

Aus der

Hals-, Nasen- und Ohrenklinik des Unfallkrankenhauses Berlin

Direktor: Professor Dr. med. A. Ernst

## **Habilitationsschrift**

***Direkte Zell-Zell Kommunikation cochleärer Hensenzellen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen: Untersuchungen zur Konnexin-assoziierten Innenohrschwerhörigkeit***

zur

Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Hals-, Nasen- Ohrenheilkunde

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Ingo Todt  
geboren am 24.12.1968 in Bielefeld

Eingereicht: Juni 2007

Dekan: Professor Dr. med. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Strutz

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Plinkert

Antrittsvorlesung: 07.11.2008

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <b><u>Einleitung</u></b>	
1.1 Interzelluläre Kopplung durch Zell-Zell-Kanäle: Struktur und Funktion	6
1.2 Zell-Zell-Kanäle (gap junctions):Klassifikation und pathophysiologische Bedeutung	9
1.3 Vorkommen und funktionell-klinische Relevanz von Zell-Zell-Kanälen (gap junctions) im Innenohr	11
1.4 Klinische Bedeutung von Konnexin- Mutationen für das Hören	15
1.5 Zielsetzung	16
2. <b><u>Material und Methoden</u></b>	
2.1 Versuchstiere und deren Haltung	18
2.2 Präparation der Innenohrgewebeanteile	18
2.3 Lösungen	20
2.4 Elektrophysiologischer Messaufbau	21
2.5 Pipettenherstellung	21
2.6 Bestimmung der Leitfähigkeit und der Widerstände	22
2.7 Messung des $[Ca^{2+}]_i$	25
2.8 Messprotokoll	26
2.9 Analyse und statistische Aufarbeitung der erhobenen Messdaten	27
2.10 Patientenauswahl und Gruppierung der Patienten mit Innenohrschwerhörigkeit	27
2.11 Definition und Verteilung der Subgruppen	28
2.12 Molekulargenetische Analysen	29

3.	<b><u>Ergebnisse</u></b>	
3.1	Etablierung der doppelten Ganzzelleableitung (DWPC) nach erfolgreicher Isolation cochleärer Hensenzellen	31
3.2	Spannungsabhängigkeit der transjunctionalen Leitfähigkeit	34
3.3	Auswirkungen von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die interzelluläre Kopplung	37
3.4	Auswirkungen von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf das [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	38
3.5	Auswirkungen von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die Ionenkanäle der Einzelzelle	40
3.6	Einfluß von Gentamycin auf die GJIC	41
3.7	Inhibition der Gentamycin- induzierte Veränderung der GJIC durch Katalase	43
3.8	Interaktion von ionisiertem Eisen und Deferoxamine mit der Gentamycin- induzierten Veränderung der GJIC	44
3.9	Häufigkeit von Connexin- Mutationen in der Population	48
3.10	Verteilung der Mutationshäufigkeit in den klinischen Subgruppen von Patienten	48
4.	<b><u>Diskussion</u></b>	
4.1	Regulation von Zell-Zell-Kanälen an Hensenzellen des Innenohres	51
4.2	Funktionelle Bedeutung von Cx 26 und Cx 30 im Corti-Organ	54
4.3	Der Einfluß von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die interzelluläre Kopplung	56
4.4	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> und interzelluläre Kopplung	57

4.5	Bildung freier Radikale und Aminoglykosid- ototoxizität	58
4.6	Häufigkeitsverteilung von Konnexin- Mutationen	62
4.7	Cx26- Mutationen bei akuter Hörminderung und beiderseitiger Innenohrschwerhörigkeit	65
4.8	Cx26- Mutationen bei Taubheit	66
4.9	Cx26- Mutationen bei Morbus Meniere'	67
4.10	Cx26- Mutationen bei Akustikusneurinomen	67
4.11	Cx26- und Cx30- Mutationen bei Otosklerose	68
4.12	Erbgang von Cx26- Mutationen	69
5.	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	70
6.	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	73
7.	<b><u>Anhang</u></b>	94

Abkürzungsverzeichnis:

MW, Molekulargewicht

Cx, Connexin

CMTX, Charcot Marie Tooth

KID, Keratitis-Ichtyosis-Deafness

HID, Hysterix like-Ichtyosis-Deafness

mV, milliVolt

OHC, Outer hair cell, äußere Haarzelle

EP, Endocochleäre Potential

DWPC, Double whole cell patch clamp,  
Doppelte Ganzzelleableitung

GJIC, Gap junctional intercellular communication,  
Direkte Zell-Zell-Kommunikation

ROS, Radical oxygen species,  
Freie Radikale

HBSS, Hanks balanced salt solution

MΩ, MegaOhm

GΩ, GigaOhm

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, intrazelluläres Calcium

SDM, Standard deviation of the mean

GJ, interzelluläre Leitfähigkeit

nS, NanoSiemens

mM, milliMol

μM, microMol

InsP<sub>3</sub>, Phosphatidylinositol 4,5-trisphosphat

### *1. Einleitung*

#### *1. 1. Interzelluläre Kopplung durch Zell-Zell-Kanäle:*

##### *Struktur und Funktion*

Der erste experimentelle Nachweis einer direkten interzellulären Kopplung gelang bereits 1964 Kanno und Loewenstein, welche anhand von Speicheldrüsenepithelien der *Drosophila melanogaster* feststellten, „dass die Permeabilität der Epithelialmembran in der mit der anderen Zelle anhaftenden Region, im Gegensatz zum Rest der Zelloberfläche, kein grundsätzliches Hindernis zum Übertritt von Ionen bot“. Nach Versuchen mit Kalium, Natrium und Chlorid folgten (Kanno et al., 1964; Loewenstein et al., 1964) Versuche mit dem auch heute noch angewandten Fluoreszenzfarbstoff Natrium-Fluorescein (Loewenstein et al., 1964).

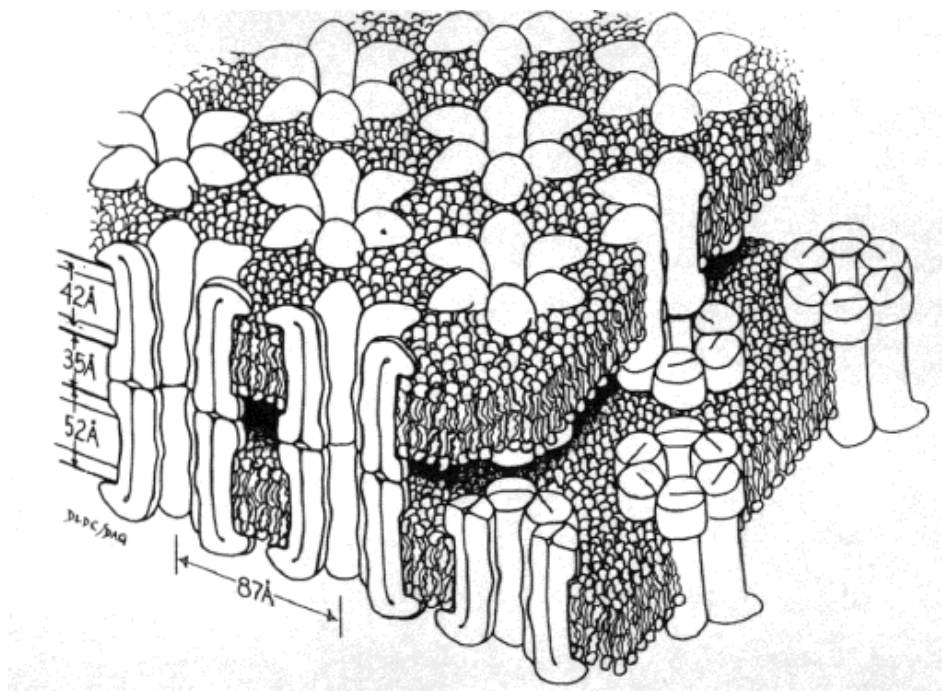
Der elektrophysiologische Nachweis direkter Zell-Zell-Verbindungen („gap junctions“) am Innenohr gelang sehr früh, d.h. ein Jahr nach dem Nachweis der interzellulären Kopplung (Loewenstein et al., 1965).

Nach dem experimentellen Nachweis stellten sich Fragen nach der physiologischen und pathophysiologischen Relevanz der interzellulären Kopplung. Eine gängige Hypothese besagte, dass ein physiologisches Gewebewachstum eine Interaktion von Zellen benötigt, so dass sowohl Wachstum als auch Hemmung zu einzelnen Zeitpunkten und je nach Erfordernis möglich werden (Loewenstein et al., 1966). Fraglich war jedoch zum damaligen Zeitpunkt, ob die Zell-Zell-Diffusion von Substanzen in diesen Signaltransduktionsprozess involviert ist. Eine indirekte Antwort ergab sich aus Untersuchungen an Leberkrebszellen, die sich nachweislich so verhielten wie Zellen, deren interzelluläre Kommunikation unterbrochen ist (Loewenstein et al., 1966). Dies war der erste experimentell gewonnene Hinweis auf die pathophysiologische Relevanz interzellulärer Kopplung.

---

Weitere Untersuchungen mit diffusiblen Einzelsubstanzen zeigten, dass Zell-Zell-Kanäle für Substanzen mit einem Molekulargewicht (MW) von 69.000 (Albumin) durchgängig sind, jedoch eine Passage von Polylysin (127.000 MW) nicht mehr möglich ist. Damit konnte strukturell geschlussfolgert werden, dass der einzelne Zell-Zell-Kanal einen hydrodynamischen Radius von mindestens 36 Å haben musste (Kanno et al., 1966).

Frühe röntgenologische und elektronenmikroskopische Studien belegen die in Abb.1 dargestellte Struktur einzelner Zell-Zell-Kanäle (Vrensen et al., 1991), bei der jeder Kanal aus einem Paar hexamer strukturierter Oligomere (Konnexine) gebildet wird, die als Konnexone bezeichnet werden.



**Abb.1:**

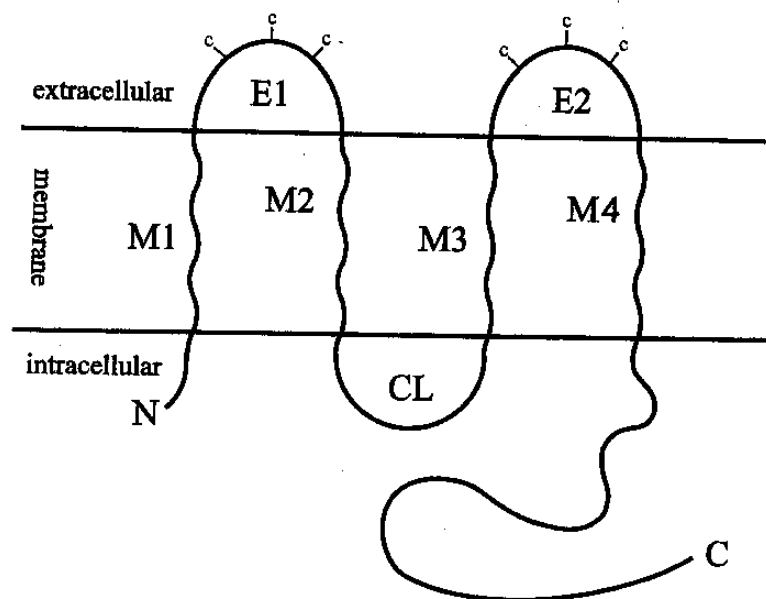
Modell eines Zell-Zell-Kanals (gap junction):

Jede benachbarte Zelle trägt mit einem Halbkanal (Konnexon) zur Bildung eines Zell-Zell-Kanals bei, welcher das Zytoplasma der Zellen miteinander verbindet. Jedes Konnexon ist ein Multimer und kann mehr als einen Konnexin-Typ enthalten (Vrensen et al., 1991).

---

Die Annahme einer hexameren, symmetrischen Struktur der Konnexone wurde unterstützt durch 3D-Rekonstruktionen elektronenmikroskopischer Aufnahmen und Gefrierbruchtechniken („freeze-fracture techniques“) (Unwin et al., 1980; 1984).

Diese und andere Ergebnisse belegen (Goodenough et al., 1974; Caspar et al., 1977; Makowski et al., 1977; Makowski et al., 1984; Hoh et al., 1993; Evans et al., 2002), dass jedes einzelne Konnexin aus vier transmembranären hydrophoben Molekülen (M1-M4), zwei extrazellulären Schleifen (E1 und E2) sowie einer intrazellulären Schleife (CL) besteht (Beyer et al., 1989).



**Abb.2:**

Schematische Darstellung eines Konnexinproteins (aus Goodenough et al., 1996).



---

## 1.2. Zell-Zell-Kanäle (*gap junctions*): Klassifikation und pathophysiologische Bedeutung

Synonymisch wird für den Zell-Zell-Kanal in der Literatur der Begriff „*gap junctions*“ verwendet, der im engeren Sinne ein Plaque oder Feld von Zell-Zell-Kanälen benennt (Söhl et al., 2003). Konnexine werden nach ihrem Molekulargewicht klassifiziert (Konnexin 26/Cx26 bis Konnexin 62/Cx62). Bisher sind 20 verschiedene Konnexine für die Maus und 21 für den Menschen identifiziert (Söhl et al., 2003). Nicht jedes Konnexin ist jedoch in der Lage, heterotypische interzelluläre Kanäle zu bilden (Swenson et al., 1989). Es zeigte sich, daß die extrazellulären Loops E1 und E2 für die Kompatibilität (und damit Funktionalität) der Zell-Zell-Kanäle eine Rolle spielen (Abb.2) (White et al., 1994). Aufgrund spezifischer Mutationen des E1-Loops von Cx26 und Cx32 fanden sich Hinweise auf einen Spannungssensor in dieser Region, welcher in Interaktion mit dem anderen Konnexon das Öffnungsverhalten in Abhängigkeit von Spannung und Membranpotential bestimmt (Rubin et al., 1992). Aus der großen Anzahl an verschiedenen Konnexinen ergibt sich eine theoretisch sehr große Anzahl an Kombinationen zur Bildung von heterotypischen Kanälen (unterschiedliche Konnexone homogener Konnexine) und eine noch größere Anzahl an heteromeren Konnexonen (unterschiedliche Konnexine eines Konnexons).

Nur einzelne Konnexine können jedoch funktionelle Halbkanäle bilden, deren Regulation u.a. durch Änderungen der Membranspannung, ( $\text{Ca}^{2+}$ ), pH und Phosphorylierung erfolgen (Contreras et al., 2003; Beahm et al., 2002; Ngezahayo et al., 1998).

Die erste bekannte humane, Konnexin-assoziierte Erkrankung ist die X-chromosomal vermittelte Form der Charcot-Marie Tooth-

---

Krankheit (CMTX) (Bergoffen et al.,1993), die als eine der häufigsten erblichen Demyelinisierungserkrankungen des peripheren Nervensystems gilt. Cx32- Mutationen können diese Erkrankung verursachen, indem sie die Signaltransduktion innerhalb der Schwann'schen Nervenscheide beeinträchtigt.

Katarakte folgen oft einem autosomal-dominantem Erbgang und die Unterform CZP1 kann nach Studien an größeren Familienverbänden durch Cx50-Mutationen hervorgerufen werden (Shiels et al.,1998). Cx37-Mutationen können eine Ursache weiblicher Infertilität durch Ovulationshemmung sein (Simon et al., 1997), Cx40-Mutationen können die kardiale Reizfortleitung im His-Purkinje-System beeinträchtigen (Gourdie et al., 1993; Simon et al.,1998; Kirchhoff et al., 1998).

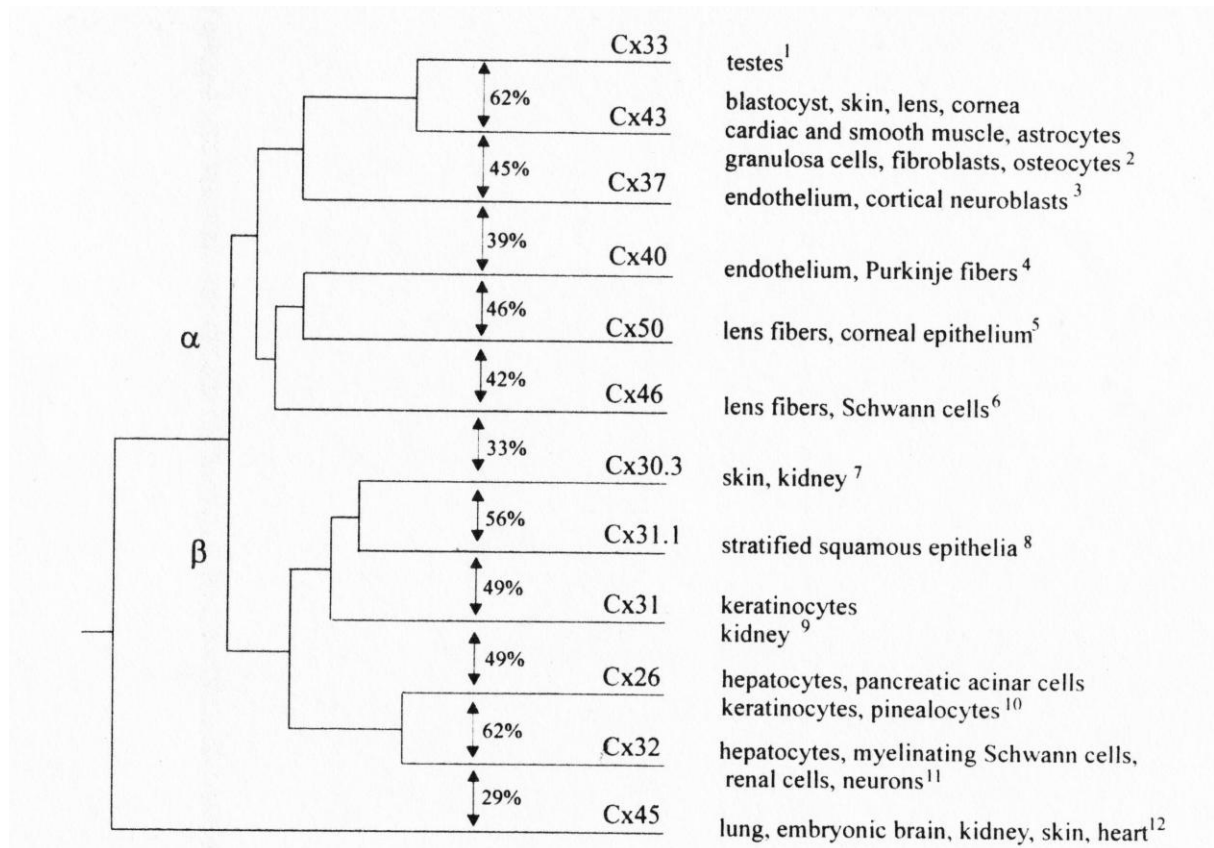
Innenohrhörstörungen können nach jüngstem Kenntnisstand durch verschiedene Mutationen auf den Genen von 4 Konnexinen (Cx26, Cx30, Cx31, Cx43) hervorgerufen werden (Carrasquillo et al., 1997; Denoyelle et al., 1997; Kelsell et al., 1997; Xia et al., 1998; Grifa et al., 1999; Liu et al., 2001; Bitner-Glindzicz et al., 2002; Stoikovic et al., 1999; Matsuyama et al., 2001).

Cx26- Mutationen werden als häufigste Ursache hereditärer, non-syndromaler Schwerhörigkeiten angesehen (Bitner-Glindzicz et al., 2002). Sie können jedoch auch eine Reihe anderer, klinisch relevanter Syndrome jenseits des Innenohres induzieren, wie z.B. das KID-Syndrom (Keratitis-Ichtyosis-Deafness), das HID-Syndrom (Van Geel et al., 2002), das Vohwinkels- Syndrom und das Palmoplantar-Keratoderma-Syndrom (Rabionet et al., 2002).

Cx26 wird auch als Tumorsuppressor- Gen in verschiedenen Karzinomformen diskutiert (Tanaka et al., 2004; Momiyama et al., 2003; Gee et al., 2003).

Aufgrund eines in den letzten Jahren stark zunehmenden wissenschaftlichem Interesse an Konnexinen durch die Assoziation mit Erkrankungen (Pubmed- Recherche: 2008, 5977 Hits; 2003, 710 Hits; 1997, 230 Hits; 1993, 110 Hits) ist eine umfassende

Übersicht über die Expression von Konnexinen in den unterschiedlichen humanen, Maus- oder Rattengeweben sehr schwierig (vgl. Goodenough et al., 1996).



**Abb. 3:**

Das Dendrogram illustriert die phylogenetische Beziehung der Konnexine sowie deren RNA- Expression bzw. den immunhistochemischen Nachweis in den Einzelgeweben.

### 1.3. Vorkommen und funktionell-klinische Relevanz von Zell-Zell-Kanälen (gap junctions) im Innenohr

Elektronenmikroskopische Untersuchungen mittels Gefrierbruch haben bereits in den 70er Jahren morphologisch eine ausgeprägte interzelluläre Kopplung der labyrinthären Gewebsanteile nachgewiesen (Jahnke et al., 1975; Iurato et al., 1976; Iurato et

---

al., 1977; Forge et al., 1999). Das Ausmaß der interzellulären Kopplung umfasst teilweise 25 % der Plasmamembran zwischen benachbarten Stützzellen des Innenohres. Da jeder Zell-Zell-Kanal aus Plaques von über 100 000 Kanälen besteht, handelt es sich dabei um eine der am intensivsten gekoppelten Regionen des menschlichen Organismus (Forge et al., 2003). Während Einigkeit darüber herrscht, dass Zell-Zell-Kanäle zwischen Sinneszellen (Haarzellen) des Innenohres und Stützzellen bei den verschiedenen Arten fehlen (Forge et al., 2003), wird die Kopplung zwischen sensorischem Epithel der Vestibularorgane und derer Stützzellen kontrovers diskutiert (Nadol et al., 1976; Hama et al., 1980; Mulroy et al., 1993; Forge et al., 2003). Immunhistochemische Untersuchungen haben die Konnexine 26, 30, 31, 32 und 43 im Innenohr und 26, 30 und 43 in den Vestibularorganen nachweisen können (Kikuchi et al., 1994; Kikuchi et al., 1995; Lautermann et al., 1998; Xia et al., 2001; Forge et al., 2003), wobei eine enge morphologische Korrelation von Cx26 zu den Schlussleistenproteinen (tight junctions) Occludin und ZO-1 beobachtet werden konnte (Suzuki et al., 2001).

Während man Cx26 und Cx30 in verstärktem Maße in der Region des Corti-Organs und den Basalzellen der Stria vascularis nachweisen konnte, findet sich Cx43 in der strialen Marginalzellregion, den Typ-I- Fibrocyten und den apikalen Anteilen der Deiterszellen (Liu et al., 2001; Forge et al., 2003). Cx31 findet sich in den Typ-II- Fibrozyten (Xia et al., 2001) und Cx32 wurde in der Literatur nur einmalig im Innenohr nachgewiesen (Forge et al., 1999). Aufgrund der ausgeprägte Kolokalisation von Cx26 und Cx30 wurde die Bildung von heterotypischen oder auch heteromeren Kanälen als wahrscheinlich angesehen (Lautermann et al., 1998), so dass auch kürzlich der Nachweis heteromerer Konnexone mittels Immunpräzipitation gelang (Forge et al., 2003; Ahmad et al., 2003).

---

Funktionell wird angenommen, dass Zell-Zell-Kanäle im Innenohr zur Aufrechterhaltung eines interzellulären Kommunikationsweges erforderlich sind, der Kaliumionen nach dem Freiwerden aus den Sinneszellen zeitnah entfernt und so die Repolarisierbarkeit sichert (lokaler Kaliumpuffermechanismus) (Johnstone et al., 1989). Johnstone und Mitarbeiter konnten 1989 einen Anstieg und eine schnelle Minderung des Kaliumgradienten nach Depolarisation nachweisen. Es kann deshalb angenommen werden, dass die Stützzellen Kalium über den K-Cl Cotransporter KCC4 (Boettger et al., 2002) oder andere Kaliumkanäle – z.B. KCNQ4 (Liang et al., 2004), MERG 1a (Nie et al., 2004) oder Kir 4.1 (Chiba et al., 2004)- aufnehmen und mittels eines Zell-Zell-Kanalnetzwerkes abtransportieren und somit die ionale Homöostase um die äußeren Haarzellen aufrecht erhalten. Elektrophysiologische Untersuchungen an depolarisierten OHC und Deiterszellen, der nächstgelegenen Stützzellpopulation im Corti-Organ, belegen einen auswärtsgerichteten Kaliumstrom der OHC und einwärtsgerichteten Kaliumstrom der Deiterszellen (Lagostena et al., 2003), so dass diese Ergebnisse die Hypothese vom lokalen Kaliumpuffermechanismus stützen.

Ebenso wahrscheinlich ist, dass die Zell-Zell-Kanäle zur Aufrechterhaltung des hochpositiven, endocochleären Potentials (+85mV) beitragen, so dass dieser „Batteriestrom“ die Repolarisierung der OHC initiieren kann (Kikuchi et al., 1995; Wangemann et al., 2002). In der Stria vascularis, dem für die Generation und Aufrechterhaltung des endocochleären Potentials (EP) zentralen Gewebe, besteht ebenfalls eine ausgeprägte interzelluläre Kopplung (Forge, 1984), vor allem an den Basalzellen (Forge, 1985; Carlisle et al., 1990; Souter et al., 1998). Striale Basalzellen bilden mit ligamentären Fibrozyten Zell-Zell-Kanäle. Diese Fibrozyten sind reich an Na/ K-ATPasen (Mc Guirt et al., 1994; Schulte et al., 1994), so dass aus den OHC

---

stammendes Kalium vermutlich von den ligamentären Fibrozyten in die Stria vascularis überführt wird (Souter et al., 1998).

An Cx30-Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass kein endocochleäres Potential generiert wird und auch die OHC zugrunde gehen (Teubner et al., 2003). Ein OHC-Verlust lässt sich ebenfalls durch eine Cx26-targeted-Ablation oder Expression einer dominanten Cx-26- Mutation bei Mäusen induzieren, wobei hier jedoch das EP weiter besteht (Cohen-Salomon et al., 2002; Kudo et al., 2002).

Bisher sind 8 autosomal dominante und 110 autosomal rezessive Cx26- Mutationen, 2 autosomal-dominante Cx30-, 2 autosomal-dominante bzw. 3 autosomal-rezessive Cx31- sowie 2 autosomal-rezessive Cx43- Mutationen beschrieben, die mit einer Hörminderung unterschiedlichen Ausmasses einhergehen ("The Konnexin deafness homepage", Stand 6/2003-<http://www.crg.es/deafness/>).

Die Expression der mRNA einzelner Cx26- Mutationen in den gängigen Expressionsmodellen (*Xenopus laevis*, HeLa- Zellen) zeigt in vielen Fällen Übereinstimmung der exprimierten Zell-Zell-Kanäle mit den Mutanten, die die klinisch relevanten Hörstörungen verursachen (Kelsell et al., 1997; Grifa et al., 1999; Martin et al., 1999). In einigen bisher beschriebenen Einzelfällen liessen sich die elektrophysiologischen Leitfähigkeiten der artifiziellen Kanäle mit einem angenommenen Komplettausfall der Funktion des natürlichen Kanals (und damit klinischer Taubheit) jedoch nicht in Einklang bringen. So fanden sich z.B. regelrechte Leitfähigkeiten bei Cx-Mutationen im Expressionsmodell bei klinisch nachgewiesener Taubheit des betroffenen Patienten oder eine Aufhebung der Leitfähigkeit bei einer bisher für einen Polymorphismus gehaltenen Mutation (siehe V84L; V37I, Bruzzone et al., 2003). Diese Beobachtungen und auch die beobachtete hohe Variabilität des Phenotyps ist in vivo wahrscheinlich auf die beschriebene Koexpression von Cx26 und

---

Cx30 und eine kompensatorische Gegenregulation bzw. auf einen weiteren, neben der Cx- Mutation bestehenden Defekt zurückzuführen (de Brouwer et al., 2002).

*Klinische Bedeutung von Konnexin- Mutationen  
für das Hören*

In einem weiteren klinischen Teil sollte die phänotypische Ausprägung von Konnexin- Mutationen im Hinblick auf das Hörenvermögen näher untersucht werden.

Bisher wurden 35 Gene identifiziert, die mit nicht syndromalen Formen der Schwerhörigkeit assoziiert werden. Cx26- Mutationen werden für etwa 50 % der autosomal- rezessiven, nicht syndromalen Formen von sensorineuraler Schwerhörigkeit verantwortlich gemacht. Mehr als 90 Mutationen auf dem Cx26- Gen wurden bisher beschrieben (Gualandi et al., 2003). Wie bereits angeführt, wird eine Störung der internen Kaliumhomöostase des Cortiorgans (Kelsell et al., 1997) als Ursache der Hörschädigung gesehen. Hierfür werden Mutationen der Genloci GJB2 und GJB6, die Konnexin- 26 und Konnexin- 30 kodieren, verantwortlich gemacht.

Das klinische Bild des Hörverlustes kann jedoch sehr variabel sein. Neben den homozygoten Mutationen, welche üblicherweise mit hochgradigen Formen der Schwerhörigkeiten einhergehen, ist das klinische Bild der "compound heterozygoten Mutationen" in einigen Fällen mit einer variablen Ausprägung der Hörminderung beschrieben worden (Cryns et al., 2003). Dominante Formen heterozygoter Mutationen sind zumeist mit einer Taubheit und auch zusätzlichen Symptomen, wie z.B. Hauterkrankungen assoziiert (Rabionet et al., 2002). In etwa 30 % der Patienten mit heterozygoten GJB2 Mutationen treten die Hörminderungen ohne einen nachweisbaren Bezug auf (Marlin et al., 2001). Besonders in diesen Fällen wird das zusätzliche Bestehen von bisher nicht bekannten Mutationen angenommen.

---

Neuere Arbeiten scheinen einige dieser genetisch unklaren Formen der Hörminderung durch die Beschreibung zusätzlicher Mutationen des GJB6 zu erklären (342-kb deletion, 232-kb deletion including *GJB6*) (del Castillo et al., 2002; Lerer et al., 2001; Palares-Ruiz et al., 2002; del Castillo et al., 2005; Bolz et al., 2004). Während große Studien ausschließlich die Ausprägung des Grades der Hörminderung mit den verschiedenen Mutationen in Beziehung setzten (Snoeckx et al., 2005; Welch et al., 2007), fehlt bisher eine Korrelation zu den üblichen neurotologischen Krankheitsbildern, wie sie uns in der Klinik begegnen.

### *1.5 Zielsetzung*

Das Ziel des elektrophysiologischen Teils der vorliegenden Arbeit war es, erstmalig eine elektrophysiologische Charakterisierung der zentralen Stützzellpopulation der Cochlea - der Hensenzellen - mittels der doppelten Ganzzelleableitung (double whole-cell patch-clamp- Konfiguration (DWPC)) vorzunehmen. Die DWPC- Technik gilt in der elektrophysiologischen Literatur als der Goldstandard der Untersuchung der gap- junctionalen Kopplung (GJIC). Sie bietet mehrere Vorteile gegenüber anderen Techniken (z.B. der Fluoreszenzfarbstofftechnik), indem die Zellmembran bei den Untersuchungen intakt bleibt und Einzelkanalmessungen über einen längeren Zeitraum vorgenommen werden können.

Außerdem sollten pathophysiologische, intracochleäre Veränderungen in ihrem Einfluß auf die GJIC untersucht werden, um so Rückschlüsse auf die Beeinflussbarkeit der OHC und auf die klinische Entstehung von Innenohrschwerhörigkeiten zu ziehen. Dabei wurde vor allem die Rolle freier Radikaler (radical oxygen species, ROS) näher untersucht, da sie bei verschiedenen Schädigungsmustern des Innenohres (Aminoglykosidtoxizität, lärminduzierte Schwerhörigkeit und Altersschwerhörigkeit) eine zentrale Rolle spielen (Seidmann et al., 1991; Quirk et al., 1994; Garetz et al., 1994a, 1994b; Priuska et al., 1995; Ravi et al.,



---

1995, Clerici et al., 1995; 1996; Clerici and Yang 1996; Hirose et al., 1997; Kopke et al., 1997; Lopez- Gonzalez et al., 1998; Seidmann and Shivapuja, 1993, Quirk et al., 1994; Hu et al., 1997).

Ziel des klinischen Teils der Arbeit war es, die Häufigkeit des Auftretens von *GJB2* and *GJB6* Mutationen in einer größeren Gruppe otologischer Patienten und nicht otologischer Kontrollen zu untersuchen und die erhobenen Ergebnisse mit den klinisch-audiologischen Untersuchungsbefunden zu korrelieren.

Der vorliegende elektrophysiologische Teil der Arbeit wurde durchgeführt im Institut für Biophysik der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Hans Albert Kolb. Der experimentelle Teil der Arbeit wurde im Juni 2000 abgeschlossen. Der klinische Teil wurde unter Mithilfe von Dr. Hans Christian Hennies, Max-Delbrück-Center Berlin- Buch, durchgeführt, und am Unfallkrankenhaus Berlin Ende 2006 abgeschlossen.

---

## *2. Material und Methoden*

### *2.1 Versuchstiere und deren Haltung*

Die Aufzucht und Haltung der Tiere wurde gemäß § 2 und § 8b des geltenden Tierschutzgesetzes (BGBl. IS.1094, 25.06.1998) durch das Institut für Versuchstierhaltung der Medizinischen Hochschule Hannover (Direktor: Prof. Dr. H.J. Hedrich) übernommen.

Als Versuchstiere wurden junge, pigmentierte Meerschweinchen beiderlei Geschlechts mit einem Durchschnittsgewicht von 250 g bis 300 g sowie intaktem Preyer- Reflex verwandt. Die Tiere wurden bei Pelletfutter und Wasser ad libitum in konstantem Tag/Nacht-Rhythmus gehalten.

Die Tötung der Tiere zum Zweck der Organentnahme (Entnahme der Bulla tympanica) zu wissenschaftlichen Zwecken ist weder anzeige- noch genehmigungspflichtig. Die entsprechenden Auflagen nach §4,§7,§8 sowie §9 des Tierschutzgesetzes wurden erfüllt.

### *2.2 Präparation der Innenohrgewebeanteile*

Nach erfolgter Anästhesie mittels intraperitonealer Applikation von 200 mg/ kg Phenobarbital erfolgt der Zugang zur Bulla tympanica von ventrolateral. Nach Entnahme der Bulla erfolgt die Eröffnung mittels Präparationsnadel unter einem binokularen Auflichtmikroskop (Leitz, Wetzlar) unter 15-facher Vergrößerung. Nach Darstellung der Cochlea wurde die knöchernen Cochleawand unter vorsichtigem Erhalt des Häutchenpräperates abgeschoben. Es erfolgte die mikroskopische Dissektion der Stria vascularis mit zwei Präparationsnadeln, beginnend am Helicotrema. Unter Sicht auf das Corti-Organ erfolgt die Auslösung von der Spitze bis zur basalen Windung und Überführung auf einen Objektträger mit HBSS. Alternativ wurde kaudal der Lamina spiralis ossea, der basalen Windung, der Modiolus mit dem N.cochlearis scharf

---

durchtrennt und nach Überführung in den HBSS-befeuchteten Objektträger wie oben beschrieben weiter präpariert.

Es folgte die mikroskopische Trennung der cochleären Zellverbände mittels Präparationsnadel und Identifikation der Hensenzellen aufgrund ihrer charakteristischen Lipidinklusionen. Nach Aufnahme der Hensenzellen erfolgte die Überführung auf beschichtete Deckgläschen (Cell-Tak, Becton Dickenson, USA). Nach Absaugen des HBSS-Überstandes wurde in Kollagenase II (500 U/ml in  $\text{Ca}^{2+}$  freiem HBSS, Worthington) oder Trypsin (500 U/ml, in  $\text{Ca}^{2+}$  freiem HBSS, Sigma) über 15 min bis 45 min inkubiert. Nach nochmaligem Absaugen und mehrfacher Spülung mit HBSS erfolgt die Übernahme in die Messapparatur.

Sowohl isolierte Zellpaare als auch Zellkonglomerate wurden zur Messung genutzt, wobei sich hierdurch keine Konsequenzen für die Leitfähigkeiten ergeben (Junker et al., 2000).

Dabei wurden verschiedene Lösungen eingesetzt, als Standardbadlösung wurde HBSS (Sigma, St. Louis, USA) verwandt, welches nach Pufferung mit HEPES auf einen pH von 7.24 (digitales pH-Meter, Knick 646) und eine Osmolarität von 300 mosmol/kg eingestellt wurden (Vapor Pressure Osmometer 5500). Die verwandten Pipettenlösungen wurden ebenfalls frisch hergestellt und auf pH 7,3 und 300 mosmol/kg eingestellt. Für die Messungen zur Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde eine modifizierte Pipettenlösung verwandt.

Die veränderten Badlösungen in den Versuchen mit Gentamycin sowie mit Catalase und Deferoxamine sind ebenfalls angegeben.

Die Lösungen wurden wie aufgeführt erworben und waren wie folgt zusammengesetzt:

---

### 2.3 Lösungen

---

Name der Lösung	Zusammensetzung (g/l)
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Calciumchlorid (2H <sub>2</sub> O): 0,185 Magnesiumsulfat: 0,09767 Kaliumchlorid: 0,4 Kaliumphosphat: 0,1 Natriumchlorid: 8,0 Natriumphosphat: 0,04788 D-Glucose: 1,0 Phenolrot: 0,01 HEPES 2,38 , NaOH auf pH 7,24 Osmolarität (mit D-Glucose) 300 mosmol/kg
Standardpipetten- medium	Kaliumgluconat: 135 EGTA: 5 5-Natrium-adenosin-triphosphat (Na <sub>2</sub> -ATP): 5 Calciumchlorid: 3 Magnesiumchlorid: 5 Natriumchlorid: 5 3',5'-cyclisches Adenosin-Monophosphat: 0,1 HEPES: 10, KOH auf pH 7,24 Osmolarität (mit Sucrose) 300 mosmol/kg
Pipettenmedium ( für intrazellulären Ca <sup>2+</sup> - Messungen)	Kaliumchlorid: 120 Glucose: 10 EGTA: 0,5 5-Natrium-adenosin-triphosphat (Na <sub>2</sub> -ATP): 5 Calciumchlorid: 0,58

---

---

Magnesiumchlorid: 1,5  
3',5`cyclisches Adenosin-Monophosphat: 0,1  
HEPES: 10, KOH auf pH 7,24  
FURA 2 FM: 200  $\mu$ M  
Osmolarität (mit Sucrose) 300 mosmol/kg

---

#### *2.4 Elektrophysiologischer Messaufbau*

Der Messplatz wurde mittels eines Faradayschen Käfigs gegen die umgebende Strahlung abgeschirmt. Die Messapparatur war auf einer Stahlplatte befestigt, die auf einem massiven Stahltisch hydraulisch schwingungsgedämpft gelagert wurde.

Die Messapparatur bestand aus einem Inversmikroskop (Axiovert 10, Carl Zeiss, Oberkochen) mit CCD-Kamera zur optischen Kontrolle (Sony, Japan). Dies diente der genauen Positionierung der elektrisch betriebenen Mikromanipulatoren (Carl Zeiss, Oberkochen) an den Messköpfen mit Pipetten. Diese ragten in die mediumgefüllte Messkammer, die mit Hilfe einer Mikropumpe (Pharmacia Fine Chemicals , Peristaltic pump P-3, USA) durchströmt wurde (Flussrate 0,6 – 0.7 ml/h). Die Messköpfe waren mit den Messverstärkern verbunden (EPC 7, List Medical Electronics, Darmstadt), die über einen A-D/D-A-Wandler (ITC-16, Instrutech Corp., USA) die ermittelten Daten an einen MacIntosh- Computer weitergaben. Hier erfolgte die Analyse der Daten mittels einer spezifischen Software (Pulse/Pulsefit 8.09; HEKA- Elektronik). Neben der Anlyase der Daten erfolgte ebenso die elektrische Stimulation der Zellen mittels PC über die Kopplung an A-D/D-A Wandler und Messverstärker.

#### *2.5 Pipettenherstellung*

Zur Herstellung der Messpipetten wurde Borsilikatglas verwandt. Das Ziehen der Pipetten erfolgte unmittelbar vor einer Messreihe mittels Vertikalpullers (Narishige, PP-830, Japan). Hiernach

---

erfolgte die Hitzepolierung bis zu einem finalen Spitzendurchmesser von ca. 1µm und das Backfilling der Pipetten. Der Widerstand der jeweiligen Pipette im Badmedium betrug 2- 5 MΩ.

### 2.6. Bestimmung der Leitfähigkeiten und Widerstände

Die Bestimmung der Leitfähigkeit erfolgte durch Anlegen einer Spannungsdifferenz zwischen benachbarten Zellen. Die Membranspannung beider Zellen wurde dabei auf -40 mV gehalten. Nach Änderung der Spannung einer Zelle konnte die Ermittlung der Leitfähigkeit erfolgen. Zur Beschreibung der Kopplung zwischen den beobachteten Zellen wurde als Größe der Kehrwert des Widerstandes, die Leitfähigkeit (in Siemens, S) berücksichtigt. Die Leitfähigkeit lässt sich rechnerisch bestimmen (Donaldson et al., 1995):

$$G_j = \frac{-\Delta I_{p2} \cdot (1 + R_{a2} / R_{m2})}{\Delta V_{p1} - R_{a1} \cdot \Delta I_{p1} + R_{a2} \cdot \Delta I_{p2}}$$

$G_j$  = Leitfähigkeit [S],  $R_{a1,2}$  Eingangswiderstand der Pipetten 1 und 2,  $R_{m2}$  Widerstand der nicht am junctionalen Kontakt beteiligten Membran,  $\Delta V_{p1}$  Spannungsimpulse auf Zelle 1,  $I_{p1,2}$  Meßströme der gepatchten Zellen 1 und 2.

Die Eingangswiderstände ( $R_{a1,2}$ ) und die Widerstände der nicht an der Kopplung beteiligten Membran ( $R_{m1,2}$ ) wurden bestimmt, indem beide Zellen gleichzeitig mit identischen Spannungspulsen außerhalb der wahrscheinlichen Aktivierungskinetik (-20 mV - + 20 mV in Schritten zu 10 mV) belegt wurden, so dass kein interzellulärer Strom floß :

$$\Delta V = R_a \cdot I_{p1} + R_m \cdot I(1-t/r)$$

( $t$  = Zeit nach dem Spannungsimpuls,  $r$  = Zeitkonstante der Spannungsänderung) ergibt sich die Bestimmung von

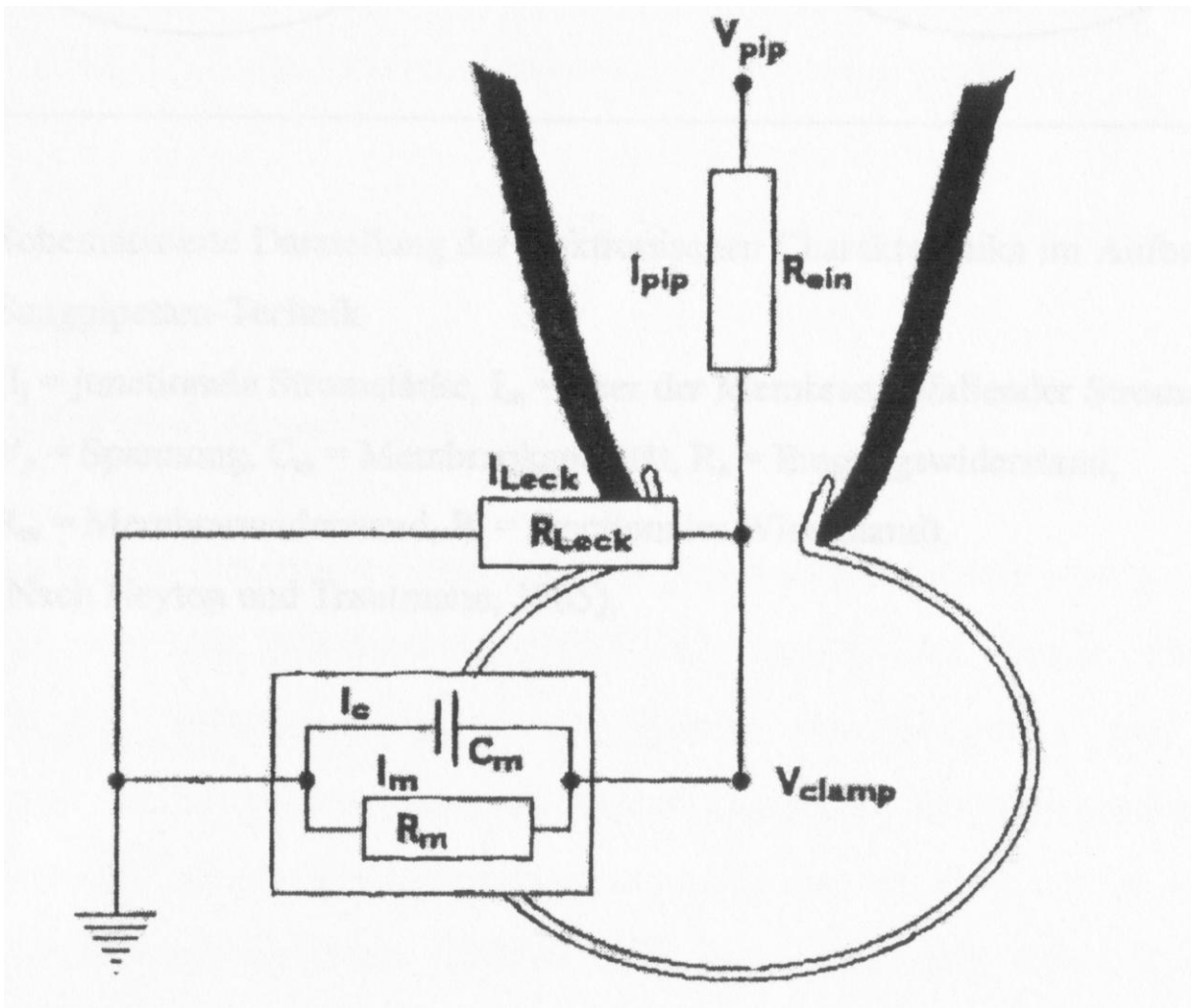
---

$$R_a = \Delta V / I(t=0)$$

und

$$R_m = \Delta V / I(t=8)$$

Auf diese Weise erfolgte die Überprüfung der Membranwiderstände zu Beginn, im Intervall und zum Abschluß der Versuche. Die beobachteten Widerstände lagen zwischen 200 M $\Omega$  und 2 G $\Omega$ . Bei Werten unter 200 M $\Omega$  konnte davon ausgegangen werden, dass eine unzureichende Membranabdichtung vorlag, weshalb diese Versuche nicht ausgewertet wurden.

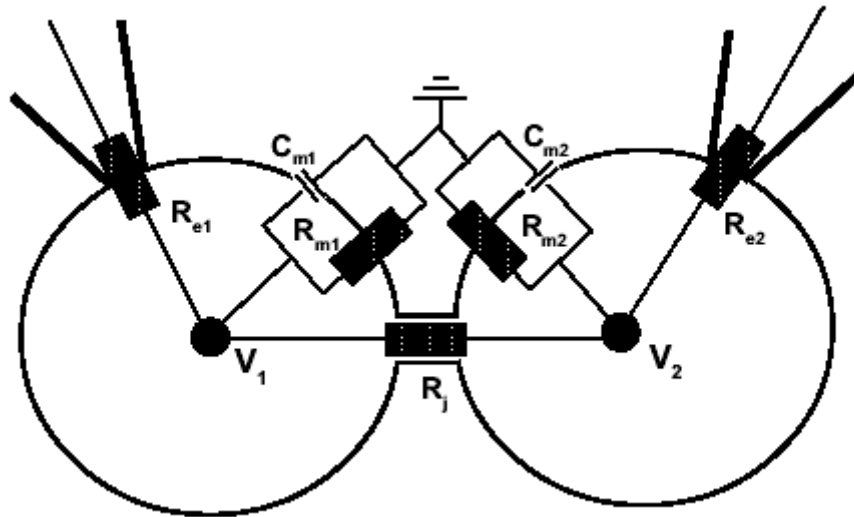


**Abb. 4:**

Schematische Darstellung der Widerstandsordnung bei der Einzellzelmessung (Ubl et al., 1992).

(I= Stromstärke, V= Spannung, C= Kapazität, R= Widerstand)





**Abb.5:**

Schematische Darstellung der Double whole-cell patch-clamp-Konfiguration (nach Neyton und Trautmann, 1985).

(Ra= Eingangswiderstand, Rm= Membranwiderstand, Cm= Membrankapazität, Rj= junctionaler Widerstand, V= Spannung)

### 2.7 Messung des $[Ca^{2+}]_i$

Zur Messung des intrazellulären Calcium wurde, wie durch Ngezahayo und Mitarbeiter 1993 beschrieben, ein Photomultiplierbasiertes System (Luigs & Neumann, Ratingen) in den Strahlengang eingebracht, so dass mit Hilfe der Fluoreszenzfrequenzen (360/ 390nm) (Grynkiewicz et al., 1985) die Konzentration des  $[Ca^{2+}]_i$  spezifisch (mittels Fura-2), bestimmt werden konnte. Zuvor erfolgte die Aufladung der Zelle durch das spezifische Pipettenmedium nach Anlegen einer DWPC-Konfiguration. Die so ermittelten Daten des Photomultiplierbasierten Systems wurden mit Hilfe eines PC erfasst.

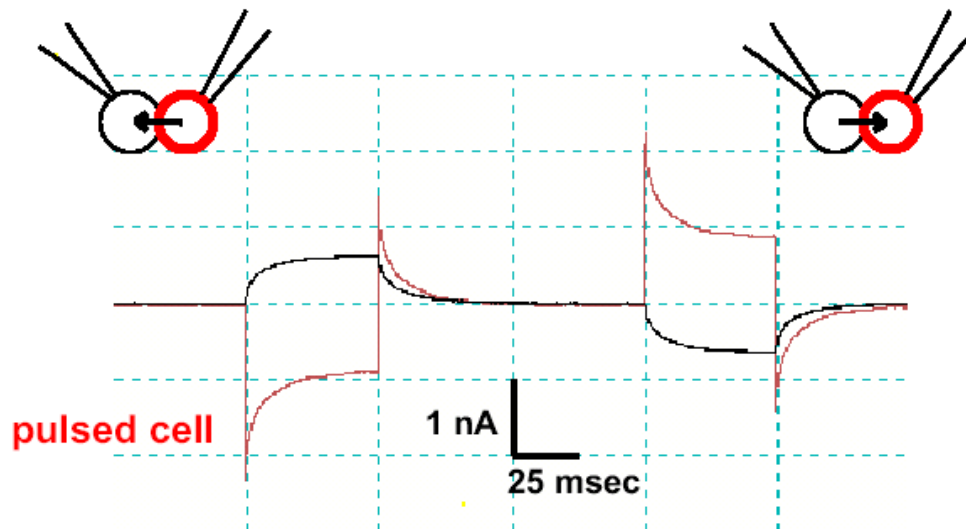
Das in den vorliegenden Messungen eingesetzte Fura 2 ist im Gegensatz zum häufig verwandten Fura 2 AM membranimpermeabel, so dass Streuartefakte durch Verunreinigungen auf dem Deckgläschen ausgeschlossen werden konnten.

---

## 2.8 Messprotokoll

Zur Messung der Kopplungsströme wurden zwei unterschiedliche Messprotokolle verwandt:

Die Messung von  $G_j$ /Zeiteinheit erfolgte durch alternierende Stimulation der Zellen nach Anlegen der Spannungsklemme mit Spannungsdifferenzen von 20 mV über 50 ms (Abb. 6).



**Abb.6:** Messanordnung zur Ermittlung der Kopplungsströme

Außerdem erfolgten Versuche zur Überprüfung der Spannungsabhängigkeit der Ionenkanalleitfähigkeit. Hierbei wurden über den Bereich von  $-120$  mV bis  $+120$  mV ( $\Delta V$  10 mV, über 50 ms) verschiedene Spannungen an nur eine Zelle angelegt und der Strom über die andere Zelle oder in der einzelnen Ganzzelleableitung gegen das Badmedium zur Untersuchung der Ionenströme abgeleitet. In beiden Protokollen wurde zwischen den Impulsen eine Relaxationszeit von 100 ms eingehalten. Die Versuche erfolgten bei Raumtemperatur.

---

## 2.9 Analyse und statistische Aufarbeitung der erhobenen Messdaten

Zur statistischen Analyse wurden Median-/ Mittelwertbestimmungen mittels SPSS (Version 10.0) sowie der mittleren Standardabweichung (Standard deviation of the mean, SDM) durchgeführt. Eine Bestimmung signifikanter Differenzen zwischen zwei Populationen erfolgte mittels gepaartem t-Test. Das Signifikanzniveau betrug ( $p < 0.05$ ).

## 2.10 Patientenauswahl und Gruppierung der Patienten mit Innenohrschwerhörigkeit

Insgesamt wurde eine Anzahl von 530 Probanden in diese prospektive Studie integriert. Die Studiengruppe umfasste eine Grösse von 270 Patienten (131 weiblich, 139 männlich). Einschlusskriterium für die Studiengruppe war ein einseitiger oder beidseitiger sensorineuraler Hörverlust von mehr als 30 dB in mehr als 2 Frequenzen.

Ausschlusskriterien waren:

- Hörverlust bedingt durch akuten oder chronischen Lärmeinfluss.
- Hörverlust nach Schädelhirntrauma.
- Hörverlust nach Barotrauma.
- Hörverlust bei anamnestisch durchgemachten Mittelohroperationen.
- Hörverlust, der als Folge von Infektionen (Mittelohrentzündungen, Mastoiditiden, Labyrinthitiden) aufgetreten war.

Die Kontrollgruppe umfasste 260 Patienten, die aufgrund von nicht- otologischen Krankheitsbildern hospitalisiert wurden (z.B. chronische Tonsillitis, Septumdeviation) und bei denen klinisch eine Hör- oder Gleichgewichtsstörung bestand. Der weibliche

---

Anteil betrug 137 Patienten. Der männliche Anteil betrug 123 Patienten.

Jeder Proband willigte schriftlich in die Entnahme von Blut und deren molekulargenetische Analyse ein. Nach Studienabschluss wurden alle Studienteilnehmer über das Ergebnis der genetischen Analyse informiert.

Alle Probanden wurden HNO- ärztliche Untersuchung untersucht.

Die Studiengruppe wurde unterteilt in 6 Untergruppen auf der Basis von klinischen Krankheitsbildern.

- 1) Patienten mit beiderseitiger Ertaubung.
- 2) Patienten mit Morbus Meniere'.
- 3) Patienten mit Akustikusneurinomen.
- 4) Patienten mit Otosklerose.
- 5) Patienten mit einem akuten einseitigen Hörverlust.
- 6) Patienten mit einem beiderseitigen chronischen Hörverlust unklarer Ursache.

### *2.11 Definition und Abgrenzung der Subgruppen*

Die Abgrenzung der Patienten der Gruppe 1 von denen der Gruppe 6 erfolgte auf der Basis des Reintonaudiogramms. Bei einem Hörverlust von mehr als 70- 80 dB, entsprechend der derzeit gängigen Kriterien zur Indikationsstellung für die Cochlear Implantversorgung, erfolgte die Zuordnung zu Gruppe 1.

Die Zuordnung zu Gruppe 2 erfolgte nach durchgeführter Elektrocochleographie (SP/AP ratio >0.33) (Moffat et al., 1979) oder erfolgtem, positivem Klockhoff Test (Moffat et al., 1978) und Erfuellung der Kriterien der AAO- HNS.

Gruppe 3 wurde nach durchgeführter kernspintomographischer Untersuchung und dem Nachweis eines Akustikusneurinoms gebildet.

---

Die Zuordnung zu Gruppe 4 erfolgte nach Feststellung einer Schallleitungsschwerhörigkeit, einem negativen Test nach Rinne und der intraoperativen Feststellung einer Otosklerose.

Gruppe 5 wurde entsprechend der individuellen Anamnese und des vorliegenden Reintonaudiogramms gebildet. Die akute Hörminderung sollte innerhalb der letzten 3 Tage stattgefunden haben.

Die Klassifikation der Hörverluste erfolgte auf der Basis der Reintonaudiogramme entsprechend der bekannten Übereinkunft „Classification Criteria of the European Workshop on Genetic Hearing Loss; Xue Zhong et al., 2005).

Alle Studiengruppenmitglieder wurden hinsichtlich eines familiär- hereditären Hintergrundes ihres Hörverlustes befragt. Ein solcher Hintergrund wurde angenommen, wenn ein Hörverlust von Vater und Mutter oder ein Hörverlust über 3 Generationen beschrieben wurde.

Aufgrund der großen Anzahl von Konnexin- Mutationen in der Kontrollgruppe erfolgte die Wiedereinbestellung der von Mutationen betroffenen Patienten zur Durchführung einer Hörprüfung.

### *2.12 Molekulargenetische Analyse*

Die DNA-Extraktion peripherer Leukozyten wurde mittels üblicher Methoden durchgeführt (Miller et al., 1988). *GJB2* wurde amplifiziert mittels PCR zwischen den Positionen 19,660,916 und 19,661,879 der menschlichen Chromosom 13 Sequenz (GenBank accession number NC\_000013, version 9). *GJB6* wurde amplifiziert mittels PCR zwischen den Positionen 19,701,471 und 19,702,407 der menschlichen Chromosom 13 Sequenz. Die Produkte wurden direkt sequenziert unter Verwendung des „BigDye Terminator Sequencing Reagents“(Applied Biosystems)

---

und die DNA automatisch analysiert (Applied Biosystems 3730). Die die Deletion beinhaltende *GJB6* (del(*GJB6*-D13S1830)) wurde direkt mittels PCR analysiert unter Verwendung der beschriebenen Primer (del Castillo et al., 2003). Die Untersuchungen erfolgten am Max-Delbrück-Center, Berlin- Buch.

---

### 3. Ergebnisse

Insgesamt wurde eine Anzahl von etwa 170 Zellpaaren erfolgreich untersucht. Die durchgeführte Studie umfasste drei Teilbereiche.

Der erste Teil umfasste die Etablierung der Methodik, die Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften und die Auswirkungen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf die GJIC sowie die Beobachtung des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Im zweiten Teil wurde die Wirkung von Gentamycins auf die GJIC näher untersucht.

Im dritten Teil erfolgte die Analyse der Funktion ionisierten Eisens/  $\text{H}_2\text{O}_2$  für die Gentamycin-abhängige GJIC.

#### *3.1 Etablierung der doppelten Ganzzelleableitung (DWPC) nach erfolgreicher Isolation cochleärer Hensenzellen*



**Abb. 7:**

Aufnahme eines isolierten Hensenzellpaares mit ihren charakteristischen Lipideinschlüssen in der DWPC-Konfiguration.

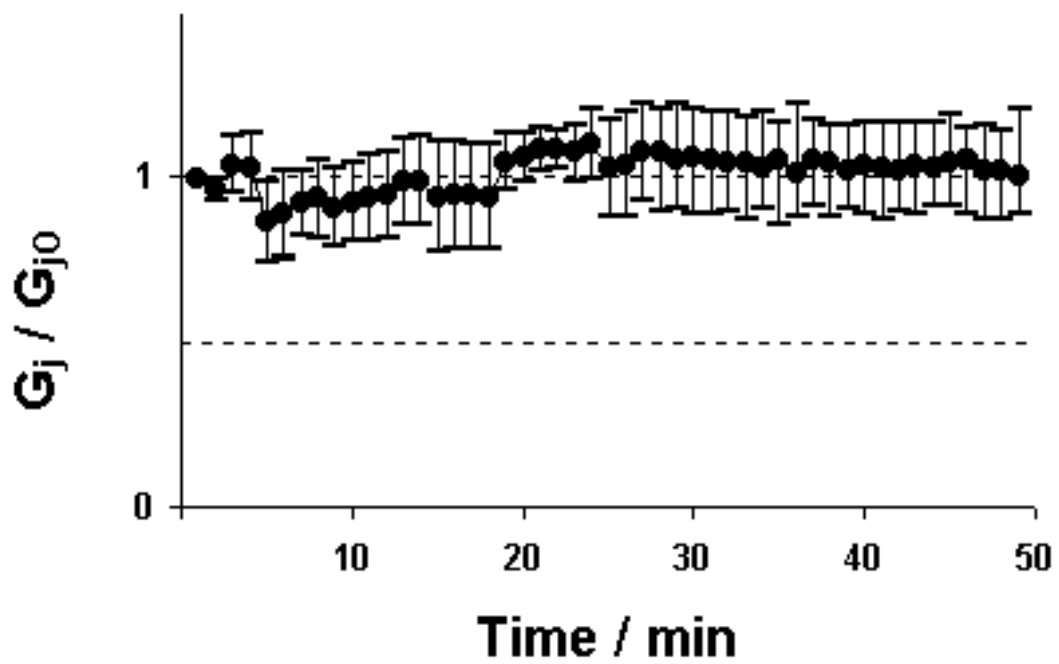
---

Nach Identifikation eines Hensenzellpaares aufgrund der charakteristischen Lipideinschlüsse erfolgte die Anlage der Pipetten zur doppelten Ganzzelleableitung (DWPC).

Unter kontrollierten Bad- und Pipettenbedingungen fanden sich bei einem applizierten Haltepotential von  $-40$  mV mittlere interzelluläre Leitfähigkeiten ( $G_j$ ) für die erste Versuchsreihe von  $29.9 \pm 2.6$  nS ( $n=31$ ), für die zweite Reihe  $55.5 \pm 16.7$  nS ( $n=18$ ) und für die dritte Versuchsreihe  $67.2 \pm 10.1$  nS ( $n = 13$ ). Diese Leitfähigkeiten veränderten sich über die gesamte Messdauer nicht signifikant. Die gemessenen Membranpotentiale betragen für die erste Versuchsreihe  $-30.0 \pm 1.2$  mV ( $n=108$ ), für die zweite Versuchsreihe  $-27.3 \pm 6.3$  mV ( $n=18$ ) und  $-35.0 \pm 1.1$  mV ( $n=13$ ) für die dritte Versuchsreihe.

Die während der gesamten Messperiode ermittelten Leitfähigkeiten wurden gegen den Mittelwert der ersten 5 Meßminuten gemittelt, so dass die Leitfähigkeiten als ( $G_j / G_{j0}$ ) angegeben wurden. Die kurzzeitig beobachtbaren Schwankungen in der interzelluläre Leitfähigkeit unmittelbar nach Etablierung der DWPC-Konfiguration sind die Folge der Diffusion des Pipettenmediums in den zytoplasmatischen Raum. Insgesamt gelangen Messreihen mit einer stabilen GJIC über 90 (erste Versuchsreihe) bzw. 150 min (dritte Versuchsreihe) nach Optimierung der Versuchsdurchführung.





**Abb. 8:**

Zeitabhängigkeit der interzelluläre Kopplung cochleärer Hensenzellen in der Kontrollgruppe (n= 18) mit Standardabweichungen.

---

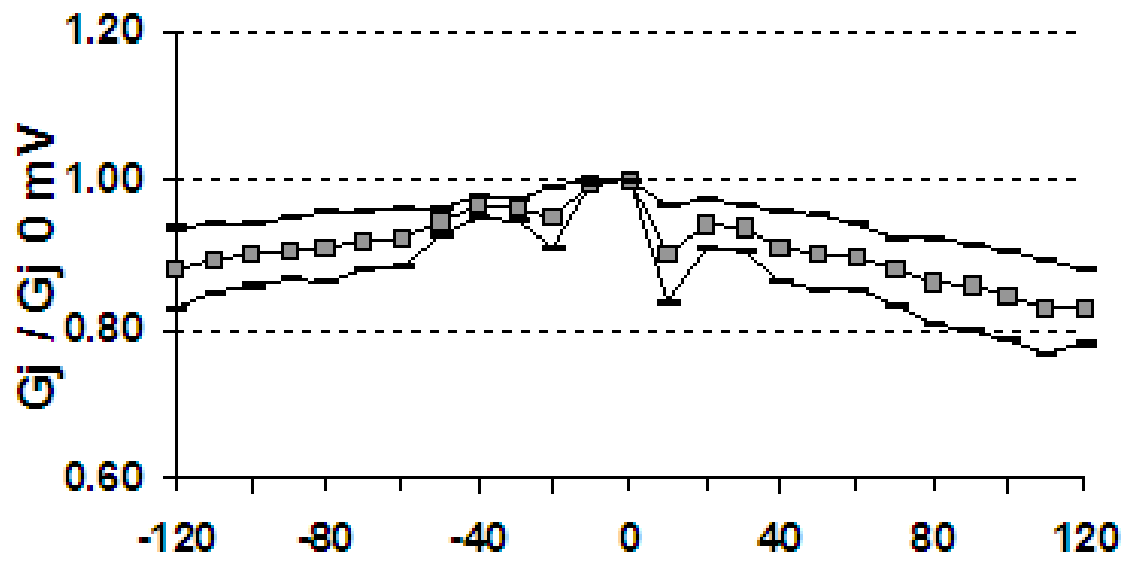
### 3.2 Spannungsabhängigkeit der transjunctionalen Leitfähigkeit

In dieser Versuchsanordnung erfolgte die Normierung der interzelluläre Leitfähigkeit gegen die Leitfähigkeit bei 0 mV.

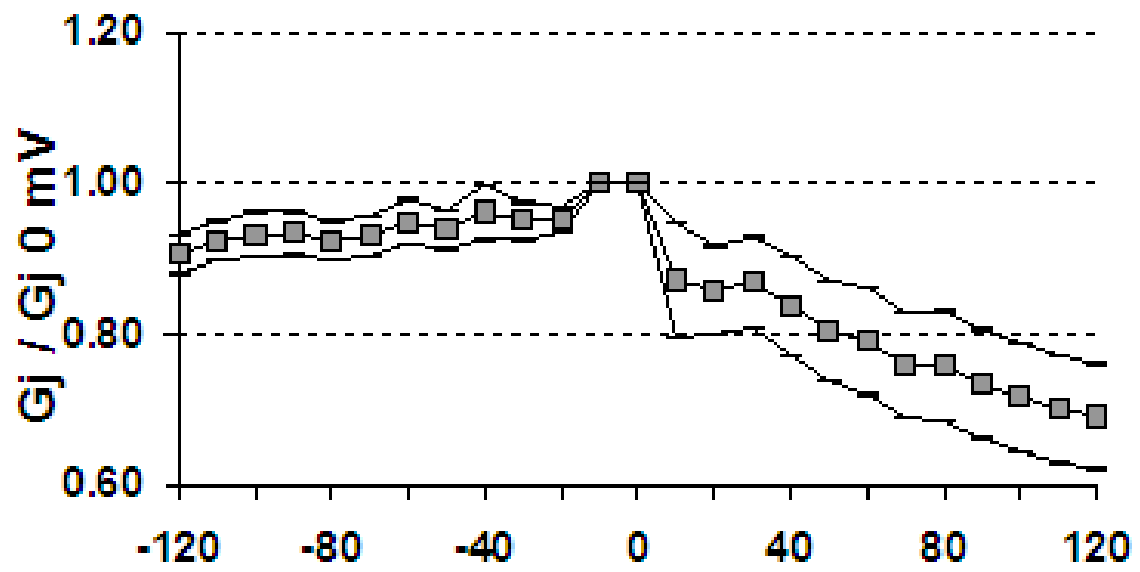
Die interzelluläre Leitfähigkeit variierte spannungsabhängig in charakteristischer Weise (Abb. 9) bei konstantem Membranpotential ( $n = 14$ ). So fand sich zum einen (Abb. 9a) eine geringe Spannungsabhängigkeit. Dabei finden sich die maximale Leitfähigkeit bei  $V_j = 0$  mV und die interzelluläre Leitfähigkeit nimmt im positiven Bereich um 17.0 % ( $n=4$ ) ab (0 mV bis +120 mV).

Zum anderen ließ sich eine signifikante Spannungsabhängigkeit der interzelluläre Leitfähigkeit (Abb. 9b) in dieser Gruppe nachweisen. Die Leitfähigkeiten blieben einerseits im Bereich von -120 bis 0 mV konstant und fielen von 0 bis +120 mV um 30.9 % ab ( $n=7$ ).

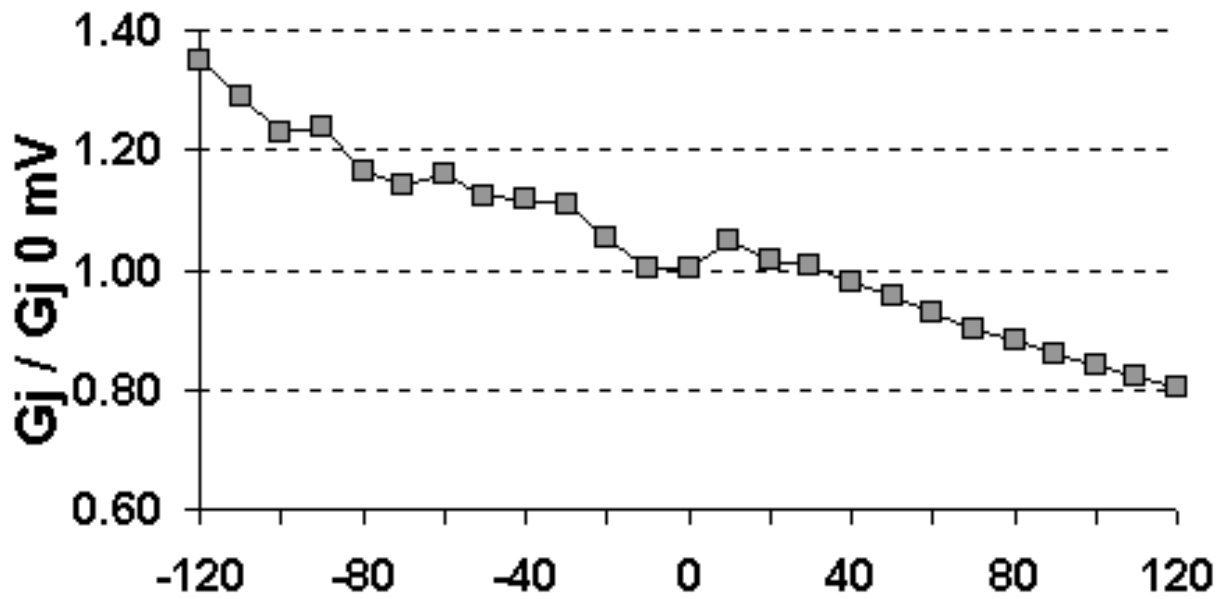
Zusätzlich zu den oben beschriebenen Verläufen kam es sporadisch entweder zu einem monophasischen Abfall (bis zu 60 %) der Leitfähigkeit im Bereich von -120 bis +120 mV (Abb. 9c) oder zu einem Anstieg (bis zu 35 %) der Leitfähigkeit von -120 bis 0 mV bei konstanter Leitfähigkeit von 0 bis +120 mV (Abb. 9d).



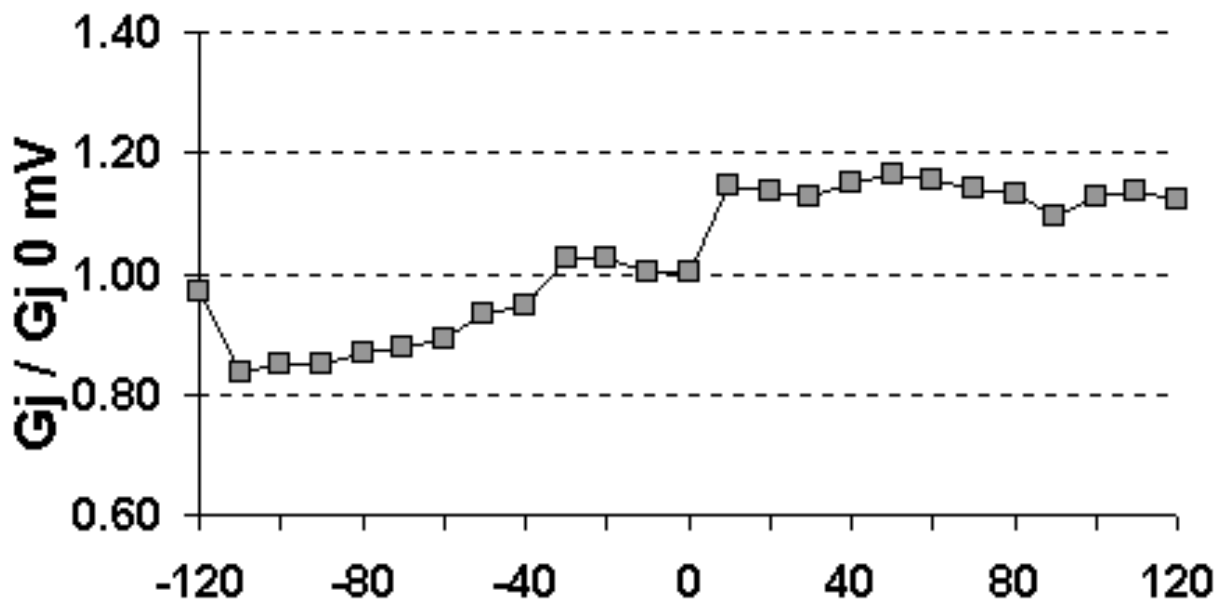
(a)



(b)



(c)



(d)

**Abb. 9:**

Messungen der Spannungsabhängigkeit interzelluläre Leitfähigkeit (a - d). 9a und 9b mit mittleren Standardabweichungen. 9c und 9d Einzelmessungen (Die Leitfähigkeit wurde jeweils gegen den Wert bei 0 mV normalisiert. Die transjunctionale Spannung (mV) ist von -120 mV bis 120 mV dargestellt)

---

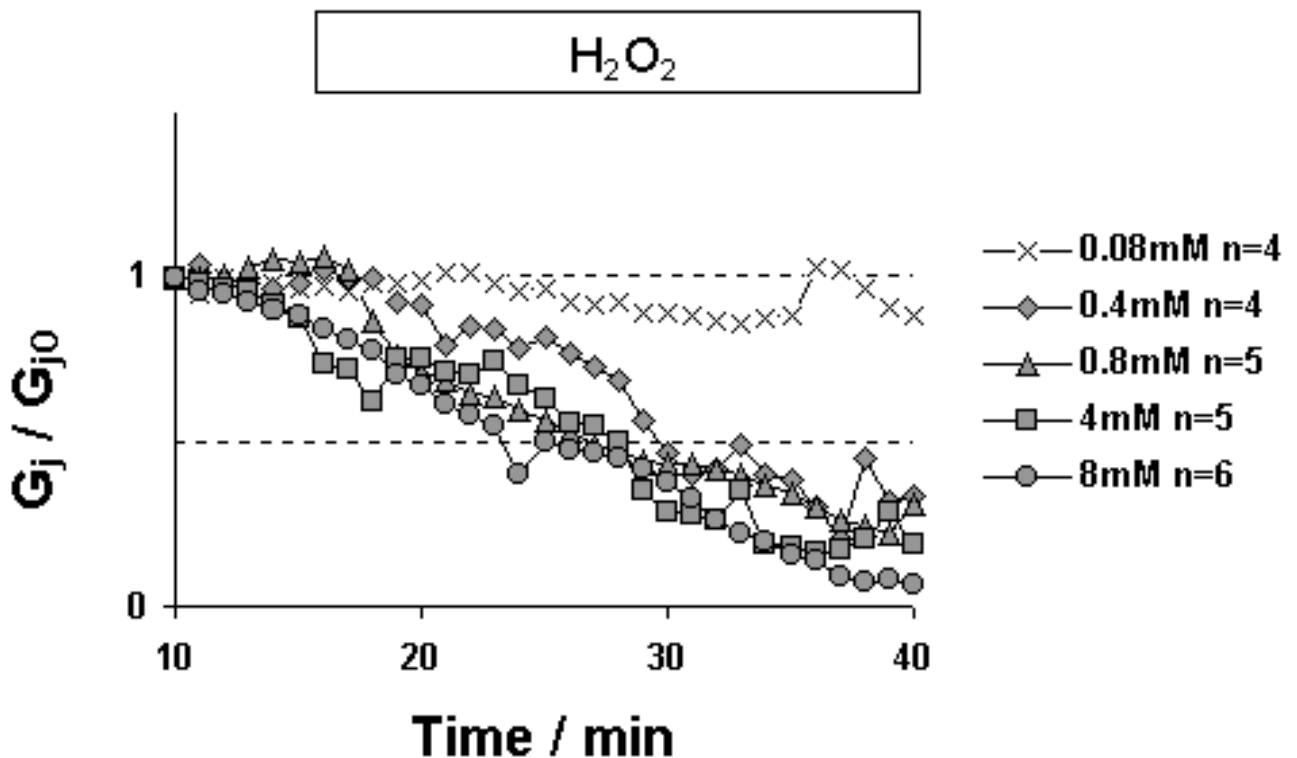
### 3.3 Auswirkungen von $H_2O_2$ auf die interzelluläre Kopplung

In dieser Serie erfolgte die Normierung der Leitfähigkeit (Gj) gegen den Mittelwert der Leitfähigkeit innerhalb der ersten 10 Meßminuten ( $n = 24$ ). Nach weiteren 5 min stabiler Leitfähigkeit erfolgte die interzelluläre Perfusion mit 0.08 mM, 0.4 mM, 0.8 mM, 4 mM und 8 mM  $H_2O_2$ . Das Membranpotential war über den gesamten Messzeitraum stabil. Mikroskopisch waren die Zellen ebenfalls unverändert, so dass von ihrer Vitalität ausgegangen werden kann (keine zytoplasmatischen Veränderungen, keine Form- oder sichtbaren Membranveränderungen).

Bei einer Konzentration von 0.08 mM  $H_2O_2$  fanden sich keine Änderungen der interzelluläre Leitfähigkeit (Gj/Gj0) ( $\pm 0.1$  SDM max.), bei höheren Konzentrationen nahm die Leitfähigkeit jedoch schnell, signifikant und irreversibel ab. Nach 15 min Perfusionszeit sank die Leitfähigkeit durchschnittlich um mindestens 50 % ab im Bereich von 0.4 mM ( $\pm 0.08$  SDM max.), 0.8 mM ( $\pm 0.12$  SDM max.), 4 mM ( $\pm 0.08$  SDM max.) bis 8 mM ( $\pm 0.08$  SDM max.)  $H_2O_2$ .

Kontrollmessungen, bei denen nach dem Absinken der Leitfähigkeit eine neutrale Kontrollbadlösung eingesetzt wurde, führten nicht zu einem Wiederanstieg.

Innerhalb der Versuchsreihe fanden sich variable Kinetiken der Leitfähigkeitsänderungen, die möglicherweise ihre Ursache in der unterschiedlichen intracochleären Lokalisation (mittlere/basale Schneckenwindung) der eingesetzten Hensenzellen (und damit einer veränderten Membrankinetik) haben (vgl. Diskussion) (Spicer et al., 1994).



**Abb. 10:**

Zeitliche Veränderungen interzelluläre Leitfähigkeit cochleärer Hensenzellen unter Perfusion mit verschiedenen Konzentrationen von  $H_2O_2$ .

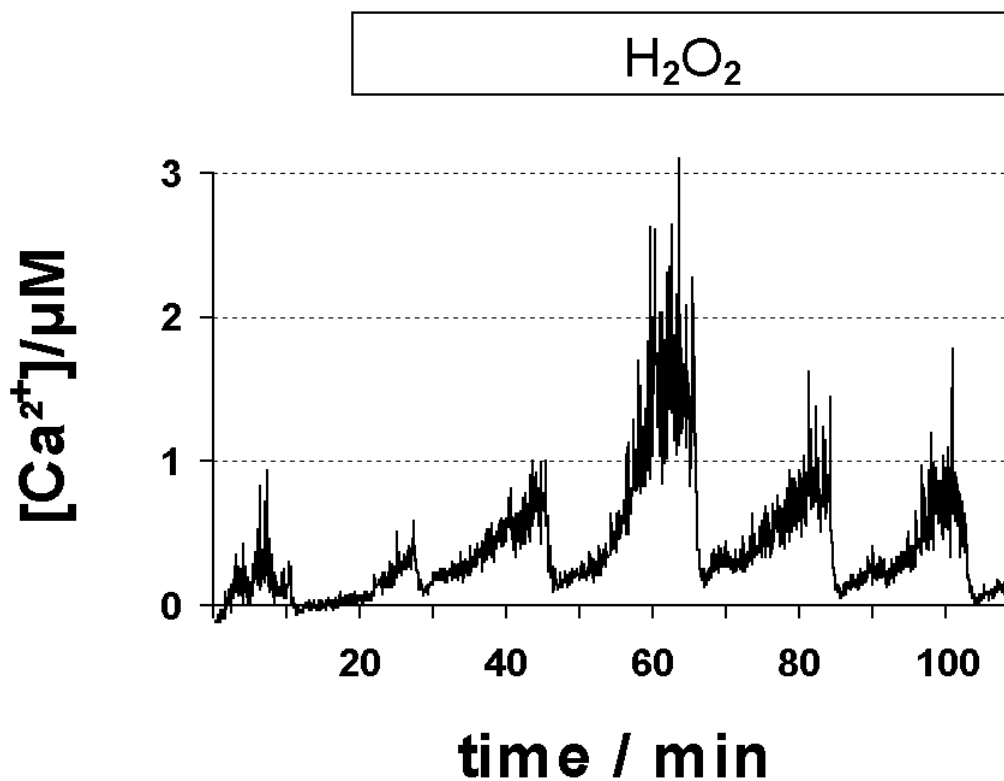
### 3.4 Auswirkungen von $H_2O_2$ auf $[Ca^{2+}]_i$

Nach Etablierung einer doppelten Ganzzelleableitung mit dem spezifischem Pipettenmedium (Fura 2) erfolgte der Beginn der Messungen erst nach Stabilisierung des  $[Ca^{2+}]_i$ , um perfusionsunabhängige  $[Ca^{2+}]_i$  Veränderungen auszuschließen (z.B. Membrandefekte und/ oder ableitungsinduzierte  $Ca^{2+}$  - Freisetzung, Interaktionen von Zytosol, Calciumspeichern und/oder Pipettenmedium).

Die Veränderungen des  $[Ca^{2+}]_i$  durch  $H_2O_2$  konnten somit erst nach Erreichen eines Steady-state gemessen werden. In Abwesenheit von  $H_2O_2$  fand sich ein intrazellulärer Kalziumspiegel von 100-200 nM (Abb. 11, 12).  $H_2O_2$ -Perfusion der Zellen (0.08/ 0.8 mM,

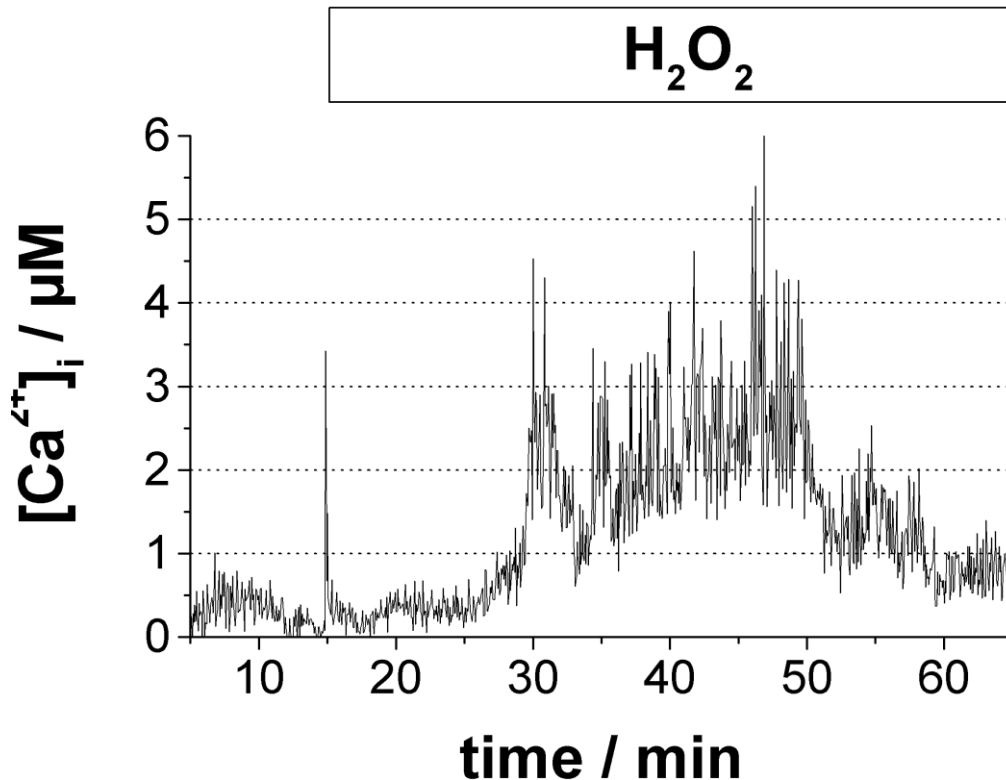
je n=4) im Badmedium induzierten eine zeit- und konzentrationsabhängige Veränderung des  $[Ca^{2+}]_i$  (vgl. Abb. 11, 12). Bei einer Konzentration von 0.08 mM  $H_2O_2$  fanden sich oszillierende Antworten des  $[Ca^{2+}]_i$ . Kurz nach Initiierung der  $H_2O_2$ -Perfusion fanden sich periodische Veränderungen des intrazellulären Kalziumspiegels (innerhalb eines 15 min.-Rhythmus) mit einem steten Anstieg, gefolgt von einem rapiden Abfall. Das GJIC-Verhalten war dabei stabil (Abb. 11).

Nach Zugabe von 0.8 mM  $H_2O_2$  zum Badmedium kam es zu einem nachhaltigen, kontinuierlichen Anstieg des  $[Ca^{2+}]_i$ , wobei nach 25 min ein Maximalwert ( $2 \mu M [Ca^{2+}]_i$ ) erreicht wurde (Abb. 12). Parallel dazu war eine Abnahme der interzelluläre Kopplung zu beobachten (Abb.12).



**Abb. 11:**

Veränderungen von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Perfusion mit 0.08 mM  $H_2O_2$ .



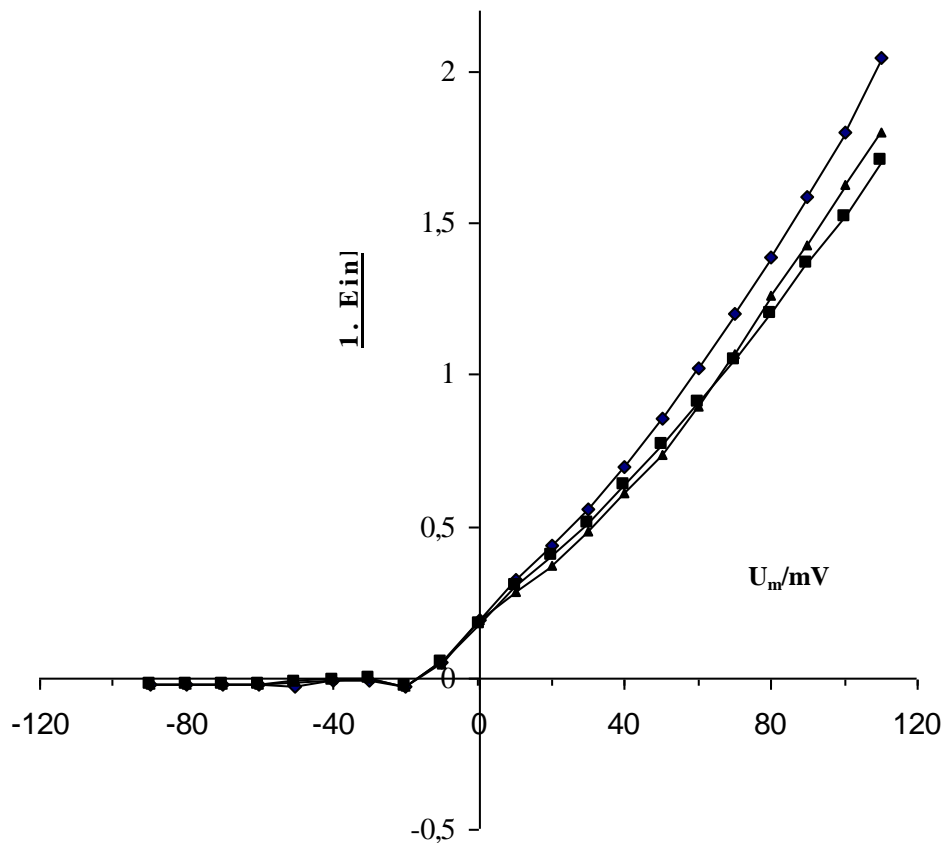
**Abb. 12:**

Veränderungen von  $[Ca^{2+}]_i$  nach Perfusion mit 0.8 mM  $H_2O_2$ .

### *3.5 Auswirkungen von $H_2O_2$ auf die Ionenkanäle der Einzelzelle*

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob die beobachteten Veränderungen der Leitfähigkeit und des intrazellulären Kalziumspiegels auch zu Veränderungen der Ionenkanalleitfähigkeiten der einzelnen Hensenzelle führen. Hierzu wurden einzelne Hensenzellen nach 30 min- Inkubation im Badmedium (HBSS - n=4; HBSS + 0.08 mM  $H_2O_2$  - n=3; HBSS + 0.8 mM  $H_2O_2$  - n=3) untersucht, wobei sich für alle Medien eine Aktivierungskinetik bei -20 mV fand. Die Strom/Spannungskennlinie ließ sich durch die Zugabe von  $H_2O_2$  nicht beeinflussen, d.h. das spannungsabhängige Öffnungsverhalten der Ionenkanäle blieb unverändert und  $[Ca^{2+}]_i$  hatte keinen Einfluß.





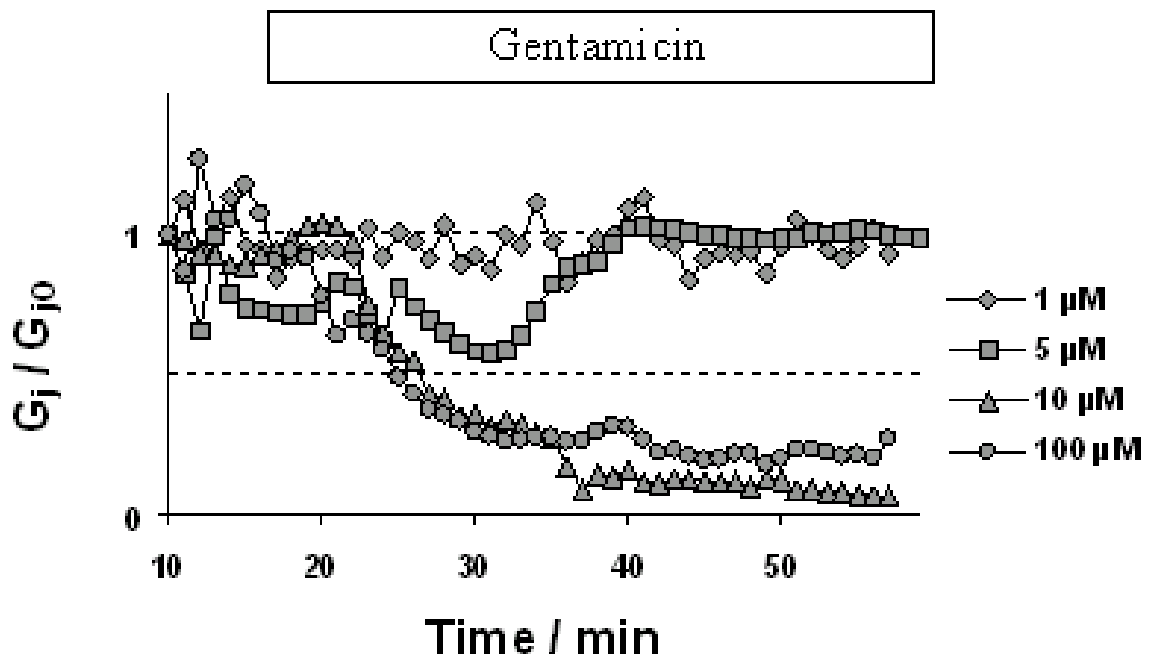
**Abb. 13:**

Strom-Spannungskennlinien von einzelnen Hensenzellen in der einzelnen Ganzzelleableitung während einer Perfusion mit verschiedenen Lösungen (◆ Kontrolllösung, ▲ 0.8 mM und ■ 8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### 3.6 Einfluß von Gentamycin auf die GJIC

Die Perfusion der Hensenzellen mit verschiedenen Gentamycinkonzentrationen (1 µM – 100 µM) führte weder zu einer Veränderung des Membranpotentials bzw. des nicht-junctionalen Widerstandes noch zu morphologischen Veränderungen der Zellen (s.o.). Die Zellen waren vital und wurden durch den Versuchsaufbau nicht beeinträchtigt (Abb. 14, 15).

Auch die interzelluläre Leitfähigkeit änderte sich bei 1 µM Gentamycin über den Beobachtungszeitraum von 1 h nicht.



**Abb. 14:**

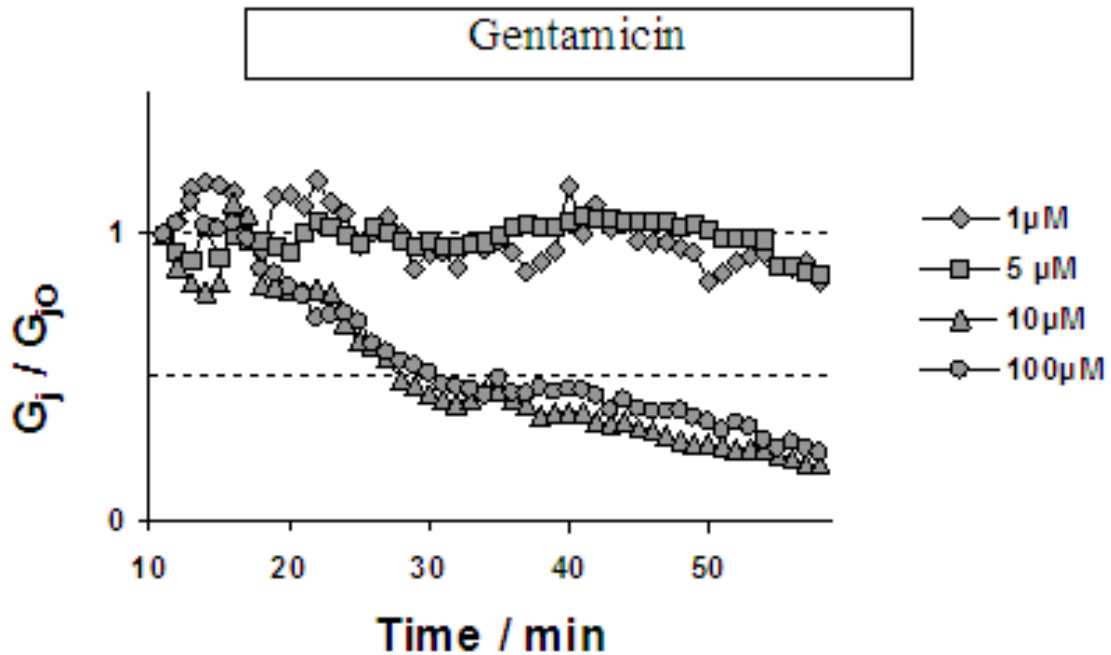
Beispielhafte Auswirkung von unterschiedlichen Gentamycin konzentrationen auf die interzelluläre Kopplung von Hensenzellpaaren (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ ).  $G_j$  wurde relationiert zum Mittelwert der Leitfähigkeit 10 min nach Etablierung der DWPC-Konfiguration.

Erst bei Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  Gentamycin zum Perfusat fanden sich diskrete Veränderungen in der interzellulären Leitfähigkeit (Abb. 15), die sich nach ca. 15 min Perfusion wieder normalisiert hatten (Schwellenkonzentration). Nicht vollständig klar war, ob bei diesen diskreten Veränderungen (s.o.) die jeweilige intracochleäre Position der einzelnen gewonnenen Hensenzellen (d.h. die tonotope Anordnung und Variabilität) eine Rolle spielte (Spicer et al., 1994; Sha et al., 2001).

Bei höheren Gentamycinkonzentrationen kam es zu einem monophasischen Abfall der interzelluläre Leitfähigkeit um 20 % innerhalb von 7 ( $\pm 2.9$ ) bzw. um 50 % innerhalb von 23 ( $\pm 1.4$ ) min (10  $\mu\text{M}$ ). Bei 100  $\mu\text{M}$  betrug der Abfall 20 % (50 %) nach 6.5 ( $\pm 0.5$ ) min (10.5  $\pm 2.5$  min). Die mittleren maximalen Standardabweichungen der interzellulären Leitfähigkeit betrug

für 1  $\mu\text{M}$  ( $\pm 0.13$ ), 5  $\mu\text{M}$  ( $\pm 0.18$ ), 10  $\mu\text{M}$  ( $\pm 0.14$ ) und 100  $\mu\text{M}$  ( $\pm 0.22$ ).

Damit ließ sich eine signifikante, konzentrationsabhängige Abnahme der interzelluläre Leitfähigkeit durch Gentamycin nachweisen.



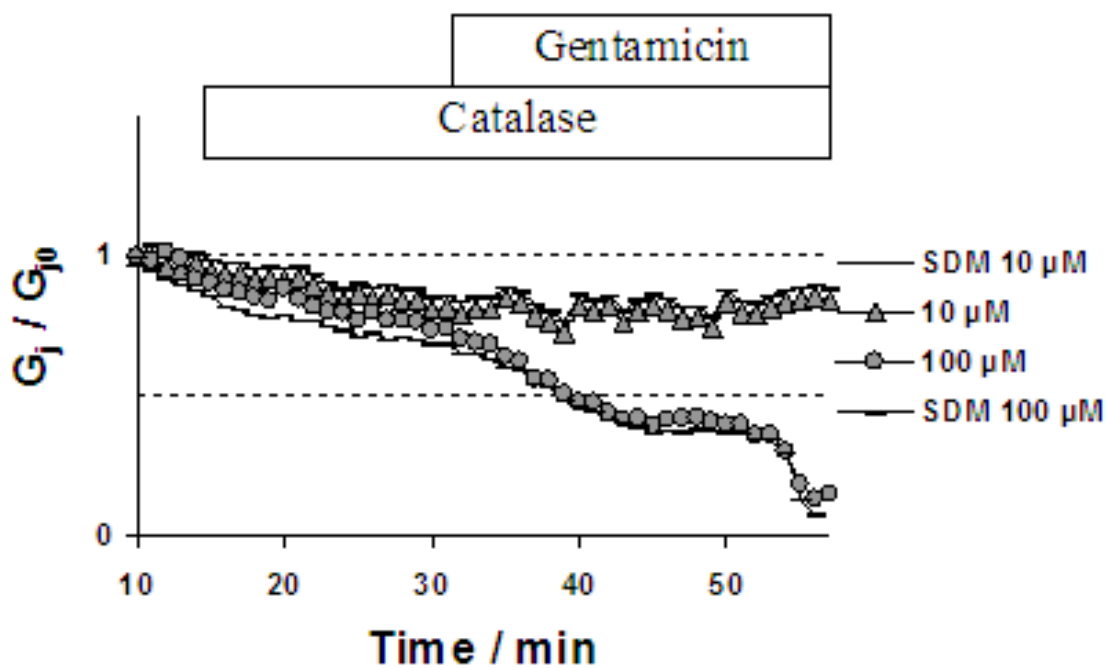
**Abb.15:**

Einfluß unterschiedlicher Gentamycinkonzentrationen auf die interzelluläre Kopplung von Hensenzellpaaren ( $n = 3$  für jede Konzentration) .

### *3.7 Inhibition der Gentamycin-induzierten Veränderung der GJIC durch Katalase*

Katalase ist ein ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -spezifischer) Radikalfänger, mit dem die Hensenzellpaare nach Herstellung einer stabilen doppelten Ganzzelleableitung präinkubiert wurden (1000 U/ml). Durch nachfolgende Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Gentamycin ( $n=3$ ) veränderte sich die interzelluläre Leitfähigkeit bei stabilem Membranpotential nicht. Damit wurde gezeigt, dass die Gentamycinvermittelten zellulären Veränderungen wesentlich durch freie Radikale ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) vermittelt werden. Auch nach Zugabe einer nochmals deutlich höheren Gentamycinkonzentration (100  $\mu\text{M}$ ,  $n=3$ ) fand sich zwar ein zeitverzögertes Absinken der interzelluläre Leitfähigkeit.

Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, dass die Katalasekonzentration unverändert blieb und vermutlich nicht ausreichte, um eine Inhibition des Gentamycineffektes vollständig zu erreichen.



**Abb. 16:**

Suppression der Gentamycin-induzierten (10 µM/ 100 µM) Minderung der GJIC mittels Präinkubation und simultaner Addition von Catalase (1000U/ml).

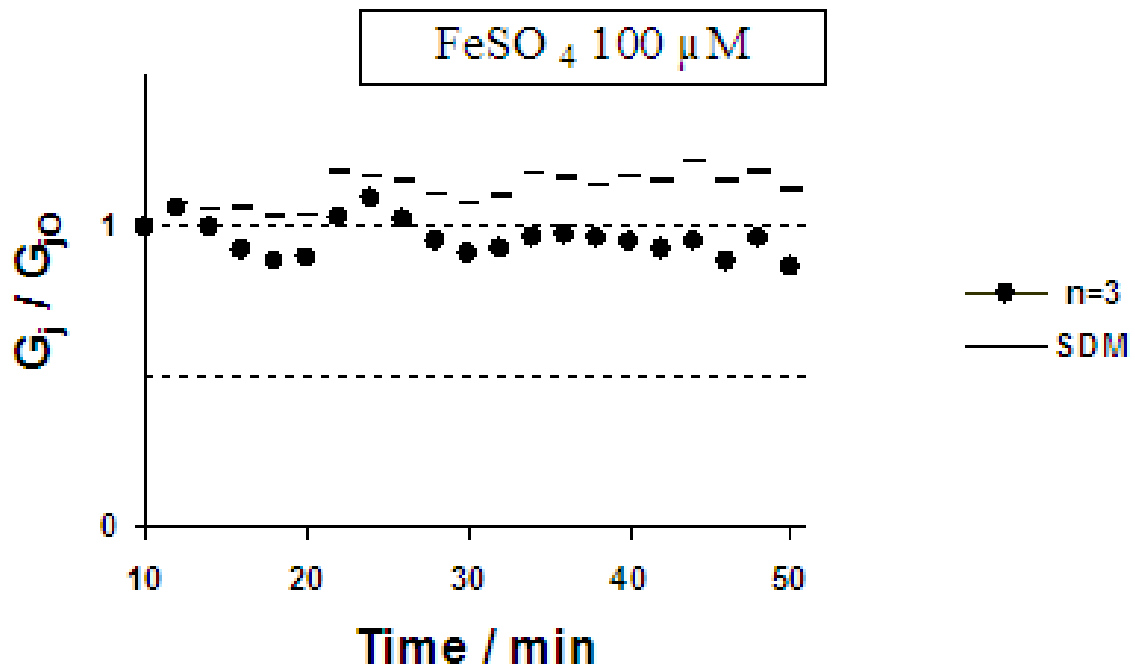
### 3.8 Interaktion von ionisiertem Eisen und Deferoxamine mit der Gentamycin-induzierten Veränderung der GJIC

Da in der Literatur belegt ist, dass Eisenchelatoren die ototoxische Gentamycinwirkung antagonisieren können (Song et al., 1996) bzw. ionisiertes Eisen die Ototoxizität verstärkt (Xu et al., 1995; Conlon et al., 1998), sollte in der vorliegenden Serie die Rolle ionisierten Eisens und von Deferoxamine (als Eisenchelator) beim GJIC untersucht werden. Der zellulären Toxizität von Gentamycin liegt eine Komplexbildung mit ( $\text{Fe}^{2+}$ )

---

zugrunde (Priuska et al. 1995), die dann die ROS-Freisetzung auslöst (Fenton-Reaktion).

In einer ersten Serie wurden die Hensenzellpaare mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  (als Zusatz zum Badmedium) perfundiert (Abb. 17). Dabei fand sich eine stabile Kopplung ohne Beeinträchtigung des Membranpotentials. Somit konnte eine direkte Interaktion von Eisen und der GJIC ausgeschlossen werden.

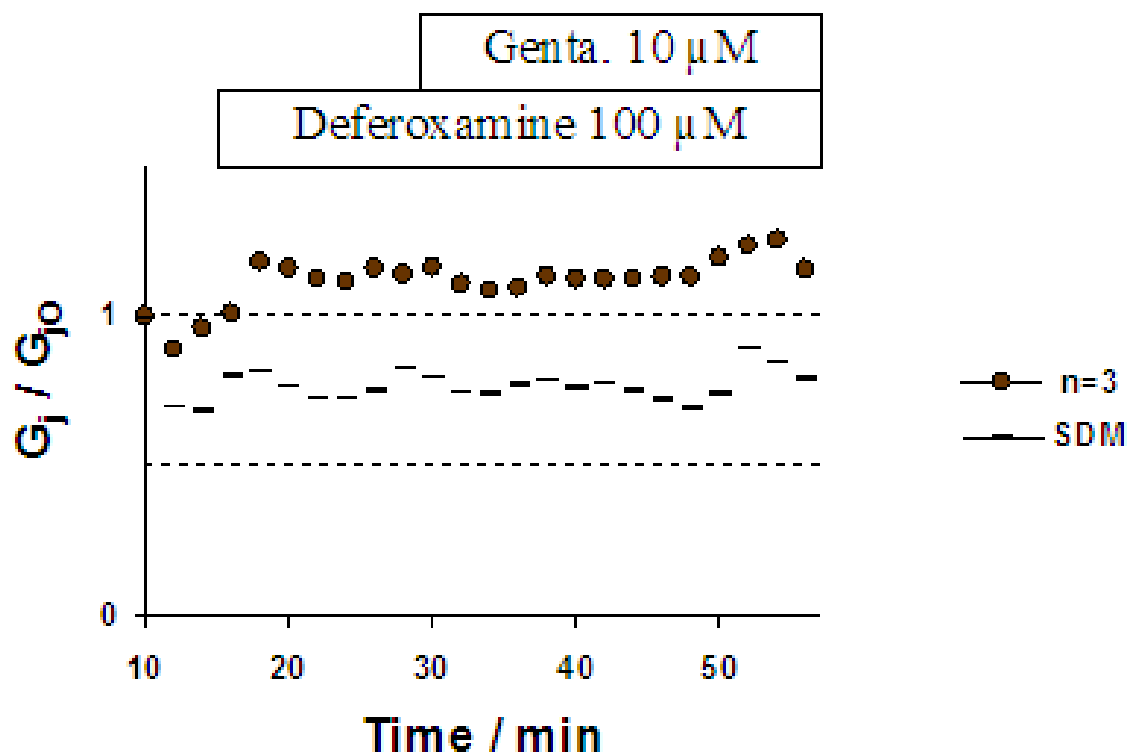


**Abb. 17 :**

Leitfähigkeitsänderungen ( $G_j$ ) nach Zugabe von 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  zum Badmedium. Mittlere Standardabweichungen sind dargestellt .

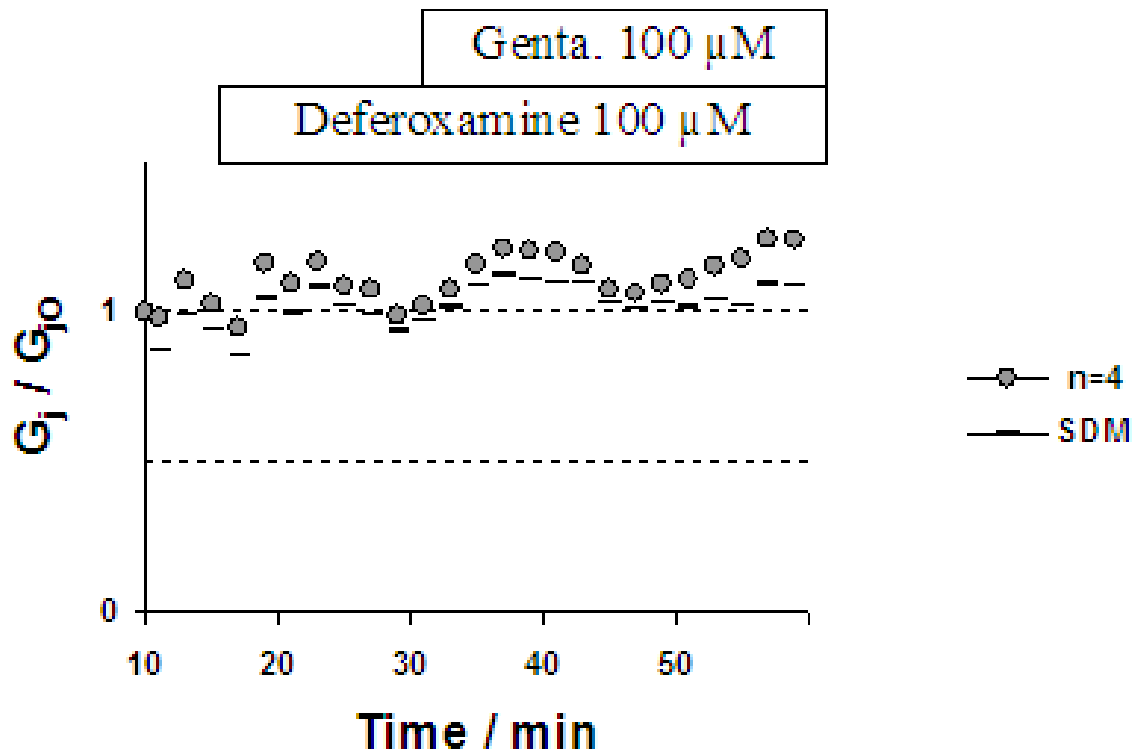
In einer nächsten Versuchsreihe inkubierten wir unsere Zellpaare mit dem Eisenchelator Deferoxamine (100  $\mu\text{M}$ ) und fügten der Badlösung nach 15 min 10  $\mu\text{M}$  Gentamycin (Abb.18) und in einer weiteren Versuchsreihe 100  $\mu\text{M}$  Gentamycin (Abb.19) hinzu. Es fand sich eine stabile interzelluläre Kopplung zwischen 43.8 nS (Abb.18) ( $n=3$ ) und 70.1 nS (Abb. 19) ( $n=4$ ) unter den genannten Versuchsbedingungen. Der Chelator führte zu einer Bindung des intrazellulär gelösten Eisens, so dass es nicht zu einer

Komplexbildung mit Gentamycin und der Kaskade nachfolgender Effekte kommen konnte.



**Abb. 18:**

Leitfähigkeitsänderungen ( $G_j$ ) nach Vorinkubation mit Deferoxamine (100  $\mu\text{M}$ ) und nachfolgender Zugabe von Gentamycin (10  $\mu\text{M}$ ).

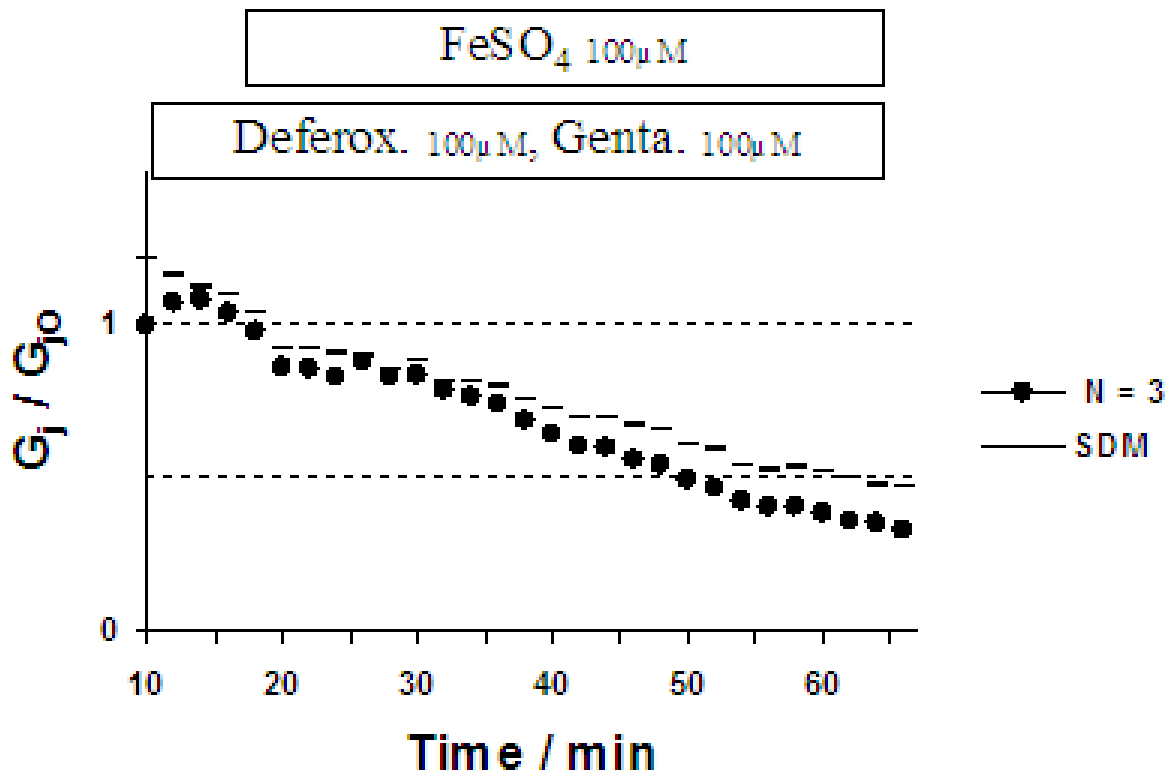


**Abb. 19:**

Leitfähigkeitsänderungen ( $G_j$ ) nach Vorinkubation mit Deferoxamine (100  $\mu\text{M}$ ) und nachfolgender Zugabe von Gentamycin (10  $\mu\text{M}$ ).

In einer letzten Serie konnte gezeigt werden, dass erst durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Fe  $\text{SO}_4$  (zum Badmedium HBSS, was bereits 100  $\mu\text{M}$  Deferoxamine/Gentamycin enthielt) die interzelluläre Leitfähigkeit um 56 ( $\pm 11.5$ ) % nach 30 min und 68 ( $\pm 14.4$ ) % nach 45 min absank (Abb. 20) ( $n=3$ ).

Damit wurde bestätigt, dass nach vollständiger Absättigung des Eisenchelators Deferoxamine durch Eisenzugabe die Fentonreaktion mit ROS-Bildung verstärkt einsetzt und somit die interzelluläre Leitfähigkeit verringert wird (Linksverschiebung).



**Abb. 20 :**

Leitfähigkeitsänderungen ( $G_j$ ) bei vorinkubierten Hensenzellen ( $100 \mu\text{M}$  Deferoxamine/Gentamycin) nach Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  Fe SO<sub>4</sub>.

### 3.9 Häufigkeit von Konnexin- Mutationen in der Population

Insgesamt fanden sich bei 30 (11.1%) Patienten Cx26- Mutationen innerhalb der Studiengruppe von 270 Patienten. Bei 4 dieser Patienten fand sich eine homozygote Mutation. Bei 2 Patienten fand sich eine „compound- heterozygote Mutation“ und bei 23 Patienten eine heterozygote Cx26- Mutation. Bei einem weiteren Patienten bestand eine „compound heterozygote Konstellation“ einer Cx26- Mutation und einer Cx30- Deletion (Tab.1: Pat. IL: *GJB2-V37L/ GJB6-D13S1830*). Bei 3 Patienten der Studiengruppe zeigte sich eine heterozygote Cx30- Mutation (Ser199Thr). Die Häufigkeit von Patienten mit c.35delG- Mutationen in der Studiengruppe betrug 3.3 % (n=9). Die Häufigkeit dieser Mutation in der Cx26- Mutationsgruppe lag bei 30 %. Weitere häufigere



---

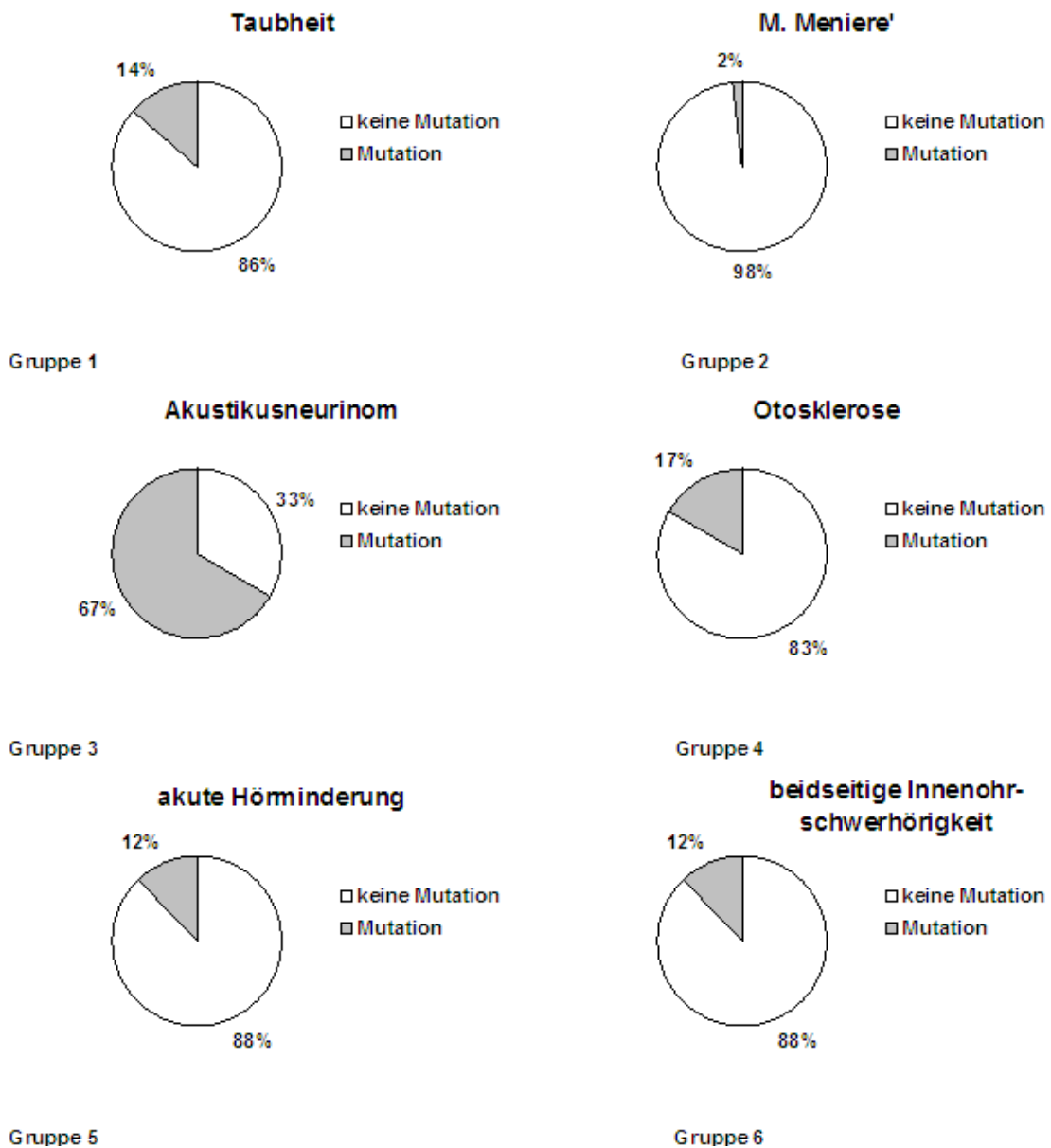
Mutationen in der Studiengruppe waren M34T (n=7), V153I (n=4) und V37T (n=3). Eine individualisierte Darstellung der Patienten mit Mutation, klinischer Subgruppe und Hörverlust findet sich in Tab.1 (Anhang).

Die Häufigkeit von Mutationen im Bereich der Kontrollgruppe von 260 Probanden betrug 8.9 % (n=23) und betraf ausschließlich heterozygote Cx26- Mutationen. Cx30- Mutationen fanden sich in der Kontrollgruppe nicht. Die häufigsten Cx26- Mutationen waren M34T (n=9), c.35del (n=5) und V37T (n=4). Eine individualisierte Darstellung der Patienten mit Mutation, klinischer Subgruppe und Hörverlust findet sich in Tab.2 (Anhang).

### ***3.10 Verteilung der Mutationshäufigkeiten in den klinischen Subgruppen von Patienten***

Zusammenfassend fand sich eine Verteilung der Mutationshäufigkeit innerhalb der klinischen Subgruppen wie folgt:

- 3 von 22 (13.6%) Patienten innerhalb der Gruppe 1;
- 1 von 52 (2.0%) Patienten innerhalb der Gruppe 2;
- 2 von 3 (66.6%) Patienten innerhalb der Gruppe 3;
- 4 von 24 (16.7%) Patienten innerhalb der Gruppe 4;
- 7 von 57 (12.3%) Patienten innerhalb der Gruppe 5;
- 13 von 113 (11.5%) Patienten innerhalb der Gruppe 6



**Abb. 21 :**  
Verteilung der Häufigkeit von Cx26-Mutationen innerhalb der klinischen Subgruppen.

Das Auftreten der drei Cx30- Mutationen betrifft ausschliesslich die Gruppe 4.

Unter Ausschluss der Patienten mit Konnexin- Mutationen fand sich, basierend auf der Familienanamnese, bei 8.5 % der Patienten der Studiengruppe der Hinweis auf einen genetischen Hintergrund der bestehenden Hörminderung. In der Gruppe der Konnexin-

---

Mutationsträger fand sich innerhalb der Familienanamnese der Hinweis auf eine genetische Ursache der Hörminderung bei 38.2 % der Patienten.

---

## 4. Diskussion

### 4.1 Regulation von Zell-Zell-Kanälen an Hensenzellen des Innenohres

1985 zeigten Neyton und Trautmann erstmals, dass die doppelte Ganzzelleableitung aufgrund ihres hohen Signal – Rauschabstandes, des niedrigen Eingangswiderstandes und des geringen Leckstromes eine hervorragende Methode zur Untersuchung von einzelnen Zell-Zell-Kanälen darstellt. Die Einzelkanalleitfähigkeit von Tränen-drüsenzellen der Ratte wurde in der damaligen Untersuchung mit 70-180 pS angegeben bei einer langsamen, spannungsunabhängigen Kanalkinetik mit einer mittleren Öffnungszeit von 2 s.

In der Folgezeit erfolgte die Charakterisierung weiterer Kanaleigenschaften mittels ACh (Neyton et al., 1986), Phosphorylierung, Ca<sup>2+</sup>, pH, Cholezystokinin, Calmodulin etc. (Kolb et al., 1991).

Das Ausmaß der interzelluläre Kopplung cochleärer Hensenzellen ist ungewöhnlich hoch, da 25 % der zellulären Oberfläche von konnexonhaltigen Plaques eingenommen wird (Forge et al., 2003). Die im Rahmen unserer Untersuchungen gefundenen Leitfähigkeiten dieser Zell-Zell-Kanäle (Todt et al., 1999) von bis zu 180 nS bestätigen die ausgeprägte Kopplung und liegen somit deutlich über den Werten anderer gekoppelter Zellen (z.B. 45- 85 nS für pankreatische Azinarzellen, 30 nS für Kardiomyozyten) (Ngezahayo et al., 1993, Verrachia et al., 1999). Die bislang in der Literatur beschriebenen Verfahren zum Kopplungsnachweis waren entweder qualitativer Natur (Farbstoffkopplung, z.B. mit Lucifer yellow) oder semiquantitativ zum Nachweis der Anzahl miteinander verkoppelter Zellen (Kapazitätsmessungen) (Santos Sacchi et al., 1986) geeignet.

Unsere Untersuchungen führten im Laufe des Experimentalzeitraums durch Optimierung der Präparationstechniken, durch Medienmodifikation u.a. zu einer verlängerten Lebensfähigkeit der

---

Zellpräparation und zu kontinuierlich verbesserten Ableit- und Messbedingungen. Die anfänglich gemessene mittlere Leitfähigkeit (29.9 nS bei einer Kopplungsdauer von etwa 1,5 h) verbesserte sich später auf 67.0 nS bei einer Kopplungsdauer von etwa 2.5 h (Todt et al., 1999; 2000; 2001; Junker 2000; Blödown et al., 2003).

In unseren Versuchsreihen fanden sich variable Spannungsabhängigkeiten, die von relativ gering (Abb. 9a) bis zu sehr stark (Abb.9c) schwankten. An diesen Beispielen lassen sich keine Analogieschlüsse zu homotypischen Zell-Zell-Kanälen herleiten. Eine deutliche Ähnlichkeit der inversen Kurvenverläufen, wie sie in den Untersuchungen beobachtet wurden (Abb. 9b, 9d), besteht jedoch zum Kanalverhalten der heterotypischen Kanäle (Cx30/Cx26) (Dahl et al. 1996). Es kann deshalb vermutet werden, dass diese heterogenen Zell-Zellkanäle im Corti- Organ eine funktionell wichtige Rolle bei der interzellulären Kopplung spielen (Todt et al., 1999; Todt et al., 2001). Heteromere Konnexone konnten mittels immun-histochemischen Nachweises im Corti-Organ bereits nachgewiesen werden (Forge et al., 2003; Ahmad et al., 2003) und Sun und Mitarbeiter (2004) zeigten, dass diese Kanäle sogar quantitativ überwiegen. Zur Zeit gelingt ein weiteres experimentelles Aufschlüsseln der einzelnen Konnexine (innerhalb der Konnexon-Untereinheiten) noch nicht, so dass wir ohne strukturellen Nachweis auf die funktionell-elektrophysiologischen Untersuchungsergebnisse angewiesen sind. Mit dieser Heterogenie der Kanalzusammensetzung zwischen den Hensenzellen erklärt sich auch das hochgradig variable, spannungsabhängige Öffnungsverhalten. Sowohl die spannungsabhängige Leitfähigkeit homomerer homotypischer Cx26/Cx30-Kanäle als auch homomerer, heterotypischer Cx26/Cx30-Kanäle (Dahl et al., 1996; Valunias et al., 1999; Manthey et al., 2001; Beltramello et al., 2003) entspricht nicht den beobachteten Kanaleigenschaften der frisch dissoziierten Hensenzellen (Todt et

---

al., 1999; Zhao et al., 2000; Todt et al., 2001). Die funktionelle Bedeutung dieses variablen Öffnungsverhaltens kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt ebenfalls noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Möglich erscheint jedoch eine tonotope, spezifische Funktion einzelner Hensenzellsub-populationen innerhalb der Cochlea, so dass die Vorstellung eines räumlich gut definierten Puffermechanismus damit belegt wäre (Spicer et al., 1994).

Experimentell kann man die Kanaleigenschaften der verschiedenen Konnexine nach Expression in Zellsystemen untersuchen: Während in HELA- Zellen homotypische Zell-Zell-Kanäle bekannter Konnexine oder angenommen heterotypische unklarer Konnexinzusammensetzung elektrophysiologisch untersucht werden können, kann man mit Hilfe der *Xenopus laevis*- Oozyte zwei homotypische Konnexone unterschiedlicher Konnexine analysieren. So wurde beschrieben, dass Cx26-Zell-Zell-Kanäle - ebenso wie Cx30 - ein weitgehend symmetrisches Spannungsverhalten zeigen. Jedoch zeigt das spannungsabhängige Öffnungsverhalten - im Hinblick auf die Kinetik und  $V_0$  - sehr unterschiedliche Ausprägung (Dahl et al., 1996). Koppelt man heterotypisch Cx26 mit Cx30, findet sich ein deutlicher Abfall der Leitfähigkeit bei Hyperpolarisierung (Dahl et al., 1996). Weitere Unterschiede finden sich in der Farbstoffkopplung homotypischer Kanäle. Die Expression von Cx26/Cx30 Chimären in HeLa- Zellen belegen, daß die zytoplasmatischen Domänen dieser Konnexine für das leitfähigkeits- und spannungsabhängige Öffnungsverhalten verantwortlich sind (Manthey et al., 2001). Valiunas und Mitarbeiter (1999) nehmen an, daß Cx30 bei einer mittleren Leitfähigkeit von 180 pS nicht nur dazu in der Lage ist, kleinere Ionen passieren zu lassen, sondern auch Moleküle zwischen 40 - 300 pS (vgl. auch dazu Waltzmann und Spray 1995). Damit ist Cx30 aus funktioneller Sicht gut dafür geeignet, intensive, interzelluläre Signaltransduktion zu ermöglichen.

---

#### 4.2 Funktionelle Bedeutung von Cx26 und Cx30 im Corti-Organ

Cx26 und Cx30 konnten als quantitativ wichtigste Konnexine in cochleären Hensenzellen nachgewiesen werden (Kikuchi et al. 1995; Lautermann et al., 1998). Damit sind diese beiden Kanäle wahrscheinlich vorrangig für den intracochleären, intrazellulären Abtransport des bei der Haarzelldepolarisation freiwerdenden Kaliums verantwortlich (Kikuchi et al., 1995, 2000; Forge et al., 1999; Wangemann 2002). Bei der Signaltransduktion der auftreffenden Schallwelle („cochleärer Verstärkermechanismus“) erfolgt in die äußere Haarzelle ein Kaliumeinstrom durch die Stereozilien entlang eines elektrochemischen Gradienten. Nach der Depolarisation der Zelle wird das Kalium durch einen Maxi-K-Kanal aus der basolateralen Zellwand heraustransportiert (Gitter et al., 1992), um so die schnelle Repolarisierbarkeit zu sichern. Es ist wahrscheinlich, dass die so freigesetzten Kaliumionen aus dem Corti-Tunnel mit Hilfe eines K-Cl Cotransporters KCC 4 (Boettger et al., 2002) oder von Kaliumkanälen Kir 4.1 (Hibino et al., 1997), MERG1a (Nie et al., 2004) oder KCNQ3 (Liang et al., 2004) in die Stützzellen gelangen. Von dort werden sie über die Zell-Zell-Kanäle abgeleitet, um so die ionale Homöostase im Corti-Organ zu gewährleisten („lokaler Kaliumpuffermechanismus“) (Johnstone et al., 1989).

Durch diesen lokalen Puffermechanismus ermöglichen die Zell-Zell-Kanäle der Hensenzellen die Aufrechterhaltung des hochpositiven endolymphatischen Potentials (EP, +85 mV). Dieses positive Bestandpotential wird von der kaliumreichen Endolymphe getragen und „treibt als Batteriestrom“ die Repolarisierung der OHC voran (Kikuchi et al., 1995; Souter and Forge et al., 1998; Wangemann, 2002; Forge et al., 2003). Weitere Zell-Zell-Kanäle im Corti-Organ finden sich in der Stria vascularis, einem kaliumsekretorischen Epithel, das den

---

Endolymphschlauch an der lateralen Seite begrenzt (Forge, 1994; Carlisle et al., 1990; Souter and Forge, 1998). Eine mögliche Route des „Kalium-Traffickings“ in die Stria vascularis (McGuirt and Schulte 1994; Schulte and Steel, 1994) geht über die ligamentären Fibrozyten unter Umgehung der dichten Schlussleistenkomplexe der Basalzellen. So konnte gezeigt werden, dass nach intracochleärer Applikation von Proadifen - einem spezifischen Zell-Zell-Kanalentkoppler - ein Absinken des endocochleären Potentials (EP) zu beobachten war (Spiess et al., 2002).

Cx30 spielt von den intracochleär nachweisbaren Konnexinen eine zentrale Rolle in der cochleären Physiologie, wie Knockout-Experimente an Mäusen zeigten. Während fehlendes Cx30 dazu führte, dass die Tiere kein EP ausbilden (Teubner et al., 2003), ist das EP bei Cx26-Knockout-Mäusen normal nachweisbar (Cohen-Salmon et al., 2002). So sind die Konnexine im Corti-Organ und in der Stria vascularis unterschiedlich exprimiert. Somit ist bei unterschiedlicher Kompatibilität von Cx26/30 mit anderen Konnexinen eine kompensatorische Expression anderer Konnexine (Cx32, Cx31, Cx43) vorstellbar, so dass diese scheinbar gegenläufigen Ergebnisse der Knockout-Versuche verständlich werden.

Ein wichtiger Aspekt der Arbeit lag in der Untersuchung der Beteiligung interzellulärer Kommunikationsmechanismen bei pathophysiologischen Veränderungen im Corti-Organ. Bei verschiedenen Innenohrkrankungen – wie z.B. der Ototoxizität (Garetz et al., 1994a, 1994b; Priuska et al., 1995; Ravi et al., 1995, Clerici et 1995; 1996; Clerici and Yang 1996; Hirose et al., 1997; Kopke et al., 1997; Lopez-Gonzalez et al., 1998), den akuten oder chronischen Hör- und Gleichgewichtsstörungen (Seidmann et al., 1991; Quirk et al., 1994, Seidmann and Shivapuja, 1993, Quirk et al., 1994, Hu et al., 1997, Yamane et al., 1995) – spielt die erhöhte Produktion freier Radikale (ROS,



---

d.h. Wasserstoffperoxid-, Anionen- und Hydroxylradikale) in der Entstehung der einzelnen Störungen eine zentrale Rolle. Ähnliches gilt für andere neuronale Gewebe, z.B. nach akuten Traumen (Siesjo et al., 1989; Hall et al., 1993), das Reperfusionsmodell nach akuter Ischämie (Cao et al., 1988; Halliwell, 1992) oder chronisch-degenerative Veränderungen (Götz et al., 1994; Gutteridge, 1994).

#### *4.3 Der Einfluß von $H_2O_2$ auf die interzelluläre Kopplung*

Bisherige Untersuchungen der GJIC an Hensenzellen (Santos Sacchi et al., 1983; Santos Sacchi 1984) bezogen sich ausschließlich auf die physiologische Modulierbarkeit der Kanaleigenschaften, z.B. durch pH-,  $Ca^{2+}$ -, Spannungs- und Temperaturänderungen (Santos Sacchi, 1985; 1986; Sato et al., 1994; Sato et al., 1998; Zhao et al., 1998).

In unserer Versuchsreihen fanden sich keine Hinweise auf eine unmittelbare Beeinträchtigung der Zellviabilität- bzw. integrität der Zellmembran nach Zugabe von  $H_2O_2$  unterschiedlicher Konzentration. Diese Resistenz der Hensenzellen – im Vergleich zu den wesentlich empfindlicheren Sinneszellen (Clerici et al., 1995)– konnte bereits im Häutchenpräparat nachgewiesen werden (Dehne et al., 2000) und beruht auf dem hohen intrazellulären Gehalt an Radikalfängern (Usami et al., 1996).

Die Veränderungen der GJIC waren konzentrationsabhängig und fanden in einem engen zeitlichen Fenster von 30 min statt. Währenddessen kam es vom Absinken bis zur subtotalen Reduktion (10 %) der Kopplung. Dieser Effekt lässt sich als direkte Interaktion mit dem Zell-Zell-Kanal interpretieren (z.B. Konnexinphosphorylierung), da dessen zelluläre Halbwertszeit im Bereich von 2 bis 5 h liegt, so dass als alternative Erklärung für die Reduktion der intrazellulären Kopplung ein Komplettaustausch der Zell-Zell-Kanäle über ein Trafficking ausscheidet (Evans et

---

al., 2002). Aufgrund der Bildung heteromerer Konnexone im Corti-Organ (Forge et al. 2003) und der somit wahrscheinlichen Ausbildung heteromerer, heterotypischer Zell-Zell-Kanäle der Hensenzellen (Cx26/Cx30) erscheint dieser Pathomechanismus aufgrund der unterschiedlichen Phosphorylierbarkeit der Konnexine als wahrscheinlichste Erklärung. Für Cx43 (Upham et al., 1997) und Cx30 (Saez et al., 1998) ist bereits die Phosphorylierung durch  $H_2O_2$  experimentell gut belegt. Bei Zugabe von 0.08 mM  $H_2O_2$  zeigten sich keine Änderung der interzellulären Leitfähigkeit, jedoch wies die intrazelluläre Kalziumkonzentration oszillatorische Schwankungen auf (Abb. 11). Dieser Effekt (Kannan et al., 1997) könnte über Ryanoidrezeptoren vermittelt sein (Favero et al., 1995; Burlando et al., 1997; Hernandez-Cruz et al., 1997), wie sie bereits für Hensenzellen nachgewiesen wurden (Sato et al., 1998) oder auf komplexe Veränderungen in der Signaltransduktion zurückgehen (inkl. Genexpression, ATP-Synthese in Mitochondrien etc.) (Nakahara et al., 1998; Ngezahayo et al., 1993).

#### 4.4 $[Ca^{2+}]_i$ und interzelluläre Kopplung

Unter Perfusion mit höheren  $H_2O_2$ -Konzentrationen (0.8 mM) findet sich neben einer Minderung der Leitfähigkeit ein paralleler, signifikanter Anstieg des  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb.12).

Generell werden bei der auch hier angewandten (doppelten) Ganzzelleableitung die zytoplasmatischen Elektrolyte durch die Pipettenlösung bestimmt, weshalb die Zugabe von 5 mM EGTA in der Pipettenlösung die Kalziumionen gepuffert hatte. Somit kann ausgeschlossen werden, dass es zu einem  $H_2O_2$ -induzierten Anstieg von Kalziumionen im Zytoplasmaraum kam. Deshalb ist wahrscheinlich, dass der in unseren Versuchen beobachtbare Anstieg des  $[Ca^{2+}]_i$  in Anwesenheit von EGTA durch eine Freisetzung aus zellmembrannahen Regionen verursacht wurde

---

(You et al., 1997)(Abb. 11, 12). Der stärker ausgeprägte Anstieg des  $[Ca^{2+}]_i$  nach  $H_2O_2$ -Zugabe fand seinen Niederschlag in der parallelen Abnahme der GJIC (Abb. 10). Dieser Befund geht primär auf eine direkte Interaktion des  $[Ca^{2+}]_i$  mit der Kanalstruktur zurück (Somogyi et al., 1991) und wurde für cochleäre Stützzellen im Millimolarbereich bereits beschrieben (Sato et al., 1994). Andere, begleitende kalziumassoziierte Ereignisse bei Anwesenheit von  $H_2O_2$  umfassen die bereits oben beschriebene Phosphorylierung der Konnexine und eine Phosphorylierung über G-Proteine (Nishida et al., 2000) sowie eine Interaktion mit Calmodulin (Blödow et al., 2003). Ein Einfluss von  $H_2O_2$  auf die spannungsabhängige Leitfähigkeitsänderung der GJIC konnte ausgeschlossen werden (Abb. 13)(Todt et al., 2001).

#### *4.5 Bildung freier Radikale und Aminoglykosidototoxizität*

Aufgrund der bekannten Beteiligung von ROS an der Aminoglykosidototoxizität (Takayama et al. 1997) und unserer Ergebnisse der  $H_2O_2$ -induzierten Veränderungen der interzellulären Leitfähigkeit sollte in einem nächsten Abschnitt untersucht werden, welchen Einfluss Gentamycin auf die GJIC hat. Die Beobachtung, dass äußere Haarzellen ex vivo ohne umgebende Stützzellen nach Aminoglykosidexposition über einen Zeitraum von 6 h keine Vitalitätsänderungen (Dulon et al., 1989, Zenner et al., 1994) und nur geringfügige Änderungen des Membranpotentials (Ernst et al., 1994) zeigen, lässt eine aktive Beteiligung der Stützzellen bei der Generation freier Radikaler und der Vermittlung der Aminoglykosidototoxizität vermuten. So war bisher bekannt, dass Aminoglykoside den Transduktionskanal der Stereozilien der äußeren Haarzellen blockieren können (50  $\mu$ M) (Kroese et al., 1982; 1989), höhere Konzentration (0.5 mM-1mM) in explantierten Kulturen von OHC und Stützzellen führen

---

zum Zelluntergang der OHC (Richardson et al., 1991). Damit entstand die Hypothese, dass der Hörverlust nach Aminoglykosidgabe durch den Haarzellschaden alleine nicht entstehen könne, sondern dass andere zelluläre Strukturen und Pathomechanismen einen ebenso entscheidenden Anteil daran haben.

Der in den 80er Jahren vorgeschlagene und lange akzeptierte zelluläre Pathomechanismus der Gentamycintoxizität umfasste die Blockade eines  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten  $\text{K}^+$ -Kanals in der lateralen Wand der OHC und die nachfolgende Bindung an zytoplasmatisches Phosphatidylinositol 4,5-trisphosphat ( $\text{InsP}_3$ ) (Lim, 1986; Williams, 1987). Alle diese Versuche wurden jedoch an isolierten OHC-Präparationen ex vivo durchgeführt. Da jedoch auch ein Jahr nach erstmaliger i.v.-Gabe von Gentamycin im Tierversuch bei unveränderter Hörschwelle noch Gentamycin intracochleär nachweisbar war (Dulon et al., 1993), musste der oben vorgeschlagene Pathomechanismus einer Revision unterzogen werden. Da Gentamycin als Substanz alleine keine zytotoxische Wirkung auf isolierte OHC entfalten kann (Ernst et al., 1994), mußte von einer Metabolisierung („Toxifizierung“) ausgegangen werden (Huang et al., 1990; Crann et al., 1992). So wurde gezeigt, dass eine Chelatbildung von Gentamycin und Eisen im Corti-Organ zur Freisetzung von ROS führt (Fenton-Reaktion) (Priuska et al., 1995). Im Umkehrschluss konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibition der ROS-Freisetzung durch Radikalfänger oder Eisenchelatlagerer in vivo (Garetz et al., 1994; Song et al., 1996; 1997) und in vitro (Garetz et al., 1994; Zenner et al., 1994) die Aminoglykosidotoxizität verhindert.

Die Beobachtung von morphologischen Veränderungen der Zell-Zell-Kanäle nach Gentamycinexposition sowohl im Corti-Organ als auch in der Stria vascularis (Forge et al., 1985; Mc Dowell et al., 1989) legten deshalb eine funktionelle Beteiligung der

---

Hensenzellen bei der Aminoglykosidototoxizität nahe (Forge et al., 2003; Bitner- Glindzicz, 2002).

So setzt ab 1h bis 3h nach Gentamicin Exposition mit fortschreitender Zeit eine Minderung der gap junctionalen Plaques in den entsprechenden Regionen der Basalzellen der Stria vaskularis ein (Forge et al., 1985).

In unseren Versuchen nach Gentamycinzugabe findet sich eine konzentrationsabhängige, schnelle, irreversible Minderung der GJIC durch 10  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  um 50 % innerhalb von 10.5 min bzw. 23 min (Abb.14) (Todt et al., 1999).

Diese unterschiedlichen Zeitverläufe haben vermutlich zwei zugrundeliegende Mechanismen. Zum einen deutet die Irreversibilität der GJIC-Verminderung auf einen nicht mehr vollständig funktionsfähige Zell-Zell-Kanäle hin. Da der gentamicininduzierte Kanalabbau mittels Trafficking in einem zeitlichen Fenster von 2 bis 5 h beginnt (Evans et al., 2002), sind die von Forge und Mitarbeitern (1985) beobachteten elektronenoptischen Veränderungen mit großer Wahrscheinlichkeit auf diesen Mechanismus zurückzuführen. Die funktionellen Änderungen der GJIC beginnen – wie oben gezeigt - deutlich früher (Abb.14), wobei sich unsere eingesetzten Konzentrationen daran orientierten, was Tran Ban Huy et al. (1981) in der Perilymphe fanden (20 $\mu\text{M}$ ). Damit simulieren unsere Versuchsbedingungen realistisch das Szenario der ototoxischen Reaktionen am Corti-Organ. Die Schwellenkonzentration für das Absinken der GJIC lag bei 5  $\mu\text{M}$  (Abb.14), Gentamycin-konzentrationen von 10 – 100  $\mu\text{M}$  führen zu einer zeitlich schnelleren Verminderung der GJIC (Abb.14). Dieser Effekt konnte durch Zugabe von Catalase - einem spezifischen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Radikalfänger (Mueller et al., 1996) - antagonisiert werden (Abb.16). Damit konnten wir als Mechanismus der Toxifizierung von Gentamycin die Bildung von ROS an den Hensenzellen indirekt belegen. Aufgrund des hohen intrazellulären Eisenanteils

---

in den Hensenzelle (Dehne et al., 2001), muß auch an diesen Zellen die Fenton-Reaktion ursächlich angenommen werden (Priuska et al., 1995). Die Beobachtung, dass OHC unter Perfusion von Gentamycin in ihrer Lebensfähigkeit nicht eingeschränkt sind (Dulon et al., 1989; Zenner et al., 1994; Keiner et al., 1995), unterstützt die Hypothese, dass Stützzellen als Eisenlieferanten dienen. Die Hypothese, dass zusätzliche Blutserumbestandteile mit ihren Eisenspeichern zur Bildung von ROS beitragen (Forge et al., 2000), ist möglich. Neueste Arbeiten zeigen jedoch, dass die Catalasebildung nach Gentamycingabe in der Cochlea intrinsisch hochreguliert wird (Bodmer et al., 2004).

Die Hensenzellen reagierten weder morphologisch noch elektrophysiologisch auf die Gentamycinzugabe in unseren Versuchen, was vermutlich auf ihren hohen Anteil an Gluthation (Usami et al., 1996), Taurin (Horner et al., 1997) und Vitamin A (Biesalski et al., 1984) zurückzuführen ist, da diese Substanzen als Radikalfänger dienen.

Da  $[\text{Fe}^{2+}]_i$  in der Perilymphe nach Gentamycin ansteigt (Xu et al., 1995), der Eisenchelator Deferoxamin zu einer Reduktion der Ototoxizität führt (Song et al., 1996) und extern zugeführtes  $[\text{Fe}^{2+}]$  zu einer Zunahme der Ototoxizität führt (Canlon et al., 1998), wurden zusätzliche Versuche zur weiteren Aufklärung der Rolle von  $[\text{Fe}^{2+}]_i$  unternommen (Todt et al., 2001).

So konnten wir zeigen, dass eine Deferoxamine- Zugabe den Gentamycineffekt antagonisiert (Abb. 18, Abb. 19), wobei das  $[\text{Fe}^{2+}]_i$  mit hoher Wahrscheinlichkeit aus den Mitochondrien der Hensenzellen stammt (Hiel et al., 1993; Balogh et al., 1970; Hayashida et al., 1985; de Groot et al., 1990) und diese damit die Sensitivität des Innenohres gegenüber Gentamycin mitbestimmen (Fischel-Ghodsian et al., 1993; Sun et al., 1990).

Damit ist auch auf der zellulären Ebene der Stützzellen der entscheidende Beitrag des – in den Hensenzellen besonders hohen (Dehne et al., 2001)-  $[\text{Fe}^{2+}]_i$  am Pathomechanismus der

---

Aminoglykosidototoxizität bestätigt worden. Untersuchungen an renalen Mitochondrien belegen die Fähigkeit von Gentamycin,  $[\text{Fe}^{2+}]_i$  durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  aus seinen Bindungen zu lösen und so seine nephrotoxische Wirkung zu entfalten (Ueda et al., 1993; Yang et al., 1995).

Der Zusammenbruch der GJIC nach Gentamycinexposition zwischen den Stützzellen hat gravierende pathophysiologische Auswirkungen, da das beim Hörvorgang aus den OHC freiwerdende ionisierte Kalium nicht mehr lokal gepuffert werden kann. Damit ist die Repolarisierbarkeit der OHC nicht mehr gegeben, das EP sinkt ab und mittelfristig entstehen die klinischen Symptome, wie Hörstörung und Tinnitus.

Unsere Untersuchungen legen den Schluß nahe, dass der klinische Einsatz von Radikalfängern sich bei verschiedenen Krankheitszuständen des Innenohres anbietet. An wichtigster Stelle steht hier – neben der Prävention der Aminoglykosidototoxizität – die akute Hörminderung bzw. die akute Innenohrschädigung (durch Ischämie, Lärmtrauma etc.). Ähnlich wie die Diskussionen um die zuvor weniger beachtete Glia in den letzten zwei Jahrzehnten für das ZNS zeigten, scheinen auch die (glialen) Stützzellpopulationen des Corti-Organ eine eigene, wichtige Rolle in der Physiologie und Pathophysiologie des Hörens zu spielen, wie diese und andere Erkenntnisse belegen. Vor allem die Aufklärung der am häufigsten weltweit vorkommenden, nicht-syndromaler Schwerhörigkeit, die durch eine Mutation des Cx26-Kanalproteins hervorgerufen wird, hat hierzu entscheidend beigetragen.

#### *4.6 Häufigkeitsverteilung von Connexin- Mutationen*

Aufgrund der Einführung von genetischen Reihenuntersuchungen in die klinische Praxis gewinnt die Frage der Häufigkeit spezifischer Connexin- Mutationen sowie der Nachweis

---

spezifischer klinischer und neurootologische Befundkonstellationen zunehmend an Bedeutung.

Erste Studien beschrieben eine Korrelation zwischen Ausprägung und Form des Hörverlustes und verschiedenen Typen homozygoter, heterozygoter, and „compound heterozygoter“ Cx26- Mutationen (Cryns et al., 2003; Löffler et al., 2001; Azaiez et al., 2004). Die Häufigkeit von Konnexin- Mutationen in einer tauben nordamerikanischen Population wird mit 15.4% homozygoten Trägern der Cx26 Mutation c.35delG und 11.8% einer einzelnen Sequenzvariation von *GJB2* angegeben (Pandya et al., 2003). Die Häufigkeit von *GJB2*- Mutationen in Deutschland hingegen wurde, in einer Population mit 50% genetischen Hörverlusten untersucht mit 9 % auf beiden Allelen und weiteren 9% auf einem Allel (c.35delG) angegeben (Kunstmann et al., 2005). Weitere Studien beschreiben eine Häufigkeit von 3.8% homozygoten Trägern der c.35delG Mutation in *GJB2* bei Patienten mit mittelgradigem bis schwerem (moderate to profound) Hörverlust, 2.6% „compound heterozygoten“ and 4.7% heterozygoten Trägern. In einer Kontrollgruppe von Probanden ohne Hörverlust lag die Häufigkeit von *GJB2* Mutationen bei 0.8% (Kupka et al., 2002).

Homozygote and „compound heterozygote“ Mutationen des Cx26- Gens sind als Ursache verschiedener Graduierungen und Formen der Hörminderung anzusehen (Laird et al., 2008). Die Rolle heterozygoter, rezessiver Mutationen des Cx 26- Gens bei der Entstehung von Hörstörungen ist oftmals unklar. Die Aufklärung zusätzlicher Mutationen z.B. (del(*GJB6*-D13S1830); del(*GJB6*-D13S1854)) ermöglichen deshalb ein besseres Verständnis dieser genetisch unklaren Typen von Hörverlusten (del Castillo et al., 2002; Lerer et al., 2001; Palares-Ruiz et al., 2002; del Castillo et al., 2005). Auch taube Populationen sind charakterisiert durch eine hohe Anzahl von Trägern heterozygoter Cx-26-Mutationen im



---

Vergleich zu Trägern homozygoter Mutationen (Pandya et al., 2003). In unserer Studienpopulation findet sich nur in einem Fall eine der genannten zusätzlichen Mutationen (del(*GJB6-D13S1830*)).

In der Literatur wird eine gewisse Korrelation zwischen schweren Hörminderungen und homozygoten Cx26- Mutationen bzw. leichten bis mittelgradigen Hörminderungen und compound heterozygoten and heterozygoten Mutationen beschrieben (Xue et al., 2005; Snoeckx et al., 2005; Welch et al., 2007).

Dies stimmt zu einem gewissen Masse mit den individuellen Ausprägungsgraden der gefundenen Hörminderungen in unserer Studienpopulation (Tab.1) überein. Diese Korrelation macht die Verteilung der Mutationstypen in der Studiengruppe aufgrund der Einschlusskriterien (zwei Frequenzen > 30 dB) transparent. Bedingt durch die Einbeziehung von Patienten mit geringergradigen Hörverlusten ist der Anteil der homozygoten und „compound heterozygoten“ Träger vergleichsweise gering (n=7) und der Anteil der heterozygoten Träger vergleichsweise hoch (n=23).

In einer Studienpopulation mit einem höheren Anteil höhergradiger Hörverluste findet sich deshalb eine abweichende Häufigkeit (1:0.8) (Kupka et al., 2002).

Die Häufigkeit der Cx26- Mutation c.35delG von 3.3% in unserer Studiengruppe steht im Einklang mit anderen Studien (Gasparini et al., 2002). Die Frequenz von selektiven, vermutlich pathogenen Cx26-Mutationen (c.35delG and c.313del14) von 2.7 % in der Kontrollgruppe war höher als die in der Kontrollgruppe von (Kupka et al., 2002) beschriebene Häufigkeit dieser Mutationen (1.6%).

Dieses Ergebnis erklärt sich durch das hochselektierte Klientel in einem Krankenhaus im Vergleich zu einer „Normalpopulation“ wie bei Kupka et al., 2002.

---

In der Kontrollgruppe findet sich die bezüglich ihrer Pathogenität kontrovers diskutierte M34T- Mutation (Oshima et al., 2007) in einer höheren Rate (9 von 23) als die c.35delG Mutation (5 von 23) und auch häufiger als in der Studiengruppe (7 von 30).

Die M34T ist somit im Vergleich zur c.35delG (14) mit 16 betroffenen Probanden die häufigste isolierte Cx26- Mutation in der untersuchten Gesamtpopulation.

Dies verwundert, da die c.35delG Mutation in anderen Studien die am häufigsten isolierte Mutation in Deutschland ist. (Kunstmann et al., 2005; Kupka et al., 2002). Auch ethnische Einflüsse in Berlin Brandenburg durch Einwanderungsströme aus Osteuropa über die letzten 250 Jahre können dies nicht erklären, da für diese Regionen ebenfalls eine c.35delG- Dominanz beschrieben wurde (Posukh et al., 2005; Wiszniewski et al., 2001). Möglicherweise spielt hier die Probandenauswahl in der Klinik eine determinierende Rolle (vgl. dazu Pollak et al., 2007). Das Auftreten der 3 Patienten mit Konnexin 30 Mutationen steht in Übereinstimmung mit der niedrigen Frequenz in anderen Studien (Kunstmann et al., 2005).

#### *4.7 Cx26- Mutationen bei akuter Hörminderung und beiderseitiger Innenohrschwerhörigkeit*

Reintonaudiometrische Untersuchungen innerhalb der Studien- gruppe zeigen ein klinisch- audiologisch uneinheitliches Bild.

Im Gegensatz zu anderen Studien fanden sich innerhalb unserer heterozygoten Konnexin- Mutationsträger tieffrequente Hörverluste (Xue et al., 2005), insbesondere in der Gruppe der Patienten mit einer akuten einseitigen Hörminderung (Tab.1).

In den meisten Fällen von bilateraler Hörminderung zeigten sich symmetrische, pantonale (flat) oder steilabfallende (sloping) Hoerverluste im Reintonaudiogram.

---

Innerhalb der Kontrollgruppe waren nur eine begrenzte Anzahl von Reintonaudiogrammen (6 von 24) zu ermitteln.

Dabei konnte jedoch in allen Reintonaudiogrammen von Studien- und Kontrollgruppe ein Hörverlust nachgewiesen werden, der über der Standardabweichung der Hörtests Normalhöriger lag (10 dB).

Aus Untersuchungen der otoakustischen Emissionen von heterozygoten 35delG- Trägern (Engel-Yeger et al., 2002) wissen wir, dass diese vermindert sind.

Franze und Mitarbeiter (2005) beschrieben eine signifikante reintonaudiometrische Differenz zwischen Trägern der heterozygoten Cx26- Mutation c.35delG und einem Normalkollektiv für die Frequenzen 6 kHz and 8 kHz. Dies belegt einen signifikanten Hörverlust auch für die Gruppe der heterozygoten Träger von 35delG- Mutationen. Daher kann, auf der Basis der reintonaudiometrischen Ergebnisse bei Trägern der heterozygoten Cx26 Mutationen, neben der c.35delG Mutation, in Studien und Kontrollgruppe ein Einfluss dieser Mutationen auf das Höervermögen angenommen werden.

#### *4.8 Cx26- Mutationen bei Taubheit*

Cx26- Mutationen sind als Ursache für Ertaubung bei Cochlea-Implant- Patienten gut bekannt. Ein besseres postoperatives Sprachverständnis bei Cx26- Mutationen- Trägern im Vergleich zu anderen Patienten, die mit einem Cochlea Implant versorgt wurden, wird diskutiert (Bauer et al., 2003; Sinnathuray et al., 2004, Connell et al., 2007). Studien zur Häufigkeit von Cx26- Mutationen bei Cochlea-Implant- Patienten variieren zwischen 18% und 40% (Lustig et al., 2004; Bauer et al., 2003). Die geringe Anzahl an Cx26 Mutationen- Trägern in unserer Studie (13.6%) ist wahrscheinlich auf das höhere Alter der implantierten Patienten zurückzuführen.

---

Während in anderen Studien der Anteil von Kindern hoch ist, finden sich in unserer Studie überwiegend Patienten mit einem Alter von über 30 Jahren. Daher kann der Anteil an Patienten mit einer nicht hereditären Ursache der Hörminderung als größer angenommen werden als in Studien mit einem hohen Anteil an Kindern.

#### *4.9 Cx26- Mutationen bei Morbus Meniere'*

Innerhalb der wissenschaftliche Literatur findet sich kein Hinweis auf eine Korrelation zwischen M. Meniere' und Konnexin-Mutationen.

Die geringe Anzahl an Patienten (2%) mit Konnexin- Mutationen und M. Meniere' in unserer Studie bestätigt diese Einschätzung.

#### *4.10 Cx26- Mutationen bei Akustikusneurinomen*

Die große Bedeutung von Konnexin- Mutationen für Wachstum und Integrität neuraler Strukturen ist seit der erstmaligen Beschreibung der Cx32- assoziierten X-chromosomalen Charcot-Marie-Tooth Erkrankung unbestritten. Bis zu 163 Cx32- Mutationen sind beschrieben worden (Ressot et al., 2000). Auffälligerweise besteht zwischen Cx32 und Cx26 eine phylogenetisch enge Beziehung und die pathogenetisch bedeutsame Cx32- Mutation Met34Thr ist auf derselben Proteinposition wie die bezüglich ihrer Pathogenität kontrovers diskutierte Cx26 Mutation (Met34Thr) (Feldmann et al., 2004b) lokalisiert. In der vorliegenden Studie fand sich die beschriebene Cx26- Mutation (Met34Thr) bei beiden Patienten mit Cx26- Mutationen und Akustikusneurinom.

Cx32 und Cx26 können heterotypische Zell- Zell- Kanäle bilden (Swenson et al., 1989). Cx32 befindet sich bei den Schwannschen Zellen an den Ranvier'schen Schnürringen sowie an den Schmidt-Lantermann- Inzisurem. Bei Mäusen lässt sich Cx26 innerhalb der Myelinscheiden, den Schmidt- Lantermann- Inzisurem, jedoch

---

nicht an den Ranvier'schen Schnürringen nachweisen. Des weiteren erscheint Cx26 geringfügiger exprimiert zu werden als Cx32 (Zhao and Spray, 1998), welches die fehlende Beschreibung in anderen Studien erklären könnte (Mambetisaeva et al., 1999).

Nagaoka und Mitarbeiter beschreiben Cx26 an den perineuralen Scheiden peripherer Nerven in Kolokalisation mit Laminin. (1999). Somit erscheint eine physiologische Ausprägung des Cx26 an nervalem Gewebe unzweifelhaft bedeutsam zu sein.

Die Diskussion der Relevanz gefundener Mutationen bei 2 von 3 Patienten mit Akustikusneurinomen erscheint aufgrund der geringfügigen Anzahl an Patienten schwierig.

Größere Studienpopulationen sind notwendig um eine mögliche Korrelation zwischen Cx26 Mutationen und Akustikusneurinomen einordnen zu können.

#### *4.11 Cx26- und Cx30- Mutationen bei Otosklerose*

Die Osteoblastenaktivität spielt bei der Pathogenese der Otosklerose eine zentrale Rolle.

Konnexine wiederum werden als ein Schlüsselfaktor in der interzellulären Kommunikation von Osteoblasten angesehen (Donahue et al., 1995). Einerseits wurde ausschließlich Cx43 an Osteoblasten beschrieben (Donahue et al., 2000), andererseits fanden sich an Felsenbeinpräparaten von Patienten mit Otosklerose Bereiche hoher Cx26- Expression. Atrophische Veränderungen und zystische Auftreibungen konnten in diesen Regionen nachgewiesen werden (Doherty et al., 2004).

Der Hörverlust von Patienten mit Otosklerose und Cx26- Mutation in unserer Studiengruppe zeigte keine hochgradige Schwerhörigkeit weder als reine Schalleitungsschwerhörigkeit noch als kombinierte Schwerhörigkeit (Tab. 1). Die Häufigkeit von Cx26- Mutations- Trägern (16.7%) in unserer Studiengruppe legt den Verdacht einer Beziehung zwischen Konnexin- Mutationen und Otosklerose nahe, obschon keine spezifischen Cx26- Mutationen

---

gehäuft vorkommen. Der Anteil an von Konnexin-Mutationen betroffenen Otosklerosepatienten erhöht sich noch weiter, wenn man die nachgewiesenen 3 Patienten mit Cx30- Mutationen hinzurechnet. Einschränkend muss jedoch darauf verwiesen werden, dass man dieser Mutation (Ser199Thr) zum jetzigen Zeitpunkt keine wesentliche Pathogenität zurechnet (Kelley et al., 1999).

In allen Fällen von Konnexin-Mutationen fanden sich auch anamnestisch Hinweise auf eine Heredität der Otosklerose.

Neben den allgemein akzeptierten Ursachen der Otosklerose (chronische Entzündung, virale oder genetische Ursache; Menger et al., 2003) legen die vorliegenden Ergebnisse vor allem den genetischen Hintergrund nahe. Betont werden muss in diesem Zusammenhang, dass Konnexine intensiv in den Mechanismus des interzellulären Austausches bei der Vermittlung von chronischen Entzündungen involviert sind.

(Tran van Nhieu et al., 2003).

#### *4.12 Erbgang von Cx26- Mutationen*

Vergleichen wir die Häufigkeit eines hereditären familiären Hintergrundes bei Cx26- Mutationsträgern (38.2%) innerhalb der Studiengruppe mit den Patienten ohne Cx26- Mutationen (8.5%), so müssen Cx26- Mutationen als die häufigste genetische Determinante in der gesamten Population angenommen werden (Gopalarao et al., 2008).

Bei einer Häufigkeit von 38.2 % Cx26- Mutationsträgern und 8.5 % ohne Konnexin- Hintergrund kann im Rückschluss von einer Anzahl von 50 % spontanen Mutationen ausgegangen werden. Diese Häufigkeit korreliert gut mit den in der Literatur gemachten Angaben (60 %; Murgia et al., 1999).

---

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Aufklärung der physiologischen und pathophysiologischen Funktion von nicht-sensorischem, glialem Innenohrgewebe leisten. Die elektrophysiologischen Untersuchungen dienten insbesondere der Aufklärung von Regulationsmechanismen der durch Zell-Zell-Kanäle (gap junctions) verbundenen Hensenzellen des Meerschweincheninnenohres, denen eine entscheidende Rolle bei der ionalen Homöostase des Innenohres zugeschrieben wird.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit der elektrophysiologischen Methode der doppelten Ganzzellaufnahme (double whole-cell patch-clamp) an frisch dissoziierten Hensenzellen des Meerschweincheninnenohres durchgeführt, da bislang in der Literatur nur Farbstoffkopplungen beschrieben wurden. Diese elektrophysiologische Methode repräsentiert den Goldstandard bei der direkten Untersuchung der durch Zell-Zell-Kanäle vermittelten interzellulären Kopplung. Zusätzlich wurden die begleitenden Veränderungen der Kalziumionenkonzentration mittels FURA-2-Fluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet.

Erstmals gelang es in den vorliegenden Untersuchungen, die elektrische Leitfähigkeit cochleärer Zell-Zell-Kanäle unter in-vitro-Bedingungen zu bestimmen. Die so nachgewiesenen, variablen Kanaleigenschaften lassen eine heterogene Konnexin-zusammensetzung der Zell-Zell-Kanäle im Corti-Organ vermuten und machen die Grenzen funktioneller Expressionsmodelle (*Xenopus laevis*-Oozyte, HeLa-Zelle) für die Aufklärung der interzellulären Kommunikation unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen deutlich.

Da freie Radikale bei der Entstehung wichtiger pathophysiologischer Vorgänge und Krankheitszustände im Innenohr eine zentrale Rolle spielen (u.a. bei der Lärmschwerhörigkeit, Aminoglykosidototoxizität, Presbyakusis),

---

wurde deren Einfluß auf die interzelluläre Leitfähigkeit untersucht. So fanden sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der interzellulärer Kopplung nach Perfusion mit  $H_2O_2$  ohne morphologisch eingeschränkte Vitalität der Hensenzellen bei gleichzeitiger Modulation durch kalziumabhängige Signaltransduktionswege.

Pathophysiologisch von großer Bedeutung erschien die Untersuchung der Beteiligung der Hensenzellen an der zellulären Ototoxizität von Aminoglykosiden. Bei Perfusion von gepaarten Hensenzellen mit pathophysiologisch schädigungsrelevanten Konzentrationen von Gentamycin zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der interzellulären Leitfähigkeit, die sich durch präexponentielle Inkubation der Zellen mit Katalase, einem spezifischen Radikalfänger, verhindern ließ. Grundlage dieser ototoxischen Gentamycinwirkung, die durch freie Radikale vermittelt wird, bildet die Fenton-Reaktion. Dabei kommt es zur Komplexbildung von Gentamycin und Eisenionen, in deren Folge freie Radikale entstehen. Eine Versuchsserie mit Eisenionen und dem Eisenchelatbildner Deferoxamin wies nach, dass dem Gentamycineffekt eine eisenabhängige,  $H_2O_2$ -generierende Reaktion zugrunde liegt. Da bislang die sensorischen Zellen des Innenohres (äußere Haarzellen) als zelluläres Haupttarget der Gentamycinototoxizität galten, gelang in den vorliegenden Untersuchungen erstmals der Nachweis einer Beteiligung nicht-sensorischer, glialer Innenohrstrukturen.

Die klinische Relevanz der vorgelegten Untersuchungen fuer die HNO- Heilkunde ergibt sich aus der Tatsache, daß 50 % aller nicht-syndromalen Innenohrschwerhörigkeiten durch Mutationen in den Genorten entstehen, die das Kanalprotein Konnexin-26 (Cx26) kodieren. Cx26 ist das quantitativ wichtigste Konnexin, welches neben weiteren Konnexinen im Innenohr Zell-Zell-Kanäle (gap junctions) bildet. Störungen der physiologischen Zellfunktionen



---

der Hensenzellen (u.a. Kaliumpufferfunktion, EP-Generierung) haben damit unmittelbare, gravierende Auswirkungen auf den Hörvorgang und können zum irreversiblen Hörverlust beitragen. Da die klinische Manifestation der Innenohrschwerhörigkeit bei gleicher Mutation stark variieren kann, ist die Aufdeckung von Regulationsvorgängen bei Zell-Zell-Kanälen des Innenohres von besonderem pathophysiologischem Interesse. Zusätzlich wird intermittierend die Hypothese einer „2. Mutation“ diskutiert, die in verschiedenen Fällen ursächlich für Hörstörungen nachgewiesen werden konnte. In den vorliegenden Untersuchungen konnten entsprechende zusätzliche Mutationen (*GJB6-D13S1830*) nur in einem von 530 Fällen nachgewiesen werden und sind daher aus epidemiologischer Sicht zu vernachlässigen. In der spezifischen Mutationsanalyse der untersuchten Population fanden sich entgegen aller bisherigen mitteleuropäischen Studien die Mutation M34T als die am häufigsten vorkommende Cx26- Mutation. Bislang konnte ansonsten c35 delG am häufigsten nachgewiesen werden. Dies lässt sich nur durch die hohe Vorselektion der analysierten Patientenpopulation in einer spezialisierten Fachabteilung erklären.

Bei der tiefergehenden Analyse von Konnexinmutationen konnte ein gehäuftes Auftreten innerhalb der Gruppen von Patienten mit Otosklerose und Akustikusneurinomen nachgewiesen werden

Hier sollten weitere Studien mit größeren Patientengruppen und spezifischer molekulargenetischen Fragestellungen finale Evidenz erbringen.

---

## 6. Literaturverzeichnis

- Ahmad S, Chen S, Sun J, Lin X. (2003) Konnexins 26 and 30 are co-assembled to form gap junctions in the cochlea of mice.  
*Biochem Biophys Res Commun.*, Jul 25 ;307(2): 362-8.
- Azaiez H, Chamberlin GP, Fischer SM, Welp CL, Prasad SD, Taggart RT, del Castillo I, Van Camp G, Smith RJ. (2004) GJB2: The spectrum of deafness-causing allele variants and their phenotype.  
*Hum Mut.*; 24: 305-311.
- Balogh K Jr, Hiraide F, Ishii D. (1970) Distribution of radioactive dihydrostreptomycin in the cochlea. An autoradiographic study.  
*Ann Otol Rhinol Laryngol.*,Jun; 79(3): 641-52.
- Bauer PW, Geers AE, Brenner C, Moog JS, Smith RJ. (2003) The effect of GJB2 allele variants on performance after cochlear implantation.  
*Laryngoscope.*; 113(12): 2135-40.
- Beahm DL, Hall JE. (2002) Hemichannel and junctional properties of Konnexin 50.  
*Biophys J.*, Apr ;82(4): 2016-31.
- Beltramello M, Bicego M, Piazza V, Ciubotaru CD, Mammano F, D'Andrea P. (2003) Permeability and gating properties of human Konnexins 26 and 30 expressed in HeLa cells.  
*Biochem Biophys Res Commun.*, Jun 13; 305(4): 1024-33.
- Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH. (1993) Konnexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease.  
*Science.*,Dec 24; 262(5142): 2039-42.
- Beyer EC, Kistler J, Paul DL, Goodenough DA. (1989) Antisera directed against Konnexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues.  
*J Cell Biol.*, Feb; 108(2): 595-605.
- Biesalski HK. (1984) Retinol and retinyl ester in separated structures of the guinea pig inner ear.  
*Int J Vitam Nutr Res.*; 54(2-3): 113-8.
- Bitner-Glindzicz M. (2002) Hereditary deafness and phenotyping in humans.  
*Br Med Bull.*; 63: 73-94.
- Blodow A, Ngezahayo A, Ernst A, Kolb HA. (2003) Calmodulin antagonists suppress gap junction coupling in isolated Hensen cells of the guinea pig

---

cochlea.

Pflugers Arch., Apr; 446(1): 36-41.

Bodmer D, Brors D, Bodmer M. (2004) Early gene expression in the organ of corti exposed to gentamicin.

# 528, 27th Midwintermeeting, Association for Research in Otolaryngology, 2004, Daytona Beach, Florida, USA.

Boettger T, Hubner CA, Maier H, Rust MB, Beck FX, Jentsch TJ. (2002) Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4.

Nature., Apr 25; 416(6883): 874-8.

Bolz H, Schade G, Ehmer S, Kothe C, Hess M, Gal A. (2004) Phenotypic variability of non syndromic hearing loss in patients heterozygous for both c.35delG of GJB 2 and the 342-kb deletion involving GJB6.

Hear Res.; 188: 42-46.

Bruzzone R, Veronesi V, Gomes D, Bicego M, Duval N, Marlin S, Petit C, D'Andrea P, White TW.(2003) Loss-of-function and residual channel activity of Connexin26 mutations associated with non-syndromic deafness.

FEBS Lett., Jan 2; 533(1-3): 79-88.

Burlando B, Viarengo A, Pertica M, Ponzano E, Orunesu M. (1997) Effects of free oxygen radicals on Ca<sup>2+</sup> release mechanisms in the sarcoplasmic reticulum of scallop (*Pecten jacobaeus*) adductor muscle.

Cell Calcium., Aug; 22(2): 83-90.

Cao W, Carney JM, Duchon A, Floyd RA, Chevion M. (1988) Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain.

Neurosci Lett., May 26; 88(2): 233-8.

Carlisle L, Steel K, Forge A. (1990) Endocochlear potential generation is associated with intercellular communication in the stria vascularis: structural analysis in the viable dominant spotting mouse mutant.

Cell Tissue Res., Nov; 262(2): 329-37.

Carrasquillo MM, Zlotogora J, Barges S, Chakravarti A. (1997) Two different Connexin 26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness: implications for genetic studies in isolated populations.

Hum Mol Genet., Nov; 6(12): 2163-72.

Caspar DL, Goodenough DA, Makowski L, Phillips WC. (1977) Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction.

J Cell Biol., Aug; 74(2): 605-28.

Chiba T, Kikuchi T, Yoshida R, Kobayashi T. (2004) Expression of Kir 4.1 potassium channels in the outer sulcus cells in the guinea pig cochlea.

# 988, 27<sup>th</sup> Midwintermeeting, Association for Research in Otolaryngology, 21-26 Feb.2004, Daytona Beach, Florida, USA.

- 
- Clerici WJ, DiMartino DL, Prasad MR. (1995) Direct effects of reactive oxygen species on cochlear outer hair cell shape in vitro. *Hear Res.*, Apr; 84(1-2): 30-40.
- Clerici WJ, Hensley K, DiMartino DL, Butterfield DA. (1996) Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res.*, Sep 1; 98(1-2): 116-24.
- Clerici WJ, Yang L. (1996) Direct effects of intraperilymphatic reactive oxygen species generation on cochlear function. *Hear Res.*, Nov 1; 101(1-2): 14-22.
- Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini I, Eybalin M, Wu T, Marcus DC, Wangemann P, Willecke K, Petit C. (2002) Targeted ablation of Connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr Biol.*, Jul 9; 12(13): 1106-11.
- Canlon BJ, Smith DW. (1998) Supplemental iron exacerbates aminoglycoside ototoxicity in vivo. *Hear Res.*, Jan; 115(1-2): 1-5.
- Contreras JE, Saez JC, Bukauskas FF, Bennett MV. (2003) Gating and regulation of Connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Sep 30; 100(20): 11388-93.
- Connell SS, Angeli SI, Suarez H, Hodges AV, Balkany TJ, Liu XZ. (2007) Performance after cochlear implantation in DFNB1 patients. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, Oct;137(4):596-602.
- Crann SA, Huang MY, McLaren JD, Schacht J. (1992) Formation of a toxic metabolite from gentamicin by a hepatic cytosolic fraction. *Biochem Pharmacol.*, Apr 15; 43(8): 1835-9.
- Cryns K, Orzan E, Murgia A, Huygen PL, Moreno F, del Castillo I, Chamberlin GP, Azaiez H, Prasad S, Cucci RA, Leonardi E, Snoeckx RL, Govaerts PJ, Van de Heyning PH, Van de Heyning CM, Smith RJ, Van Camp G. (2003) A genotype-phenotype correlation for GJB2 (Cx26) deafness. *J Med Gen.*; 41: 147-154.
- Dahl E, Manthey D, Chen Y, Schwarz HJ, Chang YS, Lalley PA, Nicholson BJ, Willecke K. (1996) Molecular cloning and functional expression of mouse Connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *J Biol Chem.*, Jul 26; 271(30): 17903-10.
- de Brouwer AP, Pennings RJ, Roeters M, Van Hauwe P, Astuto LM, Hoefsloot LH, Huygen PL, van den Helm B, Deutman AF, M Bork J, Kimberling WJ, Cremers FP, Cremers CW, Kremer H. (2003) Mutations in the calcium-binding

---

motifs of CDH23 and the 35delG mutation in GJB2 cause hearing loss in one family.

Hum Genet., Feb; 112(2): 156-63.

de Groot JC, Meeuwse F, Ruizendaal WE, Veldman JE. (1990) Ultrastructural localization of gentamicin in the cochlea.

Hear Res., Dec; 50(1-2): 35-42.

Dehne N, Lautermann J, ten Cate WJ, Rauen U, de Groot H. (2000) In vitro effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the cochlear neurosensory epithelium of the guinea pig.

Hear Res., May; 143(1-2): 162-70.

Dehne N, Lautermann J, Petrat F, Rauen U, de Groot H. (2001) Cisplatin ototoxicity: involvement of iron and enhanced formation of superoxide anion radicals.

Toxicol Appl Pharmacol., Jul 1; 174(1): 27-34.

del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, del Castillo FJ, Alvarez A, Tellería D, Menéndez I, Moreno F. (2002) A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment.

N Engl J Med., 24; 346(4): 243-9.

del Castillo FJ, Rodríguez-Ballesteros M, Alvarez A, Hutchin T, Leonardi E, de Oliveira CA, Azaiez H, Brownstein Z, Avenarius MR, Marlin S, Pandya A, Shahin H, Siemering KR, Weil D, Wuyts W, Aguirre LA, Martín Y, Moreno-Pelayo MA, Villamar M, Avraham KB, Dahl HH, Kanaan M, Nance WE, Petit C, Smith RJ, Van Camp G, Sartorato EL, Murgia A, Moreno F, del Castillo I. (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: 588-594.

Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl HH, Middleton A, Houseman MJ, Dode C, Marlin S, Boulila-ElGaied A, Grati M, Ayadi H, BenArab S, Bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M, Loiselet J, El-Zir E, Aubois A, Joannard A, Petit C. (1997) Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the Connexin 26 gene.

Hum Mol Genet., Nov; 6(12): 2173-7.

Doherty JK, Linthicum FH. (2004) Spiral ligament and stria vascularis changes in cochlear otosclerosis: effect on hearing levels.

Otol Neurotol.; 25: 457- 464.

Donaldson PJ, Dong Y, Roos M, Green C, Goodenough DA, Kistler J. (1995) Changes in lens Connexin expression lead to increased gap junctional voltage dependence and conductance.

Am J Physiol., Sep; 269(3 Pt 1): C590-600.

---

Donahue HJ, McLeod KJ, Rubin CT, Andersen J, Grine EA, Hertzberg EL, Brink PR. (1995) Cell to cell communication in osteoblastic networks: cell line dependent hormonal regulation of gap junction function. *J Bone Miner Res.*; 10: 881-889.

Donahue HJ, Li Z, Zhou Z, Yellowley CE. (2000) Differentiation of human fetal osteoblastic cells and gap junctional intercellular communication. *Am J Physiol Cell Physiol.*; 278(2): C315-22.

Dulon D, Zajic G, Aran JM, Schacht J. (1989) Aminoglycoside antibiotics impair calcium entry but not viability and motility in isolated cochlear outer hair cells. *J Neurosci Res.*, Oct;24(2): 338-46.

Dulon D, Hiel H, Arousseau C, Erre JP, Aran JM. (1993) Pharmacokinetics of gentamicin in the sensory hair cells of the organ of Corti: rapid uptake and long term persistence. *C R Acad Sci III.*, Jul; 316(7): 682-7.

Engel-Yeger B, Zaaroura S, Zlotogora J, Shalev S, Hujeirat Y, Carrasquillo M, Barges S, Pratt H. (2002) The effects of connexin 26 mutation-35delG- on oto-acoustic emissions and brainstem evoked potentials :homozygotes and carriers.

Ernst A, Reuter G, Zimmermann U, Zenner HP. (1994). Acute aminoglycoside ototoxicity in cochlear outer hair cells. *Brain Res.*; 636: 153-156

Evans WH, Martin PE. (2002) Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol.*, Apr-Jun; 19(2): 121-36.

Favero TG, Zable AC, Abramson JJ. (1995) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulates the Ca<sup>2+</sup> release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* ,Oct 27; 270(43): 25557-63. *Hear Res.*; 163: 93-100.

Feldmann D, Denoyelle F, Loundon N, Weil D, Garabedian EN, Couderc R, Joannard A, Schmerber S, Delobel B, Leman J, Journal H, Catros H, Ferrec C, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Moati L, Petit C, Marlin S. (2004) Clinical evidence of the non-pathogenic nature of M34T variant in the connexin 26 gene. *Eur J Hum Gen.*; 12: 279-284.

Feldmann D, Denoyelle F, Chauvin P, Garabédian EN, Couderc R, Odent S, Joannard A, Schmerber S, Delobel B, Leman J, Journal H, Catros H, Le Maréchal C, Dollfus H, Eliot MM, Delaunoy JP, David A, Calais C, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Bouccara D, Sterkers O, Huy PT, Goizet C, Duriez F, Fellmann F, Hélias J, Vigneron J, Montaut B, Lewin P, Petit C, Marlin S. (2004) Large deletions of GJB6 gene in deaf patients heterozygous for the GJB2 gene mutation: genotypic and phenotypic analysis. *Am J Med Gen.*; 127A: 263-7.

---

Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Bu X, Oztas S. (1993) Mitochondrial ribosomal RNA gene mutation in a patient with sporadic aminoglycoside ototoxicity.

Am J Otolaryngol., Nov-Dec; 14(6): 399-403.

Forge A. (1984) Gap junctions in the stria vascularis and effects of ethacrynic acid.

Hear Res., Feb; 13(2): 189-200.

Forge A, Fradis M. (1985) Structural abnormalities in the stria vascularis following chronic gentamicin treatment.

Hear Res.; 20(3): 233-44.

Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Evans WH, Lench N, Souter M. (1999) Gap junctions and Connexin expression in the inner ear.

Novartis Found Symp.; 219: 134-50; discussion 151-6.

Forge A, Schacht J. (2000) Aminoglycoside antibiotics.

Audiol Neurootol. Jan-Feb; 5(1): 3-22.

Forge A, Becker D, Casalotti S, Edwards J, Marziano N, Nevill G. (2003) Gap junctions in the inner ear: comparison of distribution patterns in different vertebrates and assesment of Connexin composition in mammals.

J Comp Neurol., Dec 8; 467(2): 207-31.

Franzé A, Caravelli A, Di Leva F, Marciano E, Auletta G, D'Aulos F, Saulino C, Esposito L, Carella M, Gasparini P. (2005) Audiometric evaluation of carriers of the connexin 26 mutation 35 del G.

Europ Arch Oto Rhino.; 262(11): 921-4.

Garetz SL, Altschuler RA, Schacht J. (1994) Attenuation of gentamicin ototoxicity by glutathione in the guinea pig in vivo.

Hear Res., Jun 15; 77(1-2): 81-7.

Garetz SL, Rhee DJ, Schacht J. (1994) Sulfhydryl compounds and antioxidants inhibit cytotoxicity to outer hair cells of a gentamicin metabolite in vitro.

Hear Res., Jun 15; 77(1-2): 75-80.

Gasparini P, Rabionet R, Barbujani G, Melchionda S, Petersen M, Brøndum-Nielsen K, Metspalu A, Oitmaa E, Pisano M, Fortina P, Zelante L, Estivill X. (2000) High carrier frequency of the 35 del G deafness mutation in European populations.

Eur J Hum Mut Gen.; 8: 19-23.

Gee J, Tanaka M, Grossman HB. (2003) Connexin 26 is abnormally expressed in bladder cancer.

J Urol., Mar;169(3):1135-7.

---

Gitter AH, Fromter E, Zenner HP. (1992) C-type potassium channels in the lateral cell membrane of guinea pig hair cells.  
Her Res.; 60(1): 13-19.

Goodenough DA, Gilula NB. (1974) The splitting of hepatocyte gap junctions and zonulae occludentes with hypertonic disaccharides.  
J Cell Biol., Jun; 61(3): 575-90.

Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. (1996) Konnexins, Konnexons, and intercellular communication.  
Annu Rev Biochem.; 65: 475-502.

Gopalarao D, Kimberling WJ, Jesteadt W, Kelley PM, Beauchaine KL, Cohn ES. (2008) Is hearing loss due to mutations in the connexin 26 gene progressive ?  
Int J Audiol., Jan; 47(1):11-20.

Gotz ME, Kunig G, Riederer P, Youdim MB. (1994) Oxidative stress: free radical production in neural degeneration.  
Pharmacol Ther.; 63(1): 37-122.

Gourdie RG, Green CR, Severs NJ, Anderson RH, Thompson RP. (1993) Evidence for a distinct gap-junctional phenotype in ventricular conduction tissues of the developing and mature avian heart.  
Circ Res., Feb; 72(2): 278-89.

Grifa A, Wagner CA, D'Ambrosio L, Melchionda S, Bernardi F, Lopez-Bigas N, Rabionet R, Arbones M, Monica MD, Estivill X, Zelante L, Lang F, Gasparini P.(1999) Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus.  
Nat Genet., Sep; 23(1):16-8.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties.  
J Biol Chem., Mar 25; 260(6): 3440-50.

Gualandi F, Martini A, Calzolari E. (2003) Progress in understanding GJB2-linked deafness.  
Community Genet.; 6: 125-132.

Gutteridge JM. (1994) Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration.  
Ann N Y Acad Sci., Nov 17; 738: 201-13.

Hall ED, Braugher JM. (1993) Free radicals in CNS injury.  
Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.; 71: 81-105.

Halliwell B. (1992) Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction?  
Ann Neurol.; 32 Suppl: S10-5.



- 
- Hama K. (1980) Fine structure of the afferent synapse and gap junctions on the sensory hair cell in the saccular macula of goldfish: a freeze-fracture study. *J Neurocytol.*, Dec; 9(6): 845-60.
- Hayashida T, Nomura Y, Iwamori M, Nagai Y, Kurata T. (1985) Distribution of gentamicin by immunofluorescence in the guinea pig inner ear. *Arch Otorhinolaryngol.*; 242(3): 257-64.
- Hernandez-Cruz A, Escobar AL, Jimenez N. (1997) Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release phenomena in mammalian sympathetic neurons are critically dependent on the rate of rise of trigger Ca<sup>2+</sup>. *J Gen Physiol.*, Feb; 109(2): 147-67.
- Hiel H, Erre JP, Aurousseau C, Bouali R, Dulon D, Aran JM. (1993) Gentamicin uptake by cochlear hair cells precedes hearing impairment during chronic treatment. *Audiology.*; 32(1): 78-87.
- Hirose K, Hockenbery DM, Rubel EW. (1997) Reactive oxygen species in chick hair cells after gentamicin exposure in vitro. *Hear Res.*, Feb; 104(1-2): 1-14.
- Hibino H, Horio Y, Inanobe A, Doi K, Ito M, Yamada M, Gotow T, Kawamura M, Kubo T, Kurachi Y. (1997) An ATP- dependent inwardly rectifying potassium channel, KAP (Kir4.1), in cochlear stria vascularis of inner ear: its specific subcellular localization and correlation with formation of the endocochlear potential. *J Neurosci.*; 17(12): 4711-4721.
- Hoh JH, Sosinsky GE, Revel JP, Hansma PK. (1993) Structure of the extracellular surface of the gap junction by atomic force microscopy. *Biophys J.*, Jul; 65(1): 149-63.
- Horner KC, Aurousseau C. (1997) Immunoreactivity for taurine in the cochlea: its abundance in supporting cells. *Hear Res.* Jul; 109(1-2): 135-42.
- Hu BH, Zheng XY, McFadden SL, Kopke RD, Henderson D. (1997) R-phenylisopropyladenosine attenuates noise-induced hearing loss in the chinchilla. *Hear Res.*, Nov; 113(1-2): 198-206.
- Huang MY, Schacht J. (1990) Formation of a cytotoxic metabolite from gentamicin by liver. *Biochem. Pharmacol.*, 1;40(11): R11-4.
- Iurato S, Franke K, Luciano L, Wermbter G, Pannese E, Reale E. (1976) Intercellular junctions in the organ of Corti as revealed by freeze fracturing. *Acta Otolaryngol.*, Jul-Aug; 82(1-2): 57-69.

---

Iurato S, Franke KD, Luciano L, Wermbter G, Pannese F, Reale E. (1977) The junctional complexes among the cells of the organ of Corti as revealed by freeze-fracturing.

Adv Otorhinolaryngol.; 22: 76-80.

Jahnke K.(1975) The fine structure of freeze-fractured intercellular junctions in the guinea pig inner ear.

Acta Otolaryngol Suppl.; 336: 1-40.

Johnstone BM, Patuzzi R, Syka J, Sykova E. (1989) Stimulus-related potassium changes in the organ of Corti of guinea-pig.

J Physiol.; 408: 77-92.

Junker R. (2000) Elektrophysiologische Charakterisierung einer nicht sensorischen Zellpopulation (Hensenzellen) des Cortischen Organs mit Hilfe der doppelten Saugpipettentchnik,

Dissertation, FU Berlin.

Kannan MS, Prakash YS, Brenner T, Mickelson JR, Sieck GC. (1997) Role of ryanodine receptor channels in Ca<sup>2+</sup> oscillations of porcine tracheal smooth muscle.

Am J Physiol., Apr; 272(4 Pt 1): L659-64.

Kanno Y, Loewenstein WR. (1964) Low resistance coupling between gland cells. Some observations on intercellular contact membranes and intercellular space.

Nature., Jan 11; 201: 194-5.

Kanno Y, Loewenstein WR. (1964) Intercellular diffusion

Science., Feb 28;143: 959-60.

Kanno Y, Loewenstein WR. (1966) Cell-to-cell passage of large molecules.

Nature., Nov.5; 212(62): 629-30.

Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G, Mueller RF, Leigh IM. (1997) Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness.

Nature., May 1; 387(6628): 80-3.

Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Adams JC. (1995) Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis.

Anat Embryol (Berl)., Feb; 191(2): 101-18.

Kikuchi T, Adams JC, Miyabe Y, So E, Kobayashi T. (2000) Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness.

Med Electron Microsc., 33(2): 51-6.

- 
- Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A, Kruger O, Traub O, Willecke K. (1998) Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in Konnexin40-deficient mice. *Curr Biol.*, Feb 26; 8(5): 299-302.
- Kolb HA, Somogyi R. (1991) Biochemical and biophysical analysis of cell-to-cell channels and regulation of gap junctional permeability. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*; 118: 1-47.
- Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D, Garcia P, Steinman H, Malgrange B, Ruben RJ, Rybak L, Van de Water TR. (1997) Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol.*, Sep; 18(5): 559-71.
- Kroese AB, van den Bercken J. (1982) Effects of ototoxic antibiotics on sensory hair cell functioning. *Hear Res.*, Feb; 6(2): 183-97.
- Kroese AB, Das A, Hudspeth AJ. (1989) Blockage of the transduction channels of hair cells in the bullfrog's sacculus by aminoglycoside antibiotics. *Hear Res.*, Feb; 37(3): 203-17.
- Kudo T, Kure S, Ikeda K, Xia AP, Katori Y, Suzuki M, Kojima K, Ichinohe A, Suzuki Y, Aoki Y, Kobayashi T, Matsubara Y. (2003) Transgenic expression of a dominant-negative Konnexin26 causes degeneration of the organ of Corti and non-syndromic deafness. *Hum Mol Genet.*, May 1; 12(9): 995-1004.
- Kunstmann E, Hildmann A, Lautermann J, Aletsee C, Epplen JT, Sudhoff H. (2005) Kongenitale Schwerhörigkeit. *HNO.*; 53: 773-778.
- Kupka S, Braun S, Aberle S, Haack B, Ebauer M, Zeissler U, Zenner HP, Blin N, Pfister M. (2002) Frequencies of GJB2 mutations in german control individuals and patients showing sporadic non- syndromic hearing impairment. *Hum Mut.*; 20(1): 77-8. Kikuchi T, Adams JC, Paul DL, Kimura RS. (1994) Gap junction systems in the rat vestibular labyrinth: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Acta Otolaryngol.*, Sep; 114(5): 520-8.
- Lautermann J, ten Cate WJ, Altenhoff P, Grummer R, Traub O, Frank H, Jahnke K, Winterhager E. (1998) Expression of the gap-junction Konnexins 26 and 30 in the rat cochlea. *Cell Tissue Res.*, Dec; 294(3): 415-20.
- Lagostena L, Cicuttin A, Inda J, Kachar B, Mammano F. (2001) Frequency dependence of electrical coupling in Deiters' cells of the guinea pig cochlea. *Cell Commun Adhes.*; 8(4-6): 393-9.

---

Laird DW.(2008) Closing the gap on autosomal dominant connexin-26 and connexin-43 mutants linked to human disease.  
J Biol Chem.;283(6):2997-3001.

Lerer I, Sagi M, Ben-Neriah Z, Wang T, Levi H, Abeliovich D. (2001) A deletion mutation in GJB6 cooperating with a GJB2 mutation in trans in non-syndromic deafness: a novel founder mutation in ashkenazi jews.  
Hum Mut.; 458: 1-10.

Löffler J, Nekahm D, Hirst-Stadlmann A, Günther B, Menzel HJ, Utermann G, Janecke AR. (2001) Sensorineural hearing loss and the incidence of Cx26 mutations in Austria.  
Eur J Hum Genet.; 9(3): 226-30.

Loewenstein WR, Socolar SJ, Higashino S, Kanno Y, Davidson N. (1965) Intercellular communication: Renal, urinary bladder, sensory and salivatory gland cells.  
Science,; 16: 295-298.

Loewenstein WR, Kanno Y. (1966) Intercellular communication and control of tissue growth: lack of communication between cancer cells.  
Nature., Mar. 19; 209(29): 1248-9.

Liang G, Jin z, Ulfendahl M, Järlebark LE. (2004) Identification, expression and localization of K-channel subtypes KCNQ2 and 3 in the mammalian cochlea.  
#695, 27<sup>th</sup> Midwintermeeting, Association for Research in Otolaryngology, 21-26 Feb.2004, Daytona Beach, Florida, USA.

Lim DJ. (1986) Effects of noise and ototoxic drugs at the cellular level in the cochlea: a review.  
Am J Otolaryngol., Mar-Apr; 7(2): 73-99.

Liu S, Taffet S, Stoner L, Delmar M, Vallano ML, Jalife J. (1993) A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxyl tail length.  
Biophys J., May; 64(5): 1422-33.

Liu XZ, Xia XJ, Adams J, Chen ZY, Welch KO, Tekin M, Ouyang XM, Kristiansen A, Pandya A, Balkany T, Arnos KS, Nance WE. (2001) Mutations in GJA1 (Konnexin 43) are associated with non-syndromic autosomal recessive deafness.  
Hum Mol Genet., Dec 1; 10(25): 2945-51.

Lopez-Gonzalez MA, Lucas M, Delgado F, Diaz P. (1998) The production of free oxygen radicals and nitric oxide in the rat cochlea.  
Neurochem Int., Jul; 33(1): 55-9.

---

Lustig LR, Lin D, Venick H, Larky J, Yeagle J, Chinnici J, Polite C, Mhatre AN, Niparko JK, Lalwani AK. (2004) GJB2 gene mutations in cochlear implant recipients: prevalence and impact on outcome.  
Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 130(5):541-6.

Loewenstein WR, Kanno Y. (1964) studies on an epithelial(gland) cell junction. I Modification of surface membrane permeability  
J Cell Biol., Sep; 22: 565-86.

Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA. (1977) Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data.  
J Cell Biol., Aug; 74(2): 629-45.

Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA. (1984) Gap junction structures. V. Structural chemistry inferred from X-ray diffraction measurements on sucrose accessibility and trypsin susceptibility.  
J Mol Biol., Apr 15; 174(3): 449-81.

Mambetisaeva ET, Gire V, Evans H. (1999) Multiple connexin expression in peripheral nerve, schwann cells and schwannoma cells.  
J Neuroscience Res. ; 57: 166-175.

Marlin S, Garabédian EN, Roger G, Moatti L, Matha N, Lewin P, Petit C, Denoyelle F. (2001) Connexin26 gene mutation in congenitally deaf children.  
Arch Oto Head Neck.; 127: 927-933.

Manthey D, Banach K, Desplantez T, Lee CG, Kozak CA, Traub O, Weingart R, Willecke K. (2001) Intracellular domains of mouse Konnexin26 and -30 affect diffusional and electrical properties of gap junction channels.  
J Membr Biol., May 15; 181(2): 137-48.

Martin PE, Coleman SL, Casalotti SO, Forge A, Evans WH. (1999) Properties of Konnexin26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness.  
Hum Mol Genet., Dec; 8(13): 2369-76.

Matsuyama W, Nakagawa M, Moritoyo T, Takashima H, Umehara F, Hirata K, Suehara M, Osame M. (2001) Phenotypes of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease and altered trafficking of mutant Konnexin 32 (GJB1).  
J Hum Genet., 46(6): 307-13.

Manthey D, Willecke K. (2001) Transfection and expression of exogenous Konnexins in mammalian cells.  
Methods Mol Biol.;154:187-99.

Menger DJ, Tange RA. (2003) The aetiology of otosclerosis: a review of the literature.  
Clin Otol.; 28: 112-120.

---

McDowell B, Davies S, Forge A. (1989) The effect of gentamicin-induced hair cell loss on the tight junctions of the reticular lamina. *Hear Res.*, Jul; 40(3): 221-32.

McGuirt JP, Schulte BA. (1994) Distribution of immunoreactive alpha- and beta-subunit isoforms of Na,K-ATPase in the gerbil inner ear. *J Histochem Cytochem.*, Jul; 42(7): 843-53.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.*; 16: 1215.

Moffat DA. (1979) Transtympanic electrocochleography in menieres disease : variation in the amplitude of the summationg potential related to clinical status. *Brit J Audiol.*; 13: 149- 152.

Moffat DA, Gibson WP, Ramsden RT, Morrison AW, Booth JB. (1978) Transtympanic electrocochleography during glycerol dehydration. *Acto Otol (Stockh).*; 85: 158- 166.

Momiyama M, Omori Y, Ishizaki Y, Nishikawa Y, Tokairin T, Ogawa J, Enomoto K. (2003) Konnexin26-mediated gap junctional communication reverses the malignant phenotype of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Sci.*, Jun; 94(6): 501-7.

Mueller S, Riedel HD, Stremmel W. (1996) Determination of catalase activity at physiological H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations. *Anal Biochem.*; 245: 55-60.

Mulroy MJ, Dempewolf SA, Curtis S, Iida HC. (1993) Gap junctional connections between hair cells, supporting cells and nerves in a vestibular organ. *Hear Res.*, Dec; 71(1-2): 98-105.

Murgia A, Orzan E, Polli R, Martella M, Vinanzi C, Leonardi E, Arslan E, Zacchello F. (1999) Cx26 deafness: mutation analysis and clinical variability. *J Med Genet.*; 36: 829- 832.

Nadol JB Jr, Mulroy MJ, Goodenough DA, Weiss TF. (1976) Tight and gap junctions in a vertebrate inner ear. *Am J Anat.*, Nov; 147(3): 281-301.

Nagaoka T, Oyamada M, Okajima S, Takamatsu T. (1999) Differential expression of gap junction proteins Cx 26, 32 and 43 in normal and crush-injured rat sciatic nerves: and occludin in the perineurium. *J Hist Cytochem.* ; 47: 937-948.

- 
- Nakahara H, Kanno T, Inai Y, Utsumi K, Hiramatsu M, Mori A, Packer L. (1998) Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM).  
Free Rad Biol Med.; 24: 85-92.
- Neyton J, Trautmann A. (1985) Single-channel currents of an intercellular junction.  
Nature., Sep 26-Oct 2; 317(6035): 331-5.
- Neyton J, Trautmann A. (1986) Acetylcholine modulation of the conductance of intercellular junctions between rat lacrimal cells.  
J Physiol., Aug; 377: 283-95.
- Nishida M, Futami S, Morita I, Maekawa K, Murota SI. (2000) Hypoxia-reoxygenation inhibits gap junctional communication in cultured human umbilical vein endothelial cells.  
Endothelium.; 7(4): 279-86.
- Ngezahayo A, Kolb HA. (1993) Gap junctional conductance tunes phase difference of cholecystokinin evoked calcium oscillations in pairs of pancreatic acinar cells.  
Pflugers Arch., Jan; 422(4): 413-5.
- Ngezahayo A, Zeilinger C, Todt I I, Marten I I, Kolb H. (1998) Inactivation of expressed and conducting rCx46 hemichannels by phosphorylation  
Pflugers Arch., Sep; 436(4): 627-9.
- Nie L, Feng W, Diaz RC, Doyle KJ, Gratton MA, Vazquez AE, Ebenezer NY. (2004) Molecular cloning and functional identification of Merg 1A Potassium channel in mouse cochlea.  
#697, 27<sup>th</sup> Midwintermeeting, Association for Research in Otolaryngology, 21-26 Feb.2004, Daytona Beach, Florida, USA.
- Oshima A, Tani K, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y, Sosinsky GE. (2007) Three-dimensional structure of a human connexin26 gap junction channel reveals a plug in the vestibule.  
Proc Natl Acad Sci U S A., Jun 12;104(24): 10034-9.
- Pallares-Ruiz N, Blanchet P, Mondain M, Claustres M, Roux AF. (2002) A large deletion including most of GJB6 in recessive non syndromic deafness: a digenic effect?  
Eur J Hum Genet.; 10(1): 72-6
- Pandya A, Arnos KS, Xia XJ, Welch KO, Blanton SH, Friedman TB, Garcia Sanchez G, Liu MD XZ, Morell R, Nance WE. (2003) Frequency and distribution of GJB 2 and GJB 6 mutations in a large north american repository of deaf probands.  
Gen in Med.; 5(4): 295-303.

---

Pollak A, Skorka A, Mueller-Malesinska M, Kostrzewa G, Kisiel B, Waligora J, Krajewski P, Oldak M, Korniszewski L, Skarzynski H, Ploski R.(2007) M34T and V37I mutations in GJB2 associated hearing impairment: evidence for pathogenicity and reduced penetrance.  
Am J Med Genet A., Nov 1; 143 (21):2534-43.

Posukh O, Pallares-Ruiz N, Tadinova V, Osipova L, Claustres M, Roux AF. (2005) First molecular screening for deafness in the altai republic population.  
BMC Med Genet.; 24: 6-12.

Priuska EM, Schacht J.(1995) Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex.  
Biochem Pharmacol., Nov 27; 50(11): 1749-52.

Quirk WS, Shivapuja BG, Schwimmer CL, Seidman MD. (1994) Lipid ation inhibitor attenuates noise-induced temporary threshold shifts.  
Hear Res., Apr; 74(1-2): 217-20.

Rabionet R, Lopez-Bigas N, Arbones ML, Estivill X. (2002) Konnexin mutations in hearing loss, dermatological and neurological disorders.  
Trends Mol Med., May; 8(5): 205-12.

Ravi R, Somani SM, Rybak LP. (1995) Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system.  
Pharmacol Toxicol., Jun; 76(6): 386-94.

Ressot C, Bruzzone R. (2000) Connexin channels in schwann cells and the development of the X-linked form of Charcot- Marie- Tooth disease.  
Brain Res Rev. ; 32: 192-202.

Richardson GP, Russell IJ. (1991) Cochlear cultures as a model system for studying aminoglycoside induced ototoxicity.  
Hear Res., Jun; 53(2): 293-311.

Rubin JB, Verselis VK, Bennett MV, Bargiello TA. (1992) Molecular analysis of voltage dependence of heterotypic gap junctions formed by Konnexins 26 and 32.  
Biophys J., Apr; 62(1): 183-93; discussion 193-5.

Saez JC, Martinez AD, Branes MC, Gonzalez HE. (1998) Regulation of gap junctions by protein phosphorylation.  
Braz J Med Biol Res., May; 31(5): 593-600.

Santos-Sacchi J, Dallos P. (1983) Intercellular communication in the supporting cells of the organ of Corti.  
Hear Res., Mar; 9(3): 317-26.

Santos-Sacchi J. (1984) A re-evaluation of cell coupling in the organ of Corti.  
Hear Res., May; 14(2): 203-4.



- 
- Santos-Sacchi J. (1985) The effects of cytoplasmic acidification upon electrical coupling in the organ of Corti.  
Hear Res.; 19(3): 207-15.
- Santos-Sacchi J.(1986) The temperature dependence of electrical coupling in the organ of Corti.  
Hear Res.; 21(3): 205-11.
- Santos-Sacchi J. (1986) Dye coupling in the organ of Corti.  
Cell Tissue Res.; 245(3): 525-9.
- Sato Y, Santos-Sacchi J. (1994) Cell coupling in the supporting cells of Corti's organ: sensitivity to intracellular H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>.  
Hear Res., Oct; 80(1): 21-4.
- Sato Y, Handa T, Matsumura M, Orita Y. (1998) Gap junction change in supporting cells of the organ of Corti with ryanodine and caffeine.  
Acta Otolaryngol., Nov; 118(6): 821-5.
- Seidman MD, Quirk WS, Nuttall AL, Schweitzer VG. (1991) The protective effects of allopurinol and su dismutase-polyethylene glycol on ischemic and reperfusion-induced cochlear damage.  
Otolaryngol Head Neck Surg., Sep; 105(3): 457-63.
- Seidman MD, Shivapuja BG, Quirk WS. (1993) The protective effects of allopurinol and su dismutase on noise-induced cochlear damage.  
Otolaryngol Head Neck Surg., Dec; 109(6): 1052-6.
- Schulte BA, Steel KP. (1994) Expression of alpha and beta subunit isoforms of Na,K-ATPase in the mouse inner ear and changes with mutations at the Wv or Sld loci.  
Hear Res., Jul; 78(1): 65-76.
- Sha SH, Taylor R, Forge A, Schacht J. (2001) Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals.  
Hear Res., May; 155(1-2): 1-8.
- Shiels A, Mackay D, Ionides A, Berry V, Moore A, Bhattacharya S. (1998) A missense mutation in the human Konnexin50 gene (GJA8) underlies autosomal dominant "zonular pulverulent" cataract, on chromosome 1q.  
Am J Hum Genet., Mar; 62(3): 526-32.
- Siesjo BK, Agardh CD, Bengtsson F. (1989) Free radicals and brain damage.  
Cerebrovasc Brain Metab Rev., Fall; 1(3): 165-211.
- Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. (1997) Female infertility in mice lacking Konnexin 37.  
Nature., Feb 6; 385(6616): 525-9.

---

Simon AM, Goodenough DA, Paul DL. (1998) Mice lacking Connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block.

Curr Biol., Feb 26; 8(5): 295-8.

Sinnathuray AR, Toner JG, Clarke-Lytle J, Geddis A, Patterson CC, Hughes AE. (2004) Connexin 26 (GJB2) gene-related deafness and speech intelligibility after cochlear implantation.

Otol Neurotol.; 25(6): 935-42

Snoeckx RL, Huygen PL, Feldmann D, Marlin S, Denoyelle F, Waligora J, Mueller- Malienska M, Pollak A, Ploski R, Murgia A, Orzan E, Castorina P, Ambrosetti U, Nowakowska-Szyrwinska E, Bal J, Wisniewski W, Janecke AR, Nekahm- Heis D, Seeman P, Bendova O, Kenna MA, Frangulov A, Rehm HL, Tekin M, Incesulu A, Dahl HH, du Sart D, Jenkins L, Lucas D, Bittner-Glindzicz M, Avraham KB, Brownstein Z, del Castillo I, Moreno F, Blin N, Pfister M, Sziklai I, Toth T, Kelley PM, Cohn ES, van Maldergem L, Hilbert P, Roux AF, Mondain M, Hoefsloot LH, Cremers CW, Lopponen T, Lopponen H, Parving A, Gronskov K, schrijver I, Roberson J, Gualandi F, Martini A, Lina- Granade G, allares- Ruiz N, Correia C, Fialho G, Cryns K, Hilgert N, van de heyning P, Nishimura CJ, Smith RJ, van Camp G. (2005) GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study.

Am J Hum Genet., Dec; 77(6): 945-57.

Sohl G, Willecke K. (2003) An update on Connexin genes and their nomenclature in mouse and man.

Cell Commun Adhes., Jul-Dec; 10(4-6): 173-80.

Somogyi R, Zhao M, Stucki JW. (1992) Modulation of cytosolic-[Ca<sup>2+</sup>] oscillations in hepatocytes results from cross-talk among second messengers. The synergism between the alpha 1-adrenergic response, glucagon and cyclic AMP, and their antagonism by insulin and diacylglycerol manifest themselves in the control of the cytosolic-[Ca<sup>2+</sup>] oscillations.

Biochem J., Sep 15; 286 (Pt 3): 869-77.

Song BB, Schacht J. (1996) Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig in vivo.

Hear Res., May; 94(1-2): 87-93.

Song BB, Anderson DJ, Schacht J. (1997) Protection from gentamicin ototoxicity by iron chelators in guinea pig in vivo.

J Pharmacol Exp Ther., Jul; 282(1): 369-77.

Souter M, Forge A. (1998) Intercellular junctional maturation in the stria vascularis: possible association with onset and rise of endocochlear potential.

Hear Res., May; 119(1-2): 81-95.

Spicer SS, Schulte BA. (1994) Differences along the place- frequency map in the structure of supporting cells in the gerbil cochlea.

Hear Res.; 79(1-2): 161-177.

- 
- Spiess AC, Lang H, Schulte BA, Spicer SS, Schmiedt RA. (2002) Effects of gap junction uncoupling in the gerbil cochlea. *Laryngoscope.*, Sep; 112(9): 1635-41.
- Stojkovic T, Latour P, Vandenberghe A, Hurtevent JF, Vermersch P. (1999) Sensorineural deafness in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with *Konnexin 32* mutation (R142Q) *Neurology.*, Mar 23; 52(5): 1010-4.
- Suzuki T, Oyamada M, Takamatsu T. (2001) Different regulation of *Konnexin26* and *ZO-1* in cochleas of developing rats and of guinea pigs with endolymphatic hydrops. *J Histochem Cytochem.*, May; 49(5): 573-86.
- Swenson KI, Jordan JR, Beyer EC, Paul DL. (1989) Formation of gap junctions by expression of *Konnexins* in *Xenopus* oocyte pairs. *Cell.*, Apr 7; 57(1): 145-55.
- Sun AH, Li JY, Xiao SZ, Li ZJ, Wang TY. (1990) Changes in the cochlear iron enzymes and adenosine triphosphatase in experimental iron deficiency. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*; 99: 988-992.
- Sun JJ, Ahmad, Peng BG, Lin X. (2004) Heteromerically assembled gap junctions comprised of *Cx26* and *30* are the major type of GJ in the cochlea and show larger Ca permeability than their homomerically-assembled counterparts. #763, 27<sup>th</sup> Midwintermeeting, Association for Research in Otolaryngology, Daytona Beach, Florida, USA.
- Takayama M, Yamane H, Konishi K, Iguchi H, Shibata S, Sunami K, Nakai Y, Nakagawa T. (1997) Induction of free radicals in the cochlea by aminoglycoside antibiotics. *Acta Otolaryngol Suppl.*; 528: 19-24.
- Tanaka M, Grossman HB. (2004) *Konnexin 26* induces growth suppression, apoptosis and increased efficacy of doxorubicin in prostate cancer cells. *Oncol Rep.*, Feb; 11(2): 537-41.
- Teubner B, Michel V, Pesch J, Lautermann J, Cohen-Salmon M, Sohl G, Jahnke K, Winterhager E, Herberhold C, Hardelin JP, Petit C, Willecke K. (2003) *Konnexin30* (*Gjb6*)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum Mol Genet.*, Jan 1; 12(1): 13-21.
- The Connexin deafness homepage (<http://www.crg.es/deafness/>).
- Todt I, Ngezahayo A, Ernst A, Kolb HA. (1999) Inhibition of gap junctional coupling in cochlear supporting cells by gentamicin. *Pflugers Arch.*, Nov; 438(6): 865-7.

---

Todt I, Ngezahayo A, Kolb HA, Ernst A. (1999) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreases gap junctional conductance in cochlear supporting cells.  
#12, 22<sup>nd</sup> Midwintermeeting, Association for Research in Otolaryngology, 1999, St. Petersburg, Florida, USA.

Todt I, Ngezahayo A, Kolb HA, Ernst A. (2000) Gentamicin onto cochlear Hensen cells: Production of free radicals and inhibition of gap junctional coupling.  
#261, 23rd Midwintermeeting, Association for Research in Otolaryngology, 2000, St. Petersburg, Florida, USA.

Todt I, Ngezahayo A, Kolb HA, Ernst A (2001) Iron chelator deferoxamine suppresses the gentamicin induced gap junctional uncoupling of Hensencells.  
#12, 24th Midwintermeeting, Association for Research in Otolaryngology, 2001, St. Petersburg, Florida, USA.

Todt I, Ngezahayo A, Ernst A, Kolb HA. (2001) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibits gap junctional coupling and modulates intracellular free calcium in cochlear Hensen cells.  
J Membr Biol., May 15; 181(2): 107-14.

Tran Ban Huy P, Manuel C, Meulemans A, Sterkers O, Amiel C. (1981) Pharmacokinetics of gentamicin in perilymph and endolymph of the rat as determined by radioimmunoassay.  
J Infect. Des. ; 143: 476-486.

Tran Van Nhieu G, Clair C, Bruzzone R, Mesnil M, Sansonetti P, Combettes L. (2003) Connexine- dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of shigella in epithelial cells.  
Nature.; 5(8): 720-726.

Ubl J. (1992) Ionentransportsysteme in einer Nierenzelllinie (OK-Zellen) und deren Beteiligung an der Volumenregulation.  
Dissertation , Universität Konstanz.

Ueda N, Guidet B, Shah SV. (1993) Gentamicin-induced mobilization of iron from renal cortical mitochondria.  
Am J Physiol., Sep; 265(3 Pt 2): F435-9.

Unwin PN, Zampighi G. (1980) Structure of the junction between communicating cells.  
Nature., Feb 7; 283(5747): 545-9.

Unwin PN, Ennis PD. (1984) Two configurations of a channel-forming membrane protein.  
Nature., Feb 16-22; 307(5952): 609-13.

Upham BL, Kang KS, Cho HY, Trosko JE. (1997) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibits gap junctional intercellular communication in glutathione sufficient but not glutathione

---

deficient cells.

Carcinogenesis., Jan; 18(1): 37-42.

Usami S, Hjelle OP, Ottersen OP. (1996) Differential cellular distribution of glutathione--an endogenous antioxidant--in the guinea pig inner ear.

Brain Res., Dec 16; 743(1-2): 337-40.

Valiunas V, Manthey D, Vogel R, Willecke K, Weingart R. (1999) Biophysical properties of mouse Connexin30 gap junction channels studied in transfected human HeLa cells.

J Physiol., Sep 15; 519 Pt 3: 631-44.

van Geel M, van Steensel MA, Kuster W, Hennies HC, Happel R, Steijlen PM, König A. (2002) HID and KID syndromes are associated with the same Connexin 26 mutation.

Br J Dermatol.; 146(6): 938-42.

Verrecchia F, Duthe F, Duval S, Duchatelle I, Sarrouilhe D, Herve JC. (1999) ATP counteracts the rundown of gap junctional channels of rat ventricular myocytes by promoting protein phosphorylation.

J Physiol., Apr 15; 516 ( Pt 2): 447-59.

Vrensen GF, Graw J, De Wolf A. (1991) Nuclear breakdown during terminal differentiation of primary lens fibres in mice: a transmission electron microscopic study.

Exp Eye Res., Jun; 52(6): 647-59.

Waltzmann M, Spray D. (1995) Exogenous expression of Connexins for physiological characterization of channel properties: comparison of methods and results.

Intercellular communication through gap junctions, Vol.4 Progress in cell research. pp.9-17, Elsevier, Amsterdam, Netherlands

Wangemann P. (2002) K<sup>+</sup> cycling and the endocochlear potential.

Hear Res., Mar; 165(1-2): 1-9.

Welch KO, Marin RS, Pandya A, Arnos KS. (2007) Compound heterozygosity for dominant and recessive GJB2 mutations: effects on phenotype and review of the literature.

Am J Med Genet., Jul 15; 143(14): 1567-73.

White TW, Bruzzone R, Wolfram S, Paul DL, Goodenough DA. (1994) Selective interactions among the multiple Connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between Connexins.

J Cell Biol., May; 125(4): 879-92.

---

Williams SE, Zenner HP, Schacht J. (1987) Three molecular steps of aminoglycoside ototoxicity demonstrated in outer hair cells. *Hear Res.*; 30(1): 11-8.

Wiszniewski W, Sobieszczanska-Radoszewska L, Nowakowska-Szyrwinska E, Obersztyn E, Bal J. (2001) High frequency of GJB2 gene mutations in polish patients with prelingual non- syndromic deafness. *Genet Test.*; 5(2): 147-8.

Xia JH, Liu CY, Tang BS, Pan Q, Huang L, Dai HP, Zhang BR, Xie W, Hu DX, Zheng D, Shi XL, Wang DA, Xia K, Yu KP, Liao XD, Feng Y, Yang YF, Xiao JY, Xie DH, Huang JZ. (1998) Mutations in the gene encoding gap junction protein beta-3 associated with autosomal dominant hearing impairment. *Nat Genet.*, Dec; 20(4): 370-3.

Xu M, Fan Y, Gao Z, Chen J, Li J. (1995) Hearing loss and trace elements Fe<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in the perilymph. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.*, Sep-Oct; 57(5): 245-9.

Xue Zhong L, Pandya A, Angeli S, Telischi FF, Arnos KS, Nance WE, Balkany T. (2005) Audiological features of GJB2 (Connexin 26) deafness. *Ear Hearing.*; 26: 361-369.

Yamane H, Nakai Y, Takayama M, Iguchi H, Nakagawa T, Kojima A. (1995) Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*; 252(8): 504-8.

Yang CL, Du XH, Han YX. (1995) Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail.*; 17(1): 21-26.

Zenner HP, Keiner S, Zimmermann U. (1994) Specific glutathione-SH inhibition of toxic effects of metabolized gentamicin on isolated guinea pig hair cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*; 251(2): 84-90.

Zhao HB, Santos-Sacchi J. (1998) Effect of membrane tension on gap junctional conductance of supporting cells in Corti's organ. *J Gen Physiol.*, Oct; 112(4): 447-55.

Zhao HB, Santos-Sacchi J. (2000) Voltage gating of gap junctions in cochlear supporting cells: evidence for nonhomotypic channels. *J Membr Biol.*, May 1; 175(1): 17-24.

Zhao and Spray.(1998) Localization of Cx26, Cx 32 and Cx 43 in myelinating schwann cells of mouse sciatic nerve during postnatal development. *Gap junctions*. R.Werner (Ed.) IOS Press.

---

ID	mutation	clinical group	audiogram
IB	homozygous 35delG	cochlea-implant	profound, symmetric
FM	homo. 35delG	cochlea-implant	profound, symmetric
MM	homo. 35delG	bil.SNHL	not available
PM	homo. 35delG	bil.SNHL	not available
CJ	heterozygous M34T	sudden SNHL	moderate/ normal, low freq ascending, asymmetric
GJ	het. M34T	sudden SNHL	normal/ severe, flat, asymmetric
SB	het.V37I	bil.SNHL	moderate/ mild, flat, symmetric
KW	comp.het. W77R/35delG	cochlea-implant	profound, flat, symmetric
VT	het. 35 delG	otosclerosis	mild, slop, symmetric
MK	het V37I	otosclerosis	normal, flat, symmetric
AS	het. 167delT	bil.SNHL	normal, slop, symmetric
AN	het. 167del T	bil.SNHL	mild, slop, symmetric
HM	het. 35del G	otosclerosis	mild, slop, symmetric
JS	het V153I	sudden SNHL	mild, low freq asc, symmetric,
DS	het. V153I	bil.SNHL	mild/moderate, slop, symmetric
RS	het. V27I	bil.SNHL	mild, flat, symmetric
PK	het. P83L	sudden SNHL	normal/severe, slop, asymmetric
EH	het. 35del G	sudden SNHL	normal/ moderate, slop, asymmetric
AL	het. V153I	menieres disease	normal/moderate, low freq asc, asymmetric
MT	het. 313 del 14	bil.SNHL	moderate, flat, symmetric
AT	comp.hetero 35delG/313del14	bil. SNHL	moderate, slop, symmetric
JS	het. M34T	sudden SNHL	mild, flat, symmetric
KR	het. L90P	otosclerosis	mild/normal, flat, symmetric
EME	het. M34T	acoustic neuroma	normal/ mild, slop, asymmetric
KD	het. M34T	sudden SNHL	normal/ mild, flat, asymmetric
BB	het. M34T	acoustic neuroma	mild, flat, symmetric
IL	het. V37I	bil.SNHL	mild, flat, symmetric
TT	het. R127H	bil.SNHL	mild, slop, symmetric
BS	het.M34T	bil.SNHL	mild, slop, symmetric
AW	het V153I	bil.SNHL	mild, slop, symmetric

**Tab.1: Cx 26 Mutationen und deren Träger in der Studiengruppe.**

Tab. zeigt individualisiert Mutationen, klinische Subgruppen und Hörverlust. Patient IL hat eine zusätzliche Mutation (GJB6-D13S1830). Aufgrund der englischen Klassifizierung der Hörminderungen erfolgt die Darstellung in Englisch.



<b>ID</b>	<b>mutations</b>  all heterozygous	<b>clinical</b>  <b>diagnosis</b>	<b>audiogram</b>
PG	M34T	septal deviation	max. 25 dB
DK	M34T	cervical cyst	not available
HS	M34T	tonsillitis	max. 20 dB
MF	M34T	cholesteatoma	max. 20 dB
LN	35delG	nasal fracture	not available
ML	V37I	sinusitis	not available
PZ	F83L	septal deviation	not available
MH	M34T	tonsillitis	not available
WS	M34T	papillomatosis	not available
JM	35delG	marfan- syndrom	not available
JS	35delG	sinusitis	not available
FvP	V37I	toxoplasmosis	not available
RR	V37I	hypopharyngeal cancer	not available
AG	M34T	septal deviation	max 20 dB
KS	M34T	tonsillitis	not available
MS	M34T	tonsillitis	not available
SH	V37I	submandibulitis	not available
CD	E 119K	tonsillitis	not available
RCR	V153I	septal deviation	not available
EL	35delG	cervical trauma	not available
DS	35delG	tonsillitis	not available
PS	313 del14	face lift	not available
IK	313del14	cholesteatoma	max. 20 dB

**Tab.2: Cx 26 Mutationen und deren Träger in der Kontrollgruppe.**

Tab. zeigt individualisiert Mutationen, klinische Diagnose, welche zum stationären Aufenthalt führte und den Hörverlust soweit ermittelbar.

---

## *Danksagung*

Zuerst möchte ich meiner Frau, meiner Tochter und meinem Sohn für die Geduld, Rücksichtnahme und vielen entbehrten Stunden und Tage danken.

Ausdrücklich und herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Arne Ernst für die persönliche Unterstützung bedanken, ohne die mein bisheriger Werdegang und die Erstellung dieser Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Hans-Albert Kolb für die kritische Begleitung und die fruchtbaren Diskussionen bedanken, welche auch in schwierigen Situationen oftmals den rechten Pfad wiesen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Anaclet Ngezahayo bedanken, da ohne seine hervorragende Einarbeitung, Diskussion des Themas und der Methodiken eine Bewältigung der Thematik nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem möchte ich mich auch bei Dr. med. R. Junker und Dr. med. A. Blödown für die fruchtbare Weiterführung des experimentellen Projektes bedanken.

Des weiteren möchte ich mich bei den Patienten und ihren Angehörigen für die Teilnahme an der Studie bedanken. Weiterer Dank gilt Françoise André, Anette Peffekoven, Daniel Herbst und Tino Köhler für ihre technische Assistenz bei der molekulargenetischen Analyse.

---

## **Erklärung**

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charite

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 20.06.2007