

**Aus der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Tübingen
Abteilung Allgemeine Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. mult. H. P. Zenner**

**Klinische und molekulargenetische
Analyse monozygoter Zwillinge mit
stapes gusher-Syndrom
(*POU3F4*)**

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

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

**vorgelegt von
Na-Ri Oh**

aus

Nastätten

2003

Dekan: Prof. Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. H. P. Zenner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. N. Blin

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen und Worterklärungen	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Hereditäre Schwerhörigkeit	1
1.1.1 X-chromosomal vererbte Formen von Schwerhörigkeit (DFN)	2
Tabelle 1: Bekannte Loci für die nicht-syndromalen X-chromosomalen Schwerhörigkeiten (DFN)	3
1.1.2 <i>Stapes gusher</i> -Syndrom (DFN3)	3
1.2 Transkriptionsfaktoren	4
1.2.1 <i>POU3F4</i>	5
1.3 Fragestellung	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Probandenkollektiv	8
2.2 Allgemeine Materialien	8
2.3 Molekularbiologische Methoden	8
2.3.1 Isolation und Aufarbeitung genomischer DNA aus Frischblut.....	8
2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA.....	9
2.3.3 Southern Blot.....	10
2.3.3.1 Herstellung der Sonde: Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	11
2.3.3.2 Herstellung des Southern Blots	12
2.3.3.2.1 Verdau der genomischen DNA mit <i>EcoRI</i>	12
2.3.3.2.2 Transfer (Southern Blot)	12
2.3.3.3 Hybridisierung des Southern Blots	12
2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	13
2.3.4.1 Genotypisierung auf dem ABI PRISM® 377	15
2.3.4.2 Sequenzierung der kodierenden Region des <i>POU3F4</i> -Gens und Deletionsanalyse der nicht-kodierenden Region.....	15
2.3.5 DNA-Gelelektrophorese	17

2.3.6	Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	18
2.3.7	Sequenzierung	18
2.3.7.1	Vorbereitung der Proben	19
2.3.7.2	Vorbereitung des Gels.....	20
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Klinik.....	22
3.1.1	Tonschwellenaudiometrie	22
	Abb. 1: Audiogramme von OJ im Alter von fünf (obere Audiogramme) und acht Jahren (untere Audiogramme)	23
	Abb. 2: Audiogramme von PJ im Alter von vier (obere Audiogramme) und acht Jahren (untere Audiogramme)	24
	Abb. 3: Audiogramme von OJ (obere Audiogramme) und PJ (untere Audiogramme) im Alter von 11 Jahren (Zustand nach Hörgeräteversorgung).....	25
3.1.2	Computertomographie (CT).....	25
	Abb. 4: CT-Befund von OJ	26
3.1.3	Tympanoskopie	26
3.1.4	Pädiatrische und neurologische Untersuchung	26
3.2	Molekulargenetik.....	27
3.2.1	STR-Analysen als Nachweis für die Monozygotie	27
	Tabelle 2: Markerdaten und Ergebnisse der Genotypisierung der Zwillingbrüder (OJ, PJ), deren Mutter (BJ) sowie einer Kontrolle.....	27
	Abb. 5: Ergebnisse der Genotypisierung der Zwillingbrüder (OJ, PJ), deren Mutter (BJ) sowie einer Kontrolle anhand dreier Mikrosatellitenmarker	28
3.2.2	Southern Blot.....	29
	Abb. 6: Ergebnisse des Southern Blots.....	29
3.2.3	Etablierung der Exon-PCR und Sequenzierung	29
	Abb. 7: PCR-Fragmente der kodierenden Region des <i>POU3F4</i> -Gens der analysierten Personen.....	30
3.2.4	Überprüfung der nicht-kodierenden Region.....	30
	Abb. 8: Beispiele für das Ergebnis dreier verwendeter Mikrosatellitenmarker A) Marker DXS26, B) Marker 71:21, C) Marker DXS995.....	31
	Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse für alle analysierten Mikrosatellitenmarker	31
	Abb.9: Übersicht über die detektierten Deletionen im nicht-kodierenden Bereich proximal des <i>POU3F4</i> -Gens	32

4 Diskussion	33
4.1 Klinik	33
4.1.1 Tonschwellenaudiometrie	34
4.1.2 Computertomographie (CT).....	34
4.1.3 Tympanoskopie	35
4.1.4 Pädiatrische und neurologische Untersuchung	35
4.1.5 Zusammenfassung der klinischen Befunde	35
4.2 Molekulargenetik.....	36
4.2.1 Nachweis der Monozygotie	36
4.2.2 Southern Blot.....	37
4.2.3 Sequenzierung	37
4.2.4 Überprüfung der nicht-kodierenden Region proximal des <i>POU3F4</i> -Gens	38
Abb. 9: Vergleich einiger von de Kok et al., 1995 beschriebener Mutationen (2-7) der 5'-Region des <i>POU3F4</i> -Gens mit den in dieser Arbeit detektierten Deletionen (1)	39
4.3 Schlussfolgerung	40
5 Zusammenfassung	41
6 Literatur	42
7 Anhang	47
7.1 Allgemeine Materialien	47
7.1.1 Laborgeräte	47
7.1.2 Glas- und Kunststoffwaren	48
7.1.3 Sonstige Materialien	48
7.1.4 Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten.....	49
7.1.5 Weitere Chemikalien	49
7.1.6 Enzyme für molekularbiologische Arbeiten.....	50
7.1.7 Puffer und Stammlösungen	50
7.1.8 Oligonukleotidprimer.....	52
7.2 Genregion Xq21.2.....	53
7.3 Nukleotidsequenz <i>POU3F4</i>	53
7.4 Danksagung.....	54
7.5 Curriculum vitae.....	55

Abkürzungen und Worterklärungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cen	Zentromer
cM	Centimorgan
CT	Computertomographie
dd	doppelt-deionisiert
d.h.	das heisst
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
kb	Kilobasen
Mb	Megabasen
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferter Natriumchlorid-Puffer)
PCR	polymerase chain reaction (Polymeraseketten-Reaktion)
q	langer Arm eines Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SSC	standard saline citrate (Natriumchlorid-Citrat-Puffer)
STS	sequence-tagged site
T	Thymin
TE	Tris-EDTA-Puffer
tel	Telomer
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
Σ	Summe

Ansonsten gelten die SI-Einheiten.

Die Vielzahl von Fachtermini, die überwiegend aus dem Englischen stammen, wurde dort, wo es für das Verständnis förderlich war, übersetzt. Die folgenden Begriffe wurden jedoch übernommen, da eine Übersetzung nicht sinnvoll erschien:

Primer	Oligonukleotid zur Initiation der enzymatischen DNA-Synthese
Repeat	Wiederholungssequenz von Nukleotiden

1 Einleitung

1.1 Hereditäre Schwerhörigkeit

Schwerhörigkeit stellt weltweit die häufigste sensorische Erkrankung des Menschen dar. Neben den durch exogene Faktoren ausgelösten Formen gibt es verschiedene genetisch bedingte Hörstörungen. Die Inzidenz beträgt etwa 1:1000 Geburten (de Kok *et al.*, 1995). Die hereditären Formen machen etwa 60%, die nicht genetisch bedingten Formen etwa 40% aller Hörstörungen aus. Dabei wird unter den hereditären Schwerhörigkeiten unterschieden zwischen familiären und sporadisch (d.h. genetisch bedingt, aber nicht familiär gehäuft) auftretenden Formen, wobei die familiären Formen mit etwa 60% die Mehrzahl der Fälle bilden.

Die verschiedenen Formen hereditärer Schwerhörigkeit werden nach der Art des Vererbungsmodus in autosomal-dominant (DFNA), autosomal-rezessiv (DFNB) und X-chromosomal (DFN) unterteilt. Einige Formen von Schwerhörigkeit werden ausserdem rein mitochondrial vererbt. Weiterhin werden syndromale Formen hereditärer Hörstörungen (d.h. Schwerhörigkeit, die mit anderen Krankheitssyndromen vergesellschaftet auftritt) von nicht-syndromalen Formen, die klinisch nur durch die Schwerhörigkeit in Erscheinung treten, unterschieden (Bergstrom *et al.*, 1971).

Mit 70% ist der Grossteil der angeborenen Formen von Hörstörungen nicht-syndromaler Natur. Unter den nicht-syndromalen Formen werden etwa 75% autosomal-rezessiv vererbt, die autosomal-dominanten Formen machen 10-20% aus, X-chromosomal vererbte Hörminderungen treten in 2-3% auf. Die seltenen mitochondrialen Formen bilden weniger als 1% aller nicht-syndromalen Schwerhörigkeitsformen (Rose, 1977; Fraser, 1971).

Innerhalb der letzten Dekade wurden erhebliche Fortschritte bei der Aufklärung der molekulargenetischen Grundlagen hereditärer Schwerhörigkeit gemacht. Es wurden fast 70 Genloci (d.h. bestimmte Chromosomenregionen, die in der Regel mehrere Gene enthalten) für nicht-syndromale hereditäre Schwerhörigkeit identifiziert (35 Loci für DFNA, 30 Loci für DFNB und 4 Loci für DFN) und 32 einzelne Schwerhörigkeitsgene (17 autosomal-dominante, 14 autosomal-rezessive und 1 X-chromosomales Gen) charakterisiert. Daneben wurden

ebenfalls verschiedene Formen mitochondrial vererbter Schwerhörigkeit beschrieben (van Camp und Smith, 2002). Es wird angenommen, dass weit über 100 verschiedene Gene mit hereditärer Schwerhörigkeit in Verbindung gebracht werden können; eine eindeutige Kopplung konnte bisher jedoch nur für weniger als 50 Genloci nachgewiesen werden.

Eine Form X-chromosomal vererbter Schwerhörigkeit, DFN3, wird durch Mutationen in und proximal des Gens, das für den Transkriptionsfaktor *POU3F4* kodiert, verursacht.

1.1.1 X-chromosomal vererbte Formen von Schwerhörigkeit (DFN)

Aufgrund des Vererbungsmodus sind in erster Linie Männer von X-chromosomal vererbten Formen von Schwerhörigkeit betroffen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch bei heterozygoten weiblichen Familienmitgliedern eine Schwerhörigkeit auftreten kann, wenn auch meist in abgeschwächter Form.

Die häufigste Form innerhalb der Gruppe der X-chromosomal vererbten Hörstörungen ist DFN3, das sogenannte *stapes gusher*-Syndrom. Bei den übrigen Formen (DFN1, 2, 4 und 6) konnten die zugrunde liegenden Gendefekte bis auf DFN1 (das zugehörige Gen wurde als DDP identifiziert) bisher noch nicht beschrieben werden (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Bekannte Loci für die nicht-syndromalen X-chromosomalen Schwerhörigkeiten (DFN)

Name	Lokalisation	Gen	Referenz
DFN 1*	Xq22	<i>TIMM8A</i>	Tranebjaerg <i>et al.</i> , 1995 Jin <i>et al.</i> , 1996
DFN 2	Xq22	unbekannt	Tyson <i>et al.</i> , 1996
DFN 3	Xq21.1	<i>POU3F4</i>	De Kok <i>et al.</i> , 1995
DFN 4	Xp21.1	unbekannt	Lalwani <i>et al.</i> , 1994 Pfister <i>et al.</i> , 1998
DFN 5	zurück- gezogen	unbekannt	
DFN 6	Xp22	unbekannt	Del Castillo <i>et al.</i> , 1996
DFN 7	zurück- gezogen		
DFN 8	vorgemerkt		

Van Camp & Smith, 2002

* DFN1 gehört zu den syndromalen Formen von Schwerhörigkeit und wurde fälschlicherweise ursprünglich als nicht-syndromal eingestuft

1.1.2 *Stapes gusher*-Syndrom (DFN3)

DFN3 oder *stapes gusher*-Syndrom ist die häufigste X-chromosomal vererbte Form hereditärer Schwerhörigkeit. DFN3 macht bis zu 0.5% aller Fälle schwerer kindlicher Schwerhörigkeit (Nance *et al.*, 1971) und bis zu 5% aller nicht-syndromalen Hörstörungen aus (Reardon, 1990).

Die betroffenen Individuen weisen meist einen kombinierten Hörverlust auf. Wie 1995 von Bitner-Glindzicz *et al.* beschrieben wurde, kann jedoch auch eine reine Schallempfindungsschwerhörigkeit ohne konduktive Komponente vorliegen. Ist eine konduktive Komponente vorhanden, ist sie in der Regel stärker vermindert im Tieftonbereich. Der Hörverlust ist meist progredient. Trotz des einheitlichen Krankheitsbeginns innerhalb der ersten Lebensdekade ist der Grad der Schwerhörigkeit interindividuell sehr unterschiedlich. Zusammenfassend liegt eine nicht-syndromale, prälinguale, progressive, kombinierte Form von Schwerhörigkeit vor.

Bei der klinischen Untersuchung zeigen sich im Computertomogramm charakteristischerweise ein erweiterter innerer Gehörgang (Glasscock, 1973) sowie ein Knochendefekt am Fundus des inneren Gehörganges (Phelps *et al.*, 1991)

mit einer kleinen Cochlea und unvollständiger Trennung der cochleären Windungen.

Der namensgebende *gusher* (engl. Schwall) erfolgt bei einer Stapedektomie (Entfernung des Stapes und Ersatz durch autologes Knorpeltransplantat) und beruht auf einer pathologischen Verbindung zwischen dem abnorm erweiterten inneren Gehörgang und dem Innenohr. Nach $F=p \cdot A$ (F: Kraft; p: Druck; A: Fläche) erhöht sich bei gleichbleibendem Liquordruck durch die vergrößerte Fläche zwischen Innenohr und innerem Gehörgang die auf die Stapesfussplatte wirkende Kraft. Bei einer Eröffnung der Fussplatte kommt es daher zu dem pathognomonischen Perilymphschwall.

DFN3 wird durch Mutationen im *POU3F4*-Gen bzw. in dessen regulatorischen DNA-Regionen verursacht. Bis heute wurden für dieses auf dem X-Chromosom lokalisierte Gen und dessen Promotorregion mehr als 20 Mutationen beschrieben (Van Camp und Smith, 2002).

1.2 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die aktivierend oder inhibitorisch auf die Transkription einzelner oder mehrere Gene einwirken. Dabei interagieren sie einerseits über spezielle Domänen (z.B. *Helix-loop-helix*-Motiv, Zink-Finger-Domäne) sequenzspezifisch mit bestimmten Bereichen der DNA, z.B. mit Promotoren, Enhancern oder Silencern, andererseits beeinflussen sie über Protein-Protein-Interaktionen auch Proteine wie die RNA-Polymerase. Auf diese Weise kann etwa die Aktivität der RNA-Polymerase und somit die Initiationsrate der Transkription, d.h. der mRNA-Synthese, beeinflusst werden.

Transkriptionsfaktoren werden nach ihrer Struktur sowie nach ihrer Spezifität in verschiedene Klassen eingeteilt (Heinemeyer *et al.*, 1998):

1. Superklasse: *Basic Domains*
2. Superklasse: *Zinc-coordinating DNA-binding domains*
3. Superklasse: *Helix-turn-helix* (3.1 Klasse: *homeodomain* (3.1.2.3.4 *POU3F4*))
4. Superklasse: *β -Scaffold Factors with Minor Groove Contacts*

1.2.1 ***POU3F4***

POU3F4 gehört zu den Transkriptionsfaktoren der Superklasse 3, die eine namengebende „POU“-Domäne enthalten. Der Name „POU“ leitet sich von den Transkriptionsfaktoren ab, in denen die „POU“-Domäne als erstes gefunden wurde: „P“ steht für Pit-1, einen hypophysenspezifischen Transkriptionsfaktor, „O“ bezeichnet eine Gruppe von Faktoren, die an eine oktamer Sequenz im Bereich bestimmter Gene, u.a. der Gene für Immunglobuline, binden, und „U“ bezeichnet den Transkriptionsfaktor Unc-86, der eine wichtige Rolle bei der Neurogenese in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* spielt. Die Transkriptionsfaktoren Pit-1, Oct-1 und Oct-2 sind säugetierspezifisch. Hinsichtlich der POU-Domäne besteht (auch bei Unc-86) Sequenzhomologie.

Douville *et al.* zeigten 1994 erstmals, dass *Pou3f4* in der Maus auf dem X-Chromosom in einem Bereich lokalisiert ist, der im Menschen der Region Xq13-q22 entspricht. De Kok *et al.* (1995) engten den Genlocus ein auf einen 1.4 kb grossen Bereich 20 kb distal von DXS995 (Xq21.1), der das 1083 bp grosse Gen für *POU3F4* enthielt. Bei der Untersuchung verschiedener Patienten fanden de Kok *et al.* überraschenderweise nicht nur Mutationen in dem obigen Bereich, sondern auch drei Mikrodeletionen und eine Duplikation, die alle proximal in 5'-Richtung des *POU3F4*-Gens lagen. Insgesamt wurden von de Kok *et al.* für das *POU3F4*-Gen acht verschiedene Mutationen beschrieben: Deletionen (eines Adenins an Position 895, 1995; eines von vier Guaninen an Position 648-651, 1995; eines CAAA-Tetranukleotid-Tandems an Position 603-610, 1995), Substitutionen (Leu317Trp, 1995; Lys334Glu, 1995; Arg330Ser, 1997) sowie ein somatisches Mosaik für eine Arg323Gly-Substitution (1997). Bitner-Grindzicz *et al.* fanden eine 4bp-Deletion an Position 862-866 (1995) und eine Ala935Val-Substitution (1995). Cremers *et al.* (2000) fanden bei der Untersuchung von 33 Patienten 15 Mutationen innerhalb des *POU3F4*-Gens (fünf Proteintrunkationen, neun Substitutionen und eine Deletion in der POU-Domäne).

Bei drei Patienten lagen Deletionen vor, die das gesamte Gen betrafen. Zehn Mutationen lagen ausserhalb des Gens, davon acht innerhalb eines kleinen Bereiches bis 900 kb proximal von *POU3F4*. Bei fünf Patienten konnte keine Mutation nachgewiesen werden.

Die POU-Domäne setzt sich aus zwei Subdomänen zusammen: einer POU-spezifischen Domäne (POU_S), die nur von dieser Genklasse exprimiert wird, und einer sogenannten Homeodomäne vom POU-Typ (POU_{HD}). Die beiden hochkonservierten Subdomänen, die insgesamt 155 Aminosäuren lang sind, sind durch eine nicht konservierte, flexible Verbindungssequenz miteinander verbunden. Die POU-spezifische Subdomäne reguliert in erster Linie die sequenzspezifische DNA-Bindung, während die Homeodomäne für Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung ist. Zwar genügt die isolierte Homeodomäne für die sequenzspezifische Bindung an ein DNA-Fragment, die zusätzliche Anwesenheit der POU-spezifischen Domäne erhöht jedoch die Affinität und die Spezifität einer solchen Bindung. Die DNA-bindende Struktur besteht in diesem Fall aus einer *helix-turn-helix*-Struktur sowie der benachbarten Helixregion.

Die Oktamer-bindenden Transkriptionsfaktoren Oct-1 und Oct-2 regulieren die Expression bestimmter Gene, z.B. des Gens, welches für das Histon H2B kodiert, des Gens für die snRNA-Moleküle und der Gene für die Immunglobuline. Oct-2 ist spezifisch für B-Zellen. Pit-1, dessen Erkennungssequenz sich lediglich um zwei Basen von der Oktamersequenz unterscheidet, ist von entscheidender Bedeutung für die Expression der Hypophysen-spezifischen Gene. Die Inaktivierung des Gens für Pit-1 führt sowohl im Tierexperiment mit Mäusen als auch beim Menschen zu einer fehlerhaften Entwicklung der Hypophyse mit resultierendem kongenitalem Zwergwachstum. Unc-86 spielt eine Rolle bei der Entwicklung sensorischer Neurone, genauer bei der Entwicklung haptischer Rezeptorneurone und bestimmter cephalischer Begleitneurone, die nur im männlichen Geschlecht exprimiert werden.

POU3F4 wird gewebespezifisch exprimiert; RNA *in situ*-Analysen bei Ratten ergaben eine Expression von *RHS2*, dem Homolog des humanen *POU3F4*, in Zellen der Ohrbläschen, des Bulbus olfactorius und im Neuralrohr an den Tagen 15.5 bzw. 17.5 der Embryonalentwicklung.

1.3 Fragestellung

Stapes gusher ist die häufigste Form X-chromosomal vererbter Schwerhörigkeit. Sie zeichnet sich durch charakteristische klinische Befunde aus und wurde in mehreren Arbeiten mit Mutationen in *POU3F4* in Zusammenhang gebracht (Bitner-Glindzicz *et al.*, 1995; de Kok *et al.*, 1995 und 1997; Friedman *et al.*, 1997; Reardon *et al.*, 1991). In dieser Arbeit sollte eine Familie mit Mutter und eineiigen Zwillingen phäno- und genotypisch untersucht werden. Bei den Brüdern wurde im frühen Kindesalter das Vorliegen einer kombinierten Schwerhörigkeit festgestellt. Durch die klinischen Untersuchungen ergab sich die Verdachtsdiagnose DFN3 (*stapes gusher*). Mit Hilfe der molekulargenetischen Analysen sollte dies überprüft werden.

Die besondere Bedeutung dieser Arbeit lag darin, dass eineiige Zwillinge untersucht wurden. Monozygote Zwillinge sind genetisch identisch, können aber dennoch einen unterschiedlichen Phänotyp aufweisen. Sie sind besonders geeignet für die Erforschung des Einflusses genetischer und umweltbedingter Faktoren auf die Entwicklung von Individuen.

2 Material und Methoden

2.1 Probandenkollektiv

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Familie bestand aus zwei eineiigen männlichen Zwillingen und ihrer Mutter. In der Universitäts-HNO-Klinik Tübingen wurde bei den unter Schwerhörigkeit leidenden Kindern klinisch das Vorliegen des sogenannten *stapes gusher*-Syndroms diagnostiziert, während die asymptomatische Mutter keine pathologischen Veränderungen des Hörsystems aufwies.

Daraufhin erfolgte eine Blutentnahme (jeweils 10 ml Vollblut). Die Isolierung der DNA aus EDTA-Blut und ihre molekulargenetische Analyse erfolgten im Institut für Anthropologie und Humangenetik in der Abteilung für Klinische Genetik.

2.2 Allgemeine Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien sind im Anhang unter 6.1 beschrieben.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Methoden sind in den folgenden Labor-Handbüchern beschrieben:

Ausubel, F.M. ed. (1995): *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1-3, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School Boston, Massachusetts. Wiley & Sons, New York;

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

2.3.1 Isolation und Aufarbeitung genomischer DNA aus Frischblut

Für die molekulargenetische Analyse der untersuchten Familie wurde die genomische DNA aus Frischblutproben der Probanden isoliert. Die Isolation der DNA wurde nach der Methode von Miller (Miller *et al.*, 1988) durchgeführt.

Reagenzien:

- Lysispuffer	
- SE-Puffer	
- SDS	20% in H ₂ O _{dd}
- Proteinase K	20 mg/ml
- NaCl	gesättigt (5M)
- Ethanol	absolut p.a.
- Ethanol	70%
- TE (Tris-EDTA-Puffer) (pH 8.0)	10 mM Tris-HCl 0.1 mM Na ₂ EDTA

Zunächst wurde die Zytoplasmamembran der Blutzellen mit Lysispuffer aufgebrochen, um die Zellbestandteile freizusetzen (Zellkern). Die zellkernlosen Erythrozyten wurden von den für die DNA-Isolierung relevanten Leukozyten getrennt. Die Leukozytenkerne wurden durch die Behandlung mit SE-Puffer lysiert und so die DNA freigesetzt. Das anionische Detergens SDS wurde zur Lösung der Proteine eingesetzt. Diese wurden durch SDS denaturiert und die Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten zerlegt. Die Proteine wurden anschließend mit Proteinase K verdaut. Verbliebene Proteinreste wurden mit Natriumchlorid gefällt. Durch Zugabe von absolutem Alkohol wurden die DNA-Moleküle präzipitiert. Die DNA wurde mit 70%igem Alkohol gewaschen und getrocknet. Anschliessend wurde sie in TE-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration und Reinheit der DNA wurden mit Hilfe eines Photospektrometers bestimmt. Bei der Photospektrometrie wird die Absorption elektromagnetischer Wellen gemessen; Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der Spektralcharakteristika der in ihnen vorhandenen Basen ultraviolettes Licht zwischen 250 und 270 nm Wellenlänge, wobei sich charakteristische Absorptionsmaxima ergeben. Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von DNA, gibt Aufschluss über die Konzentration der DNA-Lösung. Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, ist ein Indikator für die Reinheit bzw. Verunreinigung der DNA-Lösung. Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ sollte möglichst 1.8-

2.0 betragen; Werte <1.8 weisen auf eine hohe Proteinverunreinigung hin, Werte >2.0 zeigen eine Kontamination durch RNA an.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in einem Photospektrometer unter Verwendung von Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm. Vor der Konzentrationsbestimmung wurde das Photometer durch eine Leerwertbestimmung mit reinem TE-Puffer geeicht. Die Konzentration wurde in einer 50-fachen Verdünnung der DNA-Lösung gemessen. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz wurde unter Einberechnung des Extinktionskoeffizienten und des Verdünnungsfaktors die Gesamtkonzentration der DNA-Lösung berechnet:

$$\text{Konzentration [c]} = \text{optische Dichte [OD}_{260}] \times \text{Verdünnungsfaktor [50]} \times \text{Extinktionskoeffizient für DNA [47.5]}$$

Ein Absorptionswert von 1 entspricht somit etwa einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ (ohne Berücksichtigung der Verdünnung).

2.3.3 Southern Blot

Das Southern Blotting (Immunprinting, Immunoblotting) ist eine Methode zur qualitativen und/oder quantitativen Analyse von DNA-Fragmenten in einem DNA-Gemisch. Das zu analysierende Gemisch wird zunächst elektrophoretisch aufgetrennt; anschließend werden die getrennten Komponenten aus dem Gel auf eine Membran transferiert („geblottet“) und damit immobilisiert. Durch die Zugabe von Sonden, die spezifisch an DNA-Bereiche binden, können diese detektiert werden (z.B. durch eine Farbreaktion, eine immunologische Reaktion oder durch radioaktive Markierung der Sonde). Das Blotten kann durch Anwendung von Druck erfolgen, durch Anlegen eines Vakuums oder durch elektrochemischen Transfer, d.h. mit Hilfe eines elektrischen Feldes (Elektroblotting). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Blotting durch einen aufwärts gerichteten Kapillartransfer erreicht, bei dem die DNA-Moleküle durch Kapillarstrom in einem Hochsalz-Transferpuffer aus dem Agarosegel auf die Membran übertragen werden, wobei der Transferpuffer die Bindung an die Nitrozellulosemembran fördert.

Die auf diese Weise immobilisierte DNA wurde später durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert. Die radiographische Detektion erfolgte in zwei Phasen:

- (a) Um unspezifische freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde diese mit einer Prähybridisierungslösung, welche Heringssperma-DNA enthielt, inkubiert.
- (b) Die radioaktiv markierte Oligonukleotidsonde, die spezifisch mit dem zu detektierenden DNA-Bereich reagierte, wurde mit der Membran und der Hybridisierungslösung inkubiert.
- (c) Nach mehrmaligem Waschen der Membran wurde die Hybridisierungsreaktion sowohl durch Autoradiographie als auch durch Exposition auf einer Phosphoimager-Platte sichtbar gemacht.

2.3.3.1 Herstellung der Sonde: Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Als Sonde zur spezifischen Detektion der gesuchten Sequenz auf dem Southern Blot wurde das PCR-Produkt der Primer POU3-Ia und POU3-Vb verwendet (siehe Abschnitt 2.3.4). Das PCR-Produkt wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, gereinigt und radioaktiv markiert. Die radioaktive Markierung mit ^{32}P - γ -ATP erfolgte mit Hilfe der von dem T_4 -Phagen produzierten T_4 -Kinase, welche 5'-Enden von Oligonukleotiden durch Übertragung des γ -Phosphatrestes aus ATP phosphoryliert.

Zu 1 μl DNA wurden 1 μl Polynukleotid-Puffer, 1 μl Polynukleotid-Kinase und 2 μl ^{32}P - γ -ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) gegeben. Es wurde in einem Volumen von 10 μl gearbeitet. Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 2 μl 0.5 M EDTA inaktiviert. Im Anschluss wurde die Sonde denaturiert (10 min, 96°C) und direkt in die vorgewärmte Hybridisierungslösung gegeben.

2.3.3.2 Herstellung des Southern Blots

2.3.3.2.1 Verdau der genomischen DNA mit *EcoRI*

Es wurden jeweils 10 µg genomische DNA mit *EcoRI* bei 37°C über Nacht verdaut und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Restriktionsverdau-Ansatz:

10 µg genomische DNA
1 µl *EcoRI* (10 U/µl)
25 µl *EcoRI*-Reaktionspuffer

Die Gelelektrophorese wurde bei 30 V über Nacht durchgeführt.

2.3.3.2.2 Transfer (Southern Blot)

Die im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Moleküle wurden durch das Southern Blotting aus der Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und als eine semipermanente Kopie des DNA-Musters immobilisiert. Zur Vorbereitung des Southern Blots wurde ein in 20x SSC getränktes Whatman-Filterpapier in Gelgröße ausgeschnitten, auf welches das Gel, die Membran und drei weitere mit 20x SSC getränkte Whatman-Filterpapiere gelegt wurden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen ausbildeten, welche den Transfer beeinträchtigen würden. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht, die Vollständigkeit der Übertragung wurde durch Kontrolle des Gels im UV-Licht überprüft. Um die DNA vollständig zu immobilisieren, wurde die Nitrozellulosemembran zwei Stunden bei 80°C „gebacken“. Danach konnte die Membran für die Hybridisierungsreaktion weiterverwendet werden.

2.3.3.3 Hybridisierung des Southern Blots

Vor der eigentlichen Hybridisierung muss die Membran mit einer Prähybridisierungslösung inkubiert werden, um freie Bindungsstellen zu blockieren und somit

unspezifische Bindungsreaktionen zu minimieren. Die Inkubation erfolgte für drei Stunden bei 65°C in 10 ml Prähybridisierungslösung. Diese wurde danach gegen die vorgewärmte Hybridisierungslösung ausgetauscht und die markierte Oligonukleotidsonde zugefügt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht. Der Southern Blot wurde zweimal für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 2x SSC-Waschlösung gewaschen und anschliessend sowohl auf einem herkömmlichen Film als auch auf einer Phosphoimager-Entwicklerplatte exponiert.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; *PCR*) ist eine schnelle und sehr effiziente Methode zur *in vitro*-Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes. Das Prinzip der PCR wurde erstmals 1988 von Saiki *et al.* beschrieben. Dabei werden zwei Oligonukleotide bekannter DNA-Sequenz als Primer verwendet, welche den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren und komplementär zu Sequenzen auf den gegenüberliegenden Einzelsträngen der DNA sind.

Das Reaktionsprinzip der PCR beruht auf der Wiederholung von drei Reaktionsschritten in mehreren Zyklen, die durch ein Enzym, die *Taq*-Polymerase, katalysiert werden. Durch die Denaturierung (92°C-95°C) wird das doppelsträngige DNA-Molekül in die komplementären Einzelstränge aufgetrennt. Während des Annealings (40°C-68°C) lagern sich die Primer an die komplementären Abschnitte der DNA-Einzelstränge an. An diese kurzen doppelsträngigen DNA-Segmente bindet die *Taq*-Polymerase. Während des Extensionsschrittes (72°C) erfolgt, ausgehend vom 3'-Ende des jeweiligen Primers, die DNA-Neusynthese in 5'→3'-Richtung. Die während eines Reaktionszyklus synthetisierten DNA-Kopien entsprechen den primerbegrenzten DNA-Abschnitten und dienen ihrerseits im nächsten Zyklus als Matrize, so dass eine exponentielle Amplifikation erfolgt; nach 30 Zyklen liegen ca. 10^7 gleiche DNA-Fragmente vor. Der letzte Zyklus wird oft mit einem längeren Extensionsschritt beendet. Dadurch soll gewährleistet werden, dass alle PCR-Produkte die volle Länge erreichen, da mit zunehmender Zahl der Zyklen die Menge an Nukleotiden abnimmt und in zunehmendem Masse auch unspezifische Amplifikationsprodukte (Abbruchsequenzen) gebildet werden.

Die Dauer der Denaturierungs- und Extensionsschritte hängt von der Länge und dem GC-Gehalt der zu amplifizierenden DNA-Sequenz ab. Die Temperatur des Denaturierungsschrittes beträgt bei fast allen PCR-Verfahren 94°C, die des Extensionsschrittes 72°C. Die optimale Temperatur des Annealingschrittes kann annäherungsweise aus dem Gehalt der Primer an den Nukleotiden C/G bzw. A/T ermittelt werden. Sie liegt 5°C unter der Schmelz- oder Dissoziatontemperatur T_m , die notwendig wäre, um die Primer von ihren komplementären DNA-Sequenzen zu trennen. T_m lässt sich anhand der folgenden Formel abschätzen:

$$T_m = [2x (\Sigma \text{ Adenin- und Thymin-Basen}) + 4x (\Sigma \text{ Guanin- und Cytosin-Basen})]$$

Ausgehend von T_m muss die Annealingtemperatur für jedes Primerpaar optimiert werden. Aufgrund der Spezifität der Primer und der exponentiellen Amplifikation wird mit zunehmender Zahl der Zyklen fast ausschliesslich die gewünschte DNA-Sequenz vervielfältigt. Die Anzahl der Reaktionszyklen ist jedoch auf etwa 35 begrenzt, da die *Taq*-Polymerase nach dieser Anzahl von Zyklen (bzw. nachdem etwa 10^6 Amplifikate erzeugt worden sind) durch die wiederholten Denaturierungsschritte an Aktivität verliert und die Anzahl der unerwünschten Nebenprodukte zunimmt.

2.3.4.1 Genotypisierung auf dem ABI PRISM[®] 377

Genomische DNA wurde nach Miller *et al.* (1988) aus Lymphozyten der untersuchten Personen präpariert. Für die PCR wurden 100 ng DNA und 5 µM der jeweiligen Primer eingesetzt. Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 15 µl Allele True Permixon Buffer (ABI[®]) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1 Zyklus (94°C 12', 55°C 15'', 72°C 30'')
10 Zyklen (94°C 15'', 55°C 15'', 72°C 30'')
20 Zyklen (89°C 15'', 55°C 15'', 72°C 30'')
1 Zyklus (89°C 15'', 55°C 15'', 72°C 10')

Die PCR-Produkte wurden auf ein 5%-Polyacrylamidgel (mit 7M Harnstoff) aufgetragen und im ABI PRISM[®] 377-Sequenziergerät analysiert. Die Auswertung erfolgte mit GeneScan[®]- und Genotyper[®]-Software der Firma Applied Biosystems.

Abstand und Entfernung der STS-Marker wurden anhand der RHMB-Karte der „Genetic Epidemiology Research Group“ der University of Southampton bestimmt.

2.3.4.2 Sequenzierung der kodierenden Region des *POU3F4*-Gens und Deletionsanalyse der nicht-kodierenden Region

Sowohl für die Sequenzierung der kodierenden Region, als auch für die anschließende Deletionsanalyse der nicht-kodierenden Region, wurde nach folgender PCR-Anleitung gearbeitet:

Reagenzien:

10x PCR-Puffer	200 mM Tris-HCl (pH 8.4)
	500 mM KCl
Magnesiumchlorid	50 mM
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/ μ l
dNTP-Mix	je 1.25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
Primer	10 pmol/ μ l
H ₂ O _{dd}	autoklaviert

Alle PCR-Reaktionen wurden in autoklavierten 0.2 ml-PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Um eine unspezifische Aktivität der Primer und damit das Auftreten sogenannter Primer-Dimere sowie eine frühzeitige Aktivierung der *Taq*-Polymerase (die auch bei Zimmertemperatur eine Restaktivität aufweist) und damit unspezifisches Annealing zu minimieren, wurden alle PCR-Ansätze auf Eis zusammenpipettiert und der PCR-Heizblock auf 95°C vorgeheizt. Es wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 μ l gearbeitet:

Reaktionsansatz für genomische DNA (25 μ l):

DNA	2.00 μ l
Primer sense (10 pmol/ μ l)	2.00 μ l
Primer antisense (10 pmol/ μ l)	2.00 μ l
dNTP-Mix (1.25 mM)	4.00 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	0.75 μ l
10x <i>Taq</i> -Reaktionspuffer	2.50 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μ l)	0.50 μ l
H ₂ O _{dd}	11.25 μ l
Σ	25.00 μ l

Die PCR-Reaktionen wurden in Peltier-Thermocyclern durchgeführt. Da in den verwendeten Geräte durch einen Heizdeckel ein Verdampfen der Proben während der Reaktion verhindert wurde, war eine Überschichtung der Proben mit Mineralöl nicht notwendig.

PCR-Bedingungen:

1 Zyklus (94°C 5', 62°C 1', 72°C 1')
4 Zyklen (94°C 1', 62°C 1', 72°C 1')
25 Zyklen (94°C 1', 56°C 1', 72°C 1')
1 Zyklus (94°C 1', 56°C 1', 72°C 10')

Bei jedem PCR-Lauf wurde eine Negativkontrolle mitamplifiziert, bei der statt DNA-Template Wasser eingesetzt wurde. Auf diese Weise konnte eine mögliche Kontamination der PCR-Ansätze durch DNA-Spuren in einem der Reagenzien nachgewiesen werden: Die Amplifikation eines PCR-Produktes in der Negativkontrolle war ein Indiz für eine Kontamination. Die PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.3.5 DNA-Gelelektrophorese

Zur qualitativen Analyse der durch die PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden jeweils 10 µl eines PCR-Produktes mit 5 µl Blaumarker auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die DNA-Gelelektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die unterschiedliche Laufgeschwindigkeit von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Grösse in einem elektrischen Feld zu ihrer qualitativen Auftrennung ausgenutzt wird.

Für analytische Zwecke werden 1x TBE-Gele verwendet, während für präparative Zwecke (wie hier) 1x TAE-Gele eingesetzt werden. Je nach der Grösse der aufzutrennenden DNA-Moleküle wurden 1%ige und 2%ige Gele verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1/3 des Volumens 6x Blaupuffer versetzt, um zu verhindern, dass die Proben aus den Beladungstaschen hinausdiffundierten und um durch die Visualisierung der Lauffront den Gellauf besser verfolgen zu können. Zur Bestimmung der Grösse der einzelnen DNA-Fragmente wurden ebenfalls 5 µl des 100 bp-DNA-Molekulargewichtsmarkers aufgetragen. Den Agarosegelen wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.67 µg/ml zugefügt. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelhelix-Struktur der DNA und wird durch die Bestrahlung mit UV-Licht zur Lichtemission angeregt. Auf diese

Weise können DNA-Fragmente im Gel detektiert werden. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt.

2.3.6 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Für eine Sequenzierung ist eine vorherige Reinigung der amplifizierten DNA notwendig, um Kontaminationen wie Salze, Enzymreste, nicht-integrierte Nukleotide oder Matrizen-DNA zu entfernen. Eine zu diesem Zweck häufig angewendete Methode ist die Gelextraktion. Dabei wird die DNA aus einem Gelstück extrahiert und gereinigt. Die Gelextraktion erfolgte mit Hilfe des QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte in einem TAE-Agarosegel wurde das gewünschte Fragment mit einem sauberen Skalpell herausgeschnitten und in ein 1.5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Agarose wurde durch Inkubation mit einem salzhaltigen Puffer solubilisiert; gleichzeitig wurden die geeigneten Bedingungen für die optimale Bindung der DNA an die Silicagel-Membran der speziellen QIAquick[®]-Säulen geschaffen. Die weiteren Waschschriffe mit speziellen Puffern dienten der Entfernung von verbliebenen Verunreinigungen wie Agarose, Ethidiumbromid und Proteine, welche die nachfolgenden Reaktionen stören könnten. Salze wurden durch den Ethanol-haltigen Puffer PE quantitativ entfernt. Durch die Zugabe von 30 µl Elutionspuffer wurde die DNA von der Silicagel-Membran eluiert und konnte für weitere Arbeitsschritte (z.B. Ligationen) verwendet werden.

2.3.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung oder Sequenzanalyse ist eine Methode zur Ermittlung der Primärstruktur von Nukleinsäuren (DNA, RNA) und Proteinen. Die erste Sequenzierung wurde 1953 von F. Sanger zur Analyse von Insulin durchgeführt. In den 60er Jahren entwickelte Sanger Methoden zur Sequenzanalyse von Ribonukleinsäuren, und Mitte der 70er Jahre folgten zwei Methoden für die Sequenzierung von Desoxyribonukleinsäuren, die Maxam-Gilbert-Methode und die enzymatische Methode nach Sanger.

Die zunehmende Automation der Sequenzierungsreaktion ermöglicht heutzutage die Sequenzierung mit Hilfe eines DNA-Sequenzers, der eine modifizierte Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode von F. Sanger zugrunde liegt.

Es wurden sowohl in Plasmide klonierte und in Bakterien transformierte Plasmid-DNA als auch direkt geleluierte PCR-Produkte sequenziert.

2.3.7.1 Vorbereitung der Proben

Geräte:

- GeneAmp PCR System 9600

Reagenzien:

- EtOH abs.
- EtOH 70%
- Ladepuffer („red loading buffer“)
- Natriumacetat (3 M)
- Primer (M13, POU3-Ia und Vb)
- Sequenzier-Premix (BigDye-Terminator[®])

Ansatz für eine Sequenzierungsreaktion:

10 µl H₂O

1 µl Primer

5 µl DNA

mischen, 3-5 min bei 96°C denaturieren

1 min auf Eis inkubieren

4 µl Sequenzier-Premix (BigDye-Terminator[®]) zufügen, mischen

Sequenzierung:

25 Zyklen: 96°C 10 sec
50°C 5 sec
60°C 4 min

Ethanol-Fällung:

80 µl H₂O
10 µl 3 M Natriumacetat
250 µl EtOH abs.
zufügen
zentrifugieren (15.000 rpm, 30 min, RT)
Pellet mit 250 µl 70% EtOH waschen (15.000 rpm, 15 min, RT)
Pellet in der SpeedVac 15-20 min trocknen
Pellet in 3 µl red loading buffer auflösen, vortexen
1 µl auf Sequenziergel auftragen

2.3.7.2 Vorbereitung des Gels

Geräte:

- ABI PRISM® 377 PE Applied Biosystems, Perkin Elmer, Darmstadt
- Power Macintosh G3 Apple, Stuttgart

Material:

- Gelhalterung
- Glasplatten (20 x 36 cm)
- Kunststoff-Spacer (0.2 mm Breite)
- Kunststoff-Kamm („Haifischkamm“, 0.2 mm Breite, 36 wells)

Reagenzien:

- Acrylamid-Stammlösung: 30%, Acrylamid/Bisacrylamid 29:1
- Alconox
- APS
- Harnstofflösung 21.0 g/20.0 ml H₂O_{dd}
- 10x TBE
- TEMED

Acrylamid und Bisacrylamid sind Monomere und bilden nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS), welches als Radikalstarter wirkt, Polymere aus. N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert die Bildung freier Radikale aus Persulfat und beschleunigt den Polymerisationsprozess. Das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bestimmt den Grad der Quervernetzung innerhalb des Gels und beeinflusst dadurch das Laufverhalten der DNA-Fragmente. Die Sequenzierung wurde in einem 5%igen Polyacrylamidgel (36 cm Höhe, Lesegeschwindigkeit 1200 Basen pro Stunde) bei 2500 V, 48 Watt und 51°C bei einer Laufzeit von 8 Stunden durchgeführt.

Durchführung:

Die Glasplatten wurden vor Gebrauch auf der Gelseite mit Alconox gereinigt. Zwischen die Platten wurden die Spacer seitlich so eingesetzt, dass sie exakt mit den Platten abschlossen. Die Platten wurden in die Gelhalterung eingesetzt und die Polyacrylamid-Lösung vorbereitet.

Ansatz für ein 5% Polyacrylamid-Gel/7 M Harnstoff (50 ml):

35.6 ml Harnstoff-Stocklösung (21.0 g/20.0 ml H₂O_{dd})
8.4 ml 30%ige Acrylamidlösung
6.0 ml 10x TBE-Puffer
20.0 ml H₂O_{dd}

Nach Zugabe von APS und TEMED wurde die Gellösung luftblasenfrei zwischen die Gelplatten gegossen. Der Haifischkamm wurde mit den Zähnen nach oben ca. 50 mm in die Gellösung eingesetzt. Nach der vollständigen Auspolymerisierung des Gels (nach ca. einer Stunde) wurde das Gel mit der Halterung in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Der Haifischkamm wurde umgedreht und mit den Spitzen so in das Gel eingesetzt, dass sich getrennte Slot-Taschen bildeten. Nach einem halbstündigen Vorlauf zum Aufheizen des Gels auf 51°C wurden die Proben aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinik

Bei einer in der frühen Kindheit durchgeführten tonschwellenaudiometrischen Untersuchung wurde bei den hier untersuchten Zwillingenbrüdern OJ und PJ eine hochgradige Schwerhörigkeit diagnostiziert. Nach Adenotomie und beidseitiger Einlage eines Paukenröhrchens wurden im Alter von 9 (OJ) bzw. 11 (PJ) Jahren Jahren ein hochauflösendes Felsenbein-Computertomogramm angefertigt und eine explorative Tympanoskopie durchgeführt. Es folgten weitere audiometrische Untersuchungen im Verlauf der Kindheit sowie bei beiden Kindern mehrfache Hörgeräteversorgungen (erstmalig im Alter von zehn Jahren). Weiterhin wurde eine pädiatrische und neurologische Untersuchung durchgeführt.

3.1.1 Tonschwellenaudiometrie

Die erste audiometrische Untersuchung im Alter von fünf (OJ) bzw. vier (PJ) Jahren ergab bei beiden Kindern einen kombinierten Hörverlust.

Bei OJ war der sensorische Hörverlust (Schallempfindungsschwerhörigkeit) auf beiden Seiten identisch ausgeprägt und vor allem bei höheren Frequenzen (ab 2000 Hz) deutlich erkennbar. Die konduktive Komponente (Schalleitung) war auf dem linken Ohr stärker beeinträchtigt als auf dem rechten Ohr. Bei der Kontrolluntersuchung nach drei Jahren war der kombinierte Hörverlust auf beiden Seiten fortgeschritten. Bei niedrigeren Frequenzen (bis etwa 1000 Hz) war eine leichte Besserung des sensorischen Anteils zu erkennen, bei höheren Frequenzen dagegen hatte sich der Befund im Vergleich zur vorangegangenen Untersuchung verschlechtert. Die konduktive Komponente war auf beiden Ohren in allen Frequenzbereichen stärker betroffen als vorher.

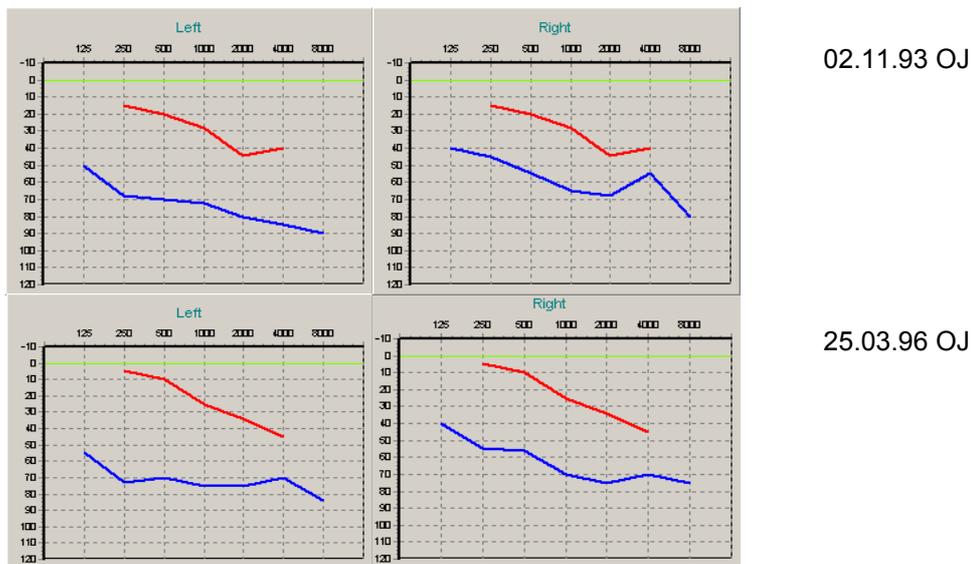


Abb. 1: Audiogramme von OJ im Alter von fünf (obere Audiogramme) und acht Jahren (untere Audiogramme)

Bei PJ wurde im Alter von vier Jahren ebenfalls das Vorliegen einer kombinierten Hörstörung festgestellt. Die Schallempfindungsschwerhörigkeit war auf beiden Seiten etwa gleich stark ausgeprägt wie bei seinem Bruder OJ. Die konduktive Komponente war auf dem rechten Ohr etwa in dem Maße gemindert wie bei OJ, auf dem linken Ohr dagegen deutlich weniger. Bei der vier Jahre später erfolgten Kontrollaudiometrie konnte wie auch bei OJ hinsichtlich des sensorischen Anteil (vor allem bei den tieferen Frequenzen) eine leichte Besserung der Hörminderung festgestellt werden. Die Schalleitungsstörung hingegen war beidseits deutlich fortgeschritten und insgesamt stärker als bei OJ ausgeprägt, insbesondere auf dem linken Ohr und auf beiden Seiten besonders im Bereich höherer Frequenzen.

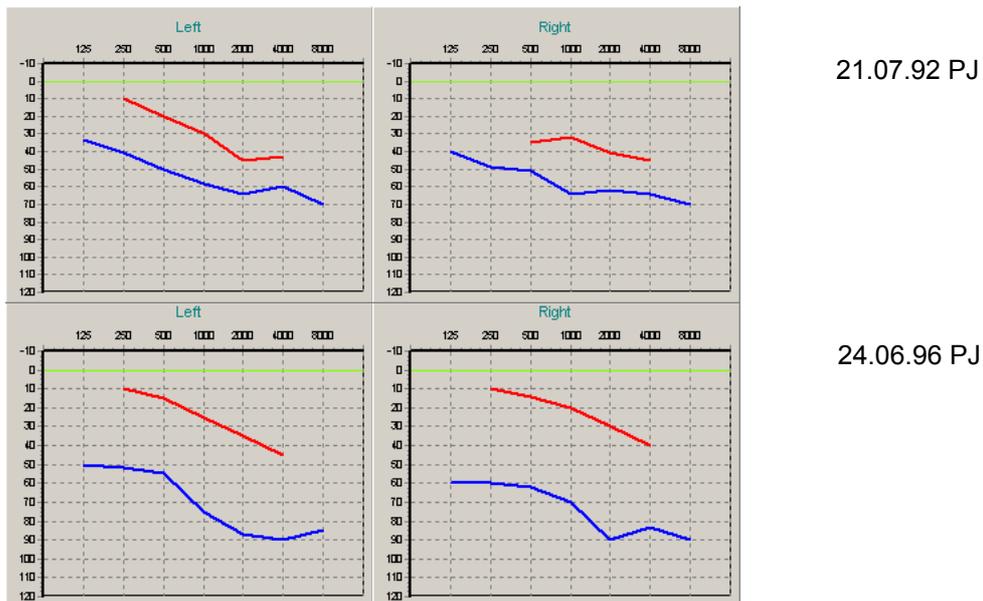


Abb. 2: Audiogramme von PJ im Alter von vier (obere Audiogramme) und acht Jahren (untere Audiogramme)

Im Alter von zehn Jahren erfolgte bei beiden Kindern eine Hörgeräteversorgung. Bei einer anschliessenden Kontrollaudiometrie im folgenden Jahr (1999, siehe Abbildung 3) wurde bei beiden Brüdern eine weiterhin deutlich progrediente Entwicklung der Schwerhörigkeit auf beiden Seiten sowohl für die Schallempfindungs- als auch für die Schalleitungskomponente festgestellt. Bei OJ zeigte sich besonders auf dem rechten Ohr im Bereich mittlerer und höherer Frequenzen (ab 500 Hz) eine Verschlechterung der kombinierten Hörmindering. Bei PJ fiel über den gesamten Frequenzbereich insbesondere in der Schallempfindung eine gravierende Progredienz der vorherigen Befunde auf.

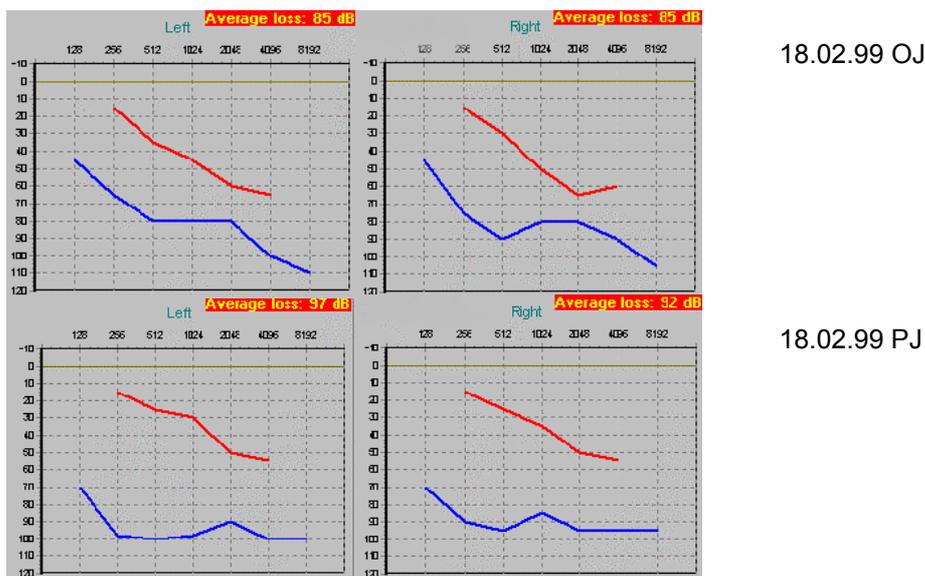
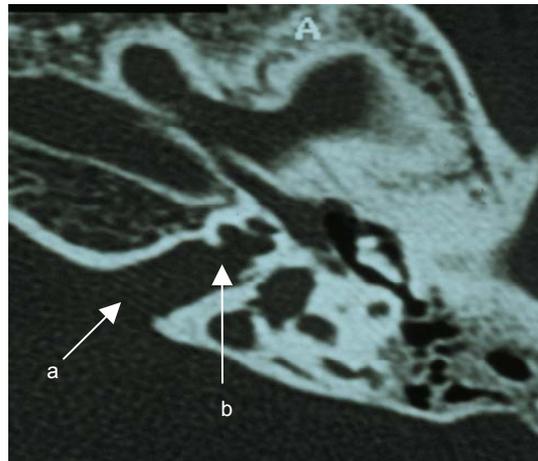


Abb. 3: Audiogramme von OJ (obere Audiogramme) und PJ (untere Audiogramme) im Alter von 11 Jahren (Zustand nach Hörgeräteversorgung)

3.1.2 Computertomographie (CT)

Bei der hochauflösenden Felsenbein-Computertomographie zeigten sich ein erweiterter innerer Gehörgang (Abbildung 4a) sowie eine fehlende knöcherne Separation zwischen dem Fundus des inneren Gehörganges und der basalen Windung der Cochlea (Abbildung 4b). Der Befund war bei beiden Patienten identisch (Daten von PJ nicht gezeigt).



(a) bulbösartig erweiterter innerer Gehörgang
(b) fehlende knöchernen Trennung von innerem Gehörgang und basaler Cochlea

Abb. 4: CT-Befund von OJ

3.1.3 Tympanoskopie

Bei einem der Zwillinge (PJ) bestand eine Incus-Arrodierung, die mit einer Typ-III-Tympanoplastik nach Wullstein (Entfernung von Malleus und Incus und direkte Auflagerung des verbleibenden Stapes auf das Trommelfell, somit Unterbrechung der normalen Gehörknöchelchen-Kette) revidiert wurde. Es ergaben sich keine weiteren pathologischen Befunde.

3.1.4 Pädiatrische und neurologische Untersuchung

Bis auf eine verzögerte Sprachentwicklung zeigten sich keine Auffälligkeiten.

3.2 Molekulargenetik

3.2.1 STR-Analysen als Nachweis für die Monozygotie

Ein auch in Vaterschaftsgutachten häufig angewendeter Nachweis des Verwandtschaftsgrades zwischen einzelnen Individuen ist der Einsatz hochpolymorpher Mikrosatelliten-Marker. Die Monozygotie der Zwillinge OJ und PJ wurde mit Hilfe von sechs hochpolymorphen Fluoreszenzmarkern (D1S220, D2S391, D3S1266, D7S517, D12S83, D13S171) für fünf verschiedene Chromosomen überprüft (vgl. Tabelle 2). Hierbei zeigte sich für alle untersuchten Loci eine identische Allelverteilung bei den Zwillingen.

Tabelle 2: Markerdaten und Ergebnisse der Genotypisierung der Zwillingenbrüder (OJ, PJ), deren Mutter (BJ) sowie einer Kontrolle

Marker	Heterozygotie	Markierung	Größe des PCR-Produktes	Mutter (BJ)	OJ	PJ	Kontrolle
D3S1266	0.73	HEX	292-308	298/298	298/296	298/296	298/298
D7S517	0.83	FAM	247-265	256/256	252/256	252/256	261/261
D12S83	0.81	FAM	107-127	120/120	114/120	114/120	109/115
D13S171	0.73	TET	179-207	189/189	189/199	189/199	189/189
D1S220	0.92	HEX	231-251	233/247	247/247	247/247	231/245
D2S391	0.79	TET	147-161	156/156	152/156	152/156	154/156

Durch die Analyse mit GeneScan[®] konnte die Monozygotie der Zwillinge nachgewiesen werden: Abbildung 5 zeigt, dass die Profile der beiden Zwillingenbrüder im Vergleich zur Mutter sowie einer Kontrollperson hinsichtlich der Verteilung der Allele (Peaks) identisch sind. Es sind exemplarisch drei Marker (D3S1266, D7S517 und D12S83) aufgeführt.

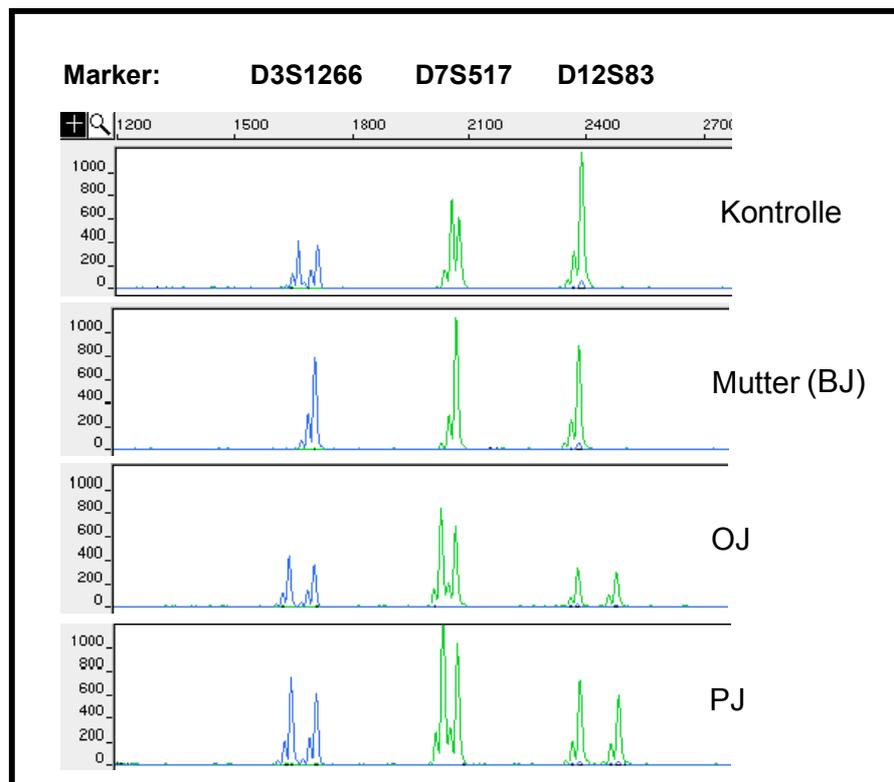
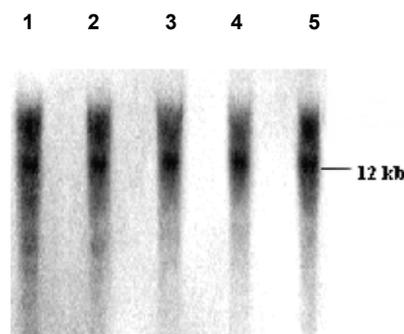


Abb. 5: Ergebnisse der Genotypisierung der Zwillingenbrüder (OJ, PJ), deren Mutter (BJ) sowie einer Kontrolle anhand dreier Mikrosatellitenmarker

3.2.2 Southern Blot

Genomische DNA von BJ, OJ und PJ sowie von zwei Kontrollpersonen (M, N) wurde mit *EcoRI* verdaut. Das *POU3F4*-Gen wurde durch PCR amplifiziert und auf die Southern Blots hybridisiert. Dabei war bei allen Personen ein 12-kb *EcoRI*-Fragment zu sehen (siehe Abbildung 6). Größere Rearrangements der analysierten chromosomalen Region konnten daher ausgeschlossen werden.

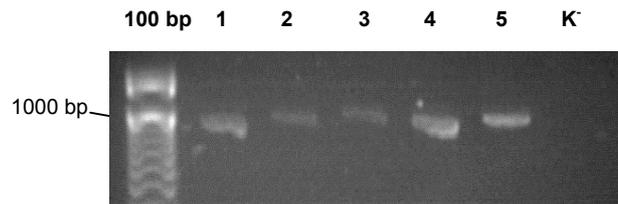


1: BJ, 2: OJ, 3: PJ, 4: M (Positivkontrolle), 5: N (Positivkontrolle)

Abb. 6: Ergebnisse des Southern Blots

3.2.3 Etablierung der Exon-PCR und Sequenzierung

Zur Überprüfung der kodierenden Region des *POU3F4*-Gens sollte aus der genomischen DNA der Familienmitglieder sowie zweier Kontrollperson (M, N) mit Hilfe der Oligonucleotid-Primer POU3-Ia und POU3-Vb jeweils ein 1083 bp grosses PCR-Fragment amplifiziert werden. Es handelte sich hierbei um das gesamte intronlose Gen für *POU3F4*. Wie aus Abbildung 7 hervorgeht, konnte das gewünschte Fragment bei allen untersuchten Personen amplifiziert werden. Zur weiteren Analyse wurden die Fragmente aus dem Gel extrahiert und sequenziert. Der Vergleich der jeweiligen Sequenzen mit der Originalsequenz für *POU3F4* (NCBI: XM_010259, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; vgl. Anhang 7.3) ergab eine identische Nukleotidfolge für alle Personen. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass innerhalb des kodierenden Bereiches von *POU3F4* Mutationen vorlagen, die zur phänotypischen Ausprägung von DFN3 führten.



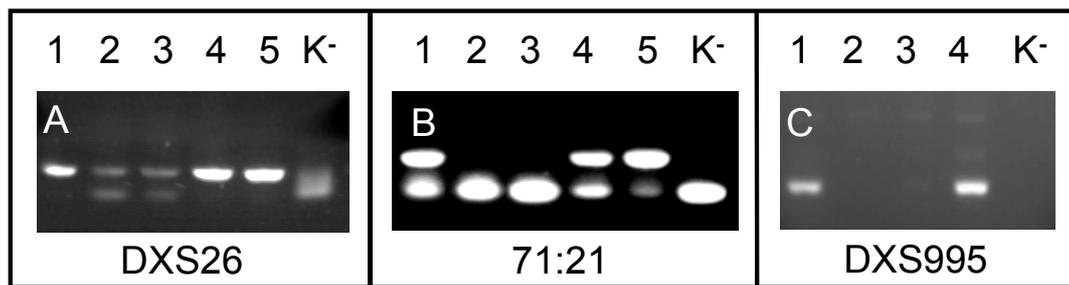
100 bp: DNA-Marker, 1: BJ, 2: OJ, 3: PJ, 4: M (Positivkontrolle), 5: N (Positivkontrolle), K (Negativkontrolle)

Abb. 7: PCR-Fragmente der kodierenden Region des *POU3F4*-Gens der analysierten Personen

3.2.4 Überprüfung der nicht-kodierenden Region

Wie von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits berichtet wurde, können nicht nur Mutationen im *POU3F4*-Gen zur Entstehung von DFN3 führen, sondern auch solche, die proximal des Exons liegen. Als besonders wichtige Region wurde dabei ein Bereich bis etwa 900 bp in 5'-Richtung von *POU3F4* identifiziert. Aus diesem Grund wurde ein Set von Mikrosatellitenmarkern etabliert, um diesen Bereich zu überprüfen. In Abbildung 8 ist exemplarisch das Ergebnis dreier analysierter Loci dargestellt. Die beiden betroffenen Zwillinge (Personen 2 und 3) zeigen in Abbildung 7A die PCR-Produkte in der entsprechenden Größe. Die in Abbildung 7B und 7C dargestellten Ergebnisse belegen, dass die entsprechenden DNA-Bereiche bei den Zwillingen deletiert sind.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse für alle untersuchten Mikrosatelliten zusammengefasst.



1: BJ, 2: OJ, 3: PJ, 4: M (Positivkontrolle), 5: N (Positivkontrolle), K- (Negativkontrolle)

Abb. 8: Beispiele für das Ergebnis dreier verwendeter Mikrosatellitenmarker

A) Marker DXS26, B) Marker 71:21, C) Marker DXS995

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse für alle analysierten Mikrosatellitenmarker

Locus	genetischer Abstand in cM	Position bezüglich des POU3F4-Gens	Status	Amplicon (bp)	Referenz
<i>POU3F4</i>	92.388	<i>POU3F4</i>			
Ia/Ib	–	<i>POU3F4</i> -kodierende Region	keine Mutation	215	de Kok <i>et al.</i> , 1995a
IIa/IIb	–	<i>POU3F4</i> -kodierende Region	keine Mutation	318	de Kok <i>et al.</i> , 1995a
IIIa/IIIb	–	<i>POU3F4</i> -kodierende Region	keine Mutation	246	de Kok <i>et al.</i> , 1995a
IVa/IVb	–	<i>POU3F4</i> -kodierende Region	keine Mutation	295	de Kok <i>et al.</i> , 1995a
Va/Vb	–	<i>POU3F4</i> -kodierende Region	keine Mutation	302	de Kok <i>et al.</i> , 1995a
POU3-Ia/Vb	–	<i>POU3F4</i> -kodierende Region	keine Mutation	1083	de Kok <i>et al.</i> , 1995a
DXS995	88.46	Proximal	Deletion	193-199	www.gdb.org
DX26	82	Proximal	keine Deletion	140	Dahl <i>et al.</i> , 1995
DXS7702	81.7	Proximal	keine Deletion	117	www.gdb.org
STS: 71:15	–	Proximal	Deletion	280	Dahl <i>et al.</i> , 1995
STS: 24:5	–	Proximal	Deletion	212	Dahl <i>et al.</i> , 1995
STS: 34/71:2	–	Proximal	Deletion	249	Dahl <i>et al.</i> , 1995
STS: 24:71	–	Proximal	Deletion	227	Dahl <i>et al.</i> , 1995
STS: 71:2	–	Proximal	Deletion	208	Dahl <i>et al.</i> , 1995
STS: 71:21	–	Proximal	Deletion	185	Dahl <i>et al.</i> , 1995
STS: 71:3	–	Proximal	Deletion	165	Dahl <i>et al.</i> , 1995
STS: 34:2	–	Proximal	Deletion	280	Dahl <i>et al.</i> , 1995
DXS169	81.3	Proximal	Deletion	390	Dahl <i>et al.</i> , 1995
DxS738	81.1	Proximal	Deletion	144	www.gdb.org
DxS1420	80.5	Proximal	keine Deletion	129	www.gdb.org
DxS7695	79.4	Proximal	keine Deletion	114	www.gdb.org

In Abbildung 9 ist das Ergebnis der Mikrosatellitenanalysen schematisch dargestellt. Als gestrichelte Linien sind hierbei die deletierten Regionen gezeigt, die nicht-deletierten Bereiche als durchgezogene Linien. Zu erkennen sind zwei Deletionen in der nicht-kodierenden Region: eine kleinere, ca. 100-300 kb umfassende Deletion nahe der 5'-Region des Gens, sowie eine große, mindestens 1 Mb umfassende Deletion weiter proximal.

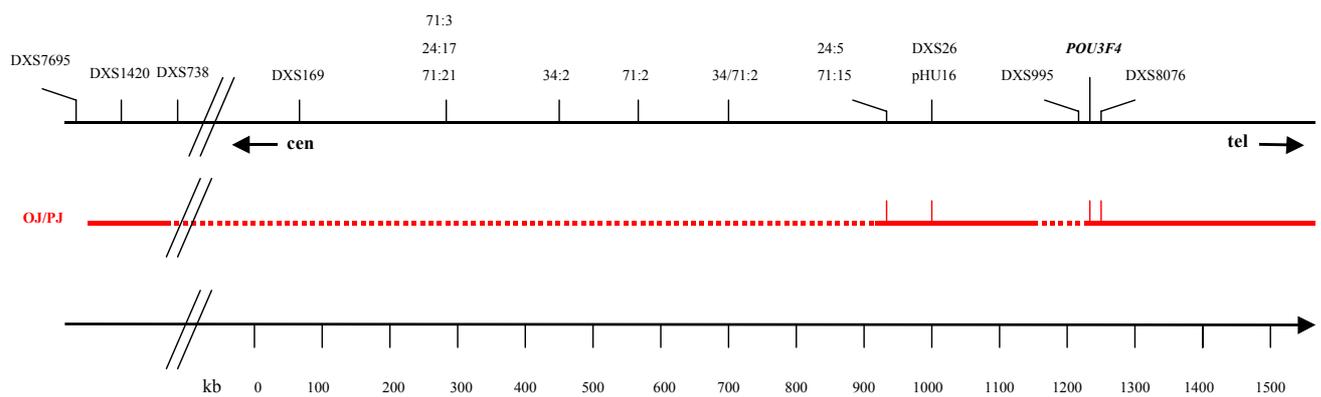


Abb.9: Übersicht über die detektierten Deletionen im nicht-kodierenden Bereich proximal des POU3F4-Gens

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine gesunde Mutter und ihre eineiigen schwerhörigen Zwillingssöhne auf das Vorliegen von DFN3 oder *stapes gusher*-Syndrom untersucht. DFN3 ist die häufigste X-chromosomal vererbte Form hereditärer Schwerhörigkeit und macht bis zu 0.5% aller Fälle hochgradiger kindlicher Schwerhörigkeit (Nance *et al.*, 1971) und bis zu 5% aller nicht-syndromalen Hörstörungen aus (Reardon, 1990). Betroffene zeigen in der Regel einen prälingualen, kombinierten Hörverlust, der meist progredient verläuft (de Kok *et al.*, 1995; Bitner-Glindzicz *et al.*, 1995). Klinische Merkmale sind ein abnorm erweiterter innerer Gehörgang, ein Knochendefekt am Fundus des inneren Gehörganges, eine kleine Cochlea und unvollständige Trennung der cochleären Windungen (Glasscock, 1973; Phelps *et al.*, 1991).

1995 lokalisierten de Kok und Mitarbeiter das für DFN3 verantwortliche Gen, *POU3F4*, auf Xq21.1. Es besteht aus einem kodierenden Exon, in dem bereits einige Mutationen beschrieben wurden (de Kok *et al.*, 1995; Bitner-Glindzicz *et al.*, 1995; Friedman *et al.*, 1997; Cremers *et al.*, 2000). *POU3F4* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der unter anderem für die embryonale Entwicklung des Hörorgans von Bedeutung ist.

Bei den hier untersuchten Zwillingen wurde in früher Kindheit eine Schwerhörigkeit diagnostiziert. Durch die klinischen Untersuchungen ergab sich die Verdachtsdiagnose *stapes gusher*, die molekulargenetisch überprüft werden sollte.

4.1 Klinik

Die klinische Untersuchung umfasste Tonschwellenaudiometrie, Sprachaudiometrie, Computertomographie (CT), Tympanoskopie und allgemeine pädiatrische und neurologische Anamneseerhebung.

4.1.1 Tonschwellenaudiometrie

Charakteristisch für *stapes gusher* ist eine kombinierte Schallempfindungs- und Schalleitungsschwerhörigkeit. Dieser Befund lag bei OJ und PJ vor, wie aus den Audiogrammen in Abb. 1 bis 3 erkennbar wird.

Sowohl bei OJ als auch bei PJ konnte im Verlauf von sechs bzw. sieben Jahren eine deutliche Progredienz der vorliegenden Hörminderung nachgewiesen werden. Dabei verschlechterten sich die audiometrischen Befunde beidseits sowohl bezüglich der Schallempfindungs- als auch bezüglich der Schalleitungskomponente. *Stapes gusher* zeichnet sich durch einen progressiven Hörverlust im Verlauf der Kindheit aus, wie er in diesem Fall vorlag.

Dabei waren sowohl die Ausgangsbefunde als auch der klinische Verlauf bei PJ ausgeprägter als bei seinem Bruder OJ. Dies gilt insbesondere für die Entwicklung der Schallempfindungsschwerhörigkeit. Der sensorische Anteil war im Verlauf des Beobachtungszeitraumes bei beiden Brüdern stärker betroffen als der konduktive Anteil, was ebenfalls mit der Diagnose *stapes gusher* zu vereinbaren ist.

Die Ergebnisse der audiometrischen Untersuchungen sind grundsätzlich mit der Verdachtsdiagnose *stapes gusher* vereinbar.

4.1.2 Computertomographie (CT)

Die radiologischen Befunde zeigten das Bild eines abnorm erweiterten inneren Gehörganges sowie die mangelhaft ausgebildete Trennung zur Cochlea. Das Fehlen der knöchernen Grenze war besonders in dem mit (b) gekennzeichneten Bereich in Abbildung 3 deutlich zu erkennen. Die erhobenen Befunde stimmen exakt mit dem von Phelps *et al.* (1991) beschriebenen charakteristischen Bild bei *stapes gusher* überein. Das Ausmass der anatomisch-pathologischen Veränderungen war bei OJ und PJ gleich stark ausgeprägt (Befunde nicht gezeigt).

4.1.3 Tympanoskopie

Der bei PJ erhobene Befund einer Incus-Arrodierung kann anhand der bisher vorliegenden Daten nicht als pathognomonisch für *stapes gusher*, aber dennoch als typisch angesehen werden. Aufgrund des pathologisch erhöhten Liquordrucks auf das Trommelfell und damit auch auf die Gehörknöchelchenkette ist die mechanische Beanspruchung von Malleus, Incus und Stapes erhöht, wodurch die Arrodierung zu erklären ist.

4.1.4 Pädiatrische und neurologische Untersuchung

Aufgrund der Hörstörung, die sich bereits im frühen Kindesalter entwickelte, war die Ausbildung der Sprachentwicklung bei den Zwillingen verzögert. Hierbei handelt es sich um einen für alle Formen prälingualer Schwerhörigkeit typischen Befund.

4.1.5 Zusammenfassung der klinischen Befunde

Insgesamt konnte durch die klinischen Befunde die Verdachtsdiagnose DFN3 bei OJ und PJ bestätigt werden. Sowohl die CT-Untersuchung als auch die Tonschwellenaudiometrie wiesen die typischen Veränderungen des audiologischen Systems nach. Durch die sequentielle Untersuchung im Abstand von drei Jahren konnte auch die langsam progrediente Entwicklung der Schwerhörigkeit gezeigt werden.

Bei der Mutter BJ konnten keine klinischen Auffälligkeiten festgestellt werden, was mit dem Erbgang von DNF3 erklärbar ist: DFN3 wird X-chromosomal-rezessiv vererbt. Die Mutter besitzt auf einem X-Chromosom ein defektes und auf dem anderen X-Chromosom ein gesundes Allel und ist damit heterozygote Konduktorin, d.h. sie trägt und vererbt das Krankheitsmerkmal zwar, ist jedoch aufgrund des zweiten, gesunden X-Chromosoms selbst nicht betroffen.

4.2 Molekulargenetik

Bei der molekulargenetischen Analyse wurde die DNA der Familienmitglieder auf Mutationen im *POU3F4*-Gen untersucht. Hierfür wurden Southern Blot, PCR- sowie Sequenzierungsreaktionen durchgeführt. Dabei wurden die Familienmitglieder mit gesunden Kontrollpersonen verglichen.

4.2.1 Nachweis der Monozygotie

Ein auch in Vaterschaftsgutachten häufig angewendeter Nachweis des Verwandtschaftsgrades zwischen einzelnen Individuen ist der Einsatz hochpolymorpher Mikrosatelliten-Marker. Mikrosatelliten oder short tandem repeats (STRs) sind kurze DNA-Abschnitte (meist 2-4 Basenpaare lang), die tandemartig, d.h. in gleicher Orientierung fortlaufend, wiederholt werden. Die Anzahl der Wiederholungen kann von fünf bis 5000 reichen; meist liegen jedoch etwa 20-50 Wiederholungen vor (Weber & Wong, 1993). Im menschlichen Genom sind 50,000-100,000 solcher Mikrosatelliten in unterschiedlichen Abständen zu finden. Die Länge der Mikrosatelliten variiert bei verschiedenen Menschen und wird vererbt; dieser Polymorphismus wird ausgenutzt bei STS-Analysen: STS oder *sequence tagged sites* sind kurze DNA-Sequenzen (meist 200-500 bp), deren Besonderheit darin liegt, dass sie im gesamten Genom nur ein einziges Mal vorkommen. Ihre genaue Lokalisation sowie ihre Sequenz sind bekannt. Einige STS enthalten Mikrosatelliten. Da diese hochpolymorph sind (mindestens zehn Allele), eignen sie sich als Marker zur Erstellung von Abstammungsgutachten. Dazu wird die zu untersuchende DNA mittels PCR amplifiziert und anschliessend auf einem Sequenziergel aufgetrennt.

Die Monozygotie der Zwillinge OJ und PJ wurde mit Hilfe von sechs hochpolymorphen Fluoreszenzmarkern (D1S220, D2S391, D3S1266, D7S517, D12S83, D13S171) für fünf verschiedene Chromosomen überprüft. Hierbei zeigten die Brüder an jedem analysierten Locus dieselbe Allelkombination. Dieses Ergebnis deutet auf eine Monozygotie hin. Zum endgültigen Nachweis müssten noch weitere genetische Marker überprüft werden, was den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte.

4.2.2 Southern Blot

Um größere Rearrangements des *POU3F4*-Gens zu überprüfen, wurde die genomische DNA der Familienmitglieder sowie von Kontrollpersonen mit *EcoRI* verdaut und mittels Southern Blot untersucht.

Bei der Hybridisierung der genomischen DNA-Probe mit der radioaktiv markierten Sonde zeigte sich die erwartete Bande bei 12 kb, die von de Kok *et al.* (1995) beschrieben wurde. Die Bande war in allen DNA-Proben identifizierbar, wobei keine Größenabweichungen feststellbar waren. Damit konnten grobe Mutationen, etwa die Deletion eines grossen Bereiches innerhalb des Gens, ausgeschlossen werden. Durch diese Untersuchung konnten jedoch Mutationen, die nur einen geringen Teil der kodierenden Sequenz betreffen, z.B. eine Punktmutation, nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde die kodierende Region im Anschluss sequenziert.

4.2.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung des DNA-Abschnittes, der das 1083 bp grosse *POU3F4*-Gen enthält, zeigte bei allen Personen ein vollständig und mutationsfrei vorliegendes Gen. Damit wurde bewiesen, dass die genetische Ursache für die vorliegende Schwerhörigkeit nicht auf einer Mutation der kodierenden Region des *POU3F4*-Gens basiert.

Die Verdachtsdiagnose *stapes gusher*, die aufgrund der auffälligen klinischen Befunde vorlag, war damit jedoch noch nicht widerlegt, da von mehreren Arbeitsgruppen genetische Defekte beschrieben wurden, die ausserhalb des *POU3F4*-Gens lagen, aber dennoch zum Phänotyp von *stapes gusher* führten (de Kok *et al.*, 1995; Bitner-Glindzicz *et al.*, 1995).

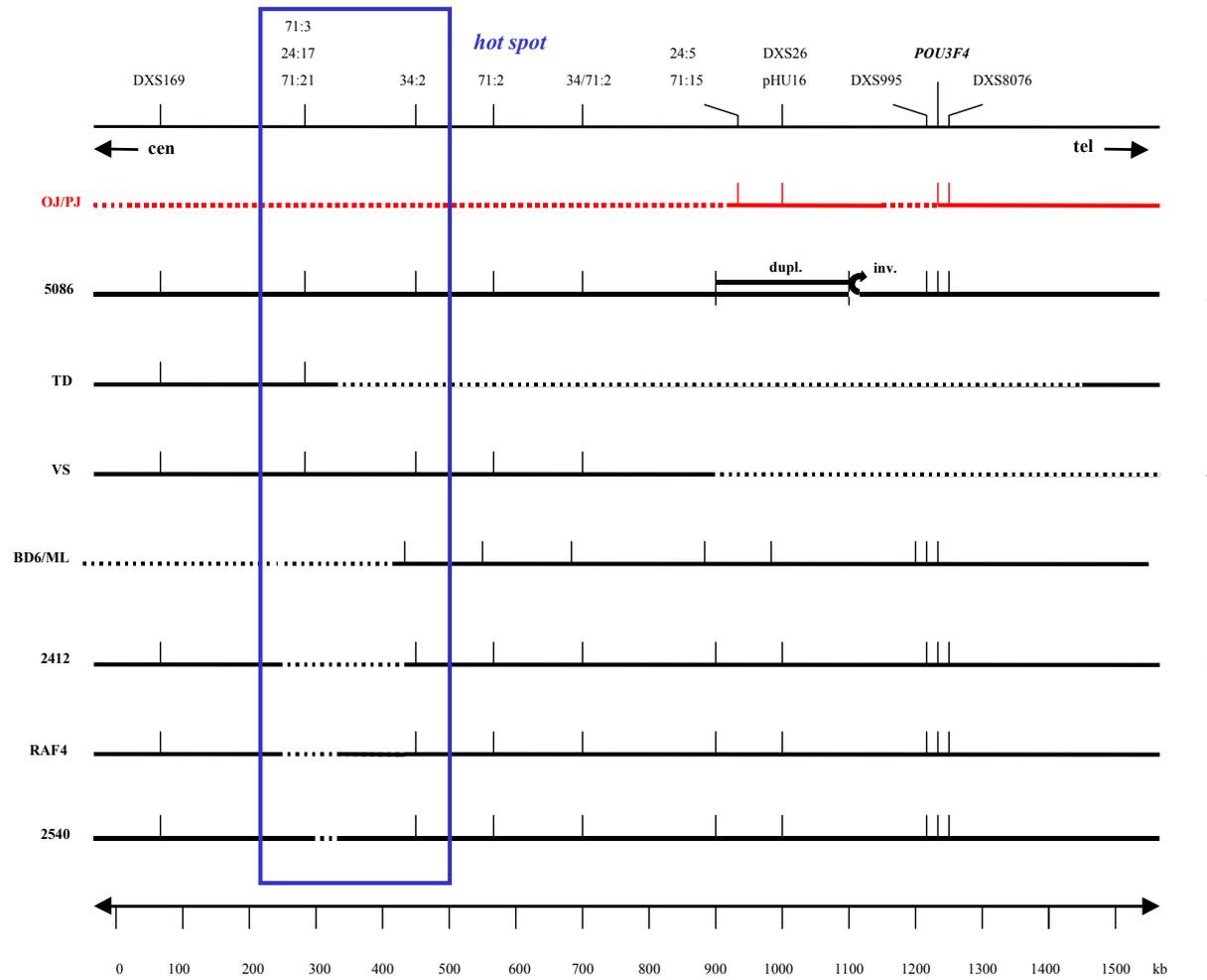
Es war daher notwendig, auch den von de Kok *et al.* als *hot spot* für ausserhalb des Exons liegende Mutationen beschriebenen Bereich zu untersuchen.

4.2.4 Überprüfung der nicht-kodierenden Region proximal des *POU3F4*-Gens

Nachdem zunächst ausgeschlossen werden konnte, dass ein genetischer Defekt innerhalb des *POU3F4*-Gens vorlag, führten wir für die bereits als *hot spot* vorgeschriebene Region proximal des Gens STR-Analysen durch. Diese Analysen ergaben zwei Deletionen, zum einen in einer Region etwa 20-200 kb proximal des Exons, zum anderen in einer Region 400-1300 kb proximal des Exons. Damit liegt der bislang einzige Fall einer doppelten Mutation im Bereich der genregulierenden Region für *POU3F4* vor (der von de Kok *et al.* 1995 publizierte Fall einer Duplikation und parazentrischen Inversion betraf nur eine Region und ging auch nicht mit einer Deletion einher, wie dies in unserer Familie der Fall ist, vgl. Abb.10, Nr.2).

Von Bedeutung bei der größeren Deletion ist, dass sie den von de Kok *et al.* (1995) beschriebenen, etwa 900 kb proximal von *POU3F4* gelegenen *hot spot* für Mutationen umfasst. Der von de Kok und Mitarbeitern auf 8 kb eingeschränkte minimal deletierte Bereich liegt dabei innerhalb dieser Deletion.

Abbildung 10 zeigt einen schematischen Vergleich zwischen einigen bereits beschriebenen Mutationen und den in dieser Arbeit detektierten Deletionen. Die grössere Deletion umfasst, wie bereits erwähnt, die von de Kok *et al.* postulierte *hot spot*-Mutationsregion. Die Autoren vermuten, dass in dieser DNA-Region ein regulatorisches Element für die *POU3F4*-Expression liegt. Dies wäre eine Erklärung für die Ausprägung des DFN3-Phänotyps auch bei Patienten, die keine Mutation in der kodierenden Region zeigen. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit noch eine zweite Deletion in der nicht-kodierenden 5'-Region des *POU3F4*-Gens detektiert werden. Die einzigen bislang bekannten Deletionen in diesem Bereich umfassen jeweils auch das *POU3F4*-Gen selbst. Die in dieser Arbeit untersuchten Zwillingbrüder stellen damit den ersten derzeit bekannten Fall mit zwei Deletionen in der nicht-kodierenden Region des *POU3F4*-Gens dar. Zwar wurde in dieser chromosomalen Region bisher kein regulatorisches Element vermutet, jedoch zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass hier durchaus für die Transkription des *POU3F4*-Gens essentielle DNA-Sequenzen liegen könnten.



nicht deletierter DNA-Bereich
 deletierter DNA-Bereich
 hot spot (de Kok *et al.*, 1995)

Abb. 9: Vergleich einiger von de Kok *et al.*, 1995 beschriebener Mutationen (2-7) der 5'-Region des *POU3F4*-Gens mit den in dieser Arbeit detektierten Deletionen (1)

4.3 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde eine Familie aus Mutter und eineiigen Zwillingen untersucht. Bei den Brüdern wurde im frühen Kindheitsalter das Vorliegen einer Hörstörung diagnostiziert. Durch die klinische Untersuchung wurde die Verdachtsdiagnose *stapes gusher* gestellt; bei den audiometrischen und radiologischen Untersuchungen zeigten sich dabei charakteristische Befunde wie eine progressive gemischt sensorisch-konduktive Hörminderung und ein abnorm erweiterter innerer Gehörgang sowie eine pathologische Verbindung zwischen Cochlea und innerem Gehörgang.

Die molekulargenetische Analyse der Familie zeigte bei allen Personen ein intaktes *POU3F4*-Gen: Beim Southern Blotting wurde das erwartete Signal in allen Proben detektiert, die PCR ergab im Vergleich zu den Kontrollpersonen bei allen Versuchspersonen ein vollständiges, 1083 bp PCR-Produkt. Durch die Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass in der kodierenden Region des Gens keine Mutationen vorhanden sind. Bisher konnten keine weiteren Gene ursächlich mit DFN3 in Verbindung gebracht werden; vielmehr wurden mehrere Mutationen im 5'-Bereich des Gens, der wahrscheinlich für die Regulation der Transkription relevant ist, beschrieben, die ebenfalls den Phänotyp von *stapes gusher* hervorrufen. Auch im Falle unserer Familie lag die Ursache für die klinisch in Erscheinung getretene Schwerhörigkeit in der putativen Promotorregion von *POU3F4*.

Die besondere Bedeutung der in dieser Arbeit untersuchten Familie besteht darin, dass es sich bei OJ und PJ um den ersten und bisher weltweit einzigen Fall von *stapes gusher* bei eineiigen Zwillingen handelt. Bei den umfassenden klinischen Untersuchungen wurde deutlich, dass trotz der identischen genetischen Information die phänotypische Ausprägung deutlich variiert. Dies unterstreicht eindrücklich die Bedeutung der Interaktion zwischen genetischer Veranlagung und Umwelteinflüssen bei der Entstehung pathologischer (und physiologischer) Zustände.

5 Zusammenfassung

DFN3 (*stapes gusher*) ist die häufigste Form X-chromosomal vererbter Schwerhörigkeit. In der vorliegenden Arbeit wurden Zwillingenbrüder mit der Verdachtsdiagnose *stapes gusher*, deren Mutter sowie Kontrollpersonen klinisch und molekulargenetisch analysiert.

Die Klinik der untersuchten Zwillingenbrüder stimmte in allen typischen Merkmalen mit bereits beschriebenen DFN3-Befunden überein. Die genetischen Untersuchungen des *POU3F4*-Gens ergaben keine chromosomalen Aberrationen der kodierenden Region des Gens. Diverse Autoren haben Mutationen beschrieben, die zu klinisch manifestem *stapes gusher* führten, jedoch nicht mit einer DNA-Veränderung innerhalb des *POU3F4*-Gens in Verbindung gebracht werden konnten. Vielmehr beruhten diese Fälle auf Mutationen im Bereich proximal von *POU3F4*, dessen funktionelle Bedeutung noch ungeklärt ist. Aus diesem Grund wurde die 5'-Region des Gens ebenfalls in dieser Arbeit analysiert. Hierbei konnte erstmals eine Doppel-Deletion in der proximalen Region des Gens nachgewiesen werden. In diesen deletierten Bereichen könnten Modulatoren, z.B. Enhancer oder Repressoren, liegen, so dass auch bei einer Mutation in dieser regulatorischen Region die Expression des *POU3F4*-Gens signifikant beeinträchtigt werden würde.

Der Vergleich der klinischen Untersuchungsergebnisse mit den molekulargenetischen Resultaten belegt das Vorliegen von DFN3 bei den Zwillingen, während die Mutter der beiden Kinder klinisch und genetisch gesund ist.

In dieser Arbeit wurde die weltweit einzige Familie mit eineiigen Zwillingen, die von DFN3 betroffen sind, identifiziert. Die Bedeutung dieser Tatsache liegt darin, dass im Verlauf der Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass trotz nachgewiesener Monozygotie der Brüder unterschiedliche Ausprägungen des Phänotyps vorlagen. Während die radiologischen Befunde bei beiden Patienten identisch waren, zeigte sich bei den audiologischen Untersuchungen eine deutliche Differenz des Schwerhörigkeitsgrades. Diese kann aufgrund der genetischen Identität nur auf die Einwirkung äußerer Faktoren zurückgeführt werden.

6 Literatur

- Ausubel, F.M. ed. (1995)
Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1-3, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School Boston, Massachusetts.
Wiley & Sons, New York
- Bach, I. (1992)
Microdeletions in patients with gusher-associated, X-linked mixed deafness (DFN3)
Am J Hum Genet 50, 38-44
- Bach, I., Robinson, D., Thomas, N., Ropers, H.-H., and Cremers, F.P.M. (1992)
Physical fine mapping of genes underlying X-linked deafness and non fra (X)-X-linked mental retardation at Xq21
Hum Genet 89, 620-624
- Bento, R.F., Miniti, A. (1985)
X-linked mixed hearing loss: Four case studies
Laryngoscope 95, 462-468
- Bergstrom, L., Stewart, J. (1971)
New concepts in congenital deafness
Otolaryngol Clin North Am J 4, 431-443
- Bitner-Glindzicz, M., Turnpenny, P., Hoeglund, P., Käärläinen, H., Sankila, E.-M., van der Maarel, S.M., de Kok, Y.J.M., Ropers, H.-H., Cremers, F.P.M., Pembrey, M. and Malcolm, S. (1995)
Further mutations in *Brain 4* (*POU3F4*) clarify the phenotype in the X-linked deafness, DFN3
Human Molecular Genetics 4, 1467-1469
- Carey, M., Smale, S.T. (1999)
Transcriptional Regulation in Eukaryotes: Concepts, Strategies, and Techniques
Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Cremers, C.W.R.J. (1985)
Audiologic features of the X-linked progressive mixed deafness syndrome with perilymphatic gusher during stapes surgery
Am J Otolaryngol 6, 243-246
- Cremers, C.W.R.J. *et al.* (1983)
Perilymphatic gusher and stapes surgery. A predictable complication?
Clin Otolaryngol 8, 235-240
- Dahl, N., Laporte, J., Hu, L., Biancalana, V., le Paslier, D., Cohen, D., Piussan, C., and Mandel, J.-L. (1995)

Deletion Mapping of X-linked Mixed Deafness (DFN3) Identifies a 265-525-kb Region Centromeric of DXS26
Am J Hum Genet 56, 999-1002

de Kok, Y.J.M., Cremers, C.W.R.J., Ropers, H.-H., Cremers, F.P.M. (1997)
The molecular basis of X-linked deafness type 3 (DFN3) in two sporadic cases: identification of a somatic mosaicism for a *POU3F4* missense mutation
Hum Mutat 10, 207-211 (Letter to the editor)

de Kok, Y.J.M., Merkx, G.F.M., van der Maarel, S.M., Huber, I., Malcolm, S., Ropers, H.-H. and Cremers, F.P.M. (1995)
A duplication/paracentric inversion associated with familial X-linked deafness (DFN3) suggests the presence of a regulatory element more than 400 kb upstream of the *POU3F4* gene. Human Molecular Genetics 4, 2145-2150

de Kok, Y.J.M., van der Maarel, S.M., Bitner-Glindzicz, M., Huber, I., Monaco, A.P., Malcolm, S., Pembrey, M.E., Ropers, H.-H., Cremers, F.P.M. (1995)
Association Between X-linked Mixed Deafness and Mutations in the POU Domain Gene *POU3F4*
Science 267, 685-688

de Kok, Y.J.M., Vossenaar, E.R., Cremers, C.W.R.J., Dahl, N., Laporte, J., Hu, L.J., Lacombe, D., Fischel-Ghodsian, N., Friedman, R.A., Parnes, L.S., Thorpe, P., Bitner-Glindzicz, M., Pander, H.-J., Heilbronner, H., Graveline, J., den Dunnen, J.T., Brunner, H.G., Ropers, H.-H. and Cremers, F.P.M. (1996)
Identification of a hot spot for microdeletions in patients with X-linked deafness type 3 (DFN3) 900 kb proximal to the DFN3 gene *POU3F4*
Human Molecular Genetics 5, 1229-1235

Douville, P.J., Atanasoski, S., Tobler, A., Fontana, A., Schwab, M.E. (1994)
The brain-specific POU-box gene *Brn4* is a sex-linked transcription factor located on the human and mouse X chromosomes
Mammalian Genome 5, 180-182

Engelkamp, D. and van Heyningen, V. (1996)
Transcription factors in disease
Current Opinion in Genetics & Development 6, 334-342

Fraser, G.R. (1971)
The genetics of congenital deafness
Otolaryngol Clin North Am 4, 227-247

Friedman, R.A., Bykhovskaya, Y., Tu, G., Talbot, J.M., Wilson, D.F., Parnes, L.S., Fischel-Ghodsian, N. (1997)
Molecular analysis of the *POU3F4* gene in patients with clinical and radiographic evidence of X-linked mixed deafness with perilymphatic gusher
Ann Otol Rhinol Laryng 106, 320-325

- Ganter, S., Sauermost, R. (Redaktion, 1995)
Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie in drei Bänden.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg·Berlin·Oxford.
- Glasscock, M.E. (1973)
The stapes gusher
Arch Otolaryngol 98, 82-91
- Gruber, C.A., Rhee, J.M., Gleiberman, A. and Turner, E.E. (1997)
POU domain factors of the Brn-3 class recognize functional DNA elements
which are distinctive, symmetrical and highly conserved in evolution
Molecular and Cellular Biology 17, 2391-2400
- He, X., Treacey, M.N., Simmonds, D.M., Ingraham, H.A., Swanson, L.W. and
Rosenfeld, M.G. (1989)
Expression of a large family of POU-domain genes in mammalian brain
development. Nature 340, 35-42
- Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, A.E., Kel, O.V.,
Ignatieva, E.V., Ananko, E.A., Podkolodnaya, O.A., Kolpakov, F.A., Pod-
kolodny, N.L. and Kolchanov, N.A. (1998)
Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL
Nucleic Acids Res 26, 364-370
- Heller, S. and Hudspeth, A.J. (1998)
Two deaf mice, two deaf mice...
Nature Medicine 4, 560-561
- Huber, I., Bitner-Glindzicz, M., de Kok, Y.J.M., van der Maarel, S.M., Ishikawa-
Brush, Y., Monaco, A.P., Robinson, D., Malcolm, S., Pembrey, M.E., Brunner,
H.G., Cremers, F.P.M. and Ropers, H.-H. (1994)
X-linked mixed deafness (DFN3): cloning and characterization of the critical
region allows the identification of novel microdeletions
Human Molecular Genetics 3, 1151-1154
- Kalatzis, V. and Petit, C. (1997)
The fundamental and medical impacts of recent progress in research on he-
reditary hearing loss
Human Molecular Genetics 7, 1589-1597
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (1993)
Principles of Neural Science, 2. Edition
Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut
- Latchman, D.S. (1998)
Eukaryotic Transcription Factors
Academic Press

- Lewin, B. (2000)
Genes VII
Oxford University Press
- Lindner, T.H., Njolstad, P.R., Horikawa, Z., Bostad, L., Bell, G.I. and Sovik, O. (1999)
A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1 β
Human Molecular Genetics 8, 2001-2008
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J. (1995)
Molecular Cell Biology, 3. Edition
Scientific American Books, New York
- Michel, O., Breunsbach, J. und Matthias R. (1991)
Das angeborene Liquordrucklabyrinth
HNO 39, 480-490
- Minowa, O., Ikeda, K., Sugitani, Y., Oshima, T., Nakai, S., Katori, Y., Suzuki, M., Furukawa, M., Kawase, T., Zheng, Y., Ogura, M., Asada, Y., Watanabe, K., Yamanaka, H., Gotoh, S., Nishi-Takeshima, M., Sugimoto, T., Kikuchi, T., Takasaka, T., Noda, T. (1999)
Altered Cochlear Fibrocytes in a Mouse Model of DFN3 Nonsyndromic Deafness
Science 285, 1408-1411
- Mumm, S., Jermak, C., Waeltz, P., Schmatz, M., Terrell, J., McCauley, B., Shoemaker, M., Srivastara, A., Kere, J., Nagaraja, R. (1998)
22-Mb integrated physical and genetic map based on YAC/STS content spanning the interval DXS1125-DXS95 in human Xq12-q21.31
Gene 208, 147-156
- Nance, W.E., Sweeney, A. (1975)
Genetic factors in deafness of early life
Otolaryngol Clin North Am 8, 19-48
- Phelps, P.D., Reardon, W., Pembrey, M., Bellman, S., Luxom, L. (1991)
X-linked deafness, stapes gushers and a distinctive defect of the inner ear
Neuroradiology 33, 326-330
Pschyrembel (1994)
Klinisches Wörterbuch, 257. Aufl.
Walter de Gruyter, Berlin·New York
- Reardon, W. (1990)
Sex linked deafness: Wilde revisited
J Med Genet 27, 376-379

Reardon, W., Middleton-Price, H.R., Sandkuijl, L., Phelps, P., Bellman, S., Luxon, L., Pembrey, M.E., Malcolm, S. (1991)
A multipedigree linkage study of X-linked deafness: linkage to Xq13-q21 and evidence for genetic heterogeneity
Genomics 11, 885-894

Roche (1999)
Roche Lexikon Medizin, 4. Aufl.
Urban & Schwarzenberg, München

Rose, W.R. (1977)
Audiology-1: hearing and deafness
Number fourteen in a series
Vet Med Small Anim Clin 72, 281-286

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Satoh, H., Nonomura, N., Takahashi, S. (1999)
Four cases of familial hearing loss with large vestibular aqueducts
Eur Arch Otorhinolaryngol 31, 1-4, 1999 (Letter to the editors)

Steel, K.P. (1998)
Human Genetics: Progress in Progressive Hearing Loss
Science 279, 1870-1871

Van Camp, G., Smith, R.J.H.
Hereditary Hearing Loss Homepage
URL: <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/>

Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. und Zoller, M. (1995)
Rekombinierte DNA, 2. Auflage
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg·Berlin·Oxford

Weber, J.L. and Wong, C. (1993)
Mutation of human short tandem repeats
Hum Mol Genet 2, 1123-1128

Zenner, H.P. (1995)
Praktische Therapie von Hals-Nasen-Ohren-Krankheiten
Schattauer, Stuttgart·New York

7 Anhang

7.1 Allgemeine Materialien

7.1.1 Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius analytic, Sartorius AG, Göttingen
Brutschrank	Bachofer, Reutlingen
E.A.S.Y. PLUS Analysis	Herolab, Wiesloch
	Elektrophoreseapparaturen
	BioRAD Laboratories, Richmond, VA, USA
	Pharmacia, Freiburg
	Renner, Dannstadt
Gel-Trockner	Modell 583, BioRAD Laboratories, Richmond, VA, USA
Heizblock	Thermomixer GFL 3015, Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Magnetrührer	IKAMAG RCT, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Mikrowelle	MWS 2822, Bauknecht
Netzteile (Agarose-Gelelektrophorese)	GNA 200, MWG-Biotech
PCR-Gerät und -Heizblöcke	GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer, PE Biosystems, Darmstadt
	MJ Research PTC-200, PE Applied Biosystems, Perkin Elmer, Darmstadt
pH-Meter	Modell Φ 32 pH-Meter, Beckman, Palo Alto, CA, USA
Phosphoimager-Analysator	SI-Molecular Dynamics
Phosphoimager-Platte	Kodak, X-Omatic Cassette
Schüttelgerät (Vortexer)	Modell VF2, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen
Schüttlerinkubator für Bakterienkulturen	3015 GFL, Bachofer, Reutlingen
Sequenziergerät	ABI PRISM 377 DNA Sequencer, PE Applied Biosystems, Perkin Elmer, Darmstadt
Spektrophotometer	LKB Produkte, Bromma, Schweden
	UV/VIS Sceptrometer lambda 2, Perkin Elmer

Sterile Arbeitsbank	Lamin Air HB 2448, Heraeus Instruments, Osterode/Hanau
Thermocycler	Biometra, Göttingen Biozym Diagnostik GmbH, Hameln
UV-Screen	LTF Labortechnik
Vakuumtrockner (SpeedVac Concentrator)	Bachofer, Reutlingen
Wasserbäder	B. Braun, Melsungen
Wasserdeionisierungsanlage	Milli-Q-Plus, Millipore, Molsheim, Frankreich
Zentrifugen	Bachofer, Reutlingen Beckman, Palo Alto, CA, USA Dupont, Boston, MA, USA Eppendorf, Hamburg Heraeus, Osterode

7.1.2 Glas- und Kunststoffwaren

Glaspipetten	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße (0.2 ml)	Biozym, Oldenburg
Petrischalen	Greiner, Frickemhausen
Pipettenspitzen	Biozym, Oldenburg Greiner, Frickemhausen
Plastikpipetten (10 ml)	Greiner, Frickemhausen
Quarzküvetten	Hellma, Mülheim
Reaktionsgefäße (1.5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter (0.22 µm Porengröße)	Schleicher & Schuell, Dassel
Zentrifugenröhrchen (Spitzboden, 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg

7.1.3 Sonstige Materialien

DNASIS Software	Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA
Filementwicklerkassetten	Siemens, München
Fuji Medical X-Ray Film RX	Hirrlinger, Baden-Baden
GeneScan [®] Software	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Genotyper [®] Software	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Kodak GBX Developer	Hirrlinger, Baden-Baden
Kodak GBX Fixer and Replenisher	Hirrlinger, Baden-Baden
Mitsubishi Video Copy Processor	Hirrlinger, Baden-Baden
Parafilm	American National Can, Neenah, WI, USA
Whatman 3 MM Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK

7.1.4 Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	BioRAD Laboratories, Richmond, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
Alconox (Glasreiniger)	Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRAD Laboratories, Richmond, USA
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 100 mM)	GibcoBRL, Paisley, Scotland
100bp-DNA-Molekulargewichtsmarker (500 µg/ml)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot Frankreich
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Gelladepuffer („red loading buffer“)	Amersham, Life Science, Braunschweig
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Herings sperma-DNA	Sigma, Deisenhofen
Kit für Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN GmbH, Hilden
Kit für Minipräparationen	QIAGEN Plasmid Miniprep Kit, QIAGEN GmbH, Hilden
Kit für Midipräparationen	Jetstar Plasmid Midiprep Kit, Genomed, Bad Oeynhausen
λHindIII-DNA-Molekulargewichtsmarker = 100 bp ladder (50 ng/µl)	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Nitrozellulosemembran (0.45 µm)	Amersham, Life Science, Braunschweig
Nylonmembran, Nytran 0.2	Schleicher & Schuell, Dassel
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRAD, Laboratories, Richmond, USA
Oligonukleotidprimer	MWG Biotech AG, Ebersberg
³² P-γ-ATP	ICN, Doorenveld, Belgien
SDS	Roth, Karlsruhe
Tris	Sigma, Deisenhofen

7.1.5 Weitere Chemikalien

Alle weiteren hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

7.1.6 Enzyme für molekularbiologische Arbeiten

Proteinase K	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Random Primed Labeling Kit	Boehringer Mannheim
Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i> (20 U/ μ l)	Boehringer Mannheim
T ₄ -Polynukleotid-Kinase (10 U/ μ l)	GibcoBRL, Paisley, Scotland
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	GibcoBRL, Paisley, Scotland

7.1.7 Puffer und Stammlösungen

Alle im folgenden genannten Puffer und Stammlösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit doppelt deionisiertem Wasser angesetzt und vor Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert.

Desoxyribonukleotid-Gemisch (dNTPs) für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

1.25 mM dATP
 1.25 mM dCTP
 1.25 mM dGTP
 1.25 mM dTTP

6x DNA-Ladepuffer (Blaupuffer)

0.1% Bromphenolblau
 0.1% Xylencyanol
 15% Ficoll 400

Dithiothreitol (DTT)-Stammlösung

1 M

DNA-Molekulargewichtsmarker (100 bp DNA ladder)

500 μ g/ml

0.5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

186.1 g Na₂-EDTA x 2 H₂O
 ad 1 Liter, pH 8.0

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml

λ Hind III-Größenmarker (50 ng/ μ l)

20 ml λ Hind III-Restriktionsfragmente (0.25 mg/ml)
17 ml 6x Agarose-Puffer

ad 100 ml H₂O_{dd}

5 min bei 75°C denaturieren (Trennung der einzelnen Fragmente)

Lysispuffer

155 mM NH₄Cl
10 mM KHCO₃
0.1 mM Na₂EDTA

pH-Wert auf 7.4 einstellen

0.5 M Na₃PO₄ Phosphatpuffer-Stammlösung

0.5 M Na₂HPO₄ (pH 9.8; Stammlösung: 26.7 g/300 ml H₂O_{dd})
0.5 M Na₂HPO₄ (pH 4.2; Stammlösung: 15.6 g/200 ml H₂O_{dd})

gegeneinander titrieren bis pH 7.2

SE-Puffer

75 mM NaCl
1 mM Na₂EDTA

pH-Wert auf 8.0 einstellen

Southern Blot-Hybridisierungslösung

2 ml Na₃PO₄-Stammlösung (0.5 M; pH 7.2)
20 μ l EDTA-Stammlösung (0.5 M; pH 8.0)
3.5 ml SDS

ad 10 ml mit H₂O_{dd} auffüllen

Southern Blot-Prähybridisierungslösung

15 ml Hybridisierungslösung
150 μ l Heringssperma-DNA (10 min bei 95°C denaturieren, 2 min auf Eis inkubieren)

20x SSC (standard saline citrate)

175.3 g NaCl (3 M)
88.2 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat (0.3 M)

in 800 ml H₂O_{dd} lösen, pH-Wert auf 7.0 einstellen, ad 1 Liter auffüllen.

10 x TAE-Puffer

400 mM Tris-Base (pH 8)
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA (pH 8.0)

10x TBE-Puffer

890 mM Tris-Base (pH 8.3)
890 mM Borsäure
10 mM EDTA (pH 8.0)

pH-Wert auf 8.0 einstellen

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
1 mM EDTA

pH-Wert auf 8.0 einstellen

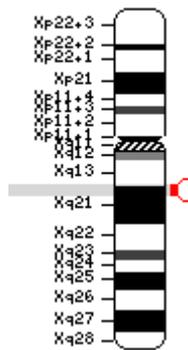
7.1.8 Oligonukleotidprimer

Primersequenzen der verwendeten Primer (die Primer sind nach ihrer Sequenz in 5'→3'-Richtung aufgeführt):

<u>Primernamen</u>	<u>Primersequenz</u>
POU3-1a	act agt agg gga tcc tca ccg
POU3-Vb	gcc tcc teg ctt cct cca

Die Primer wurden zusätzlich für die Synthese der Hybridisierungssonde im Southern Blot verwendet.

7.2 Genregion Xq21.2



7.3 Nukleotidsequenz *POU3F4*

```

1  acattataac tagtagggga tcctcaccga ccatggccac agctgcctcg aatccctaca
61  gcattctcag ttccacctcc ctagtccatg cggactctgc gggcatgcag caggggagtc
121 ctttccgcaa ccctcagaaa cttctccaaa gtgattactt gcagggagtt cccagcaatg
181 ggcatcccct cgggcatcac tgggtgacca gtctgagcga cgggggcca tggctctcca
241 cactggccac cagccccctg gaccagcagg acgtgaagcc cgggcgcgaa gacctgcaac
301 tgggtgcgat catccatcac cgctcgccac acgtagccca ccactaccg cacactaacc
361 accccaacgc ctggggggcc agcccggcac cgaaccctc tatcacgtca agcggccaac
421 ccctcaacgt gtactcgcag cctggcttca ccgtgagcgg catgctggaa cacgggggac
481 tcaccccacc tccagctgcc gcctctgcac agagcctgca cccgggtgctc cgagagcccc
541 cggatcacgg cgaactgggc tcgcaccatt gccaggatca ctccgacgag gagacgcaa
601 cctctgatga gttggaacag ttcgccaac aattcaaaca aaagaagaat caagttgggc
661 ttcacgcagg ccgacgtggg gttggcgctg ggcacactgt atggtaacgt gttctcgag
721 accaccatct gcaggttcga aggcttgca ctgagcttca aaaatatgtg caagctgaag
781 cccctgctga acaagtggct ggaggaggcg gattcgtcca cagggagccc gaccagcatt
841 gacaagatcg ctgcacaggg ccgcaagcgc aagaagcgga cctccatcga ggtgagtgtc
901 aagggcgtac tggagacgca tttcctcaag tgtccaagc ctgccgcgca ggagatctcc
961 tcgctggcag acagcctcca gttggagaag gaagtgggct gtgtctgggt ctgtaatcga
1021 agacaaaaaag agaaaagaat gactccgcca ggggatcagc agccgcatga ggtttattcg
1081 cacaccgtga aaacagacac atcttgccat gatctctgac tggaggaagc gaggaggcgg
1141 ccggccgcac tgggagcagc gcggatttct ctttctctct cactctcttc ctttcattct
1201 agtattcttt attatttttc tctctctctc gttcgtctcg tctctcgtac tctctctctt
1261 ttccctcctt tcctttttct ttcccttccc ctttttcttt cccttctttt tccctttcct
1321 ttcccttcat tttctttcct ttccccttcc ctccccttcc ctccatctc ttcccttctt
1381 ttcccttctt ttcttttgct ttcccttctt ttttttccct tttctttctt tttcataaga
1441 ggttctaact tctgttgaca aaggaaacac atactc

```

7.4 Danksagung

Danke an alle Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. H. P. Zenner und Herrn Prof. N. Blin für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz sowie die Bereitschaft, die Gutachten zu übernehmen.

Herrn Dr. M. Pfister, für die Überlassung des Dissertationsthemas, die freundschaftliche Zusammenarbeit und den stetigen Informationsaustausch.

Den Mitarbeitern der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik Tübingen, für die Unterstützung bei den klinischen Untersuchungen.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulargenetik erblicher Schwerhörigkeiten“ für die gute Zusammenarbeit; insbesondere Herrn Hakan Esmer für die Hilfe bei den zeitaufwendigen Sequenzierarbeiten.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Blin für die herzliche Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen nützlichen Tips; im besonderen Herrn Dr. Tuncay Kayademir, für die vielen fachlichen Diskussionen und die moralische Unterstützung.

Ganz besonders Frau Dr. Susan Kupka, für ihre fachliche Expertise, ihren kritischen Beistand und die angenehme Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Werner für unschätzbare technische Expertise und seine Unterstützung als Mentor.

Allen anderen, die hier nicht namentlich erwähnt sind, aber auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes für die grosszügige finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums.

Und meiner Familie, wie immer für alles.

7.5 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Na-Ri Oh
 Geburtstag: 18.06.1974
 Geburtsort: Nastätten
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1980-1984 Kath. Grundschule Eberhofweg, Hamburg
 1984-1993 Kath. Gymnasium Sophie-Barat-Schule, Hamburg

Studium

1993-1994/ Studium der Biochemie/Molekularbiologie,
 1995-1996 Universität Hamburg
 1994-1995 Visiting Undergraduate Student, Neuroscience,
 Harvard University, Cambridge, USA
 1996 Vordiplomsprüfung Biochemie/Molekularbiologie
 1996-2000 Studium der Medizin und der Biochemie,
 Eberhard-Karls-Universität Tübingen
 1997 Ärztliche Vorprüfung
 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2000-2001 Studium der Medizin,
 Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
 22. November 2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit

seit 04/2002 Ärztin im Praktikum, Humboldt-Universität Charité,
 Institut für Mikrobiologie und Hygiene

