

**Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen
Abteilung Physiologie I
Leiter: Professor Dr. F. Lang**

**Funktionelle Charakterisierung von Connexin 26-
Mutationen bei Patienten mit autosomal-rezessiver
Schwerhörigkeit**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard –Karls -Universität
zu Tübingen**

Vorgelegt von

**Kathrin Helene Schmalisch
aus
Böblingen**

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang
2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. M. Knipper

Für Joachim, Lena und Karen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Schwerhörigkeit.....	6
1.2. Aufbau des menschlichen Innenohrs	9
1.3. Schallumsetzung im Innenohr.....	12
1.4. Connexine.....	14
1.5. Das <i>GJB2</i> -/Connexin 26 Gen.....	23
1.6. Ziele dieser Arbeit	26
2. Material und Methoden.....	28
2.1. Verwendete Lösungen und Substanzen	28
2.2. <i>Xenopus laevis</i> und Oozytenpräparation	29
2.3. cRNA-Injektion	31
2.4. DNA-Proben.....	34
2.5. Konstrukte und zielgerichtete Mutagenese	35
2.6. Western Blot	36
2.7. Quantifizierung der Oberflächenexpression durch Chemilumineszenz 37	
2.8. Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Messungen (TEVC).....	38
2.9. Subjektive und objektive Audiometrieverfahren	41
2.10. Statistik.....	42
2.11. Abkürzungsverzeichnis.....	42
3. Ergebnisse	44
3.1. Heterologe Expression der Connexin 26 Mutationen in <i>Xenopus</i> Oozyten	44
3.2. Funktionelle Analyse der Connexin 26 Mutationen	47
3.3. Transdominante Wirkung der Connexin 26 Mutationen auf Connexin 30 und Connexin 31.....	51
3.4. Die neu entdeckte Punktmutation N14D	54
3.4.1. Klinische Daten	54
3.4.2. Molekulare Analysen.....	57
3.4.3. Funktionelle Analysen.....	57

4.	Diskussion.....	62
4.1.	Fehlerdiskussion	62
4.1.1.	Oozytenpräparation	62
4.1.2.	Lösungen und Geräte	62
4.1.3.	Auswertung.....	62
4.2.	Diskussion der Ergebnisse.....	63
5.	Literatur.....	70
5.1.	Literaturverzeichnis.....	
5.2.	Verwendete Internetseiten:	78
5.3.	Verwendete Bücher.....	78
6.	Anhang.....	79
6.1.	Publikationsverzeichnis.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
6.2.	Abstracts	79
6.3.	Danksagung.....	80
6.4.	Curriculum vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

1.1. Schwerhörigkeit

Nicht-syndromale, sensorineurale Schwerhörigkeit ist die häufigste Krankheit der Sinnesorgane des Menschen. Etwa 1 von 1000 Kindern wird mit prälingualer Schwerhörigkeit geboren und in etwa 50 % der Fälle ist die Krankheit vererbt (Morton, N. E. 1991). Das Vererbungsmuster ist in 70% der Fälle autosomal-rezessiv, zu 15% autosomal-dominant, zu 1-3% x-chromosomal und unter 1% der Fälle mitochondrial vererbt. Erbliche Schwerhörigkeiten werden in syndromale, bei denen außer Hörbeeinträchtigung noch weitere klinische Symptome vorkommen und nicht-syndromale, isolierte, Schwerhörigkeiten unterschieden. Aktuell sind mehr als 70 Loci, die in Verbindung mit nicht-syndromalen Formen von Schwerhörigkeit stehen, identifiziert (<http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>). Ein Locus, DFNB1, ist für einen großen Anteil nicht-syndromaler, autosomal-rezessiv vererbter Schwerhörigkeit verantwortlich. Die autosomal-rezessiven Formen der genetisch bedingten, nicht-syndromalen Schwerhörigkeiten werden am häufigsten beobachtet. Diese Formen sind mit den höchsten Hörverlusten assoziiert, d.h. es kann zur Ausprägung von Hörverlusten kommen, die an Taubheit grenzend (>90 dB) bezeichnet werden (Kalatzis, V. & Petit, C. 1998). Das am häufigsten beteiligte Gen in DFNB1 ist *GJB2*, welches das Connexin 26 Protein verschlüsselt. Aufgrund der komplexen Innenohrphysiologie nimmt man an, dass es mindestens 100 Gene und Genprodukte gibt, die beim Hörvorgang eine tragende Rolle spielen und deren Defekte zu einer Hörschwäche führen könnten (Petit, C. et al. 2001). Es ist bis jetzt nur ein Bruchteil der Gene bekannt, wobei die meisten in den letzten 10 Jahren identifiziert wurden. Schwerhörigkeiten können von unterschiedlicher Ausprägung sein und werden klinisch entsprechend des Schweregrades, des Beginns der Beeinträchtigung, des involvierten Frequenzbereichs und weiteren Kriterien eingeteilt (Tabelle 1).

Kriterien	Kategorie
Schweregrad (Frequenz 2-4 kHz)	-normal: <20 dB -mild: 21-40 dB -mittelgradig: 41-70 dB -hochgradig: 71-95 dB -taub: >95 dB
Erkrankungsalter	-prälingual: vor Sprachentwicklung -postlingual: nach Sprachentwicklung
Typ	-konduktiv (Schalleitungs-SH): Außen- und Mittelohrdefekt -sensorineural (Schallempfindungs-SH): cochleärer oder retrocochleärer Defekt -kombiniert
Involvierte Frequenzen	-niedrige Frequenzen: 250-500 Hz -mittlere Frequenzen: 500-2000 Hz -hohe Frequenzen: 2000-8000 Hz
Lokalisation	-rechtes/ linkes Ohr -symmetrisch/ asymmetrisch: >10 dB Differenz zwischen den Ohren für mindestens 2 Frequenzen
Entwicklung	-progressiv -stabil
Syndromal/ Nicht-syndromal	-syndromal: mit anderen klinischen Anomalien assoziiert -nicht-syndromal: Schwerhörigkeit isoliert

Tabelle 1: Klassifikation von Schwerhörigkeiten

Grundsätzlich wird zwischen 2 Formen des Hörverlustes unterschieden: Manifestiert sich die Hörstörung innerhalb der ersten beiden Lebensjahre, bzw. vor dem Erlernen von Sprache, so wird die Hörstörung als prälingual bezeichnet. Tritt der Hörverlust nach dem Erlernen von Sprache auf, wird er als postlingual definiert. Prälinguale Schwerhörigkeit tritt oftmals bedingt durch genetische Ursachen oder als Folge von frühkindlichen Infektionen (z.B.: Toxoplasmose, Röteln oder Cytomegalie) oder infolge von akustischen Traumata auf. Postlinguale Hörstörungen finden Ihre Ursache meist in Form von alterungsbedingten Veränderungen, als Folge von traumatisch bedingten Läsionen (Lärm, mechanische Traumata), bzw. als Folge von Infektionen, oder werden ebenfalls auf Grund von angeborenen Gendefekten verursacht, die sich nach Erlernen von Sprache manifestieren (Avraham, K. B. 1997).

Im angloamerikanischen Sprachgebiet werden die Hörstörungen nach Schweregrad des Hörverlustes, ausgedrückt in dB (Schalldruckpegel), eingeteilt.

Bezüglich der anatomischen Ursachen werden formal bei den Schwerhörigkeiten konduktive (schalleitungsbedingt), sensorineurale (schallempfindungsbedingt), kombinierte und zentrale Formen unterschieden (Kalatzis, V. & Petit, C. 1998). Handelt es sich um konduktive Hörstörungen, so ist der Defekt im Bereich von äußerem Ohr oder Mittelohr lokalisiert. Daraus ergeben sich Probleme, die die Schalleitungsfähigkeit des Ohres beeinflussen. Unter sensorineuralen Defekten versteht man Hörverluste, deren Ursachen im Bereich des Innenohres, oder aber im Verlauf des Hörnerven und des Hirnstammes zu finden sind. Hierbei kommt es zu Hörstörungen, die auf Grund einer verminderten Generierung von Aktionspotentialen im Bereich der Cochlea zu Stande kommen.

1.2. Aufbau des menschlichen Innenohrs

Das Innenohr liegt im harten Knochen des Felsenbeins. Es besteht aus drei schneckenförmig gewundenen Kanälen und wird deswegen auch Cochlea (Schnecke) genannt. Die drei Kanäle werden Scala vestibuli, Scala media und Scala tympani genannt. Die Scala vestibuli und die Scala tympani werden durch die Stapesfußplatte am ovalen Fenster bzw. durch die Membran am runden Fenster abgeschlossen (Abbildung 1). Alle Skalen sind mit Flüssigkeit gefüllt, die Scala media mit Endolymphe, die beiden anderen mit Perilymphe. Die Perilymphe ist ein Ultrafiltrat des Blutplasmas, sie ähnelt in der Zusammensetzung also extrazellulären Flüssigkeiten und enthält dementsprechend viel Natrium (140 mmol/l) und wenig Kalium. Die Perilymphräume von Scala vestibuli und Scala tympani stehen an der Schneckenspitze, dem Helikotrema, miteinander in Verbindung. Die Endolymphe wird von der Stria vascularis, einem stoffwechselaktiven Bereich an der seitlichen Schneckenwand, sezerniert. Endolymphe enthält etwa 145 mmol/l Kalium und entsprechend wenig Natrium, ähnlich der intrazellulären Flüssigkeit. Durch die Ionenpumpen der Stria vascularis wird nicht nur das Kalium in den Endolymphraum sezerniert, sie laden dadurch gleichzeitig auch den Endolymphraum auf etwa +80 mV positiv gegenüber dem Perilymphraum auf. Dieses funktionell wichtige Potential nennt man endolymphatisches Potential. Schleifendiuretika blockieren die Ionenpumpen der Stria, bei einer Überdosierung bricht das endolymphatische Potential zusammen und es entstehen Hörstörungen. Der Endolymphraum wird gegen die Scala vestibuli durch die Reißner-Membran begrenzt, diese hauchdünne Membran muss Peri- und Endolymphe voneinander trennen (Abbildung 2).

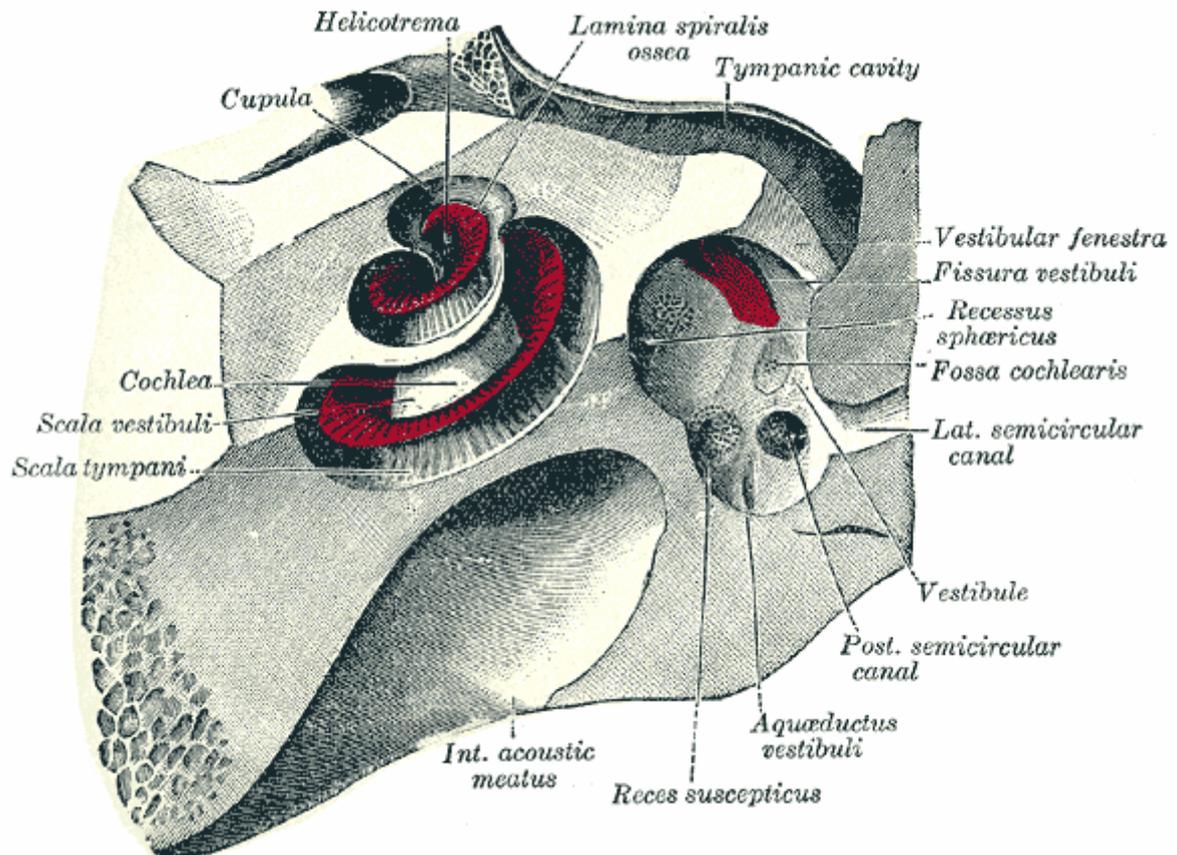


Abbildung 1: Aufbau der Cochlea (Quelle: Gray's Anatomy of the Human Body, 20th U.S. Edition)

Die Basalmembran bildet die Grenze zur Scala tympani und trägt den sensorischen Apparat, das Corti-Organ. Umgeben von Stützzellen, finden sich dort zwei Arten von Rezeptorzellen und zwar eine Reihe von inneren und drei Reihen von äußeren Haarzellen. An ihrer freien Oberfläche tragen die Haarzellen feine Härchen, die Stereovili, an der Spitze sitzen die „tip links“, kleine Eiweißfäden, wo sie an den Stereovili ansetzen liegen Ionenkanäle, hier wird bei der Transduktion der Schallreiz in ein Rezeptorpotential umgesetzt. Das Corti-Organ wird von der Tektorialmembran abgedeckt, es handelt sich um ein gallertartiges Gebilde, an dessen Unterseite die Spitzen der längsten Stereovili der äußeren Haarzellen angeheftet sind. Dies ist wichtig für die

Schalltransduktion. Die Haarzellen sind sekundäre Sinneszellen, d.h. sie bilden selbst keine Nervenfortsätze aus. Stattdessen werden sie von peripheren Dendriten der Bipolarzellen des Ganglion spirale innerviert. Die Axone des Ganglion spirale bilden den Hörnerv und ziehen zum Nucleus cochlearis. Auch efferente Fasern innervieren die Cochlea, die meisten enden an den äußeren Haarzellen, wenn diese Fasern vom zentralen Nervensystem aktiviert werden, reduzieren sie die Empfindlichkeit des Ohres.

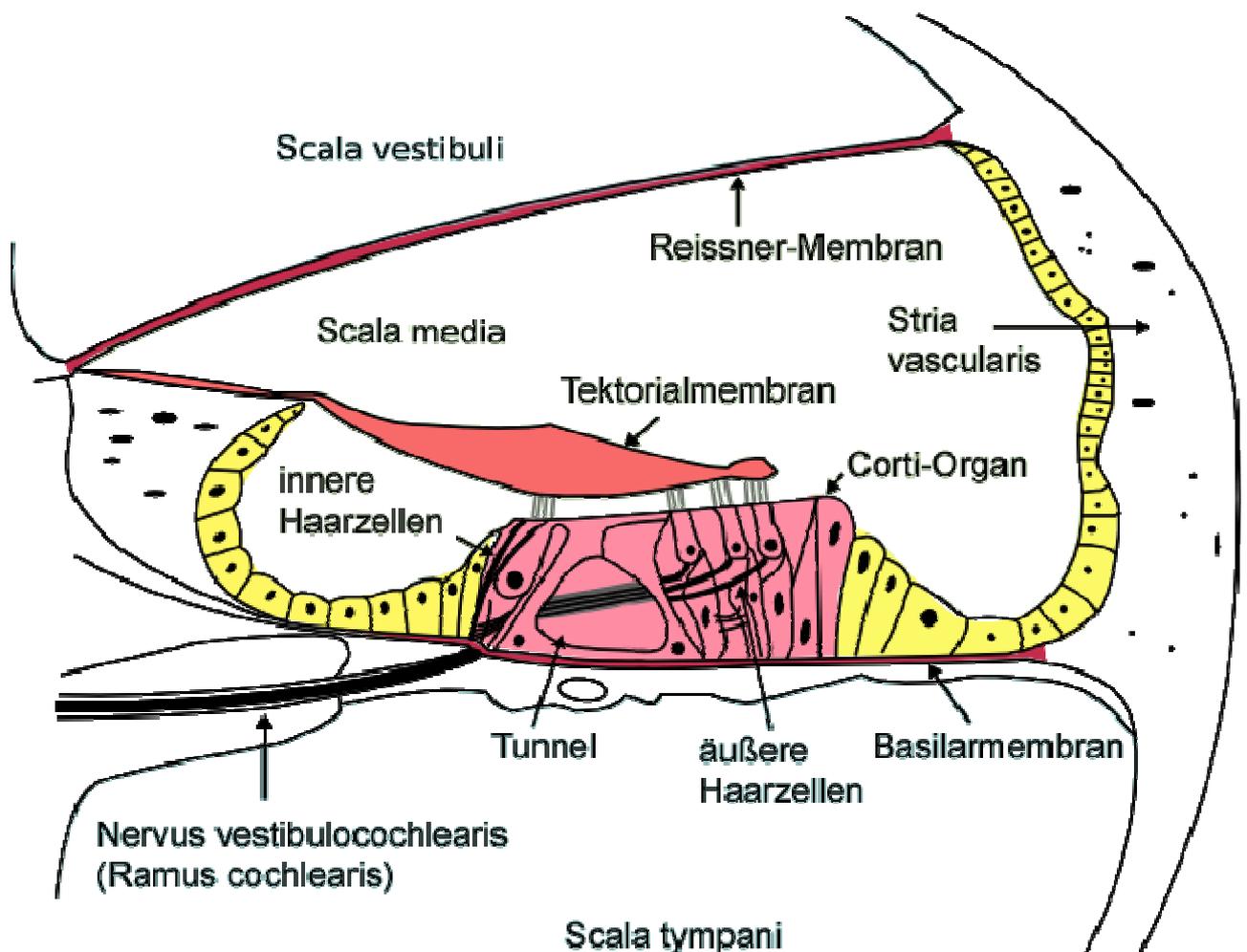


Abbildung 2: Schnitt durch die Hörschnecke, Aufbau des Corti-Organs, (Quelle: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/58/Cochlea-crosssection-de.png>)

1.3. Schallumsetzung im Innenohr

Die Schallumsetzung im Innenohr ist ein dreistufiger Vorgang.

Durch den Schallreiz gerät die Basilarmembran in Schwingung, zunächst schwingt der Stapes, seine Fußplatte bewegt sich dadurch ein- und auswärts. Dadurch werden die Schallwellen auf die Innenohrflüssigkeiten und die Membranen der Cochlea übertragen. Dies führt zu einer wellenförmigen Bewegung (Wanderwelle) entlang der genannten Membranen. An sich haben die entstehenden Wellen eine winzige Amplitude, es gibt jedoch zwischen Stapes und Helikotrema einen Ort, wo die Wellen eine wesentlich größere Amplitude erreichen. Grundlage dieses Schwingungsverhaltens ist die vom Stapes zum Helikotrema abnehmende Steife der Basilarmembran. Diese Steife bestimmt, zusammen mit schwingenden Massen, an welchem Ort der Basilarmembran die Schwingungsfähigkeit für eine bestimmte Anregungsfrequenz optimal ist. Der Ort des Maximums hängt von der Schallfrequenz ab. Hohe Frequenzen bilden das Maximum in der Nähe des Stapes, niedrige in der Nähe des Helikotremas aus. Jede Frequenz wird einem bestimmten Ort der Basilarmembran zugeordnet, man spricht von einer Frequenz-Ortsabbildung.

Die Wellenbewegungen führen zu gleichzeitigen Auf- und Abbewegungen von Basilarmembran und Tektorialmembran. Dabei kommt es vor allem im Bereich des Maximums der Wellenbewegung zu Scherbewegungen zwischen beiden Membranen, in deren Folge dort die Stereovili der äußeren Haarzellen abgebogen werden. Bei einer Aufwärtsbewegung der Basilarmembran werden dadurch die „tip links“ gedehnt und Ionenkanäle (Transduktionskanäle) in der Membran der Vili öffnen sich. Bei Abwärtsbewegungen werden die Transduktionskanäle wieder geschlossen. Die äußeren Haarzellen besitzen ein normales Membranpotential von etwa -70 mV , dadurch entsteht zwischen dem $+80\text{ mV}$ positiv geladenen Endolymphraum und dem Zytoplasma der Haarzellen eine Potentialdifferenz von etwa 150 mV . Entlang dieses Potentialgefälles fließen bei geöffneten Transduktionskanälen Kalium-Ionen in die Haarzelle und depolarisieren sie, es entsteht also ein Rezeptorpotential.

Werden die Transduktionskanäle wieder geschlossen, repolarisieren die Zellen wieder, dazu öffnen sich an der seitlichen Zellwand gelegene spannungsabhängige Kaliumkanäle und das Kalium fließt in die kaliumarmen Extrazellulärräume des Corti-Organs. Die äußeren Haarzellen erfüllen bei der Transduktion eine Doppelfunktion: Zum einen wird an ihnen der mechanische Schallreiz transduziert. Zum anderen führt das oszillierende Membranpotential bei ihnen zu oszillierenden Längenänderungen. Dazu gibt es in ihrer Zellmembran einen kontraktilem Apparat, der vom Membranpotential abhängt. Mit seiner Hilfe verlängern bzw. verkürzen sich die äußeren Haarzellen aktiv. Sie produzieren also zusätzliche Schallenergie und verstärken die Wanderwelle. Diese wird im Bereich des Maximums überhört, dadurch wird die Frequenzselektivität verbessert.

Die Oszillationen der äußeren Haarzellen besitzen die gleiche Frequenz wie der auslösende Schallreiz. Sie erhöhen also in einem lokal begrenzten Bereich der Basilarmembran die Schwingungsamplitude der Wanderwelle. Durch die verstärkte Schwingungsenergie werden nun auch die Stereovilli der inneren Haarzellen abgelenkt. Ihre „tip links“ werden wiederum gedehnt bzw. entdehnt und dadurch öffnen sich bzw. schließen sich die an den inneren Haarzellen befindlichen Transduktionskanäle. Bei geöffneten Transduktionskanälen fließen Kalium-Ionen ins Zellinnere, eine Depolarisation der inneren Haarzellen führt über einen Calcium-Einstrom zu einer Ausschüttung des Transmitters Glutamat, am basalen Pol der Haarzelle. Dadurch werden die afferenten Nervenfasern erregt, es entstehen Aktionspotentiale.

Somit ist der Transduktionsprozeß im Innenohr ein dreistufiger Prozeß:

1. Zunächst bildet sich durch die passiven Eigenschaften der Basilarmembran eine Wanderwelle aus.
2. Im Bereich des Wanderwellenmaximums werden die äußeren Haarzellen erregt und oszillieren aktiv. Dies verstärkt lokal die Wanderwelle, so dass nun auch
3. Die inneren Haarzellen erregt werden. Trotz der geschilderten Verstärkung sind die Schwingungsamplituden der Basilarmembran winzig. Bei der Hörschwelle betragen die Auslenkungen etwa dem mittleren Durchmesser

eines Wasserstoffatoms, damit ist das Ohr das empfindlichste Sinnesorgan des Menschen.

Viele Innenohrschwerhörigkeiten beruhen auf dem Ausfall des Verstärkermechanismus, es resultieren dabei Hörverluste von 30-50 dB, auch das Frequenzauflösungsvermögen ist verschlechtert. Diese Verschlechterung der Frequenzdiskrimination hat zur Folge, dass bei Innenohrschwerhörigkeit der Schaden durch eine Erhöhung des Schalldrucks (Hörgerät) nur unbefriedigend kompensiert werden kann.

1.4. Connexine

Als Connexine bezeichnet man eine Familie von Transmembranproteinen, die in Zellen *Gap junctions* bilden und den direkten Austausch von Molekülen bis zu einer Größe von circa 1 kDa zwischen benachbarten Zellen ermöglichen.

Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann man erkennen, dass *Gap junctions* eine dichte Packung mit einem regelmässigen hexagonalen Muster aufweisen (Abbildung 3). Sie weisen eine zentrale Öffnung von circa einem Durchmesser von 2 nm auf, die Zentren benachbarter Kanäle sind etwa 8,5 nm voneinander entfernt. Die Dichte der Kanäle einer *Gap junction* ist sehr hoch. Alle polaren Moleküle bis zu einer Größe von circa 1 kDa können diese Zell-Zell-Kanäle passieren, z.B. anorganische Ionen, Aminosäuren, Nucleotide, dagegen sind z.B. Proteine, Polysaccharide für diese Kanäle zu groß. *Gap junctions* sind wichtig für die interzelluläre Kommunikation. Die Zellen einiger erregbarer Gewebe, zum Beispiel des Herzmuskels, sind über einen raschen Strom von Ionen durch diese Kanäle miteinander gekoppelt, was eine schnelle und synchrone Antwort auf Reize gewährleistet. *Gap junctions* sind auch für die Ernährung von Zellen wichtig, die weit von den Blutgefäßen entfernt liegen, zum Beispiel in der Augenlinse und im Knochen. Darüberhinaus spielen kommunizierende Kanäle bei der Regulation von Entwicklung und Differenzierung eine bedeutende Rolle, zum Beispiel verwandelt sich während der Schwangerschaft der Uterus von einem ruhenden, den Fetus beschützenden Muskel mit dem Beginn der Geburt in einen sich

kontrahierenden Muskel zum Ausstoß der Frucht. Die Bildung von *Gap junctions* zu diesem Zeitpunkt erzeugt ein Syncytium von Muskelzellen, die sich synchron kontrahieren können.

Bis jetzt sind 21 verschiedene Connexine des Menschen bekannt und 20 Connexine in der Maus. Ihre Größe variiert zwischen 25 kDa und 60 kDa. Sie besitzen vier Transmembrandomänen mit zwei extrazellulären Schleifen, die aus antiparallelen β -Faltblättern aufgebaut sind. Ein Zell-Zell-Kanal besteht aus zwölf Molekülen Connexin, sechs Connexinmoleküle bilden einen Halbkanal, den man als Connexon bezeichnet. Jeweils zwei Connexone zweier benachbarter Membranen bilden einen *Gap junction*-Kanal.

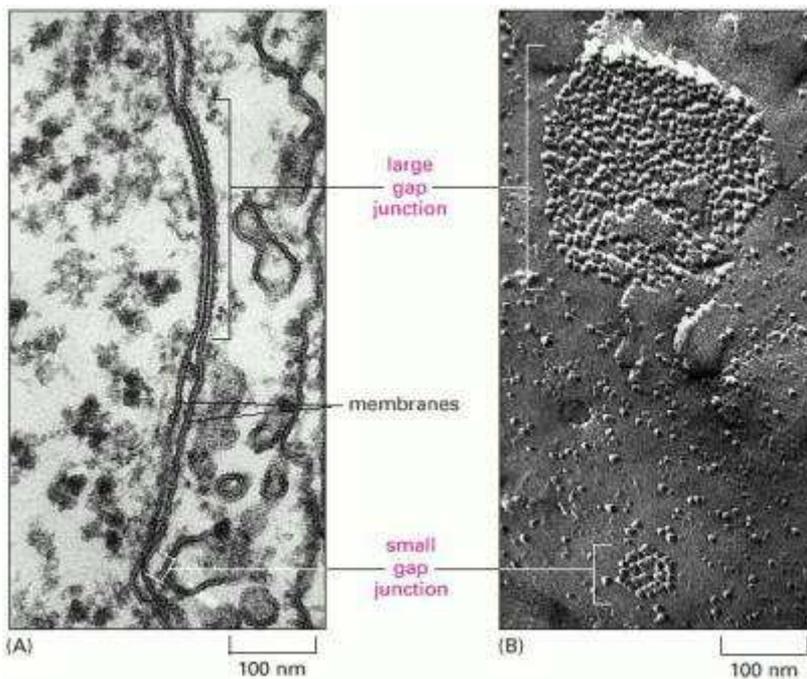


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von großen und kleinen *Gap junctions* zwischen Fibroblasten in einer Zellkultur (Quelle: Gilula, in *Cell Communication* [R.P. Cox, ed.], pp. 1–29. New York: Wiley, 1974. Reprinted by permission of John Wiley & Sons, Inc.)

Zell-Zell-Kanäle unterscheiden sich von anderen Membrankanälen in drei Punkten:

1. Sie durchziehen zwei Membranen, nicht nur eine.
2. Sie verbinden Cytosol mit Cytosol, nicht das Cytosol mit dem Extrazellulärraum oder dem Lumen einer Organelle.
3. Die kanalbildenden Connexone werden von verschiedenen Zellen synthetisiert.

Gap junctions entstehen rasch, wenn zwei Zellen in Kontakt gebracht werden, ein einmal gebildeter Kanal bleibt sekunden- bis minutenlang geöffnet. Hohe Calciumionenkonzentrationen und ein niedriger pH-Wert schließen sie. Das Schließen der *Gap junctions* durch Ca^{2+} oder H^+ dient dazu, normale Zellen gegen geschädigte oder absterbende Nachbarzellen zu isolieren. Der Hill-Koeffizient beträgt für das Ca^{2+} -induzierte Schließen der Kanäle 3, für das H^+ -induzierte 4,5, was anzeigt, dass es sich um einen kooperativen Vorgang handelt. *Gap junctions* werden außerdem durch das Membranpotential und hormonabhängige Phosphorylierungen kontrolliert. Die Untereinheiten eines Connexons sind zylindrisch, etwa 2,5 nm im Durchmesser und 7,5 nm lang. Die zentrale Öffnung ist im extrazellulären Bereich etwa 2 nm weit, im Inneren der Membran aber enger. Bei Calcium-Einwirkung drehen sich die Untereinheiten jedes Connexons und verschieben sich so, dass ihre Längsachsen anschließend stärker parallel zur Kanalachse liegen. Die Änderung des Neigungswinkels um nur 7,5 Grad bewirkt am zytoplasmatischen Ende jeder Untereinheit eine recht große Verschiebung von etwa 0,9 nm. Die Enden jedes Untereinheitenpaares auf entgegengesetzten Kanalseiten bewegen sich dadurch um 1,8 nm aufeinander zu, was den Kanal schließt. Es ist eine bemerkenswerte Eigenschaft dieses Mechanismus, dass die Umschaltung ohne größere Verdrehung jeder einzelnen Connexinketten erfolgt. Im offenen wie im geschlossenen Zustand bleiben die polaren Bereiche der Untereinheiten dem wässrigen Milieu zugewandt und die unpolaren im hydrophoben Kern der Doppelschicht. Die Umschaltung ist leicht, weil sich die freie Energie im offenen und geschlossenen Zustand nicht wesentlich unterscheidet. Eine relativ geringe Koformationsänderung als Folge der Calcium-Bindung an einem Ende einer

Untereinheit wird durch kooperative Gleit- und Drehbewegung der Untereinheiten zu einer viel größeren am anderen Ende verstärkt. Dieser allosterische Mechanismus dient wahrscheinlich generell zur Steuerung der Aktivität von Kanälen (Abbildung 4).

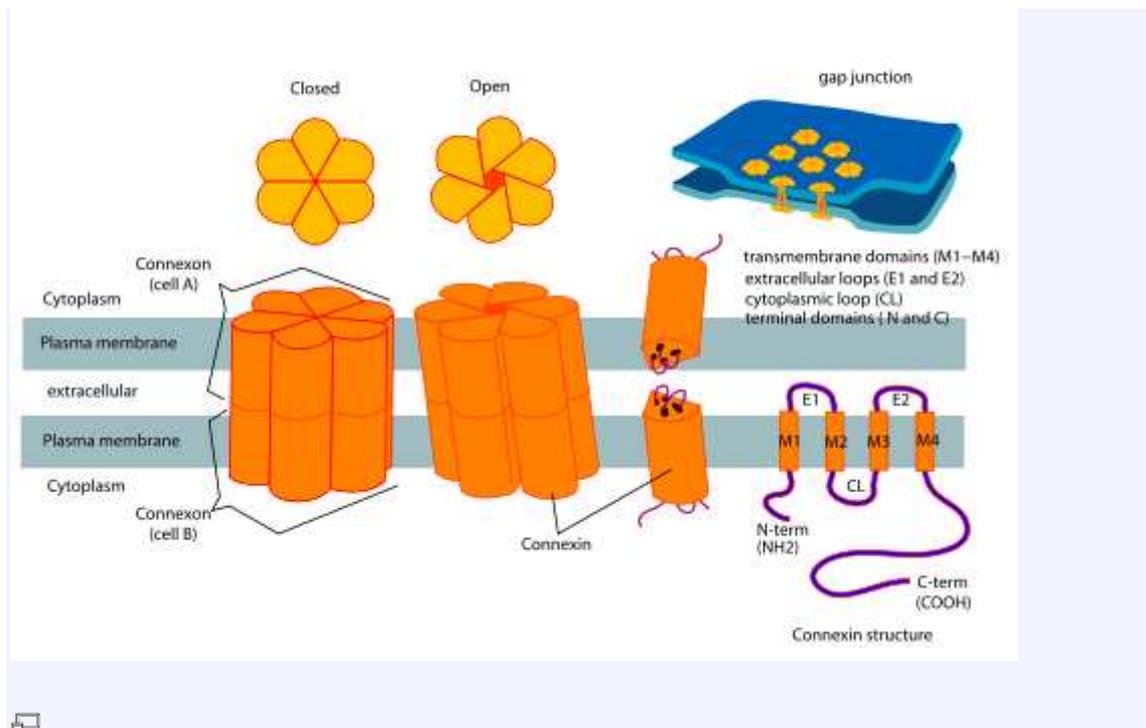


Abbildung 4: Connexine und Gap junctions

(Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Connexon_and_connexin_structure.svg)

Die Connexine werden aufgrund von Sequenz-Ähnlichkeiten in zwei Typen α und β unterteilt. Sie werden von Genen mit der Nomenklatur GJA bzw. GJB codiert. Die Connexin-codierenden Gene stellen eine Multi-Gen-Familie dar, die aus mindestens 16 Genen besteht. *Gap junctions*, die aus unterschiedlichen Connexinen bestehen, wurden bei vielen Säugern in fast allen Geweben nachgewiesen mit Ausnahme von Spermien, Erythrozyten, Thrombozyten und in endgültig differenzierten Skelettmuskelzellen.

Verschiedene Erkrankungen sind auf Defekte in Connexin Genen zurück zu führen z.B. die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit ist eine Demyelinisierungskrankheit peripherer Nerven in vielen Fällen verbunden mit Schwerhörigkeit und ist auf einen Defekt im Connexin 32 Gen zurückzuführen (Shy, M. E. et al. 2007), die selten vorkommende Hautkrankheit Erythrokeratoderma variabilis beruht auf einen Defekt im Connexin 31 (Stander, S. et al. 2005), außerdem konnte die Beteiligung von unterschiedlichen Connexin Genen bei der Krebsentstehung in unterschiedlichen Organen nachgewiesen werden, wobei diese Gene als Tumorsuppressorgene wirken (Schneider, B. et al. 2002).

Fünf verschiedene Connexine kommen nach heutigem Erkenntnisstand im Innenohr vor (Tabelle 2).

Gen	Locus	Protein	Schwerhörigkeitstyp	Referenz
<i>GJA1</i>	6q21-23.2	Connexin 43 (Cx43)	Sporadische Schwerhörigkeit	(Willecke, K.et al. 1990)
<i>GJB1</i>	Xq13.1	Connexin 32 (Cx32)	Charcot-Marie-Tooth-Syndrom	(Bergoffen, J.et al. 1993)
<i>GJB2</i>	13q12	Connexin 26 (Cx26)	DFNB1 DFNA3	(Guilford, P.et al. 1994) (Kelsell, D. P.et al. 1997)
<i>GJB3</i>	1p35.1	Connexin 31 (Cx31)	DFNA2	(Xia, J. H.et al. 1998) (Lopez-Bigas, N.et al. 2001)
<i>GJB6</i>	13q12	Connexin 30 (Cx30)	DFNA3	(Chaib, H.et al. 1994) (Dahl, E.et al. 1996)

Tabelle 2: Connexin Gene, die im Innenohr exprimiert werden, und ihre zugehörigen Proteine

Man vermutet, daß die *Gap junctions* am Rücktransport von Kaliumionen, die in die Haarsinneszellen fließen und die Depolarisation auslösen, in die Endolymphe beteiligt sind (Kikuchi, T.et al. 1995); (Spicer, S. S. & Schulte, B. A. 1998). Die Kaliumionen können vermutlich über zwei verschiedene Wege transportiert werden. Das Kalium der inneren Haarzellen soll dabei über die benachbarten Stützzellen aufgenommen werden und dann entweder über die inneren Sulkuszellen oder die Fibrozyten des Limbus spiralis zu den Interdentalzellen transferiert werden, welche dann das Kalium in die Endolymphe abgeben. Das Kalium der äußeren Haarzellen soll entlang einer

lateralen Route transportiert werden, und zwar über die Deiterschen Zellen, die Hensenzellen, die Claudiuszellen und die äußeren Sulkuszellen zu den Fibrozyten des Spiralen Ligaments und schliesslich zur Stria vascularis, wo die Kaliumionen wieder in die Endolymphe eintreten (Holme, R. H. & Steel, K. P. 1999) (Abbildung 5).

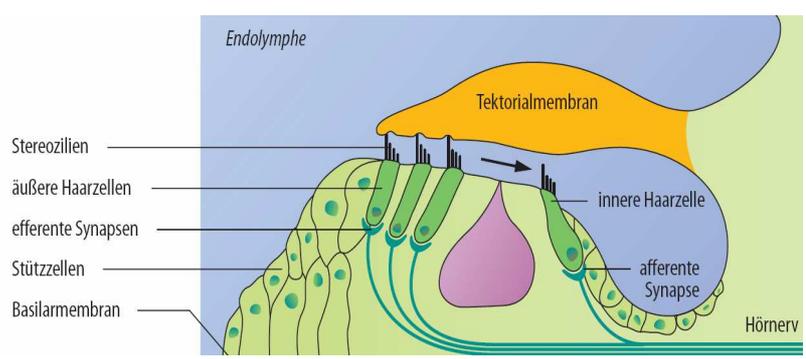
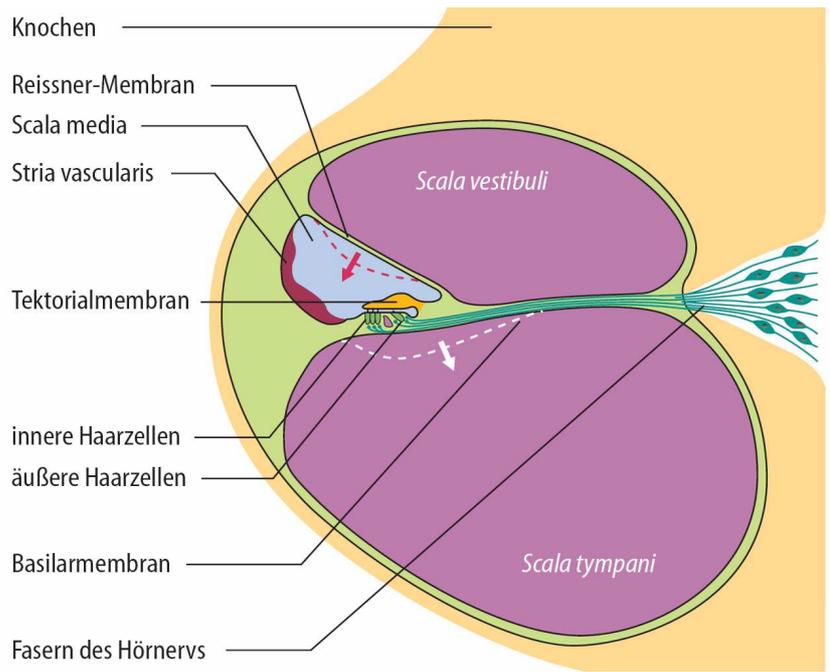
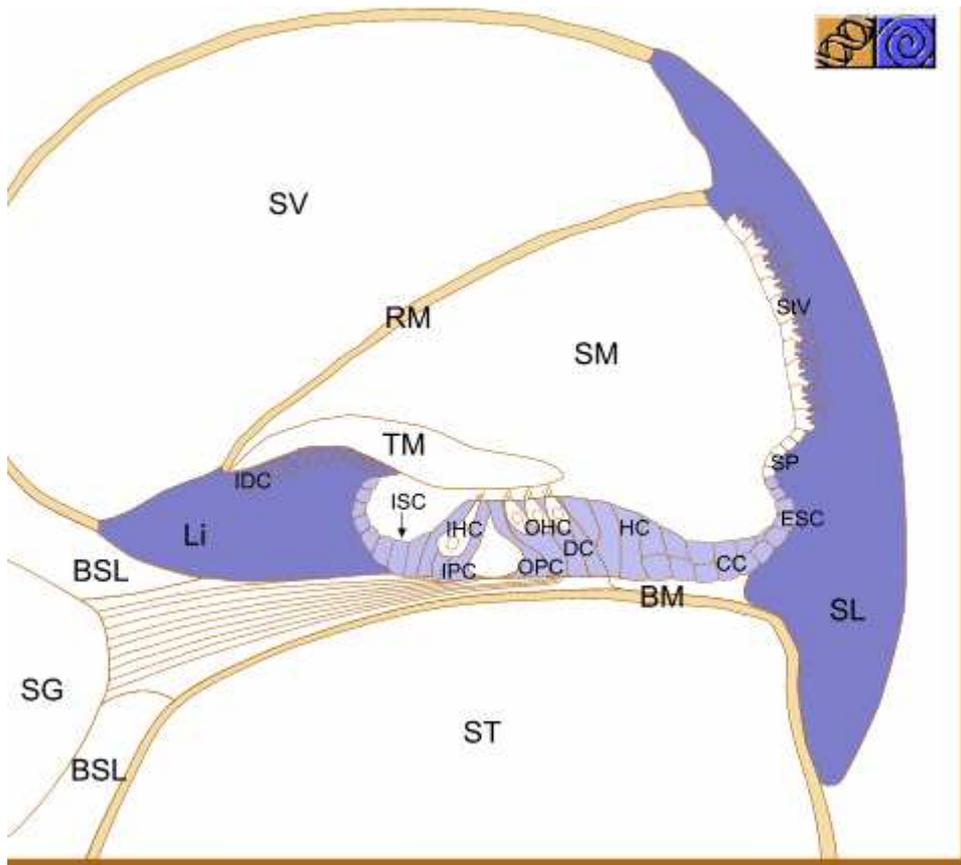


Abbildung 5: Transport von Kalium-Ionen in der Cochlea (modifiziert nach Spicer, S. S. & Schulte, B. A. 1998)

Connexine werden in unterschiedlichen hochspezialisierten Zellen der Cochlea exprimiert, zum Teil bilden aber einige Zellen mehrere Connexine. Histologische Untersuchungen des Innenohrs der Ratte zeigten, dass sich Connexin 26 und Connexin 30 in der Cochlea, sowohl in den Stützzellen des Cortischen Organs, als auch in der Stria vascularis, vor allem im Bereich der Basalzellen, im Ligamentum spirale, vor allem in den Fibrozyten Typ I nahe der Stria vascularis und im Limbus spiralis nachweisen lassen, nicht jedoch als direkte Verbindung zwischen den sensorischen Haarzellen (Lautermann, J. et al. 1998); (Kikuchi, T. et al. 1995). Das genaue Screening auf 13 verschiedene Connexine hat ergeben, dass nur Connexin 26 und Connexin 30 in diesen Geweben exprimiert werden (Forge, A. et al. 2003). Zwar lassen sich auch Connexin 31 und Connexin 43 in der Cochlea nachweisen, sie finden sich jedoch in anderen Kompartimenten der lateralen Cochleawand (Abbildung 6).



Legende

BM: Basilarmembran
 BSL: Lamina spiralis
 CC: Claudius'sche Stützzellen
 DC: Deiters'sch Stützzellen
 ESC: Sulcus externus-Zellen
 HC: Hensen'sche Stützzellen
 IDC: Labium vestibulare
 IHC: Innere Haarzellen
 IPC: Innere Pfeilerzellen
 ISC: Sulcus internus-Zellen
 Li: Limbus spiralis
 OHC: Äußere Haarzellen
 OPC: Äußere Pfeilerzellen
 RM: Reissner'sche Membran
 SG: Ganglion spirale cochleae
 SL: Ligamentum Spirale

SM: Scala media
 SP: Prominentia spiralis
 ST: Scala tympani
 StV: Stria vascularis
 SV: Scala vestibuli
 TM: Tectorialmembran

Abbildung 6: Querschnitt durch eine Cochlea der Ratte, blau angefärbt die Orte der Expression von Connexin 26 (Lautermann, J.et al. 1998)

1.5. Das *GJB2*-/Connexin 26 Gen

Die genomische Struktur des Connexin 26 besteht aus zwei Exons, getrennt durch ein Intron. Das erste, nicht-kodierende Exon hat eine Größe von 160 bp. Das zweite Exon kodiert für das Genprodukt und ist 681 bp lang (Kiang, D. T. et al. 1997). Das eingeschobene Intron hat eine Länge von 3147 bp. Das Genprodukt Connexin 26 besteht aus 227 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 26 kDa. Es wird in der Haut, der Mamma lactans, der Placenta, dem Pankreas, den Hepatozyten, der Cochlea und im Myometrium des Uterus exprimiert (Kelsell et al. 1997); (Lautermann et al. 1998). Das Protein Connexin 26 besitzt wie die anderen *Gap junction* Proteine vier membranübergreifende Domänen, die durch eine intrazelluläre und zwei extrazelluläre Schleifen verbunden sind, während sein N-terminales Ende und das Carboxyl- Ende zytoplasmatisch liegen (Abbildung 7).

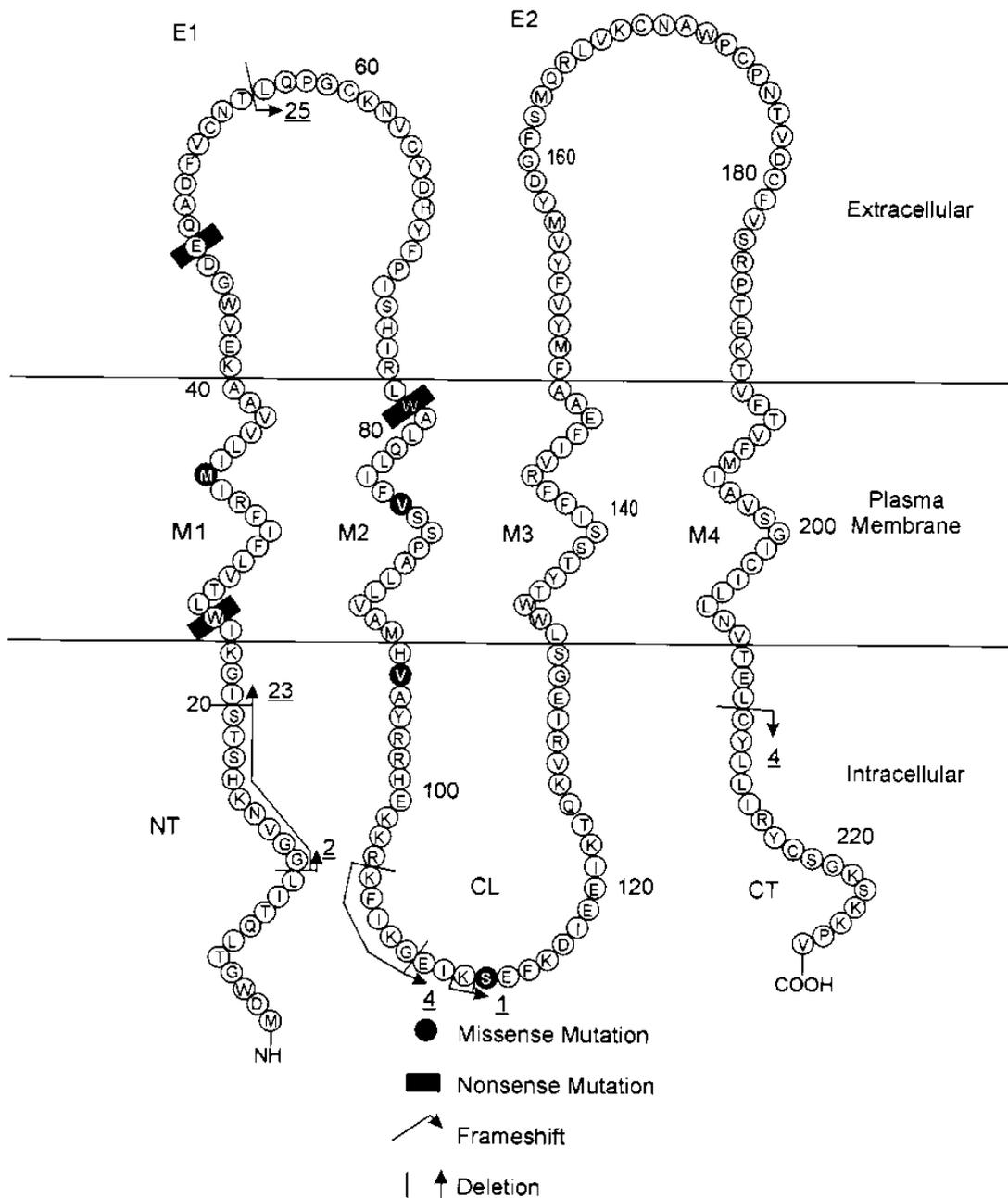


Abbildung 7: Schematische Darstellung von Connexin 26 und der Cx26 Mutationen NT=N-terminales Ende, M1, M2, M3 und M4=Transmembrandomänen, E1 und E2=Extrazellulärraum, CL=Zytoplasmatische Bindungsstelle, CT=Carboxylende. Die unterstrichenen Nummern neben dem Frameshift zeigen die Anzahl der Reste nach dem Frameshift, bevor ein Terminationscodon gefunden wird. In der Polypeptidkette ist jeder zwanzigste Rest durchnummeriert. Der Mutationstyp ist gemäß der Legende am Ende der Abbildung gekennzeichnet (Kelley, P. M. et al. 1998)

Die wichtige Rolle, die die *Gap junctions* durch Zellkommunikation bei der Gewebisdifferenzierung spielen, führte zum Bestreben, die einzelnen für Connexine kodierenden Gene genau zu lokalisieren. Nachdem *GJB2* mittels Southern-Blot und hybrider Zelllinien bereits auf das Chromosom 13 kartiert worden war (Willecke, K. et al. 1990), wurde die Lokalisation durch In-Situ-Hybridisierung auf Chromosom 13q11-q12 präzisiert (Mignon, C. et al. 1996). Damit waren sowohl der Taubheitslocus DFNB1 als auch *GJB2*, der Locus für das *Gap junction* Protein Connexin 26, auf das Chromosom 13q11-12 kartiert worden. Das Connexin 26 Gen ist hauptsächlich bei der Vererbung der rezessiven Gehörlosigkeit beteiligt. Im Jahre 1997 zeigte eine Studie von Dr. Kelsell aus London, dass Connexin 26 Mutationen für über 50 % der rezessiven Schwerhörigkeit und Taubheit im Mittelmeerraum verantwortlich sind. Dies war eine äußerst wichtige Entdeckung, da nachfolgende Arbeiten zeigten, dass Connexin 26 Mutationen auch in den meisten anderen Bevölkerungsgruppen vorliegen: 30% in Nordeuropa, 40% in den USA, 22% in Brasilien, 25% im Fernen Osten, 17% in Ghana und 15% in Australien. Diese Prozentzahlen zeigen, dass die Studie des Connexin 26 Gens bedeutende Auswirkungen auf die molekulare Diagnose und die Beratung der Patienten hat. Die meisten der Connexin 26 Mutationen werden rezessiv vererbt, obwohl einige seltene Mutationen entweder dominantem Hörverlust oder syndromische Gehörlosigkeit verursachen, die mit Hautsymptomen einhergeht (Denoyelle, F. et al. 1997); (Kupka, S. et al. 2000); (Toth, T. et al. 2004). Bis heute wurden mehr als 100 Connexin 26 Mutationen gefunden, die in der „Connexin 26-Deafness“ – Webseite unter <http://www.crg.es/deafness/cx26mut.php> aufgelistet sind.

In den in Europa beheimateten Bevölkerungsgruppen ist die häufigste Mutation die 35delG Mutation, welche für 80% der Mutationen verantwortlich ist. Die Trägerinzidenz variiert von 1/35 in Südeuropa zu 1/79 in Nordeuropa. Dies bedeutet, dass mindestens 3% der Bevölkerungsgruppen im Mittelmeerraum gesunde Träger sind (Estivill, X. et al. 1998); (Kelley, P. M. et al. 1998); (Tekin, M. et al. 2001); (Gabriel, H. et al. 2001). In anderen Bevölkerungsgruppen beobachtet man sehr häufig folgende Mutationen: z. B. die 235delC-Mutation in

Ostasien (Japaner, Chinesen und Koreaner), die R143W-Mutation in Ghana und die W24X-Mutation bei Indern und Romas (Liu, X. Z. et al. 2002).

In der Familie der Connexin Proteine gibt es zwei weitere Connexine, 30 und 31, die Connexin 26 ähnlich sind und ebenfalls Gehörlosigkeit verursachen. Das *GJB6*-/Connexin 30 Gen wurde auch auf Chromosom 13q12 lokalisiert, es wurde nachgewiesen, dass Mutationen in *GJB6* ebenfalls zu Schwerhörigkeit führten (Grifa, A. et al. 1999). Connexin 26 und Connexin 30 werden beide im Innenohr exprimiert, ihre Untereinheiten können sich in der Cochlea zu einem "Functional Gap" zusammenschließen (Marziano, N. K. et al. 2003). Das humane Connexin 31-Gen, *GJB3*, ist auf dem DFNA2-Lokus des Chromosom 1p35 zugeordnet und kann syndromale oder nicht-syndromale Schwerhörigkeit auslösen (Wenzel, K. et al. 1998). Die Expression von *GJB3* in der Cochlea überlappt teilweise mit der von *GJB2* und *GJB6*, es wurden Fälle beschrieben, in denen bei Patienten sowohl Mutationen in *GJB3* als auch in *GJB2* vorlagen (Xia, J. H. et al. 1998); (Lopez-Bigas, N. et al. 2001); (Mhatre, A. N. et al. 2003).

1.6. Ziele dieser Arbeit

Ziele dieser Arbeit waren es mutante Connexin 26 Proteine funktionell *in vitro* zu charakterisieren. Connexin 26-Mutationen können zu einer Proteindysfunktion führen und somit den Phänotyp von Patienten erklären. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen zu identifizieren, die zu einer Proteindysfunktion führen. Es standen Patientenkollektive mit nicht-syndromaler, sensorineuraler Schwerhörigkeit aus Ungarn und Deutschland zur Verfügung, aus deren DNA unterschiedliche Mutationskonstrukte in Expressionsvektoren kloniert wurden und von diesen *in vitro* cRNA hergestellt wurde. Die cRNA wurde dann in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert und die Funktionalität sowie Expression der mutanten *Gap junction* Proteine mittels Voltage Clamp und quantitative Immunoassays gemessen. Die Arbeit soll zu einem besseren Verständnis molekulargenetischer Grundlagen beitragen und auch das diagnostische Spektrum für betroffene Patienten erweitern. Neue Erkenntnisse können Anwendung in der genetischen Beratung finden und zu

einer frühzeitigen Therapie beitragen. Eine möglichst frühzeitige Diagnose der Hörstörung ermöglicht dem Patienten und dem behandelnden Arzt eine rasche Einleitung einer individuell angepassten Therapie und damit die Chance auf eine komplikationsarme, sozioökonomische Entwicklung in der Gesellschaft.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Lösungen und Substanzen

Es sind im folgenden die verwendeten Lösungen aufgeführt, sie wurden jeweils aus einer als 10-fach konzentrierten Stammlösung hergestellt und entsprechend gelagert, um Abbauprozesse zu verhindern. Zum Einstellen des gewünschten pH-Wertes wurde NaOH bzw. HCl zum Titrieren verwendet. Die Osmolarität wurde mit einem Osmometer (Vapor Pressure Osmometer, Vapro 5520, Wescor, Logan, USA) kontrolliert.

Substanz	OR-2	ND 96	ND 96 Aufbewahrung
NaCl	82,5 mM	96 mM	96 mM
KCl	2 mM	2 mM	2 mM
CaCl ₂	-	1,8 mM	1,8 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM	1 mM
Tris-Hepes	5 mM	5 mM	5 mM
Natriumpyruvat	-	-	2,5 mM
Theophyllin	-	-	0,5 mM
Gentamycin	-	-	50 µg/l
pH-Wert	7,4	7,4	7,4

Tabelle 3: Verwendete Lösungen: Die kalziumfreie Oozytenringerlösung OR-2 wurde für den Kollagenaseverdau der Oozyten benutzt, sie ist calciumfrei, dadurch wird der Kollagenaseverdau verbessert, da Ca²⁺ die Kollagenaseaktivität hemmt. Nach der Kollagenisierung wurden die Oozyten in 200 mOsm ND 96-Lösung aufbewahrt. Gentamycin wurde dazu gegeben, um eine Infektion der Oozyten zu verhindern, Theophyllin hemmte die weitere Reifung. Die für die Messungen verwendeten Lösungen basierten auf ND 96 als Grundlösung, der pH-Wert war in allen Experimenten mit NaOH auf pH 7,4 titriert. Für einzelne Versuche musste zur Inkubation und während der Messungen CaCl₂ entfernt werden

2.2. *Xenopus laevis* und Oozytenpräparation

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* wird seit langem für Forschungszwecke im Bereich der Nierenphysiologie und Entwicklungsbiologie im Labor gehalten. Seine Oozyten werden für die Expression heterologer RNA im Labor genutzt (Dawid, I. B. et al. 1985). Neben der Fähigkeit der Oozyten nach Injektion von RNA heterologe Proteine zu exprimieren, bieten die Oozyten eine Vielzahl technischer Vorteile. *Xenopus laevis* ist als obligat aquatisches Tier ohne viel Aufwand im Labor zu halten, zudem ist die Anschaffung günstig. Anästhesie und Oozytenentnahme gestalten sich einfach, ein großer Zelldurchmesser der Zellen (circa 1,3 mm) erleichtert die allgemeine Handhabung wie Aussortieren und Inkubation, ermöglicht aber auch einfache cRNA-Injektion und das Messen physiologischer Größen mit intrazellulären Glaskapillaren, sie weisen einen niedrigen Spannungsabfall über die Membran auf, so sind sie ideal für z.B. Voltage-Clamp Messungen (Smith, L. D. et al. 1991).

Weibliche *Xenopus laevis* Frösche wurden in 10 Liter Aquarien untergebracht, die mit Wasserfiltern und künstlicher Beleuchtung ausgestattet waren. Zur Gewinnung der Oozyten wurde ein adulter weiblicher *Xenopus laevis* für die Narkose ca. 20 Minuten in 0,1%ige 3-Aminobenzoessäureethylester-Lösung gelegt. Die Narkosetiefe konnte durch Überprüfung des Wendereflexes und Schluckreflexes überprüft werden. Danach wurde der Frosch auf dem Rücken liegend auf Eis gelagert und am Bauch gründlich desinfiziert. Unter semisterilen Bedingungen wurde quer am rechten oder linken Unterbauch ein ca. 0,5 - 1 cm langer Schnitt in die Haut und anschließend in den Muskel gesetzt. Nun konnten die bindegewebigen Ovarialsäcke scharf herausgetrennt werden. Nach Entnahme der Oozyten wurde die Wunde mittels resorbierbaren Fäden durch Muskel- und Hautnaht wieder verschlossen. Der Frosch wurde zum Aufwachen in einen mit Wasser gefüllten Käfig gelegt, bevor er nach mehreren Stunden wieder zurück ins Aquarium gebracht wurde. Die Ovarialsäcke wurden mit Pinzette und Schere in kleine Einheiten getrennt und mit Kollagenase A (1-3 g) in OR2 unter ständiger Bewegung denudifiziert. Der Kollagenaseverdau dauerte

bei Raumtemperatur ca. 2-3 Stunden und wurde durch häufiges Spülen mit ND96 beendet, wenn auf den Oozyten keine Blutgefäße mehr sichtbar und die Zellen zum Großteil vereinzelt waren. Unter dem Binokular wurden die Oozyten anschließend nach Vitalitätszustand und Reifegrad sortiert. Es wurden nur Zellen verwendet, die sich im Stadium V und VI befanden (Abbildung 8), eine klare Trennung zwischen Vegetal- und Animalpol aufwiesen und keine Aufhellung im Animalpol zeigten (Dumont, J. N. 1972). Die Oozyten wurden dann in ND96 mit Antibiotika bei 18°C aufbewahrt, bevor sie am nächsten Tag zur Injektion verwendet wurden.



Abbildung 8: *Xenopus laevis* und *Xenopus laevis* Oozyten (Stadium V und VI)

2.3. cRNA-Injektion

In *Xenopus laevis* Oozyten kann *in vitro* synthetisierte cRNA exprimiert werden (Gurdon, J. B. et al. 1971). Die verwendete cRNA wurde von B. Noll, Physiologisches Institut Tübingen und B. Haack, Pathologisches Institut Tübingen, und N. Schug, Institut für Humangenetik, synthetisiert. Für die Klonierung der *GJB2*-Mutationskonstrukte wurde zunächst eine PCR zur Amplifikation des *GJB2*-Gens mit der genomischen DNA von Patienten, welche die entsprechenden Mutationen entweder homozygot oder heterozygot tragen, durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Gelextraktion mit einem QIAGEN Gel-Extraktions-Kit aufgereinigt und in die PCR mit Restriktionsschnittstellen-Primern eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarose-Gel überprüft und entweder mittels Gelextraktion oder Ethanolfällung (0,1 Vol. 3M NaAc, pH 5,2+2,5 Vol. 100% EtOH) aufgereinigt. Sowohl die PCR-Produkte als auch der Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) geschnitten und anschließend über Gelextraktion aufgereinigt. Das so hergestellte BamHI/HindIII-Fragment wurde mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase in den Vektor pSP64 Poly(A) eingebracht (Promega GmbH Mannheim). Dabei handelt es sich um einen Vektor, der sowohl einen SP6-Promotor enthält, als auch eine Poly-A-Sequenz hinter der Multiple-cloning-site, sodass sich dieser Vektor für *in vitro*-Transkription mittels der SP6-Polymerase geeignet ist. Für die Transformation wurden kompetente *E. coli*-Zellen (Stamm JM109, Promega GmbH, Mannheim) verwendet. Die Transformation mittels Hitze-Schock wurde entsprechend des Protokolls des Herstellers durchgeführt. Die Transformationsansätze wurden auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 Grad inkubiert. Einige Kolonien wurden gepickt und z.B. mittels Mini-Plasmid-Preparation und anschließendem Restriktionsverdau mit den Klonierungsenzymen überprüft. Klone, die bei der Überprüfung positiv waren, wurden durch Sequenzierung überprüft. Hierfür wurde eine Plasmid-Preparation im Midi- oder Maxi-Maßstab mit dem JetStar-Kit der Firma Genomed, Löhne, durchgeführt. Diese Plasmid-DNA wurde dann auch für die

folgende *in vitro*-Transkription verwendet. Vor der *in vitro*-Transkription musste die Plasmid-DNA linearisiert werden. Dazu wurde das Enzym EcoRI (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet, das wenige Basen hinter der Poly-A-Sequenz des Vektors schneidet. Das linearisierte Plasmid wurde durch Ethanolfällung (0,1 Vol. 3M NaAc, pH 5,2+2,5 Vol. 100% EtOH) aufgereinigt und dessen Konzentration mittels Gelelektrophorese überprüft. Für die *in vitro*-Transkription wurde das RiboMAX Large Scale RNA Produktion System-SP6 (Firma Promega GmbH, Mannheim) verwendet. Um die Stabilität der RNA in den Oozyten zu verbessern, wurde ein Ribo m7G Cap-Analog (Promega) verwendet. Somit ist die RNA sowohl auf der 5'-Seite durch das Cap als auch am 3'-Ende durch die Poly-A-Sequenz geschützt. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die so hergestellte RNA wurde mit Hilfe des SV RNA Isolation System (Promega) nach Herstellerangaben aufgereinigt und anschließend deren Qualität mittels Gelelektrophorese überprüft. Dafür wurde ein 1,5%iges Agarosegel (in 1xTBE-Puffer) verwendet. Die Proben wurden zu gleichen Teilen mit Ladepuffer (0,05% Bromphenolblau in 90% Formamid) gemischt und vor dem Auftragen bei 70 Grad für 10 Minuten denaturiert. Eine exakte Konzentrationsbestimmung wurde durch eine photometrische Messung (Bio-Photometer, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Ausgehend von einem bestimmten Gen-Vektor-Konstrukt können mit Hilfe von gezielter Mutagenese und anschließender, spezifischer Selektion Mutationskonstrukte hergestellt werden.

Die cRNA-Injektion erfolgte mittels eines automatischen Nanoliterinjektors (Fa. WPI, Sarasota, USA). Zur Injektion wurden Borosilikatglaskapillaren (Fa. Hilgenberg) mit einem Aussendurchmesser von 1,2 mm als Injektionskanülen mit sehr langer Spitze in einem Mikroelektrodenpuller (DMZ Universal-Puller der Firma Zeitz, Augsburg) gezogen. Die so hergestellten Glaskapillaren wurden mit Paraffinöl aufgefüllt, danach konnte die cRNA mit Hilfe des Mikroinjektors in die Kapillaren aufgezogen werden. Die Injektionsschritte sowie die cRNA-Handhabung waren semisteril durchzuführen, um eine Kontamination mit RNAsen zu verhindern. Unter einer Stereolupe wurden pro Oozyte 50 nl Connexin 26 Wildtyp cRNA, Connexin 30 Wildtyp, Connexin 31 Wildtyp

oder/und Connexin 26 Mutationen cRNA injiziert (Tabelle 4). Den Kontrollzellen wurde DEPC-behandeltes Wasser und anschliessend autoklaviertes Wasser injiziert, um die injektionsbedingte Zellerteration auszugleichen. Alle Messungen wurden 2 bis 4 Tage nach Injektion bei Raumtemperatur durchgeführt.

Protein	[cRNA] (ng/μl)
Connexin 26 Wildtyp	50
Connexin 30 Wildtyp	50
Connexin 31 Wildtyp	50
V27I Connexin 26	50
V37I Connexin 26	50
N14D Connexin 26	50
R143W Connexin 26	50
L90P Connexin 26	50
I82M Connexin 26	50
G59V Connexin 26	50
M34T Connexin 26	50
R127H Connexin 26	50
DEPC-behandeltes Wasser	50

Tabelle 4: Die verwendete cRNA und deren injizierte Konzentrationen. Die Oozyten wurden jeweils mit 50 nl cRNA injiziert. Für die Coexpressionsversuche wurden die entsprechenden cRNA hintereinander injiziert

2.4. DNA-Proben

Die in dieser Studie untersuchten Connexin 26-Mutationen wurden bei Patienten mit erblicher, nichtsyndromaler Schwerhörigkeit identifiziert.

Durch Kooperation mit den Universitäts-HNO-Kliniken in Tübingen (Dr. med M. Pfister) und Debrecen, Ungarn (Dr. med. T. Toth) standen Patientenkollektive bestehend aus insgesamt 135 deutschen und 53 ungarischen Personen mit erblicher, nichtsyndromaler Schwerhörigkeit sowie die entsprechenden Patientenkollektive zur Verfügung (Tabelle 5). Es wurde aus 6 ml EDTA-Blut DNA nach Standard-Methoden isoliert. Sämtliche Patientenkollektive umfassten nur Personen, die vom behandelnden Arzt über die Studien aufgeklärt wurden und von denen eine durch die Ethikkommission geprüfte schriftliche Einwilligung zur Untersuchung ihres genetischen Materials vorlag. Die verschiedenen Patienten stammen aus dem süddeutschen Raum bzw. aus dem nordöstlichen Ungarn und wiesen Schwerhörigkeiten unterschiedlicher Ausprägung auf.

Kollektive/Familien/Einzelfälle	Anzahl der DNA-Proben
Deutsches Gesamtkollektiv	422
Deutsches Teilkollektiv	112
Deutsche <i>GJB2</i> -Heterozygote	23
Deutsche Kontrollen	206
Ungarisches Gesamtkollektiv	180
Ungarisches Teilkollektiv	19
Ungarische <i>GJB2</i> -Heterozygote	34
Ungarische Kontrollen	205
Familie „R127H“	9 Familienmitglieder
Familie „N14D“	1 Probe der Familie
Patient „V27I“	1

Tabelle 5: Übersicht über die DNA-Kollektive, die in dieser Studie verwendet wurden

Es wurden deutsche Patienten mit bilateraler, congenitaler, mittel- bis hochgradiger Schwerhörigkeit, welche entweder in einem Restriktionstest auf die häufige c.35delG-Mutation oder in der Sequenzierung von *GJB2* nur Wildtyp-Allele gezeigt hatten (Teilkollektiv), auf bestimmte Mutationen untersucht, um Allelfrequenzen zu bestimmen. Das ungarische Teilkollektiv besteht ebenfalls aus sporadischen Fällen mit bilateraler, congenitaler, mittel- bis hochgradiger Schwerhörigkeit, in denen *GJB2*-Mutationen durch Sequenzierung der codierenden Region ausgeschlossen wurden. Außerdem wurden deutsche und ungarische Patienten, die nur eine einzige *GJB2*-Mutation gezeigt hatten, auf Mutationen in anderen Genen und Regionen untersucht (*GJB2*-Heterozygotenkollektive).

2.5. Konstrukte und zielgerichtete Mutagenese

Die *GJB2* codierende Region wurde von gesunden Menschen und Patienten isoliert und in die Hind III und BamHI Schnittstellen des pSP64 Poly(A) Vektor (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) kloniert. Die p.V27I, p.M34T, p.V37I, p.G59V, p.182M, p.L90P und p.R143W Connexin 26 Mutationen wurden mittels zielgerichteter Mutagenese (GeneEditor *in vitro* zielgerichtetes Mutagenese-System, Promega GmbH, Mannheim, Germany) mit den in Tabelle 6 dargestellten Primern nach den Anweisungen des Herstellers angefertigt.

Primerbezeichnung	Sequenz 5´->3´
mut_V27I	5´ CTGGCTCACCATCCTCTTCATTTTTTC 3´
mut_M34T	5´ CGC ATTACGATCCTCG 3´
mut_V37I	5´GATCCTCATTGTGGCTGC 3´
mut_G59V	5´CTGCAGCCAGTCTGCAAGAAC 3´
mut_I82M	5´CTGCAGCTGATGTTTCGTGTCCAC 3´
mut_L90P	5´GCCAGCGCTCCCAGTGGCCA TGC 3´
mut_R143W	5´GCATCTTCTTCTGGGTCATCTTC 3´

Tabelle 6: Die Sequenzen der zur Ziel-gerichteten-Mutagenese benutzten Primer

Die cRNA encoding Connexin 26 Wildtyp und mutierte Connexin 26, Connexin 30 Wildtyp und Connexin 31 Wildtyp wurden *in vitro* folgend den Anweisungen hergestellt (Large Scale RNA Production System, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland).

2.6. Western Blot

Xenopus Oozyten wurden mit Wildtyp, mutierter Connexin 26 cRNA oder mit Wasser injiziert. 2 Tage nach der Injektion wurden die Oozyten in Lysis Puffer (5 mM Tris, (pH (8,0), 5 mM EDTA (pH 8,0) mit dem Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Penzberg, Deutschland) in den empfohlenen Konzentrationen gelöst. Nach der Homogenisierung wurden die Extrakte bei 1,000 g und 4 Grad für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann bei 100,000 g und 4 Grad für 30 Minuten ultrazentrifugiert. Die gewonnenen Pellets wurden in SDS Puffer gelöst und auf ein 12% Polyacrylamid Gel aufgetragen.

Für die Bestimmung der Cx26 Expression in der Plasmamembran, wurden die Plasmamembranen wie von Bagowski (Bagowski, C. P.et al. 2001) beschrieben, präpariert. Die Oozyten wurden homogenisiert und zentrifugiert

bei 1,000 g und 4 Grad für 10 Minuten. Der Überstand wurde dann bei 10,000 g zentrifugiert, es entstand ein Überstand, der Zytosol, Microsomen und kleine Bläschen beinhaltete und ein Pellet, das die Plasmamembran beinhaltete. Die Pellets wurden wieder für 10 Minuten bei 10,000 g zentrifugiert, um jeden Rest des Zytosols zu entfernen. Die gewonnenen Pellets wurden in SDS Puffer gelöst, auf ein 12% Polyacrylamid Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulose Membran bei 100 V für 60 Minuten transferiert.

Für Immunoblots wurde ein rabbit-anti-Cx26-Antikörper (Zymed/Invitrogen, Paisley, UK, Verdünnung 1:500 in PBS/0,15% Tween 20/5% Trockenmilch) benutzt, um Cx26 zu detektieren. Nach dem Transfer wurde der Blot mit 5% fettfreier Trockenmilch in PBS/0,15% Tween 20 für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert um die unspezifische Bindung zu unterdrücken, dann wurden die Blots über Nacht mit dem Primärantikörper bei 4 Grad inkubiert. Der zweite mit Peroxidase konjugierte sheep anti-rabbit IgG Antikörper (Amersham, Freiburg, Germany, Verdünnung 1:1000 in PBS/0,15% Tween 20/5% fettfreier Trockenmilch) wurde für die Lumineszenzdetektion mit einem verbesserten Chemilumineszenz (ECL) Set benutzt (Amersham, Freiburg, Germany).

2.7. Quantifizierung der Oberflächenexpression durch Chemilumineszenz

Zur Quantifizierung der Oberflächenexpression der Ionenkanäle auf *Xenopus laevis* Oozyten wurde eine Hämagglutinin-Sequenz (HA) in eine extrazelluläre Schleife der Connexin 26-Untereinheit eingefügt. Zwei Tage nach cRNA Injektion wurden die defollikulierten Oozyten zuerst mit einem anti-Hämagglutinin-Antikörper inkubiert (1 µg/ml, Klon 3F10, Boehringer, Deutschland). Im nächsten Schritt fügte man einen gegen anti-HA gerichteten Antikörper mit einer Peroxidase hinzu (2 µg/ml, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA). Ein hinzu gegebenes Substrat, welches Luminol als Spaltprodukt enthält, (SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce, Rockford, USA) wurde darauf von der dem 2-ten Antikörper anhängenden Peroxidase katalytisch umgesetzt. Die dabei entstandene Lichtmenge konnte photometrisch quantifiziert werden. Die gesamte Reaktion

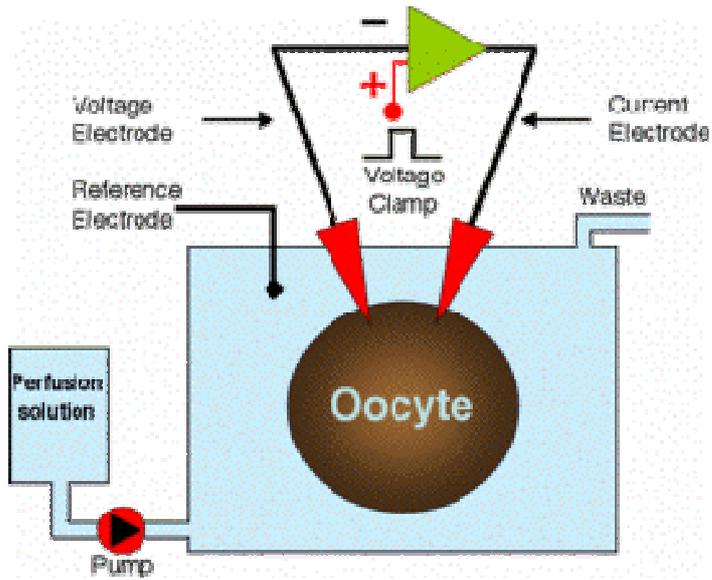
lief in 96-Loch-Platten mit jeweils einer Oozyte und 20 µl Substratlösung pro Loch ab. Ein Mikroplattenluminometer berechnete das in 1 Sekunde emittierte Licht. Dieses ist direkt proportional zur Menge der mit Hämagglutinin markierten Connexin 26-Kanäle an der Oozytenmembran. Als Kontrolle wurden nicht injizierte Oozyten gemessen. Nach den Chemilumineszenzmessungen wurden Oozyten aus der gleichen Injektionsreihe elektrophysiologischen Messungen mit der TEVC-Methode unterzogen. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass funktionstüchtige Kanäle in der Membran vorhanden sind.

2.8. Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Messungen (TEVC)

Mit der Zweielektroden-Spannungsklemme ist es möglich, das Membranpotential der *Xenopus laevis* Oozyte auf ein beliebiges Potential zu klemmen und den Strom zu messen, der nötig ist, um die Zelle auf dem gewünschten Potential zu halten. Hierbei wird über die Spannungselektrode das aktuelle Potential der Zelle gemessen, im Rückkopplungsverstärker (GeneClamp Amplifier, Axon Instruments, Union City, USA) verstärkt und mit dem eingestellten Haltepotential verglichen. Aus der Differenz dieser Signale ergibt sich der Strom, der nötig ist, um das Haltepotential zu erreichen. Er wird über die Stromelektrode appliziert, fließt durch die Membran und wird über die Badelektrode gemessen. Der gemessene Strom (I) entspricht dem Ionenstrom durch die Oozytenmembran mit dem Membranwiderstand (R) bei einem entsprechenden Haltepotential (U). Es gilt das Ohmsche Gesetz $R=U/I$. Wird nun eine Substanz gegeben, die elektrogen über die Membran transportiert wird, oder wird die Öffnungswahrscheinlichkeit eines Ionenkanals verändert, ändert sich der Membranwiderstand (R), und mit ihm der zur Aufrechterhaltung des vorgegebenen Potentials (U) zu applizierende Strom (I). Diese Änderung kann als induzierter Strom gemessen werden. Mit der ersten Elektrode wird eine gewünschte Spannung an der Zelle angelegt, dieser Wert wird konstant gehalten (daher der Name „Voltage-Clamp“, festgeklemmte Spannung) und bewirkt, dass sich die spannungsabhängigen Ionkanäle öffnen oder schließen. Um nun den Ein- oder Ausstrom von Ionen

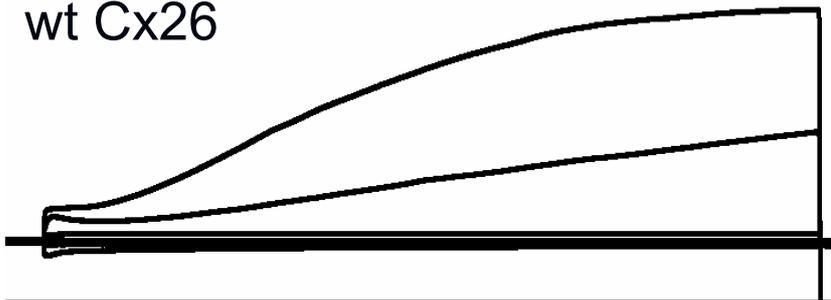
messen zu können, wird eine zweite Elektrode in die Zelle eingeführt, die einen entgegen gesetzten Strom besitzt wie die ein- oder ausströmenden Ionen, wodurch die Ströme sich gegenseitig kompensieren. Durch bestimmte Moleküle können nun die einzelnen Ionenströme stillgelegt werden, wodurch die Möglichkeit entsteht die Ionenkanäle und deren Spannungsabhängigkeit genau zu untersuchen (Abbildung 9).

A



B

wt Cx26



+ 60 mV

- 100 mV

5 sec

nicht inj.

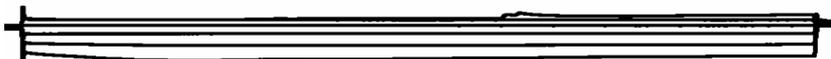


Abbildung 9: Schema Zwei-Elektroden Voltage-Clamp Stromkreis (A) und Originalaufzeichnungen der Messungen von mit Wildtyp Cx26 und Wasser injizierten Zellen (B)

2.9. Subjektive und objektive Audiometrieverfahren

Die Audiometrieverfahren wurden in der HNO-Universitätsklinik Tübingen durchgeführt.

Die Reintonaudiometrie wurde mit einem Maico Audiometer (Maico Diagnostik GmbH, Berlin, Deutschland, <http://www.maico-diagnostic.de>) durchgeführt. Die Tympanometrie mit einem Maico I 34 (Maico Diagnostik GmbH, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Ableitung akustisch evozierter Potentiale des Hirnstamms des jüngeren Bruders der Familie N14D wurden mit einem Nicolet Spirit System (Nicolet Biomedical Systems, Viasys Healthcare, USA, <http://www.viasyhealthcare.com>) durchgeführt. Der ältere Bruder wurde zuerst im Jahr 2002 getestet, der Hörverlust wurde in einem Alter von 6 Jahren und 2 Monaten entdeckt, der jüngere Bruder wurde im Alter von 2 Jahren getestet.

Man unterscheidet objektive und subjektive Audiometrieverfahren. Zu den objektiven Verfahren zählen z.B. die Ableitung akustisch evozierter Potentiale, bei der Elektrocochleographie (ECochG) werden Summenaktionspotentiale des Hörnerven registriert, die akustisch evozierten Hirnrindenpotenziale (CERA) werden mit Hautelektroden über der, relativ zum gereizten Ohr, kontralateralen Hirnhälfte abgeleitet. Die Ableitung von Hirnstammpotenzialen (BERA) mittels Hautelektroden von der Kopfhaut (Vertex bzw. Stirn gegen Mastoid) ist die derzeit verbreitetste Methode zur Ableitung akustisch evozierter Potenziale.

Die BERA ist gegenüber der ECochG nicht-invasiv und ermöglicht neben der Beurteilung der Hörnervenfunktion eine Hörbahndiagnostik bis zur Hirnstammebene. Ebenso wie die ECochG sind die BERA-Befunde nicht abhängig vom Aufmerksamkeitsgrad, und damit von der Schlaftiefe. So kann die BERA im Bedarfsfall im Schlaf, in Sedierung oder auch in Narkose durchgeführt werden. Dieser Aspekt gewinnt für die Untersuchung von Kleinkindern und Mehrfachbehinderten besondere Bedeutung, da die Ableitungsbedingungen bei diesen Patientengruppen wegen zu starker Bewegungsaktivitäten im Wachzustand zu ungünstig sind. Die altersbedingte Hirnreifung beeinflusst die BERA-Befunde in bekannter Weise und kann bei der Interpretation der Befunde berücksichtigt werden. Da der

Signal-Rauschabstand bei der BERA wesentlich geringer ist als bei der ECochG, ist die Untersuchungsdauer entsprechend länger. Ein anderes objektives Audiometrieverfahren ist die Tympanometrie, ein Tympanogramm stellt die Trommelfellbeweglichkeit, die sich umgekehrt proportional zur Impedanz verhält, in Abhängigkeit vom Druck im äußeren Gehörgang dar.

2.10. Statistik

Die Daten wurden als arithmetische Mittelwerte±Standardfehler (SEM) dargestellt, n stellt die Anzahl der untersuchten Oozyten dar. Alle Experimente wurden mindestens drei Mal mit verschiedenen Oozytenbatches wiederholt, es wurden qualitativ vergleichbare Daten erzielt. Zur statistischen Analyse wurde der zweiseitige, unabhängige t-Test nach Student verwendet. Zwei Datengruppen wurden dann als statistisch signifikant angesehen, wenn ein Wert für p kleiner als 0,05 errechnet worden war. Wurden mehr als 2 Gruppen miteinander verglichen, wurden die Daten durch ANOVA (Analysis of Variance) auf signifikante Unterschiede getestet. Die Verfahren untersuchen, ob (und gegebenenfalls wie) sich die Erwartungswerte der metrischen Zufallsvariablen in verschiedenen Gruppen (auch Klassen) unterscheiden. Mit den Prüfgrößen des Verfahrens wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Dadurch kann ermittelt werden, ob die Gruppeneinteilung sinnvoll ist oder nicht bzw. ob sich die Gruppen signifikant unterscheiden oder nicht.

2.11. Abkürzungsverzeichnis

cRNA	copyRNA
Cx26	Connexin 26
Cx30	Connexin 30
Cx31	Connexin 31
dB	Dezibel

DNA	Desoxyribonukleinsäure
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl) Ethansulfonsäure
ND96	Oozytenstandardlösung mit 96 mM Natriumchlorid
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
TEVC	Two Electrode Voltage Clamp; Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

3. Ergebnisse

3.1. Heterologe Expression der Connexin 26 Mutationen in *Xenopus* Oozyten

Unter den vielen Mutationen die identifiziert wurden, wurden 9 für die funktionellen Analysen ausgewählt. Die Auswahl erfolgte nach dem häufigsten Vorkommen, sowie der größten klinischen Relevanz.

Die Mutationen p.V27I c.79G>A, p.M34T c.101T>C, p.V37I c.G>A, p.I82M c.246C>G, p.L90P c.269T>C und p.R143W c.427C>T sind in den Transmembrandomänen lokalisiert, p.G59V c.176C>G ist in der ersten extrazellulären Schleife lokalisiert und p.R127H c.380G>A in der intrazellulären Schleife (Abbildung 10).

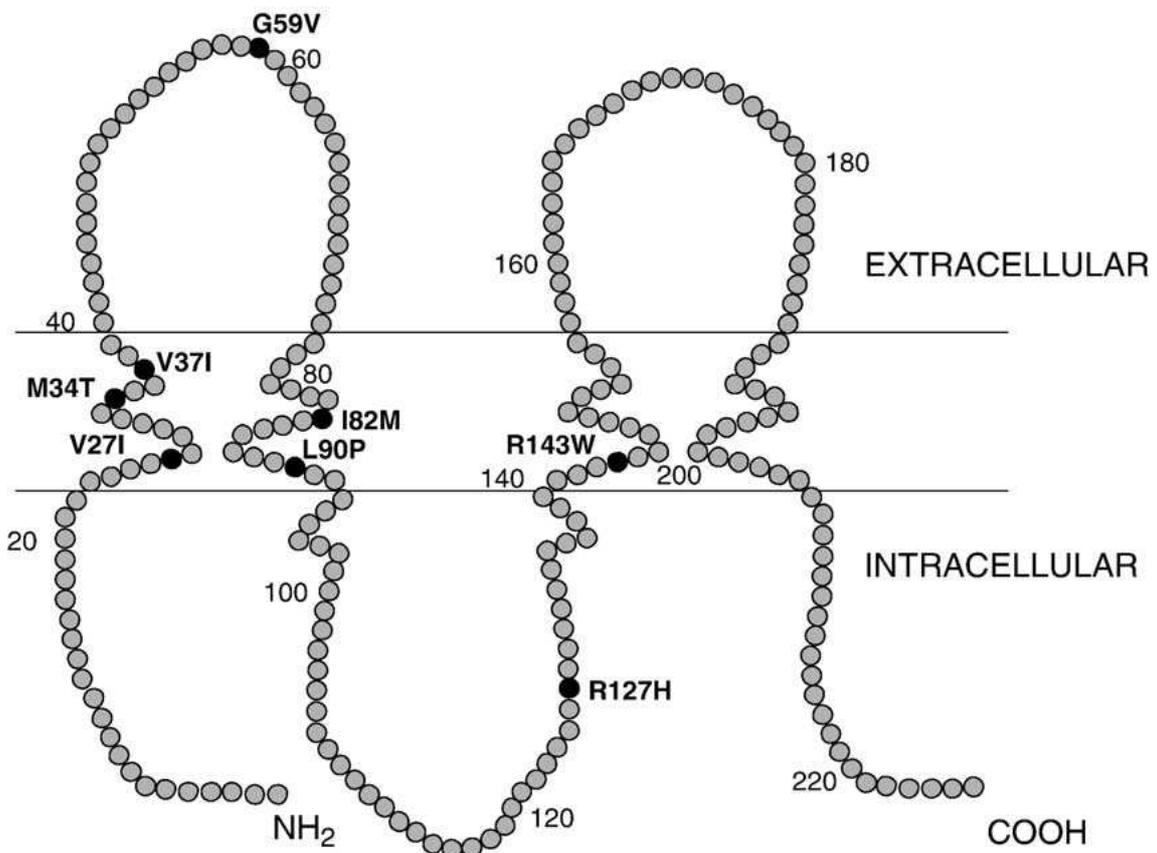


Abbildung 10: Connexin 26 Topologie, die untersuchten Connexin 26 Mutationen sind fettgedruckt gekennzeichnet. p.G59V ist in der ersten extrazellulären Schleife, p.R127H in der intrazellulären Schleife und p.V27I, p.M34T, p.V37I, p.I82M, p.L90P und p.R143W sind in den Transmembrandomänen lokalisiert

Alle Mutationen, die bei Patienten mit Schwerhörigkeit identifiziert wurden, liegen in Verbindung mit der c.35delG Mutation heterozygot vor, ausgenommen p.V27I und R127H, die homozygot vorkamen, p.M34T kam mit keiner zusätzlichen Mutation oder mit p.A147T c.445G>A vor und p.G59V, die bei Patienten mit 35delG oder alleine vorkommt (Toth, T.et al. 2004); (Kupka, S.et al. 2002).

Um die volle Expression der Wildtyp und Connexin 26 Mutationen zu bestimmen, wurden die Oozyten 2 Tage nach Injektion der Connexin 26 RNA lysiert und Western Blots wurden durchgeführt. Wie in den Western Blots bewiesen, wurden die Proteine der Wildtyp und Connexin 26 Mutationen richtig translatiert (Abbildung 11A). Um nachzuprüfen, ob die mutierten Connexin 26 Proteine richtig in die Plasmamembran transportiert wurden, wurden Western Blots von isolierter Plasmamembran angefertigt. Wie in Abbildung 11B dargestellt, wurden alle Mutationen ähnlich wie Connexin 26 Wildtyp in die Plasmamembran eingebaut.

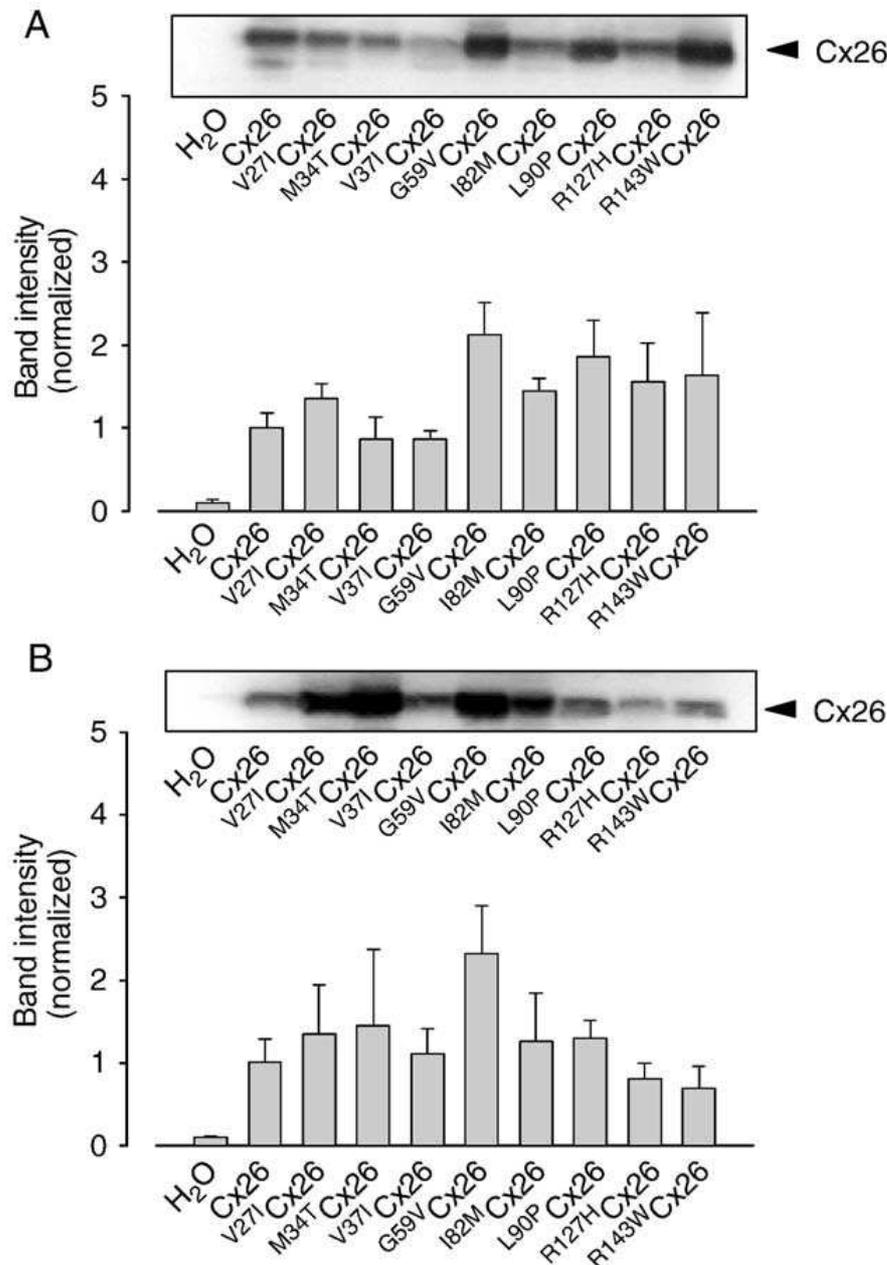


Abbildung 11: Western Blot Analysen der Oozyten, die heterolog Wildtyp oder Connexin 26 Mutationen exprimierten. In die *Xenopus* Oozyten wurden Wildtyp, Connexin 26 Mutation cRNA oder Wasser injiziert, 2-3 Tage nach der Injektion, wurden die Oozyten aufgelöst und auf totale Expression (A) oder Plasmamembranexpression (B) untersucht. Untere Reihe: Quantifizierung der Bandenintensität. Die Werte von drei verschiedenen Experimenten wurden auf die Mittelwerte der Bandenintensitäten von Wildtyp Cx26-injizierten Oozyten normalisiert. Mittelwerte \pm SEM. Obere Reihe: Die Western Blots zeigten, dass Wildtyp und alle Connexin 26 Mutationen Proteine richtig translatiert und in die Zellmembran transportiert wurden

3.2. Funktionelle Analyse der Connexin 26 Mutationen

Um zu prüfen, ob die Mutationen die Connexin 26 Funktion beeinträchtigen, wurden Wildtyp oder mutierte Connexin 26 RNA in *Xenopus Oozyten* exprimiert und die Aktivität der Kanäle mittels elektrophysiologischer Analysen untersucht. Wie Abbildung 12A zeigt, ruft die Depolarisation einen langsam aktivierenden Strom in Connexin 26 exprimierenden Oozyten hervor ($5.85 \pm 0.99 \mu\text{A}$, $n=36$), der 30fach höher ist als der Strom, der in den mit Wasser injizierten Kontrolloozyten gemessen wurde ($0.20 \pm 0.03 \mu\text{A}$, $n=26$). Von allen untersuchten Mutationen zeigte nur die V27I Mutation funktionelle Aktivität ($5.20 \pm 0.92 \mu\text{A}$, $n=17$). Die G59V Cx26, I82M Cx26 und R127H Cx26 Mutationen zeigten einen teilweisen (von $5.85 \pm 0.99 \mu\text{A}$, $n=36$ auf $0.48 \pm 0.20 \mu\text{A}$ in Wildtyp Connexin 26 exprimierenden Oozyten beziehungsweise $0.48 \pm 0.05 \mu\text{A}$ oder $0.77 \pm 0.15 \mu\text{A}$, $n=6-17$ in G59V Cx26, I82M Cx26 und R127H Cx26 exprimierenden Oozyten) und die M34T Cx26, V37I Cx26, L90P Cx26 und R143W Cx26 Mutationen einen vollständigen, fehlerhaften Phänotyp (Abbildung 12B).

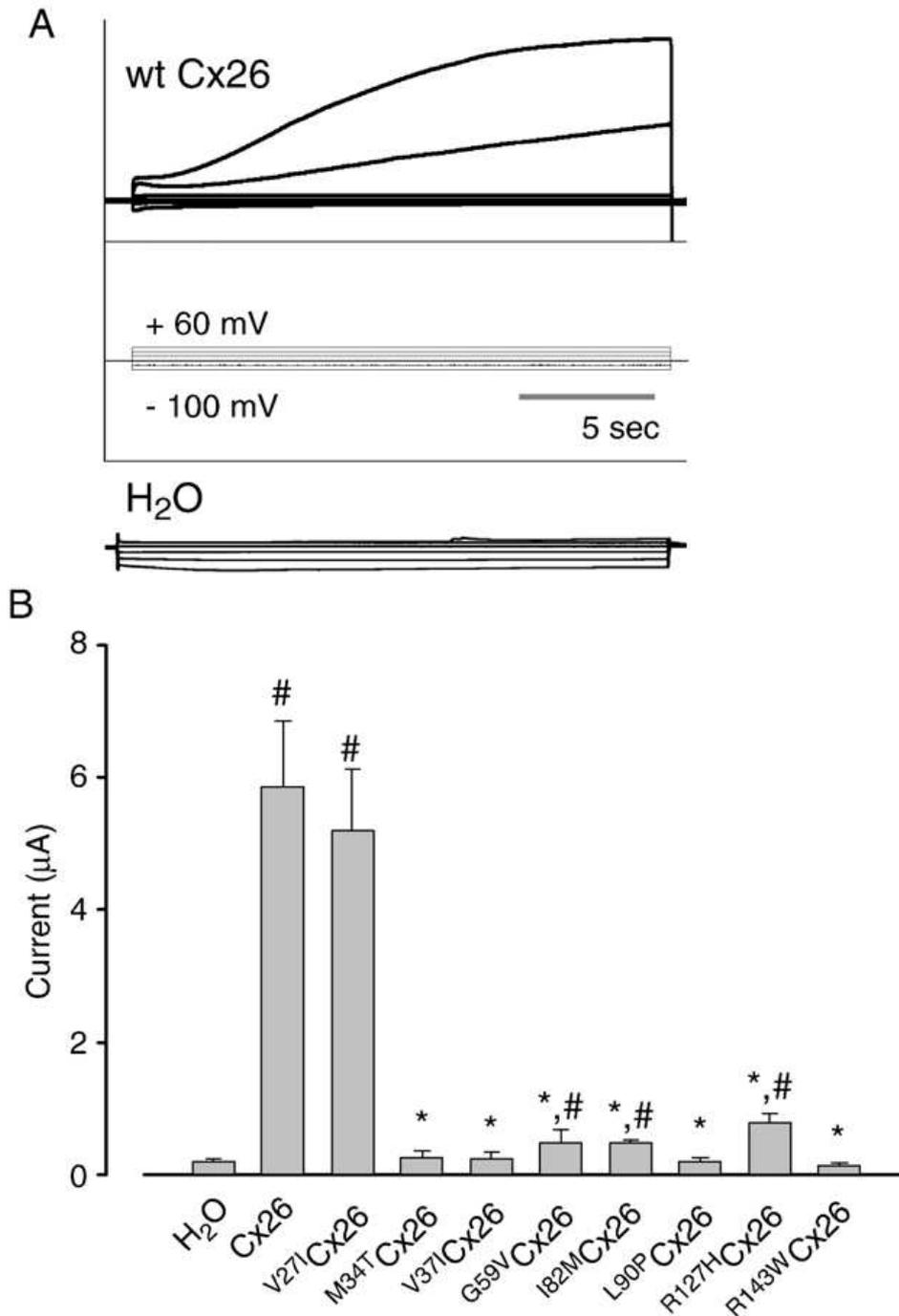


Abbildung 12: Funktionelle Charakterisierung der Connexin 26 Mutationen. *Xenopus* Oozyten wurden mit Wildtyp cRNA, Connexin 26 Mutationen cRNA oder mit Wasser injiziert. 2-3 Tage nach Injektion wurde die Aktivierung der Kanäle mittels Depolarisation von -100mV bis +60mV für 20s untersucht. (A) Original Aufnahmen von Wildtyp Connexin 26- und Wasser-injizierten Oozyten, (B) Mittelwerte \pm SEM *Zeigt den statistisch

signifikanten Unterschied zum Strom in *Xenopus* Oozyten, die Wildtyp Connexin 26 exprimieren. #Zeigt den statistisch signifikanten Unterschied zum Strom in *Xenopus* Oozyten, die mit Wasser injiziert wurden. Von allen untersuchten Mutationen zeigte nur V27I Cx26 eine funktionelle Aktivität. Die G59V Cx26, I82M Cx26 und R127 Cx26 Mutationen zeigten einen teilweisen (*, #) und die M34T Cx26, V37I Cx26, L90P Cx26 und R143W Cx26 Mutationen einen vollständigen (*), fehlerhaften Phänotyp

Um zu erforschen, ob einer der mutierten Kanäle einen dominanten, hemmenden Effekt auf Wildtyp Kanäle ausüben könnte, wurden Wildtyp Cx26 cRNA und die cRNAs der Cx26 Mutationen in *Xenopus* Oozyten in gleichen Mengen koinjiziert, ähnlich der Situation in heterozygoten Menschen.

Wie Abbildung 13 zeigt, hatte die Coexpression von G59V Cx26, L90P Cx26, R127H Cx26 oder R143W Cx26 Mutationen keine bedeutsame Auswirkung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Wildtyp Kanäle (n=7-9). Im Gegensatz dazu verminderte die Coexpression von M34T Cx26, V37I Cx26 oder I82M Cx26 signifikant die Connexin26-vermittelnden Ströme (von $5.94 \pm 1.16 \mu\text{A}$, n=18 in Wildtyp Cx26 exprimierenden Oozyten auf $2.28 \pm 0.46 \mu\text{A}$, $1.55 \pm 0.58 \mu\text{A}$ oder $0.49 \pm 0.19 \mu\text{A}$, n=9-17 in M34T Cx26, V37I Cx26 und I82M Cx26 coexprimierten Oozyten). Folglich üben p.M34T, p.V37I und p.I82M tatsächlich einen dominanten, hemmenden Effekt aus.

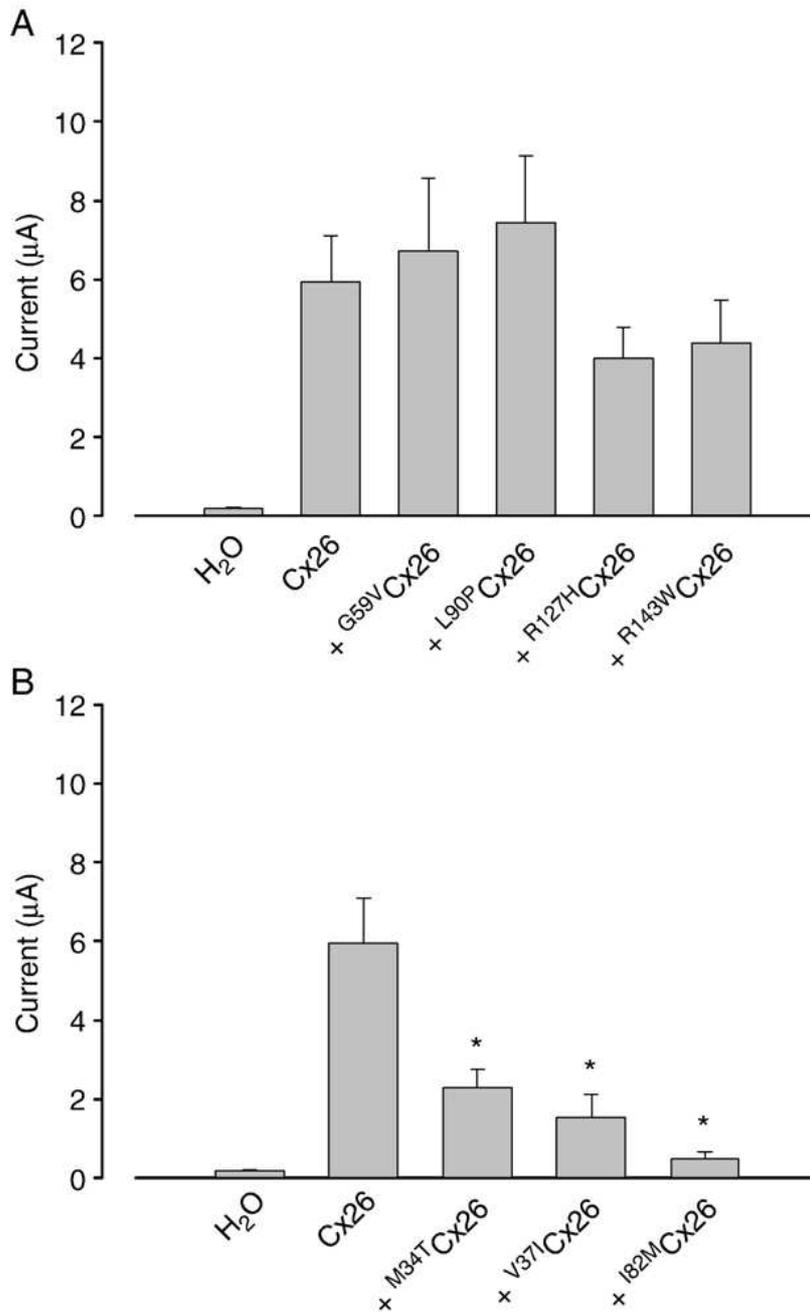


Abbildung 13: Coexpressions-Studien von Wildtyp und Cx26 Mutationen. *Xenopus* Oozyten wurden mit Wildtyp und veränderter (p.G59V, p.L90P, p.R127H oder p.R143W in Abbildung (A) und p.M34T, p.V37I und p.I82M in Abbildung (B)) Cx26 cRNA in gleichen Mengen oder mit Wasser injiziert. 2-3 Tage nach der Injektion wurden die Aktivitäten der Kanäle gemessen. Mittelwerte \pm SEM. *Zeigt den statistisch signifikanten Unterschied zum Strom in *Xenopus* Oozyten, die Wildtyp Cx26 exprimieren. G59V Cx26, L90P Cx26, R127H Cx26 und R143W Cx26 haben ein rezessives Verhalten. Im Unterschied dazu üben M34T Cx26, V37I Cx26 und I82M Cx26 einen dominanten, hemmenden Effekt aus

3.3. Transdominante Wirkung der Connexin 26 Mutationen auf Connexin 30 und Connexin 31

Connexin 26 ist teilweise colokalisiert mit Connexin 30 in der Rattencochlea (Lautermann, J. et al. 1998). Immunhistochemische und in situ Hybridisierungsstudien zeigten, dass Connexin 31 auch in der Cochlea exprimiert wird. (Xia, A. P. et al. 2000); (Bergoffen, J. et al. 1993); (Lopez-Bigas, N. et al. 2001). Aufgrund der Tatsache, dass Connexin 26 fähig ist heteromere Hemikanäle mit anderen Connexinen zu bilden (Stauffer, K. A. 1995); (Lee, M. J. & Rhee, S. K. 1998), untersuchten wir, ob die Connexin 26 Mutationen transdominant sich auf Connexin 30 oder/und Connexin 31 Aktivität auswirken. Zu diesem Zweck wurden Wildtyp oder veränderte Cx26 cRNAs mit Wildtyp Cx30 oder Cx31 in *Xenopus* Oozyten zu gleichen Teilen koinjiziert. Wie Abbildung 14 zeigt, reduzierten alle Mutationen, außer der Polymorphismus V27I Cx26, drastisch die Cx30 Aktivität (von $5.94 \pm 1.16 \mu\text{A}$, $n=18$ in Wildtyp Cx30 exprimierenden Oozyten auf $3.29 \pm 0.56 \mu\text{A}$, $0.81 \pm 0.38 \mu\text{A}$, $0.35 \pm 0.09 \mu\text{A}$, $1.69 \pm 0.31 \mu\text{A}$, $0.94 \pm 0.39 \mu\text{A}$, $1.74 \pm 0.39 \mu\text{A}$, $0.86 \pm 0.26 \mu\text{A}$, $1.24 \pm 0.27 \mu\text{A}$, $n=8-12$ in M34T Cx26, V37I Cx26, G59V Cx26, I82M Cx26, L90P Cx26, R127H Cx26 und R143W Cx26 coexprimierten Oozyten).

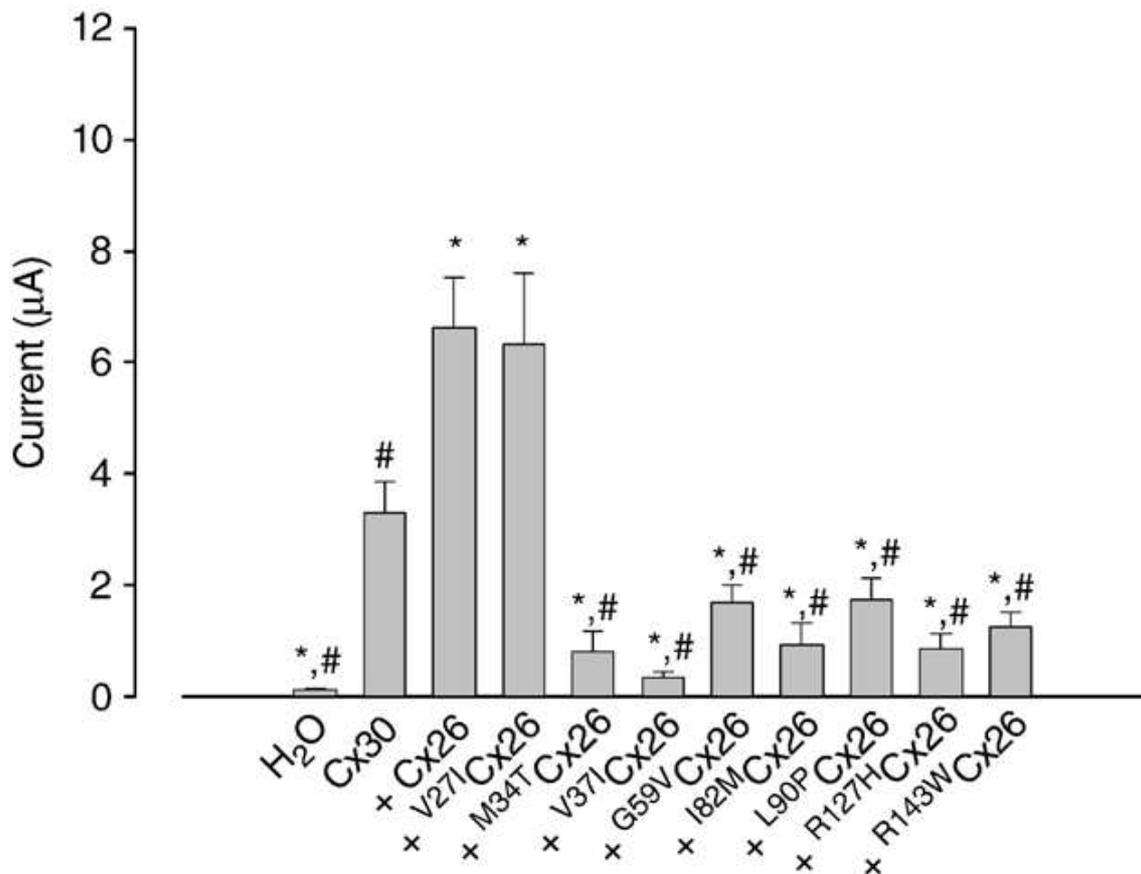


Abbildung 14: Coexpressions-Studien von Wildtyp oder Connexin 26 Mutationen mit Wildtyp Connexin 30. *Xenopus Oozyten* wurden mit Wildtyp Cx30 cRNA zusammen mit Wildtyp oder veränderter Cx26 cRNA in gleichen Mengen oder mit Wasser injiziert. 2-3 Tage nach Injektion wurde die Aktivität der Kanäle untersucht. Mittelwerte \pm SEM. *Zeigt den statistisch signifikanten Unterschied des Stroms in *Xenopus Oozyten*, die Wildtyp Cx30 und Wildtyp Cx26 coexprimieren. #Zeigt den statistisch signifikanten Unterschied des Stroms in *Xenopus Oozyten*, die Wildtyp Cx30 exprimieren. Alle Mutationen, außer der Polymorphismus V27I Cx26, üben einen dominanten, hemmenden Effekt aus

Im Gegensatz, wurde die Connexin 31 Aktivität nur durch die Coexpression mit M34T Cx26, V37I Cx26 und L90P Cx26 signifikant reduziert (von $2.17\pm 0.48 \mu\text{A}$, $n=10$ in Wild Typ Cx31 exprimierenden Oozyten auf $0.77\pm 0.20 \mu\text{A}$, 0.63 ± 0.12

μA , $0.53 \pm 0.17 \mu\text{A}$, $n=10$ in M34T Cx26, V37I Cx26 und L90P Cx26 in coexprimierten Oozyten) (Abbildung 15).

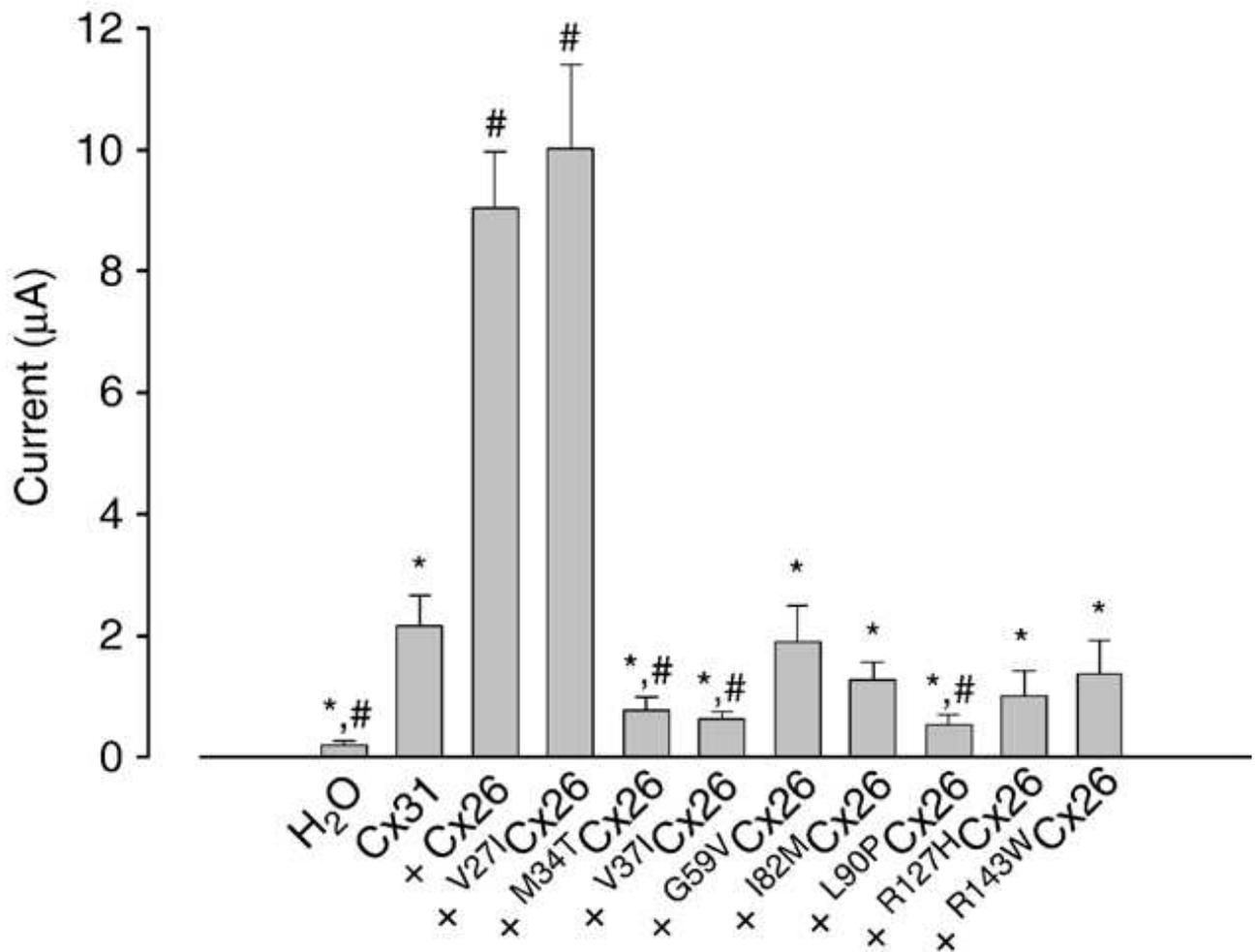


Abbildung 15: Coexpressions-Studien von Wildtyp oder veränderter Connexin 26 cRNA mit Wildtyp Cx31. *Xenopus* Oozyten wurden mit Wildtyp Cx31 cRNA, mit Wildtyp oder Cx26 Mutationen oder mit Wasser in gleichen Mengen injiziert. 2-3 Tage nach Injektion wurde die Aktivität der Kanäle untersucht. Mittelwerte \pm SEM. *Zeigt den statistisch signifikanten Unterschied des Stroms in *Xenopus* Oozyten, die Wildtyp Cx31 und Wildtyp Cx26 coexprimieren. #Zeigt den statistisch signifikanten Unterschied des Stroms in *Xenopus* Oozyten, die Wildtyp Cx31 exprimieren. Nur M34T Cx26, V37I Cx26 und L90P Cx26 üben einen dominanten, hemmenden Effekt aus

3.4. Die neu entdeckte Punktmutation N14D

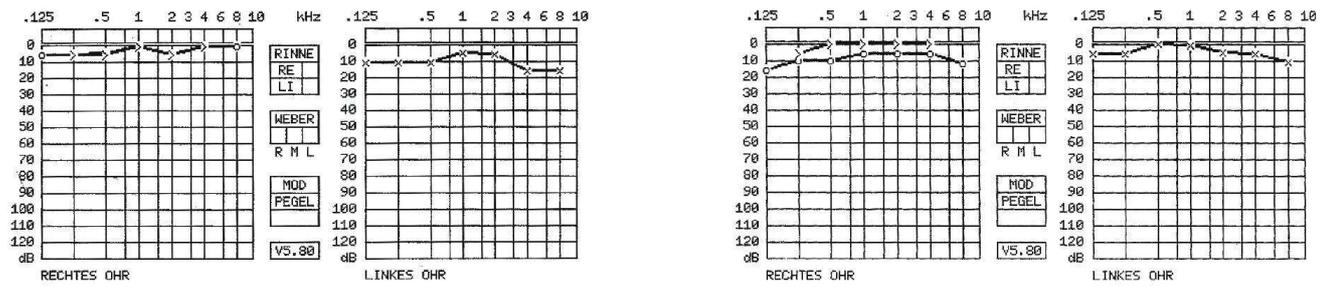
Die neu entdeckte Punktmutation c.40A>G [p.N14D], wurde bei zwei Brüdern mit Schwerhörigkeit gefunden, die die Mutation c.35delG *in trans* tragen. Um die pathophysiologische Signifikanz der p.N14D Mutation zu bestätigen, führten wir eine funktionelle Charakterisierung in *Xenopus laevis* Oozyten mittels Zwei-Elektroden Voltage-Clamp durch.

3.4.1. Klinische Daten

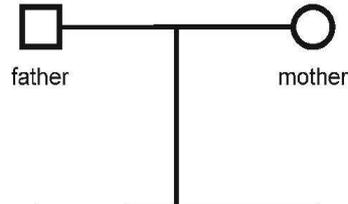
Patient 1 wurde mit 6 Jahren zur Audiometrie überwiesen, nachdem bei der medizinischen Untersuchung für die Einschulung der Verdacht auf Schwerhörigkeit gestellt wurde. Sein Hörverlust war 50 dB bei 1 und 2 kHz für das rechte Ohr und 55 dB und 65 dB bei 1 kHz und 8 kHz für das linke Ohr. Der Junge entwickelte sich normal, er begann mit 20-22 Monaten zu sprechen. Sprachprüfungen ergaben eine milde Dyslalie, IQ-Tests waren normal mit einem IQ von 106. Seine medizinische Vorgeschichte war unauffällig.

Patient 2 ist der jüngere Bruder von Patient 1. Nach der Entdeckung der Schwerhörigkeit seines Bruders wurde er mit 30 Monaten getestet. Die Ableitung akustisch evozierter Potentiale des Hirnstamms zeigte einen Schwellenwert von 35 dB für das rechte Ohr und 20 dB für das linke Ohr. Die Ableitung akustisch evozierter Potentiale des Hirnstamms mit Lautheitsausgleich zeigte einen maximalen Hörverlust von 1 und 2 kHz. Er litt an einer verspäteten Sprech- und Sprachentwicklung. Auch seine medizinische Vorgeschichte war bis jetzt unauffällig. Beiden Jungen ging es nach Anpassung eines Hörgerätes besser, sie werden regelmäßig in der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde kontrolliert. Die kürzlich durchgeführte Audiometrieuntersuchung des älteren Bruders mit 9 Jahren ergab einen Hörverlust von 45 dB bei 1-2 kHz für beide Ohren (Abbildung 16). Für den jüngeren Bruder, der mit 5 Jahren getestet wurde, ergab die Audiometrie einen maximalen Hörverlust von 60 dB und 70 dB bei 2 kHz für das rechte und linke Ohr (Abbildung 16). Es wurde auch eine Audiometrie bei den Eltern

durchgeführt, diese ergab einen normalen Befund (Abbildung 16). Es wurde eine vererbte Schwerhörigkeit vermutet und so wurde die Familie in eine Klinik für Genetik überwiesen. Außer einer Großmutter mütterlicherseits, die Probleme mit dem Hören im 7. Lebensjahrzehnt hatte, gab es keinen Verwandten mit einer Schwerhörigkeit. Eine ausführliche ärztliche Untersuchung beider Jungen ergab keine weiteren Anomalien. Der Verdacht einer nicht-syndromalen, autosomal-rezessiv vererbten, sensorineuralen Schwerhörigkeit bestand und so wurde der Familie eine molekulare Analyse des *GJB2* Gen angeboten.



WT / c.35delG p.N14D / WT



patient 1

patient 2

p.N14D / c.35delG

p.N14D / c.35delG

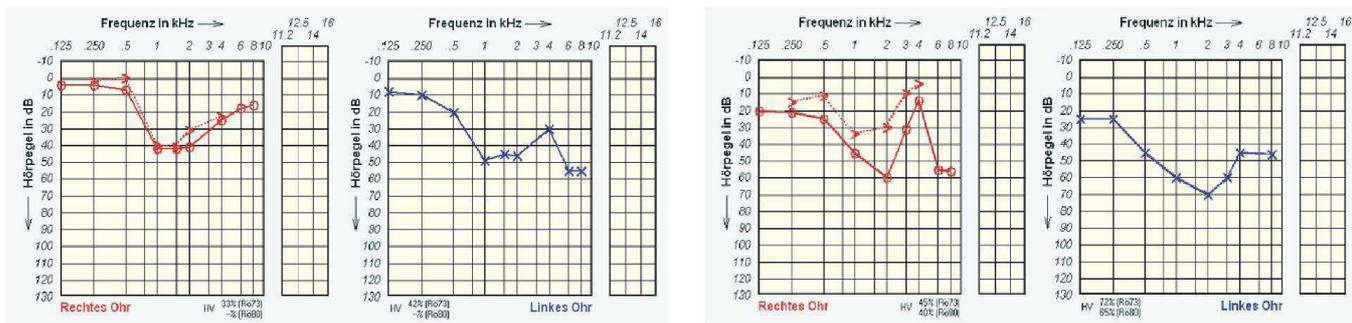


Abbildung 16: Der Stammbaum der Familie, in der die p.N14D Mutation entdeckt wurde. Die Allele und die Audiogramme der Familienmitglieder werden neben den Stammbaumsymbolen gezeigt. Der Vater trägt eine heterozygote c.35delG Mutation und hat ein normales Gehör, die Mutter trägt eine heterozygote p.N14D Mutation und ist ebenfalls klinisch unauffällig. Beide Söhne zeigten eine mittelschwere Schwerhörigkeit für den mittleren Frequenzbereich

3.4.2. Molekulare Analysen

Die Sequenzierung der *GJB2* codierenden Region der zwei Brüder zeigte die c.35delG Mutation und eine A>G Ersatz bei Nukleotid 40 (c.40A>G), der zu einem Aminosäureaustausch p.N14D führte. Der Vater zeigte eine heterozygote c.35delG und die Mutter eine p.N14D Mutation und beide zeigten keine Auffälligkeiten betreffend ihrem Hörvermögen (Abbildung 16). Bei 300 normalhörende Kontrollpatienten aus Deutschland konnte der c.40A>G Ersatz nicht gefunden werden.

3.4.3. Funktionelle Analysen

Um die Auswirkungen der p.N14D Mutation auf die Connexin26 Funktion zu untersuchen, wurden N14D Cx26 und Wildtyp Cx26 in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Aktivität der Hemikanäle durch elektrophysiologische Untersuchungen bestimmt. Wie Abbildung 17A darstellt, induzierte die Depolarisation der Cx26 exprimierenden Oozyten einen langsam aktivierenden Strom. Der Strom in mit Cx26 Wildtyp injizierten Zellen (4.41 ± 0.83 PA, n=12) war ~ 20-fach größer als der Strom in mit Wasser injizierten Kontrolloozyten (0.21 ± 0.06 PA, n=12) (Abbildung 17B). N14D Cx26 exprimierende Oozyten zeigten deutlich reduzierte Ströme (0.66 ± 0.13 PA, n=12) verglichen mit den Wildtyp Cx26 injizierten Zellen. Für den HA-markierten Wildtyp und N14D Cx26 wurden ähnliche Ergebnisse verglichen mit den korrespondierenden unmarkierten Connexinen erzielt (4.79 ± 1.15 PA, n=12 and 0.64 ± 0.16 PA, n=12). Um heraus zu finden, ob die reduzierte Aktivität der Kanäle bedingt durch eine unzureichende Translation oder Internalisierung der Proteine in die Plasmamembran ist, wurde die Expression von Wildtyp und Cx26 Mutationen in Zelllysaten und in der Plasmamembran bestimmt (Abbildung 18). Um zu ermitteln ob das Protein in die Plasmamembran integriert wurde, wurden Konstrukte, die einen Haemagglutinin (HA)-tag in der ersten extrazellulären Schleife enthielten, erzeugt und in *Xenopus Oozyten* exprimiert. Während N14D Cx26 normal translatiert wurde (Abbildung 18A), war die

Zelloberflächenexpression von N14D Cx26 deutlich reduziert auf 41.1 ± 4.6 % of Kontroll (n=47, Abbildung 18B).

Um eine heterozygote Mutation nachzuahmen, wurden Coexpressionsversuche mit Wildtyp und N14D Cx26 durchgeführt (Abbildung 19). Wildtyp und N14D Cx26 cRNA wurde zu gleichen Teilen injiziert, es wurden Ströme evoziert (5.10 ± 1.26 PA, n=9), die nicht signifikant unterschiedlich von den gemessenen Strömen in Zellen, die mit Wildtyp Cx26 allein injiziert, waren (4.42 ± 1.48 PA, n=10).

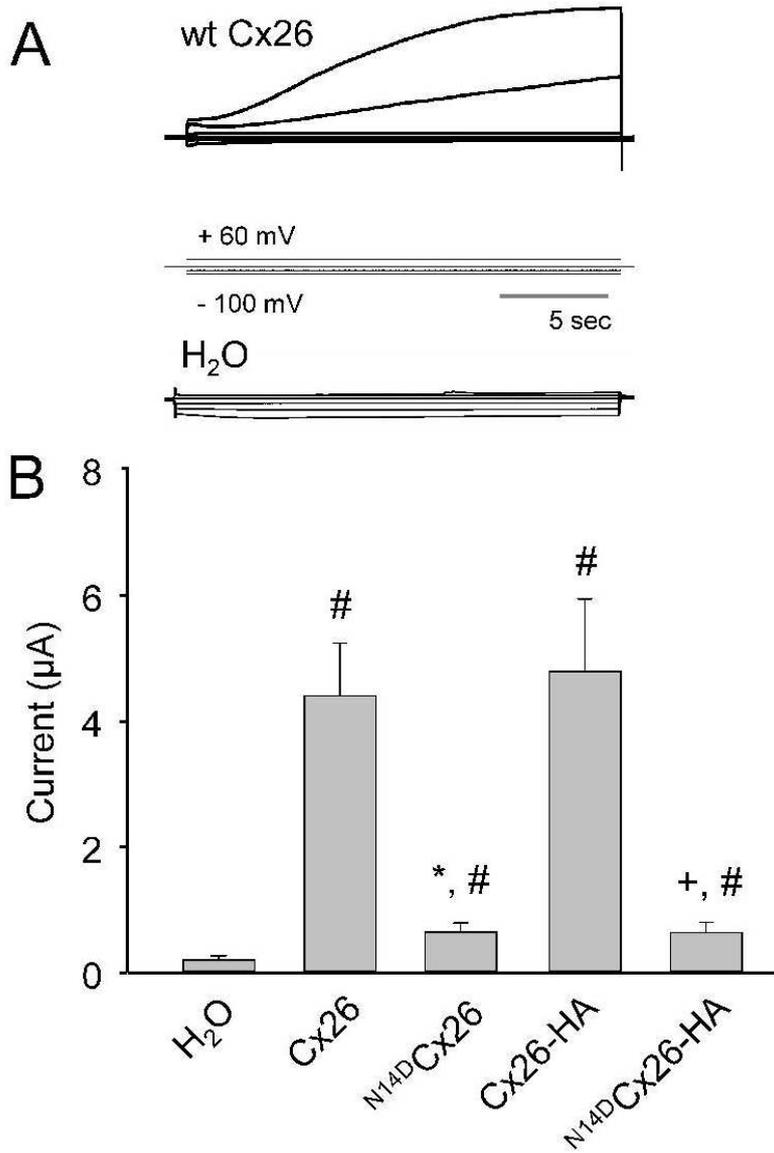


Abbildung 17: Funktionelle Charakterisierung von Connexin 26 und p.N14D, die Kanalaktivität wurde mit einer Depolarisation von -100 mV bis +60 mV für 20 s analysiert. A: Original Aufzeichnungen der Wildtyp Cx26- und wasser-injizierten Oozyten. B: Gemessene Ströme für Wildtyp und N14D Cx26 Mutation, entweder HA-markiert oder unmarkiert. Abgesehen von den HA-markierten N14D Cx26, zeigte N14D Cx26 einen stark reduzierten Strom verglichen mit Wildtyp Cx26. Mittelwerte \pm SEM. * zeigt den statistisch signifikanten Unterschied zu den Strömen in Wildtyp Cx26 exprimierenden Oozyten, + zeigt den statistisch signifikanten Unterschied zu den Strömen in HA-markierten Wildtyp Cx26 exprimierenden Oozyten. # zeigt den statistisch signifikanten Unterschied zu den Strömen in Oozyten, die mit Wasser injiziert wurden

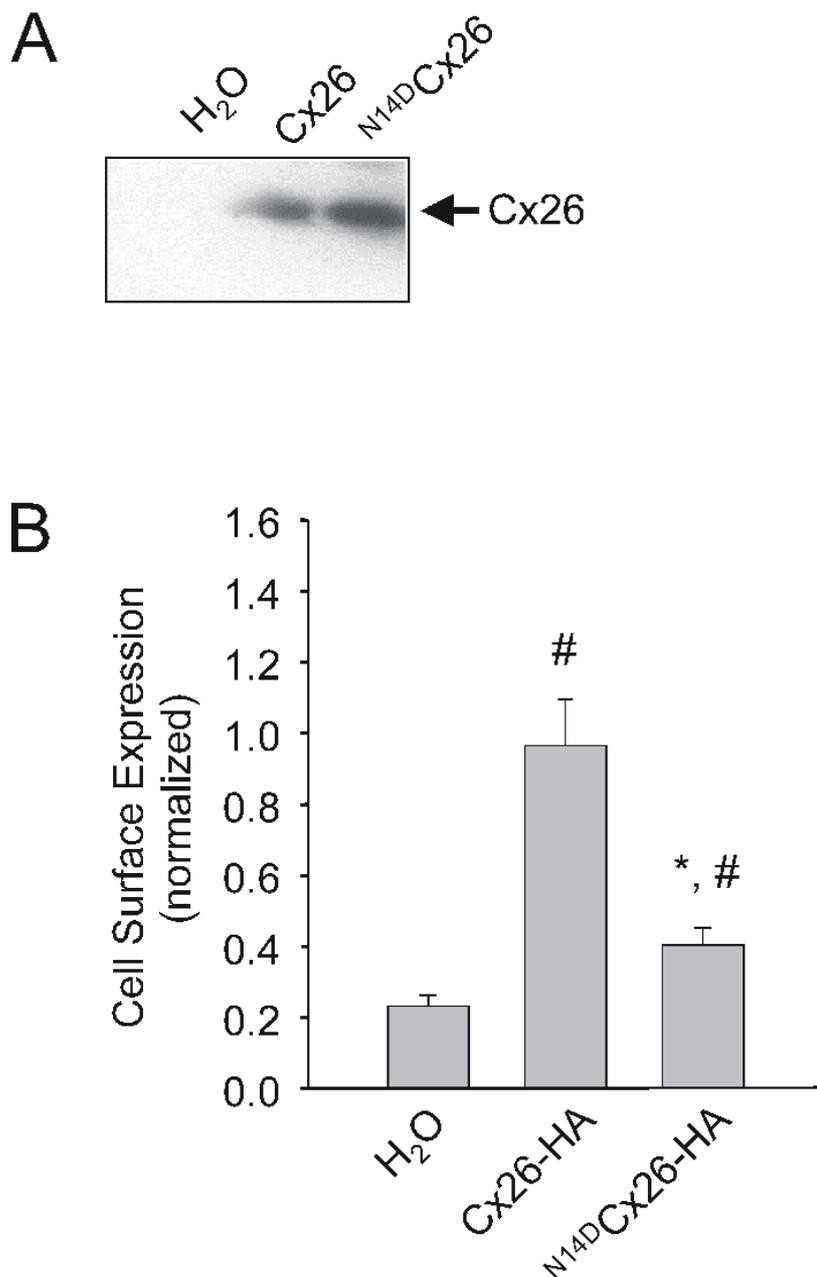


Abbildung 18: Expression von Wildtyp und N14D Cx26 in *Xenopus laevis* Oozyten nach cRNA Injektion. A: Expression von N14D Cx26 und Wildtyp Cx26 detektiert durch Western Blot. B: Zelloberflächenexpression von Haemagglutinin (HA)-markierten N14D Cx26 und Wildtyp Cx26 detektiert durch Chemilumineszenzmessungen. Mittelwerte \pm SEM. * zeigt den statistisch signifikanten Unterschied zu den Strömen in Wildtyp Cx26 exprimierenden Oozyten, # zeigt den statistisch signifikanten Unterschied zu den Strömen in Oozyten, die mit Wasser injiziert wurden

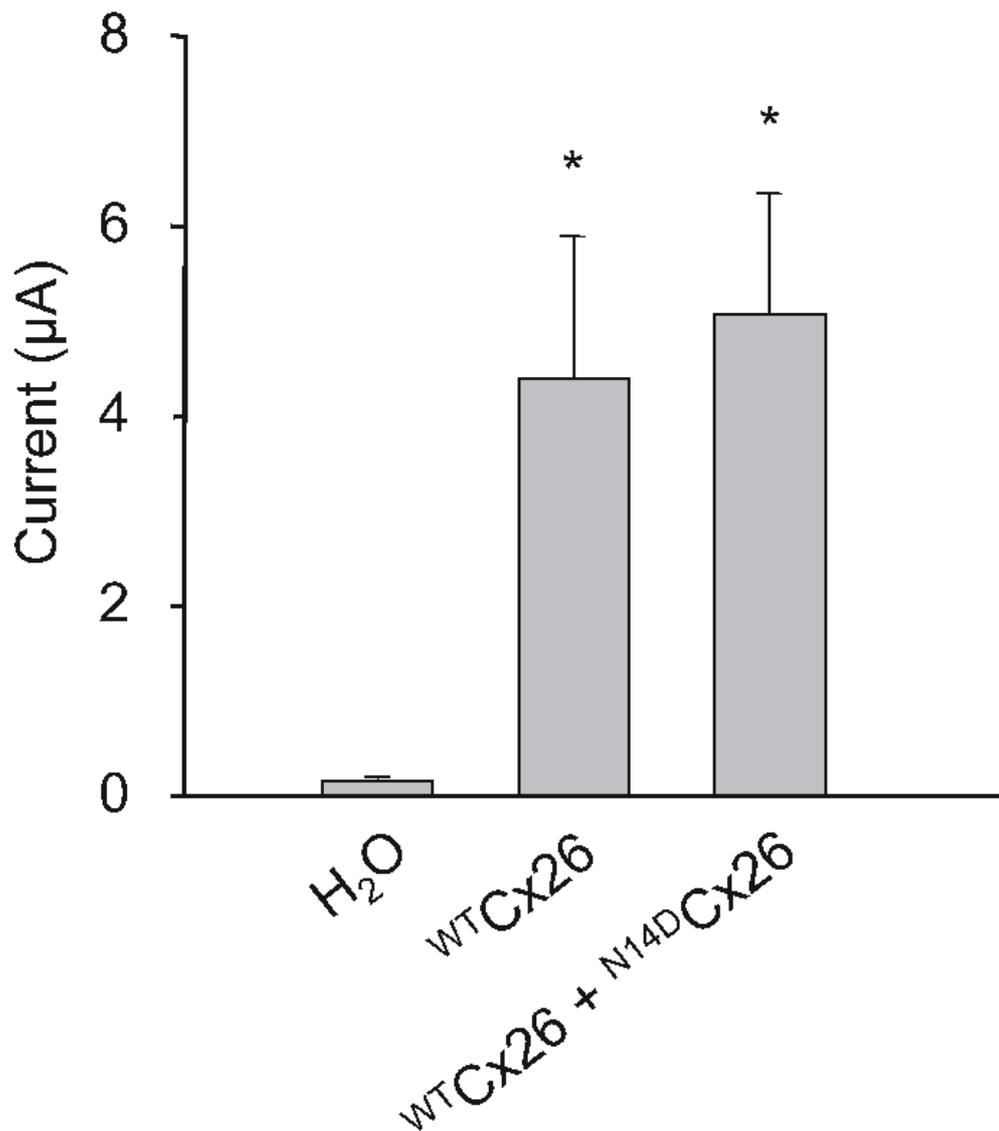


Abbildung 19: Coexpression von Wildtyp Cx26 und N14D Cx26, *Xenopus* Oozyten wurden mit Wildtyp und N14D Cx26 cRNA zu gleichen Teilen oder mit Wasser injiziert. 2 Tage nach der Injektion wurde die Kanalaktivität gemessen. Wildtyp Cx26 stellte die Eigenschaften der Leitfähigkeit von N14D Cx26 wieder her. Mittelwerte \pm SEM. * zeigt den statistisch signifikanten Unterschied zu den Strömen in mit Wasser injizierten Oozyten

4. Diskussion

4.1. Fehlerdiskussion

4.1.1. Oozytenpräparation

Die Qualität der Oozyten war unterschiedlich von Präparation zu Präparation. Dieses zeigte sich insbesondere durch ihren basalen Leckstrom. Um diese Unterschiede auszugleichen, wurden stets mehrere Versuchsreihen mit Zellen aus unterschiedlichen Präparationen durchgeführt.

Auf eine möglichst genaue Kontrolle der Injektionsmenge von cRNA wurde durch Verwendung von hochpräzisen Mikroinjektoren geachtet.

Ungenauere Injektion hätte auch zu unterschiedlicher Expression und damit Aktivität geführt. Durch hohe Zellzahl und mehrmalige Wiederholungen der Messungen konnten die hierdurch entstehenden unsystematischen Fehler ausgeglichen werden.

4.1.2. Lösungen und Geräte

Eventuelle, von anderen Geräten ausgehende, elektrische Störungen wurden durch einen Faraday'schen Käfig weitgehend abgeschirmt.

Der Widerstand der Elektroden, der durch Verstopfen der Spitzen verändert sein konnte, wurde regelmäßig kontrolliert, und wenn nötig, wurden die Glaselektroden ausgewechselt. Für eine gute Beschichtung der AgCl-Elektrode wurde durch regelmäßiges Chlorieren des Silberdrahtes gesorgt.

Die Lösungen wurden aus 10-facher Stammlösung vor jedem Versuch hergestellt. Die Gesamtmolarität und der pH der Lösungen wurden dabei vor jedem Versuch kontrolliert.

4.1.3. Auswertung

Bei der Beurteilung und Auswertung der Ergebnisse ist besonders auf die Größe der Ströme und die Genauigkeit der Messungen einzugehen.

Verschiedene Einflüsse führen zu Schwankungen und Abweichungen des

basalen Stromes in den Oozyten. Es wurde deshalb auf einen linearen, stabilen Verlauf des Stromes geachtet, bevor die durch Substratgabe erzeugten Differenzen der Ströme ermittelt wurden.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Die Studie beschreibt die funktionellen Analysen von 8 Punktmutationen, die auf der codierenden Region des *GJB2* Gen liegen. Es wurden alle Mutationen richtig translatiert, jedoch behielt nur die Mutation V27I Cx26 eine funktionelle Aktivität. Es gibt mehrere Beweise dafür, dass diese Mutation ein Polymorphismus ist (Kelley, P. M. et al. 1998); (Abe, S. et al. 2000); (Kudo, T. et al. 2000); (Park, H. J. et al. 2000). Deswegen wurde die V27I Cx26 Mutation als positive Kontrolle in diese Studie miteinbezogen. Die angefertigten Western Blots der Präparation der Plasmamembranen zeigten, dass alle Mutationen in die Plasmamembran ähnlich wie Wildtyp Cx26 eingebaut wurden. Daher ist das Fehlen der Funktionalität der Connexin 26 Mutationen nicht die Folge von geändertem Trafficking, sondern eher infolge von Änderungen der Eigenschaften und im Aufbau der Kanäle.

Die Mutationen p.M34T, p.V37I, p.G59V, p.I82M, p.L90P, p.R127H und p.R143W, die ein funktionelles Defizit in unseren Messungen zeigten, sollten mit der diagnostizierten Schwerhörigkeit assoziiert werden. Aktuell sind zahlreiche biochemische und elektrophysiologische Studien in heterologen Expressionssystemen durchgeführt worden, um die funktionelle Bedeutung der Connexin 26 Mutationen zu klären (Martin, P. E. et al. 1999); (Thonnissen, E. et al. 2002); (Bruzzone, R. et al. 2003); (Skerrett, I. M. et al. 2004). Die meisten der untersuchten Mutationen waren, etwa 80%, weniger aktiv als Wildtyp Cx26 oder ohne Funktion. Entsprechend unseren Coexpressions-Studien üben nur die Mutationen I82M Cx26, V37I Cx26 und M34T Cx26 einen dominant hemmenden Effekt auf die Wildtyp Cx26 Kanäle aus.

Die p.I82M Mutation wurde in zusammengesetzter Heterozygotie mit c.35delG bei zwei Brüdern mit tiefgreifender Schwerhörigkeit entdeckt und wurde in keiner der 170 Kontrollen gefunden (Kupka, S. et al. 2002), was eher auf eine

schwere Auswirkung der Mutation hinweist. Obwohl diese Mutation nur auf einen Austausch von zwei neutralen Aminosäuren (Isoleucin zu Methionin) zurückzuführen ist, scheint die Tatsache, dass die Position entwicklungs­mässig erhalten ist und dass Methionin eine Sulfatgruppe trägt, zu genügen, um einen dominanten, negativen Effekt auszuüben, vielleicht bewirkt durch die bevorstehende Oligomerisation in die Connexone. Nach unserem Wissen, war dies die erste Publikation, in der diese Mutation auf ihre funktionelle Wirkung und ihren Effekt auf Wildtyp Cx26 Proteine untersucht wurde (Palmada, M. et al. 2006).

Die zweite Mutation bei Patienten mit Schwerhörigkeit, die einen dominant negativen Effekt auf Wildtyp Cx26 ausübt, ist p.V37I. Die Mutation wurde im Gegensatz zu der Mehrzahl der GJB2 Mutationen in knapp über 1% der Fälle beobachtet (Marlin, S. et al. 2001). Anfänglich wurde p.V37I als Polymorphismus beschrieben, aber mehrere nachträglich erschienene Publikationen zeigten eine rezessive Vererbung (Kelley, P. M. et al. 1998); (Rabionet, R. et al. 2000); (Wilcox, S. A. et al. 2000); (Marlin, S. et al. 2001); (Kenna, M. A. et al. 2001); (Bason, L. et al. 2002). Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen zeigte Bruzzone et al., dass V37I ohne Funktion ist, aber im Gegensatz zu unserer Studie, wurden keine Coexpressionsmessungen durchgeführt (Bruzzone, R. et al. 2003). Wie die schon erwähnte p.I82M Mutation ist p.V37I ebenso in einer Transmembrandomäne lokalisiert und ähnlich an der Oligomerisation in hexamerischen Connexin Hemikanälen beteiligt ist.

Die p.M34T Mutation wird relativ häufig beobachtet und ist in einigen Bevölkerungen kaukasischen Ursprungs die zweithäufigste vorkommende Mutation nach c.35delG (Marlin, S. et al. 2001). In vorherigen genetischen Studien der p.M34T Mutation wurden gegensätzliche Ergebnisse erzielt (Kelsell, D. P. et al. 1997); (Scott, D. A. et al. 1998); (Marlin, S. et al. 2001); (Houseman, M. J. et al. 2001), unterstützt durch funktionelle Untersuchungen in verschiedenen *in vitro* Systemen (White, T. W. et al. 1998); (Thonnissen, E. et al. 2002); (D'Andrea, P. et al. 2002). Unsere Ergebnisse zeigen einen dominant negativen Effekt von M34T Cx26 auf Cx26 Wildtyp-Ströme in den elektrophysiologischen Messungen. Aufgrund der widersprüchlichen,

genetischen Ergebnisse und unterschiedlichen Ergebnissen in verschiedenen funktionellen Messungen, wurde vermutet, dass p.M34T eine dominante Mutation mit verminderter Penetranz abhängig vom genetischen Hintergrund ist, eine Hypothese, die mit unseren Ergebnissen übereinstimmt.

Bis jetzt wurden fünf verschiedene Mutationen p.W44C, p.W44S, p.G59A, p.D66H und p.R75W mit Hilfe von genetischen und zum Teil funktionellen Studien gefunden, die eine dominant vererbte Taubheit verursachen (Denoyelle, F.et al. 1998); (Richard, G.et al. 1998); (Maestrini, E.et al. 1999); (Heathcote, K.et al. 2000). Diese Mutationen sind in der ersten extrazellulären Schleife von Connexin 26 lokalisiert (Rabionet, R.et al. 2000). Die extrazellulären Schleifen der *Gap junctions* wurden als entscheidend für das Andocken zweier Hemikanäle beschrieben, um eine *Gap junction* Einheit zu bilden. Folglich könnte ein dominantes Verhalten teilweise begründet sein entweder durch ein beeinträchtigtes Andocken der Connexonhemikanäle oder übereinstimmend mit unseren Ergebnissen durch eine beeinträchtigte Oligomerisation der Connexine. Trotz ihrer Lokalisation in der ersten extrazellulären Schleife zeigte die p.G59V Mutation keinen dominant negativen Effekt auf Wildtyp Cx26. Die zwei Patienten, die in einer unserer früheren Studien identifiziert wurden, zeigten eine schwere, kongenitale Schwerhörigkeit (Toth, T.et al. 2004). Eine fehlende dominant negative Wirkung von G59V Cx26 auf Wildtyp Cx26 in unseren Expressionssystemen könnte durch einen dominant negativen Effekt auf andere Connexine erklärt werden. Tatsächlich hatte G59V Cx26 einen dominant negativen Effekt als es mit Cx30 coexprimiert war, ein Connexin, das an autosomal dominant vererbter Taubheit beteiligt ist (Grifa, A.et al. 1999).

Die p.L90P Cx26 Mutation hat eine höhere Relevanz in genetischer Diagnostik und Beratung aufgrund eines häufigeren Vorkommens als die Vielzahl der *GJB2* Mutationen (Rabionet, R.et al. 2000); (persönliche Korrespondenz mit Van Camp). Ähnlich wie p.V37I ist die p.L90P Mutation eher mit milder bis mittlerer ausgeprägter Schwerhörigkeit assoziiert worden (Cryns, K.et al. 2004). In unseren Coexpressionsstudien änderte L90P Cx26 nicht signifikant die Cx26-vermittelten Ströme.

Die Signifikanz der p.R127H Mutation für den Krankheitsphänotyp war Gegenstand unterschiedlicher Diskussionen. Es wurde behauptet, dass die Mutation ein Polymorphismus ist (Marlin, S. et al. 2001); (Thonnissen, E. et al. 2002) sowohl als auch eine rezessive Mutation (Estivill, X. et al. 1998); (D'Andrea, P. et al. 2002); (Wang, H. L. et al. 2003) beides durch genetische Beweise und Zellkulturen nachgewiesen. In einer vorherigen Studie wurde die p.R17H Mutation in einer Familie gefunden und zeigte dort eine klare rezessive Vererbung dieser Mutation in Cosegregation mit tiefgreifender Schwerhörigkeit (Toth, T. et al. 2004). Die funktionellen Daten unterstützten zunächst die Sicht, dass die Mutation relevant sei, da die R127H Cx26 Mutation signifikant kleinere Ströme zeigte als Wildtyp Cx26 Hemikanäle. In Coexpression mit den Wildtyp Proteinen wurde kein dominant negativer Effekt gesehen, ein Ergebnis, dass, wenn man sich unsere genetischen Untersuchungen anschaut, zu erwarten war.

Die p.R143W Mutation wurde als Polymorphismus nach Expressionsexperimenten in N2A Neuroblastomazellen häufig diskutiert, bei denen R143W Cx26-vermittelnde Ströme und Farbtransfer ähnlich den jeweiligen Werten in Wildtyp Cx26 exprimierenden Zellen waren (Wang, H. L. et al. 2003). Im Gegensatz dazu verwies die Studie, die die Mutation anfänglich beschrieben hatte, auf eine krankheitserregende Mutation mit rezessiver Vererbung (Broby, G. W. et al. 1998). In Übereinstimmung mit den funktionellen Analysen (Mese, G. et al. 2004) zeigten unsere Ergebnisse, dass die Mutation p.R143W unfähig war funktionelle Connexone zu bilden. Zusätzlich zeigte unsere Studie, dass die Mutation keinen dominanten negativen Effekt auf Wildtyp Cx26 ausübt, was einen rezessiven Charakter dieser Mutation andeuten würde.

Die Punktmutation c.40A>G p.N14D wurde in zusammengesetzter Heterozygotie mit der c.35delG Mutation bei 2 Brüdern mit moderater nicht-syndromaler, sensorineuraler Schwerhörigkeit im mittleren Frequenzbereich gefunden. Die Trennung der p.N14D Mutation zusammen mit der c.35delG Mutation in dieser Familie schliesst auf einen rezessiven Erbgang, da der c.35delG heterozygote Vater und die p.N14D heterozygote Mutter normales

Hören zeigten. Eine Assoziation zwischen der p.N14D Mutation und Schwerhörigkeit wird weiter durch die Abwesenheit in der normalhörenden Kontrollgruppe unterstützt.

Die funktionellen Analysen der Mutation in *Xenopus laevis* Oozyten zeigten, dass das p.N14D Protein regelrecht synthetisiert wird, aber nur in deutlich reduzierten Mengen in die Zellmembran eingebaut wird, gezeigt werden konnte dies in Western Blot Versuchen der ganzen Zellysate und durch Chemilumineszenz Detektion der Zelloberflächenexpression. Dieses Ergebnis wird bestätigt durch die Messungen der Ströme der Hemikanäle, die ebenso stark reduziert in mit N14D Cx26 cRNA injizierten Oozyten waren.

Die Aminosäure, die von dieser Mutation betroffen ist, ist in der zytoplasmatischen, N-terminalen Region lokalisiert. Dieser Proteindomäne wird nachgesagt im Prozess der Integration in die Membran und die Hexamerformation involviert zu sein (D'Andrea, P.et al. 2002); (Zeilinger, C.et al. 2005). Die Position 14 ist unter verschiedenen Spezies und verschiedenen Typen von Connexinen evolutionär bewahrt, dies zeigt die essentielle Rolle für eine richtige Expression. Der bedeutende Wechsel der neutralen Aminosäure Asparagin zur sauren, negativ geladenen Aminosäure Aspartat scheint für eine insuffiziente Zelloberflächenexpression und so für reduzierte Ströme, gemessen in unseren funktionellen Analysen, verantwortlich zu sein. Van Steensel et al. berichteten von einer *GJB2* Mutation an Position 14, die einen Wechsel von Asparagin zu Lysin bewirkt (p.N14K), bei einem Patienten, der an einem Clouston-Syndrom-ähnlichen Phänotyp mit Schwerhörigkeit leidet. Beim Clouston-Syndrom kommt typischerweise keine Schwerhörigkeit vor, es ist assoziiert mit Mutationen in *GJB6* (Cx30). Die Autoren folgerten, dass der Phänotyp dieses Patienten vielleicht durch einen transdominanten, hemmenden Effekt der p.N14K Mutation auf die Zusammensetzung in heteromeren oder heterotypen Cx26/Cx30 *Gap junctions* zu erklären sei.

Unsere Untersuchungen der p.N14D Mutation im *Xenopus* Expressionssystem beweist, dass diese Cx26 Mutation nicht in die Zellmembran integriert ist.

Unsere Experimente in *Xenopus* Oozyten enthüllten weiter, dass die Coinjektion von N14D Cx26 und Wildtyp cRNA einen gewissen Level der

Wildtyp Leitfähigkeit wiederherstellen kann, ausschließend einen dominant negativen Effekt von p.N14D auf Wildtyp Cx26, und bestätigten den rezessiven Charakter dieser Mutation auf der Basis der Segregation des Genotyps und Phänotyps in der untersuchten Familie.

Die Beobachtung des p.N14D/c.35delG Genotyps in Patienten mit einer moderaten Schwerhörigkeit ist übereinstimmend mit dem Ergebnis, dass Kombinationen von rezessiv vererbten Nonsense- und Missense-Mutationen in *GJB2* signifikant öfter mit moderater Schwerhörigkeit assoziiert sind (Cryns, K.et al. 2004); (Azaiez, H.et al. 2004); (Marlin, S.et al. 2005). Das rezessive Auftreten dieser *GJB2* Mutation zusammen mit unseren funktionellen Daten bietet einen Beweis für die Assoziation der p.N14D Mutation mit der diagnostizierten Schwerhörigkeit. Darüber hinaus kann die Charakterisierung dieses mutierten Proteins dazu beitragen die Funktion besser zu verstehen. Die pathogenetischen Abläufe zu verstehen, wird dazu beitragen, die genetische Beratung von Patienten mit Schwerhörigkeit zu verbessern.

Es wird vermutet, dass Connexin 26 eine wichtige Rolle im Kaliumkreislauf zwischen verschiedenen Komponenten der Cochlea spielt (Kikuchi, T.et al. 1995). Eine Beeinträchtigung der Wiedergewinnung von Kalium in der Endolymphe könnte in einem Ergebnis von einer Anhäufung von Kalium in den extrazellulären Komponenten der Haarzellen resultieren und so die Funktion und schließlich das Überleben der Haarzellen beeinträchtigen. Tatsächlich verursacht eine gezielte Entfernung von Cx26 im epithelialen *Gap junction* Netzwerk im Innenohr Schwerhörigkeit und Zelltod (Cohen-Salmon, M.et al. 2002). Die Hypothese, dass eine Kette von Dysfunktionen vom Fehlen von Cx26 zu einer Störung im Ionentransport führt und schließlich die Apoptosewege aktiviert werden, weist darauf hin, dass die Manifestation von einer DFNB1-begründeten Schwerhörigkeit vielleicht durch verschiedene Formen von Allelen anderer Gene beeinflusst wird. Dementsprechend der Versuch bestimmte Cx26 Mutationen mit verschiedenen klinischen Manifestationen zu korrelieren, könnte durch den Einfluss von Modifikationsgenen kompromittiert werden. Connexin 30 und Connexin 31 werden ebenfalls mit Schwerhörigkeit in Verbindung gebracht. Mutationen in

Connexin 31 wurden auch bei einer Hautkrankheit, Erythrokeratoderma variabilis, entdeckt (Richard, G. et al. 1998). Folglich können Cx26 Mutationen, die stumm sind, wenn sie mit Wildtyp Cx26 coexprimiert sind, vielleicht mit anderen Connexinen z.B. Cx30, Cx31 transdominant agieren und so vielleicht die syndromale/nichtsyndromale Beschaffenheit der Taubheit bestimmen.

Zusammengefasst erwartet man vom Vergleich der funktionellen Eigenschaften von mutierten Cx26 Kanälen mit klinischen Daten einen wertvollen Einblick in die Pathophysiologie von Schwerhörigkeit. Die Krankheitsmechanismen zu verstehen schafft die Grundlagen für eine bessere genetische Diagnostik und Beratung von Patienten, die unterschiedliche Mutationen von *GJB2* Genen tragen, als auch eine Analyse von Modifikationsgenen in einem mutationsspezifischen *in vitro* System.

5. Literatur

5.1. Literaturverzeichnis

Abe, S., Usami, S., Shinkawa, H., Kelley, P. M., Kimberling, W. J. (2000)
Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese
J Med Genet **37**, 41-43

Avraham, K. B. (1997)
Deafness. Sounds from the cochlea
Nature **390**, 559-560

Azaiez, H., Chamberlin, G. P., Fischer, S. M., Welp, C. L., Prasad, S. D., Taggart, R. T., del, C., I, Van Camp, G., Smith, R. J. (2004)
GJB2: the spectrum of deafness-causing allele variants and their phenotype
Hum Mutat **24**, 305-311

Bagowski, C. P., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr. (2001)
The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in Xenopus oocytes
J Biol Chem **276**, 37708-37714

Bason, L., Dudley, T., Lewis, K., Shah, U., Potsic, W., Ferraris, A., Fortina, P., Rappaport, E., Krantz, I. D. (2002)
Homozygosity for the V37I Connexin 26 mutation in three unrelated children with sensorineural hearing loss
Clin Genet **61**, 459-464

Bergoffen, J., Scherer, S. S., Wang, S., Scott, M. O., Bone, L. J., Paul, D. L., Chen, K., Lensch, M. W., Chance, P. F., Fischbeck, K. H. (1993)
Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease
Science **262**, 2039-2042

Brobby, G. W., Muller-Myhsok, B., Horstmann, R. D. (1998)
Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa
N Engl J Med **338**, 548-550

Bruzzo, R., Veronesi, V., Gomes, D., Bicego, M., Duval, N., Marlin, S., Petit, C., D'Andrea, P., White, T. W. (2003)
Loss-of-function and residual channel activity of connexin26 mutations associated with non-syndromic deafness
FEBS Lett **533**, 79-88

Chaib, H., Lina-Granade, G., Guilford, P., Plauchu, H., Levilliers, J., Morgon, A., Petit, C. (1994)

A gene responsible for a dominant form of neurosensory non-syndromic deafness maps to the NSRD1 recessive deafness gene interval
Hum Mol Genet **3**, 2219-2222

Cohen-Salmon, M., Ott, T., Michel, V., Hardelin, J. P., Perfettini, I., Eybalin, M., Wu, T., Marcus, D. C., Wangemann, P., Willecke, K., Petit, C. (2002)
Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death
Curr Biol **12**, 1106-1111

Cryns, K., Orzan, E., Murgia, A., Huygen, P. L., Moreno, F., del, C., I, Chamberlin, G. P., Azaiez, H., Prasad, S., Cucci, R. A., Leonardi, E., Snoeckx, R. L., Govaerts, P. J., Van de Heyning, P. H., Van de Heyning, C. M., Smith, R. J., Van Camp, G. (2004)
A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness
J Med Genet **41**, 147-154

D'Andrea, P., Veronesi, V., Bicego, M., Melchionda, S., Zelante, L., Di Iorio, E., Bruzzone, R., Gasparini, P. (2002)
Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin26 alleles
Biochem Biophys Res Commun **296**, 685-691

Dahl, E., Manthey, D., Chen, Y., Schwarz, H. J., Chang, Y. S., Lalley, P. A., Nicholson, B. J., Willecke, K. (1996)
Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin
J Biol Chem **271**, 17903-17910

Dawid, I. B., Haynes, S. R., Jamrich, M., Jonas, E., Miyatani, S., Sargent, T. D., Winkles, J. A. (1985)
Gene expression in *Xenopus* embryogenesis
J Embryol Exp Morphol **89 Suppl**, 113-124

Denoyelle, F., Lina-Granade, G., Plauchu, H., Bruzzone, R., Chaib, H., Levi-Acobas, F., Weil, D., Petit, C. (1998)
Connexin 26 gene linked to a dominant deafness
Nature **393**, 319-320

Denoyelle, F., Weil, D., Maw, M. A., Wilcox, S. A., Lench, N. J., Allen-Powell, D. R., Osborn, A. H., Dahl, H. H., Middleton, A., Houseman, M. J., Dode, C., Marlin, S., Boulila-ElGaid, A., Grati, M., Ayadi, H., BenArab, S., Bitoun, P., Lina-Granade, G., Godet, J., Mustapha, M., Loiselet, J., El Zir, E., Abois, A., Joannard, A., Petit, C., . (1997)
Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene
Hum Mol Genet **6**, 2173-2177

Dumont, J. N. (1972)

Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals
J Morphol **136**, 153-179

Estivill, X., Fortina, P., Surrey, S., Rabionet, R., Melchionda, S., D'Agruma, L., Mansfield, E., Rappaport, E., Govea, N., Mila, M., Zelante, L., Gasparini, P. (1998)
Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness
Lancet **351**, 394-398

Forge, A., Marziano, N. K., Casalotti, S. O., Becker, D. L., Jagger, D. (2003)
The inner ear contains heteromeric channels composed of cx26 and cx30 and deafness-related mutations in cx26 have a dominant negative effect on cx30
Cell Commun Adhes **10**, 341-346

Gabriel, H., Kupsch, P., Sudendey, J., Winterhager, E., Jahnke, K., Lautermann, J. (2001)
Mutations in the connexin26/GJB2 gene are the most common event in non-syndromic hearing loss among the German population
Hum Mutat **17**, 521-522

Grifa, A., Wagner, C. A., D'Ambrosio, L., Melchionda, S., Bernardi, F., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Arbones, M., Monica, M. D., Estivill, X., Zelante, L., Lang, F., Gasparini, P. (1999)
Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus
Nat Genet **23**, 16-18

Guilford, P., Ben Arab, S., Blanchard, S., Levilliers, J., Weissenbach, J., Belkahlia, A., Petit, C. (1994)
A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q
Nat Genet **6**, 24-28

Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R., Marbaix, G. (1971)
Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells
Nature **233**, 177-182

Heathcote, K., Syrris, P., Carter, N. D., Patton, M. A. (2000)
A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis (MIM 148350)
J Med Genet **37**, 50-51

Holme, R. H. & Steel, K. P. (1999)
Genes involved in deafness
Curr Opin Genet Dev **9**, 309-314

Houseman, M. J., Ellis, L. A., Pagnamenta, A., Di, W. L., Rickard, S., Osborn, A. H., Dahl, H. H., Taylor, G. R., Bitner-Glindzicz, M., Reardon, W., Mueller, R. F., Kelsell, D. P. (2001)

Genetic analysis of the connexin-26 M34T variant: identification of genotype M34T/M34T segregating with mild-moderate non-syndromic sensorineural hearing loss
J Med Genet **38**, 20-25

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

Kelley, P. M., Harris, D. J., Comer, B. C., Askew, J. W., Fowler, T., Smith, S. D., Kimberling, W. J. (1998)

Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss
Am J Hum Genet **62**, 792-799

Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F., Leigh, I. M. (1997)

Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness
Nature **387**, 80-83

Kenna, M. A., Wu, B. L., Cotanche, D. A., Korf, B. R., Rehm, H. L. (2001)

Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss
Arch Otolaryngol Head Neck Surg **127**, 1037-1042

Kiang, D. T., Jin, N., Tu, Z. J., Lin, H. H. (1997)

Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene
Gene **199**, 165-171

Kikuchi, T., Kimura, R. S., Paul, D. L., Adams, J. C. (1995)

Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis
Anat Embryol (Berl) **191**, 101-118

Kudo, T., Ikeda, K., Kure, S., Matsubara, Y., Oshima, T., Watanabe, K., Kawase, T., Narisawa, K., Takasaka, T. (2000)

Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population
Am J Med Genet **90**, 141-145

Kupka, S., Braun, S., Aberle, S., Haack, B., Ebauer, M., Zeissler, U., Zenner, H. P., Blin, N., Pfister, M. (2002)

Frequencies of GJB2 mutations in German control individuals and patients showing sporadic non-syndromic hearing impairment
Hum Mutat **20**, 77-78

Kupka, S., Mirghomizadeh, F., Haug, T., Braun, S., Leistenschneider, P., Schmitz-Salue, C., Arold, R., Blin, N., Zenner, H. P., Pfister, M. (2000)
[Mutational analysis of the connexin26 gene in sporadic cases of moderate to profound deafness]
HNO **48**, 671-674

Lautermann, J., ten Cate, W. J., Altenhoff, P., Grummer, R., Traub, O., Frank, H., Jahnke, K., Winterhager, E. (1998)
Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea
Cell Tissue Res **294**, 415-420

Lee, M. J. & Rhee, S. K. (1998)
Heteromeric gap junction channels in rat hepatocytes in which the expression of connexin26 is induced
Mol Cells **8**, 295-300

Liu, X. Z., Xia, X. J., Ke, X. M., Ouyang, X. M., Du, L. L., Liu, Y. H., Angeli, S., Telischi, F. F., Nance, W. E., Balkany, T., Xu, L. R. (2002)
The prevalence of connexin 26 (GJB2) mutations in the Chinese population
Hum Genet **111**, 394-397

Lopez-Bigas, N., Olive, M., Rabionet, R., Ben David, O., Martinez-Matos, J. A., Bravo, O., Banchs, I., Volpini, V., Gasparini, P., Avraham, K. B., Ferrer, I., Arbones, M. L., Estivill, X. (2001)
Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment
Hum Mol Genet **10**, 947-952

Maestrini, E., Korge, B. P., Ocana-Sierra, J., Calzolari, E., Cambiaghi, S., Scudder, P. M., Hovnanian, A., Monaco, A. P., Munro, C. S. (1999)
A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families
Hum Mol Genet **8**, 1237-1243

Marlin, S., Feldmann, D., Blons, H., Loundon, N., Rouillon, I., Albert, S., Chauvin, P., Garabedian, E. N., Couderc, R., Odent, S., Joannard, A., Schmerber, S., Delobel, B., Leman, J., Journal, H., Catros, H., Lemarechal, C., Dollfus, H., Eliot, M. M., Delaunoy, J. L., David, A., Calais, C., Drouin-Garraud, V., Obstoy, M. F., Goizet, C., Duriez, F., Fellmann, F., Helias, J., Vigneron, J., Montaut, B., Matin-Coignard, D., Faivre, L., Baumann, C., Lewin, P., Petit, C., Denoyelle, F. (2005)
GJB2 and GJB6 mutations: genotypic and phenotypic correlations in a large cohort of hearing-impaired patients
Arch Otolaryngol Head Neck Surg **131**, 481-487

Marlin, S., Garabedian, E. N., Roger, G., Moatti, L., Matha, N., Lewin, P., Petit, C., Denoyelle, F. (2001)
Connexin 26 gene mutations in congenitally deaf children: pitfalls for genetic counseling

Arch Otolaryngol Head Neck Surg **127**, 927-933

Martin, P. E., Coleman, S. L., Casalotti, S. O., Forge, A., Evans, W. H. (1999)
Properties of connexin26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness
Hum Mol Genet **8**, 2369-2376

Marziano, N. K., Casalotti, S. O., Portelli, A. E., Becker, D. L., Forge, A. (2003)
Mutations in the gene for connexin 26 (GJB2) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30
Hum Mol Genet **12**, 805-812

Mese, G., Londin, E., Mui, R., Brink, P. R., White, T. W. (2004)
Altered gating properties of functional Cx26 mutants associated with recessive non-syndromic hearing loss
Hum Genet **115**, 191-199

Mhatre, A. N., Weld, E., Lalwani, A. K. (2003)
Mutation analysis of Connexin 31 (GJB3) in sporadic non-syndromic hearing impairment
Clin Genet **63**, 154-159

Mignon, C., Fromaget, C., Mattei, M. G., Gros, D., Yamasaki, H., Mesnil, M. (1996)
Assignment of connexin 26 (GJB2) and 46 (GJA3) genes to human chromosome 13q11-->q12 and mouse chromosome 14D1-E1 by in situ hybridization
Cytogenet Cell Genet **72**, 185-186

Palmada, M., Schmalisch, K., Bohmer, C., Schug, N., Pfister, M., Lang, F., Blin, N. (2006)
Loss of function mutations of the GJB2 gene detected in patients with DFNB1-associated hearing impairment
Neurobiol Dis **22**, 112-118

Park, H. J., Hahn, S. H., Chun, Y. M., Park, K., Kim, H. N. (2000)
Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss
Laryngoscope **110**, 1535-1538

Petit, C., Levilliers, J., Hardelin, J. P. (2001)
Molecular genetics of hearing loss
Annu Rev Genet **35**, 589-646

Rabionet, R., Gasparini, P., Estivill, X. (2000)
Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins
Hum Mutat **16**, 190-202

Richard, G., White, T. W., Smith, L. E., Bailey, R. A., Compton, J. G., Paul, D. L., Bale, S. J. (1998)

Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma
Hum Genet **103**, 393-399

Schneider, B., Teschner, M., Sudermann, T., Pikula, B., Lautermann, J. (2002)

Expression of gap junction proteins (connexin 26, 30, 32, 43) in normal mucosa, hyperkeratosis and carcinoma of the human larynx
ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec **64**, 324-329

Scott, D. A., Greinwald, J. H., Jr., Marietta, J. R., Drury, S., Swiderski, R. E., Vinas, A., DeAngelis, M. M., Carmi, R., Ramesh, A., Kraft, M. L., Elbedour, K., Skworak, A. B., Friedman, R. A., Srikumari Srisailapathy, C. R., Verhoeven, K., Van Gamp, G., Lovett, M., Deininger, P. L., Batzer, M. A., Morton, C. C., Keats, B. J., Smith, R. J., Sheffield, V. C. (1998)

Identification and mutation analysis of a cochlear-expressed, zinc finger protein gene at the DFNB7/11 and dn hearing-loss loci on human chromosome 9q and mouse chromosome 19
Gene **215**, 461-469

Shy, M. E., Siskind, C., Swan, E. R., Krajewski, K. M., Doherty, T., Fuerst, D. R., Ainsworth, P. J., Lewis, R. A., Scherer, S. S., Hahn, A. F. (2007)

CMT1X phenotypes represent loss of GJB1 gene function
Neurology **68**, 849-855

Skerrett, I. M., Di, W. L., Kasperek, E. M., Kelsell, D. P., Nicholson, B. J. (2004)

Aberrant gating, but a normal expression pattern, underlies the recessive phenotype of the deafness mutant Connexin26M34T
FASEB J **18**, 860-862

Smith, L. D., Xu, W. L., Varnold, R. L. (1991)

Oogenesis and oocyte isolation
Methods Cell Biol **36**, 45-60

Spicer, S. S. & Schulte, B. A. (1998)

Evidence for a medial K⁺ recycling pathway from inner hair cells
Hear Res **118**, 1-12

Stander, S., Stadelmann, A., Traub, O., Traupe, H., Metze, D. (2005)

[Erythrokeratoderma variabilis (EKV)]--a disorder due to altered epidermal expression of gap junction proteins
J Dtsch Dermatol Ges **3**, 354-358

Stauffer, K. A. (1995)

The gap junction proteins beta 1-connexin (connexin-32) and beta 2-connexin (connexin-26) can form heteromeric hemichannels

J Biol Chem **270**, 6768-6772

Tekin, M., Akar, N., Cin, S., Blanton, S. H., Xia, X. J., Liu, X. Z., Nance, W. E., Pandya, A. (2001)

Connexin 26 (GJB2) mutations in the Turkish population: implications for the origin and high frequency of the 35delG mutation in Caucasians
Hum Genet **108**, 385-389

Thonnissen, E., Rabionet, R., Arbones, M. L., Estivill, X., Willecke, K., Ott, T. (2002)

Human connexin26 (GJB2) deafness mutations affect the function of gap junction channels at different levels of protein expression
Hum Genet **111**, 190-197

Toth, T., Kupka, S., Haack, B., Riemann, K., Braun, S., Fazakas, F., Zenner, H. P., Muszbek, L., Blin, N., Pfister, M., Sziklai, I. (2004)

GJB2 mutations in patients with non-syndromic hearing loss from Northeastern Hungary
Hum Mutat **23**, 631-632

Wang, H. L., Chang, W. T., Li, A. H., Yeh, T. H., Wu, C. Y., Chen, M. S., Huang, P. C. (2003)

Functional analysis of connexin-26 mutants associated with hereditary recessive deafness
J Neurochem **84**, 735-742

Wenzel, K., Manthey, D., Willecke, K., Grzeschik, K. H., Traub, O. (1998)

Human gap junction protein connexin31: molecular cloning and expression analysis
Biochem Biophys Res Commun **248**, 910-915

White, T. W., Deans, M. R., Kelsell, D. P., Paul, D. L. (1998)

Connexin mutations in deafness
Nature **394**, 630-631

Wilcox, S. A., Saunders, K., Osborn, A. H., Arnold, A., Wunderlich, J., Kelly, T., Collins, V., Wilcox, L. J., McKinlay Gardner, R. J., Kamarinos, M., Cone-Wesson, B., Williamson, R., Dahl, H. H. (2000)

High frequency hearing loss correlated with mutations in the GJB2 gene
Hum Genet **106**, 399-405

Willecke, K., Jungbluth, S., Dahl, E., Hennemann, H., Heynkes, R., Grzeschik, K. H. (1990)

Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes
Eur J Cell Biol **53**, 275-280

Xia, A. P., Ikeda, K., Katori, Y., Oshima, T., Kikuchi, T., Takasaka, T. (2000)

Expression of connexin 31 in the developing mouse cochlea

Neuroreport **11**, 2449-2453

Xia, J. H., Liu, C. Y., Tang, B. S., Pan, Q., Huang, L., Dai, H. P., Zhang, B. R., Xie, W., Hu, D. X., Zheng, D., Shi, X. L., Wang, D. A., Xia, K., Yu, K. P., Liao, X. D., Feng, Y., Yang, Y. F., Xiao, J. Y., Xie, D. H., Huang, J. Z. (1998)
Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment
Nat Genet **20**, 370-373

Zeilinger, C., Steffens, M., Kolb, H. A. (2005)
Length of C-terminus of rCx46 influences oligomerization and hemichannel properties
Biochim Biophys Acta **1720**, 35-43

5.2. Verwendete Internetseiten:

Connexin deafness Homepage:

<http://www.crg.es/deafness/cx26mut.php>

Hear-it homepage:

<http://www.german.hear-it.org/page>

OMIM:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

Wikipedia

http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Connexon_and_connexin_structure.svg

5.3. Verwendete Bücher

Biochemie Jeremy M. Berg/John L. Tymoczko/Lubert Stryer (4. Auflage)

Lehrbuch der Physiologie Rainer Klinke und Stefan Silbernagel (3. Auflage)

Gray's Anatomy of the Human Body, 20th U.S. Edition)

6. Anhang

6.1. Publikationsverzeichnis

Palmada, M., Schmalisch, K., Bohmer, C., Schug, N., Pfister, M., Lang, F., Blin, N. (2006)

Loss of function mutations of the GJB2 gene detected in patients with DFNB1-associated hearing impairment
Neurobiol Dis **22**, 112-118

Haack, B.*, Schmalisch, K.*, Palmada, M., Bohmer, C., Kohlschmidt, N., Keilmann, A., Zechner, U., Limberger, A., Beckert, S., Zenner, H. P., Lang, F., Kupka, S. (2006)

Deficient membrane integration of the novel p.N14D-GJB2 mutant associated with non-syndromic hearing impairment
Hum Mutat **27**, 1158-1159

*first-shared authorship

6.2. Abstracts

Schmalisch, K., Palmada, M., Böhmer C., Kupka S., Pfister M., Blin N., Lang F. (2005)

Mutations in the GJB2 gene from patients with severe to profound hearing impairment cause functional defects of the connexin 26 protein
Pflugers Arch - Eur J Physiol [Suppl1] 449: S29, O06-3

Schmalisch K., Haack B., Böhmer C., Palmada M., Pfister M., Blin N., Lang F., Kupka S. (2004)

GJB2 mutations in patients with severe to profound hearing impairment
Pflugers Arch - Eur J Physiol [Suppl1] 447: S116, P20-4

6.3. Danksagung

Ich habe vielen Menschen zu danken, die zur Entstehung meiner Doktorarbeit beigetragen haben. Als erstes gilt mein Dank Professor Dr. med. Florian Lang, der mich in sein Institut aufnahm und mir ermöglicht hat zu forschen und diese Doktorarbeit entstehen zu lassen. Als nächstes gilt mein besonderer Dank Professor Christoph Böhmer und Professor Monica Palmada, die mich in ihr Labor aufnahmen, mir sehr viel gezeigt und beigebracht haben und mich in allem unterstützt haben, u.a. diese Doktorarbeit entstehen zu lassen. Birgitta Noll, Birgit Haack und Nicola Schug danke ich für die Bereitstellung und Anfertigung der RNA und ihre Hilfe.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Joachim Hald, der mich mit seiner Liebe immer unterstützt und für mich da ist und meiner Schwester Lena Schmalisch, meinen Freundinnen Karen Weidner, Monika Bunikic und Stefanie Schaal, die immer für mich da sind und auf die ich mich in jeder Situation verlassen kann. Danke von Herzen an alle.

6.4. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Kathrin Schmalisch

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsdatum: 25.09.1978

Geburtsort: Böblingen

Ausbildung

Seit Juni 2007	Facharztausbildung, Assistenzärztin Universitätsklinik für Neurochirurgie, Tübingen Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. M. Tatagiba
04/2000-10/2002	04/2000-10/2002 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Abschluss: Physikum
10/2002-05/2007	Fortsetzung und Abschluss des Studiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen Praktisches Jahr: 24.4.-13.8.2006 Wahlfach Neurochirurgie (UKT) 14.8.-7.10.2006 Innere Medizin, Universitätsklinikum Alicante, Spanien 7.10.-3.12.2006 Innere Medizin (UKT) 4.12.-25.3.2007 Allgemein Chirurgie (UKT) 10.05.2007 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 15.05.2007 Approbation zur Ärztin
2004-2007	Promotion: Physiologisches Institut Tübingen, Prof. Dr. med. F. Lang