

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. B. Ringelstein-

**Auditory Neuropathy Spectrum Disorder (ANSO) – Nicht-invasives  
Screening mittels modifizierter Hirnstammpotentialmessung und  
erweiterter molekulargenetischer Sequenzierstrategie**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Yavuz, Murat

aus Halle (Westfalen)

2012

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-  
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. P. Young

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. G. Kurlemann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2012

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. B. Ringelstein-  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. P. Young  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. G. Kurlemann

## ZUSAMMENFASSUNG

Auditory Neuropathy Spectrum Disorder (ANSD) – Nicht-invasives Screening mittels modifizierter Hirnstammpotentialmessung und erweiterter molekulargenetischer Sequenzierstrategie

Yavuz, Murat

Unter dem Begriff der „Auditory Neuropathy Spectrum Disorder“ (ANSD) werden Hörstörungen zusammengefasst, die eine interindividuell variable Schwerhörigkeit mit disproportionaler Sprachverständnisstörung im Störgeräusch, sowie pathologische Hirnstammpotentiale und erhaltene otoakustische Emissionen (OAE) aufweisen. Im Verlauf wird die Diagnostik durch eine fluktuierende Symptomatik, Temperaturabhängigkeit und dem Erlöschen initial erhaltener OAE erschwert.

Ziel dieser interdisziplinären Pilotstudie – mit dem Focus der erweiterten molekulargenetischen Diagnostik – war es, durch ein standardisiertes Screening, die Versorgungssituation der ANSD-Patienten zu verbessern. Zusätzlich sollten Informationen zur Defektlokalisierung gewonnen und der Grundstein für eine zukünftige Prävalenzangabe der ANSD gelegt werden.

Das Screening schwerhöriger Patienten erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie des UK Münster (Direktorin: Fr. Prof. Dr. A. G. am Zehnhoff-Dinnesen). Eine modifizierte Testbatterie ermöglichte auch bei fehlenden OAE die nicht-invasive Diagnostik. Anschließend wurden die ANSD-assoziierten Kandidatengene *OTOF*, *GJB2*, *GJB3* und *GJB6* auf Abweichungen untersucht. Die Entwicklung der Sequenzierstrategie erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Neurologie des UK Münster (Direktor: Prof. Dr. E. B. Ringelstein; Laborleitung: Prof. Dr. P. Young). Darüber hinaus konnte die routinemäßige DNA-Extraktion aus nicht-invasiven Patienten-Proben auf ihre klinische Alltagstauglichkeit geprüft und bestätigt werden.

Im Zeitraum von 2005 bis 2007 wurden 13 Kinder mit ANSD identifiziert, bei denen insgesamt 27 Punktmutationen in den Kandidatengenen vorlagen, wovon 14 als Sequenzvarianten bekannt waren und die restlichen 13 als solche im Rahmen dieser Arbeit klassifiziert werden konnten. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass bei einigen dieser Patienten Abweichungen anderer Loci ursächlich für die ANSD sind.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2012

## ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

**Auditory Neuropathy Spectrum Disorder (ANSO) – Nicht-invasives Screening mittels modifizierter Hirnstammpotentialmessung und erweiterter molekulargenetischer Sequenzierstrategie**

in der / im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

**Klinik und Poliklinik für Neurologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

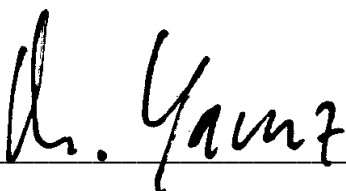
unter der Anleitung von:

**Univ.-Prof. Dr. med. P. Young**

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Heidelberg, den 24. April 2012

Ort, Datum



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dr. Young', is written over a horizontal line.

Unterschrift

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Schwerhörigkeit im Allgemeinen.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Einteilung.....	5
1.2 Die „Auditory Neuropathy Spectrum Disorder“ im Besonderen.....	10
1.2.1 Definition.....	10
1.2.2 Ätiologie.....	11
1.2.3 Pathomechanismus.....	12
1.2.4 Klinik.....	14
1.2.5 Diagnostik.....	15
1.2.6 Therapie.....	17
1.3 Ziele dieser Arbeit.....	19
1.4 Kandidatengene.....	20
1.4.1 Das Gen <i>OTOF</i> .....	21
1.4.2 Die Gene <i>GJB2</i> , <i>GJB3</i> und <i>GJB6</i> .....	22
<b>2 Patienten und Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1 Überblick – Audiologie und Molekulargenetik.....	24
2.2 Patientenrekrutierung und Kontrollpersonen.....	24
2.2.1 Patienten.....	24
2.2.2 Kontrollpersonen.....	24
2.2.3 Audiologische Untersuchung.....	25
2.2.4 Probenentnahme.....	26
2.3 Molekulargenetische Untersuchung.....	27
2.3.1.1 Begriffsdefinition und Überblick über die Sequenzierstrategie.....	27
2.3.1.2 Isolation genomischer DNA.....	28
2.3.1.2.1 EDTA-Vollblut.....	29
2.3.1.2.2 Oragene <sup>®</sup> Speichelasservat.....	30
2.3.1.2.3 Photometrie.....	31

2.3.1.3	Vorbereitungen zur Amplifikation.....	33
2.3.1.3.1	Primer-Design.....	34
2.3.1.3.2	Ermittlung der Annealing-Temperatur.....	36
2.3.1.4	Amplifikation (PCR) .....	37
2.3.1.4.1	Agarosegelelektrophorese (PCR-Kontrolle) .....	39
2.3.1.4.2	Whole Genome Amplification (WGA) .....	42
2.3.1.5	Aufreinigung der PCR-Produkte .....	46
2.3.1.5.1	Agarosegelelektrophorese (Aufreinigungskontrolle).....	46
2.3.1.6	Sequenzierreaktion .....	47
2.3.1.6.1	Aufreinigung der Sequenzierprodukte.....	48
2.3.1.7	Sequenzierung (Zentrallabor).....	50
2.3.1.8	Sequenzanalyse .....	52
2.3.1.9	Allelfrequenz-Analyse (PLP-Kontrolle) .....	55
2.3.1.9.1	Primer-Design.....	56
2.3.1.9.2	Restriktionsendonukleasen-Auswahl.....	56
2.3.1.9.3	Amplifikation (PCR) .....	59
2.3.1.9.4	Agarosegelelektrophorese (PCR-Kontrolle) .....	59
2.3.1.9.5	Enzymverdau (PLP).....	60
2.3.1.9.6	Geldokumentation (Restriktionsfragmentmuster) .....	61
2.4	Nicht aufgeführte Geräte und Materialien .....	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
3.1	Teilergebnis – Audiologische Befunde .....	62
3.1.1	Patienten .....	62
3.2	Teilergebnis – Molekulargenetische Befunde.....	68
3.2.1	Sequenzierstrategie.....	68
3.2.2	Sequenzanalyse .....	72
3.2.2.1	Übersicht .....	72
3.2.2.2	Bekannte Sequenzabweichungen .....	74
3.2.2.3	Unbekannte Sequenzabweichungen.....	76
3.2.2.4	Analyse unbekannter Sequenzabweichungen .....	77
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	80
3.3.1	Patienten 1 und 10 .....	80
3.3.2	Patient 2 .....	80
3.3.3	Patient 4 .....	81
3.3.4	Patient 5 .....	83

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>87</b>
4.1	Ergebnisanalyse.....	87
4.1.1	Übersicht .....	87
4.1.2	Die Patienten.....	87
4.1.3	Fehleranalyse .....	90
4.2	Fazit .....	92
4.2.1	Weitere Kandidatengene .....	92
4.2.2	gDNA aus Speichelproben.....	95
4.3	Empfehlung – ANSD-Screening .....	96
4.3.1	Primär audiologische Patienten .....	96
4.3.2	Primär neurologische Patienten.....	99
4.4	Ausblick .....	99
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>116</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Verteilung der Schweregrade der Hörbeeinträchtigung.....	1
Abbildung 1-2	Ursachen einer angeborenen Hörstörung .....	2
Abbildung 1-3	Überblick der kindlichen Sprachentwicklung.....	4
Abbildung 1-4	Übersicht des Hör- und Corti-Organ.....	6
Abbildung 1-5	Stationen der akustischen Signaltransformation.....	7
Abbildung 1-6	Ideogramme der Kandidatengene .....	20
Abbildung 1-7	Cochleäre Expressionsorte von Otoferlin.....	22
Abbildung 2-1	Arbeitsschritte nach Handbuch.....	29
Abbildung 2-2	Bandenmuster nach der Geltrennung.....	42
Abbildung 2-3	Ablauf der WGA (whole genome amplification) .....	44
Abbildung 2-4	Arbeitsschritte nach Handbuch.....	45
Abbildung 2-5	Dye Blobs (leicht- und mittelgradig).....	48
Abbildung 2-6	Ablauf der Kapillarelektrophorese .....	50
Abbildung 2-7	Ablauf der Sequenzdetektion.....	51
Abbildung 2-8	EDV-gestützte Sequenzanalyse .....	53
Abbildung 2-9	Browser-Darstellung der BLAT-Suche .....	54
Abbildung 2-10	Abweichende Basensequenz in SeqMan II® .....	57



Abbildung 2-11	WatCut-Benutzeroberfläche .....	57
Abbildung 2-12	Beispielhaftes WatCut-Ergebnis .....	58
Abbildung 3-1	Stammbaumanalyse des Patienten 2 .....	81
Abbildung 3-2	Stammbaumanalyse des Patienten 4 .....	82
Abbildung 3-3	Stammbaumanalyse der Patienten 5, 6 und 7 .....	84
Abbildung 4-1	Fragebogen zur Erfassung einer peripheren Neuropathie (PNP).....	98

Sofern nicht anderslautend angegeben, liegen die Rechte der jeweiligen Abbildung beim Autor.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1	Einteilung tonaudiometrisch ermittelter Hörverluste .....	8
Tabelle 1-2	Übersicht der Kandidatengene .....	20
Tabelle 2-1	Information über verwendete Kandidatengene .....	35
Tabelle 2-2	Annealing-PCR Mixtur .....	36
Tabelle 2-3	Annealing-PCR Programmablauf .....	37
Tabelle 2-4	Standard-PCR Mixtur und Stabilisatoren / Additive.....	38
Tabelle 2-5	PCR Programmablauf .....	39
Tabelle 2-6	Sequenzier-PCR Mixtur.....	47
Tabelle 2-7	Sequenzier-PCR Programmablauf .....	48
Tabelle 2-8	Standard-PCR Mixtur für die RFLP.....	59
Tabelle 2-9	PCR-Programmablauf für die RFLP .....	59
Tabelle 2-10	RFLP Mixtur .....	60
Tabelle 2-11	RFLP Programmablauf.....	60
Tabelle 2-12	Materialtabelle.....	61
Tabelle 3-1	Audiologische Messergebnisse der Patienten 1 bis 7 .....	63
Tabelle 3-2	Audiologische Messergebnisse der Patienten 8 bis 13 .....	64
Tabelle 3-3	Übersicht der Primerkonstrukte .....	69
Tabelle 3-4	Fortsetzung der Tabelle 3-3 (Übersicht der Primerkonstrukte).....	70
Tabelle 3-5	Fortsetzung der Tabelle 3-3 (Übersicht der Primerkonstrukte).....	71
Tabelle 3-6	Übersicht der verwendeten Restriktions-Endonukleasen .....	71
Tabelle 3-7	Übersicht gefundener Sequenzabweichungen .....	73
Tabelle 3-8	Übersicht bekannter, unbekannter und stiller Mutationen.....	75
Tabelle 3-9	Übersicht der bisher unklaren Sequenzabweichungen .....	77
Tabelle 3-10	Sequenzabweichungen in der Familie der Patienten 5, 6 und 7.....	85

Sofern nicht anderslautend angegeben, liegen die Rechte der jeweiligen Tabelle beim Autor.

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ABR	auditory brainstem response, siehe BERA, AEP
AD	auditorische Dys-synchronie
AEP	akustisch evoziertes Potential, siehe BERA, ABR
AG	Arbeitsgemeinschaft
AHS	Ammonshornsklerose
ÄHZ	äußere Haarzellen
AN	auditorische Neuropathie
ANSD	Auditory Neuropathy Spectrum Disorder
ARNSHI	autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment, siehe ARNSHL
ARNSHL	autosomal recessive nonsyndromic hearing loss, siehe ARNSHI
AS	auditorische Synaptopathie
AVWS	auditive Verarbeitungs- und Wahrnehmungsstörung
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BBR	Breitbandrauschen
BERA	brainstem evoked response audiometry, siehe ABR, AEP
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
CAP	compound action potential, siehe SAP
CAS	contralateral acoustic suppression
CAS-TEOAE	kontralaterale akustische Suppression der TEOAE
CCD	charge-coupled device
cDNA	coding DNA
CE	capillary electrophoresis
CI	Cochlea Implantat
CM	cochlear microphonics
cMRT	kraniale Magnet-Resonanz-Tomographie
CMT	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung, siehe HMSN
CVF	cochleäre Verstärkerfunktion
Cx	Connexin
dB HL	decibel hearing level
dB SPL	decibel sound pressure level
dB	Dezibel

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
dbSNP	SNP Datenbank
ddNTP	(2',3'-)Dideoxynukleosidtriphosphat
DFN	x-linked deafness
DFNA	dominant deafness
DFNB	recessive deafness
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DPOAE	distorsionsproduzierte OAE
dsDNA	double strand DNA
DZH	Deutsches Zentralregister für kindliche Hörstörungen
ECochG	Elektrocochleographie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	elektronische Datenverarbeitung
EE-FEAP	elektrisch evozierte FAEP
EEP	elektrisch evozierte Potentiale
FAEP	frühe akustisch evozierte Potentiale
FAS	fetales Alkoholsyndrom
FG	Frühgeborene
FM-Anlage	frequenzmodulierte Anlage
G-BA	Gemeinsamer Bundesausschuss
gDNA	genomic DNA
GJB	gap junction protein beta
HCl	Chlorwasserstoff
het	heterozygot
HG	Hörgerät
HIP	Hirnstamm Implantat
HMSN	hereditär motorisch-sensible Neuropathie
hom	homozygot
HPLC	high performance liquid chromatography
HS	Hörstörung
HV	Hörverlust
Hz	Hertz
ID	Identität
IgA	Immunglobulin A
IHZ	innere Haarzellen
iMDA	isothermal multiple displacement amplification

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
k. A.	keine Angaben
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kHZ	Kilohertz
kPa	Kilopascal
M	Mol
MAEP	mittlere akustisch evozierte Potentiale
mAU	milli-absorbance-units
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHV	mittlerer Hörverlust
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOC	medialer olivo-cochleärer Reflexbogen
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Multiple Sklerose
mtDNA	mitochondrial DNA
mV	Millivolt
n. d.	nicht durchgeführt
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NG	Neugeborene
NSHI	nonsyndromal hearing impairment
NSRAN	nonsyndromal recessive auditory neuropathy
OAE	otoakustische Emissionen
OTOF	Otoferlin
pCCA	partielle Corpus callosum Agenesie
PCR	polymerase chain reaction
PCR-RFLP	siehe PLP
PET	Positronenemissionstomographie
pH	negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen Aktivität, pH-Wert
PLP	PCR- Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
pmol	Pikomol
PNP	periphere Neuropathie
RefSeq	Reference Sequences Datenbank der NCBI
REN	Restriktionsendonukleasen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
RF	Risikofaktor
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RTA	Reintonaudiogramm
SAEP	späte akustisch evozierte Potentiale
SAP	Summenaktionspotential, siehe CAP
SES	Schallempfindungsstörung
SGN	Spiralganglionneurone
SH	Schwerhörigkeit
SLS	Schalleitungsstörung
SNHI	sensory neural hearing impairment, siehe SNHL
SNHL	sensory neural hearing loss, siehe SNHI
SNP	single nucleotide polymorphism
SP	Summationspotential
ssDNA	single strand DNA
SSW	Schwangerschaftswoche
Taq	Thermus aquaticus
TEOAE	transitorisch evozierte OAE
TFP	Trommelfellperforation
TORCH	Toxoplasmose, Röteln, Cytomegalie und Herpes
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS-NSRAN	temperature sensitive nonsyndromal recessive auditory neuropathy
U	unit
UCSC	University of California Santa Cruz
UK	Universitätsklinikum
UKM	Universitätsklinikum Münster
UTR	untranslated regions
V	Volt
WGA	whole genome amplification
y	year
ZHB	zentrale Hörbahn

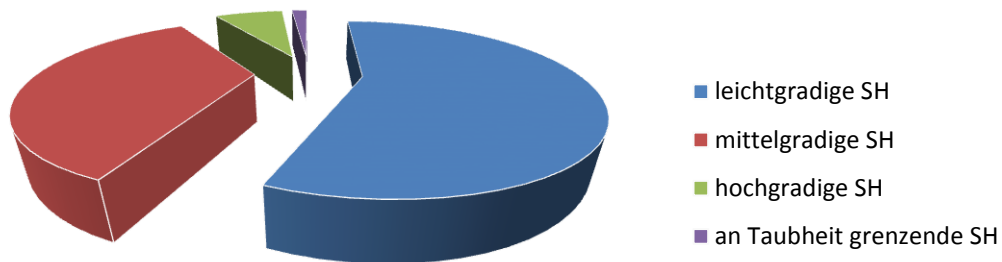
# 1 Einleitung

## 1.1 Die Schwerhörigkeit im Allgemeinen

### 1.1.1 Definition

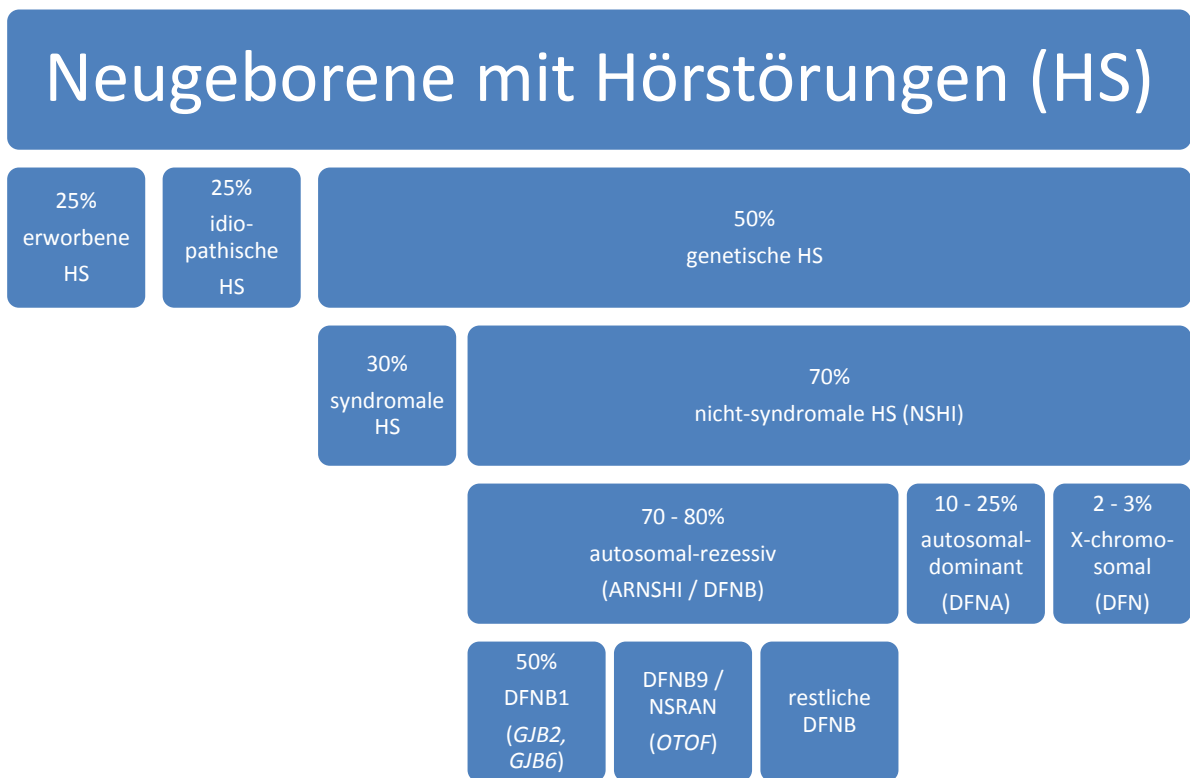
Hörminderungen bis hin zur Gehörlosigkeit werden – unabhängig ihrer Ätiologie – durch den Begriff der „Schwerhörigkeit“ (SH, Hypakusis) zu einer heterogenen Gruppe zusammengefasst. Diese liegt ein- oder beidseitig vor und kann angeboren sein oder erst im Laufe des Lebens auftreten. Hierzu zählt auch die Altersschwerhörigkeit (Presbyakusis).

Die letzte repräsentative Untersuchung hinsichtlich einer Aussage zur Prävalenz der SH in Deutschland erfolgte im Jahre 2001 [167]. Dabei wurde festgestellt, dass 19 Prozent der über 14-jährigen eine Hörbeeinträchtigung aufwiesen (► Abbildung 1-1, S. 1).



**Abbildung 1-1** Verteilung der Schweregrade der Hörbeeinträchtigung (nach W. Sohn [167]).  
Neunzehn Prozent der deutschen Bevölkerung über 14 Jahre sind hörbeeinträchtigt.  
SH = Schwerhörigkeit.

Basierend auf dieser Untersuchung berechnete der „Deutsche Schwerhörigen Verbund e. V.“ ([www.schwerhoerigen-netz.de](http://www.schwerhoerigen-netz.de)), dass in den Jahren von 2000 bis 2005 die Gruppe der Schwerhörigen kontinuierlich gewachsen sein soll. Laut der „Deutsche(n) Kinderhilfe e. V. / Aktion Frühkindliches Hören“ ([www.neugeborenen-hoerscreening.de](http://www.neugeborenen-hoerscreening.de)) und des „Deutsche(n) Zentralregister(s) für kindliche Hörstörungen“ (DZH), weisen zudem zwei bis drei von 1000 Gesunden [56] – bzw. zwei bis drei von 100 Neugeborenen (NG) mit Risikofaktoren für eine SH („Hamburger Arbeitskreis für Hörscreening bei Neugeborenen e.V.“, [www.hahn-hh.de](http://www.hahn-hh.de)) – eine behandlungsbedürftige Hörstörung (HS) auf [115]. Abhängig von der zugrundeliegenden Studie leiden jeweils 25 Prozent der betroffenen NG unter einer erworbenen oder idiopathischen HS (► Abbildung 1-2, S. 2).



**Abbildung 1-2** Ursachen einer angeborenen Hörstörung.  
Nach AWMF-Reg.-Nr. 049/010 (02/2005), Kubisch [85], Riemann [134] und „Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview“ [117].

Als Risikofaktoren für die erworbene HS gelten z. B. eine Hyperbilirubinämie, perinatale Hypoxie, Frühgeburtlichkeit, ototoxische Medikamente, etc. (► 1.1.2 Einteilung der Hörstörungen, S. 5). Den größten Teil der angeborenen HS, mit bis zu 50 Prozent, stellen die genetischen Formen dar [57, 121]. Davon sind laut der „Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Phoniatrie und Pädaudiologie“ (<http://www.uni-duesseldorf.de/AWME>) ca. 30 Prozent syndromal und 70 Prozent isoliert schwerhörig (AWMF-Reg.-Nr. 049/010, Stand: 02/2005). Somit ist die HS generell nicht nur eine der häufigsten angeborenen Erkrankungen, sondern sie zählt auch zu den häufigsten monogenen Erkrankungen überhaupt [83, 84].

Laut DZH werden angeborene Hörstörungen (Dysakusis) erst in einem Zeitraum vom 21. Lebensmonat bis über das sechste Lebensjahr hinaus erfasst, wobei der Großteil der Diagnosen auf elterlichen „Hörstörungsverdacht“ hin gestellt wird [76, 120].

Der Diagnosezeitpunkt hängt vom Ausprägungsgrad der HS ab und wird umso später gestellt, je leichtgradiger die Hörstörung ist [50].

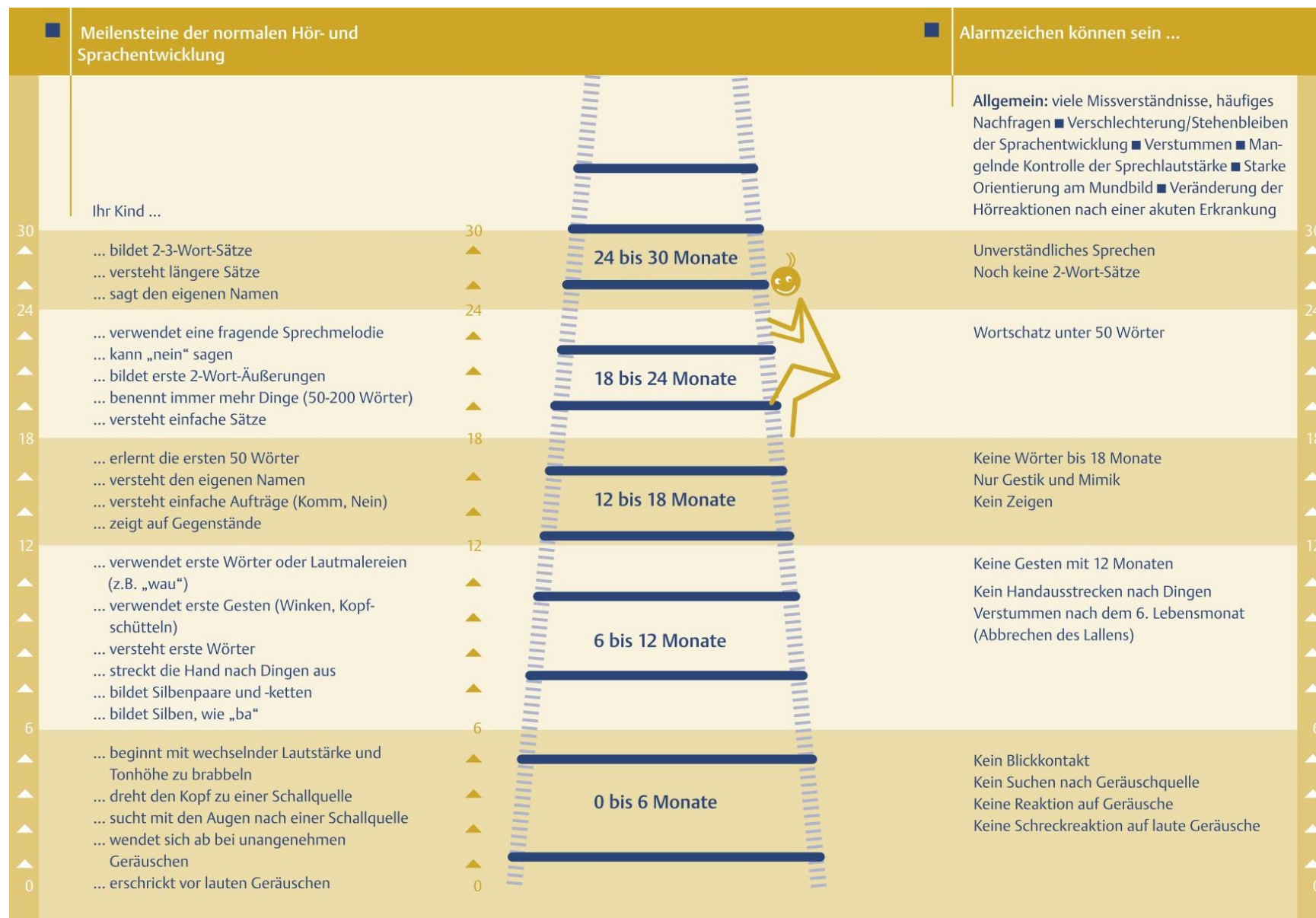
Durch den Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses (G-BA) vom 19.06.2008 existiert in Deutschland ein universelles Neugeborenen-Hörscreening, das am 01.01.2009 in Kraft getreten ist und im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen zum Leistungskatalog der Krankenversicherungen zählt.

Da aber eine HS in jedem Altersabschnitt – auch nach einem unauffälligen Hörscreening – auftreten kann, sollten Eltern die Entwicklung der Kinder weiterhin „im Auge“ behalten. Dies gilt besonders für Kinder mit Risikofaktoren.

Ziel ist es, eine HS während der sensiblen Hör- und Sprachentwicklungsphase frühzeitig zu erkennen und zu therapieren (► Abbildung 1-3, S. 4).

Zurzeit besteht keine bundeseinheitliche Regelung zur Nachuntersuchung (tracking) bei einem auffälligen Hörscreening.





**Abbildung 1-3** Überblick der kindlichen Sprachentwicklung in Abhängigkeit des Alters und mögliche Anzeichen für eine Störung. Aus der Broschüre „Von Anfang an...“ der Klinik und Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie des Universitätsklinikums Münster. Mit freundlicher Genehmigung der Autorin Fr. Anja Fiori und der Direktorin Prof. Dr. med. A. G. am Zehnhoff-Dinnesen.

### 1.1.2 Einteilung

Die Unterteilung der Schwerhörigkeit erfolgt u. a. nach folgenden Kriterien:

- Topographie
- Ausprägungsgrad
- Ätiologie

In der **topographischen Einteilung** peripherer Hörstörungen wird zwischen einer Schallleitungsstörung (SLS) und einer Schallempfindungsstörung (SES) unterschieden, die auch in Kombination auftreten können (kombinierte Hörstörung).

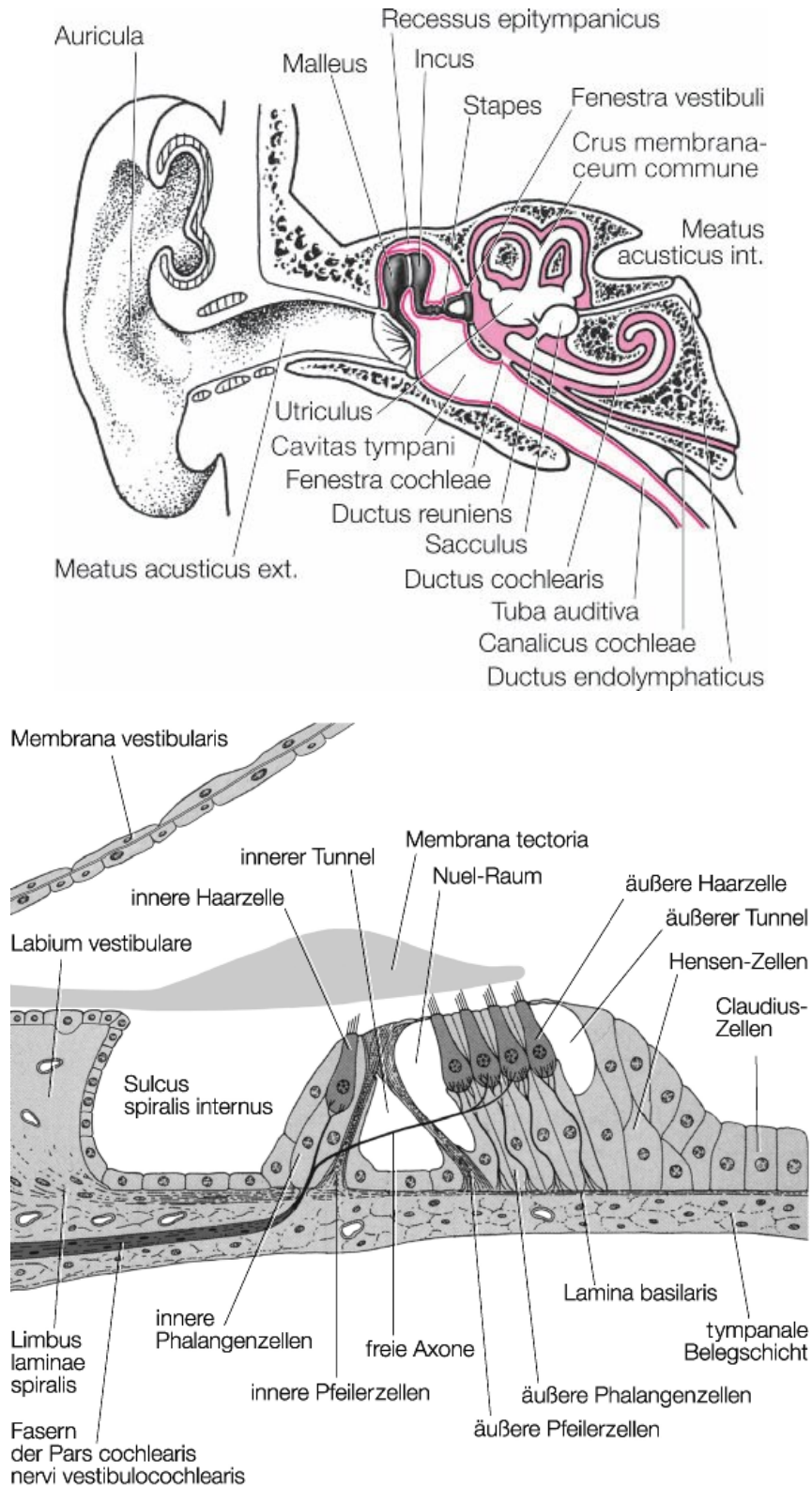
Die SLS betrifft alle Strukturen von der Ohrmuschel bis hin zu den beiden cochleären Fenstern. Somit umfasst eine SLS den äußeren Gehörgang, das Trommelfell und das Mittelohr mit der darin befindlichen Gehörknöchelchenkette und Paukenhöhle einschließlich der Eustach'schen Röhre (► Abbildung 1-4, S. 6).

Bei einer SES sind die Ursachen im Innenohr (Cochlea), dem synaptischen Spalt und – bei äußerer Betrachtung – den dahinterliegenden neuronalen Strukturen (Spiralganglionneurone [SGN] und zentrale Hörbahn [ZHB]) lokalisiert (► Abbildung 1-4, S. 6).

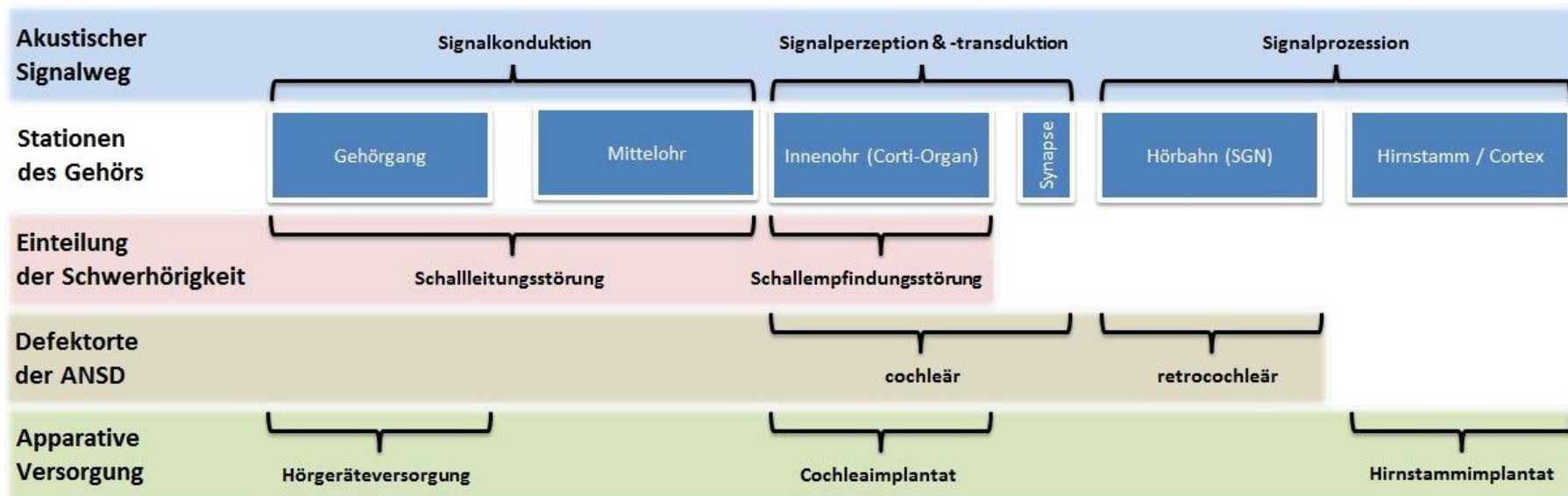
Pathoanatomisch werden Störungen im (endo)cochleären und retrocochleären Abschnitt auch als „Sensorineurale Hörstörungen“ (sensory neural hearing impairment, SNHI<sup>\*</sup>) bezeichnet (► Abbildung 1-5, S. 7).

---

\* Synonym: sensory neural hearing loss, SNHL



**Abbildung 1-4** Übersicht des Hör- und Corti-Organ.  
 Aus T. H. Schiebler und H.-W. Korf: *Anatomie*, 10. Auflage.  
 Steinkopff-Springer, 2007, Seiten 704 und 714. Mit freundlicher Genehmigung des Verlages.



**Abbildung 1-5** Stationen der akustischen Signaltransformation im Zusammenhang mit den Defektorten und apparativer Versorgungsmöglichkeiten. ANSD = Auditory Neuropathy Spectrum Disorder (► 1.2.1 Definition, S. 10); SGN = Spiralganglionneurone. Eigenentwurf.

Zur **Einteilung der SH nach dem Ausprägungsgrad** dient der tonaudiometrisch gemessene Hörverlust (HV) in Dezibel (dB):

Hörverlust (in dB)	Schweregrad des HV
25 - 40	geringgradig
40 - 60	mittelgradig
60 - 90	hochgradig
> 90	Hörrestigkeit / Taubheit

**Tabelle 1-1** Einteilung tonaudiometrisch ermittelter Hörverluste (HV) in Schweregrade. Nach AWMF-Reg.-Nr. 049/010 (02/2005)

Aus der **ätiologischen Unterteilung** der HS gehen drei Gruppen hervor – die *erworbenen, idiopathischen und genetischen* HS. Die erworbene Form kann noch weiter zeitlich unterteilt werden in prä-, peri- und postnatale HS und schließt in mehreren Studien auch pathogenetische Ursachen ein. Um Verwechslungen auszuschließen, wird an dieser Stelle insgesamt von der „erworbenen HS“ gesprochen – ohne weitere zeitliche Differenzierung – und unter Auslassung genetischer Grundlagen. Diese werden ausschließlich in ihrer eigenen Gruppe genannt.

Die Ursachen der peripheren *erworbenen Hörstörung* sind vielfältig [56]. Die Gemeinsamkeit der Ursachen liegt darin, dass die HS durch eine Schädigung des Hörapparates hervorgerufen wird, dessen Funktion bei Fehlen der „Noxe“ unbeeinträchtigt wäre. Im Folgenden sind einige Risikofaktoren beispielhaft genannt:

- Schwangerschaftsinfekte (TORCH)\*
- neonatale Sepsis, bakterielle Meningitis
- Frühgeburtlichkeit
- niedriger Apgar-Score
- perinatale Hypoxie
- kritische Hyperbilirubinämie
- ototoxische Substanzen
- Raumforderung
- Schall- und Schädeltrauma
- Otitis media, Labyrinthitis
- Cholesteatom
- autoimmune Grunderkrankung
- Labyrinthischämie
- Altersdegeneration (Presbyakusis)

---

\* Toxoplasmose, Röteln, Cytomegalie, Herpes

Die *idiopathische Form* der HS ist dadurch charakterisiert, dass auch nach eingehenden Untersuchungen keine grundlegende Ursache feststellbar ist. Diese Art der HS kann – sowohl bei NG und Kindern, als auch bei Jugendlichen und Erwachsenen – jederzeit auftreten. Die akute Hörstörung mit einhergehender SH und zusätzlichen vestibulo-cochleären Symptomen wird als „Hörsturz“ bezeichnet.

Die *genetisch bedingte HS* – mit einer Prävalenz von bis zu 50 Prozent unter den betroffenen NG – stellt den größten Teil der angeborenen HS dar [57, 121]. Diese wird – abhängig vom Erkrankungsmuster – weiter in eine syndromale (30 Prozent) und eine nicht-syndromale / isolierte Form (70 Prozent) unterteilt [185]. Weiterhin werden beide Gruppen einem autosomalen, X-chromosomalen oder mitochondrialen Vererbungsmuster zugeordnet. Etwa 70 bis 80 Prozent der isolierten HS unterliegen einem autosomal-rezessiven Erbgang (autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment, ARNSHI\*), womit diese Gruppe mit Abstand die häufigste Ursache einer angeborenen / prälingualen HS darstellt [85, 134] (► Abbildung 1-2, S. 2). In der Literatur werden die unterschiedlichen isolierten HS mithilfe des Akronyms „DFN“ (deafness), den Suffixen „A“ oder „B“ (dominanter- / rezessiver Erbgang) und einer nachgestellten Zahl benannt – die „DFN“ ohne weitere Angaben kennzeichnet einen X-chromosomalen Erbgang. Die Zahlen werden nach der Reihenfolge der entdeckten ursächlichen Genloci festgelegt; dies führte in der Vergangenheit bei Neuentdeckung eines Locus zwischen zwei vermerkten Genorten zu Zahlenkorrekturen.

Bis heute sind über 400 Syndrome, die mit einer HS einhergehen, bekannt [54]. Davon treten am Häufigsten das Pendred- und das Usher-Syndrom mit jeweils drei bis sechs Prozent und das Waardenburg-Syndrom mit ca. zwei Prozent auf (AWMF-Reg.-Nr. 049/010, Stand: 02/2005, [19, 89, 90, 124]). Momentan wird die Zahl der ursächlichen Loci für die isolierte HS auf über 200 geschätzt, wovon laut „Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage“ 57 autosomal-dominante (DFNA), 77 autosomal-rezessive (DFNB / ARNSHI), acht X-chromosomale (DFN) und sieben mitochondriale Loci bekannt sind (<http://hereditaryhearingloss.org/>). Bei der Hälfte aller Patienten mit einer ARNSHI liegt eine DFNB1 vor, die durch klinisch relevante Mutationen in den Connexin (Cx) kodierenden Genen *GJB2* [48, 71, 72, 202] und *GJB6* [40] (Gap junction protein beta) hervorgerufen wird (► 1.4 Kandidatengene, S. 20) – daher wird die DFNB1 auch als „*GJB*-related deafness“ bezeichnet.

---

\* Synonym: autosomal recessive nonsyndromic hearing loss, ARNSHL

## 1.2 Die „Auditory Neuropathy Spectrum Disorder“ im Besonderen

### 1.2.1 Definition

In den 80er und 90er Jahren beschrieben die Arbeitsgruppen Kraus und Starr – unabhängig voneinander – ein Krankheitsbild, bei dem Patienten Unregelmäßigkeiten im Muster ihrer auditorisch evozierten Hirnstammpotentiale aufwiesen (brainstem evoked response audiometry, BERA<sup>\*</sup>). Dabei waren die Ergebnisse der Reintonaudiogramme besser als die BERA hätte vermuten lassen [81, 170].

Der Begriff der „Auditory Neuropathy Spectrum Disorder“ (ANSD) bezeichnet eine besondere Form der Schwerhörigkeit, die sich von dieser sowohl durch ihre charakteristische Symptomatik, als auch durch die komplexe Diagnosestellung und Therapie, unterscheidet. Ein- oder beidseits betroffene ANSD-Patienten zeigen eine interindividuell variable SH (bis hin zur Taubheit), wobei zusätzlich eine unverhältnismäßig starke Sprachverständnisstörung auffällt, die besonders unter Störgeräuschen ausgeprägt ist [129]. In der audiologischen Diagnostik können initial otoakustische Emissionen (OAE) und / oder Mikrophonpotentiale (cochlear microphonics, CM) nachgewiesen werden. Gleichzeitig zeigt die BERA pathologische oder völlig fehlende FAEP (frühe akustisch evozierte Potentiale) [170, 172], und – abhängig vom Grad der vorliegenden SH – nicht regelrecht auslösbare Stapediusreflexe [13, 61].

Einerseits kommt erschwerend hinzu, dass die ANSD-Symptomatik fluktuieren kann und sogar eine Temperaturabhängigkeit zeigt [102, 174, 186], so dass Untersuchungsergebnisse eines Patienten unterschiedlich ausfallen. Andererseits werden – durch die generelle Verwendung des ANSD-Begriffs – verschiedene histopathologische Lokalisationen zu einer heterogenen Krankheitsgruppe zusammengefasst. Dabei können die inneren Haarzellen (IHZ) und / oder ihre Synapsen betroffen sein – was einer sensori-synaptischen (perisynaptischen) Störung entspräche [93] oder die Ursache ist retrocochleär zu finden und betrifft die neuronale Weiterleitung und / oder Verarbeitung (► 1.2.3 Pathomechanismus, S. 12) [169, 172].

Prävalenzangaben zur ANSD in der Population schwerhöriger Kinder und Erwachsene sind bisher ungenau und variieren je nach Studie zwischen fünf und elf Prozent unter den Kindern mit SNHI [12, 28, 51, 111, 131, 139]. Dabei ist die Schwierigkeit einerseits, dass die Zahlen

---

\* Synonym: auditory brainstem response, ABR; akustisch evoziertes Potential, AEP

jeweils in Patientenkollektiven mit unterschiedlichem Tonschwellengehör erhoben wurden und andererseits führt der sekundäre Verlust der OAE [137, 165, 172, 187] dazu, dass eine ANSD in der Gruppe der SNHI-Patienten nicht mehr erfasst werden kann. Zusätzlich werden die Prävalenzangaben um die Zahl initial diagnostizierter ANSD-Fälle bei Frühgeborenen (FG) nach einer Hörbahnreifung korrigiert. Die Häufigkeit der ANSD bei Kindern mit Risikofaktoren zur Entwicklung einer erworbenen SH wird mit unter einem Prozent angenommen [51, 131].

Prävalenzangaben zu Erwachsenen existieren bisher nicht, jedoch zeigten sich im Tiermodell – nach einem induzierten Lärmtrauma – Funktionsänderungen in den auditorischen Synapsen und den SGN [59], die bei einer ANSD als „topographische“ Ursache durchaus in Frage kommen (► 1.2.3 Pathomechanismus, S. 12). Bei Übertragbarkeit dieser Modell-Ergebnisse auf den Menschen würde die Prävalenz der ANSD unter den erwachsenen SNHI-Patienten im Vergleich zu den Betroffenen Kindern überproportional hoch ausfallen, da statistisch die erworbenen Funktionseinschränkungen mit dem Alter voranschreiten.

### 1.2.2 Ätiologie

Die **hereditäre ANSD** wird als Subtyp der erblichen SH zur großen Gruppe (50 Prozent) der angeborenen prälingualen Hörstörungen gerechnet (► Abbildung 1-2, S. 2). Davon wird ein geringerer Teil zur kleineren Gruppe (30 Prozent) der angeborenen syndromalen HS gezählt. Hierbei tritt die ANSD im Rahmen komplexer Krankheitsbilder auf, bei denen sich primär oder sekundär Neuropathien entwickeln, wie z. B. bei hereditär motorisch-sensiblen Neuropathien (HMSN), beim Morbus Refsum oder der Friedreich-Ataxie [25, 97, 98, 116, 148, 150, 171]. Der größere Teil der familiären ANSD zählt zu den isolierten Formen der SH (nonsyndromal hearing impairment, NSHI). In dieser Gruppe sind autosomal-dominante [20, 55, 77] und -rezessive [187], X-chromosomale [191] und mitochondriale Erbgänge [192] als Auslöser einer ANSD bekannt. Dritthäufigste Ursache einer hereditären ANSD mit prälingual hochgradiger SH stellt die DFNB9 dar [111, 138, 187], die durch Punktmutationen im *OTOF*-Gen ausgelöst wird [107, 137, 180, 186, 187].

Insgesamt ist die DFNB9, nach der DFNB1, sogar zweithäufigste Ursache einer hereditären HS [63]. Durch Erkenntnisse im Mausmodell [200] wird angenommen, dass das in den IHZ exprimierte Otoferlin – durch eine Calcium-bindende C2-Domäne [108] – eine



Schlüsselfunktion in der vesikulären Transmitterfreisetzung und somit in der synaptischen Signalcodierung besitzt (► 1.2.3 Pathomechanismus, S. 12). Daher steht die häufig vorkommende DFNB9 mit der primär auditorischen Synaptopathie (AS) den selteneren, aber häufig syndromalen auditorischen Neuropathien (AN) der Hörbahn gegenüber.

Risikofaktoren der **erworbenen ANSD** stellen eine extreme Frühgeburtlichkeit (< 28. SSW) und extremes Untergewicht, Intensivpflichtigkeit der FG, perinatale Hypoxie und prolongierte Beatmungspflicht, kongenitale Hirnanomalie, postpartale Hyperbilirubinämie oder Sepsis, demyelinisierende Erkrankungen (z. B. Multiple Sklerose, MS), ototoxische Medikation und eine familiäre Disposition dar [17, 46, 101, 114, 131, 132, 163, 172, 178, 189, 197]. Im Verlauf kommen metabolische Ursachen, wie z. B. eine diabetische Neuropathie oder eine Hypothyreose, hinzu [32, 74].

### 1.2.3 Pathomechanismus

Die ANSD stellt ein uneinheitliches Krankheitsbild dar, bei der die Patienten unterschiedlich von den Therapieansätzen profitieren – eine Versorgung mit Hörgeräten (HG) hilft nur bedingt [42]. Die Patienten berichten zwar von der Zunahme der Lautstärke ihrer akustischen Wahrnehmung, jedoch keiner Verbesserung der Sprachverständlichkeit (AWMF-Reg.-Nr. 049/010, Stand: 02/2005). Ergebnisse der BERA weisen darauf hin, dass das Sprachverstehen die Synchronität der SGN voraussetzt, welche wiederum von der regelrechten synaptischen Signaltransduktionsfähigkeit der IHZ abhängt [75]. Ihre Fehlfunktion spiegelt sich in fehlenden oder pathologischen FAEP wieder. Die im Gegensatz dazu relativ guten Ergebnisse des Tonschwellengehörs werden mit den späten AEP (SAEP) in Zusammenhang gebracht, die hirstammnah auftreten und auch bei asynchronen SGN (auditorische Dys-synchronie, AD [13, 15]) zu einer zentralen Kompensation führen. Der Grund wird in der auditorischen Signalamplifikation gesehen, die durch eine divergente Innervation der Neurone des Hirnstamms – durch die SGN – erzeugt wird [168]. Evolutionstheoretisch vereinfacht gesagt, wird ein Ausfall des entwicklungs geschichtlich jüngeren und komplexen Sprachverstehens, durch die ältere, überlebenswichtigere Tonwahrnehmung teilweise kompensiert. Die Fehlfunktion auf retrocochleärer Ebene dient auch zur Erklärung einer Beeinträchtigung der kontralateralen akustischen Suppression (contralateral acoustic suppression, CAS) der OAE [11, 15, 61] und auffälliger Stapediusreflexe [13, 61]. Dass retrocochleäre Ursachen das

Krankheitsbild der ANSD mitbestimmen zeigt sich zusätzlich durch die Tatsache, dass nicht jeder ANSD-Patient durch das – im Gegensatz zur HG-Versorgung invasivere – Cochlea-Implantat (CI) profitiert [99, 131, 158].

Insgesamt reichen die Ursachen der ANSD von einer peripheren zeitlichen Verarbeitungsstörung [15, 81] oder totalen Signalblockierung [93] durch Defekte der IHZ und / oder ihrer Synapsen, bis hin zu retrocochleären Erregungsleitungsstörung bei axonalen und / oder demyelinisierenden Erkrankungen [172], wobei die OAE initial erhalten bleiben, da die äußeren Haarzellen (ÄHZ) primär nicht affektiert sind [203]. Sekundär kann es – durch Verlust von SGN bei synaptischen Defekten – zu „synapto-neuropathischen“ Mischformen kommen oder durch den Ausfall der ÄHZ zu einer globalen cochleären Dysfunktion [169].

Aufgrund der Entdeckung eines Zusammenhangs zwischen der SGN-Synchronität und des Sprachverständnisses, wurde die Umbenennung des Krankheitsbildes der „AN“ in die „auditorische Dys-synchronie“ (AD) vorgenommen [9]. Wenige Jahre später folgte der Vorschlag einer differenzierteren Einteilung der AN bzw. der AD. Dabei sollte eine primäre Neuropathie des Hörnerven als proximale AN (Typ-I AN) und Defekte, die IHZ, Synapsen oder terminale Dendriten der SGN betreffen als distale AN (Typ-II AN) bezeichnet werden [169]. Die Arbeitsgruppe Loundon forderte kurz darauf die Verwendung des Begriffs „AN“ streng retrocochleären Störungen vorzubehalten [99]. Da die klinisch-audiologische Lokalisation des ursächlichen „Defektortes“ bis dato nicht exakt genug war, hatte sich die generelle Begriffskombination der „Auditorischen Synaptopathie“ und „Auditorischen Neuropathie“ (AS / AN) durchgesetzt. Um dem Facettenreichtum dieses Krankheitsbildes gerecht zu werden, wurde 2008 im Rahmen der „Guidelines Development Conference on the Identification and Management of Infants with Auditory Neuropathy“ in Cernobbio (Italien) der Begriff der „Auditory Neuropathy Spectrum Disorder“ (ANSD) eingeführt [14, 143].

Mithilfe **experimenteller Tiermodelle** wurden Erkenntnisse über die Pathomechanismen der ANSD gewonnen. Die Arbeitsgruppe Yasunaga hatte im Mausmodell nachgewiesen, dass Otoferlin bei embryonalen Mäusen in den IHZ, ÄHZ und in den SGN exprimiert wird, bei der adulten Maus jedoch nur noch in den IHZ [200], was die initial erhaltenen OAE erklärt. Otoferlin soll mit seiner calciumbindenden Domäne eine entscheidende Funktion in der vesikulären Transmitterexocytose besitzen. Durch ein induziertes Lärmtrauma konnte gezeigt

werden, dass eine Schädigung der IHZ eine Fehlfunktion der auditorischen Synapsen nach sich zieht [59]. Des Weiteren führten selektive Funktionsstörungen der IHZ, der SGN und ihre kombinierte Beeinträchtigung zu SH und Taubheit mit einer Minderung der Zahl synchroner SGN und dementsprechend pathologischer oder fehlender FAEP [22, 44, 45, 75, 88, 119, 126, 204, 205].

In einem Otoferlin-defizienten Mausmodell konnte die Klinik der DFNB9 nachgestellt werden [144]. Hierbei fehlten die AEP völlig oder es traten pathologische FAEP bei erhöhter Reizschwelle auf (ab 100 dB SPL). Bei direkter Stimulation der SGN durch eine Elektrode über das runde Fenster konnten unauffällige elektrisch evozierte Potentiale (EEP) abgeleitet werden. Jedoch wurde im Gegensatz zum murinen Wildtyp eine nahezu dreifache Reizspannung benötigt (500 mV). Als Grund hierfür wird angenommen, dass bei primärem IHZ-Defekt eine konsekutiv neuronale Degeneration und somit eine verminderte Zahl an SGN vorliegt, so dass mit einem stärkeren Reiz stimuliert werden muss. In diesem Fall ist eine CI-Versorgung denkbar und bestätigt die Erfolge bei einigen ANSD-Patienten [70, 93, 104, 137, 144]. Die Funktion der ÄHZ und des Vestibularorgans waren in den Tiermodellen nicht wesentlich beeinträchtigt.

#### 1.2.4 Klinik

Objektive Diagnosekriterien der ANSD sind pathologische oder fehlende FAEP bei gleichzeitig initial nachweisbaren OAE und / oder CM. Die Stapediusreflexe fehlen gänzlich oder sind erst durch stark überschwellige Reize auslösbar, zusätzlich fehlen die CAS. Die Klinik ist zudem temperaturabhängig.

Subjektiv zeigt sich ein häufig fluktuierender, variabler HV im Reintonaudiogramm, der von einer geringgradigen SH bis hin zur Taubheit ausgeprägt sein kann. Zusätzlich besteht eine, im Vergleich zum Tonschwellengehör, überproportionale Sprachverständnisstörung – besonders unter Störgeräuschen. Die Kinder fallen durch Verhaltens- und Sprachentwicklungsstörungen auf und zeigen einen geringen Nutzen von einer HG-Versorgung.

Im Verlauf der ANSD kommt es – neben der erwähnten Fluktuation und Temperaturabhängigkeit – zum sekundären Verlust der OAE und somit zum progredienten HV.

Bei Frühgeburtlichkeit und intaktem peripherem Gehör besteht die Möglichkeit zur „Nachreifung“ des auditorisch-neuronalen Netzwerks [78, 105].

### 1.2.5 Diagnostik

Die Arbeitsgruppe Moser schlägt eine in „ (...) Altersgruppen getrennt(e) und in 2 Stufen gegliederte (...)“ Vorgehensweise bei der Diagnostik der ANSD vor [111]. „Dabei führt die 1. Stufe zur Verdachtsdiagnose (...), die dann durch die weitere Diagnostik gesichert und gegebenenfalls differenziert wird.“ Es werden drei Altersgruppen unterschieden – Früh- und Neugeborene (FG, NG), Kinder bis sechs Jahre und Kinder ab sechs Jahren / Erwachsene.

Der objektive Verdacht einer ANSD in der **Basisdiagnostik** wird gestellt, wenn in der Hirnstammaudiometrie pathologische AEP und gleichzeitig vorhandene OAE gemessen werden. Der Nachweis wird mittels transitorisch evozierter- oder distorsionsproduzierter OAE (TEOAE / DPOAE) erbracht [175], zusätzlich erfolgt mittels Tympanometrie der Ausschluss einer Mittelohrbeteiligung zur fehlerfreien Deutung der Ergebnisse. Die FAEP-Defizite in der BERA reichen von geringen Latenzverzögerungen und Adaptationsstörungen [88] über eine erhöhte Reizschwelle (ab 80 dB HL) bis hin zum völligen Ausfall [119] und einer schlechten Reproduzierbarkeit der Kurven. Die Arbeitsgruppe Moser empfiehlt zur Artefaktreduktion und Vermeidung einer Fehlinterpretation der FAEP / BERA, die Verwendung von Einsteckhörern, Sog-Druck-Reizungen [10] und die Messung klickevozierter FAEP bei unterschiedlichen Reizraten. Die Stapedius-Reflexmessung dient bei Fehlen oder einer erhöhten Reflexschwelle zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose. Zur subjektiven Abschätzung der SH wird eine Reflexaudiometrie in der Gruppe der NG und die Verhaltensaudiometrie – wie z. B. eine Spiele- und Sprachaudiometrie oder Ablenkreaktionen – in der Gruppe der Kinder bis sechs Jahre durchgeführt. Die Hörschwelle in der Gruppe der Kinder ab sechs Jahren und Erwachsenen wird durch die Reinton- und Sprachaudiometrie ermittelt. Die sprachaudiometrische Testung erfolgt in beiden letztgenannten Gruppen zusätzlich unter einem Störgeräusch. Um eine Nachreifung der Hörbahn bei FG zu erfassen, wird bei einem ANSD-Verdacht das Ergebnis in Zeitabständen von zwei bis drei und fünf bis sechs Monaten nach Diagnosestellung reevaluiert.

Die **weiterführende audiologische Diagnostik** sichert einerseits die bestehende Verdachtsdiagnose einer ANSD, andererseits wird der Verdacht einer ANSD bei sekundär

erloschenen OAE erst ermöglicht. Moser et al. empfehlen hierzu die invasive Elektrocochleographie (ECoChG) als „zentrales“ Instrument [93, 111, 133]. Bei fehlenden OAE und hochgradigem HV dient die Messung erhaltener elektrischer Reizantworten des Innenohres (cochlear microphonics, CM) bei Reizpegeln unter 80 dB als genügender Nachweis einer Restaktivität der ÄHZ [137, 172, 173]. Zusätzlich wird durch die Messung der Summationspotentiale (summing potential, SP) die präsynaptische mechanoelektrische Transduktionsfähigkeit der Haarzellen festgestellt, die durch Schwingung der Basilarmembran bei hohen Reizpegeln ausgelöst wird. Geringe Amplituden und verlängerte Latenzzeiten des Summenaktionspotentials (SAP, compound action potential, CAP) – als sehr frühe und sensitivere Komponente der FAEP – weisen auf eine periphere Dys-Synchronie der SGN hin [45, 126]. Sowohl ein Verlust der CAS, als auch der Nachweis mittlerer und später AEP (MAEP / SAEP) – bei fehlenden oder pathologischen FAEP – dienen zur objektiven Diagnosesicherung.

Als subjektive Methode dienen, wenn durchführbar, psychoakustische Prüfungen und Untersuchungen der rezeptiven- und produktiven Sprache. Die Arbeitsgruppe Moser empfiehlt die zusätzliche Funktionstestung des Vestibularapparates, aufgrund gegensätzlicher Literaturangaben hinsichtlich einer Mitbeteiligung bei einer ANSD [52, 161, 162, 191]. Differentialdiagnosen wie Fehlbildungen, Schädigungen oder eine Fehlanlage der Hörbahn werden mittels MRT-Bildgebung ausgeschlossen.

Die **ergänzende Diagnostik** dient zur Klärung der Ursachen einer diagnostizierten ANSD. Hierbei werden z. B. neurologische-, ophthalmologische-, humangenetische- und weitere bildgebende Untersuchungen durchgeführt, um Ursachen wie generalisierte neurologische Erkrankungen, häufige Mutationen und anatomisch-funktionelle Abweichungen der Hörbahn zu klären. Dabei legen Moser et al. [111] großen Wert auf „Diagnostik der Hör-, Sprach- und Kommunikationsentwicklung durch Logopäden (...), Hörgeschädigtenpädagogen (...), ggf. unter Hinzuziehen einer begleitenden kinderneurologischen und entwicklungspsychologischen Diagnostik.“

Letztlich liefern diese Zusatzuntersuchungen weitere Hinweise auf ein syndromales Krankheitsbild und dienen ggf. zur Diagnosesicherung einer nicht-syndromalen ANSD.

### 1.2.6 Therapie

Das Primärziel bei gesicherter ANSD ist die ausführliche Information und Beratung bezüglich Diagnose, Therapie und Prognose [111]. Bei Verdacht auf eine hereditäre Ursache der ANSD wird eine genetische Beratung angeboten. Ferner haben in diesem Fall die ausführliche audiologische Anamnese und Untersuchung von Familienangehörigen einen besonderen Stellenwert.

**FG und NG** werden bezüglich einer möglichen Nachreifung der Hörbahn mehrmals nachuntersucht. Moser et al. weisen darauf hin, dass eine Nachreifung ab einem Alter von zwölf bis 18 Monaten nicht mehr zu erwarten ist. Um keine kostbare Zeit der Nachreifung, der sensiblen Hör-, Sprach- und Verhaltensentwicklung durch erschwerte, langwierige Diagnostik zu „verschenken“, wird die Messung der sensiblen FAEP und eine probatorische HG-Versorgung durchgeführt. Die Anpassung des HG richtet sich nach den Ergebnissen der subjektiven Reflexaudiometrie. Unter Berücksichtigung der fluktuierenden Symptomatik wird mit einer schwachen Verstärkereinstellung begonnen, die ohne großen Zeitverlust gesteigert wird, bis Reaktionen beobachtbar sind. Das gewählte Gerät soll genug Reserve bezüglich einer späteren Justierbarkeit der Ausgangsschalldruckpegel und Verstärkung bieten [111]. Neben engmaschigen Kontrollen der Hörreaktion und Messung der OAE wird zusätzlich eine pädagogische Frühförderung durchgeführt. Die Ergebnisse der FAEP dienen zur Abklärung einer notwendigen CI-Versorgung bei einer Taubheit / an Taubheit grenzender Schwerhörigkeit.

Bei HS mit einem HV von weniger als 80 dB HL in der Verhaltensaudiometrie, erfolgt bei **Kindern bis sechs Jahre** ein Therapieversuch durch eine HG-Versorgung. Der Therapieerfolg wird anhand enger Kontrollen des Verhaltens, der Sprachentwicklung und des Sprachverständnisses beurteilt [130]. Aufgrund der besonderen Sprachverständnisstörungen im Störgeräusch ist im Schulalltag eine FM-Anlage (frequenzmodulierte Anlage) sinnvoll. Die Indikation einer CI-Versorgung ist gegeben, wenn sich ein objektiver und subjektiver Nutzen einer HG-Versorgung nach sechs bis neun Monaten Tragedauer nicht einstellt oder durch objektive Untersuchungsverfahren eine Taubheit / eine an Taubheit grenzender SH diagnostiziert wird [111]. Der Erfolg einer CI-Versorgung bei ANSD-Patienten ist vergleichbar mit einer Versorgung von SNHI-Patienten anderer Ursache [93, 101, 104, 123]. Auch CI-Versorgungen bei einer DFNB9 (*OTOF*-Mutation) verliefen positiv [137, 142]. Bleibt die CI-

Versorgung erfolglos, muss der Einsatz eines auditorischen Hirnstamm-Implantats (HIP) abgewogen werden ([31], AWMF-Reg.-Nr. 049/010, Stand: 02/2005). Parallel zur apparativen Versorgung erfolgt eine regelmäßige Hör-Sprach-Therapie. Dabei haben sich laut der Arbeitsgruppe Moser bei Kindern mit ANSD „Verfahren bewährt, die gesprochene Sprache möglichst synchron unterstützen, z. B. „cued speech““ ([15], <http://www.cuedspeech.co.uk>). Da weitere Erkrankungen – wie eine Mittelohrentzündung oder ein Paukenerguss – die HS bei einem ANSD-Patienten verstärken und somit wertvolle Zeit der Hör- und Sprachentwicklung verloren geht, müssen diese frühzeitig erkannt und therapiert werden.

Bilateral betroffene **Kinder und Erwachsene**, nach der Phase des Spracherwerbs, können bei ungenügender HG-Versorgung durch eine CI-Versorgung im Bereich des Sprachverstehens profitieren [70, 104]. Hierzu liefert der subjektive Promontoriumtest den Nachweis der Erregbarkeit des Hörnerven und Aussagen zum Erfolg einer CI-Versorgung.

Bei unklaren Ergebnissen oder einer Nichtdurchführbarkeit des Promontoriumtests bei Erwachsenen empfehlen Moser et al. den Einsatz der Positronenemissionstomographie (PET), die bei Kindern auch in Narkose durchgeführt werden kann [94].

Bei jüngeren Kindern muss der Promontoriumtest durch die Messung elektrisch evozierter FAEP (EE-FAEP) ersetzt werden. Die Nadel wird hierbei am Promontorium oder am runden Fenster platziert. Bei uneindeutigen EE-FAEP wird die Elektrode intracochleär platziert [87, 111]. Bei sicherer Indikation erfolgt die Versorgung durch ein CI [111].

### 1.3 Ziele dieser Arbeit

Diese Arbeit soll in seiner Durchführung als Modell für ein standardisiertes ANSD-Screening dienen, um die klinische Versorgungssituation der betroffenen Personen durch nicht-invasives Vorgehen zu verbessern. Schwerpunkt hierbei stellt die molekulargenetische Sequenzierstrategie und Sequenzanalyse dar.

Die Verbesserung soll im Wesentlichen durch zwei Verfahren sichergestellt sein:

1. Durch eine audiologische Testbatterie mit modifizierter BERA, die eine nicht-invasive ANSD-Diagnostik bei hörgestörten Kindern mit sekundär erloschenen OAE ermöglicht.
2. Durch die Erweiterung der molekulargenetischen Untersuchungsmöglichkeiten des Neurogenetik Labors um die Kandidatengene, wodurch eine Diagnosesicherung als auch eine Subtypisierung einer ANSD ermöglicht wird. Für die vorliegende Arbeit wird in Familien mit audiologisch unauffälligen Eltern und hörgeminderten Kindern, deren audiologische Befundkonstellation für eine ANSD spricht, eine Mutationsanalyse in den Genen *OTOF*, *GJB2*, *GJB3* und *GJB6* durchgeführt (► 1.4 Kandidatengene, S. 20).

Die Kenntnis über den Schädigungsort (endo- vs. retrocochleär) dient einerseits zur Abschätzung des Nutzens der gegenwärtigen (HG-)Versorgung und andererseits als Hilfestellung hinsichtlich einer Entscheidung über begleitende Maßnahmen (bilinguale Früherziehung im Sinne von Lippenlesen, Gebärdensprache) oder bei der Auswahl und Prognose invasiver apparativer Versorgungsmöglichkeiten (CI oder HIP).

Zusätzlich soll die routinemäßige – nicht invasive – DNA-Probenentnahme auf die Tauglichkeit und Zweckmäßigkeit im klinischen Alltag des Universitätsklinikums Münster geprüft werden.



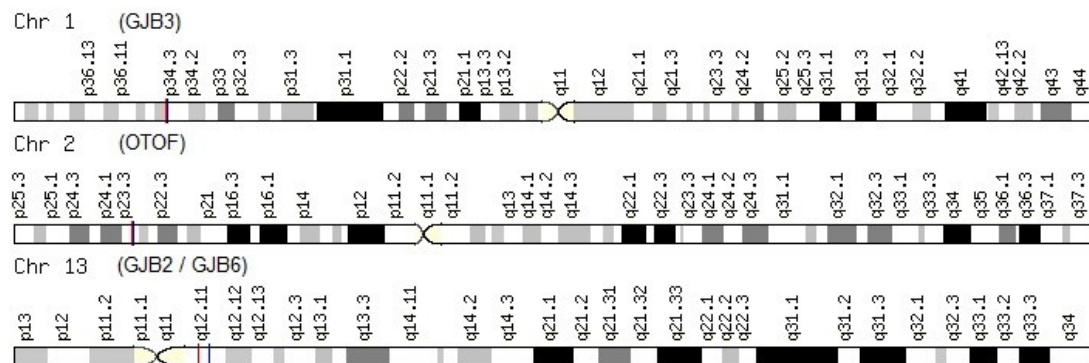
## 1.4 Kandidatengene

Die Sequenzierstrategie wird für Gene entwickelt, die einerseits in der Literatur häufig mit einer ANSD assoziiert werden und andererseits ein autosomal rezessives Vererbungsmuster für die isolierte ANSD zeigen, da die Eltern der in die Studie eingeschlossenen ANSD-Patienten ein klinisch intaktes Gehör besitzen (► 3.1 Teilergebnis – Audiologische Befunde, S. 62).

Die Sequenzierstrategie berücksichtigt folgende Gene:

Gen	Produkt	Genposition	genomische Größe (in bp)	Datenbankeintrag*
<b>GJB2</b>	Connexin 26	13q12.11	5509	NM_004004 (RefSeq)
<b>GJB3</b>	Connexin 31	1p34.3	5176	NM_024009 (RefSeq)
<b>GJB6</b>	Connexin 30	13q12.11	9272	NM_006783 (RefSeq)
<b>OTOF</b>	Otoferlin	2p23.3	101495	NM_194248 (RefSeq)

**Tabelle 1-2** Übersicht der Kandidatengene.  
\*“The National Center for Biotechnology Information”  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Stand: 03/2006 (NCBI36/hg18)).



**Abbildung 1-6** Ideogramme der Kandidatengene. Modifiziert.  
The Weizmann Institute of Science: *GeneCards v3* (<http://www.genecards.org>).  
Mit freundlicher Genehmigung von Fr. Marylin Safran.

Die Kenntnis über die ursächlichen Gene bei einer hereditären ANSD ermöglicht die Eingrenzung des Schädigungsortes, so dass primär endocochleäre Fehlfunktionen (z. B. OTOF-Mutationen) den retrocochleären / neuronalen Fehlfunktionen (z. B. *GJB*-Mutationen) gegenüberstehen.

### 1.4.1 Das Gen *OTOF*

In der Gruppe der ARNSHI sind *OTOF*-Mutationen die zweithäufigste Ursache einer SH mit ANSD-Symptomatik (DFNB9; OMIM 601071, Stand: 05/2010). Bisher sind für die nicht-syndromale autosomal-rezessive auditorische Neuropathie (NSRAN) keine weiteren Genmutationen außer in *OTOF* bekannt. Die häufigste *OTOF*-Mutation stellt hierbei *OTOF*:p.Q829X [107] dar. Die temperaturabhängige Klinik der ANSD (temperature sensitive, TS-NSRAN) wird den *OTOF*-Mutationen p.E1804del, p.Q994VfsX6 und p.R1607W zugeschrieben [102, 190].

*OTOF*<sup>\*</sup> (OMIM 603681 [4, 21], Stand: 05/2010) liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 2. Es beinhaltet 48 Exone [199] und kodiert das Transmembranprotein Otoferlin<sup>†</sup> (► Tabelle 1-2 und Abbildung 1-6, S. 20). Aufgrund von alternativem Spleißen (alternative splicing) sind bisher fünf Isoformen des Otoferlin bekannt (UniProtKB/Swiss-Prot Q9HC10 [68, 184], Stand: 05/2010, v94). Diese Formen unterscheiden sich in ihrer Produktgröße, Calcium- und Vesikel bindender Domänenzahl, dem Expressionsort und der Länge des carboxy-terminalen Endes. Die kurzen Formen besitzen drei C2-Domänen, die lange „Isoform 1<sup>‡</sup>“ (Otoferlin 1) hingegen sechs.

Die Arbeitsgruppe Yasunaga [200] konnte im experimentellen Tiermodell Spleißvarianten des Otoferlins an mehreren Orten – peripher und zentral – nachweisen (► Abbildung 1-7, S. 22).

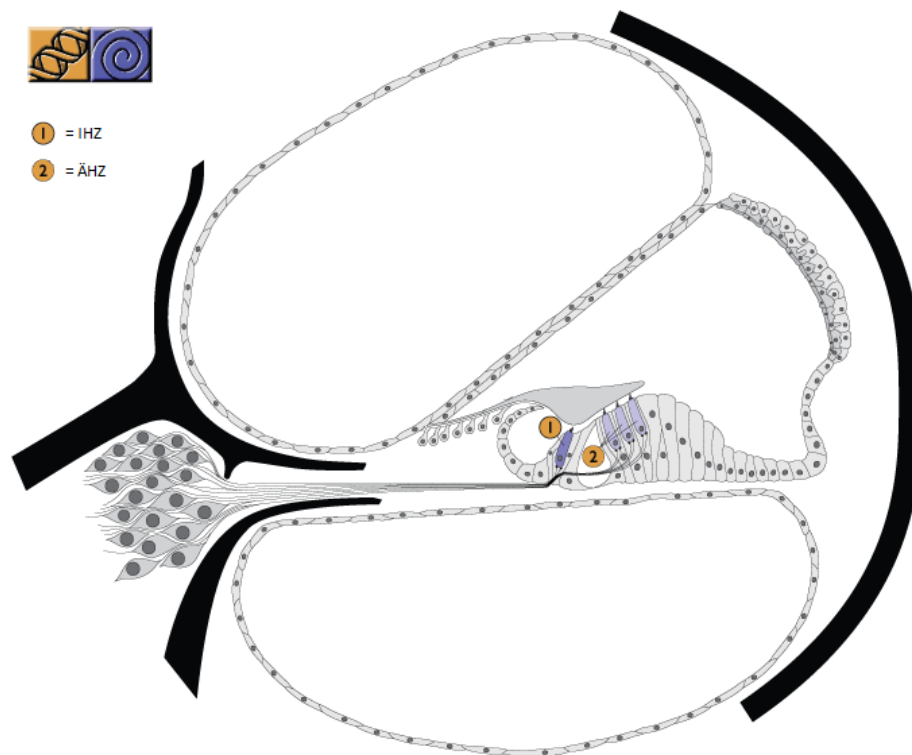
In der embryonalen Maus wird Otoferlin 1 in Gehirn, Cochlea (IHZ und ÄHZ), SGN und Vestibularapparat exprimiert, wobei die Expression in den ÄHZ der adulten Maus nicht mehr stattfindet – diese Tatsache wird zur Erklärung initial erhaltener OAE angeführt. Es wird angenommen, dass das Otoferlin 1 durch die Calcium bindenden Eigenschaften der C2-Domänen die vesikuläre Transmitterexozytose in der auditorischen Synapse steuert [16, 144]. Dementsprechend führen Aminosäuresubstitutionen in diesen Domänenbereichen zu einer Funktionsstörung der IHZ mit dem klinischen Bild der ANSD [108].

---

\* Synonym: AUNB1, DFNB6, DFNB9, FER1L2, NSRD9, *OTOF\_HUMAN*

† Synonym: Fer-1 like protein 2

‡ Synonym: Otoferlin a, Isoform a



**Abbildung 1-7** Cochleäre Expressionsorte von Otoferlin.  
IHZ = innere Haarzellen; ÄHZ = äußere Haarzellen. Modifiziert.  
Mit freundlicher Genehmigung der Autoren der „Hereditary Hearing Loss Homepage“  
(<http://hereditaryhearingloss.org>), Guy Van Camp und Richard J.H. Smith.

#### 1.4.2 Die Gene *GJB2*, *GJB3* und *GJB6*

Die häufigste Ursache einer SH in der Gruppe der ARNSHI-Patienten (50 Prozent) stellt die DFNB1 dar (OMIM 220290, Stand: 05/2010), die durch Mutationen in den Genen *GJB2* [48, 71, 72, 202] und *GJB6* [40] verursacht wird (OMIM 121011, 604418, Stand: 05/2010).

Beide Gene kodieren für jeweils eine spezifische transmembrane Connexinprotein-Untereinheit, sechs Untereinheiten bilden eine zelluläre Pore – das Connexon (hemichannel). Zwei Connexone benachbarter Zellen liegen sich gegenüber und bilden dadurch einen Zell-Zell-Kanal (gap junction\*), der die elektro-chemische Kopplung beider Zytoplasmen herstellt und reguliert. *GJB2* kodiert für das Connexin 26 (Gap junction protein, beta 2), *GJB3* für das Connexin 31 und *GJB6* für das Connexin 30 (Gap junction protein, beta 6) (► Tabelle 1-2 und Abbildung 1-6, S. 20). Nexus kommen z. B. in der Myelinscheide der SGN vor.

\* Synonym: Nexus

Cheng et al. berichteten 2005, dass die Klinik einer ANSD sowohl durch die homozygote Trägerschaft von *GJB2*-Mutationen, als auch durch die Kombination zweier unterschiedlicher Sequenzabweichungen in beiden homologen Allelen (Compound-Heterozygotie) oder eine digene Vererbung (*GJB2* / *GJB6*) hervorgerufen wird [28].

Laut „Deafness Research Group“ (CRG, <http://davinci.crg.es/deafness>) sind die Mutationen *GJB2*:c.35delG, *GJB2*:c.167delT und *GJB2*:c.235delC häufigste Ursache einer hereditären NSRHI im Sinne einer DFNB1.

Als weitere Ursache einer SH, im Sinne einer DFNB1, beschrieb die Arbeitsgruppe Liu et al. 2009 [96] ein digenes Vererbungsmuster (*GJB2* / *GJB3*) mit Beteiligung eines varianten *GJB3*-Allels (OMIM 603324, Stand: 05/2010). Zuvor berichteten Lopez-Bigas et al. 2001 von einer Familie mit hereditärer Neuropathie und zusätzlicher ANSD-Symptomatik, bei der eine *GJB3*-Punktmutation vorlag [97].

Den Stellenwert der Connexine für die funktionelle Integrität des Innenohrs unterstreicht eine tierexperimentelle Studie von Tang et al., die durch Ablation von Connexin 29 in transgenen Mausmutanten eine ANSD-konforme Symptomatik induzieren konnten [179]. Das murine Connexin 29 weist eine 75-prozentige Homologie zum humanen Connexin 30 auf.

## 2 Patienten und Methoden

### 2.1 Überblick – Audiologie und Molekulargenetik

Die audiologische Untersuchung der Patienten erfolgte mittels modifizierter Testbatterie in der Klinik und Poliklinik für **Phoniatrie und Pädaudiologie** des Universitätsklinikums Münster (Direktorin: Fr. Prof. Dr. A. G. am Zehnhoff-Dinnesen). Die Genotypisierung der identifizierten ANSD-Patienten erfolgte im **neurogenetischen Labor** der Klinik und Poliklinik für Neurologie des UKM (Direktor: Prof. Dr. E. B. Ringelstein; Laborleitung: Prof. Dr. P. Young). Hier wurde zunächst eine Erweiterung der Sequenzierstrategie um die z. Zt. nicht etablierten ANSD-Kandidatengene entwickelt, um anschließend ein standardisiertes DNA-Proben-Screening durchführen zu können. Dazu wurde letztlich die DNA-Sequenz der Kandidatengene im Zentrallaboratorium des Universitätsklinikums Münster (Leiter: Dr. B. Schlüter) ermittelt und in der Neurogenetik EDV-gestützt ausgewertet.

### 2.2 Patientenrekrutierung und Kontrollpersonen

#### 2.2.1 Patienten

Mit ca. 200 neudiagnostizierten SNHI-Patienten in der Klinik und Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie des Universitätsklinikums Münster und einer geschätzten Prävalenz der ANSD in dieser Gruppe von fünf bis elf Prozent war eine repräsentative Anzahl von ANSD-Patienten zu erwarten. Die Vorstellung der Patienten erfolgte z. B. bei Auffälligkeiten im Rahmen des NG-Hörscreenings, eines geringen Benefits von einer HG-Versorgung der Kinder mit eingeschränktem Sprachverständnis im Störgeräusch oder aufgrund eines elterlichen Verdachts auf Sprach-, Entwicklungs- und Verhaltensstörungen.

#### 2.2.2 Kontrollpersonen

Zur Klärung der klinischen Relevanz einer gefundenen Sequenzabweichung mit konsekutiver Aminosäuresubstitution wurde die Allelfrequenz in einer mit den Patienten vergleichbaren gesunden Population ermittelt. Die Kontrollgruppe in diesem Projekt bestand aus 130 gesunden Probanden kaukasischer Herkunft. Die schriftlichen Einverständniserklärungen lagen vor.

### 2.2.3 Audiologische Untersuchung

Die audiologische Phänotypisierung der Patienten erfolgte – nach schriftlicher Einverständniserklärung der Eltern und Zustimmung durch die Ethikkommission – in der Klinik und Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie des Universitätsklinikums Münster (Direktorin: Fr. Prof. Dr. A. G. am Zehnhoff-Dinnesen). Hierzu wurden Untersuchungen des Mittel- und Innenohrs, sowie der Hörbahn durchgeführt. Um bei diagnostizierter ANSD eine isolierte- von einer syndromalen Form zu unterscheiden, wurden die Patienten anschließend mithilfe eines Fragebogens bezüglich einer peripheren Neuropathie (PNP) gescreent (► Abbildung 4-1, S. 98).

Zur Prüfung der **Innenohrfunktion** und des Sprachverständnisses erfolgte eine Reintonaudiometrie und eine Sprachaudiometrie (Göttinger- / Freiburger Sprachtest bei 80 dB) im Störgeräusch mit dem AT900 Audiometer (Auritec, Hamburg, Deutschland).

Im Reintonaudiogramm wurde der gewichtete mittlere Hörverlust (MHV) bei Frequenzen von 500, 1000 und 2000 Hz ermittelt. Die Kontrolle der OAE mit dem ILO88 oder ILO292 (Otodynamics, Hatfield, UK) beinhaltete die Messung der DPOAE und TEOAE im nicht-linearen Stimulationsmodus bei 80 dB  $\pm$  1 dB. Zusätzliche Messungen der CAS dienten zur Beurteilung des medialen olivo-cochleären Reflexbogens (MOC) und der ÄHZ-Mikromechanik. Hierzu konnte am kontralateralen Ohr mittels Einsteckhörer ein konstantes Breitbandrauschen (BBR) von 60 dB angeboten werden, während simultan die TEOAE-Messung mit und ohne kontralaterales BBR erfolgte [112].

Die **Hörbahn** konnte mit der Evoselect ABR (Pilot Blankenfelde, Blankenfelde, Deutschland) und Einsteckhörern untersucht werden. Die FAEP wurden – zur Wellensynchronisation – durch Chirp-Stimuli [36], Click-Stimuli mit alternierenden Reizraten von 40,5 und 11,1 Hz [8] und konstanten Sog-Druck-Impulsen [10] evoziert. Zum Ausschluss einer HS anderer Genese, erfolgte die kraniale Bildgebung mittels Magnet-Resonanz-Tomographie (cMRT).

Impedanzmessungen (Stapediusreflexe und Tympanometrie) mit dem GSI 33 Middle Ear Analyzer (Grason Stadler, Eden Prairie, MN, USA) dienten u. a. zur Beurteilung der **Mittelohrfunktionen**; das **Gleichgewichtsorgan** wurde kalorisch getestet.

Die Dokumentation erfasste zudem einerseits potentielle Risikofaktoren für eine möglicherweise erworbene ANSD und andererseits die Familienanamnese bezüglich einer bekannten HS. Bei schon vorhandener HG-Versorgung wurde zusätzlich auch der Nutzen des Patienten von einer solchen Therapie erhoben.

Es folgte eine Aufklärung und Therapieeinleitung, z. B. durch HG-Versorgung und audioverbaler Sprachförderung, sowie eine DNA Probenentnahme zur weiteren molekulargenetischen Untersuchung (► 2.2.4 Probenentnahme, S. 26). Audiologische Nachuntersuchungen dienten zur Kontrolle des Therapieerfolges und zum Erkennen einer Hörbahnnachreifung.

#### 2.2.4 Probenentnahme

Nach Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärungen und Zustimmung durch die Ethikkommission wurden die Proben gesammelt. Dabei wurde für die Patienten und ihre Angehörigen hauptsächlich das Oragene DNA Self-Collection Kit (DNA Genotek Inc., Kanata, Ontario, Kanada) verwendet, das je nach Ausführung entweder einen Sammelbehälter in Form einer Phiolen (OG-100) oder Disc (OG-250) beinhaltet. Diese Gefäße wurden nach zugehörigem Protokoll bis zur Markierung mit Speichel (ca. 2 ml) gefüllt und bei Raumtemperatur gelagert. Bei erschwerter Speichelabgabe, z. B. bei Säuglingen und Kleinkindern, wurden die mitgelieferten Wattestäbchen verwendet, um den Speichel aus der Wangentasche aufzunehmen. Der wattetragende Teil des Stäbchens wurde im Sammelbehälter fixiert und mit einer sterilen Schere abgetrennt. Die im Deckel des Behälters vorhandene Flüssigkeit wurde durch den Verschlussvorgang freigesetzt und durch manuelles Schütteln mit der Speichelprobe gemischt. Die Proben waren ab diesem Zeitpunkt bei Raumtemperatur mehrere Jahre lagerbar und konnten ohne besonderen Aufwand transportiert, gelagert und verschickt werden.

Abgesehen davon, dass dieses „nicht invasive“ Vorgehen die Probengewinnung insbesondere für Kinder erleichterte, sollte zudem laut Hersteller das Speichel-Isolationsverfahren – verglichen mit der herkömmlichen EDTA-Vollblutmethode – durchschnittlich die doppelte DNA-Menge liefern (55 µg DNA / ml statt 30 µg / ml) [140]. Die auf diese Weise erhaltene DNA sollte laut Hersteller uneingeschränkt für weitere Untersuchungsschritte (z. B. polymerase

chain reaction [PCR] oder whole genome amplification [WGA]) und Sequenzanalysen weiterverwendbar sein [146].

## 2.3 Molekulargenetische Untersuchung

### 2.3.1.1 Begriffsdefinition und Überblick über die Sequenzierstrategie

Um Verwechslungen [33, 34, 103] zu vermeiden, sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass der Begriff „Mutation“ **neutral** für jedwede Sequenzänderung auf Ebene der Nukleinsäure verwendet wird, ohne weitere Aussagen hinsichtlich eines eventuellen Krankheitswertes zu treffen. Dazu gleichbedeutend sind die neutralen Begriffe „Abweichung“ und „Sequenzvariation“. Ein „Polymorphismus“ hingegen besagt, dass die Abweichung keine klinische Relevanz zur Folge hat und / oder mit einer Allelfrequenz von mindestens einem Prozent in einer gesunden Kontrollgruppe zu finden ist. Ein „single nucleotide polymorphism“ (SNP) wiederum erfüllt einerseits die genannten Kriterien eines Polymorphismus und andererseits wird die zugrunde liegende Art der Sequenzabweichung näher definiert – ein SNP hat seine Ursache in einem einzelnen Basenaustausch (Punktmutation). Als „still“ oder „stumm“ (silent mutation) wird eine Mutation bezeichnet, wenn die Veränderung der Basensequenz keinen Aminosäureaustausch (Aminosäuresubstitution) zur Folge hat. Eine „neutrale“ Mutation hingegen bezeichnet eine Veränderung der Nukleinsäuresequenz mit daraus folgender Aminosäuresubstitution, jedoch ohne Krankheitswert für den Organismus, dies entspricht wiederum einem Polymorphismus. Zur Vermeidung von Missverständnissen und zur Erleichterung der Lesbarkeit wird im Folgenden – wenn möglich – der neutralere Begriff „Sequenzabweichung“ anstatt Mutation verwendet, oder im Falle einer gesicherten nicht-pathogenen Sequenzabweichung von „Sequenzvariante“.

Nachdem die DNA isoliert wurde, erfolgte die Konstruktion von flankierenden Oligonukleotidprimern für die kodierenden Bereiche der Kandidatengene und schließlich eine selektive Amplifikation (polymerase chain reaction, PCR) der genannten Exone [147]. Die PCR-Produkte (Amplifikate) dienten anschließend selbst als Matrize für die Sequenzierreaktion (Sequenzier-PCR), aus denen die Basenabfolge (Sequenz) EDV-gestützt gelesen werden konnte. Die nun bekannte, patientenspezifische DNA-Sequenz wurde auf Abweichungen mit Online-Datenbanken und Literaturangaben verglichen. Die Klärung bisher unbekannter Positionen für einen Basenaustausch mit nachfolgender Aminosäuresubstitution (Aminosäureaustausch)



erfolgte durch RFLP-Kontrollen (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) innerhalb einer vergleichbaren gesunden Kontrollgruppe. Hierdurch ließen sich Aussagen über eventuell klinisch relevante Mutation oder – im Falle von einem neutralen Basenaustausch – über Allelfrequenzen treffen. Zwischen den im Folgenden beschriebenen Methodenschritten und auch in Fällen von Sequenzvariationen wurden Kontrollen durchgeführt, die einerseits die Quantität des DNA-Materials sicherstellten (durch Photometrie, Agarosegelelektrophorese), als auch einen Fehler hinsichtlich der gefundenen Basenabweichung ausschlossen. Somit erfolgte eine Verifizierung des Locus durch eine Wiederholung des gesamten Vorgangs – von der DNA Isolation bis hin zur Sequenzanalyse. Denkbar waren in diesem Fall nicht nur Anwendungsfehler, wie eine Verwechslung und Kontamination der Proben oder eine fehlerhafte EDV-Auswertung, sondern auch Fehler während der Amplifikationsreaktion (PCR) durch die eingesetzte thermostabile DNA-Polymerase (*Thermus aquaticus*, Taq-Polymerase). Es war bekannt, dass diesem Enzym die 3' - 5' Exonukleaseaktivität fehlte [91] und somit keine „Korrekturlesung“ (proof reading) erfolgte, mit dem Ergebnis einer „Basentausch-Fehlerrate“ von 1 : 9000 Nukleotiden [183]. Wäre dieser Fehler in den ersten Zyklen einer PCR aufgetreten, so wäre in der Auswertung eine fälschlicherweise heterozygote Trägerschaft des Patienten für diesen Austausch festgestellt worden. Nach Bestätigung der gefundenen Loci wurden diese mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) auf Allelfrequenzen in einer gesunden Vergleichsgruppe kontrolliert.

Die Durchführung jedes einzelnen Schrittes erforderte größte Sorgfalt, damit Kontaminationen oder Verwechslungen der Proben vermieden werden konnten.

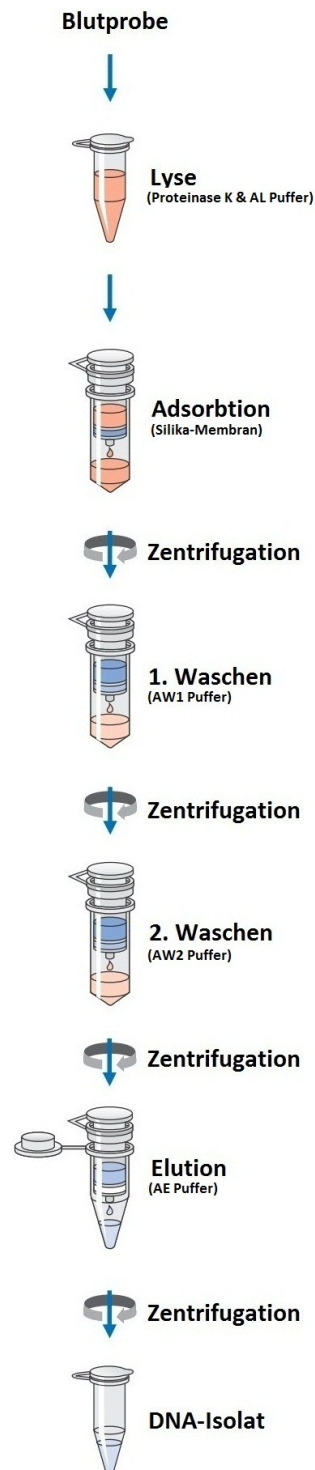
### **2.3.1.2 Isolation genomischer DNA**

Zur Isolation der Patienten-DNA fanden abhängig von der Art der vorliegenden Proben – EDTA-Vollblut (Probanden der Kontrollgruppe) oder Speichelasservat – unterschiedliche Methoden ihre Anwendung. Im Folgenden werden einmalige Vorbereitungen, wie sie z. B. für den erstmaligen Gebrauch eines Isolations-Kits benötigt wurden (Auftauvorgänge oder Verdünnung von Pufferkonzentraten) nicht erwähnt. Diese Schritte sind den genannten Protokollen entnehmbar.

### 2.3.1.2.1 EDTA-Vollblut

Zur DNA-Isolation aus Lymphozyten wurde eine 200 µl EDTA-Vollblutprobe aus der Monovette (EDTA KE / 9 ml; SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) in ein 1,5 ml Standard Reaktionsgefäß (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) pipettiert und mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit und zugehörigem Protokoll (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) verarbeitet. Zuerst erfolgte die Lyse zellulärer und enzymatischer Bestandteile der 200 µl Probe durch Zugabe von 20 µl Proteinase-K (600 mAU / ml) und 200 µl Puffer (AL-Buffer) mit Durchmischung auf dem Reagenzglasschüttler (EU 444-1372; VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) für 15 Sekunden. Anschließend folgte eine 10 minütige Phase im Inkubator (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) bei 56 °C. Nach Hinzufügen von 99-prozentigem Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) wurde das Lysat wiederum für 15 Sekunden auf dem Reagenzglasschüttler gemischt. Zur Trennung der freigesetzten DNA von dem Rest der Lösung, wurde die gesamte Mixtur in eine spezielle Kombination aus Säule mit Silika-Membran (QIAamp Mini spin column) und 2 ml Auffanggefäß pipettiert und 1 Minute lang bei 8000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5804 R; Eppendorf GmbH, Hamburg). In dieser Zeit passierte das Lysat die Silika-Säule, woran die DNA aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen adsorbierte, während der Rest der Mixtur größtenteils in das 2 ml Auffanggefäß abzentrifugiert wurde. Damit

verbliebene Lysatreste aus der Säule entfernt werden konnten, folgten 2 weitere separate „Waschvorgänge“ mit den Waschpuffern AW1 (500 µl) und AW2 (500 µl) mit anschließender



**Abbildung 2-1** Arbeitsschritte nach Handbuch. Modifiziert. Mit freundlicher Genehmigung durch die QIAGEN GmbH.

Zentrifugation nach jedem Schritt (8000 rpm für 1 Minute und zuletzt mit 14000 rpm für 3 Minuten). Filtrat und Auffanggefäß wurden verworfen und gegen ein neues Gefäß getauscht. Um die DNA aus der Säule zu lösen wurde 200 µl Elutionspuffer (AE Buffer; 10 mM TRIS-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) auf die Säule aufgetragen und 5 Minuten bei 23 °C Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Säule zentrifugiert (8000 rpm / 1 Minute) und die gereinigte genomische DNA samt 1,5 ml Auffanggefäß entnommen. Laut Hersteller des Kits waren Fragmente von bis zu 150 kb Länge und einer Konzentration von ca. 30 ng DNA / µl Eluat bei diesem Verfahren zu erwarten. Es folgte eine photometrische Kontrolle der Probe (► 2.3.1.2.3 Photometrie, S. 31).

#### 2.3.1.2.2 Oragene® Speichelasservat

Die DNA Aufreinigung aus der Speichelprobe erfolgte nach modifiziertem Oragene Protokoll und mittels des mitgelieferten Reinigungspuffers (Oragene Purifier, OG-L2P; DNA Genotek Inc., Kanata, Ontario, Kanada). Als „DNA-Quelle“ dienten hierbei sekretorische Lymphozyten (IgA) und Epithelzellen der Mundschleimhaut. Zur Vorbereitung wurde die Speichelprobe im Oragene Sammelbehälter (Oragene DNA Disc OG-250, Oragene DNA Vial OG-100) bei 23 °C Raumtemperatur auf dem Thermomixer comfort (1,5 ml; Eppendorf GmbH, Hamburg) für 30 Minuten (1000 rpm) durchmischt. Dieser Schritt diente der Freisetzung von DNA und Inaktivierung vorhandener Enzyme (Nukleasen) in der Probe. Anschließend wurden 500 µl der Probe in ein 1,5 ml Standard Reaktionsgefäß pipettiert und auf dem Thermomixer comfort (300 rpm / 30 Minuten bei 50 °C) inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Verunreinigungen in der Lösung durch Hinzugabe von 20 µl Oragene Purifier (OG-L2P) und Schwenken per Hand für mindestens 5 Sekunden ausgefällt (Trübung der Lösung). Um den Präzipitationsvorgang zu unterstützen erfolgte eine Inkubation auf einem Kühlelement für Reaktionsgefäße (Eppendorf IsoTherm; Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) im Eisfach bei -18 °C für 15 Minuten. Danach wurde die Lösung durch Zentrifugation (Centrifuge 5415 C; Eppendorf GmbH, Hamburg) mit 13000 rpm für 8 Minuten in Überstand und Bodensatz (Pellet) getrennt. Der klare Überstand wurde in ein 2 ml Standard Reaktionsgefäß umpipettiert und das Pellet verworfen.

In den nächsten Schritten wurde die DNA zur weiteren Aufreinigung zunächst ausgefällt und zur weiteren Verwendbarkeit anschließend wieder in Lösung gebracht.

Erst wurde 500  $\mu\text{l}$  99-prozentiges Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt. Während des anschließenden 10 bis 15-fachen langsamen Schwenkens per Hand wurde ausgefällte DNA gelegentlich als „Präzipitatfaden“ sichtbar. Die fragile DNA wurde erschütterungsfrei bei 23 °C Raumtemperatur inkubiert und danach mit 13000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5415 C; Eppendorf GmbH, Hamburg). Der Überstand wurde – ohne Irritation des sichtbaren oder unsichtbaren DNA-Pellets – verworfen.

Um die DNA wieder zu lösen wurde als Lösungsmittel 100  $\mu\text{l}$  1 $\times$  TE-Puffer (10 mM TRIS-HCl, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz und 1 mM EDTA, MP Biochemicals, LCC, Solon, OH, USA, pH 8,0) in das Gefäß gegeben und anschließend auf dem Thermomixer comfort (1,5 ml; Eppendorf GmbH, Hamburg) mit 750 rpm für 1 Stunde bei 50 °C inkubiert. Die Funktion dieses Puffers bestand nicht nur darin als Lösungsmittel zu wirken, sondern es senkte zum Einen durch den pH-Wert von 8,0 die Aktivität von noch vorhandenen DNA-Nukleasen und zum Anderen chelierte es EDTA-Metallionen, die von diesen Enzymen für eine normale Funktion benötigt worden wären. Die gereinigte Probe mit genomischer DNA wurde zur besseren Handhabung in ein 1 ml Biosphere MicroTube (mit anhängendem Deckel; SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) umpipettiert. Laut Oragene-Protokoll war eine DNA-Konzentration von 20 - 200 ng/ $\mu\text{L}$  zu erwarten. Es folgte eine photometrische Kontrolle der Probe (► 2.3.1.2.3 Photometrie, S. 31).

### 2.3.1.2.3 Photometrie

Die DNA-Konzentration in den vorliegenden Proben wurde mittels Photometrie ermittelt. Hierbei wurde im Licht-Strahlengang die Extinktionsrate der reinen Lösung bestimmt, um anschließend den DNA-Gehalt einer Probe ermitteln zu können. Die Absorption (**A**) ist abhängig von der Wellenlänge des Lichts und der Länge des Strahlenganges, als auch von der Transmissionseigenschaft und Konzentration der durchstrahlten Lösung (Lambert-Beer Gesetz). Die Messung der DNA-Konzentration ( $C_{\text{gDNA}}$ ) erfolgte durch Licht mit einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 260 nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäure,  $A_{260}$ ) und in einer Einweg-Küvette (UVette 220 - 1600 nm, 50 - 2000  $\mu\text{l}$ ; Eppendorf GmbH, Hamburg) im BioPhotometer 6131 (v1.35; Eppendorf GmbH, Hamburg). Werte für  $A_{260}$  sollten im Bereich von 0,1 - 1,5 liegen, bei höheren Werten wurde die Probe zusätzlich verdünnt und gemessen.

Um verbleibende Verunreinigungen in der Lösung aus der Berechnung ausschließen zu können, wurde außerdem die Absorption bei  $\lambda = 320$  nm gemessen ( $A_{320}$ ) und von allen ermittelten Absorptionswerten subtrahiert (korrigierte Absorption). Anschließend folgte die Berechnung der  $C_{gDNA}$  mit Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (**VF**) der Messprobe und Konversionsfaktors (**KF**) für reine DNA (Faktor 50). Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$C_{gDNA} \text{ (in ng / } \mu\text{l)} = (A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ (VF)} \times 50 \text{ (KF)}.$$

Da die vollständige Trennung von Protein und DNA nicht gelang, wurde zudem auch der Absorptionswert der Lösung bei  $\lambda = 280$  nm (Absorptionsmaximum von Protein,  $A_{280}$ ) gemessen und das Verhältnis aus den korrigierten Werten berechnet:

$$A = \frac{A_{260 \text{ nm}} - A_{320 \text{ nm}}}{A_{280 \text{ nm}} - A_{320 \text{ nm}}}.$$

Je höher der Quotient ausfiel, desto „reiner“ war das vorliegende DNA-Isolat in der gemessenen Probe. Das erwartete „korrigierte“ Verhältnis für die Proben lag bei über 1,6.

Zur Messung der gDNA-Isolate aus den Speichelproben wurde vorher ein Nullabgleich des Photometer mit reinem 1× TE-Puffer (10 mM TRIS-HCl, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz und 1 mM EDTA, MP Biochemicals, LCC, Solon, OH, USA, pH 8,0) durchgeführt. Vor der Messung der DNA-Menge aus dem EDTA-Vollblut und der WGA erfolgt standardmäßig jeweils ein Nullabgleich mit HPLC-H<sub>2</sub>O (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland).

Die Reinheit und Konzentration der Proben lag im erwarteten Bereich. Die photometrische Messung der WGA-gDNA-Probe (Patient 5) zeigte einen hohen Reinheitsgrad (1,8) und eine hohe DNA-Konzentration (1231,0 ng /  $\mu$ l). Die Agarosegelelektrophorese (► 2.3.1.4.1 Agarosegelelektrophorese (PCR-Kontrolle), S. 39) dieser Probe zeigte ein gering gewandertes Bandenmuster, das deutlich über der längsten Bande (1 kb) des GeneRuler 100 Basenpaar (bp) DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) lag.

Somit entsprach die WGA-gDNA-Probe – laut Qiagen-Protokoll – dem Kriterium erwarteter Fragmentlängen von 2 – 100 kb und wies eventuell eine sogar zu hohe gDNA-Konzentration für

die folgende PCR auf. Daher wurde die Probe – wie im Protokoll empfohlen – zehnfach mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf ca. 120 ng DNA / µl verdünnt.

### 2.3.1.3 Vorbereitungen zur Amplifikation

Um selektiv Abschnitte der gDNA amplifizieren zu können, wurden Oligonukleotidprimer benötigt, die diesen Bereich der Doppelstrang-DNA (double strand DNA, dsDNA) flankierten. Dabei lagerte sich jeweils ein Primer am 3'-Ende des codierenden Strangs (sense / forward Primer) und nicht-codierenden Strangs (anti-sense / reverse Primer) an und bot der eingesetzten DNA-Polymerase freie 3'-OH-Gruppen. Nach Abspaltung dieser Gruppe begann die DNA-Polymerase die Synthese eines neuen Strangs (primer extension) durch den Einbau von Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTP) [113]. Damit die Hybridisierung (Anlagerung des Primer an die DNA-Matrize) am richtigen Locus stattfand, wurde einerseits eine vollständige Komplementarität des Primers zur Exon flankierenden 3'-Region und andererseits eine Einzelstrang-DNA-Matrize (single strand DNA, ssDNA) vorausgesetzt.

Die Primersequenz – charakteristisch für den Anlagerungsort – wurde mittels Primer-Design (► 2.3.1.3.1 Primer-Design, S. 34) definiert, wobei die verwendeten Programme Empfehlungen für die optimale Anlagerungstemperatur (annealing temperature,  $T_A$ ) für Primer und zugehörigen Locus ausgaben. Die  $T_A$  diente dazu, Fehlhybridisierungen zu minimieren, indem nach der Trennung/Schmelzung der dsDNA in ssDNA (melting temperature,  $T_M$ ) die Temperatur in vitro lediglich soweit gesenkt wurde, dass nur die Hybride mit den meisten Wasserstoffbrückenbindungen entstanden und stabil blieben. Dies war der Fall, wenn der Primer in seiner Nukleotidsequenz vollständige Komplementarität zur Matrize aufwies. Die  $T_A$  lag unterhalb der  $T_M$  und konnte häufig anhand dieser in Kombination mit den Vorschlägen der Primer-Design-Software abgeschätzt werden. Die  $T_M$  hing von unterschiedlichen Faktoren ab, wie z. B. von der Zahl der komplementären Basenpaare (A-T und G-C) sowie ihrer Stapelung (Basenpaar-Sequenz) und Wechselwirkung (stacking interaction) in der DNA-Doppelhelix [198]. Zur Berechnung dienten verschiedene Formeln [188], die mehr oder weniger genau waren, die Bekannteste hiervon war die Wallace-Regel:

$$T_M = (A + T) \times 2^\circ\text{C} + (G + C) \times 4^\circ\text{C}.$$

Das in der PCR einst verwendete thermolabile Enzym „Klenow-Fragment“ [113, 147] wurde inzwischen durch eine Reihe thermostabilerer Enzyme für unterschiedliche Anforderungen, mit jeweils unterschiedlicher Fehlerrate, ersetzt [3].

Das bekannteste und auch hier genutzte Enzym war die Taq-Polymerase. Sie erwies sich im angewandten PCR-Programm (► Tabelle 2-5, S. 39), mit ihrer Aktivitätsabnahme von Zyklus zu Zyklus – bedingt durch die hohe  $T_M$  – als relativ thermostabil [147]. Zur Reduktion der Synthesefehlerrate, erfolgte die Kombination des PCR-Ansatzes (► Tabelle 2-4, S. 38) mit unterschiedlichen Zusätzen, wie  $MgCl_2$  (25 mM) und 5× Q-Solution (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) [47]. Da die in 5′ - 3′ Richtung synthetisierten Fragmente ihrerseits als Matrize im nächsten Zyklus dienten, folgte eine exponentielle Amplifikation der flankierten Sequenz mit  $2^n$  (n = Anzahl der Zyklen).

### 2.3.1.3.1 Primer-Design

Um Primer entwickeln zu können, war es wichtig die genomische und kodierende Sequenz der Gene (cDNA) zu kennen. Hierzu diente der – durch die „University of California Santa Cruz“ (UCSC; Santa Cruz, CA, USA) kostenlos zur Verfügung gestellte – „Genome Browser“ (<http://genome.ucsc.edu/>). Die verwendeten Gen-Informationen (► Tabelle 2-1, S. 35) stammten aus dem „Reference Sequences“ (RefSeq) Datensatz vom März 2006 (NCBI36 / hg18)“, welcher durch „The National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Bethesda, MD, USA) [24] dem UCSC Genome Browser bei Genanfragen zur Verfügung gestellt wurde. Dort waren die Sequenzen unter der jeweiligen Zugriffsnummer (accession number) aus einer der zahlreichen Datenbanken abrufbar [195]. Dieser Nummer ging ein Präfix voraus, das die Herkunft der eingesehenen Sequenz zeigte.

In diesem Fall stammten alle verwendeten Referenzsequenzen von RNA-Transkripten (Präfix „NM\_“), aus denen wiederum auf die zugrunde liegende DNA-Sequenz geschlossen wurde (► Tabelle 2-1, S. 35).

Gen	Produkt	Genposition	genomische Größe <sup>1</sup>	Datenbankeintrag <sup>2</sup>
GJB2	Connexin 26	13q12.11	5509	NM_004004 (RefSeq)
GJB3	Connexin 31	1p34.3	5176	NM_024009 (RefSeq)
GJB6	Connexin 30	13q12.11	9272	NM_006783 (RefSeq)
OTOF	Otoferlin	2p23.3	101495	NM_194248 (RefSeq)

**Tabelle 2-1** Information über verwendete Kandidatengene.  
<sup>1</sup>in Basenpaaren (bp), <sup>2</sup>“The National Center for Biotechnology Information“  
[\(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/); Stand: 03/2006 (NCBI36/hg18)

Die erhaltenen c- und gDNA Informationen wurden auf der ExonPrimer-Seite (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>) des Instituts für Humangenetik Helmholtz Zentrum München GmbH (München, Deutschland) eingefügt und mit den Standardeinstellungen verwendet. Diese Seite diente mit ihrer vereinfachten Bedienoberfläche und den zugehörigen Voreinstellungen als anleitende / übergeordnete Kommandoebene (Script) für die eigentlichen zwei Programme im Hintergrund. Diese Programme waren zum einen „BLAT-Search Genome“ (► 2.3.1.8 Sequenzanalyse, S. 52), zur Verfügung gestellt durch die o. g. UCSC. Hierbei wurden die eingefügten Sequenzen nochmals für die Primerkonstruktion mit der Datenbank abgeglichen. Zum anderen wurde das eigentliche Primer-Design-Programm gesteuert – Primer3 v0.4, welches vom Whitehead Institute for Biomedical Research (Cambridge, MA, USA) zur Verfügung gestellt wurde [145].

Die Standardeinstellungen von ExonPrimer verlangten für die zu konstruierenden Primer einen 35 bp-„Sicherheits-Abstand“ von den Exonregionen. Hierdurch wurden letztendlich die exonflankierenden Spleißakzeptor- und Donorpositionen durch die PCR berücksichtigt, so dass Basenänderungen in diesen Bereichen nicht übersehen werden konnten. Außerdem wurde für die Primer eine Minimumlänge von 17 Nukleotiden verlangt, um die Wahrscheinlichkeit einer Fehlhybridisierung zu minimieren. Zu beachten ist, dass nur die kodierenden Abschnitte der Gene durch Primer abgedeckt wurden. Dies bedeutet, dass 5'- und 3'-flankierende nicht-codierende Bereiche (untranslated regions, UTR) keine Berücksichtigung fanden und sich die Gesamtzahl der Exone dieser Studie von den Zahlen im UCSC Genome Browser unterschieden. Das heißt z. B., dass *OTOF* durch 46 Exone für die lange Isoform (Isoform a) des Otoferlin kodierte, das Gen jedoch in der Datenbank mit 48 Exonen verzeichnet war, da die UTR dort mitgezählt wurden.



Kleinbuchstabile Primersequenzen zeigten an, dass diese intronisch hybridisierten. Großbuchstaben hingegen signalisierten entweder eine Hybridisierung innerhalb einer UTR oder eine intra-exonische Lage (interne Primer). Interne Primer wurden gewählt, wenn die Exonlänge einen bestimmten Wert überschritt, so dass dieses durch zwei Primerpaare mit ausreichender Sequenzüberlappung der PCR-Produkte abgedeckt werden konnte. Andererseits wurden zwei benachbarte Exone, inklusive des dazwischenliegenden Introns, durch nur ein Primerpaar abgedeckt, wenn die erwartete Gesamtlänge des PCR-Produktes es zuließ.

Anhand der erhaltenen Primersequenzen (► Tabelle 3-3, Tabelle 3-4 und Tabelle 3-5, S. 69 - 71) wurden die Oligonukleotidprimer-Konzentrate bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bestellt. Für die Anwendung im PCR-Ansatz wurden 20 µl 100 mM Primerproben (Aliquots) mit 180 µl HPLC-H<sub>2</sub>O auf 10 pmol / µl verdünnt. Konzentrate und Aliquots wurden mit den restlichen PCR-Additiven bei -21 °C im Eisschrank gelagert.

#### 2.3.1.3.2 Ermittlung der Annealing-Temperatur

Zu den Primersequenzen lieferte Primer3 auch die errechneten Annealing Temperaturen ( $T_A$ ), jedoch waren diese für jedes Primerpaar unterschiedlich. Um im nächsten Schritt möglichst viele Primerpaare auf einem Thermo Cycler innerhalb eines PCR-Programms umsetzen zu können, mussten gemeinsame  $T_A$ -Werte ermittelt werden.

Hierzu wurde eine PCR, wie sie im nächsten Abschnitt detaillierter beschrieben ist, verwendet (► Tabelle 2-2, S. 36). Die PCR-Reaktion wurde mit dem DNA Engine Thermal Cycler PCR (PTC-200; MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) und zugehörigem Gradienten Steuer-Programm ausgeführt (► Tabelle 2-3, S. 37).

Substanzen	Menge
10× Puffer	2,5 µl
Primer F (10 pmol / µl)	1,0 µl
Primer R (10 pmol / µl)	1,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	18,9 µl
Taq-Polymerase (5 U / µl)	0,1 µl
gDNA	1,0 µl
$\Sigma$	25,0 µl

Tabelle 2-2 Annealing-PCR Mixtur.

Schritte	Temperatur	Zeit	Zyklen	Funktion
1.	95 °C	15 Min.	1×	Denaturierung (ds-gDNA)
2. - 4.	94 °C	45 Sek.	30×	De-Hybridisierung (Amplikon und Matrize) <sup>2</sup>
	45 - 65 °C <sup>1</sup>	45 Sek.		Annealing (Oligonukleotidprimer)
	72 °C	45 Sek.		Primerelongation (Taq-Polymerase)
5.	72 °C	10 Min.	1×	Ausleitung der PCR (Terminierung)

**Tabelle 2-3** Annealing-PCR Programmablauf.  
<sup>1</sup>Gradientenbereich, <sup>2</sup>dieser Schritt ist erst ab dem zweiten Zyklus relevant, da vorher keine Hybride vorliegen.

Bei dem verwendeten DNA Engine Thermal Cycler PCR (PTC-200; MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) war es möglich im Programmschritt für das Primerannealing einen Temperaturgradienten zu verwenden, d. h. die zueinander diametral liegenden Kavitäten des Cycler-Blocks wiesen die Eckwerte des eingestellten Gradienten auf. Die Temperatur der dazwischen liegenden restlichen Kavitäten unterschied sich um einen jeweils festen Temperaturwert, sodass der gesamte Temperaturbereich abgedeckt werden konnte. Zur Klärung einer gemeinsamen  $T_A$  wurde ein Temperaturgradient von 45 - 64 °C verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese auf ihre Bandenstärke geprüft und mit den erwarteten Produktgrößen verglichen (► Tabelle 3-3, Tabelle 3-4 und Tabelle 3-5, S. 69 - 71). Durch die Kenntnis einer spezifischen  $T_A$  einer Kavität mit den besten PCR-Produkten, konnte in Kombination mit den Gel-Bandenmustern jeweils ein  $T_A$ -Toleranzbereich für einzelne Primerpaare abgeleitet werden. Damit war es möglich mehrere „temperaturtolerante“ Primerpaare zusammen zu fassen und mit einer festen  $T_A$  zeitgleich innerhalb eines PCR-Programms umzusetzen.

In Fällen schwacher / fehlender Bandenmuster dienten PCR-Additive wie  $MgCl_2$  und 5× Q-Solution (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) zur Stabilisation der Taq-Polymerase Reaktion [47]. Das HPLC-H<sub>2</sub>O im Ansatz wurde um die zugesetzte Menge Additivum verringert (► Tabelle 2-4, S. 38), so dass das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes konstant blieb.

#### 2.3.1.4 Amplifikation (PCR)

Für einen Standard-PCR Ansatz von 50 µl pro Reaktionsgefäß wurden 5 µl 10-fach Puffer (15 mM  $MgCl_2$ / 10 µl; QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland), 1 µl dNTP-Gemisch (10 mM; Eppendorf GmbH, Hamburg), 37,8 µl HPLC-H<sub>2</sub>O (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland),

0,2 µl HotStar-Taq (5 U / µl; QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland), jeweils 2 µl der flankierenden Primer (10 pmol / µl; Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) und 2 µl gDNA benötigt (► Tabelle 2-4, S. 38). Dieser Standard-PCR Ansatz wurde in Fällen, in denen bei der Suche nach der Annealing Temperatur ein Bandenmuster in der Gelkontrolle schwach oder nicht darstellbar war, um Additive wie MgCl<sub>2</sub> (25 mM; QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) und 5× Q-Solution (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) ergänzt (► Tabelle 3-3, Tabelle 3-4 und Tabelle 3-5, S. 69 - 71). Hierbei wurde die Menge an HPLC-H<sub>2</sub>O um die zugefügte Menge Additivum verringert. Somit blieb es – wie bei dem Standardreaktionsgemisch – bei einem Ansatzvolumen von insgesamt 50 µl. Die MgCl<sub>2</sub>-Menge wurde, in Fällen gänzlich fehlender Bandenmuster in der gelelektrophoretischen Kontrolle, von 2 auf 4 µl erhöht. Q-Solution wurde mit einem festen Volumen von 10 µl hinzugefügt.

Substanzen	Mengenangaben für eine		
	Standard-PCR	PCR mit MgCl <sub>2</sub>	PCR mit Q-Solution
10× Puffer	5 µl	5 µl	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl	1 µl	1 µl
HPLC-H <sub>2</sub> O*	37,8 µl	35,8 <b>oder</b> 33,8 µl	27,8 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	∅	2 <b>oder</b> 4 µl	∅
5× Q-Solution	∅	∅	10 µl
HotStar-Taq (5 U / µl)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
Primer F (10 pmol / µl)	2 µl	2 µl	2 µl
Primer R (10 pmol / µl)	2 µl	2 µl	2 µl
gDNA	2 µl	2 µl	2 µl
Σ	50 µl	50 µl	50 µl

**Tabelle 2-4** Standard-PCR Mixtur und Stabilisatoren / Additive.  
 \*Bei einer Mixtur mit 50 µl Reaktionsvolumen wird die HPLC-H<sub>2</sub>O-Menge um das hinzugegebene Volumen des Additivums verringert.

Sämtliche Substanzen für die PCR-Ansätze wurden, nach sorgfältigem Mischen mit dem Reagenzglasschüttler (EU 444-1372; VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), auf dem PCR-Cooler (0,2 ml; Eppendorf GmbH, Hamburg) in 0,2 ml 8er-Strips PCR-Gefäße mit anhängendem Deckel (781330; BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland) pipettiert und anschließend nochmals gemischt. Um Verunreinigungen der Gemische während der Prozedere im Nachhinein erkennen zu können, wurden parallel sogenannte „Kontroll-Leerwerte“ verwendet. Diese bestanden aus dem PCR-Ansatz für das jeweilige Primerpaar ohne Zusatz von

gDNA, so dass in der anschließenden Gelkontrolle keine Bandendarstellung möglich sein sollte. Leerwerte mit Bandenmuster hatten zur Folge, dass alle zugehörigen PCR-Ansätze mit dem jeweiligen Primerpaar verworfen und wiederholt wurden, da von einer Verunreinigung ausgegangen werden musste. PCR-Ansätze und Leerwerte wurden im DNA Engine Thermal Cycler PCR (PTC-200; MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) auf Single und Dual Alpha Unit Block Assemblies (ALS-1296 und ALD-1244; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mittels zugehörigem PCR-Programm (► Tabelle 2-5, S. 39) umgesetzt.

Schritte	Temperatur	Zeit	Zyklen	Funktion
1.	95 °C	15 Min.	1×	Denaturierung (ds-gDNA)
	94 °C	45 Sek.		De-Hybridisierung (Amplikon und Matrize)*
2. - 4.	T <sub>A</sub>	45 Sek.	30×	Annealing (Oligonukleotidprimer)
	72 °C	45 Sek.		Primerelongation (Taq-Polymerase)
5.	72 °C	10 Min.	1×	Ausleitung der PCR (Terminierung)
6.	12 °C	∞		Aufbewahrung / Lagerung (PCR-Produkt)

**Tabelle 2-5** PCR Programmablauf.  
 Annealing-Temperatur (T<sub>A</sub>, ► Tabelle 3-3, S. 69),  
 \*dieser Schritt ist erst ab dem zweiten Programm-Zyklus relevant, da vorher keine Hybride vorliegen.

Durch die 30-fache Wiederholung der Schritte „2. - 4.“ des PCR-Programms erfolgte die selektive in vitro Amplifikation der primerflankierten Abschnitte der gDNA um das 2<sup>30</sup>-fache (2<sup>n</sup>). Amplikons und Leerwerte wurden anschließend gelelektrophoretisch überprüft.

#### 2.3.1.4.1 Agarosegelelektrophorese (PCR-Kontrolle)

Um Nukleinsäurefragmente makroskopisch beurteilen zu können, müssen diese voneinander getrennt und sichtbar gemacht werden. Hierzu wurde ein Agarosegel eingesetzt, das in seiner ausgekühlten gelartigen Form (vernetzte Polysaccharide) als Widerstand (Molekularsieb) gegenüber der untersuchten Nukleinsäure wirkte. Die Konzentration des Gels bestimmte die Maschengröße des Siebs und somit den Widerstand. Der Transport der in der Summe negativ geladenen Nukleinsäuren (Anionen) gelang durch Anlage eines Gleichstroms in der Pufferlösung. Dadurch wanderten die Anionen im Laufkasten vom Startpunkt (Geltaschen) in Richtung Anode. Die Wandergeschwindigkeit hing u. a. vom Widerstand im Medium, von der Gesamtladung der Ionen und ihrer Größe / Form ab. Damit die Proben das Gel nicht vollständig

durchwanderten und in der Pufferlösung verschwanden, wurden diese vorher mit einem farbigen Ladepuffer versetzt. Der Puffer wanderte schneller als die Nukleinsäuren, so dass bei Erreichen der Gekante die Spannung aufgehoben werden konnte bevor Proben verloren gingen. Zur Abschätzung der Amplikongröße und Quantität wurde parallel ein standardisiertes Nukleinsäurefragment-Gemisch (DNA-Leiter, industriell definierte Plasmidfragmente aus Endonukleaseverdau) aufgetragen. In der Auswertung konnte anschließend durch die bekannte Fragmentlänge und Stärke der aufgetrennten Leiter-Banden auf die Werte der untersuchten Amplikon-Banden geschlossen werden. Die Darstellung der Banden gelang durch das interkalierende Ethidiumbromid [194], das jedesmal vor der Polymerisierung dem Gel zugefügt wurde, damit es sich in festen Abständen zwischen die Basenpaare der wandernden DNA-Fragmente einlagerte. Dadurch änderte sich das Absorptionsspektrum, wodurch die Fluoreszenzfähigkeit der Nukleinsäure gesteigert wurde [92]. Durch UV-Belichtung konnten die Banden zur Emission angeregt und schließlich fotodokumentiert werden [1, 159].

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 7,5 g SeaKem LE Agarosegel-Pulver (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) auf der Analysenwaage MC1 (LC 2200 P; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) abgewogen und mit 500 ml 1× TBE-Puffer (HPLC-H<sub>2</sub>O Verdünnung von 10× TBE: 107,32 g 0,89 M TRIS, 55,03 g 0,89 M Borsäure, 7,44 g 2 mM EDTA, pH 8,3 auf 1000 ml HPLC-H<sub>2</sub>O; Biochemicals, LCC, Solon, OH, USA) gemischt. Das Gemisch wurde in einer 1000 ml Labor Flasche (SCHOTT AG, Mainz, Deutschland) nochmals gewogen und ohne Schraubverschluss 5 Minuten in der Mikrowelle (AEG Micromat 135; Electrolux Hausgeräte Vertriebs GmbH, Nürnberg, Deutschland) – unter gelegentlichem Schwenken – durch Kochen in Lösung gebracht. Anschließend wurde der Ansatz gewogen und der Wasserverlust, durch den Kochvorgang bedingt, mit HPLC-H<sub>2</sub>O ausgeglichen und – nach Umfüllen in eine 500 ml Laborflasche – im Wasserbad bei 62 °C gelagert. Somit wurde die Ausgangskonzentration des Gels wiederhergestellt und das Aushärten (Polymerisieren) verhindert. Von der Gellösung wurden anschließend ca. 50 ml Portionen mit 5µl 1-prozentiger Ethidiumbromidlösung (1mg / ml) in einer separaten Laborflasche gemischt und luftblasenfrei in eine 10 × 15 cm Gelschablone gegossen. Danach wurde ein sogenannter „Kamm“ eingesetzt, dieser formte die späteren Geltaschen.

Das Gel polymerisierte in den folgenden 20 Minuten bei 23 °C Raumtemperatur. Bevor das fertige Gel in die Horizontal-Gel-Elektrophoresekammer (midi; Harnischmacher Labortechnik,

Kassel, Deutschland) eingesetzt werden konnte, wurde diese bis zur Markierung mit 1× TBE Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Darin wurde das Gel mit dem Kamm kathodenseitig eingebracht. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt, so dass die Geltaschen nicht rissen oder das Gel durch den Puffer unterspült wurde und anfang zu schwimmen.

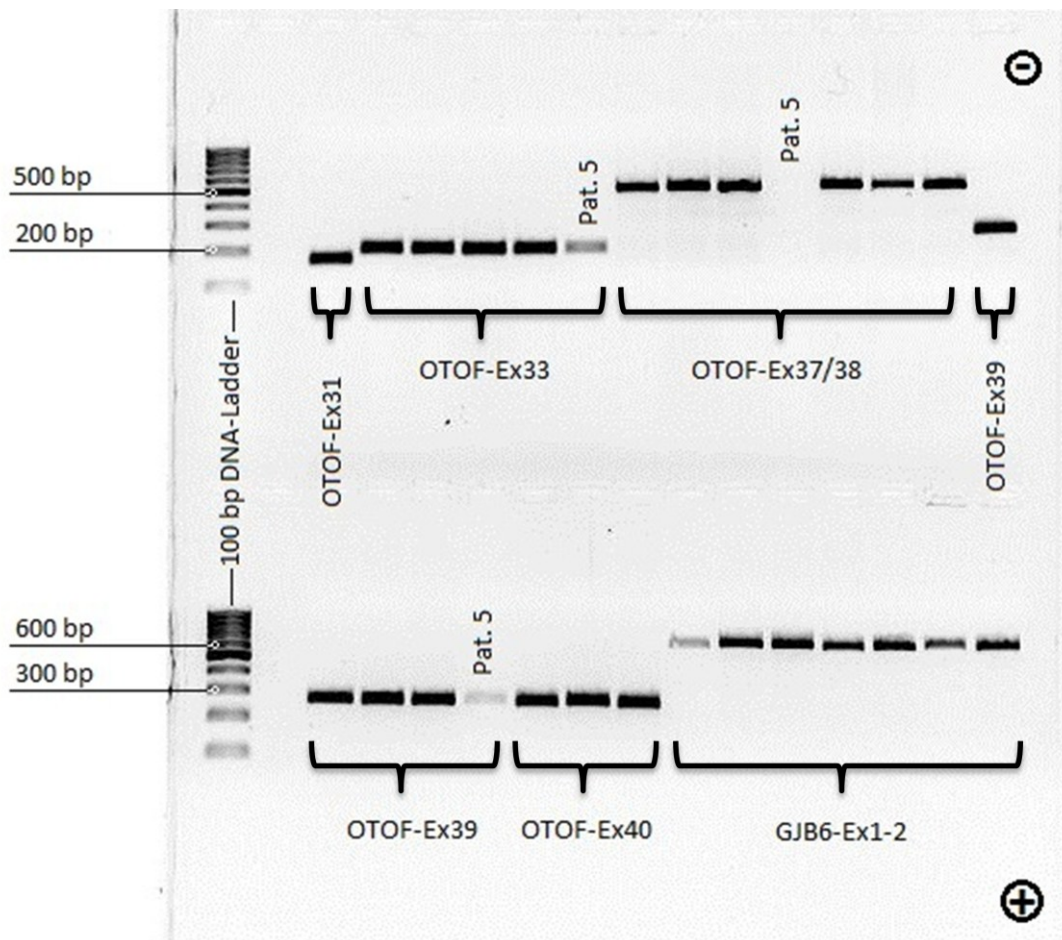
Die in die Geltaschen pipettierten 5 µl Proben waren ein Gemisch aus 2 µl 6× Loading Dye (0,03 Prozent Bromphenolblau, 0,03 Prozent Xylencyanol FF, 60 Prozent Glycerol und 60 mM EDTA, 10 mM TRIS-HCL, pH 7,6; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) und jeweils 3 µl PCR-Produkt, Leerwert oder GeneRuler 100 bp DNA Ladder (0,5 µg / µl; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland). Zwischen der DNA-Leiter und den Proben wurde eine Tasche / Spur frei gelassen, damit Pipettierfehler in der Fotodokumentation erkannt werden konnten. Anschließend wurde zur Elektrophorese 185 V Gleichstrom (Standard Power Pack P25; Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland) auf den Laufkasten für ca. 20 Minuten angelegt, welcher nach Erreichen der Gelkante durch die „Ladepuffer-Lauffront“ aufgehoben wurde.

Das Gel wurde mithilfe des MultiImage Light Cabinet und zugehöriger AlphaEase v5.5-Software (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA, USA) im ultravioletten Lichtspektrum belichtet, fotografiert, bearbeitet und schließlich archiviert. Die erhaltenen Amplikongrößen wurden anhand der DNA-Leiter eingeordnet und mit den erwarteten PCR-Produktlängen für die verwendeten Primerpaare verglichen (► Tabelle 3-3, Tabelle 3-4 und Tabelle 3-5, S. 69 - 71).

In Fällen abweichender Produktlängen, verunreinigter Leerwerte (vorhandene Banden) und sehr schwachen Bandensignalen wurden die PCR-Produkte verworfen. Die betroffenen Exone wurden wiederholt amplifiziert.

Die Gelbandensignale des Patienten 5 stellten sich auch nach wiederholter PCR und Geltrennung nur schwach dar oder fehlten vollständig (► Abbildung 2-2, S. 42).

In diesem Fall wurde das gDNA-Isolat aus dem Speichel des Patienten mithilfe einer besonderen Methode in toto amplifiziert (► 2.3.1.4.2 Whole Genome Amplification (WGA), S. 42), so dass dieses neue gDNA-Produkt als Grundlage für die folgende molekulargenetische Untersuchung der bisher ungenügend amplifizierten Exone des Patienten 5 diente.



**Abbildung 2-2** Bandenmuster nach der Geltrennung.  
 Schwache oder fehlende Bandensignale des Patienten 5 vor der WGA / iMDA.  
 Geltrennung: U = 185 V, t = ca. 20 Minuten, Ethidiumbromid (Interkalanz),  
 Gelkonzentration = 1,5 Prozent Agarose bei einfach TBE (TRIS, Borsäure, EDTA).  
 bp = Basenpaare; Ex = Exon; Pat. = Patient.

#### 2.3.1.4.2 Whole Genome Amplification (WGA)

Die „whole genome amplification“ (WGA) ist eine in der Rechtsmedizin häufig eingesetzte Methode [154], bei der eine geringe Menge Ausgangs-DNA amplifiziert wird – was eine weitergehende molekulare Untersuchung des Materials erst ermöglicht. Dieses Verfahren nutzt ein spezielles Enzym – die  $\Phi$ 29-DNA-Polymerase (Phi29). Im Gegensatz zur Taq-Polymerase (► 2.3.1.4 Amplifikation (PCR), S. 37) arbeitet die Phi29-Polymerase isotherm bei 30 °C, d. h. eine Temperaturregulierung durch automatisierte Inkubatoren – wie es für die PCR benötigt wird – entfällt. Außerdem besitzt es 3′ - 5′ Exonukleaseaktivität, was sich bei den

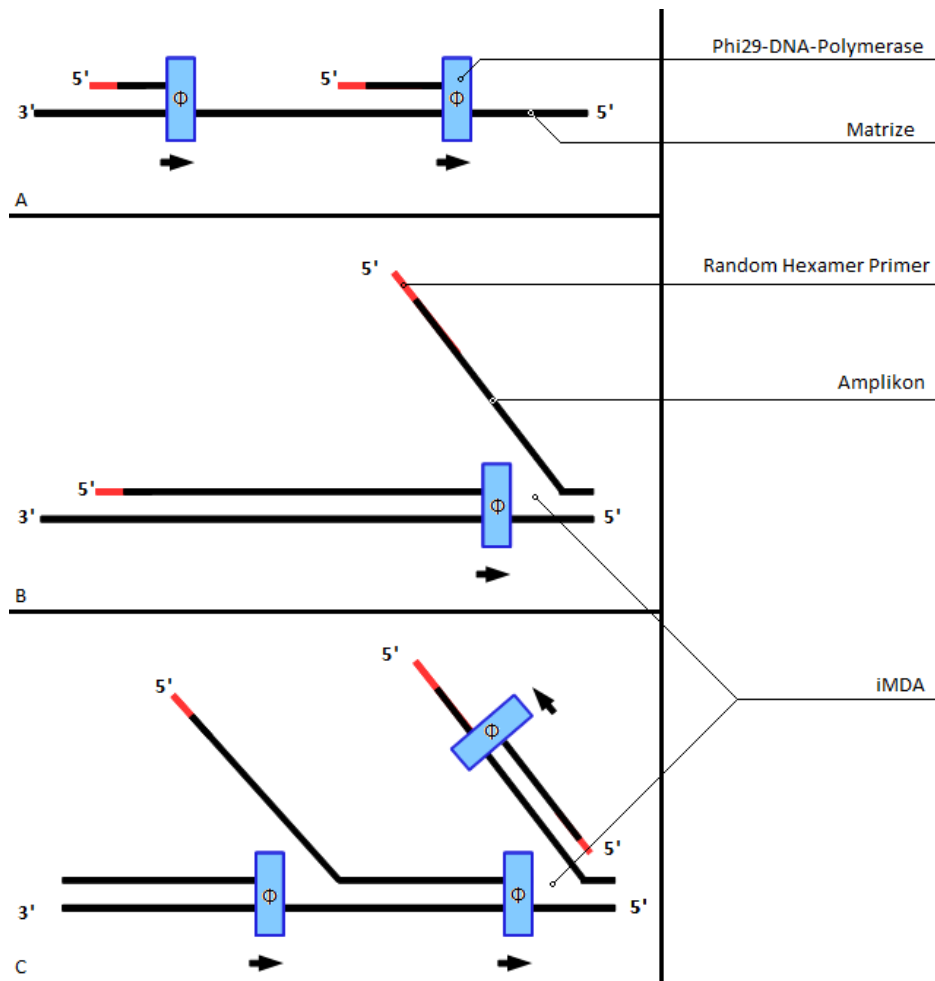
polymerisierten Strängen (Amplikons) von bis zu 100 kb durch geringere Fehlerraten als vorteilhaft erweist [100]. Der Grund für die Isothermie liegt darin, dass Phi29 die Fähigkeit besitzt, die Trennung eines DNA-Doppelstrangs in Einzelstränge zu katalysieren. Dies führt während der Synthesereaktion dazu, dass bei Kontakt stromabwärts gelegener 5'-Enden anderer Amplikons, diese von der Matrize verdrängt werden (isothermal multiple displacement amplification, iMDA), wobei die Synthese des ersten Stranges fortgesetzt wird.

Die verwendeten Oligonukleotidprimer weisen Besonderheiten auf, z. B. sind es Hexamer-Gemische (random hexamere primer), die an unterschiedlichen homologen Stellen – verteilt über die gesamte DNA – hybridisieren und somit diese, durch die entstehenden Fragmente (bis zu 100 kb), vollständig und mit ausreichender Überlappung in den einstigen iMDA-Bereichen abdecken. Außerdem sind sie durch Thiophosphatmodifikation an den beiden letzten Nukleotiden am 3'-Ende gegen hydrolytischen Abbau durch Exonukleasen geschützt [38].

Dies bedeutet, dass die WGA bei geringen DNA Mengen im Ausgangsmaterial, ohne besondere apparative Voraussetzungen und sogar bei unaufbereiteten / ungereinigten Proben eingesetzt werden kann, da die modifizierten random hexamere primer „exonukleasestabil“ sind [62].

Abgeleitet von dem Bild, dass bei der Amplifikation einer Plasmid-DNA durch die WGA / iMDA entsteht – wofür dieses Verfahren initial ihre Anwendung fand [39] – werden diese Vorgänge auch als „rolling circle“ bezeichnet (► Abbildung 2-3, S. 44).





**Abbildung 2-3** Ablauf der WGA (whole genome amplification).  
 A: Hybridisierung der Polymerasen und Synthese.  
 B: iMDA-Reaktion (isothermal multiple displacement amplification)  
 C: Alle Schritte laufen parallel (Ausschnitt aus einem „rolling circle“). Eigenentwurf.

Das beschriebene WGA-Verfahren wurde in dieser Studie in einem besonderen Fall eingesetzt. Die gereinigten Speichelproben des Patienten 5 zeigten zwar unauffällige Extinktionswerte in den photometrischen Kontrollen, jedoch war es nicht möglich nach der PCR in der Agarosegelelektrophorese Banden nachzuweisen. Die mehrfache Speichelasservation und gDNA-Isolation, sowie die Variation der PCR-Rezeptur und Verwendung „frischer“ Komponenten blieben erfolglos – so dass das WGA-Verfahren eingesetzt werden musste. In diesem Fall lagen aus den zahlreichen Versuchen die vermeintlichen gDNA-Isolate vor. Diese wurden für einen „gDNA Gesamt-Mix“ zusammenpipettiert / gepoolt und dienten als Ausgangsmaterial zur DNA-Isolation mit dem REPLI-g Ultrafast Mini Kit und zugehörigem Protokoll (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). 1 µl gDNA-Mix wurde mit 1 µl Denaturierungs Puffer D1 auf dem Reagenzglasschüttler (EU 444-1372; VWR International GmbH, Darmstadt,

Deutschland) gemischt. Nach kurzem „Anzentrifugieren“ (Centrifuge 5804 R; Eppendorf GmbH, Hamburg) der Probe folgte eine Inkubationsphase bei 23 °C Raumtemperatur für 3 Minuten.

Danach wurde 2 µl Neutralisations Puffer N1 hinzugegeben, wiederum auf dem Schüttler gemischt und anschließend kurz anzentrifugiert.

Die kurze Zentrifugierung diente dazu, dass die gDNA und der Puffer in der Spitze des 0,2 ml Standard Reaktionsgefäßes in „Kontakt“ kamen und somit Reaktionszeit gespart wurde.

Anschließend wurde 16 µl „Master Mix“ hinzupipettiert. Dieser bestand aus 15 µl Reaktions Puffer (enthielt die random hexamere primer) und 1 µl DNA-Polymerase (Φ29-DNA-Polymerase). Die Probe, mit initiiertem WGA,

wurde bei 30 °C für 1,5 h auf einem Inkubator (DNA Engine Thermal Cycler PCR; MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) mit Single Alpha Unit Block Assembly (ALS-1296; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) inkubiert. Zur Inaktivierung der Phi29-DNA-Polymerase wurde die Probe auf dem Inkubator für 3 Minuten auf 65 °C erhitzt. Die erhaltene Probe wurde mittels

Photometrie und Agarosegelelektrophorese ausnahmsweise doppelt kontrolliert, da sich die gDNA-Isolation beim Patienten 5 als schwierig erwiesen hatte; in den photometrischen Kontrollen waren die Werte für die gDNA-Konzentration unauffällig gewesen und dennoch blieben die gelelektrophoretischen PCR-Kontrollen erfolglos. Im Fall der Weiterverwendbarkeit der

Probe folgte eine extinktionsabhängige Verdünnung (► 2.3.1.2.3 Photometrie, S. 31). Laut QIAGEN-Protokoll waren eine DNA-Konzentration von 7 - 10 µg / ml und Fragmentlängen von 2 - 100 kb zu erwarten.

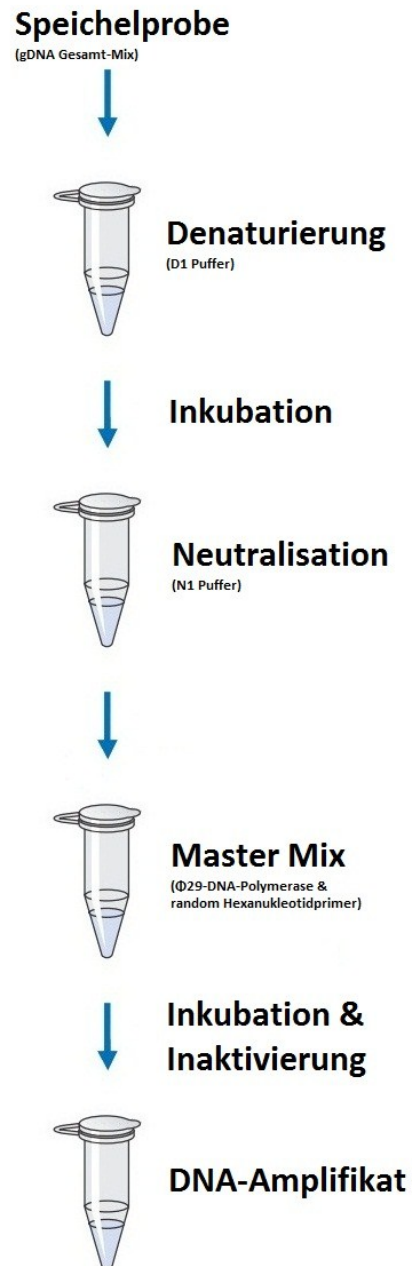


Abbildung 2-4 Arbeitsschritte nach Handbuch. Modifiziert. Mit freundlicher Genehmigung durch die QIAGEN GmbH.

### 2.3.1.5 *Aufreinigung der PCR-Produkte*

Alle PCR-Produkte mit unauffälligen Bandensignalen in der Gelkontrolle, wurden – vorbereitend für die Sequenzierreaktion – von Überresten des PCR-Ansatzes (Polymerase, Primer, Puffer, u. s. w.) gereinigt. Dazu wurden je 100 µl Probengemische, bestehend aus jeweils 50 µl PCR-Produkt und HPLC-H<sub>2</sub>O, in die Kavitäten (Wells) einer MultiScreen<sub>96</sub> PCR-Filterplatte (Millipore Corp., Billerica, MA, USA) pipettiert. Die Proben in den Wells wurden mit dem Vakuum-Pumpensystem (MultiScreen Separations System; Millipore Corp., Billerica, MA, USA) bei 30 kPa Unterdruck für 15 Minuten filtriert. Zur (Zurück-)Gewinnung der gereinigten PCR-Produkte wurde mithilfe einer Multipipette (Eppendorf Multipipette plus; Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) pro Well 30 µl HPLC-H<sub>2</sub>O auf die Filtermembran gebracht und – um den Lösungsvorgang zu unterstützen – bei 800 rpm für 15 Minuten auf dem Thermomixer comfort (1,5 ml; Eppendorf GmbH, Hamburg) bei 23 °C Raumtemperatur geschüttelt. Die gereinigten 30 µl PCR-Proben wurden mithilfe einer Eppendorf Research Mehrkanal Pipette (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) von der Filterplatte in neue 0,2 ml 8er-Strips PCR-Gefäße mit anhängendem Deckel (781330; BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland) umpipettiert.

#### 2.3.1.5.1 *Agarosegelelektrophorese (Aufreinigungskontrolle)*

Nach der Aufreinigung folgte die elektrophoretische Probendokumentation. Die erhaltenen Bandensignale dienten im Vergleich mit den Voraufnahmen zur Beurteilung des Aufreinigungserfolges. Bei völligem Verlust des PCR-Produktes (Spur ohne Bande) oder Verwechslung / Verunreinigung (abweichende Produktlänge, mehrere Banden pro Spur) wurde der Reinigungsschritt wiederholt. Bei schwachen Banden, durch primär wenig PCR-Produkt und / oder sekundärem Teilverlust, wurde die benötigte Probenmenge für den Sequenzieransatz erhöht (► Tabelle 2-6, S. 47). Die 1,5-prozentige Agarosegelelektrophorese wurde wie schon beschrieben durchgeführt (► 2.3.1.4.1 Agarosegelelektrophorese (PCR-Kontrolle), S. 39). Das Gesamtvolumen der in die Geltaschen pipettierten Proben betrug 3 µl und war somit geringer als die Probenmenge für die vorangegangene Geltrennung, da nur 1 µl gereinigtes PCR-Produkt oder DNA-Leiter verwendet wurden.

### 2.3.1.6 Sequenzierreaktion

Die angewandte Technik basierte auf der von F. Sanger vorgestellten Methode zur Ermittlung einer Basenabfolge durch die Abbruchsequenzierung [149]. Dazu wurde jedem Sequenzieransatz zusätzlich eine geringe Menge Fertigmischung (Ready Mix), bestehend aus den vier fluoreszenzmarkierten 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs) und einer DNA-Polymerase, hinzugegeben [141]. Der zufällige Einbau eines ddNTP (Terminator) führte zum Abbruch der Sequenzierreaktion, da die DNA-Polymerase für die Verknüpfung des nächsten Nukleosidtriphosphats die fehlende freie 3'-Hydroxylgruppe benötigte.

Für die Sequenzierreaktion wurde das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) verwendet.

Bei einem Sequenzieransatz von insgesamt 10 µl (► Tabelle 2-6, S. 47) wurden aus dem Kit jeweils 2 µl 5× Sequenzierpuffer (5 mM MgCl<sub>2</sub> und 200 mM TRIS, pH 9,0) und 1,0 µl Ready Mix – bestehend aus den 4 Terminatoren (dROX BD [C], dR110 BD [G], dR6G BD [A], dTAMRA BD [T]) und der AmpliTaq-DNA-

Polymerase – in 0,2 ml 8er-Strips PCR-Gefäße mit anhängendem Deckel (781330; BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland) pipettiert. Die benötigte Menge PCR-Produkt war abhängig von der Stärke des Bandensignals in

der Gelkontrolle und variierte zwischen 1,5 bis 4,5 µl. Davon reziprok abhängig war das benötigte Volumen HPLC-H<sub>2</sub>O von 5,0 bis 2,0 µl.

Substanzen	Mengenangabe für eine Sequenzier-PCR
5× Puffer	2,0 µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	5,0 bis 2,0 µl
BigDye v3.1	1,0 µl
Primer F <b>oder</b> R (10 pmol / µl)*	0,5 µl
PCR-Produkt	1,5 bis 4,5 µl
Σ	10 µl

Tabelle 2-6

Sequenzier-PCR Mischung.

\*Primer F (sense) oder R (anti-sense) jeweils getrennt in eigenem Ansatz.

reziprok

Abschließend wurde jeweils 0,5 µl Primer (10 pmol / µl) dazugegeben, d. h. dass der Ansatz doppelt vorbereitet wurde, da die Primer nicht als Paar, sondern einzeln verwendet wurden. Die Umsetzung der Ansätze erfolgte mit einem DNA Engine Thermal Cycler PCR (PTC-200; MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA) auf Single und Dual Alpha Unit Block Assemblies (ALS-1296 und ALD-1244; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Das zugehörige Sequenzierprogramm (► Tabelle 2-7, S. 48) war an die Empfehlungen des Kit-Herstellers angelehnt.

Schritte	Temperatur	Zeit	Zyklen	Funktion
1. - 3.	96 °C	10 Sek.	24×	Denaturierung der PCR-dsFragmente
	55 °C	10 Sek.		Annealing (Oligonukleotidprimer)
	60 °C	4 Min.		Synthese bis Terminierung (ddNTP-Einbau)
4.	12 °C	∞		Aufbewahrung / Lagerung des Produkts

Tabelle 2-7 Sequenzier-PCR Programmablauf.

Die Schritte „1. bis 3.“ wurden 24× wiederholt, damit sichergestellt werden konnte, dass in der Summe jede Nukleotidposition durch den zufälligen Terminatoreinbau Berücksichtigung fand.

### 2.3.1.6.1 Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Um Artefakte bei der Sequenzermittlung zu minimieren, wurden die Sequenzierprodukte aufgereinigt. Dadurch konnten insbesondere während der Sequenzierreaktion nicht eingebaute (un-incorporated) Terminatoren aus den Proben entfernt werden, welche ansonsten zu einer Fehlmessung geführt hätten. Typische Fehlmessungen stellten die sogenannten „Dye Blobs“ dar, die in der Sequenzdarstellung als breitbasige „Farbkleckse“ in Form von „Hintergrundrauschen“ die Sequenzermittlung störten oder sogar durch hohe Fluoreszenzmaxima (peaks) die Position(en) unlesbar machten (► Abbildung 2-5, S. 48).

Die häufigsten Fehler beruhen auf Aufreinigungsprotokollen, die zur Elution der Sequenzierprodukte Ethanol verwenden. Daher wurde zur Aufreinigung

ein alkoholfreies Zentrifugationsverfahren gewählt [27]. Der hergestellte Filter bestand aus Dextranmolekülen, deren Quervernetzungsgrad die Porosität des Gels und damit die Größe

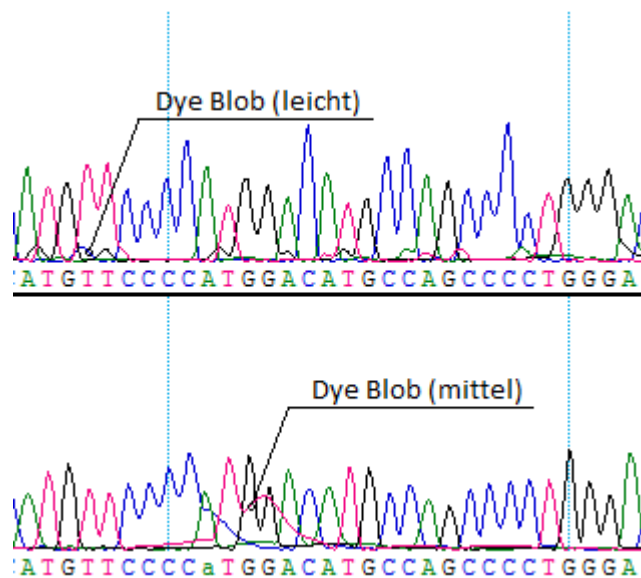


Abbildung 2-5 Dye Blobs (leicht- und mittelgradig) in Folge von Aufreinigungsfehlern. Aus SeqMan II ®.

der zurückgehaltenen Teile bestimmte [127]. Durch Zentrifugation wurden paradoxerweise die großmolekularen Sequenzierprodukte schneller durch das Gel transportiert als z. B. die niedrigmolekularen Terminatoren, die sich einerseits in den Maschen des Gels „verfangen“ und andererseits, im Vergleich zu Ihrer Molekülgröße, relativ hohen Widerstands- und Reibungskräften (friction) ausgesetzt waren. Die großen Sequenzierprodukte nahmen einen kürzeren Weg durch den Gelfilter und wurden als erste aufgefangen [53].

Zur Herstellung der Gelsäule wurde eine Schablone (MultiScreen Column Loader 45 µl, MACL 09645; Millipore Corp., Billerica, MA, USA) mit Sephadex-Pulver (G-50 fine; GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) befüllt. Die Pulverkörner der verwendeten G-50 fine Variante des Sephadex sollten laut Hersteller einen Durchmesser von 20 - 80 µm haben und eine Trennung von Molekülen im Bereich von 1,5 - 30 kDa ermöglichen. Das Pulver wurde auf eine 96-Well Zentrifugierfilterplatte (MultiScreen-HV Platte 0,45 µm, MAHVN 4550; Millipore Corp., Billerica, MA, USA) umgekippt. Jedem Well mit Sephadex-Pulver wurde mit der Eppendorf Multipette plus (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) jeweils 300 µl HPLC-H<sub>2</sub>O hinzupipettiert. Anschließend quollen die Sephadexsäulen für 3 Stunden erschütterungsfrei bei 23 °C Raumtemperatur. Um Verunreinigungen in dieser Zeit zu vermeiden wurde die Filterplatte zuvor mit zugehörigem Deckel und einem Untersatz (Eppendorf Microplate 96 / V 20 - 300 µl; Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) versehen und alle Komponenten mit Parafilm M (American National Can Comp., Menasha, WI, USA) fixiert. Nach der Quellphase wurde das überschüssige Wasser der Gelsäulen mit der Eppendorf Zentrifuge (Centrifuge 5804R) und zugehörigem Schwingrotor (Swing-bucket Rotor A-2-DWP; Eppendorf GmbH, Hamburg) und Gegengewicht mit 910 g für 5 Minuten in den Untersatz abzentrifugiert. Der Untersatz wurde gegen eine 96-Well Detektierplatte (ABgene THERMO-FAST 96 PCR Detection Plate, AB-1100; Abgene House, Epsom, UK) mit Zentrierrahmen (Centrifuge Alignment Frame, MACF09604; Millipore Corp., Billerica, MA, USA) getauscht.

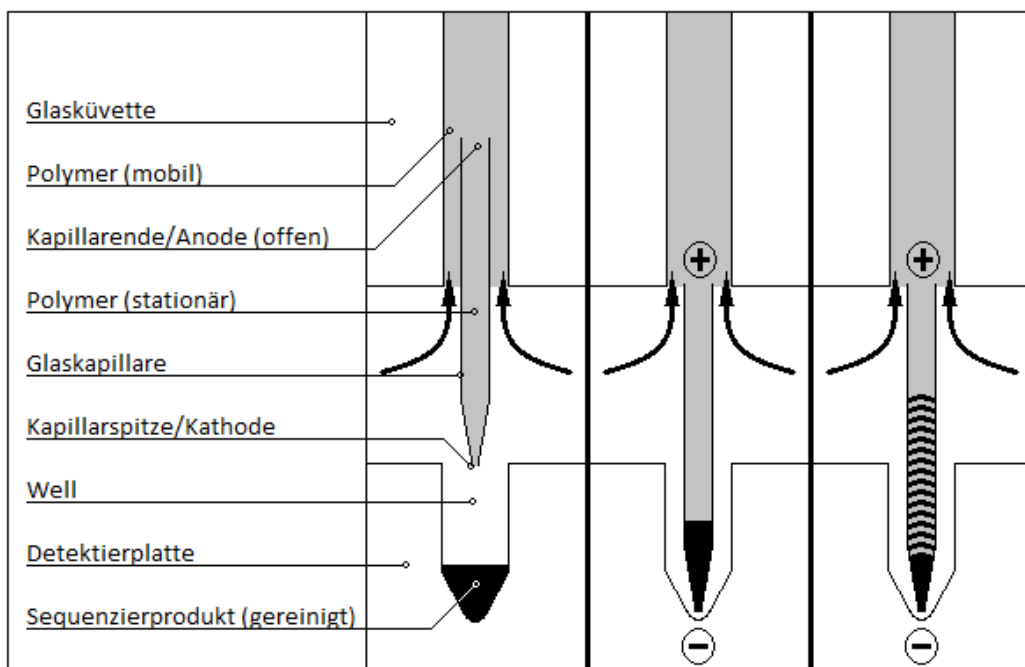
Mit einer Eppendorf Research pro Pipette (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) wurden die Wells der Detektierplatte mit jeweils 10 µl HPLC-H<sub>2</sub>O befüllt. Danach wurden mit der Pipette die Sequenzierprodukte auf die Gelsäulen pipettiert. Dabei war es wichtig die Proben mittig auf die Säulen zu geben und diese mit der Pipettenspitze nicht zu berühren, um ein Vorbeifließen der Proben oder „frakturieren“ der porösen Sephadexsäulen zu verhindern, was die schon erwähnten Dye Blobs zur Folge gehabt hätte. Zur Trennung wurde die oben

beschriebene Eppendorf Zentrifuge mit den genannten Einstellungen verwendet. Die Detektierplatte mit den gereinigten Sequenzierprodukten wurde entnommen und mit einer silbernen Durchstechfolie versiegelt (Adhesive PCR Foil Seal, AB-0626; Abgene House, Epsom, UK). Nach Dokumentation der Probenpositionen auf der Detektierplatte wurde diese im Zentrallaboratorium des Universitätsklinikums Münster (Leiter: Dr. B. Schlüter) zur Registrierung der Basensequenzen eingereicht.

### 2.3.1.7 Sequenzierung (Zentrallabor)

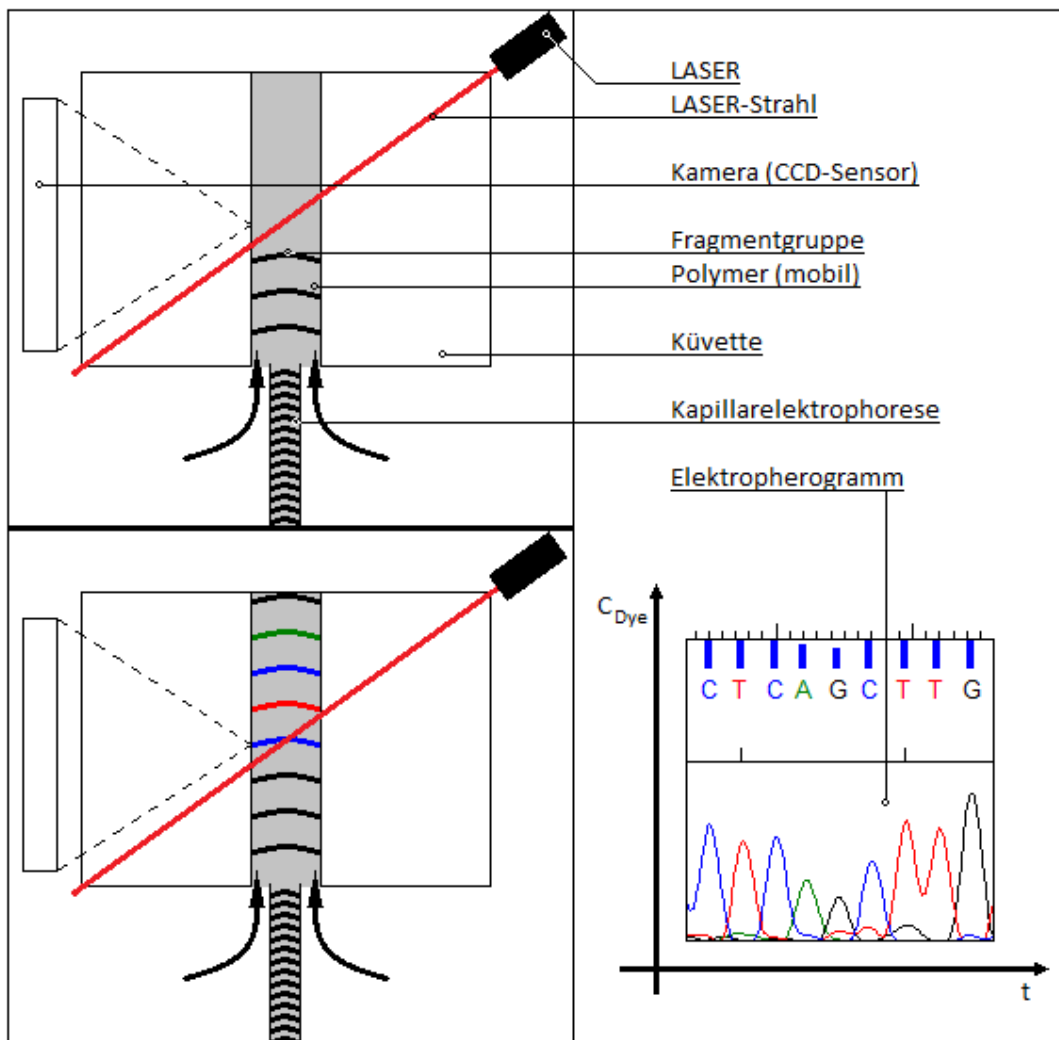
Die Detektion der Basensequenzen der Proben erfolgte im Zentrallaboratorium des Universitätsklinikums Münster (Leiter: Dr. B. Schlüter). Nach Kalibrierung des Sequenzierers (ABI PRISM 3700 DNA Analyzer; Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT, USA) und Einsetzen der 96-Well Detektierplatte wurde das vollautomatische Sequenzierprogramm gestartet.

Zunächst wurden die Proben gleichzeitig und vollständig in polymerbefüllte (POP-5 Polymer; Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) Glaskapillaren aspiriert. Das stationäre POP-5 wirkte bei angelegtem Gleichstrom als Trennmedium (► Abbildung 2-6, S. 50).



**Abbildung 2-6** Ablauf der Kapillarelektrophorese der Sequenzierprodukte mittels Gleichstrom und stationärem Polymer in einer Glaskapillare. Eigentwurf in Anlehnung an das Sequenzier-Handbuch. Mit freundlicher Erlaubnis von Life Technologies Corporation.

Die Proben wurden aufgrund ihrer negativen Gesamtladung von der Kapillarspitze (Kathode) in Richtung des offenen Kapillarendes (Anode) gelenkt und dabei langlenabhangig in Gruppen / Fraktionen aufgetrennt [60]. Die hier durchgeföhrte Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis, CE) ähnelte zwar der oben beschriebenen Agarosegelelektrophorese (► 2.3.1.4.1 Agarosegelelektrophorese (PCR-Kontrolle), S. 39), jedoch wurde der Gleichstrom bei Erreichen des Kapillarendes durch die kürzeste und somit schnellste Fragmentgruppe (Primer + 1 Terminator) nicht aufgehoben. Das Kapillarend wurde mit mobilem Polymer umflossen, welches die aufgetrennten Fragmentgruppen konvektiv durch eine Küvette transportierte (► Abbildung 2-7, S. 51).



**Abbildung 2-7** Ablauf der Sequenzdetektion mittels mobilem Polymer, LASER und CCD-Sensor in einer Glasküvette. Erstellung des Elektropherogramms durch Registrierung der Dye-Konzentration ( $C_{Dye}$ ) gegen die Zeit ( $t$ ). Eigenentwurf in Anlehnung an das Sequenzierer-Handbuch. Mit freundlicher Erlaubnis von Life Technologies Corporation.



Auf ihrem Weg passierten die Fragmente einen LASER-Strahl, der die Terminatormarkierungen fluoreszieren ließ und diese somit durch die CCD-Kamera (charge-coupled device) detektiert werden konnten. Der CCD-Sensor konvertierte die Fluoreszenzsignale in digitale Daten, die am PC mittels zugehöriger Software als Elektropherogramm dokumentiert wurden. Dabei wurden für jede Fragmentgruppe die relativen Dye-Konzentrationen (y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse) aufgetragen. Aus dem Elektropherogramm berechnete das Sequenz Analyse Programm v5.1 (Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA) anhand unterschiedlicher Algorithmen (für z. B. Form und Lage der Peaks) letztendlich die vorliegenden Basensequenzen in den jeweiligen Proben, so dass in der abschließend gespeicherten Sequenzdatei (sample file) jeder Peak eine Base repräsentierte. Dies war u. a. der Grund, weshalb die Sequenzierreaktion mit nur jeweils einem Primer eines Primerpaars erfolgte (► 2.3.1.6 Sequenzierreaktion, S. 47).

Wenn beide Primer in einem Ansatz vorgelegen hätten, wären die generierten Fragmente zwar in der Kapillarelektrophorese korrekt längenabhängig aufgetrennt worden, aber in der Detektion wäre an vielen Basenpositionen dieser Probe ein Mischsignal zu beobachten gewesen – hervorgerufen durch heterogene Fragmentgruppen mit zwei unterschiedlichen Terminatorsignalen.

Trat trotz vorschriftsmäßiger Durchführung der einzelnen Schritte ein Mischsignal oder ein abweichendes Einzelsignal an einer Position auf, so wurde diese Position nach wiederholter Bestätigung der Abweichung (erneute Isolierung, PCR und Sequenzierung), auf klinische Relevanz geprüft.

#### **2.3.1.8 Sequenzanalyse**

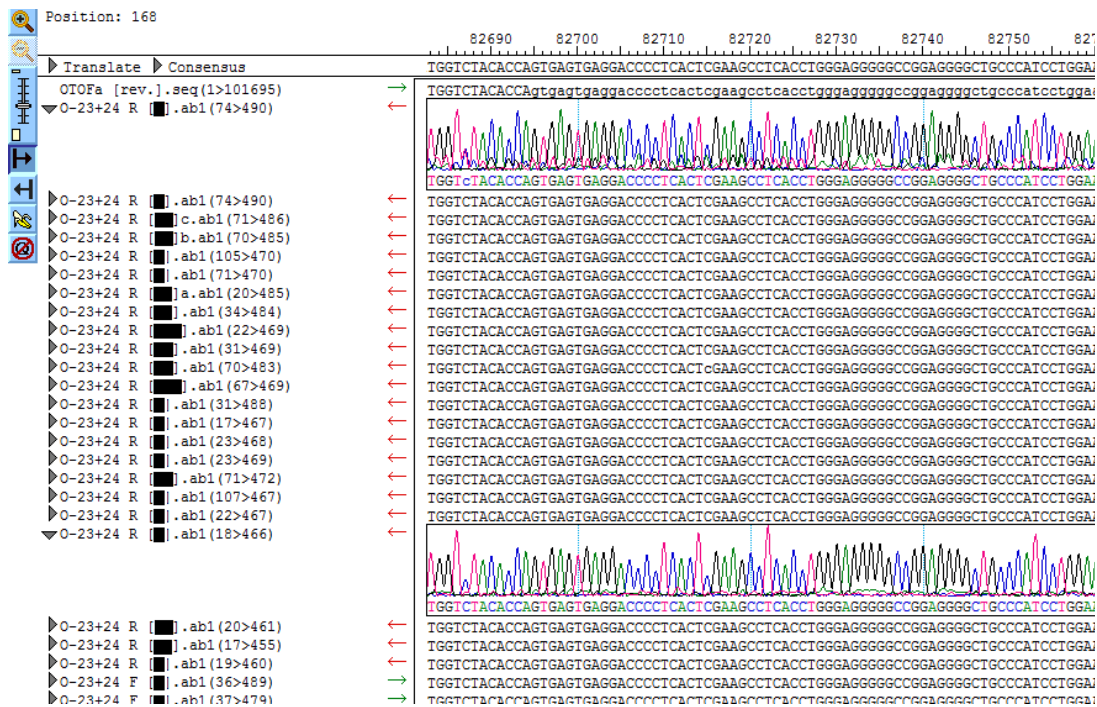
Zur Analyse wurden die ermittelten Sequenzen mit den Referenzsequenzen, die im Abschnitt 2.3.1.3.1 Primer-Design (► S. 34) verwendet wurden, verglichen. Für diesen Vergleich mussten diese Sequenzen korrekt zueinander ausgerichtet werden (alignment).

Für das Alignment wurden die Programme EditSeq und SeqMan II aus dem DNASTAR Lasergene-Paket v5.0 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) eingesetzt.

Als erstes wurde die Referenzsequenz im „Genome Browser“ (<http://genome.ucsc.edu/>) aufgerufen und in EditSeq eingefügt, wodurch die Sequenz eine Formatierung erhielt.

Anschließend wurde diese Datei mit den zu vergleichenden Sequenzdateien (aus dem Zentrallaboratorium) mit SeqMan II geöffnet.

Dieser Schritt führte zum Alignment der geladenen Sequenzen an der Referenzsequenz aus der Datenbank, so dass ein Sequenzvergleich stattfinden konnte (► Abbildung 2-8, S. 53).

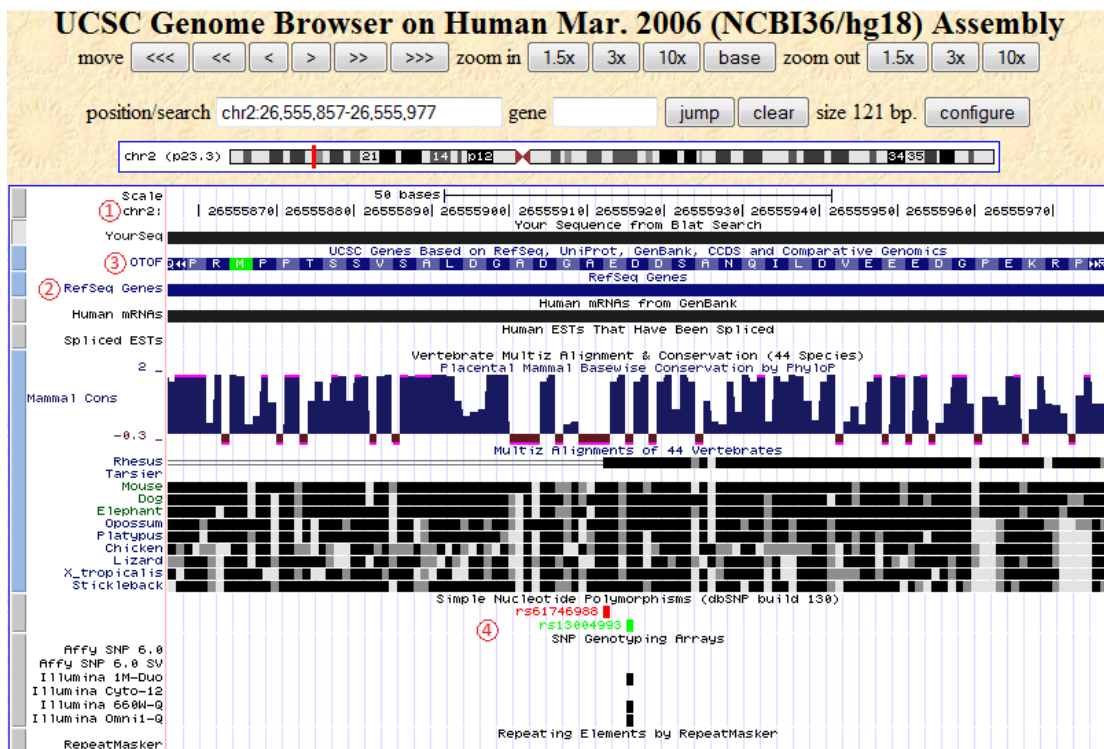


**Abbildung 2-8** EDV-gestützte Sequenzanalyse. Ausrichtung (Alignment) der ermittelten Patienten-Sequenzen an der Referenzsequenz. Patientenidentitäten verschleiert, Bildschirmausschnitt aus SeqMan II (DNASTAR Inc.).

Dabei wurden an jeder Position die „dye peaks“ (► Abbildung 2-7, S. 51) der Sequenzierprodukte – die jeweils eine spezifische Base repräsentierten – mit der Basenabfolge der Referenzsequenz verglichen. Unauffällige Positionen besaßen eindeutige dye peaks und stimmten mit den Referenzbasen überein. Positionen mit zwei unterschiedlichen oder einem abweichenden Peak – sowohl im sense, als auch im anti-sense Sequenzierprodukt – waren auffällig.

Auffällige Positionen wurden mittels „BLAT-Search Genome“ (the BLAST-like alignment tool; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) im Genome Browser auf bekannte Abweichungen für diese Position (single nucleotide polymorphism, SNP) kontrolliert [73]. Dazu wurde ein

mindestens 20 Basen langer Abschnitt der Referenzsequenz, inklusive der zu überprüfenden Position, zur Suche in BLAT eingefügt und der richtige Datensatz (assembly) gewählt (Stand: 03/2006 [NCBI36 / hg18]). Nach Bestätigung der Suche lieferte BLAT mehrere Ergebnisse, von denen das Ergebnis mit passendem Gen und 100 prozentiger Übereinstimmung (identity) für die „Browser-Darstellung“ gewählt wurde (► Abbildung 2-9, S. 54).



**Abbildung 2-9** Browser-Darstellung der BLAT-Suche.  
 1 = Chromosom mit gesuchtem Sequenzabschnitt;  
 2 = gewählter Datensatz; 3 = Genbezeichnung; 4 = bekannte SNP-Positionen.

Im Fall von dokumentierten SNPs an der gesuchten Position wurden diese unten in der Übersicht angezeigt (► Abbildung 2-9, S. 54; Punkt 4) und konnten für weitere Details – wie z. B. ihre Häufigkeit in unterschiedlichen Population (Allelfrequenzen) – aufgerufen werden. Bekannte Sequenzvariationen waren in der Datenbank für SNPs (dbSNP) unter einer bestimmten Nummer und dem Präfix „rs“ (reference SNP ID) vermerkt und wurden von NCBI für die Suche über den Genome Browser der UCSC, wie schon zuvor die Referenzsequenzen, zur Verfügung gestellt [160]. Für die überprüften Positionen ergaben sich verschiedene Szenarien. Einerseits konnten diese Abweichungen bekannt und als solche durch eine rs-Nummer in der dbSNP mit und ohne Angaben zu Allelfrequenzen verzeichnet sein oder sie

waren unbekannt und somit ergab die Suche keine „Treffer“. Andererseits konnten diese Loci, egal ob verzeichnete SNPs oder bisher unbekannte Basenabweichungen, einen Aminosäureaustausch zur Folge haben. Sowohl dokumentierte SNPs mit fehlenden Angaben zu Allelfrequenzen, als auch stille Mutation, wurden direkt mittels RFLP (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) innerhalb einer gesunden Kontrollgruppe auf ihre Allelfrequenz überprüft (► 2.3.1.9 Allelfrequenz-Analyse (PLP-Kontrolle), S. 55). Alle bisher unbekannt Sequenzabweichungen mit konsekutiver Aminosäuresubstitution, wurden zum Ausschluss von Fehlern und zur Verifikation, erneut von einer zweiten Person (Labormitarbeiter) umgesetzt.

Anschließend wurden die bestätigten Basenabweichungen auf ihre Allelfrequenz kontrolliert. Diese Kontrollen dienten zur Unterscheidung zwischen einer eventuell klinisch relevanten und einer neutralen Mutation.

### **2.3.1.9 Allelfrequenz-Analyse (PLP-Kontrolle)**

Nachdem die Mutationsloci bekannt waren (► Tabelle 3-8, S. 75), wurde die Häufigkeit eines varianten Allels in einer Population ermittelt (Allelfrequenz). Hierzu wurde eine RFLP-Kontrolle innerhalb einer kaukasischen Kontrollgruppe (n = 130) durchgeführt. Die Kenntnis über den Basenaustausch samt umgebender Nukleotidsequenz wurde dazu genutzt, um an dieser Position die Probanden-DNA mittels Enzymverdau [5, 35] zu fragmentieren (Restriktions Fragmente). Die verwendeten Restriktionsendonukleasen (RENs) schnitten an spezifischen, häufig palindromischen, DNA Sequenzen (Erkennungssequenz). Sie werden jeweils nach ihrer bakteriellen Herkunft benannt [166] und aufgrund ihrer DNA-Schnitthäufigkeit in „rare“ und „frequent cutter“ eingeteilt. Die resultierenden Fragmentenden werden, abhängig vom Schnitttyp, als „blunt“ (stumpf, symmetrisch) oder „sticky“ (klebrig, asymmetrisch) bezeichnet. Außerdem spielt die Entfernung des „Schnittlokus“ von ihrer Erkennungssequenz eine wichtige Rolle bei der Einteilung der RENs in mehrere Typen [135]. Die hier verwendeten RENs Typ II schnitten innerhalb oder in unmittelbarer Nähe ihrer Erkennungssequenzen ohne hierzu weitere Enzymaktivität oder Energieträger zu benötigen (Methyltransferase und ATP). Je nachdem, ob die Erkennungs- und Schnittsequenz durch die Basenveränderung hinzugekommen oder weggefallen war, entstanden Fragmente von unterschiedlicher Länge (Längenpolymorphismus). Dabei wurde, abhängig von der gewählten REN, die wildtyp- oder mutante Sequenz hydrolysiert. Zur Dokumentation und Analyse der RFLP-Kontrolle wurde der

zu verdauende DNA-Abschnitt kurz gewählt, damit die Schnitthäufigkeit der REN möglichst gering ausfiel. Daher wurden alle relevanten Loci – inklusive einiger flankierender Nukleotidbasen – vor dem Enzymverdau mithilfe des PCR-Verfahrens amplifiziert (PCR-Längenpolymorphismus, PLP). Nach dem Enzymverdau erfolgte die Geldokumentation und Auswertung der Allelfrequenzen für die Kontrollgruppe.

#### 2.3.1.9.1 Primer-Design

Die detaillierten Schritte der Primerkonstruktion sowie ihre Hersteller wurden bereits im Text genannt (► 2.3.1.3.1 Primer-Design, S. 34).

Die gewählten Oligonukleotidprimer flankierten nebst relevantem Locus zusätzlich eine ausreichende Menge umgebender Nukleotide, so dass PCR-Produktlängen von 200 bis 240 bp nach der Amplifikation zu erwarten waren (► Tabelle 3-6, S. 71).

#### 2.3.1.9.2 Restriktionsendonukleasen-Auswahl

Um aus dem breiten Spektrum kommerziell erhältlicher RENs das passende Enzym für die jeweilige Abweichung zu finden, wurde das von der Universität Waterloo (Waterloo, ON, CA) kostenlos angebotene Onlineprogramm WatCut (Stand: 07/2006, <http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php>) verwendet.

WatCut greift bei der Suche nach einem geeigneten Restriktionsenzym auf die Restriktionsenzym Datenbank „Rebase“ (<http://rebase.neb.com/>) [136] zu, welche durch die Enzymanbieter kostenlos zur Verfügung gestellt und im monatlichen Intervall aktualisiert wird. Für die Suchanfrage wurde eine kurze, den Locus beinhaltende Sequenz (insgesamt 25 Nukleotidbasen), aus dem Sequenzanalyseprogramm SeqMan II (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) in WatCut eingefügt (► Abbildung 2-10 und Abbildung 2-11, S. 57).



Das Ergebnis lieferte eine Liste von in Frage kommenden RENS Typ II (► Abbildung 2-12, S. 58). Die Entscheidung für eines dieser Enzyme wurde nach Kontrolle ihrer Schnitthäufigkeit innerhalb des geplanten PCR-Produktes getroffen, optimal war hierbei ein rare cutter mit maximal einer möglichen Schnittsequenz.

Hierzu wurde die gesamte PCR-Planungssequenz in MapDraw (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) auf die Schnitthäufigkeit des jeweiligen Enzyms geprüft (► Tabelle 3-6, S. 71). Anschließend wurden die Typ II Restriktionsendonukleasen PvuI, NmuCI, MspI (Fermentas Int. Inc., Burlington, ON, CA) und HaeII (Promega Corp., Madison, WI, USA), mit einer Enzymaktivität von 10 U / µl, erworben.

**Results of SNP-RFLP analysis** **Enzymes: All**

Mutations: up to  Distance to SNP  Sort by   [Print version](#)

Save checked enzymes as new set:   [Check all](#) [Uncheck all](#)

Enzyme	recognizes	cleaves at	SNP site / mutations:	Base changes
<input type="checkbox"/> <a href="#">BstMCI</a>	CGRY^CG	-1	..GCCGGGCCTTCGGTC <b>G</b> CTACACACTGGTGGG..	0
<input type="checkbox"/> <a href="#">BstMWI</a>	GCN5^N2GC	-2	..GCCGGGGCTTCGGTC <b>G</b> CTACACACTGGTGGG..	1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Hpy99I</a>	CGWCG^	1	..GCCGGGCCTTC <b>C</b> GTC <b>G</b> CTACACACTGGTGGG..	1
<input type="checkbox"/> <a href="#">MaeIII</a>	^GTNAC	-3	..GCCGGGCCTTCGGTC <b>A</b> CTACACACTGGTGGG..	0
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Tsp45I</a>	^GTSAC	-3	..GCCGGGCCTTCGGTC <b>A</b> CTACACACTGGTGGG..	0

These enzymes recognize the sequence within 25 bp of the polymorphic site and were excluded:  
 BanII, BmgT120I, BseI, Bsp1286I, BstSCI, CviJI, HaeIII, Hpy8I, MspI, NciI, NlaIV, OliI, Sau96I, ScrFI, SmiMI, TaqII, TspRI

**Abbildung 2-12** Beispielhaftes WatCut-Ergebnis auf eine Benutzeranfrage. Auswahl der Restriktionsendonukleasen für die Position mit der Basenabweichung. Tsp45I ≙ NmuCI.

### 2.3.1.9.3 Amplifikation (PCR)

Das Vorgehen bei der PCR entspricht den Ausführungen weiter oben im Text (► 2.3.1.4 Amplifikation (PCR), S. 37). Angaben zum Reaktionsansatz mit den verwendeten Primersequenzen und dem dazugehörigen Amplifikationsprogramm sind der Tabelle 2-8 (► S. 59), Tabelle 3-6 (► S. 71) und Tabelle 2-9 (► S. 59) entnehmbar.

Substanzen	Mengenangabe für eine standard PCR
10× Puffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	37,8 µl
HotStar-Taq (5 U / µl)	0,2 µl
Primer F (10 pmol / µl)	2 µl
Primer R (10 pmol / µl)	2 µl
gDNA	2 µl
Σ	50 µl

Tabelle 2-8 Standard-PCR Mixtur für die RFLP.

Schritte	Temperatur	Zeit	Zyklen	Funktion
1.	95 °C	15 Min.	1×	Denaturierung (ds-gDNA)
	94 °C	45 Sek.		De-Hybridisierung (Amplikon und Matrize)*
2. - 4.	60 °C	45 Sek.	30×	Annealing (Oligonukleotidprimer)
	72 °C	45 Sek.		Primerelongation (Taq-Polymerase)
5.	72 °C	10 Min.	1×	Ausleitung der PCR (Terminierung)
6.	12 °C	∞		Aufbewahrung / Lagerung (PCR-Produkt)

Tabelle 2-9 PCR-Programmablauf für die RFLP.  
 \*Dieser Schritt ist erst ab dem zweiten Programm-Zyklus relevant, da vorher keine Hybride vorliegen.

### 2.3.1.9.4 Agarosegelelektrophorese (PCR-Kontrolle)

Dieser Schritt diente zur Erfolgskontrolle der vorausgehenden PCR und war identisch mit den Ausführungen zur Agarosegelelektrophorese weiter oben im Text (► 2.3.1.4.1 Agarosegelelektrophorese (PCR-Kontrolle), S. 39).



### 2.3.1.9.5 Enzymverdau (PLP)

Die PCR-Produkte wurden nach der Gelkontrolle mit den dazugehörigen Enzymen verdaut (PCR-RFLP, PLP). Der 10 µl Reaktionsansatz bestand aus 1,0 µl 10-fach Reaktionspuffer R (einfach Puffer: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0,1 mg / ml BSA, 10 mM TRIS-HCl, pH 8,5), 3,8 µl HPLC-H<sub>2</sub>O, 0,2 µl Enzym (10 U / µl) und 5 µl PCR-Produkt (► Tabelle 2-10, S. 60).

Bis auf die Restriktionsendonuklease HaeII (Promega Corp., Madison, WI, USA), wurden alle Enzyme inklusive des 10-fachen Reaktionspuffers von Fermentas (Fermentas Int. Inc., Burlington, ON, CA) bezogen. Im verwendeten Reaktionspuffer R (red) zeigten die Enzyme laut Hersteller eine für die RFLP ausreichende Aktivität von 20 bis 100 Prozent. Die einzelnen Komponenten wurden in 0,2 ml 8er-Strips PCR-Gefäße mit anhängendem Deckel (781330; BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland) zu einem 10 µl Reaktionsansatz pipettiert und sorgfältig auf dem Reagenzglasschüttler (EU 444-1372; VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) miteinander gemischt. Anschließend wurde der isotherme Enzymverdau bei 37 °C auf einem Inkubator (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) mittels zugehörigem Programm eingeleitet.

Substanzen	Menge
10× Puffer R	1,0 µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	3,8 µl
REN Typ II	0,2 µl
PCR-Produkt	5 µl
$\Sigma$	10 µl

Tabelle 2-10 RFLP Mixtur.

Nach 3 Stunden war die Endonukleolyse abgeschlossen und die Enzyme wurden durch eine Temperaturerhöhung für 20 Minuten inaktiviert (► Tabelle 2-11, S. 60).

Das Ergebnis wurde mithilfe der folgenden Geldokumentation ausgewertet.

Schritte	Temperatur	Zeit	Funktion
1.	37 °C	3 Std.	Enzymverdau (PCR-Produkte)
2.	65 oder 80 °C	20 Min.	Inaktivierung* (RENs)

Tabelle 2-11 RFLP Programmablauf.  
\*Gewählte Inaktivierungstemperatur (T<sub>i</sub>) ist abhängig von der jeweils verwendeten REN (► Tabelle 3-6, S. 71).

### 2.3.1.9.6 Geldokumentation (Restriktionsfragmentmuster)

Um laut Hersteller Fragmente mit eine Länge von 100 - 500 bp adäquat trennen zu können, wurde ein 3-prozentiges NuSieve 3 : 1 Agarose Fertiggel (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) in 1× TBE-Puffer hergestellt.

Bis auf diese Änderungen entsprach das Verfahren zur Gelherstellung und -dokumentation dem schon beschriebenen Vorgang (► 2.3.1.4.1 Agarosegelelektrophorese (PCR-Kontrolle), S. 39).

## 2.4 Nicht aufgeführte Geräte und Materialien

Die im Text und in der folgenden Tabelle genannten Substanzen, Geräte und Materialien sind auch bei Fehlen einer besonderen Kennzeichnung geschützte Warenbezeichnungen ihrer Hersteller.

Geräte / Materialien	Hersteller
epTIPS Pipettenspitzen (0,1 - 10 µl; 0,5 - 20 µl; 2 - 200 µl; 20 - 300 µl; 50 - 1000 µl)	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
SafeSeal Tips Premium (2,5 µl; 5,0 µl; 300 µl; 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Filter Tip 10 µl	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Combitips® plus Pipettenspitzen (0,1 - 10 ml)	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
PCR Gefäße (0,2 ml; 0,5 ml)	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Standard Reaktionsgefäß (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf IsoTherm® (IsoPack, IsoRack)	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Falcon™ konische Röhrchen (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Labor Flasche (80 ml; 500 ml; 1000 ml)	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Milli-Q UF Plus	Millipore Corp., Billerica, MA, USA

**Tabelle 2-12** Materialtabelle.  
Weitere – im Text nicht erwähnte – Geräte / Materialien und ihre Hersteller.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Teilergebnis – Audiologische Befunde

#### 3.1.1 Patienten

Mithilfe der genannten Untersuchungsmethode (► 2.2.3 Audiologische Untersuchung, S. 25) konnten in der Klinik und Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie des Universitätsklinikums Münster im Zeitraum von 2005 bis 2007 **insgesamt 13 Kinder** (drei weiblich, zehn männlich), die die Einschlusskriterien einer ANSD erfüllten, identifiziert werden (► Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2, S. 63 - 64). Die Eltern dieser Patienten waren alle hörgesund.

Die ANSD-Erstdiagnose wurde bei diesen Kindern im Alter von  $6,31 \pm 2,74$  Jahren gestellt. Acht Kinder wiesen eine monaurale und fünf eine binaurale ANSD auf – drei der beidseits betroffenen Kinder waren verwandt (Brüder).

**Einschlusskriterien** waren eine normale bis erhöhte Schwelle im Reintonaudiogramm (RTA) oder in der Reflexaudiometrie, eine herabgesetzte Sprachdiskrimination im Störschall, initial nachweisbare OAE und eine fehlende Reizantwort oder eine pathologisch erhöhte Schwelle in der BERA.

Initial erfüllte ein weiteres Kind im Alter von zehn Monaten die ANSD-Kriterien. In den folgenden Kontrollen zeigte das Kind jedoch eine Verbesserung der Schwellenwerte, bis im Alter von zweieinhalb Jahren normalisierte Hörschwellen vorlagen, so dass bei Annahme einer **Hörbahnnachreifung** das bis dato verwendete HG abgesetzt werden konnte.

Die **subjektive Audiometrie** zeigte bei den Patienten einen HV von insgesamt  $71,6 \pm 31,8$  dB. Bis auf einen Patienten, dessen Sprachdiskrimination von maximal 25 Prozent als stark eingeschränkt einzustufen war, konnte in keinem weiteren Fall eine Sprachdiskrimination im Störschall nachgewiesen werden.

		<b>Geschwister</b>											
<b>ID</b>		<b>1</b>	<b>2</b>		<b>3</b>	<b>4</b>		<b>5</b>		<b>6</b>		<b>7</b>	
<b>Patient</b>	Geschlecht	m	w		m	w		m		m		m	
	Geburtsjahr	2001	1995		1996	2000		1988		1995		1992	
	Alter <sup>1</sup>	5,08	9,75		9,58	5,33		9,83		5,17		10,67	
	betroffene Seite	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>L</b>		<b>R</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>L</b>
<b>Audio-gramm</b>	Hörverlust (MHV) im RTA <sup>2</sup>	<b>103</b>	<b>64</b>	<b>75</b>	<b>101</b>	<b>90</b>		<b>55</b>	<b>45</b>	<b>53</b>	<b>47</b>	<b>11</b>	<b>11</b>
	Sprachverständnis im Störschall <sup>3</sup>	0	0	0	0	0		0	0	0	0	<b>25</b>	<b>10</b>
<b>Click-BERA</b>	Alternierend <sup>4</sup>	<b>70</b>	<b>&gt; 100</b>	<b>&gt;100</b>	<b>85</b>	<b>85</b>		<b>&gt; 100</b>	<b>&gt; 100</b>	<b>&gt; 100</b>	<b>&gt; 100</b>	<b>&gt; 100</b>	<b>&gt; 100</b>
	Druck	< 60	> 100	> 100	95	85							
	Sog	70	90	> 100	85	85							
	Chirp-BERA	70	> 100	> 100	75	95						95	> 95
	Sync.-Störung <sup>5</sup>	V. a.											
<b>CVF</b>	TEOAE <sup>6</sup>	16,5	20,1	17	8,1	17,4		e. B. <sup>8</sup>	e. B. <sup>8</sup>	21,1	14,7	15,5	19
	CAS-TEOAE <sup>7</sup>	1,8	-0,3	0,1	-0,5	-0,3						-0,5	-0,7
<b>Impedanz</b>	Tympanometrie				TFP re.								
	kontralaterale Stapediusreflexe	∅	∅		∅	∅		∅	∅	∅	∅	∅	
	Kalorische Prüfung	normal	normal		normal	normal		normal	normal	normal	normal	normal	
	cMRT	normal	normal		normal	normal		normal	normal	normal	normal	normal	
	Ätiologie / RF	FAS	Konsanguinität, FG, Epilepsie		Konsanguinität	familiäre SH		familiäre SH	familiäre SH	familiäre SH	familiäre SH	familiäre SH	
	Apparative Therapie	CROS re., Benefit	HG beidseits, Benefit		CROS li., Benefit	CROS li., Benefit		CI re.	CI re.	CI re.	CI re.	HG re., Benefit	

**Tabelle 3-1**

Audiologische Messergebnisse der Patienten 1 bis 7.

<sup>1</sup>Altersangabe (in Jahren) bei Erstvorstellung; <sup>2</sup>Mittlerer Hörverlust (MHV) bei 0,5, 1 und 2 kHz Tönen im Reintonaudiogramm (RTA); <sup>3</sup>Sprachverständnis in Prozent (Göttinger- oder Freiburger Sprachtest) bei 80 dB Störschall; <sup>4</sup>Click-BERA Schwelle (in dB HL) mit alternierenden (40,5 und 11,1 Hz) Reizraten;

<sup>5</sup>Synchronisationsstörungen (Sync.-Störung): kein Antwortpotential bei hohen und vorhandene (verzögerte) Welle V bei niedrigen Pegeln; <sup>6</sup>Click-TEOAE Antwort (in dB SPL) mit mind. 60 prozentiger Reproduzierbarkeit; <sup>7</sup>Kontralaterale akustische Suppression (CAS) der TEOAE (CAS-TEOAE) in dB SPL; <sup>8</sup>Externe Befunde (e. B.) mit initial vorhandenen TEOAE, jedoch inzwischen erloschen; ID = Identität; CVF = cochleäre Verstärkerfunktion; pCCA = partielle Corpus callosum Agenesie; Rea = Reanimation; TFP = Trommelfellperforation; HG mit kontralateraler Signalübermittlung (contralateral routing of signals / CROS).

		8	9	10	11	12	13
Patient	ID						
	Geschlecht	m	m	m	m	m	w
	Geburtsjahr	2002	1994	2003	2005	2000	2003
Patient	Alter <sup>1</sup>	4,5	5,83	3,5	2,17	6,25	4,33
	betroffene Seite	R	L	L	R   L	L	R
Audio-gramm	Hörverlust (MHV) im RTA <sup>2</sup>	100	100	91	100   100	> 100	> 100
	Sprachverständnis im Störschall <sup>3</sup>	0	0	0	0   0	0	0
Click-BERA	Alternierend <sup>4</sup>	75	> 100	65	> 100   > 100	70	65
	Druck	< 75		65		70	
	Sog	< 65		< 55		80	
	Chirp-BERA	< 75		75		70	65
CVF	Sync.-Störung <sup>5</sup>	V. a.	V. a.	V. a.		V. a.	V. a.
	TEOAE <sup>6</sup>	20,3	16	20,1	7,9   9,6	1,9	e. B. <sup>8</sup>
Impedanz	CAS-TEOAE <sup>7</sup>		-0,3	0,35		-0,5	
	Tympanometrie						
Impedanz	kontralaterale Stapediusreflexe		∅	∅	∅	∅	∅
	Kalorische Prüfung				normal	normal	normal
	cMRT	normal			pCCA	normal	normal
	Ätiologie / RF	unbekannt	∅	∅	∅	FG (< 32. SSW) mit Rea, ototox. Medikation	unbekannt
	Apparative Therapie	HG re.	CROS li., Benefit	CROS li., Benefit	CI beidseits	HG li., kein Benefit	∅

**Tabelle 3-2**

Audiologische Messergebnisse der Patienten 8 bis 13.

<sup>1</sup>Altersangabe (in Jahren) bei Erstvorstellung; <sup>2</sup>Mittlerer Hörverlust (MHV) bei 0,5, 1 und 2 kHz Tönen im Reintonaudiogramm (RTA); <sup>3</sup>Sprachverständnis in Prozent (Göttinger- oder Freiburger Sprachtest) bei 80 dB Störschall; <sup>4</sup>Click-BERA Schwelle (in dB HL) mit alternierenden (40,5 und 11,1 Hz) Reizraten; <sup>5</sup>Synchronisationsstörungen (Sync.-Störung): kein Antwortpotential bei hohen und vorhandene (verzögerte) Welle V bei niedrigen Pegeln; <sup>6</sup>Click-TEOAE Antwort (in dB SPL) mit mind. 60 prozentiger Reproduzierbarkeit; <sup>7</sup>Kontralaterale akustische Suppression (CAS) der TEOAE (CAS-TEOAE) in dB SPL; <sup>8</sup>Externe Befunde (e. B.) mit initial vorhandenen TEOAE, jedoch inzwischen erloschen; ID = Identität; CVF = cochleäre Verstärkerfunktion; pCCA = partielle Corpus callosum Agenesie; Rea = Reanimation; TFP = Trommelfellperforation; HG mit kontralateraler Signalübermittlung (contralateral routing of signals / CROS).

In allen Fällen war die **Click-BERA** pathologisch – sechs Patienten zeigten keine ABR und sieben lediglich pathologisch erhöhte Schwellen ( $73,6 \pm 8,52$  dB). Bei sechs Kindern wurde der Verdacht auf eine Wellen-Synchronisationsstörung in der BERA gestellt, d. h. fehlende Antwortpotentiale bei hohen und eine (verzögert) generierbare Welle V bei niedrigen Schalldruckpegeln (SPL) – unterhalb der Schwelle im RTA. Dieses Phänomen ist als weitere Möglichkeit zur Diagnostik einer ANSD bei bereits erloschenen OAE in der Diskussion, zumindest für eine Subgruppe der ANSD [64].

**TEOAE** konnten bei elf Patienten nachgewiesen werden. Bei zwei Patienten lagen externe Befunde über initial vorhandenen OAE vor, die inzwischen erloschen und nicht mehr nachweisbar waren. Die kontralaterale akustische Suppression der TEOAE (CAS-TEOAE) war bei sechs von sieben untersuchten Patienten pathologisch.

Bei genauerer Betrachtung der audiologischen Befundkonstellation zeigte sich, dass die Patienten zwei ANSD-Gruppen zugeordnet werden konnten – in eine Gruppe mit relativ besseren und eine Gruppe mit relativ schlechteren „BERA-Schwellen“ als im RTA, letzteres im Sinne einer klassischen ANSD. Zusätzlich war feststellbar, dass die Patienten der ersten Gruppe nur einseitig betroffen waren, wohingegen fünf von sechs der klassischen ANSD-Patienten beidseits eine SH aufwiesen. Die Tatsache, dass in dieser Gruppe nur ein Patient eine Synchronisationsstörung der Wellen in der Hirnstammaudiometrie zeigte, lag an der nicht durchgeführten Kontrolle der restlichen Patienten in dieser Gruppe.

In der **Gruppe mit den relativ besseren BERA-Ergebnissen** befanden sich sieben monaural betroffene Patienten im Alter von  $4,95 \pm 1,99$  Jahren, dabei überwog die Zahl der männlichen Patienten (Nr. 1, 3, 8, 10, 12 und 13) gegenüber den weiblichen (Nr. 4 und 13). Im RTA lag die Hörschwelle mit  $97 \pm 6$  dB bei allen ANSD-Patienten über der pathologisch erhöhten BERA-Schwelle mit  $74 \pm 8,5$  dB – Patient 4 zeigte sowohl in der objektiven, als auch in der subjektiven Audiometrie einen hochgradigen HV. Bei keinem der Patienten war eine Sprachdiskrimination im Störschall nachweisbar.

Anamnestisch waren Ereignisse, die mit der Entwicklung einer ANSD in Zusammenhang gebracht werden konnten, bei Patienten 8 und 13 nicht zu klären, bei Patient 10 gab es keine ANSD-begünstigenden RF. Bei Patient 1 lag die Diagnose eines fetalen Alkoholsyndroms (FAS)

und bei Patient 3 eine Konsanguinität der Eltern (Cousins ersten Grades) vor. Patient 4 hatte eine positive Familienanamnese bezüglich einer SH in der mütterlichen Linie (Großmutter und Großonkel). Die Vorgeschichte des Patienten 12 beinhaltete eine Frühgeburtlichkeit (vor der 32. Schwangerschaftswoche) mit anschließender Reanimationspflicht und ototoxischer Medikation. Externe audiologische Befunde dieses Patienten bestätigten initial erhaltene OAE (TEOAE bei 1 kHz und DPOAE bis 2 kHz), die zwei Monate später nicht mehr eruierbar gewesen sind. Bei den restlichen Patienten konnten TEOAE nachgewiesen werden.

Sechs der Patienten dieser Gruppe wurden u. a. apparativ versorgt. Patient 8 und 12 erhielten ein konventionelles HG, wovon letzterer keinen Benefit zeigte. Patient 1, 3, 4 und 10 wurden durch HG mit einseitiger kontralateraler Signalübermittlung (contralateral routing of signals, CROS) versorgt, wovon zwei Patienten (Nr. 3 und 4) profitierten.

In der **Gruppe der klassischen schweren ANSD** befanden sich sechs Patienten im Alter von  $7,07 \pm 3,37$  Jahren – davon waren fünf männlich (Nr. 5, 6, 7, 9 und 11) und einer weiblich (Nr. 2). Bis auf Patient 9 waren alle Patienten dieser Gruppe binaural betroffen. Drei der Patienten (Nr. 5, 6 und 7) waren verwandt (Brüder).

Die Patienten dieser Gruppe zeigten deutlich erhöhte Schwellen in der BERA (über 100 dB) und somit letztlich fehlende ABR. Die Hörschwelle mit  $60,09 \pm 32,11$  dB in der subjektiven Audiometrie lag bei allen Patienten unterhalb der Schwellenwerte der BERA. Bis auf die drei Geschwister zeigten die übrigen Patienten dieser Gruppe einen hochgradigen HV im RTA. Zwei der Geschwister (Patienten 5 und 6) hatten einen mittelgradigen HV. Der Dritte (Patient 7) besaß eine normale Hörschwelle im RTA. Die Sprachdiskriminationsfähigkeit dieses Patienten lag unter ruhigen Umgebungsbedingungen bei maximal 55 Prozent – im Störschall bei maximal 25 Prozent. Eine sprachliche Diskriminationsfähigkeit der anderen Patienten konnte nicht nachgewiesen werden.

In der Vorgeschichte der Patienten 9 und 11 existierten keine RF für eine ANSD. Bei Patient 2 waren eine Konsanguinität der Eltern, Frühgeburtlichkeit und eine Epilepsie bekannt. Die Familienanamnese bezüglich begünstigender RF der Geschwister (Patienten 5, 6 und 7) war, aufgrund der Tatsache dass alle drei eine SH im Rahmen einer ANSD aufwiesen, positiv. Zudem hatten die drei noch zwei weitere Brüder (B1 und B2). Der ältere Bruder (B1) war klinisch

unauffällig. Der jüngere Bruder (B2) war klinisch normalhörend, besuchte dennoch eine Schule für Hörgeschädigte, da eine auditive Verarbeitungs- und Wahrnehmungsstörung (AVWS), sowie verschiedene Teilleistungsstörungen bestanden. Die Eltern dieser fünf Geschwister waren klinisch normalhörig, wobei der Vater einer weitergehenden audiologischen ANSD-Untersuchung widersprach. Der Älteste der betroffenen Geschwister (Patient 5) hatte inzwischen keine nachweisbaren OAE mehr, die jedoch vorher durch externe audiologische Untersuchungen festgestellt wurden.

Bei den anderen Patienten (Nr. 2, 9 und 11) dieser Gruppe konnten TEOAE nachgewiesen werden.

Patient 2 erhielt eine beidseitige und Patient 7 eine einseitige (rechtes Ohr) konventionelle HG-Versorgung – wovon beide profitierten. Patient 9 wurde mit einem einseitigen CROS-System versorgt. Drei der Patienten erhielten ein Cochlea-Implantat (CI) – Patienten 5 und 6 einseitig und Patient 11 beidseits.

Eine Provokation sowohl ipsi-, als auch kontralateraler **Stapediusreflexe** über dem betroffenen Ohr, war bei keinem der 13 Patienten möglich, jedoch konnten bei allen einseitig betroffenen ANSD-Patienten, über dem nicht-afektierten Ohr ipsilaterale Reflexe generiert werden, die wiederum kontralateral im betroffenen Ohr fehlten.

Die kalorische Funktionsprüfung des Vestibularapparates wurde bei zehn Patienten durchgeführt und war unauffällig. Patient 3 hatte eine Trommelfellperforation (TFP) auf der nicht betroffenen Seite. Die kraniale MRT (cMRT) des Hirnstamms und des Hirnnerven (N. VIII) war in allen kontrollierten Fällen ohne pathologischen Befund, bei Patient 11 wurde nebenbefundlich eine partielle Balkenagenesie (pCCA) diagnostiziert.

Im PNP-Screening der 13 Patienten gab es keine eigen- oder fremdanamnestischen Hinweise auf eine hereditäre motorische und sensible Neuropathie (HMSN\*).

---

\* Synonym: Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung, CMT



## 3.2 Teilergebnis – Molekulargenetische Befunde

### 3.2.1 Sequenzierstrategie

Um eine standardisierte Sequenzanalyse der Kandidatengene durchführen zu können, wurden – wie im Methodenteil ausführlich beschrieben – flankierende Oligonukleotidprimerpaare konstruiert. Zur Stabilisation der PCR erfolgte die empirische Ermittlung der Hybridisierungstemperaturen ( $T_A$ ) und Reaktionszusätze. Den hieraus folgenden Wertetabellen können die Hybridisierungsorte der Primer, die PCR-Produkt- und die flankierten Exonlängen entnommen werden (► Tabelle 3-3, Tabelle 3-4 und Tabelle 3-5, S. 69 - 71). Die verwendeten PCR-Programme, sowie die Zusammensetzung der Reaktionsansätze sind dem zugehörigen Methodenteil entnehmbar (► 2.3.1.3.1 Primer-Design, S. 34).

Zur Klärung einer klinischen Relevanz von bisher unbekanntem Sequenzabweichungen mit konsekutiver Aminosäuresubstitution, wurden die Allelfrequenzen mittels PLP (PCR-RFLP) in einer gesunden kaukasischen Kontrollgruppe (n = 130) ermittelt.

Die im Methodenteil entwickelten Oligonukleotidprimerpaar-Sequenzen, ihre Hybridisierungsorte und -temperaturen, die verwendeten Endonukleasen mit ihren Schnitthäufigkeiten und Restriktionsfragmentlängen können der Tabelle 3-6 (► S. 71) entnommen werden.

Die Reaktionsansätze der PCR und RFLP, sowie die dazugehörigen Thermo Cycler-Programme sind in den entsprechenden Abschnitten des Methodenteils detailliert erklärt (► 2.3.1.4 Amplifikation (PCR), S. 37 und 2.3.1.9.5 Enzymverdau (PLP), S. 60).

Gen, Exon-Nummer und Primerausrichtung	5'-Primersequenz-3'	PCR-Produktlänge (in bp)	T <sub>A</sub> (in °C)	Exonlänge (in bp)
GJB2-Ex2-1F GJB2-Ex2-1R	tctgtcttcacctgttttggg GACGTACATGAAGGCGGC <sup>l</sup>	630	57	426
GJB2-Ex2-2F GJB2-Ex2-2R	TCGAGGAGATCAAAACCCAG <sup>l</sup> GAGGCTTTAGGGGAGCAGAG <sup>u</sup>	523		
GJB3-Ex1-1F GJB3-Ex1-1R	aacaagtcagaactcagaacactg TGTGCAGCAGGTAGAGGAAG <sup>l</sup>	572	57	406
GJB3-Ex1-2F GJB3-Ex1-2R	AGCTGTACGACAACGAGG <sup>l</sup> CAGAGTGGGGTCACTCAGC <sup>u</sup>	570		
GJB6-Ex1-1F GJB6-Ex1-1R	ccttaaaataaagttggcttcagtc GCTGCTTCAAAGATGATTCG <sup>l</sup>	557	57	396
GJB6-Ex1-2F GJB6-Ex1-2R	AAACCACTCGCAAGTTCAGG <sup>l</sup> CGTTGTGTATGAATGGAGCAAG <sup>u</sup>	656	53	
OTOF-Ex1F OTOF-Ex1R	CACCGGCTAGCTCCTTC <sup>u</sup> acctccagagcatgggc	203	53	79
OTOF-Ex2F OTOF-Ex2R	atgctcatcgtctggacagc agaggcaggaagggtg	185	60	59
OTOF-Ex3F OTOF-Ex3R	acaagagattcccctccac gagaagagcaggctcccag	227	53 <sup>Q</sup>	89
OTOF-Ex4F OTOF-Ex4R	gtcagtcttgctcctcacc aggcagggagaacagacc	233	57	100
OTOF-Ex5F OTOF-Ex5R	gtaaaccaccaagcagcc gtctctcccgtgtcttg	321	57 <sup>M</sup>	182
OTOF-Ex6F OTOF-Ex6R	ttgtgtgtttcctcatgc aggaggccctttggcag	229	60 <sup>Q</sup>	74
OTOF-Ex7F OTOF-Ex7R	cagagtaaaggagaaatggtcac tcatggcaagccaggtc	267	57	127
OTOF-Ex8F OTOF-Ex8R	cagtgtcctcctcccaac atgcacatccggctagaatc	191	53	55
OTOF-Ex9F OTOF-Ex9R	aggctcctaggctcaggc cagccactcctatttctctg	271	60	132
OTOF-Ex10F OTOF-Ex10R	ctgggctgttgctgctg acaaaggtgcagttgaggg	174	60	63
OTOF-Ex11F OTOF-Ex11R	atggaagcctcacccttg gcaccacgctccctgag	199	60	85
OTOF-Ex12F OTOF-Ex12R	cactgggagacgctctgg ctcagcaaacctcaccg	300	57	160
OTOF-Ex13F OTOF-Ex13R	cccaggagtgtgtagatgcc agcctgcccttgtgatacc	326	62	187
OTOF-Ex14F OTOF-Ex14R	acatgcaccactcacacac catattcctccctcaggc	308	57 <sup>M</sup>	187

Tabelle 3-3

Übersicht der Primerkonstrukte.

<sup>l</sup>Primer hybridisiert in UTR-Region; <sup>l</sup>Primer hybridisiert innerhalb des Exons (interner Primer);

<sup>M</sup>MgCl<sub>2</sub>- und <sup>Q</sup>Q-Solution-Zusatz zur Reaktionsstabilisierung; F = Vorwärts (forward / sense)

Primer; R = Rückwärts (reverse / anti-sense) Primer. Beachte: Lange Exonabschnitte werden mit zwei Primerpaaren abgedeckt, sehr kurze Abschnitte – mit zwei aufeinander folgenden Exonen und dazwischen liegendem Intron – werden hingegen mit einem Primerpaar umgesetzt.

Gen, Exon-Nummer und Primerausrichtung	5'-Primersequenz-3'	PCR-Produktlänge (in bp)	T <sub>A</sub> (in °C)	Exonlänge (in bp)
OTOF-Ex15F OTOF-Ex15R	cttccccaggaaactgg gggaccaggtgactcag	356	53	224
OTOF-Ex16F OTOF-Ex16R	ccgacctgccacccttac acacttaccacctgcagcc	249	57	109
OTOF-Ex17/18F OTOF-Ex17/18R	ggattggacggtgggag caggaaggccctctgac	528	60 <sup>M</sup>	390
OTOF-Ex19/20F OTOF-Ex19/20R	aacagggaggaggcatttg acaccttctcacaaccaggc	466	53	334
OTOF-Ex21/22F OTOF-Ex21/22R	gtcatggcccagctgtc cactcaggctccagccc	537	57	398
OTOF-Ex23/24F OTOF-Ex23/24R	cccttccccacctcttg tcacaggcttctgggtgctc	524	53	404
OTOF-Ex25F OTOF-Ex25R	cttctgtttgtcatctgcc gtggagtgcaggaacaag	268	60	135
OTOF-Ex26F OTOF-Ex26R	ggaccaaacgagatcacagg cctaggccccaactccc	291	57	162
OTOF-Ex27F OTOF-Ex27R	actcatgggaaagagacc cctctgggtcctcagactc	244	53	120
OTOF-Ex28/29F OTOF-Ex28/29R	ggctggctcccttgactaag gagacctggagcccttc	561	53	436
OTOF-Ex30F OTOF-Ex30R	tctcactgttctcttgctcc aggatgtgtcacacgaagtg	251	57	131
OTOF-Ex31F OTOF-Ex31R	ccacacacctgtgctagg tcattgccaataaaggacc	170	57	30
OTOF-Ex32F OTOF-Ex32R	aggctctcgggattgtcc acaggagggtctgagtgtgg	250	60	129
OTOF-Ex33F OTOF-Ex33R	cagactcctcccaggaaac agaagcaggatgatgaggtgg	205	57	67
OTOF-Ex34/35F OTOF-Ex34/35R	atccaggccttctgctc gtgggaggtgagtgagg	540	62	403
OTOF-Ex36F OTOF-Ex36R	agctatttgaatgccacc gcttcttctctctcccag	271	53	138

**Tabelle 3-4**

Fortsetzung der Tabelle 3-3 (Übersicht der Primerkonstrukte).

<sup>U</sup>Primer hybridisiert in UTR-Region; <sup>I</sup>Primer hybridisiert innerhalb des Exons (interner Primer); <sup>M</sup>MgCl<sub>2</sub>- und <sup>Q</sup>Q-Solution-Zusatz zur Reaktionsstabilisierung;

F = Vorwärts (forward / sense) Primer; R = Rückwärts (reverse / anti-sense) Primer.

Beachte: Lange Exonabschnitte werden mit zwei Primerpaaren abgedeckt, sehr kurze Abschnitte – mit zwei aufeinander folgenden Exonen und dazwischen liegendem Intron – werden hingegen mit einem Primerpaar umgesetzt.

Gen, Exon-Nummer und Primerausrichtung	5'-Primersequenz-3'	PCR-Produktlänge (in bp)	T <sub>A</sub> (in °C)	Exonlänge (in bp)
OTOF-Ex37/38F OTOF-Ex37/38R	ggcactgaagatgagcagg tagagtggaggcaaagcagg	521	57	405
OTOF-Ex39F OTOF-Ex39R	atccaggatggcttagtccc ctcctggcctctgaaacct	278	57	161
OTOF-Ex40F OTOF-Ex40R	ccagcaaaggcttcttggtc cttactgactcaggttgggg	277	57	143
OTOF-Ex41F OTOF-Ex41R	ggagagctgatcttctggg gtggtgggaagtgggtgg	215	60	89
OTOF-Ex42/43F OTOF-Ex42/43R	ctggcacctggcataac gccctgcctcttctcag	604	60	486
OTOF-Ex44/45F OTOF-Ex44/45R	tctgcactcagaaacaagg aggaagagatggggtgtctg	578	60	384
OTOF-Ex46F OTOF-Ex46R	acaccaatcccttctcctc cctgcctagcccttggtc	302	60	181

**Tabelle 3-5** Fortsetzung der Tabelle 3-3 (Übersicht der Primerkonstrukte).  
<sup>U</sup>Primer hybridisiert in UTR-Region; <sup>I</sup>Primer hybridisiert innerhalb des Exons (interner Primer); <sup>M</sup>MgCl<sub>2</sub>- und <sup>Q</sup>Q-Solution-Zusatz zur Reaktionsstabilisierung; F = Vorwärts (forward / sense) Primer; R = Rückwärts (reverse / anti-sense) Primer. Beachte: Lange Exonabschnitte werden mit zwei Primerpaaren abgedeckt, sehr kurze Abschnitte – mit zwei aufeinander folgenden Exonen und dazwischen liegendem Intron – werden hingegen mit einem Primerpaar umgesetzt.

Primer-ausrichtung <sup>1</sup>	5'-Primersequenz-3'	T <sub>A</sub>	PCR-Produkt <sup>2</sup>	REN Typ II <sup>3</sup>	T <sub>i</sub>	Restriktionsfragmente <sup>4</sup>
I108V-F I108V-R	ACGCTGATTGATGACAACAATGCTATC <sup>I</sup> cacagattgagccattccag	60	200	PvuI (ER0621)	80	wt = 200 mut = 174 und 26
R1214H-F R1214H-R	ACATCCTGTGGCCAGTGTG <sup>I</sup> GGGGGCCGGTAGATGAAG <sup>I</sup>	60	219	NmuCI (ER1511)	65	wt = 219 mut = 183 und 36
C1251G-F C1251G-R	tgcccatatttctcccttg CCTCTGGCTCCATAGTACC <sup>I</sup>	60	240	Haell (R6661)	80	wt = 168 und 72 mut = 240
R1853Q-F R1853Q-R	tctgcactcagaaacaagg GCCTTTGACGCGCTTTTG <sup>I</sup>	60	232	MspI (ER0511)	80	wt = 124, 53 und 55 mut = 177 und 55

**Tabelle 3-6** Übersicht der verwendeten Restriktions-Endonukleasen.  
<sup>1</sup>Primerausrichtung für die gefundenen Sequenzabweichungen im *OTOF*;  
<sup>2</sup>PCR-Produktgröße in bp; <sup>3</sup>REN mit Bezeichnung und Bestellnummer, NmuCI ≙ Tsp 451, MspI ≙ HpaII; <sup>4</sup>Restriktionsfragmente: Größe in bp, wt = Wildtyp, mut = Mutante. <sup>I</sup>Interne Primer; T<sub>A</sub> = Anlagerungs-Temperatur in °C; T<sub>i</sub> = REN-Inaktivierungs-Temperatur in °C.

## 3.2.2 Sequenzanalyse

### 3.2.2.1 Übersicht

Die Sequenzanalyse aller untersuchter Kandidatengene erbrachte in der Gruppe der 13 ANSD-Patienten den Nachweis von insgesamt 27 unterschiedlichen Sequenzabweichungen (Punktmutationen; ► Tabelle 3-7, S. 73).

Mit 85 Prozent befand sich ein Großteil der Abweichungen in *OTOF*, wovon mindestens zwei bei jedem der 13 Patienten nachgewiesen werden konnten.

Jeweils 7 Prozent der Punktmutationen befanden sich in *GJB2* und *GJB3*. Von den *GJB2*-Abweichungen waren 15 Prozent der Patienten und von den *GJB3*-Abweichungen 39 Prozent betroffen.

Es konnte bei keinem der 13 Patienten eine Sequenzabweichung in *GJB6* nachgewiesen werden.

		Alle gefundenen Sequenzabweichungen (DNA-Ebene)*																															
		GJB2:c.249C>G	GJB2:c.608T>C	GJB3:c.357C>T	GJB3:c.798C>T	OTOF:c.145C>T	OTOF:c.244C>T	OTOF:c.322A>G	OTOF:c.372A>G	OTOF:c.945G>A	OTOF:c.1926C>T	OTOF:c.2010C>T	OTOF:c.2315+24G>A	OTOF:c.2464C>T	OTOF:c.2580C>G	OTOF:c.2613C>T	OTOF:c.2703G>A	OTOF:c.2736G>C	OTOF:c.3189G>A	OTOF:c.3247G>C	OTOF:c.3641G>A	OTOF:c.3751T>G	OTOF:c.4332C>T	OTOF:c.4629+18C>T	OTOF:c.4936C>T	OTOF:c.5391C>T	OTOF:c.5558G>A	OTOF:c.5655C>T					
Patienten-ID	1	het			het	het						het		het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het			
	2			het		het	het						het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het			
	3			het					het						het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het			
	4								het	het	het			het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het		
	5	het		het					het						het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het		
	6														het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	
	7				het										het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	
	8														het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	
	9														het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	
	10				het										het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	
	11														het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het
	12														het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het
	13														het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het	het

Tabelle 3-7

Übersicht gefundener Sequenzabweichungen bei den Studienpatienten.

het = heterozygote Trägerschaft; hom = homozygote Trägerschaft.

\*Mutationsnomenklatur nach den Empfehlungen der „Human Genome Variation Society“ (<http://www.hgvs.org/>, [43]).

### 3.2.2.2 Bekannte Sequenzabweichungen

Von der Gesamtheit der Abweichungen waren 52 Prozent als bekannte SNP in der online Datenbank (dbSNP) der „University of California Santa Cruz“ (<http://genome.ucsc.edu/>, Stand: 12/2009) registriert (► Tabelle 3-8, S. 75). Hiervon codierten 64 Prozent für die jeweils gleiche Aminosäure (stille / stumme Mutation) und 29 Prozent führten zu einer nachfolgenden Aminosäuresubstitution ohne klinische Relevanz (neutrale Mutation).

Die intronisch gelegene Sequenzabweichung OTOF:c.4629+18C>T unterschied sich in der 18. Pyrimidinbase nach dem 37. Exon des *OTOF* von der Referenzsequenz. Hier befand sich anstelle des Cytosins die Pyrimidin-Base Thymin (C > T).

Die häufigsten Abweichungen im OTOF stellten die SNP c.372A>G (rs11687696), c.2736G>C (rs4335905) und c.2580G>C (rs2272069) dar, die in 70 bis 100 Prozent der untersuchten ANSD-Patienten in hetero- oder homozygoter Form nachgewiesen wurden und als stille Mutation für die jeweils gleiche Aminosäure codierten (p.=).

Exon-Nr.	Substitution auf		dbSNP <sup>2</sup>		ANSD-Population	
	DNA-Ebene <sup>1</sup>	Protein-Ebene <sup>1</sup>	Reference SNP ID	Allelfrequenzen	Patienten-ID <sup>3</sup> mit Abweichung	Anteil
1	GJB2:c.249C>G	p.F83L	∅	∅	5	7,7 %
2	GJB2:c.608T>C	p.I203T	∅	∅	1	7,7 %
1	GJB3:c.357C>T	p.=	rs41310442	∅	3	7,7 %
2	GJB3:c.798C>T	p.=	rs35983826	∅	2, 5, 7, 10	30,8 %
3	OTOF:c.145C>T	p.R49W	rs61746568	∅	1	7,7 %
4	OTOF:c.244C>T	p.R82C	rs13031859	HapMap-CEU <sup>4</sup> (> 1%)	1, 2, 9, 10	30,8 %
4	OTOF:c.322A>G	p.I108V	∅	∅	2	7,7 %
5	OTOF:c.372A>G	p.=	rs11687696	∅	3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13	69,2 %
10	OTOF:c.945G>A	p.=	rs41288779	∅	4, 11	15,4 %
17	OTOF:c.1926C>T	p.=	∅	∅	4	7,7 %
17	OTOF:c.2010C>T	p.=	∅	∅	1	7,7 %
19	OTOF:c.2315+24G>A	(intronsch)	∅	∅	2	7,7 %
21	OTOF:c.2464C>T	p.R822W	∅	∅	4	7,7 %
22	OTOF:c.2580C>G	p.=	rs2272069	HapMap-CEU <sup>4</sup> (> 1%)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	100 %
22	OTOF:c.2613C>T	p.=	rs2272068	∅ HapMap-CEU <sup>4</sup>	1	7,7 %
23	OTOF:c.2703G>A	p.=	rs4997760	∅	1	7,7 %
23	OTOF:c.2736G>C	p.=	rs4335905	∅	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13	77 %
26	OTOF:c.3189G>A	p.=	∅	∅	4	7,7 %
26	OTOF:c.3247G>C	p.A1083P	∅	∅	4	7,7 %
29	OTOF:c.3641G>A	p.R1214H	∅	∅	10	7,7 %
30	OTOF:c.3751T>G	p.C1251G	rs41288773	∅	5, 6, 7	23,1 %
35	OTOF:c.4332C>T	p.=	∅	∅	4	7,7 %
37	OTOF:c.4629+18C>T	(intronsch)	rs56018216	∅	8	7,7 %
39	OTOF:c.4936C>T	p.P1646S	rs17005371	HapMap-CEU <sup>4</sup> (> 1%)	2	7,7 %
43	OTOF:c.5391C>T	p.=	∅	∅	2	7,7 %
44	OTOF:c.5558G>A	p.R1853Q	∅	∅	5	7,7 %
44	OTOF:c.5655C>T	p.=	rs45442103	HapMap-CEU <sup>4</sup> (> 1%)	2, 11	15,4 %

Tabelle 3-8

Übersicht bekannter, unbekannter und stiller Mutationen.

<sup>1</sup>Mutationsnomenklatur nach den Empfehlungen der „Human Genome Variation Society“ (<http://www.hgvs.org/>, [43]); „p.“ = stille Mutation.

<sup>2</sup>„The National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Stand: 03/2006 (NCBI36/hg18)).

<sup>3</sup>hetero- oder homozygotes Vorkommen der Sequenzabweichung im Erbgut des / der jeweiligen ANSD-Patienten.

<sup>4</sup>HapMap-CEU = im Rahmen des „Haplotype Mapping Project“ [67] durch das „Centre d'Etude du Polymorphisme Humain“ in Utah (UT, USA) gesammelte DNA-Proben von gesunden Probanden mit kaukasischer Verwandtschaft zur Allelfrequenzanalyse gefundener Sequenzabweichungen.



### 3.2.2.3 *Unbekannte Sequenzabweichungen*

Die restlichen 13 Punktmutationen (48 Prozent) waren in der dbSNP nicht vermerkt (Stand: 12/2009, ► Tabelle 3-8, S. 75). Hiervon stellten fünf stille Mutationen (38 Prozent) und sieben (54 Prozent) Sequenzabweichungen mit nachfolgender Aminosäuresubstitution von unklarer klinischer Relevanz dar. Zudem befand sich auch in dieser Gruppe eine intronisch gelegene Abweichung (8 Prozent) mit unklaren Folgen hinsichtlich der Funktion des Proteinendproduktes – im 19. Intron des *OTOF* war die 24. Nuklein-Base Guanin durch die Purin-Base Adenin ersetzt (G > A).

Diese **acht unklaren Sequenzabweichungen** (Punktmutationen), mit sieben konsekutiven Aminosäuresubstitutionen und einem intronisch gelegenen Basenaustausch, wurden zur Klärung ihrer Relevanz für die Entwicklung einer ANSD weitergehend kontrolliert.

Im ersten Schritt wurden Literaturangaben auf Nennung und Einstufung der betrachteten Abweichung gesucht. Fehlten Literaturangaben oder waren diese insgesamt unklar, folgte die Feststellung der Allelfrequenz in einer Kontrollgruppe mit 130 gesunden Personen und eine Stammbaumanalyse der betroffenen Patientenfamilien in Kombination mit den audiologischen Untersuchungsergebnissen (► 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse, S. 80).

Diese Schritte entfielen, wenn die betrachtete Abweichung in der Literatur als eindeutig stille Mutation (Polymorphismus) eingestuft wurde. Die Ergebnisse dieser weiteren Untersuchung zeigt Tabelle 3-9 (► S. 77).

Patient (ID)	Exon-Nr.	Substitution auf		Einstufung in der Literatur <sup>2</sup>	Allelfrequenz <sup>3</sup>	Stammbaum Analyse
		DNA-Ebene <sup>1</sup>	Protein-Ebene <sup>1</sup>			
5	1	GJB2:c.249C>G	p.F83L	Polymorphismus	n. d.	durchgeführt
1	2	GJB2:c.608T>C	p.I203T	Polymorphismus	n. d.	n. d.
2	4	OTOF:c.322A>G	p.I108V	k. A.	G = 0 %	durchgeführt
2	19	OTOF:c.2315+24G>A	(intronisch)	k. A.	entfällt	durchgeführt
4	21	OTOF:c.2464C>T	p.R822W	uneindeutig	entfällt	durchgeführt
4	26	OTOF:c.3247G>C	p.A1083P	Polymorphismus	n. d.	durchgeführt
10	29	OTOF:c.3641G>A	p.R1214H	k. A.	A = 0 %	n. d.
5	44	OTOF:c.5558G>A	p.R1853Q	k. A.	A = 1 %	durchgeführt

Tabelle 3-9

Übersicht der bisher unklaren Sequenzabweichungen.

<sup>1</sup>Mutationsnomenklatur nach den Empfehlungen der„Human Genome Variation Society“ (<http://www.hgvs.org/>, [43]);<sup>2</sup>„PubMed“ Meta-Datenbank Recherche (<http://www.pubmed.gov/>);<sup>3</sup>► 2.3.1.9 Allelfrequenz-Analyse (PLP-Kontrolle), S. 55); n. d. = nicht durchgeführt.

### 3.2.2.4 Analyse unbekannter Sequenzabweichungen

Da bei den ANSD-Patienten 3, 6, 7, 8 und 9 keine unbekanntes Sequenzabweichungen vorlagen, werden sie in diesem Abschnitt nicht erwähnt (► Tabelle 3-8, S. 75 und Tabelle 3-9, S. 77).

**Patient 1** war heterozygot für die Abweichung **p.I203T (GJB2)**. Mehrere Arbeitsgruppen erklärten diese Sequenzvariante zum Polymorphismus [2, 86, 95], nachdem diese mehrmals in gesunden japanischen Kontrollgruppen mit einer Allelfrequenz von bis zu 8,3 Prozent gefunden wurde [2]. Auch Park et al. gingen im Jahre 2000 von einem Polymorphismus aus, als sie in ihrer Studie drei heterozygote Gesunde und ein heterozygoten NG mit isolierter HS beschrieben [118]. Bei eindeutigen Literaturangaben hinsichtlich der Abweichung p.I203T erfolgte weder eine Kontrolle der Allelfrequenz, noch eine weitergehende Stammbaumanalyse, da Patient 1 heterozygot für diese Sequenzvariante war und die Eltern ein normales Gehör aufwiesen. Diese Abweichung hätte, bei Annahme eines autosomal-dominanten Erbgangs (z. B. DFNA3A; OMIM 601544, Stand: 12/2010) bei mindestens einem Elternteil diese Erkrankung hervorrufen müssen. Die Sequenzabweichung **p.I203T** wurde als SNP eingestuft.

**Patient 2** war heterozygot für zwei Sequenzabweichungen im *OTOF*. Aufgrund fehlender Literaturangaben bezüglich der Punktmutationen **p.I108V (OTOF)** und **OTOF:c.2315+24G>A** (intronisch), wurde die Allelfrequenzbestimmung für die erste Abweichung in der gesunden Kontrollgruppe und eine Stammbaumanalyse durchgeführt. Die Kontrolle ergab eine Allelfrequenz von null Prozent. Die Ermittlung der Allelfrequenz für die intronische Abweichung entfiel, da mithilfe der Stammbaumanalyse nachgewiesen werden konnte, dass die Vererbung durch die heterozygote Trägerin für beide Allele und zugleich hörgesunde Mutter erfolgt war (► Abbildung 3-1, S. 81). Somit wurden die Punktmutationen **p.I108V** und **c.2315+24G>A** als SNP eingestuft.

Die *OTOF* Sequenzabweichungen **p.R822W** und **p.A1083P** wurden in heterozygoter Form beim **Patienten 4** nachgewiesen. Beide Varianten wurden im Jahr 2006 von Varga et al. [186] als SNP eingestuft. Die Arbeitsgruppe Hutchin [66] konnte im Jahr 2005 die Bedeutung der gefundenen Abweichung p.R822W in ihrer Studie nicht eindeutig klären, da ein Geschwisterpaar mit einer DFNB9, sowohl homozygot für eine – wahrscheinlich ursächliche – Punktmutation im *OTOF* (p.R963X), als auch gleichzeitig homozygot für die hier untersuchte Abweichung p.R822W war. Zusätzlich wurde diese Abweichung von Hutchin et al. bei gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen (T < 1 Prozent). Die Abweichung **p.A1083P** wurde als SNP eingestuft, so dass die Kontrolle der Allelfrequenz entfiel. Die Abweichung p.R822W fand sich auch bei der hörgesunden Mutter des Patienten, die zusätzlich auch die Abweichung p.A1083P und damit dasselbe Sequenzabweichungsprofil in *OTOF* aufwies wie ihr ANSD-betroffenes Kind (► Abbildung 3-2, S. 82). Damit war eine Pathogenität von **p.R822W** nahezu ausgeschlossen, so dass keine Bestimmung der Allelfrequenz in der Kontrollpopulation durchgeführt wurde.

**Patient 5** war heterozygot für die Sequenzabweichungen **p.F83L (GJB2)** und **p.R1853Q (OTOF)**. Die Punktmutation **p.F83L** wurde von mehreren Arbeitsgruppen als Polymorphismus [49] gedeutet, da diese in gesunden Kontrollgruppen [156] vorlag und auch anhand von Stammbaumanalysen [58] als Ursache einer Hörstörung im Sinne einer DFNB1 ausgeschlossen werden konnte. Die Arbeitsgruppe Prasad et al. [128] stufte diese Abweichung – im Kontext einer genetisch bedingten HS – als unklar ein, da sich in ihrer Studie sowohl homozygote SNHL-Patienten, als auch gesunde heterozygote Träger in der Kontrollgruppe befanden. Die Abweichung wurde mit der Möglichkeit einer HS aufgrund einer Compound-Heterozygotie diskutiert, jedoch als Ursache einer DFNB1 ausgeschlossen. Da diese Abweichung in der

Literatur überwiegend als Polymorphismus eingestuft wurde, war von einem SNP auszugehen, daher wurde auf die Bestimmung der Allelfrequenz in der Kontrollgruppe verzichtet. Dennoch erfolgte eine Stammbaumanalyse, um bleibenden Zweifel an der Ursächlichkeit dieser Abweichung für die Entwicklung einer ANSD in der Familie des Patienten 5 auszuschließen. Hierdurch konnte die Abweichung **p.F83L** als SNP eingestuft werden, da beim hörgesunden Geschwisterkind B2 das gleiche Muster für die unbekanntes Sequenzabweichungen p.F83L und p.R1853Q vorlag (► Abbildung 3-3, S. 84).

Für die Abweichung **p.R1853Q** existierten keine Literaturangaben, so dass die Allelfrequenz in der Kontrollgruppe ermittelt wurde, zur zusätzlichen Kontrolle erfolgte auch für diese Abweichung eine Stammbaumanalyse des Patienten (► Abbildung 3-3, S. 84).

Die kombinierten Ergebnisse der Allelfrequenzermittlung (A = 1 Prozent) und der Stammbaumanalyse führten zur Einstufung der Abweichung **p.R1853Q** als SNP.

Über die heterozygote Sequenzvariante **p.R1214H (OTOF)** des **Patienten 10** waren keine Literaturangaben vorhanden. In der darauffolgenden Bestimmung der Allelfrequenz in der Kontrollgruppe konnte diese Abweichung nicht nachgewiesen werden (A = 0 Prozent). Eine weitergehende Stammbaumanalyse konnte nicht durchgeführt werden, da eine genetische Untersuchung der Eltern nicht möglich war.

Da der Patient heterozygot für diese Abweichung und die Eltern jedoch normalhörig waren, schied damit diese Abweichung als genetische Ursache einer ANSD bei dem Patienten 10 aus, da bei Annahme einer ANSD-determinierenden Folge, bei mindestens einem Elternteil diese Erkrankung hätte vorliegen müssen. Ein autosomal-dominanter Erbgang war bei pathogenen Sequenzabweichungen in OTOF bislang nicht beschrieben. Die Sequenzvariante **p.R1214H** wurde somit als SNP eingestuft.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Dieser Abschnitt dient zur Klärung der Frage, ob die bislang nicht als SNP beschriebenen heterozygoten Sequenzabweichungen der Patienten 2, 4 und 5 eine klinische Relevanz bezüglich der Entwicklung einer ANSD besitzen. Die folgenden Stammbaumanalysen beinhalten die audiologischen und molekulargenetischen Untersuchungsergebnisse der Patienten und ihrer leiblichen Familienmitglieder.

#### 3.3.1 Patienten 1 und 10

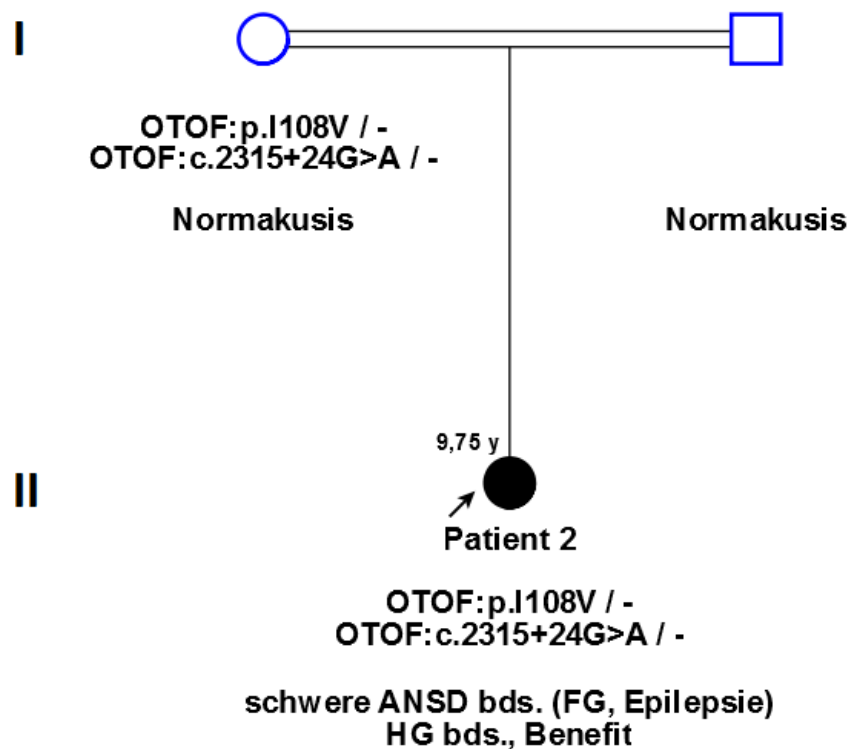
Die heterozygoten Abweichungen GJB2:p.I203T beim Patienten 1 und OTOF:p.R1214H beim Patienten 10 wurden nicht mittels Stammbaumanalyse weitergehend kontrolliert, da ein ANSD-verursachender Charakter im vorhergehenden Abschnitt ausgeschlossen werden konnte (► 3.2.2.4 Analyse unbekannter Sequenzabweichungen, S. 77).

#### 3.3.2 Patient 2

Aus der Stammbaumanalyse (► Abbildung 3-1, S. 81) ging einerseits hervor, dass die konsanguinen Eltern hörgesund waren, dass bei dem Patient (9,75 Jahre) zusätzlich zur beidseitig schweren ANSD eine Epilepsie vorlag und als Risikofaktor eine Frühgeburtlichkeit bekannt war. Der Patient profitierte von der beidseitigen konventionellen Hörgeräteversorgung.

Andererseits war Patient 2 heterozygot für die *OTOF*-Sequenzabweichungen p.I108V und c.2315+24G>A, die beide von der Mutter vererbt wurden. Die Mutter besaß bei identischer Abweichungskonstellation ein klinisch normales Gehör.

**Die *OTOF*-Punktmutationen p.I108V und c.2315+24G>A waren nicht Ursache der ANSD des Patienten 2.**



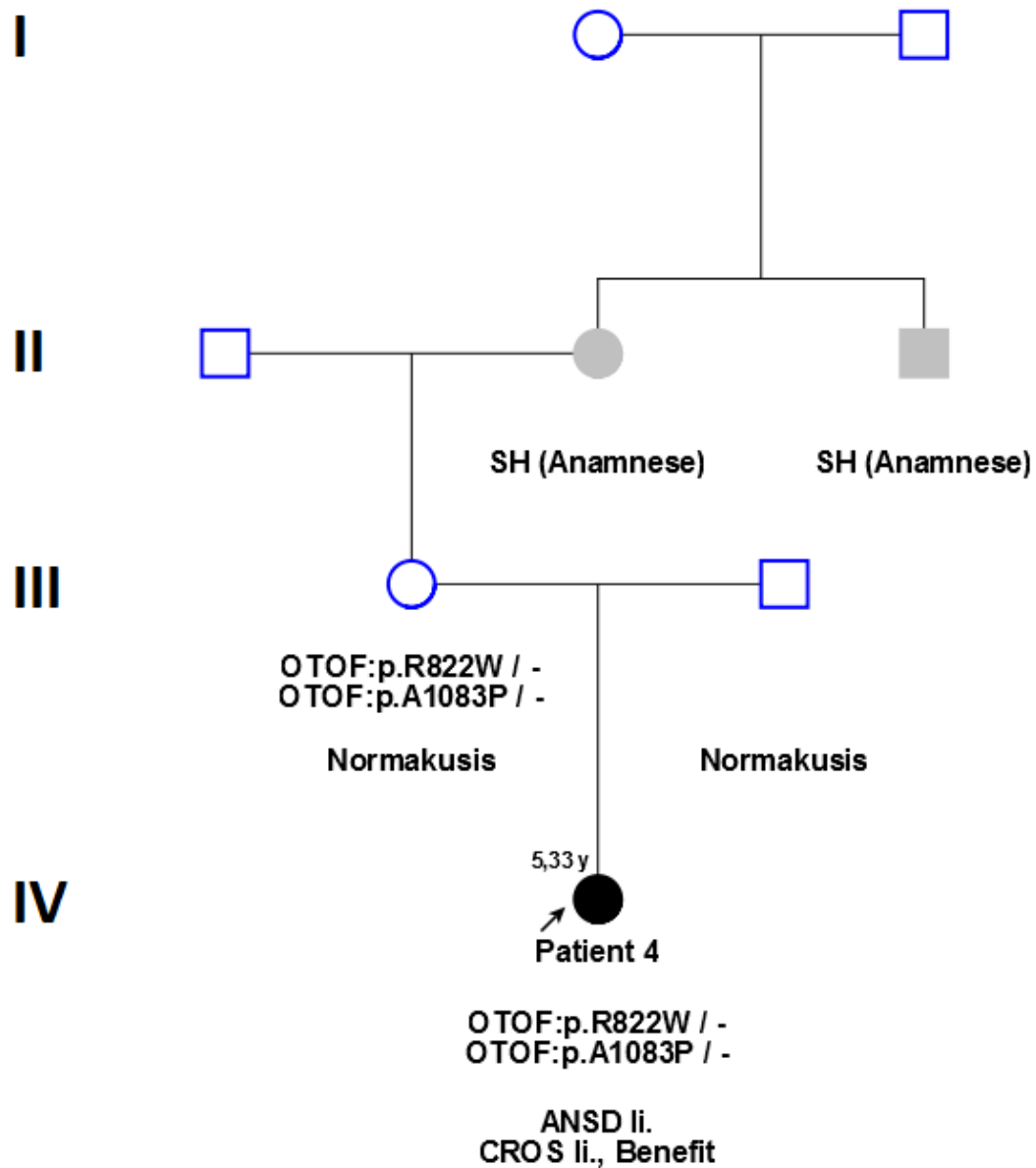
**Abbildung 3-1** Stammbaumanalyse des Patienten 2. Stammbaumbeschriftung nach Bennett [6, 7], modifiziert: heterozygoter Trägerstatus durch „Abweichung / minus“ gekennzeichnet; homozygoter Trägerstatus durch „Abweichung / selbe Abweichung“ dargestellt. Mutationsnomenklatur nach den Empfehlungen der „Human Genome Variation Society“ (<http://www.hgvs.org/>, [43]). Darstellung: HaploPainter v1.043 [182]. FG = Frühgeburt; y = Alter (years) bei Vorstellung (in Jahren).

### 3.3.3 Patient 4

Die Stammbaumanalyse (► Abbildung 3-2, S. 82) zeigte, dass beide Eltern des Patienten klinisch hörgesund waren und dass anamnestisch eine Schwerhörigkeit unklarer Genese bei der Großmutter und dem Großonkel mütterlicherseits bestand. Der Patient (5,33 Jahre) wurde aufgrund einer linksseitigen ANSD mit einem CROS-System therapiert, von dem er profitierte.

Mutter und Tochter waren heterozygot für die *OTOF*-Sequenzabweichungen p.R822W und p.A1083P, wobei die Mutter keine Hörstörungen aufwies.

**Die *OTOF*-Punktmutationen p.R822W und p.A1083P waren nicht Ursache der ANSD des Patienten 4.**



**Abbildung 3-2** Stammbaumanalyse des Patienten 4. Stammbaumbeschriftung nach Bennett [6, 7], modifiziert: heterozygoter Trägerstatus durch „Abweichung / minus“ gekennzeichnet; homozygoter Trägerstatus durch „Abweichung / selbe Abweichung“ dargestellt. Mutationsnomenklatur nach den Empfehlungen der „Human Genome Variation Society“ (<http://www.hgvs.org/>, [43]). Darstellung: HaploPainter v1.043 [182]. CROS = HG mit kontralateraler Signalübermittlung (contralateral routing of signals); SH = Schwerhörigkeit; y = Alter (years) bei Vorstellung (in Jahren).

### 3.3.4 Patient 5

Die Stammbaumanalyse zeigte, dass die Eltern der Patienten 5, 6 und 7 ein klinisch normales Gehör besaßen, wobei der Vater einer weitergehenden audiologischen ANSD-Diagnostik widersprach (► Abbildung 3-3, S. 84).

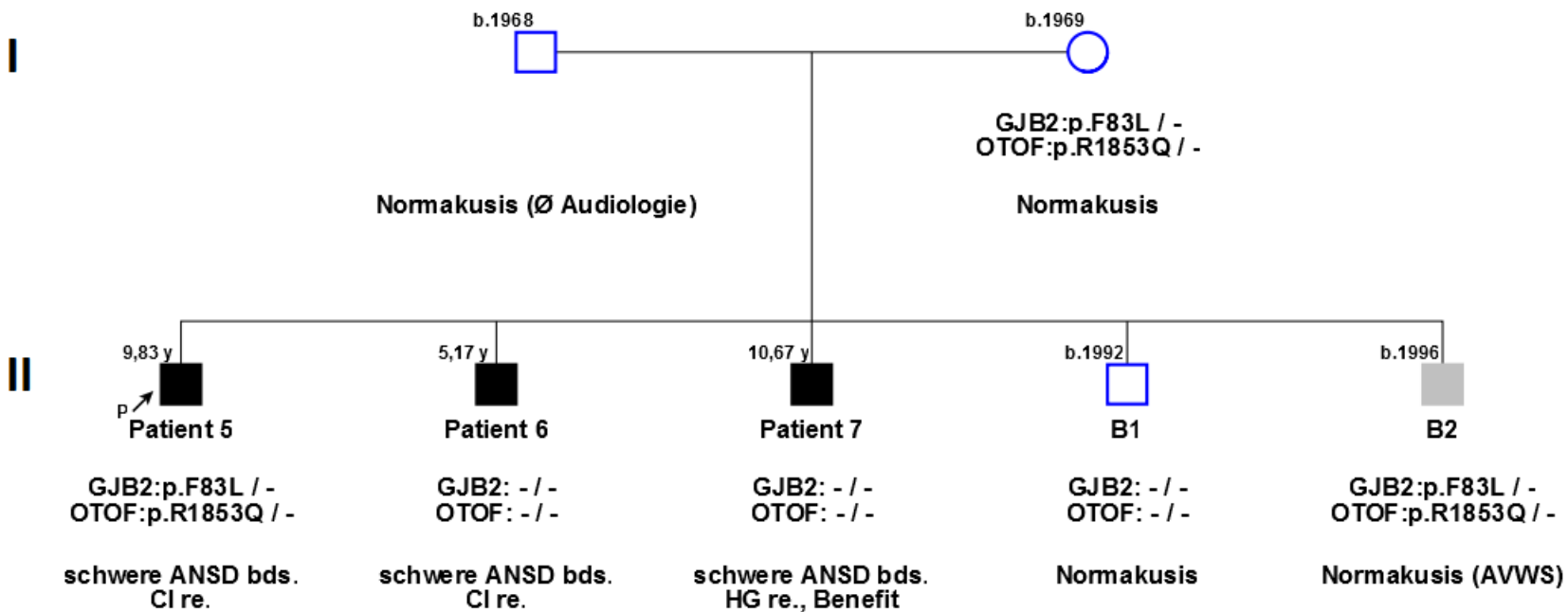
Bei insgesamt drei der fünf Geschwister lag eine schwere beidseitige ANSD vor.

Patient 5 (9,83 Jahre) und Patient 6 (5,17 Jahre) wurden rechtsseitig mit einem CI versorgt. Patient 7 (10,67 Jahre) wurde einseitig (rechts) mit einem konventionellen HG versorgt, von dem er profitiert.

Die audiologische Untersuchung der beiden anderen Brüder bestätigte eine Normakusis. Beim Jüngeren von beiden (B2, Geburtsjahr 1996) waren eine AVWS und verschiedene Teilleistungsstörungen bekannt.

Die Sequenzabweichungen GJB2:p.F83L und OTOF:p.R1853Q wurden von der heterozygoten Mutter an zwei Söhne weitervererbt (Patient 5 und B2). Das Gehör der Mutter und des Bruders B2 war nicht beeinträchtigt. Die anderen zwei Brüder, die an einer ANSD erkrankten (Patienten 6 und 7), besaßen keine dieser Abweichungen.





**Abbildung 3-3** Stammbaumanalyse der Patienten 5, 6 und 7. Stammbaumbeschriftung nach Bennett [6, 7], modifiziert: heterozygoter Trägerstatus durch „Abweichung / minus“ gekennzeichnet; homozygoter Trägerstatus durch „Abweichung / selbe Abweichung“ dargestellt und homozygoter Wildtyp (Fehlen einer Abweichung) durch „minus / minus“ symbolisiert. Mutationsnomenklatur nach den Empfehlungen der „Human Genome Variation Society“ (<http://www.hgvs.org/>, [43]). Darstellung: HaploPainter v1.043 [182]. AVWS = Auditive Verarbeitungs- und Wahrnehmungsstörung; b = Geburtsjahr (year of birth); B1 und B2 = Brüder der Studienpatienten; CI = Cochlea-Implantat; CROS = HG mit kontralateraler Signalübermittlung (contralateral routing of signals); y = Alter (years) bei Vorstellung (in Jahren).

Um eine Compound-Heterozygotie bei der Klärung der Relevanz dieser Abweichungen für die Entwicklung einer ANSD nicht zu übersehen, wurden sämtliche Sequenzabweichungen dieser Familie nochmals zusammengefasst (► Tabelle 3-10, S. 85).

Werden die vier stillen Mutationen aus der Betrachtung ausgeschlossen, so bleiben insgesamt drei Aminosäure-substituierende Sequenzabweichungen übrig – GJB2:p.F83L, OTOF:p.C1251G und OTOF:p.R1853Q.

Exon-Nr.	Substitutionsebene		ANSD-Pat.			Normakusis			
	DNA <sup>1</sup>	Protein <sup>1</sup>	5	6	7	B1	B2	Mutter	Vater
1	<b>GJB2:c.249C&gt;G</b>	p.F83L	het				het	het	
2	<b>GJB3:c.798C&gt;T</b>	p.=	het		het	het	het	het	
5	<b>OTOF:c.372A&gt;G</b>	p.=	het	hom	hom	hom	het	het	het
22	<b>OTOF:c.2580C&gt;G</b>	p.=	hom	hom	hom	hom	hom	hom	hom
23	<b>OTOF:c.2736G&gt;C</b>	p.=	het	hom	hom	hom	het	het	hom
30	<b>OTOF:c.3751T&gt;G</b>	p.C1251G	het	het	het	het	het		het
44	<b>OTOF:c.5558G&gt;A</b>	p.R1853Q	het				het	het	

**Tabelle 3-10** Sequenzabweichungen in der Familie der Patienten 5, 6 und 7.  
<sup>1</sup>Mutationsnomenklatur nach den Empfehlungen der „Human Genome Variation Society“ (<http://www.hgvs.org/>, [43]). B1 und B2 = Brüder der Studienpatienten; het = heterozygote Trägerschaft; hom = homozygote Trägerschaft.

Die Abweichung **OTOF:p.C1251G** war in der dbSNP mit der Referenznummer rs41288773 als SNP vermerkt. Bis auf die Mutter waren alle Familienmitglieder heterozygot für diesen Basenaustausch. Vier der Familienmitglieder (Vater, B1, Patient 6 und 7) hatten, zusätzlich zu dieser Abweichung, keine weiteren Punktmutationen der Kandidatengene, die für eine andere Aminosäure codierten. Zwei der heterozygoten Familienmitglieder – isoliert mit dieser Abweichung (Vater und Sohn B1) – besaßen ein unauffälliges Gehör. Die beiden anderen Kinder (Patienten 6 und 7) waren an einer ANSD erkrankt.

Das älteste (Patient 5) und das jüngste Kind (B2) hatten zusätzlich zur Abweichung OTOF:p.C1251G zwei in der Stammbaumanalyse beschriebene Punktmutationen – **GJB2:p.F83L** und **OTOF:p.R1853Q**. Der Bruder B2 war jedoch nicht an einer ANSD erkrankt und zeigte eine Normakusis. Bei ihm bestand jedoch, wie in der Stammbaumanalyse schon erwähnt, eine AVWS mit weiteren Defiziten.

Sowohl das isolierte Vorkommen des Basenaustausches OTOF:p.C1251G, als auch die Kombination mit den anderen zwei substituierenden Punktmutationen (GJB2:p.F83L und OTOF:p.R1853Q) konnte als Ursache einer ANSD bei den Patienten 5, 6 und 7 ausgeschlossen werden.

**Keine der gefundenen Sequenzabweichungen bedingte das Vorkommen einer ANSD bei den Patienten 5, 6 und 7.**

## 4 Diskussion

### 4.1 Ergebnisanalyse

#### 4.1.1 Übersicht

Von den 27 gefundenen Punktmutationen der Kandidatengene *GJB2*, *GJB3* und *OTOF* waren 14 bekannt und als SNP registriert (► Tabelle 3-8, S. 75). Die restlichen 13 Abweichungen waren neu und konnten im Rahmen dieser Untersuchung als SNPs identifiziert werden (► 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse, S. 80).

Somit sind alle gefundenen Punktmutationen als genetische Ursache für die Entwicklung einer ANSD bei den 13 Patienten ausgeschlossen. Im Kandidatengen *GJB6* lagen keine Abweichungen vor.

#### 4.1.2 Die Patienten

Vier der Patienten hatten nicht-familiäre Risikofaktoren für die Entwicklung einer ANSD in ihrer Vorgeschichte. Drei dieser ANSD-Patienten (**Nr. 1, 3 und 12**) sind monaural, der vierte (**Patient 2**) binaural erkrankt. Die einseitig vorkommende ANSD spricht in Kombination mit den individuellen Risikofaktoren der Patienten und den negativen molekulargenetischen Untersuchungsergebnissen eher für eine erworbene Form der ANSD [23].

Vor dem Hintergrund einer leeren oder unbekanntenen Anamnese bezüglich der Risikofaktoren, negativen molekulargenetischen Untersuchungsergebnissen und monaural bestehender ANSD scheint eine hereditäre Form der ANSD bei den **Patienten 8, 9, 10 und 13** eher unwahrscheinlich. Auch **Patient 11** hat keine Risikofaktoren in der Vorgeschichte und negative genetische Testergebnisse, jedoch wurde zusätzlich zur beidseitig vorliegenden ANSD eine partielle Balkenfehlanlage diagnostiziert, welche ein Hinweis für eine erworbene oder syndromale Form der ANSD bei einer übergeordneten Erkrankung sein könnte (► 1.2.2 Ätiologie, S. 11).

Zur Festigung der Annahme einer erworbenen ANSD könnte – zusätzlich zur kranialen Bildgebung (cMRT) – eine weitergehende neurologische Untersuchung des **Patienten 2**,

hinsichtlich der vorliegenden Epilepsieform und des Entstehungsortes, beitragen. Bei einer Diagnosekonstellation, von therapierefraktärer Temporallappenepilepsie mit bestehender Ammonshornklerose (AHS) und der bekannten Frühgeburtlichkeit, wäre eine perinatale Hypoxie [196] in Kombination mit einem initial unreifen ZNS in der Vorgeschichte vorstellbar. Neuronale Unreife und Hypoxie könnten zu einer Manifestation der genannten Epilepsie, einer unvollständigen Nachreifung der Hörbahn und einer bleibende hypoxischen Schädigung der IZH geführt haben [163]. Auch bei vollständiger Nachreifung der Hörbahn wäre eine fehlende Sprachdiskrimination noch plausibel, da die Synchronität der SGN auch von der intakten vesikulär-exocytotischen Funktion der IZH abhängt [75], die bei einem hypoxischen Ereignis eine irreparable Schädigung erfahren haben könnte. Bei diesem Patienten wurde keine Untersuchung zur Feststellung vorliegender Synchronitätsstörungen der SGN durchgeführt. Diese Methode sollte dazu dienen, ANSD-Patienten mit erloschenen OAE identifizieren zu können [64, 153], und nicht um die Diagnose einer erworbenen ANSD durch hypoxischen IZH-Schaden zu bekräftigen. Dennoch sollte die Messung der SGN-Synchronität – mit modifizierter Fragestellung und in Kombination mit einer cMRT – zur Identifikation eines primär isolierten IZH-Defektes weitergehend untersucht werden, um zusätzliche Erkenntnisse über die nicht-invasive Lokalisierbarkeit des Schädigungsortes der ANSD zu gewinnen.

Bei **Patient 4** war ein familiäres Risiko in Form von Schwerhörigkeit in der Großelterngeneration (mütterlicherseits) bekannt. Die ANSD des Patienten lag einseitig vor und die molekulargenetische Untersuchung verlief negativ. In Kombination der im Rahmen dieser Untersuchung gewonnenen Ergebnisse und der Annahme einer altersbedingten Schwerhörigkeit der Großeltern (Presbyakusis) erscheint eine erworbene Form der ANSD als wahrscheinlich.

Die Mutationsanalyse der Kandidatengene *OTOF*, *GJB2*, *GJB3* und *GJB6* erbrachte bei den **Patienten 5,6** und **7** keinen pathologischen Befund. Die neu identifizierten Sequenzvarianten sind entsprechend der oben gemachten Ausführungen als nicht pathogene SNP einzustufen. Der Umstand, dass die Eltern der drei betroffenen Brüder hörgesund sind, legt weiterhin einen rezessiven – alternativ einen X-chromosomalen oder mitochondrialen – Vererbungsmodus nahe. Ein autosomal-rezessiver Erbgang ist in Anbetracht einer Vielzahl weiterer Kandidatengene („Hereditary Hearing Loss Homepage“, <http://hereditaryhearingloss.org>) nicht unwahrscheinlich.

Im Falle eines mitochondrialen Erbgangs wäre die Normakusis der Mutter dadurch erklärbar, dass ihre Zellen eine Mischung von mutierter und nicht mutierter mitochondrialer DNA (mtDNA) im Zytoplasma aufweisen (Heteroplasmie), wobei die zelluläre Konzentration des mutierten Allels unterhalb der pathogenen Schwelle liegt (threshold expression) und somit keine Zellfunktionsstörungen und damit einhergehende Krankheiten auftreten [30, 110, 164]. Durch das sogenannte „bottleneck phenomenon“ zur Embryonalzeit wird die Zahl der Mitochondrien in den Keimzellen (Primordialzellen) reduziert [79, 151]. Dadurch unterscheiden sich in Folge die Keimzellen von der übrigen mütterlichen mtDNA-Verteilung (somatisches Mosaik) und letztlich auch die Nachkommen.

Wenn die mtDNA-Dosis der Patienten 5, 6 und 7 in diesem Fall durch eine Umverteilung der heteroplasmatischen Allele – zugunsten des pathogenen Alleles – eine Überschreitung der threshold expression zur Folge hatte, wäre eine ANSD denkbar. Auch die Näherung an die pathogene Allelkonzentration wäre in Nervenzellen kritisch einzustufen, da schon bei einer temporär hypoxischen Situation (Trigger-Effekt) der Zellen – bedingt zum Beispiel durch den Geburtsvorgang oder einen erhöhten Sauerstoff-Verbrauch bei Infekten – die Funktion der übrigen intakten Mitochondrien nicht ausreichte. Mitochondriale Apoptosemechanismen könnten durch einen solchen Trigger-Effekt einen Zelluntergang sogar zusätzlich forcieren [82].

Aufgrund des somatischen Mosaiks würden sich die Söhne dieser Familie in ihrem mtDNA-Verteilungsmuster auch untereinander unterscheiden. Denkbar wäre in diesem Fall, dass der Bruder B2 ein anderes somatisches Mosaik aufweist und durch einen Trigger-Effekt in der Vergangenheit an einem anderen neuronalen Ort affiziert wurde, so dass zwar keine ANSD, jedoch andere (Teilleistungs-) Störungen hervorgerufen wurden.

Trotz der Tatsache, dass Mitochondriopathien häufig mit syndromalen Krankheitsbildern in Zusammenhang gebracht werden [29], sind mtDNA-Mutationen als Ursache einer isolierten ANSD nicht ausgeschlossen („Hereditary Hearing Loss Homepage“, <http://hereditaryhearingloss.org>), sodass diese – wenn vorausgehende Untersuchungen frustan verlaufen – als Kandidatengene berücksichtigt werden müssen (► 4.2.1 Weitere Kandidatengene, S. 92).

Ein zukünftiger Benefit der Patienten von ihrer CI-Versorgung spräche nicht gegen die mitochondriale „Hypoxie-Theorie“, da die reduzierte Zahl der SGN-Zellen in diesem Fall eine höhere Reizstärke zur Synchronisation benötigten, die eventuell die vesikulär-synaptische Transduktionskapazität der IHZ auf Dauer überschreitet und durch das CI besser kompensiert wird [144].

### 4.1.3 Fehleranalyse

Um Fehler in der molekulargenetischen Untersuchung zu minimieren, wurden folgende Maßnahmen unternommen:

1. Das „Übersehen“ eines Basenaustausches wurde durch das PCR-Verfahren selbst minimiert, da die sense und anti-sense Oligonukleotidprimer-Produkte jede Basenposition innerhalb der flankierten Region doppelt abdeckten. Lange Exone wurden zur Sicherheit mit überlappenden Primerpaaren amplifiziert, so dass sogar eine abschnittsweise vierfache Abdeckung bei Überlappung entstand. Dennoch besteht die geringe Wahrscheinlichkeit, dass durch fehlendes „proof reading“, der Taq-Polymerase in den ersten Zyklen der Amplifikation eine falsche Base eingebaut wurde, die sich in den nächsten Zyklen der Amplifikation exponentiell „etablierte“ (► 2.3.1.1 Begriffsdefinition und Überblick, S. 27).

2. Um eine Fehlinterpretation der gefundenen Sequenzabweichungen – sowohl durch versehentliche Verunreinigung und Verwechslung der Proben, als auch im Sinne eines Amplifikationsfehlers der verwendeten Polymerase (siehe Punkt 1) – zu vermeiden, wurden alle gefundenen Basenabweichungen mit konsekutiver Aminosäuresubstitution wiederholt untersucht. Dazu wurde erstens eine neue DNA-Probe aus dem Speichelasservat entnommen und bis zur Sequenzanalyse bearbeitet und anschließend ausgewertet. Zweitens wurden diese Schritte durch eine andere Person (Labormitarbeiter) durchgeführt.

3. Bei sicherer Beherrschung der molekulargenetischen Labortechniken erfolgte die Bearbeitung der Proben in großer Stückzahl von nur einer Person, um eine gleichbleibende hohe Qualität zu gewährleisten und die interindividuelle Fehlerrate zu minimieren.

Dennoch ist es möglich, dass relevante Positionen innerhalb der Kandidatengene unentdeckt blieben, da tief-intronische Bereiche mit möglicher „Splice-Site“-Funktion und nachfolgender alternativer Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) / Proteinendprodukt [18], nicht kontrolliert wurden. Auch erfolgte keine vollständige Kontrolle der genflankierenden stromauf- und abwärts gelegenen untranslatierten Regionen (UTR), so dass sich z. B. Sequenzabweichungen in translationsinitiierenden- (5'-UTR) oder polyadenylisierenden Abschnitten (3'-UTR) befinden könnten [106, 125].

Neben den unternommenen Maßnahmen zur Qualitätssicherung der molekulargenetischen Untersuchung sind weitere Punkte zu berücksichtigen:

1. Denkbar wäre eine fehlerhafte audiologische Messung / Rekrutierung, so dass in der untersuchten Patientengruppe zwar eine SH, aber nicht im Sinne einer ANSD vorlag.
2. Darüber hinaus können ANSD-verursachende Mutationen innerhalb anderer Gene nicht beurteilt werden, da die molekulargenetische Untersuchung nur für die Kandidatengene *GJB2*, *GJB3*, *GJB6* und *OTOF* erfolgte. Hierzu müsste die Untersuchung auf weitere Chromosomenbereiche ausgedehnt werden.
3. Auch indirekte Mechanismen, die eine posttranslationale Modifikation und / oder den Transport eines Proteinendprodukts regulieren, könnten Ursache einer ANSD sein.
4. Weiterhin ist es denkbar, dass eine Kumulation neutraler Mutationen innerhalb eines Genes, die Vulnerabilität des Organismus gegenüber Umwelteinflüssen (Trigger Faktoren) steigert.



## 4.2 Fazit

### 4.2.1 Weitere Kandidatengene

Da aufgrund der Ergebnis- und Fehleranalyse eine genetische Ursache der ANSD nicht ausgeschlossen werden kann, und insbesondere die familiäre Untersuchung der Patienten 5, 6, und 7 eine hereditäre Ursache sogar als wahrscheinlich erahnen lässt, sollte die molekulargenetische Untersuchung dieser Patienten auf weitere Gene ausgedehnt werden.

Unter Berücksichtigung, dass in der Elterngeneration der Patienten keine HS festgestellt wurde, sollten folgende ANSD-verursachende Kandidatengene untersucht werden:

- nukleäre *PJVK*
- nukleärer Locus Xq23 – 27.3 (*AUNX1*)
- nukleäre *GJB1*, *MPZ* und *PMP22*
- mitochondriale *RNR1*, *CO2* und *ND6*

Die Arbeitsgruppe Delmaghani identifizierte im Jahre 2006 zwei Mutationen im ***PJVK*** (***PJVK:c.547C>T***, **p.R183W** und ***PJVK:c.161C>T***, **p.T54I**) mit autosomal rezessivem Vererbungsmuster (DFNB59) als Ursache einer ANSD [41]. *PJVK* codiert für das neuidentifizierte Protein Pejvakin, das mithilfe von Immunhistofluoreszenzfarbstoffen im Soma afferenter Neurone des Spiralganglions lokalisiert wurde. Mithilfe eines *PJVK:c.547C>T* Knock-In Mausmodells, konnte die audiologische Klinik der Studienfamilie, im Sinne einer ANSD reproduziert werden.

Ein Jahr später konnte die Arbeitsgruppe Schwander im Mausmodell zeigen [155], dass Pejvakin sowohl neuronal als auch in Haarzellen exprimiert wird. Es konnte keine detaillierte Funktion des Proteins erkannt werden, jedoch scheint die Aufrechterhaltung cochleärer Haarzell- und SGN-Funktionen von diesem Protein abzuhängen – wohingegen *PJVK* keine Rolle in der Entwicklung dieser Zellen spielen soll.

Die Mutationen p.R183W und p.T54I sind somit weitere Kandidatengene für die Entwicklung einer ANSD und sollten daher – nach Ausschluss relevanter Sequenzabweichungen in den vier Kandidatengenen – molekulargenetisch kontrolliert werden.

Die Arbeitsgruppe Wang beschrieb in den Jahren 2003 und 2006 einen X-chromosomalen rezessiven Erbgang für die ANSD [191, 193]. Der hiermit assoziierte **Locus Xq23 – 27.3 (AUNX1)** führte bei den Patienten im Durchschnittsalter von 13 Jahren initial zum Krankheitsbild der ANSD. Später erkrankten die Patienten zusätzlich an einer peripheren Neuropathie (PNP).

Petersen et al. wiesen im Jahre 2008 darauf hin [122], dass die verursachte ANSD nicht isoliert bei den Studienpatienten vorlag und der Grund hierfür in der Überlappung des damit assoziierten Locus Xq23 – 27.3 mit zwei putativen Loci (CMT4X und CMT5X) für das X-chromosomal vererbte (CMTX) Krankheitsbild [201] der hereditären motorischen und sensiblen Neuropathie (HMSN\*) zu finden sein könnte. Die „Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database“ (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Home/IPN.cfm>, Stand: 12/07) zeigt, dass insgesamt fünf Loci für die CMTX bekannt sind, wovon zwei ursächliche rezessive Gene (*GJB1* / CMT1X und *PRPS1* / CMT5X) bisher beschrieben wurden.

Ähnliches berichteten Takashima et al. im Jahre 2003 [177] über Patienten mit unterschiedlichen Mutationen des **GJB1** – ein Patient zeigte zwei Jahre vor dem Beginn der PNP eine Hörminderung, bei einem Weiteren folgte die Hörminderung der PNP in einem zeitlichen Abstand von 25 Jahren. Die Punktmutationen GJB1:p.V138A und GJB1:p.R142Q wurden 1999 und 2004 als Ursache einer HMSN-begleitenden Hörstörung im Sinne einer ANSD beschrieben [69, 176].

Ohnehin wurde die genetisch und phänotypisch heterogene Gruppe der HMSN häufig mit einer zusätzlich bestehenden Innenohrschwerhörigkeit beschrieben.

Als einer der wenigen Arbeitsgruppen konnten Starr et al. 2004 mithilfe detaillierter audiologischer und histologischer Untersuchung zeigen, dass die zusätzliche Hörstörung im Sinne einer ANSD – bei vorwiegend axonaler PNP – mit dem Zellverlust im Spiralganglion zusammenhing [169]. Die ursächliche Punktmutation (p.Y145S) wurde im **MPZ** (Myelinprotein

---

\* Synonym: Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung, CMT

Zero) lokalisiert. Inzwischen konnten mehrere ANSD-assoziierte Mutationen im MPZ identifiziert werden (p.T24M, p.D75V, p.E97V [26, 37, 109, 152, 157]).

Auch bei weiteren HMSN-ursächlichen Genen – wie zum Beispiel dem **PMP22** (peripheres Myelin-Protein) – wurde von einer zusätzlich bestehenden Hörstörung berichtet [65, 80, 148] – die Arbeitsgruppe Sambuughin konnte im Jahre 2003 eine Deletion (p.A115\_T118del) als Ursache für die begleitende ANSD identifizieren.

Die Diagnose einer ANSD konnte jedoch häufig nicht gestellt werden, da die hierfür benötigten OAE-Messungen selten durchgeführt wurden, so dass die Prävalenz der ANSD bei einer HMSN mit zusätzlicher Hörstörung unklar bleibt.

Der Locus Xq23 – 27.3 und die HMSN assoziierten Gene *PMP22*, *MPZ* und *GJB1* sind somit weitere Kandidatengene für die Entwicklung einer ANSD und sollten – nach Ausschluss relevanter Mutationen der vier primären Kandidatengene und des *PJK* oder bei Verdacht auf eine PNP – in die molekulargenetische Kontrolle eingeschlossen werden.

Für die Identifikation einer ursächlichen Mutation der ANSD bei den Patienten dieser Arbeit sind primär der Locus Xq23 – 27.3 und *GJB1* relevant, da die Eltern nicht an einer PNP erkrankt sind und keine Hörstörungen aufweisen.

Die zwei Arbeitsgruppen Tessa und Wang berichteten in den Jahren 2001 und 2005 über Patienten mit **mitochondrialen Mutationen**, die an einer isolierten Hörstörung im Sinne einer ANSD erkrankt waren [181, 192]. Als Ursache wurden die homoplasmatischen Mutationen m.1095T>C, m.8108A>G und m.14340C>T (<http://mitomap.org/MITOMAP>) erkannt.

Die genannten drei mitochondrialen Mutationen sind somit weitere Kandidatengene und sollten nach Ausschluss einer pathogenen Mutation in den vier primären Kandidatengenen zusätzlich kontrolliert werden.

#### 4.2.2 gDNA aus Speichelproben

Die gDNA-Extraktion aus Speichelproben hat sich im Rahmen dieser Arbeit als vorteilhaft erwiesen. Die nach dem „Oragene DNA Self-Collection Kit“-Verfahren (DNA Genotek Inc., Kanata, Ontario, Kanada) isolierte gDNA konnte ohne weitere Einschränkungen für molekulargenetische Untersuchungsmethoden verwendet werden. Dies entspricht somit der Verwendbarkeit von gDNA aus EDTA-Vollblutproben.

Die Vorteile dieser Methode im Vergleich zur gDNA aus EDTA-Vollblutproben begründen sich in folgenden Punkten:

1. Compliance
2. Invasivität  
Risiken
3. Ökonomie

Die Risiken und Nebenwirkungen einer invasiven Blutprobenentnahme reichen von subkutanen Blutungen, Infektionen und Thrombosegefahr bis zu Parästhesien. Von diesen vermeidbaren Risiken abgesehen, kann durch dieses nicht-invasive Verfahren eine negative Beeinflussung der Compliance zwischen den zumeist jungen Patienten und dem Medizinpersonal verringert werden.

Dieses Vorgehen diene nicht nur zum Schutz des Patienten, sondern wäre zusätzlich eine Vorausleistung für die noch folgenden Kontrollen in der jeweiligen Klinik – da eine gute Kooperation des Patienten unter anderem auch unnötigen Zeitverlust minimiert.

Die einfache Probenentnahme ohne zusätzliche Materialien, der Transport und die Lagerung bei Raumtemperatur sind nur einige weitere ökonomische Vorteile dieses Verfahrens. Zudem kann die Probenentnahme jederzeit vom Patienten selbst durchgeführt werden, wovon jedoch abzuraten ist. Die Probennahme sollte unter Aufsicht geschehen, da eine „Fremdkontamination“ (Husten, Niesen, falsche Anwendung) und Verwechslungen der Etikettierung (bei mehreren Entnahmen innerhalb einer Familie) ausgeschlossen werden müssen. Dies könnte zum Beispiel unter der Aufsicht und Anleitung von geschultem nicht-ärztlichem Personal durchgeführt werden.

In Kombination mit der uneingeschränkten molekulargenetischen Verwendbarkeit von gDNA aus Speichelasservaten und den weiteren genannten Vorteilen dieser Methode, ist dieses Verfahren im klinischen Alltag – insbesondere bei jungen Patienten – gegenüber der üblichen invasiven EDTA-Vollblutentnahme zu bevorzugen.

### 4.3 Empfehlung – ANSD-Screening

Durch die Erweiterung der molekulargenetischen Untersuchung um weitere Kandidatengene (► 4.2.1 Weitere Kandidatengene, S. 92) folgen Empfehlungen zum Procedere einer ANSD-Diagnostik für zwei Patientenkollektive:

1. primär audiologische Patienten
2. primär neurologische Patienten

#### 4.3.1 Primär audiologische Patienten

Um eine bestehende ANSD eines SNHI-Patienten – unabhängig vom Alter – nicht zu übersehen, sollte die audiologische Routinediagnostik die Messung der OAE und BERA standardmäßig beinhalten. Die modifizierte BERA dient hierbei zur Identifikation einer bestehenden ANSD bei erloschenen / fehlenden OAE. Eventuell können durch Messungen auf Synchronisationsstörungen der SGN erste nicht-invasive Hinweise auf den Schädigungsort gewonnen werden – dieses Verfahren sollte weiter auf die Aussagefähigkeit eines primären IHZ-Defektes an einem größeren Patientenkollektiv evaluiert werden.

Zusätzliche Informationen sind durch eine kraniale Bildgebung (cMRT) zu klären, um Fehlbildungen und andere Erkrankungen auszuschließen. Zur üblichen audiologischen Anamnese sollte gezielt nach dem Vorkommen von Symptomen einer PNP gefragt werden – Hilfestellungen können hier Fragebögen sein (► Abbildung 4-1, S. 98).

Das molekulargenetische Screening erfolgt primär auf Mutationen der Gene *GJB2*, *GJB3*, *GJB6* und *OTOF*, die einerseits kombiniert (*GJB2*, *GJB3*, *GJB6*) oder monogen (*OTOF*) für die beiden

häufigsten autosomal-rezessiv bedingten Hörstörungen verantwortlich gemacht werden (DFNB1, DFNB9), und andererseits mit dem Krankheitsbild einer ANSD assoziiert sind.

Zusätzlich sollten auch Mutationen im relativ neuentdeckten *PJVK* erfasst werden, da diese mit der autosomal-rezessive Form der ANSD assoziiert wurde. Die Funktion des Proteinendproduktes Pejvakin konnte bisher nicht geklärt werden, jedoch scheint es eine Rolle in der Funktionserhaltung der cochleären Haarzellen und der SGN zu besitzen.

Wenn die molekulargenetischen Kontrollen der fünf Kandidatengene keine relevanten Mutationen zeigen und eine syndromale Form der ANSD beim Patienten mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden kann, sollte – bei passender Stammbaumanalyse / Vererbungsmuster – eine Kontrolle auf die drei bekannten Mutationen in den mitochondrialen Genen *RNR1*, *CO2* und *ND6* erfolgen.

Sowohl Patienten mit syndromaler ANSD, als auch Patienten mit erfolgloser Testung auf die genannten Mutationen bei vermeintlich isolierter ANSD, sollten einer Kontrolle auf pathogene Sequenzabweichungen im Locus Xq23 – 27.3 (*AUNX1*) und der molekulargenetischen Routinediagnostik (*GJB1*, *MPZ*, *PMP22*) unterzogen werden.

Die Identifikation einer relevanten Mutation im Bereich dieser Gene dient bei Patienten mit bisher isolierter ANSD nicht nur zur Klärung der Ätiologie, sondern besitzt auch prognostischen Wert – bezüglich der individuellen Prädisposition für eine PNP.

Sowohl Patienten die an einer ANSD mit begleitender PNP erkrankt sind, als auch Patienten mit nicht-syndromaler Form und positiver Testung in der molekulargenetischen Routinediagnostik, sollten zwecks weitergehenden Untersuchungen und zusätzlicher Beratung, in der Neurologie vorstellig werden.



Westfälische  
Wilhelms-Universität  
Münster

Klinik und Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie



**Patientenfragebogen periphere Neuropathie (Kinder)**

Name:

Vorname:

Geschlecht:

Geburtsdatum:

Fragebogen ausgefüllt am:

1	In welchem Alter hat Ihr Kind Laufen gelernt?	_____ Monate		
2	Hat Ihr Kind Probleme beim Schul- oder Freizeitsport?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
3	Wenn ja, welche?			
4	Kann sich Ihr Kind ohne Probleme auf die Fersen stellen?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
5	Kann sich Ihr Kind ohne Probleme auf die Zehenspitzen stellen?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
6	Kann Ihr Kind normal laufen?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
7	Hat Ihr Kind Probleme beim Treppensteigen?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
8	Kann Ihr Kind aus der Hocke aufstehen?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
9	Stolpert oder stürzt Ihr Kind häufig?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
10	Hat Ihr Kind Hohlfüße und/oder Krallenzehen?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
11	Sind die Beine Ihres Kindes (insbesondere die Unterschenkel) in letzter Zeit schwächer geworden?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
12	Sind die Hände und/oder Finger Ihres Kindes in letzter Zeit schwächer geworden?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
13	Hat Ihr Kind Probleme beim Zuknöpfen eines Hemdes oder einer Hose?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
14	Hat Ihr Kind Probleme beim Betätigen eines Reißverschlusses?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
15	Beklagt Ihr Kind ein taubes Gefühl an den Füßen/Unterschenkeln?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
16	Beklagt Ihr Kind ein taubes Gefühl an den Fingern/Händen?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
17	Leidet Ihr Kind unter Missempfindungen (Kribbeln, Brennen, Schmerzen) an den Füßen/Unterschenkeln?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
18	Leiden Sie unter solchen Missempfindungen auch an den Fingern/Händen?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
19	Verschluckt sich Ihr Kind häufig?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	
20	Hat oder hatte Ihr Kind Angehörige (Eltern, Geschwister, Kinder, Verwandte 2. und 3. Grades) mit Beschwerden, wie sie in den Fragen Nr. 1-19 genannt sind?	<input type="checkbox"/> JA	<input type="checkbox"/> NEIN	<input type="checkbox"/> WEISS NICHT
	- Wenn ja, wer?			

Abbildung 4-1 Fragebogen zur Erfassung einer peripheren Neuropathie (PNP) bei primär audiologisch aufgefallenen Patienten im Sinne einer ANSD. Klinik und Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie des Universitätsklinikums Münster.

#### 4.3.2 Primär neurologische Patienten

Bei neurologischen Patienten mit der Diagnose einer PNP im Sinne einer HMSN und konkomitanter Hörstörungen, sollte nach einer Kontrolle mittels cMRT die molekulargenetische Routinediagnostik durchgeführt werden (*GJB1, MPZ, PMP22*).

Unabhängig von den molekulargenetischen Resultaten, wird der Patient in der audiologischen Klinik vorstellig, damit einerseits eine Beratung und andererseits mithilfe der erweiterten audiologischen Diagnostik eine ANSD auch bei fehlenden OAE identifiziert werden kann.

Bei negativer Routinediagnostik und bestätigter ANSD, wird die genetische Kontrolle auf den Locus Xq23 – 27.3 (*AUNX1*) ausgedehnt, da dieser mit der Entwicklung einer ANSD und dem zusätzlichen Auftreten einer PNP beschrieben ist. Die zusätzliche PNP scheint mit der chromosomalen Lage des *AUNX1* zusammen zu hängen, da dieser zwei X-chromosomale Loci überlappt, die eine Rolle in der X-chromosomal rezessiven Form der HMSN spielen.

Sind die genetischen Untersuchungen bisher erfolglos verlaufen, kann über die weitere Kontrolle der Gene *OTOF* und *PJVK* nachgedacht werden, um eine von der PNP unabhängige Ursache für die ANSD zu identifizieren.

Natürlich kann es je nach Klinik und Fragestellung sinnvoll sein, auch die anderen Gene zu kontrollieren.

#### 4.4 Ausblick

Durch Etablierung eines standardisierten Screenings für ANSD-Patienten in der neurologischen und audiologischen Fachdisziplin kann einerseits die frühzeitige und adäquate Diagnose gestellt und andererseits die bisher eingeleitete Therapie (HG-Versorgung und audioverbale Therapie) bei Bedarf weiter präzisiert und durch, z. B. Gebärdensprache und Lippenlesen, frühzeitig ergänzt werden.

Der Erkenntnisgewinn aus den audiologischen und molekulargenetischen Untersuchungen könnte die nicht-invasive Lokalisationsdiagnostik der ANSD verbessern, die wiederum als



prognostische Hilfestellung bezüglich der Beratung über den Krankheitsverlauf und der Effektivität einer angedachten invasiveren apparativen Therapie (CI und HIP) dienen könnte.

Neben einer Verbesserung der klinischen Versorgung der ANSD-Patienten, wird durch konsequentes Screening die Ermittlung genauerer Zahlen zur Prävalenz der ANSD bei ARNSHI-Patienten ermöglicht.

Zusätzlich können Aussagen zum Vorkommen einer ANSD bei PNP-Patienten mit Hörstörungen getroffen, als auch eine Assoziation zu den ursächlichen Mutationen – in den schon bekannten und routinemäßig kontrollierten Genen für eine HMSN – hergestellt werden.

Mit der wachsenden Zahl molekulargenetischer Untersuchungsdaten über die ANSD am Universitätsklinikum Münster und im Vergleich mit den Ergebnissen anderer forschender Institute könnte in absehbarer Zeit für die genannten Gene und Loci eine Informationsdatenbank entstehen, wovon die Patientenversorgung am hiesigen Standort zusätzlich profitieren würde.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Aaij, C. and P. Borst (1972) *The gel electrophoresis of DNA*. Biochim Biophys Acta **269**(2): S. 192-200.
2. Abe, S., et al. (2000) *Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese*. J Med Genet **37**(1): S. 41-3.
3. Abu Al-Soud, W. and P. Radstrom (1998) *Capacity of nine thermostable DNA polymerases To mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples*. Appl Environ Microbiol **64**(10): S. 3748-53.
4. Amberger, J., et al. (2009) *McKusick's Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*. Nucleic Acids Res **37**(Database issue): S. D793-6.
5. Arber, W. and S. Linn (1969) *DNA modification and restriction*. Annu Rev Biochem **38**: S. 467-500.
6. Bennett, R.L., et al. (2008) *Standardized human pedigree nomenclature: update and assessment of the recommendations of the National Society of Genetic Counselors*. J Genet Couns **17**(5): S. 424-33.
7. Bennett, R.L., et al. (1995) *Recommendations for standardized human pedigree nomenclature. Pedigree Standardization Task Force of the National Society of Genetic Counselors*. Am J Hum Genet **56**(3): S. 745-52.
8. Berg, A.L., et al. (2005) *Newborn hearing screening in the NICU: profile of failed auditory brainstem response/passed otoacoustic emission*. Pediatrics **116**(4): S. 933-8.
9. Berlin, C., L. Hood, and K. Rose (2001) *On renaming auditory neuropathy as auditory dys-synchrony*. Audiology Today **13**: S. 15-17.
10. Berlin, C.I., et al. (1998) *Reversing click polarity may uncover auditory neuropathy in infants*. Ear Hear **19**(1): S. 37-47.
11. Berlin, C.I., et al. (1993) *Does type I afferent neuron dysfunction reveal itself through lack of efferent suppression?* Hear Res **65**(1-2): S. 40-50.
12. Berlin, C.I., et al. (2010) *Multi-site diagnosis and management of 260 patients with auditory neuropathy/dys-synchrony (auditory neuropathy spectrum disorder)*. Int J Audiol **49**(1): S. 30-43.
13. Berlin, C.I., et al. (2005) *Absent or elevated middle ear muscle reflexes in the presence of normal otoacoustic emissions: a universal finding in 136 cases of auditory neuropathy/dys-synchrony*. J Am Acad Audiol **16**(8): S. 546-53.

14. Berlin, C.I., T. Morlet, and L. Hood (2008) *Management of Individuals with Auditory Neuropathy Spectrum Disorder*, in *Guidelines Development Conference on the Identification and Management of Infants with Auditory Neuropathy at International Newborn Hearing Screening Conference*. Cernobbio (Como Lake), Italy.
15. Berlin, C.I., T. Morlet, and L.J. Hood (2003) *Auditory neuropathy/dyssynchrony: its diagnosis and management*. *Pediatr Clin North Am* **50**(2): S. 331-40, vii-viii.
16. Beurg, M., et al. (2008) *Calcium- and otoferlin-dependent exocytosis by immature outer hair cells*. *J Neurosci* **28**(8): S. 1798-803.
17. Beutner, D., et al. (2007) *Risk factors for auditory neuropathy/auditory synaptopathy*. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **69**(4): S. 239-44.
18. Black, D.L. (2003) *Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing*. *Annu Rev Biochem* **72**: S. 291-336.
19. Bolz, H. and A. Gal (2002) *Genetik des Usher-Syndroms*. *Med. Genetik* **14**: S. 10-14.
20. Bonfils, P., et al. (1991) *Progressive hereditary deafness with predominant inner hair cell loss*. *Am J Otol* **12**(3): S. 203-6.
21. Borate, B. and A.D. Baxevanis (2009) *Searching Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) for information on genetic loci involved in human disease*. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 1**: S. Unit 1 2.
22. Brandt, A., J. Striessnig, and T. Moser (2003) *CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells*. *J Neurosci* **23**(34): S. 10832-40.
23. Buchman, C.A., et al. (2006) *Auditory Neuropathy Characteristics in Children with Cochlear Nerve Deficiency*. *Ear and Hearing* **27**(4): S. 399-408  
10.1097/01.aud.0000224100.30525.ab.
24. Burks, C., et al. (1985) *The GenBank nucleic acid sequence database*. *Comput Appl Biosci* **1**(4): S. 225-33.
25. Butinar, D., et al. (1999) *Hereditary auditory, vestibular, motor, and sensory neuropathy in a Slovenian Roma (Gypsy) kindred*. *Ann Neurol* **46**(1): S. 36-44.
26. Chapon, F., et al. (1999) *Axonal phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease associated with a mutation in the myelin protein zero gene*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **66**(6): S. 779-82.
27. Chen, N. and L. Yun (2006) *DNA recovery from agarose gels with a simple centrifuge-driven Sephadex filtration*. *Forestry Studies in China* **8**(1): S. 32-34.
28. Cheng, X., et al. (2005) *Connexin 26 variants and auditory neuropathy/dys-synchrony among children in schools for the deaf*. *Am J Med Genet A* **139**(1): S. 13-8.

29. Chinnery, P.F. and E.A. Schon (2003) *Mitochondria*. J Neurol Neurosurg Psychiatry **74**(9): S. 1188-99.
30. Chomyn, A., et al. (1992) *MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts*. Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): S. 4221-5.
31. Colletti, V., et al. (2005) *Auditory brainstem implant (ABI): new frontiers in adults and children*. Otolaryngol Head Neck Surg **133**(1): S. 126-38.
32. Comi, G. (1997) *Evoked potentials in diabetes mellitus*. Clin Neurosci **4**(6): S. 374-9.
33. Condit, C.M., et al. (2002) *The changing meanings of "mutation:" A contextualized study of public discourse*. Hum Mutat **19**(1): S. 69-75.
34. Cotton, R.G. (2002) *Communicating "mutation:" Modern meanings and connotations*. Hum Mutat **19**(1): S. 2-3.
35. Danna, K. and D. Nathans (1971) *Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae*. Proc Natl Acad Sci U S A **68**(12): S. 2913-7.
36. Dau, T., et al. (2000) *Auditory brainstem responses with optimized chirp signals compensating basilar-membrane dispersion*. J Acoust Soc Am **107**(3): S. 1530-40.
37. De Jonghe, P., et al. (1999) *The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype*. Brain **122** ( Pt 2): S. 281-90.
38. Dean, F.B., et al. (2002) *Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification*. Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): S. 5261-6.
39. Dean, F.B., et al. (2001) *Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification*. Genome Res **11**(6): S. 1095-9.
40. del Castillo, I., et al. (2002) *A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment*. N Engl J Med **346**(4): S. 243-9.
41. Delmaghani, S., et al. (2006) *Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy*. Nat Genet **38**(7): S. 770-8.
42. Deltenre, P., et al. (1999) *Auditory neuropathy with preserved cochlear microphonics and secondary loss of otoacoustic emissions*. Audiology **38**(4): S. 187-95.
43. den Dunnen, J.T. and S.E. Antonarakis (2000) *Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion*. Hum Mutat **15**(1): S. 7-12.

44. Ding, D.L., et al. (1999) *Selective loss of inner hair cells and type-I ganglion neurons in carboplatin-treated chinchillas. Mechanisms of damage and protection.* Ann N Y Acad Sci **884**: S. 152-70.
45. Dou, H., et al. (2004) *Null mutation of alpha1D Ca<sup>2+</sup> channel gene results in deafness but no vestibular defect in mice.* J Assoc Res Otolaryngol **5**(2): S. 215-26.
46. Dowley, A.C., et al. (2009) *Auditory neuropathy: unexpectedly common in a screened newborn population.* Dev Med Child Neurol **51**(8): S. 642-6.
47. Eckert, K.A. and T.A. Kunkel (1990) *High fidelity DNA synthesis by the Thermus aquaticus DNA polymerase.* Nucleic Acids Res **18**(13): S. 3739-44.
48. Estivill, X., et al. (1998) *Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness.* Lancet **351**(9100): S. 394-8.
49. Ferraris, A., et al. (2002) *Pyrosequencing for detection of mutations in the connexin 26 (GJB2) and mitochondrial 12S RNA (MTRNR1) genes associated with hereditary hearing loss.* Hum Mutat **20**(4): S. 312-20.
50. Finckh-Krämer, U., M.E. Spormann-Lagodzinski, and M. Gross (2001) *Geschwister mit kindlichen Hörstörungen Daten zu Diagnosezeitpunkt und Grad der Hörstörung.* HNO **49**(3): S. 212-215.
51. Foerst, A., et al. (2006) *Prevalence of auditory neuropathy/synaptopathy in a population of children with profound hearing loss.* Int J Pediatr Otorhinolaryngol **70**(8): S. 1415-22.
52. Fujikawa, S. and A. Starr (2000) *Vestibular neuropathy accompanying auditory and peripheral neuropathies.* Arch Otolaryngol Head Neck Surg **126**(12): S. 1453-6.
53. Gelotte, D.B. and A. Emnéus (1966) *Gel-Filtration, ein chromatographisches Verfahren zur Trennung nach Molekülgröße.* Chemie Ingenieur Technik - CIT **38**(4): S. 445-451.
54. Gorlin, R., H. Toriello, and M. Cohen (1995) *Hereditary Hearing Loss and its Syndromes.* ed.: Oxford University Press, NY.
55. Grati, F.R., et al. (2009) *Pure monosomy and pure trisomy of 13q21.2-31.1 consequent to a familial insertional translocation: exclusion of PCDH9 as the responsible gene for autosomal dominant auditory neuropathy (AUNA1).* Am J Med Genet A **149A**(5): S. 906-13.
56. Gross, M., U. Finckh-Kramer, and M. Spormann-Lagodzinski (2000) *[Congenital hearing disorders in children. 1: Acquired hearing disorders].* HNO **48**(12): S. 879-86.
57. Gross, M., K. Lange, and M. Spormann-Lagodzinski (2001) *[Congenital hearing loss in children. 2: Genetic hearing loss].* HNO **49**(8): S. 602-17.

58. Heathcote, K., et al. (2000) *A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis (MIM 148350)*. J Med Genet **37**(1): S. 50-1.
59. Henry, W.R. and M.J. Mulroy (1995) *Afferent synaptic changes in auditory hair cells during noise-induced temporary threshold shift*. Hear Res **84**(1-2): S. 81-90.
60. Hjerten, S. (1967) *Free zone electrophoresis*. Chromatogr Rev **9**(2): S. 122-219.
61. Hood, L.J. (1999) *A review of objective methods of evaluating auditory neural pathways*. Laryngoscope **109**(11): S. 1745-8.
62. Hosono, S., et al. (2003) *Unbiased whole-genome amplification directly from clinical samples*. Genome Res **13**(5): S. 954-64.
63. Hoth, S. and K. Neumann (2006) *Das OAE-Handbuch: Otoakustische Emissionen in der Praxis*. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag KG.
64. Hübner, R., et al. (2007) *Hirnstammaudiometrische Untersuchungen bei auditorischen Neuropathien*, in *Dreiländertagung D-A-CH. 24. Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Phoniatrie und Pädaudiologie e. V.*: Innsbruck, Österreich.
65. Huehne, K., et al. (2003) *Novel mutations in the Charcot-Marie-Tooth disease genes PMP22, MPZ, and GJB1*. Hum Mutat **21**(1): S. 100.
66. Hutchin, T., et al. (2005) *Assessment of the genetic causes of recessive childhood non-syndromic deafness in the UK - implications for genetic testing*. Clin Genet **68**(6): S. 506-12.
67. *The International HapMap Project*. (2003) Nature **426**(Number): S. 789-96.
68. Jain, E., et al. (2009) *Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website*. BMC Bioinformatics **10**: S. 136.
69. Karadima, G., et al. (2004) *A V38A mutation in X-linked Charcot-Marie-Tooth neuropathy with unusual clinical features*. J Neurol **251**(2): S. 222-3.
70. Katada, A., S. Nonaka, and Y. Harabuchi (2005) *Cochlear implantation in an adult patient with auditory neuropathy*. Eur Arch Otorhinolaryngol **262**(6): S. 449-52.
71. Kelley, P.M., et al. (1998) *Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss*. Am J Hum Genet **62**(4): S. 792-9.
72. Kelsell, D.P., et al. (1997) *Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness*. Nature **387**(6628): S. 80-3.
73. Kent, W.J. (2002) *BLAT--the BLAST-like alignment tool*. Genome Res **12**(4): S. 656-64.
74. Khedr, E.M., et al. (2000) *Peripheral and central nervous system alterations in hypothyroidism: electrophysiological findings*. Neuropsychobiology **41**(2): S. 88-94.

75. Khimich, D., et al. (2005) *Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling*. Nature **434**(7035): S. 889-94.
76. Kiese-Himmel, C. and E. Kruse (2005) [*Hearing loss in infancy. Who first suspects it? A descriptive analysis?*]. HNO **53**(9): S. 810-4, 816.
77. Kim, T.B., et al. (2004) *A gene responsible for autosomal dominant auditory neuropathy (AUNA1) maps to 13q14-21*. J Med Genet **41**(11): S. 872-6.
78. Klinke, R., et al. (2001) *Plastic changes in the auditory cortex of congenitally deaf cats following cochlear implantation*. Audiol Neurootol **6**(4): S. 203-6.
79. Koehler, C.M., et al. (1991) *Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation*. Genetics **129**(1): S. 247-55.
80. Kovach, M.J., et al. (1999) *A unique point mutation in the PMP22 gene is associated with Charcot-Marie-Tooth disease and deafness*. Am J Hum Genet **64**(6): S. 1580-93.
81. Kraus, N., et al. (1984) *Absent auditory brain stem response: peripheral hearing loss or brain stem dysfunction?* Laryngoscope **94**(3): S. 400-6.
82. Kroemer, G., B. Dallaporta, and M. Resche-Rigon (1998) *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis*. Annu Rev Physiol **60**: S. 619-42.
83. Kubisch, C. (2005) *Genetische Grundlagen nichtsyndromaler Hörstörungen*. Dtsch Arztebl **102**(43): S. 2946-.
84. Kubisch, C. (2005) *Monogene und komplex-genetische Formen der Schwerhörigkeit: Der Beitrag der Humangenetik zum Verständnis der Physiologie des Hörens.*, in 8. DGA Jahrestagung. Göttingen. S. 1-3.
85. Kubisch, C. (2002) *Autosomal dominante nicht-syndromale Hörstörungen*. Med. Genetik **14**: S. 30-36.
86. Kudo, T., et al. (2000) *Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population*. Am J Med Genet **90**(2): S. 141-5.
87. Kumar, A.U. and M. Jayaram (2005) *Auditory processing in individuals with auditory neuropathy*. Behav Brain Funct **1**: S. 21.
88. Lacas-Gervais, S., et al. (2004) *Beta1VSigma1 spectrin stabilizes the nodes of Ranvier and axon initial segments*. J Cell Biol **166**(7): S. 983-90.
89. Lange, K., M. Gross, and M. Spormann-Lagodzinski (2002) *Genetik syndromaler Hörstörungen - ein kurzer Überblick*. Med. Genetik **14**: S. 5-9.
90. Lange, K., M. Gross, and M. Spormann-Lagodzinski (2002) *Pendred-Syndrom*. Med. Genetik **14**: S. 23-27.

91. Lawyer, F.C., et al. (1993) *High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length Thermus aquaticus DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity*. PCR Methods Appl **2**(4): S. 275-87.
92. Le Pecq, J.B. and C. Paoletti (1966) *A new fluorometric method for RNA and DNA determination*. Anal Biochem **17**(1): S. 100-7.
93. Lesinski-Schiedat, A., et al. (2001) *[Subjective deafness in case of peri-synaptic audiopathy. Isolated defects of the inner haircells?]*. Laryngorhinootologie **80**(10): S. 601-4.
94. Lesinski-Schiedat, A., et al. (2006) *Kochleaimplantation bei Kindern im 1. Lebensjahr*. HNO **54**(7): S. 565-572.
95. Lin, D., et al. (2001) *Assessment of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) in screening for mutations in connexin 26 (GJB2)*. Hum Mutat **18**(1): S. 42-51.
96. Liu, X.Z., et al. (2009) *Digenic inheritance of non-syndromic deafness caused by mutations at the gap junction proteins Cx26 and Cx31*. Hum Genet **125**(1): S. 53-62.
97. Lopez-Bigas, N., et al. (2001) *Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment*. Hum Mol Genet **10**(9): S. 947-52.
98. Lopez-Diaz-de-Leon, E., et al. (2003) *Auditory neuropathy in Friedreich ataxia. A report of two cases*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol **67**(6): S. 641-8.
99. Loundon, N., et al. (2005) *Auditory neuropathy or endocochlear hearing loss?* Otol Neurotol **26**(4): S. 748-54.
100. Luthra, R. and L.J. Medeiros (2004) *Isothermal Multiple Displacement Amplification: A Highly Reliable Approach for Generating Unlimited High Molecular Weight Genomic DNA from Clinical Specimens*. J Mol Diagn **6**(3): S. 236-242.
101. Madden, C., et al. (2002) *Clinical and audiological features in auditory neuropathy*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg **128**(9): S. 1026-30.
102. Marlin, S., et al. (2010) *Temperature-sensitive auditory neuropathy associated with an otoferlin mutation: Deafening fever!* Biochem Biophys Res Commun **394**(3): S. 737-42.
103. Marshall, J.H. (2002) *On the changing meanings of "mutation"*. Hum Mutat **19**(1): S. 76-8.
104. Mason, J.C., et al. (2003) *Cochlear implantation in patients with auditory neuropathy of varied etiologies*. Laryngoscope **113**(1): S. 45-9.
105. Massinger, C., K.L. Lippert, and A. Keilmann (2004) *Verzögerung in der Hörbahnreifung*. HNO **52**(10): S. 927-934.



106. Mazumder, B., V. Seshadri, and P.L. Fox (2003) *Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means*. Trends Biochem Sci **28**(2): S. 91-8.
107. Migliosi, V., et al. (2002) *Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss*. J Med Genet **39**(7): S. 502-6.
108. Mirghomizadeh, F., et al. (2002) *Substitutions in the conserved C2C domain of otoferlin cause DFNB9, a form of nonsyndromic autosomal recessive deafness*. Neurobiol Dis **10**(2): S. 157-64.
109. Misu, K., et al. (2000) *An axonal form of Charcot-Marie-Tooth disease showing distinctive features in association with mutations in the peripheral myelin protein zero gene (Thr124Met or Asp75Val)*. J Neurol Neurosurg Psychiatry **69**(6): S. 806-11.
110. Moraes, C.T., et al. (1989) *Heteroplasmy of mitochondrial genomes in clonal cultures from patients with Kearns-Sayre syndrome*. Biochem Biophys Res Commun **160**(2): S. 765-71.
111. Moser, T., et al. (2006) *Diagnostik und Therapie der auditorischen Synaptopathie/Neuropathie*. HNO **54**(11): S. 833-841.
112. Muchnik, C., et al. (2004) *Reduced medial olivocochlear bundle system function in children with auditory processing disorders*. Audiol Neurootol **9**(2): S. 107-14.
113. Mullis, K., et al. (1986) *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: S. 263-73.
114. Nickisch, A., et al. (2009) *Pedaudiologic findings after severe neonatal hyperbilirubinemia*. Eur Arch Otorhinolaryngol **266**(2): S. 207-12.
115. Oudesluys-Murphy, A.M., et al. (1996) *Neonatal hearing screening*. Eur J Pediatr **155**(6): S. 429-35.
116. Oysu, C., et al. (2001) *The site of the hearing loss in Refsum's disease*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol **61**(2): S. 129-34.
117. Pagon, R., et al. (1993-2011) *GeneReviews [Internet]*. University of Washington, Seattle.
118. Park, H.J., et al. (2000) *Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss*. Laryngoscope **110**(9): S. 1535-8.
119. Parkinson, N.J., et al. (2001) *Mutant beta-spectrin 4 causes auditory and motor neuropathies in quivering mice*. Nat Genet **29**(1): S. 61-5.
120. Parving, A. and B. Christensen (1992) *Children younger than 4 years of age, referred to an audiological department*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol **23**(2): S. 161-70.

121. Parving, A., A.M. Hauch, and B. Christensen (2003) *[Hearing loss in children--epidemiology, age at identification and causes through 30 years]*. Ugeskr Laeger **165**(6): S. 574-9.
122. Petersen, M.B., Q. Wang, and P.J. Willems (2008) *Sex-linked deafness*. Clin Genet **73**(1): S. 14-23.
123. Peterson, A., et al. (2003) *Outcomes of cochlear implantation in children with auditory neuropathy*. J Am Acad Audiol **14**(4): S. 188-201.
124. Pfister, M. and S. Kupka (2002) *Waardenburg-Syndrom*. Med. Genetik **14**: S. 15-17.
125. Pickering, B.M. and A.E. Willis (2005) *The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease*. Semin Cell Dev Biol **16**(1): S. 39-47.
126. Platzer, J., et al. (2000) *Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels*. Cell **102**(1): S. 89-97.
127. Porath, J. and P. Flodin (1959) *Gel filtration: a method for desalting and group separation*. Nature **183**(4676): S. 1657-9.
128. Prasad, S., et al. (2000) *Genetic testing for hereditary hearing loss: connexin 26 (GJB2) allele variants and two novel deafness-causing mutations (R32C and 645-648delTAGA)*. Hum Mutat **16**(6): S. 502-8.
129. Rance, G., et al. (2007) *Speech perception in noise for children with auditory neuropathy/dys-synchrony type hearing loss*. Ear Hear **28**(3): S. 351-60.
130. Rance, G., et al. (2007) *Receptive language and speech production in children with auditory neuropathy/dyssynchrony type hearing loss*. Ear Hear **28**(5): S. 694-702.
131. Rance, G., et al. (1999) *Clinical findings for a group of infants and young children with auditory neuropathy*. Ear Hear **20**(3): S. 238-52.
132. Rance, G., et al. (2002) *Speech perception and cortical event related potentials in children with auditory neuropathy*. Ear Hear **23**(3): S. 239-53.
133. Rapin, I. and J. Gravel (2003) *"Auditory neuropathy": physiologic and pathologic evidence calls for more diagnostic specificity*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol **67**(7): S. 707-28.
134. Riemann, K. (2002) *Autosomal rezessiv vererbte Schwerhörigkeit*. Med. Genetik **14**: S. 37-44.
135. Roberts, R.J., et al. (2003) *A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes*. Nucleic Acids Res **31**(7): S. 1805-12.
136. Roberts, R.J., et al. (2010) *REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes*. Nucleic Acids Res **38**(Database issue): S. D234-6.

137. Rodriguez-Ballesteros, M., et al. (2003) *Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (OTOF)*. Hum Mutat **22**(6): S. 451-6.
138. Rodriguez-Ballesteros, M., et al. (2008) *A multicenter study on the prevalence and spectrum of mutations in the otoferlin gene (OTOF) in subjects with nonsyndromic hearing impairment and auditory neuropathy*. Hum Mutat **29**(6): S. 823-31.
139. Rodriguez Dominguez, F.J., et al. (2007) *[Prevalence of auditory neuropathy: prospective study in a tertiary-care center]*. Acta Otorrinolaringol Esp **58**(6): S. 239-45.
140. Rogers, N.L., et al. (2007) *New saliva DNA collection method compared to buccal cell collection techniques for epidemiological studies*. Am J Hum Biol **19**(3): S. 319-26.
141. Rosenblum, B.B., et al. (1997) *New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns*. Nucleic Acids Res **25**(22): S. 4500-4.
142. Rouillon, I., et al. (2006) *Results of cochlear implantation in two children with mutations in the OTOF gene*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol **70**(4): S. 689-96.
143. Roush, P. (2008) *Auditory neuropathy spectrum disorder: Evaluation and management*. The Hearing Journal **61**(11): S. 36, 38-41.
144. Roux, I., et al. (2006) *Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse*. Cell **127**(2): S. 277-89.
145. Rozen, S. and H. Skaletsky (2000) *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol **132**: S. 365-86.
146. Rylander-Rudqvist, T., et al. (2006) *Quality and quantity of saliva DNA obtained from the self-administrated oragene method--a pilot study on the cohort of Swedish men*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(9): S. 1742-5.
147. Saiki, R.K., et al. (1988) *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science **239**(4839): S. 487-91.
148. Sambuughin, N., et al. (2003) *Deafness and CMT disease associated with a novel four amino acid deletion in the PMP22 gene*. Neurology **60**(3): S. 506-8.
149. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson (1977) *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): S. 5463-7.
150. Scaioli, V., et al. (1992) *F response and somatosensory and brainstem auditory evoked potential studies in HMSN type I and II*. J Neurol Neurosurg Psychiatry **55**(11): S. 1027-31.
151. Scheffler, I.E. (2001) *A century of mitochondrial research: achievements and perspectives*. Mitochondrion **1**(1): S. 3-31.
152. Schiavon, F., et al. (1998) *Mutations of the same sequence of the myelin PO gene causing two different phenotypes*. Hum Mutat **Suppl 1**: S. S217-9.

153. Schmidt, C.M., et al. (2008) *Audiologischer Phänotyp und molekulargenetische Befunde bei Kindern mit auditorischer Neuropathie*, in 25. Wissenschaftliche Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Phoniatrie und Pädaudiologie e. V.: Düsseldorf.
154. Schneider, P.M., et al. (2004) *Whole genome amplification - the solution for a common problem in forensic casework?* Progress in Forensic Genetics 10 Elsevier Science(ICS 1261): S. 24-26.
155. Schwander, M., et al. (2007) *A forward genetics screen in mice identifies recessive deafness traits and reveals that pejvakin is essential for outer hair cell function.* J Neurosci **27**(9): S. 2163-75.
156. Scott, D.A., et al. (1998) *Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss.* Hum Mutat **11**(5): S. 387-94.
157. Seeman, P., et al. (2004) *Hearing loss as the first feature of late-onset axonal CMT disease due to a novel P0 mutation.* Neurology **63**(4): S. 733-5.
158. Shallop, J.K., et al. (2001) *Cochlear implants in five cases of auditory neuropathy: postoperative findings and progress.* Laryngoscope **111**(4 Pt 1): S. 555-62.
159. Sharp, P.A., B. Sugden, and J. Sambrook (1973) *Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis.* Biochemistry **12**(16): S. 3055-63.
160. Sherry, S.T., et al. (2001) *dbSNP: the NCBI database of genetic variation.* Nucleic Acids Res **29**(1): S. 308-11.
161. Sheykhosslami, K., et al. (2000) *Vestibular function in auditory neuropathy.* Acta Otolaryngol **120**(7): S. 849-54.
162. Sheykhosslami, K., et al. (2005) *Sacculo-collic pathway dysfunction accompanying auditory neuropathy.* Acta Otolaryngol **125**(7): S. 786-91.
163. Shirane, M. and R.V. Harrison (1987) *The effects of hypoxia on sensory cells of the cochlea in chinchilla.* Scanning Microsc **1**(3): S. 1175-83.
164. Shoffner, J.M., et al. (1990) *Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation.* Cell **61**(6): S. 931-7.
165. Sininger, Y.S. (2002) *Identification of Auditory Neuropathy in Infants and Children.* Semin Hear **23**(03): S. 193-200.
166. Smith, H.O. and D. Nathans (1973) *Letter: A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes.* J Mol Biol **81**(3): S. 419-23.
167. Sohn, W. (2001) *"Schwerhörigkeit in Deutschland", Repräsentative Hörscreening-Untersuchung bei 2000 Probanden in 11 Allgemeinpraxen., in Z. Allg. Med (77).* Hippokrates-Verlag, Stuttgart. S. 143-147.

168. Spoendlin, H. (1971) *Degeneration behaviour of the cochlear nerve*. Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd **200**(4): S. 275-91.
169. Starr, A., et al. (2004) *A dominantly inherited progressive deafness affecting distal auditory nerve and hair cells*. J Assoc Res Otolaryngol **5**(4): S. 411-26.
170. Starr, A., et al. (1991) *Absence of both auditory evoked potentials and auditory percepts dependent on timing cues*. Brain **114** ( Pt 3): S. 1157-80.
171. Starr, A., et al. (2003) *Pathology and physiology of auditory neuropathy with a novel mutation in the MPZ gene (Tyr145->Ser)*. Brain **126**(Pt 7): S. 1604-19.
172. Starr, A., et al. (1996) *Auditory neuropathy*. Brain **119** ( Pt 3): S. 741-53.
173. Starr, A., et al. (2001) *Cochlear receptor (microphonic and summing potentials, otoacoustic emissions) and auditory pathway (auditory brain stem potentials) activity in auditory neuropathy*. Ear Hear **22**(2): S. 91-9.
174. Starr, A., et al. (1998) *Transient deafness due to temperature-sensitive auditory neuropathy*. Ear Hear **19**(3): S. 169-79.
175. Starr, A., et al. (2008) *Perspectives on Auditory Neuropathy: Disorders of Inner Hair Cell, Auditory Nerve, and Their Synapse*, in *The Senses: A Comprehensive Reference*, I.B. Allan, et al., Editors. Academic Press: New York. S. 397-412.
176. Stojkovic, T., et al. (1999) *Sensorineural deafness in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with connexin 32 mutation (R142Q)*. Neurology **52**(5): S. 1010-4.
177. Takashima, H., et al. (2003) *Gap junction protein beta 1 (GJB1) mutations and central nervous system symptoms in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease*. Acta Neurol Scand **107**(1): S. 31-7.
178. Takeno, S., et al. (1994) *Cochlear function after selective inner hair cell degeneration induced by carboplatin*. Hear Res **75**(1-2): S. 93-102.
179. Tang, W., et al. (2006) *Connexin29 is highly expressed in cochlear Schwann cells, and it is required for the normal development and function of the auditory nerve of mice*. J Neurosci **26**(7): S. 1991-9.
180. Tekin, M., D. Akcayoz, and A. Incesulu (2005) *A novel missense mutation in a C2 domain of OTOF results in autosomal recessive auditory neuropathy*. Am J Med Genet A **138**(1): S. 6-10.
181. Tessa, A., et al. (2001) *Maternally inherited deafness associated with a T1095C mutation in the mtDNA*. Eur J Hum Genet **9**(2): S. 147-9.
182. Thiele, H. and P. Nurnberg (2005) *HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes*. Bioinformatics **21**(8): S. 1730-2.
183. Tindall, K.R. and T.A. Kunkel (1988) *Fidelity of DNA synthesis by the Thermus aquaticus DNA polymerase*. Biochemistry **27**(16): S. 6008-13.

184. *The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010.* (2010) *Nucleic Acids Res* **38**(Number): S. D142-8.
185. Van Camp, G., P.J. Willems, and R.J. Smith (1997) *Nonsyndromic hearing impairment: unparallelled heterogeneity.* *Am J Hum Genet* **60**(4): S. 758-64.
186. Varga, R., et al. (2006) *OTOF mutations revealed by genetic analysis of hearing loss families including a potential temperature sensitive auditory neuropathy allele.* *J Med Genet* **43**(7): S. 576-81.
187. Varga, R., et al. (2003) *Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene.* *J Med Genet* **40**(1): S. 45-50.
188. von Ahsen, N., C.T. Wittwer, and E. Schutz (2001) *Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg(2+), deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas.* *Clin Chem* **47**(11): S. 1956-61.
189. Wake, M., et al. (1996) *Otoacoustic emission amplification after inner hair cell damage.* *Acta Otolaryngol* **116**(3): S. 374-81.
190. Wang, D.Y., et al. (2010) *Screening mutations of the OTOF gene in Chinese patients with auditory neuropathy, including a familial case of temperature-sensitive auditory neuropathy.* *BMC Med Genet* **11**(1): S. 79.
191. Wang, Q., et al. (2003) *Familial auditory neuropathy.* *Laryngoscope* **113**(9): S. 1623-9.
192. Wang, Q., et al. (2005) *Clinical and molecular characterization of a Chinese patient with auditory neuropathy associated with mitochondrial 12S rRNA T1095C mutation.* *Am J Med Genet A* **133A**(1): S. 27-30.
193. Wang, Q.J., et al. (2006) *AUNX1, a novel locus responsible for X linked recessive auditory and peripheral neuropathy, maps to Xq23-27.3.* *J Med Genet* **43**(7): S. e33.
194. Waring, M.J. (1965) *Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids.* *J Mol Biol* **13**(1): S. 269-82.
195. Wheeler, D.L., et al. (2006) *Database resources of the National Center for Biotechnology Information.* *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): S. D173-80.
196. Wolf, K. and D. Wiestler (1996) *Die Neuropathologie chronischer pharmakoresistenter Epilepsien.* *Dtsch Arztebl* **93**(40): S. 2544-.
197. Xoinis, K., et al. (2007) *Extremely low birth weight infants are at high risk for auditory neuropathy.* *J Perinatol* **27**(11): S. 718-23.
198. Yakovchuk, P., E. Protozanova, and M.D. Frank-Kamenetskii (2006) *Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix.* *Nucleic Acids Res* **34**(2): S. 564-74.

199. Yasunaga, S., et al. (2000) *OTOF encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9*. Am J Hum Genet **67**(3): S. 591-600.
200. Yasunaga, S., et al. (1999) *A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness*. Nat Genet **21**(4): S. 363-9.
201. Young, P. and U. Suter (2003) *The causes of Charcot-Marie-Tooth disease*. Cell Mol Life Sci **60**(12): S. 2547-60.
202. Zelante, L., et al. (1997) *Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans*. Hum Mol Genet **6**(9): S. 1605-9.
203. Zeng, F.G., et al. (1999) *Temporal and speech processing deficits in auditory neuropathy*. Neuroreport **10**(16): S. 3429-35.
204. Zhou, R., P.J. Abbas, and J.G. Assouline (1995) *Electrically evoked auditory brainstem response in peripherally myelin-deficient mice*. Hear Res **88**(1-2): S. 98-106.
205. Zhou, R., et al. (1995) *Anatomical and physiological measures of auditory system in mice with peripheral myelin deficiency*. Hear Res **88**(1-2): S. 87-97.

## 6 Danksagung

Vielen Menschen, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht in dieser Form möglich gewesen wäre, bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt zum Einen Herrn Prof. Dr. med. Peter Young und Dr. med. Matthias Boentert, aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie, für die Überlassung des Themas, der konstruktiven Kritik und der Betreuung der Dissertation.

Zudem danke ich Fr. Prof. Dr. med. Antoinette am Zehnhoff-Dinnesen, Dr. med. Robin Hübner und Dr. med. Michael Schmidt, aus der Klinik und Poliklinik für Phoniatrie und Pädaudiologie, für die audiologische Rekrutierung der Patienten und die anschließende DNA-Probensammlung.

Zum Anderen danke ich ganz herzlich Gabriele Berens, Joke Nowitzki und Dr. rer. medic. Anja Schirmacher, aus der AG Neurogenetik der Klinik und Poliklinik für Neurologie, für die Einführung in die benötigten Labormethoden. Jederzeit war es möglich über Problemlösungsansätze, Verfahrensoptimierungen und auch über allzu menschliches zu diskutieren.

Wissen und Förderung, sowie Ideen und Kreativität waren in diesem Team eine Selbstverständlichkeit.

Mein größter Dank geht an die Patienten und deren Familien, die sich dazu bereit erklärt haben, dieses Projekt zu unterstützen. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht realisierbar gewesen.



## 7 Lebenslauf

