

Aus der ABTEILUNG für  
KLINISCHE CHEMIE und LABORATORIUMSMEDIZIN  
komm. Leiter PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER  
der FAKULTÄT für MEDIZIN  
der UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Identification and genotype/phenotype correlation of mutations  
in a large German cohort with hearing loss**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christopher Beck

2014



Aus der ABTEILUNG für  
KLINISCHE CHEMIE und LABORATORIUMSMEDIZIN  
komm. Leiter PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER  
der FAKULTÄT für MEDIZIN  
der UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Identification and genotype/phenotype correlation of mutations  
in a large German cohort with hearing loss**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christopher Beck

2014

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Charalampos Aslanidis
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Jürgen Strutz
Tag der mündlichen Prüfung:	06.08.2015

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

1. Abstract der publizierten Originalarbeit (deutsche Übersetzung)	2
2. Deutsche Zusammenfassung der publizierten wissenschaftlichen Originalarbeit	3
a. Einleitung	4
b. Material und Methoden	6
c. Ergebnisse	8
d. Diskussion	12
e. Zusammenfassung	17
f. Literaturverzeichnis	19
3. Danksagung	22
4. Lebenslauf	23

## Abstract der publizierten Originalarbeit (deutsche Übersetzung)

Die Prävalenz einer Hörschädigung/Schwerhörigkeit wird mit etwa 1 auf 1000 Neugeborene angegeben. Um eine höhere Rate an detektierten Mutationen bei betroffenen Patienten mit erblicher Schwerhörigkeit zu erreichen, wurde ein dreistufiges Mutations-Screening-Programm etabliert mit der Untersuchung des GJB2-Gens im ersten Schritt, nachfolgender Untersuchung von GJB1, GJB3 und GJB6 (2. Schritt) und bei negativem oder heterozygotem Ergebnis einer Testung von GJA1, GJB4, SLC26A4 und PJVK (3. Schritt).

Zur näheren Klassifizierung der Schwerhörigkeit wurden audiometrische Untersuchungen der Patienten, speziell auch zur Charakterisierung der audiologischen Merkmale von Betroffenen mit Mutationen im GJB2-Gen, durchgeführt.

In 59 (31,3 %) der 188 Patienten konnte die Schwerhörigkeit kausalen Mutationen im GJB2-Gen zugeschrieben werden, wovon 45 (23,9 %) eine Homozygotie für die 35delG-Mutation und 14 (7,4 %) eine Compound-Heterozygotie für Mutationen in der codierenden Region des Exon 2 im GJB2-Gen aufzeigten.

Demgegenüber konnten keine relevanten Mutationen im Exon 1 des GJB2-Gens nachgewiesen werden. Bei 22 (11,7 %) der Patienten zeigte sich eine singuläre rezessive Mutation in GJB2, GJB3, GJB6 oder SLC26A4 ohne Nachweis einer weiteren Mutation auf dem zweiten Allel.

Unsere Studie zeigte einen signifikanten Unterschied im Ausmaß der Schwerhörigkeit bei Patienten mit Mutationen im GJB2-Gen. 45 (45,5 %) GJB2-Kasuistiken konnten in 99 Patienten mit schwerer bis an Taubheit grenzender Schwerhörigkeit gegenüber 14 (17,7 %) Fällen in 79 Patienten mit mäßiggradiger Schwerhörigkeit detektiert werden, während in 10 Betroffenen mit milder Schwerhörigkeit keine Mutation nachgewiesen werden konnte ( $p < 0,0001$ ).

In Anbetracht der hohen phänotypischen Variabilität der Ausprägung der Schwerhörigkeit in Patienten mit identischem Genotyp (sogar intrafamiliär) lässt sich keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation erstellen. Basierend auf dem detektierten Mutationsspektrum und entsprechenden Mutationsfrequenzen, insbesondere im GJB2-Gen, sollte ein stufenweises Screening-Programm angeboten werden, welches in Zukunft eine bessere Stratifizierung von Patienten mit Schwerhörigkeits-/Taubheitssyndromen im Sinne eines besseren therapeutischen Outcome ermöglicht.

DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG  
der publizierten wissenschaftlichen Originalarbeit

Identification and genotype/phenotype correlation of mutations in a large German cohort with  
hearing loss

(im Sinne von § 6 Abs. 7 PromO)

Aufgrund von Copyright-Richtlinien bezüglich der Originalarbeit, welche im European Archive of Otorhinolaryngology veröffentlicht wurde, wird hier ausschließlich die deutsche Zusammenfassung vorgelegt.

Ein entsprechender Verweis zur Originalpublikation bzw. der Online-Version ist untenstehend aufgeführt:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00405-014-3157-5>

## Einleitung

Die Prävalenz von Schwerhörigkeits-/Taubheitssyndromen wird mit etwa 1 auf 1000 Neugeborene beziffert und stellt somit die häufigste angeborene Erkrankung dar. Sofern diese bei Geburt nicht frühzeitig erkannt wird, ziehen diese häufig Beeinträchtigungen sowohl der lautsprachlichen als auch geistigen Entwicklung nach sich. Aus diesem Grund ist eine frühzeitige Diagnostik unabdingbar, um ebensolche negativen Auswirkungen im Bereich der Kommunikation, sozialen Integration und Interaktion zu vermeiden.

In diesem Sinne wird die Durchführung des sog. Neugeborenen-Hörscreenings durch Messung der otoakustischen Emissionen (OAE) oder gegebenenfalls mittels Durchführung einer Hirnstammaudiometrie (brainstem evoked response audiometry = BERA) empfohlen.

Eltern, welche im Rahmen dieser Untersuchungen mit der Diagnose eines schwerhörigen Kindes konfrontiert werden, werden sich an den Arzt mit der Frage nach der Ursache und der prognostischen Entwicklung der vorliegenden Schwerhörigkeit wenden, so dass hier entsprechenden klinischen und genetischen Untersuchungen besondere Bedeutung zukommt.

Aufgrund der Heterogenität von Schwerhörigkeits-/Taubheitssyndromen und der hohen phänotypischen Variabilität in Bezug auf Manifestationsalter, Typ, Schweregrad, Symmetrie sowie einer möglichen erblichen Komponente gestaltet sich der Prozess der Ursachenfindung oftmals schwierig.

Etwa die Hälfte der Fälle wird exogenen Faktoren wie Frühgeburtlichkeit, prä- und postnatalen Infektionen oder Geburtstraumata sowie der Pharmakotoxizität bestimmter Medikamente zugeschrieben, während die restlichen 50% einer erblich bedingten Ursache zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit wird der Fokus auf ein Patientenkollektiv gelegt, bei denen eine isolierte (nicht-syndromale) Schwerhörigkeit vorliegt, d.h. ohne weitere klinische Symptome, welche innerhalb eines klinisch-apparenten Syndromenkomplex mit der Schwerhörigkeit assoziiert werden (wie z.B. Usher-, Alport-, Jervell-Syndrom uvm.).

Der Vererbungsmodus ist in bis zu 80% der Fälle autosomal-rezessiv (gegenüber 15-20% autosomal-dominanten und 5% mitochondrialen Erbgängen). Hiervon sind wiederum etwa 50% trotz der genetischen Heterogenität mit Mutationen im GJB2-Gen assoziiert (bei über 180 Loci und 89 Genen, welche mit Schwerhörigkeit in Verbindung gebracht werden). Jedoch kann eine Untersuchung aller Genloci bzw. identifizierter Gene aus ökonomischen Gründen nicht für den Einzelfall angeboten werden.

Um ein entsprechend effektives Screening-Programm auf molekularer Ebene einzurichten, wurde eine sequenzielle molekulargenetische Diagnostik aufgebaut, welche in erster Linie die Untersuchung von GJB2, GJB3, GJB6 und GJB1 beinhaltet. Patienten mit wildtypischer oder heterozygoter Sequenz wurden in einem zweiten Schritt auf Mutationen in neu aufgebauten Genanalysen für GJB4, GJA1, SLC26A4 und DFNB59 untersucht. Die Zielsetzung dieser Studie war, die molekulargenetische Untersuchung von Patienten mit Schwerhörigkeitssyndromen in Deutschland in dem Bewusstsein hervorzuheben, dass diese in der Zukunft eine zunehmende Rolle in der klinischen Praxis einnehmen wird. Insbesondere muss betont werden, dass die Familienplanung von betroffenen Eltern nicht unwesentlich durch das Risiko des Wiederauftretens beeinflusst wird, so dass eine entsprechende genetische Beratung von Eltern mit schwerhörigen Kindern in jedem Fall empfehlenswert erscheint.

## Material und Methoden

In die Studie wurden 211 betroffene Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde am Universitätsklinikum Regensburg eingeschlossen (100 weibliche und 111 männliche Probanden, mittleres Alter 13,7 Jahre). Die Teilnahme erfolgte freiwillig, ebenso wurde die Patienten (bzw. deren Eltern) nach international geläufigen Statuten für den Respekt der Persönlichkeit, der medizinischen Ethik und des Medizinrechts entsprechend informiert, auch was Risiken und mögliche Konsequenzen einer molekulargenetischen Untersuchung anbelangt.

23 der genannten 211 Patienten wurden aufgrund einer syndromalen Schwerhörigkeit bzw. einer exogenen Ursache (Neugeborenen-Meningitis, USHER-Syndrom, CHARGE-Syndrom, Ohrmalformation u.a.), welche im Zusammenhang mit der diagnostizierten Schwerhörigkeit steht, initial selektiert und nicht für eine weitere Untersuchung in der Studie berücksichtigt, sofern sich keine anderen Indikationen für eine genetische Testung ergaben.

Die körperliche Untersuchung der Funktion des auditorischen Systems erfolgte altersadaptiert mittels otoakustischer Emissionen bzw. Hirnstammaudiometrie (BERA) bei Neugeborenen sowie durch Erstellung eines Reintonaudiogramms (RTA) bei Kindern und Erwachsenen (Frequenzbereich zwischen 125- 8000 Hz). Eine Subklassifikation des Schweregrads der Hörschädigung erfolgte in folgende Gruppen: mild (20-40 dB), moderat (41-70 dB), schwer (71-90 dB) bzw. an Taubheit grenzend (> 90dB). Eine asymmetrische Hörleistung wurde ab einem Unterschied von 15 dB als signifikant angesehen, eine Progredienz bzw. Verschlechterung der Hörleistung bei einer Differenz von 15 dB innerhalb von 3 Jahren.

Zur Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen wurde DNA-Material aus venösem EDTA-Blut oder Mundschleimhautabstrichen der Patienten extrahiert (QIAamp DNA Blood Midi Kit und QIAamp DNA Mini Kit for buccal swabs, Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Zur Durchführung von Untersuchungen in einem gesunden Kontrollkollektiv wurde DNA-Material von 150 Medizinstudenten im Rahmen des Blockpraktikums am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg entnommen. Die Teilnahme an der Studie erfolgte nach ausdrücklicher Information und Einwilligung der Probanden, auch unter den bereits genannten Statuten des ethischen und medizinischen Rechts sowie unter dem Schutz der Persönlichkeit.

Die Untersuchung der Gene GJB2, GJB3, GJB6 und GJB1 (1. Schritt) wie auch der Gene SLC26A4, DFNB59, GJA1 und GJB4 (2. Schritt) erfolgte nach dem Prinzip der Polymerase-Chain-Reaction (PCR) bzw. Sanger-Sequenzierung der codierenden Regionen, Exon-Intron-Grenzen sowie der Splicing-Stellen unter Verwendung exonflankierender Oligonukleotid-Primer (PCR-Bedingungen und Reaktionskit in der Original-Publikation bzw. online im Supplementary Material aufgeführt). Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte gemäß Protokoll (QIAquick PCR purification KIT, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) mit Visualisierung auf Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gelen. Die anschließenden Sequenzierungsschritte (Cycle-Sequencing, bidirectional DNA sequencing) erfolgten mittels ABI Big-Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) im Sequenz-Analyzer ABI Prism Genetic Analyzer 3100xl capillary sequencer (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Zur Auswertung wurde ein Abgleich mit der Referenzsequenz aus dem NCBI (National Center for Biotechnology Information) unter Verwendung der SEQUENCHER-Software (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA) durchgeführt und die detektierten Genveränderungen mit Mutationsdatenbanken (Humane Gene Mutation Database, HGMD), SNP-Datenbanken (short genetic variations, single-nucleotide-polymorphism database) abgeglichen.

Die Detektion von in der Literatur beschriebener Deletionen im GJB6-Gen (del(GJB6-D13S1830) und del(GJB6-D13S1854)) erfolgte gemäß Protokoll nach del Castillo et al. (Quellenangabe Nr. 26 und 34 in Original-Publikation).

Die statistische Auswertung erfolgte mittels MedCalc, Version 11.5.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

## Ergebnisse

Von den 211 genannten Patienten (ausschließlich der 23 vorab selektierten mit syndromaler oder exogener Ursache der Schwerhörigkeit) stellten sich 122 Patienten als sporadische Fälle gegenüber 66 multiplen intrafamiliären Kasuistiken mit zumindest einem betroffenen Verwandten 1. Grades dar. Darunter zeigten sich 10 Patienten mit milder, 79 mit mäßiggradiger sowie 39 mit schwergradiger und 60 mit an Taubheit grenzender Schwerhörigkeit, welche in den meisten Fällen bilateral und symmetrisch ohne Zeichen der Progredienz auftrat. Lediglich 16 Patienten wiesen eine Progredienz der Schwerhörigkeit auf gegenüber 31 Fällen mit asymmetrischem Hörverlust (vgl. auch Figure 1 der Original-Publikation).

Zur Evaluation der Heterozygoten-Frequenz erbrachte die Untersuchung von 150 gesunden Kontrollprobanden den Nachweis der (häufigen) 35delG-Mutation im GJB2-Gen in 4 Personen, entsprechend einer Häufigkeit von 2,7% bzw. einer Prävalenz von 1/37 in der Referenzgruppe.

In der Zusammenschau konnten 18 verschiedene Mutationen in 90 Patienten nachgewiesen werden, wohingegen sich im Restkollektiv der 98 Patienten die Untersuchung von GJB2, GJB3, GJB6 und GJB1 keine mit Schwerhörigkeit assoziierte oder neue (bisher nicht beschriebene) Mutation nachweisen ließ (vgl. Table 2 der Original-Publikation).

In der angeschlossenen sequenziellen Untersuchung dieser Patienten für SLC26A4, DFNB59, GJA1 und GJB4 zeigten sich im SLC26A4-Gen zwei Sequenzveränderungen mit einer Splicing-Stelle und einer intronischen Genveränderung (vgl. Table 3 der Original-Publikation). Darüberhinaus wurden 22 verschiedene Polymorphismen (SNPs), welche in der dbSNP-Datenbank registriert sind, detektiert.

Mutationen, die mit nicht-syndromaler Schwerhörigkeit assoziiert sind (Connexin deafness homepage, <http://davinci.crg.es/deafness>) wurden als pathogen eingestuft, bei bislang nicht in der Literatur oder Mutations-Datenbanken beschriebenen Sequenzveränderungen mit unklarer Pathogenität wurde ein Abgleich der entsprechenden Sequenzregion in Bezug auf die Konservierung im Vergleich verschiedener Spezies durchgeführt (BLAT genome browser, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>).

Im Folgenden wird auf die Resultate der einzelnen, in dieser Studie untersuchten Gene eingegangen.

## GJB2

Die mit Abstand häufigste Mutation innerhalb der deutschen Bevölkerung ist die Deletion an Stelle c.35delG, welche in 65 Patienten detektiert wurde, entsprechend einer Mutationshäufigkeit von 29,2% (110/376 Allele) mit 45 homozygoten (23,4%) und 12 compound-heterozygoten (6,3%) Patienten. In 8 Patienten ließ sich neben einer singulären 35delG-Variante auf einem Allel keine zweite Mutation im GJB2-Gen nachweisen. 2 Patienten wiesen eine Homozygotie für Non-35delG-Mutationen auf (1,1%) neben zwei weiteren Patienten mit einer singulären Non-35delG-Mutation, wohingegen in 119 Patienten kein Nachweis einer Sequenzveränderung im GJB2-Gen gelang (hierzu vgl. auch Table 1 und Table 2 der Original-Publikation).

Zur Erstellung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation wurde die Verteilung des Mutationsspektrums auf das Ausmaß der Schwerhörigkeit extrapoliert (hierzu vgl. Figure 2 der Original-Publikation). Dabei ließ sich keine Mutation im GJB2-Gen bei den Patienten mit milder Schwerhörigkeit nachweisen. Unter Verwendung des Chi-Quadrat-Tests zeigte sich eine signifikante Veränderung im Vergleich des Patientenkollektivs von milder bzw. mäßiggradiger Schwerhörigkeit (14 von 89 Patienten, (15,7%)) gegenüber 45 Patienten (45,5%) aus den verbliebenen 99 Patienten mit schwerer bzw. an Taubheit grenzender Schwerhörigkeit, welche ebenfalls biallelische Mutationen im GJB-Gen aufzeigten. Zudem erbrachte die Auswertung den Hinweis, dass Patienten mit homozygoter 35delG-Mutation eine signifikant gravierendere Schwerhörigkeit als solche mit einer 35delG/non-35delG bzw. non-35delG/non-35delG Allelvariante aufweisen.

Bei der Diskriminierung der Mutationsrate und phänotypischen Konstellation zwischen intrafamiliären (35) und sporadischen Fällen (32) ergaben sich im direkten Vergleich keine signifikanten Unterschiede. Allerdings zeigten sich in der genealogischen Auswertung von zwei intrafamiliären Kasuistiken eine phänotypische Varianz bei gleichem Genotyp. Jeweils 3 der vier Kinder mit identischem Genotyp wiesen eine schwere bis an Taubheit grenzende Schwerhörigkeit auf, welche mit Cochlea-Implantaten versorgt wurde, wohingegen beim vierten Kind in beiden Familien lediglich eine milde Form der Schwerhörigkeit bekannt ist, welche mit Hörgeräten ausgeglichen wurde (hierzu vgl. auch Figure 3 der Original-Publikation).

## GJB6

Die Untersuchung des GJB6-Gens (codierende Regionen, Exon-Intron-Grenzen, 2 Deletionen) erbrachte den Nachweis von 3 unterschiedlichen, bisher nicht beschriebener Sequenzveränderungen in 3 Patienten (vgl. Table 2 der Original-Publikation), jedoch in heterozygoter Form ohne Nachweis einer zweiten Mutation (auch nicht in den anderen Genen), so dass sich Hinweise für eine digenische Vererbung ebenfalls nicht ergaben. Diese Sequenzveränderungen ließen sich auch im Kontrollkollektiv nicht nachweisen.

## GJB1 und GJB3

Auch im GJB3-Gen ließen sich 3 Sequenzveränderungen (vgl. Table 2) nachweisen, welche bisher nicht in der Literatur beschrieben wurden, sich jedoch auch im Kontrollkollektiv nicht detektieren ließen. Die Untersuchung des GJB1-Gens verblieb sowohl in 188 Patienten wie auch in 150 Kontrollen ohne Nachweis einer Sequenzveränderung.

Im Anschluss hierzu wurde sequenziell die Testung von SLC26A4, GJA1, GJB4 und DFNB59 (= PJVK) in 39 Patienten, welche eine wildtypische oder heterozygote Sequenz in den bisher beschriebenen Genen aufwiesen, durchgeführt.

## SLC26A4

Bei fehlendem Nachweis einer Mutation in den codierenden Regionen des SLC26A4-Gens konnte in zwei Geschwistern eine in der Literatur beschriebene Splicing-Variante an Position c.1001+1G>A (auch als IVS8+1G>A nach alter Nomenklatur) nachgewiesen werden. Eine weiterführende klinische Untersuchung dieser Patienten erbrachte einen erweiterten vestibulären Aquädukt (EVA) in einem der beiden Geschwister, was mit der Beschreibung in vorhergehenden Studien korreliert, dass bei einzelnen Patienten das klinisch offensichtliche Symptom der Hörverlust ist und ein EVA erst im Verlauf festgestellt wird, sofern entsprechende Untersuchungen angeschlossen werden.

Eine intronische Mutation mit unklarer Pathogenität konnte an Position c.1544+9C>T detektiert werden, welche bislang in der Literatur nicht beschrieben ist, jedoch ein Nukleotidaustausch von C>G an derselben Position. Dieser wird laut HGMD-Datenbank als signifikante Splicing-Variante in Verbindung mit einem Pendred-Syndrom eingestuft.

GJA1, GJB4 und DFNB59 (PJVK)

Neben 4 in der NCBI-Datenbank registrierten single nucleotid polymorphisms (SNPs) konnten keine mit Schwerhörigkeit assoziierten Sequenzveränderungen in diesen Genen isoliert werden.

Probatorisch wurde die Testung von GJB2, GJB3, GJB6 und GJB1 in den zunächst selektierten 23 Patienten mit syndromaler bzw. exogen assoziierter Schwerhörigkeit veranlasst, dabei zeigten sich zwei Patienten mit einseitiger Schwerhörigkeit heterozygot für die beschriebene (häufige) 35delG-Sequenzveränderung im GJB2-Gen, zudem zeigte sich ein weiterer Patient mit Zustand nach Neugeborenen-Meningitis heterozygot für eine c.682-683insA Mutation im GJB6-Gen.

## Diskussion

Die Prädominanz von Mutationen im GJB2-Gen bei autosomal-rezessiv vererbter nicht-syndromaler Schwerhörigkeit wurde bereits in zahlreichen Studien aufgeführt. In diesem Zusammenhang wurden die entsprechenden Heterozygotenfrequenzen in Europa und speziell Deutschland mit einer Prävalenz von bis 1/50 angegeben. In unserer Studie zeigte sich eine Prävalenz von 1/37 bzw. eine Frequenz von 2,7%, welche im Vergleich zu anderen deutschen Studien mit Frequenzen zwischen 0,4% und 1,58% bemerkenswert hoch ausfällt. In der Erwartungshaltung einer relativ hohen Mutationsrate im GJB2-Gen, speziell bezüglich der 35delG-Mutation mit hier nachgewiesener Frequenz von 29,2% findet sich eine Häufigkeit in vergleichbarer Höhe auch in anderen Studien.

Zusammenfassend konnten in 59 (31,3%) aus 188 Patienten pathogene Mutationen im GJB2-Gen nachgewiesen werden, vermehrt bei Kasuistiken mit intrafamiliärer Schwerhörigkeit (43,9%) gegenüber sporadischen Fällen (24,6%). In Anbetracht der Tatsache, dass 78,9% der GJB2-assoziierten Schwerhörigkeits-Fälle mit der häufigen 35delG-Mutation in Verbindung gebracht werden, muss die diagnostische Wertigkeit einer Untersuchung des GJB2-Gens innerhalb der deutschen Population, nicht nur in familiären, sondern auch in sporadischen Fällen ausdrücklich betont werden.

Zumal allgemein postuliert wird, dass GJB2 für bis zu 50% aller genetisch bedingten Schwerhörigkeits-/Taubheitssyndrome verantwortlich ist, muss in Erwägung gezogen werden, dass der in unserer Studie erbrachte (im internationalen Vergleich relativ niedrige) Prozentsatz von 31,3% mit unterschiedlicher Wichtung von Einzelfaktoren im Studiendesign zusammenhängen kann. Ein Vergleich mit anderen Studien und deren Mutationsdetektionsraten wird im Hinblick auf die Variabilität des Studienaufbaus, die lokoregionären demographischen Einflüsse sowie Ausmaß bzw. Durchführung der Analysen erschwert. Gemessen an der von Studien im deutschen Raum angesetzten Raten von zwischen 6,4% und 16,7% für Patienten mit biallelischen Mutationen im GJB2-Gen erscheint der von uns erbrachte Prozentsatz von 31,3% relativ hoch, so dass die Assoziation von GJB2 mit nicht-syndromaler Schwerhörigkeit in Deutschland etwas überbewertet imponiert, jedoch nach wie vor die führende Ursache für Schwerhörigkeits-/Taubheitssyndrome mit genetischer Grundlage ist.

Die im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant gesteigerte Rate an monoallelischen 35delG-Mutationsträgern im Patientenkollektiv führt zu der Annahme, dass möglicherweise eine zweite Mutation im GJB2-Gen oder einem anderen Gen, welche durch direkte Sequenzierung nicht erfasst wird (Mutation in der Promoter-Region, intronische Mutation oder Splicing-Mutation) kausativ zur Ausbildung des klinischen Bildes der Schwerhörigkeit beiträgt. Einschlägige Studien (Pollak et al., Nr. 48 der Literaturangaben in der Original-Publikation) konnten jedoch keine Sequenzveränderungen in der Promoter-Region in GJB2 detektieren, während Matos et al. (Nr. 49) eine basale Promotor-Mutation nachwies, welche die Promoter-Aktivität deaktiviert. Hinzu kommt, dass eine (in den meisten Instituten übliche) standardisierte PCR-Amplifikation der codierenden Region des Exon 2 im GJB2-Gen große Deletionen ebensowenig erfasst wie auch Variationen in der Promoter-Region des GJB2-Gens, welche möglicherweise die hohe Rate monoallelischer Patienten erklären könnten.

Hinweise für einen digenischen Vererbungsmodus der Schwerhörigkeit, speziell der in der Literatur mehrmals beschriebenen GJB2/GJB6-kombinierten Deletionen del(GJB6-D13S1830) und del(GJB6-D13S1854) ergaben sich im vorliegenden Patientenkollektiv nicht.

Die beschriebene Mutation V37I im GJB2-Gen konnte in einem Patienten mit milder Schwerhörigkeit in homozygoter Allelkombination detektiert werden, passend zu der nach Pollak et al. erwähnten Tatsache, dass diese zumeist mit relativ milder Schwerhörigkeit in Verbindung gebracht wird und in Einzelfällen mit reduzierter Penetranz nicht bemerkt wird.

In Bezug auf die Erstellung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation, insbesondere der 35delG-Mutation im GJB2-Gen zeigte sich, dass diese signifikant mit einer schwergradigen bzw. an Taubheit grenzenden Schwerhörigkeit assoziiert ist (Chi-Quadrat-Test), zumal sich im Patientenkollektiv mit milder Schwerhörigkeit keine Mutation im GJB2-Gen detektieren ließ. Dies unterstützt die Annahme, dass der Nachweis einer pathogenen Mutation insbesondere bei Patienten mit schwergradiger bzw. an Taubheit grenzender Schwerhörigkeit wahrscheinlicher ist. Dennoch sollten Patienten mit leichtgradiger Schwerhörigkeit nicht allein aus diesem Grund von einer molekulargenetischen Untersuchung ausgeschlossen werden.

Eine eindeutige Korrelation zwischen einer bestimmten Mutation und einer entsprechenden phänotypischen Ausprägung, welche im Rahmen einer prädiktiven genetischen Beratung von

betroffenen Eltern eminent hilfreich wäre, lässt sich im Einzelfall nicht erstellen. Hierzu müssen die in dieser Studie beschriebenen Kasuistiken von intrafamiliärer Schwerhörigkeit erwähnt werden. Bei identischem Genotyp von jeweils vier Geschwistern zeigte sich dennoch eine phänotypische Variabilität mit milder Schwerhörigkeit in einem Kind, während die drei Geschwister eine schwergradige bzw. an Taubheit grenzende Schwerhörigkeit zeigten. Es ist anzunehmen, dass das klinische Bild und die Entwicklung von schwerhörigen Patienten, auch bei intrafamiliären Fällen, durch Umweltfaktoren oder möglicherweise andere genetische Faktoren beeinflusst werden, die nicht in erster Linie mit einem Hörverlust bzw. einem Schwerhörigkeitssyndrom assoziiert werden.

Diese Annahme kann auch für das folgende Ergebnis der vorliegenden Studie geltend gemacht werden. Interessanterweise ließen sich auch in den primär aus Gründen einer offenbar syndromalen oder exogenen Schwerhörigkeit selektierten 23 Patienten in 3 Fällen eine Sequenzveränderung nachweisen, speziell in 2 Fällen die häufige 35delG-Mutation im GJB2-Gen sowie im dritten Fall eine Insertion im GJB6-Gen (c.682-683insA). In Anbetracht der hohen Heterozygotenfrequenz der 35delG-Mutation in der Normalbevölkerung muss ein Zufallsereignis in Erwägung gezogen werden, der Sachverhalt kann jedoch auch als Hinweis gewertet werden, dass Gene in Verbindung mit nicht-syndromaler Schwerhörigkeit auch in Fällen von syndromalen oder exogen zugeschriebenen Schwerhörigkeits-/Taubheitssyndromen involviert sind.

Unter der Annahme einer möglichen Interaktion von Sequenzveränderungen im GJB1- und GJB3-Gen bei entsprechenden Expressionsprofilen in der Entwicklung der Hörschnecke am Mausmodell, konnte in keinem der Patienten eine homozygote oder compound heterozygote Sequenzveränderungen in diesen Genen detektiert werden, ebensowenig in GJB6, SLC26A4, DFNB59 und GJA1, welche die diagnostische Lücke bei molekulargenetischen Testungen von schwerhörigen Patienten erklären könnten. Die Rolle einzelner Sequenzveränderungen im GJB3-Gen (K56Q, R101Q und R106H) und GJB6-Gen (V190A, M203V, 682insA), welche in entsprechenden Datenbanken (HGMD und dbSNP) oder in der Literatur nicht beschrieben worden sind, bleibt unklar, zumal sich keine zweite Sequenzveränderung nachweisen ließ, welche bei autosomal-rezessivem Erbgang einen möglichen Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp erklären könnte.

In der Untersuchung des SLC26A4-Gens, welche in einem zweiten Schritt bei wildtypischer oder heterozygoter Sequenzveränderung im Patientenkollektiv durchgeführt wurde, wiesen zwei Geschwister eine heterozygote Mutation an Position c.1001+1G>A (Splicing-Stelle) auf. Diese Mutation spielt im Vergleich zur kaukasischen Bevölkerung im asiatischen Raum eine größere Rolle bei Schwerhörigkeitssyndromen. Mutationen in Splicing-Stellen des SLC26A4-Gens werden (auch bei Heterozygotie) mit einem erweiterten vestibulären Aquädukt assoziiert, wie dies auch in unserer Studie der Fall ist. In Übereinstimmung mit einer anderen europäischen Studie in Frankreich (Albert et al., Quellenangabe Nr. 64 der Originalpublikation) sind wir ebenfalls der Ansicht, dass die Rolle von SLC26A4 bei nicht-syndromaler Schwerhörigkeit nicht unterschätzt werden sollte und auch bei der kaukasischen Bevölkerung im Einzelfall berücksichtigt werden sollte. Ähnlich wie bei GJB2 wird in vorhergehenden Studien ein hoher Prozentsatz von schwerhörigen Patienten mit Heterozygotie für eine Mutation im SLC26A4-Gen beschrieben, so dass die Frage aufkommt, inwieweit diese monoallelischen Sequenzveränderungen als pathogen eingestuft werden können, speziell im Fall von Patienten mit Schwerhörigkeit und erweitertem vestibulären Aquädukt.

Anzumerken ist, dass eine Sequenzanalyse mittels standardisierter PCR-Reaktion große Deletionen von Exonen oder Genregionen, welche für die Regulation und Translation (z.B. Promoter- und Enhancer-Region) zuständig sind, nicht erfasst. In der Literatur werden Fälle von schwerhörigen Patienten mit erweitertem vestibulären Aquädukt beschrieben, welche eine singuläre Mutation sowohl im SLC26A4-Gen als auch im FOXI1-Gen aufzeigten, wobei letztgenanntes Gen als Transkriptions-Aktivator-Gen für SLC26A4 fungiert. Diese Tatsache unterstützt die Vermutung, dass SLC26A4 gerade in Fällen mit nicht-syndromaler Schwerhörigkeit und monoallelischen Mutationen involviert ist. Bei geschätzten 6-15% von schwerhörigen Patienten in der kaukasischen Bevölkerung mit erweitertem vestibulären Aquädukt oder Mondini-Dysplasie wird die These unterstützt, dass die molekulargenetische Untersuchung von SLC26A4 auch in Fällen von offenbar nicht-syndromaler Schwerhörigkeit angeboten werden sollte, um eine höhere Detektionsrate an Mutationen zu erreichen und (im Falle eines positiven Mutationsstatus) weiterführende klinische Untersuchungen anzustreben (z.B. bildgebende Verfahren zur Frage eines erweiterten vestibulären Aquädukts, Funktionsstörungen der Schilddrüse uvm.).

Zusätzlich wurde im SLC26A4-Gen in einem Patienten die Sequenzveränderung an Position IVS13+9C>T detektiert, welche in der Literatur als intronische Variante beschrieben wird. Jedoch wird an selber Position ein Nukleotidaustausch von C>G als signifikante Splicing-

Variante (HGMD-Datenbank) angesehen. Dies impliziert die Frage, ob eine unterschiedliche Sequenzveränderung an gleicher Stelle denselben pathogenen Effekt hat.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass eine Korrelation von Genotyp zu Phänotyp bei Schwerhörigkeits-/ Taubheitssyndromen, speziell für GJB2 und SLC26A4 mit hoher Variabilität vergesellschaftet ist und in Hinblick auf die Konsequenzen bezüglich prognostischer Aussagen und genetischer Beratung von betroffenen Patienten bzw. Familien zurückhaltend interpretiert werden sollte.

Die Behandlung von Patienten mit Schwerhörigkeits-/Taubheitssyndromen sollte in interdisziplinärer Zusammenarbeit von Hals-Nasen-Ohren-Ärzten mit Schwerpunkt Audiologie und Phoniatrie sowie Humangenetikern und Sprachtherapeuten erfolgen.

## Zusammenfassung

Um ein effektives molekulargenetisches Screening-Programm für hörgeschädigte Kinder aufzubauen, wurde eine Stufendiagnostik eingerichtet, welche in erster Linie die Untersuchung von GJB2, GJB3, GJB6 und GJB1 durch direkte Sequenzierung in einem dafür eingerichteten Patientenkollektiv beinhaltet. In einem zweiten Schritt wurde in einem Kollektiv von hierfür wildtypischen oder heterozygoten Patienten die Analyse von GJB4, GJA1, SLC26A4 und DFNB59 angeschlossen.

In unserem Kollektiv aus deutschen hörgeschädigten Patienten zeigten sich in 31,3% der Fälle Mutationen im GJB2-Gen als ursächlich für die diagnostizierte nicht-syndromale Schwerhörigkeit. Die hohe prozentuale Variabilität im direkten Vergleich mit anderen Studien muss unterschiedlichen Auswahlkriterien bzw. der jeweiligen Selektion von Patienten im Studiendesign zugeschrieben werden.

Die im GJB2-Gen am häufigsten detektierte Mutation (del35G) wird verstärkt mit dem klinischen Bild einer schwergradigen bzw. an Taubheit grenzenden Schwerhörigkeit assoziiert. Hinweise für einen digenischen Vererbungsmodus, speziell die bereits beschriebene Verbindung von GJB2 mit GJB6, ergaben sich im vorliegenden Patientenkollektiv nicht.

Bei Nachweis von lediglich 2 heterozygoten Mutationen im SLC26A4-Gen in 3 Patienten spielt das Pendred-Syndrom mit erweitertem vestibulären Aquädukt in der kaukasischen Bevölkerung eine untergeordnete Rolle, sollte jedoch speziell in Fällen mit bislang frustran verlaufender Mutationssuche in Erwägung gezogen werden.

Der Aufbau zusätzlicher Genanalysen (DFNB59, GJA1, GJB4) erbrachte keinen Nachweis von pathogenen Sequenzveränderungen, welche die zugrundeliegende Schwerhörigkeit erklären könnten. Letztendlich erscheint die Fokussierung auf GJB2 beim Mutationscreening von Patienten mit nicht-syndromaler Schwerhörigkeit am effektivsten.

Die Zielsetzung unserer Studie war, die Möglichkeiten eines genetischen Screenings von Patienten mit Schwerhörigkeitssyndromen hervorzuheben und insofern Hals-Nasen-Ohren-Ärzte zu ermutigen, betroffene Patienten und deren Familien auf die zunehmende Bedeutung genetischer Untersuchungen hinzuweisen und sie dementsprechend zu informieren, auch in dem Bewusstsein, dass die Familienplanung von Eltern mit betroffenen Kindern nicht unwesentlich durch das Risiko des Wiederauftretens beeinflusst wird, so dass eine entsprechende genetische Beratung von Eltern mit schwerhörigen Kindern in jedem Fall empfehlenswert erscheint.

Angesichts der Tatsache, dass bei vielen schwerhörigen Patienten lediglich eine einzelne (heterozygote) Mutation nachgewiesen werden kann, sollte diesem Gesichtspunkt einer offenbar fehlenden Mutation auf dem anderen Allel im Rahmen weiterer Studien nachgegangen werden.

## Literaturverzeichnis

1. Kenneson, A., K. Van Naarden Braun and C. Boyle (2002) GJB2 (connexin 26) variants and nonsyndromic sensorineural hearing loss: a HuGE review. *Genet Med* 4(4) p. 258-274.
2. Buttross, S.L., J.G. Gearhart and J.E. Peck (1995) Early identification and management of hearing impairment. *Am Fam Physician* 51(6) p. 1437-1446, 1451-1432.
3. Ruben, R.J. (1993) Early identification of hearing impairment in infants and young children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 27(3) p. 207-213.
4. Mehl, A.L. and V. Thomson (2002) The Colorado newborn hearing screening project, 1992-1999: on the threshold of effective population-based universal newborn hearing screening. *Pediatrics* 109(1) p. E7.
5. Morton, C.C. and W.E. Nance (2006) Newborn hearing screening--a silent revolution. *N Engl J Med* 354(20) p. 2151-2164.
6. Smith RJH, H.M., Van Camp G. (1999 Feb 14 (updated 2010 Oct 14)) Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. *GeneReviews* (Internet) Seattle (WA): University of Washington, Seattle; .
7. Roizen, N.J. (1999) Etiology of hearing loss in children. Nongenetic causes. *Pediatr Clin North Am* 46(1) p. 49-64, x.
8. Yaeger, D., et al. (2006) Outcomes of clinical examination and genetic testing of 500 individuals with hearing loss evaluated through a genetics of hearing loss clinic. *Am J Med Genet A* 140(8) p. 827-836.
9. Marazita, M.L., et al. (1993) Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am J Med Genet* 46(5) p. 486-491.
10. Morton, N.E. (1991) Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci* 630 p. 16-31.
11. Hilgert, N., R.J. Smith and G. Van Camp (2009) Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res* 681(2-3) p. 189-196.
12. Yan, D. and X.Z. Liu (2008) Cochlear molecules and hereditary deafness. *Front Biosci* 13 p. 4972-4983.
13. Kanczuga-Koda, L., et al. (2004) Expression of connexins 26, 32 and 43 in the human colon--an immunohistochemical study. *Folia Histochem Cytobiol* 42(4) p. 203-207.
14. Rabionet, R., et al. (2002) Connexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders. *Trends Mol Med* 8(5) p. 205-212.
15. Liu, W., et al. (2009) Unique expression of connexins in the human cochlea. *Hear Res* 250(1-2) p. 55-62.
16. Kikuchi, T., et al. (1995) Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat Embryol (Berl)* 191(2) p. 101-118.
17. Kelley, P.M., E. Cohn and W.J. Kimberling (2000) Connexin 26: required for normal auditory function. *Brain Res Brain Res Rev* 32(1) p. 184-188.
18. Mahdiah, N. and B. Rabbani (2009) Statistical study of 35delG mutation of GJB2 gene: a meta-analysis of carrier frequency. *Int J Audiol* 48(6) p. 363-370.
19. Gasparini, P., et al. (2000) High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *Genetic Analysis Consortium of GJB2 35delG*. *Eur J Hum Genet* 8(1) p. 19-23.
20. Van Eyken, E., et al. (2007) The contribution of GJB2 (Connexin 26) 35delG to age-related hearing impairment and noise-induced hearing loss. *Otol Neurotol* 28(7) p. 970-975.
21. Denoyelle, F., et al. (1998) Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* 393(6683) p. 319-320.
22. Estivill, X., et al. (1998) Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351(9100) p. 394-398.
23. Dalamon, V., et al. (2010) GJB2 and GJB6 genes: molecular study and identification of novel GJB2 mutations in the hearing-impaired Argentinean population. *Audiol Neurootol* 15(3) p. 194-202.
24. Putcha, G.V., et al. (2007) A multicenter study of the frequency and distribution of GJB2 and GJB6 mutations in a large North American cohort. *Genet Med* 9(7) p. 413-426.
25. Pallares-Ruiz, N., et al. (2002) A large deletion including most of GJB6 in recessive non syndromic deafness: a digenic effect? *Eur J Hum Genet* 10(1) p. 72-76.
26. del Castillo, F.J., et al. (2005) A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(GJB6-d13s1854), found in trans with mutations in the GJB2 gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *J Med Genet* 42(7) p. 588-594.
27. Lee, K.Y., et al. (2008) Molecular analysis of the GJB2, GJB6 and SLC26A4 genes in Korean deafness patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 72(9) p. 1301-1309.
28. Yuan, Y., et al. (2009) Comprehensive molecular etiology analysis of nonsyndromic hearing impairment from typical areas in China. *J Transl Med* 7 p. 79.
29. Collin, R.W., et al. (2007) Involvement of DFNB59 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *Hum Mutat* 28(7) p. 718-723.

30. Hashemzadeh Chaleshtori, M., et al. (2007) Novel mutations in the pejvakin gene are associated with autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Iranian families. *Clin Genet* 72(3) p. 261-263.
31. Neumann, K., et al. (2009) Quality assurance of a universal newborn hearing screening. Recommendations of the German Society of Phoniatrics and Pediatric Audiology. *HNO* 57(1) p. 17-20.
32. M. Mazzoli, G.V.C., V. Newton, N. Giabini, F. Declau and A. Parving (2003) Gendef: recommendations for the description of genetic and audiological data for families with nonsyndromic hereditary hearing impairment. *Audiol Med* 1 (2003) p. pp. 148-150.
33. Margolis, R.H. and G.L. Saly (2008) Asymmetric hearing loss: definition, validation, and prevalence. *Otol Neurotol* 29(4) p. 422-431.
34. del Castillo, I., et al. (2002) A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 346(4) p. 243-249.
35. Wilch, E., et al. (2006) Expression of GJB2 and GJB6 is reduced in a novel DFNB1 allele. *Am J Hum Genet* 79(1) p. 174-179.
36. Frei, K., et al. (2004) Lack of association between Connexin 31 (GJB3) alterations and sensorineural deafness in Austria. *Hear Res* 194(1-2) p. 81-86.
37. Alexandrino, F., et al. (2004) Screening for mutations in the GJB3 gene in Brazilian patients with nonsyndromic deafness. *J Appl Genet* 45(2) p. 249-254.
38. Mhatre, A.N., E. Weld and A.K. Lalwani (2003) Mutation analysis of Connexin 31 (GJB3) in sporadic non-syndromic hearing impairment. *Clin Genet* 63(2) p. 154-159.
39. Yang, T., et al. (2007) Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). *Am J Hum Genet* 80(6) p. 1055-1063.
40. Yong, A.M., et al. (2001) Two Chinese families with Pendred's syndrome--radiological imaging of the ear and molecular analysis of the pendrin gene. *J Clin Endocrinol Metab* 86(8) p. 3907-3911.
41. Petersen, M.B. and P.J. Willems (2006) Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *Clin Genet* 69(5) p. 371-392.
42. Tranebaerg, L. (2008) Genetics of congenital hearing impairment: a clinical approach. *Int J Audiol* 47(9) p. 535-545.
43. Kupka, S., et al. (2000) [Mutational analysis of the connexin26 gene in sporadic cases of moderate to profound deafness]. *HNO* 48(9) p. 671-674.
44. Frei, K., et al. (2005) GJB2 mutations in hearing impairment: identification of a broad clinical spectrum for improved genetic counseling. *Laryngoscope* 115(3) p. 461-465.
45. Kupka, S., et al. (2002) Frequencies of GJB2 mutations in German control individuals and patients showing sporadic non-syndromic hearing impairment. *Hum Mutat* 20(1) p. 77-78.
46. Gabriel, H., et al. (2001) Mutations in the connexin26/GJB2 gene are the most common event in non-syndromic hearing loss among the German population. *Hum Mutat* 17(6) p. 521-522.
47. Zoll, B., et al. (2003) Evaluation of Cx26/GJB2 in German hearing impaired persons: mutation spectrum and detection of disequilibrium between M34T (c.101T>C) and -493del10. *Hum Mutat* 21(1) p. 98.
48. Pollak, A., et al. (2008) GJB2 and hearing impairment: promoter defects do not explain the excess of monoallelic mutations. *J Med Genet* 45(9) p. 607-608.
49. Matos, T.D., et al. (2007) A novel hearing-loss-related mutation occurring in the GJB2 basal promoter. *J Med Genet* 44(11) p. 721-725.
50. Gualandi, F., et al. (2002) Exploring the clinical and epidemiological complexity of GJB2-linked deafness. *Am J Med Genet* 112(1) p. 38-45.
51. Marlin, S., et al. (2005) GJB2 and GJB6 mutations: genotypic and phenotypic correlations in a large cohort of hearing-impaired patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 131(6) p. 481-487.
52. Batissoco, A.C., et al. (2009) Prevalence of GJB2 (connexin-26) and GJB6 (connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. *Ear Hear* 30(1) p. 1-7.
53. 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) p. 53-62.
54. Frei, K., et al. (2004) Screening for monogenetic del(GJB6-D13S1830) and digenic del(GJB6-D13S1830)/GJB2 patterns of inheritance in deaf individuals from Eastern Austria. *Hear Res* 196(1-2) p. 115-118.
55. Pollak, A., et al. (2007) M34T and V37I mutations in GJB2 associated hearing impairment: evidence for pathogenicity and reduced penetrance. *Am J Med Genet A* 143A(21) p. 2534-2543.
56. Cryns, K., et al. (2004) A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. *J Med Genet* 41(3) p. 147-154.
57. Oguchi, T., et al. (2005) Clinical features of patients with GJB2 (connexin 26) mutations: severity of hearing loss is correlated with genotypes and protein expression patterns. *J Hum Genet* 50(2) p. 76-83.
58. Liu, X.Z., et al. (2005) Audiological features of GJB2 (connexin 26) deafness. *Ear Hear* 26(3) p. 361-369.

59. Snoeckx, R.L., et al. (2005) GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet* 77(6) p. 945-957.
60. Toth, T., et al. (2007) Coincidence of mutations in different connexin genes in Hungarian patients. *Int J Mol Med* 20(3) p. 315-321.
61. Salvinelli, F., et al. (2004) Hearing loss associated with 35delG mutation in Connexin-26 (GJB2) gene: audiogram analysis. *J Laryngol Otol* 118(1) p. 8-11.
62. Lopez-Bigas, N., et al. (2002) Expression profiles of the connexin genes, Gjb1 and Gjb3, in the developing mouse cochlea. *Gene Expr Patterns* 2(1-2) p. 113-117.
63. Wang, Q.J., et al. (2007) A distinct spectrum of SLC26A4 mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct in China. *Clin Genet* 72(3) p. 245-254.
64. Albert, S., et al. (2006) SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur J Hum Genet* 14(6) p. 773-779.
65. Azaiez, H., et al. (2007) Genotype-phenotype correlations for SLC26A4-related deafness. *Hum Genet* 122(5) p. 451-457.
66. Pryor, S.P., et al. (2005) SLC26A4/PDS genotype-phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. *J Med Genet* 42(2) p. 159-165.
67. Campbell, C., et al. (2001) Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* 17(5) p. 403-411.
68. Antonelli, P.J., A.E. Varela and A.A. Mancuso (1999) Diagnostic yield of high-resolution computed tomography for pediatric sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 109(10) p. 1642-1647.
69. Cross, N.C., et al. (1999) Computed tomography evaluation of the inner ear as a diagnostic, counselling and management strategy in patients with congenital sensorineural hearing impairment. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 24(3) p. 235-238.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein Dank gilt besonders Prof. Dr. Charalampos Aslanidis, welcher dieses für mich persönlich höchst interessante Promotionsthema bereitgestellt hat und auch die Erstgutachterschaft übernommen hat. Hervorzuheben ist besonders die exzellente Betreuung, welche ihresgleichen sucht.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Jürgen Strutz für die Übernahme der Zweitgutachterschaft.

Bedanken möchte ich mich auch bei den technischen Assistentinnen der Molekularbiologie am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, speziell bei Melanie Schlangstedt, welche mir im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite stand und den Laboralltag häufig auf humorvolle Weise unvergesslich machte.

Dankend erwähnen möchte ich auch die Mitarbeiter des Instituts für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, sowohl in der direkten Patientenversorgung als auch in der Audiologie, ebenso alle Patienten, ohne deren Einwilligung und Mitarbeit diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern, welche mir durch ihre immerwährende Unterstützung, ihr Verständnis und ihren Rückhalt das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben.

## Lebenslauf

Name, Vorname	Beck, Christopher
Geburtsdatum, - ort	22.05.1985, Viechtach
Eltern:	Beck, Siegfried Beck, Elisabeth, geb. Bauer
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Schule	
1991 – 1995	Grundschule Viechtach
1995 – 2004	Dominicus-von-Linprun Gymnasium Viechtach Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Studium	
10/2004 – 11/2010	Studium der Humanmedizin Universität Regensburg Abschluss: Staatsexamen (Erster + Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung)
Beruflicher Werdegang	
02/2011 – aktuell	Assistenzarzt am Pathologischen Institut der Universität Würzburg

