

Aus dem Med. Zentrum für Humangenetik  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsf. Direktor: Professor Dr. K.-H. Grzeschik  
Institut für Allgemeine Humangenetik  
Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik  
Direktor: HD Dr. rer. nat. J. Kunz

**Familienuntersuchung zur Identifizierung einer  
Kandidatengenregion für eine autosomal-dominante,  
nicht-syndromale Form einer Mittel- bis  
Tiefenschwerhörigkeit**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

(Dr. med.)

vorgelegt dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

von

Susanne Brodewolf

aus Aachen

Marburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am. 03.06.2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:           Herrn Prof. Dr. B. Maisch

Referent:       Herr HD Dr. J. Kunz

Koreferent:     Frau Prof. Dr. R. Berger

Meinen Eltern gewidmet

---

<b>I</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	1
<b>II</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	4
1.	Anatomie und Funktion des menschlichen Ohres .....	4
1.1.	Der Hörvorgang .....	5
2.	Schwerhörigkeit .....	6
2.1.	Genetisch bedingte Schwerhörigkeit .....	8
2.1.1.	Genetisch bedingte, syndromale Formen der Schwerhörigkeit .....	9
2.1.2.	Nicht-syndromale Schwerhörigkeit .....	11
3.	Hörverlust in niedrigen Frequenzbereichen.....	13
3.1.	Nicht-syndromale, sensorineurale Tieftonschwerhörigkeit .....	13
4.	Strategien zur Identifizierung von Genen.....	15
4.1.	Funktionsspezifische Klonierung.....	15
4.2.	Positionsunabhängige Kandidatengenverfahren.....	16
4.3.	Positionelle Klonierung .....	16
4.3.1.	Positionelle Kandidatengenverfahren.....	19
5.	Zielsetzung der Arbeit.....	19
<b>III</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	21
1.	Materialien.....	21
1.1.	Geräte und Zubehör .....	21
1.2.	Chemikalien.....	22
1.3.	Enzyme.....	22
1.4.	Nukleotide .....	22
1.5.	DNA-Größenstandards.....	22
1.6.	Oligonukleotide.....	22
1.7.	Fertigsysteme .....	22
1.8.	Puffer und Lösungen.....	22
1.9.	Computer-Software .....	24
1.10.	Verwendete Internet-Ressourcen.....	24
2.	Patientengut.....	24

---

2.1.	Pädaudiologische Untersuchungsmethoden zur Diagnosesicherung bei Verdacht auf genetisch bedingte, nicht-syndromale, sensorineurale Hörstörung .....	25
2.2.	Ohrmikroskopie .....	25
2.3.	Tympanometrie .....	25
2.4.	Audiometrie .....	25
2.5.	Die Elektrische Reaktions-Audiometrie (ERA).....	26
3.	Molekulargenetische Methoden.....	27
3.1.	Isolierung genomischer DNA aus menschlichen Leukozyten (modifiziert nach Miller et al., 1988).....	27
3.2.	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	27
3.2.1.	Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	27
3.2.2.	Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	28
3.3.	Polymerasekettenreaktion (Mullis et al., 1986) .....	28
3.4.	Kriterien zur Auswahl genetischer Marker .....	29
3.5.	Oligonukleotide.....	29
3.6.	Aufreinigung von PCR-Produkten mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) .....	34
3.7.	Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989) .....	34
3.8.	Automatisierte Allelbestimmung / GeneScan.....	35
3.9.	Standardisierung der Nachweismethode von Mikrosatelliten .....	36
4.	Statistische Methoden.....	37
4.1.	Zwei-Locus-LOD-Wert-Analyse .....	37
4.2.	Multimarkerkartierung.....	39
<b>IV</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>41</b>
1.	Auswertung der Tonschwellenaudiogramme.....	41
2.	Auswahl der für die Kopplungsanalyse verwendeten Marker.....	42
3.	Optimierung der Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation der Mikrosatellitenmarker .....	44
4.	GeneScan-Analyse .....	45
5.	Ermittelte Allelgrößen.....	46

---

6.	Haplotypenanalyse .....	47
7.	Zwei-Locus-LOD-Wert-Analyse .....	50
8.	Multimarkermarkierung .....	51
<b>V</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>53</b>
1.	Kopplungsanalyse als Methode .....	54
2.	Kopplungsanalyse zur Identifizierung der Kandidatengenregion für auto- somal-dominante, nicht-syndromale Tieftonschwerhörigkeit .....	55
3.	Progression der Schwerhörigkeit in den hohen Frequenzen.....	60
4.	Informativität der Familie .....	61
5.	Kandidatengene .....	62
6.	Das Kandidatengen WFS1 .....	67
<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>69</b>
<b>VII</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>71</b>
<b>VIII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>72</b>
<b>IX</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>79</b>
1.	Definitionen .....	79
2.	Kasuistik eines Patienten mit autosomal-dominanter, nicht-syndromaler, sensorineuraler Schwerhörigkeit.....	81
3.	Allelgrößen und -frequenzen für die in der Kopplungsanalyse verwendeten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 4 und Chromosom 5 .....	84
<b>X</b>	<b>Curriculum vitae</b> .....	<b>87</b>
<b>XI</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	<b>89</b>
<b>XII</b>	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b> .....	<b>90</b>
<b>XIII</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>91</b>

## II Einleitung

### 1. Anatomie und Funktion des menschlichen Ohres

Das Ohr ist in drei Abschnitte zu untergliedern: das äußere Ohr, das Mittelohr und das Innenohr. Zum äußeren Ohr werden die Ohrmuschel und der äußere Gehörgang gezählt. Durch die Ohrmuschel wird der Schall aufgefangen und durch den etwa 3 cm langen, S-förmig gekrümmten Gehörgang weitergeleitet. Der äußere Gehörgang endet mit dem Trommelfell.

Zum Mittelohr gehören verschiedene, mit Schleimhaut ausgekleidete, luftgefüllte Räume, die im Os temporale lokalisiert sind. Der Hauptraum besteht aus der Paukenhöhle (Cavum tympani), die Teile des schalleitenden Apparats, die drei Gehörknöchelchen Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes), enthält. Ihm angeschlossen sind nach hinten das Antrum mastoideum, das zu den Cellulae mastoideae führt, und die Ohrtrumpete (Tuba auditiva), das Verbindungsrohr zwischen Paukenhöhle und Nasenrachenraum. Die Gehörknöchelchen bilden ein Hebelsystem, welches mit einem Ende am Trommelfell und mit dem anderen Ende am ovalen Fenster (Fenestra vestibuli) befestigt ist und über das Schwingungen des Trommelfells auf die Perilymphe des Innenohres übertragen werden. In Abbildung 1 ist die Anatomie des menschlichen Ohres schematisch dargestellt.

Gleichgewichts- und Hörorgan liegen als Bestandteile des Innenohres im Felsenbein. Im Innenohr werden ein knöchernes und ein häutiges Labyrinth unterschieden. Das knöcherne Labyrinth des Hörorgans, die Schnecke (Cochlea), ist gefüllt mit Perilymphe, in der das häutige Labyrinth, (Ductus cochlearis) mit Endolymphe „schwimmt“ (Schiebler und Schmidt, 1997). Die Cochlea windet sich spiralförmig zweieinhalb mal um die knöcherne Schneckenachse (Modiolus).

Von der Schneckenachse ragt eine Knochenleiste (Lamina spiralis ossea) in den Schneckenkanal. Die Knochenleiste geht über in die Basilarmembran, die mit der lateralen Wand des Schneckenkanals verbunden ist. Dadurch wird die Cochlea in eine obere (Scala vestibuli) und eine untere Etage (Scala tympani) geteilt. An der Schneckenspitze (Helicotrema) stehen die beiden Etagen miteinander in Verbindung. Der Endolymphengang der Cochlea, der Ductus cochlearis, liegt am Boden der Scala vestibuli und beherbergt das Corti-Organ (Organum spirale), einen Rezeptor für akustische Signale. Der Ductus cochlearis wird von der Scala vestibuli durch die Reissner'sche Membran und von der Scala tympani durch die Basilarmembran getrennt. Über das Corti-Organ deckt sich die Tektorialmembran, eine gallertartige Masse, die an der Innenseite der Schnecke befestigt ist.

Das Corti-Organ befindet sich auf der Basilarmembran. Im Corti-Organ liegen umgeben von Stützzellen mit Stereozilien ausgestattete Sinneszellen (Haarzellen). Man unterscheidet bei den

Haarzellen eine innere von drei äußeren Haarzellreihen. Die Sinneszellen sind in der Lage, Schallwellen mechanoelektrisch zu transduzieren. Die elektrischen Signale werden über den Hörnerv in die Hörrinde geleitet und dort zu einem Höreindruck verarbeitet.

### 1.1. Der Hörvorgang

Die durch das äußere Ohr aufgenommenen und durch das Mittelohr weitergeleiteten Schallwellen werden in der Cochlea des Innenohres in mechanoelektrische Impulse transduziert. Bedingt durch die mechanischen Eigenschaften der Basilarmembran führen bestimmte Frequenzen eines Schalls nur an definierten Orten der Basilarmembran zu nennenswerten Schwingungen, ein Phänomen, das als Frequenzdispersion bezeichnet wird (Hick und Hick, 1997). Tiefe Frequenzen werden an apikalen Arealen der Cochlea, hohe Frequenzen an basalen Arealen der Cochlea abgebildet. An diesen Stellen kommt es zur Relativbewegung zwischen Basilar- und Tektorialmembran. Diese Relativbewegung führt wegen des Kontakts der Stereozilien der äußeren Sinneszellen zur Tektorialmembran zu ihrer Abbiegung. Zwischen dem normalen Ruhepotential im Innern der Sinneszellen und dem des positiv geladenen Endolymphraums besteht ein Potentialgefälle von bis zu 150 mV. An den äußeren Sinneszellen erfolgt durch die Abbiegung der Stereozilien ein reizsynchrones Öffnen und Schließen von Transduktionskanälen und damit eine Änderung des Membranwiderstandes (Schmidt und Thews, 1995). Es wird ein Einstrom von Kalium-Ionen aus der kaliumreichen Endolymphflüssigkeit in die Haarzellen ausgelöst, welcher eine Depolarisation der Stereozilien mit Ausbildung eines Rezeptorpotentials zur Folge hat. Eine anschließende Neurotransmitterfreisetzung bewirkt an der afferenten Nervenfasern an der Basis der inneren Haarzelle eine Auslösung von Aktionspotentialen, die nach Modifikation und Weiterleitung zur Hörrinde den Höreindruck vermitteln (Kalatzis und Petit, 1998).

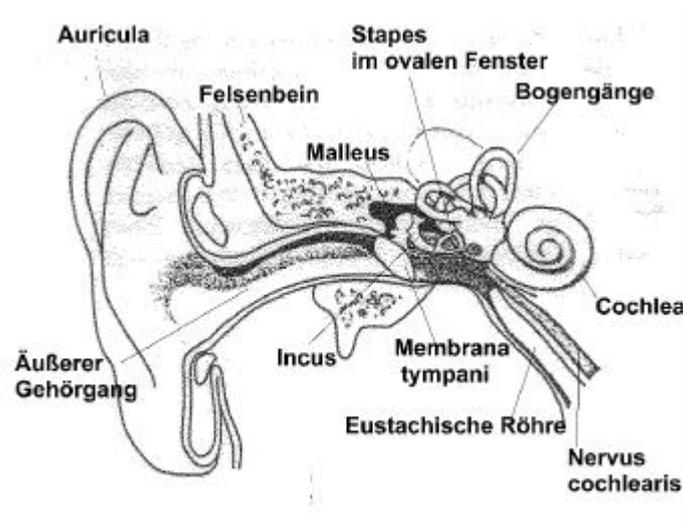
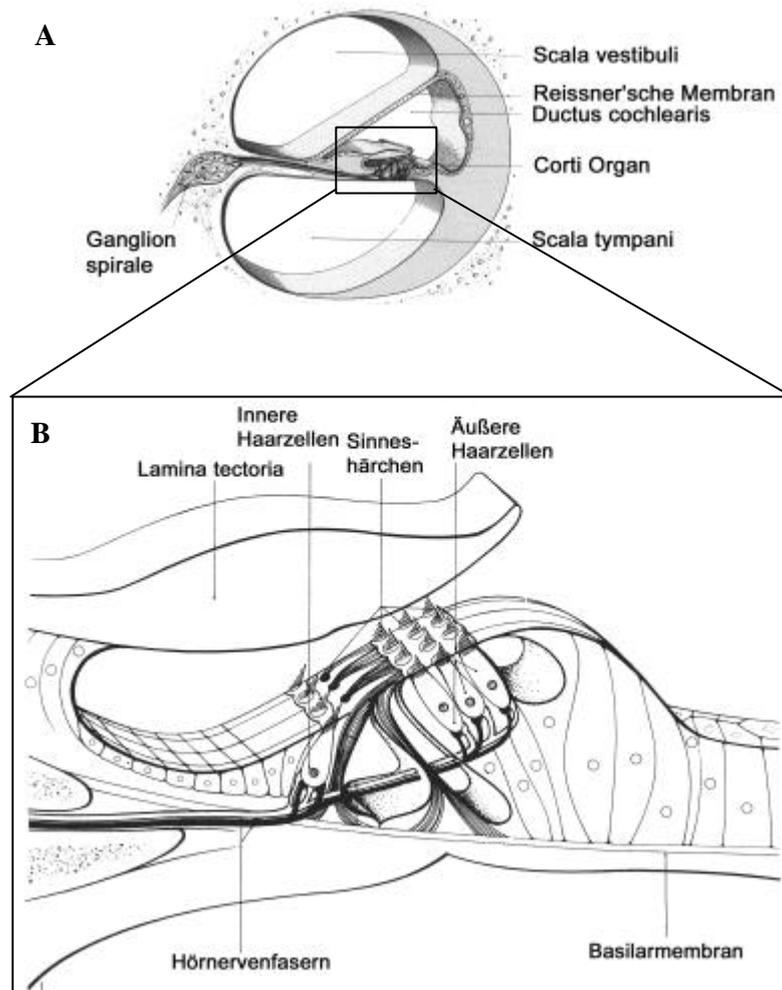


Abbildung 1: Schematische Darstellung des menschlichen Ohres (modifiziert nach Putz, 1993).



**Abbildung 2: Darstellung und Lokalisation des Corti-Organ im Innenohr.**

**A:** Querschnitt der Cochlea

**B:** Schematische Darstellung des Corti-Organ  
(modifiziert nach Berghaus et al., 1996)

## 2. Schwerhörigkeit

Störungen des Hörens im Sinn einer Schwerhörigkeit stellen den häufigsten primär sensorischen Defekt des Menschen dar. Die Auswirkung der Taubheit sind sowohl für das betroffene Individuum und sein näheres Umfeld als auch für die Gesellschaft bedeutend. Der Erkrankte selbst ist in der Kommunikationsfähigkeit mit seiner Umwelt und seinem sozialen Interaktionsgefüge beeinträchtigt (Kubisch et al., 2000).

Fast jeder zweite Mensch leidet im Laufe seines Lebens unter einem Hördefizit von mehr als 25 dB (Kubisch et al., 2000). Ungefähr eines von tausend Kindern ist bereits bei der Geburt

oder in der frühen Kindheit von gravierender Schwerhörigkeit betroffen (Kalatzis und Petit, 1998).

Dem Gehör kommt eine tragende Rolle beim Erlernen der Sprache zu. Doch auch eine nach erfolgter Sprachentwicklung einsetzende Schwerhörigkeit kann starke Auswirkung auf die sozioökonomische Entwicklung der betroffenen Person haben.

Daher ist die frühe Diagnosestellung der Hörstörung besonders bei Kindern, die sich noch vor der Sprachentwicklung befinden, von Bedeutung (Ptok, 1997), da durch rechtzeitigen Beginn einer Therapie bei diesen Patienten die ungehinderte Reifung der Hörbahn und hörverarbeitenden Zentren im 18.-24. Lebensmonat ermöglicht wird.

Schwerhörigkeit kann sowohl genetische als auch umweltbedingte Ursachen haben. Zu den wichtigsten Umweltfaktoren gehören maternofetale Infektionen (z.B. Toxoplasmose, Röteln und Zytomegalie-Virusinfektionen), perinatale Komplikationen (z.B. mit Hypoxie einhergehende Hörstörungen), Infektionen (z.B. Meningitis und Mumps), ototoxische Medikamente (z.B. Aminoglykoside oder Cisplatin) und Lärmbelastung (Kubisch et al., 2000).

Es wird bei der Schwerhörigkeit zwischen prä- und postlingualer Schwerhörigkeit unterschieden. Bei der prälingualen Form der Schwerhörigkeit sind die Patienten schon vor Abschluss des Spracherwerbs betroffen, während bei der postlingualen Form die Schwerhörigkeit erst nach abgeschlossener Sprachentwicklung manifest wird. Prälinguale Schwerhörigkeit tritt meist bedingt durch genetische Ursachen oder als Folge von perinatalen Komplikationen oder frühkindlichen Infektionen auf (siehe oben). Die Ursache postlingualer Hörstörungen sind häufig altersbedingte Veränderungen oder die Folge akustischer Traumata, sie können jedoch auch eine genetische Ursache haben, die sich erst nach erfolgtem Spracherwerb manifestiert.

Bezüglich der anatomischen Ursachen wird bei Hörstörungen formal zwischen konduktivem (schalleitungsbedingt), sensorineuralem (schallempfindungsbedingt) und kombiniertem sensorineural / konduktivem Hörverlust differenziert. Auch zentrale Formen von Hörstörungen, die beispielsweise den Hörnerv oder die Hörrinde betreffen, sind möglich. Ein Defekt des Schalleitungsapparates, also des äußeren Ohres oder des Mittelohres, führt zur konduktiven Form der Schwerhörigkeit (Parving und Bak-Pedersen, 1978). Kongenitale Malformation, posttraumatische Schäden, akute oder chronische Infektionen können z.B. zur Zerstörung der Gehörknöchelchen oder Versteifung der Gehörknöchelchenkette führen (Parving und Bak-Pedersen, 1978).

Die Ursachen für einen sensorineuralen Hörverlust liegen meist in einer pathologisch veränderten Cochlea im Innenohr oder in seltenen Fällen weiter zentral in einem pathologisch ver-

änderten Hörnerv oder zentralen Hörstörungen (Parving und Bak-Pedersen, 1978). Sensorineuraler Hörverlust ist fakultativ charakterisiert durch Progression der Schwerhörigkeit und oftmals assoziierten Symptomen in anderen Organsystemen (Königsmark, 1969).

Eine Einteilung der Schwerhörigkeit in verschiedene Schweregrade erfolgt durch Erfassung des Hörverlusts in Dezibel (dB). In einem Tonschwellenaudiogramm werden für bestimmte Frequenzen im Bereich von 0,125-8 kHz die Lautstärken in Dezibel (dB) bestimmt, die beim Patienten zu einer Hörstörung führen. Die Abweichungen der gemessenen Schwellenwerte von Normschwellenwerten werden ermittelt und so der Hörverlust in Dezibel (dB) angegeben. Ein Dezibel (dB) ist definiert als der dekadische Logarithmus zweier Schallintensitäten zur Objektives des Schallintensitätspegels.

Die Einteilung erfolgt im angloamerikanischen Sprachgebiet in fünf Schweregrade. Die Einteilung für den deutschsprachigen Raum lehnt sich weitgehend daran an (Gross et al., 1998) und ist in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

**Tabelle 1: Englisch- und deutschsprachige Einteilung der Hörstörung.**

<b>Einteilung im englischsprachigen Raum</b>	<b>Hörverlust in dB</b>	<b>Einteilung im deutschsprachigen Raum</b>	<b>Hörverlust in dB</b>
mild	27 - 40 dB	leicht	25 - 40 dB
moderate	41 – 55 dB	mittel	40 - 69 dB
moderate to severe	56 –70 dB		
severe	71 – 90 dB	mittel- hochgradig	70 - 94 dB
profound	>90 dB	an Taubheit grenzend / resthörig	>94 dB

## **2.1. Genetisch bedingte Schwerhörigkeit**

Die genetisch bedingte Schwerhörigkeit wird mit einer Häufigkeit von ca. 1-2 auf 1000 Lebendgeborene beobachtet (Denoyelle et al., 1999; Estivill et al., 1998). Ein weiteres Individuum auf 1000 Lebendgeborene zeigt eine genetisch bedingte Prädisposition, eine Form der Schwerhörigkeit im Laufe des Lebens zu entwickeln (Kalatzis und Petit, 1998).

Schätzungen zufolge haben somit etwa 60% der Fälle von Schwerhörigkeit in den Entwicklungsländern eine genetische Ursache (Kalatzis und Petit, 1998; Green et al., 1999). Bei den genetisch bedingten Schwerhörigkeiten handelt es sich um eine sowohl ätiologisch als auch klinisch gesehen sehr heterogene Erkrankungsgruppe (Green et al., 1999).

### **2.1.1. Genetisch bedingte, syndromale Formen der Schwerhörigkeit**

Syndromale Formen werden mit einer Häufigkeit von 30% aller genetisch bedingten Schwerhörigkeiten beobachtet (Kalatzis und Petit, 1998). Genetisch bedingte Schwerhörigkeit wird als syndromal bezeichnet, wenn außer dem Hörverlust noch Fehlbildungen anderer Organe zu finden sind (z.B. die der Netzhaut im Usher-Syndrom, die der Niere im Alport-Syndrom, die des Herzens im Jervell-Lang-Nielsen-Syndrom und die der Schilddrüse im Pendred-Syndrom) (Kubisch et al., 2000). Mehrere hundert verschiedene Syndrome, die mit Schwerhörigkeit assoziiert sind, sind bisher beschrieben (Gorlin et al., 1995).

Bisher beobachtete Gendefekte, welche die syndromalen Formen der genetisch bedingten Schwerhörigkeit mit einschließen, betreffen sowohl autosomale, als auch X-chromosomale Genloci, deren Genprodukte u.a. extrazellulär (z.B. beim Alport-Syndrom), cytoskeletal (z.B. beim Usher type IB) und mitochondrial (z.B. beim „non-insulin-dependent-diabetes mellitus“ (NIDDM)) exprimiert werden.

Genprodukte, die hierbei durch Mutationen betroffen sein können, sind z.B. Enzyme (z.B. Hurler-Syndrom), Transkriptionsfaktoren (z.B. Waardenburg-Syndrom), Bestandteile von Ionenkanälen (z.B. Jervell-and Lange-Nielsen-Syndrom) oder Rezeptoren und Liganden (z.B. Crouzon-Syndrom).

Bisher identifizierte und charakterisierte Genloci und Genprodukte, die genetisch bedingte, syndromale Schwerhörigkeit verursachen können und ihre zelluläre Expression sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

**Tabelle 2: Gene und ihre Genprodukte der genetisch bedingten syndromalen Schwerhörigkeit** (modifiziert nach Kalatzis und Petit, 2001).

Expressionskompartiment	Genname	Genprodukt	Form der Schwerhörigkeit (Syndrom)	Chromosomenlokalisierung
Extrazelluläre Matrixkomponente	<i>COLAA3</i>	TypIV( $\alpha3\alpha4$ )-	Alport, autosomal-rezessiv	2q36-37
	<i>COLAA4</i>	Kollagen		
	<i>COLAA5</i>	TypII( $\alpha5\alpha6$ )-	Alport, X-linked	Xq22
	<i>COLAA6</i>	Kollagen		
	<i>COLA2A1</i>	TypII( $\alpha$ )-Kollagen	Stickler	12q13.1-13.3
	<i>KAL</i>	Anosmin-1	X-linked Kallmann`s	Xp22.3
	<i>NDP</i>	Norrin	Norrie	Xp11.3
Enzyme	<i>IDUA</i>	$\alpha$ -Liduronidase	Hurler	4q16.3
	<i>IDS</i>	Iduronate-2-Sulfatase	Hunter	Xp27.3
	<i>ERCC3</i>	Helicase	Cockayne`s	2p21
Transkriptionsfaktoren	<i>PAX3</i>	PAX3	Waardenburg Typ 1/3	2p35
	<i>MITF</i>	MITF	Waardenburg Typ 2	3p12.3-14.1
	<i>SOX10</i>	SOX10	Waardenburg-Hirschsprung	22q13
	<i>EYA1</i>	EYA1	Branchio-Oto-Renal	8q13.3
	<i>unbekannt</i>	unbekannt	Branchio-Oto-Renal	1q31
	<i>SALL1</i>	SALL1	Townes-Brooks	16q21.1
Zytoskeletale Komponenten	<i>NF2</i>	Merlin	Neurofibromatose Typ II	22q12
	<i>MYO7A</i>	Myosin VIIA	Usher Typ IB	11q13.5
Bestandteile von Ionenkanälen	<i>KvLQT1</i>	KvLQT1	Jervell and Lange-Nielsen	11p15.5
	<i>KCNE1</i>	KCNE1/ISK	Jervell and Lange-Nielsen	21q22.1-22.2
Rezeptoren, Liganden	<i>FGFR2</i>	FGFR2	Crouzon	10p25-26
	<i>EDNRB</i>	Endothelin-B-Rezeptor	Waardenburg-Hirschsprung	13q22
	<i>EDN3</i>	Endothelin3	Waardenburg-Hirschsprung	20q13.2-13.3
Putative Sulfattransporter Mitochondriale Gene	<i>PDS</i>	Pendrin	Pendred	7q21-34
	<i>tRNA</i>	transfer RNA	NIDDM, MELAS	mitochondrial
	<i>tRNA</i>	transfer RNA	MERF, MERF/MELAS	mitochondrial
Putatives nucleoläres Phosphoprotein	<i>TCOF1</i>	Treacle	Treacher-Collins	5q32-33.1

### 2.1.2. Nicht-syndromale Schwerhörigkeit

Den weitaus größeren Anteil der genetisch bedingten Schwerhörigkeit nehmen mit circa 70% die nicht-syndromalen Formen ein. Von nicht-syndromaler Schwerhörigkeit wird gesprochen, wenn keine weiteren Symptome oder Anomalien vorliegen und somit ein isolierter Defekt des Hörorgans anzunehmen ist. Diese nicht-syndromalen, monogenen Formen der Schwerhörigkeit sind durch eine sehr hohe genetische Heterogenität gekennzeichnet, das heißt, dass verschiedene Mutationen in verschiedenen Genen zu einem vergleichbaren oder identischen Phänotyp führen (Kubisch et al., 2000). Schätzungen zufolge können Veränderungen in bis zu hundert Genen für die Entwicklung der nicht-syndromalen Schwerhörigkeit verantwortlich gemacht werden (Morton and Reynolds, 1991). Die extreme genetische Heterogenität des nicht-syndromalen Hörverlustes lässt vermuten, dass es viele verschiedene Prozesse gibt, die eine Fehlfunktion des Innenohres verursachen können (Heller und Hudspeth, 1998).

Neben der ausgeprägten genetischen Heterogenität der Schwerhörigkeit ist seit langem bekannt, dass die monogenen Formen der Erkrankung verschiedenen Erbgängen folgen können (Kubisch et al., 2000). Es sind sowohl autosomal-dominante, autosomal-rezessive, X-chromosomale als auch mitochondriale Vererbungsmuster vorhanden. Bei den prälingualen Formen der monosymptomatischen hereditären Schwerhörigkeit scheinen 75-80% autosomal-rezessiv, etwa 20-25% autosomal-dominant und lediglich 1-1.5% X-chromosomal vererbt zu werden (Kubisch et al., 2000). Vereinzelt kommen auch mitochondriale Vererbungsschemata vor. Bei den später manifesten Formen der Schwerhörigkeiten liegen zum Teil keine genaueren Einschätzungen hinsichtlich der Häufigkeit der verschiedenen Vererbungsmodi vor, dennoch ist anzunehmen, dass hier der Anteil der autosomal-dominanten Formen deutlich höher sein wird (Kubisch et al., 2000). Bei der Einteilung und Benennung genetisch bedingter Schwerhörigkeiten spielen die verschiedenen Vererbungsmuster eine Rolle. Dabei steht DFN für X-chromosomale Vererbung, mit DFNA bezeichnet man einen autosomal-dominanten Erbgang der Schwerhörigkeit und DFNB ist die Abkürzung für einen autosomal-rezessiven Erbgang. Mehr als 60 Genloci wurden bisher kartiert und 15 Gene wurden identifiziert, die mit nicht-syndromalem Hörverlust in Verbindung stehen. Gendefekte der monogenen, nicht-syndromalen Schwerhörigkeit sind beispielsweise Störungen der Kaliumhomöostase des Innenohres, Störungen des Haarzellcytoskeletts sowie Störung der gewebespezifischen Entwicklung oder Differenzierung. Genloci und Genprodukte, die genetisch bedingte, nicht-syndromale Schwerhörigkeit verursachen können und deren zelluläres Verteilungsmuster sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Genloci und -produkte der genetisch bedingten nicht-syndromalen Schwerhörigkeit** (modifiziert nach Kalatzis und Petit, 2001).

Expressions-kompartiment	Genname	Genprodukt	Form der Schwerhörigkeit	Art des Hörverlustes	Chromosomen-lokalisierung
Extrazelluläre Matrixkomponente	<i>TECTA</i>	$\alpha$ -Tectorin	DFNA8/DFNA12/ DFNB21	prälingual; sensorineural	11q22-24
	<i>COCH</i>		DFNA9	postlingual, sensorineural	14q12-q13
Transkriptionsfaktor	<i>POU3F4</i>	POU3F4	DFN3	prälingual; sensorineural,	Xp21.1
	<i>EYA4</i>		DFNA10	postlingual, sensorineural	6q22-q23
	<i>POU3F4</i>	POU3F4	DFNA15	prälingual; sensorineural,	5q31
Cytoskellatale Komponenten	<i>Cx26</i>	Connexin 26	DFNB 1	prälingual, sensorineural	13q12
	<i>Cx26</i>	Connexin 26	DFNA3	prälingual, sensorineural	13q12
	<i>MYO7A</i>	Myosin VII A	DFNB2	prälingual, sensorineural	11q13.5
	<i>MYO15</i>	Myosin XV	DFNB3	prälingual, sensorineural	17q11.2
	<i>OTOF</i>	Otoferlin	DFNB9	prälingual, sensorineural	2p22-p23
	<i>DIAPH1</i>	Diaphonus I	DFNA 1	postlingual, sensorineural	5q31
	<i>CX31</i>	Connexin 31	DFNA2	postlingual, sensorineural	1p34
	<i>Cx30</i>	Connexin 30	DFNA3	prälingual, sensorineural	13q12
	<i>MYO7A</i>	Myosin VII A	DFNA11	postlingual, sensorineural	11q12-q21
	<i>COL11A2</i>		DFNA13	postlingual, sensorineural	6p21.3
Membran-komponenten	<i>PDS</i>	Pendrin	DFNB4	prälingual, sensorineural	7q31
	<i>TMPRSS3</i>		DFNB8/DFNB10	prälingual, sensorineural	21q22
	<i>DFNB29</i>	Claudin-14	DFNB9	prälingual, sensorineural	21q22
	<i>CDH23</i>		DFNB12	prälingual, sensorineural	10q21-q22
Mitochondriale Gene	<i>12srRNA</i>	12srRNA	MINSDP	postlingual, sensorineural	mitochondrial
	<i>tRNAser</i>	tRNAser	MINSDP	postlingual, sensorineural	mitochondrial

### **3. Hörverlust in niedrigen Frequenzbereichen**

Der Hörverlust in den tiefen Frequenzen ist definiert als ein Hörverlust, der sich hauptsächlich in den Frequenzbereichen unterhalb von 2 kHz manifestiert.

Die Klassifizierung der Tieftonschwerhörigkeit erfolgt zum einen in schallempfindungsbedingte (sensorineurale) Schwerhörigkeit, schalleitungsbedingte (konduktive) Schwerhörigkeit und kombiniert sensorineural/konduktive Formen der Schwerhörigkeit. Auch ein zentraler Hörverlust ist möglich. Zusätzlich unterscheidet man bei genetisch bedingter Tieftonschwerhörigkeit zwischen syndromalen und nicht-syndromalen Schwerhörigkeitsformen. Weitere Kriterien der Einteilung sind der Vererbungsmodus (autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv), das Alter des Einsetzens der Hörbeschwerden und das Ausmaß der Schwerhörigkeit (gemessen in Dezibel).

Tieftonschwerhörigkeit ist bei verschiedenen sensorineuralen Hörbeschwerden von Bedeutung, z.B. bei der Ménière Krankheit, bei viralen Infektionen, beim Myxödem sowie bei Deformitäten des Innenohres und bei genetisch bedingtem Hörverlust (Enander und Stahle, 1967; The Vanderbilt Hereditary Deafness Study Group, 1968; Königsmark et al, 1971; Parving, 1976, 1979; Parving und Bak-Pedersen, 1978; Parving et al., 1978; Parving und Eberling, 1982; Djupesland et al., 1979; Suehiro und Sando, 1979; Bergström, 1980; Schmidt, 1980).

Daneben findet sich ein Hörverlust in den niedrigen Frequenzen auch bei konduktiven Hörstörungen. In diesem Fall resultiert der Hörverlust z.B. aus einer partiellen Läsion oder einer Versteifung der Gehörknöchelchenkette (Parving, 1984).

#### **3.1. Nicht-syndromale, sensorineurale Tieftonschwerhörigkeit**

Genetisch bedingte, nicht-syndromale, sensorineurale Tieftonschwerhörigkeit in den niedrigen Frequenzen ist eine seltene Krankheit, die erstmalig von der Vanderbilt Hereditary Deafness Study Group (1968), Königsmark et al. (1971) und Nance und Swenney (1975) untersucht wurde. Charakterisiert ist diese Art der Tieftonschwerhörigkeit durch einen dominanten Vererbungsmodus mit kompletter Penetranz des mutierten Gens (Parving, 2000). Der Hörverlust ist überwiegend kongenital oder entwickelt sich im Laufe der ersten Lebensdekade. Das Hörvermögen verschlechtert sich meist im Laufe des Lebens und endet im Alter mit einem Hörverlust, der alle Frequenzen umfasst. Die Prävalenz dieser Schwerhörigkeit wird auf eine Häufigkeit von auf 11-18 Betroffene pro 100.000 Personen geschätzt und bleibt bis zur Gruppe der über 80-jährigen Personen konstant (Parving et al., 2000).

Genloci für genetisch bedingte, nicht-syndromale, sensorineurale Tieftonschwerhörigkeit sind bisher auf dem Chromosom 5 (5q31) und dem Chromosom 4 (4p16.3) lokalisiert worden.

**Tabelle 4: Bekannte Genloci für autosomal-dominante Tieftonschwerhörigkeit.**

Genlocus	Lokalisation	Gen	Vererbungsmodus	Auftreten der Symptome	Progression	Autoren
DFNA1	5q31	<i>DIAPH1</i>	autosomal-dominant	erste Lebensdekade	schnell	Lynch et al., 1992
DFNA6	4p16.3	unbekannt	autosomal-dominant	zweite Lebensdekade	langsam	Lesperance et al., 1995
DFNA14	4p16.3	unbekannt	autosomal-dominant	erste oder zweite Lebensdekade	langsam	Van Camp et al., 1999

Der erste autosomal-dominante Krankheitslocus, DFNA1, konnte 1992 in einer Familie aus Costa Rica kartiert werden (Leon et al., 1992). Eine Mutation im *Diaphonus1*-Gen ist verantwortlich für einen autosomal-dominanten, sensorineuralen, progressiven Hörverlust mit voller Penetranz. Beide Ohren sind gleichermaßen betroffen. Ein Verlust des Hörvermögens in den tiefen Frequenzen zeigt sich bei den Patienten um das zehnte Lebensjahr und entwickelt sich bis zum dreißigsten Lebensjahr zu einer schwerwiegenden, bilateralen Schwerhörigkeit, die alle Frequenzen mit einschließt (Van Camp et al., 1999).

Durch umfangreiche Sequenzanalysen konnte ein Gen identifiziert werden (Lynch et al., 1997), welches in der Cochlea exprimiert wird und eine signifikante Homologie zu Genen aus anderen Spezies aufweist, beispielsweise dem *Diaphonus*-Gen aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und dem Gen *p140mDia* aus der Maus. Das Genprodukt des *Diaph1*-Gen gehört zur Familie der FH (Forminhomologen)-Proteinfamilie, deren Mitglieder eine zentrale Rolle in der Regulation der Aktinorganisation einnehmen und dadurch an einer Vielzahl von zellulären Funktionen, wie z.B. an der Zellteilung (Castrillon und Wasserman, 1994) oder der Ausbildung der Zellform beteiligt sind. Aufgrund dieser Befunde wird heute angenommen, dass das humane *Diaphonus1*-Gen sich wahrscheinlich an der Aktinorganisation innerhalb der Stereozilien oder in der Kutikularplatte beteiligt, die besonders reich an Aktinmonomeren ist. Störungen dieser Funktion führen dementsprechend in Analogie zu Störungen der Myosinarchitektur zum Verlust der charakteristischen Haarzellstruktur und somit der Fähigkeit zur mechanoelektrischen Signaltransduktion (Kubisch et al, 2000).

Die beiden Genloci DFNA6 und DFNA14 liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4. In Familien, in denen die Schwerhörigkeit mit dem Locus DFNA6 (Lesperance et al., 1995) gekoppelt ist, setzt der Hörverlust meist erst in der zweiten Lebensdekade ein. Bei den meisten Patienten ist der Hörverlust bilateral und symmetrisch und manifestiert im Frequenzbereich von 250-1000 Hz (Van Camp et. al., 1999).

Familienmitglieder, bei denen die Schwerhörigkeit mit dem Genlocus DFNA14 koppelt, weisen einen Hörverlust in der ersten oder zweiten Lebensdekade auf. Die audiologische Untersuchungen zeigen einen bilateralen und symmetrischen Hörverlust. Die betroffenen Frequenzen liegen in einem Bereich bis 1000 oder 2000 Hz (Van Camp et al., 1999).

Für die beiden Genloci DFNA6 und DFNA14 konnten bis zum Zeitpunkt der Beendigung der vorliegenden Arbeit keine Kandidatengene identifiziert werden.

#### **4. Strategien zur Identifizierung von Genen**

Zur Identifizierung von Genen, die bei Beeinträchtigung ihrer Funktion zur Ausprägung einer Krankheit führen, stehen prinzipiell vier Strategien zur Verfügung, wobei der vierte Ansatz eine Weiterentwicklung des dritten Ansatzes darstellt. In den folgenden Abschnitten werden diese vier Verfahren vorgestellt und ihre Anwendung zur Identifizierung des Gens für Tiefschwerhörigkeit in der untersuchten Familie diskutiert.

##### **4.1. Funktionsspezifische Klonierung**

Bei der funktionsspezifischen Klonierung nutzt man Informationen über die Funktion des Gens. Wenn das Genprodukt bekannt ist, kann man es nach einer teilweisen Aufreinigung des zugrunde liegenden Gens auf verschiedene Weisen identifizieren. Eine Möglichkeit besteht darin, genspezifische Oligonukleotide zu generieren, indem man das Protein ansequenziert und aufgrund der Aminosäuresequenz Rückschlüsse auf die Basensequenz zieht. Für die Synthese der Oligonukleotide werden Bereiche mit möglichst wenig degenerierten Codons verwendet. Mit der so erstellten Sonde lassen sich cDNA-Banken untersuchen. Über die cDNA-Banken kann man letztendlich auf eine genomische DNA-Bank zurückgreifen und damit die genomische Struktur des für die Krankheit verantwortlichen Gens charakterisieren (Strachan und Read, 2000).

Diese Strategie lässt sich in der zu untersuchenden Familie nicht anwenden, da keine Informationen über die funktionelle Ursache der Hörstörung bekannt sind. Erschwerend kommt

hinzu, dass es sehr viele verschiedene Faktoren gibt, die eine Malfunktion des Innenohres verursachen können (Heller und Hudspeth, 1998).

#### **4.2. Positionsunabhängige Kandidatengenverfahren**

Bei Anwendung des positionsunabhängigen Kandidatengenverfahrens stellt man Vermutungen über die Funktion eines Gens an, ohne dass die chromosomale Zuordnung des Krankheitslocus bekannt ist (Strachan und Read, 2000). Diese Vorgehensweise ist nur möglich, wenn der Phänotyp einer Krankheit dem eines anderen Phänotyps bei Tieren oder bei Menschen ähnlich ist, für den das zugrunde liegende Gen bekannt ist, oder wenn das Gen aufgrund der molekularen Pathogenese offensichtlich zu einer bekannten Genfamilie gehört.

#### **4.3. Positionelle Klonierung**

Bei dem Verfahren der positionellen Klonierung ist von dem gesuchten Gen nur die Zuordnung zu einer chromosomalen Teilregion bekannt. Informationen über die Pathogenese oder die biochemische Funktion sind nicht notwendig. Im Allgemeinen versucht man, physikalische oder genetische Karten der entsprechenden genetischen Region anzufertigen, die Position des Locus genauer zu bestimmen und dann diejenigen Gene in diesem Bereich zu identifizieren, die als Kandidatengene in Betracht kommen (Strachan and Read, 2000). Gene in der so definierten Chromosomenregion sind als Kandidatengene in Erwägung zu ziehen, wenn sie aufgrund ihrer Expressionsmuster oder der putativen Aufgaben des codierten Proteins nicht unwahrscheinlich sind ( Strachan und Read, 2000).

Diese Strategie ist Vorgehensweise der Wahl bei der hier untersuchten Familie. Aus der Literatur (Van Camp et al., 1999) sind die beiden Loci DFNA6 (Lesperance et al., 1995) und DFNA14 (Van Camp et al., 1999) auf dem Chromosom 4p16.3 als Kandidatengenloci für autosomal-dominante, nicht-syndromale Tieftonschwerhörigkeit bekannt. Ein weiteres Kandidatengen für autosomal-dominante, nicht-syndromale Schwerhörigkeit, nämlich das *Diaphorus1*-Gen wurde auf dem Chromosom 5q31 kartiert (Lynch et al., 1997).

Grundsätzlich beginnt die Identifizierung eines Gens mittels Kopplungsanalyse mit der Rekrutierung möglichst großer Familien, in denen die Krankheit segregiert. Für die weitere Untersuchung bedient man sich immer präziserer genetischer und anschließend physikalischer Karten, um den Krankheitslocus weiter einzugrenzen.

Aus einer physikalischen Karte ist die Position eines Genlocus und dessen Distanz zu anderen Genen auf demselben Chromosom in absoluten Werten (ausgedrückt in Basenpaaren) ersicht-

lich. Physikalische Karten können erstellt werden, ohne dass etwas über die Natur der Gene und ihre Funktion bekannt ist (Botstein et al., 1980).

Die genetische Karte zeigt demgegenüber die relative Position von Genloci in Rekombinationseinheiten, ausgedrückt in centi Morgan (cM).

Biologische Grundlage der genetischen Kartierung ist die Chromosomenverteilung während der Meiose, wobei gefragt wird, ob bzw. wie oft zwei verschiedene Loci auf demselben Chromosom durch meiotische Rekombination getrennt werden. Bei dem Vorgang der Rekombination tauschen das maternale Chromosom und das danebenliegende paternale Chromosom einander entsprechende Bereiche aus und kombinieren die Chromosomen so neu. Die Rekombination bricht die ursprüngliche Anordnung in einheitlich väterlich und einheitlich mütterliche Reihen von Erbanlagen auf, arbeitet also gegensinnig zur gekoppelten Weitergabe. Je enger zwei Genloci in der Reihe benachbart sind, desto seltener ist das Unterbrechen der ursprünglich linearen Aufreihung durch Rekombination (Speich und Grzeschik, 1997). Nahe beieinander liegende Genloci zeigen folglich dasselbe Vererbungsmuster. Man kann somit nachweisen, ob Kopplung zwischen einem bereits kartierten Markerlocus und einem unbekanntem zweiten Locus – zum Beispiel einem Krankheitslocus – besteht. Bei Kopplungsanalysen wird demnach untersucht, ob beide Loci außergewöhnlich häufig gemeinsam innerhalb von Familien vererbt werden.

Die Häufigkeit der Rekombination zwischen zwei Genorten wird als Maß zur Bestimmung der genetischen Distanz auf dem Chromosom genutzt. Eine Rekombinationshäufigkeit von 1% der Meiosen entspricht der Einheit eines centi Morgan (cM).

Zur Bezeichnung eines Genlocus hat man sich auf ein Nomenklatursystem mit D-Nummern (DNA-Elementenummern) geeinigt. Oft sind es Genloci, denen ein erblicher Polymorphismus zugrunde liegt. Polymorphismus bedeutet in diesem Zusammenhang, dass von einer bestimmten DNA-Sequenz innerhalb einer Population mindestens zwei Allele existieren, von denen das seltenere in einer Stichprobe der Population mindestens ein Mal unter 100 Chromosomen vorkommt (Speich und Grzeschik, 1997).

Jeder Genlocus erhält nach dem Buchstaben D die Nummer des Chromosoms auf dem er liegt, ein S, wenn das Segment singulär im Genom vorkommt und eine fortlaufende Nummer, die von der Genome Database (GDB) an der John Hopkins Universität vergeben wird (z.B. D4S412) (Speich und Grzeschik, 1997).

Ein wichtiges Kennzeichen dieser DNA-Polymorphismen ist ihr Informationsgehalt. Der Informationsgehalt des polymorphen Markerabschnitts eines Chromosoms ergibt sich aus der

Heterozygotität, in deren Bestimmung die Parameter Allelzahl und Häufigkeit mit eingehen. Polymorphismen sind hochinformativ, wenn zahlreiche Allele mit vergleichbar hoher Häufigkeit in der Bevölkerung existieren. Dies trifft z.B. auf einen Polymorphismus mit 10 verschiedenen Allelen, von denen jedes eine Allelfrequenz von 10% in der Bevölkerung aufweist, zu. Dagegen hat ein Polymorphismus mit nur zwei Allelen, die jeweils mit einer Häufigkeit von jeweils 50% in der Bevölkerung vorliegen, einen weitaus geringeren Informationsgehalt.

Damit ein Polymorphismus als Marker zur Erstellung einer genetischen Karte verwendet werden kann, muss sein Informationsgehalt (Heterozygotität), seine Lage auf einem bestimmten Chromosomenabschnitt und sein genetischer Abstand in cM bestimmt werden.

Als genetische Marker mit hohem Informationsgehalt bieten sich Mikrosatelliten an. Dies sind DNA-Bereiche, in denen sich Di-, Tri- oder Tetranukleotidsequenzen in Folge wiederholen. Sie sind auch unter der Bezeichnung STRs (Short interspersed Tandem Repeats) bekannt. Repetitive Einheiten aus Di-, Tri- oder Tetranukleotiden sind hoch polymorph (Strachan und Read, 2000). So kann sich z.B. in einem Allel an einem bestimmten Locus das Tandem Repeat 28-mal wiederholen, während bei einem zweiten Allel dasselbe Tandem-Repeat nur 20-mal nacheinander auftritt.

Umfassen die Wiederholungseinheiten zwischen 4 und 60 Basenpaare (bp), so spricht man von einem Minisatelliten bzw. einem VNTR-Polymorphismus (Variable Number of Tandem Repeats).

Sind die flankierenden Sequenzen eines Mikrosatelliten bekannt, ist eine Amplifikation des Mikrosatelliten mittels PCR möglich. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Fragmente lässt sich anhand der Länge der Wanderungsstrecke, die von der Molekülgröße abhängt, bestimmen, welche Variante des Tandem-Repeats an die Nachkommen weitergegeben wurde. Daraus kann man schließen, welche Kopie des entsprechend gekoppelten Genlocus vererbt wurde.

Informationen über die Charakteristika des Markers, PCR-Primer-Sequenzen für seine Amplifikation und PCR-Bedingungen stehen im WWW (World Wide Web) unter der Adresse <http://www.gdb.org> zur Verfügung (Speich und Grzeschik, 1997).

Man nimmt an, dass es bis zu 500.000 verschiedene Mikrosatelliten gibt, die über das gesamte Genom verteilt sind. Der geschätzte Abstand zwischen zwei Mikrosatelliten beträgt etwa 7000 bp. Zusätzlich zum oben erwähnten CA-Dinukleotid sind auch CT/AG-Wiederholungen weit verbreitet. Sie erscheinen im Durchschnitt alle 50 bp und haben einen Anteil von 0,2%

am Genom. CG/GC-Wiederholungen treten dagegen nur äußerst selten auf; denn C-Reste, neben denen sich am 3'Ende ein G-Rest befindet, neigen zur Methylierung mit anschließender Desaminierung (Strachan und Read, 2000).

#### **4.3.1. Positionelle Kandidatengenverfahren**

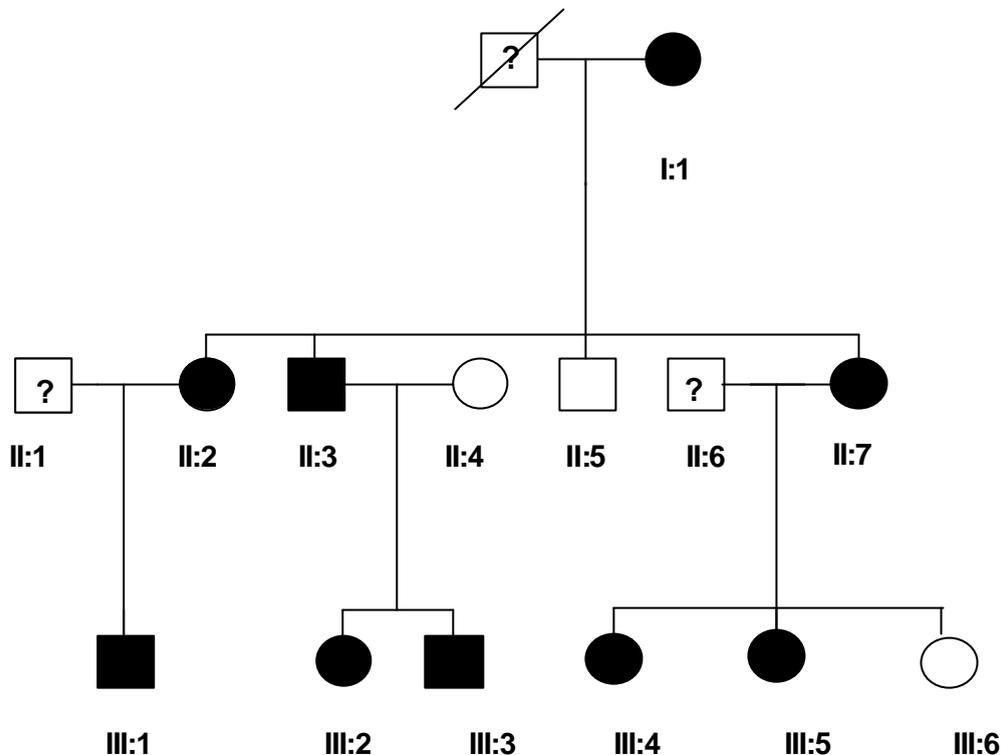
Ist die Position eines Krankheitslocus bekannt, können inzwischen relativ leicht Kandidatengene mit Hilfe einer Datenbanksuche ermittelt werden. Grundsätzlich ist dieser Ansatz eine Weiterentwicklung der positionellen Klonierung, bei der man das im Humangenomprojekt angereicherte Wissen nutzt (Strachan und Read, 2000). Da immer mehr menschliche Gene den verschiedenen chromosomalen Teilbereichen spezifisch zugeordnet werden, wächst die Anwendungsmöglichkeit des positionellen Kandidatengenverfahrens zunehmend.

### **5. Zielsetzung der Arbeit**

Durch Zusammenarbeit mit der Klinik für Phoniatrie und Pädaudiologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg standen 13 DNA-Proben aus einer deutschen Familie zur Verfügung. Bei einigen Familienmitgliedern wurde aufgrund der Familienanamnese und audiologischer Untersuchungsbefunde die Diagnose einer genetisch bedingten, beidseitigen, leicht -bis mittelgradigen, apicochleären Schallempfindungsschwerhörigkeit in den tiefen Frequenzen gestellt. In den Audiogrammen ist bei allen betroffenen Familienmitgliedern im Frequenzbereich zwischen 250 und 1-2 kHz ein Hörverlust von  $50 \pm 10$  Dezibel (dB) erkennbar. Bei den Erwachsenen ist zusätzlich zu dem Hörverlust in den tiefen Frequenzen ein Hörverlust in den hohen Frequenzen vorhanden. Der jüngste Patient zeigte bei Erstuntersuchung im Alter von 3 Jahren die Ausprägung des Phänotyps. Der Hörverlust ist bilateral und symmetrisch. Die Tieftonschwerhörigkeit folgt in dieser Familie einem autosomal-dominanten Erbgang. Da bei den betroffenen Familienmitgliedern durch Untersuchungen keine weiteren Symptome diagnostiziert wurden, die auf eine syndromale Schwerhörigkeit hindeuten, wird eine monosymptomatische Form der Schwerhörigkeit angenommen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll anhand einer Kopplungsanalyse mit Mikrosatellitenmarkern untersucht werden, ob in der vorgestellten Familie ein Hinweis auf eine Kartierung des Krankheitslocus für Tieftonschwerhörigkeit auf bereits bekannte Genloci für autosomal-dominante, nicht-syndromale Tieftonschwerhörigkeit vorliegt. Gene, in denen eine Mutation eine nicht-syndromale, autosomal-dominante Schwerhörigkeit mit Hörverlust in den mittleren

und tiefen Frequenzen bedingt, wurden bisher auf Chromosom 4p16.3 (Genloci DFNA6 und DFNA14) und auf Chromosom 5q31 (Genlocus DFNA1) kartiert.



**Abbildung 3: Ausschnitt aus dem Stammbaum der untersuchten Familie.**

Zeichenerklärung: männl. (□); weibl. (○); schwerhörig (■●), nicht schwerhörig (□○), Personen standen für die Haplotypenanalyse nicht zur Verfügung (?)  
Mit Querstrich versehene Symbole kennzeichnen verstorbene Familienmitglieder.

Ausgehend von den audiologischen Befunden, dem Zeitpunkt des Einsetzens des Hörverlustes sowie dem Progressionsgrad des Hörverlusts wurde bei der Auswahl der Mikrosatellitenmarker auf Van Camp (1999) Bezug genommen, der in einer niederländischen Familie die autosomal-dominant vererbte Tieftonschwerhörigkeit auf die Chromosomregion 4p16.3 kartieren konnte. Zum Ausschluss einer Kartierung des Locus für Tieftonschwerhörigkeit in dieser Familie auf dem Locus DFNA1 (Lynch et al., 1997) wurde eine Kopplung mit zwei Mikrosatellitenmarkern durchgeführt, welche auf dem Chromosom 5q31 die Region des *Diaphorus1*-Gens eingrenzen.

### III Material und Methoden

#### 1. Materialien

##### 1.1. Geräte und Zubehör

DNA-Sequencer, Model 373A	Applied Biosystems / Perkin Elmer, USA
DNA-Sequencer, Model 310	Applied Biosystems / Perkin Elmer, USA
Fluorometer TKO 100	Hofer Scientific Instruments, San Fransisco, USA
Heizblock Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Horizontal Electrophoresis System	Owl Scientific, Inc., USA
Photometer:	
Pharmacia Novospec II	Pharmacia, Schweden
Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Schweden
Bio Rad Smart Spec 2000	Biometra, Göttingen
Pipetten:	
Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Gilson	Gilson, Frankreich
Rotator	GFL, Burgwedel
Spannungsgeber:	
Modell Consort E455	Consort, Belgien
PCR-Maschinen:	
Trio-Thermoblock TB1	Biometra, Göttingen
Waagen:	
Sartorius Modell 2254	Sartorius, Göttingen
Mettler Modell PM 2000	Mettler, Schweiz
Wasserbäder:	
Schüttelwasserbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifugen:	
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
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

Proteinase-K	Boehringer, Mannheim
Eppendorf Master Taq Kit	Eppendorf, Hamburg

## 1.4. Nukleotide

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

## 1.5. DNA-Größenstandards

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

## 1.6. Oligonukleotide

Oligonukleotide	Applied Biosystems
	SIGMA (Taufkirchen)

## 1.7. Fertigsysteme

QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Eppendorf Master Taq Kit	Eppendorf, Hamburg
310 Genetic Analyzer POP-4™	Applied Biosystems

## 1.8. Puffer und Lösungen

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

Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid
----------------------------	-------------------------

---

6x Gelladepuffer	2,5 mg/ml Bromphenolblau 150 mg/ml Ficoll 400,
RCLB-Puffer	10 mM Tris/HCl 10 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,6
SE-Puffer	75 mM NaCl 25 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,0
5x TBE-Puffer	0,5 M Tris 0,5 M Borsäure 10 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA, pH 8,0

## 1.9. Computer-Software

### Verzeichnis der verwendeten Auswerteprogramme:

Programm	Anwendung	Autor/Firma
EASY Store	Geldokumentation,	Herolab, St. Leon-Roth
EASY RH-3	Fragmentgrößenbestimmung	Herolab, St. Leon-Roth
Cyrillic 2.1	Kopplungsanalyse, LOD-Wert-Berechnung	CHEM-Research GmbH Frankfurt
GeneScan Analysis Software 2.1	GeneScan-Auswertung	ABI PRISM

## 1.10. Verwendete Internet-Ressourcen

GDB:	<a href="http://www.gdb.org">http://www.gdb.org</a>
Marshmed:	<a href="http://www.marshmed.org/genetics">http://www.marshmed.org/genetics</a>
Hearing loss Homepage:	<a href="http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/hhhgenes.htm">http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/hhhgenes.htm</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>

## 2. Patientengut

Das genetische Untersuchungsmaterial stammt von einer Familie, in der eine nicht-syndromale, sensorineurale Tiefschwerhörigkeit nach einem autosomal-dominanten Erbgang segregiert. Die Patienten wurden durch die Abteilung für Phoniatrie und Pädaudiologie der Philipps-Universität Marburg betreut. Alle Familienmitglieder wurden über die Intention dieser Studie informiert und ausschließlich nach Einverständniserklärung in die Untersuchung aufgenommen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg geprüft und anerkannt.

Zur Symptomerkenkung und Diagnosesicherung wurden für diese Studie die audiometrischen Arbeitsmethoden: Ohrmikroskopie, sowie die Tympanometrie, Hörschwellenaudiometrie und BERA (*brainstem evoked response audiometrie, dt. Elektrische Reaktionsaudiometrie (ERA)*) angewandt.

## **2.1. Pädaudiologische Untersuchungsmethoden zur Diagnosesicherung bei Verdacht auf genetisch bedingte, nicht-syndromale, sensorineurale Hörstörung**

Alle audiologischen Untersuchungsmethoden wurden ausschließlich in der Klinik für Pädaudiologie und Phoniatrie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

## **2.2. Ohrmikroskopie**

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

## **2.3. 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.

## **2.4. Audiometrie**

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 Knöchenschallhörer, 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, indem subjektiv vom Patienten angegeben wird, zu welchem Zeitpunkt er die obertonfreien Töne der verschiedenen Frequenzen (0,5 kHz; 1 kHz; 2 kHz; 4 kHz und 8 kHz) 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 seitenge-

trennten frequenzspezifischen Erfassung des Hörverlustes, sowie der Differenzierung von Hörstörungen.

## 2.5. Die Elektrische Reaktions-Audiometrie (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 Potenziale“ (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 dienten zwei Arten der BERA der Diagnosesicherung:

### a.) „Click-BERA“

Hierbei dient ein akustischer „Click“-Reiz der Auslösung der FAEP (frühe akustisch evozierte Potenziale). Mit dieser Methode können Aussagen über die Hörschwelle im Bereich von ca. 1-4 kHz 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 kHz; 1 kHz; 2 kHz; 4 kHz, 6 kHz und 8 kHz (Stürzebecher et al., 1996).

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

### **3. Molekulargenetische Methoden**

#### **3.1. Isolierung genomischer DNA aus menschlichen Leukozyten**

(modifiziert nach Miller et al. 1988)

Die Extraktion genomischer DNA aus den kernhaltigen Leukozyten des menschlichen Blutes erfolgte nach Zellyse und anschließendem Proteinabbau durch die Aussalzmethode.

Zur Lyse der Erythrozyten wurden 10 ml EDTA-Blut (Frischblut oder nach Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) mit 30 ml RCLB-Puffer versetzt und für 15 min auf Eis unter regelmäßigem Schwenken der Röhren inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (10.000 U/min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min) sedimentierten die nicht lysierten Leukozyten. Der Überstand mit den lysierten Erythrozyten und dem in späteren Arbeitsschritten störenden Hämoglobin wurde verworfen. Anschließend wurde das Sediment in 30 ml  $4^{\circ}\text{C}$  kalten RCLB gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die im Sediment vorhandenen Leukozyten in 5 ml SE-Puffer resuspendiert und mit 25  $\mu\text{l}$  10 mg/ml Proteinkinase K und 250  $\mu\text{l}$  10% SDS-Lösung versetzt. Der Verdau erfolgt über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter konstantem Schwenken.

Um einen möglichst vollständigen Verdau zu erreichen, erfolgte nach Zugabe von 5 ml SE-Puffer eine erneute Inkubation für 10 min bei  $55^{\circ}\text{C}$ . Nach Lyse der Leukozyten wurden die Proteine durch die Zugabe von 2,5 ml 5 M NaCl dehydriert und präzipitiert. Die Sedimentation der Proteine erfolgte bei einer anschließenden Zentrifugation bei 3000 U/min von 15 min bei Raumtemperatur. Zur Fällung der DNA wurden dem Überstand 45 ml 96%, auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühltes Ethanol hinzugefügt. Nach leichtem Schwenken wurde der DNA-Faden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 100-300  $\mu\text{l}$  TE-Puffer aufgenommen und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte anschließend photometrisch.

#### **3.2. Bestimmung der DNA-Konzentration**

##### **3.2.1. Fluorometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33258. Zur DNA-Konzentrationsbestimmung im Fluorometer wurde die zu untersuchende DNA mit 10 ml 1x TNE sowie mit 1  $\mu\text{l}$  des Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 (1 mg/ml) versetzt.

Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst lagert sich nicht-interkalierend an Nukleinsäuren an, wobei der genaue Mechanismus bisher noch unbekannt ist. Die DNA-Konzentration wird indirekt über die Menge des gebundenen Farbstoffs bestimmt. Aus diesen Gründen muss vor der ei-

gentlichen Messung eine Eichung des Fluorometers (mind. ein Eckwert) mit Hilfe bekannter DNA-Konzentrationen (z.B. Kalbsthymus-DNA, je nach erwarteter Probenmenge in Konzentrationen von 100-1000 ng/ $\mu$ l ) durchgeführt werden. Die Konzentrationen der DNA-Proben kann nun im Vergleich zum Standard ermittelt werden.

### 3.2.2. Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Nukleinsäuren besitzen die Eigenschaft ultraviolettes Licht zu absorbieren, wobei das Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Im Gegensatz dazu besitzen Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, weil hier die Reste der aromatischen Aminosäuren (Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin und Histidin) ihr Absorptionsmaximum haben. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  sollte für eine DNA-Konzentration mit hohem Reinheitsgrad im Bereich von 1,8 liegen. Protein- bzw. Phenolverunreinigung bewirken eine Erniedrigung dieses Wertes. Zur DNA-Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte (OD) von Nukleinsäurelösungen bei bekannten Verdünnungsgraden bei 260 nm und 280 nm mit einem Spektralphotometer gemessen.

Die  $OD_{260}$  von 1 entspricht dabei folgenden Konzentrationen (Sambrook et al, 1989):

Doppelsträngige DNA:	ca. 50 $\mu$ g/ml
Einzelsträngige DNA oder RNA:	ca. 40 $\mu$ g/ml
Oligonukleotide:	ca. 20 $\mu$ g/ml

### 3.3. Polymerasekettenreaktion (Mullis et al., 1986)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können *in vitro* DNA-Sequenzen spezifisch amplifiziert werden. Ein anfänglicher Denaturierungsschritt lässt aus der DNA-Doppelhelix Einzelstränge entstehen, die als Matrize für die Synthese komplementärer Stränge entstehen. Zur Anlagerung der Oligonukleotide an die Einzelstränge wird die Temperatur erniedrigt, wobei die Annealing-Temperatur von den eingesetzten Oligonukleotiden abhängig ist und üblicherweise zwischen 50°C und 60°C liegt. Die Annealing-Temperatur kann mit einer Faustformel berechnet werden, die die Basenzusammensetzung der eingesetzten Oligonukleotidprimer berücksichtigt.

Höhere Anlagerungstemperaturen bewirken in der Regel eine höhere Spezifität. Die Oligonukleotide dienen der DNA-Polymerase als Startpunkt zur Synthese der komplementären Stränge, die man bei 72°C durchführt, da bei dieser Temperatur die für gewöhnlich einge-

setzte Taq-Polymerase ihr Aktivitätsoptimum besitzt. Die Taq-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und toleriert selbst Temperaturen bis 94°C für eine gewisse Zeit. Den Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Oligonukleotidanlagerung und DNA-Synthese, wiederholt man in der Regel 25- bis 35-mal und erhält nach n Zyklen ein theoretisches Maximum von  $2^n$  doppelsträngigen DNA-Molekülen.

### **3.4. Kriterien zur Auswahl genetischer Marker**

Bei der Auswahl der Marker D4S3034, D4S412, D4S2957, D4S3023, D4S2925, D4S432, D4S431, D4S2935, D4S3007, D4S394, D4S2983, D4S3009, die die Genloci DFNA14 und DFNA6 abdecken, wurde auf eine Publikation von Van Camp und Mitarbeitern (1999) Bezug genommen. Zur Definition der Marker wurde die jeweilige Kartenposition nach Généthon (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/>) eingesetzt. Weiterhin konnten nur solche Mikrosatellitenmarker verwendet werden, deren jeweilige Allele bekannt waren und die eine möglichst hohe Heterozygotität aufwiesen. Die einzelnen Allele und ihre Allelfrequenzen in der kaukasischen Bevölkerung sind im Anhang beschrieben (Genome Database; GDB).

### **3.5. Oligonukleotide**

Bei den Oligonukleotiden handelt es sich um natürlich oder chemisch synthetisierte Nukleotidketten, die über Phosphatbrücken miteinander verbunden sind. In der Molekularbiologie werden häufig Oligomere aus 20-40 Nukleotiden benutzt.

Die Amplifikation der genetischen Marker erfolgt mittels PCR-Reaktion, bei der jeweils ein Oligonukleotid mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Farbstoff-Amidit) markiert vorliegt, während das zweite Oligonukleotid unmarkiert ist. Das resultierende PCR-Produkt ist somit anschließend am 5'Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen (Schuster, 1997).

Zur Markierung der Oligonukleotide stehen drei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe (fam: blau, tet: grün, hex: gelb), welche unterschiedliche Emissionsspektren aufweisen, zur Verfügung.

**Tabelle 5: Oligonukleotidinformationen (Chromosom 4p16.3).**

Oligonukleotide	Kartenposition nach Génethon (cM)	Allelgröße	Markierung	Heterozygotität
D4S3034	3,7	182-188	fam	62%
D4S412	3,7	237-249	fam	76%
D4S2957	5,3	105-111	fam	60%
D4S432	5,4	224-254	fam	73%
D4S2925	6,7	151-155	fam	60%
D4S431	10,8	246-270	hex	83%
D4S2935	12,2	112-116	tet	62%
D4S3007	12,3	242-246	hex	62%
D4S394	14,5	189-215	tet	76%
D4S2983	16,1	220-252	tet	87%
D4S3009	21,9	265-279	tet	79%
D4S3023	6,7	147-153	fam	70%

**Tabelle 6: Oligonukleotidinformationen (Chromosom 5q31).**

Oligonukleotide	Kartenposition nach Génethon (cM)	Allelgröße	Markierung	Heterozygotität
D5S399	150,9	116-132	tet	79%
D5S402	144,9	165-169	fam	62%

**Tabelle 7: Oligonukleotidsequenzen für die PCR-Amplifikation der Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 4p16.3 und 5q31.**

Mikrosatelliten	Primer	Sequenz	Länge (bp)	Produktgröße (bp)	Anlagerungstemperatur(°C)
D4S3034	AFMa055tc9a	CTGCCAATAAACTGGGT	17	182-188	50°C
	AFMa055tc9m	TTGCTCACCAAAGAGGTT	18		
D4S412	AFM196xb6a	ACTACCGCCAGGCACT	16	237-249	50°C
	AFM196xb6m	CTAAGATATGAAAACCTAAGGGA	23		
D4S2957	AFMb016xg9a	TGGGGAAGTCAGGCATACAC	20	105-111	51°C
	AFMb016xg9m	CCCCTCAGCACGTTGTAAA	19		
D4S432	AFM266wb9a	ACTCTGAAGGCTGAGATGGG	20	224-254	55°C
	AFM266wb9m	CTGAACCGCAGATCCCC	17		
D4S2925	AFM163yc1a	TCAGAAACCCCTACAGGAAA	20	151-155	50°C
	AFM163yc1m	TTTGATGAGTTATTCGGAGG	20		
D4S431	AFM262vg9a	AGGCATACTAGGCCGTATT	19	246-270	55°C
	AFM262vg9m	TTCCCATCAGCGTCTTC	17		
D4S2935	AFMa247xb5a	GCTCACAGAAGTGCCCAATA	20	112-116	50°C
	AFMa247xb5m	CCCTGGGTGAAGTTTAATCTC	21		
D4S3007	AFM292ya5a	ATTTTTGCTACATTGGTGACATA	22	242-246	57°C
	AFM292ya5m	CTTCAGGTTCTACTAGTTCATGG	22		
D4S394	AFM037yg1a	CCCTTGAGCATCCTGACTTC	20	189-215	59°C
	AFM037yg1m	GAGTGAGCCCCTGTACTCCA	20		
D4S2983	AFM265yh5a	TGTCCAGTTGGCAGGG	16	220-252	55°C
	AFM265yh5m	GGTCGCATTCATTCGC	16		
D4S3009	AFM308wb9a	ATGGCCTGTGAATCAACCC	19	265-279	55°C
	AFM308wb9m	AATCCTTTGAAGACGGCCC	19		
D4S3023	AFMa046xh1a	ACCTCACTGGAACTAAATGG	21	147-153	55°C
	AFMa046xh1a	TGAACAGCAGCGGTCT	16		
D5S399	AFM108xe3a	GAGTGATCAGTCAGGGTGC	20	116-132	55°C
	AFM108xe3m	GGCCTCAACTTCATAATCAA	20		
D5S402	AFM127xh4a	TTAAAGAAGGTTACAGGGAA	21	165-169	55°C
	AFM127xh4m	TCAGGAAGTTAAGATGGTGA	21		

Die PCR-Bedingungen zur Amplifikation der Mikrosatelliten wurden standardmäßig mit genomischer DNA unter folgenden Bedingungen ausgetestet. Es wurde das Eppendorf Master Taq Kit verwendet. Da ein Thermocycler mit beheizbarem Deckel zur Verfügung stand, mussten die Reaktionsansätze nicht mit Paraffin überschichtet werden. Dem letzten Zyklus wurde eine 10 min Synthesephase angeschlossen, um doppelsträngige DNA als Produkt zu erhalten. Zur Überprüfung der PCR wurden die Produkte in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht mit einem Geldokumentationssystem aufgenommen.

### Reaktionsansatz A

10x PCR-Puffer	5,0	μl
dNTPs (20 mM)	0,25	μl
Primer forward (100 ng/μl)	0,5	μl
Primer reverse (100 ng/μl)	0,5	μl
Taq-Polymerase (4 U/μl)	0,125	μl
DNA (100 ng/μl)	2,0	μl
A. bidest.	ad 25,0	μl

### Reaktionsansatz B

10x PCR-Puffer	5,0	μl
dNTPs (20 mM)	0,25	μl
Primer forward (100 ng/μl)	0,5	μl
Primer reverse (100 ng/μl)	0,5	μl
Taq-Polymerase (4 U/μl)	0,125	μl
DNA (100 ng/μl)	2,0	μl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,5	μl
Formamid	1,0	μl
A. bidest.	ad 25,0	μl

**Reaktionsansatz C**

10x PCR-Puffer	5,0	μl
dNTPs (20 mM)	0,25	μl
Primer forward (100 ng/μl)	0,5	μl
Primer reverse (100 ng/μl)	0,5	μl
Taq-Polymerase (4 U/μl)	0,125	μl
DNA (100 ng/μl)	2,0	μl
Formamid	0,5	μl
A. bidest.	ad 25,0	μl

**Reaktionsansatz D**

10x PCR-Puffer	5,0	μl
dNTPs (20 mM)	0,25	μl
Primer forward (100 ng/μl)	0,5	μl
Primer reverse (100 ng/μl)	0,5	μl
Taq-Polymerase (4 U/μl)	0,125	μl
DNA (100 ng/μl)	2,0	μl
DMSO	1,25	μl
A. bidest.	ad 25,0	μl

Folgendes PCR-Programm wurde standardmäßig benutzt:

Schritt 1:	5 min	94°C
Schritt 2:	1 min	94°C
Schritt 3:	1 min	siehe Tabelle 8
Schritt 4:	1 min	72°C
Schritt 5:	5 min	72°C
Schritt 6	∞	4°C

Schritte 2-4 wurden 35-mal wiederholt.

**Tabelle 8: Optimierte Bedingungen für die Durchführung der PCR-Amplifikation der verwendeten genetischen Marker.**

Verwendete Annealing-Temperatur	Optimierter Reaktions-ansatz	Oligonukleotidpaare für genetische Marker
50°C	A	D4S3034
		D4S412
		D4S2925
		D4S2935
51°C	D	D4S2957
55°C	B	D4S432
57°C	A	D4S3007
55°C	A	D4S431
		D4S2983
		D4S3009
		D4S3023
		D5S402
59°C	C	D5S399
		D4S394

### 3.6. Aufreinigung von PCR-Produkten mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)

Um PCR-Produkte für die GeneScan-Analyse einsetzen zu können, mussten die Taq-Polymerase, überschüssige dNTPs sowie störende Zusätze und Salze entfernt werden. Die Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe des 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 Waschschrirte gereinigt, und schließlich in H<sub>2</sub>O eluiert. Zur Kontrolle und zur Abschätzung der DNA-Konzentration wurden 2 µl des Eluates in einem Agarosegel aufgetrennt.

### 3.7. Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989)

Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatreste bei alkalischem pH-Wert können DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe durch ein elektrisches Feld aufgetrennt werden. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle im elektrischen Feld im Wesentlichen von ihrer Größe, der Höhe der angelegten Spannung und der Konzentration des Gels ab (Sambrook et al., 1989).

Bei der vorliegenden Arbeit wurde eine Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarosegel in 1x TBE-Puffer bei 100 Volt über 40 Minuten durchgeführt. Zur Abschätzung der Größe der einzelnen PCR-Produkte wurde ein 100 bp Ladder (Gibco BRL, Eggenstein) verwendet.

Zum Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese mit Gel-Ladepuffer gemischt. Durch den darin enthaltenen Zucker (Ficoll) kommt es zu einem Absinken der Proben in die Geltaschen. Durch den im Ladepuffer enthaltenen Farbstoff Bromphenolblau ist eine Abschätzung der Wanderungstrecke der DNA-Moleküle während der Elektrophorese möglich. Bromphenolblau hat eine Wanderungsgeschwindigkeit, die Fragmenten einer Größe von etwa 100 bp entspricht, wohingegen Xylencyanol mit Fragmentgrößen von etwa 800 bp im Gel wandert. Die Färbung der DNA-Fragmente erfolgte durch Ethidiumbromid, welches in einer Konzentration von 0,3 µg/ml dem Gel zugefügt wurde.

Ethidiumbromid besitzt ein aromatisches Molekülgerüst und lagert sich bevorzugt parallel zwischen benachbarte Basenpaare der DNA ein. Da Ethidiumbromid die Fähigkeit zur Fluoreszenz besitzt und die Intensität des emittierten Lichts proportional zur Menge der in der DNA interkalierten Ethidiumbromid-Moleküle ist, kann man sowohl DNA im Gel sichtbar machen als auch deren Konzentration durch Vergleich mit Banden bekannter Konzentration abschätzen.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Dokumentation unter UV-Licht (302 nm) mit einem Geldokumentationssystem aufgenommen.

### **3.8. Automatisierte Allelbestimmung / GeneScan**

Die Längenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgt in einem automatischen DNA-Sequenziergerät (DNA-Sequenzier, Modell 310 und Modell 373A, Applied Biosystems/Perkin Elmer, USA) mit Hilfe eines internen Längenstandards.

Nach erfolgter PCR-Reaktion werden die PCR-Produkte denaturiert und die DNA-Einzelstränge zusammen mit einem internen Längenstandard elektrophoretisch in einem automatischen DNA-Sequenziergerät aufgetrennt. Da sich die Größe zweier Allele eines Locus nur um zwei Basenpaare unterscheiden kann, ist zu ihrer Analyse eine Auftrennung in einer hochauflösenden denaturierenden Acrylamidmatrix notwendig. Während der Elektrophorese werden die fluoreszenzmarkierten Fragmente mit Hilfe eines Lasers und eines optischen Systems angeregt. Der Längenstandard ist ebenfalls farbstoffmarkiert und kann somit von den zu analysierenden Proben unterschieden werden, die in der gleichen Spur aufgetragen werden, aber mit anderen Farbstoffen versehen sind (Schuster, 1997). Die bekannten Fragmentlängen des

Standards können von der Fragmentlängen-Software (GeneScan Analysis Software 2.1) zur Erzeugung einer Kalibrierungskurve herangezogen werden. Mit Hilfe dieser Kurve ist es möglich, die Längen unbekannter PCR-Produkte durch Extrapolation zu bestimmen. Die gewonnenen Daten werden auf einem Computer für eine automatische Auswertung gespeichert.

Da für die Markierung der PCR-Primer drei Farbstoffe zur Verfügung stehen (die vierte Farbe wird für den internen Längenstandard benötigt), können zunächst auch die Produkte dreier verschiedener PCR-Reaktionen innerhalb einer Gelspur identifiziert werden. Dies wird als Multiplex-Analyse bezeichnet (Speich und Grzeschik, 1997). Die allelische Variation eines Dinukleotid schwankt in einem definierten Größenbereich. Es ist daher durch geschickte Kombination von Markern, deren Allelgrenzbereiche ausreichend differieren, möglich, sogar mehr als drei verschiedene PCR-Produkte in einer Spur gemeinsam aufzutrennen und zu identifizieren (Speich und Grzeschik, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren der Multiplex-PCR-Reaktion aufgrund der geringen Anzahl der zu analysierenden Marker nicht verwendet.

### **3.9. Standardisierung der Nachweismethode von Mikrosatelliten**

Um die Ergebnisse der Allelgrößenbestimmung zu standardisieren und die computergestützte Auswertung zu erleichtern, wurden die Untersuchungen um die Bestimmung der Allelgröße einer allgemein zugänglichen Standard-DNA erweitert. Die PCR-Amplifikation wird damit intern kontrolliert (Spurr, 1991). Die Länge des PCR-Produkts variiert bei verschiedenen Markierungsmethoden, bei verschiedenen Typen der verwendeten Polymerase und dadurch, welcher der beiden Primer bei Primerendmarkierung kinasiert wird (Spurr, 1991).

Als Standard dienen die bekannten Allelgrößen einer international festgelegten DNA-Probe der Person 134702 aus dem Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH), nach der die bei den untersuchten Familienmitgliedern bestimmten Allelgrößen korrigiert wurden. Bei diesen CEPH-Kontrollen handelt es sich um die DNA bestimmter Personen aus einer Sammlung von Familien mit idealer Familienstruktur (die CEPH-Familien bestehen aus drei Generationen, alle vier Großeltern stehen zur Verfügung und es gibt mindestens 8 Kinder).

## 4. Statistische Methoden

In der Statistik betrachtet man beobachtete Messwerte als eine Stichprobe aus der Grundgesamtheit aller theoretisch möglichen Messungen. Ein statistischer Test untersucht, ob die Unterschiede zweier Stichproben durch zufallsbedingte Streuung zu erklären sind, die Stichproben also aus derselben Grundgesamtheit stammen. Andernfalls liegt tatsächlich ein Effekt vor und es handelt sich um Stichproben aus zwei verschiedenen Grundgesamtheiten.

Es werden zwei Hypothesen aufgestellt. Die Nullhypothese  $H_0$  besagt, dass die beiden verglichenen Grundgesamtheiten hinsichtlich des untersuchten Parameters übereinstimmen. Unter dieser Annahme wäre ein in der Stichprobe beobachteter Effekt ein Produkt des Zufalls. Die Alternativhypothese  $H_1$  besagt, dass der in der Stichprobe gefundene Effekt auch in der Grundgesamtheit existiert, sich also die beiden Grundgesamtheiten hinsichtlich des betrachteten Parameters tatsächlich unterscheiden.

Ein statistischer Test ist ein Entscheidungsverfahren, um zu ermitteln, ob die Nullhypothese  $H_0$  mit den vorliegenden Daten vereinbar ist. Es wird errechnet mit welcher Wahrscheinlichkeit sich die vorliegenden Ergebnisse zufällig ergeben können, wenn  $H_0$  tatsächlich zuträfe. Ist diese Wahrscheinlichkeit geringer als das zuvor festgesetzte Signifikanzniveau, wird  $H_0$  verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  entspricht der Wahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Art, nämlich die Nullhypothese aufgrund der Stichprobe zu verwerfen, obwohl sie zutrifft. Meist setzt man das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$ . Bei einem statistischen Test errechnet man aus den Untersuchungsdaten die Testgröße und ermittelt den zugehörigen p-Wert. Der p-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, eine mindestens so große Prüfgröße wie aus den Daten berechnet zu erhalten, wenn im Wirklichkeit die Nullhypothese gilt; d.h. der p-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, mit der man sich irrt, wenn man die Nullhypothese ablehnt. Ist  $p < \alpha$  wäre die beobachtete Abweichung beim Zutreffen der Nullhypothese zwar möglich, aber doch so unwahrscheinlich, dass die Nullhypothese verworfen wird.

### 4.1. Zwei-Locus-LOD-Wert-Analyse

Kopplungsanalysen beruhen auf der Beobachtung, dass zwei verschiedene Loci auf einem Chromosom um so eher gemeinsam vererbt werden, je näher sie beieinander liegen. Je weiter zwei Genloci auf einem Chromosom voneinander entfernt liegen, um so größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie durch meiotische Rekombination getrennt werden. Die Rekombinationsrate  $\theta$ , definiert als Wahrscheinlichkeit einer Rekombination zwischen zwei Loci, ist daher

auch ein Maß für den Abstand zweier Loci. Als Wahrscheinlichkeit ist die Rekombinationsrate  $\theta$  dimensionslos. Der Abstand auf einer Genkarte zwischen zwei Loci, die eine Rekombination von einem Prozent zeigen, beträgt per Definition ein centi Morgan (cM). Liegen zwei Loci auf verschiedenen Chromosomen, werden sie unabhängig voneinander vererbt und  $\theta = 0$ . Die Rekombinationsrate liegt also zwischen 0.5 („freie Rekombination“) und 0 („komplette Kopplung“):

$$0 \leq \theta \leq 0.5$$

Mit einer Kopplungsanalyse wird überprüft, ob ein ausgewählter Marker und der hypothetische Krankheitslocus überzufällig häufig miteinander gekoppelt vererbt werden oder nicht (Ott, 1999).

Nach der Nullhypothese  $H_0$  werden Marker und Erkrankung voneinander unabhängig vererbt. Nach der Alternativhypothese  $H_1$  sind sie gekoppelt:

$$H_0: \theta = 0.5$$

$$H_1: \theta < 0.5$$

Die Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen jeder Hypothese errechnet sich aus der Wahrscheinlichkeit, mit der bei ihrer Gültigkeit die Beobachtungsdaten zu erwarten sind:

$$L(H_0) = L(\theta = 0.5) = P(\text{Daten} | H_0)$$

$$L(H_1) = L(\theta = \theta_1) = P(\text{Daten} | H_1)$$

Daraus wird die relative Kopplungswahrscheinlichkeit  $R$  (odds ratio) gebildet:

$$R = L(H_1) / L(H_0)$$

Der dezimale Logarithmus von  $R$  ist der sogenannte *LOD-Wert*  $Z$  (logarithm of the odds ratio)

$$Z(\theta_1) = \log_{10}(R)$$

Trifft die Nullhypothese zu und Marker und Krankheitslocus werden unabhängig voneinander vererbt, ist die Wahrscheinlichkeit für Kopplung und Nichtkopplung gleich groß und der LOD-Wert kleiner Null:

$$\theta = 0.5$$

$$L(H_1) = L(H_0) = L(\theta = 0.5)$$

$$Z(\theta_1) = \log_{10}(L(H_1)/L(H_0)) = \log_{10}(1) = 0$$

Wenn dagegen  $H_1$  zutrifft und Marker und Krankheitslocus gekoppelt vererbt werden, wird  $L(H_1) > L(H_0)$  und  $Z(\theta_1)$  nimmt größere Werte an.

Die LOD-Werte werden für eine Reihe von  $\theta$ -Werten zwischen 0 und 0.5 berechnet. Um über die Annahme oder Ablehnung der Hypothesen zu entscheiden, sind im Voraus kritische Schwellenwerte für Z festgelegt.

Wenn  $Z > +3$  ist, wird das Testergebnis bei Kopplungsanalysen mit Krankheitsloci auf Autosomen für signifikant erklärt, und die Nullhypothese kann verworfen werden (Morton, 1995). Das entspricht einem Wahrscheinlichkeitsverhältnis Kopplung/Nichtkopplung von 1000 : 1, d.h. es ist 1000-mal wahrscheinlicher, die gegebenen Daten zu erhalten, wenn  $H_1$  zutrifft, als diese Daten zu erhalten, wenn  $H_0$  zutrifft (Strachan und Read, 2000). Die Wahl des Schwellenwertes ergibt sich aus der gewünschten Falschpositivenrate von 5% und der Berücksichtigung der sogenannten *a priori* Wahrscheinlichkeit, mit der zwei zufällig ausgewählte Loci gekoppelt vorliegen. Sie wird auf 1 : 50 geschätzt, so dass nur noch ein Verhältnis von 20 zu 1 für Kopplung resultiert, was dem üblichen Grenzwert für Signifikanz ( $\alpha = 0.05$ ) entspricht (Ott, 1999). Ist  $Z < -2$ , muss die Kopplungshypothese verworfen werden. Für Werte zwischen  $Z = -2$  und  $Z = +3$  sind bei Kopplungsanalysen mit hypothetischen Krankheitsloci auf Autosomen keine Angaben möglich.

Für die Kartierung eines Markers mit einem Krankheitslocus geht man üblicherweise von einem Zwei-Locus-LOD-Wert aus, der zeigt, dass der Krankheitslocus in der Nähe eines bestimmten Markers liegt. Die Zwei-Locus-LOD-Werte werden für jedes Locipaar (hypothetischer Krankheitslocus und einer der Mikrosatellitenmarker) durch ein spezielles Computerprogramm (z.B. Cyrillic) errechnet.

## 4.2. Multimarkerkartierung

Kopplungsanalysen lassen sich effizienter durchführen, wenn man gleichzeitig die Daten von mehr als zwei Loci analysiert (Strachan und Read, 2000). Der Vorteil einer Multimarkerkartierung besteht darin, dass Probleme vermieden werden, die durch den geringen Informationsgehalt von Markern entstehen. Voraussetzung für eine Multimarkerkartierung mit dem Computer ist eine genetische Karte, in der man diesen Marker einordnen kann. Ziel ist es, das Krankheitsgen innerhalb der vorgegebenen Markerkarte einem der Abschnitte zwischen zwei Markern zuzuordnen. Es wurden dabei die Programme FASTMAP und GENEHUNTER verwendet. Die Programme bestimmen die Lokalisation des Krankheitslocus auf der Markerkarte, indem sie für jede mögliche Position anhand der Stammbaumdaten die Gesamtwahrscheinlichkeit berechnen. Das Ergebnis ist eine Kurve, bei der die Wahrscheinlichkeitswerte gegen die Position in der Karte aufgetragen sind. Der höchste Punkt markiert die wahrschein-

---

lichste Position des Krankheitslocus. Wenn die Kurve über den gesamten chromosomalen Abschnitt hinweg unterhalb eines LOD-Wertes von  $Z = -2$  bleibt, kann eine Kopplung des Krankheitslocus mit diesem Chromosomenabschnitt ausgeschlossen werden.

## IV Ergebnisse

### 1. Auswertung der Tonschwellenaudiogramme

Zur phänotypischen Charakterisierung der Familie mit einer autosomal-dominanten Form einer Tieftonschwerhörigkeit wurden alle für die Studie zur Verfügung stehenden betroffenen Familienmitglieder (n=8) einer Tonschwellenaudiometrie unterzogen. Hierbei sind Rückschlüsse auf vorliegende Hörverluste in bestimmten Frequenzbereichen möglich, die in dB (Schalldruckpegel) angegeben werden. Es wurden sowohl die Knochen- als auch die Luftleitung jeweils separat für das linke und rechte Ohr ermittelt.

Dabei wurde jedem untersuchten Familienmitglied über Kopfhörer Töne in verschiedenen Frequenzen dargeboten. Die Frequenz eines Tons wird in Hertz (Hz) angegeben. Der im Tonaudiogramm gemessene Frequenzbereich liegt zwischen 0,125 kHz und 8 kHz. In den in der Abbildung 4 dargestellten Audiogrammen wurden die Frequenzen 0,125 kHz; 0,25 kHz; 0,5 kHz; 1 kHz; 2 kHz; 4 kHz; 6 kHz und 8 kHz geprüft.

Die Messung wurde mit Tönen mit Schalldruckpegeln im sicher unterschwelligem Bereich begonnen und der Schalldruck langsam erhöht, bis der Patient eine Hörempfindung angab. Die hierdurch erhaltenen Werte wurden in ein standardisiertes Diagramm eingetragen. In diesen Formularen ist (als Referenzwert) die Hörschwelle eines nicht Hörgeschädigten mit einem Hörverlust von 0 dB als waagerechte Linie dargestellt. Wurden bei den Patienten höhere Schalldruckpegel zur Hörbarkeit eines Tons einer bestimmten Frequenz benötigt, wurden diese im Diagramm nach unten abgetragen und als Hörverlust (gemessen in dB) bezeichnet.

Um bei den Familienmitgliedern die Knochenleitung zu ermitteln, wurde anstelle eines Kopfhörers ein Schwingkörper verwandt, der auf den Warzenfortsatz (Os mastoideum) des zu überprüfenden Ohres aufgesetzt wurde und den Schädelknochen dadurch direkt zu Schwingungen angeregt.

Die in Abbildung 4 dargestellten Audiogramme zeigen bei allen 8 betroffenen Familienmitgliedern einen moderaten, bilateralen Hörverlust von bis zu 80 dB in den tiefen bis mittleren Frequenzbereichen. Luft- und Knochenleitung sind hiervon gleichermaßen betroffen. Bezüglich der Ausprägung der Hörstörung lassen sich die Familienmitglieder in verschiedene Gruppen einteilen.

Die untersuchten Familienmitglieder in der ersten bis fünften Lebensdekade (Generation II (B) und Generation III(C)) zeigen zusätzlich zu einem Hörverlust von bis zu 80 dB in den tiefen und mittleren Frequenzen einen Anstieg der Hörschwellenkurven im hohen Frequenzbereich (oberhalb eines Frequenzbereich von 1-2 kHz). Das Hörvermögen dieser Patienten-

gruppe gleicht sich besonders bei Frequenzen über 4 kHz zunehmend dem Hörvermögen Normalhörender an. Innerhalb der Patientengruppe ist zu beobachten, dass die Steilheit des Anstiegs der Hörschwellenkurve altersabhängig zu sein scheint. Dies wird insbesondere durch die Auswertung der Hörschwellenkurve des Patienten I:2 deutlich. Hier zeigt sich eine linear verlaufende Hörkurve im Audiogramm, die auf einen Hörverlust von 60-70 dB in allen Frequenzbereichen hindeutet.

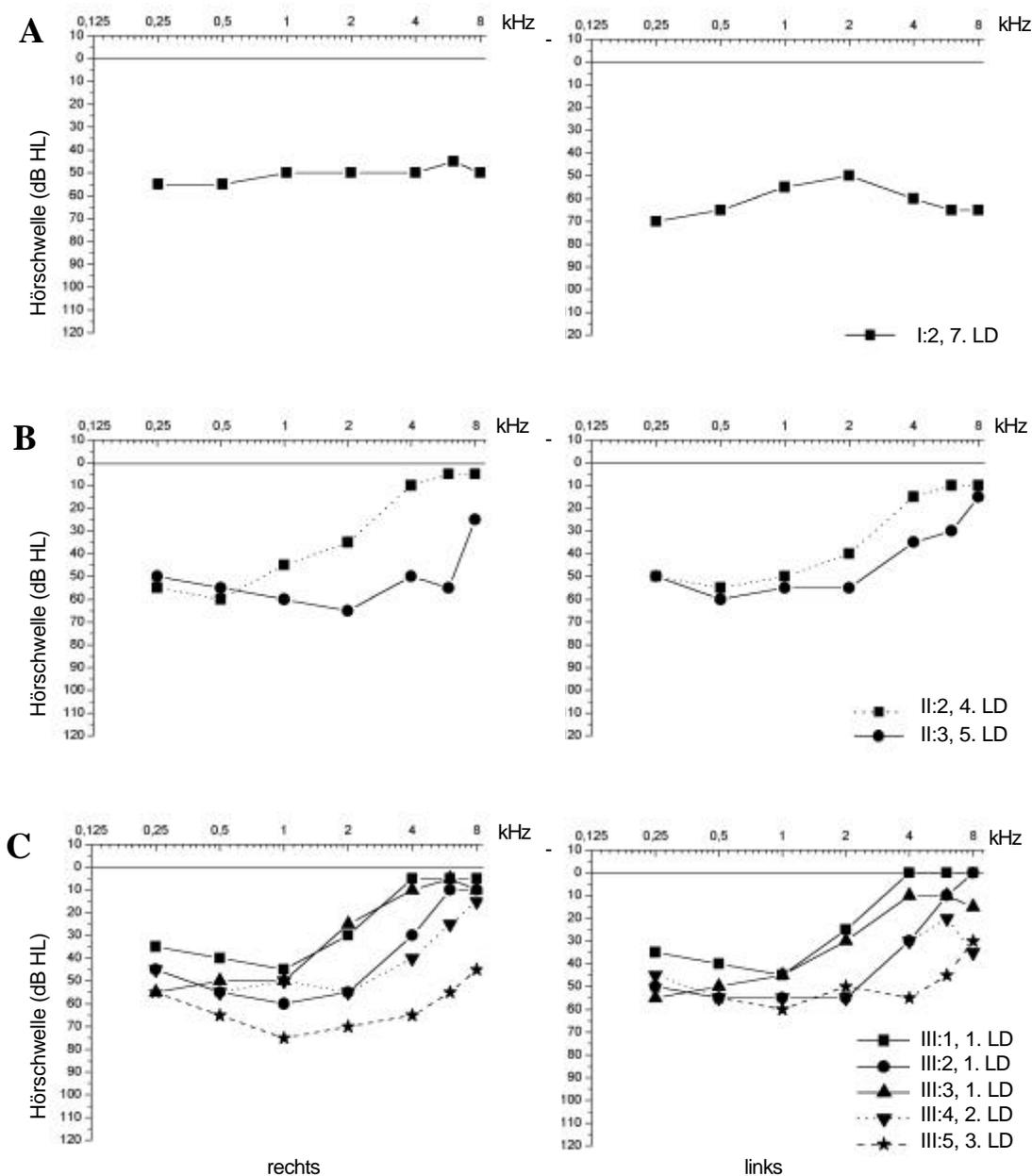
Eine bedeutsame Progression der Schwerhörigkeit ist von der Generationen II zur Generation III nicht vorhanden; wohingegen beim Vergleich der Generationen III und I eine deutliche Progression der Schwerhörigkeit mit Betonung der höheren Frequenzen festzustellen ist. Dagegen zeigt sich keine Progression des Hörverlustes im Tieftonbereich. Die Verminderung des Hörvermögens in den hohen Frequenzbereichen könnte auf das Vorliegen einer Presbiakusis zurückzuführen sein.

## 2. Auswahl der für die Kopplungsanalyse verwendeten Marker

Die Festlegung auf die Untersuchung der beiden Genloci DFNA6 und DFNA14 erfolgte aufgrund von Hinweisen aus der Literatur (Van Camp et al., 1999). Um möglichst aussagekräftige Ergebnisse für die Kopplungsanalyse zu erzielen, wurden die Marker auf dem Chromosom 4 so gewählt, dass sie einen Bereich von etwa 20 cM abdecken. Zum Ausschluss einer Kartierung des Krankheitslocus für Tieftonschwerhörigkeit auf dem Chromosom 5 wurde eine Kopplungsanalyse mit Mikrosatellitenmarkern, die das Gen *Diaphorus1* (DFNA1, Lynch et al., 1997) flankieren, durchgeführt.

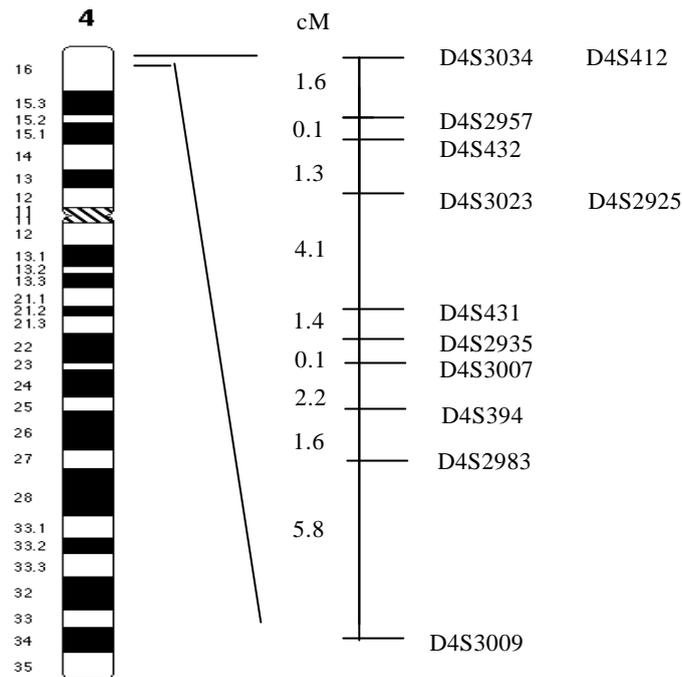
Es wurden nur solche Mikrosatellitenmarker in den Untersuchungen verwendet, deren jeweilige Allelgrößen bekannt und die hoch polymorph sind. Zur Definition der Markerpositionen wurde die jeweilige Kartenposition nach Généthon verwendet. Die Allelgrößen sowie ihre Frequenzen in der Bevölkerung sind in Tabelle 11 beschrieben.

In der Abbildung 5 ist die Anordnung der 12 verwendeten Mikrosatelliten in der Chromosomenbande 4p16.3 des kurzen Arms von Chromosom 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Tonschwellenaudiogramme betroffener Familienmitglieder der Generation I (7. Lebensdekade), Generation II (4. und 5. Lebensdekade) und Generation III (1.-3. Lebensdekade).**

Für bestimmte Frequenzen im Bereich von 0,125-8 kHz werden die Lautstärken in Dezibel (dB) bestimmt, die bei den Patienten zu einer Hörempfindung führen. Die ermittelten Werte werden in einem standardisierten Diagramm vermerkt und mit einer Normschwelle verglichen. Die Hörschwellenkurven wurden für das rechte und das linke Ohr separat ermittelt (Luftleitung = Knochenleitung).

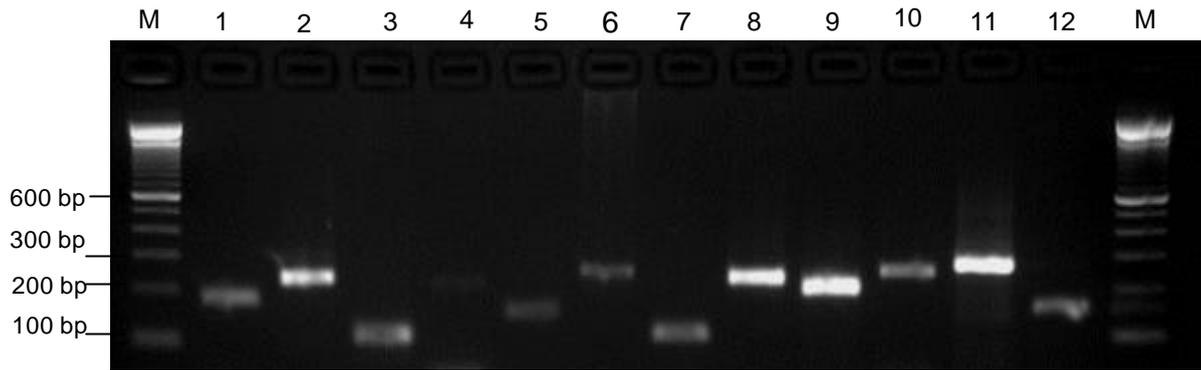


**Abbildung 5: Genetische Karte des Chromosomabschnitts 4p16.3.**

Genetische Karte der chromosomalen Region 4p16.3 mit der Position der Mikrosatellitenmarker, die in dieser Studie verwendet wurden. Die Balken zeigen die Ergebnisse der Kopplungsanalyse bei Familien mit Tieftonschwerhörigkeit, die mit dem Locus DFNA6 (Lesperance et al., 1997) und mit dem Locus DFNA14 (Van Camp et al., 1999) gekoppelt sind. Die Distanzen zwischen den Markern beziehen sich auf die Génethon-Karte (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/>).

### 3. Optimierung der Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation der Mikrosatellitenmarker

Für die Amplifikation der Mikrosatellitenmarker mit Hilfe der Oligonukleotidprimer D4S3034-D4S3023 wurde genomische DNA der einzelnen Familienmitglieder verwendet. Die Abbildung 6 zeigt das Ergebnis der in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte. Exemplarisch wird hier die gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Mikrosatellitenmarker D4S3034-D4S3023 des Familienmitglieds III:3 dargestellt. In der ersten sowie in der letzten Spur der Abbildung ist ein 100 bp Ladder als Größenstandard aufgetragen. Anhand dieses Größenstandards ist es möglich, die Größe der gewonnenen Fragmente abzuschätzen.



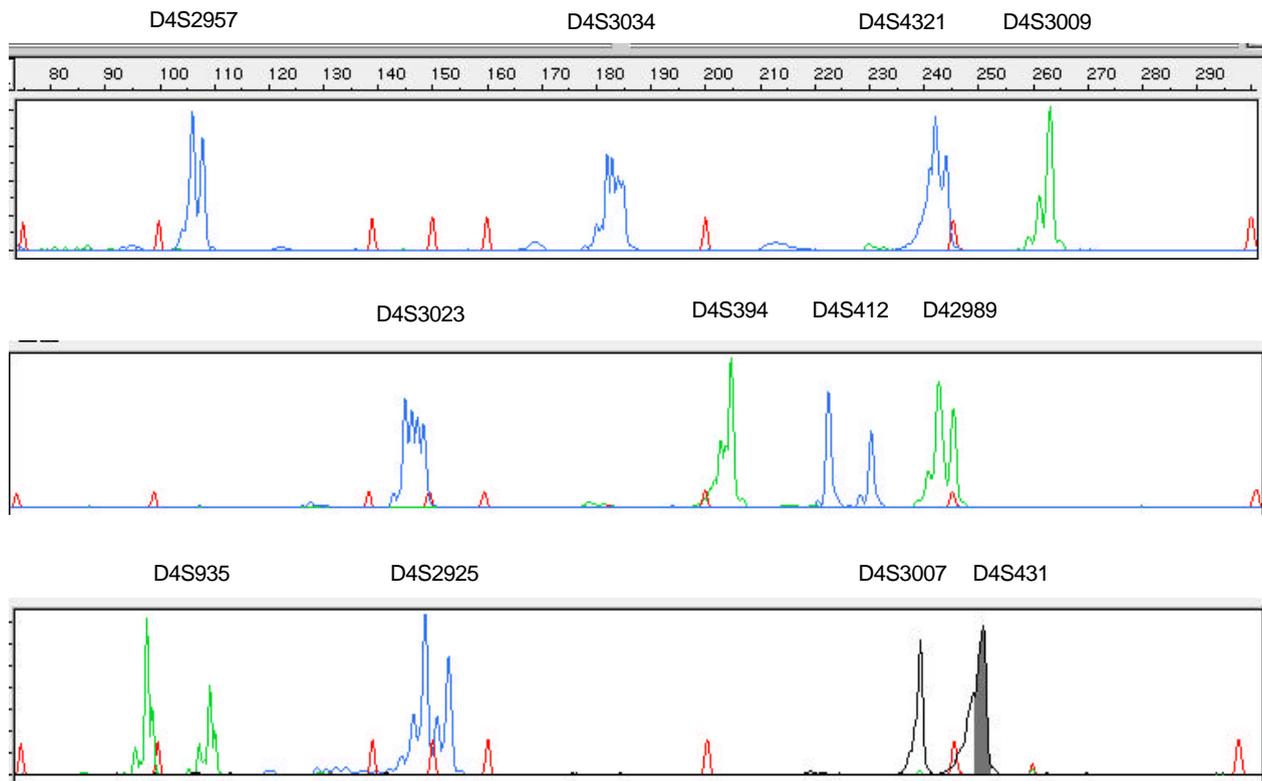
**Abbildung 6: Überprüfung der PCR-Produkte der Mikrosatellitenmarker in der Agarosegelelektrophorese.**

Exemplarische Darstellung der PCR-Produkte aller verwendeten Marker im 2%igen Agarosegel: In der ersten und in der letzten Spur der Abbildung ist ein 100 bp Ladder (Gibco BRL, Eggenstein) als Größenstandard aufgetragen. Die Beschriftung des Größenstandards in Basenpaaren (bp) erfolgt links der Abbildung. In den Spuren 1-12 sind die jeweiligen PCR-Produkte der genetischen Marker aufgetragen (Spur 1: D4S3034, Spur 2: D4S412; Spur 3: D4S2957, Spur 4: D4S2925; Spur 5: D4S432; Spur 6: D4S431; Spur 7: D4S2935; Spur 8: D4S3007; Spur 9: D4S394; Spur 10: D4S2983; Spur 11: D4S3009; Spur 12: D4S3023).

#### 4. GeneScan-Analyse

Die Auswertung der Allelgrößen der amplifizierten Mikrosatelliten erfolgte mit dem 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem/Perkin Elmer, USA). Allele von Dinukleotiden unterscheiden sich in der Regel um ein Vielfaches von zwei Basenpaaren. In der Abbildung 7 ist das Elutionsdiagramm einer GeneScan-Analyse dargestellt. Die PCR-Produkte der einzelnen Allele werden auf Grund ihrer Länge aufgetrennt und erscheinen als Elutionsgipfel. Neben dem eigentlichen Produkt (Hauptgipfel) tauchen weitere Gipfel in der Analyse auf, die auf die fehlerhafte Amplifikation durch die in der PCR verwendeten Polymerase zurückzuführen sind und aus diesem Grund nicht in die Auswertung einbezogen werden dürfen (sogenannte Stotterbanden).

Exemplarisch ist für den Patienten III:1 das Elutionsdiagramm der Allele für jeden der zwölf Mikrosatellitenmarker dargestellt. Die gemeinsame Auswertung der Allele von bis zu 4 Mikrosatellitenmarkern in einem Gellauf ist möglich, da die Größe und die allelische Variation der einzelnen Mikrosatelliten in einem definierten, nicht überlappenden Größenbereich schwankt. Die Größenbestimmung der einzelnen Allele ist in Tabelle 9 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 7: Darstellung der Ergebnisse der Allelgrößenbestimmung bei Patient III:1 in der GeneScan-Analyse.**

Die GeneScan-Analysen zeigen die Allele von Patient III:1 als Elutionsgipfel. Auf der X-Achse der Abbildung ist die Allelgröße in Basenpaaren abzulesen. Die Höhe der Elutionsgipfel ist der Produktmenge der gemessenen PCR-Produkte proportional. Die Darstellung der Allelgrößen von 4 verschiedenen Mikrosatellitenmarkern in einer Spur ist möglich, da die Produktgröße der einzelnen Mikrosatelliten definiert ist. Die schwarz schraffierte Fläche wird vom Computerprogramm zur Größenbestimmung erstellt. Rote Elutionsgipfel stellen den mitgeführten Größenstandard dar.

## 5. Ermittelte Allelgrößen

Zur Standardisierung der Allelgrößen wurde jeweils eine GeneScan-Analyse einer international festgelegten DNA-Probe, der CEPH-Kontrolle Nr. 134702 (CEPH = Centre d'Etude du Polymorphisme Humain) durchgeführt. Die jeweiligen Allelgrößen für die einzelnen Mikrosatellitenmarker waren bekannt (Dib et al, 1996). Aufgrund der durch die eigenen Analysen festgestellten Abweichungen der Werte des CEPH-Standards Nr. 134702 zum Literaturwert konnten die eigenen Daten um die entsprechenden Werte korrigiert werden. Die nach der Größe des CEPH-Standards korrigierten Allelgrößen der jeweiligen Mikrosatelliten für die untersuchten Personen sind in der Tabelle 9 zusammengestellt.

## 6. Haplotypenanalyse

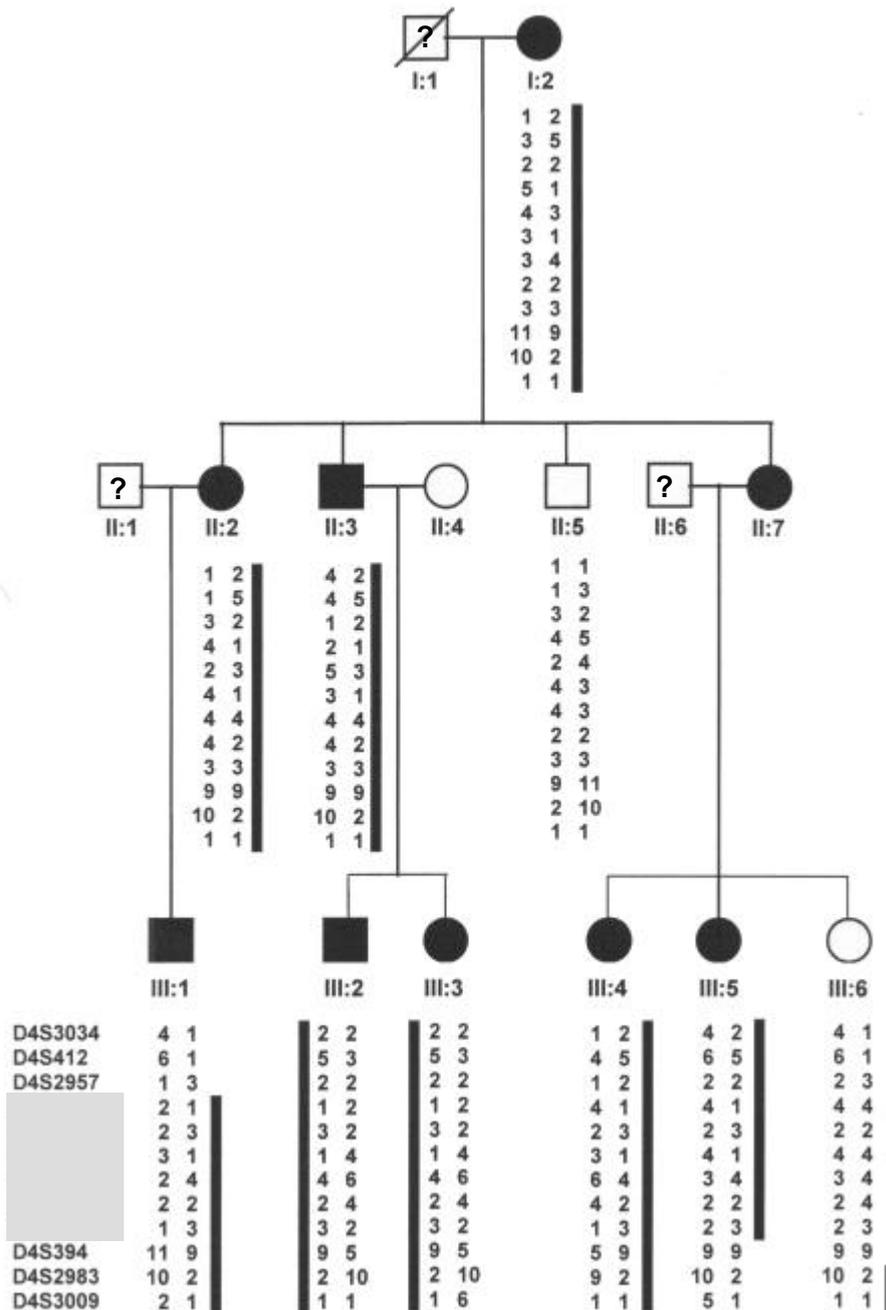
Die Kombination der zwei Allele eines Chromosomenpaares wird als Genotyp bezeichnet. Der Genotyp eines jeden untersuchten Familienmitglieds ist in Tabelle 9 aufgeführt. Als Haplotyp bezeichnet man eine Reihe von Allelen an benachbarten Genloci, die von einem Elternteil stammen. Es gibt einen maternalen und einen paternalen Haplotyp. Die Haplotypen wurden durch das Programm SIMWALK (Version 2.8) berechnet. Die jeweiligen Allelgrößen eines Mikrosatelliten sind durch Zahlen kodiert. Die Angaben der Allelgrößen und ihre Kodierung sind im Anhang angegeben.

Allele, die sich nur bei betroffenen Familienmitgliedern finden und bei nicht betroffenen Familienmitgliedern nicht vorhanden sind, befinden sich zwischen den Mikrosatelliten D4S432 und D4S3007. Dieser Haplotypenabschnitt segregiert ohne durch Rekombinationsereignisse getrennt zu werden bei allen betroffenen Familienmitgliedern. Die Allele der telomerwärts gelegenen Mikrosatellitenmarker D4S3034, D4S412 und D4S2957 und die zentromerwärts dieses Haplotypenabschnittes lokalisierten Mikrosatellitenmarker D4S394, D4S2983 und D4S3009 weisen Allele auf, die sowohl bei schwerhörigen als auch bei hörgesunden Mitgliedern zu finden sind. Der Haplotypenabschnitt zwischen den Markern D4S432 und D4S3007, der mit dem Krankheitslocus assoziiert ist, wird durch meiotische Rekombinationsereignisse begrenzt. Zwischen dem Mikrosatelliten D4S2957 und dem Mikrosatelliten D4S432 hat sich bei der schwerhörigen Person III:1 eine Rekombination ereignet. Ebenfalls eine Rekombination hat zwischen dem Mikrosatelliten D4S394 und dem Mikrosatelliten D4S3007 bei dem hörgesunden Familienmitglied III:6 stattgefunden. Durch die Haplotypenanalyse konnte somit der Bereich für den Krankheitslocus auf ca 7 cM eingegrenzt werden.

**Tabelle 9: Ergebnisse der Allelgrößenbestimmung bei betroffenen und nichtbetroffenen Familienmitgliedern der untersuchten Familien mit Tieftonschwerhörigkeit mit Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 4p16.3 und 5q32.**

Marker	Untersuchte Familienmitglieder										
	I:2	II:2	II:3	II:5	III:1	III:2	III:3	III:4	III:5	III:6	
<b>D4S3034</b>	184/186	184/186	188/186	184/184	188/184	186/186	186/186	184/186	188/186	188/184	
<b>D4S412</b>	243/247	237/247	245/247	237/243	249/237	247/243	247/2437	245/247	249/247	249/237	
<b>D4S257</b>	111/111	107/111	109/111	107/111	109/107	111/111	111/111	109/111	111/111	111/107	
<b>D4S432</b>	254/244	244/224	232/224	224/254	232/244	224/231	224/232	224/222	244/224	244/244	
<b>D4S2925</b>	151/153	149/153	151/153	149/151	151/153	153/149	153/149	151/153	149/153	149/149	
<b>D4S431</b>	250/252	252/252	252/252	252/250	248/252	252/256	252/256	256/252	250/252	250/252	
<b>D4S2935</b>	104/104	114/104	111/104	104/104	104/104	104/114	104/114	111/104	104/114	104/114	
<b>D4S3007</b>	240/240	240/240	240/240	240/240	242/240	240/246	240/246	242/240	246/240	246/240	
<b>D4S394</b>	201/205	205/205	205/205	205/201	201/205	205/197	205/197	197/205	205/205	205/205	
<b>D4S2983</b>	249/246	249/246	249/246	246/249	246/249	246/249	246/249	248/246	249/246	249/246	
<b>D4S3009</b>	265/265	265/265	265/265	265/265	271/265	265/265	265/269	265/265	273/265	265/265	
<b>D4S3023</b>	149/151	143/151	155/151	143/149	143/151	151/143	151/143	143/151	143/151	143/143	
<b>D5S399</b>	118/126	116/116	118/126	118/128	116/118	118/126	118/126	116/128	118/128	118/126	
<b>D5S4002</b>	167/167	165/169	167/169	167/169	165/165	165/165	167/169	167/167	165/167	167/169	

Die ermittelten Allelgrößen wurden um die Größen des CEPH-Standards korrigiert.



**Abbildung 8: Ergebnisse der Haplotypenanalyse der untersuchten Familienmitglieder mit autosomal-dominant vererbter, nicht-syndromaler Tieftonschwerhörigkeit.**

Die ermittelten Haplotypen sind für diejenigen Familienmitglieder dargestellt, bei denen DNA zur Untersuchung zur Verfügung stand. Die schwarzen Balken kennzeichnen den Haplotyp, der mit dem Phänotyp segregiert. Die mit einem Fragezeichen gekennzeichneten Personen standen für die Haplotypenanalyse nicht zur Verfügung. Die Benennung der genetischen Marker erfolgt auf dem linken Abbildungsabschnitt in der dritten Generation des Stammbaums. Die betroffenen Individuen III:1 und III:5 zeigen Schlüssel-Rekombinationen zwischen den Markern D4S2957 und D4S432 und zwischen den Markern D4S3007 und D4S394. Die Lokalisation des Krankheitsgens befindet sich somit am wahrscheinlichsten in der Region zwischen den genetischen Markern D4S2957 und D4S394.

## 7. Zwei-Locus-LOD-Wert-Analyse

Eine statistische Auswertung der Haplotypenanalyse wurde anhand einer Zwei-Locus-LOD-Wert-Berechnung durchgeführt. Aus dieser wird ersichtlich, in der Nähe welchen Markers der Krankheitslocus liegt. Morton (1995) führte den LOD-Wert  $Z$  als den Logarithmus der Chancen ein, dass bestimmte Loci eher gekoppelt (mit einer Rekombinationshäufigkeit  $\theta$ ) als ungekoppelt (Rekombinationshäufigkeit von 0.5) sind. LOD-Werte sind eine Funktion der Rekombinationshäufigkeit  $\theta$ . Sie werden daher für einen Bereich von  $\theta$ -Werten berechnet und der Maximalwert von  $Z$  geschätzt (Strachan und Read, 2000).

Als Grundlage für die Berechnung der LOD-Werte wurde eine Prävalenz für autosomal-dominante, nicht-syndromale Tieftonschwerhörigkeit in der Bevölkerung von 1:100.000 angenommen.

Mit Hilfe des Computerprogramms SIMWALK (Version 2.8) wurde für jedes Locipaar (hypothetischer Locus für Tieftonschwerhörigkeit und einer der Markerloci) LOD-Werte bei Rekombinationsraten  $\theta$  zwischen 0 und 0.4 errechnet. Für die Berechnung mussten zusätzlich zu Penetranz und Prävalenz noch die bekannten Allelgrößen sowie deren Frequenzen und die bei den Untersuchungen erhaltenen Allelgrößen angegeben werden.

Die Ergebnisse der Zwei-Locus-LOD-Wert-Analyse sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Die drei telomerwärts gelegene Mikrosatellitenmarker D4S3034, D4S412 und D4S2957 weisen bei einer Rekombinationsfraktion  $\theta = 0$  einen LOD-Wert unterhalb  $Z = -2$  auf. Für die Mikrosatellitenmarker D4S432, D4S3023 und D4S2925 wurden bei einer Rekombinationsfraktion  $\theta = 0$  maximale LOD-Werte mit  $Z = +2.16$ ,  $+1.93$  und  $+1.99$  gefunden. Es ist zu beobachten, dass mit zunehmender Rekombinationshäufigkeit  $\theta$ , also mit größerer Entfernung des Mikrosatelliten vom hypothetischen Krankheitslocus, weniger positive LOD-Werte ermittelt werden, die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung also abnimmt.

Die LOD-Werte der die untersuchte Region in Richtung Zentromer abgrenzenden Marker D4S431, D4S2935, D4S3007, D4S394, D4S2983, D4S3009 erreichen bei einer Rekombinationsfraktion  $\theta = 0$  Werte von maximal  $Z = +1$ .

Die LOD-Werte die den Genlocus DFNA1 flankierenden Marker D5S399 und D5S402 liegen bei einer Rekombinationsfraktion  $\theta = 0$  in einem Bereich unterhalb  $Z = -2$ . Eine Kopplung des Krankheitslocus mit dem Genlocus DFNA1 kann damit ausgeschlossen werden.

Mit Hilfe der Zwei-Locus-LOD-Wert-Analyse konnte somit der chromosomale Bereich für den Krankheitslocus innerhalb dieser Familie auf einen Bereich von ca. 6 cM eingegrenzt werden.

**Tabelle 10: Ergebnisse der Zwei-Locus-LOD-Wert-Analyse für die genetischen Marker auf Chromosom 4p16.3 und Chromosom 5q31.**

Mit Hilfe des Computerprogramms SIMWALK (Version 2.8) wurden für jedes Locuspaar LOD-Werte bei Rekombinationsraten  $\theta$  zwischen 0 und 0.4 errechnet. Als Grundlage für die Berechnung der LOD-Werte wurde eine Prävalenz für autosomal-dominante, nicht-syndromale Tiefschwerhörigkeit in der Bevölkerung von 1:100.000 angenommen.

Marker	$\theta$						
	0.0	0.01	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
D4S3034	-3.60	-0.60	0.07	0.31	0.43	0.36	0.19
D4S412	-2.64	0.34	0.95	1.11	1.04	0.77	0.39
D4S2957	-3.66	-0.67	-0.04	0.17	0.28	0.25	0.14
D4S432	2.16	2.15	2.08	1.94	1.56	1.08	0.53
D4S3023	1.93	1.94	1.91	1.80	1.46	1.00	0.48
D4S2925	1.99	1.96	1.80	1.60	1.16	0.70	0.30
D4S431	0.12	0.13	0.18	0.19	0.14	0.06	-0.00
D4S2935	0.13	0.21	0.41	0.52	0.57	0.47	0.28
D4S3007	-0.22	-0.21	-0.17	-0.13	-0.07	-0.03	-0.01
D4S394	-1.23	-0.56	-0.01	0.18	0.25	0.18	0.06
D4S2983	-1.13	-1.09	-0.93	-0.77	-0.55	-0.34	-0.14
D4S3009	-0.29	-0.28	-0.23	-0.17	-0.1	-0.04	-0.01
D5S399	$-\infty$	-4,99	-2,81	-1,85	-0,91	-0,43	-0,14
D5S402	$-\infty$	-6,07	-3,32	-2,15	-1,04	-0,48	-0,16

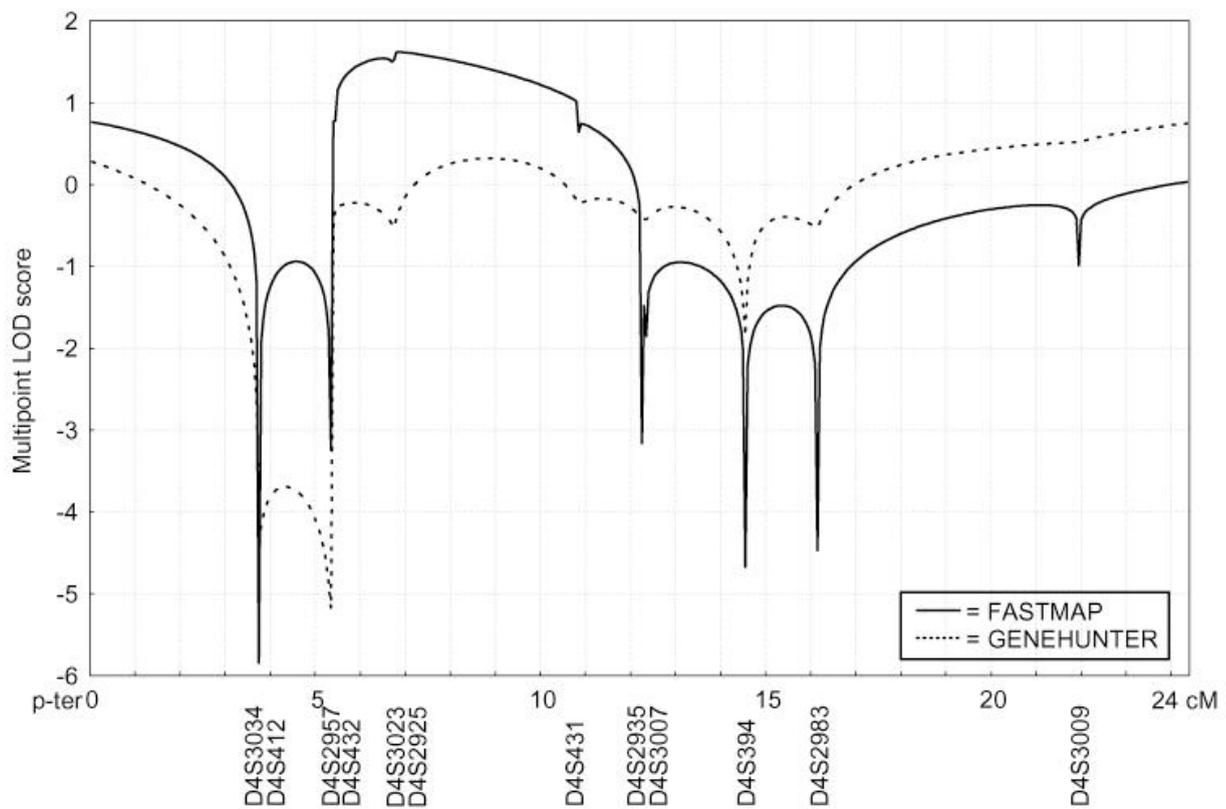
## 8. Multimarkerkartierung

Ziel einer Multimarkerkartierung ist es, das Krankheitsgen innerhalb einer vorgegebenen Mikrosatellitenmarkerkarte einem der Abschnitte zwischen zwei Markern zuzuordnen. Für diese Analyse wurden die Programme FASTMAP sowie GENHUNTER verwendet.

Die Abbildung 9 zeigt die grafische Darstellung der durchgeführten Multimarkerkartierung. Die X-Achse stellt die genetische Karte von Chromosom 4p16.3 zwischen den Markern pter-D4S3034 und D4S3009-cen dar. An der Y-Achse sind die berechneten LOD-Werte aufgetragen. In der Nähe von Markern, die mit dem Krankheitslocus nicht gekoppelt sind, werden die

Werte stark negativ. Dies trifft für die Marker D4S3034, D4S412 und D4S2957 zu. Der höchste Wert der Kurve zeigt die wahrscheinlichste Position des Krankheitslocus an. Anhand der Auswertung mit den Statistik-Programmen GENEHUNTER und FASTMAP ist der höchste Punkt der Kurve zwischen den Markern D4S432 und D4S431 lokalisiert.

Die Chancen für diese Position werden aufgrund des Ausmaßes bestimmt, um das der höchste Wert der Kurve den nächstniedrigeren überragt (Strachan und Read, 2000). Wenn die Kurve über den gesamten chromosomalen Abschnitt hinweg unterhalb eines LOD-Wertes von  $Z = -2$  bleibt, kann dieser Abschnitt ausgeschlossen werden.



**Abbildung 9: Ergebnis der Multimarkerkartierung der genetischen Marker auf Chromosom 4.**

Auf der X-Achse sind die Abstände der genetischen Marker auf dem Chromosomenabschnitt 4p16.3 in centi Morgan (cM) angegeben. Die Kartenposition der Marker sind der Genome Database (GDB) entnommen. Auf der y-Achse der Abbildung sind die berechneten LOD-Werte aufgetragen. Für die Erstellung der Multimarkerkarte sind die Programme FASTMAP sowie GENEHUNTER verwendet worden.

## V Diskussion

Störungen des Hörens im Sinn einer Schwerhörigkeit oder Taubheit stellen den häufigsten primär sensorischen Defekt des Menschen dar. Das Ausmaß der Beeinträchtigung durch den Hörverlust ist weitgehend vom Alter des Einsetzens der Schwerhörigkeit und der Schwere des Hörverlustes abhängig. Bei einem hochgradigen Hörverlust, der bereits in der frühen Kindheit einsetzt, ist eine starke Auswirkung im Hinblick sowohl auf die Sprachentwicklung als auch auf die sozioökonomische Entwicklung der betroffenen Person zu erwarten.

60-70% aller beobachteten Fälle von Schwerhörigkeit in Industrieländern liegt eine genetische Ursache zugrunde (Kalatzis und Petit, 1998; Green et al., 1999). Innerhalb dieser Gruppe treten bis zu 70% nicht-syndromale Formen der Schwerhörigkeit auf (Denoyelle et al., 1998; Kalatzis und Petit, 1998). Mit Hilfe von Positionsklonierungsstrategien konnten in den letzten Jahren bereits 39 Genloci identifiziert werden, in denen ein Gendefekt zu autosomal-dominantem, nicht-syndromalen Hörverlust führt.

Eine besonders die tiefen Frequenzen betreffende nicht-syndromale, autosomal-dominante Schwerhörigkeit ist eine selten auftretende Erkrankung. Als Tieftonschwerhörigkeit wird ein Hörverlust bezeichnet, der sich hauptsächlich im Frequenzbereich unter 2 kHz manifestiert. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten drei Genloci, DFNA1 (Leon et al., 1992), DFNA6 (Lesperance et al., 1995) und DFNA14 (Van Camp et al., 1999) für autosomal-dominant vererbte, nicht-syndromale, sensorineurale Tieftonschwerhörigkeit identifiziert werden, die auf dem Chromosom 5 (DFNA1) und dem Chromosom 4 (DFNA6, DFNA14) lokalisiert sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der genetischen Kopplungsanalyse in einer deutschen Familie mit autosomal-dominant vererbter, nicht-syndromaler Schwerhörigkeit ein Beitrag zur Suche eines Kandidatengens für Tieftonschwerhörigkeit geleistet. Aufgrund sowohl der Familienanamnese sowie audiologischer Untersuchungsbefunde wurde bei Mitgliedern dieser Familie die Diagnose einer monosymptomatischen, beidseitigen, leicht- bis mittelgradigen, apicochleären Schallempfindungsschwerhörigkeit in den mittleren bis tiefen Frequenzen gestellt. In den Audiogrammen ist bei allen Familienmitgliedern im Frequenzbereich zwischen 0,25 kHz und 1-2 kHz ein Hörverlust von  $50 \pm 10$  dB feststellbar. Der jüngste Patient zeigte bei seiner Erstuntersuchung im Alter von 3 Jahren bereits die Ausprägung des Phänotyps. Zu diesem Hörverlust im Tieftonbereich ist bei Mitgliedern im höheren Lebensalter zusätzlich ein Hörverlust in den hohen Frequenzen vorhanden. Eine Entwicklungsverzögerung bezüglich des Spracherwerbs war bei keinem der untersuchten Kinder (III:1; III:2 und III:3) festzustellen. Zur Unterstützung des Sprachverständnisses besitzen jedoch

bereits alle untersuchten Kinder sowie die von Schwerhörigkeit betroffenen erwachsenen Familienmitglieder ein Hörgerät.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der audiologischen Befunde der DFNA6- und der DFNA14-Familien mit den audiologischen Befunden der in dieser Arbeit untersuchten Familie wurde eine Kopplungsstudie mit genetischen Markern, die in der Region der Genloci DFNA6 und DFNA14 kartiert sind, durchgeführt. Eine Kopplung des Krankheitsgens mit dem DFNA6- oder dem DFNA14-Genlocus in der deutschen Familie sollte entweder bestätigt oder ausgeschlossen werden. Bei der Auswahl der Mikrosatellitenmarker (D4S3034, D4S412, D4S2957, D4S432, D4S3023, D4S2925, D4S431, D4S2935, D4S3007, D4S394, D4S2983 und D4S3009) wurde auf die Publikation von Van Camp et al. (1999) Bezug genommen.

Da bis zu einem Alter von 66 Jahren in der untersuchten Familie kein Fall von progredienter Tieftonschwerhörigkeit festgestellt werden konnte, erschien eine Kopplung des Krankheitsgens mit dem oben beschriebenen DFNA1-Genlocus in der untersuchten Familie vom phänotypischen Standpunkt aus nicht sehr wahrscheinlich. Ein Ausschluss der Kopplung des Krankheitslocus für Tieftonschwerhörigkeit in dieser Familie mit dem Genlocus DFNA1 erfolgte durch eine Kopplungsanalyse mit zwei Mikrosatellitenmarkern D5S402 und D5S399, die das *Diaphonus1*-Gen (DFNA1) flankieren.

## 1. Kopplungsanalyse als Methode

In der vorliegenden Arbeit wird das Verfahren der positionellen Klonierung angewandt. Als positionell bezeichnet man die Klonierung eines Gens, von dem außer der Zuordnung zu einer chromosomalen Teilregion nichts bekannt ist (Collins, 1992, 1995). Im Gegensatz zur funktionellen Klonierung, bei der man von einem bestimmten Protein bekannter Funktion ausgeht, steht bei der Strategie der positionellen Klonierung eine chromosomale Lokalisation eines für die Krankheit verantwortlichen Gens am Ausgangspunkt der Untersuchung. Die möglichst enge chromosomale Lokalisation und nachfolgende Klonierung führt schließlich zur Aufklärung der bis dahin unbekanntem Funktion des Gens (Strachan und Read, 2000).

Grundsätzlich beginnt die Identifizierung eines Gens mittels Kopplungsanalyse innerhalb möglichst großer Familien, in denen die Krankheit segregiert. Im günstigsten Fall sind dies Familien, in denen einfache, monogene Merkmale vererbt werden. In der Strategie der Positionsklonierung ist dies der erste Schritt, dem dann die Suche nach der Gensequenz im Intervall zwischen genetischen Markerpunkten durch Methoden der sogenannten physikalischen Kartierung folgt (Speich und Grzeschik, 1997).

Die Aussagekraft einer Kopplungsanalyse wird von mehreren Faktoren beeinflusst, zu denen z.B. die Informativität der verwendeten Mikrosatellitenmarker zählt. Der Informationsgehalt eines Markers ergibt sich aus der Heterozygotität, in deren Bestimmung die Parameter Allel-anzahl und Häufigkeit eingehen (Speich, Grzeschik, 1997). Ein Maß für die polymorphen Eigenschaften eines Markers ist der PIC-Wert (Polimorphism Information Content) (Botstein et al., 1980). Angaben über Informativität einzelner Allele bezogen auf die kaukasische Bevölkerung wurden der Datenbank Généthon entnommen. Ein hoher PIC-Wert eines Mikrosatellitenmarkers in der kaukasischen Bevölkerung lässt allerdings nicht unbedingt auf eine hohe Informativität dieses Markers innerhalb der zu untersuchenden Familie schließen.

Neben der Anzahl der zu untersuchenden Familienmitglieder spielt die Struktur der Familie für die Aussagekraft eine Rolle. Ideale Strukturen würden bei Familien zu finden sein, in denen möglichst drei Generationen mit jeweils acht Kindern vorhanden sind und alle vier Großelternpaare zur Verfügung stehen (Strachan und Read, 2000). Familien mit diesen Voraussetzungen sind allerdings in Europa selten und liegen auch in dieser Untersuchung nicht vor.

In der ebenfalls durchgeführte Haplotypenanalyse werden Haplotypenabschnitte, die zusammen mit der Krankheit vererbt werden, im Stammbaum definiert und Rekombinanten, die diese Abschnitte begrenzen, identifiziert. So ist schließlich die Bestimmung von Markern möglich, die den Krankheitslocus proximal und distal flankieren (Strachan und Read, 2000). Die Haplotypenanalyse wird neben der Informativität der Mikrosatellitenmarker in der Familie (s.o.) entscheidend beeinflusst von der Anzahl meiotischer Rekombinationsereignisse.

## **2. Kopplungsanalyse zur Identifizierung der Kandidatengenregion für autosomal-dominante, nicht-syndromale Tieftonschwerhörigkeit**

Die Kopplungsanalyse wurde mit dem Ziel einer Bestätigung oder eines Ausschlusses der Kopplung des Krankheitslocus mit den bereits bekannten Genloci für Tieftonschwerhörigkeit durchgeführt. Die Kopplungsstudie in dieser Arbeit ist als eine unabhängige Bestätigung von Ergebnissen früherer Publikationen (Lesperance et al., 1995; Van Camp et al., 1999) zu betrachten. Für nicht-syndromale, sensorineurale Tieftonschwerhörigkeit, die in einer Familie nach einem autosomal-dominanten Erbgang segregiert, sind bisher nur drei verschiedene chromosomale Regionen als Kandidatengenloci bekannt. Aufgrund dieser Überlegungen wurde in dieser Arbeit bereits ein für einen genetischen Marker ermittelter LOD-Wert von  $Z > +1.2$  als ein statistisch signifikantes Kriterium für Kopplung des Krankheitslocus mit dem Marker akzeptiert (Lander und Krugliak, 1995).

In Analysen, in denen Marker über das gesamte Genom verteilt auf eine Kopplung mit einem Krankheitslocus getestet werden, akzeptiert man dagegen erst LOD-Werte von  $Z = +3.3$ . (Lander und Krugliak, 1995).

Der LOD-Wert  $Z = +1.2$  (für einen globalen Signifikanzlevel von 0.05) als Kriterium für Signifikanz wird ermittelt durch Anwendung von den in der Publikation von Lander und Krugliak (1995) veröffentlichten Berechnungsformeln. In die Berechnung gehen die Überlegungen ein, dass die chromosomale Region, auf die sich die beiden Kandidatengenloci DFNA6 und DFNA14 erstrecken, ca. 24 cM groß ist und der Abstand der genetischen Marker untereinander ca. 2 cM beträgt.

Maximale LOD-Werte in der Zwei-Locus-LOD-Wert-Analyse mit  $Z = +2.16$ ,  $Z = +1.93$  und  $Z = +1.99$  bei einer Rekombinationsfraktion  $\theta = 0$  wurden für die Mikrosatellitenmarker D4S432, D4S3023 und D4S2925 ermittelt. Ein statistisch signifikanter Hinweis auf eine Kopplung in der Region der drei Marker mit den Krankheitslocus für Tieftonschwerhörigkeit in dieser Familie ist somit vorhanden. Negative LOD-Werte von  $Z = -2$  bei einer Rekombinationsfraktion  $\theta = 0$  wurden für die am weitesten telomerwärts lokalisierten Marker D4S3034, D4S412 und D4S2957 ermittelt. LOD-Werte von  $Z < +1$  bei einer Rekombinationsfraktion  $\theta = 0$  wurden für die Marker D4S431, D4S2935, D4S3007, D4S394, D4S2983 und D4S3009 erreicht. Somit ist eine Kopplung des Krankheitslocus mit diesen Markern auszuschließen. Die Ergebnisse der Multimarkerkartierung bestätigen das Ergebnis der Zwei-Locus-LOD-Wert-Analyse. Anhand der Auswertung der Haplotypenanalyse ist aufgrund von drei Schlüssel-Rekombinationen eine Lokalisation des Krankheitsgens in die chromosomale Region, welche von den genetischen Markern D4S2957 und D4S394 begrenzt wird, zu erwarten.

Lesperance und Mitarbeiter (1995) kartierten in einer Kopplungsstudie in einer Familie im Südwesten der USA, in der ebenfalls nicht-syndromale Tieftonschwerhörigkeit nach einem autosomal-dominanten Erbgang segregiert, das Krankheitsgen in die chromosomale Region 4p16.3 zwischen die Marker D4S412 und D4S432. Der maximale LOD-Wert wurde mit  $Z = +5.05$  bei einer Rekombinationsfraktion  $\theta = 0$  für den Mikrosatelliten D4S126 ermittelt. Dieser Kandidatengenlocus für autosomal-dominante Tieftonschwerhörigkeit wurde durch das HUGO/GDB Nomenklatur Komitee DFNA6 benannt.

In einer Kopplungsanalyse mit einer niederländischen Familie konnte die Arbeitsgruppe von Van Camp (1999) ein Krankheitsgen für autosomal-dominante, nicht-syndromale Tiefton-

schwerhörigkeit in der 5,6 cM umfassenden Region zwischen den genetischen Markern D4S3023 und D4S3007 kartieren. Der maximale LOD-Wert wurde mit  $Z = +6.67$  bei einer Rekombinationsfraktion  $\theta = 0$  für den Mikrosatellitenmarker D4S431 ermittelt. Rekombinationen in der genetischen Region zwischen den Mikrosatellitenmarkern D4S3023 und D4S431 sowohl in einem von Schwerhörigkeit betroffenen als auch in einem gesunden Familienmitglied geben einen Hinweis auf die telomerwärts gerichtete Begrenzung des Kandidatengenlocus. Die zentromerwärts gerichtete Grenze des Genlocus wird durch eine Rekombination in der Region zwischen den Markern D4S2935 und D4S3007 markiert.

Die Kartierung des Krankheitslocus für Tieftonschwerhörigkeit in dieser Familie erfolgte somit zwar in eine in unmittelbarer Nachbarschaft (1,3 cM entfernt) liegende chromosomale Region zu dem von Lesperance und Mitarbeitern (1995) lokalisierten Genlocus DFNA6. Eine Überlappung der beiden Kandidatengenloci wurde jedoch ausgeschlossen (Van Camp et al., 1999). Der neu entdeckte Genlocus wurde DFNA14 benannt.

Anhand der Kopplungsstudie der in dieser Arbeit untersuchten Familie wurde ein Hinweis auf Kopplung des Krankheitslocus mit den genetischen Markern D4S3023 und D4S2925 erbracht. Die Marker D4S3023 und D4S2925 begrenzen den DFNA14-Locus telomerwärts (Van Camp et al., 1999). Ebenfalls besteht mit dem maximal ermittelten LOD-Wert von  $Z = +2,19$  bei einer Rekombinationsfraktion  $\theta = 0$  ein Hinweis auf eine Kopplung des Krankheitsgens in der Familie mit dem Mikrosatellitenmarker D4S432, welcher in der Kopplungsanalyse von Lesperance (1995) als der am weitesten zentromerwärts lokalisierte Marker des DFNA6-Locus bezeichnet wurde. Die anhand der Haplotypenanalyse definierte Kandidatenregion in der in dieser Arbeit untersuchten Familie überlappt sowohl den Kandidatengenlocus DFNA6 als auch den Locus DFNA14. Eine eindeutige Zuordnung des Krankheitslocus in der deutschen Familie zu einem der beiden Genloci DFNA6 (Lesperance et al., 1995) oder DFNA14 (Van Camp et al., 1999) ist somit allein anhand der Ergebnisse der Kopplungsstudie und der Haplotypenanalyse nicht möglich.

Bezüglich der phänotypischen Ausprägung verhalten sich Mutationen in den Genloci DFNA6 und DFNA14 sehr ähnlich (Van Camp et al., 1999). Sowohl in DFNA6- als auch in DFNA14-Familien ist der Hörverlust bilateral und symmetrisch. Die betroffenen Frequenzen liegen primär in einem Frequenzbereich bis 2000 Hz. Unterschiede zwischen beiden Genloci sind zum Zeitpunkt des Einsetzens des Hörverlustes zu finden. Tieftonschwerhörigkeit, die mit

dem Genlocus DFNA14 gekoppelt ist, manifestiert sich bereits in der ersten Lebensdekade (Van Camp et al., 1999). Dagegen erfolgt das Einsetzen des Hörverlusts bei Familien, in denen das Krankheitsgen mit dem Locus DFNA6 gekoppelt ist, erst in der zweiten Lebensdekade (Lesperance et al., 1995). In der untersuchten Familie wurde die Diagnose Tieftonschwerhörigkeit bereits bei einem dreijährigen Familienmitglied gestellt. Das Alter, in dem sich die Familienmitglieder das erste Mal einem Arzt zur Abklärung ihrer Schwerhörigkeit vorgestellt haben, variiert jedoch, so dass der Zeitpunkt des Einsetzens der Schwerhörigkeit nicht genau bestimmt werden kann. Ein kongenitaler Hörverlust kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Das entweder in der frühen Kindheit oder eventuell sogar konnatale Einsetzen der Tieftonschwerhörigkeit in der Familie spricht gegen eine Kopplung des Krankheitslocus mit dem DFNA6-Genlocus. Bezüglich des Alters, in dem die Schwerhörigkeit eintritt, sprechen die audiologischen Daten der untersuchten Familienmitglieder somit am ehesten für eine Kopplung des Krankheitslocus mit dem DFNA14-Locus.

Vom molekulargenetischen Standpunkt geben die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse dagegen Anlass zur Spekulation, dass die Tieftonschwerhörigkeit in der DFNA6- und in der DFNA14-Familie nicht durch einen Defekt in zwei verschiedenen Genen verursacht wird, sondern dass ein und derselbe Gendefekt für die Tieftonschwerhörigkeit sowohl in der DFNA6- und in der DFNA14-Familie als auch in der in dieser Arbeit untersuchten Familie verantwortlich ist.

Das in der Publikation von Van Camp et al. (1999) veröffentlichte Ergebnis der Kopplungsstudie, welches dem DFNA6-Genlocus (Lesperance et al., 1995) eine direkt benachbarte, jedoch nicht überlappende Kandidatengenregion (DFNA14) gegenüberstellt, könnte durch Artefakte in der genetischen Analyse begründet sein (Kunst et al., 1999; Van Camp et al., 1999).

Als Fehlermöglichkeit in Betracht zu ziehen ist z.B., dass einer der Kandidatengenloci durch eine Schlüssel-Rekombination in einem Familienmitglied festgelegt wurde, welches inkorrekt als tieftonschwerhörig diagnostiziert wurde (Van Camp et al., 1999; Kunst et al., 1999). Dies könnte sich z.B. durch das Auftreten von sogenannten Phänokopien in einer der untersuchten Familien ereignet haben. Phänokopien sind -bezogen auf die untersuchten Familien-Personen, bei denen Tieftonschwerhörigkeit diagnostiziert wird, diese Schwerhörigkeit aber z.B. nicht dieselbe Ursache hat.

Möglich ist auch, dass bei der Bestimmung der Allelgrößen Fehler aufgetreten sind oder dass in einem der in den Kopplungsanalysen verwendeten Mikrosatellitenmarker eine spontane Mutation stattgefunden hat (Van Camp et al., 1999; Kunst et al., 1999.) In diesem Fall würden artifizielle Rekombinationen in den Haplotypen der Familienmitglieder auftreten, die die Analyse verfälschen.

Als weitere Möglichkeit für die Entstehung eines Artefakts ist z.B. die nicht korrekte Anordnung der Reihenfolge der Mikrosatellitenmarker D4S432 und D4S3023 auf der genetischen Karte vorstellbar (Van Camp et al., 1999). Die Anordnung der Mikrosatellitenmarker ist sowohl in den Publikationen von Van Camp et al. (1999) und Lesperance et al. (1995) als auch in dieser Arbeit aus der Datenbank Généthon entnommen. Eine fehlerhafte Lokalisation des Mikrosatellitenmarker D4S432 zentromerwärts in Relation zu dem den DFNA14-Genlocus telomerwärts flankierenden Mikrosatellitenmarkers D4S3023 auf der genetischen Karte könnte fälschlicherweise zu dem Ergebnis führen, dass die beiden Genloci DFNA6 und DFNA14 zwei separate Genloci sind (Van Camp et al., 1999).

Die genetischen Karte aus der Datenbank Marshfield bestätigt jedoch die Lokalisation des Markers D4S432 telomerwärts des Markers D4S3023 (Van Camp et al., 1999). Allerdings, selbst wenn eine Vertauschung der relativen Position der beiden Mikrosatellitenmarker vorläge, würde sich die Position des Markers D4S432 als der den DFNA6-Locus zentromerwärts flankierenden Marker nicht ändern, außer dass der Marker D4S432 in diesem Fall auch die Region des DFNA14-Genlocus telomerwärts begrenzen würde (Van Camp et al., 1999). Das Ergebnis zweier separater, nicht überlappender Genloci DFNA6 und DFNA14 würde somit nicht widerlegt werden (Van Camp et al., 1999).

Van Camp (1999) schließt in seiner Publikation auch einen eventuell im Vergleich zu der genetischen Karte schmalen Abstand der Marker D4S432 und D4S3023 zueinander auf der physikalischen Karte nicht aus. Eine physikalische Karte gibt die Position eines Mikrosatellitenmarkers und dessen Distanz zu anderen Markern auf demselben Chromosom in absoluten Werten, ausgedrückt in Basenpaaren, an. Eine genetische Karte zeigt die relative Position von Genloci in Rekombinationseinheiten, ausgedrückt in cM an. In Nachbarschaft des Mikrosatellitenmarkers D4S126 des Genlocus DFNA6 (Lesperance et al., 1995) konnte eine sehr große Anzahl von Rekombinationen ermittelt werden. Dadurch ist zu erklären, dass diese auf der genetischen Karte relativ große, 3.5 cM umfassende Region mit einer auf der physikalischen Karte nur 300-400 kb großen Region korrespondiert (Allitto et al., 1991). Unter der Annahme, dass sich diese hohe Anzahl an Rekombinationsmöglichkeiten weiter in die zentromerwärts des Markers D4S126 gelegene chromosomale Region fortsetzt, ist die Mög-

lichkeit in Betracht zu ziehen, dass sich ein großes Gen über den 1,3 cM umfassenden Abstand auf der genetischen Karte zwischen dem DFNA6- und dem DFNA14-Genlocus spannt (Van Camp et al., 1999).

Unterschiede bezüglich des Zeitpunkts des Einsetzens der Schwerhörigkeit in der DFNA14- und in der DFNA6-Familie können auch durch verschiedene Mutationen in einem Gen für Tieftonschwerhörigkeit zu erklären sein, wobei z. B. eine Mutation in einer 5'-Enhancer Region des Gens in einer der beiden Familien stattgefunden haben könnte (Van Camp et al., 1999). Diese Art „Distanz-Effekt“ wurde bereits bei Mutationen auf dem Genlocus DFNB3 in Erwägung gezogen. In Familien, in denen Schwerhörigkeit mit dem DFNB3-Genlocus gekoppelt ist, wurden bei einigen von Schwerhörigkeit betroffenen Personen Mikrodeletionen gefunden, welche 400 kb proximal des *POU3F4*-Gens lokalisiert sind. Die Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, dass diese Mutationen einen identischen Phänotyp hervorrufen wie Mutationen in der kodierenden Region des *POU3F4*-Gens, sind noch nicht geklärt. Auch Mutationen in verschiedenen Domänen eines Gens, die zu Unterschieden im Phänotyp führen, sind möglich.

Phänotypische Variabilität könnte Unterschiede bezüglich des Einsetzens der Symptome in der DFNA6- und DFNA14-Familie durch identische Mutationen in einem Gen erklären. Das Phänomen der phänotypischen Variabilität ist in der Literatur u.a. auch bei dem Saethre-Chotzen-Syndrom (SCS, auch bekannt als Acrocephalosyndaktilie Typ III/ACS3) beschrieben. Das Saethre-Chotzen-Syndrom ist eine autosomal-dominante Erkrankung, welche bei den betroffenen Personen zu den Symptomen Craniosynostose, tief sitzender Haaransatz, Gesichtasymmetrien, Ptosis, kleine Ohren, mild ausgeprägte Fingersyndaktilien und Daumen in Valgus-Stellung führen kann (Pantke et al., 1975; Friedmann et al., 1977; Cohen, 1986; Reardon et al., 1994). Viele dieser möglichen Symptome können allerdings bei betroffenen Personen fehlen oder sehr mild ausgeprägt sein, auch fehlende Penetranz wurde beschrieben (Carter et al., 1982; Marini et al., 1991).

### **3. Progression der Schwerhörigkeit in den hohen Frequenzen**

Auffällig ist bei den Familienmitgliedern der untersuchten Familie ein in der Altersgruppe um 50 Jahre zusätzlich zu dem Frequenzverlust im Tieftonbereich erkennbarer Hörverlust im hohen Frequenzbereich (oberhalb 2 kHz), der im Audiogramm der jüngeren Familienmitglieder nicht zu beobachten ist. Eine noch stärkere Progression des Hörverlust im hochfrequenten Bereich bei einem ca. 66-jährigen Familienmitglied könnte einen Hinweis dafür sein,

dass dieser begleitende Hörverlust in den hohen Frequenzen altersabhängig ist. Auch bei den in den Arbeiten von Van Camp et al. (1999) und Lesperance et al. (1995) beschriebenen Familien ist bei der Altersklasse der ca. 70-jährigen Familienmitglieder zusätzlich zu der Tieftonschwerhörigkeit ein Hörverlust in den hohen Frequenzen zu beobachten.

In einer von Kunst und Mitarbeitern (1999) vorgestellten statistische Analyse, in der die Abhängigkeit der Hörschwellen vom Alter in der ursprünglich von Van Camp und Mitarbeitern. (1999) vorgestellten niederländischen Familie untersucht wurde, kann Presbiakusis als Ursache für den progressiven Hörverlust in den hohen Frequenzen nicht ausgeschlossen werden. Die Progression der Schwerhörigkeit in den hohen Frequenzen unterscheidet sich allerdings von den in der Publikation von Hallermann und Plath (1974) vorgestellten altersabhängigen Hörschwellenkurven. Der Hörverlust in den hohen Frequenzen tritt bei den in dieser Arbeit untersuchten Familienmitgliedern bereits in einem Alter auf, in dem Presbiakusis typischerweise noch nicht beobachtet werden kann. Gegen Presbiakusis als Ursache der Progression der Schwerhörigkeit im hohen Frequenzbereich spricht auch, dass der Hörverlust bei den untersuchten Familienmitgliedern nicht im 6 kHz-Bereich beginnt (Hallermann und Plath, 1974). Der Hörverlust nimmt in der untersuchten Familie seinen Ursprung von der apikalen Region der Cochlea und weitert sich auf die basocochleäre Region aus. Nicht auszuschließen ist allerdings die Möglichkeit einer Prädisposition für Presbiakusis oder einer abnormalen Sensitivität zur umweltbedingter Geräuschaussetzung bei Patienten mit einer genetisch bedingten Schwerhörigkeit in den tiefen Frequenzen (The Vanderbilt University Hereditary Deafness Study Group, 1968).

#### **4. Informativität der Familie**

Die maximal ermittelten LOD-Werte in den Kopplungsstudien der Arbeitsgruppen von Van Camp et al. (1999) und Lesperance et al. (1995) sind mit Werten von  $Z = +5.05$  bei einer Rekombinationsfraktion  $\theta = 0$  für den Mikrosatellitenmarker D4S412 (Lesperance et al., 1995) und  $Z = +6.67$  bei einer Rekombinationsfraktion  $\theta = 0$  für den Marker D4S431 wesentlich höher als der in dieser Arbeit ermittelte maximale LOD-Wert von  $Z = +2.19$  für den Marker D4S432.

Die hohen LOD-Werte in den Studien von Van Camp et al. (1999) und Lesperance et al. (1995) sind zum einen auf die großen Anzahl der zur Untersuchung zur Verfügung stehenden Familienmitglieder zurückzuführen. Die Kopplungsstudie von Van Camp et al. (1999) wurde mit 48 Familienmitgliedern durchgeführt, von denen bei 20 Personen die Diagnose Tiefton-

schwerhörigkeit gestellt werden konnte. 34 Familienmitglieder (von denen 17 von Tieftonschwerhörigkeit betroffen sind) nahmen an der Kopplungsstudie von Lesperance und Mitarbeitern (1995) teil. Im Vergleich dazu ist die Anzahl der in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Familienmitglieder mit 13 Personen, von denen 9 Personen von Schwerhörigkeit betroffen sind, gering. Eventuell würde die Teilnahme weiterer Familienmitglieder an der Kopplungsanalyse die LOD-Werte der drei Mikrosatelliten D4S432, D4S3023 und D4S2925 in dieser Arbeit erhöhen.

Die Aussagekraft einer Haplotypenanalyse wird beeinflusst durch die Anzahl von Schlüssel-Rekombinationsereignissen der Familienmitglieder, durch die die Kandidatengenregion begrenzt werden kann. In der Haplotypenanalyse von Van Camp et al. (1999) konnte der Genlocus für Tieftonschwerhörigkeit durch Rekombinationsereignisse in vier Familienmitgliedern bestimmt werden. In der in dieser Arbeit durchgeführten Haplotypenanalyse und in der 1999 von Van Camp und Mitarbeitern durchgeführten Kopplungsanalyse wurde die chromosomale Region, in der die Lokalisation des Krankheitsgens vermutet wird, durch Schlüssel-Rekombinationsereignisse in jeweils 3 Familienmitgliedern bestimmt. Durch Einbeziehung weiterer Mitglieder der in dieser Arbeit untersuchten Familie mit charakteristischen Rekombinationsereignissen wäre die Kandidatengenregion für Tieftonschwerhörigkeit auf dem Chromosom 4 möglicherweise genauer zu bestimmen. Die Untersuchung der DNA der Familienmitglieder II.6. und II.7. wäre in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung. Genetisches Untersuchungsmaterial dieser beiden Personen steht dieser Studie jedoch nicht zur Verfügung. Von Vorteil wäre auch die Einbeziehung weiterer Familien, in denen Tieftonschwerhörigkeit nach einem autosomal-dominanten Erbgang segregiert in die Kopplungsanalyse. Eventuelle Schlüssel-Rekombinationsereignisse bei Mitgliedern neu hinzugezogener Familien würden eine Chance darstellen, den Kandidatengenlocus weiter zu begrenzen.

## **5. Kandidatengene**

Die Kandidatengenregion für den Genlocus Tieftonschwerhörigkeit in der untersuchten Familie wurde in die Region im Bereich der genetischen Marker D4S431 (telomerwärts) und den Markern D4S3023 und D4S2925 (zentromerwärts) kartiert. Ein diese Region 10 cM zentromerwärts und 10 cM telomerwärts flankierender DNA-Bereich wird in die Betrachtung mit eingeschlossen. Diesem ersten Schritt in der Positionsklonierung sollte nun eine Suche nach potentiellen Krankheitsgenen folgen.

Die Kandidatengensuche erfolgt mit Hilfe einer kompletten physikalischen Karte der Chromosomenregion 4p16.3, welche durch das „Human Genome Project“ zur Verfügung gestellt wurde.

Das „Human Genome Project“ ist ein internationales Projekt, dessen Vorhaben die vollständige Beschreibung des menschlichen Genoms mit Hilfe der DNA-Sequenzierung ist. Ziel ist, die Kenntnis von der Bedeutung der verschiedenen Gene für die Gesundheit und für Erkrankung zu erweitern. Das „Human Genome Project“ leistet mit der Etablierung der gesamten Nukleotidsequenz des Menschen und der Identifikation des vollständigen Genbestands einen ganz wesentlichen Beitrag zu den allgemeinen Grundlagen der Humangenetik.

Die wissenschaftliche Aufgabe des „Human Genome Project“ umfasst vor allem die Erstellung genetischer und physikalischer Karten von hoher Auflösung mit dem Ziel der Fertigstellung einer endgültigen physikalischen Karte mit der vollständigen Sequenz des menschlichen Genoms.

Am 15. Februar 2001 veröffentlichte das Internationale Human Genome Sequencing Consortium die menschliche Genom-Sequenz in der Zeitschrift Nature (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Die Veröffentlichung der Daten der privaten Organisation Celera Genomics in Rockville (Maryland) erschienen ebenfalls im Februar in der Zeitschrift Science (Venter et al., 2001).

In Abbildung 10 ist der chromosomale Bereich der Kandidatengenregion zwischen den genetischen Markern D4S412 und D4S3023 als kombinierte genetische und physikalische Karte mit den lokalisierten Genen gezeigt (NCBI).

Bei der Auswahl potentieller Kandidatengene werden solche Gene in Betracht gezogen, die im Innenohr exprimiert werden, bzw. bei denen eine Expression während der Innenohrentwicklung in Modellorganismen aufgezeigt werden konnte. Daten hierzu sind in einer von der Arbeitsgruppe Steel erstellten Expressionsdatenbank des Innenohres zu finden (Holme RH, Bussolini TJ, Steel KP. Table of gene expression in the developing ear. World Wide Web URL: [http://www.ihr.mrc.ac.uk/Hereditary\\_genetable /index .shtml.](http://www.ihr.mrc.ac.uk/Hereditary_genetable/index.shtml))

Unter den 30 Genen, die in der Kandidatengenregion lokalisiert sind, erscheinen 4 Gene als besonders interessante Kandidatengene: *WDR1*, *MSX1*, *CRMP1* sowie *CPZ*, die in nachfolgenden Analysen in der in dieser Arbeit untersuchten Familie untersucht werden sollen. Im Folgenden wird auf diese möglichen Kandidatengene näher eingegangen.

Das *WDR1*-Gen kodiert für ein 67-kDA Protein, welches 9 *WDR40* Repeats enthält. *WDR40*-Proteine spielen bei verschiedenen Proteininteraktionen eine Rolle, z.B. bei der Zellteilung, der Gen-Transkription, der Zellreifung, der m-RNA-Modifikation, der Transmembran-Interaktion sowie bei der Vesikel-Fusion (Neer et al., 1994).

Ein Vergleich mit Hilfe von Sequenzdatenbanken zeigte hohe Sequenzhomologien zwischen der menschlichen *WDR1*-cDNA (95%), der *WDR1*-cDNA der Maus und der *WDR1*-cDNA des Huhns.

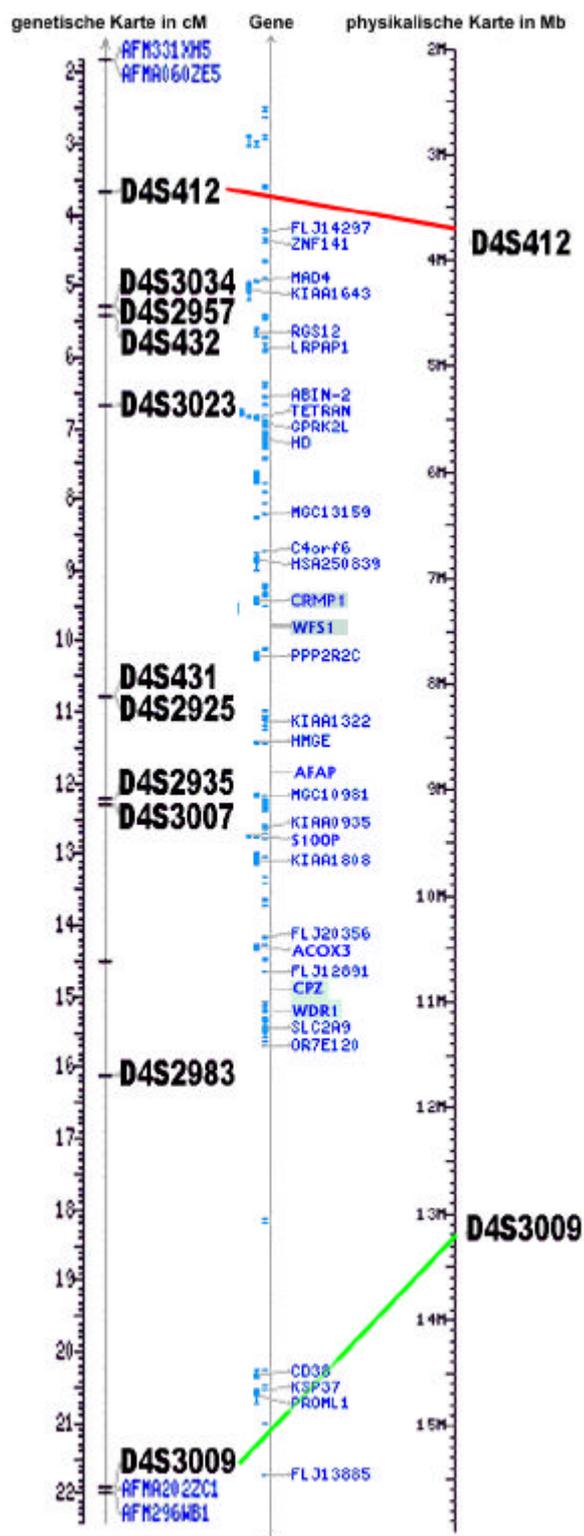
Nach akustischer Überstimulation beim Huhn ist in den betroffenen Regionen der Papillen der Basilarmembran ein Anstieg bei den Expressionsraten des *WDR1*-Gens zu beobachten. Akustische Überstimulation führt zu einer Schädigung des Epithels im Innenohr der Säugetiere. Dies endet beim Menschen im Allgemeinen in einer dauerhaften Schwerhörigkeit (Hawkins, 1973; Stebbins et al., 1979). Im Gegensatz hierzu konnte bei Vögeln die Fähigkeit zur Reparatur des beschädigten Hörepthels nachgewiesen werden.

Die genaue Funktion des *WDR1*-Proteins im Innenohr der Vögel ist bisher nicht bekannt. Die Beobachtung, dass das *WDR1*-Protein hohe Sequenzhomologien zu dem mit Aktin interagierenden Protein (AIP1) der Spezies *S.cerevisiae* aufweist (Amberg et al., 1995), führt allerdings zu der Vermutung, dass das *WDR1*-Protein an der Aktinbindung (mit dem  $\beta$ -Aktin) beteiligt ist.  $\beta$ -Aktin ist ein Protein, welches für die Zellstabilität beispielsweise der Kutikularplatte und der Stereozilien (Sinneszellen) verantwortlich ist (Pickles, 1993; Lee und Cotanche, 1995).  $\beta$ -Aktin ist auch in den Mikrovilli der Stützzellen, welche die Sinneszellen umgeben, gefunden worden (Raphael, 1992; 1993). Aktine sind also für den Aufbau des Hörorgans sowohl bei Vögeln als auch bei Säugetieren von großer Bedeutung.

Weitere Studien sind notwendig, um die Frage zu klären, ob eine Beteiligung des menschlichen *WDR1*-Protein an der Erhaltung der Haarzellen im Innenohr oder an der Reparatur beschädigter Strukturen im Innenohr vorliegt (Adler et al., 1999).

Das *Collapsin response mediator protein-1* (*crmp-1*) ist Mitglied der *Unc-33* Genfamilie. Eine Beteiligung des *Unc-33*-Gens an der Axonaussprossung in der Maus konnte nachgewiesen werden (Hedgecock et al., 1987; Li et al., 1992; McIntire et al., 1994). In neugeborenen Mäusen konnte die Expression eines 3 kB großen *crmp1*- Transkripts sowohl in der Cochlea als auch in der Retina und im Gehirn nachgewiesen werden.

In besonderem Maße scheint die Expression während der Entwicklung der Cochlea in Mäusen zu erfolgen, während eine niedrigere Expression des *crmp1*-Gens im Erwachsenenalter nachgewiesen wurde (Cohen-Salomon et al., 1996).



**Abbildung 10:** Darstellung der Kandidatengenregion für Tieftonschwerhörigkeit auf dem menschlichen Chromosomenabschnitt 4p16.3.

Abgebildet sind die genetische Karte des Chromosomenabschnitts der Datenbank Génethon und die dazu korrespondierende physikalische Karte sowie die in den Abschnitt zwischen den Mikrosatellitenmarkern D4S412 und D4S3023 lokalisierten Gene. Die in der Diskussion dargestellten Kandidatengene sind durch Schraffierung hervorgehoben (Quelle: NCBI).

Die genaue Funktion des *crmp1*-Gens ist bisher nicht bekannt. Man konnte allerdings in Mäusen eine hohe Expression des *crmp1*-Gens zu dem Zeitpunkt nachweisen, an dem ein Anschluss des sensorischen Epithels der Cochlea an das Nervensystem erfolgt (Cohen-Salomon et al., 1996). Die Aussprossung von Nervenfasern und Ausbildung von Synapsen zwischen afferenten Nervenfasern und den Dendriten der inneren Sinneszellen, sowie die Knüpfung von Synapsen zwischen äußeren Haarzellen und efferenten Nervenfasern ist ein bedeutender Vorgang in der Entwicklung des Hörens (Pujol, 1985).

Ein weiteres Kandidatengen ist das *Homöobox* Gen *MSX1*, dessen Expression des Gens in der Maus und im Huhn während der Entwicklung des Innenohres nachgewiesen wurde (Hill et al., 1989, Ivens et al., 1990, Wu und Oh, 1996). *Homöobox*-Gene (*HOX-Gene*) sind eine große Familie entwicklungsregulatorischer Gene, die verschiedene Funktionen während der Embryogenese besitzen (Hu et al., 2001).

Die *MSX*-Familie der *HOX*-Gene wurde ursprünglich durch eine Homologie zu dem *Drosophila-msh* (*muscle segment homeo box*)-Gen gefunden. Transgene Mäuse, die homozygot für ein nicht funktionierendes *MSX1*-Gen sind, zeigen gespaltenen Gaumen und Gesichts- und Zahn-Anomalien (Sakota und Maas, 1994). Mutationen im menschlichen *MSX1*-Gen konnten bisher mit selektiven Zahnanomalien in Verbindung gebracht werden. Es wird allerdings vermutet, dass das *Homöobox*-Gen auch mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert (Gehring et al., 1994; Zhang et al., 1996) und somit eventuell auch an der Entwicklung des Innenohres beteiligt ist.

Die *Carboxypeptidase Z* (*CPZ*) ist ein neues Mitglied der Familie der Metallo-carboxypeptidasen. Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden wurde eine Expression des *CPZ*-Gens u.a. in Epithelzellen der Cochlea von Mäusen und im die Cochlea umgebenden mesenchymalen Gewebe ermittelt (Novikota et al., 2001). Eine besonders hohe Expression der *Carboxypeptidase Z* konnte in Mäusen in der späten Schwangerschaft nachgewiesen werden, wohingegen die Expression des Gens im Gewebe erwachsener Mäuse relativ niedrig ist (Novikova et al., 2001).

Die Identifikation des Gens, in dem eine Mutation zu autosomal-dominantem Hörverlust in den tiefen und mittleren Frequenzen führt und, die Isolierung seines Genprodukts könnten das Verständnis der molekularen Mechanismen des Hörens weiter vertiefen.

## 6. Das Kandidatengen *WFS1*

Nicht syndromaler, sensorineuraler Hörverlust im Tieftonbereich ist eine sehr seltene Form der Schwerhörigkeit. Der Gendefekt, der den autosomal-dominant vererbten Hörverlust der in dieser Arbeit untersuchten Familie verursacht, konnte in der chromosomalen Region 4p16.3 im Bereich der beiden Genloci *DFNA6* und *DFNA 14* lokalisiert werden.

In der aktuellen Literatur konnten Mutationen im *WFS1*-Gen mit dem klinischen Bild der nicht-syndromalen, autosomal-dominant vererbten, sensorineuralen Tieftonschwerhörigkeit assoziiert werden. Das *WFS1*-Gen ist in der Region der beiden Genloci *DFNA6* und *DFNA14* in der Nähe des Markers *D4S431* lokalisiert: Aufgrund seiner Lokalisation ist das *WFS1*-Gen, welches für das autosomal-rezessiv vererbte Wolfram-Syndrom *Typ1* verantwortlich ist, somit als ein mögliches Kandidatengen für nicht-syndromale Tieftonschwerhörigkeit in Betracht zu ziehen (Strom et al., 1998; Inoue et al., 1998).

Das Wolfram-Syndrom vom *Typ1* ist mit Diabetes insipidus, juvenilem Diabetes mellitus, Optikusatrophie und progressivem Hörverlust assoziiert (Fraser et al., 1997). Weitere Symptome wie Nierenfehlbildungen, Ataxie, periphere Neuropathie, geistige Behinderung und psychiatrische Krankheiten konnten bei betroffenen Personen diagnostiziert werden (Barrett et al., 1995; Swift et al., 1990).

Der progressive Hörverlust, welcher mit dem *WFS1*-Gen assoziiert ist, erstreckt sich typischerweise auf den hohen Frequenzbereich, ein Hörverlust im Tieftonbereich konnte jedoch auch beobachtet werden (Cremers et al., 1977; Higashi, 1991). Der Hörverlust beginnt bei den betroffenen Personen im Alter von 5-15 Jahren. Der Zeitraum, in dem der Hörverlust einsetzt, unterscheidet sich damit nicht wesentlich im Vergleich zum Zeitraum des Einsetzens des Hörverlusts in *DFNA6*- und *DFNA14*-Familien (Barrett et al., 1995).

In einer Studie von Bespalova et al. (2000) wurden fünf verschiedene, bisher nicht in der Literatur beschriebene, heterozygote Missense-Mutationen (*T699M*, *A716T*, *V779M*, *L829P*, *G831D*) im *WFS1*-Gen in sechs Familien mit sensorineuraler, nicht-syndromaler Tieftonschwerhörigkeit gefunden. Eine der Mutationen (*A716T*) wurde in zwei der untersuchten Familien ermittelt. Keine dieser Mutationen konnte bei 220 hörgesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden, mit Ausnahme einer Mutation *V779M*, welche in einer von 336 Kontrollpersonen gefunden wurde. Diese Häufigkeit ist allerdings übereinstimmend mit der Prävalenz heterozygoter Träger des *WFS1*-Gens, die auf 0,3-1% in der Bevölkerung geschätzt wird. Bei diesen heterozygoten Trägern des *WFS1*-Gens wurde eine steigende Rate von sensorineuralem Hörverlust beobachtet.

Die heterozygote Mutation (A716T) im *Wolfram*-Gen konnte ebenfalls in einer Familie in Neufundland als Ursache für nicht-syndromale, autosomal-dominant vererbte, sensorineurale Tieftonschwerhörigkeit ermittelt werden (Young et al., 2001). Mutationen im *WFS1*-Gen scheinen somit ursächlich für nicht-syndromale Tieftonschwerhörigkeit zu sein (Bespalova et al., 2001).

Die in Familien mit nicht-syndromaler, sensorineuraler Tieftonschwerhörigkeit nachgewiesenen Mutationen im *WFS1*-Gen befinden sich ausschließlich im Exon 8 des *WFS1*-Gens, das die C-terminale Domäne des Wolframin-Proteins kodiert, wohingegen Mutationen, die zum Wolfram-Syndrom führen, im gesamten kodierenden Bereich des Gens nachgewiesen werden konnten (Bespalova et al., 2001).

Das *WFS1*-Gen kodiert für ein Protein (Wolframin) mit 890 Aminosäuren und neun putativen Transmembran-Domänen (Bespalova et al., 2001). Wolframin weist keinerlei Homologien zu anderen Proteinen auf und seine Funktion ist bisher nicht bekannt (Strom et al., 1998; Inoue et al., 1998). Aufgrund seiner Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum wird vermutet, dass es eine Rolle bei der Proteinbiosynthese und beim Proteintransport spielt (Takeda et al., 2001). *WFS1* wird ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert; eine hohe Expression im Gehirn in verschiedenen Neuronenpopulationen einschließlich des Nucleus cochlearis anterior und des Nucleus cochlearis posterior konnte jedoch nachgewiesen werden. In neuropathologischen Studien bezüglich des Wolfram-Syndroms wurde ein Verlust von Nervenfasern in Hörnerven sowie ein milder Neuronenverlust verbunden mit einer Gliose im zentralen Hörsystem beschrieben (Genis et al., 1997).

Das *WFS1*-Gen ist somit ein vielversprechendes Kandidatengen für die nicht-syndromale, autosomal-dominant vererbte, sensorineurale Tieftonschwerhörigkeit der in dieser Arbeit untersuchten Familie.

## VI Zusammenfassung

Die Beeinträchtigung des von Schwerhörigkeit betroffenen Menschen ist abhängig vom Schweregrad der Erkrankung sowie vom Alter des Einsetzens der Symptome. Eine bereits in der frühen Kindheit einsetzende Hörstörung kann erhebliche Auswirkung auf die kognitive und psychosoziale Entwicklung des Betroffenen haben.

Für autosomal-dominante, nicht-syndromale Schwerhörigkeit sind 39 Genloci in der Literatur beschrieben worden. Drei dieser Genloci (DFNA1, lokalisiert auf Chromosom 5q31, und DFNA6 und DFNA14, lokalisiert auf dem Chromosom 4p16.3) segregieren in Familien, die von Schwerhörigkeit besonders in mittleren und tiefen Frequenzbereichen betroffen sind. Eine Mutation im humanen *Diaphonus1*-Gen, welches signifikante Homologien zu dem *Diaphonus*-Gen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* aufweist, konnte bereits identifiziert werden und ist verantwortlich für den Hörverlust in einer Familie aus Costa Rica, in der der Genlocus DFNA1 segregiert.

In der vorliegenden Arbeit stand DNA einer deutschen Familie mit drei Generationen zur Verfügung, in der Familienmitglieder von sensorineuraler, autosomal-dominant vererbter Schwerhörigkeit im mittleren und tiefen Frequenzbereich (bis 2000 Hz) betroffen sind. Der Hörverlust ist bilateral und symmetrisch. Es wurde eine Kopplungsanalyse mit Mikrosatellitenmarkern durchgeführt mit dem Ziel, bei den betroffenen Familienmitgliedern Kopplung des Krankheitslocus für Tieftonschwerhörigkeit mit den jeweiligen Genloci DFNA1, DFNA6 und DFNA14 zu bestätigen oder auszuschließen.

Für die Kopplungsanalyse wurden fluoreszenzmarkierte Mikrosatellitenmarker verwendet, die die Genloci DFNA1, DFNA6 und DFNA14 flankieren. Bei der Auswahl der Mikrosatellitenmarker für die Genloci DFNA14 und DFNA6 wurde auf eine Publikation von Van Camp et al. (1999) Bezug genommen. Kartenposition der Marker und der Abstand der Marker untereinander wurden der Datenbank Généthon (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/>) entnommen. Informationen über PCR-Bedingungen sind in der Genome Datenbank (<http://www.gdb.org.de>) zu finden.

Mit einem computergestützten GeneScan-Verfahren wurden die Allelgrößen der amplifizierten Marker für jedes untersuchte Familienmitglied ermittelt. Zur Standardisierung der Allelgrößen wurde jeweils eine GeneScan-Analyse einer international festgelegten DNA-Probe der Person 134702 vom Centre d'Étude du Polymorphisme Humain durchgeführt. Aufgrund der durch die eigenen Analysen festgestellten Abweichungen zum Literaturwert konnten die eigenen Daten um die entsprechenden Werte korrigiert werden. Aus den korrigierten Daten wurde für jedes untersuchte Familienmitglied der Haplotyp erstellt.

Meiotische Rekombination zwischen den Markern D4S2957 und D4S432 und zwischen den Markern D4S3007 und D4S394 konnte bei den schwerhörigen Familienmitgliedern III:1 und III:5 nachgewiesen werden, wohingegen sich bei dem nicht von Schwerhörigkeit betroffenen Familienmitglied III:6 eine Rekombination zwischen den Markern D4S394 und D4S2983 nachweisen lässt. Die chromosomale Region, in der das Krankheitsgen somit am wahrscheinlichsten lokalisiert ist, wird von den Markern D4S2957 und D4S394 begrenzt.

In einer anschließenden Zwei-Locus-LOD-Wert-Analyse wurde für jeden der Mikrosatellitenmarker die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung mit dem Krankheitslocus berechnet. Bei einer Rekombinationsfraktion von  $\theta = 0$  wurden maximale LOD-Werte für die genetischen Marker D4S432 ( $Z = +2.16$ ), D4S3023 ( $Z = +1.93$ ) und D4S2925 ( $Z = +1.99$ ) ermittelt. Für die telomerwärts lokalisierten Mikrosatellitenmarker D4S3034, D4S412 und D4S2957 wurden bei einer Rekombinationsfraktion von  $\theta = 0$  LOD-Werte von  $Z = -2$  erreicht. Maximale LOD-Werte aller übrigen Marker betragen  $Z = <+1$ . Zusätzlich zu der Zwei-Locus-LOD-Wert-Analyse wurde eine Multimarkerkartierung mit den Statistik-Programmen FASTMAP und GENEHUNTER durchgeführt, in der das Krankheitsgen einem der Abschnitte zwischen zwei genetischen Markern zugeordnet wurde. Der höchste Wert der Multimarkerkartierung wurde in der Region der Mikrosatellitenmarker D4S3023 und D4S2925 ermittelt.

Ein Hinweis auf signifikante Kopplung der Marker D4S3023 und D4S2925 mit dem Krankheitslocus, welche in der Region des DFNA6 Genlocus lokalisiert sind, ist somit gegeben. Ebenfalls wurde eine Kopplung des Krankheitslocus mit dem Marker D4S432, welcher in der Region des DFNA14 Genlocus lokalisiert ist, ermittelt. Eine eindeutige Zuordnung des Krankheitslocus zu einem der beiden bisher beschriebenen Genloci DFNA14 oder DFNA6 ist somit nicht möglich. Aufgrund der Ergebnisse der eigenen Untersuchungen im Vergleich zur Literatur ist anzunehmen, dass es sich bei den Genloci DFNA6 und DFNA14 um einen Genlocus handeln muss.

Das „Human Genome Project“ stellt eine komplette physikalische Karte des Chromosomenabschnitts 4p16.3 zur Verfügung, in der mehr als 30 Gene in dem Intervall zwischen den Markern D4S2957 und D4S3007 aufgelistet sind. Teilweise stehen Informationen über die Funktionen der einzelnen Gene zur Verfügung. Für die Gene *MSX1*, *WDR1*, *CRMP1* und *CPZ* konnte eine Expression während der Entwicklung des Innenohres nachgewiesen werden, wodurch sie zu den attraktivsten Kandidatengen zählen. Aufgrund aktueller Studienergebnisse ist das ebenfalls in der Kandidatenregion lokalisierte *WFS1*-Gen als besonders vielversprechendes Kandidatengen in Betracht zu ziehen.

## VII Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata
AEP	Akustisch Evozierte Potentiale
BERA	Brainstem Evoked Response Audiometry
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
cM	centi Morgan
dB	Dezibel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid 5'-triphosphat
DP OAE	Otoakustische Distorsionsproduktinformationen Emissionen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERA	Elektrische Reaktions-Audiometrie
et al.	et alii (und andere)
LOD	logarithm of the odds ratio
Od <sub>x</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge <sub>x</sub>
p/q	kurzer/langer Arm eines Chromosoms
PCR	Polymerasekettenreaktion
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
STR <sub>s</sub>	Short interspersed Tandem Repeats
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

## VIII Literaturverzeichnis

- ADANO (Arbeitsgemeinschaft Deutschsprachiger Audiologen und Neurootologen): Empfehlungen zur Durchführung der ERA (Elektrische Reaktionsaudiometrie), verabschiedet auf der Geschäftssitzung vom 19.03.1994; Hoth S, Lenarz TH (1994) Elektrische Reaktionsaudiometrie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New-York
- Adler HJ, Winnicki RS, Gong TW, Lomax MI (1999) A gene upregulated in the acoustically damaged chick basilar papilla encodes a novel *WD40* repeat protein. *Genomics* 56: 59-69
- Allitto BA, MacDonald ME, Bucan M (1999) Increased recombination adjacent to the Huntington disease-linked D4S10 marker. *Genomics* 9: 104-112
- Amberg DC, Basart E, Borstein D (1995) Defining protein interactions with yeast actin in vivo. *J Struct Biol* 2: 28-35
- Barett TG, Bunday SE, Macleod AF (1995) Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* 346: 1458-1463
- Berghaus A, Rettinger G, Böhme G (1996) Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Hippokrates-Verlag Stuttgart: 24-38
- Bergström L (1980) Pathology of congenital deafness. Present status and future priorities. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 89: 31-42
- Bespalova IN, Van Camp G, Bohm SJH, Brown DJ, Cryns K, DeWan AT, Erson AE, Flothmann K, Kunst H, Kurnool P, Sivakumaran TA, Cremers CWRJ, Leal SM, Burmeister M, Lesperance MM (2001) Mutations in the *Wolframin syndrome 1 gene (WFS1)* are a common cause of low frequency sensorineural hearing loss. *Hum Mol Genet* 22: 2501-2508
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
- Carter CO, Till K, Fraser V, Coffey R (1982) A family study of craniosynostosis, with probable recognition of a distinct syndrome. *J Med Genet* 19: 280-285
- Castrillon DH, Wasserman SA (1994) *Diaphanous* is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development* 120: 3367-3377
- Cohen MM Jr (1986) Syndromes with craniosynostosis. In: *Craniosynostosis: diagnosis, evaluation, and management*. New York: Raven Press: 413-590
- Cohen-Salomon M, Crozet F; Rebillard G; Petit C (1996) Cloning and characterization of the mouse *collapsin response mediator protein-1, Crmp1*. *Mammalian Genome* 8: 349-351
- Collins FS (1992) Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nature Genetics* 1: 3-6

- Collins FS (1995) Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nature Genetics* 9: 347-350
- Cremers CW, Wijdeveld PG, Pinckers AJ (1977) Juvenile diabetes mellitus, optic atrophy, hearing loss, diabetes insipidus, atonia of the urinary tract and bladder, and other abnormalities (Wolfram syndrome). A review of 88 cases from the literature with personal observations on 3 new patients. *Acta Paediatr Scand* 264: 1-16
- 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: 1298-1303
- Dib C, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vigal A, Millassaeu P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J (1995) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5.264 microsatellites. *Nature* 380: 152-154.
- Djupesland G, Flottorp G, Gegre M, Stien R, Skrede S (1979) Cochlear hearing loss and viral infection. *Acta Otolaryngol* 87: 247-254
- Enander A, Stahle J (1967) Hearing in Meniere's disease. A study of pure-tone audiograms in 334 patients. *Acta Otolaryngol* 64: 543-546
- Estivill X; Fortina P, Surrey S, Rabionett 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: 394-398
- Fraser FC, Gunn T (1997) Diabetes mellitus, diabetes insipidus and optic atrophy, an autosomal recessive syndrome? *J Med Genet* 14: 190-193
- Friedmann JM, Hanson JW, Graham CB, Smith DW (1977) Saethre-Chotzen syndrome: a broad and variable pattern of skeletal malformations. *J Pediatr* 91: 929-933
- Gehring WJ, Qiu Qian Y, Billtere M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wüthrich K (1994) Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78: 211-223.
- Genis D, Davalos A, Molins A, Ferrer I (1997) Wolfram syndrome: a neuropathological study. *Acta Neuropathol* 93: 426-429
- Gorlin RJ, Toriello HV, Cohen MM (1995) *Hereditary Hearing Loss and its Syndromes*. Oxford University Press, Oxford, UK
- 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: 2211-2216
- Gross M, Finckh-Krämer U, Spormann-Lagodzinski ME (1998) Deutsches Zentralregister für kindliche Hörstörungen. *Dt Ärzteblatt* 95: 45-50

- Hallermann W, Plath P (1974) Der Einfluss des Alters auf die Diskriminationsfähigkeit des Hörorgans. HNO 19: 26-32
- Hawkins, JE (1973) Comparative otopathology: Aging, noise and ototoxic drugs. Adv Otorhinolaryngol. 20: 125-141
- Hedgecock LM, Culotti JG, Hall DH, Stern BD (1987) Genetics of cell and axon migration in *Caenorhabditis elegans*. Development 100: 365-382
- Heller S, Sheane CA, Javed Z, Hudspeth AJ (1998) Molecular markers for cell types of the inner ear and candidate genes for hearing disorders. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 11400-11405
- Hick C, Hick A (1997) Physiologie Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog Physiologie. Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart: 365-379
- Higashi J (1991) Otologic findings of DIDMAOD syndrome. Am J Otol 12: 57-60
- Hill RE, Jones PFD, Rees AR, Sime CM, Justice MJ, Copeland NG, Jenkins NA, Graham E, Davidson DR (1989) A new family of mouse homeobox-containing genes: Molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of *HOX-7.1*. Genes Development 3: 26-37
- Holme RH, Bussolini TJ, Steel KP. Table of gene expression in the developing ear. World Wide Web URL: <http://www.ihr.mrc.ac.uk/Hereditary/genetable/index.shtml>
- Hu G, Lee H, Price SM, Shen MM, Abate-Shen C (2001) *Msx homeobox* genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1. Development 128: 2373-2384
- Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, Mueckler M, Marshall H, Donis-Keller H, Crock P (1998) A gene coding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). Nat Genet 20: 143-148
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 49: 860-921
- Ivens A, Flavin N, Williamson R, Dixon M, Bates G, Buckingham M, Robert B (1990) The human homeobox gene *HOX7* maps to chromosome 4p16.1 and may be implicated in Wolf-Hirschhorn Syndrome. Hum. Genet 84: 473-476
- Kalatzis V, Petit C (1998) The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. Hum Mol Genet 7: 1589-1597
- Keats BJ, Berlin CI (1999) Genomics and hearing impairment. Genome Res 9: 7-16
- 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: 80-83
- Konigsmark BW (1969) Hereditary deafness in man. N Engl J Med 281: 774-778
- Konigsmark BW, Mengel M, Berlin CI (1971) Familial low frequency hearing loss. Laryngoscope 81:759-771

- Kubisch C, Bolz H, Gal A (2000) Genetik und molekulare Grundlagen der nicht-syndromalen Taubheit. In: Handbuch der Molekularen Medizin, Band 7, Monogen bedingte Erbkrankheiten, Teil 2 [Ganten D Ruckpaul K (Hrsg)] Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Kunst H, Marres H, Huygen P, Van Camp G, Joosten F, Cremers C (1999) Autosomal dominant non-syndromal low-frequency sensorineural hearing impairment linked to chromosome 4p16 (DFNA14): statistical analysis of hearing threshold in relation to age and evaluation of vestibulo-ocular functions. *Audiology* 38: 165-173
- Kunst H, Marres H, Huygen P, van Duijnhoven G, Krebsova A, van der Velde S, Reis A, Cremers F, and Cremers C (2000) Non-syndromic autosomal dominant progressive non-specific mid-frequency sensorineural hearing impairment with childhood to late adolescence onset (DFNA21). *Clin Otolaryngol* 25: 45-54
- Lander E, Krugliak L (1995) Genetik dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11: 241-247
- Lee KH, Cotanche DA (1995) Detection of  $\beta$ -actin mRNA by RT-PCR in normal and degenerating chicken cochlea. *Hear Res* 87: 9-15
- Lehnhardt E (1987) The Children Cochlear Implantation Project in Hannover. *Am J Otol* 18: 4-6
- Leon PE, Raventos H, Lynch E, Morrow J, and King MC (1992) The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5181-5184
- Lesperance MM, Hall JW, Bess FH, Fukushima K, Jain PK, Ploplis B, San Agustin TB, Skarka H, Smith RJ, Wills M (1995) A gene for autosomal dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment maps to 4p16.3. *Hum Mol Genet* 4: 1967-1972.
- Li W, Hermann RK, Shaw JE (1992) Analysis of the *Caenorabditis elegans* and axonal guidance and outgrowth gene *unc-33*. *Genetics* 132: 675-689
- Lynch ED, Lee MK, Morrow JE, Welsch PL, Leon PE, and King MC (1997) Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene *diaphanous*. *Science* 278: 1315-1318
- Marini R, Temple K, Chitty L, Genet S, Baraitser M (1991) Pitfalls in counselling: the craniosynostoses. *J Med Genet* 28: 1117-1121
- McIntire SL, Gurriga G, White J, Jacobson D, Horvitz HR (1994) Genes necessary for directed axonal elongation and fasciculation in *C.elegans*. *Neuron* 8: 307-322
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215-1218
- Morton LP, Reynolds L (1991) High frequency thresholds: variations with age and industrial noise exposure. *S Afr J Commun Disord* 38: 13-7
- Morton NE (1995) Sequential test for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* 58: 17-20

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273
- Nance WE; Sweeny A (1975) Genetic factors in deafness of early life. *Otolaryngol Clin North Am* 84: 459-472
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF (1994) The ancient regulatory-protein family of *WD*-repeat proteins. *Nature* 371: 297-300
- Novikota E, Frickler LD, Reznik SE (2001) *Metalloproteinase Z* is dynamically expressed in mouse development. *Mech Dev* 102: 259-262
- Ott J (1999) Analysis of human genetic linkage. Baltimore, MD: John Hopkins University Press: 1-424
- Pantke OA, Cohen MM Jr, Witkop CJ Jr et al (1975) The Saethre-Chotzen syndrome. *Birth Defects* 11: 190-225
- Parving A (1976) Meniere's disease in childhood. *J Laryngol Otol* 90: 817-821
- Parving A (1979) Complete remission of a monosymptomatic unilateral sensorineural low-frequency hearing loss in a child. *J Laryngol Otol* 93: 507-511
- Parving A (1984) Inherited low-frequency hearing loss. A new mixed conductive/sensorineural entity. *Scand Audiol* 13: 47-56
- Parving A, Bak-Pedersen K (1978) Clinical findings and diagnostic problems in sensorineural low frequency hearing loss. *Acta Otolaryngol* 85: 184-190
- Parving A, Elberling C (1982) High-pass masking in the classification of low-frequency hearing loss. *Scand Audiol* 11: 173-178
- Parving A, Johnsen NJ, Holm-Jensen S (1978) Dominantly inherited low-frequency hearing loss. *Audiology* 17: 165-172
- Parving A, Sakihara Y, Christensen B (2000) Inherited sensorineural low-frequency hearing impairment: some aspects of phenotype and epidemiology. *Audiology* 39: 50-60
- Pickles JO (1993) An analysis of actin isoforms expressed in hair-cell enriched fractions of the chick basilar papilla by the polymerase chain reaction technique. *Hear Res* 71: 225-229
- Ptok M (1997) [Hearing disorders in infants and young children. Possibilities for early diagnosis and therapy]. *Hno* 45: 183-184
- Pujol R (1985) Morphology, synaptology and electrophysiology of the developing cochlea. *Acta Otolaryngol* 421: 5-9
- Putz R, Pabst R (1993) Sobotta: Atlas der Anatomie des Menschen. Urban & Schwarzenberg München Wien Baltimore Band 2: 365-384
- Raphael Y (1992) Evidence for supporting cell mitosis in response to acoustic trauma in the avian inner ear. *J Comp Neurol* 330: 521-532

- Raphael Y (1993) Reorganization of the chick basilar papilla following acoustic trauma. *J Comp Neurol* 330: 521-532
- Reardon W, Winter RM (1994) Saethre-Chotzen syndrome. *J Med Genet* 31: 393-396
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sambrook JF, Maniatis T (1998) *Molecular cloning – A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Satokata I, Maas R (1994) *Msx1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 6: 348-356
- Schiebler Theodor H, Schmidt W, Zilles K (1997) *Anatomie Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: 703-718
- Schmidt Robert F, Thews G (1995) *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: 258-276
- Schmidt, PH (1980) Low-tone perceptive hearing loss. Paper presented at Collegium ORLAS: Scientific Meeting in San Francisco California, 14-18 Sept.
- Schuster D (1997) DNA-Fragmentgrößenbestimmung und Quantifizierung. In: *Automatische genetische Analytik* [ Hrsg: Mertes G, Schaefer TA, Schild G, Schuster D, vom Stein J] Wiley-VCH-Verlag Weinheim 87-117
- Speich N, Grzeschik KH (1997) Kartierung von genetischen Markern. In: *Automatische genetische Analytik* [Hrsg: Mertes G, Schaefer TA, Schild G, Schuster D, vom Stein J] Wiley-VCH-Verlag Weinheim 165-177
- Spurr, NK (1991) Standards for report alleles at high polymorphic loci: a proposal. *Hum Mol Gen* 1: 211-212
- Stebbins WC, Hawkins JE, Johnson LG, Moody DB (1979) Hearing thresholds with outer and inner hair cell loss. *Am J Otolaryngol* 1: 15-27
- Stone JS, Cotanche DA (1994) Identification of the timing of S phase and the patterns of cell proliferation during hair cell regeneration in the chick cochlea. *J Comp Neurol* 341: 50-67
- Strachan T, Read AP (2000) *Human Molecular Genetics*, BIOS Scientific Publishers Limited: 367-393
- Strom TM, Hortnagel K, Hofmann S, Gekeler F, Scharfe C, Rabl W, Gerbitz KD, Meitinger T (1998) Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (*wolframin*) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet* 7: 2021-2028

- Stürzebecher E, Wagner H, Cebulla M, Bischoff M (1996) Frequency-specific brainstem responses to bone-conducted tone pulses masked by notched noise. *Audiology* 35: 45-54
- Suehiro S, Sando I (1979) Congenital anomalies of the inner ear: introducing a new classification of labyrinthine anomalies. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 88: 1-24
- Swift RG, Sadler DB, Swift M (1990) Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet* 336: 667-669
- Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, Watnabe Y, Shinoda K, Oka Y (2001) *WFS* (*Wolfram-syndrome 1*) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmatic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet* 10: 477-484
- The Vanderbilt University Hereditary Deafness Study Group (1968) Dominantly Inherited Low-Frequency Hearing Loss. *Arch Otolaryng* 88: 242-251
- Van Camp G, Kunst H, Flothmann K, McGuirt W, Wauters J, Marres H, Verstreken M, Bernalova IN, Burmeister M; Van de Heining PH, Smith RJ, Willems PJ; Cremers CW, Lesperance MM (1999) A gene for autosomal dominant hearing impairment (DFNA14) maps to a region on chromosome 4p16.3 that does not overlap the DFNA6 locus. *J Med Genet* 36: 532-536
- Venter C, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ et al. (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science* 291: 1304-1321
- Wang Y, Raphael Y (1996) Re-innervation patterns of chick auditory sensory epithelium after acoustic overstimulation. *Hear Res* 97: 11-18
- Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch BM, and Narumiya S (1997) *PI40mDia*, a mammalian homolog of *Drosophila diaphanous*, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J* 16: 3044-3056
- Wu DK, Oh SH (1996) Sensory organ generation in the chick inner ear. *J Neurosci* 16: 645-662
- Young TL, Ives E, Person E, Snook S, Mac Laren L, Cator T, Griffin A, Fernandez B, Lee MK, King MC (2001) Non-syndromic progressive hearing loss DFNA38 is caused by heterozygous missense mutation in the *Wolfram syndrome gene WFS1*. *Hum Genet* 22: 2509-2514
- Zhang H, Catron K, Abate-Shen C (1996) A role for the *Msx-1* homeodomain in transcriptional regulation: Residues in the N-terminal arm mediate TATA binding protein interactions and transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93: 1764-1769

## IX Anhang

### 1. Definitionen

Ein **Locus** ist ein bestimmter Ort auf einem Chromosom, der die Position eines bestimmten Gens oder einer DNA-Sequenz definiert.

Ein **Gen** ist ein DNA-Abschnitt, der normalerweise ein funktionstüchtiges Polypeptid oder ein RNA-Produkt kodiert.

Als **Allel** bezeichnet man ein oder mehrere unterschiedliche Formen eines Gens oder einer DNA-Sequenz an einer bestimmten Position im Genom (Locus). Eine Person besitzt an jedem autosomalen Locus zwei Allele, eines vom Vater und eines von der Mutter.

Die Kombination der jeweils zwei Allele eines Chromosomenpaares entspricht dem **Genotyp**. Die Reihenfolge einzelner Allele benachbarter Loci auf einem Chromosom bezeichnet man dagegen als **Haplotyp**.

**Kopplung** ist eine Tendenz von Genen oder anderen DNA-Sequenzen an bestimmten Loci aufgrund ihrer räumlichen Nähe auf einem Chromosom gemeinsam vererbt zu werden. Kopplung zwischen zwei Loci liegt vor, wenn die Rekombinationsrate zwischen den Loci kleiner als 0.5 ist.

**Rekombination** ist eine durch „crossing over“ während der Meiose neu entstehende Kombination von Genen. Weil „crossing over“ ein Zufallsprozess ist, ist die Wahrscheinlichkeit für Rekombination zwischen weit auseinander liegenden Loci auf einem Chromosom größer als jene für nahe beieinander liegende Loci. Diese Abhängigkeit der Rekombinationsrate von der Distanz zwischen zwei Loci auf einem Chromosom bildet die Grundlage für Kopplungsanalysen. Mit solchen Analysen soll die Reihenfolge von Loci auf einem Chromosom geschätzt werden. Wenn z.B. die Rekombinationsrate zwischen den Loci A und B 0.05 und zwischen den Locus A und C 0.15 ist, kann man die Loci zur Reihenfolge A-B-C ordnen. Zudem lässt sich aus der Höhe der Rekombinationsrate eine genetische Distanz zwischen den Loci errechnen. Für Loci, die nicht auf dem gleichen Chromosom liegen, beträgt die Rekombinationsrate exakt 0.5.

**Marker** ist für sich allein kein eindeutig definierter Begriff. In der klassischen Genetik bezog sich der Begriff Marker auf phänotypische Merkmale, wie zum Beispiel Fellfarbe oder Hornlosigkeit. Diese Markerphänotypen konnte man ohne großen Aufwand messen und beobachten. Die Individuen konnten anhand der Ausprägung dieser Merkmale (z.B. rote Fellfarbe) klassifiziert werden.

---

Ein **genetische Marker** ist z.B. eine polymorphe DNA-Sequenz, die von einem einzigen chromosomalen Locus abstammt und die für die genetische Kartierung genutzt werden kann.

Günstige genetische Marker weisen meist viele Allele auf, man bezeichnet sie dann als hochpolymorph. Anhand polymorphen Markern ist die Segregation von Genen besonders gut zu beobachten.

Die erste Generation von DNA-Markern waren 1975 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs), die auf Restriktionsschnittstellen-Polymorphismen beruhen. Da diese Restriktionsschnittstellen-Polymorphismen nur zwei Allele besitzen, war die Entdeckung von Minisatellitenmarkern (VNTR-Markern, 1985) und Mikrosatellitenmarkern (1989) mit vielen Allelen und einem dementsprechend großen Informationsgehalt ein großer Fortschritt.

Auch Blutgruppen, Enzymvarianten und Proteinpolymorphismen sind als genetische Marker verwendbar. Hierbei muss man allerdings von Markerphänotypen sprechen, weil man hierbei nicht den Genotyp, sondern den Phänotyp beobachten kann.

## **2. Kasuistik eines Patienten mit autosomal-dominanter, nicht-syndromaler, sensorineuraler Schwerhörigkeit**

### **Patientin, weiblich, geboren am 07.05.1993**

Die Patientin wurde erstmals im Alter von 3 Jahren und zwei Monaten mit Verdacht auf Schwerhörigkeit in der Abteilung für Phoniatrie und Pädaudiologie der Philipps-Universität Marburg vorgestellt.

### **Diagnose:**

Verdacht auf beidseitige, mittelgradige, apicochleär betonte Schallempfindungsschwerhörigkeit.

### **Anamnese:**

Bei bekannter Schwerhörigkeit des Vaters sowie des älteren Bruders des Kindes wurde die Patientin zur Einschätzung ihres peripheren Hörvermögens von den Eltern vorgestellt. Eine Hörminderung sei im häuslichen Umfeld bislang nicht aufgefallen, die Sprachentwicklung sei normal verlaufen. Zur Vorgeschichte des Kindes sind mit Ausnahme häufiger Erkältungen keine Besonderheiten bekannt.

### **Körperlicher Befund:**

Körperliche Untersuchungsbefunde erbrachten keine äußerlichen Dysmorphiezeichen. Der HNO-Status war bis auf einen fronto-offenen Biss unauffällig. Ohrmikroskopie und Spiegelbefunde, die in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde üblicherweise durchgeführt werden, zeigten keine als pathologisch einzustufenden Auffälligkeiten.

Die Sprache der dreijährigen Patientin wies eine partielle Dyslalie, einen Schetismus sowie eine Konsonantenverbindungsschwäche auf. Im Vergleich zur Altersnorm waren die Sprachleistungen allerdings nicht nennenswert auffällig. Das übrige orientierende Entwicklungsscreening ergab ebenfalls keine Besonderheiten.

### **Funktionsbefunde:**

Tonschwellenaudiometrisch ermittelt sich ein tieftonbetonter Hörverlust von etwa 40 dB. Die Tympanogrammkurven sind beidseits glockenförmig und in den Unterdruckbereich

verschoben. DP OAE (Otoakustische Distorsionsproduktinformationen Emissionen) sind beidseits nur über einen sehr schmalen Frequenzbereich um etwa 3 kHz reproduzierbar messbar.

**Beurteilung:**

Bei bekannter familiärer Disposition wird eine genetische, monosymptomatische Ätiologie der diagnostizierten beidseitigen mittelgradigen, apicochlär betonten Schallempfindungsschwerhörigkeit angenommen.

**Therapie:**

Insgesamt wurde das Hörvermögen so eingeschätzt, dass keine nennenswerten audiogenbedingten Einschränkungen für die Sprachentwicklung zu erwarten sind. Regelmäßige audiologische Kontrolluntersuchungen wurden empfohlen, um gegebenenfalls eine apparative Versorgung einleiten zu können.

**Epikrise:**

Eine Vorstellung der Patientin erfolgte am 07.05.1993 mit Verdacht auf Schwerhörigkeit bei bekannter familiärer Disposition. Aufgrund der Diagnose einer beidseitigen, mittelgradigen, apicochleär betonten Schallempfindungsschwerhörigkeit wurde zu regelmäßigen Kontrollen geraten.

Trotz der recht gut erhaltenen Fähigkeit des Sprachverstehens erfolgte nach der erneuten audiologischen Kontrolle am 19.03.1998 zunächst probeweise eine beidohrige Hörgerätversorgung (Hörgerät Oticon Digi Life C). Hierunter sollte dem Kind eine Erleichterung bei ungünstiger akustischer Umgebung geschaffen werden.

Am 11.12.1998 wurde die Patientin zur erneuten audiometrischen Kontrolle mit Überprüfung der Hörgerätenpassung vorgestellt. Von elterlicher Seite wurde berichtet, dass die Patientin ihr Hörgerät inzwischen gut akzeptiere. Es sei erkennbar, dass die Patientin Gesprächen jetzt besser folgen könne.

**Fragestellung:**

Für autosomal-dominante, nicht-syndromale Schwerhörigkeit sind 39 Genloci in der Literatur beschrieben worden. Drei dieser Genloci (DFNA1, lokalisiert auf Chromosom 5q31, und

DFNA6 und DFNA14, beide auf dem Chromosom 4p16.3 lokalisiert) segregieren in Familien, die von Schwerhörigkeit besonders in mittleren und tiefen Frequenzbereich betroffen sind.

Bei klinisch-anamnestischen Verdacht auf nicht-syndromale, autosomal-dominant vererbter Tieftonschwerhörigkeit in der Familie soll eine Kopplung des Krankheitslocus für Tieftonschwerhörigkeit mit den bereits aus der Literatur bekannten Genloci DFNA1, DFNA6 und DFNA14 nachgewiesen oder widerlegt werden.

### **Molekulargenetischer Befund:**

Es wurde bei von Schwerhörigkeit betroffenen und hörgesunden Familienmitgliedern eine Kopplungsanalyse mit Mikrosatellitenmarkern durchgeführt, die die Genloci DFNA1, DFNA6 und DFNA14 flankieren. Eine Rekombination zwischen den Markern D4S2957 und D4S432 und zwischen den Markern D4S3007 und D4S394 konnte bei den schwerhörigen Familienmitgliedern III:1 und III:5 nachgewiesen werden, wohingegen sich bei dem nicht von Schwerhörigkeit betroffenen Familienmitglied III:6 eine Rekombination zwischen den Markern D4S394 und D4S2983 nachweisen lässt. Die chromosomale Region, die von den Markern D4S2957 und D4S394 begrenzt ist, ist somit ausschließlich bei betroffenen Familienmitgliedern vorhanden. Es konnte durch die durchgeführte Kopplungsanalyse eine Assoziation mit der Kandidatengenregion auf Chromosom 4p16.3 nachgewiesen werden. Durch Mutationsanalysen in der in Frage kommenden Kandidatengenregion soll die molekulargenetische Ursache für die autosomal-dominante, nicht-syndromale Tieftonschwerhörigkeit weiter analysiert werden.

### 3. Allelgrößen und -frequenzen für die in der Kopplungsanalyse verwendeten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 4 und Chromosom 5

**Tabelle 11:** Allelbezeichnungen und -frequenzen in der kaukasischen Bevölkerung für die in der Kopplungsanalyse verwendeten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 4 und Chromosom 5 (Genome Database GDB).

#### Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 4

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D4S3034</b>	1	184	0,48
	2	186	0,36
	3	182	0,12
	4	188	0,04

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D4S412</b>	1	237	0,3
	2	239	0,03
	3	243	0,21
	4	245	0,28
	5	247	0,08
	6	249	-

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D4S2957</b>	1	109	0,2
	2	111	0,56
	3	107	0,22
	4	105	0,02

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D4S432</b>	1	224	0,1
	2	232	0,16
	3	234	0,02
	4	244	0,38
	5	254	0,28
	6	258	0,04
	7	272	0,02

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D4S2925</b>	1	153	0,42
	2	155	0,12
	3	151	0,46
	4	149	-

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D4S431</b>	1	246	0,01
	2	248	0,16
	3	250	0,05
	4	252	0,19
	5	254	0,23
	6	256	0,19
	7	258	0,07
	8	260	0,03
	9	262	0,01
	10	270	0,01

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D4S2935</b>	1	116	0,45
	2	104	0,41
	3	120	0,02
	4	114	0,05
	5	118	0,04
	6	112	0,04

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D4S3007</b>	1	242	0,16
	2	246	0,38
	3	240	0,46

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D4S394</b>	1	189	0,1
	2	191	0,03
	3	193	0,19
	4	195	0,03
	5	197	0,37
	6	199	0,19
	7	209	0,01
	8	215	0,03
	9	205	-
	10	218	-
	11	201	-

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D4S2983</b>	1	252	0,07
	2	246	0,2
	3	250	0,18
	4	244	0,04
	5	238	0,02
	6	245	0,04
	7	254	0,11
	8	251	0,04
	9	248	0,18
	10	249	0,07
	11	247	0,04
	12	241	0,02
	13	220	0,02

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D4S3023</b>	1	147	0,04
	2	143	0,50
	3	151	0,14
	4	149	0,09
	5	155	0,09
	6	145	0,12
	7	153	0,02

### Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 5

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D5S399</b>	1	116	0,17
	2	118	0,23
	3	126	0,21
	4	128	0,26
	5	130	0,30
	6	132	0,07

Markername	Allelbezeichnung	Allelgröße (bp)	Allelfrequenz
<b>D5S402</b>	1	165	0,25
	2	167	0,50
	3	169	0,25

## X Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Anschrift: Susanne Brodwolf  
Neubronner Str.7  
87437 Kempten

Geburtsdatum/-ort: 14.11.1977 – Aachen, NRW

Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1984 - 1985 Grundschule Raisting,  
Kreis Weilheim-Schongau; Bayern

1985 - 1988 Everword-Grundschule,  
Warendorf-Freckenhorst; NRW

1988 - 1995 Gymnasium Laurentianum,  
Warendorf; NRW

1995 - 1997 Max-Planck-Schule,  
Gymnasium des Landkreises Darmstadt-Dieburg

17.06.1997 Abschluss:  
Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

### Hochschulausbildung:

09/1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin  
an der Philipps-Universität Marburg

09/1999 Ärztliche Vorprüfung

08/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

WS 2002/03 Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm, mit Beginn  
des Praktischen Jahres am Klinikum Kempten-Oberallgäu;  
Wahlfach: Pädiatrie

10/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

ab 01.11.2003 Ärztin im Praktikum am Zentrum für Innere Medizin - Abteilung  
Kardiologie des Lehrkrankenhauses Kempten-Oberallgäu

**Promotionsarbeit:**

09/2000-02/2002

Durchführung am Zentrum für Humangenetik des FB Medizin der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von HD Dr. rer. nat. Jürgen Kunz

Thema: Familienuntersuchung zur Identifizierung einer Kandidatengenregion für eine autosomal-dominante, nicht-syndromale Form einer Mittel- bis Tieftonschwerhörigkeit

Publikation in Clin Genet 60: 155-160

**Famulaturen und Praktika:**

08.02.98 – 08.03.98

Krankenpflegepraktikum auf der internistischen Abteilung des St. Rochus-Krankenhauses in Dieburg

09.03.98 – 05.04.98

Krankenpflegepraktikum in der Kinderklinik Prinzessin Margaret in Darmstadt

14.02.00 – 13.03.00

Famulatur in der Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin im Diakonie-Krankenhaus Wehrda / Marburg

03.03.01 – 01.04.01

Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin im Kreis-Krankenhaus Groß-Umstadt / Dieburg

29.08.01 – 01.10.01

Famulatur in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe im University Central Hospital in Turku / Finnland

09.07.01 – 12.08.01

Famulatur in einer Facharztpraxis für Kinderheilkunde in Groß-Umstadt / Dieburg

**Studiumbegleitende Veranstaltungen:**

WS 1999/2000

Teilnahme am Impfkurs am Institut für Virologie der Philipps-Universität- Marburg

WS 1999/2000

Teilnahme an der Vorlesung mit praktischen Übungen zur Transfusionsmedizin und -serologie

SS 2002

Teilnahme am Kurs „Praktische Übungen zur operativen Dermatologie“

Kempten, 2004

## **XI Ehrenwörtliche Erklärung**

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

„Familienuntersuchung zur Identifizierung einer Kandidatengenregion für eine autosomal-dominante, nicht-syndromale Form einer Mittel- bis Tieftonschwerhörigkeit“

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

### **Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:**

Brodwolf S, Bötdecker IR, Ziegler A, Rausch P, Kunz J (2001) Further evidence for linkage of low-mid frequency hearing impairment to the candidate region on chromosome 4p16.3. Clin Genet 60: 155-160

### **Posterbeiträge:**

Rausch P, Brodwolf S, Kunz J (2001) Low-mid frequency sensory hearing impairment in a three generation family with evidence for linkage to the candidate region on chromosome 4p16.3. Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Phoniatrie und Pädaudiologie, Frankfurt/Main 28.-30. September: S. 62

Kunz J, Brodwolf S, Bötdecker IR, Ziegler A, Rausch P (2001) Analysis of low-mid frequency hearing impairment shows further evidence for linkage to chromosome 4p16.3 The molecular biology of hearing and deafness, October 4-7, 2001 Ryatt Regency Hotel Bethesda, Maryland, USA: S. 41

Marburg, 2004

(Susanne Brodwolf)

---

## **XII Verzeichnis der akademischen Lehrer**

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

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Behr, Berger, Bertalanffy, Bien, Doss, Engel, Engenhardt-Cabillic, Gemsa, Gotzen, Griss, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Heeg, Hofmann, Klenk, Klose, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhn, Lange, Lill, Lorenz, Maisch, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Renz, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Schulz, Schwarz, Seyberth, Vogelmeier, Voigt, Weiler, Werner, Wulf.

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

Antes, Mischkowski, Müller, Neher, Prümmer.

### **XIII Danksagung**

Die vorliegende Arbeit habe ich am Zentrum für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von September 2000 bis März 2001 unter der Leitung von Herrn Hochschuldozent PD Dr. J. Kunz durchgeführt.

Danken möchte ich allen, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben;

insbesondere danke ich

- Herrn HD Dr. J. Kunz für die Bereitstellung des interessanten und aktuellen Themas, für seinen persönlichen Einsatz bei der durchgehend interessierten fachlichen Begleitung der Arbeit, für zahlreiche Anregungen, sachliche Kritik und die Vermittlung wichtiger Kontakte.
- Frau Prof. Dr. Berger und Herrn Dr. med. P. Rausch 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. A. Ziegler und Frau I.R. Böddeker für die gute Zusammenarbeit bei der statistischen Auswertung der Familiendaten;
- Herrn Dr. F. Oeffner für die Hilfe bei der Auswertung der Kopplungsanalyse;
- Herrn H. Engel für seine technische Hilfe.

**Ferner möchte ich den Angehörigen der Probandenfamilie für ihre Kooperation danken.**

Allen Mitarbeitern des Instituts bin ich dankbar für die freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit, für ihre Hilfe und Unterstützung:

- Herrn Dipl. Biol. C. Kosan für die Einarbeitung in die Arbeitsmethoden und für die zuverlässige Hilfsbereitschaft;
- Frau Dipl. Biol. M. Godmann, Frau U. Neidel und Frau D. Lerche für ihre Unterstützung und für die vielen schönen Stunden im Labor!

Auch allen hier nicht namentlich erwähnten Institutsmitgliedern danke ich für das gute Arbeitsklima. Ich werde mit Freude an die Zeit im Labor zurückdenken.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, Herrn Dr. H. Brodwolf und Frau M.-L. Brodwolf, die mir durch vielseitige Unterstützung die Durchführung der Arbeit ermöglicht haben .