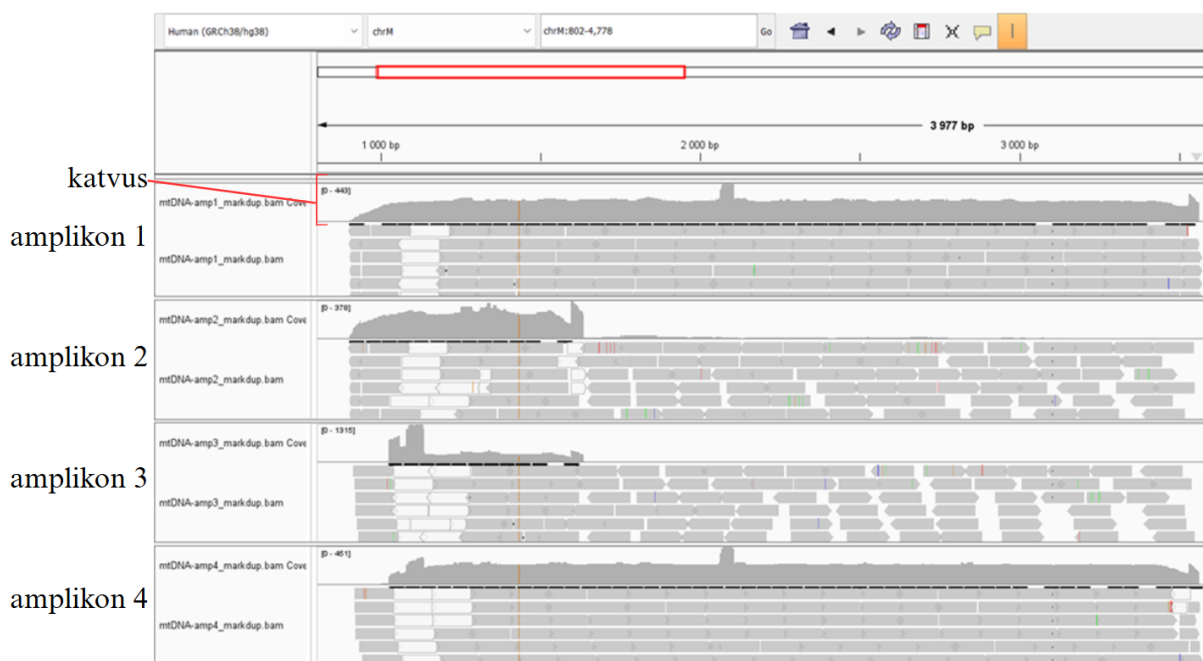
Analüüsitava DNA järjestused tuvastati Illumina NextSeq 1000 instrumendiga ning määratud järjestuste põhjal tuvastati kolme uuritava MT-RNR1 geeni mutatsiooni positsiooni katvused ja selles positsioonis esinevate nukleotiidide osakaalud.

Sekveneerimistulemused laaditi alla Illumina BaseSpace'i platvormilt ning andmetöötlus viidi läbi Tartu Ülikooli kõrgjõudlusega andmetöötluse (HPC) serverikeskkonnas. Väljundfailid sisestati Integrative Genomics Viewer (IGV) programmi, mille abil võrreldi tulemusi inimese referentsgenoomiga GRCh38. Mitokondriaalse DNA fragmendi järjestuses on võimalik näha huvipakkuva positsiooni katvust ehk kui palju sekveneeritud lugemeid vastavale genoomipositsioonile joondus ning nukleotiide jaotust igas positsioonis (joonis 1). Mutatsiooni tuvastamiseks arvutati mutantse nukleotiidi esinemise osakaal. Selleks jagati mutantsete lugemite arv antud positsioonis kõigi lugemite koguarvuga. Mutantne alleel loeti kinnitatuks, kui vastava nukleotiidi osakaal katvuses ületas 50%.



Joonis 2. Nelja erineva ampliconi PCR-produktid agarosgeelelektroforeesis: amplicon 1 pikkus 2657 bp (For1 + Rev1), amplicon 2 pikkus 728 bp (For1 + Rev2), amplicon 3 pikkus 610 bp (For2 + Rev2), amplicon 4 pikkus 2539 bp (For2 + Rev1). DNA visualiseeriti etiidiumbromiidiga UV-valguses, M tähistab DNA markerit.

Kõigi nelja praimerikombinatsiooniga viidi läbi mitokondri re-sekveneerimise analüüs ning nelja ampliconi sekveneerimisel tuvastatud järjestusi võrreldi omavahel IGV programmis (joonis 3). Esmalt jäeti kõrvale praimer Rev1 (tabel 1) ehk ampliconid 1 ja 4, sest hoolimata sellest, et amplifitseeriti ligi 2000 bp pikkune fragment, ei olnud seal ühtegi huvipakkuvat positsiooni (joonis 3). Võrreldes For1 ja For2 primereid (tabel 1) ja vastavalt amplicone 1 ja 2 ampliconidega 3 ja 4 ilmnes, et For2 praimerit kasutades on katvus ampliconi alguses ebaühtlane, seevastu saavutati For1 praimeriga ühtlasem katvus (joonis 3). Seetõttu kasutati edasises töös praimeripaari For1 + Rev2.



Joonis 3. Nelja ampliconi sekveneerimistulemuste visualiseerimine IGV programmis. Amplikon 1 – For1 + Rev1, amplikon 2 – For1 + Rev2, amplikon 3 – For2 + Rev2, amplikon 4 – For2 + Rev1. Esimene rida iga ampliconi kohal näitab katvust ehk lugemite arvu igas positsioonis.

2.3.2. Mitokondriaalse 12S rRNA re-sekveneerimise tulemused

Mitokondri re-sekveneerimise analüüsiks valiti 27 NIPT analüüsi läbinud proovi, mille sekveneerimistulemustes esines ühes huvipakkavas positsioonis mutantne alleel sagedusega 20% või rohkem. Mutatsioon m.1555G>A tuvastati 15 proovis, m.1095T>C kümnes proovis ja m.1494C>T kahes proovis. Re-sekveneerimise tulemused kinnitasid mutatsioonilise alleeli olemasolu viies proovis ehk 50% juhtudest m.1095 positsioonil, 50% juhtudest ehk ühes proovis m.1494 positsioonil ja 40% juhtudest ehk kuues proovis m.1555 positsioonil (tabel 2).

Lisaks kontrolliti kogu analüüsi töökindlust 135 juhuslikult valitud proovi abil, milles esialgne NIPT tulemus mitokondri mutatsioonide osas vastas referentsgenotübile. Kokku analüüsiti nende proovide põhjal kolme mutatsioonikohta 135 erinevas proovis. Kõigi proovide puhul kinnitas re-sekveneerimine esialgset tulemust täielikult ehk polnud ühtegi valenegatiivset tulemust. Testi spetsiifilisus on 100%.

Ühes kontrollimisel positiivsena kinnitatud m.1555G>A mutatsiooniga proovis leiti mutantne alleel, mille osakaal oli 8% (tabel 2). Selline heteroplasmia tase ei ole geneetiliselt dominantne, mistõttu jäeti see proov mutantse alleeli sageduse lõplikust arvestusest välja.

Tabel 2. Kolme mitokondri 12S rRNA geenijärjestuse positsiooni NIPT ja re-sekveneerimise tulemused. Tabelis on esitatud lugemite jaotus nukleotiidide (A, C, G, T) lõikes, mutantse alleeli sagedus NIPT tulemuses ja re-sekveneerimises (%) ning tulemuste tõlgendus. TP tähistab tõelist positiivset ja VP valepositiivset proovi. Metsiktüüpi nukleotiid antud positsioonis on tähistatud rohelisega ning mutantne nukleotiid punasega

| Mitokondri variatsioon | NIPT katvus | A | C | G | T | Mutantse alleeli sagedus NIPT tulemustes (%) | Mutantse alleeli sagedus mitokondri re-sekveneerimisel (%) | Tõlgendus |
|------------------------|-------------|----|----|----|---|--|--|-----------|
| m.1095T>C | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 100 | 98 | TP |
| | 11 | 0 | 10 | 0 | 1 | 91 | 99 | TP |
| | 18 | 0 | 16 | 0 | 2 | 89 | 95 | TP |
| | 3 | 0 | 2 | 0 | 1 | 67 | 98 | TP |
| | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 50 | 0 | VP |
| | 3 | 0 | 1 | 0 | 2 | 33 | 0 | VP |
| | 4 | 0 | 1 | 0 | 3 | 25 | 0 | VP |
| | 5 | 0 | 1 | 0 | 4 | 20 | 0 | VP |
| | 6 | 0 | 6 | 0 | 0 | 100 | 100 | TP |
| | 5 | 0 | 1 | 0 | 4 | 20 | 0 | VP |
| m.1494C>T | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | VP |
| | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 | 100 | 99 | TP |
| m.1555A>G | 5 | 0 | 0 | 5 | 0 | 100 | 100 | TP |
| | 12 | 0 | 0 | 12 | 0 | 100 | 100 | TP |
| | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 100 | 95 | TP |
| | 6 | 0 | 0 | 6 | 0 | 100 | 99 | TP |
| | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 50 | 0 | VP |
| | 13 | 7 | 0 | 6 | 0 | 46 | 99 | TP |
| | 7 | 5 | 0 | 2 | 0 | 29 | 8 | TP |
| | 4 | 3 | 0 | 1 | 0 | 25 | 0 | VP |
| | 5 | 4 | 0 | 1 | 0 | 20 | 0 | VP |
| | 5 | 4 | 0 | 1 | 0 | 20 | 0 | VP |
| | 5 | 4 | 0 | 1 | 0 | 20 | 1 | VP |
| | 48 | 37 | 0 | 11 | 0 | 23 | 0 | VP |
| | 5 | 4 | 0 | 1 | 0 | 20 | 0 | VP |
| | 6 | 4 | 0 | 2 | 0 | 33 | 31 | VP |
| | 7 | 0 | 0 | 7 | 0 | 100 | 99 | TP |

Genotüübi kinnitamise tulemuste põhjal ilmneb, et re-sekveneerimine on põhjendatud juhul, kui mutantne alleel on esialgses sekveneerimistulemuses tuvastatud 20% määral. Selliseid juhtumeid esines 0,51% (27/5291) kõigist analüüsitud NIPT proovidest (tabel 2).

Kokku kasutati kolme mitokondriaalse variatsiooni tuvastamise valideerimiseks 5291 NIPT testi sekveneerimistulemusi. Kumulatiivse esinemissageduse arvutamisel eemaldati andmestikust kõik proovid, mille vastavas positsioonis katvus puudus, ning seejärel arvutati iga mutatsiooni sagedus (tabel 3). Uuritud valimi põhjal oli kolme mutatsiooni summaarne esinemissagedus 0,23%. Individuaalsete mutatsioonide sagedused erinesid kirjanduses välja toodud esinemissagedustest. Mutatsioonide m.1095T>C ja m.1555A>G sagedus magistritöös valitud populatsioonis oli vastavalt 0,10% ja 0,11% (tabel 3), kuigi kirjanduses oli sagedaseim mutatsioon m.1555A>G ning kõige harvem m.1095T>C. Mutatsioon m.1494C>T osutus töö tulemuste põhjal kõige harvemaks esinemissagedusega 0,02% (tabel 3).

Tabel 3. Proovide katvus ja mutantsete alleelide esinemissagedus NIPT proovidest

| | NIPT proovid (n) | Ilma katvusega proovid (n) | DNA lugemitega proovid (n) | Mutantsete alleelid (n) | Mutantsete alleelid (%) |
|-----------|-----------------------------|---|---|------------------------------------|------------------------------------|
| m.1095T>C | 5291 | 156 | 5135 | 5 | 0,10 |
| m.1494C>T | 5291 | 36 | 5255 | 1 | 0,02 |
| m.1555A>G | 5291 | 18 | 5273 | 6 | 0,11 |

Kumulatiivne alleeli sagedus **0,23**

NIPT testi katvust hinnati 1129 proovi põhjal, mille sekveneerimiseks kasutati NextSeq 1000 instrumenti. Sekveneerimisel oli piisav katvus 3362 lookusel 3387 lookusest (3×1129), mis teeb sekveneerimise edukuse määraks (*call rate*) 99,26% (tabel 4).

Tabel 4. Proovide katvus ja *call rate* kolmes lookuses NextSeq 1000 instrumendiga sekveneeritud proovidest

| | Ilma katvusega proovid (n) | Katvusega proovid (n) | <i>Call rate</i> |
|--------------|----------------------------|-----------------------|------------------|
| m.1095T>C | 22 | 1107 | 98,05% |
| m.1494C>T | 1 | 1128 | 99,91% |
| m.1555A>G | 2 | 1127 | 99,82% |
| Kõik proovid | 1129 | | 99,26% |

Lisakontrolliks viidi läbi 135 juhuslikult valitud referentsgenotüübiga proovi re-sekveneerimine, kokku 405 genotüüpi. Kõik tulemused vastasid täielikult esialgsele NIPT-analüüsile, mistõttu lahknevusi ei täheldatud.

Uuritud kolme mutatsiooni tuvastamise tundlikkus NIPT-andmete põhjal oli 100%. Mutatsioonipositsioonide kaupa esines erinev arv valepositiivseid tulemusi: m.1095T>C positsioonil 5 juhtu, m.1494C>T positsioonil 1 juhtum ja m.1555A>G positsioonil 7 juhtu (kokku 13/5291 proovi). Kõigi uuritud positsioonide spetsiifilisus NIPT-andmete põhjal oli >99,9%. Täiendava PCR ja re-sekveneerimise põhjal oli spetsiifilisus 100%, mis tähendab, et PCR kinnituse abil oli võimalik eemaldada valepositiivsed tulemused ja usaldusväärselt kinnitada tõelised mutatsioonipositiivsed proovid. Kokkuvõttes oli kahe järjestikuse genotüpiseerimismeetodi koondspetsiifilisus 100%.

2.3.3. Kliiniline olulisus

Töö tulemused näitasid, et farmakogeneetiline testimine NIPT andmete põhjal on tehniliselt teostatav. Selline testimine aitab kliiniliselt vältida ravimipõhist kuulmislangust kõrge riskiga patsientidel, eelkõige neonatoloogias.

Tihti on neonatoloogias aminoglükosiidi kasutamise vajadus aegkriitiline, mistõttu on kasulik juba eelnevalt raseduse ajal välja selgitada võimalik geneetiline risk kuulmislanguksele (Boles & Friedlich, 2010). Vahetult patsiendi juures tehtav genotüpiseerimine on samuti võimalik ning võtab ainult 26 minutit, kuid see võimaldab tuvastada ainult m.1555A>G mutatsiooni ning neonatoloogia osakonnas testi kasutades selgus, et 20% proovidest ei olnud võimalik genotüpiseerida (McDermott, Mahaveer, *et al.*, 2022).

Lisaks on mtDNA järjestuses olevate mutatsioonide info kliiniliselt oluline nii ema kui ka tema teiste laste jaoks. Kuna on teada, et mtDNA-d leidub munarakkudes, päranduvad mutatsioonid mtDNA-s emalt lastele (Barbarino *et al.*, 2016). Mutatsiooni esinemisel lootel võiksid aminoglükosiide vältida ka teised ema kaudu suguluses olevad isikud (Usami & Nishio, 2004).

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös analüüsiti 5529 NIPT analüüsi sekveneerimisandmeid, et tuvastada kolme ototoksilisusega seotud MT-RNR1 mutatsiooni esinemissagedust. Mutatsioonide tuvastamiseks ja valideerimiseks töötati välja cfDNA-põhine töövoog, mis hõlmas olemasolevate NIPT andmete põhjal proovide, mille mutantse alleeli osakaal oli vähemalt 20%, re-sekveneerimist.

MT-RNR1 mutatsioonid m.1095T>C, m.1494C>T ja m.1555A>G kinnitati, kui mutantse alleeli osakaal sekveneeritud lugemitest oli üle 50% kõigist alleelidest. Kolme mutatsiooni kumulatiivne esinemissagedus oli 0,23%.

Re-sekveneerimine kinnitas osad mutatsioonileiud, kuid tuvastas ka valepositiivseid tulemusi, rõhutades NIPT andmete valideerimise vajalikkust. Kontrollproovide analüüs 135 proovist näitas NIPT tulemuste täielikku kooskõla re-sekveneerimisel, mis toetab analüüsi usaldusväärsust.

Töö näitab, et mitokondri mutatsioonide sõeluuring NIPT andmetes on vajalik tööriist kõrge riskiga patsientide tuvastamiseks. See loob võimaluse ennetada ravimite poolt põhjustatud kuulmislangust juba enne ravi alustamist.

Töö tulemusena saavad patsiendid NIPT testi tulemustes teada ototoksilisust põhjustava MT-RNR1 geeni mutatsiooni olemasolu. Riskialleeli info on nähtav elektroonilistes terviseandemetes, et tervishoiutöötajad saaksid aminoglükosiidide manustamisel teha informeeritud otsuse.

SUMMARY

Re-sequencing of mitochondrial RNR1 variants linked to hearing loss using cell-free DNA

Benelote Uusküla

Summary

Hearing is essential for daily functioning and quality of life, and its impairment can lead to significant social and economic consequences. One known cause of hearing loss is genetic variation in the mitochondrial MT-RNR1 gene, which increases sensitivity to the ototoxic effects of aminoglycoside antibiotics. Specific mutations, m.1555A>G, m.1494C>T, and m.1095T>C, are associated with a heightened risk of irreversible hearing damage following aminoglycoside treatment.

Since these antibiotics are commonly used in clinical settings, particularly in neonatal care where treatment often begins before a full diagnosis, early identification of at-risk individuals is crucial. A pharmacogenetic approach enables the detection of patients with increased susceptibility to drug-induced side effects.

This study focused on evaluating the utility of non-invasive prenatal testing (NIPT) data for identifying pathogenic mitochondrial DNA mutations associated with aminoglycoside-induced ototoxicity. Specifically, the research aimed to detect three well-characterized mutations in the MT-RNR1 gene – m.1095T>C, m.1494C>T, and m.1555A>G, which are known to significantly increase the risk of hearing loss when carriers are exposed to aminoglycosides.

A total of 5,529 NIPT sequencing datasets were analyzed. A specialized workflow was developed for mutation detection using cell-free DNA (cfDNA). Samples with at least 20% mutant allele reads out of all reads based on NIPT data were selected for re-sequencing to confirm the findings. A mutation was considered confirmed if more than 50% of reads in the re-sequenced data carried the mutant allele.

The cumulative prevalence of the three MT-RNR1 mutations was found to be 0.23%. Re-sequencing validated a portion of the initially detected mutations but also revealed false positives, emphasizing the importance of validation when working with NIPT-derived data. Additionally, a control set of 135 samples showed complete concordance between initial NIPT results and re-sequencing, supporting the reliability of the developed method.

The findings highlight the potential of incorporating mitochondrial mutation screening into routine NIPT workflows as a proactive strategy for identifying individuals at elevated risk for drug-induced hearing loss. Importantly, detection of MT-RNR1 risk alleles through NIPT allows this genetic information to be integrated into patients' electronic health records. This enables healthcare professionals to make informed treatment decisions, especially when considering the use of aminoglycoside antibiotics, thus reducing the risk of preventable hearing impairment.

TÄNUAVALDUSED

Suured tänud juhendajale Kaarel Krjutškovile, kes andis võimaluse nii huvitavast ja olulisest projektist osa võtta. Olen tänulik, et sain töötada Celvia meeskonnas. Samuti tänan juhendajat Margus Leppikut, kelle põhjalik tagasiside andis tööle viimase lihvi.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adey, A. C.** (2021). Tagmentation-based single-cell genomics. *Genome Research*, 31(10), 1693–1705.
- Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S. H., & Ramakrishnan, V.** (2015). The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science*, 348(6230), 95–98.
- Barbarino, J. M., McGregor, T. L., Altman, R. B., & Klein, T. E.** (2016). PharmGKB summary: Very important pharmacogene information for: MT-RNR1. *Pharmacogenetics and genomics*, 26(12), 558–567.
- Bitner-Glindzicz, M., Pembrey, M., Duncan, A., Heron, J., Ring, S. M., Hall, A., & Rahman, S.** (2009). Prevalence of mitochondrial 1555A→G mutation in European children. *New England Journal of Medicine*, 360(6), 640–642.
- Boles, R. G., & Friedlich, P.** (2010). Should patients be screened for 12S rRNA mutations before treatment with aminoglycosides? *Mitochondrion*, 10(4), 391–392.
- Bruss, D. M., & Shohet, J. A.** (2023). Neuroanatomy, Ear. *StatPearls Publishing*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551658/>
- Chattopadhyay, B.** (2002). Newborns and gentamicin—How much and how often? *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 49(1), 13–16.
- Chen, M., & Zhao, H.** (2019). Next-generation sequencing in liquid biopsy: Cancer screening and early detection. *Human genomics*, 13(1), 34.
- Cheng, F., Su, L., & Qian, C.** (2016). Circulating tumor DNA: a promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*, 7(30), 48832.
- Chuang, L.-Y., Yang, C.-H., Tsui, K.-H., Cheng, Y.-H., Chang, P.-L., Wen, C.-H., & Chang, H.-W.** (2008). Restriction enzyme mining for SNPs in genomes. *Anticancer Research*, 28(4A), 2001–2007.

- Contopoulos-Ioannidis, D. G., Giotis, N. D., Baliatsa, D. V., & Ioannidis, J. P. (2004).** Extended-interval aminoglycoside administration for children: A meta-analysis. *Pediatrics*, *114*(1), e111–e118.
- Dehne, N., Rauen, U., Groot, H. de, & Lautermann, J. (2002).** Involvement of the mitochondrial permeability transition in gentamicin ototoxicity. *Hearing Research*, *169*(1), 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(02\)00338-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(02)00338-6)
- Dyer, S. C., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barba, M., Barnes, I., Barrera-Enriquez, V. P., Becker, A., Bennett, R., Beracochea, M., Berry, A., & others. (2025).** Ensembl 2025. *Nucleic Acids Research*, *53*(D1), D948–D957.
- Estivill, X., Govea, N., Barceló, A., Perelló, E., Badenas, C., Romero, E., Moral, L., Scozzari, R., D'Urbano, L., Zeviani, M., & others. (1998).** Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment with aminoglycosides. *The American Journal of Human Genetics*, *62*(1), 27–35.
- Goodyear, R. J., Gale, J. E., Ranatunga, K. M., Kros, C. J., & Richardson, G. P. (2008).** Aminoglycoside-induced phosphatidylserine externalization in sensory hair cells is regionally restricted, rapid, and reversible. *Journal of Neuroscience*, *28*(40), 9939–9952.
- Greber, B. J., Bieri, P., Leibundgut, M., Leitner, A., Aebersold, R., Boehringer, D., & Ban, N. (2015).** The complete structure of the 55 S mammalian mitochondrial ribosome. *Science*, *348*(6232), 303–308.
- Guan, M.-X., Fischel-Ghodsian, N., & Attardi, G. (1996).** Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. *Human molecular genetics*, *5*(7), 963–971.
- Göpel, W., Berkowski, S., Preuss, M., Ziegler, A., Küster, H., Felderhoff-Müser, U., Gortner, L., Mögel, M., Härtel, C., & Herting, E. (2014).** Mitochondrial mutation m.

- 1555A> G as a risk factor for failed newborn hearing screening in a large cohort of preterm infants. *BMC pediatrics*, *14*, 1–5.
- Hamasaki, K., & Rando, R. R.** (1997). Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness. *Biochemistry*, *36*(40), 12323–12328.
- Huang, Q., Liu, Y., Lei, W., Liang, J., Wang, Y., Zheng, M., Huang, X., Liu, Y., Huang, K., & Huang, M.** (2023). Detecting mitochondrial mutations associated with aminoglycoside ototoxicity by noninvasive prenatal testing. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *37*(1), e24827.
- Hutchin, T., & Cortopassi, G.** (1994). Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *38*(11), 2517–2520.
- Jiang, H., Sha, S., Forge, A., & Schacht, J.** (2006). Caspase-independent pathways of hair cell death induced by kanamycin in vivo. *Cell Death & Differentiation*, *13*(1), 20–30.
- Koressaar, T., & Remm, M.** (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, *23*(10), 1289–1291.
- Kotra, L. P., Haddad, J., & Mobashery, S.** (2000). Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *44*(12), 3249–3256.
- Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T., & Grinshpun, A.** (2019). Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer biology & therapy*, *20*(8), 1057–1067.
- Kõressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., & Remm, M.** (2018). Primer3_masker: Integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, *34*(11), 1937–1938.
- Li, H., & Steyger, P. S.** (2011). Systemic aminoglycosides are trafficked via endolymph into cochlear hair cells. *Scientific reports*, *1*(1), 159.

- Li, Y., Zimmermann, B., Rusterholz, C., Kang, A., Holzgreve, W., & Hahn, S.** (2004). Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clinical chemistry*, *50*(6), 1002–1011.
- Liang, B., Li, H., He, Q., Li, H., Kong, L., Xuan, L., Xia, Y., Shen, J., Mao, Y., Li, Y., & others.** (2018). Enrichment of the fetal fraction in non-invasive prenatal screening reduces maternal background interference. *Scientific reports*, *8*(1), 17675.
- Lo, Y. D., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M., & Hjelm, N. M.** (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *The American Journal of Human Genetics*, *64*(1), 218–224.
- Lo, Y. D., Tein, M. S., Lau, T. K., Haines, C. J., Leung, T. N., Poon, P. M., Wainscoat, J. S., Johnson, P. J., Chang, A. M., & Hjelm, N. M.** (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *The American Journal of Human Genetics*, *62*(4), 768–775.
- Lo, Y. D., Wainscoat, J. S., Gillmer, M., Patel, P., Sampietro, M., & Fleming, K.** (1989). Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *The Lancet*, *334*(8676), 1363–1365.
- Lun, F. M., Chiu, R. W., Allen Chan, K., Yeung Leung, T., Kin Lau, T., & Dennis Lo, Y.** (2008). Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clinical chemistry*, *54*(10), 1664–1672.
- MacDougall, C., & Schooley, R. T.** (2023). Miscellaneous Antibacterials: Aminoglycosides, Polymyxins, Urinary Antiseptics, Bacteriophages. L. L. Brunton & B. C. Knollmann (Toim), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 14th Edition*. McGraw-Hill Education.
accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1193239214
- Mandel, P., & Metais, P.** (1948). Nuclear acids in human blood plasma. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, *142*(3–4), 241–243.

- McDermott, J. H., Mahaveer, A., James, R. A., Booth, N., Turner, M., Harvey, K. E., Miele, G., Beaman, G. M., Stoddard, D. C., Tricker, K., & others.** (2022). Rapid point-of-care genotyping to avoid aminoglycoside-induced ototoxicity in neonatal intensive care. *JAMA pediatrics*, *176*(5), 486–492.
- McDermott, J. H., Wolf, J., Hoshitsuki, K., Huddart, R., Caudle, K. E., Whirl-Carrillo, M., Steyger, P. S., Smith, R. J., Cody, N., Rodriguez-Antona, C., & others.** (2022). Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline for the use of aminoglycosides based on MT-RNR1 genotype. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *111*(2), 366–372.
- Nestaas, E., Bangstad, H.-J., Sandvik, L., & Wathne, K.-O.** (2005). Aminoglycoside extended interval dosing in neonates is safe and effective: A meta-analysis. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, *90*(4), F294-FF300.
- Paluoja, P., Jatsenko, T., Teder, H., Krjutškov, K., Vermeesch, J. R., Salumets, A., & Palta, P.** (2025). BinDel: Detecting Clinically Relevant Fetal Genomic Microdeletions Using Low-Coverage Whole-Genome Sequencing-Based NIPT. *Prenatal Diagnosis*, *45*(3), 352–361.
- Panidis, D., Markantonis, S. L., Boutzouka, E., Karatzas, S., & Baltopoulos, G.** (2005). Penetration of gentamicin into the alveolar lining fluid of critically ill patients with ventilator-associated pneumonia. *Chest*, *128*(2), 545–552.
- Qian, Y., & Guan, M.-X.** (2009). Interaction of aminoglycosides with human mitochondrial 12S rRNA carrying the deafness-associated mutation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*(11), 4612–4618.
- Rahman, S., Ecob, R., Costello, H., Sweeney, M. G., Duncan, A. J., Pearce, K., Strachan, D., Forge, A., Davis, A., & Bitner-Glindzicz, M.** (2012). Hearing in 44–45 year olds with m. 1555A> G, a genetic mutation predisposing to aminoglycoside-induced deafness: A population based cohort study. *BMJ open*, *2*(1), e000411.

- Rando, R. R. & others.** (2002). Decoding region bubble size and aminoglycoside antibiotic binding. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 12(16), 2241–2244.
- Rybak, L. P., & Ramkumar, V.** (2007). Ototoxicity. *Kidney International*, 72(8), 931–935.
<https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002434>
- Shane, A. L., Sánchez, P. J., & Stoll, B. J.** (2017). Neonatal sepsis. *The lancet*, 390(10104), 1770–1780.
- Sinnathuray, A., Raut, V., Awa, A., Magee, A., & Toner, J.** (2003). A review of cochlear implantation in mitochondrial sensorineural hearing loss. *Otology & neurotology*, 24(3), 418–426.
- Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C., & Beljanski, M.** (1989). Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 46(5), 318–322.
- Zhao, H., Li, R., Wang, Q., Yan, Q., Deng, J.-H., Han, D., Bai, Y., Young, W.-Y., & Guan, M.-X.** (2004). Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *The American Journal of Human Genetics*, 74(1), 139–152.
- Zhao, L., Young, W.-Y., Li, R., Wang, Q., Qian, Y., & Guan, M.-X.** (2004). Clinical evaluation and sequence analysis of the complete mitochondrial genome of three Chinese patients with hearing impairment associated with the 12S rRNA T1095C mutation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(4), 1503–1508.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.199>
- Taglauer, E., Wilkins-Haug, L., & Bianchi, D.** (2014). Cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta*, 35, S64–S68.

- Thyagarajan, D., Bressman, S., Bruno, C., Przedborski, S., Shanske, S., Lynch, T., Fahn, S., & DiMauro, S.** (2000). A novel mitochondrial 12SrRNA point mutation in parkinsonism, deafness, and neuropathy. *Annals of neurology*, *48*(5), 730–736.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G.** (2012). Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, *40*(15), e115–e115.
- Usami, S., Abe, S., Akita, J., Namba, A., Shinkawa, H., Ishii, M., Iwasaki, S., Hoshino, T., Ito, J., Doi, K., & others.** (2000). Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. *Journal of medical genetics*, *37*(1), 38–40.
- Usami, S., Abe, S., Kasai, M., Shinkawa, H., Moeller, B., Kenyon, J. B., & Kimberling, W. J.** (1997). Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *The Laryngoscope*, *107*(4), 483–490.
- Usami, S., & Nishio, S.** (2004). Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, Mitochondrial. *GeneReviews*. University of Washington, Seattle. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1422/>
- van der Meij, K. R., Sistermans, E. A., Macville, M. V., Stevens, S. J., Bax, C. J., Bekker, M. N., Bilardo, C. M., Boon, E. M., Boter, M., Diderich, K. E., & others.** (2019). TRIDENT-2: National implementation of genome-wide non-invasive prenatal testing as a first-tier screening test in the Netherlands. *The American Journal of Human Genetics*, *105*(6), 1091–1101.
- Volik, S., Alcaide, M., Morin, R. D., & Collins, C.** (2016). Cell-free DNA (cfDNA): Clinical significance and utility in cancer shaped by emerging technologies. *Molecular Cancer Research*, *14*(10), 898–908.
- Wu, L., Li, R., Chen, J., Chen, Y., Yang, M., & Wu, Q.** (2018). Analysis of mitochondrial A1555G mutation in infants with hearing impairment. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *15*(6), 5307–5313.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Benelote Uusküla,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Kuulmislangusega seotud mitokondri RNR1 geenimutatsioonide re-sekveneerimine rakuvabast DNA-st,

mille juhendajad on Kaarel Krjutškov ja Margus Leppik,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Benelote Uusküla
29.05.2025