

Aus dem Institut für Humangenetik
des FB Medizin der Philipps-Universität Marburg
Abteilung für Allgemeine Humangenetik
Leiter: Professor Dr. K.-H. Grzeschik
Arbeitsgruppe Entwicklungs-genetik
Leiter: HD Dr. rer. nat. J. Kunz

**Molekulargenetische Diagnostik von *Connexin 26* bei
genetisch bedingter, nicht-syndromaler, sensorineuraler
Schwerhörigkeit**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

(Dr. med.)

vorgelegt dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

von

Lars Petersen

aus Marburg

Marburg, 2001

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 06.09.2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Herr Prof. Dr. med. R. Arnold
Referent:	Herr HD Priv.-Doz. Dr. J. Kunz
Koreferent:	Frau Prof. Dr. med. R. Berger

Meinen Eltern gewidmet

In Dankbarkeit

Lars

I.	Zusammenfassung.....	1
II.	Einleitung.....	3
1.	Anatomie und Funktion des menschlichen Ohres.....	3
1.1	Der Hörvorgang.....	4
2.	Schwerhörigkeit.....	4
3.	Genetisch bedingte Schwerhörigkeit.....	7
4.	Genetisch bedingte, syndromale Formen der Schwerhörigkeit.....	9
5.	Genetisch bedingte, nicht-syndromale Formen der Schwerhörigkeit.....	11
6.	Die Rolle von <i>Connexin 26</i> im Context der genetisch bedingten, nicht-syndromalen Schwerhörigkeit.....	12
7.	Veränderungen im <i>Connexin 26</i> -Gen und klinische Variabilität des Ausprägungsgrades der dadurch bedingten Schwerhörigkeit.....	16
8.	Ziele dieser Arbeit.....	16
III.	MATERIAL UND METHODEN.....	17
1.	Material.....	17
1.1	Geräte und Zubehör.....	17
1.2	Chemikalien.....	18
1.3	Enzyme.....	18
1.4	Nukleotide.....	18
1.5	DNA-Größenstandards.....	18
1.6	Oligonukleotide.....	19
1.7	Fertigsysteme zur DNA-Sequenzierung.....	19
1.8	Fertigsysteme zur Aufreinigung von DNA.....	19
1.9	Puffer und Lösungen.....	19
1.10	Computer-Software.....	20
2.	Patientengut und pädaudiologische Untersuchungsmethoden...20	
3.	Molekulargenetische Methoden.....	24
3.1	Isolierung genomischer DNA aus menschlichen Leukozyten.....	24
3.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	25
3.3	Gelelektrophorese.....	25

3.3.1	Agarosegelelektrophorese.....	25
3.4	Polymerasekettenreaktion.....	25
3.4.1	Generierung von Oligonukleotiden.....	26
3.4.2	PCR-Bedingungen zur Amplifikation des <i>Connexin 26</i> -Gens aus genomischer DNA.....	26
3.5	Aufreinigung von PCR-Produkten mittels QIAquick PCR- Purification Kit.....	27
3.6	Mutationsanalyse im <i>Connexin 26</i> -Gen bei klinischem Verdacht auf genetisch bedingte, isolierte, sensorineurale Hörstörung.....	28
3.6.1	Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA).....	29
3.7	Silbernitratfärbung von Polyacrylamid-Gelen (hier SSCA-Gelen).....	31
3.8	DNA-Sequenzierung.....	31
3.8.1	Sequenzieransatz: Taq-Cycle-PCR.....	33
3.8.2	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	34
3.8.3	Sequenzierung am Sequenzier-Automat 373 A.....	35
3.8.4	Auftrennung des Sequenzieransatzes (Model 310).....	35
3.9	Statistische Methoden.....	36
IV.	Ergebnisse.....	37
1.	Etablierung der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur molekular-genetischen Analyse der kodierenden Region des <i>Connexin 26</i> -Gens.....	38
2.	Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) zur Detektion von Sequenzvarianten bei Patienten mit klinischem Verdacht auf genetisch bedingte, nicht-syndromale Schwerhörigkeit.....	40
3.	Sequenzanalyse.....	42
3.1	Heterozygotensequenzierung der kodierenden Region des <i>Connexin 26</i> -Gen bei Patienten mit klinischem Verdacht auf genetisch bedingte, nicht-syndromale Schwerhörigkeit.....	42
3.1.1	Mutationen im <i>Connexin 26</i> Gen bei Patienten mit klinischem Verdacht auf genetisch bedingte, nicht-syndromale, sensorineurale Schwerhörigkeit.....	43
3.1.2	Heterozygote Sequenzvarianten im <i>Connexin 26</i> -Gen bei Patienten mit klinischem Verdacht auf genetisch bedingte,	

nicht-syndromale, sensorineurale Schwerhörigkeit.....	46
3.1.3 Heterozygotensequenzierung der kodierenden Region von <i>Connexin 26</i> bei 100 gesunden, nicht-verwandten, deutschen Kontrollpersonen zur Bestimmung der Heterozygoten-frequenz im <i>Connexin 26</i> -Gen.....	51
4. Genotyp-Phänotyp-Korrelation anhand der audiometrischen Untersuchungsbefunde.....	53
4.1 Audiometrischen Untersuchungsbefunde bei Patienten ohne <i>Connexin 26</i> -Sequenzvarianten.....	53
4.2 Audiometrische Untersuchungsbefunde bei Patienten mit Sequenzvarianten im <i>Connexin 26</i> -Gen.....	54
4.2.1 Audiometrische Untersuchungsbefunde bei Patienten mit Mutationen in <i>Connexin 26</i>	54
4.2.2 Audiometrische Untersuchungsergebnisse bei Patienten mit heterozygoten Sequenzvarianten in der kodierenden Region des <i>Connexin 26</i> -Gen.....	55
5. Zusammenfassende Auswertung der molekulargenetisch erhobenen Untersuchungsdaten.....	57
V. Diskussion.....	59
VI. Ausblick.....	73
VII. Abkürzungen.....	75
VIII. Literaturverzeichnis.....	77
IX. Anhang.....	85
Kasuistik eines Patienten mit <i>Connexin 26</i> Mutation.....	85
Patientendaten der untersuchten Patienten.....	89
Tabellarische Darstellung der bisher bekannten Mutationen im <i>Connexin 26</i> -Gen.....	91
X. Curriculum vitae.....	94

XI.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	95
XII.	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	96
XIII.	Danksagung.....	97

I. Zusammenfassung

Hörstörungen sind klinisch, wie ätiologisch gesehen eine sehr heterogene Erkrankungsgruppe. Schätzungsweise ein Kind auf 1000 Neugeborene leidet an einer congenitalen Hörstörung. Allein 50-60% der Fälle mit einer angeborenen Hörstörung können genetisch bedingt sein.

Die häufigste Ursache für genetisch-bedingte, sensorineurale, nicht-syndromale Hörstörung sind Mutationen im *Connexin 26*-Gen. Das *Connexin 26*-Gen kodiert für das „*Gap-Junction-Protein-β2*“ (GJB2). Dieses Protein spielt eine maßgebliche Rolle im Kaliumionen-Kreislauf des Corti'schen Organes des Innenohres und damit an der Generierung von cochleären Aktionspotentialen, die dem Menschen den Höreindruck vermitteln. Mutationen im *Connexin 26*-Gen können für bis zu 60% aller sensorineuralen, genetisch-bedingten, autosomal-rezessiv vererbten Hörstörungen verantwortlich gemacht werden. Die Hörstörungen, die durch Mutationen im *Connexin 26*-Gen verursacht werden können, sind phänotypisch sehr variabel und können „mittelgradige“ bis „an Taubheit grenzende“ Hörverluste bei den betroffenen Patienten verursachen.

In dieser Arbeit wurde eine molekulare Diagnostik für das *Connexin 26* Gen etabliert und ein Patientenkollektiv von 28 nicht-verwandten Probanden mit Verdacht auf nicht-syndromale, sensorineurale Hörstörung auf Sequenzvarianten in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens untersucht.

Die Untersuchungen ergaben, dass bei 36% (10/28) der Patienten Sequenzvarianten in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens aufzufinden waren. Bei 18% der Patienten (5/28) konnten krankheitsverursachende Mutationen detektiert werden. Darunter befanden sich drei Patienten mit einer homozygot vorliegenden 35delG-Mutation. Bei zwei Patienten konnten „compound-heterozygot“ vorliegende Mutationen nachgewiesen werden, die für die Ausprägung des Phänotypes verantwortlich gemacht werden können. Bei weiteren 18% der Patienten (5/28) konnte nur auf einem Allel eine Sequenzvariante in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens detektiert werden. Diese heterozygot vorliegenden Sequenzvarianten können, isoliert betrachtet, nicht für die Ausprägung des Phänotypes verantwortlich gemacht werden. Bei diesen Patienten wird das Vorliegen eines heterogen bedingten Krankheitsbildes vermutet, bzw. könnten Mutationen in

nicht analysierten Genregionen (z. B. Promotorbereich bzw. 5'-UTR) des *Connexin 26*-Gens vorliegen.

Im Weiteren wurde versucht, eine Genotyp-Phänotyp Korrelation bei den detektierten Sequenzvarianten durchzuführen. Die Hörstörungen, die bei den Patienten mit krankheitsverursachenden Mutationen diagnostiziert wurden, zeigten sich sehr variabel in ihrem Ausprägungsgrad. Sie reichten von „mittelgradig“, bis „an Taubheit grenzende“ Hörverluste. Selbst eine phänotypische Unterscheidung zwischen Patienten mit heterozygot vorliegenden, autosomal-rezessiven Mutationen und Patienten mit heterozygoten Sequenzvarianten, bei denen bisher unklar ist, ob es sich um krankheitsverursachende Sequenzvarianten in der kodierenden Region von *Connexin 26* handelt, war nicht möglich.

Zur Bestimmung der Heterozygotenfrequenz von *Connexin 26* Mutationen innerhalb der gesunden, deutschen Bevölkerung, wurde die DNA von 100 Kontrollpersonen im Alter von 18-60 Jahren analysiert.

Bei 7 von 100 (7%) untersuchten Probanden konnten heterozygot vorliegende Sequenzvarianten in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens detektiert werden. Bei zwei untersuchten Kontrollpersonen konnten heterozygote 35del-G-Mutationen diagnostiziert werden. Dieses Untersuchungsergebnis entspricht einer Heterozygotenhäufigkeit von 2% für diese Sequenzvariante innerhalb der deutschen Population. Damit entspricht die Häufigkeit der Heterozygotenfrequenz für diese Mutation, der des deltaF508 Allels im CFTR-Gen bei der Mukoviscidose.

Mutationen im *Connexin 26*-Gen können für eine große Anzahl der Fälle von nicht-syndromaler, sensorineuraler Hörstörung verantwortlich gemacht werden. Bei der Heterogenität der klinisch ausgeprägten Hörstörungen erscheint es sinnvoll die molekulargenetische Diagnostik des *Connexin 26*-Gens auch auf Patienten mit leichtgradigen Hörstörungen auszuweiten, bei denen der Verdacht auf einen nicht-syndromalen, sensorineuralen Hintergrund besteht. Eine möglichst frühzeitige Diagnose der Hörstörung ermöglicht dem Patienten und dem behandelnden Arzt eine rasche Einleitung einer individuell angepassten Therapie und damit die Chance auf eine komplikationsarme, sozioökonomische Entwicklung in der Gesellschaft.

II. Einleitung

1. Anatomie und Funktion des menschlichen Ohres

Das Ohr ist psychologisch gesehen eines der wichtigsten Sinnesorgane des Menschen, dient es doch der sprachlichen Kommunikation, ohne die ein Individuum aus der Gesellschaft ausgeschlossen sein kann (Deetjen und Speckmann, 1992). Es liegt, vor mechanischen Einflüssen geschützt, im härtesten Knochen des Schädels, dem Felsenbein (Os temporale). Anatomisch und funktionell wird das Ohr in drei Abschnitte gegliedert: Das äußere Ohr, das Mittelohr und das Innenohr (Abb. 1).

Das äußere Ohr (Auris externa) besteht aus der Ohrmuschel (Auricula), dem äußeren Gehörgang (Meatus acusticus externus) und dem Trommelfell (Membrana tympani). Die Ohrmuschel ist auf Grund ihrer Trichterform geeignet Schallwellen zu sammeln und sie dem Gehörgang zuzuleiten. Am Trommelfell werden diese Schallphänomene an das Mittelohr weitergeleitet.

Das Mittelohr besteht aus einem pneumatisch gefüllten Hohlraumsystem, der Paukenhöhle, ausgekleidet von Schleimhaut. In der Paukenhöhle befindet sich die Gehörknöchelchenkette, die aus drei Knochen besteht, die syndesmotisch miteinander verbunden sind: Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes). Die Schallwellen, die über das Trommelfell an die Gehörknöchelchenkette übergeben werden, werden am ovalen Fenster an die Hörschnecke (Cochlea) des Innenohres weitergeleitet.

Das Innenohr besteht aus dem Hör- und dem Gleichgewichtsorgan. Man differenziert innerhalb des Innenohres ein knöchernes von einem häutigen Labyrinth. Das knöcherne Labyrinth, gebildet von der Felsenbeinpyramide, ist gefüllt mit Perilymphe. Darin „schwimmt“ das häutige Labyrinth (Schiebler und Schmitt, 1977). Die Hörschnecke (Cochlea) bildet den vorderen Abschnitt des knöchernen Labyrinths und zeigt 2,5 korkenzieherartige Windungen. Die Hörschnecke wird in zwei Etagen unterteilt. Die obere Etage, Scala vestibuli, geht an der Hörschneckenspitze (Helicotrema) in die untere Etage (Scala tympani) über. Beide Gangsysteme beinhalten, wie das gesamte knöcherne Labyrinth, Perilymphe. Der Endolymphgang der Cochlea, der Ductus cochlearis, liegt am Boden der Scala vestibuli und beinhaltet das Corti'sche Organ. Der Ductus cochlearis wird von der Scala vestibuli durch die Reissner'sche Membran, von der Scala tympani durch eine Basilarmembran getrennt (Abb. 2). Das Corti'sche Organ befindet sich auf der Basilarmembran und besteht aus hochprismatischen Sinnes- und Stützzellen. Hier werden Schallphänomene

mechanoelektrisch transduziert und damit in eine Form gebracht, die der Mensch zentral, im Bereich der Hörrinde, verarbeiten kann und die ihm so den Höreindruck vermitteln.

1.1 Der Hörvorgang

Die Schallwellen werden durch das äußere Ohr aufgenommen und über das Mittelohr an das Innenohr weitergeleitet, um mit Hilfe des Corti'schen Organes an einem frequenzspezifischen Areal (basal, am Beginn des Hörschneckenganges, hohe Frequenzen, apikal, an der Hörschnecken spitze, tiefe Frequenzen) der Cochlea in mechanoelektrische Impulse überführt zu werden: Über die Bewegung der Tectorialmembran, die Bestandteil des Corti'schen Organes ist und in die die Stereozilien der äußeren Haarzellen eingelagert sind, werden diese Stereozilien abgelenkt und führen so zu einer Öffnung von Ionenkanälen. Durch diese geöffneten Ionenkanäle strömen Kaliumionen aus der kaliumreichen Endolymphe, entlang eines Konzentrationsgefälles, unterstützt durch ein elektrisches Potential von 150 mV, in die äußeren Haarzellen und führen so zur Depolarisation und Entstehung von cochleären Aktionspotentialen, die, nach Modifikation und Weiterleitung zur Hörrinde, den Höreindruck vermitteln (Kubisch et al., 2000). Die in die äußeren Haarzellen eingeströmten Kaliumionen werden über „gap-junctions“ zur Stria vascularis geleitet und von dort wieder in die Endolymphe sezerniert (Martin et al., 1999).

2. Schwerhörigkeit

Dem Gehör kommt eine tragende Rolle beim Erlernen von Sprache zu. Ohne Sprache und Gehör kann die Beziehung zwischen Menschen auf Dauer stark beeinträchtigt sein. Diese Beeinträchtigung hat sehr starke Auswirkungen auf die sozioökonomische Entwicklung der betroffenen Personen, daher sollte, bei diagnostizierter Hörstörung, auf eine frühzeitige Therapieeinleitung im Sinne des Patienten geachtet werden. Dies ist im Besonderen zu fordern, wenn es sich bei Patienten um Kinder handelt, die sich noch in der Sprachentwicklung befinden (Ptok 1997). Gefordert wird insbesondere eine frühzeitige Diagnosestellung, um dem Patienten die sensiblen Reifungsphasen von Hörbahn und hörverarbeitenden Zentren im 18-24 Lebensmonat zu ermöglichen.

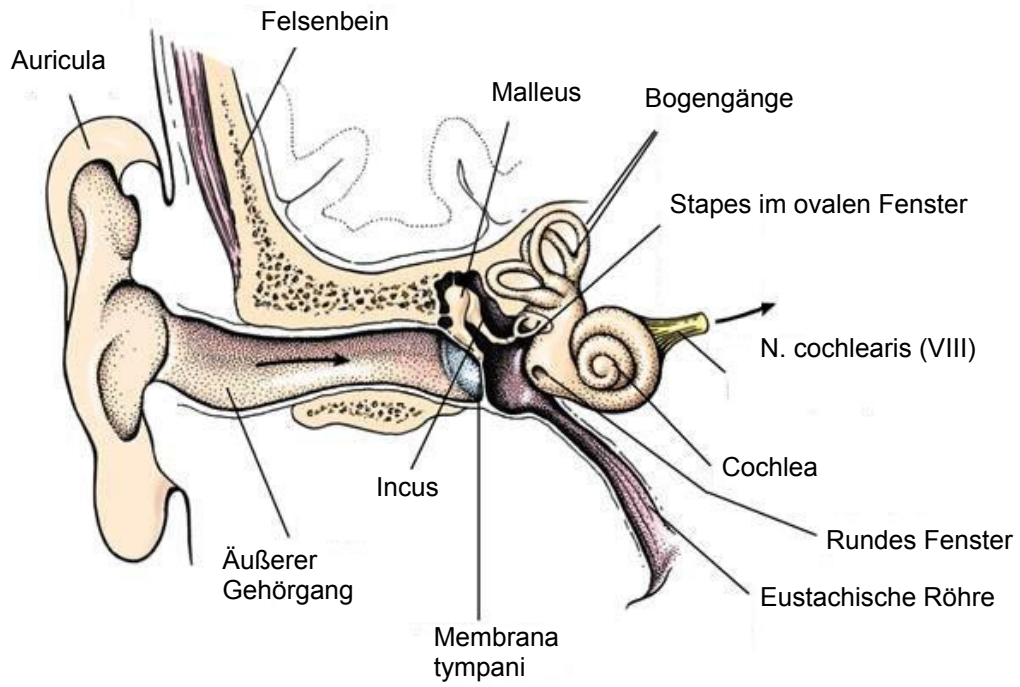


Abb. 1: Schematische Darstellung des menschlichen Ohres (modifiziert nach Sobotta, 1993)

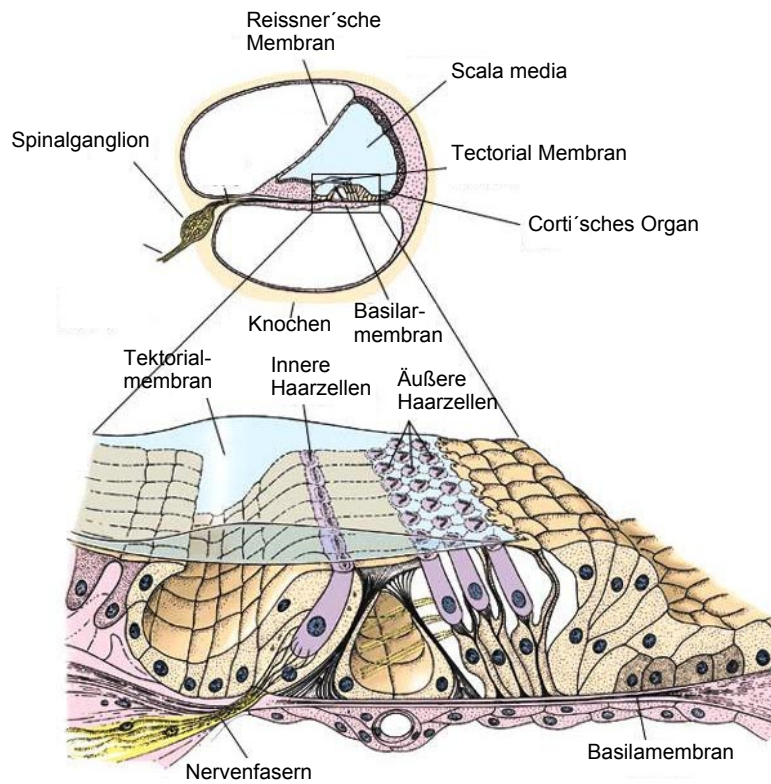


Abb. 2: A: Querschnitt der Cochlea
 B: Schematische Darstellung des Corti'schen Organes (modifiziert nach Robertson und Morton, 1999)

In der westlichen Welt kommen 0,1-0,2% aller lebendgeborenen Kinder mit Hörstörungen zur Welt. Fast die Hälfte der Weltpopulation erleidet, bei Erreichen des achtzigsten Lebensjahres, einen partiellen oder vollständigen Hörverlust.

Grundsätzlich wird zwischen 2 Formen des Hörverlustes unterschieden: Manifestiert sich die Hörstörung innerhalb der ersten beiden Lebensjahre, bzw. vor dem Erlernen von Sprache, so wird die Hörstörung als prälingual bezeichnet. Tritt der Hörverlust nach dem Erlernen von Sprache auf, wird er als postlingual definiert.

Prälinguale Schwerhörigkeit tritt oftmals bedingt durch genetische Ursachen oder als Folge von frühkindlichen Infektionen (z.B.: Toxoplasmose, Röteln oder Cytomegalie) oder infolge von akustischen Traumata auf.

Postlinguale Hörstörungen finden Ihre Ursache meist in Form von alterungsbedingten Veränderungen, als Folge von traumatisch bedingten Läsionen (Lärm, mechanische Traumata), bzw. als Folge von Infektionen, oder werden ebenfalls auf Grund von angeborenen Gendefekten verursacht, die sich nach Erlernen von Sprache manifestieren (Avraham et al., 1997).

Im angloamerikanischen Sprachgebiet werden die Hörstörungen nach Schweregrad des Hörverlustes, ausgedrückt in dB (Schalldruckpegel), eingeteilt (Kalatzis und Petit, 1998). Eine für den deutschsprachigen Raum gültige Klassifikation lehnt sich weitgehend daran an (Gross et al., 1999), und ist in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

Bezüglich der anatomischen Ursachen werden formal bei den Schwerhörigkeiten konduktive (schalleitungsbedingt), sensorineurale (schallempfindungsbedingt), kombinierte und zentrale Formen unterschieden (Kalatzis und Petit, 1998).

Tab. 1: Deutsch- und englischsprachige Einteilung der Hörstörungen nach dem Grad des Hörverlustes, gemessen in Schalldruckpegel (dB).

Hörverlust in dB	Einteilung „deutsch“	Hörverlust in dB	Einteilung „englisch“
27-40 dB	leicht	27-40 dB	mild
40-69 dB	mittel	41-55 dB	moderate
70-94 dB	hochgradig	56-70 dB	moderate severe
>94 dB	resthörig, bzw. taub	71-90 dB	severe
		>90 dB	profound

Handelt es sich um konduktiven Hörstörungen, so ist der Defekt im Bereich von äußerem Ohr oder Mittelohr lokalisiert. Daraus ergeben sich Probleme, die die Schalleitungsfähigkeit des Ohres beeinflussen.

Unter sensorineuralen Defekten versteht man Hörverluste, deren Ursachen im Bereich des Innenohres, oder aber im Verlauf des Hörnerven und des Hirnstammes zu finden sind. Hierbei kommt es zu Hörstörungen, die auf Grund einer verminderten Generierung von Aktionspotentialen im Bereich der Cochlea zu Stande kommen. In Deutschland (alte Bundesländer) gibt es schätzungsweise 7000-8000 hochgradig schwerhörige Kinder (Gross et al., 1999). Drei bis vier Prozent aller Schulkinder leiden an einer leichtgradigen Hörstörung. Damit ergibt sich für Deutschland eine Gesamtzahl von weit über 500 000 Kindern mit therapiebedürftiger Hörstörung. Die Schätzung dieser Zahlen beinhaltet allerdings noch nicht die jugendlichen Patienten, die unter zentralen Hörstörungen leiden (Gross et al., 1999).

3. Genetisch bedingte Schwerhörigkeit

Die genetisch bedingte Schwerhörigkeit kann mit einer Häufigkeit von bis zu zwei auf 1000 Lebendgeborene beobachtet werden (Denoyelle et al., 1999; Estivill et al., 1998).

Ein weiteres Individuum auf 1000 Lebendgeborene zeigt eine genetisch bedingte Prädisposition, eine Hörstörung im Laufe des Lebens zu entwickeln (Kalatzis und Petit, 1998). Das bedeutet, dass bei ca. 60-70% aller beobachteten Schwerhörigkeiten eine genetische Ursache zu Grunde liegen kann (Kalatzis und Petit, 1998; Green et al., 1999). Bei den genetisch bedingten Schwerhörigkeiten handelt es sich um eine ätiologisch, wie klinisch gesehen, sehr heterogene Erkrankungsgruppe (Green et al., 1999).

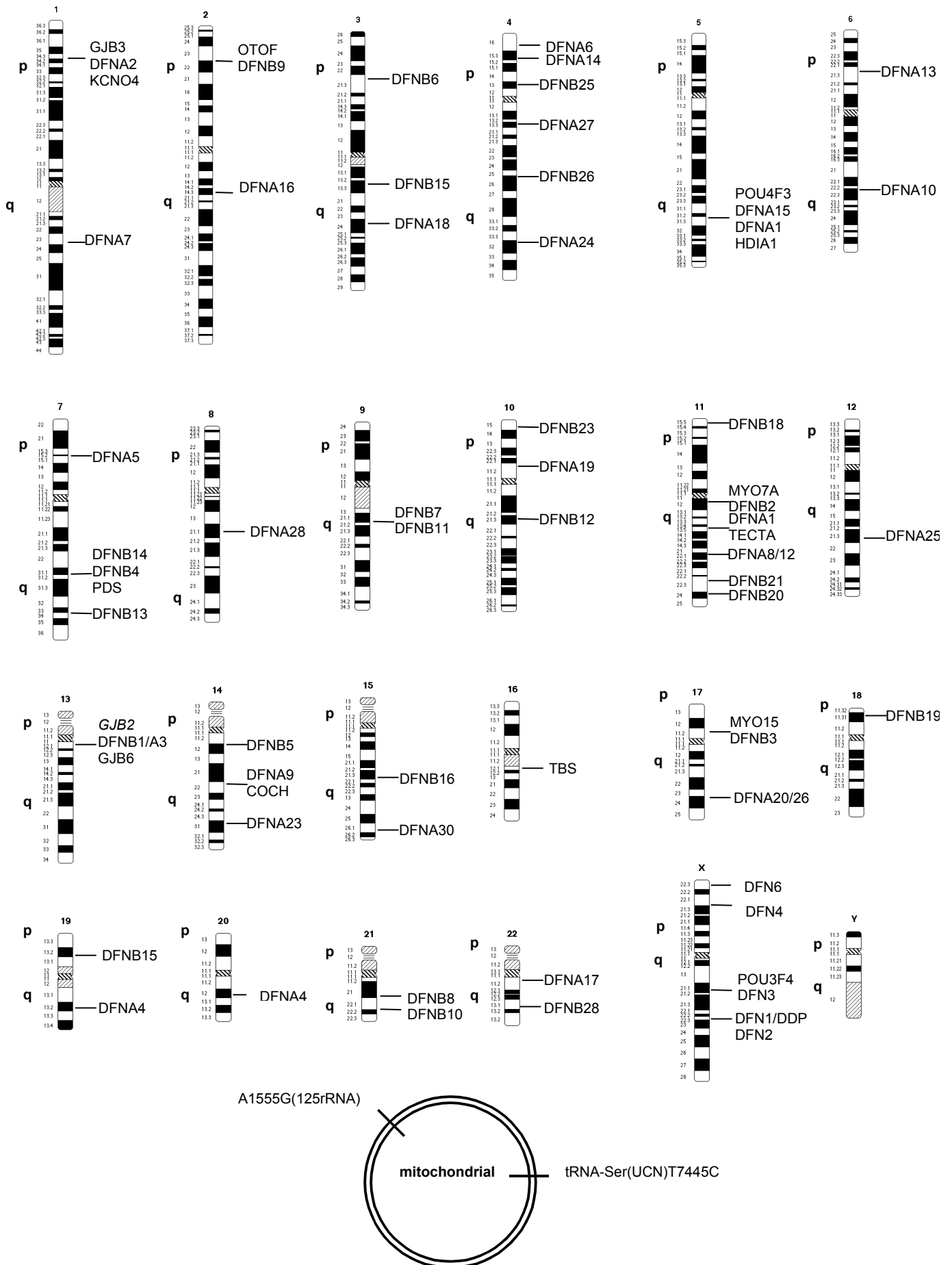


Abb. 3: Zusammenfassende Darstellung aller bisher bekannten Genloci, die genetisch bedingte Schwerhörigkeit verursachen können und ihre Lokalisation im humanen Genom (modifiziert nach Griffith und Friedman, 1999).

Das bedeutet, dass es verschiedene Arten der hereditär bedingten Schwerhörigkeit gibt, die sich in Lokalisation und Ausprägung unterscheiden können. Bisher sind mehr als hundert Gendefekte beschrieben worden, die mit Hörstörungen assoziiert sein können (Denoyelle et al., 1999). Die bisher bekannten Genloci sind mit Ausnahme des Y-Chromosoms über das gesamte menschliche Genom verteilt (Griffith und Friedmann, 1999) (siehe Abb. 3).

Auch in der Subgruppe der hereditär-bedingten Schwerhörigkeiten werden alle oben beschriebenen formalen Formen beobachtet. Es können allerdings zwei große Gruppen der genetisch bedingten Hörstörungen voneinander abgegrenzt werden, die syndromalen Formen und die nicht-syndromalen Formen der genetisch-bedingten Hörstörungen (Keats und Berlin, 1999).

4. Genetisch bedingte, syndromale Formen der Schwerhörigkeit

Syndromale Formen der genetisch bedingten Schwerhörigkeit kommen mit einer Häufigkeit von bis zu 20-30% aller genetisch bedingten Schwerhörigkeiten vor (Kalatzis und Petit, 1998). Bei diesen Formen der Hörstörung ist das Symptom des Hörverlustes kombiniert mit weiteren phänotypischen Veränderungen, die durch Fehlbildungen anderer Organsysteme bedingt sind. Hierbei können Fehlbildungen beobachtet werden, die alle Organsysteme betreffen können.

Die bisher beobachteten Gendefekte, die die syndromalen Formen der genetisch bedingten Schwerhörigkeit verursachen können, betreffen sowohl autosomale, wie auch X-chromosomale Genloci, deren Genprodukte u.a. extrazellulär (z.B. Alport-Syndrom), cytoskeletal (z.B. Usher type IB) und mitochondrial (z.B. „Non-insulin-dependent-diabetes-mellitus“ (NIDDM)) aufzufinden sind.

Es finden sich weiterhin genetisch-bedingte Defekte, die Gene betreffen, deren Genprodukte Enzyme (z.B. Hurler-Syndrom), Enzym-Liganden (z.B. Waardenburg-Hirschsprung-Syndrom), Transkriptionsfaktoren (z.B. Waardenburg-Hirschsprung-Syndrom), Rezeptoren (z.B. Muenke-Syndrom) und Ionenkanäle (z.B. Jervell und Lange-Nielsen-Syndrom) sind (Kalatzis und Petit 1998).

Die bisher analysierten Genloci, deren Genprodukte und die dazugehörigen bekannten Syndrome sind in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 2: Genloci und Genprodukte, die genetisch-bedingte syndromale Schwerhörigkeit verursachen können und ihre zelluläre Expression (modifiziert nach Kalatzis und Petit 1998).

Expressions-kompartiment	Genname	Genprodukt	Form der Schwerhörigkeit (Syndrom)	chromosomale Lokalisation	
Extrazelluläre Matrixkomponente	COLAA3, COLAA4	TypIV($\alpha3\alpha4$)-Kollagen	Alport, autosomal-rezesiv	2q35-37	
	COLAA5, COLAA6	TypIV($\alpha5\alpha6$)-Kollagen	Alport, x-linked	Xq22	
	COLA2AI	TypII(α)-Kollagen	Stickler	12q13.1-13.3	
	KAL	Anosmin-1	X-linked Kallmann`s	Xp22.3	
	NDP	Norrin	Norrie	Xp11.3	
	Enzyme	IDUA	α -Liduronidase	Hurler	4q16.3
		IDS	Iduronate-2-Sulfatase	Hunter	Xp27.3
ERCC3		Helicase	Cockayne`s	2p21	
Transkriptions-faktoren	PAX3	PAX3	Waardenburg Typ1/3	2p36	
	MITF	MITF	Waardenburg Typ 2	3p12.3-14.1	
	SOX10	SOX10	Waardenburg-Hirschsprung	22q13	
	EYA1	EYA1	Branchio-Oto-Renal	8q13.3	
	SALL1	SALL1	Townes-Brocks	16q21.1	
Zytoskelettale-Komponenten	NF2	Merlin	Neurofibromatose Typ II	22q12	
	MYO7A	Myosin VIIA	Usher-Typ IB	11q13.5	
Bestandteile von Ionenkanälen	KvLQT1	KvLQT1	Jervell and Lange-Nielsen	11p15.5	
	KCNE	minK	Jervell and Lange-Nielsen		
Rezeptor, Liganden	FGFR2	FGFR2	Crouzon	10p25-26	
	EDNRB	Endothelin-B-Rezeptor	Waardenbug-Hirschsprung	13q22	
	EDN3	Endothelin3	Waardenbug-Hirschsprung	22q13.2-13.3	
Putative Sulfattransporter	PDS	Pendrin	Pendred	7q31	
Mitochondriale Gene	tRNA	transfer RNA	NIDDM, MELAS	mitochondrial	
	tRNA	transfer RNA	MERF, MERF/MELAS	mitochondrial	
Putatives nucleoläres Phosphoprotein	TCOF1	Treacle	Treacher-Collins	5q32-33.1	

5. Genetisch bedingte nicht-syndromale Formen der Schwerhörigkeit

Die genetisch-bedingten, nicht-syndromalen Schwerhörigkeiten kommen mit einer Häufigkeit von bis zu 70% aller hereditären Hörstörungen vor (Denoyelle et al., 1998; Kalatzis und Petit, 1998). Mit Hilfe von Positionsklonierungsstrategien konnten in den letzten Jahren 40 verschiedene Genloci im humanen Genom lokalisiert und später identifiziert werden (Keats und Berlin, 1999). Die genetisch bedingten, nicht-syndromalen Schwerhörigkeiten können X-chromosomal, autosomal-dominant, autosomal-rezessiv, wie auch mitochondrial vererbt werden. Anhand dieser möglichen Erbgänge erfolgt eine Einteilung der nicht-syndromalen Hörstörungen in 4 verschiedene Kategorien. Dabei steht DFN für X-chromosomal-gebundene Vererbung und wird in 1-3% der Fälle beobachtet. DFNA steht für einen autosomal-dominanten Erbgang und kommt in 15 % der Fälle vor. Bei 85% der Patienten wird ein autosomal-rezessiver Erbgang beobachtet, der mit DFNB bezeichnet wird (Denoyelle et al., 1998; Kalatzis und Petit 1998).

Tab. 3: Genloci und Genprodukte, die genetisch-bedingte nicht-syndromale Schwerhörigkeit verursachen können und ihr zelluläres Verteilungsmuster (modifiziert nach Kalatzis und Petit, 1998)

Expressionskompartiment	Genname	Genprodukt	Form der Schwerhörigkeit	Art des Hörverlustes	Chromosome n-lokalisation
Extrazelluläre Matrixkomponente	TECTA	α -Tectorin	DFNA8/12	Prelingual; sensorineural	11q22-24
Transkriptionsfaktor	POU3F4	POU3F4	DFN3	Pelingual, sensorineural, kombiniert	Xp21.1
	POU4F3	POU4F3	DFNA15	Pelingual, sensorineural, kombiniert	5p31
Zytoskelettale Komponenten	MYO7A	Myosin VII A	DFNB2	Pelingual, sensorineural	11q13.5
			DFNA11	Postlingual, sensorineural	11q13.5
	MYO15	Myosin XV	DFNB3	Pelingual, sensorineural	17q11.2
	diaphanous	Diaphanous I	DFNA 1	Postlingual, sensorineural	5q31
	Cx26	Connexin 26	DFNB1	Pelingual, sensorineural	13q11-12
Membrankomponenten			DFNA3	Pelingual, sensorineural	13q12
	PDS	Pendrin	DFNB4	Pelingual, sensorineural	7q31
Mitochondriale Gene	12srRNA	12SrRNA	MINS DP	Postlingual, sensorineural	mitochondrial
	tRNAser	tRNAser	MINS DP	Postlingual, sensorineural	mitochondrial

Es kommen auch mitochondriale Erbgänge vor, die als MINSB bezeichnet werden (Kalatzis und Petit, 1998). Aktuell sind 20 DFNB-, 14 DFNA- und 4 DFN-Genloci bekannt (Kalatzis und Petit, 1998).

Die autosomal-rezessiven Formen der genetisch bedingten, nicht-syndromalen Schwerhörigkeiten werden am häufigsten beobachtet. Diese Formen sind mit den höchsten Hörverlusten assoziiert, d.h. es kann zur Ausprägung von Hörverlusten kommen, die als „resthörig“, bzw. „an Taubheit grenzend“ (>90 dB) bezeichnet werden (Kalatzis und Petit, 1998).

Einzelne Genloci im Kontext der genetisch bedingten nicht-syndromalen Schwerhörigkeit können jedoch Hörstörungen verursachen, die mittels unterschiedlicher Erbgänge an die folgenden Generationen weitergegeben werden können (Kalatzis und Petit 1998). Hierbei sind exemplarisch Mutationen innerhalb einzelner Genloci zu nennen, die DFNB2 und DFNA11 (beide betreffen das Gen *MYO7A*) verursachen, ebenso wie Mutationen innerhalb der Genloci DFNB1 und DFNA3 (beide betreffen das *Connexin 26*-Gen) (Kalatzis und Petit 1998). Die Genloci und betroffenen Genprodukte, die die genetisch-bedingten, nicht-syndromalen Formen der Hörstörungen verursachen können, sind in Tabelle 3 zusammenfassend dargestellt.

6. Die Rolle von *Connexin 26* im Context der genetisch bedingten, nicht-syndromalen Schwerhörigkeit

Bis zu 20% aller genetisch-bedingten, sensorineuralen Hörstörungen und bis zu 50% der genetisch-bedingten, nicht-syndromalen Schwerhörigkeit können durch ein Gen, das auf Chromosom 13q11-12 lokalisiert ist, verursacht werden. Dabei handelt es sich um das *GJB2*-Gen (Wilcox et al. 2000; Kelley et al., 1998; Cohn und Kelley, 1999; van Camp und Smith, 1998). Diese Gen kodiert für das „Gap-Junction Protein- β -2“, das auch *Connexin 26* genannt wird. Lokalisiert wurde das *Connexin 26*-Gen durch eine Arbeitsgruppe um Willecke (1990) mittels Maus-Mensch-Zellhybriden. Die chromosomale Lokalisation des Gens, als einer Kandidaten-genregion für Schwerhörigkeit, konnte mittels einer Kopplungsstudie 1994 durch Guilford und Mitarbeiter erfolgen (Guilford et al., 1994). Identifikation und Analyse der Genstruktur von *Connexin 26* gelang Mignon und Mitarbeitern 1996. In Zusammenhang mit Hörstörungen wurde *Connexin 26* von Kelsell und Mitarbeitern 1997 gebracht. Die genomische Struktur von *Connexin 26* umfasst zwei Exons, getrennt durch ein Intron.

Das erste, nicht-kodierende Exon hat eine Größe von 160 bp. Das zweite Exon kodiert für das Genprodukt und hat eine Länge von 681 bp (Kiang et al., 1997). Das eingeschobene Intron hat eine Größe von 3147 bp. Das Genprodukt *Connexin 26* besteht aus 227 AS und hat ein Molekulargewicht von 26 kDa. Dieses Transmembranprotein besteht aus 2 Extrazellulär-, 4 Transmembran- und 3 Intrazellulärdomänen (Abb. 4). Es wird in der Haut, in der Mamma lactans, in der Placenta, in Hepatocyten, im Myometrium des Uterus, im Pancreas, im Intestinum und in der Cochlea exprimiert (Kelsell et al., 1997; Lautermann et al., 1998).

In der Cochlea der Ratte zeigen sich starke Expressionsmuster von *Connexin 26* insbesondere in der Stria vascularis, in der Basilarmembran, im Limbus spiralis und im Ligamentum spirale (Schulte und Steel, 1994; Spicer und Schulte, 1996; Kalatzis und Petit 1998; Holme und Steel, 1999; Lautermann et al., 1998; Kikuchi et al., 1995). *Connexin 26* gehört zur Genfamilie der Connexine, die an der Ausbildung von Transmembrankanälen in „gap-junctions“ beteiligt sind. Die Familie der Connexine wird in zwei Gruppen eingeteilt, in Alpha-Connexine (GJA) und Beta-Connexine (GJB), die auf Grund Ihrer Primärstruktur voneinander unterschieden werden (Kumar und Juliar, 1996). Bisher sind insgesamt 14 Gene der Connexin-Genfamilie identifiziert, die auf Grund ihres Molekulargewichtes voneinander unterschieden werden (Martin, 1999).

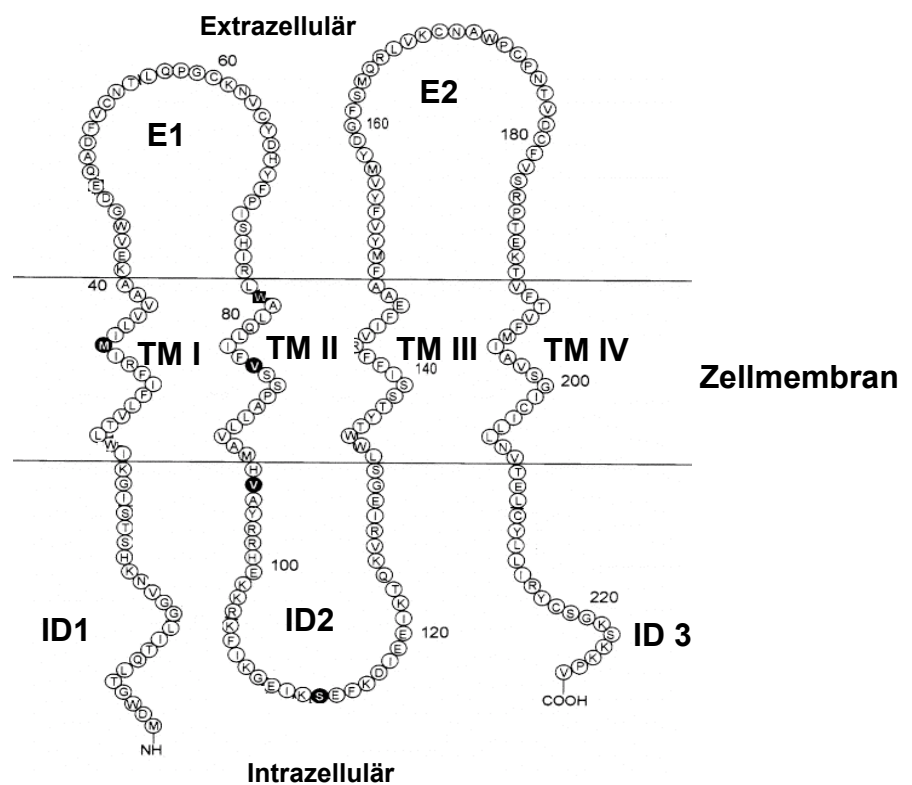


Abb. 4: Proteinstruktur von *Connexin 26* mit 2 Extrazellulärdomänen (E 1-2), 4 transmembranösen Einheiten (TM 1-4) und 3 intrazellulären Domänen (ID1-3) (modifiziert nach Kelley et al., 1998)

Die N-terminal gelegene Intrazellulärdomäne (ID 1) bildet gemeinsam mit der ersten Transmembrandomäne (TM I) einen Komplex, der dem Transmembranprotein als Spannungssensor dient. Die Extrazellulärdomänen E1 und E2 sind die agierenden Proteinbestandteile bei der Connexin-Connexin-Interaktion (siehe Abb. 5). Die intrazelluläre Schleife (ID 2) und die C-terminal-gelegene Intrazellulärdomäne (ID 3) bilden den funktionelle Komplex, der für das so genannte „*pH-gating*“ verantwortlich ist (Verselis et al., 1994).

Den Zusammenschluss von 6 Connexin-Molekülen einer Zelle zu einer hexametrischen Struktur, wird als Connexon bezeichnet. Ein Connexon einer Zelle bildet funktionell einen halben Transmembrankanal (Martin, 1999). Durch die Aneinanderlagerung zweier Connexone, zweier benachbarter Zellen, kommt es zur Ausbildung eines kompletten, funktionstüchtigen Transmembrankanals (Lautermann, 1998). Die Connexonstruktur, bzw. der Zusammenschluss mehrerer Connexone zu einer interzellulären Verbindung ist in Abb. 5 schematisch dargestellt.

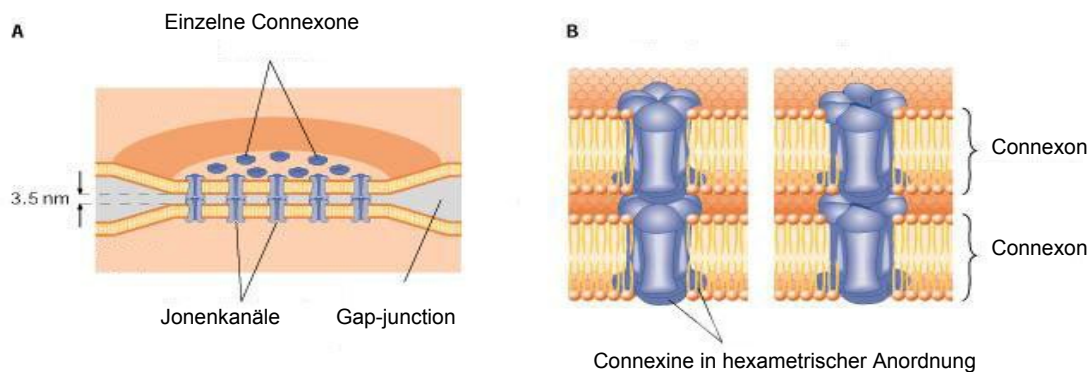


Abb. 5: **A:** Schematische Darstellung einer gap-junction mit zugehörigen Transmembrankanälen zwischen zwei Zellen
B: Aufbau eines Transmembrankanals und Darstellung einzelner Connexone.
(modifiziert nach McGuirt und Smith, 1999)

Die durch die Connexinfamilie gebildeten Transmembrankanäle unterscheiden sich in Ihrer Ionenpermeabilität, bzw. in ihrer Porengröße (Lautermann et al., 1998).

Das Molekulargewicht, der durch sie passiv transportierten Moleküle kann bis zu einem kDa betragen. Hauptsächlich passagieren durch diese Transmembrankanäle in „*gap-junctions*“ Ionen, Metaboliten und „*second messenger*“ (Dermizel und Strain,

1993; White et al., 1995; White und Bruzzone, 1996; Lautermann et al., 1998). Im Bereich der Cochlea ist *Connexin 26* maßgeblich an der Ausbildung von Kaliumionen-Kanälen in „*gap-junctions*“ zwischen äußeren Haarzellen und umgebenden nutritiven Zellen und Stützzellen im Corti'schen Organ beteiligt (Martin et al., 1999). Es wird vermutet, dass das Protein daher einen maßgeblichen Einfluß auf die Generierung von cochleären Aktionspotentialen hat, da dieser Vorgang hauptsächlich über das Verschieben von Kalium-Ionen aus der cochleären Endolymphe in die äußeren Haarzellen der Stria vascularis gewährleistet wird (Kubisch et al., 2000).

Mutationen im *Connexin 26*-Gen können zur Ausbildung von sensorineuraler, genetisch-bedingter, nicht-syndromaler Schwerhörigkeit führen (Murgia et al., 1999). Insgesamt sind bisher 49 verschiedene Mutationen im *Connexin 26*-Gen beschrieben worden, von denen 45 autosomal-rezessiv und 4 Mutationen autosomal-dominant vererbt werden können. In der kaukasischen Population kann in über 50% der Fälle bei Mutationen im *Connexin 26*-Gen eine bestimmte Mutation dieses Gens beobachtet werden (Abe et al., 2000; Antoniadis et al., 1999; Denoyelle et al., 1999; Cohn et al., 1999). Es handelt sich dabei um die 35delG-Mutation. Diese Frameshift-Mutation wird autosomal-rezessiv vererbt und führt zur Generierung eines Stop-Codons in Codon 13, das zum Kettenabbruch der Proteinbiosynthese führt. Diese Mutation bewirkt, dass in 34-50% der diagnostizierten Fälle, diese Mutation zu der schwersten Form der prälingualen, sensorineuralen Art der Schwerhörigkeit mit Hörverlusten von >90 dB führt (*resthörig*). Weitere Mutation können in verschiedenen Populationen weltweit, mit unterschiedlichen Häufigkeiten, beobachtet werden. Diese sind im „*World Wide Web*“, auf der *Connexin 26*-Homepage, (<http://www.iro.es/cx26deaf.html>), regelmäßig aktualisiert, zu finden. Neben den Mutationen sind hier auch Daten zu bisher bekannten Polymorphismen ohne Krankheitswert im *Connexin 26*-Gen veröffentlicht. Es handelt sich hierbei um den Austausch von Basen, bzw. Aminosäuren im *Connexin 26*-Gen bei untersuchten Kontrollpersonen, die scheinbar an keiner Form der Hörstörung erkrankt sind. Bisher sind 7 verschiedene Polymorphismen beschrieben, deren Häufigkeit in einzelnen Populationen variiert.

7. Veränderungen im Connexin 26-Gen und klinische Variabilität des phänotypischen Ausprägungsgrades

Die Hörstörungen, die durch Mutationen im *Connexin 26*-Gen entstehen können, insbesondere durch die 35delG-Mutation, wurden bisher als „an Taubheit grenzend, bzw. resthörig“ beschrieben, was einen Hörverlust von mindestens 90 db zur Folge hat (Murgia et al., 1999). In letzter Zeit verdichten sich die Hinweise, dass auch mildere Verlaufsformen der syndromalen und nicht-syndromalen-genetisch bedingten Schwerhörigkeit durch Mutationen im *Connexin 26*-Gen verursacht werden können (Murgia et al., 1999; Wilcox et al., 2000). Diese Daten unterstreichen die Wichtigkeit, die *Connexin 26* im Kontext der genetisch bedingten, sensorineuralen Schwerhörigkeit spielt und fordern eine eingehendere Genotyp-Phänotyp-Analyse bei bekannten Mutationen im *GJB 2*-Gen.

8. Ziele dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Aufbau einer molekulargenetischen Diagnostik und die Durchführung eines Mutationsscreening im *Connexin 26*-Gen. Hierfür wurden Patienten im Alter von 0-18 Jahren mit sensorineuralen, nicht-syndromalen Hörstörungen rekrutiert. Mit Hilfe der molekulargenetischen Befunde wurde versucht, bei diagnostizierten Veränderungen im *Connexin 26*-Gen unter zu Hilfenahme der individuellen Audiogramm- oder Bera-Befunde, eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation abzuleiten. Zur Bestimmung der Häufigkeit heterozygoter Genträger in der deutschen Normalbevölkerung wurde eine molekulargenetische Analyse der kodierenden Region von *Connexin 26* bei 100 gesunden, nicht verwandten, deutschen Probanden durchgeführt. Dies sollte Aufschluß über die Frequenz von mutierten *Connexin 26*-Allelen innerhalb der deutschen Bevölkerung geben.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. MATERIAL

1.1 Geräte und Zubehör

Autoklav	Gössner, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
DNA-Sequencer, Model 373A	Applied Biosystems/Perkin Elmer, USA
DNA-Sequencer, Model 310	Applied Biosystems/Perkin Elmer, USA
Electrophoresis Power Supply	AGS, Heidelberg
Fluorometer TKO 100	Hoefer Scientific Instruments, San Fransisco, USA
Hamilton Spritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Heizblock Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Hoefer SE 600 Series, Gel Sandwich assembly	Pharmacia, Schweden
Horizontal Electrophoresis System	Owl Scientific, Inc., USA
pH-Meter CG 836	Schott, Hofheim
Photometer:	
Pharmacia Novospec II	Pharmacia, Schweden
Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Schweden
Bio Rad Smart Spec 2000	Biometra, Göttingen
Pipetten:	
Eppendorf	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Gilson	Gilson, Frankreich
Rotator	GFL, Burgwedel
Spannungsgeber:	
Modell Consort E455	Consort, Belgien
MWG-Biotech	

PCR-Maschinen:

Trio-Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
PE 9600	Perkin Elmer, New Jersey, USA

Waagen:

Sartorius Modell 2254	Sartorius, Göttingen
Mettler Modell PM 2000	Mettler, Schweiz

Wasserbäder:

Schüttelwasserbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
----------------------------	----------------

Zentrifugen:

Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Osterode
Sorvall GLC-2B	Du Pont, Dreieich
Sorvall RT 6000 Kühlzentrifuge	Du Pont, Dreieich

1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von den Firmen Difco (Detroit, USA), Gibco BRL (Gaithersburg, USA), Hoechst (Frankfurt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) verwendet.

1.3 Enzyme

Taq-DNA-Polymerase	USB, Cleveland, USA
Proteinase-K	Boehringer, Mannheim

1.4 Nukleotide

Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
------------------------------	------------------------------

1.5 DNA-Größenstandards

100 bp Ladder	Gibco BRL, Eggenstein
---------------	-----------------------

1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) Metabion, Deutschland

1.7 Fertigsysteme zur DNA-Sequenzierung

ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Perkin Elmer, New Jersey, USA

1.8 Fertigsysteme zur Aufreinigung von DNA

QIAGEN PCR Purification Kit QIAGEN, Hilden

1.9 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit A. dest. angesetzt und ggf. autoklaviert oder sterilfiltriert.

Ethidiumbromid-Stammlösung 10 µg/ml Ethidiumbromid

6x Gelladepuffer 2,5 mg/ml Bromphenolblau
150 mg/ml Ficoll 400

RCLB-Puffer 10mM Tris/HCl
10mM NaCl
5mM MgCl₂

SE-Puffer 75 mM NaCl
25mM Na₂EDTA, pH 8,0

5x TBE-Puffer 0,5 M Tris
0,5 M Borsäure
10 mM EDTA

SSCA-Ladepuffer	Formamid 32% deionisiert 20 mM EDTA 0,05 % (w/v) Bromphenolbau 0,05 % (w/v) Xylencyanol
10 x Taq-Puffer	0,1 M Tris/HCl, ph 8,0 20 mM MgCl ₂ 0,5 M KCl 1% Triton-X 100
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA

1.10 Computer-Software

Verwendete Computer Auswerte-Software

Programm	Anwendung	Autor/Firma
Primer 3	Primergenerierung	Whitehead Institut for Biomedical Research, 1991(http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)
EASY Store EASY RH-3	Gelbilddokumentation, Fragmentgrößenbestimmung	Herolab, St. Leon-Roth Herolab, St. Leon-Roth
Sequencher V 3.1.1	Generierung von DNA-Sequenzüberlappung	Gene Codes, Ann Arbor
Standard Base Caller Adaptive Base Caller	Sequenzauswertung	Perkin Elmer, USA
StatXact4	Statistikprogramm	Cytel-Software, USA

2.1 Patientengut

Zur Mutationsanalyse im *Connexin 26*-Gen standen 28 Patienten im Alter von zwei bis 18 Jahren mit isolierten sensorineuralen Hörstörungen zur Verfügung. Bei 5 dieser Patienten bestand auf Grund der Familienanamnese der Verdacht auf einen familiär–bedingten Hintergrund der Erkrankung. Bei 20 der Patienten des Kollektivs schien es sich anamnestisch um eine sporadisch auftretenden Erkrankung zu

handeln, während bei den übrigen 3 Patienten anamnestisch keine Angaben zur Verfügung standen. Die Patienten wurden durch die Abteilung für Pädaudiologie und Phoniatrie betreut. Zur Symptomerkennung und Diagnosesicherung wurden für diese Studie die audiometrischen Arbeitsmethoden: Ohrmikroskopie, sowie die Tympanometrie, Hörschwellenaudiometrie und *BERA* (*brain stem evoked response audiometrie*, dt. *Elektrische Reaktionsaudiometrie (ERA)*) angewandt.

2.2 Pädaudiologische Untersuchungsmethoden zur Diagnosesicherung bei Verdacht auf genetisch bedingte, nicht-syndromale, sensorineurale Hörstörung

Alle pädaudiologischen Untersuchungsmethoden wurden ausschließlich in der Abteilung für Pädaudiologie und Phoniatrie des MZ für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde durchgeführt.

2.2.1 Ohrmikroskopie

Die Ohrmikroskopie dient der Inspektion des äußeren Gehörganges und des Trommelfelles. Diese Methode kann ein Hinweis auf morphologische Veränderungen des Mittelohres geben, die ihrerseits eine Schallleitungsschwerhörigkeit zur Folge haben können. Mit Hilfe dieser Methode können konduktive Hörstörungen ausgeschlossen werden.

2.2.2 Tympanometrie

Diese Methode stellt eine indirekte Tubenfunktionsprüfung dar, indem sie die Auswirkungen mangelnder Paukenbelüftung in Form eines Unterdruckes, bzw. eines Paukenergusses, registriert (Lehnhardt, 1987). Die Methode lässt damit Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit des Mittelohres zu, und dient damit dem Ausschluss von Hörstörungen, die durch Läsionen in diesem Bereich des Ohres, bedingt sein können.

2.2.3 Audiogramm

Das Tonschwellenaudiogramm wird mit Hilfe eines Audiometers erstellt. Audiometer erzeugen elektrische Wechselströme verschiedener Frequenz und Intensität (vgl. DIN 45620 „Audiometer zur Hörschwellenbestimmung“). Die Wechselströme betreiben Luftschall- und Knochenschallhörer, die einen möglichst reinen, von Oberwellen freien Ton abstrahlen. Die Verwendung von obertonfreien Tönen für die Hördiagnostik geht auf OHM, v. HELMHOLTZ und BEZOLD zurück und gilt seither als unwidersprochen (Lehnhardt, 1987). Mit Hilfe des Audiogrammes wird die Hörschwelle bestimmt, die, subjektiv, vom Patienten angegeben wird, zu welchem Zeitpunkt er die Oberton freien Töne der verschiedenen Frequenzen (0,5kHz; 1kHz; 2kHz; 4kHz und 8kHz) registriert. Daraus lassen sich Rückschlüsse auf eventuelle Hörverluste in diesen Frequenzbereichen schließen, die in dB (Schalldruckpegel) angegeben werden. Diese Art der Hörschwellenbestimmung lässt Rückschlüsse auf die Funktion des Innenohres, insbesondere der Cochlea, zu. Damit dient das Audiogramm also der seitengetrenten frequenzspezifischen Erfassung des Hörverlustes, sowie der Differenzierung von Hörstörungen.

2.2.4 Die Elektrische Reaktionsaudiometrie (ERA)

Die ERA ist der Oberbegriff für Verfahren zur Untersuchung von Gehöreigenschaften mit Hilfe der Registrierung elektrischer Spannungen physiologischen Ursprunges, die durch einen akustischen oder elektrischen Reiz ausgelöst werden können und üblicherweise als „Akustisch Evozierte Potentiale“ (AEP) bezeichnet werden, die an der Kopfhaut abgeleitet werden können. Es handelt sich hierbei um eine objektive Methode zur Bestimmung der Hörschwelle. Im anglo-amerikanischen Sprachraum wird die ERA als „Brainstem Evoked Response Audiometry“ (BERA) bezeichnet. In dieser Arbeit dienen zwei Arten der BERA der Diagnosesicherung:

a.) „Click-BERA“

Hierbei dient ein akustischer „Click“-Reiz der Auslösung der FAEP (frühe akustisch evozierte Potentiale). Mit dieser Methode können Aussagen über die Hörschwelle im Bereich von ca. 1-4kHz getroffen werden, eine definitive Aussage über den frequenzabhängigen Hörschwellenverlauf kann aus dem Meßergebnis jedoch nicht unmittelbar abgeleitet werden (Stürzebecher et al., 1995)

b.) „notched-noise-BERA“

Hierbei ist ein Reiz, der als „Gauß-burst“ bezeichnet wird, für die Auslösung der FAEPs, verantwortlich. Zur Gewinnung von frequenzspezifischen FAEPs muss sichergestellt werden, dass stets nur der interessierende, ausreichend schmale Frequenzbereich der Basilarmembran antwortfähig ist, indem die übrigen Bereiche durch eine geeignete Maskierung desynchronisiert werden. Das erforderliche Maskierungsverfahren nennt man „notched-noise“-Maskierung. Damit lassen sich Aussagen treffen über die Hörschwelle im Bereich von 0,5; 1; 2; 4- kHz (Stürzebecher et al., 1995).

Beide in dieser Arbeit angewandten Formen der BERA wurden nach den ERA-Empfehlungen der „Arbeitsgemeinschaft Deutschsprachiger Audiologen und Neuroontologen“ (ADANO) von 1994 durchgeführt .

2.3 Probanden-DNA zur Abklärung der Heterozygotenfrequenz in der deutschen Bevölkerung

Für die Untersuchung von Sequenzauffälligkeiten im *Connexin 26*-Gen diente eine Kontrollgruppe von 100 deutschen, nicht verwandten, männlichen und weiblichen Personen ohne bekannte Hörstörungen im Alter von 18-60 Jahren. Die DNA dieser Kontrollgruppe stand für die Untersuchung dem Zentrum für Humangenetik zur Verfügung.

3. MOLEKULARGENETISCHE METHODEN

3.1 Isolierung genomischer DNA aus menschlichen Leukozyten (modifiziert nach Müller et al. 1988)

Die Extraktion genomischer DNA aus den kernhaltigen Leukozyten des menschlichen Blutes erfolgte nach Zellyse und anschließendem Proteinabbau durch die Aussalzmethode. Nachteilig an dieser Methode war ein möglicher DNA-Verlust im Präzipitationsschritt, da DNA, die an den noch vorhandenen Proteine gebunden war, mit ausgefällt wurde. Zur Lyse der Erythrozyten wurden 10 ml EDTA-Blut (Frischblut oder nach Lagerung bei -20°C) mit 30 ml RCLB-Puffer versetzt, und für 15 min auf Eis unter regelmäßigem Schwenken der Röhrchen inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation (10.000 U/min, 4°C , 10 min) sedimentierten die nicht lysierten Leukozyten. Der Überstand mit den lysierten Erythrozyten und dem in den späteren Arbeitsschritten störenden Hämoglobin, wurde verworfen. Anschließend wurde das Sediment erneut mit 25 ml RCLB-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Die im Sediment befindlichen Leukozyten wurden in 5 ml SE-Puffer resuspendiert, mit $250\mu\text{l}$ 10%iger SDS-Lösung und *Proteinase K* (10mg/ml) versetzt und anschließend bei 37°C unter konstantem Schwenken für 16-18 Stunden oder bei 55°C für 3 Stunden inkubiert. Um einen möglichst vollständigen Verdau zu erreichen, folgte nach Zugabe von weiteren 5 ml SE-Puffer eine erneute Inkubation für 10 min bei 55°C . Nach der Lyse der Leukozyten wurden die Proteine durch die Zugabe von $1/3$ Volumen gesättigter NaCl-Lösung dehydriert und präzipitiert. Dafür wurde dieser Ansatz für 15 s kräftig geschüttelt und die Proteine in einer anschließenden Zentrifugation (10.000U/min, RT, 10 min) sedimentiert. Aus dem Überstand erfolgte die Fällung der DNA durch die Zugabe von 40 ml Ethanol abs. . Anschließend wurde die genomische DNA in 70% Ethanol gewaschen und für 12-24h bei 4°C auf einem Rotator in TE-Puffer gelöst.

3.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von doppelsträngiger DNA wurde durch die Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge und bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entsprach eine Absorption von 1,0 einer DNA-Doppelstrangkonzentration von 50 µg/ml. Proben der doppelsträngigen DNA wurden um den Faktor 50 verdünnt, um Absorptionswerte in einem Bereich hinreichender Genauigkeit (A_{260} 0,1-1,0) zu erhalten. Um Aufschluss über eine mögliche Proteinkontamination zu erhalten, wurde die Absorption bei 280 nm ermittelt. Bei proteinfreier doppelsträngiger DNA lag der Wert des Quotienten $A_{260}:A_{280}$ bei ca. 1,8 (Sambrook et al. 1989).

3.3 Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)

DNA-Fragmente konnten entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Da die Phosphatreste dem Molekül eine negative Ladung verliehen, wanderten sie in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die Laufeigenschaften in einem Agarosegel wurden vom Molekulargewicht und von der Konformation der DNA, der Höhe der angelegten Spannung, der Konzentration des Gels und des verwendeten Ladepuffers beeinflusst.

3.3.1 Agarosegelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten wurden 2%ige Agarosegele, die 0,025 µg/ml Ethidiumbromid enthielten, verwendet. Als Lauf- und Gelpuffer wurde 0,5 X TBE eingesetzt. Zum Absenken der DNA in die Geltaschen wurde 1/10 Volumen Probenpuffer zugefügt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in ca. 30 min bei 250 Volt. Als DNA-Längenstandard wurde der 100 bp-Marker (Gibco, BRL) verwendet. Nach der Elektrophorese wurde die DNA auf einem UV-Transluminator (302 nm) sichtbar gemacht, und die fotografische Dokumentation erfolgte mit dem Geldokumentationssystem Herolab EASY-System.

3.4 Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1989)

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR: Polymerase chain reaction) konnten definierte DNA-Abschnitte aus einer geringen DNA-Ausgangsmenge *in vitro* amplifiziert werden.

Für die PCR benötigte man DNA-Fragmente, deren Sequenz am 5'- und am 3'-Ende bekannt waren, damit aus diesem Bereich Oligonukleotide (Primer) abgeleitet werden konnten. Das Grundprinzip der PCR unterteilte sich in drei Reaktionsschritte, die zyklisch 25-35 mal durchlaufen wurden. Zuerst wurde die doppelsträngige DNA bei 94°C denaturiert, im zweiten Schritt lagerten sich die Oligonukleotide an die DNA (Annealing). Dies geschah bei Temperaturen von 50°C bis 65°C (die Temperatur hing von der Länge und der Basenzusammensetzung der Oligonukleotide ab). Im dritten Schritt begann die Synthese, bei der die Oligonukleotide als Startpunkt dienten. Die Polymerase lagerte sich an die Oligonukleotide an und synthetisierte bei 72°C einen komplementären Strang (Extension), dies erfolgte immer von 5'- in 3'-Richtung. Bei jedem neuen Zyklus konnte die neu synthetisierte DNA ebenfalls als Matrize dienen. Dies führte zu einer exponentiellen Vermehrung der gewünschten DNA-Sequenz.

3.4.1 Generierung von Oligonukleotiden

Um Sequenzabschnitte mit Hilfe der PCR zu amplifizieren, benötigte man Oligonukleotidpaare (Primerpaare). Für die Generierung von Primerpaaren mußte ein Teil der Sequenz bekannt sein, daher sind für die Auswahl von Primern einige Punkte zu beachten: Die Primer sollten eine hohe Spezifität und eine Länge von etwa 16-20 Basenpaaren aufweisen und darüberhinaus keine Motive enthalten, die Haarnadelschleifenbildung oder Primerdimerisierung begünstigten. Es war ebenfalls wichtig, dass die Anlagerungstemperatur beider Primer in etwa gleich hoch waren.

Die Auswahl der Primer wurde in dieser Arbeit mit dem Softwareprogramm „Primer 3“ des Whitehead Institute for Biomedical Research durchgeführt (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

3.4.2 PCR-Bedingungen zur Amplifikation des *Connexin 26*-Gens aus genomischer DNA

Die PCR-Bedingungen für neugenerierte Primerpaare wurden standardmäßig mit genomischer DNA unter folgenden Bedingungen ausgetestet:

Reaktionsansatz:	50 µl
10xPCR-Puffer	5 µl
dNTPs (20mM)	0,5 µl
Primer forward (100 ng/µl)	0,5 µl
Primer reverse (100 ng/µl)	0,5 µl
Taq-Polymerase (4 U/µl)	0,25 µl
DNA (100 ng/µl)	1,0 µl
A. bidest.	ad 50 µl

Da ein Thermocycler mit beheizbarem Deckel zur Verfügung stand, mußten die PCR-Proben nicht mit Paraffin überschichtet werden.

Folgendes PCR-Programm wurde standardmäßig benutzt:

Schritt 1:	5 min	94°C
Schritt 2:	1 min	95°C
Schritt 3:	1 min	58°C
Schritt 4:	1 min	72°C
Schritt 5:	10 min	72°C
Schritt 6:	∞	4°C

Schritte 2-4 wurden 35x wiederholt.

Dem letzten Zyklus wurde eine 10 min DNA-Synthesephase angeschlossen, um doppelsträngige DNA als Produkt zu erhalten. Zur Überprüfung der PCR wurden die Produkte in einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt.

3.5 Aufreinigung von PCR-Produkten mittels QIAquick PCR Purification Kit

Für die anschließende Sequenzierung war eine Abtrennung der amplifizierten PCR-Fragmente von Primer-, Enzymresten und Salz unumgänglich, da diese Reagentien die folgende Sequenzreaktion in einem erheblichen Maße negativ hätten beeinflussen können. Die Reinigung erfolgte mittels QIAquick PCR Purification Kit gemäß Herstellerangaben (Qiagen). Dabei wurde das PCR-Produkt mit einem ethanolhaltigen Puffer versetzt, auf eine Säule gegeben, durch mehrere Zentrifugations- und Waschschriffe gereinigt, und schließlich in H₂O eluiert. Zur

Kontrolle und zur Abschätzung der DNA-Konzentration wurden 2 μ l des Eluates in einem Agarosegel aufgetrennt.

3.6 Mutationsanalyse im *Connexin 26*-Gen bei klinischem Verdacht auf genetisch bedingte isolierte sensorineurale Hörstörung

Bei 28 Probanden mit klinischem Verdacht auf genetisch bedingte isolierte sensorineurale Hörstörung und 28 Familienangehörigen dieser Probanden, wurde die kodierende Sequenz des *Connexin 26*-Gens durch PCR amplifiziert. Die Wahl der Primerpaare erfolgte so, dass sechs überlappende Fragmente von 134 bp bis 280 bp generiert wurden und flankierende Sequenzabschnitte enthalten waren. Die Oligonukleotide sind in Tab. 5 dargestellt. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) auf Abweichungen im Migrationsverhalten in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel überprüft, und auffällige Fragmente zur Identifizierung und Charakterisierung der Sequenzvarianten mit Hilfe der Heterozygotensequenzierung analysiert.

Tab. 6: Oligonukleotidpaare (Primerpaare) zur Amplifizierung der kodierenden Region des Cx 26-Gens. Bei allen Oligonukleotiden betrug die Anlagerungstemperatur 58°C.

Primer- benennung	Basenabfolge von 5`- nach 3`-Ende	GC-Gehalt
1f	gaagtctccctgttctgtcct	52,4%
1r	atgagcaggccgactttgtc	55%
2f	tctttccagagcaaaccgc	50%
2r	gacacgaagatcagctgcag	55%
3f	ccaggctgcaagaacgtgtc	60%
3r	tttgatctcctcgatgtcct	45%
4f	accggagacatgagaagaag	50%
4r	acctacacacaagcagcatcttc	47,6%
5f	gaaggtccgcatcgaaggct	60%
5r	tgcaatcatgaacactgtga	40%
6f	cactgtggactgctttgtgt	50%
6r	catccctctcatgctgtct	52,6%

3.6.1 Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) (Orita et al., 1989)

Bei der SSCA wurden die PCR-Produkte denaturiert und lagen so als Einzelstränge vor. Sie wurden auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen, wobei die Einzelstränge Sekundärstrukturen ausbilden konnten, die durch schwache intermolekulare Wechselwirkungen zustande kamen (z.B. Wasserstoffbrückenbindung). Es konnten eine oder mehrere stabile Formen auftreten, wobei die Einzelstrangkongformation die Migrationsgeschwindigkeit im elektrischen Feld bestimmte.

Schon die Substitution, bzw. Deletion einer Base konnte zu einer Konformationsänderung der einzelsträngigen DNA führen und so das Laufverhalten im Gel verändern. Entscheidend für die Sensitivität der Methode war die optimale DNA-Fragmentlänge, die 150-270 bp nicht überschreiten sollte. Die Effizienz war aber auch vom Ort der Mutation, vom GC-Gehalt der Sequenz und der Art der Mutation abhängig. Eine wichtige Rolle spielten zudem die Gelzusammensetzung und die Laufbedingungen bei der Detektion von Mutationen (Sheffield et al., 1993). Das Funktionsprinzip der SSCA ist schematisch in Abb. 4 dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde standardmäßig die Auftrennung der PCR-Fragmente im 12% Acrylamidgel bei 20°C, einer Spannung von 500 V und einer Laufzeit von 2h durchgeführt. Folgende Chemikalien wurden für die Gelbereitung verwendet:

Acrylamid (40%)	9 ml
Bisacrylamid (2%)	3,6 ml
10 xTBE	3 ml
A. bidest.	ad 30 ml
APS (10 %)	280 µl
TEMED	18 µl

Das Gel wurde zwischen zwei sorgfältig gereinigte Glasplatten gegossen, die durch Spacer (0,75 mm) voneinander getrennt waren. Als Laufpuffer diente 0,5xTBE. Vom PCR-Ansatz wurden 10 µl aliquotiert und mit 8 µl des denaturierendem SSCA-Ladepuffers gemischt und 5 min bei 96°C denaturiert. Bis zum Auftrag auf das Gel erfolgte die Inkubation der Proben auf Eis. 5 µl dieses Ansatzes wurden mit der Hamilton-Spritze in die Geltaschen aufgetragen.

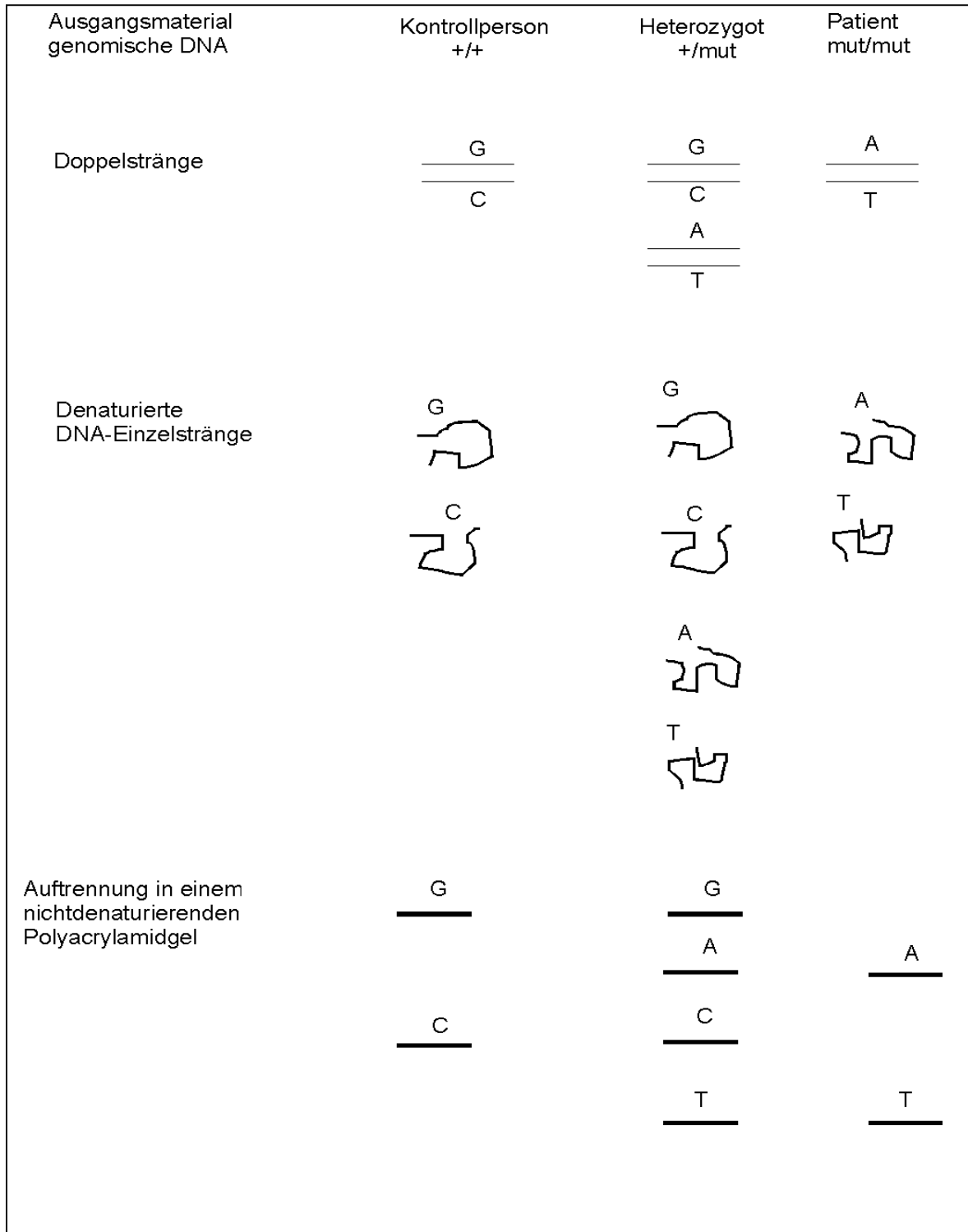


Abb. 6: Übersichtsschema der Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA)

3.7 Silbernitratfärbung von Polyacrylamid-Gelen (hier SSCA-Gelen)

Eine der sensitivsten Nachweismethoden von DNA und Proteinen in einem Polyacrylamidgel ist die Reduktion von Silbernitrat. Hierzu wurde das Gel mit Silbernitrat behandelt. Das Silbernitrat wurde durch Formaldehyd bei einem erhöhten pH-Wert zu metallischem Silber reduziert. Diese Reduktion wurde durch Makromoleküle, in diesem Fall DNA, beschleunigt (Nielson und Brown, 1984).

Beim Nachweis von DNA in Polyacrylamidgelen durch Silbernitrat-Färbung gab es eine Vielzahl von Variationsmöglichkeiten. In dieser Arbeit wurde nach der Methode von Budowle et al. 1991 gearbeitet (Budowle et al., 1991).

Das Gel wurde zur Fixierung für 5 min in eine Lösung mit 10% Ethanol abs. und 0,5% Eisessig gegeben. Die Lösung wurde dekantiert und für 10 min wurde eine 1 % Salpetersäure zugegeben. Durch diesen Schritt konnte man eine Reduktion des Hintergrundes auf dem Gel erreichen. Anschließend wurde das Gel 2-3 mal kurz mit A. dest. gespült. Nun wurde das Gel 30 min in einer 12 mM AgNO_3 -Lösung geschwenkt. Man dekantierte die Silbernitratlösung ab und wusch das Gel wieder 2-3 mal kurz mit A. dest.. Im nächsten Schritt wurde das Silbernitrat mit einer 280 mM NaCO_3 -Lösung mit 0,019% Formaldehyd reduziert. Bei diesem Schritt wurde zuerst 2x etwa 100 ml der Lösung zugegeben und direkt wieder verworfen, um das freie Silbernitrat zu reduzieren und vom Gel zu entfernen. Dann wurden 500 ml dieser Lösung zugegeben und so lange unter ständigem Schwenken in der Färbeschale belassen, bis die Banden deutlich zu sehen waren. Im letzten Schritt wurde die Reaktion in einer 10 %igen Eisessiglösung gestoppt. Zu dieser Lösung gab man etwa 50 ml Glycerin, um die Elastizität des Gels zu erhalten.

Das Gel wurde anschließend zwischen zwei feuchte permeable Membranen blasenfrei gelegt und für 16 h in einem Geltrockenrahmen getrocknet.

3.8 DNA-Sequenzierung

Die Taq-Cycle-Sequenzierung wurde mit den DNA-Sequenzier-Automaten „Model 373A“ und „Model 310“ der Firma Applied Biosystems (Perkin Elmer) durchgeführt. Bei diesen beiden Geräten handelte es sich um einen Plattensequenziergerät (373A), und um ein Kapillarsequenziergerät (310A). Bei der Taq-Cycle-Sequenzierung wurde die statistische Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) modifiziert. Diese Methode benutzte die Fähigkeit von DNA-Polymerasen

in vitro, die komplementäre Kopie eines DNA-Stranges zu synthetisieren. Der abzulesende Strang mußte für eine effiziente DNA-Synthese als Einzelstrang vorliegen. Die Synthese wurde initiiert durch ein kurzes Oligonukleotid, das sich durch seine Komplementarität an die 5'-Region der zu identifizierenden DNA-Sequenz anlagerte. Dieses kurze, angelagerte Oligonukleotid besaß eine freie 3'-Hydroxylgruppe, die von der Polymerase genutzt wurde, um eine Phosphodiesterbrückenbindung zu dem folgenden 2'-Desoxy-Nukleosidtriphosphat zu knüpfen, falls dieses komplementär zur Base des Matrizenstranges an dieser Stelle war. Diese Reaktion verlängerte das Oligonukleotid um eine Base. Durch die Verwendung einer Mischung von 2'-Desoxy-Nukleotiden und 2'3'-Dideoxynukleotiden, denen die freie 3'-Hydroxylgruppe fehlte, kam es zum zufälligen Kettenabbruch, wenn die DNA-Polymerase ein komplementäres 2'3'-Dideoxynukleotid einbaute. So entstand eine Population von Oligonukleotidsträngen mit identischen 5'-Enden, deren 3'-Ende aber bezüglich der Länge variierte (Sambrook et al. 1989). Als DNA-Polymerase wurde zur Zeit entweder die T_7 -Polymerase oder die Taq-Polymerase verwendet. Die T_7 -DNA-Polymerase produzierte ein gleichmäßigeres Sequenzmuster, hatte aber den Nachteil, dass sie nicht hitzestabil war. Die niedrige Reaktionstemperatur der T_7 -Polymerase-Reaktion von 37°C ermöglichte den Einsatz der DNA-Matrize nur als Einzelstrang, da andernfalls die Renaturierung zum Doppelstrang die Polymerisation verhindert hätte. Um ein detektierbares Signal bei einem einmaligen Ablesen des Matrizenstranges zu erhalten, mußte dieser in großen Mengen bereitgestellt werden.

Eine Vereinfachung der Sequenzierung wurde durch den Einsatz der Taq-DNA-Polymerase erreicht. Durch die Hitzestabilität der Taq-DNA-Polymerase konnte in der Sequenzreaktion der DNA-Doppelstrang verwendet werden. Die Anlagerung des Oligonukleotides und die Polymerisation fanden bei Temperaturen, die eine Renaturierung des Doppelstranges verhindern, statt. Zusätzlich konnte durch die Hitzestabilität der Taq-DNA-Polymerase der Matrizenstrang mehrmals durch eine Temperaturerhöhung denaturiert werden. Durch das wiederholte Ablesen reichten schon geringe Mengen an Matrizen-DNA aus, um ein detektierbares Signal zu erhalten. Nachteil der Taq-DNA-Polymerase war eine nicht einheitliche Signalintensität der einzelnen Nukleotide durch die Diskriminierung einzelner Nukleotide in bestimmten Sequenzmotiven.

Zur Detektion des neu synthetisierten DNA-Stranges wurde in dieser Arbeit die Fluoreszenz-Terminator-Methode angewandt.

Bei dieser Methode fehlten den Didesoxynukleotiden, die zur Kettenverlängerung nötige 3'-Hydroxygruppe der Ribose. Dafür waren sie mit 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen auf Rhodaminbasis markiert, die differierende Emissionsmaxima besaßen (ddATP: „JOE“-grün; ddGTP: „FAM“-blau; ddCTP; „TAMRA“-gelb; ddTTP; „ROX“-rot). Durch diese unterschiedliche Farbgebung war es möglich die unterschiedlichen Nukleotide einer Spur zu analysieren. In einem Sequenziergel liefen die unterschiedlich langen PCR-Produkte eines Ansatzes ihrer Größe nach an einem Argonlaser vorbei, der die Fluoreszenzfarbstoffe anregte. Da die vier Basen durch unterschiedliche Farbstoffe markiert waren, konnte die gesamte Reaktion in einem Reaktionsgefäß angesetzt werden. Die Auswertung der einzelnen Emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe wurde durch den Einsatz eines Filtersets sichergestellt, weil die Emissionsmaxima der Farbstoffe sich überlagerten. Die Bandbreite des Filterset (Filterset A) betrug: 540, 560, 580 und 600 nm .

3.8.1 Sequenzieransatz: Taq-Cycle-PCR

In dieser Arbeit wurde das BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit vers. 1.1 von Applied Biosystems verwendet. Das Kit enthielt eine modifizierte Taq-Polymerase, Desoxynukleotide und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in Konzentrationen, die eine Synthese von PCR-Produkten zwischen 10 und 700 bp sicherstellten (lt. Angabe des Herstellers). Der Sequenzieransatz variierte je nach der Konzentration der Ausgangs-DNA. In dieser Arbeit wurden aufgereinigte PCR-Produkte sequenziert. Diese PCR-Produkte wurden mit dem PCR-Purification-Kit von QIAGEN nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt (siehe Kapitel 2.5).

Sequenzieransatz (aus einem PCR-Produkt):

Terminator Ready Reaktion Mix	4 µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	X µl (75 ng)
Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
A. bidest.	ad 10 µl

Der Ansatz wurde auf Eis , unter Lichtabschluß, pipettiert.

PCR-Programm:

Die Reaktionsgefäße wurden in vorgeheizte Blöcke der PCR-Maschine gestellt. Daraufhin wurde das unten aufgeführte Programm gestartet:

Schritt 1:	20 sec	96°C
Schritt 2:	10 sec	58°C
Schritt 3:	4 min	60°C
Schritt 4:	4 min	60°C
Schritt 5	∞	4°C

Schritte 1 bis 3 wurden 30x wiederholt.

3.8.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Abtrennung der überschüssigen Terminatoren, da vor allem die fluoreszenzmarkierten ddNTPs zu einer Überlagerung bei der Sequenzauswertung führen konnten, wurden die Proben einer Salz-Alkohol-Fällung und anschließenden Reinigung unterzogen, wobei oben erwähnte Terminatoren, störende Salze und Proteine entfernt wurden.

Die Proben wurden mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol abs. gemischt und 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Proben unter Lichtabschluß getrocknet.

Nach dem Trocknen wurden die Pellets in Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden für die beiden Sequenzier-Automaten in unterschiedlichen Probenpuffern aufgenommen. Für das Modell 373A wurden die Proben in 4 µl Probenpuffer (5:1 deionisiertes Formamid zu 50 mM EDTA) resuspendiert. Für das Modell 310 wurden die Proben in 20 µl „Template Suppression Reagent“ der Firma Perkin Elmer aufgenommen, anschließend für 5 min bei 94°C denaturiert und bis zum Auftrag auf das Sequenziergel des Plattensequenzierers, bzw. bis zur Plazierung auf den Probenschlitten des Kapillarsequenziergerätes, auf Eis gelagert.

3.8.3 Sequenzierung am Sequenzier-Automat 373 A

Bei dem Sequenzierautomaten 373A von Perkin Elmer handelte es sich um einen Plattensequenziergerät. Die Glasplatten für das Sequenzgel wurden vor dem Gebrauch sorgfältig mit einem Detergens (Alconox) und A. dest. gereinigt und anschließend mit Isopropanol 99% sorgfältig gereinigt und getrocknet. Die Spacer (0,3 mm) wurden auf die Ränder der Glasplatte gelegt, die Glasplatten zusammengesetzt und mit Klammern fixiert. Das Gel bestand aus:

Harnstoff	30g
50% Acrylamid	7,2ml
10xTBE-Puffer	6ml
A. bidest	25,3ml

Den Harnstoff löste man im 50°C Wasserbad. Die denaturierenden Eigenschaften des Harnstoffs sorgen dafür, dass die DNA im Gel einzelsträngig vorliegt. Die Gel-Lösung wurde über einen 2 µm Faltenfilter filtriert. Die Polymerisation des Gels wurde mit 20 µl TEMED und 280 µl 10 %iger Amoniumpersulfatlösung gestartet. Direkt im Anschluß wurde das Gel zwischen die Glasplatten gegossen. Der Vorkamm wurde eingesetzt, und das Gel wurde 2 h in horizontaler Lage auspolymerisiert.

Nach Einbau des Gels in die Sequenzie-Maschine wurde der Auftragskamm eingesetzt, so dass die Zähne etwa 1 mm in das Gel hineinragten, die Pufferkammern wurden mit 1xTBE gefüllt und der Gelvorlauf bei 37 Watt für 1 h gestartet. Die Proben wurden alternierend in jede zweite Geltasche aufgetragen. Nach 10 min Laufzeit wurde die zweite Hälfte der Proben geladen. Die Elektrophorese erfolgt 14-16 h bei 37 Watt. Nach anschließender Sichtung der vom Computer ausgewerteten Spuren des Geles, die die aufgetragenen Sequenzier-Proben repräsentierten, wurden diese von Hand, mit Hilfe des Programms Edit View, editiert, bevor sie abschließend mit Hilfe des Computer-Programmes Sequencer 3.1.1 . ausgewertet wurden.

3.8.4 Auftrennung des Sequenzieransatzes (Model 310)

Bei dem Gerät 310 von Perkin Elmer handelte es sich um ein Kapillarsequenziergerät, bei dem die Gelmatrix (POP6 von Perkin Elmer) über ein Pumpsystem in eine Glaskapillare gepumpt wurde. Diese Gelmatrix wurde nach jedem Lauf automatisch ausgetauscht. Die Proben wurden im Reaktionsgefäß auf dem Transportschlitten des Kapillarsequenzgerätes plaziert, so dass die DNA-

Proben von dem Gerät eigenständig aus den Reaktionsgefäßen aufgenommen wurden. Die Sequenzierdaten wurden mit dem Computerprogramm Standard Base Caller (Applied Biosystems, Perkin Elmer) so nachbearbeitet, dass sie anschließend mit Hilfe des Computerprogrammes Sequencer 3.1.1 ausgewertet und beurteilt werden konnten.

3.9 Statistische Methoden

Zur Entscheidung, ob ein genetisches Merkmal ein Risikofaktor darstellt, wurden übliche statistische Verfahren angewandt (Terwilliger und Ott, 1994).

Dabei wurde untersucht, ob die Unterschiede zweier Stichproben durch zufallsbedingte Streuung zu erklären waren (Nullhypothese H^0), oder ob tatsächlich ein Effekt vorlag (Alternativhypothese H^1). Mit einem statistischen Test (χ^2 , Fisher, McNemar, Cochran-Armitage) wurde aus den Beobachtungsdaten die jeweilige Testgröße errechnet und der zugehörige p -Wert ermittelt.

Der p -Wert ist die Wahrscheinlichkeit, mit der sich die vorliegenden Ergebnisse (oder noch extremere) zufällig ergeben könnten, d.h. der p -Wert ist die Wahrscheinlichkeit, mit der man sich irrt, wenn man die Nullhypothese H^0 ablehnt. Wenn diese Wahrscheinlichkeit gering ist (kleiner als das zuvor vereinbarte Signifikanzniveau A), wird H^0 verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet. Meist (so auch in der vorliegenden Arbeit) setzt man A gleich 0.05.

Außerdem wurden *Odds Ratio* (OR) und *Konfidenzintervall* (CI) berechnet.

Die OR gibt an, um welchen Faktor das Krankheitsrisiko einer Person steigt, wenn sie Träger eines bestimmten Allels oder Genotyps ist. Bei Krankheiten mit niedriger Prävalenz wird die OR gleich dem relativen Risiko. Um die Genauigkeit der OR beurteilen zu können, wurde das zugehörige CI angegeben.

Ein CI ist der Wertebereich, der mit einer vorgegebenen Vertrauenswahrscheinlichkeit ($1-A$) die wahre OR enthält. Ein großes CI ist Indiz für eine starke Variabilität der Daten. Enthält das CI die 1, ist das Ergebnis nicht signifikant. Da wie üblich eine Irrtumswahrscheinlichkeit A gleich 5% gewählt wurde, werden 95% CI angegeben.

IV. Ergebnisse

Das menschliche *Connexin 26*-Gen (GenBank Acc.No.: NM_004004) ist auf dem langen Arm des Chromosoms 13q11-q12 lokalisiert. Es besteht aus zwei Exons, wobei das Exon 2 eine Größe von 681 bp besitzt, und für das Gap-junction-Protein- β -2 (*GJB2*) kodiert. Es handelt sich dabei um ein Transmembranprotein, dessen Struktur in der Abb. 2 schematisch dargestellt ist.

Ein Patientenkollektiv, bestehend aus 28 Patienten mit dem klinischen Verdacht auf genetisch bedingte nicht-syndromale Schwerhörigkeit, wurde auf Mutationen im *Connexin 26*-Gen untersucht. Das Kollektiv bestand aus 15 männlichen Patienten und 13 weiblichen Patientinnen. Das Alter der Patienten betrug 0-18 Jahre. Das Kollektiv setzte sich aus 21 deutschen, 6 türkischen und einem pakistanischen Patienten mit hereditären, sensorineuralen Hörstörungen zusammen.

Von diesen 28 Patienten bestand bei 5 Patienten (18%) der Verdacht auf eine isolierte Schwerhörigkeit, die einen familiären Hintergrund hat, während es sich bei 20 Patienten (71%) um eine sporadisch auftretende Form der Hörstörung handelte. Bei 3 von 28 Patienten (11%) lagen über den familiären Hintergrund der Hörstörung anamnestisch keine Angaben vor. Der Grad der Ausprägung der Hörstörung innerhalb des Patientenkollektivs war sehr heterogen. Ein Patient aus diesem Kollektiv zeigte eine „*leichtgradige*“ Hörstörung. Ein weiterer Patient dieser Gruppe konnte als „*leicht-mittelgradig*“ eingestuft werden. Eine Gruppe von 12 Patienten zeigte eine „*mittelgradige*“ Hörstörung. 1 Patient hatte eine „*mittel-hochgradige*“ Hörstörung. Bei 7 Patienten wurde eine „*hochgradige*“ Hörstörung diagnostiziert. 6 Personen zeigten eine Hörstörung, die als „*an Taubheit grenzend, bzw. resthörig*“ zu bezeichnen war. Eine Übersicht, über die im Patientenkollektiv beobachteten Hörstörungen ist in Tabelle 7 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 7: Übersicht über die Ausprägungsgrade der Schwerhörigkeit, die bei den 28 untersuchten Patienten zu beobachten waren

Ausprägungsgrad der Schwerhörigkeit	Anzahl der betroffenen Patienten	Patient/Labornummer
Leichtgradig (27-40dB)	1(3,57%)	Cx24
Leicht-mittelgradig (27-69dB)	1(3,57%)	Cx53
Mittelgradig (40-69dB)	12(42,86%)	Cx01, Cx06, Cx10, Cx14, Cx16, Cx17, Cx21, Cx22, Cx25, Cx42, Cx52, Cx56
Mittel-hochgradig (40-94dB)	1(3,57%)	Cx40
Hochgradig (70-94dB)	7(25%)	Cx09, Cx20, Cx28, Cx29, Cx33, Cx46, Cx49
Resthörig (>94 dB)	6(21,43%)	Cx05, Cx11, Cx15, Cx27, Cx30, Cx44

1. Etablierung der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur molekulargenetischen Analyse der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens

Zur Analyse der kodierenden Region und der 5`- bzw. 3`-flankierenden Sequenzabschnitte der kodierenden Region im Exon 2 von *Connexin 26* wurden 6 Primerpaare mit Hilfe der in der Genbank vorhandenen Sequenz (Acc. No.: NM_004004) ausgewählt. Folgende Auswahlkriterien wurden bei der Auswahl der Primer berücksichtigt: Zum einen sollten sie eine Länge von 280 bp nicht überschreiten, zum anderen sollten die generierten PCR-Produkte sich so überlappen, dass eine komplette Analyse der kodierenden Region des Gens gewährleistet war (Primer 1f/r-6f/r, Tab. 8).

Für die Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) wurden die einzelnen PCR-Produkte der Primerpaare 1f/r-6f/r auf ihr verändertes Migrationsverhalten bei den einzelnen Probanden überprüft.

Für die Sequenzanalyse wurden die Primer in der Kombination 1f/3r und 3f/6r für eine erste Amplifikation der kodierenden Region verwendet (Abb. 7, Spur und). Die Laufeigenschaften der PCR-Produkte in einem 2%igen Agarosegel sind in Abb. 7

dargestellt. Die Bezeichnung und die Größe der einzelnen Produkte sind in Tab. 8 aufgeführt.

Tab. 8: Zusammenfassende Darstellung der verwendeten Primerpaarkombinationen und der Größe der generierten PCR-Produkte. Für die die SSCA wurden die Primerpaarkombinationen 1f/r-6f/r verwendet. Für die Heterozygotensequenzierung fanden die Primerpaarkombinationen 1f/3r und 3f/6r Verwendung.

DNA-Fragment- bezeichnung	Verwendete Primer Kombinationen	Länge des generierten PCR-Produktes in Basenpaaren (bp)
Fragment 1	1f/1r	237 bp
Fragment 2	2f/2r	280 bp
Fragment 3	3f/3r	195 bp
Fragment 4	4f/4r	134 bp
Fragment 5	5f/5r	220 bp
Fragment 6	6f/6r	202 bp
Fragment 1/3	1f/3r	447 bp
Fragment 3/6	3f/6r	558 bp

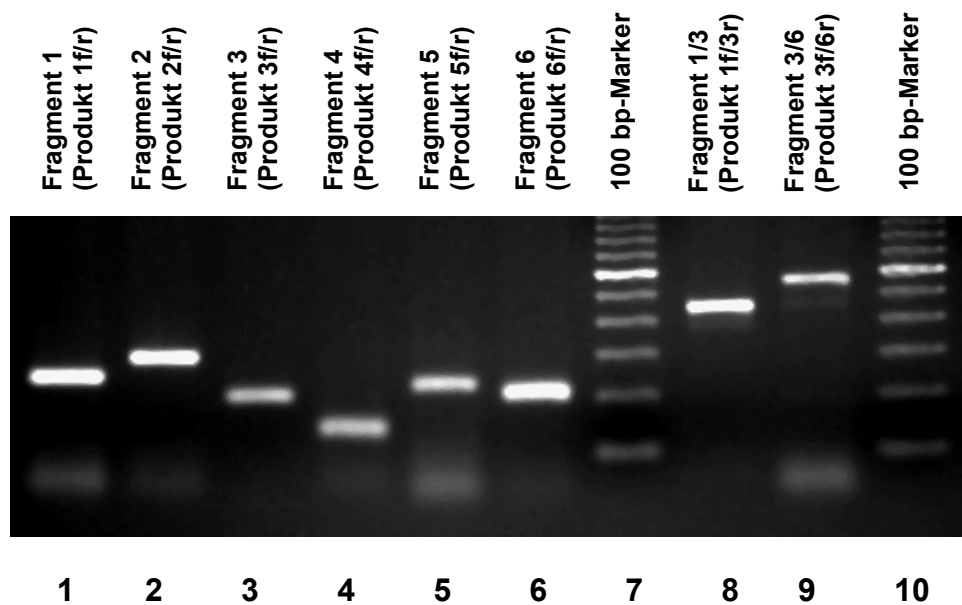


Abb. 7: Darstellung der Größe der PCR-Produkte Fragment 1-6 (Spur 1-6) und Fragment 1/3 (Spur 8), wie Fragment 3/6 (Spur 9), aufgetragen auf einem 2%igen Agarosegel, abschätzbar anhand eines 100 bp-Markers (Spur 7 und 10)

2. Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) zur Detektion von Sequenzvarianten bei Patienten mit klinischem Verdacht auf genetisch bedingte nicht-syndromale Schwerhörigkeit

Die Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) ist eine sensitive Nachweismethode zur Analyse von DNA-Sequenzveränderungen. Das Prinzip der Methode basiert auf der Untersuchung des Migrationsverhalten von DNA-Einzelsträngen im nicht-denaturierendem Polyacrylamidgel. Hierbei wird die Laufeigenschaft der Einzelstränge im elektrischen Feld schon durch Substitution bzw. Deletion einer Base im Vergleich zum Wildtyp verändert und im gefärbten Gel sichtbar gemacht (siehe Abb. 4).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Migrationsverhalten der DNA-Fragmente 1-6 (s.Tab. 8), die mittels PCR amplifiziert wurden unter konstanten SSCA-Bedingungen (500V, 2h, RT) untersucht (s. II.2.6.1).

In der SSCA wurden alle 28 Patienten, mit klinischem Verdacht auf genetisch bedingte, nicht-syndromale Schwerhörigkeiten und eine Kontrollgruppe, bestehend aus 50 gesunden, nicht-verwandten Deutschen, auf Veränderungen im Migrationsverhalten der DNA-Einzelstränge überprüft.

Insgesamt zeigten 4 von 28 untersuchten Patienten ein aberrantes Bandenmuster im Vergleich zur gesunden Kontrollperson.

Drei von 4 Patienten zeigten eine Veränderung der Laufeigenschaften der DNA-Einzelstränge im Vergleich zur verwendeten Kontrolle (Abb. 8A, Spur K) bei der Analyse des PCR-Produktes von Fragment 1 (Abb. 8A, Spur 1, 5 und 6).

Ein Patient zeigte eine Veränderung der Laufeigenschaften der DNA-Einzelstränge im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 8B, Spur K) bei Analyse des PCR-Produktes von Fragment 4 (Abb. 8B, Spur 1).

Um annehmen zu können, ob es sich bei diesen aberranten Bandenstrukturen um Mutationen handeln könnte, oder ob Polymorphismen vorlagen, wurden 100 Chromosomen, die aus einem Kontrollpersonengut der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen, mittels der SSCA mit DNA-Fragment 1-6 (Tab. 8) auf Bandenaberrationen untersucht. Es ließen sich weder das Aberrationsmuster, was bei den 3 Patienten in der SSCA mit DNA-Fragment 1 beobachtet werden konnte, noch das aberrante Bandenmuster, was in der SSCA-Analyse bei den Patienten mit DNA-Fragment 4 auftrat, wiederfinden. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei diesen Patienten mit den auffälligen Bandenstrukturen in der SSCA um Personen handelt,

die Mutationen im DNA-Fragment 1 bzw., die eine Mutation im DNA-Fragment 4 des *Connexin 26*-Gens aufwiesen.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die untersuchten Kontrollpersonen (n=50) zeigten in keinem der 6 untersuchten PCR-Produkte (1f/r-6f/r) eine Veränderung der Laufeigenschaften der DNA-Einzelstränge.

Die unterschiedliche Wirkung von einem Einzelbasenaustausch, bzw. einer Deletion auf das Migrationsverhalten der DNA-Einzelstränge und des DNA-Doppelstranges in der SSCA ist in der Abb. 8 dargestellt.

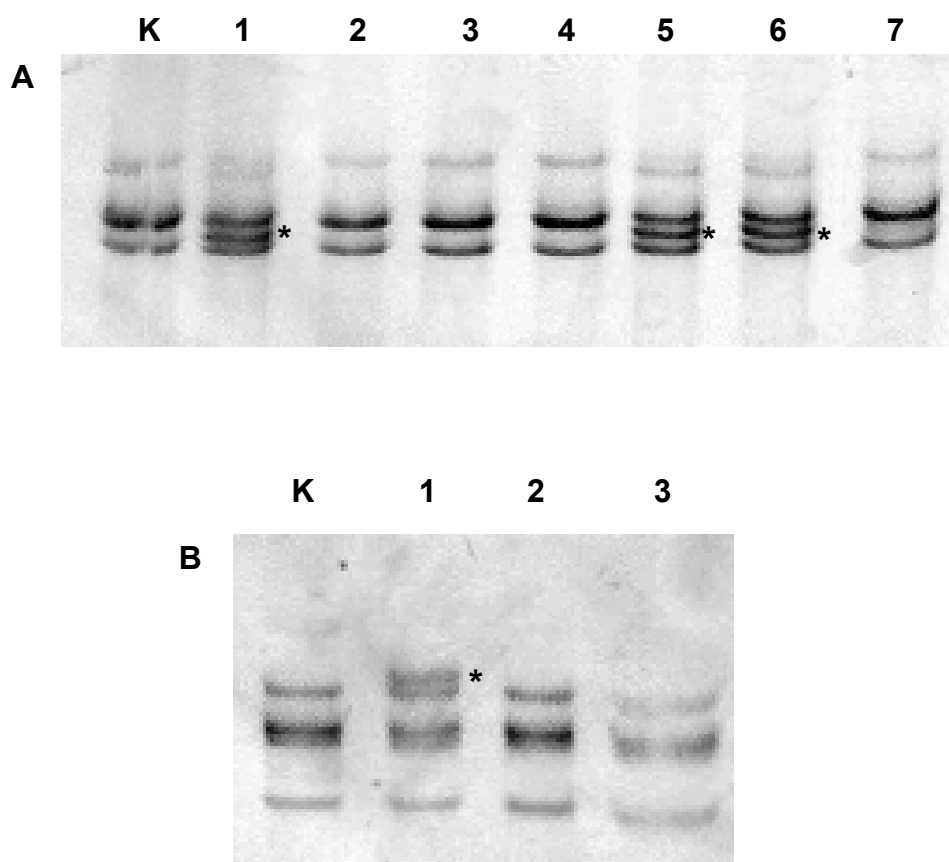


Abb. 8:

Darstellung der Einzelstrangkonnformationsanalyse der DNA-Fragmente 1 und 4.

A: Darstellung der SSCA von DNA-Fragment 1. Spuren 1,5 und 6 zeigen eine Veränderung der Laufeigenschaften der DNA-Einzelstränge. (Spur K : gesunde Kontrollperson, Spur 1-7: Patient Cx05, Cx42, Cx53, Cx20, Cx09, Cx15, Cx06)

B: Darstellung der SSCA von DNA-Fragment 4. Spur 1 zeigt eine Veränderung der Laufeigenschaften der DNA-Einzelstränge (Spur K : gesunde Kontrollperson, Spur 1-3: Patient Cx14, Cx 16, Cx21).

(*) markiert den aberranten Einzelstrang.

3. Sequenzanalyse

Zur weiteren Analyse des *Connexin 26*-Gens bei den Patienten mit Auffälligkeiten in der Einzelstrangkonnformationsanalyse wurde die Methode der Heterozygotensequenzierung gewählt. Hierfür wurden die zwei PCR-Produkte mit den Primerkombinationen 1f/3r und 3f/6r generiert und in der Folge einer Sequenzreaktion mit dem BigDye Terminator Cycle Sequencing-Kit zugeführt. Bei der Heterozygotensequenzierung werden die zwei Allele gleichzeitig analysiert. Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte sowohl auf dem „forward“- wie auf dem „reverse“-DNA-Strang. Dies sollte sicherstellen, dass bei dem Vorliegen von zwei unterschiedlichen Sequenzveränderungen, keine Sequenzvariante übersehen wird. Im weiteren erfolgte die Analyse zur Bestimmung von Sequenzvarianten im *Connexin 26*-Gen bei 100 gesunden, nicht-verwandten, deutschen Kontrollpersonen, um eine Aussage über die Heterozygotenfrequenz in der deutschen Normalbevölkerung zu erhalten.

3.1 Heterozygotensequenzierung der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gen bei Patienten mit klinischem Verdacht auf genetisch bedingte nicht-syndromale Schwerhörigkeit

Das Ergebnis der Heterozygotensequenzierung zeigte, dass bei 10 von 28 untersuchten Patienten (35,7%) Sequenzvarianten in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gen detektiert werden konnten. Bei 5 dieser Patienten wurden Mutationen gefunden, die als Ursache für die klinische Ausprägung der Hörstörung verantwortlich gemacht werden konnten. 5 weitere Patienten zeigten eine Sequenzvariante, die nicht allein verantwortlich für die phänotypische Ausprägung sein kann. Bei den krankheitsverursachenden Mutationen handelte es sich zum einen in drei Fällen um die homozygote 35delG-Mutation, zum anderen konnten bei zwei Patienten compound-heterozygote Mutationen analysiert werden. In Tabelle 9 ist das Ergebnis der Heterozygotensequenzierung zusammengefasst. In der Folge sollen die aufgefundenen Mutationen im einzelnen vorgestellt werden.

Tab. 9: Zusammenfassende Liste aller detektierten Sequenzvarianten mit und ohne Krankheitswert im *Connexin 26*-Gen aus dem untersuchten Patienten-Kollektiv mit klinischem Verdacht auf genetisch bedingte, nicht-syndromale Schwerhörigkeit.

Art der Mutation	Anzahl der Patienten	Sequenzvariante mit (+) / ohne (-) Krankheitswert	Patienten / Laborkennnummer
homozygot 35delG	3 (30%)	+	Cx5,9,15
35delG/wt	2 (20%)	-	Cx42,53
35delG/101T→C	1 (10%)	+	Cx20
167delt/250G→T	1 (10%)	+	Cx6
380G→A/wt	1 (10%)	?	Cx14
457G→A/wt	2 (20%)	-	Cx16,21

?: Bei dieser Sequenzvariante ist bisher ungeklärt, ob sie für die phänotypische Ausprägung der Erkrankung verantwortlich sein kann, oder ob es sich um einen Polymorphismus handelt.

wt: Wildtypallel

3.1.1 Mutationen im *Connexin 26* Gen bei Patienten mit klinischem Verdacht auf genetisch bedingte nicht-syndromale, sensorineurale Schwerhörigkeit

3.1.1.1 Homozygote 35delG-Mutation

Bei 3 von 28 Patienten (Cx05,Cx09,Cx15) wurde eine homozygote 35delG-Mutation nachgewiesen. Diese Mutation wurde erstmals von Zelante und Mitarbeitern (1997) beschrieben. Es kommt an Position 30-35 der kodierenden Region des Gens zu einer Deletion eines Guanins. Daher wird diese Mutation auch als 30delG bezeichnet. Durch die Deletion eines Guanins in Codon 12 kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens (Frameshift), die im folgenden Codon 13 ein Stop-Codon generiert. Die Mutation liegt in der ersten intrazellulären Domäne des Transmembranproteins. Den Patienten mit einer homozygoten 35delG-Mutation fehlt

somit das gesamte *GJB2*-Proteinprodukt. In Abb. 9 ist exemplarisch die homozygote 35delG-Mutationen dargestellt.

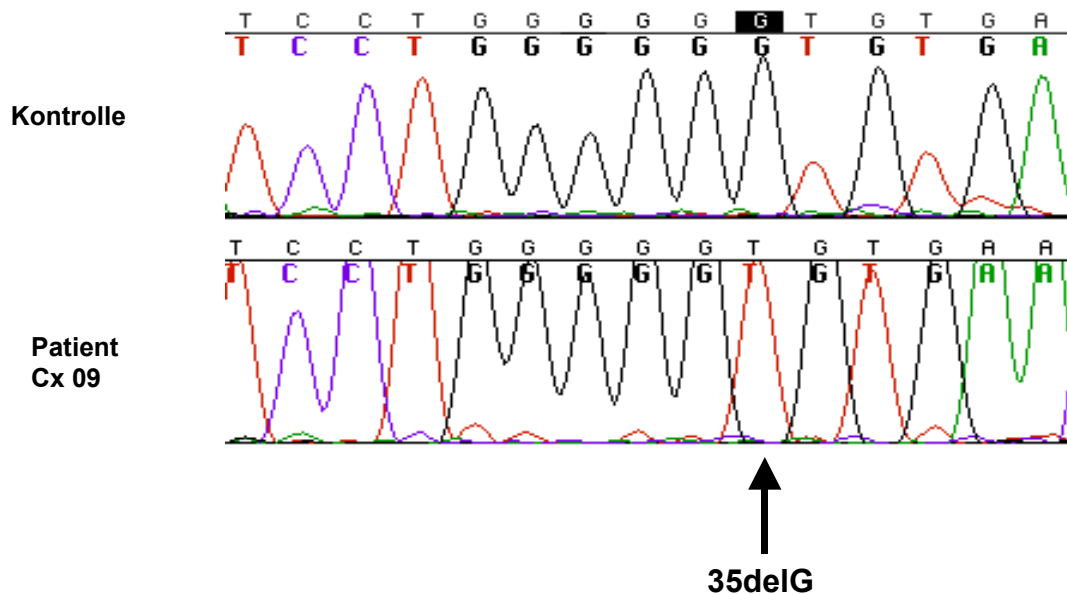


Abb. 9: Darstellung der homozygoten 35delG-Mutation in der Heterozygotensequenzierung.
Kontrolle: gesunde Kontrollperson.
Pfeil: Lokalisation der Deletion eines Guanins an Position 35 der kodierenden Region von *Connexin 26*

3.1.1.2 35delG/101T>C

Bei Patient Cx20 konnte eine compound-heterozygote 35delG/101T→C-Mutation nachgewiesen werden. Bei dieser Mutation lag neben einer 35delG-Mutation auf einem der beiden Allele, eine 101T→C-Basenaustausch auf dem zweiten Allel vor. Dieser Basenaustausch von einem Thymidin zu einem Cytosin an Position 101 führte auf Aminosäureebene zu einem Austausch der Aminosäure Methionin (M) zu Threonin (T) an der Position 34. Dieser Aminosäureaustausch ist in der ersten membranösen Domäne des Transmembranproteins *Connexin 26* lokalisiert. In Abbildung 9 wird diese compound-heterozygote Mutation dargestellt. Leider stand bei diesem Patienten kein Untersuchungsmaterial der Angehörigen zur Verfügung, so dass die Segregation der einzelnen Sequenzveränderungen nicht dargestellt werden konnte.

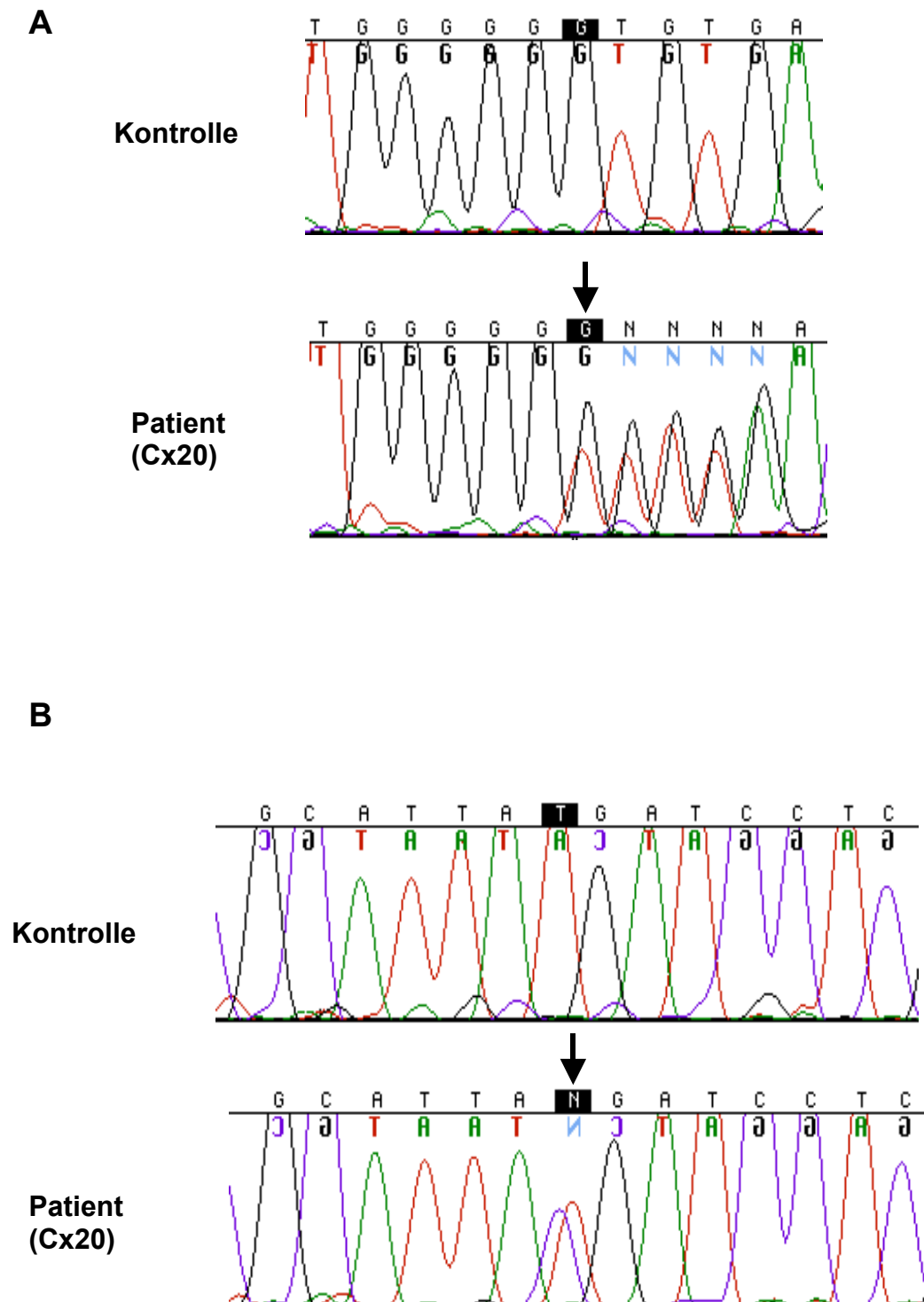


Abb. 10: Darstellung der compound-heterozygoten Mutation 35delG/101T→C bei Patient Cx20.
A: stellt das 35delG-Allel in der forward-Sequenz im Vergleich zur gesunden Kontrolle dar.
B: stellt das 101T→C Allel im Vergleich zur gesunden Kontrolle auf dem Reversen-Strang dar.

3.1.1.3 167delT/250G→T

Mit der Mutation 167delT/250G→T bei Patient Cx06 konnte eine weitere compound-heterozygote Mutation in unserem Patienten-Kollektiv nachgewiesen werden.

Bei der 167delT-Mutation kommt es zu einem Basenverlust an Position 167 der kodierenden Region von *Connexin 26*. Diese Basendeletion führt zu einer vorzeitigen Generierung eines Stop-Codon in Codon 55 (Frameshift). Diese Sequenzveränderung ist in der 1 Extrazellulärdomäne des Proteins lokalisiert.

Bei der Sequenzvariante 250G→T kommt es zu einem Basenaustausch der Base Guanin zu Thymin an Position 250 des kodierenden Region des Genes. Dieser Basenaustausch hat einen Aminosäureaustausch in Codon 84 zur Folge. Hierbei erfolgt ein Austausch der AS Valin zur AS Leucin in der Proteinsequenz. Dieser Austausch ist im Bereich der 2 Transmembran-Domäne lokalisiert.

Bei diesem Patienten konnten die nicht betroffenen Eltern auf Sequenzveränderungen im *Connexin 26*-Gen untersucht werden. Das Allel mit der 167delT-Mutation segregierte von der Mutter (Cx08) zum Patienten. Das Allel mit der 250G→T-Variante des *Connexin 26*-Gens erhielt der Patient vom Vater (Cx09). Die Mutation des Patienten, sowie die heterozygoten Sequenzvarianten der Eltern des Patienten, sind neben dem Stammbaum der Familie in Abb. 11 dargestellt.

3.1.2 Heterozygote Sequenzvarianten im *Connexin 26*-Gen bei Patienten mit klinischem Verdacht auf genetisch bedingte, nicht-syndromale, sensorineurale Schwerhörigkeit

3.1.2.1 35delG/wt

Bei zwei (Cx42,53) Patienten konnte eine heterozygote 35delG-Mutation detektiert werden, bei denen neben dem mutierten Allel, noch ein gesundes Allel nachgewiesen werden konnte. Diese Mutation führt ursächlich nicht zur phänotypischen Ausprägung der sensorineuralen Hörstörung. Auf die Darstellung dieser heterozygoten Sequenzvariante wurde verzichtet, da diese Sequenzveränderung schon bei Patient Cx 20 gezeigt werden konnte (Abb. 10 A).

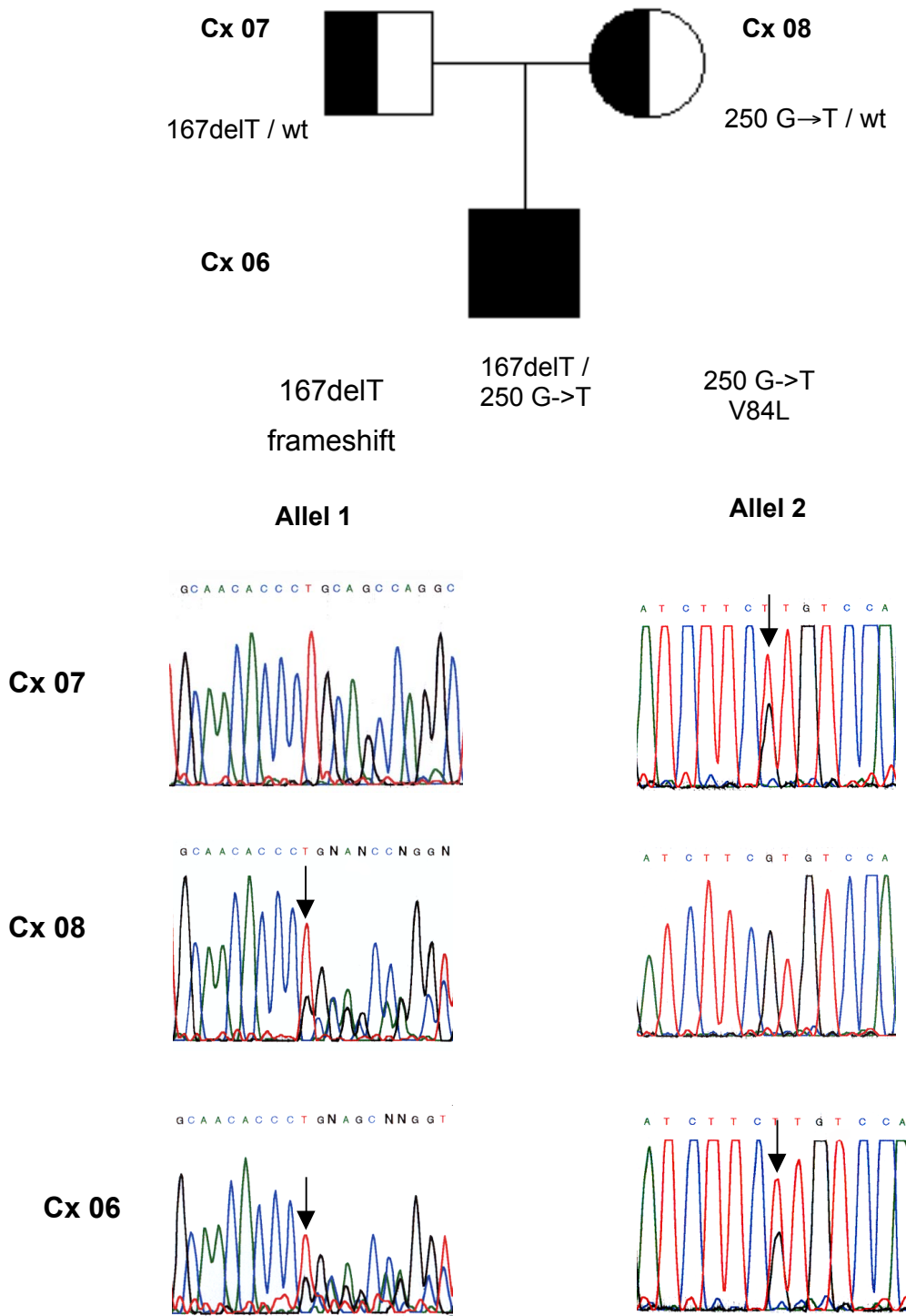


Abb. 11: Darstellung der Segregation des 167delT-Allel (vom Vater: Cx07) und 250GT-Allel (von der Mutter: Cx08) auf Patient Cx06 mit genetisch bedingter nicht-syndromaler, sensorineuraler Schwerhörigkeit.

wt: nicht betroffenes Allel

3.1.2.2 457G→A

Bei 2 Patienten (Cx16, Cx21) wurde ein Basenaustausch 457G→A entdeckt. Hierbei handelt es sich um einen Austausch eines Guanins zu einem Adenin. Durch diesen Basenaustausch an Position 457 der kodierenden Sequenz wird an Position 153 die AS Valin durch die AS Isoleucin ersetzt. Bei dieser Sequenzvariante scheint es sich um eine Sequenzvariante ohne Krankheitswert zu handeln, die in der Literatur als Polymorphismus beschrieben ist (Hilbert et al., personal communication). Lokalisiert ist dieser Bereich in der 3 Transmembrandomäne des *Connexin 26*-Proteins. Eine Darstellung der Sequenzveränderung findet sich in Abb. 12.

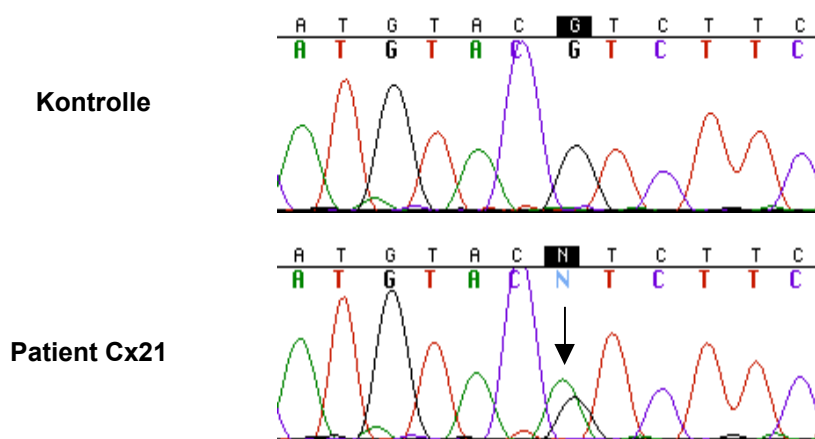


Abb. 12: Darstellung Sequenzvariante 457G→A in der Heterozygotensequenzierung
Kontrolle: gesunde Kontrollperson
Pfeil: Position des Basenaustausches Guanin zu Adenin

3.1.2.3 380G→A

Eine weitere heterozygote Sequenzvariante konnte bei Patient Cx14 detektiert werden. Hierbei handelt es sich um einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin in einem Allel an Position 380 der kodierenden Sequenz von *Connexin 26*. Auf Aminosäureebene kommt es zu einem Austausch von Arginin (R) zu Histidin (H) in Codon 127. Diese Sequenzveränderung und der damit verbundene AS-Austausch ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Da die Eltern des betroffenen Patienten nicht untersucht werden konnten, ist bisher unklar, ob es sich bei diesem Ereignis um eine Sequenzvariante ohne Krankheitswert, oder um eine autosomal-dominante Form der nicht-syndromalen sensorineuralen Schwerhörigkeit handelt. Dieser Aminosäureaustausch ist in der 2 intrazelluläre Domäne des Transmembranproteins lokalisiert. Dargestellt wird diese Sequenzvariante in Abb. 13.

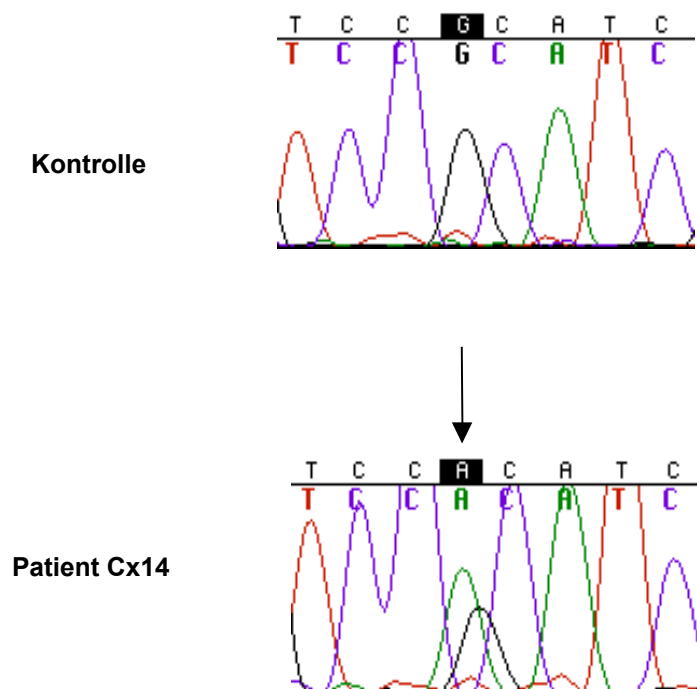


Abb. 13: Darstellung Sequenzvariante 380G→A in der Heterozygotensequenzierung
Kontrolle: gesunde Kontrollperson
Pfeil: Position des Basenaustausches Guanin zu Adenin

Die Lokalisation der detektierten Sequenzvarianten (n=6, bei 10 Patienten) aus dem untersuchten Patientenkollektiv (28 Patienten) sind in Tabelle X zusammenfassend dargestellt. In Abb. 14 ist die Lage der detektierten Mutationen innerhalb der funktionellen Domänen des Transmembranproteins *Connexin 26* schematisch dargestellt.

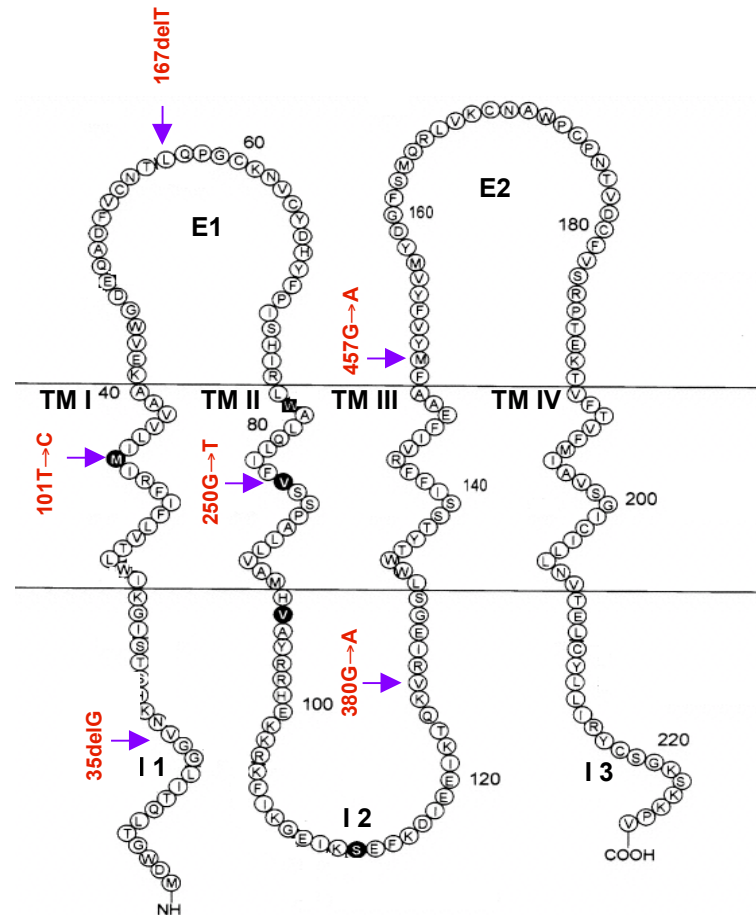


Abb 14: Schematische Darstellung der Lage der detektierten Sequenzvarianten bei Patienten dieser Studie im Protein *Connexin 26*.

TM I-IV :Transmembran-Domäne;
E1-2: Extrazellulär-Domäne;
I1-3: Intrazellulär-Domänen.

3.2 Heterozygotensequenzierung der kodierenden Region von *Connexin 26* bei 100 gesunden, nicht-verwandten, deutschen Kontrollpersonen zur Bestimmung der Heterozygotenfrequenz im *Connexin 26*-Gen

Studien aus jüngster Zeit konnten nachweisen, dass Mutationen im *Connexin 26*-Gen eine der häufigsten Ursachen für die genetisch-bedingte nicht-syndromale Form der Schwerhörigkeit ist. Insbesondere eine einzelne Mutation (homozygote 35delG-Mutation) wurde in den meisten Fällen von rezessiver familiärer, wie auch sporadischer Form der angeborenen Schwerhörigkeit als Ursache bei Kaukasiern verantwortlich gemacht (Gasparini et al., 2000). Weitere Studien wurden in verschiedenen Ländern zur Bestimmung speziell der 35delG-Heterozygotenfrequenz durchgeführt. Auch für Deutschland wurde die Heterozygotenfrequenz mit 1/50 bestimmt. In der vorliegenden Arbeit sollte nicht nur die Heterozygotenfrequenz für die 35delG-Mutation untersucht werden, sondern die gesamte kodierende Region nach Sequenzvarianten abgesucht werden.

Zur Bestimmung der Heterozygotenfrequenz in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gen in der deutschen Bevölkerung, wurde bei 100 gesunden, nicht-verwandten, deutschen männlichen und weiblichen Probanden im Alter zwischen 18 und 60 Jahren die kodierende Region des *Connexin 26*-Gen analysiert. Die 100 Probanden stammten aus dem Kontrollpersonengut, die dem Zentrum für Humangenetik zur Verfügung standen.

Von 100 untersuchten Kontrollpersonen wurde bei insgesamt 7 Probanden (7%) eine Sequenzvariante in der kodierenden Region von *Connexin 26* gefunden. Hierbei wurden bei zwei Probanden eine 35delG-heterozygote-Mutation, in zwei Fällen eine 101T→C-Mutation in einem Allel und bei zwei weiteren Kontrollpersonen eine 457G→A/wt- Sequenzvariante detektiert. Bei einer Kontrollperson konnte eine bisher unbekannte Sequenzvariante in der kodierenden Region von *Connexin 26* analysiert werden. Dabei handelt es sich um einen Basenaustausch von Cytosin zu Thymin an der Position 557 (557C→T). Dadurch kam es zu einem Aminosäureaustausch in Codon 186. Ein Threonin (T: ACG) wurde durch ein Methionin (M: ATG) ersetzt. Diese Veränderung ist in der 2. Extrazellulärdomäne des Transmembranproteins lokalisiert. Diese Sequenzvariation ist in Abbildung 15 dargestellt. Die detektierten Sequenzvarianten bei 100 deutschen, nicht-verwandten, gesunden Kontrollpersonen, sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Lage der Varianten ist in Abb. 14 schematisch dargestellt.

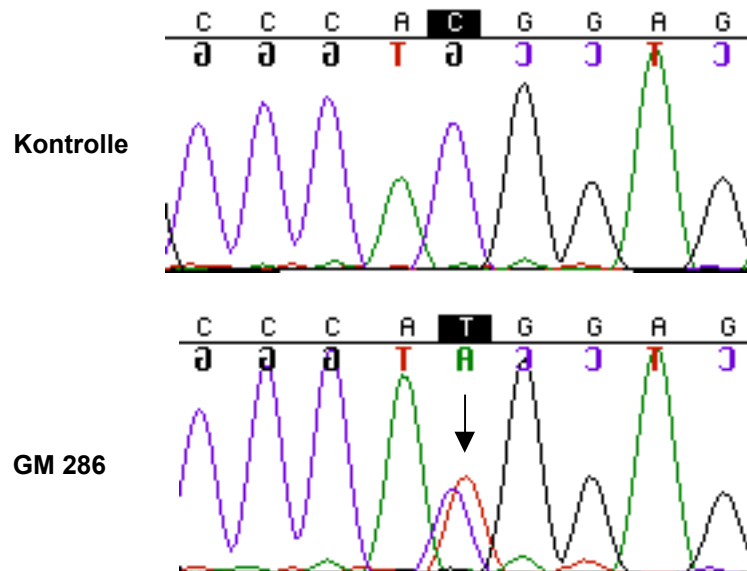


Abb. 15: Darstellung Sequenzvariante 557C→T in der Heterozygotensequenzierung
 Kontrolle: gesunde Kontrollperson
 Pfeil: Position des Basenaustausches Guanin zu Adenin bei Proband GM 286

Tab. 10: Detektierte Sequenzvarianten im *Connexin 26*-Gen bei 100 gesunden, nicht-verwandten, deutschen Probanden. In Klammern ist die Häufigkeit in Prozent dargestellt.

Sequenzvarianten	Anzahl der beobachteten Fälle
35delG/wt	2 (2%)
101T→C	2 (2%)
457G→A	2 (2%)
557C→T	1 (1%)

4. Genotyp-Phänotyp-Korrelation anhand der audiometrischen Untersuchungsbefunde

Bei allen 28 Personen aus dem Patientenkollektiv lagen audiometrische Untersuchungsbefunde vor, die eine Klassifizierung der Hörstörung ermöglichten. Einen umfassenden Überblick über die audiometrischen Untersuchungsergebnisse der einzelnen Patienten ist in Tab. 16 im Anhang zusammenfassend dokumentiert. In diesem Kapitel wird versucht eine mögliche Korrelation zwischen dem Genotyp und dem klinischen Phänotyp darzustellen.

4.1 Audiometrischen Untersuchungsbefunde bei Patienten ohne *Connexin 26*-Sequenzvarianten

Bei 18 Personen aus dem Patientenkollektiv (64,29%), mit dem klinischen Verdacht auf genetisch bedingte, sensorineurale, nicht-syndromale Schwerhörigkeit, konnten keine Sequenzauffälligkeiten in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens festgestellt werden. In dieser Patientengruppe konnten alle Grade von Hörstörungen (von leichtgradig, bis resthörig, bzw. an Taubheit grenzend) beobachtet werden (Tab. 11). Die audiometrischen Untersuchungsergebnisse der einzelnen Patienten sind, getrennt nach dem Befund für das linke Ohr und das rechte Ohr, in Abb. 16 C dargestellt.

Tab. 11: Überblick über die Verteilung der verschiedenen Grade der Hörstörungen bei Patienten ohne Auffälligkeiten in der kodierenden Region von *Connexin 26*.

Ausprägungsgrad der Schwerhörigkeit	Anzahl der Patienten	Prozentsatz (auf 18 Patienten)
leichtgradig	1/18	(5,56%)
mittelgradig	7/18	(38,89%)
mittelgradig-hochgradig	1/18	(5,56%)
hochgradig	5/18	(27,78%)
resthörig	4/18	(14,29%)

4.2 Audiometrische Untersuchungsbefunde bei Patienten mit Sequenzvarianten im *Connexin 26*-Gen

Bei 10 von 28 untersuchten Patienten (35,71%) mit klinischem Verdacht auf genetisch-bedingte, nicht-syndromale, sensorineurale Schwerhörigkeit konnten Mutationen, bzw. Sequenzvarianten ohne Krankheitswert in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens gefunden werden.

4.2.1 Audiometrische Untersuchungsbefunde bei Patienten mit Mutationen in *Connexin 26*

Bei 5 von 10 Patienten mit Sequenzvarianten konnten Mutationen in der kodierenden Region von *Connexin 26* detektiert werden. Bei drei dieser Mutationen handelte es sich um die homozygoten 35delG-Mutationen. Bei zwei weiteren Patienten konnte jeweils eine compound-heterozygote Mutation (167delT/250G>T bzw. 35delG/101T>C) als Ursache für die Ausprägung der Hörstörung festgestellt werden. Bei dieser Patientengruppe konnten mittelgradige bis an Taubheit grenzenden Hörverluste festgestellt werden. Anhand der audiometrischen Daten scheint eine Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad der Hörstörung und der Art der Mutation zu bestehen. So zeigen Patienten mit einer homozygoten 35delG-Mutation einen weitaus höheren Hörverlust im Gegensatz zu Patienten mit compound-heterozygoten Mutationen. Diese mögliche Korrelation muss aber durch größere Untersuchungszahlen noch erläutert werden. Die Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Kategorien der beobachteten Hörstörungen bei Patienten mit Mutationen in der kodierenden Region von *Connexin 26*. Die audiometrischen Untersuchungsbefunde sind in Abb. 16 dargestellt

Tab. 12: Ausprägungsgrad der Schwerhörigkeit bei Patienten mit Mutationen im kodierenden Bereich von *Connexin 26*

Ausprägungsgrad der Hörstörung	35delG		compound-heterozygot	
	Anzahl der Patienten	Prozent	Anzahl der Patienten	Prozent
mittelgradig			1/2	50%
hochgradig	1/3	33,3%	1/2	50%
resthörig	2/3	66,6%		

4.2.2 Audiometrische Untersuchungsergebnisse bei Patienten mit heterozygoten Sequenzvarianten in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gen

Bei 5 von 10 Patienten konnten heterozygote Sequenzvarianten in der kodierenden Region von *Connexin 26* detektiert werden, die alleine nicht für die phänotypische Ausprägung der Hörstörung verantwortlich gemacht werden können. Bei diesen heterozygoten Sequenzvarianten handelt es sich bei zwei Patienten um eine heterozygote 35delG-Mutation, bei weiteren zwei Patienten um eine 457G→A-Sequenzvariante. Bei einem Patienten konnte die bisher unbekannte Sequenzvariante 380G→A detektiert werden. Die Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Kategorien der beobachteten Hörstörungen bei Patienten mit Sequenzvarianten in der kodierenden Region von *Connexin 26*, die ursächlich nicht alleine mit den bei den Patienten vorhandenen Hörstörungen assoziiert werden können.

Tab. 13: Ausprägungsgrad der Schwerhörigkeit bei Patienten mit heterozygoten Sequenzvarianten im kodierenden Bereich von *Connexin 26*

Ausprägungsgrad der Hörstörung	Anzahl der untersuchten Fälle
leicht-mittelgradig	1/5
mittelgradig	4/5

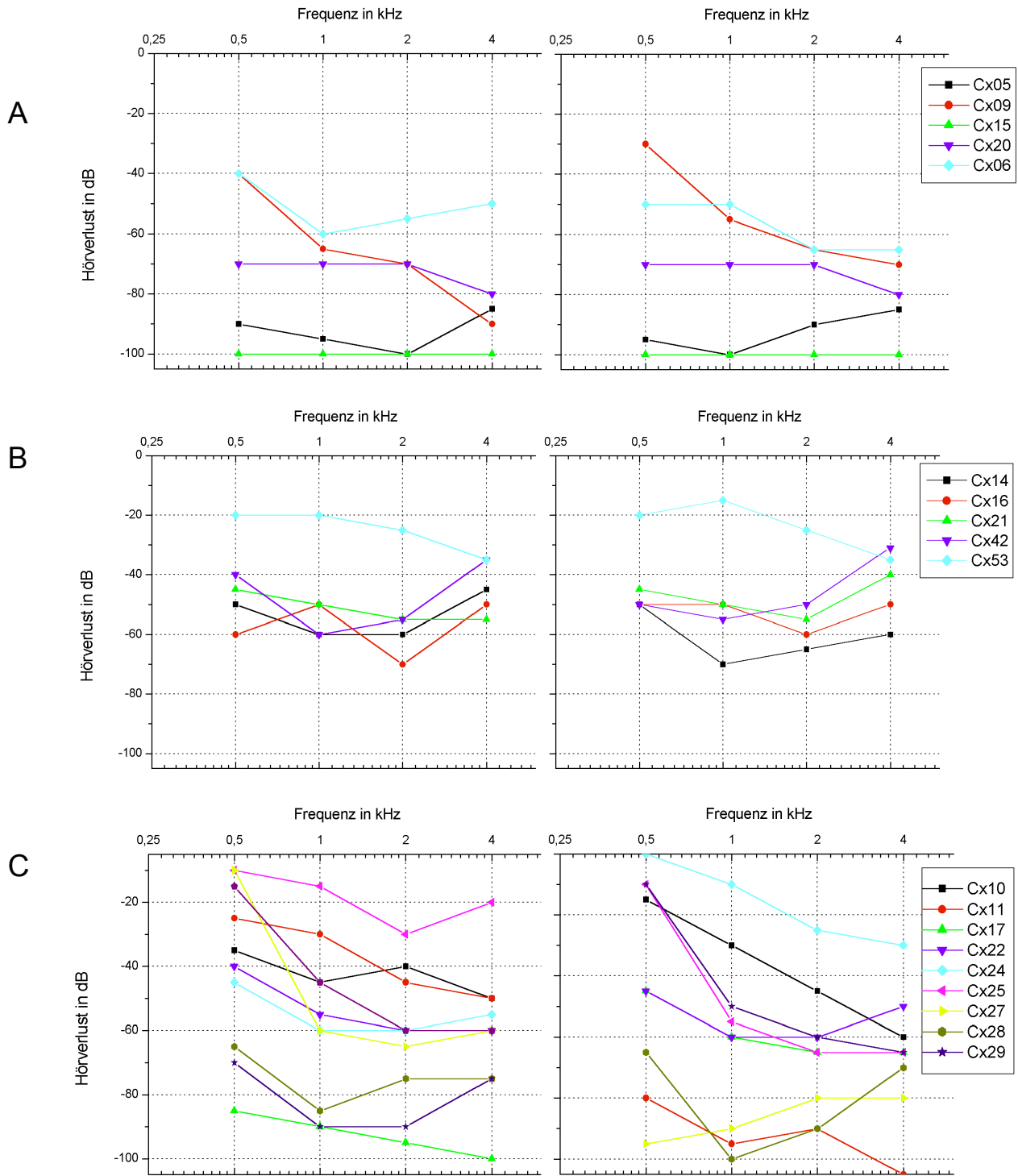


Abb. 16: Audiometrische Befunde der Patienten mit Verdacht auf genetisch-bedingte sensorinuereale Schwerhörigkeit.
A: Audiometrische Befunde bei Patienten mit krankheitsverursachenden Mutationen im *Connexin 26*-Gen.
B: Audiometrische Befunde bei Patienten mit heterozygoten Sequenzvarianten im *Connexin 26*-Gen.
C: Audiometrische Befunde bei Patienten ohne Sequenzvarianten im *Connexin 26*-Gen (9 Audiometriebefunde).

5. Zusammenfassende Auswertung der molekulargenetisch erhobenen Untersuchungsdaten

In Tabelle 14 sind die molekulargenetisch erhobenen Untersuchungsergebnisse für das untersuchte Patientenkollektiv, wie für das untersuchte deutsche Kontrollkollektiv, getrennt nach detektierter Sequenzvariante, dargestellt. Es wird die Verteilung der detektierten Sequenzvarianten innerhalb der vorstellbaren Genotypen für die Sequenzvarianten dargestellt, um eine Vergleichbarkeit der erhobenen Untersuchungsdaten innerhalb der untersuchten Probandenkollektive zu vereinfachen.

Bezeichnung der Mutation auf Nukleotidebene	Beschreibung der Mutation auf Aminosäureebene	Genotypen					
		Patienten (n=28)			Kontrollpersonen (n=100)		
35delG	Frameshift	+/+	3/28	(10,71%)	+/+	0/100	(0%)
		+/-	3/28	(10,71%)	+/-	2/100	(2%)
		-/-	22/28	(78,58%)	-/-	98/100	(98%)
101T>C	M34T	+/+	0/28	(0%)	+/+	0/100	(0%)
		+/-	1/28	(3,57%)	+/-	2/100	(2%)
		-/-	27/28	(96,43%)	-/-	98/100	(98%)
167delT	Frameshift	+/+	0/28	(0%)	+/+	0/100	(0%)
		+/-	1/28	(3,57%)	+/-	0/100	(0%)
		-/-	27/28	(96,43%)	-/-	100/100	(100%)
250G>T	V84L	+/+	0/28	(0%)	+/+	0/100	(0%)
		+/-	1/28	(3,57%)	+/-	0/100	(0%)
		-/-	27/28	(96,43%)	-/-	100/100	(0%)
380G>A	R127H	+/+	0/28	(0%)	+/+	0/100	(0%)
		+/-	1/28	(3,57%)	+/-	0/100	(0%)
		-/-	27/28	(96,43%)	-/-	100/100	(100%)
457G>A	V153I	+/+	0/28	(0%)	+/+	0/100	(0%)
		+/-	2/28	(7,14%)	+/-	2/100	(2%)
		-/-	26/28	(92,86%)	-/-	98/100	(98%)
557C>T	M186T	+/+	0/28	(0%)	+/+	0/100	(0%)
		+/-	0/28	(0%)	+/-	1/100	(1%)
		-/-	28/28	(100%)	-/-	99/100	(99%)

Tab. 14: Detektierte Sequenzvarianten bei den 28 untersuchten Patienten und 100 Kontrollpersonen in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gen. Gezeigt wird die Aufteilung der untersuchten Patienten und Kontrollpersonen auf die möglichen Genotypen, bezogen auf die Sequenzvarianten.

+/+ : betroffen
 +/- : heterozygot gesund
 -/- : gesund

In Tabelle 15 ist die Allelverteilung der detektierten Sequenzvarianten in der kodierenden Region von *Connexin 26* im Patientenkollektiv, der Allelverteilung im gesunden, deutschen Kontrollkollektiv gegenübergestellt.

Bezeichnung der Sequenzvariante	Umschreibung der Sequenzvariante	Patienten	Kontrollkollektiv
35delG	Frameshift	9/56 (16,07%)	2/200 (1%)
101T>C	M34T	1/56 (1,79%)	2/200 (1%)
167delT	Frameshift	1/56 (1,79%)	0/200 (0%)
250G>T	V84L	1/56 (1,79%)	0/200 (0%)
380G>A	R127H	1/56 (1,79%)	0/200 (0%)
457G>A	V153I	2/56 (3,57%)	2/200 (1%)
557C>T	M186T	0/56 (0%)	1/200 (0,5%)

Tab. 15: Darstellung der Allelverteilung, der in der Untersuchung detektierten Sequenzvarianten im Patientenkollektiv (28 Personen, entspricht 56 untersuchte Allele) und im Kontrollpersonenkollektiv (100 Personen, entspricht 200 untersuchte Allele).

V. Diskussion

Ätiologie der Hörstörungen

Hörstörungen sind klinisch, wie ätiologisch gesehen eine sehr heterogene Erkrankungsgruppe (Keats und Berlin, 1999; Pfister 1998). Unter statistischen Aspekten betrachtet, kommen weltweit 0,5 bis ein Kind auf 1000 Lebendgeborene mit einer congenitalen Hörstörung zur Welt (Gasparini et al., 2000; Kalatzis und Petit, 1998; Keats und Berlin, 1999; Kelsell et al., 1997; Lench et al., 1998; Murgia et al., 1999; Mc Guirt und Smith, 1999; Morell et al., 1998). Für die USA bedeutet das beispielsweise, dass täglich etwa 33 betroffene Kinder mit congenitalen Hörstörungen geboren werden (ASHA: American Speech-Language Hearing Association, 1999). Diese Zahlen verdeutlichen, dass diese angeborene Erkrankungsform zu den häufigsten, entwicklungsbedingten Fehlbildungen gehört.

Schätzungsweise 50-60% der congenitalen Hörstörungen können, nach Ausschluss anderer zur Auslösung der Krankheit verantwortlicher Faktoren, genetisch bedingt sein. Nicht-genetische Faktoren können z. B. perinatale Komplikationen oder fetale Infektionen sein (z.B. Mumps, Toxoplasmose, Röteln, Cytomegalie), (Kalatzis und Petit, 1998; Keats und Berlin, 1999; Murgia et al., 2000; Morell et al., 1998; Rabionet et al., 2000; Cohen und Gorlin, 1995).

Bei den genetisch-bedingten Hörstörungen werden die syndromalen, von den nicht-syndromalen Formen der Schwerhörigkeit unterschieden (Rabionet et al., 2000; Scott et al., 1998; Sobe et al., 2000; Denoyelle et al., 1998; Steel, 1999). Ca. 20-30% der genetisch bedingten Schwerhörigkeiten zählen zu den syndromalen Formen der Hörstörungen, bei denen neben dem Symptom der Schwerhörigkeit noch weitere klinische Symptome vorliegen, die weitere Organsysteme betreffen (Kalatzis und Petit, 1998; Denoyelle et al., 1998; Keats und Berlin, 1999). Bisher sind mehr als hundert Syndrome beschrieben, bei denen die Schwerhörigkeit eine klinische Komponente des Syndroms darstellt (Skvorak et al., 1999; Kalatzis und Petit, 1998). Die verbleibenden 70-80% der genetisch bedingten Hörstörungen gehören zu den nicht-syndromalen Formen. Diese können autosomal-rezessiv (DFNB), autosomal-dominant (DFNA), X-chromosomal (DFN) und mitochondrial vererbt werden (MINSB) (Kalatzis und Petit, 1998; Keats und Berlin, 1999).

Eines der Hauptgene, dessen Gendefekte zur Ausprägung einer nicht-syndromalen, sensorineuralen Hörstörung führen können, ist das *Connexin 26*-Gen. Dieses Gen als eine Kandidatengenregion für nicht-syndromale, sensorineurale Schwerhörigkeit wurde mittels Kopplungsanalyse auf dem langen Arm des Chromosom 13 (13q11-12) lokalisiert (Guilford et al., 1994). Die Klonierung und Aufklärung der Genstruktur gelang Kiang et al. (1997). Die genomische Strukturanalyse von *Connexin 26* ergab, dass das Gen aus zwei Exons (Exon 1: 160bp, Exon 2: 681bp) und einem 3149 bp großen Intron besteht (Kiang et al., 1997). Die kodierende Region befindet sich in Exon 2 (681 bp) und kodiert für ein Protein mit 227 Aminosäuren. Es handelt sich dabei um das „Gap-Junction-Protein- β -2“ (GJB2). Dieses GJB2-Protein ist unter anderem im Bereich des Corti'schen Organes der Hörschnecke des menschlichen Ohres an der Ausbildung von Transmembrankanälen beteiligt. Expressionsstudien konnten zeigen, dass *Connexin-26* zwischen äußeren Haarzellen und umgebenden Zellen in der Stria vascularis des Corti'schen Organs, lokalisiert ist (Lautermann et al., 1998). Es wird vermutet, dass das Protein einen maßgeblichen Einfluß an der Generierung von cochleären Aktionspotentialen hat, da dieser Vorgang hauptsächlich über eine Verschiebung von Kaliumionen aus der cochleären Endolymphe in die äußeren Haarzellen der Stria vascularis gewährleistet wird.

In Zusammenhang mit nicht-syndromalen, autosomal-rezessiv vererbten Hörstörungen wurde *Connexin 26* durch den Nachweis von Mutationen in zwei betroffenen Familien gebracht (Kelsell et al., 1997). Bisher sind eine Vielzahl von Untersuchungen weltweit bei betroffenen Patienten im *Connexin 26*-Gen durchgeführt worden. Diese Studien konnten zeigen, dass bei ca. 60% der Patienten Mutationen innerhalb dieses Gens mit der Ausprägung einer nicht-syndromalen, sensorineuralen Schwerhörigkeit assoziiert sind. Dies entspricht einem Anteil von bis zu 20% aller prälingual auftretenden Hörstörungen (Wilcox et al., 2000). Damit scheinen Mutationen im *Connexin 26*-Gen eine maßgebliche Rolle im Kontext der genetisch bedingten Schwerhörigkeit zu spielen.

Bisher konnten über 50 verschiedene Mutationen im *Connexin 26*-Gen analysiert werden. Von diesen Mutationen folgen 48 einer autosomal-rezessiven Vererbung. Im Einzelnen handelt es sich um 17 „Frameshift-Mutationen“, 9 „Nonsense-“ und 21 „Missensemutationen“. Ausserdem konnte eine „Splicesite-Variante“ detektiert werden. Diese Mutationen sind über die gesamte Genregion von *Connexin 26* verteilt.

Neben den autosomal-rezessiven Mutationen sind bisher 5 weitere Mutationen beschrieben, die einem autosomal-dominanten Erbgang folgen. Von diesen Mutationen sind 4 in der Extrazellulärdomäne 1 (EC1) und eine Mutation in der Transmembrandomäne 1 (TM1) lokalisiert. Neben den mit dem klinischen Bild einhergehenden Mutationen werden 8 Polymorphismen ohne Krankheitswert beschrieben. Darüberhinaus sind 4 Sequenzvarianten bekannt, bei denen die Auswirkung auf das klinische Bild noch nicht geklärt werden konnte. Die bisher bekannten Sequenzvarianten in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens sind im Anhang zusammenfassend dargestellt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer molekularen Diagnostik und Analyse der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens bei einem Patientenkollektiv (n=28). Die Patienten im Alter zwischen 0-18 Jahren, mit klinischem Verdacht auf nicht-syndromale, sensorineurale Hörstörung, wurden durch die Klinik für Pädaudiologie und Phoniatrie rekrutiert. Bei dem untersuchten Patientenkollektiv handelt es sich um 15 männliche und 13 weibliche Probanden. Neben 22 deutschen, gehörte ein pakistanischer und 5 türkische Probanden zum untersuchten Kollektiv. Die Patienten innerhalb des Kollektives wiesen einen „mittelgradigen“, bis „an Taubheit grenzenden“ Hörverlust auf.

Zu Beginn der Arbeit erfolgte eine Etablierung von PCR-Reaktionen mit 6 verschiedenen Oligonukleotidpaaren, die die kodierende Region von *Connexin 26* und angrenzende Sequenzabschnitte im 5'- bzw. 3'-Bereich des Gens abdeckten. Um ein effizientes und umfassendes Mutationsscreening innerhalb eines großen Patientenkollektives durchzuführen, kann auf verschiedenen Labormethoden zurückgegriffen werden. Hierbei muss methodisch grundsätzlich zwischen zwei möglichen Verfahrensweisen unterschieden werden. Die eine Möglichkeit besteht in der Sequenzanalyse von definierten DNA-Fragmenten. Eine andere Möglichkeit besteht in der Auftrennung von DNA-Fragmenten in Polyacrylamidgelen (PAA). Diese kann z. B. über die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE), die Heteroduplexanalyse (HA) und die Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCA) erreicht werden. Diese Methoden basieren auf Elektrophoreseverfahren, bei denen über ein abweichendes Migrationsverhalten der DNA-Fragmente Sequenzveränderungen detektiert werden können (Grompe 1993).

Hierbei erreicht die DGGE eine hohe Sensitivität, erfordert jedoch eine zeitaufwendige Etablierung der Methode (Myers et al., 1987).

Der Optimierungsaufwand der HA ist zwar geringer, die Methode erreicht dabei jedoch eine geringere Sensitivität, die ca. 80% betragen kann (White et al., 1992; Prosser 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde die SSCA zur Mutationsanalyse bei Patienten mit nicht-syndromaler, sensorineuraler Hörstörung gewählt. Die SSCA verbindet einen geringen Etablierungs- und Arbeitsaufwand mit einer ca. 95%igen Sensitivität der Methode (Sheffield et al., 1993). DNA-Fragmente mit einem auffälligen Migrationsverhalten wurden anschließend mit Hilfe der Heterozygotensequenzierung analysiert, um die verantwortliche Sequenzvariante zu detektieren.

Durch Variation der Elektrophoresebedingungen der Einzelstrangkonnformationsanalyse, gewährleistet über Variation der Konzentration des Polyacrylamidgeles (10% bzw. 12%) und der Umgebungstemperatur (10°C, 15°C und 20°C), wurde versucht, die Sensitivität der Methode zu maximieren. Die Größe der untersuchten PCR-Fragmente lag zwischen 120-280bp, in Einklang mit der aus der Literatur angegebenen optimalen Fragmentlänge zwischen 100-300 bp (Sheffield et al., 1993). Als Standardanalysebedingungen wurden ein 12%-PAA-Gel bei einer Trenntemperatur von 20°C gewählt.

Bei diesen Analysebedingungen konnten 4 Sequenzvarianten in dem untersuchten Patientenkollektiv nachgewiesen werden. In der sich anschließenden Sequenzanalyse konnten 3 homozygote 35delG-Mutationen und eine heterozygote Sequenzvariante (380G→A) diagnostiziert werden.

In der nachfolgenden Sequenzanalyse der kodierenden Region von *Connexin 26* bei dem Patientenkollektiv (n=28), konnten hingegen bei 10 Patienten Sequenzauffälligkeiten detektiert werden. Der Vergleich dieser beiden Untersuchungsergebnisse erbrachte, dass trotz der Optimierungsversuche nur eine 40%ige Sensitivität für die SSCA erreicht werden konnte. Der Grund hierfür könnte sein, dass insbesondere bei GC-reichen DNA-Fragmenten, Sequenzvarianten nicht zu einer Konformationsänderung des DNA-Einzelstranges führen und dabei nicht durch ein verändertes Migrationsverhalten dargestellt werden können.

Unter Berücksichtigung der notwendigen Sequenzierung bei einem veränderten Migrationsverhalten der DNA-Fragmente in der SSCA und der Tatsache, dass nur eine geringe Sensitivität der Methode erreicht werden konnte, wurden die aufgereinigten PCR-Produkte der untersuchten Patienten und der Kontrollgruppe einer sofortigen Sequenzanalyse unterzogen. Die Heterozygotensequenzierung,

unter Umgehung der SSCA, führte zur Reduktion der notwendigen Arbeitsschritte und der verwendeten Arbeitszeit, die benötigt wurden, um eine Sequenzvariante zu detektieren. Diese methodischen Schwierigkeiten wurden auch von anderen Arbeitsgruppen erkannt. Dementsprechend findet man eine Vielzahl von Arbeiten, in denen über eine Direktsequenzierung berichtet wird (Abe et al., 1999; Brobby et al., 1998; Casademont et al., 2000; Denoyelle et al., 1997, 1998 und 1999; Estivill et al., 1998; Gasparini et al., 2000; Kelsell et al., 1997; Kelley et al., 1998; Rabionet et al., 2000; Sobe et al., 2000; Scott et al., 1998; Wilcox et al., 1999).

Im Zusammenhang der methodischen Ansätze zur Untersuchung von Sequenzvarianten, sind zwei weitere Detektionsmethoden zu nennen, die angewandt wurden: die Allelspezifische-Oligonucleotid-Hybridisierung nach PCR-Amplifikation (Antoniadi et al., 1999; Gasparini et al., 2000; Rabionet und Estivill 1999) und der Restriktionsverdau nach PCR-Amplifikation (Storm et al., 1999). Beide Methoden zielen auf die Detektion von definierten Mutationen. Da in der vorliegenden Arbeit die gesamte kodierende Region und nicht nur eine definierte Mutation in dem Patientenkollektiv untersucht werden sollte, kamen diese beiden methodischen Ansätze nicht zur Anwendung.

Molekulargenetische Analyse im *Connexin 26* Gen

Patienten mit Sequenzvarianten in *Connexin 26*

Die bei 5 von 28 Patienten diagnostizierten Mutationen können als krankheitsverursachende Sequenzveränderungen im *Connexin 26*-Gen klassifiziert werden. Bei drei der 5 Mutationen handelt es sich um homozygot vorliegende 35delG-Mutationen. Bei dieser Sequenzvariante handelt es sich um einen Verlust einer Guanin Base an der Position 30-35 der kodierenden Region des Gens, der zur vorzeitigen Generierung eines Stop-Codons in Codon 13 des Proteins führt (Frameshift-Mutation). Es resultiert daraus ein verkürztes und damit funktionsloses 12-Aminosäure-Polypeptid, statt eines 227 Aminosäure-Connexin 26-Proteins (Cohn und Kelley, 2000).

Bei den beiden anderen diagnostizierten, krankheitsverursachenden Mutationen handelt es sich um sogenannte „compound-heterozygot“ vorliegende Mutationen, die ebenfalls zur Ausprägung der Hörstörung führen können. Hierbei zeigte ein Patient eine 167delT/250G→T, der zweite Patient eine 35delG/101T→C Mutation.

Die 35delG/101T→C-Sequenzvariante konnte bereits von Wilcox et al. (2000) als krankheitsverursachende Mutation beschrieben werden. Die in dieser Arbeit beschriebene 167delT/250G→T Mutation hingegen ist bisher unbekannt. Wie in Abb. IV.11 gezeigt werden konnte, segregierten die betroffenen Allele jeweils von den heterozygoten Eltern an das betroffene Kind, bei dem sie zur Ausprägung der nicht-syndromalen, sensorineuralen Hörstörung führten.

Insgesamt konnten bei 18% der Patienten in der vorliegenden Untersuchung krankheitsverursachende Mutationen detektiert werden. Untersuchungen in anderen Patientenkollektiven ergaben eine weitaus höhere Detektionsrate (bis zu 60%) (Green et al., 1999; Kelley et al., 1998; Murgia et al., 1999; Lench et al., 1998; Rabionet et al., 2000; Sobe et al., 2000). Dies könnte u.a. darauf zurückzuführen sein, dass bei diesen Untersuchungen klinisch-anamnestisch strengere Einschlusskriterien zur Auswahl der Patienten angelegt wurden.

Neben Patienten mit krankheitsverursachenden Mutationen konnten bei 5 der untersuchten Fälle heterozygote Sequenzvarianten detektiert werden. Dabei handelte es sich um Mutationen, die nur ein Allel betreffen und somit nicht alleine für die Ausprägung des Phänotypes verantwortlich gemacht werden können. Dabei zeigten 2 von 28 untersuchten Personen eine heterozygote 35delG-Mutation

(35delG/wt). Bei zwei weiteren Patienten konnte die Sequenzvariante 457G→A und bei einem weiteren Probanden wurde die Sequenzvariante 380G→A auf einem Allel des Gens detektiert.

Ähnliche Häufigkeiten für heterozygote *Connexin 26* Sequenzvarianten wurden von Wilcox et al. (2000) und Sobe et al. (2000) beschrieben. In diesen Studien konnten bei bis zu 12% der untersuchten Patienten mit sensorineuralen Hörstörungen, heterozygote Sequenzvarianten im *Connexin 26*-Gen diagnostiziert werden.

Da anzunehmen ist, dass es sich bei den meisten Schwerhörigkeiten, die durch Mutationen im *Connexin 26*-Gen ausgelöst werden um autosomal-rezessive Erkrankungen handelt, bleibt die Frage nach der Ätiologie der Erkrankung bei diesen 5 Patienten ungeklärt. Eine mögliche Ursache für die Ausprägung des Phänotypes wäre durch eine weitere Mutationen in nicht-kodierenden Bereichen des *Connexin 26*-Gens bei den betroffenen Patienten zu suchen. Hierfür kämen z.B. Mutationen in genregulierenden Abschnitten im 5`- bzw. 3`-Bereich des *Connexin 26*-Gens (Promotor- bzw. Enhancer-Bereiche) in Betracht. Es könnte sich bei den Hörstörungen der 5 Patienten jedoch auch um heterogen-bedingte Erkrankungen handeln, bei denen eine weitere Mutation in einem anderen Gen, wie z.B. der Connexin-Genfamilie vorliegt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass materno-fetale Infektionen, intrauteriner oder perinataler Art, bzw. klinisch versteckt abgelaufene Infektionen frühkindlicher Art, die anamnestisch nicht erfasst werden konnten, zur Entstehung der sensorineuralen Hörstörung bei den 5 betroffenen Patienten geführt haben.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse erbrachten, dass 9 der 15 diagnostizierten Allele mit Sequenzvarianten bei den untersuchten Patienten 35delG-Allele waren. Diese Mutation scheint eine besondere Rolle im Kontext der nicht-syndromalen, sensorineuralen Schwerhörigkeit zu spielen. Diese Region innerhalb des *Connexin 26* Gens, die aus einer 6-fachen Wiederholung der Base Guanin besteht, wird in einem überproportional hohen Maß von Deletionen betroffen und stellt somit einen sogenannten Mutationshotspot dar. Sie wird bei bis zu 60% der mutierten *Connexin 26*-Allele bei Patienten mit autosomal-rezessiven bzw. sporadisch auftretenden Schwerhörigkeiten detektiert (Abe et al., 2000; Antoniadis et al., 1999; Denoyelle et al., 1997,1999; Cohn et al., 1999 Cohn et al., 1999, 2000; Zelante et al., 1997; Carraquillo et al., 1997; Lench et al., 1998). Die homozygot vorliegende 35delG-Mutation zählt zu den häufigsten Ursachen für nicht-syndromale,

sensorineurale Schwerhörigkeit in Europa. Weltweit besagen Schätzungen, dass bis zu 10% aller diagnostizierten kindlichen Hörstörungen durch diese Mutation verursacht werden. Das bedeutet, dass bis zu 20% aller genetisch bedingten Schwerhörigkeiten insgesamt durch die homozygote 35delG-Mutation verursacht sein können (Kelley et al., 1998). Damit hat die 35delG-Mutation von *Connexin 26* eine vergleichbare Häufigkeit wie das $\Delta F508$ -Allel im *CFTR*-Gen, das zur Ausprägung der Mukoviszidose führt (Denoyelle et al., 1999; Cohn und Kelley, 2000). Diese Zahlen können auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Die compound-heterozygot vorliegende Sequenzvariante 35delG/101T→C, die in dieser Arbeit bei einem Patienten diagnostiziert werden konnte, zeigt auf einem Allel eine 35delG-Sequenzvariante. Auf dem zweiten Allel konnte eine 101T→C-Sequenzvariante nachgewiesen werden. Wilcox und Mitarbeiter konnten diese Mutation mit Krankheitswert bei einem Patienten mit genetisch-bedingter, nicht-syndromaler, sensorineuraler Hörstörung nachweisen (Wilcox et al., 2000). Die 101T→C-Sequenzvariante führt auf Proteinebene zu einem Aminosäureaustausch an der Position 34 von Methionin zu Threonin (M34T). Diese Missense-Mutation, konnte erstmals von Kelley et al. (1997) bei Patienten amerikanischer Abstammung nachgewiesen werden, und wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert.

So wird diese heterozygote Mutation (M34T/wt) bei einer Familie als Ursache für eine autosomal-dominante Form der Hörstörung beschrieben (Kelsell et al., 1997).

In einer anderen betroffenen Familie führt diese heterozygote Sequenzvariante zur Ausprägung eines autosomal-rezessiv vererbten Phänotypes, da von dem nicht-betroffenen Vater das 101T→C Allel an seinen betroffenen Sohn segregierte (101T→C/283G-A) (Kelley et al., 1998). Scott et al. (1998) hingegen definierten die M34T-Sequenzvariante als Polymorphismus, da diese Sequenzvariante auch in einer gesunden, amerikanischen Kontrollpopulation nachgewiesen werden konnte. Das Vorkommen eines 101T→C-Allels bei nur einem Patienten in dieser Arbeit mit einer krankheitsverursachenden Mutationen in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens, neben einem 35delG-Allel, lässt den Schluss zu, dass es sich bei dieser Sequenzvariante um eine autosomal-rezessive Mutation handeln könnte. Diese Hypothese wird darüberhinaus durch die hier durchgeführten Untersuchungen innerhalb der deutschen Normalbevölkerung unterstützt. Bei 2 von 100 gesunden Probanden konnte diese Sequenzvariante diagnostiziert werden.

Ausserhalb Europas lassen sich verschiedenen Sequenzvarianten im *Connexin 26*-Gen nachweisen, die in Europa nur selten diagnostiziert werden. So konnte z.B. in Japan die 235delC-Sequenzvariante in 73% der mutierten Allele nachgewiesen werden (Abe et al., 1999). Morell et al., 1998 konnten in einer amerikanischen Population von Ashkenazi-Juden eine Häufigkeit von 80% für die 167delT-Sequenzvariante nachweisen. In der israelischen Bevölkerung hingegen konnte dieses Allel nur bei 40% der untersuchten und betroffenen Allele diagnostiziert werden (Sobe et al., 2000). Untersuchungen in der ghanesischen Bevölkerung ergaben, dass ein weiteres Allel (143C-T) in 29% der veränderten Allele bei den untersuchten Patienten mutiert war (Broby et al., 1998). Diese populationsspezifischen Mutationen geben einen möglichen Hinweis auf einen sogenannten „Founder-Effekt“. Auf diesen wird im folgenden Abschnitt noch näher eingegangen.

Heterozygotenfrequenz und Founder-Effekt

Um die Häufigkeit von heterozygoten Genträgern für *Connexin 26*-Sequenzvarianten innerhalb der gesunden, deutschen Bevölkerung zu bestimmen, wurden 100 gesunde, deutsche männliche und weibliche Probanden im Alter zwischen 18-60 Jahren auf Veränderungen in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens untersucht. Insgesamt konnten dabei 7 heterozygot vorliegende Sequenzveränderungen detektiert werden. Dies entspricht einer Heterozygotenhäufigkeit von 7%. Umgerechnet auf die sequenzierten Allele, bedeutet das, dass 7 von 200 untersuchten Allelen, Sequenzvarianten im *Connexin 26*-Gen aufzeigten, was auf die Allele betrachtet einer Häufigkeit von 3,5% entspricht. In anderen Populationen konnten vergleichbare Häufigkeiten für Sequenzvarianten in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens ermittelt werden, die ebenfalls bis zu 7% betragen (Green et al., 1999; Kelley et al., 1998; Scott et al., 1998).

Bei der vorliegenden Untersuchung konnten zwei heterozygote 35delG-Mutationen detektiert werden. Dies entspricht einer Häufigkeit von 1:50 für diese Sequenzvariante innerhalb der deutschen Normalbevölkerung. Diese Untersuchungsergebnisse entsprechen dem Ergebnis eines Untersucherkonsortiums um Gasparini aus dem Jahr 2000 für die deutsche Bevölkerung. Gasparini et al. (2000) konnte zeigen, dass in Bezug auf die Heterozygotenfrequenz für die 35delG-

Mutation in den verschiedenen europäischen Kontrollgruppen ein Nord-Süd-Gefälle besteht. Das Untersucherkonsortium konnte eine zunehmende Häufigkeit der heterozygoten 35delG-Sequenzvariante von 1:79 in Nordeuropa, auf 1:35 in Südeuropa ermitteln (siehe Tab. 16). Andere Untersucherguppen konnten innerhalb europäischer und amerikanischer Populationen, kaukasischer Herkunft, vergleichbare Zahlen von bis zu 4% Heterozygotenhäufigkeit für die 35delG-Mutation ermitteln (Estivill et al., 1998; Morell et al., 1998; Kelley et al., 1998; Green et al., 1999; Scott et al., 1998; Storm et al., 1999).

Bezüglich des Nord-Süd-Gefälles, das in Hinblick auf die Heterozygotenhäufigkeit der 35delG-Sequenzvariante, mit einer Häufigkeitszunahme von Nordeuropa nach Südeuropa, mit Maximalwerten für den mediterranen Mittelmeerraum beobachtet wird, gibt es in der Literatur mehrere Erklärungsmodelle: Zum einen könnte ein Selektionsvorteil für die betroffenen Personen mit dem mutierten 35delG-Allel, in den betroffenen Regionen (Südeuropa) existieren. Dies ist zum Beispiel auch im Falle der Sichelzellanämie (β -Thalassämie) für mediterrane Populationen beschrieben. Hierbei haben heterozygote Genträger gegenüber der normalen Population einen Selektionsvorteil bei Infektion mit *Plasmodium falciparum* (Malaria). Die auftretenden heterozygoten Sequenzvarianten sind dabei populationsspezifisch. (Strachan et al., 1999)

Als weiteren möglichen Faktor, für die unterschiedlich Heterozygotenfrequenzen des mutierten 35delG-Allels in der europäischen Population, wird das Auftreten eines sogenannten „Founder-Effektes“ in Betracht gezogen.

Als „Founder-Effekt“ bezeichnet man das Verteilungsergebnis eines Allels, das innerhalb einer geographisch oder/und soziokulturell-bedingt isolierten Population über Generationen verteilt wird. Aus diesem Verteilungseffekt entsteht innerhalb dieser isolierten Population, im Vergleich mit anderen Populationen, eine höhere Heterozygotenfrequenz.

Infolge der so entstandenen hohen Heterozygotenfrequenz innerhalb dieser Population, kommt es zu einer überdurchschnittlich häufigen Ausprägung autosomal-rezessiv vererbter Erkrankungen. Dies führt in geographisch isolierten Populationen zu hohen Erkrankungszahlen wie z. B. bei einer Form der palmoplantaren Hyperkeratosis (Mal de Meleda) auf der Insel Meleda vor der kroatischen Küste (Strachan et al., 1999). Haplotypanalysen von Carrasquillo und Morell (1997)

konnten jedoch zeigen, dass die 35delG-Mutation nicht Ergebnis eines „Founders“ sein kann, sondern mehrfach, unabhängig voneinander entstanden sein muss.

Ein Zusammenspiel dieser verschiedenen Ursachen innerhalb der kaukasischen Population, die zu der hohen Heterozygotenhäufigkeit der 35delG-Sequenzvariante führen, scheint der wahrscheinlichste Lösungsansatz dieser Problematik zu sein.

Darüberhinaus deutet die geringe Häufigkeit der heterozygoten 35delG-Mutation in Südostasien auf ihren genetischen Ursprung in Europa, bzw. im mittleren Osten hin (Gasparini et al., 2000, Abe et al., 1999). Die Häufigkeiten der 35delG-Mutation in den verschiedenen Populationen sind in der Tab. 16 zusammenfassend dargestellt.

Ausser der 35delG-Mutation konnten weitere heterozygote Mutationen bei den untersuchten Probanden aus der gesunden, deutschen Bevölkerung detektiert werden. Neben dem von Hilbert et al. (P.C.) bereits beschriebenen Polymorphismus ohne Krankheitswert 457G→A, konnte eine bisher unbekannte Mutation bei einer Person detektiert werden. Dabei handelte es sich um eine 557C→T Missense-Mutation. Diese Sequenzvariante könnte eine autosomal-rezessive Mutation, ein Polymorphismus oder eine autosomal-dominante Mutation, mit Ausprägung eines klinisch sehr milden Phänotypes, in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens sein. Eine abschließende Bewertung dieser Sequenzvariante kann nicht erfolgen, da weder audiologische Untersuchungsbefunde des Probanden, noch Untersuchungsdaten der Angehörigen bekannt sind. Klärung könnte die Detektion einer weiteren 557C→T-Sequenzvariante bei einem betroffenen Patienten bringen, die dann Aufschluss über die Segregation des mutierten Allels und den oder die zu erwartenden Phänotypen bringen könnte.

Tab. 16: Heterozygotenverteilung des 35delG-Allels in diversen Subpopulationen, geordnet nach Kontinenten

Land	Diagnostizierte 35delG-Allele, bezogen auf untersuchte Personen	Heterozygotenfrequenz	Referenz
Europa			
Dänemark	2/95	1/47,5	Gasparini, 2000
Norwegen	1/190	1/190	Gasparini, 2000
Estland	5/113	1/22,5	Gasparini, 2000
England	0/119	0/119	Gasparini, 2000
Deutschland	4/200	1/50	Gasparini, 2000
Deutschland	2/100	1/50	Eigene Daten
Belgien	9/360	1/40	Storm et al., 1999
Belgien	1/190	1/190	Gasparini, 2000
Holland	2/89	1/44,5	Gasparini, 2000
Frankreich	1/200	1/200	Gasparini, 2000
Tschechien	4/195	1/48,7	Gasparini, 2000
Slowenien	1/182	1/182	Gasparini, 2000
Bulgarien	1/157	1/157	Gasparini, 2000
Portugal	4/179	1/45	Gasparini, 2000
Spanien	5/200	1/40	Gasparini, 2000
Italien	8/255	1/32	Gasparini, 2000
Italien und Spanien	9/280	1/31	Estivill et al., 1998
Griechenland	14/395	1/28	Antoniadi et al., 1999
Griechenland	12/400	1/33	Gasparini, 2000
Malta	4/144	1/36	Gasparini, 2000
Türkei	4/150	1/37,5	Gasparini, 2000
Nordamerika			
Ashkenazi-Juden	4/551	1/138	Morell et al., 1998
Schwarzamerikaner	0/173	0/50	Morell et al., 1998
am. Asiaten	0/53	0/50	Morell et al., 1998
Am. kaukasischer Herkunft	1/173	1/173	Morell et al., 1998
weisse Amerikaner	14/560	1/40	Green et al., 1999
weisse Amerikaner	1/100	1/100	Scott et al., 1998
weisse Amerikaner	2/96	1/48	Kelley et al., 1998
Asien			
Japan	0/96	0/50	Abe et al., 2000
Diverse			
Kaukasier	0/119	0/50	Denovelle et al. 1997

Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Homozygote und Compound-heterozygote Mutationen in der kodierenden Region von *Connexin 26* führen zum klinischen Bild der nicht-syndromalen, sensorineuralen Hörstörung. Dabei kann der Ausprägungsgrad der Hörstörung sehr variabel sein und von „leicht-mittelgradig“ bis an „Taubheit grenzend“ klassifiziert werden (Murgia et al. 1999). Dies führte zu der Überlegung, ob eine Genotyp-Phänotyp Korrelation bei den betroffenen Patienten möglich ist.

Bei den 5 Patienten mit Mutationen im *Connexin 26*-Gen hatten 20%(1/5) einen „leicht-mittelgradigen“ Hörverlust, 40%(2/5) einen „mittelgradigen“ bis „hochgradigen“ Hörverlust und 40%(2/5) einen „an Taubheit grenzenden“ Hörverlust. Interessanterweise zeigen die Patienten mit einer homozygoten 35delG-Mutation eine ausgeprägte Variabilität in ihrem Hörverlust. So zeigte 1 Patient einen „mittel-hochgradigen“ Hörverlust. Bei zwei weitere Patienten mit einer homozygoten 35delG-Mutation konnten „an Taubheit grenzende“ Hörverluste festgestellt werden. Wie zuvor dargestellt wird bei dieser Mutation kein funktionstüchtiges Protein gebildet. Der variable Hörverlust ist physiologisch nicht erklärbar. Eine Möglichkeit könnte sein, dass andere Mitglieder der Connexin-Familie unter bestimmten Voraussetzungen die Funktion von *Connexin 26* partiell übernehmen könnten. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Beobachtung, dass ein sogenannter „Modifier“ (DFNM1) vorliegende Mutationen in *Connexin 26* kompensieren und somit einen positiven Effekt auf homozygot Betroffene ausübt (Riazuddin et al. 2000). Weiterhin ist zu diskutieren, ob Umweltfaktoren, wie z. B. Lärmbelastung additiv, oder synergistisch bei *Connexin 26*-Mutation zur Modifikation der Ausprägung der Hörstörung beitragen können.

Eine Tendenz zur akzentuierten Hochtenschwerhörigkeit, wie ihn eine Gruppe um Wilcox et al. (2000) bei Patienten mit *Connexin 26*-Sequenzvarianten, diagnostizieren konnte, kann mittels der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden.

In der vorliegenden Untersuchung konnte bei den untersuchten Patienten mit krankheitsverursachenden Mutationen in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens keine Progressivität der ausgeprägten Hörstörung beobachtet werden, da lediglich die audiologischen Untersuchungsergebnisse der einzelnen Patienten vor Therapiebeginn berücksichtigt wurden. Eine Aussage über die Frage der Progredienz des ausgeprägten Phänotypes ist nur mittels einer Folgeuntersuchungs-

reihe (follow-up) bei den Patienten mit Mutationen in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens in der Zukunft zu klären.

Die Variation der klinisch ausgeprägten Hörstörung bei Patienten mit homozygoter 35delG-Mutation in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens innerhalb einer Familie, wie von Murgia et al. (1999) und Wilcox et al. (2000) beschrieben, konnte in der vorliegenden Untersuchung auf Grund fehlendem Untersuchungsmaterial der Angehörigen nicht untersucht werden.

Bei den 5 Patienten mit heterozygoten Mutationen konnte ein „mittelgradiger“ Hörverlust diagnostiziert werden. Dabei zeigte sich, dass keine Differenzierungsmöglichkeit von Patienten mit krankheitsverursachenden *Connexin 26*-Mutationen und dieser Gruppe möglich ist. Selbst Patienten, die keine Mutation in *Connexin 26* aufwiesen, zeigten in ihren Audiogrammbefunden eine sehr hohe Variabilität des Phänotypes auf. Daraus lässt sich schließen, dass eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation für Patienten mit krankheitsverursachenden Mutationen zur Zeit nicht möglich ist. Weitere molekulargenetische und physiologische, wie pathophysiologische Untersuchungen, die die komplexen Zusammenhänge bei der Entwicklung des Innenohres und die Physiologie des Hörvorganges besser verstehen lernen, werden es vielleicht in der Zukunft möglich machen, diese Fragen zu beantworten.

Für die verbleibenden 18 Patienten, bei denen keine Sequenzvarianten in der kodierenden Region des *Connexin 26*-Gens nachgewiesen werden konnten, müssen weitere Analysen von anderen bekannten Genen, die den Phänotyp der nicht-syndromalen Schwerhörigkeit verursachen können, durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei autosomal-rezessiven, nicht-syndromalen, sensorineuralen Hörstörungen mit mindestens mittelgradigem Hörverlust eine Molekulardiagnostik im *Connexin 26*-Gen gerechtfertigt ist.

VI. Ausblick

Beeinträchtigungen des Hörens, im Sinn einer Hörstörung oder Taubheit, sind der häufigste, diagnostizierte, sensorische Defekt des Menschen (Deetjen und Speckmann, 1992). Die Auswirkungen dieses Defektes können für den betroffenen Patienten, das persönliche Umfeld und die umgebende Gesellschaft sehr bedeutsam sein. Je stärker und früher die Erkrankung ausgeprägt ist, desto schwerer wirken sich die Folgen auf Sprachentwicklung und Sprachvermögen des betroffenen Patienten aus (Ptok, 1997). Für die Gesellschaft stellen die verschiedenen Formen der Hörstörungen ein volkswirtschaftliches Problem dar. In den Vereinigten Staaten von Amerika wird schätzungsweise ein Betrag in Höhe von 50 Mrd. \$US pro Jahr für die Versorgung und Therapie der Volkserkrankung Hörstörung ausgegeben (ASHA, 1999). Der Leidensdruck der betroffenen Patienten und der finanzielle Aufwand stellt ein Indiz dafür dar, wie wichtig es für die Patienten, die behandelnden Ärzte und das Gesundheitswesen ist, Fortschritte in der Erkenntnis der Pathophysiologie des Hörens zu machen, um in der Zukunft noch effektivere Therapiestrategien entwickeln zu können. Insbesondere der molekulargenetischen Forschung ist es in den letzten Jahren zu verdanken, dass gravierende Fortschritte, ermöglicht durch Verbesserungen im Bereich der Genlokalisierung, Genidentifikation und DNA-Sequenzierung, im Themenkomplex der hereditären Hörstörungen, gemacht wurden. Die Einführung des Neugeborenenhörscreenings ermöglicht schon jetzt die Diagnosestellung von angeborenen Hörstörungen. In den nächsten Jahren wird, aufgrund des rasanten Fortschrittes, die Möglichkeit der Durchführung von Untersuchungen an größeren Kollektiven, nach Ausschluss aller anderen, möglichen Ursachen der angeborenen Hörstörung, auf genetisch-bedingte Schwerhörigkeit, über die Neuentwicklung und Verbesserung der DNA-Chiptechnologie, möglich sein. Die darüber gewonnene Diagnose kann dann die notwendige Therapieeinleitung ermöglichen, bevor es zu Defiziten in der Sprachentwicklung der betroffenen Kinder kommen kann.

Veränderungen im *Connexin 26*-Gen können für bis zu 60% aller sensorineuralen, genetisch-bedingten, autosomal-rezessiv-vererbten, nicht-syndromalen Hörstörungen verantwortlich gemacht werden (Kelley et al., 1998). Die Hörstörungen, die durch Sequenzvarianten im *Connexin 26*-Gen verursacht werden können, sind eine klinisch gesehen sehr heterogene Erkrankungsgruppe, die von „leichtgradigen“ bis „an Taubheit grenzende“ Hörstörungen umfassen kann (Murgia et al., 1999). Diese

bisher unübersichtliche Palette an klinisch ausgeprägten Phänotypen, rechtfertigt auch in näherer Zukunft die Untersuchung von Patienten mit dem klinischen Verdacht auf genetisch-bedingte, nicht-syndromale Schwerhörigkeit, auf Veränderungen im *Connexin 26*-Gen. Insbesondere ist eine Untersuchung von Patienten mit „*leichtgradigen*“ Hörstörungen zu fordern, um zu sehen, welchen Stellenwert Veränderungen im *Connexin 26*-Gen in diesem Patientenkollektiv haben. Von sehr grosser Bedeutung ist auch die bisher unbeantwortete Frage, ob die durch *Connexin 26*-Mutation hervorgerufene Hörstörung eine progressiv-fortschreitende Erkrankung ist, oder, ob es sich um einen konstant ausgeprägten Phänotyp handelt. Diese Frage kann nur mittels Folgeuntersuchungsreihen der Patienten mit diagnostizierten *Connexin 26*-Mutationen geklärt werden. Die profunde Kenntnis dieser Zusammenhänge könnte in Zukunft bedeuten, dass Patienten, mit Hörstörungen, bedingt durch Gendefekte, deren Genprodukte eine zentrale Rolle in der Kaliumhomöostase des Innenohres spielen, unter Umständen mit Hilfe von Pharmaka therapiert werden können, die modulierend in den Kaliumhaushalt des Innenohres eingreifen könnten (Kubisch et al., 2000). Abgesehen von diesen pharmakologisch möglichen Therapiemöglichkeiten, stehen schon heute andere, sehr effektive Therapieoptionen, invasiver oder nicht-invasiver Natur, zur Verfügung. Dazu zählen Cochleaimplantate, wie immer funktionellere und für den Patienten komfortablere Hörgeräte. Die zukünftig mögliche Modifikation und Weiterentwicklung dieser heute schon existenten Therapiemöglichkeiten, könnte über noch detailliertere Kenntnisse in der Pathophysiologie und Molekulargenetik des Hörvorganges und der Hörstörungen gewährleistet sein. Dieser Fortschritt könnte dann auch detaillierte Aussagen bezüglich der möglichen ausgeprägten Phänotypen ermöglichen. Damit wäre dann eine umfassende humangenetische Beratung der betroffenen Patienten, bzw. deren Familie, bezüglich der zu erwartenden Ausprägungsform und Progressivität der Hörstörung möglich.

VII. Abkürzungen

A	Adenin
Acc. No.	Identifikationsnummer der Genbank
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ASHA	American society of hearing association
bds	beidseits
bdest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Cx26	Connexin 26
dB	Dezibel
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DGGE	Denaturierende Gradientengelelektrophorese
dNTP	2`-Didesoxyribonukleosid-5`-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAEP	früh-akustisch-evozierte-Potentiale
G	Guanin
GJA	gap-junction-protein der α -Klasse
GJB	gap-junction-protein der β -Klasse
GJB2	gap-junction-protein- β 2
HA	Heteroduplexanalyse
ICD	international classification of diseases
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Mb	Megabase
mRNA	messenger-RNA
OR	odds ratio
o.p.B.	ohne pathologischen Befund
PAA	Polyacrylamid

PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	sporadisch
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SSCA	Einzelstrangkonnformationsanalyse
T	Thymin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UTR	untranslatierte Region
w/v	Gewicht pro Volumen

VIII. Literaturverzeichnis

- Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ (2000) Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet* 37: 41-3
- Antoniadi T, Gronskov K, Sand A, Pampanos A, Brondum-Nielsen K, Petersen MB (2000) Mutation analysis of the GJB2 (connexin 26) gene by DGGE in Greek patients with sensorineural deafness. *Hum Mutat* 16: 7-12
- Antoniadi T, Rabionet R, Kroupis C, Aperis GA, Economides J, Petmezakis J, Economou-Petersen E, Estivill X, Petersen MB (1999) High prevalence in the Greek population of the 35delG mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness [letter]. *Clin Genet* 55: 381-2
- Avraham KB (1997) Deafness. Sounds from the cochlea [news]. *Nature* 390: 559-60
- Brobby GW, Muller-Myhsok B, Horstmann RD (1998) Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa [letter]. *N Engl J Med* 338: 548-50
- Bruzzone R, White TW, Paul DL (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238: 1-27
- Bruzzone R, White TW, Scherer SS, Fischbeck KH, Paul DL (1994) Null mutations of connexin32 in patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron* 13: 1253-60
- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991a) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48: 137-44
- Budowle B, Giusti AM, Wayne JS, Baechtel FS, Fourney RM, Adams DE, Presley LA, Deadman HA, Monson KL (1991b) Fixed-bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci, for use in forensic comparisons [see comments]. *Am J Hum Genet* 48: 841-55
- Budowle B, Wilson MR, DiZinno JA, Stauffer C, Fasano MA, Holland MM, Monson KL (1999) Mitochondrial DNA regions HV1 and HVII population data. *Forensic Sci Int* 103: 23-35
- Carrasquillo MM, Zlotogora J, Barges S, Chakravarti A (1997) Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Hum Mol Genet* 6: 2163-72
- Cohen MM, Jr., Gorlin RJ, Clark R, Ewing SG, Camfield PR (1993) Multiple circumferential skin folds and other anomalies: a problem in syndrome delineation. *Clin Dysmorphol* 2: 39-46
- Cohn ES, Kelley PM (1999) Clinical phenotype and mutations in connexin 26 (DFNB1/GJB2), the most common cause of childhood hearing loss. *Am J Med Genet* 89: 130-6

- Cohn ES, Kelley PM, Fowler TW, Gorga MP, Lefkowitz DM, Kuehn HJ, Schaefer GB, Gobar LS, Hahn FJ, Harris DJ, Kimberling WJ (1999) Clinical studies of families with hearing loss attributable to mutations in the connexin 26 gene (GJB2/DFNB1) [see comments]. *Pediatrics* 103: 546-50
- Denoyelle F, Lina-Granade G, Plauchu H, Bruzzone R, Chaib H, Levi-Acobas F, Weil D, Petit C (1998) Connexin 26 gene linked to a dominant deafness [letter]. *Nature* 393: 319-20
- Denoyelle F, Marlin S, Petit C, Garabedian EN (2000) [Hereditary sensorineural deafness]. *Rev Prat* 50: 146-9
- Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabedian EN, Petit C (1999) Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 353: 1298-303
- Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl HH, Middleton A, Houseman MJ, Dode C, Marlin S, Boulila-ElGaied A, Grati M, Ayadi H, BenArab S, Bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M, Loiselet J, El-Zir E, Audois A, Joannard A, Petit C, et al. (1997) Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum Mol Genet* 6: 2173-7
- Dermietzel R (1998) Gap junction wiring: a 'new' principle in cell-to-cell communication in the nervous system? *Brain Res Brain Res Rev* 26: 176-83
- Dermietzel R, Farooq M, Kessler JA, Althaus H, Hertzberg EL, Spray DC (1997) Oligodendrocytes express gap junction proteins connexin32 and connexin45. *Glia* 20: 101-14
- Dermietzel R, Gao Y, Scemes E, Vieira D, Urban M, Kremer M, Bennett MV, Spray DC (2000) Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 45-56
- Dermietzel R, Hertzberg EL, Kessler JA, Spray DC (1991) Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *J Neurosci* 11: 1421-32
- Dermietzel R, Traub O, Hwang TK, Beyer E, Bennett MV, Spray DC, Willecke K (1989) Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 10148-52
- Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, Govea N, Mila M, Zelante L, Gasparini P (1998) Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness [see comments]. *Lancet* 351: 394-8
- Friedman T, Battey J, Kachar B, Riazuddin S, Noben-Trauth K, Griffith A, Wilcox E (2000) Modifier genes of hereditary hearing loss [In Process Citation]. *Curr Opin Neurobiol* 10:487-93

- Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, Sugii A, Hibino H, Kubo T (1999) Three novel connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. *Neuroreport* 10: 1853-7
- Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen K, Metspalu A, Oitmaa E, Pisano M, Fortina P, Zelante L, Estivill X (2000) High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet* 8: 19-23
- Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJ (1999) Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *Jama* 281: 2211-6
- Griffith AJ, Chowdhry AA, Kurima K, Hood LJ, Keats B, Berlin CI, Morell RJ, Friedman TB (2000) Autosomal recessive nonsyndromic neurosensory deafness at DFNB1 not associated with the compound-heterozygous GJB2 (connexin 26) genotype M34T/167delT. *Am J Hum Genet* 67: 745-9
- Griffith AJ, Friedman TB (1999) Making sense out of sound [news; comment]. *Nat Genet* 21: 347-9
- Grompe M (1993) The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet* 5: 111-7
- Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A, Petit C (1994) A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nat Genet* 6: 24-8
- Hacia JG (1999) Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet* 21: 42-7
- Heathcote K, Syrris P, Carter ND, Patton MA (2000) A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis (MIM 148350). *J Med Genet* 37: 50-1
- Holme RH, Steel KP (1999) Genes involved in deafness. *Curr Opin Genet Dev* 9: 309-14
- Kalatzis V, Petit C (1998) The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum Mol Genet* 7: 1589-97
- Keats BJ, Berlin CI (1999) Genomics and hearing impairment. *Genome Res* 9: 7-16
- Kelley PM, Abe S, Askew JW, Smith SD, Usami S, Kimberling WJ (1999) Human connexin 30 (GJB6), a candidate gene for nonsyndromic hearing loss: molecular cloning, tissue-specific expression, and assignment to chromosome 13q12. *Genomics* 62: 172-6
- Kelley PM, Cohn E, Kimberling WJ (2000) Connexin 26: required for normal auditory function. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 184-8

- Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ (1998) Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 62: 792-9
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness [see comments]. *Nature* 387: 80-3
- Kelsell DP, Wilgoss AL, Richard G, Stevens HP, Munro CS, Leigh IM (2000a) Connexin mutations associated with palmoplantar keratoderma and profound deafness in a single family [corrected and republished article originally printed in *Eur J Hum Genet* 2000 Feb;8(2):141-4]. *Eur J Hum Genet* 8: 469-72
- Kelsell DP, Wilgoss AL, Richard G, Stevens HP, Munro CS, Leigh IM (2000b) Connexin mutations associated with palmoplantar keratoderma and profound deafness in a single family [corrected and republished in *Eur J Hum Genet* 2000 Jun;8(6):469-72]. *Eur J Hum Genet* 8: 141-4
- Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH (1997) Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene* 199: 165-71
- Kikuchi T, Adams JC, Paul DL, Kimura RS (1994) Gap junction systems in the rat vestibular labyrinth: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Acta Otolaryngol* 114: 520-8
- Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC (1995) Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol (Berl)* 191: 101-18
- Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC (2000) Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 163-6
- Kudo T, Ikeda K, Kure S, Matsubara Y, Oshima T, Watanabe K, Kawase T, Narisawa K, Takasaka T (2000) Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. *Am J Med Genet* 90: 141-5
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84: 381-8
- Lautermann J, Frank HG, Jahnke K, Traub O, Winterhager E (1999) Developmental expression patterns of connexin26 and -30 in the rat cochlea. *Dev Genet* 25: 306-11
- Lautermann J, ten Cate WJ, Altenhoff P, Grummer R, Traub O, Frank H, Jahnke K, Winterhager E (1998) Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res* 294: 415-20
- Lehnhardt E (1997) The Children Cochlear Implantation Project in Hannover. *Am J Otol* 18: S4-6
- Lench N, Houseman M, Newton V, Van Camp G, Mueller R (1998a) Connexin-26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness [letter] [see comments]. *Lancet* 351: 415

- Lench NJ, Markham AF, Mueller RF, Kelsell DP, Smith RJ, Willems PJ, Schatteman I, Capon H, Van De Heyning PJ, Van Camp G (1998b) A Moroccan family with autosomal recessive sensorineural hearing loss caused by a mutation in the gap junction protein gene connexin 26 (GJB2). *J Med Genet* 35: 151-2
- Martin PE, Coleman SL, Casalotti SO, Forge A, Evans WH (1999) Properties of connexin26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness. *Hum Mol Genet* 8: 2369-76
- Martin PE, George CH, Castro C, Kendall JM, Capel J, Campbell AK, Revilla A, Barrio LC, Evans WH (1998) Assembly of chimeric connexin-aequorin proteins into functional gap junction channels. Reporting intracellular and plasma membrane calcium environments. *J Biol Chem* 273: 1719-26
- Martin PE, Steggles J, Wilson C, Ahmad S, Evans WH (2000) Targeting motifs and functional parameters governing the assembly of connexins into gap junctions. *Biochem J* 349: 281-287
- McGuirt WT, Smith RJ (1999) Connexin 26 as a cause of hereditary hearing loss. *Am J Audiol* 8: 93-100
- Mignon C, Fromaget C, Mattei MG, Gros D, Yamasaki H, Mesnil M (1996) Assignment of connexin 26 (GJB2) and 46 (GJA3) genes to human chromosome 13q11-->q12 and mouse chromosome 14D1-E1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 72: 185-6
- Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB (1998) Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness [see comments]. *N Engl J Med* 339: 1500-5
- Mueller PR, Salser SJ, Wold B (1988) Constitutive and metal-inducible protein:DNA interactions at the mouse metallothionein I promoter examined by in vivo and in vitro footprinting. *Genes Dev* 2: 412-27
- Mueller RF, Nehammer A, Middleton A, Houseman M, Taylor GR, Bitner-Glindzicz M, Van Camp G, Parker M, Young ID, Davis A, Newton VE, Lench NJ (1999) Congenital non-syndromal sensorineural hearing impairment due to connexin 26 gene mutations--molecular and audiological findings. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 50: 3-13
- Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, Arslan E, Zacchello F (1999) Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet* 36: 829-32
- Myers RM, Maniatis T, Lerman LS (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 155: 501-27

- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-9
- Pfister M (1998) [New molecular genetic knowledge on development of hereditary deafness]. *Hno* 46: 782-4
- Ptok M (1997) [Hearing disorders in infants and young children. Possibilities for early diagnosis and therapy]. *Hno* 45: 183-4
- Rabionet R, Gasparini P, Estivill X (2000a) Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins [In Process Citation]. *Hum Mutat* 16: 190-202
- Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, Arbones ML, Gasparini P, Estivill X (2000b) Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet* 106: 40-4
- Richard G (2000) Connexins: a connection with the skin. *Exp Dermatol* 9: 77-96
- Richard G, White TW, Smith LE, Bailey RA, Compton JG, Paul DL, Bale SJ (1998) Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum Genet* 103: 393-9
- Robertson NG, Morton CC (1999) Beginning of a molecular era in hearing and deafness. *Clin Genet* 55: 149-59
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91
- Sambrook J, Gething MJ (1989) Protein structure. Chaperones, paperones [news; comment]. *Nature* 342: 224-5
- Sambrook PN, Champion GD, Browne CD, Cairns D, Cohen ML, Day RO, Graham S, Handel M, Jaworski R, Kempler S, et al. (1989a) Corticosteroid injection for osteoarthritis of the knee: peripatellar compared to intra-articular route. *Clin Exp Rheumatol* 7: 609-13
- Sambrook PN, Cohen ML, Eisman JA, Pocock NA, Champion GD, Yeates MG (1989b) Effects of low dose corticosteroids on bone mass in rheumatoid arthritis: a longitudinal study. *Ann Rheum Dis* 48: 535-8
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7
- Schulte BA, Steel KP (1994) Expression of alpha and beta subunit isoforms of Na,K-ATPase in the mouse inner ear and changes with mutations at the Wv or Sld loci. *Hear Res* 78: 65-76

- Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, Srisailapathy CR, Rosengren SS, Markham AF, Mueller RF, Lench NJ, Van Camp G, Smith RJ, Sheffield VC (1998) Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 11: 387-94
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16: 325-32
- Skvorak Giersch AB, Morton CC (1999) Genetic causes of nonsyndromic hearing loss. *Curr Opin Pediatr* 11: 551-7
- Sobe T, Vreugde S, Shahin H, Berlin M, Davis N, Kanaan M, Yaron Y, Orr-Urtreger A, Frydman M, Shohat M, Avraham KB (2000) The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum Genet* 106: 50-7
- Spicer SS, Schulte BA (1996) The fine structure of spiral ligament cells relates to ion return to the stria and varies with place-frequency. *Hear Res* 100: 80-100
- Van Camp KJ, Shanks JE, Margolis RH (1986) Simulation of pathological high impedance tympanograms. *J Speech Hear Res* 29: 505-14
- Verselis VK, Ginter CS, Bargiello TA (1994) Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature* 368: 348-51
- Willecke K, Hennemann H, Dahl E, Jungbluth S, Heynkes R (1991) The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur J Cell Biol* 56:1-7. White TW (2000) Functional analysis of human Cx26 mutations associated with deafness. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 181-3
- Willecke K, Jungbluth S, Dahl E, Hennemann H, Heynkes R, Grzeschik KH (1990) Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes. *Eur J Cell Biol* 53:275-80.
- White TW, Paul DL, Goodenough DA, Bruzzone R (1995) Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol Biol Cell* 6: 459-70
- Wilcox SA, Osborn AH, Allen-Powell DR, Maw MA, Dahl HH, Gardner RJ (1999) Connexin26 deafness in several interconnected families. *J Med Genet* 36: 383-5
- Wilcox SA, Osborn AH, Dahl HH (2000a) A simple PCR test to detect the common 35delG mutation in the connexin 26 gene. *Mol Diagn* 5: 75-8
- Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, Collins V, Wilcox LJ, McKinlay Gardner RJ, Kamarinos M, Cone-Wesson B, Williamson R, Dahl HH (2000b) High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene. *Hum Genet* 106: 399-405

Wilgenbus KK, Kirkpatrick CJ, Knuechel R, Willecke K, Traub O (1992) Expression of Cx26, Cx32 and Cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int J Cancer* 51: 522-529

Wilgenbus KK, Lichter P (1999) DNA chip technology ante portas. *J Mol Med* 77: 761-8

Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Mila M, Monica MD, Lutfi J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S, Fortina P (1997) Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum Mol Genet* 6: 1605-1609

IX. Anhang

Kasuistik eines Patienten (CX06) mit genetisch-bedingter, nicht-syndromaler, sensorineuraler Schwerhörigkeit

CX06, Patient, männlich, geboren 1991

CX06 wurde erstmals im Alter von 2 Jahren und 8 Monaten mit Verdacht auf Schwerhörigkeit und Sprachentwicklungsverzögerung in der Klinik für Phoniatrie und Pädaudiologie des Medizinischen Zentrums für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Philipps-Universität-Marburg vorgestellt.

Diagnose: -Beidseitige, genetisch bedingte, mittel-hochgradige Schallempfindungsschwerhörigkeit, annähernd pantonaler Ausprägung (**ICD 10:** H90.3)

-Audiogen bedingte Sprachentwicklungsstörung (**ICD 10:** F 80.1)

Therapie: Beidseitige Hörgeräteversorgung

Nach Befragung der Eltern des Patienten handelt es sich bei dem Kind um einen 2-jährigen Jungen mit Zustand nach sekundärer Sectio caesarea bei Geburtsstillstand in der Austreibungsperiode und pathologischem CTG. APGAR- und pH-Werte postnatal nicht bekannt. Einen Monat vor Erstvorstellung, im Alter von 2 Jahren, erfolgte eine Adenotomie und beidseitige Paukendrainage bei nicht altersgemäßer Sprachentwicklung. Die Eltern berichten: *„Vor dem Eingriff sei keine Reaktion auf laute Töne seitens CX06 erfolgt, nach dem Eingriff erfolgte eine geringgradig-einzustufende Reaktion von CX06 auf sehr laute Töne“*.

Bei Befragung der Eltern stellt sich heraus, dass es, weder in der Familie der Mutter, noch in der Familie des Vaters, Hinweise auf eine genetisch-bedingte, sensorineurale Hörstörung gibt.

Der körperliche Untersuchungsbefund erbrachte keine äußerlichen Dismorphiezeichen. Die Ohrmikroskopie und die Spiegelbefunde, die in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde üblicherweise durchgeführt werden, zeigten keine als pathologisch einzustufenden Auffälligkeiten.

Die psychoakustisch-audiometrischen Untersuchungsverfahren erbrachten einen beidseits mittel-hochgradigen, annähernd pantonal ausgeprägten Hörverlust über Luft- und Knochenleitung.

Die objektiv-audiometrischen Untersuchungsverfahren ergaben:

Tympanometrie: beidseits unauffälliger Befund.

Früh Akustisch Evozierte Potenziale (FAEP): Potentialschwelle für Clickreize links 70 dB, rechts 60dB nHL. Ohne Hinweis auf schalleitungsbedingte Hörverlustkomponente im Pegellatenzdiagramm.

CX07, Vater des Patienten, geboren 1962

Bei CX07 handelt es sich um den Vater des Patienten CX06. CX07 gibt bei Befragung an, dass es keinen Hinweis auf genetisch-bedingte Hörstörungen in seiner Familie gäbe. Er selbst könne gut hören und leide unter keiner bekannten Hörstörung. Audiometrisch lassen sich bei Herrn CX07 keine Anzeichen für eine sensorineurale Hörstörung nachweisen.

CX 08, Mutter des Patienten, geboren 1962

Bei CX08 handelt es sich um die Mutter des Patienten CX06. Auch bei ihr gibt es weder familienanamnestisch, noch eigenanamnestisch Hinweise auf eine genetisch-bedingte, nicht-syndromale, sensorineurale Hörstörung. Alle audiometrisch erfassten Untersuchungsbefunde von Frau CX08 stellen sich ohne pathologischen Befund dar.

Fragestellung:

Bei klinisch-anamnestischem Verdacht auf genetisch-bedingte, sporadische, nicht-syndromale, sensorineurale Schwerhörigkeit wurden Mutationsanalysen im Connexin 26-Gen bei dem Patienten CX06 und dessen Eltern CX07 und CX08 durchgeführt.

Molekulargenetischer Befund:

Es wurde eine molekulargenetische Untersuchung des Connexin 26-Gens auf Chromosom 13q11-12 durchgeführt. Die Analyse der kodierenden Region ergab in der Einzelstrangkonnformationsanalyse einen Hinweis auf das Vorliegen von

Sequenzveränderungen im 5`-Bereich des Gens. In der nachfolgenden Sequenzanalyse wurden bei dem Patienten CX06 eine 167delT-Mutation und eine 250G→T-Mutation diagnostiziert. Die molekulargenetische Untersuchung des Connexin 26-Gens der Eltern ergab, dass der Patient CX06 die 167delT-Mutation von der Mutter, bzw. die 250G→T-Mutation vom Vater ererbt hat. Beide Eltern haben einen Heterozygotenstatus für Ihre Mutation und sind damit bei autosomal-rezessivem Erbgang phänotypisch nicht betroffen. Der „compound-heterozygote“ Status des Patienten hingegen führt mit großer Wahrscheinlichkeit zur Ausprägung einer genetisch-bedingten, nicht-syndromalen, autosomal-rezessiv-vererbten, sensorineuralen Hörstörung.

Bewertung:

Die Untersuchung der kodierenden Region von Connexin 26 in der Heterozygotensequenzierung ergab den Hinweis auf eine Compound-Heterozygotie für die Mutation 167delT/250G→T. Diese Mutationen in zwei Allelen sind in ihrer Summe für die Ausprägung der autosomal-rezessiven Form der Schallempfindungsschwerhörigkeit verantwortlich. Da es sich bei dieser Hörstörung um eine erbliche Erkrankung handelt, wird den Eltern des Patienten eine humangenetische Beratung angeboten, da sie jeweils Träger einer heterozygoten autosomal-rezessiv-vererbten Mutation im Connexin 26-Gen sind. Dem Patienten selbst wird selbstverständlich bei beginnender Familienplanung eine humangenetische Beratung nahegelegt. Den Stammbaum der Familie und die molekulargenetisch erhobenen Untersuchungsbefunde sind in Abb. 17 dargestellt.

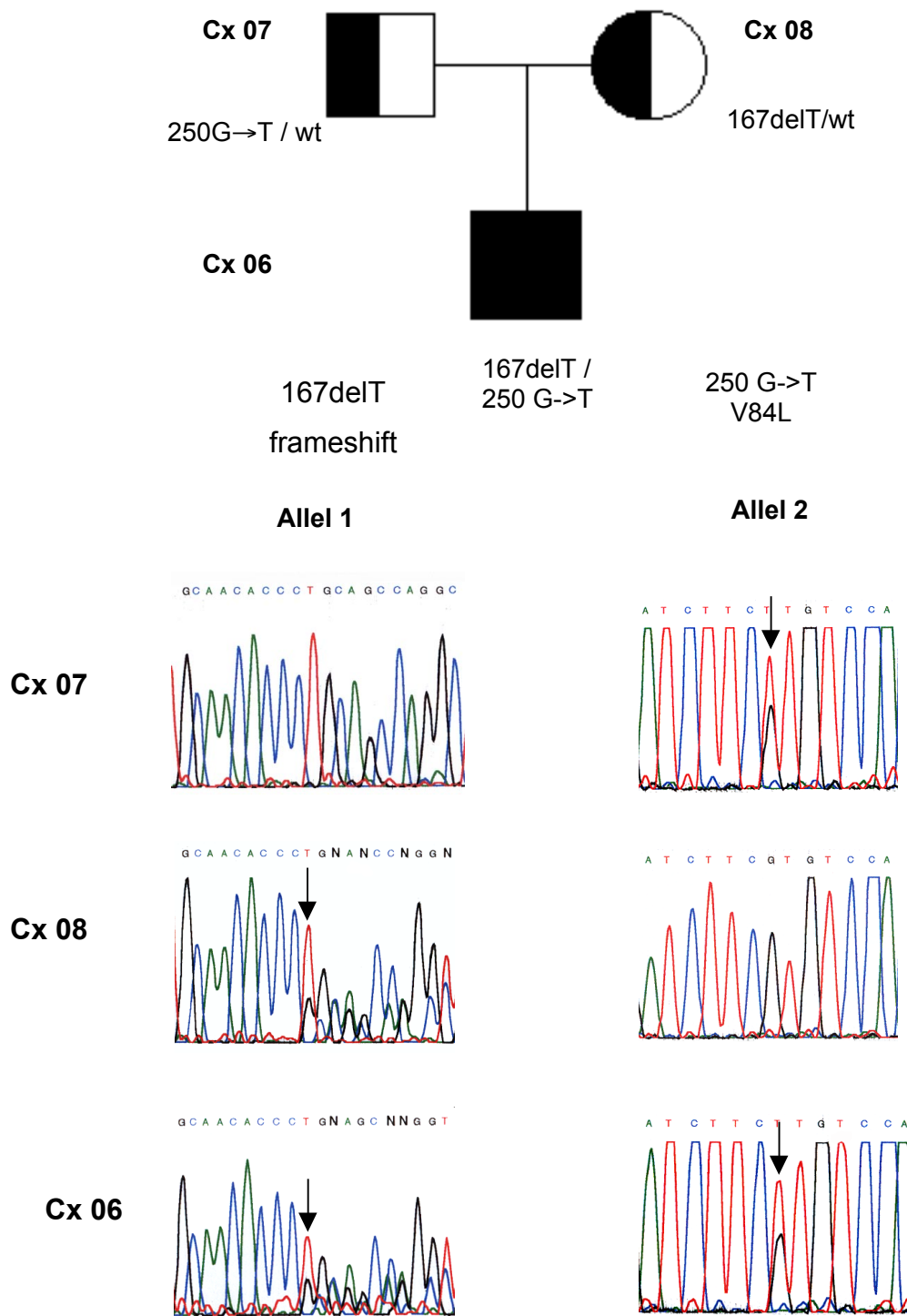


Abb. 17: Darstellung der Segregation des 167delT-Allel (vom Vater: Cx07) und 250GT-Allel (von der Mutter: Cx08) auf Patient Cx06 mit genetisch bedingter nicht-syndromaler, sensorineuraler Schwerhörigkeit.

wt: nicht betroffenes Allel

Tab. 16: Zusammenfassende Darstellung der klinisch und molekulargenetisch erhobenen Untersuchungsdaten der in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten

Patientendaten			Pädaudiologische Befunde				Verwendete Untersuchungsmethoden					Molekulargenetischer Befund	
Lfd. Pat.-Nr.	Geschlecht	Alter bei Diag.	Ausprägungsgrad	Frequenzspez.	Ein-/Beidseitig	Art	Ohrmikroskopie	Tympanogramm	Tongehörschwelle	Click-ERA	Notched-noise-ERA	Familiär/ sporadisch	Molekulargenetischer Befund
Cx01	M	8	Mittelgradig	35,45,40,50 30,35,35,45	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	Cx26 o.p.B.
Cx05	W	3	Resthörig	90,95,100,85 95,100,90,85	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	35delG
Cx06	M	2	Mittelgradig	40,60,55,50 50,50,65,55	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	167delT/250G→T
Cx09	W	5	Hochgradig	40,65,70,90 30,55,65,70	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	35delG
Cx10	M	7	Mittelgradig	25,30,45,50 15,30,45,60	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	F	Cx26 o.p.B.
Cx11	M	11	Resthörig	85,95,95,100 80,95,90,105	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	F	Cx26 o.p.B.
Cx14	W	5	Mittelgradig	50,60,60,45 50,70,65,60	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	380G→A/wt
Cx15	W	1	Resthörig	>100dB alle	Bds.	SN	o.p.B.	-	-	+	+	S	35delG
Cx16	M	2	Mittelgradig	60,50,70,50 50,50,60,50	Bds.	SN	Paukenröhrchen bds.	-	-	+	+	S	457G→A/wt
Cx17	W	1	Mittelgradig	40,55,60,60 45,60,65,65	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	Cx26 o.p.B.
Cx20	M	1	Hochgradig	70,70,70,80 70,70,70,80	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	-	+	+	S	35delG/101T→C
Cx21	W	5	Mittelgradig	45,50,55,55 45,50,55,40	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	F	457G→C/wt
Cx22	W	4	Mittelgradig	45,60,60,55 45,60,60,50	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	F	Cx26 o.p.B.
Cx24	M	-	Leichtgradig	10,15,30,20 0,10,25,30	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	Nicht bekannt	Cx26 o.p.B.
Cx25	W	5	Mittelgradig	10,60,65,60 10,55,65,65	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	Cx26 o.p.B.
Cx27	W	5	Resthörig	65,85,75,75 95,90,80,80	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	Cx26 o.p.B.
Cx28	W	6	Hochgradig	70,90,90,75 65,100,90,70	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	Cx26 o.p.B.

Lfd. Pat.-Nr.	Geschlecht	Alter bei Diag.	Ausprägungsgrad	Frequenzspez.	Ein-/Beidseitig	Art	Ohrmikroskopie	Tympanogramm	Tongehörschwelle	Click-ERA	Notched-noise-ERA	Familiär/sporadisch	Molekulargenetischer Befund
Cx29	W	6	Hochgradig	15,45,60,60 10,50,60,65	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	Cx26 o.p.B.
Cx30	M	-	Resthörig	>100dB alle	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	Nicht bekannt	Cx26 o.p.B.
Cx33	M	-	Hochgradig	55,35,50,40 40,40,60,80	Bds.	SN	Paukenerguß	o.p.B.	+	-	-	S	Cx26 o.p.B.
Cx40	M	3	Mittel-Hochgradig	70,70,70,65 75,75,65,70	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	Cx26 o.p.B.
Cx42	M	6	Mittelgradig	40,60,55,35 40,55,50,30	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	35delG/wt
Cx44	M	1	Resthörig	>100dB alle	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	F	Cx26 o.p.B.
Cx46	W	-	Hochgradig	80,70,60,60 80,60,30,70	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	Nicht bekannt	Cx26 o.p.B.
Cx49	M	5	Hochgradig	90,90,85,75 80,85,85,80	Bds.	SN	Paukenröhrchen bds.	-	+	-	-	S	Cx26 o.p.B.
Cx52	M	4	Mittelgradig	20,30,35,45 15,30,35,45	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	S	Cx26 o.p.B.
Cx53	M	6	Leicht-Mittelgradig	20,20,25,35 20,15,25,35	Bds.	SN	o.p.B.	o.p.B.	+	-	-	F	35delG/wt
Cx56	W	7	Mittelgradig	10,20,35,30 10,20,20,15	Bds.	SN	Paukenröhrchen bds.	-	+	-	-	S	Cx26 o.p.B.

M: männlich
W: weiblich
Bds.: beidseits
dB: Dezibel
SN: sensorineural
o.p.B.: ohne pathologischen Befund
S: sporadisch
F: familiär
+: Untersuchungsergebnis vorhanden
-: kein Untersuchungsergebnis vorhanden

Tab. 17: Autosomal-rezessive Mutationen im Connexin 26-Gen

Mutationsname	Beschreibung der Mutation	Effekt der Mutation	Lage der Mutation innerhalb der Proteindomäne	Refferenz
-3170G to A / IVS+1G to A	G to A at -3170	Splice site	none	Denoyelle et al. 1999 Green et al. 1999
M1V	A to G at 1	Protein starting at Met 34	IC1	Estivill et al. 1998
31del14	del of 14 nt at 31	Frameshift	IC1	Murgia et al. (1999)
31del38	del of 38 nt at 31	Frameshift	IC1	Denoyelle et al. 1997
G12V	G to T at 35	Gly at 12 into Val	IC1	Rabionet et al. 2000
35delG/30delG	del of G at 30-35	Frameshift	IC1	Zelante et al. 1997
35insG	ins of G at 30-35	Frameshift	IC1	Estivill et al. 1998
51del12insA	del of 12 nt at 52	Frameshift	IC1	Sobe et al. 2000 Sagi et al.
S19T	G to C at 56	Ser at 19 into Thr	IC1	Rabionet et al. 2000
W24X	G to A at 71	Trp at 24 into Stop	TM1	Kellsell et al. 1997
M34T ¹	T to C at 101	Met at 34 into Thr	TM1	Kellsell et al. 1997
V37I	G to A at 109	Val at 37 into Ile	TM1	Kelley et al. 1998 Rabionet et al. 2000
A40E	C to A at 119	Ala at 40 into Glu	EC1	L. Perroni P.C .
W44X	G to A at 132	Trp at 44 into Stop	EC1	Green et al. 1999
G45E	G to A at 134	Gly at 45 into Glu	EC1	Abe et al.
E47X	G to T at 139	Glu at 47 into Stop	EC1	Denoyelle et al. 1997
167delT	del of T at 167	Frameshift	EC1	Zelante et al. 1997
Q57X	C to T at 169	Gln at 57 into Stop	EC1	Wilcox et al. 1999
176-191del16	del of 16 nt at 176	Frameshift	EC1	Abe et al. Kudo et al. 2000
Y65X	C to G at 195	Tyr at 65 into Stop	EC1	Estivill et al. 1998
W77R	T to C at 229	Trp at 77 into Arg	TM2	Carrasquillo et al. 1997
W77X	G to A at 231	Trp at 77 into Stop	TM2	Kellsell et al. 1997
235delC	del of C at 233-235	Frameshift	TM2	Abe et al. Fuse et al. 1999

V84L	G to C at 250	Val at 84 into Leu	TM2	Kelley et al. 1998
L90P	T to C at 269	Leu at 90 into Pro	TM2	Murgia et al. (1999) Denoyelle et al. 1999
269insT	ins of T at 269	Frameshift	TM2	Denoyelle et al. 1999
V95M	G to A at 283	Val at 95 into Met	IC2	Kelley et al. 1998
Y97X	not described	Tyr at 97 into Stop	IC2	L. Perroni P.C.
H100Y	C to T at 298	His at 100 into Tyr	IC2	Green et al. 1999
299-300delAT	del of AT at 299	Frameshift	IC2	Abe et al.
314del14 / 312del14 / 310del14	del of 14 nt at 314	Frameshift	IC2	Denoyelle et al. 1997 Denoyelle et al. 1999 Kelley et al. 1998
333-334delAA	del of AA at 333-335	Frameshift	IC2	Kelley et al. 1998
S113R	T to G at 339	Ser at 113 into Arg	IC2	Kelley et al. 1998
delE120	del of Glu at 119 or 120	Del of Glu 120	IC2	Denoyelle et al. 1999
K122I	A to T at 365	Lys at 122 into Ile	IC2	Green et al. 1999
Q124X	C to T at 370	Gln at 124 into Stop	IC2	Scott et al. 1998b
Y136X	C to A at 408	Tyr 136 into Stop	IC2	Fuse et al. 1999 Abe et al. Kudo et al. 2000
R143W	C to T at 427	Arg at 143 into Trp	IC2	Brobby et al. 1998
E147K	G to A at 439	Glu at 147 into Lys	TM3	Murgia et al. P.C.
486insT	ins of T at 486	frameshift	EC2	Antoniadi et al. P.C.
509del14	del of 14nt from 509	frameshift	EC2	Antoniadi et al. P.C.
509insA	ins of A at 509	Frameshift	EC2	Denoyelle et al. 1999
515del17	del of 17aa at 515	Frameshift	EC2	L. Perroni P.C .
P175T	C to T at 523	Pro at 175 into Thr	EC2	Denoyelle et al. 1999
R184P	G to C at 551	Arg at 184 into Pro	EC2	Denoyelle et al. 1997
R184W	C to G at 550	Arg at 184 into Trp	EC2	Wilcox et al. 2000
S199F	C to T at 596	Ser at 199 into Phe	EC2	Green et al. 1999
631delGT	del of GT at 631-632	Frameshift	IC3	Kelley et al. 1998

Mutationsname	Beschreibung der Mutation	Effekt der Mutation	Lage der Mutation innerhalb der Proteindomäne	Refferenz
M34T	T to C at 101	Met at 34 into Thr	TM1	Kelsell et al., 1997
W44S	G to C at 131	Trp at 44 into Ser	EC1	Gasparini et al. P. C.
W44C	G to C at 132	Trp at 44 into Cys	EC1	Denoyelle et al., 1998
G59A	C to G at 176	Gly at 59 into Ala	EC1	Heathcote et al., 2000
R75 W	T to G at 223	Arg at 75 into Trp	EC1	Richard et al., 1998

Tab. 19: Sequenzveränderungen im Connexin 26-Gen, bei denen unklar ist, ob es sich um eine autosomal-rezessive, eine autosomal-dominante Mutation, oder um einen Polymorphismus handelt

Mutationsname	Beschreibung der Mutation	Effekt der Mutation	Lage der Mutation innerhalb der Proteindomäne	Refferenz
R98Q	G to A at 293	Arg at 98 into Gln	IC2	Green et al. 1999
R127H	G to A at 380	Arg at 127 into His	IC2	Estivill et al., 1998
R127C	C to T at 379	Arg at 127 into Cis	IC2	Hilbert et al. P. C.
K224Q	A to C at 670	Lys at 224 into Gln	IC3	Antoniadi et al. P. C.

Tab. 20: Polymorphismen im Connexin 26-Gen

Mutationsname	Beschreibung der Mutation	Effekt der Mutation	Lage der Mutation innerhalb der Proteindomäne	Refferenz
V271I	G to A at 79	Val at 27 into Ile	TM1	Kelley et al., 1998 Fuse et al., 1999 Kudo et al., 2000 Abe et al.
F83L	C to G at 249	Phe at 83 into Leu	TM2	Scott et al., 1998b
E114G	A to G at 341	Glu at 114 into Gly	IC2	Fuse et al., 1999 Abe et al. Kudo et al., 2000
V153I	G to A 457	Val at 169 into Ile	TM3	Hilbert et al. P. C.
G160S	G to A at 468	Glu at 160 into Ser	EC2	Scott et al., 1998b
C169Y	G to A at 506	Cys at 169 into Tyr	EC2	Murgia et al. P. C.
I203T	T to C at 608	Ile at 203 into Thr	TM4	Abe et al. Kudo et al., 2000

X. Curriculum vitae

Persönliche Daten: Name: Lars Petersen
Anschrift: Liebigstrasse 44
35037 Marburg
Geburtsdatum: 27.06.1969
Geburtsort: Marburg

Schule: 1976-1980 Otto-Ubelohde-Grundschule in Marburg
1980-1989 Elisabeth-Schule in Marburg
Abschluss: Abitur

Wehrdienst: 06/1989-09/1990
2. Kompanie des 2. Sanitätsbataillon in Marburg

Universität: 10/1991 - 04/1992 Philipps Universität Marburg
04/1992 - 04/1995 Christian Albrecht Universität zu Kiel
04/1995 - 10/1997 Philipps Universität Marburg
10/1997 - 10/1998 Technische Universität München
10/1998 Ärztliche Prüfung, bzw. Dritter Abschnitt der
Ärztlichen Prüfung an der Technischen
Universität München

07/1999-09/2001 Promotion an der Philipps-Universität Marburg

08/2000-06/2001 Abtlg. für Pränatale Diagnostik und Therapie
Allgemeines Krankenhaus Barmbek/Hamburg

04/2001 Approbation

Ab 10/2001 Abtlg. für Gynäkologie der Universitäts-Frauenklinik-Marburg

XI. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Molekulargenetische Diagnostik von *Connexin 26* bei genetisch-bedingter, nicht-syndromaler, sensorineuraler Schwerhörigkeit“

im Medizinischen Zentrum für Humangenetik unter der Leitung von Herrn HD Dr. J. Kunz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, 2001

(Lars Petersen)

XII. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die
folgenden Damen und Herren:

Kern, Geus, Baum, Thomas, Netter, Arnold, Eschenbach, Happle, Riedmiller, Stinner,
Schulz, Griss, Rothmund, v. Wichert, Meyer-Breiting, Oertel, Remschmidt, Pohlen,
Engel, Lennartz, Gotzen

Meine akademischen Lehrer an der Christian Albrechts-Universität zu Kiel waren die
folgenden Damen und Herren:

Tillmann, Klinck, Lagaly, Sievers, Gerber, Elfeldt, Simon, Santer, Reker, Henze,
Unger, Ullmann, Wawersik, Bruhn

Meine akademischen Lehrer an der Technischen Universität München waren die
folgenden Damen und Herren:

Graeff, Peschel, Classen, Siewert, Biemer

XIII. Danksagung

Die vorliegende Dissertation habe ich am Medizinischen Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn HD Dr. J. Kunz in der Zeit von Juli 1999 bis Februar 2001 angefertigt. Mein Dank gilt allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. K.-H. Grzeschik dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit im Medizinischen Zentrum für Humangenetik anzufertigen;

Herrn HD Dr. J. Kunz für die Bereitstellung des interessanten und aktuellen Themas, für die gute Betreuung, die informativen Ratschläge und die produktive Zusammenarbeit

Frau Prof. Dr. R. Berger für die Möglichkeit der Kooperation mit der Abteilung für Phoniatrie und Pädaudiologie des Medizinischen Zentrums für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Philipps-Universität Marburg

Herrn Dr. med. P. Rausch und Frau Dr. med. I. Wittkämper für die Aufnahme der Probanden in diese Studie

Meinem Freund Herrn Dipl. Biologen C. Kosan für die Einarbeitung in die Arbeitsmethoden und die vielen amüsanten Stunden im Institut

Frau Dr. med. E. Steuber für die anregenden Tipps

den Patienten und Angehörigen für Ihre Kooperation

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes möchte ich für die herzliche Aufnahme und die sehr angenehme Zusammenarbeit, ihre Hilfe und Unterstützung danken. Besonders dankbar bin ich:

Frau Prof. Dr. med. M. Koch und Frau Dr. rer. nat. Karolin Stegmann für die vielen hilfreichen Ratschläge

Frau Maren Godmann für die tatkräftige Unterstützung

Hartmut Engel für seine technische Hilfe

Dorothea Bornholdt und Martina Wessling für Ihr Engagement im Institut und die vielen aufmunternden Worte

Frau Gerti Panzner und Herrn Christopher Schwarz für den guten Kaffee am Morgen

Frau Gimbel und Frau S. Neumann für die Unterstützung bei der Erledigung von Formalitäten

Auch allen nicht erwähnten Mitarbeitern danke ich für das hervorragende Arbeitsklima. Ich habe die Zeit im Institut genossen und werde ewig mit Freude daran zurückdenken

Ich danke weiterhin

Frau Bärbel Kramer

Herrn Thomas Barth, Herrn Rüdiger Gerlach, Herrn Stefan Heldmann, Herrn Christian Kühne, Frau Maren Petersen, Frau Tanja Rost, Frau Dagmar Wenz für die stets freundschaftliche Unterstützung und die aufmunternden Worte

Meiner Großmutter Frau Annemarie Schirakowski