

Aus dem
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Abteilung
Tropenmedizinische Grundlagenforschung
Leiter: Prof. R.D. Horstmann

**Vorkommen und Verteilung von *GJB2*-Mutationen
als Ursache angeborener Gehörlosigkeit
in Ghana**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Katrin Albrecht
aus Langen

Hamburg, 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Inhalt

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2. Einleitung	2
2.1. Hereditäre Gehörlosigkeit	2
2.2. Das <i>gap junction</i> -Protein Connexin 26	3
2.2.1. Aufbau von <i>gap junctions</i>	3
2.2.2. Funktion der <i>gap junctions</i>	5
2.2.3. <i>Gap junctions</i> in der Cochlea	6
2.2.4. Connexin 26	7
2.2.5. <i>GJB2</i> und Gehörlosigkeit	7
2.3. Bisher beschriebene <i>GJB2</i> -Mutationen	8
1.3.1. Rezessive <i>GJB2</i> -Mutationen	9
1.3.2. Dominante <i>GJB2</i> -Mutationen	10
1.3.4. DFNB1 beinhaltet neben <i>GJB2</i> - auch <i>GJB6</i> -Mutationen	10
2.4. Studiengebiet	11
1.4.1. Hauptursachen von Schwerhörigkeit in Ghana	12
3. Material und Methoden	13
3.1. Material	13
3.1.1. Geräte	13
3.1.2. Software	13
3.1.3. Enzyme, Kits	13
3.1.4. Standard-Reagenzien, Puffer und Lösungen	14
3.2. Probanden	15
3.2.1. Auswahlkriterien	16
3.2.2. körperliche Untersuchung und Audiometrie	17
3.3. Methoden	17
3.3.1. Entnahme und Transport der Blutprobe	17
3.3.2. DNA Extraktion aus peripheren Blutzellen	17
3.3.3. Synthetische Oligonukleotide	18
3.3.4. PCR	20

3.3.5. Restriktionsverdau	21
3.3.6. Elektrophorese	22
3.3.7. Sequenzierung	23
4. Ergebnisse	26
4.1. Häufigkeit der <i>GJB2</i> -Mutation R143W	26
4.2. Geografische Verteilung von R143W	27
4.3. Neue Mutationen in <i>GJB2</i>	28
4.4. Gesamtzahl der ermittelten <i>GJB2</i> -Mutationen	33
4.5. Geografische Verteilung aller ermittelten <i>GJB2</i> -Mutationen	34
5. Diskussion	36
5.1. Kritische Bewertung des Studienplans und der angewandten Methoden	36
5.1.1. Auswahl der Studienteilnehmer	36
5.1.2. Körperliche Untersuchung	37
5.1.3. Untersuchung des Exon 2 von <i>GJB2</i>	38
5.2. Diskussion der Ergebnisse	38
5.2.1. Auswirkungen von <i>GJB2</i> -Mutationen auf das Genprodukt Cx26	38
5.2.2. In dieser Studie ermittelte Mutationen	40
5.2.2.1. L79P	41
5.2.2.2. V178A	41
5.2.2.3. R184Q	42
5.2.2.4. A197S	42
5.2.2.5. I203K	43
5.2.2.6. L214P	43
5.2.3. Prävalenz von <i>GJB2</i> -Mutationen	43
5.2.4. Besondere <i>GJB2</i> -Mutationen in verschiedenen Populationen	46
5.2.5. Geografische Verteilung der <i>GJB2</i> -Mutationen innerhalb Ghanas	47
5.2.4. Gibt es einen Selektionsvorteil für <i>GJB2</i> -Mutationen?	48
6. Zusammenfassung	50
7. Literaturverzeichnis	51
8. Danksagung	63

9. Lebenslauf	64
10. Eidesstattliche Versicherung	65
11. Abkürzungen	66

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Prälinguale Gehörlosigkeit hat in der westlichen Welt eine Inzidenz von etwa 0,8 von 1000 Geburten und ist in über der Hälfte der Fälle genetisch bedingt, meist mit rezessiver Vererbung. Trotz großer genetischer Vielfalt sind bestimmte Mutationen des *GJB2* in vielen Populationen für die meisten Fälle von vererbter nicht-syndromischer neurosensorischer Gehörlosigkeit verantwortlich. Das auf dem Krankheitslocus DFNB1 liegende *GJB2* kodiert für Connexin 26, ein *gap junction*-Protein, das unter anderem in der Cochlea exprimiert wird. Es wurden bereits über 50 verschiedene *GJB2*-Mutationen identifiziert (Ballana et al. 2005).

In früheren Untersuchungen wurden stark schwankende Prävalenzen von DFNB1 assoziierter Schwerhörigkeit in verschiedenen Populationen beschrieben. Dies führte zur Diskussion über den Stellenwert des Mutationsscreenings im Rahmen der Frühdiagnostik kongenitaler Hörstörungen. Für das weitere Verständnis dieser rezessiv vererbten Erkrankung sowie eine eventuelle diagnostische Anwendung des Mutationsnachweises ist die Erhebung von Daten zur genetischen Epidemiologie in der Zielbevölkerung unerlässlich. Für Westafrika liegen bisher keine dementsprechenden Daten vor.

Ziel dieser Arbeit ist die Ermittlung der Prävalenz durch *GJB2*-Mutationen verursachter Gehörlosigkeit und der Vergleich mit den Prävalenzen in anderen Populationen. Desweiteren stellt sich die Frage nach regionalen Unterschieden, wie sie unter anderem in Europa bereits gefunden wurden (Lucotte und Mercier 2001). Hierfür soll bei Personen mit neurosensorischer, nicht-syndromischer Hörstörung aus allen Regionen Ghanas das kodierende Exon des *GJB2*-Gens auf Mutationen untersucht werden.

2. Einleitung

Eine der häufigsten neurosensorischen Erkrankungen des Menschen ist die Gehörlosigkeit. Sie kann sich aufgrund von genetischen Defekten, intrauterinen Infektionen oder Kinderkrankheiten prälingual, also vor der Sprachentwicklung manifestieren. Alternativ entsteht sie erst nach dem Erwerb der Sprache durch Lärmschädigung aus der Umwelt, Infektionen, vererbte Formen der Schwerhörigkeit oder den Alterungsprozess. Hörstörungen können dabei syndromisch sein, das heißt, sie sind mit anderen Symptomen assoziiert, oder sie treten isoliert als nicht-syndromische Gehörlosigkeit auf.

Der Anteil genetisch bedingter Defekte an der Schwerhörigkeit wird in der entwickelten Welt derzeit auf 60 Prozent geschätzt (Gasparini et al. 2000; Morton NE 1991). Dies beinhaltet sowohl monogene als auch multifaktorielle Erkrankungen. Insgesamt rechnet man hier bei etwa einer von 2000 Geburten mit einer genetisch bedingten angeborenen Schwerhörigkeit (Wilcox et al. 2000; Lefebvre und Van de Water 2000; Rabionet et al. 2000a).

2.1. Hereditäre Gehörlosigkeit

Das Spektrum der erblichen Formen der Schwerhörigkeit ist groß. Es werden hierbei die syndromischen Schwerhörigkeiten, welche mit weiteren klinischen Phänotypen einhergehen, von den nicht-syndromischen, also isoliert auftretenden Hörstörungen unterschieden.

Die syndromischen Formen nehmen einen Anteil von ungefähr 20-30% an den erblichen Formen der Schwerhörigkeit ein, diese verteilen sich auf bisher etwa 400 bekannte Syndrome wie zum Beispiel das Pendred-Syndrom mit begleitender Hypothyreose und Struma oder das Alport-Syndrom mit Augenfehlbildungen und interstitieller Nephritis. Der mit etwa 70-80% weitaus größere Teil der erblichen Gehörlosigkeit ist nicht mit zusätzlichen klinischen Merkmalen assoziiert und wird als "nicht-syndromisch" (NSHL, non syndromic hearing loss) bezeichnet (Morton NE 1991; Kenna et al. 2001; Kenneson et al. 2002). Schätzungsweise 75-80% der nicht-syndromischen genetischen Hörstörungen werden rezessiv vererbt (McKusick 1992; Ballana et al. 2005; Van Camp et al. 2005), 10-15% sind autosomal dominant und 2-3% zeigen ein x-chromosomales oder mitochondriales Vererbungsschema (Hutchin et al., 2001; Prezant et al. 1993).

Bisher sind mehr als 50 genetische Loci für autosomal dominante und mehr als 30 für autosomal rezessive Schwerhörigkeit kartiert worden oder die entsprechenden Gene wurden kloniert, wobei in manchen Fällen dasselbe Gen sowohl für die dominante als auch für rezessive Form verantwortlich ist. Eine ständig aktualisierte Zusammenstellung findet sich im Internet auf der *hereditary hearing loss homepage* (Van Camp et al. 2005). Die bisher bekannten Genloci sind über das gesamte menschliche Genom mit Ausnahme des Y-Chromosoms verteilt (Griffith und Friedmann, 1999). Lange erschwerte diese starke Heterogenität genetische Studien, da viele verschiedene genetische Ursachen der Gehörlosigkeit zu einem ähnlichen Phänotyp führen können (Van Camp et al. 1997).

Der erste Locus für rezessiv vererbte Gehörlosigkeit wurde durch Kopplungsanalyse zweier großer, isoliert lebender Familien tunesischer Herkunft identifiziert, die mehrere Generationen umfassten (Guilford et al. 1994a). Ihre Form der neurosensorischen Schwerhörigkeit wurde auf das Chromosom 13q11 kartiert, und das Gensymbol wurde nach dem Phänotyp und dem Vererbungsmuster NSRD1 (nonsyndromic recessive deafness) genannt. Die seit 1997 gebräuchliche Nomenklatur bezeichnet die Loci für nichtsyndromatische Gehörlosigkeit mit DFN für "Deafness, nonsyndromic", der vierte Buchstabe steht für den Vererbungsmodus, "A" für dominant, "B" für rezessiv, und eine darauffolgende Zahl dient der genauen Identifizierung. So werden also die Loci für autosomal rezessiv vererbte Gehörlosigkeit in der Reihenfolge ihrer Entdeckung DFNB1 (Guilford et al. 1994a), DFNB2 (Guilford et al. 1994b) und so weiter genannt. Die Loci für autosomal dominant vererbte, nicht-syndromische Gehörlosigkeit werden als DFNA1 (Léon et al. 1992), DFNA2 (Coucke et al. 1994) und so weiter bezeichnet, die X-chromosomalen Loci mit den drei Buchstaben DFN und einer darauffolgenden Zahl.

2.2. Das *gap junction* Protein Connexin 26

2.2.1. Aufbau von *Gap junctions*

Gap junctions wurden zuerst elektronenmikroskopisch als Bereiche dargestellt, in denen sich die äußeren Schichten der Zellmembran zweier benachbarter Zellen bis auf 2-4 nm annähern, während der normale interzelluläre Spalt etwa 20 nm beträgt. Es zeigte sich, dass in diesen Bereichen interzelluläre Kommunikation durch eine Ansammlung zellübergreifender Kanäle, die *gap junction*-Kanäle, stattfindet. Dabei kann eine *gap junction* aus mehreren hundert Kanälen bestehen.

Der einzelne *gap junction*-Kanal setzt sich aus zwei verbundenen Hemikanälen (Connexonen) zusammen und überspannt die Zellmembranen benachbarter Zellen. Jede dieser so kommunizierenden Zellen steuert ein Connexon bei, das aus einem Hexamer von sechs Connexin-Molekülen besteht (Abb. 1). Während homomere Connexone aus sechs identischen Connexinen bestehen, sind heteromere Connexone aus zwei oder mehr Arten von Connexinen zusammengesetzt. Homotypische Kanäle werden aus zwei identischen Hemikanälen gebildet, heterotypische aus zwei verschiedenen.

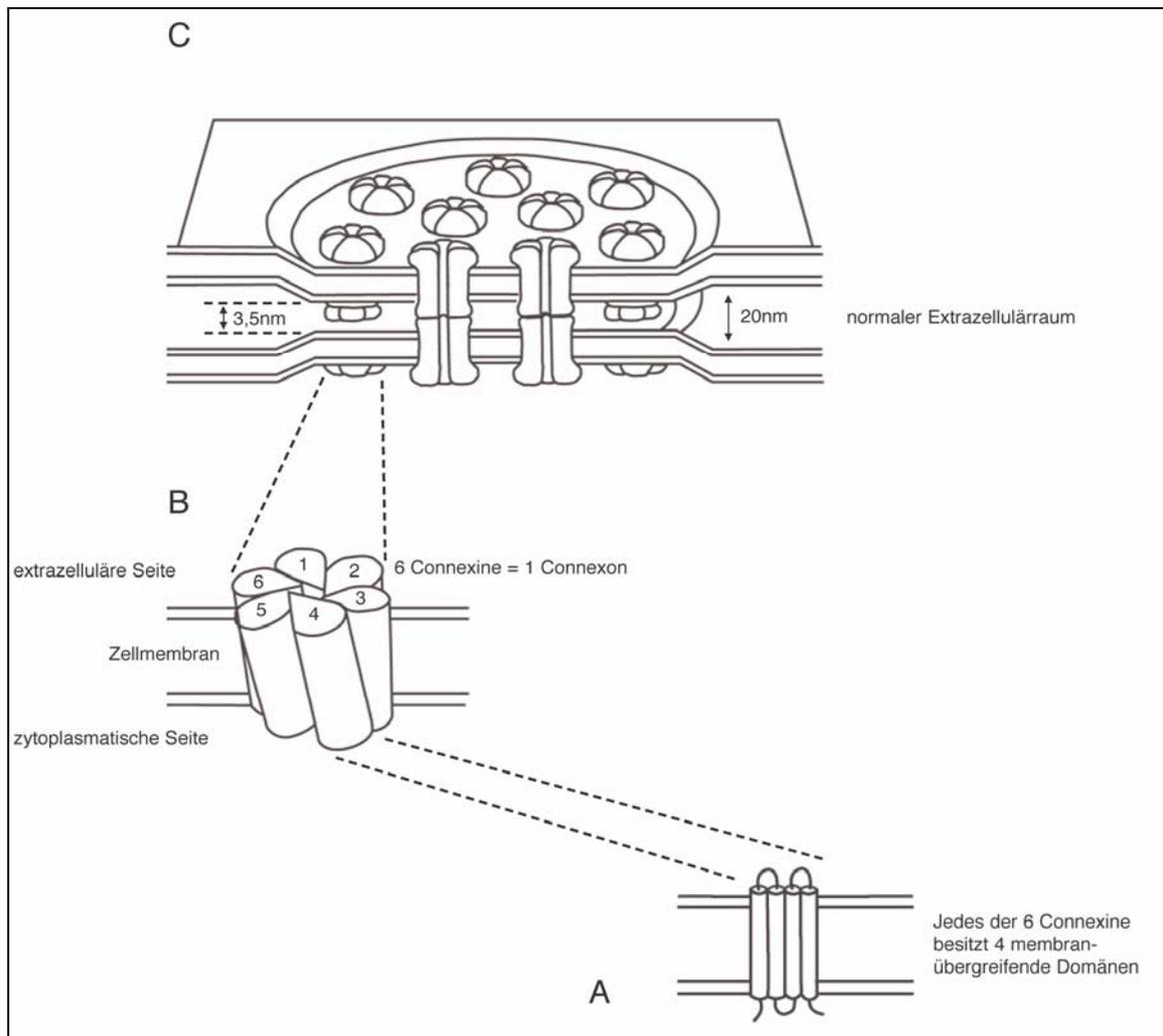


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus einer *gap junction*. nach Bruzzone et al. 1996

Die Protein-Untereinheiten, die Connexine (A), finden sich zu einer hexameren Struktur, dem Connexon (B) zusammen, das sich in die Plasmamembran einlagert. Die Connexone benachbarter Zellen bilden komplette interzelluläre Kanäle, die sich zu *gap junctions* zusammenlagern (C).

Bisher wurden mindestens 20 Subtypen humaner Connexine mit verschiedenem Molekulargewicht und gewebespezifischem Expressionsmuster beschrieben (Kelsell et al. 2001; Willecke et al. 2002). Es gibt zwei gebräuchliche Nomenklaturen für die Connexine. Die eine richtet sich nach der Molekülgröße, so hat zum Beispiel das Connexin 26 eine ungefähre Masse von 26 kDa, das Connexin 38 ungefähr 38 kDa. Eine andere Einteilung richtet sich nach Übereinstimmungen der Sequenz auf der Nukleotid- und Aminosäureebene und unterteilt die *gap junction*-Proteine in die Klassen alpha, beta und gamma. So wird zum Beispiel Connexin 43 alpha-1 *gap junction*-Protein genannt (*GJA1*), während Connexin 32 als beta-1 (*GJB1*) und Connexin 26 als beta-2 *gap junction*-Protein (*GJB2*) bezeichnet werden. Diese Nomenklatur betont damit, dass sich Connexin 32 und Connexin 26 in ihrer Struktur ähnlicher sind als jedes von ihnen dem Connexin 43 (Kumar und Gilula 1992).

2.2.2. Funktion der *gap junctions*

Gap junctions bilden ein komplexes System interzellulärer Kommunikation, in dem der Austausch von Elektrolyten, interzellulären Botenstoffen (second messenger) und Metaboliten eine bedeutende Rolle spielt (White und Bruzzone 1996, Nicholson et al. 2000). Sie unterscheiden sich von anderen Membrankanälen dadurch, dass sie zwei Zellen direkt miteinander verbinden und relativ unspezifisch sind. Die *gap junctions* besitzen eine gewisse Selektivität, die unter anderem auf der Molekülgröße beruht, so dass Moleküle, die kleiner als 1000 Da sind, wie z.B. Ionen und der second messenger cAMP passieren können, größere wie Proteine oder Nukleinsäuren jedoch nicht (Kumar et al. 1996). Ihre Permeabilität wird dabei zusätzlich durch unterschiedliche Faktoren wie z.B. das interzelluläre elektrische Potential, den pH-Wert, Kalziumspiegel und second messenger geregelt (Li et al. 1996, Nicholson et al. 2000). Die durch die verschiedenen Mitglieder der Connexinfamilie gebildeten Transmembrankanäle unterscheiden sich in ihrer Permeabilität für endogene Metabolite und auch fluoreszierende Farbstoffe (Goldberg et al. 1999). Dabei erschwert das Zusammenwirken von verschiedenen Connexinen in heteromeren und heterotypischen Kanälen die Aufklärung der komplexen Vorgänge der Signalübermittlung.

2.2.3. Gap junctions in der Cochlea

Mittlerweile wurden Mutationen in den Genen für Connexin 26 (Cx26), Connexin 30 (Cx30), Connexin 31 (Cx31), Connexin 32 (Cx32) und Connexin 43 (Cx43) als Ursache für Gehörlosigkeit gefunden, aber ein einziger Locus, DFNB1, ist für mindestens 50% dieser Art von Gehörlosigkeit verantwortlich (Maw et al. 1995; Rabionet et al. 2000a; Ballana et al. 2005).

Histologische Untersuchungen des Innenohrs der Ratte zeigten, dass sich Cx26 und Cx30 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 Typ I Fibrozyten nahe der Stria vascularis) und im Limbus spiralis nachweisen lassen, nicht jedoch als direkte Verbindung zwischen den sensorischen Haarzellen (Kikuchi et al. 1995; Lautermann et al. 1998). Das genaue Screening auf 13 verschiedene Connexine hat ergeben, dass nur Cx26 und Cx30 in diesen Geweben exprimiert werden (Forge et al. 2003). Zwar lassen sich auch Cx31 und Cx43 in der Cochlea nachweisen, sie finden sich jedoch in anderen Kompartimenten der lateralen Cochleawand (Forge et al. 2003).

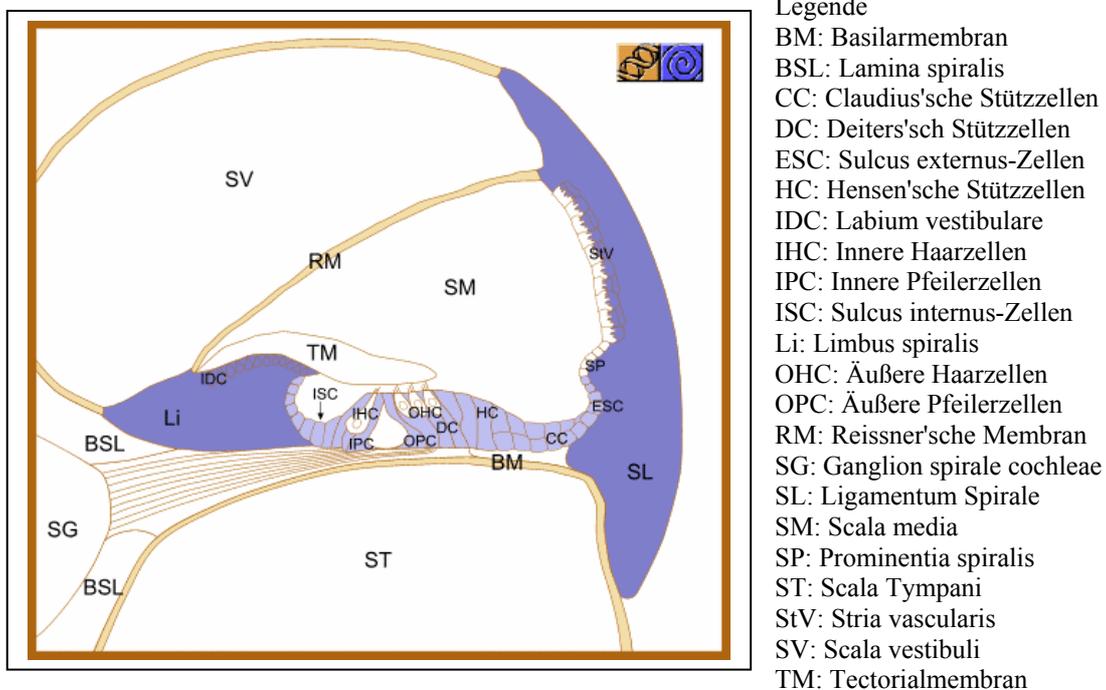


Abb. 2: Querschnitt durch die Cochlea der Ratte: blau angefarbt die Orte der Expression von Cx26 nach Lautermann et al. 1998

Über die genaue Funktion der verschiedenen *gap junctions* in der Cochlea wird noch diskutiert. Cx26 scheint maßgeblich am Kalium-Transport durch *gap junctions* zwischen äußeren Haarzellen und umgebenden nutritiven Zellen und Stützzellen im Corti'schen Organ beteiligt zu sein (Martin et al. 1999). Es wird daher angenommen, dass das Protein Einfluss auf die Generierung von cochleären Aktionspotentialen hat, die als Antwort auf Schallwellen hauptsächlich über das Verschieben von Kalium-Ionen entstehen. Durch *gap junctions* wird dabei die interzelluläre Diffusion von Ionen in die Stria vascularis gewährleistet, von wo aus Kalium aktiv zurück in die Endolymphe transportiert wird (Kikuchi et al. 2000, Rabionet et al. 2000a). Funktionstudien mit Cx26-Mutationen weisen jedoch darauf hin, dass diese zum Teil die Permeabilität für K⁺ Ionen nicht behindern, also auch Störungen im Transport anderer Metabolite des cochleären *gap junction* Netzwerks an der Entstehung von Gehörlosigkeit beteiligt sein dürften (Mese et al. 2004).

2.2.4. Connexin 26

Die genomische Struktur des Cx26 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 et al. 1997). Das eingeschobene Intron hat eine Länge von 3147 bp. Das Genprodukt Cx26 besteht aus 227 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 26 kDa. Es wird in der Haut, der Mamma lactans, der Placenta, dem Pancreas, den Hepatozyten, der Cochlea und im Myometrium des Uterus exprimiert (Kelsell et al. 1997; Lautermann et al. 1998).

Das Protein Cx26 besitzt wie die anderen *gap junction*-Proteine vier membranübergreifende Domänen (TM1-TM4), die durch eine intrazelluläre (IC2) und zwei extrazelluläre Schleifen (EC1 und EC2) verbunden sind, während sein N-terminales Ende (IC1) und das Carboxyl- Ende (IC3) intrazytoplasmatisch liegen (Abb. 1).

2.2.5. GJB2 und Gehörlosigkeit

Die wichtige Rolle, die die *gap junctions* durch Zellkommunikation bei der Gewebsdifferenzierung spielen, führte zum Bestreben, die einzelnen für Connexine kodierenden Gene genau zu lokalisieren. Nachdem das *GJB2* mittels Southern-Blot und hybrider Zelllinien bereits auf das Chromosom 13 kartiert worden war (Willecke et al.

1990; Hsieh et al. 1991), wurde die Lokalisation durch In-Situ-Hybridisierung auf Chromosom 13q11-q12 präzisiert (Mignon et al. 1996).

Damit waren sowohl der Taubheitslocus DFNB1 als auch *GJB2*, der Locus für das *gap junction*-Protein Cx26, auf das Chromosom 13q11-12 kartiert worden.

Kellsell et al. (1997) untersuchten eine Familie mit palmoplantarem Keratoderma (PPK) und gleichzeitiger autosomal dominant vererbter Gehörlosigkeit. Bei der Haplotypanalyse wurde der Phänotyp der Hautkrankheit auf 13q11-12 kartiert, wo bereits die beiden Krankheitsloci DFNB1, DFNA3 (Chaib et al. 1994) und der Locus für *Clouston hidrotic ectodermal dysplasia (HED)* lagen. Als Kandidatengen für die beiden Hautkrankheiten kam das auch auf 13q11-12 gelegene, Cx26 kodierende *GJB2* in Frage, da das Cx26 in der suprabasalen Schicht der Epidermis nachgewiesen worden war. Eine die Hautkrankheiten verursachende Mutation wurde in *GJB2* nicht gefunden, jedoch zeigte sich bei zwei gehörlosen Familienmitgliedern die Mutation M34T. Die beschriebene Mutation erwies sich später als nicht ausreichend, eine dominant vererbte Schwerhörigkeit zu erklären (Kelley et al. 1998, Griffith 2001). Sie regte aber zur Analyse einer großen Familie mit an 13q11-12 gekoppelter, autosomal rezessiver Schwerhörigkeit (Brown et al. 1996) an, in der die betroffenen Familienmitglieder homozygot für eine Nonsense-Mutation (W77X) waren. Auch bei zwei weiteren Familien mit rezessiv vererbter Gehörlosigkeit wurden jeweils homozygote Nonsense-Mutationen in *GJB2* beschrieben (Kellsell et al. 1997).

2.3. Bisher beschriebene *GJB2*-Mutationen

Die Identifizierung von Mutationen im für das *gap junction*-Protein Cx26 kodierenden *GJB2* als eine Ursache der autosomal-rezessiv vererbten NSHL hat eine Reihe von Studien nach sich gezogen. Trotz der genetischen Heterogenität der hereditären Gehörlosigkeit mit bisher über 80 verantwortlichen Genen hat sich gezeigt, dass in vielen Populationen Mutationen in *GJB2* für bis zu 50% der autosomal-rezessiv vererbten sensorineuralen NSHL verantwortlich sind (Denoyelle et al. 1997; Nance 2003). Schätzungen zur Prävalenz der *GJB2*-Mutationen bei sporadischen Fällen variieren, man geht davon aus, dass sie hier auch 10-30% der NSHL ausmachen (Estivill et al. 1998; Lench et al. 1998). Eine ansehnliche Anzahl von bereits über hundert Cx26 Mutationen wurde gefunden, von denen die Mehrzahl einem autosomal rezessiven Vererbungsmuster folgt. Eine ständig

aktualisierte Zusammenstellung findet sich im Internet auf der *Connexin-deafness Homepage* (Ballana et al. 2005).

Bei der Kurzschreibweise der Mutationen steht der erste Buchstabe für die Aminosäure der Wildtypsequenz, der zweite für die stattdessen mutationsbedingt kodierte Aminosäure und die Ziffer dazwischen für die Position in der Aminosäurekette. So bezeichnet die Abkürzung R143W eine Mutation, bei der an Position 143 der Aminosäuresequenz das Arginin (R) durch Tryptophan (W) ersetzt ist. Im Falle einer Deletion oder Insertion innerhalb einer Sequenz sich wiederholender Nucleotide wird die am weitesten in Richtung 3'-Ende liegende Position zur Beschreibung der Mutation gewählt (Antonarakis 1998). So ist die unter den *GJB2*-Mutationen in Nordamerika und Europa häufigste Mutation, eine Deletion eines einzelnen Guanins aus eine Sequenz von sechs Guaninen, bekannt als 35delG (Carrasquillo et al. 1997).

2.3.1. Rezessive *GJB2*-Mutationen

Die durch Mutationen in *GJB2* verursachte rezessiv vererbte Schwerhörigkeit ist meist vollkommen oder schwer, kann jedoch in seltenen Fällen im Schweregrad sogar innerhalb einzelner Familien bemerkenswert variieren (Denoyelle et al. 1999; Lerer et al. 2001; Murgia et al. 1999). Es hat sich gezeigt, dass homozygote Träger einer einzigen *GJB2*-Mutation eine stärkere Hörminderung zeigen als die zusammengesetzt- (*compound*) Heterozygoten mit zwei verschiedenen Cx26-Mutationen. Weiterhin bewirken Nonsense-Mutationen, die zum Strangabbruch führen, im Allgemeinen schwerere klinische Ausprägungen als Missense-Mutationen (Cryns et al. 2004; Janecke et al. 2002). Obwohl die autosomal rezessiv vererbte Gehörlosigkeit in ihrem Ausprägungsgrad meistens stabil bleibt, ist in Einzelfällen eine Progression beschrieben worden (Denoyelle et al. 1999; Cohn et al. 1999). Der Beginn der Schwerhörigkeit ist fast immer prälingual, aber nicht zwingend schon kongenital. So ist es möglich, dass das Gehör bei der Geburt noch normal funktioniert und die Schwerhörigkeit während der ersten Lebensmonate plötzlich auftritt oder schnell fortschreitet (Orzan et al. 1999; Green et al. 2000).

2.3.2. Dominante *GJB2*-Mutationen

Unter den *GJB2*-Mutationen finden sich auch einige mit autosomal dominantem Vererbungsmuster. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei *GJB2* nicht nur um den Genort für nicht-syndromische, autosomal-rezessiv vererbte Gehörlosigkeit, DFNB1, handelt, sondern dass gleichzeitig auch eine dominante Form der autosomal vererbten Gehörlosigkeit, DFNA3 (Chaib et al. 1994), durch Mutationen in *GJB2* entstehen kann. Die für DFNA3 beschriebenen Phänotypen reichen von leichter Schwerhörigkeit bis zu vollständiger Gehörlosigkeit und einige zeigen Syndrome mit Hauterkrankungen wie dem palmoplantaren Keratoderm, dem Vohwinkel-Syndrom und der Keratitis-Ichthyosis-Gehörlosigkeit (Heathcote et al. 2000; Richard et al. 1998+2002; Maestrini et al. 1999). Sicher nicht-syndromisch dominant scheinen neben der schon früh beschriebenen Mutation W44C (Denoyelle et al. 1998) nur wenige *GJB2*-Mutationen zu sein (Ballana et al. 2005).

2.3.3. DFNB1 beinhaltet neben *GJB2*- auch *GJB6*-Mutationen.

In einer Vielzahl von Studien zu den *GJB2*-Mutationen zeigte sich, dass es eine hohe Anzahl von Patienten mit nur einem mutierten Allel gibt. Auch ausführliches Screening der gesamten codierenden Region (die komplett in Exon 2 enthalten ist) sowie des Exon 1 und *splice-sites* ergaben bei 10-50% der Gehörlosen mit mindestens einer *GJB2*-Mutation keinerlei Mutationen des zweiten Allels. Eine Ursache fand sich bei Familien, die eine Kopplung mit dem Locus DFNB1 zeigten, in einer neuen Art von Mutationen, bei denen es sich um Deletionen von über 300kb handelt. Diese Deletionen beeinflussen das *GJB2* nicht, führen aber zu einem Strangabbruch beim benachbarten *GJB6*, dem kodierenden Gen für das *gap junction* Protein Cx30 (Lerer et al. 2001; del Castillo et al. 2002; Pallares-Ruiz et al. 2002). Die meisten dieser Deletionen wurden bei heterozygot von *GJB2*-Mutationen betroffenen Probanden gefunden und begleiten die einzelne Mutation *in trans*. Inzwischen wurde nachgewiesen, dass es sich in allen beschriebenen Fällen um die gleiche Deletion von 342kb, genannt del(*GJB6*-D13S1830), handelt (del Castillo et al. 2003). Damit ist auch bestätigt, dass der Locus DFNB1 zwei Gene für *gap junction*-Proteine, nämlich *GJB2*, kodierend für Cx26 sowie *GJB6*, kodierend für Cx30, umfasst. Zusätzliche Punktmutationen, die zu nicht-syndromischer, autosomal-rezessiver Gehörlosigkeit führen, haben sich im *GJB6* bisher nicht gefunden, das Cx30 wurde aber bereits mit der dominanten Form der Schwerhörigkeit DFNA3 in Zusammenhang gebracht (Grifa et al. 1999, Kelley et al. 1999).

2.4. Studiengebiet

Ghana hat in Nord-Süd-Richtung eine Ausdehnung von rund 700 km und eine maximale Breite von 450 km von Ost nach West. Es finden sich drei Haupt-Landschaftsformationen: die schmale Küstenebene im Süden, daran grenzend die Regenwaldzone und im Norden des Landes die Savanne, die erheblich weniger Niederschlag aufweist als der Rest des Landes und bereits der Sahel-Zone zugerechnet wird.

In Ghana leben viele Volksgruppen zusammen. Eine genaue Einteilung in ethnische Gruppen ist kaum möglich, man kann aber die Sprachen zwei übergeordneten Gruppen zuordnen: die Kwa-Sprachen im Süden und die Gur-Sprachen im Norden. Auch bei den Religionen zeigt sich ein Unterschied je nach geografischer Lage. Zusätzlich zu den afrikanischen Religionen sind rund 40% der Ghanaer Christen, 10% bekennen sich zum Islam. Die islamische Minderheit ist vor allem in den nördlichen Regionen zu finden.

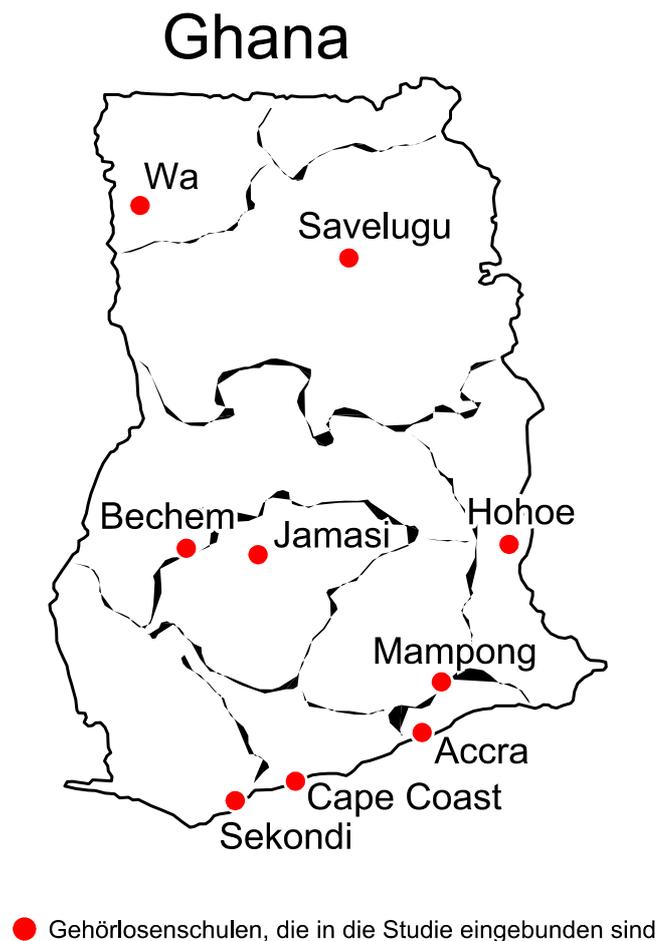


Abb. 3 Studiengebiet mit den teilnehmenden Schulen

2.4.1. Hauptursachen von Schwerhörigkeit in Ghana

Die Prävalenz kindlicher Hörstörungen hängt deutlich vom Stand der medizinischen Versorgung im jeweiligen Land ab und schwankt gegenwärtig zwischen 1:1000 und 6:1000.

In der westlichen Welt wird eine Prävalenz kindlicher Hörstörungen von 1-2:1000 angenommen (Hayes et al. 1999, Wessex Universal Neonatal Hearing Screening Trial Group 1998). In Entwicklungsländern ist von deutlich höheren Prävalenzen auszugehen. In Sierra Leone liegt die Prävalenz schwerer Hörstörungen bei 5 bis 15-jährigen Kindern bei 4:1000 (Seely et al. 1995), in einer in China durchgeführten Studie gar bei 7:1000 (Newton et al. 1999).

In einer zwischen 1979 und 1984 durchgeführten Studie am Komfo Anokye Teaching Hospital in Ghana (Brooby 1988) wurden alle 105 in dem Zeitraum behandelten Schulkinder mit neurosensorischer Gehörlosigkeit erfasst. 27 Prozent der Kinder litten unter angeborener Gehörlosigkeit. Im Einzelnen waren 21 Prozent der Fälle idiopathisch, die anderen sechs Prozent durch Röteln der Mutter während der Schwangerschaft oder Kernikterus erklärbar. Von den 73 Prozent der erworbenen Gehörlosigkeit entstand der größte Teil durch Masern, die anderen wurden durch Mumps, Meningitis, Tetanus oder Asphyxie verursacht oder wurden nach Fieberkrämpfen ungeklärter Ätiologie erstmals diagnostiziert.

In Adamarobe, einem Dorf im Osten Ghanas, das schon lange für seine außerordentlich hohe Prävalenz von rezessiv vererbter NSHL bekannt war (David et al. 1971), wurde die GJB2-Mutation R143W als Ursache für Gehörlosigkeit bei 21 gehörlosen Personen aus 11 Familien gefunden (Brooby et al. 1998). Alle heterozygot betroffenen Familienmitglieder wiesen ein normales Hörvermögen auf. Bei den hier untersuchten Familien variierten die Haplotypen erheblich zwischen den einzelnen Familien, was darauf hinweist, dass die Mutation vor mindestens 60 Generationen entstand und die Dorfgemeinschaft seitdem sehr stabil geblieben ist.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Thermomixer 5436 (Eppendorf)
Zentrifuge 5414C (Eppendorf)
Zentrifuge 4 K 10 (Sigma)
Chromabond Vakuumkammer (Macherey – Nagel)
Gene Assembler Plus (Pharmacia LBK)
Spektralphotometer (Pharmacia)
DNA Thermal Cycler TC1 (Perkin Elmer)
T3 Thermocycler (Biometra)
TRIO-Thermoblock Vers.2.4.2 (Biometra)
Agarose-Gelelektrophorese
UV-Flächenstrahler (Konrad Bender)
Videoprinter (Sony)
Membranfilter (Schleicher + Schuell)
ABI 373A DNA Sequencer (Applied Biosystems, ABI)
ABI PRISM 377 DNA Sequenzer (Applied Biosystems, ABI)
Portable Audiometer AD27 (Intracoustics)
Portable Audiometer AS7 (Intracoustics)

3.1.2. Software

„ABI Prism™ 377XL Collection 2.0“ ©1993-96 Perkin Elmer Corp.
„Sequencing Analysis 3.2“ ©1989-1998 PE Applied Biosystems
„Sequence Editor v1.0.3“ ©1992 Applied Biosystems Inc.

3.1.3. Enzyme, Kits

Taq-DNA- Polymerase (Pharmacia)
Nci I (Biolabs)

Desoxyribonukleotide (dNTPs) (AGS Hybaid)

100bp-Leiter (Pharmacia)

High Pure™ PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim)

Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Biosystems)

NucleoSpin Bood L Säulen (Macherey – Nagel)

3.1.4. Standard-Reagenzien, Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei den hier und später angegebenen Reagenzien um wässrige Lösungen. Die Chemikalien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), Boehringer (Mannheim), Sigma (St.Louis, USA), Merck (Darmstadt) und BioRad (München) bezogen.

DNA-Auftragspuffer 6fach konzentriert:

0,1% Bromphenolblau (3,3', 5,5'-Tetrabromphenolsulfophthalein)

0,1% Xylen Cyanol FF

40% Saccharose

Lagerung bei 4°C

Ethidiumbromid Stammlösung:

10 mg Ethidiumbromid / ml ddH₂O

Laufpuffer TBE 10fach konzentriert:

108g Tris-base

55g Borsäure

40ml 0,5M EDTA pH 8,0

ad 1000ml ddH₂O

Lagerung bei Raumtemperatur

TE-Puffer 10fach konzentriert:

5ml 100mM Tris-HCl pH 8,0

200µl 0,5M EDTA

ad 50ml ddH₂O

3.2. Probanden

Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission der „School of Medical Sciences of the University of Science and Technology, Kumasi, Ghana“ angenommen.

Das untersuchte Kollektiv bestand aus Schülern mit neurosensorischer Schwerhörigkeit unbekannter Genese der Klassen P1 bis P6 aus 9 Schulen für Gehörlose, die in 9 der 10 Provinzen Ghanas gelegen sind. 379 Schüler oder, wenn sie unter 16 Jahre alt waren, die Eltern oder deren Vertreter, willigten schriftlich in die Blutentnahme und die Studie ein. Dabei dienten, wenn nötig, die Lehrer als Übersetzer. 14 Verwandte ersten Grades wurden ausgeschlossen, so dass 365 Individuen in die Auswertung eingingen. Achtzig der Schüler stammten aus der *Ashanti Region*, 28 aus *Brong Ahafo*, 36 aus der *Central Region*, 25 aus der *Eastern Region*, 47 aus *Greater Accra*, 27 aus der *Northern Region*, 14 aus *Upper East*, 12 aus *Upper West*, 43 aus der *Volta Region*, und 53 aus der *Western Region*.

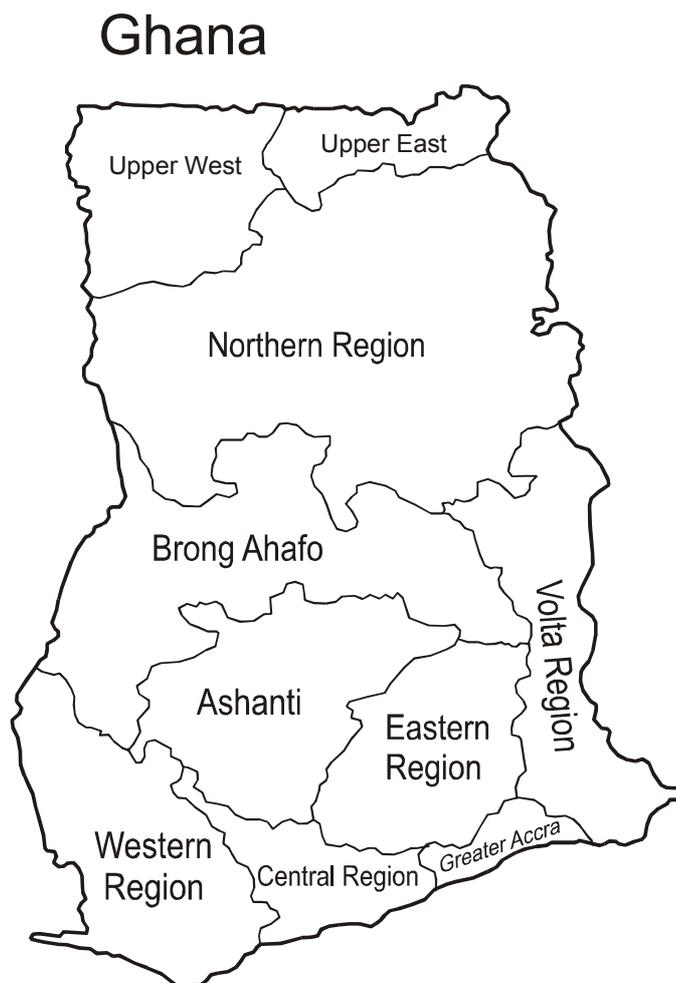


Abb.4: Studiengebiet mit den zehn Provinzen

Es wurden Daten über das Alter, das Geschlecht, den Geburtsort der Schüler sowie die Hörfähigkeit ihrer Verwandten ersten Grades erhoben. Dabei wurde jede verfügbare Informationsquelle genutzt, einschließlich der von den Schulen bei der Einschulung angelegten Dokumentationsbögen, der Eltern, Lehrer, Freunde, älteren Geschwister sowie der Hausmütter. Auch hier dienten die Lehrer als Übersetzer. Die Schüler oder ihre Aufsichtspersonen wurden um die Erlaubnis gebeten, die Testergebnisse zum Zwecke der Veranlassung von genetischer Beratung an die Lehrer weiterzuleiten.

3.2.1. Auswahlkriterien

Untersucht wurden alle Kinder der Klassen P1 bis P6, sofern die Gehörlosigkeit innerhalb der ersten zwei Lebensjahre diagnostiziert worden war. Ausgeschlossen wurden Schüler, die aus Adamarobe stammen, da diese bereits in einer vorangegangenen Studie untersucht worden waren. Die Auswahlkriterien waren

- 1) keine anderen von den Eltern oder deren Vertretern geschilderten offensichtlichen exogenen Ursachen für die Gehörlosigkeit wie perinatale Schädigung, Meningitis, Mumps, Masern, Fieberkrämpfe oder zerebrale Malaria
- 2) fehlender Nachweis für eine syndromische Form der Gehörlosigkeit, belegt durch die körperliche Untersuchung,
- 3) Ergebnisse bei der Audiometrie, die für eine Neurosensorische Form von Gehörlosigkeit sprechen, wie z.B. ein Unterschied zwischen Luftleitung und Knochenleitung von weniger als 10dB.

Für die Herkunft der Probanden wurden der Geburtsort sowie der zugehörige Distrikt und die Region festgehalten. Wenn mehrere Geschwister die Auswahlkriterien erfüllten, wurde nur das älteste Geschwisterkind in die Studie eingeschlossen.

Im zweiten Teil der Studie, der Suche nach weiteren Mutationen in *GJB2*, wurden aus den bisher untersuchten Schülern diejenigen ausgewählt, die heterozygot für R143W waren oder bei denen diese Mutation gar nicht nachgewiesen wurde.

Bei denjenigen, bei denen in diesem Abschnitt der Studie neue Mutationen entdeckt wurden, wurden dann zusätzlich möglichst viele Familienangehörige untersucht.

3.2.2. Körperliche Untersuchung und Audiometrie

Die körperliche Untersuchung zum Ausschluss syndromischer Formen von vererbter Gehörlosigkeit wurden von Herrn Geoffrey K. Amedofu, MD, der School of Medical Sciences, University of Science and Technology, Kumasi, Ghana durchgeführt. Frau Paulina Asante aus der Abteilung für HNO des Komfo Anokye Teaching Hospital untersuchte mittels Otoskopie Gehörgänge und Trommelfelle auf sichtbare Ursachen für Schwerhörigkeit oder Gehörlosigkeit. Die Form der Schwerhörigkeit ermittelten dann Herr Geoffrey K. Amedofu, MD und Frau Grace Ocansey, auch aus der Abteilung für HNO des Komfo Anokye Teaching Hospital mit tragbaren Audiometern der Firma „Intracoustics“, Modelle AD27 und AS7

3.3. Methoden

Die Methoden wurden direkt oder modifiziert aus der im einzelnen angegebenen Literatur oder folgenden Handbüchern entnommen: Sambrook, 1989; Mertes, 1997.

3.3.1. Entnahme und Transport der Blutprobe

Es wurden jedem Probanden höchstens 3 ml Blut mit einem Butterfly-System in EDTA Monovetten (Sarstedt) entnommen, hierbei half mir Frau Paulina Asante. Zur Konservierung für den Transport und die Aufbewahrung wurden die Proben mit der jeweils gleichen Menge 8M Urea vermischt. Der EDTA-Zusatz wurde ausgewählt, da im Vergleich von verschiedenen Methoden zur DNA-Extraktion aus Heparin-, Citrat- und EDTA-Vollblut mit Harnstoff die DNA-Ausbeute hier am größten war. Während des Transportes von den Schulen nach Kumasi sowie von Kumasi nach Hamburg wurden die Proben ungekühlt gelagert, die verbleibende Zeit waren sie auf 4 °C gekühlt.

3.3.2. DNA Extraktion aus peripheren Blutzellen

Die DNA-Extraktion erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden.

Ein Teil erfolgte nach folgendem Protokoll (modifiziert nach Gelhaus et al. 1995): Zunächst wurden 150 µl Harnstoffblut in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Zur Lyse der Leukozyten wurden die Proben mit 200 µl 0,2M NaOH, 10% SDS, versetzt und nach

guter Durchmischung durch Rütteln bei 68°C 10 Min. inkubiert. Dann wurden 150 µl 3M Kaliumacetat pH5,5 hinzugegeben, alles gut gemischt und 3 Min. auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Tube für 5 Min. bei 16000g zentrifugiert. Der 400 µl messende wässrige Überstand enthielt nun die genomische DNA und wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Nach Mischung mit 200 µl 0,9M NaOH wurde zur DNA-Extraktion 600 µl Chloroform dazugeben, und alles gut vermischt. Nach 5 Min. Zentrifugieren wurde 500 µl Überstand in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt, zur Fällung der DNA 1ml 98% Ethanol hinzugefügt und erneut 15 Min. zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, das verbliebene Pellet zweimal mit 1ml 70% Ethanol gewaschen und bei Zimmertemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl ddH₂O aufgenommen.

Etwa zwei Drittel der DNA Extraktion erfolgte mittels der Macherey – Nagel Chromabond Vakuumkammer und NucleoSpin Bood L Säulen von Macherey – Nagel. Benutzt wurden die mitgelieferten Reagenzien und das Protokoll für die Isolation von genomischer DNA aus Vollblut, wobei das 1:1 Blut- Harnstoff Gemisch wie Vollblut behandelt wurde. Dabei wurden zunächst die zellhaltigen Blutbestandteile lysiert und dann das Lysat auf die NucleoSpin-Säule gegeben. Durch Unterdruck wurde die Flüssigkeit durch eine Membran gesogen, an die nur spezifisch DNA bindet. In weiteren Schritten wurden dann Protein- und Zellreste ausgewaschen und danach die an die Säulenmembran gebundene DNA gelöst.

Nach der DNA Extraktion aus dem 1:1 Harnstoff-Vollblut Gemisch wurde die DNA im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.3.3. Synthetische Oligonukleotide

Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide (Primer für die Sequenzierung) wurden mit dem Gene Assembler Plus (Pharmacia) von der Arbeitsgruppe Biochemie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, Hamburg, nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Überschüssiges Ammoniak wurde über Nacht bei Raumtemperatur verdampft.

Die Konzentration der so gewonnenen Oligonukleotide wurde spektralphotometrisch bestimmt, indem jeweils 1µl 1:100 mit Aqua bidest. verdünnt wurde und in eine Quarzküvette gefüllt wurde. Eine zweite Küvette wurde als Referenzprobe mit reinem Aqua bidest. gefüllt, beide in ein Spektralphotometer gestellt und die optische Dichte, OD, bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Da DNA im Gegensatz zu Wasser Licht

dieser Wellenlänge gut absorbiert, verhält sich in diesem Bereich die Stärke der Absorption proportional zum DNA-Gehalt der Lösung. Zur Berechnung der aktuellen DNA-Konzentration diene folgende Formel:

$$\frac{OD_{260} \times 100 \times 33}{1000} = y$$

y = Konzentration der DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Mit folgender Formel wurde der Verdünnungsfaktor Z ermittelt, der zu einer Konzentration von 20 pmol/ μl führt:

$$y / 2X = Z$$

X in μg entspricht dabei der Masse von 10 pmol eines Oligonucleotids der Länge N.

N = Länge des Oligonucleotids	X in μg
17-19	0,06
20-22	0,07

Primersequenzen

Cx26-A1	5'- TCT TTT CCA GAG CAA ACC GC - 3'
Cx26-B1 (rev.)	5'- GGG CAA TGC GTT AAA CTG GC - 3'
Cx26-B2	5'- CCA GGC TGC AAG AAC GTG TG - 3'

Die Sequenzen der Primer wurden direkt von Kelsell et al. (1997) übernommen. Durch die Kombination der Primer B1 und B2 entsteht dabei ein 521bp langes Amplifikat, das die gesuchte R143W Mutation enthält und sich gut für den Nachweis derselben durch den unten beschriebenen Restriktionsverdau eignet. Kombiniert man B1 mit A1 entsteht ein 683 bp langer DNA Strang, der 12 bp der 5' -Region und das ganze Cx26 Gen bis auf 5 bp am 3'-Ende enthält und als Grundlage für die Sequenzierung zum Nachweis anderer *GJB2* Mutationen diene.

3.3.4. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur spezifischen Vervielfältigung einer definierten DNA-Sequenz aus einem heterologen DNA-Gemisch (Saiki et al. 1988). Sie besteht aus aufeinanderfolgenden Temperaturzyklen mit jeweils drei Schritten. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die DNA-Doppelstränge durch eine Temperatur von über 90°C voneinander getrennt. Beim anschließenden Absenken der Temperatur binden kurze, als Primer bezeichnete DNA-Oligonukleotide spezifisch an komplementäre Sequenzen der denaturierten DNA, die die zu amplifizierende DNA-Region einrahmen (Annealing). Im dritten Schritt wird, ausgehend von den Primern und mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase sowie der vier Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP, die Synthese neuer DNA-Stränge gestartet. Dieser dritte Schritt wird Extension genannt. Die neu synthetisierten DNA-Stränge dienen in den folgenden Zyklen als Matrizen für die weitere DNA-Synthese. Durch die zyklische Wiederholung dieser drei Schritte entsteht eine nahezu exponentielle Vervielfältigung (Amplifikation) der Zielsequenz, deren Länge dem Abstand zwischen den Primern entspricht.

Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes:

5,0 µl 10x PCR-Puffer

1µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10mM)

1µl Primer B1 (10 pmol/µl)

1µl Primer B2 (10 pmol/µl)

0,25 µl Taq Polymerase (5U/µl)

1µl Matrizen-DNA (0,05-0,15 µg DNA/µl)

der Ansatz wurde mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt.

Als Negativkontrolle zum Ausschluss von Kontamination durch Fremd-DNA wurde bei jeder PCR ein komplettes Reaktionsgemisch ohne DNA mitgeführt.

Die Amplifizierung eines 521 Basen langen Stückes fand zum Teil im Perkin Elmer DNA Thermal Cycler TC1 und zum Teil im Biometra TRIO-Thermoblock Vers.2.4.2 © Biotron 1993 statt. Dabei wurde folgendes Programm verwendet:

1. Erste Denaturierung bei 96°C für 5 Min.
2. 35 Zyklen mit
 - a) Denaturierung bei 96°C für 30 Sek.
 - b) Primeranlagerung bei 60°C für 1 Min.
 - c) Extension bei 72°C für 1 Min. 30 Sek.
3. abschließende Extension bei 72°C für 10 Min.

Um zu kontrollieren, ob die Amplifikation erfolgreich verlaufen ist, wurden jeweils 3-5 µl des PCR-Produktes auf ein 1,6%iges Agarosegel aufgetragen. Die Aufbewahrung des PCR Produktes erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

3.3.5. Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die DNA-Moleküle durch Spaltung von Phosphordiesterbindungen innerhalb definierter Sequenzbereiche schneiden. Diese Restriktionsschnittstellen sind für jede Restriktionsendonuklease spezifisch und liegen meist im Bereich von vier bis acht Nukleotiden. Das 521 bp lange, zuvor durch PCR amplifizierte Fragment des Cx26, weist beim Gesunden 2 Schnittstellen für das Restriktionsenzym NciI (Biolabs) auf. Die Mutation R143W verändert die Sequenz an einer dieser Schnittstellen, so dass bei Betroffenen nur noch eine Schnittstelle für das NciI bleibt:

Schnittstelle NciI: CC!SGG

Mutation R143W: CCGGG → CTGGG

Der Restriktionsverdau mit dem Enzym NciI erfolgte bei 37°C für 2 Stunden im T3 Thermocycler (Biometra). Dafür wurden 2µl des PCR-Produktes mit 0,25µl Nci I (5U) und 1µl Puffer nach Herstellerangaben versetzt und mit 6,75µl ddH₂O auf einen Reaktionsansatz von 10µl aufgefüllt. Das Ergebnis der Reaktion wurde durch Agarose-Gelelektrophorese auf einem 1,6%igen Agarosegel bei 90V mit einer Laufzeit von einer Stunde überprüft.

3.3.6. Elektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese macht man sich die Tatsache zunutze, dass Nukleinsäuremoleküle bei neutralem pH negativ geladen sind und daher im elektrischen Feld wandern. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge. Man kann also unterschiedlich lange Nukleinsäuremoleküle entsprechend ihrer Größe voneinander trennen, indem man sie durch ein Agarosegel wandern lässt. Der optimale Trennbereich eines Agarosegels lässt sich über die Konzentration bestimmen, da sich mit zunehmender Agarosekonzentration die Porengröße verkleinert. Die isolierte doppelsträngige DNA kann im Gel, spezifisch mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid markiert, unter UV-Licht sichtbar gemacht und durch Sofortbild-Fotografie dokumentiert werden. Der Vergleich mit einem parallel eingebrachten Längenstandard (*base-pair-ladder*) ermöglicht die Abschätzung der Größe der markierten DNA-Segmente.

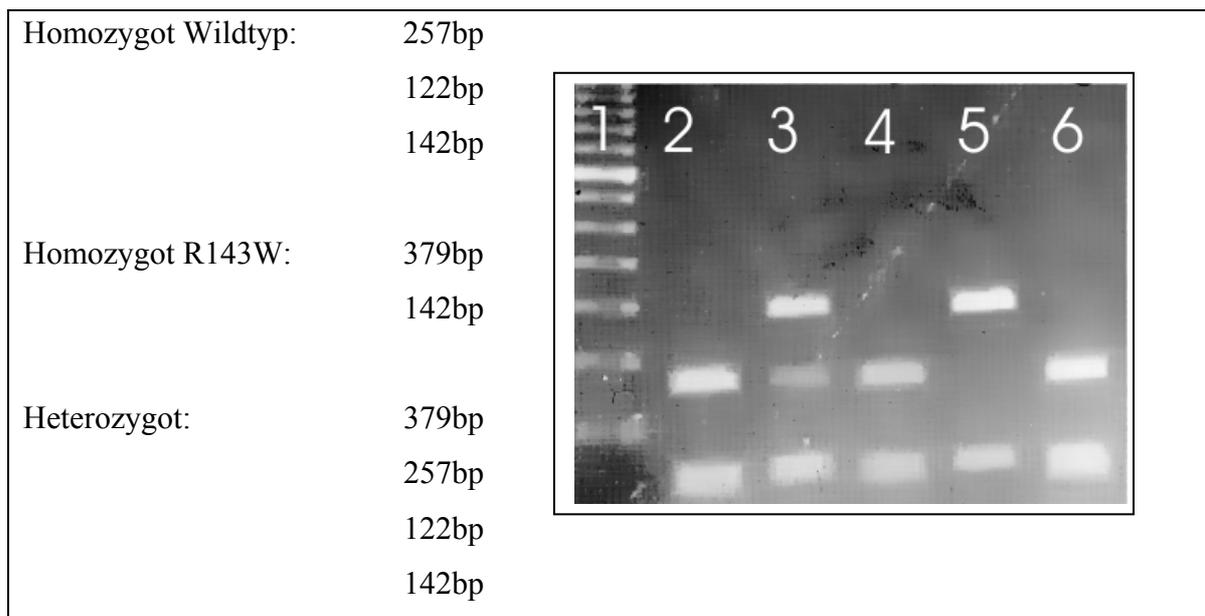


Abb. 5: Gelelektrophorese der durch PCR und Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente. Lane 1: Längenstandard; Lane 2,4,6: homozygot WT; Lane 3: heterozygot R143W/WT; Lane 5: homozygot R143W

Das Produkt des Restriktionsverdau wurde auf ein 1,6% Agarosegel gegeben und bei 90V eine Stunde laufen gelassen. Die Fluoreszierenden Banden wurden im ultravioletten Licht der Wellenlänge 254 nm dargestellt und dokumentiert.

3.3.7. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger et al. 1977). Diese Methode basiert auf der Neusynthese eines komplementären DNA-Stranges an einer einzelsträngigen Matrize. Diese Synthese erfolgt in Gegenwart von Nukleotidtriphosphaten, denen in niedriger Konzentration basenspezifische Didesoxynukleotide beigefügt sind. Es kommt zum Abbruch der DNA-Synthese, sobald ein Didesoxynukleotid in den neu synthetisierten Strang eingebaut wird. Dafür werden Didesoxynukleotide verwendet, die spezifisch für das jeweilige Nukleotid mit verschiedenen Fluorophoren, fluoreszierenden chemischen Gruppen, versehen sind. Durch den zufälligen Einbau entsteht eine Mischung neusynthetisierter DNA-Stränge unterschiedlicher Länge, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden können. Durch die Verwendung verschiedener Fluorophoren für die vier Nukleotide kann die Sequenzierreaktion in einem Reaktionsansatz ablaufen und auch auf einer Gelspur aufgetragen werden. Die Detektion erfolgt nach der Auftrennung durch die Gelelektrophorese anhand der verschiedenen Wellenlängen. Das durch die Fluoreszenzfarbstoffe emittierte Licht wird durch eine CCD-Kamera gesammelt, und nach automatisierter Analyse liegt dann eine lesbare Basensequenz vor.

Für die bidirektionale DNA-Sequenzierung wurde mit den Primern Cx26-A1 und Cx26-B1 ein 683 bp langer DNA Strang amplifiziert, der 12 bp der 5' -Region und das ganze Cx26 Gen bis auf 5 bp am 3'-Ende enthält. Bis auf den abweichenden Forward-Primer wurde die PCR mit dem gleichen Reaktionsgemisch sowie dem gleichen Programm wie in 3.3.4. beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis wurde durch Auftragen von 5 µl des PCR-Produktes auf ein Agarose-Gel überprüft und die verbleibenden 45 µl der PCR mit dem „High Pure™ PCR Product Purification Kit“ (Boehringer Mannheim) aufgereinigt. Zum Abschätzen der enthaltenen DNA-Menge wurden nun weitere 2 µl des aufgereinigten PCR-Produktes auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem Kit „Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction“ (PE Biosystems, ABI Prism), in dem außer einem Puffer bereits Taq-Polymerase, Desoxynukleotide (dNTPs) und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthalten sind, durchgeführt. Es wurden 8 µl des Kits mit jeweils 10 pmol des Forward- bzw. Reverse-Primers und 20-50 ng der amplifizierten DNA-Fragmente mit ddH₂O auf 20 µl Reaktionsansatz aufgefüllt und im Perkin Elmer DNA Thermal Cycler TC1 mit folgendem Programm amplifiziert:

1. Erste Denaturierung bei 96°C für 5 Min.
2. 25 Zyklen mit
 - a) Denaturierung bei 96°C für 30 Sek.
 - b) Primeranlagerung bei 50°C für 15 Sek.
 - c) Primerextension bei 60°C für 4 Min.
3. Kühlen auf 4°C

Die Aufreinigung der Proben nach der Sequenzierreaktion erfolgte durch Fällung:

20µl DNA (Sequenzierprodukt ohne Öl), 55µl Ethanol 100% und 2µl Na-Acetat pH 5,2 3M wurden gut gemischt und dann 30 Min. zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert, 350µl Ethanol 70% hinzugefügt und für 10 Min. zentrifugiert. Am Boden des Eppendorf-Gefäßes zeichnete sich nun ein festes Pellet ab, das, nachdem der Überstand verworfen wurde, bei Zimmertemperatur trocknen gelassen wurde. Danach wurden 3,5µl Puffer Formamid-EDTA 5:1 mit Blue Dextran hinzugefügt, beides gemischt und dann, um die DNA zu denaturieren, 2 Min. bei 94°C inkubiert. Direkt im Anschluss wurde das Produkt auf Eis gestellt, um die DNA-Stränge getrennt zu halten, bis sie auf das Sequenziergel aufgetragen wurden.

Um Nukleinsäuremoleküle mit einem Längenunterschied von nur einem Nukleotid zu trennen, werden Polyacrylamidgele verwendet. Die kurzen DNA-Fragmente wandern schneller durch die Gelmatrix als die längeren. Die hohe Harnstoff-Konzentration des Gels verhindert dabei die Renaturierung der DNA-Einzelstränge während der Elektrophorese. Durch die Variation der Acrylamid-Konzentration können Laufgeschwindigkeit und Trennbereich des Gels verändert werden.

Für die Sequenzierung des 683 bp langen DNA Stranges wurde ein 6%iges Polyacrylamidgel hergestellt. Um 50ml Gellösung (7 M Harnstoff; 6% Polyacrylamid) zu erhalten wurden 21 g Harnstoff mit 8,4 ml 30%iger Acrylamidlösung sowie 6 ml 10x TBE-Puffer und 20 ml ddH₂O vermischt. Die Entgasung der Gel-Lösung erfolgte mit Hilfe von 0,2 µm dicken Membranfiltern (Schleicher + Schuell). Für die Polymerisation wurde die Gel-Lösung mit 20 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED) und 350 µl Ammoniumpersulfat (APS), 10% (w/v), versetzt. Diese Gel-Lösung wurde dann mit einer Gießvorrichtung zwischen zwei Gelplatten gegossen, die durch 0,2 mm starke Abstandhalter getrennt waren. Mit einem Taschenkamm wurden an einer Schmalseite des Gels 36 Probestaschen eingebracht.

Die Sequenzanalyse erfolgte mit einem automatisierten Nachweissystem in einem DNA-Sequenziergerät (ABI PRISM 373A und 377 DNA Sequenzer, Applied Biosystems), in die das Gel vertikal eingespannt wird. Nach einem Elektrophorese-Vorlauf von 20 Minuten wurden zunächst nur die Proben der Geltaschen mit ungeraden Nummern aufgetragen, nach drei Minuten folgten dann die Proben der mit geraden Zahlen nummerierten Geltaschen. Dadurch liefen die jeweils benachbarten Probenspuren zu besserer Auswertbarkeit versetzt. Das Gel lief bei 2500 V und 48 Watt für 8h.

4. Ergebnisse

Im Rahmen der Studie wurden 365 unabhängige Personen mit schwerer prälingualer neurosensorischer NSHL untersucht. Sie wurden aus den Klassen P1 bis P6 von neun Gehörlosenschulen in ganz Ghana rekrutiert und waren alle im Alter zwischen 6 und 20 Jahren. Die Untersuchung erfolgte in mehreren Schritten, zuerst wurde durch PCR und Restriktionsverdau speziell die Mutation R143W im für Cx26 kodierenden Gen *GJB2* nachgewiesen.

4.1. Häufigkeit der *GJB2*-Mutation R143W

Bei der Datenerhebung wurde zwischen Probanden unterschieden, die eindeutig Auskunft geben konnten, ob eines oder mehrere ihrer Familienmitglieder auch gehörlos waren oder ob dies eindeutig nicht der Fall war, und solchen, bei denen keine zuverlässigen Angaben hierzu gemacht werden konnten. Es fanden sich 64 Probanden mit anamnestisch familiärer Gehörlosigkeit, 220 ohne weitere Fälle von Gehörlosigkeit in der Familie und 81, bei denen keine klaren Auskünfte darüber zu erhalten waren.

Von den 365 Probanden waren insgesamt 51 homozygote Träger von R143W, bei acht Probanden zeigte sich die Mutation in heterozygoter Form und 306 der Schüler zeigten keine R143W Mutation in *GJB2* (Abb. 6).

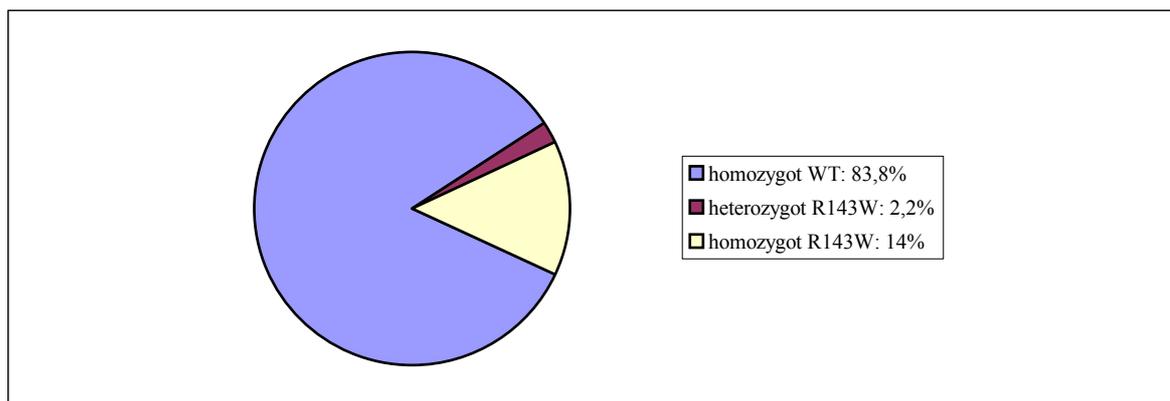


Abb. 6: Anteile der homozygoten und heterozygoten Träger der Mutation R143W in Prozent bei insgesamt 365 Probanden

Bei dem Vergleich der familiären Fälle von Gehörlosigkeit mit den sporadischen zeigte sich ein deutlicher Unterschied, die erstgenannten zeigten in 31,3% der Fälle R143W in der homozygoten Form als Ursache ihrer Gehörlosigkeit, während dies nur bei 10% der Probanden mit anamnestisch sporadischer Gehörlosigkeit der Fall war (Tab. 1). Bei den Probanden, die keine Angaben zum Vorkommen von Gehörlosigkeit in Ihrer Familie machen konnten, zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei den sporadischen Fällen.

ausgewählte Gruppe	Ergebniss	n	Anteil in Prozent
nicht familiär:	homozygot WT:	193	87,7%
	heterozygot R143W:	5	2,3%
	homozygot R143W:	22	10,0%
	gesamt	220	100,0%
familiär:	homozygot WT:	42	65,6%
	heterozygot R143W:	2	3,1%
	homozygot R143W:	20	31,3%
	gesamt	64	100,0%
unbekannt:	homozygot WT:	71	87,7%
	heterozygot R143W:	1	1,2%
	homozygot R143W:	9	11,1%
	gesamt	81	100,0%

Tab. 1: R143W-Mutationen unterteilt nach anamnestischer Hörfähigkeit der Verwandten wie in 2.2. beschrieben

4.2. Geographische Verteilung von R143W

Die R143W Mutation war weit verbreitet in Ghana mit deutlich zunehmenden Prävalenzen von Nord nach Süd (Tab. 2).

Bei den insgesamt 53 Probanden aus den drei nördlichen Regionen wurde keine R143W Mutation gefunden. In der im Süden an der Küste gelegenen *Central Region* dagegen trat die Mutation R143W bei 27,8% der Probanden in der homozygoten Form auf und verursacht somit einen erheblichen Anteil der Fälle von neurosensorischer NSHL.

Region	n	R143W/R143W	wt/R143W	wt/wt
Ashanti	80	11 13,75%	2 2,5%	67 83,75%
Brong Ahafo	28	6 21,4%	0 0,0%	22 78,6%
Central	36	10 27,8%	3 8,3%	23 63,9%
Eastern	25	6 24,0%	1 4,0%	18 72,0%
Greater Accra	47	9 19,1%	0 0,0%	38 80,9%
Northern	27	0 0,0%	0 0,0%	27 100,0%
Upper East	14	0 0,0%	0 0,0%	14 100,0%
Upper West	12	0 0,0%	0 0,0%	12 100,0%
Volta	43	4 9,3%	1 2,3%	38 88,4%
Western	53	5 9,4%	1 1,9%	47 88,7%

Tab. 2: Häufigkeit der Mutation R143W alphabetisch nach Regionen

4.3. Neue Mutationen in *GJB2*

Im zweiten Teil der durchgeführten Studie wurden von den insgesamt 365 Probanden jene 314 weitergehend untersucht, die nicht homozygot für die Mutation R143W waren. Hier wurde eine Sequenzierung des Exon 2 von *GJB2* durchgeführt. Insgesamt wurde ein Muster von Mutationen gefunden, das sich stark von denen anderer Regionen der Erde unterscheidet. Die Sequenzierung der kodierenden Region von *GJB2* zeigte, dass von den in beiden Teilen der Studie insgesamt untersuchten 365 Probanden 64 (17,5%) Missense-Mutationen oder Insertionen in dem Gen trugen. Davon scheint bei 58 der 365 Individuen (15,9%) die *GJB2*-Mutation ursächlich für die Schwerhörigkeit zu sein. Sechs neue Mutationen, keine von ihnen eine Frameshift oder Nonsense-Mutation, wurden identifiziert.

Mutation	Anzahl betroffener Individuen
R143W/R143W	51
R143W/wt	4
R143W/35insG	1
R143W/L79P	1
R143W/I203K	1
R143W/L214P	1
V178A/V178A	2
R184Q/wt	1
A197S/wt	1
betroffene Individuen insgesamt:	63
Untersuchte Individuen:	365

Tab. 3: Auflistung aller von *GJB2*-Mutationen betroffenen Individuen

Wie im ersten Teil der Untersuchung beschrieben waren 51 Individuen homozygot für R143W (Tabelle 1 u. 3). Von den acht Heterozygoten für R143W trugen 4 keine weitere Mutation in *GJB2*, während die verbleibenden 4 Träger der R143W Mutation doppelt (*compound*) heterozygot waren (Tabelle 3). Darunter war ein Träger der Mutation 35insG, die bereits zuvor als Ursache für NSRD beschrieben worden war (Estivill et al. 1998a). Die anderen drei Mutationen L79P, I203K und L214P (Abb. 7) wurden bisher noch nicht beobachtet.

Weiterhin wurden bei Probanden, die keine R143W-Mutation aufwiesen, drei neue Missense-Mutationen gefunden (Abb. 12), V178A, A197S und R184Q.

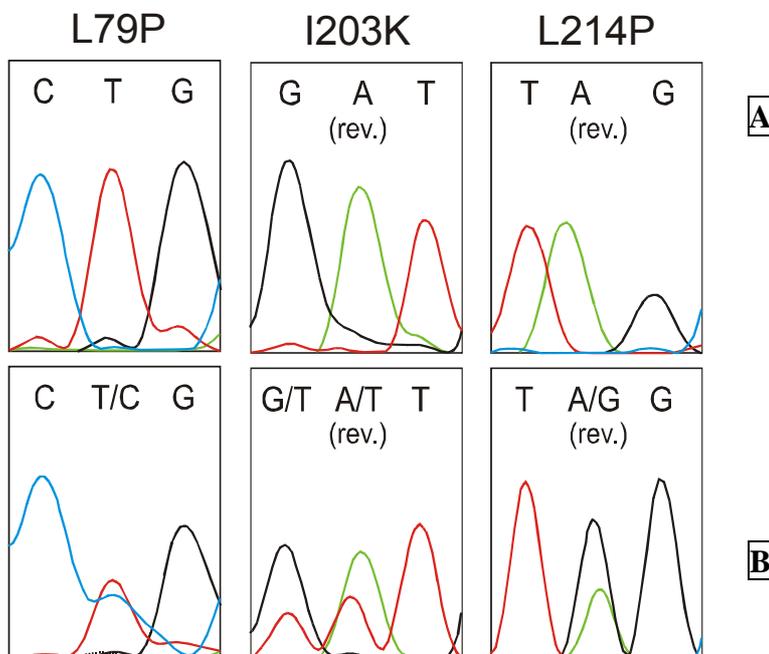


Abb. 7: die neu beschriebenen Cx26-Mutationen L79P, I203K und L214P, in der oberen Zeile (A) jeweils die Wildtyp-Sequenz, in der unteren Zeile (B) jeweils die neue Sequenzvariante.

I203K: Der Austausch zweier Basen, TC zu AA an Position 608 der Nukleotidsequenz führt zu dem Tausch von Isoleucin (I) zu Lysin (K) an Position 203 der Aminosäuresequenz. Der Proband, bei dem diese Mutation in doppelter (*compound*) Heterozygotie mit R143W gefunden wurde, stammte aus der Region *Ashanti*. Der Stammbaum zeigte, dass Heterozygotie für I203K mit einem normalen Gehör einhergeht, was darauf hinweist, dass diese Mutation rezessiv ist (Abb. 8)

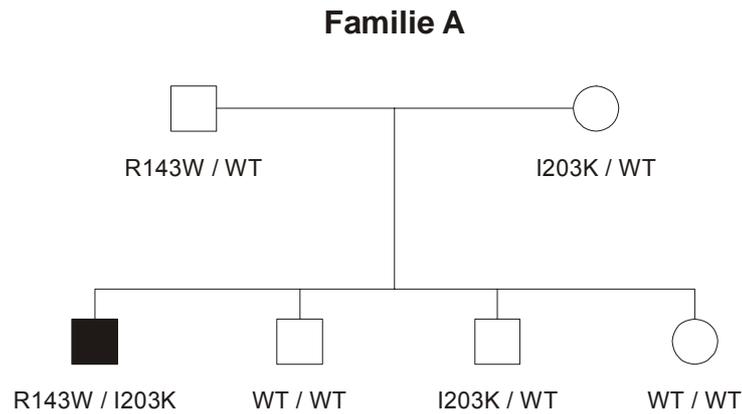


Abb.8: Stammbaum der Familie des Schülers, bei dem die I203K Mutation des *GJB2* neu beschrieben wurde

L79P: Diese Mutation wurde bei einem aus der *Central Region* stammenden Schüler in doppelter (*compound*) Heterozygotie mit R143W gefunden. Der Tausch eines T zu C an Position 236 der Nukleotidsequenz ist eine Missense-Mutation, die an Aminosäureposition 79 zum Austausch von Leucin (L) zu Prolin (P) führt. Familienstudien ergaben, dass Heterozygotie für L79P mit einem normalen Gehör einherging, was darauf hinweist, dass auch diese Mutation rezessiv ist (Abb.9).

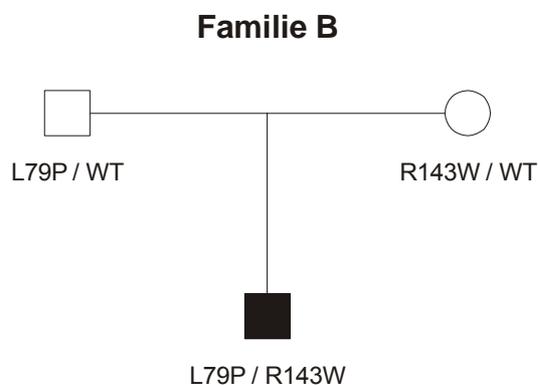


Abb.9: Stammbaum der Familie des Schülers, bei dem die L79P Mutation des *GJB2* neu beschrieben wurde

L214P: Für die Mutation, die zu einem Austausch von T zu C an Position 641 der Nukleotidsequenz führt, wodurch die Aminosäure Leucin (L) durch Prolin (P) ersetzt wird, konnten keine einfach heterozygoten Familienangehörige gefunden werden. Es wurde aber berichtet, dass die Mutter der doppelt heterozygoten Geschwister normal hörend war. Dies ließ vermuten, dass L214P auch rezessiv ist, da sie Träger von L214P sein musste (Abb. 10). Der Proband mit dieser Mutation stammt aus der *Western Region*.

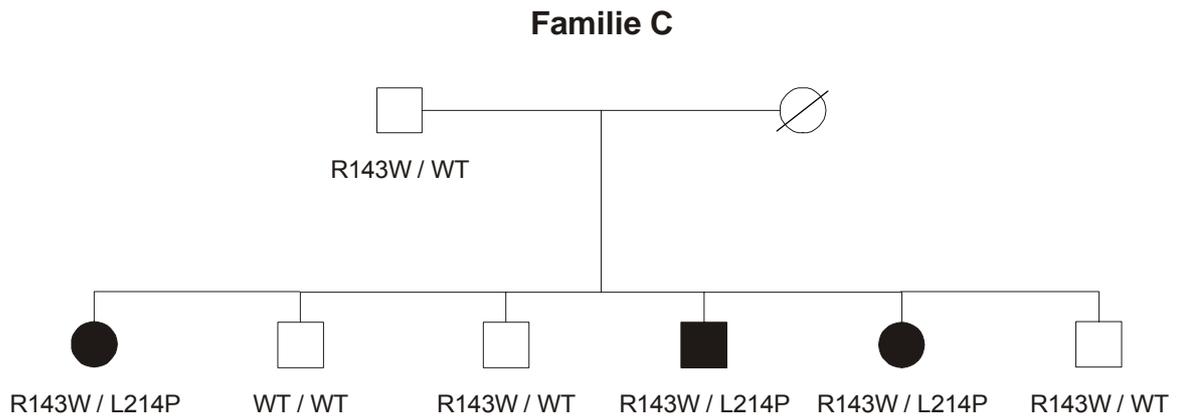


Abb.10: Stammbaum der Familie des Schülers, bei dem die L214P Mutation des *GJB2* neu beschrieben wurde

R184Q: Diese Sequenzvariante wurde bei einem aus der *Central Region* stammenden Schüler beschrieben. Bei dem Tausch G zu A an Position 551 der Nukleotidsequenz handelt es sich um eine Missense-Mutation, die in der Aminosäuresequenz zum Tausch von Arginin (R) zu Glutaminsäure (Q) führt.

Die Familienstudie zeigt, dass Gehörlosigkeit hier in allen fünf Fällen mit Heterozygotie für R184Q einherging (Abb. 11). Also scheint R184Q einer der seltenen Fälle zu sein, bei denen *GJB2*-Mutationen zu dominant vererbter Schwerhörigkeit führen. Diese Annahme wird durch die Tatsache, dass die betroffenen Geschwister zwei verschiedene Väter haben, unterstützt.

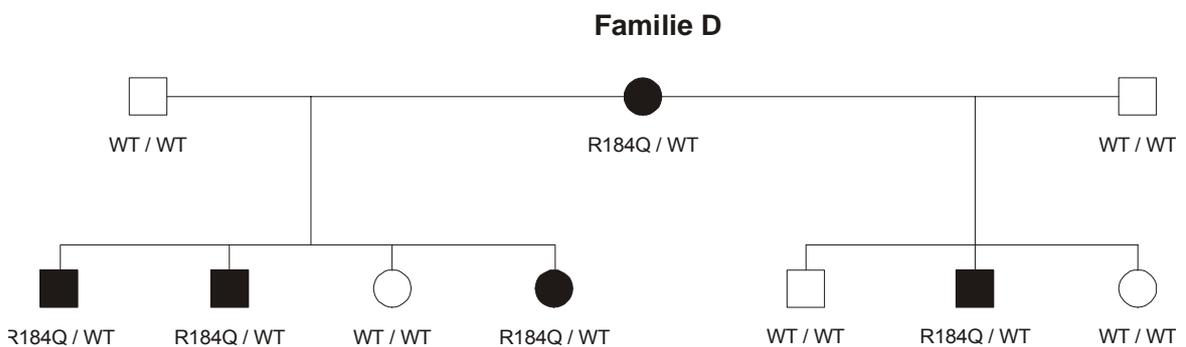


Abb.11: Stammbaum der Familie des Schülers, bei dem die LR184Q Mutation des *GJB2* neu beschrieben wurde

V178A: Die durch den Austausch der Base T zu C an Position 533 der Nukleotidsequenz gekennzeichnete Mutation, bei der in der Aminosäuresequenz an Position 178 statt Valin (V) Alanin (A) kodiert wird, wurde homozygot bei zwei anscheinend unabhängigen Individuen und einem Geschwisterkind des einen gefunden, was den Schluss nahelegt, dass es sich auch hier um eine Ursache für rezessiv vererbte NSHL handelt. Alle von V178A betroffenen Schüler wurden in der *Western Region* geboren.

A197S: Die Mutation A197S, bei der durch den Austausch der Base G zu T an Position 589 der Nukleotidsequenz Alanin (A) in Aminosäureposition 197 durch Serin (S) ersetzt ist, wurde einmal in heterozygoter Form gesehen. Der Schüler, bei dem sie auftrat, wurde in der *Ashanti Region* geboren. Da keine Familienmitglieder zu Verfügung standen, blieb die Rolle, die diese Mutation spielt, unklar. Sie konnte entweder dominant sein, oder es lag ein Fall von Gehörlosigkeit vor, der durch Veränderung in *GJB2* und einem anderen Gen verursacht worden war (*digenetic*), oder ihr Auftreten fiel zufällig mit einer anderen Ursache für Gehörlosigkeit zusammen.

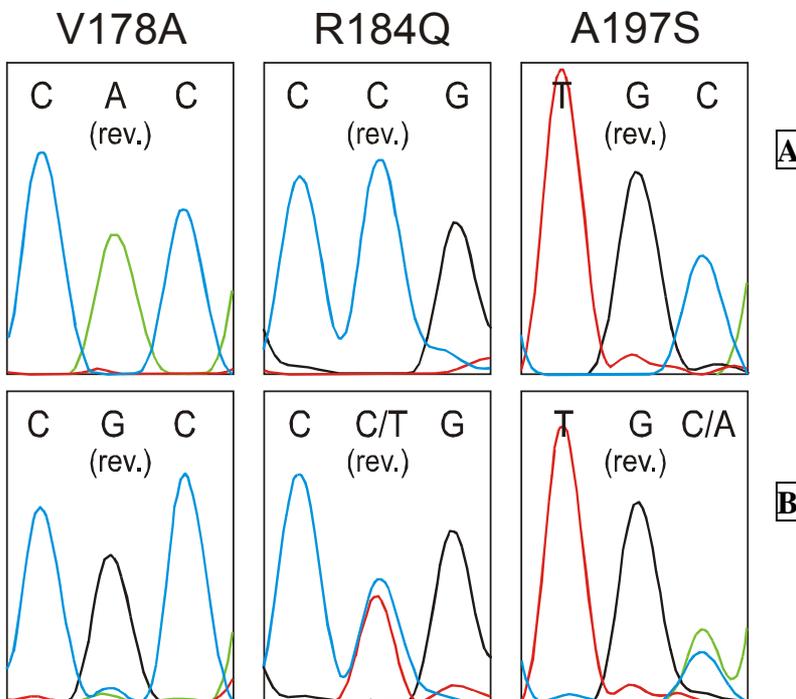


Abb. 12: die neu beschriebenen Cx26-Mutationen V178A, R184Q und A197S, in der oberen Zeile (A) jeweils die Wildtyp-Sequenz, in der unteren Zeile (B) jeweils die neue Sequenzvariante. V178A wurde dabei in homozygoter Form gefunden, R184Q und A197S dagegen traten jeweils nur in einem Allel auf.

4.4. Gesamtzahl der ermittelten *GJB2*-Mutationen

Tabelle 4 fasst alle in Ghana gefundenen Mutationen, sowohl die bereits bekannten als auch die neu beschriebenen, zusammen. Ergänzend dazu bietet Abbildung 13 eine Übersicht über die Lage dieser Sequenzvarianten innerhalb von Cx26.

<i>GJB2</i> Mutationen		Anzahl der betroffenen Allele
35insG	(frameshift)	1
236T→C	L79P	1
427C→T	R143W	110
533T→C	V178A	4
551G→A	R184Q	1
589G→T	A197S	1
608TC→AA	I203K	2
641T→C	L214P	1
veränderte Allele insgesamt:		121
Untersuchte Allele:		730

Tab. 4: Auflistung aller *GJB2* Mutationen mit ihrer Häufigkeit

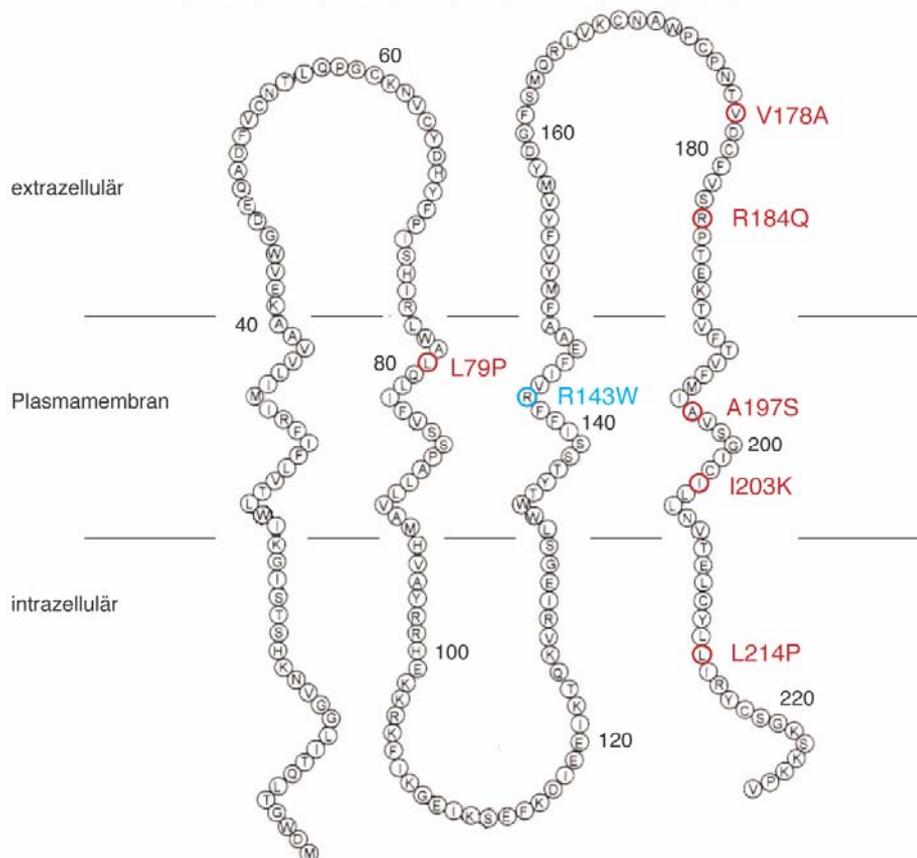


Abb. 13: Schema des Cx26-Moleküls. Die in Ghana häufige Sequenzvariante R143W ist blau hervorgehoben, Sequenzvarianten durch in der vorliegenden Studie neu beschriebene *GJB2*-Mutationen sind rot markiert.

4.5. Geografische Verteilung aller ermittelten *GJB2*-Mutationen

Nachdem sich schon bei der Verteilung der Mutation R143W eine deutliche Häufung in den südlichen Regionen Ghanas zeigt, stammen auch die Schüler mit neu beschriebenen Mutationen aus diesen Gebieten.

Die fünf Probanden mit den *GJB2*-Mutationen L79P, V178A, L214P und R184Q stammen aus der *Central* und *Western Region*. A197S und I203K fanden sich bei Schülern aus der angrenzenden *Ashant Region*, hier war auch der Proband mit der vorbeschriebenen 35insG Mutation geboren worden.

Analog zu Tabelle 2, in der die in Ghana häufige Mutation R143W nach Regionen geordnet aufgelistet ist, findet sich die Gesamtzahl der für Gehörlosigkeit verantwortlich zu machenden *GJB2*-Mutationen in Tabelle 5. Die dabei beobachtete geografische Verteilung mit klar abnehmender Prävalenz von den Küstenregionen in Richtung Norden wird durch Abbildung 14 verdeutlicht.

Region	n	Probanden mit Gehörlosigkeit verursachenden <i>GJB2</i> -Mutationen		Probanden mit Mutationen unklarer Auswirkung		Probanden ohne Mutation im <i>GJB2</i>	
Ashanti	80	12	15,5%	2	2,5%	66	82,5%
Brong Ahafo	28	6	21,4%	0	0,0%	22	78,6%
Central	36	12	33,3%	2	5,6%	22	61,1%
Eastern	25	6	24,0%	1	4,0%	18	72,0%
Greater Accra	47	9	19,1%	0	0,0%	38	80,9%
Northern	27	0	0,0%	0	0,0%	27	100,0%
Upper East	14	0	0,0%	0	0,0%	14	100,0%
Upper West	12	0	0,0%	0	0,0%	12	100,0%
Volta	43	4	9,3%	2	4,7%	37	86,0%
Western	53	9	15,3%	0	0,0%	50	84,7%

Tab. 5: Anzahl der Personen mit *GJB2*-Mutationen alphabetisch nach Regionen sortiert. n = Anzahl der insgesamt aus der jeweiligen Region stammenden, untersuchten Probanden

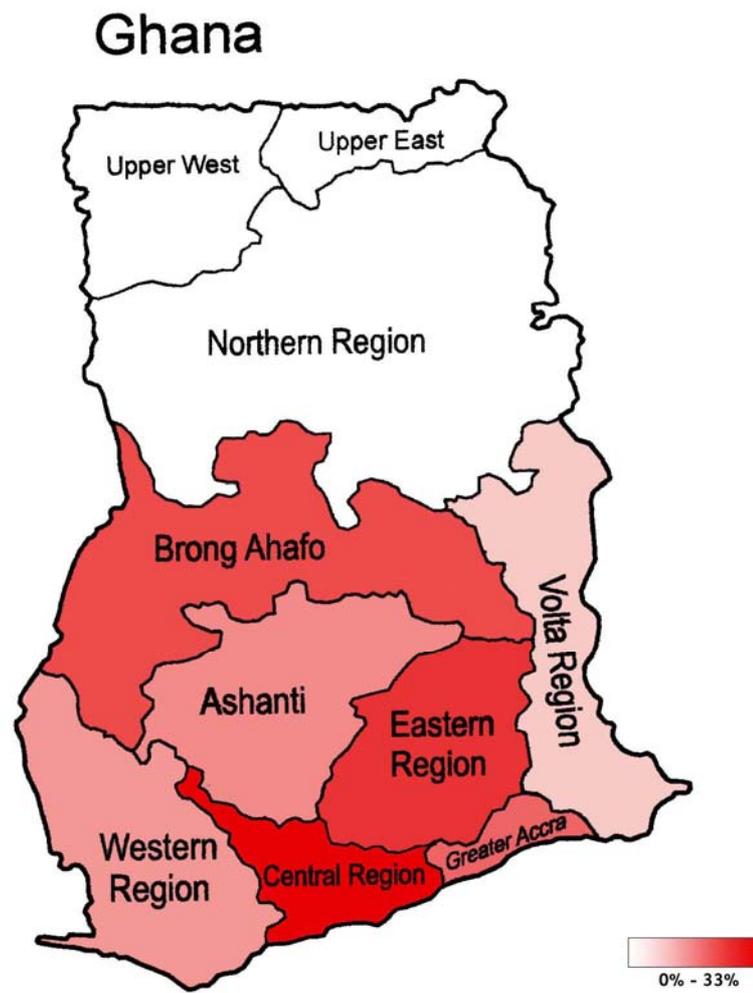


Abb. 14: geografische Verteilung der *GJB2*- Mutationen

5. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde bei 365 gehörlosen Personen in Ghana das zweite Exon des Gens *GJB2* untersucht, das für Cx26 kodiert. Im Mittelpunkt der Untersuchung stand die Frage nach der Prävalenz und Art der *GJB2*-Mutationen im Vergleich zu anderen bisher untersuchten Populationen und ihrer geografischen Verteilung innerhalb Ghanas.

5.1. Kritische Bewertung des Studienplans und der angewandten Methoden

5.1.1. Auswahl der Studienteilnehmer

Das untersuchte Kollektiv bestand aus Schülern mit neurosensorischer Schwerhörigkeit unbekannter Genese aus neun Schulen für Gehörlose, die in neun von zehn Provinzen Ghanas verteilt gelegen sind.

Zunächst wurden Kinder mit nur leichter bis mittelgradiger Schwerhörigkeit ausgeschlossen, da die durch Mutationen in *GJB2* verursachte rezessiv vererbte Schwerhörigkeit meist vollkommen oder schwer ist. Inzwischen hat sich allerdings gezeigt, dass in einigen Fällen der Schweregrad sogar innerhalb einzelner Familien bemerkenswert variieren kann (Denoyelle et al. 1999; Lerer et al. 2001; Murgia et al. 1999). Demnach könnten durch zu strenge Auswahlkriterien Fälle unterschätzt oder übersehen und Personen mit *GJB2*-bedingter Schwerhörigkeit aus der Untersuchung ausgeschlossen worden sein. Im Rahmen dieser Studie wurden allerdings keine Familienangehörigen mit gering ausgeprägter Schwerhörigkeit ermittelt. Auch bei den vier ausführlich untersuchten Familien der Personen, bei denen neue *GJB2*-Mutationen gefunden wurden, fanden sich ausschließlich Angehörige mit vollständiger Gehörlosigkeit oder ohne nachweisbare Hörstörung. Dies lässt die Wahrscheinlichkeit, Personen mit *GJB2* bedingter Schwerhörigkeit übersehen zu haben, gering erscheinen.

Weiterhin wurden Kinder mit postlingualer Schwerhörigkeit ausgeschlossen. Fast alle Formen der autosomal rezessiv vererbten NSHL beginnen prälingual (Green et al. 2000), weswegen die Patientenauswahl sich auf Fälle von Gehörlosigkeit, die sich vor dem Ende des zweiten Lebensjahres manifestiert hatten, beschränkte. Obwohl die autosomal rezessiv vererbte Gehörlosigkeit in ihrem Ausprägungsgrad meistens stabil bleibt, ist in Einzelfällen eine Progression beschrieben worden (Denoyelle et al. 1999; Cohn et al. 1999). Da der Spracherwerb vom Schweregrad der Hörstörung abhängt ist anzunehmen,

dass auch Patienten, deren Schwerhörigkeit erst postlingual auffällt, von einer *GJB2*-Mutation betroffen sein können, und die Auswahlkriterien in diesem Fall zu eng gewesen sein könnten. Insgesamt hat sich in anderen Studien gezeigt, dass insbesondere Hörstörungen ohne exogene Risikofaktoren häufig erst im zweiten oder dritten Lebensjahr auffallen (Azaiez 2004), da exogene Risikofaktoren die Aufmerksamkeit schneller auf eine eventuellen Schwerhörigkeit lenken. Die strenge Vorauswahl lässt darüber hinaus auch Rückschlüsse auf Penetranz und Expressivität der einzelnen *GJB2*-Mutationen in dieser Population nicht zu.

Ein weiteres Ausschlusskriterium war eine offensichtlich exogene Ursache für die Gehörlosigkeit. Hierzu ist die Datenlage über Vorerkrankungen der Mütter in der Schwangerschaft sowie der Probanden in der frühen Kindheit schlecht, was zum einen an der fehlenden Dokumentation, aber auch an der eingeschränkten ärztlichen Versorgung und damit mangelhafter Diagnostik liegen kann. Ein Beispiel hierfür ist die kongenitale Infektion mit Röteln. Obwohl in Westafrika 10% bis 30% der Frauen im reproduktiven Alter noch seronegativ für Rubella-AK sind und es kein Impfprogramm für diese Frauen gibt (WHO homepage), wurden hier, wider Erwarten, lange keine Fälle von Rötelnembryopathie beschrieben. Eine in Kumasi durchgeführte Studie zeigte schließlich eine Rate von 0,8 pro 1000 Geburten, was bestätigte, dass die Rötelnembryopathie sehr wohl vorkommt, jedoch als solche nicht statistisch erfasst wird (Lawn et al. 2000).

5.1.2. körperliche Untersuchung

Die Untersuchung zum Ausschluss syndromischer Formen der Schwerhörigkeit bezog die körperliche Untersuchung und die Otoskopie ein, wodurch viele Erkrankungen, wie z.B. Hautkrankheiten, Schilddrüsenvergrößerungen und Anomalien des äußeren Gehörgangs und des Trommelfells erfasst wurden, nicht jedoch Veränderungen des Innenohrs wie die Mondini-Dysplasie beim Pendred-Syndrom. Das HR-CT des Os temporale wird in der Literatur im Allgemeinen nur bei unilateraler oder progressiver Schwerhörigkeit sowie kraniofazialen Anomalien empfohlen (Hone 2002; Bamiou 2000). Gehörlosigkeit durch *DFNB1* ist in der Regel nicht mit einer radiologisch erkennbaren Innenohrveränderung assoziiert (Hone et al. 2002). Durch die Audiometrie wurden die Ausprägung der Schwerhörigkeit erfasst sowie die Differenzierung der sensorineuralen Hörstörung durchgeführt. Das Alter der Kinder ist dabei mit 6-20 Jahren hoch genug, diese von Kooperation abhängige Untersuchung durchzuführen, so dass die in Europa mittlerweile

vor allem bei jüngeren Patienten etablierte elektrische Reaktionsaudiometrie entbehrlich erschien.

5.1.3. Untersuchung des Exon 2 von *GJB2*

Wie in den meisten zuvor genannten Studien wurde das Exon 2 des *GJB2* molekulargenetisch untersucht, da es die komplette kodierende Sequenz von Cx26 enthält. Dies bleibt die allgemein übliche Methode, da sich in mehreren Studien bei keinem der Probanden, bei denen nur eine einzelne *GJB2*-Mutation in Exon 2 gefunden worden war, bei Untersuchung von Exon 1 und putativen *splice sites* Mutationen im zweiten Allel gezeigt hatten (Azaiez et al. 2004; del Castillo et al. 2003; Green et al. 1999).

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Auswirkungen von *GJB2*-Mutationen auf das Genprodukt Cx26

Die meisten vererbten Formen der Schwerhörigkeit verhalten sich monogenetisch, in letzter Zeit finden sich aber auch Beispiele von Interaktionen zweier Gene (del Castillo et al. 2002). Das häufigste Vererbungsmuster ist die rezessive Übertragung. Trotz der hohen genetischen Heterogenität ist in den meisten Populationen ein einziger Gen-Locus, DFNB1, für den größten Anteil an vererbter Gehörlosigkeit verantwortlich. DFNB1 wird auf 13q11-q12 kartiert und beinhaltet die Gene *GJB2* und *GJB6*, die für die *gap junction*-Proteine Cx26 und Cx30 kodieren. Beide Genprodukte werden in der Cochlea exprimiert (Forge et al. 2003) und Paare rezessiver Mutationen, entweder einen oder beide Loci umfassend, können Gehörlosigkeit verursachen. Mutationen in *GJB2* können dominant oder rezessiv vererbte NSHL sowie verschiedene mit Hauterkrankungen assoziierte Syndrome verursachen (Van Laer et al. 2003).

Obwohl bei der Identifizierung von Gehörlosigkeit verursachenden Genen beachtliche Fortschritte gemacht werden, ist die Korrelation der Genfunktionen mit spezifischen auditorischen Prozessen noch sehr unvollständig. Bei der Erforschung der Funktionen von Cx26 kommt erschwerend hinzu, dass *GJB2* Knockout-Mäuse aufgrund eines Defektes der Plazentaentwicklung am 11. Tag der Embryonalphase absterben (Gabriel et al. 1998). Um die genauen Auswirkungen der verschiedenen Mutationen von *GJB2* auf das Hörvermögen

und eventuelle andere Funktionen besser zu verstehen, müssen daher andere Wege gewählt werden.

Zum einen werden Funktionen der Protein-Domänen der verschiedenen Connexine im Allgemeinen untersucht. So beeinflussen die vier Transmembrandomänen das Zusammenfügen der Connexine zu den hexameren Hemikanälen, den Connexonen (Krutovskikh et al. 2000; Zhou et al. 1997). Die beiden extrazellulären Schleifen EC1 und EC2 sind entscheidend an dem Zusammenfügen zweier Connexone zu einem interzellulären Kanal beteiligt. Das stark konservierte amino-terminale Ende soll für die Einfügung der Connexine in die Zellmembran notwendig sein (Martin et al. 2000). Beim Cx32 wurden für diesen Bereich auch eine Calmodulin-Bindungsstelle (Torok 1997) und eine "*voltage gating region*" (Purnick 2000) beschrieben. Mutationen in *GJB2* können die Bildung des monomeren Cx26, das Zusammenfügen zu Connexonen, den Transport in die Zellmembran, den Kontakt zur benachbarten Zelle und die Funktion der *gap junction*-Kanäle beeinflussen.

Andere Studien haben die Auswirkung bestimmter experimenteller oder bereits in der Natur gefundener *GJB2*-Mutationen auf die Funktion der Connexine untersucht. Bisher konnten dabei keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden, und häufig haben neue Ergebnisse alte Theorien verdrängt. So wurde die *GJB2*-Mutation V37I als zufällig bei Hörenden auftretend eingeordnet. In einer Funktionsstudie mit dieser Mutation zeigte sich dann jedoch ein Funktionsverlust des Cx26. Bei der V84L-Mutation, die rezessiv vererbte Schwerhörigkeit verursacht, konnte dagegen weder in *Xenopus*-Oozyten noch in transfizierten HeLa-Zellen ein Unterschied der Kanalfunktion gegenüber dem Cx26 Wildtyp gezeigt werden (Bruzzone et al. 2003). Später wurde für V84L dann eine Reduktion der Permeabilität des Kanals für Inositol 1,4,5-trisphosphat (Ins(1,4,5)P(3)) nachgewiesen, das wiederum als Mediator für die Fortleitung einer Ca²⁺ Welle durch das Gewebe verantwortlich gemacht wird (Beltramello et al. 2005). Alle anderen untersuchten Funktionen ergaben auch in dieser Studie keinen Unterschied zum Wildtyp.

Ein weiteres Beispiel für widersprüchliche Ergebnisse von Funktionsstudien ist die in Ghana vorherrschende Mutation R143W. So verhindert diese in N2A-Zellen nicht die Entstehung von funktionsfähigen Cx26 Proteinen, die sich auch in der Zellmembran zu *gap junctions* zusammenlagern und vor allem im Bereich der Regionen der interzellulären Kontakte vorkommen (Wang et al. 2003). Im Gegensatz dazu wurden durch R143W in *Xenopus*-Oozyten keine funktionsfähigen Kanäle gebildet, obwohl Cx26 in einer Menge exprimiert wurde, die mit dem Wildtyp vergleichbar war (Mese et al. 2004).

Die dominanten *GJB2*-Mutationen delE42, D66H, W44C und R75W inhibieren die Bildung funktionsfähiger Kanäle, wenn sie mit Wildtyp-Cx26 co-exprimiert werden (Bruzzone et al. 2001; Rouan et al. 2001). Bei anderen dominanten Cx26 Mutationen zeigt sich, wenn sie mit Cx30 co-exprimiert sind, ein hemmender Effekt auf die Funktion der Cx30 Kanäle, der damit zu einer Beeinflussung der heteromeren Kanäle führen kann (Forge et al. 2003). Sollten heteromere Kanäle aus Cx26 und Cx30 einzig und allein in der Cochlea vorkommen, könnte dies eine Erklärung für den nicht-syndromischen Charakter einiger Formen von Schwerhörigkeit sein, die durch Mutationen in *GJB2* verursacht werden (Forge et al. 2003). Desweiteren wurde für delE42, D66H und R75W ein transdominanter Effekt auf Cx43, ein in der Epidermis vorkommendes Connexin, gezeigt (Rouan et al. 2001). Da bisher angenommen wird, dass Cx26 und Cx43 nicht gemeinsam in heteromeren oder heterotypischen Kanälen vorkommen, ist der Mechanismus dieses Effektes unklar.

Insgesamt zeigt sich also, dass *in vitro* Methoden zwar Hinweise auf die Auswirkung von *GJB2*-Mutationen geben, nicht aber die komplexe Situation der Genexpression *in vivo* widerspiegeln können.

5.2.2. In dieser Studie ermittelte Mutationen

Die molekulargenetische Untersuchung der kodierenden Region von *GJB2* zeigte bei insgesamt 63 der 365 in die Studie eingeschlossenen Probanden Missense-Mutationen oder Insertionen. Es wurden acht verschiedene Mutationen in *GJB2* beschrieben, die alle bei Personen mit neurosensorischer angeborener NSHL gefunden wurden. In Anbetracht früherer Berichte über die Rolle der *GJB2*-Mutationen wurde davon ausgegangen, dass auch die neuen Mutationen die Ursache für Schwerhörigkeit sind, sofern die Stammbäume der jeweiligen Familie diese Annahme unterstützten. Insgesamt 51 Personen waren homozygot für R143W, weitere acht waren heterozygot für R143W. Vier dieser Personen trugen keine weitere *GJB2*-Mutation, während die anderen vier Träger der Mutation R143W doppelt (*compound*) heterozygot waren. Von diesen zeigte sich bei einem die Frameshift-Mutation 35insG, bei der ein zusätzliches G im Bereich 30-35 eingefügt wird und die bereits zuvor als Ursache für rezessiv vererbte NSHL beschrieben worden war (Estivill et al. 1998a). Bei den übrigen drei doppelt Heterozygoten fanden sich neben R143W jeweils einmal die bisher noch nicht beobachteten Mutationen L79P, I203K und

L214P Weiterhin wurden bei Probanden, die keine R143W-Mutation aufwiesen, die drei neuen Missense-Mutationen V178A, A197S und R184Q gefunden.

R143W wurde zuvor bereits als rezessiv vererbte Ursache von NSHL in Ghana beschrieben, wo es die einzige gefundene *GJB2*-Mutation in einem Dorf mit sehr hoher Prävalenz von Gehörlosigkeit war (Broddy et al. 1998). In der aktuellen Studie zeigt sich, dass R143W auch in anderen Teilen des Landes die vorherrschende *GJB2*-Mutation ist, sie trägt 90% zu allen gefundenen *GJB2*-Mutationen bei. Der Ersatz der Base C durch T an Position 427 der Nukleotidsequenz führt zum Austausch der basischen Aminosäure Arginin gegen die hydrophobe Aminosäure Tryptophan an Position 143 der Aminosäurekette in der dritten transmembranären Protein-Domäne. R143W findet sich auch in anderen Populationen wie Koreanern (Park et al. 2000), Japanern (Abe et al. 2000) und Spaniern (Rabionet et al. 2000b). In der vorliegenden Studie wurde die Mutation in vier Fällen auch einfach heterozygot gefunden, wo sie entweder mit einer Mutation in einem anderen Gen interagiert oder in keinem Zusammenhang mit der Ursache der Schwerhörigkeit steht.

5.2.2.1. L79P

Der Ersatz der Base T durch C an Position 236 der Nukleotidsequenz ist eine Missense-Mutation, die in der zweiten transmembranären Protein-Domäne TM2 des Cx26 zum Austausch von Leucin, einer hydrophoben Aminosäure, zu Prolin führt. Prolin nimmt unter den Aminosäuren eine Sonderstellung ein, da es durch seine zyklische Struktur starken Einfluss auf die Protein-Struktur haben kann. Alle vier transmembranären Domänen der Connexine sollen für die Oligomerisation zu hexameren Connexonen verantwortlich sein (Saez et al. 2003). In der Literatur finden sich keine weiteren Hinweise auf eine mögliche strukturelle Auswirkung dieser neu beschriebenen Mutation. Familienstudien ergaben, dass einfach Heterozygote für L79P ein normales Gehör hatten, was darauf hinweist, dass diese Mutation rezessiv ist (Abb. 9).

5.2.2.2. V178A

Die durch den Austausch der Base T zu C an Position 533 der Nukleotidsequenz gekennzeichnete Mutation, bei der statt Valin die ebenso hydrophobe Aminosäure Alanin eingebaut wird, wurde homozygot bei drei Probanden gefunden. Dieser Austausch findet in der zweiten extrazellulären Protein-Domäne statt, für die ein wichtiger Einfluss beim Zusammenfinden unterschiedlicher Connexone zu heterotypischen Kanälen postuliert wird

(White et al. 1994; 1995). Beide extrazellulären Schleifen sind entscheidend an dem Zusammenfügen zweier Connexone zu einem interzellulären Kanal beteiligt.

Zwei anscheinend nichtverwandte Personen (Tabelle 3) und ein daraufhin untersuchtes Geschwisterkind des einen waren homozygot für V178A. Obwohl keine weiteren Familienangehörigen untersucht werden konnten und neutrale Mutationen, bei denen chemische verwandte Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht werden, in vielen Fällen die Funktion des gesamten Proteins nur geringfügig verändern, lässt das ausnahmslose Vorkommen von V178A in der homozygoten Form vermuten, dass auch diese Mutation verantwortlich für die Gehörlosigkeit der Betroffenen ist und rezessiv vererbt wird.

5.2.2.3. R184Q

Bei dem Austausch der Base G zu A an Position 551 der Nukleotidsequenz handelt es sich um eine Missense-Mutation, die zum Ersatz der basischen Aminosäure Arginin durch die saure Aminosäure Glutaminsäure führt. Diese Sequenzänderung befindet sich, wie bereits für V178A beschrieben, in der zweiten extrazellulären Protein-Domäne. Die Familienstudie (Abb. 11) zeigt, dass Gehörlosigkeit bei allen fünf betroffenen Familienmitgliedern mit Heterozygotie für R184Q einhergeht. Eine Vererbung durch Interaktion mit einem zweiten Gen erscheint höchst unwahrscheinlich, da die betroffenen Geschwister zwei verschiedene Väter haben. Also scheint R184Q eine der seltenen Mutationen zu sein, die bei *GJB2* zu einer dominant vererbten Form der nichtsyndromischen Gehörlosigkeit führen. Die genaue Auswirkung von R184Q auf die Funktion des C26 ist bisher nicht beschrieben. Eine Mutation an der gleichen Position, bei der es allerdings zum Einbau eines Prolins kommt, R184P, führte in transfizierten HeLa-Zellen dazu, dass keine aktiven Kanäle gebildet werden konnten (d'Andrea et al. 2002).

5.2.2.4. A197S

Die Mutation A197S wurde einmal in heterozygoter Form gefunden. Sie führt dazu, dass durch den Austausch der Base G zu T an Position 589 der Nukleotidsequenz in der vierten transmembranären Domäne TM4 statt des Alanins die Aminosäure Serin kodiert wird, die durch die Hydroxy-Gruppen in ihrer Seitenkette an Wasserstoffbrückenbildungen teilnehmen kann. Da keine Familienmitglieder zu Verfügung standen, bleibt die Rolle, die diese Mutation spielt, unklar. Sie kann entweder dominant sein, durch Veränderung in *GJB2* und einem anderen Gen NSHL verursachen, oder ihr Auftreten fällt zufällig mit einer anderen Ursache für Gehörlosigkeit zusammen.

5.2.2.5. I203K

Der Austausch zweier Basen, TC zu AA an Position 608-609 der Nukleotidsequenz, führt in der vierten transmembranären Protein-Domäne zu dem Ersatz von Isoleucin, einer hydrophoben Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette durch Lysin, einer basischen Aminosäure, deren endständige Amino-Gruppe bei neutralem pH oft positiv geladen ist. Die Familienstudie ergab, dass einfach Heterozygote für I203K ein normales Gehör hatten, was darauf hinweist, dass diese Mutation rezessiv ist (Abb. 8). In der Literatur finden sich keine weiteren Beispiele für eine mögliche strukturelle Auswirkung dieser neu beschriebenen Mutation. Im Allgemeinen werden die vier Transmembran-Domänen der Connexine, wie oben beschrieben, für das Durchdringen der Plasmamembran und das Formen des Connexons mit seinem von sechs Connexinen gebildeten Kanal verantwortlich gemacht (Sáez et al. 2003).

5.2.2.6. L214P

Die Mutation führt zu einem Austausch der Base T zu C an Position 641 der Nukleotidsequenz, so dass im C-terminalen Ende (IC3) des Cx26 die hydrophobe Aminosäure Leucin durch Prolin ersetzt wird. Für diese Sequenzänderung konnten keine einfach heterozygoten Familienangehörige gefunden werden (Abb. 10). Es wurde aber berichtet, dass die Mutter der doppelt heterozygoten Geschwister normal hörend war. Da sie Carrier von L214P sein muss, lässt dies vermuten, dass die durch L214P entstehende Gehörlosigkeit rezessiv vererbt wird.

Bei Funktionsanalysen lässt die L214P-Mutation des *GJB2* gegenüber dem Wildtyp keinen Unterschied in der Expression von Cx26 in der Zellwand erkennen, der gebildete Kanal zeigt jedoch keine Funktion (Mese et al. 2004). IC2 soll mit IC3 gemeinsam einen Komplex bilden, der die pH-abhängige Selektivität des Kanals beeinflusst (Verselis et al. 1994).

5.2.3. Prävalenz von *GJB2*-Mutationen

Über Jahre hat sich gezeigt, dass DFNB1 in vielen Populationen für 30-50% der neurosensorischen rezessiv vererbten NSHL verantwortlich ist (Estivill et al. 1998; Nance et al. 2000; Pampanos et al. 2002; Sobe et al. 2000; Zelante et al. 1997). Diese gehört damit zu den häufigsten angeborenen neurosensorischen Erkrankungen des Menschen. Über das Vorkommen von *GJB2*-abhängiger Schwerhörigkeit bei Afrikanern liegen nur wenige Studien vor (Denoyelle et al. 1997, Brobby et al. 1998, Lench et al. 1998; Ben Arab

et al. 2000, Gasmelseed et al. 2003; Masmoudi et al. 2000; Oliveira et al. 2004) Für Westafrika waren zum Zeitpunkt der vorliegenden Studie außerhalb der o.g. Untersuchung von Brobby in Adamarobe, Ghana, noch keine Daten erhoben worden.

Betrachtet man die Gesamtheit des Vorkommens und Muster der *GJB2*-Mutationen, unterscheiden sich die in der vorliegenden Studie in Ghana ermittelten Ergebnisse stark von denen, die in anderen Populationen gefunden wurden. Der Anteil von 15,9%, den die *GJB2*-Mutationen zu den Fällen von angeborener Gehörlosigkeit in Ghana beitragen, ist relativ klein verglichen mit den 30-50% unter Familien und Personen europäischer Herkunft, vor allem in Mittelmeerländern (Estivill et al. 1998; Denoyelle et al. 1997; Kelley et al. 1998). So fanden sich z.B. bei 210 griechischen Personen mit nicht-syndromischer prälingualer neurosensorischer Gehörlosigkeit in 33,3% der Fälle biallelische *GJB2*-Mutationen (Pampanos et al. 2002).

Auch in einigen anderen Populationen zeigt sich eine Abweichung von der in Europa und Nordamerika beschriebenen Prävalenz von *GJB2*-Mutationen als Ursache angeborener Hörstörungen. So fanden sich in einer Studie in Japan *GJB2*-Mutationen nur bei fünf von 39 Patienten (12%) (Kudo et al. 2000) und bei 169 taiwanesischen Schulkindern mit prälingualer Gehörlosigkeit zeigten sich biallelische Mutationen im *GJB2*-Gen nur in 12 Fällen (7,1%) (Wang et al. 2002). Bei 68 jordanischen Familien mit prälingualer rezessiv vererbter NSHL fand sich nur die 35delG-Mutation des *GJB2* (Medlej-Hashim et al. 2002). In elf von diesen Fällen (16,2%) trat sie homozygot auf, womit die Frequenz von durch *GJB2* verursachter Gehörlosigkeit auch hier deutlich niedriger lag als in den zuvor erwähnten Mittelmeerländern.

Das relativ geringe Vorkommen von *GJB2*-Mutationen in Ghana mag damit zusammenhängen, dass Ursachen von erworbener Gehörlosigkeit in früher Kindheit, wie zum Beispiel Meningitis, Mumps, Masern, Röteln und auch Windpocken in Afrika eine höhere Inzidenz haben und daher dazu beitragen, dass eine größere Anzahl von Fällen fälschlich als angeboren betrachtet wird. Für Ghana liegen keine aktuellen Zahlen zur Prävalenz genetisch verursachter Gehörlosigkeit vor. Anhand von älteren Studien und auch unter Berücksichtigung von Daten aus anderen westafrikanischen Staaten kann man jedoch davon ausgehen, dass die Mehrzahl der Fälle von Schwerhörigkeit erworben ist, hauptsächlich intrauterin oder durch Infektionen während der Kindheit. So waren noch vor wenigen Jahren in Sierra Leone ohne entsprechende Impfungen 46,1% der Hörstörungen, einschließlich postnatal erworbener, im Zusammenhang mit einer Masern-Infektion zu

sehen (Seely et al. 1995), die auch in Ghana einen Anteil von 30 Prozent einnahm (Brobbly 1988).

Eine weitere Möglichkeit für das geringe Vorkommen von *GJB2*-Mutationen in Ghana besteht darin, dass noch nicht identifizierte Mutationen in nicht kodierenden Teilen des *GJB2* existieren oder dass ein anderes Gen als *GJB2* in Ghana eine größere Rolle spielt als beispielsweise in Europa. In vielen verschiedenen Populationen wie Europäern (Estivill et al. 1998a; Denoyelle et al. 1997; Kelley et al. 1998), Ashkenasi-Juden (Morell et al. 1998) und Japanern (Abe et al. 2000) hat DFNB1 einen großen Anteil an der rezessiv vererbten NSHL. Ein Beispiel für NSHL, die auf DFNB1 kartiert und nicht durch Sequenzvarianten im Cx26 verursacht wird, findet sich in der Mutation del(*GJB6*-D13S1830). Sie beeinflusst vermutlich nicht *GJB2*, führt aber zu einer Deletion im benachbarten *GJB6*, das für das *gap junction* Protein Cx30 kodiert (Lerer et al. 2001; del Castillo et al. 2002; Pallares-Ruiz et al. 2002). Meist wurde diese Deletionen bisher in doppelter Heterozygotie mit *GJB2*-Mutationen gefunden, wobei die Betroffenen überwiegend unter kompletter Gehörlosigkeit litten (Feldmann et al. 2004). Homozygot wurde del(*GJB6*-D13S1830) erst sehr selten beschrieben (del Castillo et al. 2002; Pallares-Ruiz et al. 2002). Dagegen, dass del(*GJB6*-D13S1830) in Ghana einen erheblichen Anteil hat, spricht, dass sich in dieser Studie bei nur 6 von 365 Personen eine heterozygote *GJB2*-Mutation fand. Insgesamt ist die Frequenz von del(*GJB6*-D13S1830) bei allen bisher untersuchten Populationen nicht hoch genug, um zu einer großen Zahl von homozygoten Individuen zu führen. Sie machen unter 0,5% aller Fälle prälingualer Hörstörungen ohne *GJB2*-Mutationen aus (del Castillo et al. 2003). Da die Anzahl der Genloci, die für NSHL verantwortlich gemacht werden, ständig zunimmt (Van Camp et al. 2005), könnte auch ein ganz anderes Gen in Westafrika erheblich zur vererbten Gehörlosigkeit beitragen.

Eine dritte Möglichkeit für die niedrige Zahl von *GJB2*-Mutationen könnte darin bestehen, dass diese zwar genauso häufig vorkommen wie in anderen Teilen der Erde, aber die Penetranz aufgrund von noch nicht erkannten Umweltfaktoren niedriger ist. Aufgrund des Studiendesigns dieser Arbeit kann aber keine Aussage zu diesem Punkt gemacht werden.

Ausschlaggebend für hohe Mutationsfrequenzen ist auch die erhebliche Verbesserung der sozialen und ökonomischen Umstände von Gehörlosen seit der Einführung von Gebärdensprache und Gehörlosenschulen in Verbindung mit assortativer Paarung (Nance 2003). So könnte sich zum Beispiel in den USA die Häufigkeit von Schwerhörigkeit durch *GJB2*-Mutationen innerhalb von zwei Jahrhunderten verdoppelt haben (Nance und Kearsy 2004). Die nordafrikanischen Bedouinen sind eine weitere

Population mit einer hohen Frequenz von Gehörlosigkeit, bei ihnen hat eine eigene Gebärdensprache, wie sie auch in Adamarobe beschrieben wurde, Auswirkung auf die *fitness* der Gehörlosen. Zusätzlich besteht eine traditionelle Struktur der Partnerwahl, die sowohl Polygamie als auch Raten von Blutsverwandtschaft von 30-40% mit einer Vorliebe für Ehen zwischen Cousins ersten Grades einschließt (Jaber und Halpern 2000; Kenen und Burck 2002). Bei manchen Stämmen beträgt die Rate von Gehörlosigkeit 2,6% (Scott et al. 1995) und steigert sich weiter. In anderen Populationen dagegen ist *GJB2*-assoziierte Gehörlosigkeit in viel niedrigeren Frequenzen beobachtet worden. In der Mongolei zum Beispiel gibt es nur eine Gehörlosenschule und die Gebärdensprache wurde erst 1995 eingeführt, außerdem ist die *fitness* der Gehörlosen immer noch viel niedriger als die ihrer hörenden Geschwister. Positiv assortative Partnerwahl soll viel seltener sein als in den USA und *GJB2*-Mutationen machen nur 1,3% aller Fälle von Gehörlosigkeit aus (Pandya et al. 2001, Nance und Kearsey 2004). Ghana dürfte mit seinen 10 Gehörlosenschulen und der eingeschränkten Verbreitung der Gebärdensprache hier eine mittlere Stellung einnehmen.

Eine Verfälschung von angenommenen *GJB2*-Mutationsfrequenzen kann im Allgemeinen auch dadurch entstehen, dass Formen der bisher als "nicht-syndromisch" eingestuften Gehörlosigkeit doch assoziierte, nicht-auditorische Merkmale zeigen. Zunächst mögen diese nicht ins Auge fallen, doch bei bekannten Mutationen sollte eine genauere Untersuchung des Phänotyps in Erwägung gezogen werden. So wurden auch Familien beobachtet, deren Schwerhörigkeit zunächst als NSHL eingestuft wurde, bei denen dann jedoch mit fortgeschrittenem Alter die Entwicklung einer Struma erfolgte. Dementsprechend litten sie also doch unter einem später erkannten Pendred-Syndrom (Li et al. 1998).

5.2.4. Besondere *GJB2*-Mutationen in verschiedenen Populationen

Obwohl ein breites Spektrum an rezessiv vererbten Formen der Schwerhörigkeit durch *GJB2*-Mutationen bekannt ist, ist in Nordamerika und Europa die häufigste Mutation eine Deletion eines einzelnen Guanins aus einer Reihe von 6 Guaninen, bekannt als 35delG. Die Frequenz dieser Mutation ist in den Mittelmeerländern am höchsten, dort erreicht die "Carrier-Rate" 1/30 bis 1/35 (Gasparini et al. 2000; Estivill et al. 1998a), und 35delG macht 70% aller *GJB2*-Mutationen aus. In anderen Populationen wird 35delG dagegen gar nicht oder nur vereinzelt gefunden. Studien verschiedener ethnischer Gruppen haben

gezeigt, dass dort unterschiedliche *GJB2*-Mutationen gehäuft vorkommen. So zeigt zum Beispiel die Mutation 167delT (Zelante et al. 1997) eine hohe Prävalenz bei den Ashkenazi-Juden (Lerer et al. 2000; Morell et al. 1998; Sobe et al. 2000). In ostasiatischen Populationen ist die 235delC (Abe et al. 2000) Mutation sehr verbreitet (Fuse et al. 1999; Liu et al. 2002). Unter Indern herrschen die drei Mutationen W24X, W77X und Q124X vor (Kelsell et al. 1997; Maheshwari et al. 2003; Rickard et al. 2001; Scott et al. 1998a). Die vielen weiteren beschriebenen Mutationen wurden meist nur bei wenigen Individuen gefunden (Ballana et al. 2005; Rabionet et al. 2000a).

Im Gegensatz dazu zeigt sich in Ghana R143W als die vorherrschende Mutation, sie trägt 90% zu allen gefundenen *GJB2*-Mutationen bei. Unter den 121 mutierten Chromosomen befinden sich außerdem die sechs neu identifizierten Mutationen L79P, V178A, R184Q, A197S, I203K, und L214P.

Diese eindeutige Zuordnung einzelner Mutationen zu ethnischen Gruppen spricht gegen die ursprüngliche Annahme, es handele sich um *Hot Spots* innerhalb des *GJB2*. Auch gibt es erst einen Bericht über eine nachgewiesene Neumutation in *GJB2* (Shalev und Hujirat 2004). Inzwischen hat sich durch Haplotypenbestimmung bestätigt, dass 35delG in Europa von einem gemeinsamen Gründer stammt und schätzungsweise etwa 500 Generationen beziehungsweise annähernd 10.000 Jahre alt ist (Van Laer et al. 2001, Rothrock et al. 2003). Auch für del(*GJB6*-D13S1830) bei Ashkenazi-Juden wurde ein klarer Gründereffekt beschrieben (del Castillo et al. 2003). Bei der von einem Gründer stammenden R143W-Mutation in Adamarobe (Brobbly et al. 1998) variierten die Haplotypen erheblich zwischen den einzelnen Familien, was darauf hinweist, dass die Mutation in diesem Dorf vor mindestens 60 Generationen erstmals auftrat.

5.2.5. Geografische Verteilung der *GJB2*-Mutationen innerhalb Ghanas

Innerhalb Ghanas zeigt sich eine klare Abnahme der Prävalenz von *GJB2*-Mutationen von Süden nach Norden. Dabei wurde an der Küste eine Rate von *GJB2*-Mutationen gefunden, die fast an die der Mittelmeerländer heranreicht. Geht man von einem gemeinsamen Gründer in Südghana aus, könnte die fehlende Verbreitung über das ganze Land mehrere Gründe haben.

Man kann davon ausgehen, dass eine Durchmischung der verschiedenen Volksgruppen bis heute nur eingeschränkt stattfindet. Die mehr als 70 Sprachen und Dialekte deuten ungefähr die Zahl der Stammesverbände an. Dabei dominieren die Kwa-Sprachen im

Süden und die Gur-Sprachen im Norden. Die heutigen Staatsgrenzen Ghanas sind kolonialen Ursprungs und verlaufen vielfach durch Siedlungsgebiete der sowohl in Ghana als auch in den Nachbarstaaten ansässigen ethnisch-kulturellen Gruppen. Genaue Angaben über die ethnische Zusammensetzung werden in den letzten Jahren von Regierungsseite nicht mehr erstellt, um damit die bestehenden Stammesunterschiede zugunsten eines "Nationalbewusstseins" zu überwinden. Eine eingeschränkte Durchmischung des Nordens und des Südens zeigt sich auch durch die bereits beschriebenen religiösen Unterschiede.

Zwar hat seit der Unabhängigkeit Ghanas die Binnenwanderung stark zugenommen, allerdings einseitig von Norden nach Süden. Heute leben über 10% der Bevölkerung Ghanas im Bereich der Doppelstadt Accra-Tema. Accra ist Sitz von Regierung und Verwaltung, Tema ist wichtigste Hafen- und Industriestadt (eine Auflistung von *homepages* mit aktuellen Informationen über Ghana findet sich am Ende des Literaturverzeichnisses).

Die deutliche geografische Abhängigkeit unterstreicht das Vorhandensein von Gründereffekten. Das gehäufte Auftreten verschiedener *GJB2*-Mutationen im Süden kann aber auch die Theorie eines Selektionsvorteiles unterstützen, da sich in Ghana der Norden und der Süden zum Beispiel auch klimatisch und durch die Häufigkeit einzelner Infektionskrankheiten unterscheiden.

5.2.6. Gibt es einen Selektionsvorteil für *GJB2*-Mutationen?

In Ghana zeigt sich ein Spektrum von *GJB2*-Mutationen, das sich deutlich von dem in anderen Regionen der Erde unterscheidet. Dies führt zu der Annahme, dass verschiedene *GJB2*-Mutationen einen unterschiedlichen funktionellen Einfluss haben. Dieser Unterschied scheint nicht zufällig zu sein, sondern kann zu Spekulationen über den Einfluss von Selektionskräften führen, die einen balancierten Polymorphismus hervorgebracht haben. Die relativ hohe Trägerrate von *GJB2*-Mutationen, die rezessiv vererbte Schwerhörigkeit verursachen, im humanen genetischen Pool lässt die Frage nach einem Vorteil des Phänotyps der Träger aufkommen, der den Nachteil der Schwerhörigkeit ausgleicht.

Das bekannteste Beispiel für balancierende Selektion ist die Sichelzellanämie, bei der heterozygote Merkmalsträger resistenter gegen eine Malariainfektion mit *Plasmodium falciparum* sind als Personen ohne die verursachende Mutation. In homozygoter Form jedoch vermindert die Sichelzellanämie die Lebenserwartung. Auch bei der wegen ihrer

hohen Frequenz häufig zum Vergleich mit den *GJB2*-Mutationen herangezogenen delta-F508 Mutation des zystische Fibrose-Gens CFTR wurde ein Selektionsvorteil für heterozygote Träger diskutiert (Romeo et al. 1989; Pier et al. 1998; Hogenauer et al. 2000).

Beide Gruppen der *GJB2*-Mutationen, ghanaische und europäische, rufen in homozygoter Ausprägung offensichtlich sehr ähnliche Formen der Schwerhörigkeit hervor. Ihre unterschiedliche Rolle könnte entweder bei heterozygoten Trägern oder in Bezug auf eine andere Funktion des Connexins, möglicherweise an einem anderen Expressionsort außerhalb der Cochlea, zu finden sein. So wird Cx26 auch in den ekkrinen Schweißdrüsen und den Keratinozyten der Haut exprimiert und einige, vor allem dominante *GJB2*-Mutationen, sind mit verschiedenen Hauterkrankungen assoziiert (Heathcote et al. 2000; Haftek et al. 1999; Kelsell et al. 2000; Lucke et al. 1999; Labarthe et al. 1998; Maestrini et al. 1999; Richard et al. 2003). Immunhistochemische Untersuchungen zeigten eine starke Expression von Cx26 in Keratinozyten psoriatischer Haut und chronischer Wunden bei fehlendem Nachweis in normaler Epidermis (Rivas et al. 1997). Es wäre also möglich, dass bestimmte *GJB2*-Mutationen physiologische Hautfunktionen, z.B. im Zusammenhang mit der Thermoregulation oder die Dicke der Epidermis, beeinflussen.

Sowohl bei homozygoten als auch heterozygoten Trägern der in Ghana häufig auftretenden R143W-Mutation zeigte die histologische Untersuchung der Haut eine signifikant dickere Epidermis sowie höhere Kalium- und Chloridkonzentrationen des Schweißes als bei den Familienangehörigen, die keine *GJB2*-Mutation trugen (Meyer et al. 2002). Dies lässt an einen Heterozygotenvorteil denken. Die Befunde werden unterstützt durch die Tatsache, dass NSHL-verursachende *GJB2*-Mutationen *in vitro* die Rate an Zelltod bei Keratinozyten und Fibroblasten gegenüber dem Wildtyp reduzierten. Noch deutlicher ist der Unterschied gegenüber den bei Hautkrankheiten vorkommenden *GJB2*-Mutationen (Common et al. 2004). Dieses könnte auf einen evolutionären Vorteil für die heterozygoten Genträger hinweisen wie z.B. ein ungünstigeres Milieu auf der Haut für die Besiedelung mit pathogenen Keimen oder eine robustere mechanische Barriere gegen Insektenstiche und andere Traumata. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass das Bakterium *Shigella flexneri* die Öffnung von Cx26 Hemikanälen verursachen und damit möglicherweise die bakterielle Invasion durch die Induktion von Zellsignalen vorantreiben kann (Tran Van Nhieu G. et al. 2003). Veränderte Cx26-Kanäle könnten also einen gewissen Schutz vor Shigellose vermitteln.

Weitere Studien dieser Art könnten für das generelle Verständnis der Evolution von Erbkrankheiten von großer Bedeutung sein.

6. Zusammenfassung

Seit der Kartierung des ersten Krankheitslocus für nichtsyndromische rezessive Gehörlosigkeit DFNB1 auf 13q12 wurden mehr als 60 Loci für rezessive nichtsyndromische Schwerhörigkeit identifiziert, und über 30 der betroffenen Gene wurden kloniert. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Mutationen in einem dieser Gene, dem für Cx26 kodierenden *GJB2*, die Ursache für die häufigste Form dieser Art von Gehörlosigkeit sind.

In einem Dorf in Ghana, in dem auffällig viele Gehörlose leben, war bei allen Betroffenen die rezessiv vererbte Cx26-Mutation R143W gefunden worden.

In der vorliegenden Studie wurden 365 anscheinend nicht verwandte Personen mit prälingualer nicht-syndromischer neurosensorischer Gehörlosigkeit rekrutiert. Sie stammten aus neun Gehörlosenschulen, die über ganz Ghana verteilt in neun der zehn Regionen Ghanas lagen. Von allen wurde die medizinische Anamnese aufgenommen, eine ohrenärztliche Untersuchung einschließlich Audiometrie durchgeführt und das kodierende Exon 2 von *GJB2* untersucht.

Aus den Untersuchungen ließ sich folgern, dass 17,5% der Fälle von neurosensorischer Gehörlosigkeit durch Mutationen in *GJB2* verursacht waren. 90% der davon betroffenen Personen waren homozygot für R143W. Unter den 121 mutierten Chromosomen fanden sich die sechs neu identifizierten Mutationen L97P, V178A, R184Q, A197S, I203K und L214P, wobei I203K auf einem Dinukleotidaustausch beruht und R184Q dominant zu sein scheint. Keine der sechs neu identifizierten Mutationen bewirkt einen Abbruch der Aminosäurenkette. In nur einem Fall wurde eine früher beschriebene Mutation gefunden. Dabei handelte es sich um 35insG in doppelter (*compound*) Heterozygotie mit R143W.

Innerhalb Ghanas zeigte sich eine klare Abnahme der Prävalenz von *GJB2*-Mutationen von Süden nach Norden. In der *Central Region* an der Küste wurden über 30% der Fälle von nichtsyndromischer neurosensorischer Gehörlosigkeit durch Mutationen in *GJB2* verursacht, während sie in den nördlichen Regionen gar nicht gefunden wurden. Die deutliche regionale Häufung von Mutationen könnte auf Gründereffekte hinweisen.

Art und Verteilung der *GJB2*-Mutationen lassen auch Spekulationen über balancierende Evolution zu, die generell zum Verständnis monogener Erbkrankheiten von Bedeutung sein könnten.

7. Literaturverzeichnis

- Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ (2000) Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet* 37:41-43.
- Antonarakis SE (1998) Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat.* 11(1):1-3
- Azaiez H, Chamberlin GP, Fischer SM, Welp CL, Prasad SD, Taggart RT, del Castillo I, Van Camp G, Smith RJH (2004) GJB2: the spectrum of deafness-causing allele variants and their phenotype. *Hum Mutat* 24:305-311
- Ballana E, Ventayol M, Rabionet R, Gasparini P, Estivill X (2005) Connexins and deafness Homepage. World wide web URL: <http://www.crg.es/deafness>
- Bamiou DE, Phelps P, Sirimanna T (2000) Temporal bone computed tomography findings in bilateral sensorineural hearing loss. *Arch Dis Child* 82(3):257-60
- Beltramello M, Piazza V, Bukauskas FF, Pozzan T, Mammano F (2005) Impaired permeability to Ins(1,4,5)P3 in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nat Cell Biol.* 7(1):63-9. Epub 2004 Dec 12
- Ben Arab S, Hmani M, Denoyelle F, Boulila-Elgaied A, Chardenoux S, Hachicha S, Petit C, Ayadi H (2000) Mutations of GJB2 in three geographic isolates from northern Tunisia: evidence for genetic heterogeneity within isolates. *Clin Genet* 57(6):439-43
- Brobbly GW (1988) Causes of congenital and acquired total sensorineural hearing loss in Ghanaian children. *Trop Doct.* 18(1):30-2.
- Brobbly GW, Muller-Myhsok B, Horstmann RD (1998) Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. *New Eng J Med* 338: 548-550
- Brown KA, Janjua AH, Karbani G, Parry G, Noble A, Crockford G, Bishop DT, Newton VE, Markham AF, Mueller RF (1996) Linkage studies of non-syndromic recessive deafness (NSRD) in a family originating from the Mirpur region of Pakistan maps DFNB1 centromeric to D13S175. *Hum Molec Genet* 5:169-173
- Bruzzone R, White TW, Paul DL (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238:1-27.
- Bruzzone R, Gomes D, Denoyelle E, Duval N, Perea J, Veronesi V, Weil D, Petit C, Gabellec MM, D'Andrea P, White TW (2001) Functional analysis of a dominant mutation of human connexin26 associated with nonsyndromic deafness. *Cell Commun Adhes* 8(4-6): 425-31
- Bruzzone R, Veronesi V, Gomes D, Bicego M, Duval N, Marlin S, Petit C, D'Andrea P, White TW (2003) Loss-of-function and residual channel activity of connexin26 mutations associated with non-syndromic deafness. *FEBS Lett.* 533(1-3):79-88.

- Carrasquillo MM, Zlotogora J, Barges S, Chakravarti A (1997) Two different connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations. *Hum. Molec Genet* 6: 2163-2172
- Cohn ES, Kelley PM (1999) Clinical phenotype and mutations in connexin 26 (DFNB1/GJB2), the most common cause of childhood hearing loss. *Am J Med Genet* 24;89(3):130-6.
- 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. Molec. Genet.* 3: 2219-2222
- Common JE, Di WL, Davies D, Kelsell DP (2004) Further evidence for heterozygote advantage of GJB2 deafness mutations: a link with cell survival. *J Med Genet.* 41(7):573-5.
- Coucke P, Van Camp G, Djoyodiharjo B, Smith SD, Frants RR, Padberg GW, Darby JK, et al (1994) Linkage of autosomal dominant hearing loss to the short arm of chromosome 1 in two families. *N Engl J Med* 331:425-431
- Cryns K, Orzan E, Murgia A, Huygen PL, Moreno F, del Castillo I, Chamberlin GP, Azaiez H, Prasad S, Cucci RA, Leonardi E, Snoeckx RL, Govaerts PJ, Van de Heyning PH, Van de Heyning CM, Smith RJ, Van Camp G (2004) A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. *J Med Genet.* Mar;41(3):147-54.
- 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(3):685-91
- Del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Telleria D, Menendez I, Moreno F (2002) A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *New Eng. J. Med.* 346: 243-249
- Del Castillo I, Moreno-Pelayo MA, Del Castillo FJ, Brownstein Z, Marlin S, Adina Q, Cockburn DJ, Pandya A, Siemering KR, Chamberlin GP, Ballana E, Wuyts W, Maciel-Guerra AT, Alvarez A, Villamar M, Shohat M, Abeliovich D, Dahl HH, Estivill X, Gasparini P, Hutchin T, Nance WE, Sartorato EL, Smith RJ, Van Camp G, Avraham KB, Petit C, Moreno F (2003) Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. *Am J Hum Genet.* 73(6):1452-8. Epub Oct 21.2003
- Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl H-HM, Middleton A, Houseman MJ, Dode C, Marlin S and 17 others (1997) Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. *Hum. Molec. Genet.* 6: 2173-2177

- Denoyelle F, Marlin S, Weil D, Moatti L, Chauvin P, Garabedian E-N, Petit C (1999) Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 353: 1298-1303
- 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
- Feldmann D, Denoyelle F, Chauvin P, Garabedian EN, Couderc R, Odent S, Joannard A, Schmerber S, Delobel B, Leman J, Journal H, Catros H, Le Marechal C, Dollfus H, Eliot MM, Delaunoy JP, David A, Calais C, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Bouccara D, Sterkers O, Huy PT, Goizet C, Duriez F, Fellmann F, Helias J, Vigneron J, Montaut B, Lewin P, Petit C, Marlin S (2004) Large deletion of the GJB6 gene in deaf patients heterozygous for the GJB2 gene mutation: genotypic and phenotypic analysis. *Am. J. Med. Genet.* 127A: 263-267
- Forge A, Marziano NK, Casalotti SO, Becker DL, 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(4-6):341-6.
- Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, Sugii A, Hibino H, Kubo T (1999) Three novel connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. *Neuroreport* 10:1853-1857.
- Fujimoto K (1995) Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *J Cell Sci* 108 (Pt 11):3443-9.
- Gabriel HD, Jung D, Butzler C, Temme A, Traub O, Winterhager E, Willecke K (1998) Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice *J Cell Biol.* 140(6):1453-61
- Gasmelseed NM, Schmidt M, Magzoub MM, Macharia M, Elmustafa OM, Ototo B, Winkler E, Ruge G, Horstmann RD, Meyer CG (2004) Low frequency of deafness-associated GJB2 variants in Kenya and Sudan and novel GJB2 variants *Hum Mutat* 23(2):206-7.
- Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brondum-Nielsen K, Metspalu A, Oitmaa E, Pisano M, Fortina P, Zelante L, Estivill X (2000) High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG. *Eur J Hum Genet* 8(1):19-23
- Goldberg GS, Lampe PD, Nicholson BJ (1997) Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat Cell Biol.* 1(7):457-9
- Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Sheffield VC, Smith RJ (1999) Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *J.A.M.A.* 281: 2211-2216

- Green GE, Smith RJ, Bent JP, Cohn ES (2000) Genetic testing to identify deaf newborns. *JAMA* 13;284(10):1245.
- Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, Melchionda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N, Rabionet R, Arbones M, Monica MD, Estivill X, Zelante L, Lang F, Gasparini P (1999) Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nat Genet* 23(1):16-8
- Griffith AJ, Friedmann TB (1999) Making sense out of sound, *Nat genet* 21(4):347-9
- Griffith AJ (2001) Genetic analysis of the connexin-26 M34T variant. *J Med Genet* 38(7):E24
- Guilford P, Ben Arab S, Blanchard S, Levilliers J, Weissenbach J, Belkahia A, Petit C (1994a) A non-syndromic form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genet* 6: 24-28
- Guilford P, Ayadi H, Blanchard S, Chaib H, Le Paslier D, Weissenbach J, Drira M, Petit C (1994b) A human gene responsible for neurosensory, non-syndromic recessive deafness is a candidate homologue of the mouse sh-1 gene. *Hum. Molec. Genet.* 3: 989-993
- Haftak M, Kowalewski C, Mesnil M, Blaszczyk M, Schmitt D (1999) Internalization of gap junctions in benign familial pemphigus (Hailey-Hailey disease) and keratosis follicularis (Darier's disease). *Br J Dermatol* 141(2):224-30
- Hayes D. (1999) State programs for universal newborn hearing screening . *Pediatr Clin North Am.* 1999 Feb;46(1):89-94.
- Heathcote K, Syrris P, Carter ND, Patton MA (2000) A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis (MIM 148350). *J Med Genet.* 37(1):50-1
- Hogenauer C, Santa Ana CA, Porter JL, Millard M, Gelfand A, Rosenblatt RL, Prestidge CB, Fordtran JS. (2000) Active intestinal chloride secretion in human carriers of cystic fibrosis mutations: an evaluation of the hypothesis that heterozygotes have subnormal active intestinal chloride secretion. *Am J Hum Genet* 67: 1422-1427
- Hone SW, Smith RJ (2002) Medical evaluation of pediatric hearing loss. Laboratory, radiographic, and genetic testing. *Otolaryngol Clin North Am.* 35(4):751-64.
- Hsieh C-L, Kumar NM, Gilula NB, Francke U (1991) Distribution of genes for gap junction membrane channel proteins on human and mouse chromosomes. *Somat Cell Molec Genet* 17: 191-200
- Hutchin TP, Thompson KR, Parker M, Newton V, Bitner-Glindzicz M, Mueller RF (2001) Prevalence of mitochondrial DNA mutations in childhood/congenital onset non-syndromal sensorineural hearing impairment. *J Med Genet* 38(4):229-31.
- Jaber L, Halpern GJ, Shohat T (2000) Trends in the frequencies of consanguineous marriages in the Israeli Arab community *Clin Genet* 58(2):106-10.

- Janecke AR, Hirst-Stadlmann A, Gunther B, Utermann B, Muller T, Loffler J, Utermann G, Nekahm-Heis D (2002) Progressive hearing loss, and recurrent sudden sensorineural hearing loss associated with GJB2 mutations--phenotypic spectrum and frequencies of GJB2 mutations in Austria. *Hum Genet* 111(2):145-53. Epub 2002 Jul 3.
- Kelley PM, Harris DJ, Comer BC, Askew JW, Fowler T, Smith SD, Kimberling WJ (1998) Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *Am J Hum Genet* 62: 792-799
- Kelley PM, Abe S, Askew JW, Smith SD, Usami S, Kimberling WJ (1999) Human connexin 30 (GJB6), a candidate gene for nonsyndromic hearing loss: molecular cloning, tissue-specific expression, and assignment to chromosome 13q12. *Genomics* 62(2):172-6.
- Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387: 80-83
- Kelsell DP, Wilgoss AL, Richard G, Stevens HP, Munro CS, Leigh IM (2000) Connexin mutations associated with palmoplantar keratoderma and profound deafness in a single family. *Eur J Hum Genet* 8(6):469-72. Corrected and republished from: *Eur J Hum Genet*. 2000 Feb;8(2):141-4.
- Kelsell DP, Dunlop J, Hodgins MB (2001) Human diseases: clues to cracking the connexin code? *Trends Cell Biol* 11:2-6
- Kenan G, Burck L (2002) Trends in patrilineal parallel first cousin marriages among Israeli Arabs: 1949-1995 *Ann Hum Biol* 29(4):398-413
- Kenna MA, Wu BL, Cotanche DA, Korf BR, Rehm HL (2001) Connexin 26 studies in patients with sensorineural hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127(9):1037-42.
- Kenneson A, Van Naarden Braun K, Boyle C (2002) GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet Med* 4(4):258-74
- Kiang DT, Jin N, Tu ZJ, Lin HH (1997) Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene* 199(1-2):165-71
- Kikuchi T, Kimura R, Paul D, Adams J (1995) Gap junctions in rat cochlea: Immunohistochemical analysis. *Anat. Embryol.* 191:101-118
- Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC (2000) Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev.* 32(1):163-6.
- Krutovskikh V, Yamasaki H (2000) Connexin gene mutations in human genetic diseases. *Mutat Res* 462(2-3):197-207

- Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lutjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ (1999) KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 96(3):437-46
- 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(2):141-5
- Kumar NM, Gilula NB (1992) Molecular biology and genetics of gap junction channels. *Semin Cell Biol* 3(1):3-16
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84(3):381-8.
- Labarthe MP, Bosco D, Saurat JH, Meda P, Salomon D (1998) Upregulation of connexin 26 between keratinocytes of psoriatic lesions. *J Invest Dermatol* 111(1):72-6.
- Lautermann J, ten Cate WJ, Altenhoff P, Grummer R, Traub O, Frank H, Jahnke K, Winterhager E (1998) Expression of the gap-junction connexins 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res* 294(3):415-20.
- Lautermann J, Frank HG, Jahnke K, Traub O, Winterhager E (1999) Developmental expression patterns of connexin26 and -30 in the rat cochlea. *Dev Genet* 25(4):306-11.
- Lawn JE, Reef S, Baffoe-Bonnie B, Adadevoh S, Caul EO, Griffin GE (2000) Unseen blindness, unheard deafness, and unrecorded death and disability: congenital rubella in Kumasi, Ghana. *Am J Public Health* 90(10):1555-61.
- Lefebvre PP, Van De Water TR (2000) Connexins, hearing and deafness: clinical aspects of mutations in the connexin 26 gene. *Brain Res Brain Res Rev* 32(1):159-62.
- Lench N, Houseman M, Newton V, Van Camp G, Mueller R (1998) Connexin-26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness. *Lancet* 351: 415
- Léon PE, Raventos H, Lynch E, Morrow J, King M-C (1992) The gene for an inherited form of deafness maps to chromosome 5q31. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5181- 5184
- Lerer I, Sagi M, Malamud E, Levi H, Raas-Rothschild A, Abeliovich D (2000) Contribution of connexin 26 mutations to nonsyndromic deafness in ashkenazi patients and the variable phenotypic effect of the mutation 167delT. *Am J Med Genet* 95:53-6
- Lerer I, Sagi M, Ben-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D (2001) A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: A novel founder mutation in Ashkenazi Jews. *Hum Mutat* 18(5):460
- Li H, Liu TF, Lazrak A, Peracchia C, Goldberg GS, Lampe PD, Johnson RG (1996) Properties and regulation of gap junctional hemichannels in the plasma membranes of cultured cells. *J Cell Biol* 134(4):1019-30

- Li XC, Everett LA, Lalwani AK, Desmukh D, Friedman TB, Green ED, Wilcox ER (1998) A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness *Nat Genet* 18 (3): 215-7
- Liu Y, Ke X, Qi Y, Li W, Zhu P (2002) Connexin26 gene (GJB2): prevalence of mutations in the Chinese population. *J Hum Genet* 47(12):688-90
- Lucke T, Choudhry R, Thom R, Selmer IS, Burden AD, Hodgins MB (1999) Upregulation of connexin 26 is a feature of keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis, vaginal epithelium, and buccal epithelium. *J Invest Dermatol* 112(3):354-61.
- Lucotte G, Mercier G (2001) Meta-analysis of GJB2 mutation 35delG frequencies in Europe. *Genet Test* 5(2):149-52
- Maestrini E, Korge BP, Ocana-Sierra J, Calzolari E, Cambiaghi S, Scudder PM, Hovnanian A, Monaco AP, Munro CS (1999) A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum. Molec. Genet.* 8: 1237-1243
- Maheshwari M, Vijaya R, Ghosh M, Shastri S, Kabra M, Menon PS (2003) Screening of families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI) for mutations in GJB2 gene: Indian scenario. *Am J Med Genet A* 120(2):180-4.
- Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA (1977) Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J Cell Biol* 74(2):629-45
- Martin PE, Coleman SL, Casalotti SO, Forge A, Evans WH (1999) Properties of connexin26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness. *Hum Mol Genet* 8(13):2369-76.
- Martin PE, Steggles J, Wilson C, Ahmad S, Evans WH (2000) Targeting motifs and functional parameters governing the assembly of connexins into gap junctions. *Biochem J* 350 Pt 3:943
- Martin PE, Blundell G, Ahmad S, Errington RJ, Evans WH (2001) Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *J Cell Sci* 114(Pt 21):3845-55.
- Masmoudi S, Charfedine I, Hmani M, Grati M, Ghorbel AM, Elgaied-Boulila A, Drira M, Hardelin JP, Ayadi H (2000) Pendred syndrome: phenotypic variability in two families carrying the same PDS missense mutation. *Am J Med Genet* 90(1):38-44.
- Maw MA, Allen-Powell DR, Goodey RJ, Stewart IA, Nancarrow DJ, Hayward NK, Gardner RJM (1995) The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. *Am J Hum Genet* 57: 629-635
- McKusick VA (1992) Human genetics: the last 35 years, the present, and the future. *Am J Hum Genet* 50(4):663-70

- Medlej-Hashim M, Mustapha M, Chouery E, Weil D, Parronau J, Salem N, Delague V, Loiselet J, Lathrop M, Petit C, Megarbane A (2002) Non-syndromic recessive deafness in Jordan: mapping of a new locus to chromosome 9q34.3 and prevalence of DFNB1 mutations. *Eur J Hum Genet* 10(6):391-4.
- Mertes G, Schäfer T, Schild TA, Schmidt G, Schuster D, vom Stein J (1997) Automatische genetische Analytik Neue Methoden d. DNA-Analyse basierend auf innovativer PCR-Technologie und multifluorophorer Detektion. Verlag: Wiley-VCH Weinheim 1. Auflage ISBN-Nummer: 3527300767
- Mese G, Londin E, Mui R, Brink PR, White TW (2004) Altered gating properties of functional Cx26 mutants associated with recessive non-syndromic hearing loss *Hum Genet.* 115(3):191-9. Epub 2004 Jul 07.
- Meyer CG, Amedofu GK, Brandner JM, Pohland D, Timmann C, Horstmann RD (2002) Selection for deafness? *Nat Med* 8(12):1332-3.
- 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
- Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB (1998) Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *New Eng. J. Med.* 339: 1500-1505
- Morton NE (1991) Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann. NY Acad. Sci.* 630: 16-31
- Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vianzi C, Leonardi E, Arslan E, Zacchello F, (1999) Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J. Med. Genet.* 36: 829-832
- Nance WE, Liu X-Z, Pandya A (2000) Relation between choice of partner and high frequency of connexin-26 deafness. *Lancet* 356:500-501
- Nance WE. The genetics of deafness (2003) *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 9(2):109-19.
- Nance WE, Kearsey MJ. (2004) Relevance of connexin deafness (DFNB1) to human evolution. *Am J Hum Genet* 74(6):1081-7. Epub 2004 Apr 09
- Newton VE, Liu X, Ke X, Xu L, Bamford JM (1999) Evaluation of the use of a questionnaire to detect hearing loss in babies in China. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 48(2):125-9.
- Nicholson BJ, Weber PA, Cao F, Chang H, Lampe P, Goldberg G (2000) The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz J Med Biol Res* 33(4):369-78

- Pallares-Ruiz N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M, Roux A-F (2002) A large deletion including most of GJB6 in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *Europ J Hum Genet* 10: 72-76
- Pampanos A, Neou P, Iliades T, Apostolopoulos N, Voyiatzis N, Grigoriadou M, Katsichti L, Skevas A, Petersen MB (2000) Pseudodominant inheritance of DFNB1 deafness due to the common 35delG mutation. (Letter) *Clin Genet* 57: 232-234
- Pampanos A, Economides J, Iliadou V, Neou P, Leotsakos P, Voyiatzis N, Eleftheriades N, Tsakanikos M, Antoniadis T, Hatzaki A, Konstantopoulou I, Yannoukakos D, Gronskov K, Brondum-Nielsen K, Grigoriadou M, Gyftodimou J, Iliades T, Skevas A, Petersen MB (2002) Prevalence of GJB2 mutations in prelingual deafness in the Greek population. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 65(2):101-8.
- Pandya A, Xia XJ, Erdenetungalang R, Tekin M, White TW, Radnaabazar J, Dangaasuren B, Nance WE (2001) low frequency and unique spectrum of connexin 26 (Cx26) mutations in Mongolia: role of relaxed selection and assortative mating *Am J Hum Genet Suppl* 69:590
- Pandya A, Arnos KS, Xia XJ, Welch KO, Blanton SH, Friedman TB, Garcia Sanchez G, Liu MD XZ, Morell R, Nance WE (2003) Frequency and distribution of GJB2 (connexin 26) and GJB6 (connexin 30) mutations in a large North American repository of deaf probands. *Genet Med* 5: 295-303
- Park HJ, Hahn SH, Chun YM, Park K, Kim HN (2000) Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss. *Laryngoscope* 110(9):1535-8.
- Petit C, Levilliers J, Marlin S, Hardelin J-PS (2001) Hereditary hearing loss. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Vol. IV. Motreal, Canada: McGraw-Hill. Pp 6281-6328
- Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH (1998) Salmonella typhi uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 393: 79-82
- Purnick PE, Oh S, Abrams CK, Verselis VK, Bargiello TA (2000) Reversal of the gating polarity of gap junctions by negative charge substitutions in the N-terminus of connexin 32. *Biophys J* 79(5):2403-15.
- Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, et al. (1993) Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 4(3):289-94.
- Rabionet R, Gasparini P, Estivill X (2000a) Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Hum. Mutat* 16: 190-202
- Rabionet R, Zelante L, Lopez-Bigas N, D'Agruma L, Melchionda S, Restagno G, Arbones ML, Gasparini P, Estivill X (2000b) Molecular basis of childhood deafness resulting from mutations in the GJB2 (connexin 26) gene. *Hum Genet* 106: 40-44

- Richard G White TW Smith L E Bailey RA Compton JG Paul DL Bale SJ (1998) Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma. *Hum Genet* 103: 393-399, 1998.
- Richard G (2003) Connexin gene pathology *Clin Exp Dermatol* 28:397-409
- Rickard S, Kelsell DP, Sirimana T, Rajput K, MacArdle B, Bitner-Glindzicz M (2001) Recurrent mutations in the deafness gene GJB2 (connexin 26) in British Asian families. *J Med Genet* 38(8):530-3.
- Rivas MV, Jarvis ED, Morisaki S, Carbonaro H, Gottlieb AB, Krueger JG (1997) Identification of aberrantly regulated genes in diseased skin using the cDNA differential display technique. *J Invest Dermatol.* 108(2):188-94.
- Romeo G, Devoto M, Galietta LJ (1989) Why is the cystic fibrosis gene so frequent? *Hum Genet.*84(1):1-5.
- Rothrock CR, Murgia A, Sartorato EL, Leonardi E, Wei S, Lebeis SL, Yu LE, Elfenbein JL, Fisher RA, Friderici KH (2003) Connexin 26 35delG does not represent a mutational hotspot. *Hum Genet* 113: 18-23
- Rouan F, White TW, Brown N, Taylor AM, Lucke TW, Paul DL, Munro CS, Uitto J, Hodgins MB, Richard G (2001) trans-dominant inhibition of connexin-43 by mutant connexin-26: implications for dominant connexin disorders affecting epidermal differentiation. *J Cell Sci* 114(Pt 11):2105-13.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1998) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839):487-91.
- Sambrook J, Fritsch E & Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12):5463-7
- Scott DA Carmi R Elbedour K Duyk GM Stone EM Sheffield VC (1995) Nonsyndromic autosomal recessive deafness is linked to the DFNB1 locus in a large inbred Bedouin family from Israel. (Letter) *Am. J. Hum. Genet.* 57: 965-968
- Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, Srisailapathy CR, Rosengren SS, Markham AF, Mueller RF, Lench NJ, Van Camp G, Smith RJ, Sheffield VC (1998a) Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* 11:387-394.
- Seely DR, Gloyd SS, Wright AD, Norton SJ (1995) Hearing loss prevalence and risk factors among Sierra Leonean children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 121(8):853-8.

- Shalev SA, Hujirat Y (2004) Maternal origin of a de novo mutation of the connexin 26 gene resulting in recessive nonsyndromic deafness. *Am J Med Genet A* 124(4):411-2
- Sobe T, Vreugde S, Shahin H, Berlin M, Davis N, Kanaan M, Yaron Y, Orr-Urtreger A, Frydman M, Shohat M, Avraham KB (2000) The prevalence and expression of inherited connexin 26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss in the Israeli population. *Hum. Genet.* 106: 50-57
- Torok K, Stauffer K, Evans WH (1997) Connexin 32 of gap junctions contains two cytoplasmic calmodulin-binding domains. *Biochem J* 326 (Pt 2):479-83.
- Tran Van Nhieu G, Clair C, Bruzzone R, Mesnil M, Sansonetti P, Combettes L (2003) Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of *Shigella* in epithelial cells. *Nat Cell Biol* 5(8):720-6.
- Van Camp G, Willems PJ, Smith RJH (1997) Nonsyndromic hearing impairment: unparalleled heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 758-764
- Van Camp G, Smith RJH (2005) Hereditary Hearing Loss Homepage. World wide web URL: <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>
- Van Laer L, Coucke P, Mueller RF, Caethoven G, Flothmann K, Prasad SD, Chamberlin GP, Houseman M, Taylor GR, Van de Heyning CM, Franssen E, Rowland J, Cucci RA, Smith RJ, Van Camp G (2001) A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *J Med Genet* 38(8):515-8.
- Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, Van Camp G (2003) Nonsyndromic hearing loss. *Ear Hear* 24(4):275-88.
- Verselis VK, Ginter CS, Bargiello TA (1994) Opposite voltage gating polarities of two closely related connexins. *Nature* 368(6469):348-51
- Wang YC, Kung CY, Su MC, Su CC, Hsu HM, Tsai CC, Lin CC, Li SY (2002) Mutations of Cx26 gene (GJB2) for prelingual deafness in Taiwan. *Eur J Hum Genet* 10(8):495-8.
- Wang HL, Chang WT, Li AH, Yeh TH, Wu CY, Chen MS, Huang PC (2003) Functional analysis of connexin-26 mutants associated with hereditary recessive deafness. *J Neurochem* 84(4):735-42.
- Wessex Universal Neonatal Hearing Screening Trial Group, no authors listed (1998) Controlled trial of universal neonatal screening for early identification of permanent childhood hearing impairment. *Lancet* 352(9145):1957-64
- White TW, Bruzzone R, Wolfram S, Paul DL, and Goodenough DA (1994) Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J Cell Biol* 125: 879-892
- White TW, Paul DL, Goodenough DA, and Bruzzone R (1995) Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Mol Biol Cell* 6: 459-470

- White TW, Bruzzone R (1996) Multiple connexin proteins in single cellular channels: connexin compatibility and functional consequences, *J Bioenerg Biomembr* 28:339-350
- White TW Deans MR Kelsell DP Paul DL (1998) Connexin mutations in deafness. *Nature* 394: 630-631
- Wilcox ER, Everett LA, Li XC, Lalwani AK, Green ED (2000) The PDS gene, Pendred syndrome and non-syndromic deafness DFNB4. *Adv Otorhinolaryngol* 56:145-51.
- Wilcox SA, Saunders K, Osborn AH, Arnold A, Wunderlich J, Kelly T, Collins V, Wilcox LJ, McKinlay Gardner RJ, Kamarinos M, Cone-Wesson B, Williamson R, Dahl HH (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. *Europ. J. Cell Biol.* 53: 275-280,
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome *Biol Chem* 383:725-737
- Zelante L, Gasparini P, Estivill X, Melchionda S, D'Agruma L, Govea N, Mila M, Della Monica M, Lutfi J, Shohat M, Mansfield E, Delgrosso K, Rappaport E, Surrey S, Fortina P (1997) Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Hum. Molec. Genet.* 6: 1605-1609
- Zhou XW, Pfahnl A, Werner R, Hudder A, Llanes A, Luebke A, Dahl G (1997) Identification of a pore lining segment in gap junction hemichannels. *Biophys J* 72(5):1946-53.

Internetseiten, sofern nicht bereits oben namentlich zitiert:

- The National Center for Biotechnology Information:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Weltbank:
<http://www.worldbank.org/>
- WHO:
<http://www.who.int/countries/gha/en/>
- GHANA - A Country Study
<http://memory.loc.gov/frd/cs/ghtoc.html>
- Languages of Ghana
http://www.ethnologue.com/show_country.asp?name=Ghana
- CIA - The World Factbook - Ghana (6/2005)
<http://www.cia.gov/cia/publications/factbook/geos/gh.html>

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. R.D. Horstmann danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin sowie die Möglichkeit der selbständigen Arbeit in Ghana,
Frau Dr. A. Gelhaus für die Einführung in die molekulargenetischen Arbeitstechniken und die zuverlässige Betreuung,
allen Mitarbeitern der Abteilung für tropenmedizinische Grundlagenforschung für den angenehmen Laboralltag und besonders Frau B. Muntau für ihre tatkräftige Unterstützung und Anleitung bei der Versuchsdurchführung.

Herrn G. K. Amedofu, MD, der School of Medical Sciences, University of Science and Technology, Kumasi, danke ich für die Hilfe bei der Organisation des Projektes in Ghana, Unterstützung beim Einholen aller Genehmigungen sowie das Erstellen der Audiogramme. Für die Hilfe bei der Durchführung der Studie an den Hörlosenschulen danke ich außerdem Frau P. Asante und Frau G. Ocansey aus der Abteilung für HNO des Komfo Anokye Teaching Hospital in Kumasi, sowie Herrn P. Bekyir.
Herrn Dr. C. Hamelmann danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Fahrzeuge und der schönen Unterkunft in Kumasi.
Ich bedanke mich bei allen Direktoren und Lehrern der teilnehmenden Schulen sowie bei allen Schülern, Eltern und anderen eingebundenen Angehörigen für ihre Kooperation.

Für ihre Geduld, ihr Verständnis und viele kleine und große Hilfeleistungen danke ich meinen Freunden, meiner Schwester und meinen Eltern.

Diese Arbeit wurde unterstützt von der Volkswagen-Stiftung.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Katrin Albrecht
Adresse	Brockmannsweg 2c 20146 Hamburg
Geburtsdatum	02.07.1974
Geburtsort	Langen
Eltern	Annemarie Albrecht Uwe Albrecht

Schulbildung

1984-1993	Gymnasium Grootmoor, Hamburg
19.06.1993	Abitur

Hochschulstudium

10/1993-06/2001	Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
13.06.2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit

11/2001-04/2003	Ärztin im Praktikum in der Inneren Medizin, Bethesda AK Bergedorf, Prof. von Schrenck
01.05.2003	Erlangung der Approbation als Ärztin
09/2003-02/2004	Assistenzärztin in der 1. Chirurgie, AK Wandsbek, Prof. Kußmann
03/2004-06/2004	Assistenzärztin in der Praxis für Orthopädie, Dr. Kaden, Hamburg
07/2004-06/2005	Assistenzärztin in der Gemeinschaftspraxis für Allgemeinmedizin, Dr. Hoffmann und Frau Rewerts, Hamburg
31.08.2005	Anerkennung als Fachärztin für Allgemeinmedizin
seit 1.12.05	Assistenzärztin in der medizinischen Abteilung, Albertinen-Krankenhaus, Prof. Lock

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

K. Albrecht

11. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar
C	Cytosin
Cx	Connexin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
G	Guanin
GJA	<i>gap junction</i> -Protein der α -Klasse
GJB	<i>gap junction</i> -Protein der β -Klasse
kDa	KiloDalton
M	molar
mM	millimolar
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol
NSHL	<i>non syndromic hearing loss</i>
NSRD	<i>non syndromic recessive deafness</i>
°C	Grad Celsius
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Picomol

RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Tyrosin
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, enzymatische Einheit
UV	ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp

Aminosäuren-Einbuchstaben- und -Dreibuchstaben-Code

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asn	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asp	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin