

**Aus der neurologischen Klinik und Poliklinik und dem Deutschen  
Schwindel- und Gleichgewichtszentrum  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

**Der Einfluss von Polymorphismen in den  
spannungsabhängigen Kaliumkanalgenen KCNE1 und  
KCNE3 auf Morbus Menière**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Inga Ann-Cathrin Schmude

aus

Mannheim

2020

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. rer. biol. hum. Ina Giegling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Friedrich Ihler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hicel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2020

**Meiner Familie gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1 Morbus Menière .....	3
2.1.1 Epidemiologie.....	3
2.1.2 Symptomatik.....	4
2.1.3 Pathophysiologie .....	5
2.1.4 Die Rolle von Kalium im Innenohr .....	8
2.1.5 Diagnostik.....	9
2.1.6 Therapie .....	12
2.2 Genetik des Morbus Menière .....	14
2.2.1 Genetische Faktoren des Morbus Menière.....	14
2.2.2 Kopplungs- und Assoziationsstudien.....	15
2.2.3 Die KCNE-Gen-Familie .....	18
2.2.3.1 Das KCNE1-Gen.....	19
2.2.3.2 Das KCNE3-Gen.....	20
2.2.3.3 Assoziationen der KCNE-Gene bei Morbus Menière .....	20
<b>3 Fragestellung .....</b>	<b>24</b>
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
4.1 Studiendesign .....	25
4.1.1 Studienbedingungen.....	25
4.1.2 Datengewinnung.....	25
4.2 Studienteilnehmer .....	26
4.2.1 Rekrutierung der Kontrollprobanden.....	26
4.2.2 Rekrutierung der Patienten.....	27
4.3 Molekularbiologische Analyse.....	29
4.3.1 DNA-Extraktion.....	29
4.3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung .....	30
4.3.3 Genotypisierung .....	33
4.4 Qualitätskontrolle und statistische Analyse .....	41

<b>5 Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
5.1 Stichprobenbeschreibung .....	43
5.2 Analyse des SNP rs1805127 im KCNE1-Gen.....	45
5.2.1 Hardy-Weinberg-Equilibrium .....	45
5.2.2 Assoziationsanalyse .....	47
5.3 Analyse des SNP rs2270676 im KCNE3-Gen.....	50
5.3.1 Hardy-Weinberg-Equilibrium .....	50
5.3.2 Assoziationsanalyse .....	52
<b>6 Diskussion</b> .....	<b>55</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>73</b>
<b>8 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>9 Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>VIII</b>
<b>10 Danksagung</b> .....	<b>IX</b>

## 1 Zusammenfassung

Der Morbus Menière ist eine Innenohrerkrankung, die durch Minuten bis Stunden anhaltende Anfälle von Drehschwindel, Hörminderung und Tinnitus gekennzeichnet ist. Die aktuellen Diagnosekriterien beinhalten bei einem sicheren Morbus Menière rezidivierende episodische Schwindelsymptome von 20 Minuten bis 12 Stunden Dauer, eine sensorineurale Hörminderung im niedrigen bis mittleren Frequenzbereich sowie einen fluktuierenden Tinnitus und/oder Druck im betroffenen Ohr. Die Diagnose eines gesicherten Morbus Menière nach der *American Academy of Otolaryngology, Head and Neck Surgery* (AAO-HNS) von 1995 wurde mit der Diagnose eines sicheren Morbus Menière zusammengefasst, der histopathologische Nachweis eines endolymphatischen Hydrops als Voraussetzung entfernt. Obwohl die ätiopathologischen Hintergründe noch nicht vollständig verstanden sind, wird bei Vorliegen in einem Teil der Patienten ein endolymphatischer Hydrops als Ursache angenommen. Eine Vielzahl von umweltbedingten und genetischen Einflüssen scheinen eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung zu spielen.

Die Gene der KCNE-Familie (*Potassium voltage-gated channel subfamily E*), welche für regulatorische Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle kodieren und im menschlichen Innenohr exprimiert werden, sind mögliche Kandidaten, die an der Entstehung der Menière-Erkrankung beteiligt sein könnten. Eine Assoziation zwischen dem KCNE1- und dem KCNE3-Gen und Morbus Menière konnte mit Hilfe von Kandidatengenstudien bereits gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den Polymorphismen rs1805127 im KCNE1-Gen und rs2270676 im KCNE3-Gen und dem Auftreten der Erkrankung Morbus Menière im Rahmen einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Kollektiv aus 319 Patienten und 932 gesunden Kontrollprobanden mittels iPlex-Verfahren und Matrix-Assistierter-Laser-Desorption-Ionisierung, Time-Of-Flight-Massenspektrometrie genotypisiert und bezüglich der Genotypverteilung verglichen.

Dabei zeigte sich eine signifikante Assoziation des C-Allels des Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen mit ausschließlich an Morbus Menière erkrankten Patienten. Für den Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen.

Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass zumindest das KCNE3-Gen an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt ist. Weitere Studien sind nötig, um einen kausalen Zusammenhang der Gene der KCNE-Familie auf die Entstehung des Morbus Menière zu untersuchen. Größere Studienkollektive und klinische Subtypisierung des Patientenkollektivs erscheinen hier für künftige Studien sinnvoll.

## 2 Einleitung

### 2.1 Morbus Menière

Morbus Menière ist eine schubweise auftretende Erkrankung des Innenohrs, die sich aus dem Symptomkomplex Drehschwindel mit Hörminderung, Tinnitus und Druckgefühl auf dem betroffenen Ohr zusammensetzt (Minor et al, 2004). Nach den diagnostischen Kriterien der *AAO-HNS* lassen sich vier Kategorien unterteilen: bewiesener, sicherer, wahrscheinlicher und möglicher Morbus Menière (*AAO-HNS*, 1995). Der histopathologische Nachweis eines endolymphatischen Hydrops, Schwindelattacken mit einer Dauer von 20 Minuten oder länger, nachgewiesene Hörminderung sowie fluktuierende Ohrsymptome gehen in die Diagnosestellung mit ein. Die 2015 vom Klassifikationskommittee der *Barany-Gesellschaft* verabschiedeten Diagnosekriterien unterscheiden zwischen sicherem und wahrscheinliche Morbus Menière (Lopez-Escamez et al, 2015).

Die Attacken treten spontan auf und sind in Intensität und Frequenz variabel (Thorp & James, 2005). Die Erkrankung beginnt meist einseitig, ein Großteil der Patienten entwickelt jedoch im Krankheitsverlauf über viele Jahre eine bilaterale Symptomatik (Frejo et al, 2016; Nabi & Parnes, 2009). Monosymptomatische, das heißt rein vestibuläre oder rein cochleäre Attacken sind zu Beginn der Erkrankung häufig (da Costa et al, 2002), was die Diagnosestellung in vielen Fällen erschwert (Ciorba et al, 2017; Vassiliou et al, 2011).

#### 2.1.1 Epidemiologie

Morbus Menière gehört zu den häufigsten Ursachen vestibulären Schwindels und stellt die zweithäufigste Ursache einer bilateralen Vestibulopathie dar (Guerra-Jiménez et al, 2017; Zingler et al, 2007). Die Prävalenz liegt je nach Studie und untersuchter Population zwischen 34,5 pro 100.000 Einwohner in Japan (Shojaku et al, 2005) und 513 pro 100.000 Einwohner in Finnland (Havia et al, 2005). Gründe für die Divergenz der Untersuchungsergebnisse liegen unter anderem in den unterschiedlichen Diagnosekriterien für Morbus Menière und in methodischen Beschränkungen der Studiendesigns begründet (Harris & Alexander, 2010).

Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt zwischen der vierten und fünften Lebensdekade, wobei Frauen und Männer im Verhältnis 1,3:1 betroffen sind (Sajjadi &



Paparella, 2008; Tyrell et al, 2014). Im Kindesalter tritt die Erkrankung sehr selten auf (Casani et al, 2015).

Die Mehrheit der Fälle von Morbus Menière sind sporadisch. Eine familiäre Häufung der Erkrankung wurde jedoch ebenfalls beschrieben (Klar et al, 2006; Lee et al, 2015; Martin-Sierra et al, 2017). In einer finnischen Studienpopulation konnte bei 15% der Erkrankten mindestens ein Familienmitglied gefunden werden, das ebenfalls an Morbus Menière leidet (Klockars & Kentala, 2007).

### **2.1.2 Symptomatik**

Die klassische Symptomtrias des Morbus Menière setzt sich zusammen aus Drehschwindel, Tinnitus und Hörminderung im Tieftonbereich auf dem betroffenen Ohr, wobei viele Autoren noch ein viertes Symptom, ein Druckgefühl auf dem betroffenen Ohr, dem Symptomkomplex zurechnen (Muzzi et al, 2008; Perez-Garrigues et al, 2008; Strupp & Brandt, 2013).

Die Anfälle treten spontan und ohne tageszeitliche Bindung auf. Einige Studien gehen jedoch von Stress als einem möglichen Auslöser der Attacken aus (Horner & Cazals, 2005; Kitahara et al, 2016; Takahashi et al, 2005). Eine Verstärkung des Ohrdrucks und Tinnitus können dem abrupt einsetzenden Schwindel vorausgehen, welcher oftmals von starker Übelkeit und Erbrechen begleitet wird (Syed & Aldren, 2012). Die Attackendauer variiert zwischen wenigen Sekunden und bis zu ein bis fünf Tagen (Havia & Kentala, 2004), wobei die meisten Anfälle etwa ein bis zwei Stunden andauern (Syed & Aldren, 2012).

#### Krankheitsverlauf

Die Erstmanifestation des Morbus Menière ist oft monosymptomatisch und beginnt mit Anfällen von Drehschwindel. Nur in etwa einem Viertel der Fälle zeigt sich initial bereits das Vollbild der Erkrankung mit Drehschwindel, Hörverlust und Tinnitus (Havia et al, 2002). Die Erkrankung beginnt meist einseitig, wobei das rechte und das linke Innenohr gleichermaßen häufig betroffen sind (Perez-Garrigues et al, 2008). Der Hörverlust beschränkt sich zu Beginn auf eine tieftonbetonte Innenohrschwerhörigkeit, kann sich jedoch mit Fortschreiten der Erkrankung auch auf den Hochtonbereich ausweiten (Takumida et al, 2006). Eine vollständige Regeneration des Hörvermögens im anfallsfreien Intervall wird bei etwa 45% der Fälle beobachtet (Takahashi et al,

2005). Die Intensität des Tinnitus steigt mit zunehmender Krankheitsdauer und mit Verschlechterung des Hörvermögens (Havia et al, 2002).

Mit zunehmender Dauer der Erkrankung steigt auch die Prävalenz für eine bilaterale Symptomatik (Frejo et al, 2016; Takumida et al, 2006). Nach mehr als 20 Jahren Krankheitsdauer entwickeln bis zu 47% der Patienten eine bilaterale Form des Morbus Menière (Huppert et al, 2010).

### **2.1.3 Pathophysiologie**

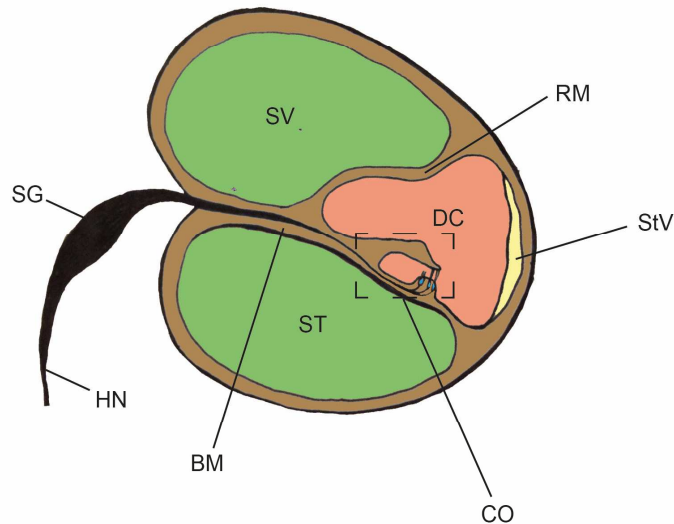
Die Ätiologie des Morbus Menière ist bisher nicht vollständig aufgeklärt worden. Laut gängiger Theorie ist jedoch von einem endolymphatischen Hydrops als histopathologischem Korrelat auszugehen (Gurkov et al, 2016). Dieser wurde erstmals im Jahr 1938 von Hallpike und Cairns (1938) beschrieben. Diese fanden eine Vorwölbung der Reissner Membran in menschlichen Felsenbeinpräparaten von Menièrepatienten.

Um die pathophysiologischen Vorgänge des endolymphatischen Hydrops zu verstehen, ist es zunächst essenziell, die Anatomie des Innenohrs zu betrachten, welche an dieser Stelle im Rahmen eines kurzen Exkurses dargestellt wird.

#### Anatomie des Innenohrs

Das Innenohr besteht aus Hörorgan (Cochlea) und Gleichgewichtsorgan (Vestibulum), welche gemeinsam im knöchernen Labyrinth der Felsenbeinpyramide liegen. Die etwa 30mm lange knöcherne Cochlea bildet einen zweieinhalbmal gewundenen Kanal, der Perilymphe enthält und den membranösen Teil, den Ductus cochlearis (auch Scala media genannt), umgibt. Dieser wiederum ist mit Endolymphe gefüllt und durch zwei Membranen vom Perilymphraum getrennt. Die Reissner Membran trennt den oberen Teil des Perilymphraums (Scala vestibuli) vom Ductus cochlearis, die Basilarmembran trennt den unteren Perilymphraum (Scala tympani) vom Ductus cochlearis (siehe Abbildung 1).

Innerhalb des Ductus cochlearis liegt das Cortiorgan, welches mit seinen über 17000 Sinneszellen (innere und äußere Haarzellen) das eigentliche Hörorgan bildet. Es liegt der Basilarmembran auf. Das Cortiorgan wird von der Tektorialmembran, einer dicken, gallertartigen Membran, überdacht (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 1:** Schematischer Querschnitt durch eine Windung der Cochlea

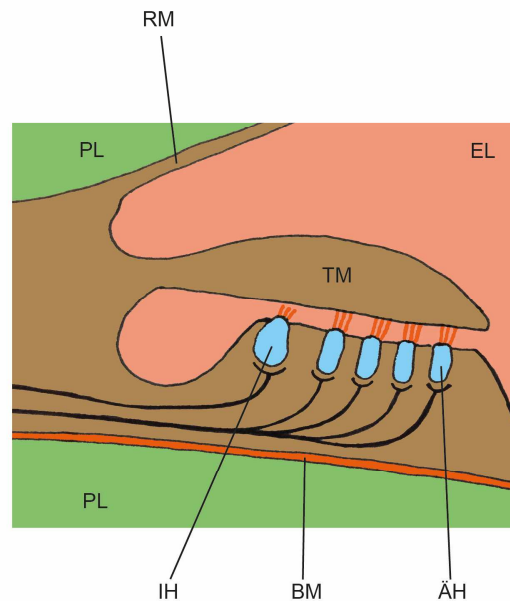
SV = Scala vestibuli; ST = Scala tympani; DC = Ductus cochlearis; RM = Reissner Membran; StV = Stria vascularis; CO = Corti Organ (Vergrößerung siehe Abbildung 2); BM = Basalmembran; HN = Hörnerv (N. vestibulocochlearis); SG = Spiralganglion

Endo- und Perilymphe unterscheiden sich grundlegend hinsichtlich ihrer Elektrolytkonzentrationen. Während die Perilymphe ein Derivat des Liquor cerebrospinalis ist und in ihrer Zusammensetzung der Extrazellulärflüssigkeit ähnelt (kaliumarm, natriumreich), wird die Endolymphe ausschließlich im Innenohr selbst von den Zellen der Stria vascularis produziert und gleicht in ihrer Zusammensetzung der Intrazellulärflüssigkeit (kaliumreich, natriumarm). Die Endolymphe weist gegenüber der Perilymphe ein +80 bis +110mV höheres elektrisches Potential (endocochleäres Potential) auf.

### Endolymphatischer Hydrops

Als histopathologisches Korrelat des Morbus Menière wird ein endolymphatischer Hydrops vermutet, also ein Überschuss an Endolymphe im Ductus cochlearis, hervorgerufen durch eine vermehrte Produktion oder verminderte Resorption der Endolymphe (Barath et al, 2014). Im Tiermodell konnte ein endolymphatischer Hydrops sowohl durch chirurgischen Verschluss des Ductus und Saccus endolymphaticus (Megerian et al, 2010), als auch durch Injektion künstlicher

Endolymphe in den Ductus cochlearis (Valk et al, 2005) herbeigeführt werden. Durch intratympanale Injektion von Gadolinium konnte der endolymphatische Hydrops erstmals 2007 an Menièrepatienten nachgewiesen und visualisiert werden (Nakashima et al, 2007).



**Abbildung 2:** Schematische Abbildung des Corti Organ

PL = Perilymphe; EL = Endolymphe; TM = Tektorialmembran; ICH = Innere Haarzelle; ÄH = Äußere Haarzelle; RM = Reissner Membran; BM = Basalmembran

Aufgrund des Volumenüberschusses im Ductus cochlearis kommt es zu Permeabilitätsänderungen an (Yeh et al, 1998) oder zur Ruptur der Reissner Membran, was eine Vermischung der kaliumarmen Perilymphe in der Scala vestibularis mit der kaliumreichen Endolymphe aus dem Ductus cochlearis zur Folge hat (Gurkov et al, 2016; Salt & Plontke, 2010). Diese Theorie konnte in mehreren Studien am Tiermodell verifiziert werden (Valk et al, 2006; Wit et al, 2000). Durch das plötzliche Anfluten von Kalium in der Perilymphe werden Aktionspotentiale an den Nervenfasern des N. vestibulocochlearis frei, welche wiederum die typischen Menière'schen Symptome erzeugen (Foster & Breeze, 2013). Sowohl die Schwere des Hydropses als auch dessen Persistenz korrelieren mit dem Ausmaß der klinischen Symptomatik (Barath et al, 2014; Yamamoto et al, 2010).

Die Ursachen, die zu einem endolymphatischen Hydrops führen, sind vielfältig und wurden bereits in zahlreichen Studien diskutiert. Die starke Infiltration durch Immunzellen (Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen) und Antikörper (IgG, IgA) im Saccus endolymphaticus sowie im perisacculären Gewebe sprechen für ein autoimmunes Geschehen (Greco et al, 2012; Kim et al, 2014).

Schuknecht und Mitarbeiter stellten bereits 1990 die Hypothese auf, dass subklinische Infektionen viele Jahre später einen endolymphatischen Hydrops auslösen können. Tatsächlich konnten erhöhte Titer gegen Varizella-Zoster- und Adenovirus (Selmani et al, 2005), sowie morphologische Veränderungen am Saccus endolymphaticus in Form einer Fibrose als mögliche Folge einer abgelaufenen Virusinfektion in Patienten mit Morbus Menière gefunden werden. Auch genetische Ursachen können möglicherweise einen endolymphatischen Hydrops auslösen. Auf diese soll im Verlauf der Arbeit näher eingegangen werden.

Darüber hinaus ist zu bedenken, dass einerseits nicht bei allen Patienten, die an Morbus Menière erkrankt sind, ein endolymphatischer Hydrops nachgewiesen werden kann (Barath et al, 2014) und andererseits nicht jeder endolymphatische Hydrops zu den klassischen Menièresymptomen führt (Attye et al, 2018; Salt & Plontke, 2010).

Angesichts der vielfältigen Theorien und Ansätze scheint ein multifaktorielles Geschehen in der Pathogenese des Morbus Menière wahrscheinlich (Minor et al, 2004).

#### **2.1.4 Die Rolle von Kalium im Innenohr**

Im menschlichen Körper kommt Kalium als positiv geladenes Ion (Kation) ubiquitär vor. Mit einer Konzentration von ca. 140mmol/l innerhalb der Zelle (im Gegensatz zu 3,5 bis 5mmol/l im Plasma) ist es das wichtigste intrazelluläre Kation und am Aufbau des Membranpotentials beteiligt. Durch die hohe intrazelluläre und niedrige extrazelluläre Konzentration von Kalium sowie die hohe extrazelluläre und niedrige intrazelluläre Konzentration von Natrium entsteht eine elektrische Potentialdifferenz über der Zellmembran, welche die Grundlage für die Weiterleitung von Erregung an Nerven- und Muskelzellen bildet.

Im Innenohr spielt Kalium bei der Verarbeitung von akustischen Reizen eine essentielle Rolle. Dabei durchläuft es einen Kreislauf in Cochlea und Vestibulum

zwischen kaliumreicher Endolymphe und kaliumarmer Perilymphe (Wangemann, 2002).

Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln erwähnt, ist die im Ductus cochlearis befindliche Endolymphe sehr kaliumreich, wodurch sich eine Potentialdifferenz von +80 bis +110mV im Vergleich zur Perilymphe ergibt. Äußere und innere Haarzellen verfügen über ein Ruhepotential von -70 bzw. -40mV. Es besteht also eine Potentialdifferenz von 120 bis 180mV zwischen Endolymphe und Haarzellen. Kommt es im Rahmen der Schalleitung nun durch die Schalldruckwelle zur Auslenkung der äußeren Haarzellen und zur Öffnung der mechanosensitiven Kationenkanäle, strömen K<sup>+</sup>-Ionen, getrieben durch die Potentialdifferenz, von der Endolymphe in die äußeren Haarzellen ein und depolarisieren diese. Über spannungsabhängige Kaliumkanäle gelangt das Kalium zunächst in die Perilymphe und in die Zellen der Stria vascularis, wo es schließlich von den Marginalzellen über den spannungsabhängigen KCNQ1/KCNE1-Kaliumkanal zurück in die Endolymphe befördert wird (Wangemann et al, 1995).

Die Wichtigkeit des Kaliumzyklus im Innenohr sowohl für das Hörvermögen als auch für den Gleichgewichtssinn konnte im Tiermodell gezeigt werden. Mäuse, deren Kaliumzyklus durch die Inaktivierung des KCNQ1/KCNE1-Kaliumkanals unterbrochen war, zeigten beidseitige Taubheit und Fallneigung sowie schwere histochemische Auffälligkeiten in Cochlea und Vestibulum (Lee et al, 2000; Letts et al, 2000). Auch bei KCNE3-Knockout-Mäusen konnten Veränderungen der Erregbarkeit auditorischer Neurone festgestellt werden (Wang et al, 2014).

### **2.1.5 Diagnostik**

Die Diagnose Morbus Menière wird anhand klinischer Kriterien unter Berücksichtigung apparativer Verfahren gestellt (Lopez-Escamez et al, 2015; Minor et al, 2004). Die 1995 von der *American Academy of Otolaryngology, Head and Neck Surgery* (AAO-HNS) formulierten diagnostischen Kriterien benennen die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Morbus Menière anhand von vier Stufen (AAO-HNS, 1995). Die Kriterien sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die diagnostischen Kriterien der AAO-HNS zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität bei eher geringer Spezifität aus, was ein relativ großes Risiko an falsch positiven Diagnosen impliziert (Güneri et al, 2016; Stapleton & Mills, 2008).

**Tabelle 1:** Diagnostische Kriterien der American Academy of Otolaryngology, Head and Neck Surgery für die Diagnose eines Morbus Menière von 1995

<b>Bewiesener Morbus Menière</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Histopathologischer Nachweis des Endolymphhydrops</li> <li>- Symptomatik wie bei sicherem Morbus Menière</li> </ul>
<b>Sicherer Morbus Menière</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zwei oder mehr Schwindelattacken von 20 Minuten Dauer oder länger</li> <li>- Nachgewiesene Hörminderung bei mindestens einer Untersuchung</li> <li>- Tinnitus oder Ohrdruck im betroffenen Ohr</li> <li>- Andere Ursache klinisch ausgeschlossen</li> </ul>
<b>Wahrscheinlicher Morbus Menière</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eine Schwindelattacke von 20 Minuten Dauer oder länger</li> <li>- Nachgewiesene Hörminderung bei mindestens einer Untersuchung</li> <li>- Tinnitus oder Ohrdruck im betroffenen Ohr</li> <li>- Andere Ursache klinisch ausgeschlossen</li> </ul>
<b>Möglicher Morbus Menière</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Eine Schwindelattacke von 20 Minuten Dauer oder länger ohne dokumentierten Hörverlust oder fluktuierende oder konstante Innenohrschwerhörigkeit, mit Gleichgewichtsstörungen, aber ohne Schwindelattacken</li> <li>- Andere Ursache klinisch ausgeschlossen</li> </ul>

Die neuen, 2015 vom Klassifikationskommittee der *Barany Gesellschaft*, der *Japan Society for Equilibrium Research*, der *European Academy of Otolology and Neurotology* (EAONO), des *Equilibrium Committee of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* (AAO-HNS) und der *Korean Balance Society* verabschiedeten Diagnosekriterien unterscheiden zwischen sicherem und wahrscheinlichem Morbus Menière. Für die Diagnose eines sicheren Morbus Menière müssen folgende Kriterien erfüllt sein: zwei oder mehr Schwindelattacken von 20 Minuten bis 12 Stunden Dauer, nachgewiesene Hörminderung (<2000 Hz, mindestens -30 dB) assoziiert mit Schwindelattacken (maximal 24 Stunden vor bzw. nach Schwindelattacke), fluktuierender Tinnitus oder Ohrdruck im betroffenen Ohr, keine Hinweise für andere Ursachen. Ein wahrscheinlicher Morbus Menière ist definiert als Symptomkomplex aus episodischem Schwindel, assoziiert mit fluktuierender Ohrsymptomatik mit einer Dauer von 20 Minuten bis 24 Stunden. In der vorliegenden Arbeit wurden die diagnostischen Kriterien der *AAO-HNS* von 1995 zur Patientenrekrutierung herangezogen.

Ergänzend zur Anamneseerhebung, klinischen Untersuchung und audiometrischen Messung stehen noch zahlreiche apparative Zusatzuntersuchungen zur Verfügung, welche die Diagnosestellung des Morbus Menière unterstützen können. Sie sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

#### Elektrocochleographie

Die Elektrocochleographie (ECochG) ist eine Methode zur Detektion cochleärer Potentiale, die als Antwort auf akustische Reize mit kurzer Latenz gesendet werden. Es können drei unterschiedliche Potentiale gemessen werden: das Mikrophonpotential (CM), das Summationspotential (SP) und das Summenaktionspotential (AP), wobei zur Diagnostik des Morbus Menière der Quotient aus SP und AP herangezogen wird (Lamounier et al, 2014).

#### Vestibulär evozierte myogene Potentiale

Über die vestibulär evozierten myogenen Potentiale (VEMPs) lässt sich die Funktion der Otolithenorgane (Sakkulus und Utriculus) messen. Im akuten Anfall sind vergrößerte VEMPs zu erwarten, wohingegen bei fortgeschrittener Erkrankung



abgeschwächte oder fehlende VEMPs beobachtet wurden (Güneri et al, 2016; Hamann & Haarfeldt, 2006).

### Glycerol-Dehydratationstest

Klockhoff und Lindblom (1966) beschrieben 1966 erstmals eine nach oraler Aufnahme von Glycerol folgende Hörverbesserung bei Menièrepatienten, die durch Diffusion der Endolymphe in den Blutkreislauf mit nachfolgender Drucksenkung im Endolymphraum verursacht wird. Der Glycerol-Dehydratationstest gilt als positiv, wenn sich die Reintonaudiometrie nach Ingestion von Glycerol um mindestens 10dB in zwei oder mehr Frequenzen zwischen 250 und 4.000Hz verbessert (Vassiliou et al, 2011).

### Magnetresonanztomographie des Felsenbeins nach intratympanaler Injektion von Gadolinium

Zur Visualisierung des Endolymphhydrops, welcher als pathophysiologische Ursache für die Menière'schen Attacken angenommen wird, eignet sich ein hochauflösendes MRT vom Felsenbein nach intratympanaler Injektion des Kontrastmittels Gadolinium (Naganawa & Nakashima, 2014). Das Gadolinium verteilt sich zunächst im Perilymphraum, der durch die Reissner Membran vom Endolymphraum getrennt wird. Liegt ein endolymphatischer Hydrops vor, erscheint der Perilymphraum durch das Einströmen der Endolymphe verkleinert, da das Gadolinium nur von der Perilymphe, nicht aber von der Endolymphe aufgenommen wird (Naganawa et al, 2008).

Neben den genannten diagnostischen Verfahren existieren weitere Möglichkeiten, die dabei helfen können, die Diagnose Morbus Menière zu bestätigen. Trotz der geringen Spezifität dieser Untersuchungsmethoden (Güneri et al, 2016) verlassen sich nur wenige Ärzte bei der Diagnosestellung ausschließlich auf die klinische Symptomatik und den audiologischen Befund (Kriterien der *AAO-HNS*). Mehr als zwei Drittel ziehen weitere diagnostische Verfahren zur Diagnosestellung heran (Kim et al, 2005).

## **2.1.6 Therapie**

Zwar existiert bisher keine kurative Therapie zur Behandlung des Morbus Menière, durch eine prophylaktische medikamentöse Therapie soll jedoch die Attackenfrequenz verlängert und ein Fortschreiten des Hörverlusts verhindert werden (Seyed Tootoonchi

et al, 2016). Der akute Schwindelanfall kann symptomatisch mit Antivertiginosa behandelt werden (Strupp et al, 2013). Zur prophylaktischen Behandlung stehen zahlreiche Therapiekonzepte zur Verfügung, welche jedoch nicht hinreichend evidenzbasiert sind (Magnan et al, 2018). Die gängigsten sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

#### Intratympanale Gabe von Glukokortikoiden

Die intratympanale Injektion von Glukokortikoiden wurde bereits in zahlreichen Studien auf ihre Wirksamkeit untersucht (Atrache Al Attrache et al, 2016; Garcia-Purrinos et al, 2005; Xenellis et al, 2006). Es konnten eine signifikante Verbesserung der Schwindelsymptomatik (Garduno-Anaya et al, 2005), sowie eine deutliche Verbesserung der Hörschwelle nachgewiesen werden (Hillman et al, 2003).

#### Transtympanale Injektion von Gentamicin

Die Wirkung der intratympanalen Gabe von Antibiotika aus der Familie der Aminoglykoside beruht auf deren ototoxischer Wirkung, genauer auf der direkten Schädigung der vestibulären Haarzellen (Ishiyama et al, 2007). Dadurch kommt es zwar in den meisten Fällen zu Schwindelfreiheit, aber auch zu einer deutlichen Innenohrschwerhörigkeit (Nicolas et al, 2019; Yetişer, 2018). Die intratympanale Injektion von Gentamicin ist der intratympanalen Injektion von Glukokortikoiden in Bezug auf die Länge des anfallsfreien Intervalls überlegen (Naples et al, 2019).

#### Betahistin

Betahistin wirkt als Agonist am H1-Histaminrezeptor und als Antagonist am H3-Histaminrezeptor (Gbahou et al, 2010) auf die Mikrozirkulation im Innenohr, indem es den Blutfluss im Vestibularorgan erhöht und somit möglicherweise das Ungleichgewicht zwischen Produktion und Resorption der Endolymphe beeinflusst (Dziadziola et al, 1999). Metaanalysen haben gezeigt, dass Betahistin dadurch einen positiven Effekt vor allem auf die Attackenfrequenz bei Patienten mit Morbus Menière hat (James & Burton, 2001). Im Rahmen einer randomisierten Doppelblindstudie konnte jedoch gezeigt werden, dass durch die Einnahme von Dosierungen von 48mg/d bis 144mg/d die Attackenfrequenz im Vergleich zur Einnahme eines Placebos nicht signifikant gesenkt werden konnte (Adrion et al, 2016). Höhere Dosierungen bis zu

1920mg/d scheinen wirksamer zu sein. Durch die kombinierte Einnahme mit dem MAO-B-Hemmer Selegilin kann die Wirksamkeit von Betahistin gesteigert und die Dosis somit gesenkt werden (Strupp et al, 2018).

## **2.2 Genetik des Morbus Menière**

### **2.2.1 Genetische Faktoren des Morbus Menière**

Die Ätiologie des Morbus Menière ist nach wie vor unklar, eine genetische Prädisposition scheint jedoch ein wichtiger Faktor der multifaktoriellen Krankheitsentstehung zu sein (Cabrera et al, 2014; Chiarella et al, 2015). Zahlreiche Studien konnten eine familiäre Häufung der Erkrankung aufzeigen, wobei die angegebenen Frequenzen des familiären Morbus Menière an der Gesamtzahl der Menièrepatienten zwischen 6,3 und 23,4% variieren (Hietikko et al, 2013; Klockars & Kentala, 2007; Lee et al, 2015; Requena et al, 2014). Klinisch unterscheidet sich die familiäre von der sporadischen Form des Morbus Menière in Manifestationsalter der Erkrankung und Schwere der Symptomatik. Nachkommen von Menièrepatienten erkranken im Schnitt früher und leiden oftmals unter schwerwiegenderen Symptomen als sporadisch erkrankte Patienten (Arweiler-Harbeck et al, 2011; Frejo et al, 2016; Frykholm et al, 2006).

Die meisten Autoren gehen von einem autosomal-dominanten Erbgang mit unvollständiger Penetranz von ca. 60% aus (Arweiler-Harbeck et al, 2011; Gazquez & Lopez-Escamez, 2011; Martin-Sierra et al, 2017). Ein rezessiver oder mitochondrialer Erbgang kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Requena et al, 2014). Ein krankheitsauslösendes Gen konnte bisher nicht identifiziert werden (Klockars & Kentala, 2007). Wahrscheinlich ist das Vorliegen einer komplexen Erkrankung, bei der eine Vielzahl von Genen an der Krankheitsentstehung beteiligt ist. Außerdem spielen häufig Umweltfaktoren eine Rolle in der tatsächlichen Manifestation einer genetischen Prädisposition (Risch, 2000).

Es scheint außerdem gewisse Risiko- bzw. Kofaktoren zu geben, welche die Wahrscheinlichkeit, an einem Morbus Menière zu erkranken, erhöhen (Bruderer et al, 2017). So haben Patienten mit Episoden von Migräne in der Eigen- oder Familienanamnese ein höheres Risiko, an Menière zu erkranken (Ray et al, 2016). Umgekehrt scheint jedoch auch das Risiko für die Entwicklung einer Migräne bei

bereits bestehendem Morbus Menière deutlich erhöht zu sein: 32 bis 56% aller Menière-Patienten leiden gleichzeitig an einer Migräne im Vergleich zu 5,3% in der Allgemeinbevölkerung (Ibekwe et al, 2008; Radtke et al, 2002). Im Rahmen einer US-amerikanischen Studie an Menière-Patienten konnten außerdem Unterschiede in Schwere der Erkrankung und Manifestationsalter bei gleichzeitiger Erkrankung an Migräne gezeigt werden (Cha et al, 2007).

## 2.2.2 Kopplungs- und Assoziationsstudien

Zur Identifizierung von Kandidatengenomen oder -regionen, die an der Krankheitsentstehung beteiligt sind, können Kopplungs- oder Assoziationsstudien herangezogen werden. Mit Hilfe von Kopplungsstudien kann ein Zusammenhang zwischen einem spezifischen genetischen Marker und dem Auftreten einer Erkrankung innerhalb einer Familie überprüft werden. Die Ergebnisse der bisher durchgeführten genomweiten Kopplungsstudien sind jedoch sehr heterogen (Chiarella et al, 2015; Vrabec, 2010).

Die Arbeitsgruppe um Klar konnte 2006 eine Kandidatenregion auf Chromosom 12p12.3 in einer schwedischen Großfamilie in fünf Generationen und zusätzlich in zwei weiteren Familien mit mehr als vier betroffenen Mitgliedern nachweisen. Diese Ergebnisse konnten 2010 im Rahmen einer Studie an 15 schwedischen Familien repliziert werden (Gabrikova et al, 2010). Fransen und seine Arbeitsgruppe konnten ein Kandidatengenom auf Chromosom 14p11.2, das so genannte COCH-Gen (*Cochlin*), identifizieren, welches durch eine *Missense*-Mutation zu Menière-ähnlichen Symptomen führt (Fransen et al, 1999). Im Rahmen einer genomweiten Kopplungsanalyse an 19 deutschen Familien mit insgesamt 52 betroffenen Mitgliedern konnte die Arbeitsgruppe um Arweiler-Harbeck (2011) eine mögliche Kandidatenregion auf Chromosom 5 identifizieren.

Jüngste Studien konnten Mutationen der Gene FAM136A (*Family with sequence similarity 136 member A*) und DTNA (*Dystrobrevin alpha*) (Requena et al, 2015) sowie DPT (*Dermatopontin*) und SEMA3D (*Semaphorin 3D*) (Martin-Sierra et al, 2017) in spanischen von Morbus Menière betroffenen Familien identifizieren. Die Replikation dieser Ergebnisse steht bis dato noch aus.

Weder die Ergebnisse von Klar, noch die Ergebnisse von Fransen zum COCH-Gen oder die Ergebnisse von Arweiler-Harbeck zur Kandidatenregion auf Chromosom 5 konnten bisher repliziert werden (Gazquez & Lopez-Escamez, 2011; Hietikko et al,

2011; Sanchez et al, 2004; Usami et al, 2003), was einerseits einer unvollständigen Penetranz, andererseits der genetische Heterogenität der Erkrankung geschuldet sein kann (Hietikko et al, 2011; Klar et al, 2006).

Mit Hilfe von Assoziationsstudien kann überprüft werden, ob ein genetischer Polymorphismus mit einem seiner Allele signifikant häufiger in einem Kollektiv von Erkrankten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe vorkommt (Hegele, 2002). Es können Kandidatengene untersucht werden, die bereits in Kopplungsstudien auffällig waren oder die potentiell an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sein könnten. Aufgrund des relativ hohen Risikos falsch-positiver Ergebnisse ist die Replikation der Ergebnisse von Assoziationsstudien von besonderer Wichtigkeit (Tabor et al, 2002).

Signifikante Assoziationen konnten bisher vor allem in Genen, die an der Immunantwort beteiligt sind, nachgewiesen werden (Furuta et al, 2011; Requena et al, 2013). So konnten Cabrera (2014) und seine Arbeitsgruppe einen Zusammenhang zwischen zwei SNPs im *Nuclear-factor-kappa-B1*-Gen (NFkB1) und der Progression des Hörverlusts in Patienten mit einseitigem Morbus Menière zeigen.

Eine Assoziation zwischen Polymorphismen im *Macropage-migration-inhibitory-factor*-Gen (MIF) einerseits, welches als Zytokin eine Rolle in der akuten Immunantwort spielt, und Morbus Menière andererseits konnte von der Arbeitsgruppe um Yazdani an einem iranischen Patientenkollektiv gezeigt werden (Yazdani et al, 2013). Auch Gazquez et al. (2013) konnten einen Zusammenhang mit einer genetischen Variation im MIF-Gen an spanischen Patienten nachweisen, konnten diese in einem amerikanischen Kollektiv jedoch nicht replizieren.

Eine Assoziation zwischen Variationen im CCL5- (RANTES) Gen, welches eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen und eosinophilen und basophilen Lymphozyten in entzündetem Gewebe spielt, konnte in einem iranischen Patientenkollektiv bei männlichen Probanden nachgewiesen werden (Yazdani et al, 2015).

Bei bilateral betroffenen Menière-Patienten konnte ein Zusammenhang zu Variationen im *Protein-tyrosine-phosphatase-non-receptor-type22*-Gen (PTPN22), welches die Reaktionsfähigkeit von B- und T-Zell-Rezeptoren beeinflusst, beobachtet werden (Lopez-Escamez et al, 2010).

**Tabelle 2:** Übersicht der bisher durchgeführten Assoziationsstudien zu Morbus Menière

Gen	Assoziation	Pat	Kon	Herkunft	Publikation
<b>AQP4</b>	Nein	86	2136	Japan	Nishio et al, 2013
<b>AQP5</b>	Ja				
<b>INFG</b>	Nein	580	552	Kaukasisch	Gazquez et al, 2013
<b>KCNE1</b>	Ja	63	237	Japan	Doi et al, 2005
	Nein	180	180	Kaukasisch	Campbell et al, 2010
<b>KCNE3</b>	Ja	63	205	Japan	Doi et al, 2005
	Nein	180	180	Kaukasisch	Campbell et al., 2010
<b>MIF</b>	Ja	72	100	Iran	Yazdani et al, 2013
	Ja	580	552	Spanien	Gazquez et al, 2013
	Nein	291	552	USA	
<b>MTHFR</b>	Ja	86	1946	Japan	Huang et al, 2013
<b>NFKB1</b>	Ja, mit Hörniveau	716	1628	Kaukasisch	Cabrera et al, 2014
<b>NOS1</b>	Nein	273	550	Kaukasisch	Gazquez et al, 2011
<b>NOS2</b>	Nein				
<b>NOS3</b>	Ja, mit Hörniveau	83	1946	Japan	Teranashi et al, 2013
	Nein				
<b>PTPN22</b>	Ja, für bilateralen M. Menière)	52	348	Kaukasisch	Lopez-Escamez et al, 2010
<b>RANTES</b>	Ja (Männer)	71	101	Iran	Yazdani et al, 2015
<b>TNFA</b>	Nein	580	552	Kaukasisch	Gazquez et al, 2013

Pat = Patienten; Kon = Kontrollen

Neben Genen, die direkt oder indirekt an der Immunantwort beteiligt sind, wurden zahlreiche weitere Polymorphismen auf einen Zusammenhang zu Morbus Menière untersucht. So konnte eine positive Assoziation des *Methylen-tetrahydrofolat-*

*reductase*-Gens (MTHFR), welches an der Umwandlung von Homocystein zu Methionin im menschlichen Körper beteiligt ist, beobachtet werden (Huang et al, 2013). Die japanische Arbeitsgruppe um Doi konnte eine positive Assoziation zwischen Polymorphismen auf dem KCNE1- und -3-Gen, welche eine Rolle im Elektrolythaushalt des Innenohrs spielen, nachweisen (Doi et al, 2005). Diese konnten Campbell und seine Arbeitsgruppe (2010), die ein amerikanisches Patientenkollektiv auf Assoziationen der letztgenannten Gene mit Morbus Menière untersuchten, jedoch nicht reproduzieren.

Kein signifikanter Zusammenhang konnte außerdem zu den Genen *Tumor-necrosis-factor-alpha* (TNFA), *Interferon-gamma* (INFG) (Gazquez et al, 2013), *Nitric-oxide-synthase*-Gen (NOS) 1 und 2A (Gazquez et al, 2011; Teranishi et al, 2013) sowie *Aquaporin-4* (AQP4) (Nishio et al, 2013) hergestellt werden.

Eine Übersicht der bisher durchgeführten Assoziationsstudien ist in Tabelle 2 dargestellt.

### **2.2.3 Die KCNE-Gen-Familie**

Die Gene der KCNE-Gen-Familie kodieren jeweils für ein Protein, welches als Untereinheit an der Regulation spannungsabhängiger Kaliumkanäle (Kv-Kanäle) beteiligt ist (Abbott & Goldstein, 1998). Kv-Kanäle bestehen aus einer Poren-formenden  $\alpha$ -Untereinheit und einer regulatorischen  $\beta$ -Untereinheit, wobei letztgenannte immensen Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften des Kanals hat (Pourrier et al, 2003). Die Familie der KCNE-Gene umfasst fünf Gene im Humangenom (KCNE1 bis 5), von denen jedes Gen für eine regulatorische  $\beta$ -Untereinheit mit unterschiedlichen modulierenden Effekten auf Kv-Kanäle kodiert (Lundquist et al, 2006). Die KCNEs sind relativ kleine Polypeptide, bestehend aus 103 bis 177 Aminosäuren und besitzen nur eine Transmembrandomäne, einen extrazellulären N- und einen zytosolischen C-Terminus (McCrossan & Abbott, 2004). Ein Interaktionspartner der KCNE-Untereinheiten ist beispielsweise der Kv-Kanal KCNQ1, wobei sie dessen Eigenschaften in unterschiedlicher Art und Weise modulieren. KCNE2 und 3 transformieren den spannungsabhängigen Kaliumstrom in einen spannungsunabhängigen, kontinuierlichen Strom (Schroeder et al, 2000; Tinel et al, 2000), während KCNE4 und 5 inhibitorisch auf KCNQ1 wirken (Angelo et al, 2002; Grunnet et al, 2002). KCNE1 und KCNE3 werden im Folgenden genauer erläutert.

### 2.2.3.1 Das KCNE1-Gen

Das KCNE1-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 21 an Position 22.12 lokalisiert. Es umfasst sieben Exons und kodiert für ein 129 Aminosäuren langes Polypeptid (Splawski et al, 1998). KCNE1 agiert als regulatorische  $\beta$ -Untereinheit mit spannungsabhängigen Kaliumkanälen, in dem es einen langsamen Kaliumstrom aus der Zelle hinaus generiert (Takumi et al, 1988). Einige Zeit wurde davon ausgegangen, KCNE1 sei ein autonomer Kaliumkanal, bis 1996 der Kv-Kanal KvLQT1 als Interaktionspartner von KCNE1 identifiziert wurde (Barhanin et al, 1996; Sanguinetti et al, 1996). Dieser wird durch das Gen KCNQ1 kodiert und bildet die Pore-formende  $\alpha$ -Untereinheit des Kanals, wohingegen das Genprodukt des KCNE1-Gens die  $\beta$ -Untereinheit bildet. Die  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus sechs transmembranären Segmenten (S1 bis S6), von denen wiederum die Segmente S1 bis S4 als Spannungsmesser fungieren, während S5 und S6 die eigentliche Kanalpore bilden (Lvov et al, 2010). Sowohl der C- als auch der N-Terminus liegen intrazellulär. Jeweils vier  $\alpha$ -Untereinheiten lagern sich als funktionelle Einheit zu einem Tetramer zusammen (Doyle et al, 1998). Die  $\beta$ -Untereinheit, also das Genprodukt des KCNE1-Gens, interagiert als regulatorische Komponente mit der  $\alpha$ -Untereinheit, in dem es den Kaliumstrom sowie die Deaktivierung des Kanals verlangsamt und die elektrische Leitfähigkeit des Kanals erhöht (Osteen et al, 2010). Sie ist zwischen dem spannungsregulierenden S4 Segment und dem die eigentliche Kanalprobe bildenden S6 Segment der  $\alpha$ -Untereinheit lokalisiert und kann so beide Segmente beeinflussen (Nakajo & Kubo, 2007). Der genaue molekulare Mechanismus ist bisher noch nicht näher bekannt (Barro-Soria et al, 2014; Melman et al, 2004).

Spannungsabhängige KCNQ1/KCNE1-Kaliumkanäle kommen vor allem in Herzmuskel, Innenohr, Niere und Gastrointestinaltrakt vor (Jespersen et al, 2005). *Missense*-Mutationen im KCNE1-Gen können zu Veränderungen der kardialen Repolarisation und somit zu schweren kardialen Arrhythmien, insbesondere zu einer verlängerten QT-Zeit (sog. Long QT-Syndrom), führen (Schulze-Bahr et al, 1997).

Der KCNQ1/KCNE1-Kaliumkanal spielt jedoch nicht nur im Herzen, sondern auch in der Flüssigkeitshomöostase einiger anderer Organe eine wichtige Rolle (Ehmke, 2002). Im Innenohr wird er von den Marginalzellen der Stria vascularis exprimiert und erlaubt den Transport von  $K^+$ -Ionen in die Endolymphe (Wangemann, 2002). Gendefekte im KCNE1-Gen führen im Innenohr zu Funktionseinschränkungen im



Sinne von Taubheit und Schwindelsymptomatik (Warth & Barhanin, 2002). Auch ein vermehrtes Auftreten von Tinnitus und lärminduzierter Schwerhörigkeit konnte bei Patienten mit genetischen Varianten im KCNE1-Gen beobachtet werden (Pawelczyk et al, 2012; Van Laer et al, 2006).

### **2.2.3.2 Das KCNE3-Gen**

Das KCNE3-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 11 an Position 13.4. Es umfasst 6 Exons und kodiert für ein Protein mit 103 Aminosäuren und einer relativen molekularen Masse von 12kD (Abbott et al, 2001). Als regulatorische  $\beta$ -Untereinheit interagiert es unter anderem mit dem spannungsabhängigen KCNQ1-Kaliumkanal, in dem es diesen konstitutiv offenhält und somit den Kaliumstrom aus der Zelle drastisch erhöht. Dieser KCNQ1/KCNE3-Kanal wird vor allem in den Kryptenzellen des Dünndarms exprimiert (Schroeder et al, 2000). Abbott und seine Forschungsgruppe (2001) konnten KCNE3 außerdem in Skelettmuskelzellen nachweisen, wo es die Leitfähigkeit des Kv-Kanals KCNC4 erhöht.

Genetische Variationen im KCNE3-Gen wurden in Patienten mit Brugada-Syndrom beobachtet, einer Erkrankung, die mit ventrikulären Tachykardien und plötzlichem Herztod durch Repolarisationsstörungen der Herzmuskelzellen vergesellschaftet ist (Delpon et al, 2008). In einigen Patienten mit periodischer Paralyse konnte ebenfalls ein genetischer Defekt im KCNE3-Gen nachgewiesen werden (Dias Da Silva et al, 2002).

Da KCNE3 zudem im Innenohr exprimiert wird (de Castro et al, 2006; Wang et al, 2014), wurde auch ein Zusammenhang zwischen der Suszeptibilität für Tinnitus und genetischen Variationen im KCNE3-Gen vermutet (Sand et al, 2011). Hier zeigte sich jedoch keine Assoziation der untersuchten Polymorphismen mit chronischem Tinnitus.

### **2.2.3.3 Assoziationen der KCNE-Gene bei Morbus Menière**

Diverse Studien konnten die Wichtigkeit der  $\beta$ -Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle der KCNE-Familie für die Funktion des Innenohrs im Tiermodell nachweisen (Lee et al, 2000; Letts et al, 2000; Warth & Barhanin, 2002). Auch beim Menschen verursachen Mutationen im KCNE1-Gen kongenitale Taubheit im Rahmen des Jevrell und Lange-Nielsen-Syndroms (Schwartz et al, 2006). Diese Erkenntnisse lassen Spekulationen über eine mögliche Beteiligung der KCNE-Gene in der

Pathophysiologie des Morbus Menière zu. Die wenigen bisher durchgeführten Assoziationsstudien zu Genen der KCNE-Familie und Innenohrerkrankungen wie Morbus Menière lieferten jedoch diskrepante Ergebnisse.

Die Arbeitsgruppe um Doi konnte 2005 erstmals eine Assoziation zwischen Polymorphismen im KCNE1- und KCNE3-Gen und Morbus Menière in einer japanischen Stichprobe von 63 an Menière erkrankten Patienten (19% Männer, 81% Frauen; Durchschnittsalter 42,5 Jahre) und 237 (29% Männer, 71% Frauen; Durchschnittsalter 35,8 Jahre) bzw. 205 (25% Männer, 75% Frauen; Durchschnittsalter 36,5 Jahre) gesunden Kontrollen aufzeigen. Der untersuchte Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen führt zum Aminosäureaustausch Serin/Glycin an Position 38 (S38G), während der Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen keinen Aminosäureaustausch zur Folge hat (Berezin et al, 2004). Doi und seine Forschungsgruppe konnten eine signifikante Häufung des A-Allels (Genotypen AA und AG) im Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen in der Patientenstichprobe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. In rs2270676 im KCNE3-Gen waren die Genotypen CC und TC signifikant häufiger in der Patientengruppe als in der Kontrollgruppe. Sie stellten daraufhin die Hypothese auf, dass diese Polymorphismen die Suszeptibilität für die Entstehung eines Morbus Menière erhöhen (Doi et al, 2005). Die Arbeitsgruppe um Campbell versuchte 2010 die Ergebnisse der japanischen Studie an einem Kollektiv US-amerikanischer Menière-Patienten kaukasischer Herkunft zu replizieren (Campbell et al, 2010). Zu diesem Zweck wurden jeweils 180 an Morbus Menière leidende Patienten (46% Männer, 54% Frauen; Durchschnittsalter 54,3 Jahre) und gesunde Kontrollprobanden, die in Alter, Geschlecht und Ethnizität der Patientengruppe entsprachen, hinsichtlich der genannten Polymorphismen im KCNE1- und 3-Gen genotypisiert. Die Allel- und Genotypverteilung innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe wurde außerdem mit der Allel- und Genotypverteilung der japanischen Stichproben, sowie mit derer der HapMap-Datenbank verglichen. Campbell und Mitarbeiter konnten keine signifikanten Unterschiede in der Allel- oder Genotypverteilung zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv nachweisen.

Die finnische Arbeitsgruppe um Hietikko konnte 2012 einen Zusammenhang des Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen, nicht jedoch des Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen zu Morbus Menière im Rahmen einer 59 Patienten und 98

gesunde Kontrollprobanden (keine Daten zu Alter- und Geschlechterverteilung) umfassenden Studie nachweisen (Hietikko et al, 2012).

Die Ergebnisse der genannten Assoziationsstudien wurden 2015 durch die chinesische Forschungsgruppe um Li im Rahmen einer Meta-Analyse untersucht (2015). Weder für den Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen, noch für den Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen ergaben sich signifikante Ergebnisse.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die bis dato publizierten Studien zum KCNE1- und KCNE3-Gen und Morbus Menière.

**Tabelle 3:** Bisherige Assoziationsstudien zu den Polymorphismen rs1805127 im KCNE1-Gen und rs2270676 im KCNE3-Gen

<b>Studie</b>	<b>Jahr</b>	<b>Studiendesign</b>	<b>Land</b>	<b>Patienten/ Kontrollen</b>	<b>signifikante Assoziation</b>
<b>Doi et al.</b>	2005	Fall-Kontroll-Studie	Japan	63/ 237 bzw. 205	KCNE1 KCNE3
<b>Campbell et al.</b>	2010	Fall-Kontroll-Studie	USA	180/ 180	
<b>Hietikko et al.</b>	2012	Fall-Kontroll-Studie	Finnland	59/98	KCNE1
<b>Li et al.</b>	2015	Meta-Analyse	China	302/515 bzw. 483	

Im Rahmen weiterer Studien wurden Zusammenhänge zwischen Polymorphismen im KCNE1- und 3-Gen und anderen Innenohrerkrankungen wie Tinnitus und lärminduzierter Schwerhörigkeit untersucht. Sand et al. überprüften 2010 einen möglichen Zusammenhang zwischen rs1805127 und vier weiteren Polymorphismen (rs17173510, rs1805128, rs2070357, rs41314071) im KCNE1-Gen mit der Suszeptibilität für chronischen Tinnitus in einem kaukasischen Kollektiv von 201 Patienten, konnten jedoch keinen Zusammenhang aufzeigen. Auch die Polymorphismen rs2270676 und rs17215437 im KCNE3-Gen schienen keine Rolle zu spielen (Sand et al, 2011). In einer polnischen Studie konnte hingegen ein signifikanter Zusammenhang zwischen chronischem Tinnitus und dem Polymorphismus rs915539 im KCNE1-Gen nachgewiesen werden (Pawelczyk et al, 2012). Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte im Rahmen einer 2009 durchgeführten Fall-Kontroll-Studie

eine mögliche Assoziation zwischen Polymorphismen im KCNE1-Gen und lärminduzierter Schwerhörigkeit. Zu diesem Zweck wurden mehr als 3860 Lärm-exponierte polnische Arbeiter, unterteilt in eine Patientengruppe mit lärminduzierter Schwerhörigkeit und eine Kontrollgruppe ohne Hörminderung genotypisiert und hinsichtlich der Allel- und Genotypverteilung verglichen. Signifikante Ergebnisse konnten für den Polymorphismus rs2070358 mit einer Häufung des Genotyps GG unter den Hörgeschädigten verzeichnet werden (Pawelczyk et al, 2009). Auch Van Laer et al. (2006) konnten eine positive Assoziation zwischen drei Polymorphismen im KCNE1-Gen und lärminduzierter Schwerhörigkeit beobachten.

### 3 Fragestellung

Die genauen pathophysiologischen Mechanismen der Krankheitsentstehung des Morbus Menière sind zwar nach wie vor unklar, es ist heute jedoch von einem multifaktoriellen Geschehen bei der Entstehung der Erkrankung auszugehen (Frejo et al, 2016; Klockars & Kentala, 2007). Sowohl Umwelt- als auch genetische Faktoren scheinen die Suszeptibilität für die Entstehung eines endolymphatischen Hydrops, der als histopathologisches Korrelat der Erkrankung gilt (Attye et al, 2018), zu beeinflussen (Strupp et al, 2019; Vrabec, 2010).

Im Rahmen von Fall-Kontroll-Studien wurden bereits einige potentielle Suszeptibilitätsgene, die eine Rolle in der Krankheitsentstehung spielen könnten, auf Assoziation mit Morbus Menière überprüft (Cabrera et al, 2014; Gallego-Martinez et al, 2018; Gazquez et al, 2013; Requena et al, 2013). Die bisherigen Ergebnisse sind jedoch sehr heterogen (Hietikko et al, 2012).

Ziel dieser Arbeit war es, einen Zusammenhang zwischen genetischen Variationen im KCNE1- und KCNE3-Gen einerseits und der Innenohrerkrankung Morbus Menière andererseits zu untersuchen. Im Speziellen sollte untersucht werden, ob Morbus Menière mit Variationen in den Polymorphismen rs1805127 im KCNE1- und rs2270676 im KCNE3-Gen assoziiert ist. Damit sollte auch der Frage nachgegangen werden, ob sich die Ergebnisse einer japanischen Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2005 (Doi et al., 2005), welche für beide Polymorphismen eine Assoziation fanden, reproduzieren lassen.

Da die bisherige Datenlage zu den untersuchten Polymorphismen inkonsistente Ergebnisse liefert, wurde das Patientenkollektiv zusätzlich in kleinere, klinisch homogenere Subgruppen unterteilt. Damit sollte untersucht werden, ob verschiedene Phänotypen eine Assoziation mit den untersuchten SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) zeigen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie, die es zum Ziel hatte, eine mögliche Assoziation zwischen der Menière-Erkrankung und den Einzelnukleotidpolymorphismen rs1805127 im KCNE1-Gen und rs2270676 im KCNE3-Gen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde bei 932 gesunden Kontrollprobanden sowie 319 Patienten mit Morbus Menière eine Genotypisierung der genannten SNPs vorgenommen. Sowohl die an Morbus Menière leidenden Patienten als auch die gesunden Kontrollprobanden wurden sorgfältig nach definierten Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt. Anhand der ermittelten Daten wurde eine statistische Analyse durchgeführt, um eine mögliche Assoziation des Genotyps der genannten SNPs mit der Erkrankung Morbus Menière zu bestimmen.

#### 4.1.1 Studienbedingungen

Die Studie wurde nach Genehmigung der lokalen Ethikkommission in München durchgeführt. Die Teilnahme aller an Menière erkrankter Patienten sowie aller gesunder Kontrollprobanden geschah auf freiwilliger Basis. Die potentiellen Studienteilnehmer wurden über Art, Inhalt und Ziel der Studie, sowie über deren Ablauf und mögliche Risiken sowohl in mündlicher als auch in schriftlicher Form informiert. Nachdem die anonymisierte Verwendung sämtlicher Daten zugesichert wurde, unterzeichneten die Probanden eine schriftliche Einverständniserklärung.

#### 4.1.2 Datengewinnung

Aufgrund der Gesamtgröße der Studienpopulation, die nötig war, um valide Ergebnisse zu generieren, wurden die Aufgabenbereiche zur Datengewinnung innerhalb der Sektion für molekulare und klinische Neurobiologie aufgeteilt.

Das eigene Aufgabengebiet umfasste vorrangig die Rekrutierung der an Morbus Menière erkrankten Patienten, welche sich über einen Zeitraum von sechs Monaten in Vollzeit erstreckte. Die Rekrutierung fand am Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum in München statt. Alle Patienten befanden sich dort zum Zeitpunkt der Teilnahme in Behandlung und/oder hatten dort eine umfangreiche Diagnostik erhalten, durch welche die Diagnose Morbus Menière gesichert wurde.

Des Weiteren umfasste die eigene Arbeit die Durchführung einer standardisierten Anamnese, die Abnahme der zur Genotypisierung benötigten Blutproben und deren Vorbereitung zur Weiterverarbeitung im molekulargenetischen Labor, sowie die Digitalisierung und Auswertung der erhobenen Daten am Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum.

Die erhobenen Daten flossen schließlich einem Pool zu, der auch Daten enthielt, die von Mitarbeitern erfasst wurden, die sich anderen Aufgabenbereichen gewidmet hatten. Dies betraf beispielsweise die Rekrutierung der Kontrollprobanden oder die Durchführung der molekulargenetischen Analyse. So konnte eine ausreichend große Stichprobe erreicht werden.

## **4.2 Studienteilnehmer**

In die Studie eingeschlossen wurden 319 an Morbus Menière erkrankte Patienten (Diagnosestellung nach den Kriterien der *AAO-HNS*) sowie 932 gesunde Kontrollpersonen. Außerdem gab es eine weitere Gruppe von Patienten, die an einer peripheren Schwindelerkrankung, jedoch nicht an Morbus Menière erkrankt waren (z.B. Benigner paroxysmaler Lagerungsschwindel, Vestibuläre Migräne, Vestibularisparoxysmie). Diese Gruppe umfasste 675 Probanden.

Alle Patienten waren mindestens 18 Jahre alt und kaukasischer Abstammung (bis mindestens zwei der vorangegangenen Generationen).

### **4.2.1 Rekrutierung der Kontrollprobanden**

Die Kontrollprobanden wurden zufällig aus dem Register des Einwohnermeldeamts München ausgewählt und zunächst schriftlich per Post zur Teilnahme an der Studie eingeladen. Das bestehende Interesse an der Teilnahme wurde durch schriftliche Rückantwort bestätigt. Im nächsten Schritt erfolgte für alle potentiellen Teilnehmer ein standardisiertes Telefoninterview. In diesem wurde über Art, Ziel und Durchführung der Studie aufgeklärt, sowie Fragen zu Herkunft, zu relevanten, insbesondere neurologischen Vorerkrankungen und zum Drogen- oder Alkoholkonsum geklärt.

Ergab das Telefoninterview keine Hinweise für das Vorliegen von Ausschlusskriterien und bestand nach wie vor Interesse an der Teilnahme seitens des Probanden, bekam dieser einen standardisierten Fragebogen per Post zugesandt. In diesem wurden allgemeine Daten (Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht), Rauchverhalten,

Vorerkrankungen und die Medikamentenanamnese abgefragt. Ergab sich weiterhin kein Anhalt für Ausschlusskriterien, wie z.B. relevante organische Erkrankungen im neurologischen (z.B. Morbus Parkinson, Demenz, Schädel-Hirn-Trauma) oder internistischen (z.B. Infektionskrankheiten wie Hepatitis oder HIV) Bereich, wurden die Probanden zur klinischen Untersuchung und Blutentnahme in die Klinik eingeladen. Dort wurden durch eine gezielte Anamneseerhebung und eine neurologische Untersuchung studienrelevante Erkrankungen ausgeschlossen und die Entnahme der für die Genotypisierung benötigten Blutproben durchgeführt.

#### **4.2.2 Rekrutierung der Patienten**

Die Rekrutierung der an Morbus Menière erkrankten Patienten fand im Zeitraum von Juli 2012 bis August 2014 im Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum statt. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Teilnahme dort in Behandlung und hatten eine umfangreiche Diagnostik erhalten, durch welche die Diagnose Morbus Menière nach den Kriterien der *AAO-HNS* (AAO-HNS, 1995) gestellt wurde (diagnostische Kriterien der *AAO-HNS* von 1995 siehe Tabelle 1). Auch Patienten, die neben Morbus Menière an einer oder mehreren anderen Schwindelerkrankungen litten, wurden in die Studie eingeschlossen. Die Diagnostik aller Patienten beinhaltete eine detaillierte Schwindelanamnese, objektivierbare Hörprüfungen sowie weitere apparative Untersuchungen zum Ausschluss anderer Ursachen.

#### Aufklärung

Zunächst wurden die potentiellen Studienteilnehmer über Art, Ziel und Durchführung der Studie sowie über mögliche Risiken aufgeklärt. Dabei wurde den Patienten insbesondere die Pseudonymisierung und Anonymisierung ihrer Daten zugesichert. Als mögliche Risiken wurden die üblichen Risiken einer venösen Blutentnahme wie Verletzungen, Irritationen der Haut an der Einstichstelle oder lokale Infektionen angeführt. Waren die Patienten nach dem Aufklärungsgespräch zur Teilnahme an der Studie bereit, wurde eine schriftliche Einverständniserklärung sowohl vom Studienteilnehmer als auch vom aufklärenden Arzt unterschrieben. Alle Teilnehmer waren über die freiwillige und unentgeltliche Teilnahme an der Studie informiert.



### Personenbezogene Daten

Im nächsten Schritt wurden die personenbezogenen Daten (Name, Vorname, Geschlecht, Adresse, Telefonnummer) des Probanden in Form einer nicht automatisierten Tabelle handschriftlich notiert. Dieses personenbezogene Dokument erhielt für jeden Probanden einen individuellen achtstelligen Pseudonymisierungscode bestehend aus einer Zahlen- und Buchstabenkombination. Dieser Pseudonymisierungscode stellte den ersten Schritt der doppelten Verschlüsselung der Daten dar.

### Anamnese

Mit Hilfe eines dreiteiligen standardisierten Anamnesebogens wurden zunächst allgemeine Angaben wie Geschlecht, Nationalität, Herkunftsland bis zur Großelterngeneration und ethnische Zugehörigkeit dokumentiert. Zudem wurden die Krankengeschichte des Studienteilnehmers und seine Familienanamnese abgefragt. Der zweite Teil des Fragebogens konzentrierte sich auf Einzelheiten zu den Symptomen der Schwindelerkrankung des Patienten. Es wurden gezielt Gangstörungen, Sehstörungen, Migräne, Hörstürze in der Vergangenheit und Schwerhörigkeit sowie deren Manifestationsalter abgefragt. Der dritte Teil des Fragebogens ging näher auf die Familienanamnese des Patienten ein. Neben allgemeinen genetischen oder neurologischen Erkrankungen wurde gezielt nach Schwindel, Gangstörungen, Sehstörungen, Migräne, Hörstürze und Schwerhörigkeit in der Familie gefragt. Diese Symptome waren bei Eltern, Großeltern, Geschwistern und Kindern relevant für die Studie, um Auskunft über eine mögliche Schwindelerkrankung innerhalb der Familie zu erhalten.

### Blutentnahme

Im Anschluss an die Anamneseerhebung wurde das zur Genotypisierung benötigte Blut venös in vorbereitete EDTA-Monovetten abgenommen. In einem letzten Dokument wurden die Probanden zu relevanten Daten wie Größe, Gewicht und Medikamentenanamnese befragt. Datum und Uhrzeit der Blutentnahme sowie der Nüchternheitsstatus des Probanden wurden ebenfalls dokumentiert. Jeder Proband erhielt schließlich einen klinischen Code, der auf dem Anamnesebogen, auf dem

Dokument zur Blutentnahme sowie auf allen mit Blut befüllten Monovetten vermerkt war.

Die Zuordnung zwischen den personenbezogenen Daten eines Patienten und seinen Ergebnissen war ab diesem Zeitpunkt nur noch über eine Verschlüsselungsdatei möglich, in welcher der Pseudonymisierungscode eines jeden Patienten dessen klinischem Code zugeordnet wurde.

## **4.3 Molekularbiologische Analyse**

### **4.3.1 DNA-Extraktion**

Die DNA-Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Qiagen DNA Blood Maxi Kit (Qiagen, Hilden) mit den in Tabelle 4 dargestellten Materialien.

#### Vorbereitung der Blutproben

Das zur Genotypisierung benötigte DNA-Material wurde aus Blutproben gewonnen. Zu diesem Zweck wurden sowohl den an Morbus Menière erkrankten Patienten als auch den gesunden Kontrollprobanden je circa 7ml venöses Vollblut in EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nürnberg) abgenommen. Durch anschließende Zentrifugation (VWR Life Science Competence Center, Erlangen) bei 3620rpm (revolutions per minute) für 12 Minuten bei 6°C wurde das Plasma von den zellulären Blutbestandteilen abgetrennt, in 200µl 96 well Matrixplatten (ABgene, Hamburg) pipettiert und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Die in der Monovette verbliebenen zellulären Blutbestandteile wurden ebenfalls bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

#### Zellyse

Zunächst wurde der Blutkuchen bei Raumtemperatur aufgetaut und mit PBS-Puffer in einem 50ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nürnberg) auf ein Volumen von jeweils 10ml ergänzt. Zur Lyse der Leukozyten wurden nun je 10ml des resuspendierten Blutkuchens mit je 500µl Qiagen Protease und je 12ml Guanidinhydrochloridhaltigem Lysepuffer versetzt. Zum Homogenisieren wurde die Lösung für 60 Sekunden auf dem Vortexer (Scientific Industries, New York, USA) gemischt und anschließend für 30 Minuten bei 70°C im Wasserbad (Memmert, Schwabhausen) inkubiert.

**Tabelle 4:** Materialien und Reagenzien zur DNA-Extraktion

<b>Material, Reagenz, Gerät</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Hersteller</b>
1xPBS-Puffer: - 8g NaCl - 0,2g KCl - 1,44g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 0,24g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - Ad 1l mit Aqua dest. - mit NaOH auf pH 7,4	Resuspendierung des Blutkuchens	Eigene Herstellung: Reagenzien von Carl Roth, Hamburg
Qiagen Protease	Zellyse	Qiagen, Hilden
GHCl-haltiger Lysepuffer	Denaturierung DNA-bindender Proteine	Qiagen, Hilden
Ethanol Rotipuran (>98% p.A.)	Entfernung der Hydrathülle	Carl Roth, Karlsruhe
Puffer AW1, GHCl-haltig	Entfernung von Zellrückständen	Qiagen, Hilden
Puffer AW2, Ethanolhaltig	Entfernung von Zellrückständen	Qiagen, Hilden
Tris-Puffer, pH<0,9	Elution der DNA	Qiagen, Hilden

#### Bindung der DNA an die Silikagelmembran

Zur Fällung der DNA aus der Lösung wurde jede Probe mit jeweils 10ml Ethanol versetzt und 2 Minuten auf dem Vortexer gemischt. Diese Lösung wurde nun auf die Silikagelsäule überführt, jeweils für 3 Minuten bei 3.000rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und so die DNA an die Silikagelmembran gebunden. Um verbleibende RNA- und Proteinreste aus dem Lysat zu entfernen, wurden 5ml eines Guanidin-HCl- (GHCl-)haltigen Puffers (Puffer AW1) zugegeben und bei 4.000rpm und RT für 2 Minuten zentrifugiert. In einem weiteren Waschschrift wurden 5ml eines ethanolhaltigen, salzarmen Puffers (Puffer AW2) zugegeben und für 15 Minuten bei

4.000rpm und RT zentrifugiert, um die GHCl-Salze des Puffers quantitativ auszuwaschen und die Silikagelsäulen zu trocknen.

#### Elution der DNA von der Silikagelmembran

Um die DNA von der Silikagelmembran zu lösen, wurde die Membran mit 0,75ml Tris-Puffer für 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend für 2 Minuten bei 5.000rpm und RT zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und die gewonnene DNA-Lösung bis zur weiteren Verwendung bei -80°C in 2ml Micro-Schraubröhrchen (Sarstedt, Nürnberg) eingefroren.

### **4.3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Für die weiteren Arbeitsschritte wurde eine einheitliche DNA-Konzentration benötigt. Um dies zu erreichen, mussten zunächst die Konzentrationen der DNA-Proben bestimmt werden, wozu die Picogreen-Methode herangezogen wurde. Bei Picogreen handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv an doppelsträngige DNA bindet. Der dadurch entstandene DNA-Farb-Komplex hat sein Absorptionsmaximum bei Licht der Wellenlänge 480nm und emittiert Licht der Wellenlänge 520nm, also im grünen Bereich sichtbares Licht. Da die gemessene Intensität des emittierten Lichts dabei mit der Menge an DNA-Farb-Komplex korreliert, kann so auf die Konzentration der DNA rückgeschlossen werden. Hierfür wurde als Referenz eine Standardkurve erstellt, wobei aus genomischer DNA der Konzentration 100ng/μl entsprechend eine Verdünnungsreihe, bestehend aus 8 Punkten mit 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 und 0 ng/μl hergestellt wurde. Anschließend konnte so eine genaue Quantifizierung der Proben-DNA vorgenommen werden. Zum Ausschluss von Messfehlern wurden sowohl die Standard-DNA-Verdünnungsreihe als auch die Proben DNA in Duplikaten gemessen.

Die dafür benötigten Materialien sind Tabelle 5 zu entnehmen. Alle Pipettierschritte wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters (Janus Automated Workstation) durchgeführt.

**Tabelle 5:** Materialien, Reagenzien und Geräte zur DNA-Konzentrationsbestimmung

<b>Material, Reagenz, Gerät</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Hersteller</b>
Human genomic DNA 100ng/ $\mu$ l	Standardverdünnungsreihe	Clontech, Mountain View, USA
96 Well Flat Bottom Plate Black	Messplatte für Standard- und Proben-DNA	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Janus Automated Workstation	Durchführung aller Pipettier- schritte	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
Thermo Fast 96 Well Plate	Vorverdünnung der Proben-DNA, Standardverdünnungsreihe	ABgene, Hamburg
Quant IT Picogreen dsDNA reagent	Fluoreszenzmessung der DNA	Invitrogen GmbH, Hamburg
Victor 3 Multilabel Counter 1420	Fluoreszenzmessung der DNA	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA

#### Vorbereitung der Messplatte

Die Proben-DNA wurde zunächst in einer separaten Platte 1:10 mit Aqua bidest. vorverdünnt, da die Konzentrationen der Proben von ca. 120 bis 150ng/ $\mu$ l außerhalb des Messbereichs der Eichkurve lagen. Währenddessen wurde die Arbeitslösung des Picogreen hergestellt. Die Lösung wurde im Verhältnis 1:156 mit Aqua bidest. verdünnt und auf dem Vortexer vermischt.

Im nächsten Schritt wurden nun in eine neue 96 *well* Platte jeweils 50 $\mu$ l Aqua bidest. in jede Vertiefung vorgelegt. In die Spalten 1 und 2 wurden nun je 5 $\mu$ l der Duplikate der Standard-Verdünnungsreihe einpipettiert, während in die Spalten 3 bis 12 jeweils 5 $\mu$ l der Proben-DNA ebenfalls in Duplikaten einpipettiert wurden. Pro Platte konnten also 40 DNA-Proben gemessen werden. Im letzten Schritt gab der Roboter je 145 $\mu$ l der vorbereiteten Picogreen-Lösung in jedes *well* der Platte, so dass sich eine Endverdünnung des Picogreens von 1:200 ergab.

### Messung der DNA-Konzentration und Konzentrationseinstellung

Der Greifarm der Janus Workstation überführte die Platte schließlich zur Messung in das Photometer (Victor3 1420 Multilabelcounter). Um eine homogene Durchmischung der Reagenzien zu erhalten, wurde die Platte für 30 Sekunden in horizontaler Ebene in Doppellellipsen geschüttelt. Der DNA-Farb-Komplex wurde bei einer Messzeit von 0,1 Sekunden mit Licht der Wellenlänge 485nm angeregt und dessen Emissionen wiederum bei 520nm gemessen. Die Fluoreszenzwerte wurden vom Messgerät direkt an den Computer weitergeleitet, der zunächst die Mittelwerte der Duplikate berechnete und anschließend anhand der Messwerte der Eichkurve die Konzentrationen der Proben-DNA berechnete, ebenso wie die benötigten Volumina an Proben-DNA und Aqua bidest., um eine Verdünnung von 50ng/μl herzustellen.

Die Arbeitslösung wurde schließlich vollautomatisch mit Hilfe der Janus Automated Workstation auf eine Konzentration von 50ng/μl und 500μl Endvolumen eingestellt und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

### **4.3.3 Genotypisierung**

Zur Genotypisierung der SNPs wurde das Prinzip der MALDI-TOF-Massenspektrometrie (**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onisation, **T**ime **O**f **F**light) angewandt, ein Verfahren, mit dessen Hilfe die molekulare Masse der DNA-Sequenz analysiert und somit der vorliegende Genotyp bestimmt werden kann.

Beginnend mit einer konventionellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die der Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Abschnitts dient, wird im zweiten Schritt das so genannte iPlex-Verfahren durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine modifizierte PCR, bei der allelspezifische Extensionsprimer um genau eine, dem polymorphen Locus komplementäre, Base verlängert werden. Da jede Base eine definierte molekulare Masse besitzt, kann nun mittels MALDI-TOF der Genotyp bestimmt werden. Die Besonderheit des iPlex-Verfahrens besteht außerdem darin, dass es sogenannte Multiplex-Reaktionen ermöglicht, was bedeutet, dass in einem einzigen Reaktionsansatz bis zu 36 PCRs gleichzeitig ablaufen können.

Die in die Genotypisierung einzuschließenden SNPs rs1805127 an Position 22.12 auf Chromosom 21 im KCNE1-Gen und rs2270676 an Position 13.4 auf Chromosom 11 im KCNE3-Gen wurden mit der Software AssayDesign 3.1 (Sequenom, San Diego) zu Multiplexen zusammengestellt. Dieses Programm entwirft für jeden zu

genotypisierenden SNP ein Primerset aus zwei PCR-Primern und einem Extensionsprimer und ermittelt die optimale Plexzusammenstellung.

### Konventionelle Polymerasekettenreaktion

Um den Genotyp eines SNPs zu bestimmen, war es zunächst nötig, die den SNP flankierende DNA-Sequenz mittels konventioneller PCR zu vervielfältigen. Tabelle 6 zeigt die Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die konventionelle PCR.

**Tabelle 6:** Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die konventionelle PCR

<b>Material, Reagenz, Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
dNTP Set, 100nM	ABene, Hamburg
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
HotStar Taq DNA Polymerase (5U/μl)	Qiagen, Hilden
MgCl <sub>2</sub> , 25mM	Qiagen, Hilden
Primer	Qiagen, Hilden
PCR-Puffer 10x	Metabion, Martinsried
Thermo Fast 96 Well Plate	ABgene, Hamburg
Thermo Fast 384 Well Plate	ABgene, Hamburg
PCR Thermal Cycler	Applied Biosystems, Foster City, USA

Die folgenden Pipettierschritte wurden vom Pipettierroboter Microlab ausgeführt. Zunächst wurde die Arbeitslösung der DNA von 50ng/μl im Verhältnis 1:10 verdünnt, in dem jeweils 90μl sterilfiltriertes Wasser in jede Vertiefung einer 96 *well* Platte vorgelegt und anschließend je 10μl Arbeitslösung hinzu pipettiert wurden. Separat wurde der für die PCR benötigte Mastermix aus den in Tabelle 7 aufgeführten Reagenzien hergestellt.

**Tabelle 7:** Eingesetzte Volumina und Konzentrationen der einzelnen Reagenzien des Mastermix in der konventionellen PCR am Beispiel eines 10xPlexes

Reagenz	Konzentration/5 $\mu$ l	Volumen für eine Reaktion (inkl. 25% Überhang)	Volumen für 384 Reaktionen (inkl. 25% Überhang)
Wasser		1,850 $\mu$ l	1368 $\mu$
PCR-Puffer 10x	1,25x	0,625 $\mu$ l	300 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> , 25mM	1,625 mM	0,325 $\mu$ l	156 $\mu$ l
dNTP Mix, 25mM	500 $\mu$ M	0,100 $\mu$ l	48 $\mu$ l
Primer Mix, 500nM jeweils	100 nM	1,000 $\mu$ l	480 $\mu$ l
Hotsstar Taq Polymerase (5U/ $\mu$ l)	0,5 U/Reaktion	0,100 $\mu$ l	48 $\mu$ l
Total	-	4,000 $\mu$ l	2400 $\mu$ l

Auf eine 384 *well* Platte wurden nun je 4 $\mu$ l des Mastermix in jede Vertiefung vorgelegt, je 2,5 $\mu$ l der DNA-Lösung, was einer Menge von 12,5ng DNA entsprach, hinzu pipettiert und für etwa eine Minute zentrifugiert. Mit Hilfe eines Thermocyclers wurden die idealen Temperaturbedingungen für die folgenden Reaktionsschritte geschaffen:

Initiale Denaturierung:	95°C für 5 Minuten	} 45 Zyklen
Denaturierung:	95°C für 20 Sekunden	
Annealing:	56°C für 30 Sekunden	
Elongation:	72°C für eine Minute	
Finale Elongation:	72°C für 3 Minuten	
Abkühlen:	12°C	



Da bei der PCR dNTPs im Überschuss zugegeben wurden, mussten die verbleibenden Nukleotide entfernt werden, da diese eine potentielle Störgröße bei der folgenden Extensionsreaktion darstellten. Das Enzym Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) besitzt die Eigenschaft, dNTPs bei niedrigen Temperaturen zu dephosphorylieren und denaturiert selbst bei Temperaturen über 85°C. Zu jeder PCR wurden 2µl SAP-Mix (siehe Tabelle 9) mit Hilfe des Multimek Pipettierroboters hinzugefügt, für 40 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 Minuten auf 85°C erhitzt. Die Lösung wurde schließlich auf 4°C abgekühlt. Tabelle 8 zeigt die Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die SAP-Reaktion.

**Tabelle 8:** Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die SAP-Reaktion

<b>Material, Reagenz, Gerät</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Hersteller</b>
Gene Amp PCR System 9700	Konventionelle PCR	Applied Biosystems, Foster City, USA
SAP-Puffer 10x	Dephosphorylierung uninkorporierter dNTPs	Sequenom, San Diego, USA
SAP-Enzym	Dephosphorylierung uninkorporierter dNTPs	Sequenom, San Diego, USA
Multimek Pipettierroboter	Zugabe des SAP-Mastermix zum PCR-Produkt	Beckmann, Fullerton, USA

**Tabelle 9:** Zusammensetzung des SAP-Mastermix

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen für eine Reaktion (inkl. 25% Überhang)</b>	<b>Volumen für 384 Reaktionen</b>
Wasser	1,530µl	734,4µl
10x SAP Puffer	0,170µl	81,6µl
SAP-Enzym	0,300µl	144,0µl
Total	2,000µl	960,0µl

iPlex-Reaktion

In der nun folgenden iPlex-Reaktion sollten sequenzspezifische Extensionsprimer, die unmittelbar vor den zu untersuchenden SNPs binden, jeweils um genau eine Base, die komplementär zum untersuchten SNP ist, verlängert werden. Dieses Verfahren wird auch als Single Base Extension (SBE) oder Einzelbasenverlängerung bezeichnet.

**Tabelle 10:** Reagenzien des iPlex Mastermix

Reagenz	Hersteller
Primer Mix, 7 $\mu$ M bis 14 $\mu$ M	Sequenom, San Diego, USA
iPlex Puffer	Sequenom, San Diego, USA
iPlex Enzym	Sequenom, San Diego, USA
iPlex Terminationmix	Sequenom, San Diego, USA
Extensionsprimer	Metabion, Martinsried

Im Gegensatz zur konventionellen PCR werden massenmodifizierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) für die Reaktion verwendet, da dank ihrer fehlenden 3'-Hydroxylgruppe keine weiteren Nukleotide an ihnen binden können und es somit zum Kettenabbruch kommt. Die Extensionsprimer werden also nur um die zum SNP komplementäre Base erweitert und weisen, je nach Base, eine spezifische Masse auf, welche wiederum im MALDI-TOF gemessen werden kann.

Alle für den Extensionscocktail benötigten Reagenzien (siehe Tabelle 10), bis auf das iPlex-Enzym, wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, in entsprechender Menge (siehe Tabelle 11) in ein 15ml Röhrchen vorgelegt, auf einem Vortexer gemischt und abzentrifugiert.

**Tabelle 11:** Eingesetzte Konzentrationen und Volumina für die iPlex Reaktion

Reagenz	Konzentration/9µl	Volumen für eine Reaktion (inkl. Überhang)	Volumen für 384 Reaktionen (inkl. Überhang)
Wasser		0,755µl	362,40µl
iPlex Puffer	0,222x	0,200µl	96,00µl
iPlex Terminationsmix	1x	0,200µl	96,00µl
Primer Mix (7µM bis 14µM)	0,625µM bis 1,25µM	0,804µl	385,92µl
iPlex Enzym	1x	0,041µl	19,68µl
<b>Total</b>		2,000µl	960,00µl

Unmittelbar vor Reaktionsstart wurde das iPlex-Enzym dem Reaktionsgemisch zugeführt. Der Pipettierroboter pipettierte nun je 2µl des iPlex-Cocktails zu jedem Produkt der SAP-Reaktion. Anschließend wurden die Platten abzentrifugiert und in den Thermocycler zur Extensionsreaktion überführt. Dort wurden folgende Reaktionsschritte ausgeführt:

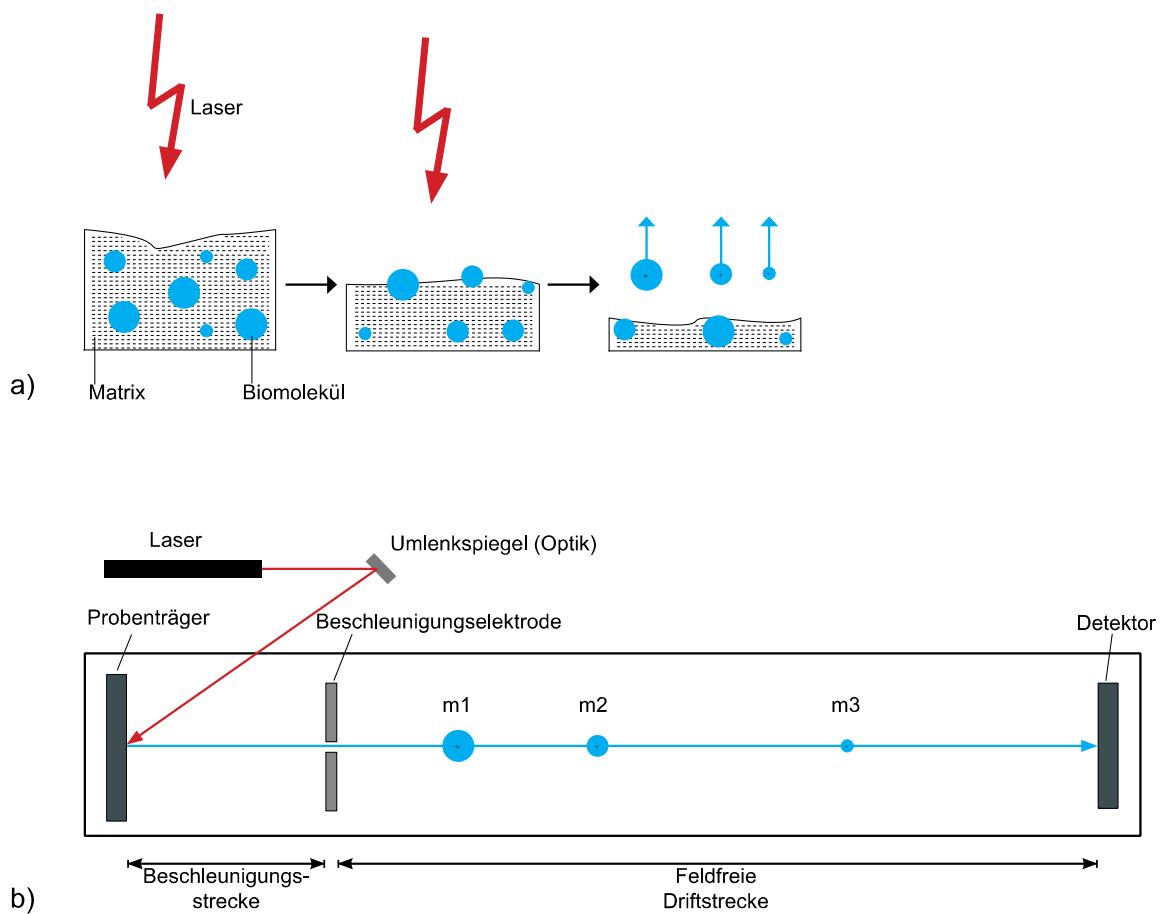
Denaturierung:	94°C für 30 Sekunden		
	94°C für 5 Sekunden		
Annealing:	52°C für 5 Sekunden	} 5	} 40 Zyklen
Extension:	80°C für 5 Sekunden		
	72°C für 3 Minuten		
Abkühlen:	4°C		

Bevor die Produkte aus der Extensionsreaktion im Massenspektrometer analysiert werden konnten, war es zunächst nötig, diese zu entsalzen, da sie aufgrund ihrer negativen Ladung (der Nukleinsäuren) eine hohe Bindungsneigung zu Kationen

zeigen, vor allem zu Natrium und Kalium. Durch die zusätzliche Masse eines Natrium- oder Kaliumions könnten im Massenspektrometer falsche Genotypen bestimmt werden. Um dies zu verhindern, wurden die Analyten aus der Extensionsreaktion mit einem Ionenaustauschharz behandelt. Zu jeder Reaktion wurden 6mg des Ionenaustauschharzes Clean Resin (Sequenom, San Diego) sowie 25µl sterilfiltriertes Wasser gegeben. Nach 10 Minuten, in denen sich eine Homogenisierung des Reaktionsprodukts einstellte, wurden die Platten bei 4.000rpm für 5 Minuten abzentrifugiert.

### MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die gereinigten Analyten konnten jetzt im MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert werden. Bei diesem Verfahren wird der Bioanalyt zunächst mit einem geeigneten organischen Molekül, einer Matrix, gemischt und es kommt zur Kokristallisation zwischen Analyt und Matrix. Im nächsten Schritt wird ein kurzer Laserimpuls über einen Umlenkspiegel auf den Kokristall gelenkt. Da die Matrix den Laser absorbiert, wird der Analyt unter Ionisation ins Vakuum freigesetzt. Aufgrund der Ionisation liegt der Analyt jetzt als einfach positiv geladenes Molekül in der Gasphase vor. Durch die negative Ladung einer so genannten Beschleunigungselektrode wird der Analyt im elektrostatischen Feld beschleunigt. Nach dem Passieren der Beschleunigungselektrode tritt der Analyt in die definierte feldfreie Driftstrecke ein. Der Flugzeitanalysator misst die Zeit bis zum Auftreffen auf den Detektor. Ionen größerer Masse sind dabei langsamer (Schematische Darstellung siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der MALDI-TOF Massenspektrometrie

a) Freisetzung des Analyten aus der Matrix

b) Messung der Flugzeit

Als Matrix wurde die organische Säure 3-Hydroxypicolinsäure verwendet, welche bereits auf einem Siliziumchip als Probenträger in 384 Matrixspots aufgetragen war. Die Probenübertragung von der 384 well Platte auf den Siliziumchip erfolgte durch den MassARRAY Point Nanodispenser, der 15nl jeder Probe auf den Siliziumchip übertrug. Um das Analysesystem zu kalibrieren, wurden auf den Siliziumchip außerdem 8 Oligonukleotide bekannter Masse aufgetragen. Der Chip wurde nun in das Massenspektrometer überführt, wo er für einige Nanosekunden einem Laserimpuls ausgesetzt war. Die Zeitspanne zwischen Laserimpuls und dem Auftreffen der ionisierten Moleküle auf dem Detektor wurde direkt an einen Computer weitergeleitet, der aus den Daten den spezifischen Genotyp jedes DNA-Fragments berechnen konnte. Alle verwendeten Materialien sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software zur Genotypisierung mittels MALDI-TOF

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
<b>3-Punkt-Kalibrant</b>	Kalibrierung der Massenspektren	Sequenom, San Diego, USA
<b>MassARRAY Point Nanodispenser</b>	Applikation der Extensionsprodukte auf SepctroCHIPs	Sequenom, San Diego, USA
<b>MassARRAY Analyzer 4</b>	Massenspektrometrische Analyse der Extensionsprodukte	Sequenom, San Diego, USA
<b>SpectroCHIPs</b>	Probenträger mit Matrixdroplets (Siliziumchip)	Sequenom, San Diego, USA
<b>TyperAnalyzer 3.4.0.18</b>	Spetrenauswertung	Sequenom, San Diego, USA

#### 4.4 Qualitätskontrolle und statistische Analyse

Damit die mittels MALDI-TOF bestimmten Genotypen der zu untersuchenden SNPs in die statistische Auswertung eingehen konnten, mussten einige Qualitätskriterien erfüllt sein. Zunächst wurde mithilfe der TyperAnalyzer (Firma Sequenom, San Diego) Software ein *clusterplot* für jeden der zu untersuchenden SNPs erstellt. Hierbei wurden alle Proben nach ihren Genotypen sortiert, in verschiedenen Gruppen dargestellt und nur dann als valide befunden, wenn sich die Cluster der verschiedenen Genotypen als geschlossene Gruppen klar voneinander getrennt präsentierten. Des Weiteren wurde auf jeder der untersuchten 96 *well* DNA-Platten je eine Blindprobe an unterschiedlicher Position platziert, so dass jede Platte anhand ihrer Blindprobe eindeutig identifiziert werden konnte. Nach dem gleichen Prinzip wurden Kontrollproben mit jeweils identischem Genotyp auf den Platten verteilt, die in der Prozessierung alle den gleichen Genotyp aufweisen mussten. Ebenfalls auf jeder Platte wurde eine Referenzprobe des *Centre d'Etude du Polymorphisme Humain* (CEPH) platziert, deren Genotypen in der HapMap Datenbank (2003) frei einsehbar waren. Die mitprozessierten CEPH-Proben mussten dem zu erwartenden Genotyp entsprechen, damit die Ergebnisse für den zu untersuchenden Polymorphismus der weiteren Auswertung zugeführt werden konnten.

Alle Ergebnisse, die durch die beschriebenen Qualitätskriterien als valide eingestuft werden konnten, wurden nun auf ihre *Callrate* überprüft. Für die weitere Auswertung wurden nur Ergebnisse berücksichtigt, bei denen mindestens 80% aller SNPs in einem Plex für einen Probanden einen auswertbaren Genotyp ergaben, was einer Probanden-Callrate von 0,8 entsprach. Für die SNP-Callrate wurde eine Grenze von 0,9 festgelegt. Das bedeutet, bei jedem SNP musste der Anteil an erfolgreich bestimmten Genotypen im Verhältnis zur maximal möglichen Anzahl an Genotypen bei mindestens 90% oder höher liegen.

Ob die Verteilung der Allele und Genotypen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg-Equilibrium, HWE) lag, wurde mit Hilfe des Fisher's Exact Test berechnet. SNPs, deren Genotypverteilung außerhalb des HWE lag ( $p \leq 0,05$ ), wurden genauer geprüft und gegebenenfalls ausgeschlossen. Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung von PLINK (PLINK v1.07, Purcell et al. 2007) und R v 2.13.0 (R Development Core Team, 2011) durchgeführt.

Mit Hilfe der logistischen Regression im additiven, dominanten und rezessiven Modell wurde der Einfluss der Genotypverteilung auf die unterschiedlichen Krankheitsausprägungen untersucht. Für das additive Modell wird ein Gen-Dosis-Effekt angenommen, bei dem jede Kopie des selteneren Allels additiv zum Risiko bzw. Phänotyp beiträgt. Das Risiko der Heterozygoten liegt entsprechend immer auf Hälfte der Homozygoten. Im dominanten Modell werden für die Testung auf Dominanz des selteneren Allels die Träger der homozygoten Genotypen des selteneren Allels den Genotypträgern mit dem häufigeren Allel gegenüber gestellt (Heterozygote und Homozygote für das häufigere Allel). Im rezessiven Modell (Test auf "Rezessivität" des selteneren Allels) werden die Träger der homozygoten Genotypen, die das seltenere Allel enthalten, mit den Heterozygoten in einer Gruppe zusammengefasst und den homozygoten Trägern des häufigeren Allels gegenübergestellt. Alter und Geschlecht gingen dabei als binäre bzw. als kontinuierliche Covariablen in die Berechnungen mit ein. Für alle statistischen Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  festgelegt,  $p$ -Werte  $\leq 0,1$  wurden als Trend zur Signifikanz gewertet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Stichprobenbeschreibung

Die Patientengruppe umfasste 319 an Morbus Menière erkrankte Patienten (Diagnosestellung nach *AAO-HNS*) zwischen 19 und 88 Jahren (im Durchschnitt 60,5 Jahre alt). Darunter befanden sich 53,9% männliche und 46,1% weibliche Patienten. Das Kollektiv der Kontrollprobanden umfasste 932 gesunde Personen im Alter von 18 bis 79 Jahren (im Durchschnitt 60,7 Jahre alt), darunter 53,4% Männer und 46,6% Frauen. Die Studie umfasste außerdem eine zweite Kontrollgruppe von an anderen Schwindelerkrankungen (z.B. Benigner peripherer paroxysmaler Lagerungsschwindel, Vestibuläre Migräne, Vestibularisparoxysmie) außer Morbus Menière leidender Patienten. Die Teilnehmer dieser Gruppe waren zwischen 18 und 93 Jahren alt (im Durchschnitt 56,7 Jahre alt) und umfasste 44,6% Männer und 55,4% Frauen. Die Gruppe der Menière-Patienten wurde für weitergehende Analysen in mehrere Untergruppen unterteilt. Die im Folgenden gebrauchten Abkürzungen werden hier erläutert.

MM	= Patienten, die an Morbus Menière und möglicherweise an einer oder mehreren zusätzlich diagnostizierten peripheren Schwindelerkrankung/en erkrankt waren
MMm	= Patienten, die ausschließlich an Morbus Menière und keiner zusätzlich diagnostizierten peripheren Schwindelerkrankung erkrankt waren (Monodiagnose)
MMbds	= Patienten, die auf beiden Innenohren an Morbus Menière erkrankt waren (ohne weitere periphere Schwindelerkrankung)
MMli	= Patienten, die ausschließlich auf dem linken Innenohr an Morbus Menière erkrankt waren (ohne weitere periphere Schwindelerkrankung)
MMre	= Patienten, die ausschließlich auf dem rechten Innenohr an Morbus Menière erkrankt waren (ohne weitere periphere Schwindelerkrankung)
DSGZ	= Patienten mit einer oder mehreren peripheren Schwindelerkrankung/en außer Morbus Menière

In die Gruppe der an Morbus Menière und möglicherweise einer oder mehreren weiteren peripheren Schwindelerkrankungen leidender Patienten wurden unter



anderem auch Probanden der anderen Patientengruppe (Monodiagnosen, rechtsseitig, linksseitig und beidseitig Erkrankte) eingeschlossen.

Die fünf Stichproben wurden jeweils in Bezug auf ihre Genotypverteilung mit der Kontrollgruppe gesunder Probanden verglichen. Außerdem wurde die Stichprobe der ausschließlich an Morbus Menière erkrankten Patienten (MMm) mit der Gruppe der an anderen Schwindelerkrankungen leidenden Patienten (DSGZ) verglichen. Die Alters- und Geschlechterverteilung der verschiedenen Stichproben ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13:** Alters- und Geschlechterverteilung der Stichproben

	<b>MM</b>	<b>MMm</b>	<b>MMbds</b>	<b>MMli</b>	<b>MMre</b>	<b>Kon</b>	<b>DSGZ</b>
<b>Alter (Jahre)</b>	60,49/	60,68/	61,38/	58,82/	61,73/	58,60/	56,71/
<b>Mittelwert/ SD</b>	13,397	13,704	12,363	12,094	13,448	12,714	16,471
<b>Geschlecht</b>							
<b>Männlich (n)</b>	172	121	22	70	65	498	301
<b>(%)</b>	(53,9)	(60,2)	(55,0)	(64,2)	(48,5)	(53,4)	(44,6)
<b>Weiblich (n)</b>	147	80	18	39	69	434	374
<b>(%)</b>	(46,1)	(39,8)	(45,0)	(35,8)	(51,5)	(46,6)	(55,4)
<b>Gesamt (n)</b>	319	201	40	109	134	932	675

SD = Standardabweichung; n = Anzahl; Kon = Kontrollgruppe

MM = an Morbus Menière und zusätzlichen Schwindelerkrankungen leidende Probanden

MMm = ausschließlich an Morbus Menière leidende Patienten

MMbds = beidseitig an Morbus Menière leidende Patienten

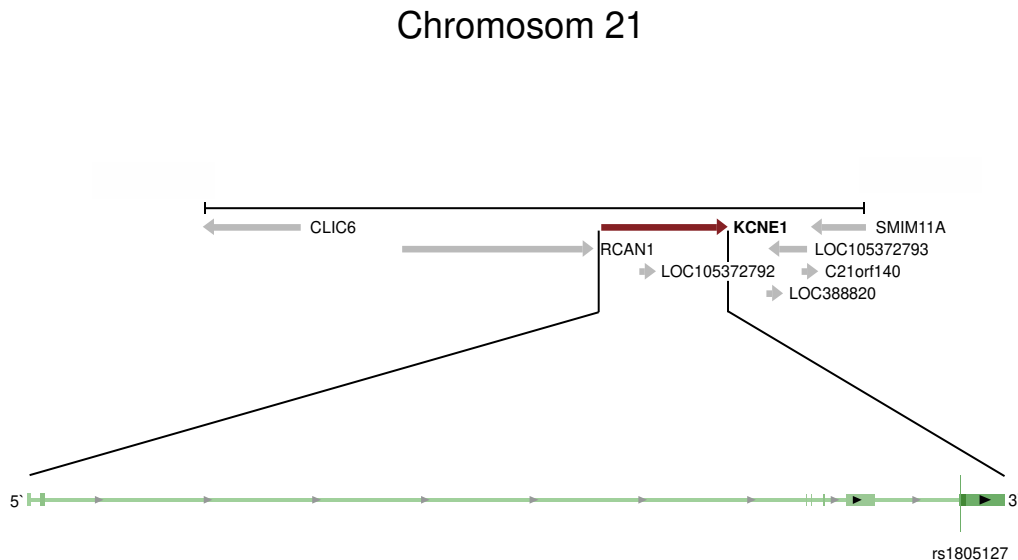
MMli = ausschließlich linksseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMre = ausschließlich rechtsseitig an Morbus Menière leidende Patienten

DSGZ = an anderen peripheren Schwindelerkrankungen (außer Morbus Menière) leidende Patienten

Alters- und Geschlechterverteilung waren in den verschiedenen Patienten- und Kontrollgruppen ähnlich. Insgesamt war der Anteil männlicher Probanden sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den meisten Patientengruppen höher als der Anteil weiblicher Probanden. Lediglich in der Gruppe der ausschließlich rechtsseitig an Menière Erkrankten lag der Anteil weiblicher Probanden mit 51,5% über dem der männlichen. Alter und Geschlecht wurden als Covariablen in die Berechnungen berücksichtigt.

## 5.2 Analyse des SNP rs1805127 im KCNE1-Gen



**Abbildung 4:** Die Lage des SNP rs1805127 im KCNE1-Gen auf Chromosom 21  
Kästchen = Exons; Verbindungsline = Introns; Pfeile = Leserichtung

Der untersuchte SNP rs1805127 liegt im KCNE1-Gen auf Chromosom 21 im Bereich des siebten Exons (siehe Abbildung 4). Durch den Austausch der Basen Adenin durch Guanin kommt es zu einer *Missense*-Mutation und damit zum Austausch der Aminosäuren Serin gegen Glycin und zur Veränderung des Genprodukts.

### 5.2.1 Hardy-Weinberg-Equilibrium

Zunächst wurden die Genotypverteilungen in den einzelnen Gruppen auf Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz (HWE) geprüft. Das HWE geht von einer idealen Population aus, in der es keine Phänomene wie Mutation, Selektion oder Migration gibt, die den Genpool beeinflussen könnten und in der Panmixie herrscht. In einer solchen, nicht realen Population wäre die Genotypverteilung der ersten Tochtergeneration ausschließlich von der Allelfrequenz der Elterngeneration abhängig und würde sich in den darauffolgenden Generationen nicht mehr verändern.

**Tabelle 14:** HWE des Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen in den Gesamtstichproben

Gruppe	Genotypanzahl (n (%))			p-Wert HWE
	AA	AG	GG	
<b>MM + Kon</b>	169 (13,6)	567 (45,5)	509 (40,9)	0,582
<b>MMm + Kon</b>	154 (13,6)	512 (45,4)	462 (41,0)	0,520
<b>MMbds + Kon</b>	135 (13,9)	445 (46,0)	388 (40,1)	0,679
<b>MMli + Kon</b>	144 (13,9)	478 (46,1)	415 (40,0)	0,739
<b>MMre + Kon</b>	155 (14,6)	473 (44,6)	432 (40,8)	0,167
<b>MMm + DSGZ</b>	157 (17,0)	392 (42,5)	373 (40,5)	0,823

HWE = Hardy-Weinberg-Equilibrium; n = Anzahl; Kon = Kontrollgruppe

MM = an Morbus Menière und zusätzlichen Schwindelerkrankungen leidende Probanden

MMm = ausschließlich an Morbus Menière leidende Patienten

MMbds = beidseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMli = ausschließlich linksseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMre = ausschließlich rechtsseitig an Morbus Menière leidende Patienten

DSGZ = an anderen peripheren Schwindelerkrankungen (außer Morbus Menière) leidende Patienten

Trotz des modellhaften Charakters des Hardy-Weinberg-Gesetzes kann es insbesondere auf größere Stichproben in der Populationsgenetik angewendet werden. Die Genotypverteilung lag für alle Stichproben im HWE (siehe Tabellen 14). Lediglich in der Subgruppe der beidseits an Menière erkrankten Patienten lag die Genotypverteilung leicht außerhalb des HWE (siehe Tabellen 15).

**Tabelle 15:** HWE des Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen in den einzelnen Untergruppen

Gruppe	Genotypanzahl (n (%))			p-Wert HWE
	AA	AG	GG	
<b>Kontrollen</b>	134 (14,4)	421 (45,4)	373 (40,2)	0,399
<b>DSGZ</b>	87 (12,9)	301 (44,8)	284 (42,3)	0,613
<b>MM</b>	35 (11,0)	146 (46,1)	136 (42,9)	0,709
<b>MMm</b>	20 (10,0)	91 (45,5)	89 (44,5)	0,748
<b>MMbds</b>	1 (2,5)	24 (60,0)	15 (37,5)	<b>0,031</b>
<b>MMli</b>	10 (9,2)	57 (47,7)	42 (54,1)	0,207
<b>MMre</b>	21 (15,9)	52 (39,4)	59 (44,7)	0,128

HWE = Hardy-Weinberg-Equilibrium; n = Anzahl; Kon = Kontrollgruppe

MM = an Morbus Menière und zusätzlichen Schwindelerkrankungen leidende Probanden

MMm = ausschließlich an Morbus Menière leidende Patienten

MMbds = beidseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMli = ausschließlich linksseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMre = ausschließlich rechtsseitig an Morbus Menière leidende Patienten

DSGZ = an anderen peripheren Schwindelerkrankungen (außer Morbus Menière) leidende Patienten

rot markiert: signifikante Abweichung vom HWE

### 5.2.2 Assoziationsanalyse

Im Rahmen der Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wurde der SNP rs1805127 im KCNE1-Gen mittels logistischer Regression auf eine mögliche Assoziation mit Morbus Menière untersucht. Hierzu wurde die Genotypverteilung der einzelnen Probandengruppen mit der Genotypverteilung der Kontrollgruppe im additiven Modell verglichen.

Der Genotyp AG lag in allen Patientengruppen sowie auch in der Gruppe der gesunden Kontrollen und in der DSGZ-Gruppe am häufigsten vor, gefolgt vom Genotypen AA. Der Genotyp GG lag in allen Stichproben am seltensten vor. Es zeigte sich in keinem der Stichprobenvergleiche ein signifikanter Unterschied der Genotypverteilung zwischen den Gruppen (siehe Tabelle 16).

**Tabelle 16:** Genotypverteilung des Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen im additiven Modell

Gruppe	Genotyp AA / AG / GG (n (%))		
	Pat	Kon	p-Wert
<b>MM vs. Kon</b>	35/146/136 (11,0/46,1/42,9)	134/421/373 (14,4/45,4/40,2)	0,224
<b>MMm vs. Kon</b>	20/91/89 (10,0/45,5/44,5)	134/421/373 (14,4/45,4/40,2)	0,155
<b>MMbds vs. Kon</b>	1/24/15 (2,5/60,0/37,5)	134/421/373 (14,4/45,4/40,2)	0,465
<b>MMli vs. Kon</b>	10/57/42 (9,2/52,3/38,5)	134/421/373 (14,4/45,4/40,2)	0,655
<b>MMre vs. Kon</b>	21/52/59 (15,9/39,4/44,7)	134/421/373 (14,4/45,4/40,2)	0,766
<b>MMm vs. DSGZ</b>	20/91/89 (10,0/45,5/44,5)	87/301/284 (12,9/44,8/42,3)	0,520

Pat = Patienten; Kon = Kontrollen; n = Anzahl

MM = an Morbus Menière und zusätzlichen Schwindelerkrankungen leidende Probanden

MMm = ausschließlich an Morbus Menière leidende Patienten

MMbds = beidseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMli = ausschließlich linksseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMre = ausschließlich rechtsseitig an Morbus Menière leidende Patienten

DSGZ = an anderen peripheren Schwindelerkrankungen (außer Morbus Menière) leidende Patienten

Im nächsten Schritt wurde eine Assoziation der möglichen Allelausprägung A und G des SNP rs1805127 mit dem Krankheitsstatus untersucht. Dazu diente der Vergleich der Gruppe der A-Allel-Träger (Genotypen AA und AG) mit der Gruppe der Homozygoten für GG (dominantes Modell), sowie die der G-Allel-Träger (AG und GG) mit der Gruppe der Homozygoten für AA (rezessives Modell).

Auch hier zeigte sich in keiner der Stichproben ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen (siehe Tabelle 17). Bei der Berechnung des rezessiven Modells für die beidseitig an Menière erkrankten Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen zeigte sich ein Trend zur Signifikanz.

**Tabelle 17:** Genotypverteilung des Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen im dominanten und rezessiven Modell

Gruppe	Dominantes Modell (Genotyp AA+AG / GG)			Rezessives Modell (Genotyp AA / AG+GG)		
	Pat (n (%))	Kon (n (%))	p-Wert	Pat (n (%))	Kon (n (%))	p-Wert
<b>MM vs. Kon</b>	181/136 (57,1/42,9)	555/373 (59,8/40,2)	0,479	35/282 (11,0/89,0)	134/794 (14,4/85,6)	0,158
<b>MMm vs. Kon</b>	111/89 (55,5/44,5)	555/373 (59,8/40,2)	0,333	20/180 (10,0/90,0)	134/794 (14,4/85,6)	0,146
<b>MMbds vs. Kon</b>	25/15 (62,5/37,5)	555/373 (59,8/40,2)	0,680	1/39 (2,5/97,5)	134/794 (14,4/85,6)	<b>0,071</b>
<b>MMli vs. Kon</b>	67/42 (61,5/38,5)	555/373 (59,8/40,2)	0,706	10/99 (9,2/90,8)	134/794 (14,4/85,6)	0,156
<b>MMre vs. Kon</b>	73/59 (55,3/44,7)	555/373 (59,8/40,2)	0,413	21/111 (15,9/84,1)	134/794 (14,4/85,6)	0,575
<b>MMm vs. DSGZ</b>	111/89 (55,5/44,5)	388/284 (57,7/42,3)	0,518	20/180 (10,0/90,0)	87/585 (12,9/87,1)	0,165

Pat = Patienten; Kon = Kontrollen; n = Anzahl

MM = an Morbus Menière und zusätzlichen Schwindelerkrankungen leidende Probanden

MMm = ausschließlich an Morbus Menière leidende Patienten

MMbds = beidseitig an Morbus Menière leidende Patienten

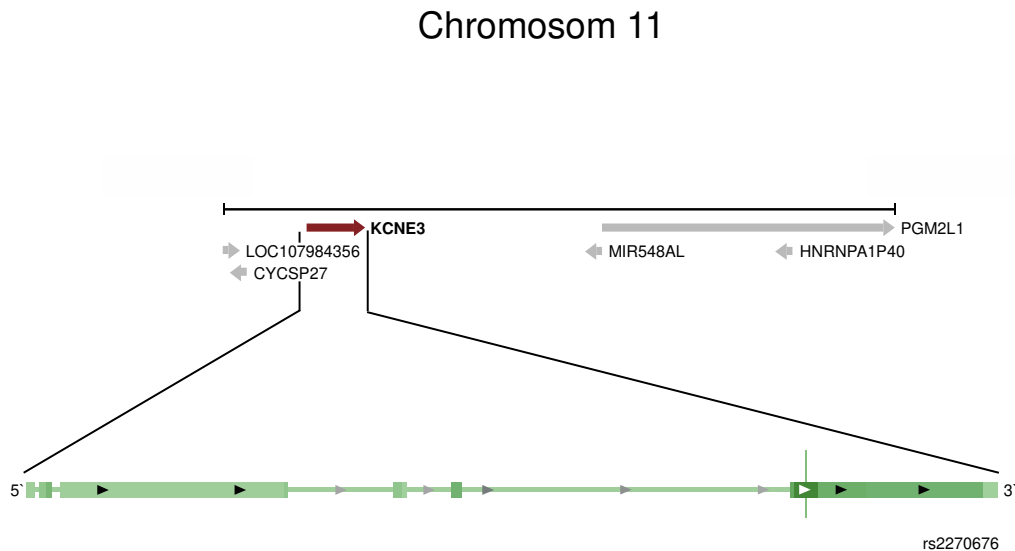
MMli = ausschließlich linksseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMre = ausschließlich rechtsseitig an Morbus Menière leidende Patienten

DSGZ = an anderen peripheren Schwindelerkrankungen (außer Morbus Menière) leidende Patienten

orange markiert: Trend zur Signifikanz

### 5.3 Analyse des SNP rs2270676 im KCNE3-Gen



**Abbildung 5:** Die Lage des SNP rs2270676 im KCNE3-Gen auf Chromosom 11  
Kästchen = Exons; Verbindungslinie = Introns; Pfeile = Leserichtung

Der untersuchte SNP rs2270676 liegt im KCNE3-Gen auf Chromosom 11 im Bereich des sechsten Exons. Das Genprodukt bleibt durch den Austausch der Basen Thymin gegen Cytosin unverändert.

#### 5.3.1 Hardy-Weinberg-Equilibrium

Auch für den SNP rs2270676 im KCNE3-Gen lag die Genotypverteilung für alle Stichgruppen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18:** HWE des Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen in den Gesamtstichproben

Gruppe	Genotypanzahl (n (%))			p-Wert HWE
	TT	TC	CC	
<b>MM + Kon</b>	969 (79,2)	239 (19,5)	16 (1,3)	0,771
<b>MMm + Kon</b>	879 (79,2)	216 (19,4)	15 (1,4)	0,648
<b>MMbds + Kon</b>	758 (79,5)	186 (19,5)	10 (1,0)	0,866
<b>MMli + Kon</b>	797 (78,2)	210 (20,6)	12 (1,2)	0,759
<b>MMre + Kon</b>	832 (79,5)	203 (19,4)	12 (1,1)	1,000
<b>MMm + DSGZ</b>	671 (79,2)	164 (19,4)	12 (1,4)	0,389

HWE = Hardy-Weinberg-Equilibrium; n = Anzahl; Kon = Kontrollgruppe

MM = an Morbus Menière und zusätzlichen Schwindelerkrankungen leidende Probanden

MMm = ausschließlich an Morbus Menière leidende Patienten

MMbds = beidseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMli = ausschließlich linksseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMre = ausschließlich rechtsseitig an Morbus Menière leidende Patienten

DSGZ = an anderen peripheren Schwindelerkrankungen (außer Morbus Menière) leidende Patienten

Tabelle 19 zeigt die Überprüfung der Genotypverteilung der einzelnen Subgruppen auf Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Bis auf die Gruppe der ausschließlich an Morbus Menière erkrankten Patienten, deren Genotypverteilung signifikant vom HWE abweicht ( $p=0,033$ ), lag die Genotypverteilung für alle Gruppen im HWE.



**Tabelle 19:** HWE des Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen in den einzelnen Untergruppen

Gruppe	Genotypanzahl (n (%))			p-Wert HWE
	TT	TC	CC	
<b>Kontrollen</b>	725 (79,1)	182 (19,9)	9 (1,0)	0,612
<b>DSGZ</b>	517 (79,0)	130 (19,9)	7 (1,1)	0,843
<b>MM</b>	244 (79,2)	57 (18,5)	7 (2,3)	0,154
<b>MMm</b>	154 (79,4)	34 (17,5)	6 (3,1)	<b>0,033</b>
<b>MMbds</b>	33 (86,9)	4 (10,5)	1 (2,6)	0,192
<b>MMli</b>	72 (69,9)	28 (27,2)	3 (2,9)	1,000
<b>MMre</b>	107 (81,7)	21 (16,0)	3 (2,3)	0,135

HWE = Hardy-Weinberg-Equilibrium; n = Anzahl; Kon = Kontrollgruppe

MM = an Morbus Menière und zusätzlichen Schwindelerkrankungen leidende Probanden

MMm = ausschließlich an Morbus Menière leidende Patienten

MMbds = beidseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMli = ausschließlich linksseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMre = ausschließlich rechtsseitig an Morbus Menière leidende Patienten

DSGZ = an anderen peripheren Schwindelerkrankungen (außer Morbus Menière) leidende Patienten

rot markiert: signifikante Abweichung vom HWE

### 5.3.2 Assoziationsanalyse

Um eine mögliche Assoziation des Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen mit Morbus Menière zu untersuchen, wurde wiederum die Genotypverteilung innerhalb der verschiedenen Patientengruppen mit derer der Kontrollgruppe verglichen (siehe Tabelle 20). Betrachtet man die Patientengruppe der ausschließlich linksseitig an Morbus Menière erkrankten Patienten, fällt bei dem Vergleich der Genotypverteilung dieser Gruppe mit der Genotypverteilung der Gruppe gesunder Kontrollen eine signifikante Abweichung der beobachteten von der erwarteten Genotypverteilung ( $p=0,0230$ ) auf. Insbesondere der Genotyp CC, welcher innerhalb der Kontrollgruppe lediglich mit einer Häufigkeit von 1% vorkommt, ist mit 2,9% innerhalb der Gruppe der linksseitig Erkrankten wesentlich häufiger vertreten.

**Tabelle 20:** Genotypverteilung des Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen im additiven Modell

Gruppe	Genotyp TT / TC / CC (n (%))		
	Pat	Kon	p-Wert
<b>MM vs. Kon</b>	244/57/7 (79,2/18,5/2,3)	725/182/9 (79,1/19,9/1,0)	0,738
<b>MMm vs. Kon</b>	154/34/6 (79,4/17,5/3,1)	725/182/9 (79,1/19,9/1,0)	0,705
<b>MMbds vs. Kon</b>	33/4/1 (86,8/10,5/2,7)	725/182/9 (79,1/19,9/1,0)	0,362
<b>MMli vs. Kon</b>	72/28/3 (69,9/27,2/2,9)	725/182/9 (79,1/19,9/1,0)	<b>0,023</b>
<b>MMre vs. Kon</b>	107/21/3 (81,7/16,0/2,3)	725/182/9 (79,1/19,9/1,0)	0,724
<b>MMm vs. DSGZ</b>	154/34/6 (79,4/17,5/3,1)	517/130/7 (79,0/19,9/1,1)	0,639

A1 = Allel1; A2 = Allel 2; Pat = Patienten; Kon = Kontrollen; n = Anzahl

MM = an Morbus Menière und zusätzlichen Schwindelerkrankungen leidende Probanden

MMm = ausschließlich an Morbus Menière leidende Patienten

MMbds = beidseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMli = ausschließlich linksseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMre = ausschließlich rechtsseitig an Morbus Menière leidende Patienten

DSGZ = an anderen peripheren Schwindelerkrankungen (außer Morbus Menière) leidende Patienten

rot markiert: signifikante Assoziation

Die Genotypverteilung innerhalb der übrigen Patientengruppen zeigte keine signifikanten Abweichungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch der Vergleich der ausschließlich an Morbus Menière erkrankten Patienten mit der Gruppe von an anderen Schwindelerkrankungen leidenden Patienten ergab keinen signifikanten Unterschied in der Genotypverteilung. In allen Patientengruppen, sowie in der Kontrollgruppe und in der DSGZ-Gruppe war der Genotyp TT der häufigste.

Um eine Assoziation des C-Allels mit dem Krankheitsstatus zu überprüfen, wurde ausgehend für das dominante Modell die Gruppe der T-Allel-Träger (Genotyp TT und TC) mit der Gruppe der Homozygoten für CC verglichen. Für das rezessive Modell wurde die Gruppe der C-Allel-Träger (Genotyp CC und TC) der Gruppe der Homozygoten für das T-Allel gegenübergestellt (siehe Tabelle 21).

**Tabelle 21:** Genotypverteilung des Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen im dominanten und rezessiven Modell

Gruppe	Dominantes Modell (Genotyp TT+TC / CC)			Rezessives Modell (Genotyp TT / TC+CC)		
	Pat (n(%))	Kon (n (%))	p-Wert	Pat (n(%))	Kon (n (%))	p-Wert
<b>MM vs. Kon</b>	301/7 (97,7/2,3)	907/9 (99,0/1,0)	0,929	244/64 (79,2/20,8)	725/191 (79,1/20,9)	0,116
<b>MMm vs. Kon</b>	188/6 (96,9/3,1)	907/9 (99,0/1,0)	0,850	154/40 (79,4/20,6)	725/191 (79,1/20,9)	<b>0,047</b>
<b>MMbds vs. Kon</b>	37/1 (97,4/2,6)	907/9 (99,0/1,0)	0,229	33/5 (86,8/13,2)	725/191 (79,1/20,9)	0,422
<b>MMli vs. Kon</b>	100/3 (97,1/2,9)	907/9 (99,0/1,0)	<b>0,041</b>	72/31 (69,9/30,1)	725/191 (79,1/20,9)	0,118
<b>MMre vs. Kon</b>	128/3 (97,7/2,3)	907/9 (99,0/1,0)	0,472	107/24 (81,7/18,3)	725/191 (79,1/20,9)	0,220
<b>MMm vs. DSGZ</b>	188/6 (96,9/3,1)	647/7 (98,9/1,1)	0,887	154/40 (79,4/20,6)	517/137 (79,9/21,0)	<b>0,033</b>

A1 = Allel 1; A2 = Allel 2; Pat = Patienten; Kon = Kontrollen; n = Anzahl

MM = an Morbus Menière und zusätzlichen Schwindelerkrankungen leidende Probanden

MMm = ausschließlich an Morbus Menière leidende Patienten

MMbds = beidseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMli = ausschließlich linksseitig an Morbus Menière leidende Patienten

MMre = ausschließlich rechtsseitig an Morbus Menière leidende Patienten

DSGZ = an anderen peripheren Schwindelerkrankungen (außer Morbus Menière) leidende Patienten

rot markiert: signifikante Assoziation

Innerhalb der Stichprobe von ausschließlich linksseitig an Morbus Menière erkrankten Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe konnte ein signifikanter Unterschied beobachtet werden ( $p=0,0409$ ). Die Träger des häufigeren T-Allels waren in der Kontrollgruppe mit 99,0% häufiger vertreten als in Patientengruppe mit 97,1%. Für das rezessive Modell konnte für die Gruppe der ausschließlich an Menière erkrankten Patienten ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur DSGZ-Gruppe festgestellt werden ( $p=0,0468$  bzw.  $p=0,0333$ ). Hier waren die Träger des selteneren C-Allels signifikant seltener in der Patientengruppe (20,6%) als in der Kontrollgruppe (20,9%) bzw. In der DSGZ-Gruppe (21,0%).

## 6 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde der Zusammenhang der SNPs rs1805127 im KCNE1-Gen und rs2270676 im KCNE3-Gen mit der Innenohrerkrankung Morbus Menière an 319 an Morbus Menière erkrankten Patienten und 932 gesunden Kontrollpersonen sowie 675 an anderen Schwindelerkrankungen leidenden Patienten untersucht. Dabei konnte für den Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen ein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung zwischen linksseitig Erkrankten und gesunden Kontrollen beobachtet werden ( $p=0,0230$ ). Sowohl der Genotyp TC als auch der Genotyp CC lagen hier häufiger in der Patientengruppe (27,2% bzw. 2,9%) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (19,9% bzw. 1,0%) vor. Auch in der Berechnung des dominanten Modells zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den genannten Gruppen ( $p=0,0409$ ). Hier waren die Träger des häufigeren T-Allels (Genotypen TT und TC) signifikant häufiger in der Kontrollgruppe vertreten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das häufigere T-Allel das protektive Allel bzw. das seltenere C-Allel das Risikoallel zu sein scheint.

Im rezessiven Modell zeigte die Gruppe der Monodiagnosen (unabhängig von der Seite der Erkrankung) eine signifikant abweichende Genotypverteilung sowohl im Vergleich mit den gesunden Kontrollen ( $p=0,0468$ ) als auch im Vergleich mit der Gruppe der an anderen Schwindelerkrankungen leidenden Patienten ( $p=0,0333$ ). Hier waren die Träger des selteneren C-Allels (Genotypen TC und CC) in beiden Gruppen seltener in der Patientengruppe vertreten.

Der SNP im KCNE1-Gen zeigte weder in der Gesamtgruppe noch in einer der Untergruppen der rechtsseitig, linksseitig oder beidseitig Erkrankten eine signifikante Assoziation zu Morbus Menière. Lediglich in der Gruppe der beidseitig Erkrankten war ein Trend zur Assoziation ( $p=0,0710$ ) im rezessiven Modell erkennbar. Dabei waren die homozygoten Träger des selteneren A-Allels häufiger in der Kontrollgruppe (14%) als in der Patientengruppe (2,5%) vertreten.

Die bisher publizierten Studien zu diesem Thema lieferten inkonsistente Ergebnisse. Während Campbell und seine Arbeitsgruppe keine Assoziation zwischen den beschriebenen SNPs und der Erkrankung Morbus Menière nachweisen konnten (Campbell et al, 2010), beobachteten Doi et al. einen signifikanten Zusammenhang (2005). Sie konnten das seltenere C-Allel im SNP rs2260676 im KCNE3-Gen als

Risiko-Allel nachweisen, welches in der vorliegenden Studie im additiven und dominanten Modell ebenfalls als Risikoallel nachgewiesen werden konnte. Eine abschließende Beurteilung eines möglichen Einflusses von KCNE1 bzw. KCNE3 auf die Entstehung des Morbus Menière steht aus. Die Gene bzw. die untersuchten Polymorphismen scheinen jedoch nicht für sich allein die Krankheitsentstehung zu bedingen.

Möglicherweise spielen die hier untersuchten SNPs im Zusammenspiel mit bestimmten Umweltfaktoren oder weiteren genetischen Variationen eine Rolle in der Ätiopathogenese. Auch andere potentielle Kandidatengene des Morbus Menière wie AQP4 und 5 (Nishio et al, 2013), IL-1 (Furuta et al, 2011), MIF (Gazquez et al, 2013; Yazdani et al, 2013), NOS (Gazquez et al, 2011; Teranishi et al, 2013), RANTES (Yazdani et al, 2015) oder TLR10 (Requena et al, 2013) waren Gegenstand der bisherigen Forschung. Ihre Ergebnisse sind jedoch ebenfalls inkonsistent, was wiederum auf eine genetische Heterogenität der Erkrankung hindeutet.

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene der KCNE-Familie stellen potentielle Kandidatengene des Morbus Menière dar, da sie eine wichtige Rolle in der Kaliumregulation im Innenohr und somit in der Funktionsfähigkeit des Hör- und Gleichgewichtsorgans spielen. Mutationen dieser Gene können verschiedene Erkrankungen verursachen. Eine Mutation im KCNE1-Gen kann so zum Beispiel zu kongenitaler Taubheit führen. In Kombination mit bestimmten Herzrhythmusstörungen wird dieser Symptomkomplex nach seinen Erstbeschreibern als Jervell und Lange-Nielsen Syndrom bezeichnet (Schwartz et al, 2006).

Der spannungsabhängige KCNQ1/KCNE1-Kaliumkanal wird im menschlichen Innenohr von der apikalen Membran der Marginalzellen der Stria vascularis exprimiert und erlaubt den Transport von Kaliumionen aus der Stria vascularis in die Endolymphe (Wangemann, 2002). Die Aufgabe der regulatorischen KCNE1- $\beta$ -Untereinheit des Kanals ist es dabei, den Kaliumstrom zu verlangsamen (Melman et al, 2004). Das Genprodukt des KCNE1-Gens ist also maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Elektrolytkonzentration der Endolymphe im Ductus cochlearis beteiligt.

Da der Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen zu einem Aminosäureaustausch (Serin/ Glycin an Position 38) und somit zu einer Veränderung des Genprodukts führt, ist es durchaus vorstellbar, dass sich die regulatorischen Eigenschaften der KCNE1-

$\beta$ -Untereinheit ebenfalls verändern. Auswirkungen auf den Kaliumkanal wären dahingehend denkbar, dass die den Kaliumstrom verlangsamende Komponente der KCNE1-Untereinheit inaktiviert und der Kaliumstrom beschleunigt wird. Eine solche Veränderung der Eigenschaften des KCNQ1/KCNE1-Kaliumkanals hätte möglicherweise direkte Auswirkungen auf die Elektrolytkonzentration der Endolymphe im Ductus cochlearis im Sinne eines Kaliumüberschusses. Dieser könnte wiederum ursächlich für den Endolymphhydrops sein, der als histopathologisches Korrelat des Morbus Menière vermutet wird.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine einzige Mutation im KCNE1-Gen, die zu einem Aminosäureaustausch an Position 67 führt, dramatische Auswirkungen auf die Funktion des Innenohrs von Mäusen hatte (Letts et al, 2000). Die Reissner Membran, die normalerweise die mit Perilymphe gefüllte Scala vestibuli und den mit Endolymphe gefüllten Ductus cochlearis voneinander trennt, war bei den mutierten Mäusen zusammengefallen, so dass Scala vestibuli und Ductus cochlearis ein gemeinsames Kompartiment bildeten. Da es in der Pathogenese des Morbus Menière ebenfalls zum Einriss der Reissner Membran durch den endolymphatischen Hydrops kommt, ist es also durchaus denkbar, dass eine genetische Variation im KCNE1-Gen dem zugrunde liegen könnte. Außerdem zeigten die mutierten Mäuse vestibuläre und cochleäre Funktionseinschränkungen im Sinne von schnellen Kopfnickbewegungen, Drehbewegungen und Taubheit (Letts et al, 2000). Ähnliche Funktionseinschränkungen des Innenohrs werden auch bei Patienten mit Morbus Menière beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen den untersuchten Polymorphismen im KCNE1-Gen und der Erkrankung Morbus Menière hergestellt werden. Es zeigte sich lediglich ein Trend zur Assoziation in der Untergruppe der beidseitig Erkrankten.

Das Expressionsmuster und die Rolle von KCNE3-regulierten Kaliumkanälen im Innenohr ist ebenfalls Gegenstand der aktuellen Forschung. Die Arbeitsgruppe um de Castro konnte jedoch bereits 2006 die Expression von KCNE3 im Innenohr von Mausembryos nachweisen. KCNE3 beeinflusst spannungsabhängige Kaliumkanäle in seiner Funktion als regulatorische  $\beta$ -Untereinheit dahingehend, dass es den Kanal unabhängig vom aktuellen Membranpotential konstitutiv offen hält (Melman et al, 2004). Im Tiermodell konnte an KCNE3-Knockout-Mäusen ein erhöhter zellaustritt

gerichteter Kaliumstrom gemessen werden, welcher veränderte Aktionspotenziale in Spinalganglien cochleärer Neurone generierte (Wang et al, 2014).

Ein Zusammenhang des KCNE3-Gens zu chronischem Tinnitus wurde 2011 von der Arbeitsgruppe um Sand untersucht. Weder für den hier untersuchten Polymorphismus rs2270676 noch für andere Polymorphismen konnte jedoch eine Assoziation zu chronischem Tinnitus hergestellt werden (Sand et al, 2011).

Da der Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen nicht zu Abweichungen der Aminosäuresequenz führt (Phenylalanin an Position 66), ist auch das Genprodukt unverändert. Es ist also nicht davon auszugehen, dass dieser SNP spannungsabhängige Kaliumkanäle in ihrer Funktionsweise direkt beeinträchtigt oder die Elektrolytkonzentrationen im Innenohr verändert. Dennoch konnte für den SNP eine Assoziation zu linksseitig an Morbus Menière erkrankten Patienten sowie zu Patienten mit Monodiagnose Morbus Menière hergestellt werden. Möglicherweise liegt der SNP also im Kopplungsungleichgewicht mit anderen genetischen Variationen. Ob und inwieweit der SNP rs2270676 im KCNE3-Gen die Kaliumhomöostase im Innenohr beeinflusst, muss in zukünftigen Studien näher erforscht werden.

Es existieren bis zum heutigen Zeitpunkt erst drei Assoziationsstudien sowie eine Meta-Analyse, welche einen Zusammenhang der hier genotypisierten SNPs mit der Erkrankung Morbus Menière untersucht haben. Eine japanische Arbeitsgruppe um Doi konnte 2005 eine signifikante Assoziation sowohl des SNPs im KCNE1- als auch des SNPs im KCNE3-Gen mit der Erkrankung nachweisen. Es konnten Unterschiede in der Genotypverteilung zwischen Patienten und Kontrollen dahingehend beobachtet werden, dass die Genotypen AA und AG (rs1805127) bzw. CC und CT (rs2270676) signifikant häufiger in der Patientengruppe zu finden waren ( $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,0015$ ). Doi et al. (2005) vermuteten daher einen Einfluss der Gene KCNE1 und 3 auf die Entstehung des Morbus Menière.

Die Arbeitsgruppe um Campbell konnte diese Ergebnisse an einer amerikanischen Studienpopulation 2010 jedoch nicht replizieren (2010). Die finnische Arbeitsgruppe um Hietikko konnte 2012 einen Zusammenhang des Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen, nicht jedoch des Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen zu Morbus Menière nachweisen (Hietikko et al, 2012). Aufgrund der Unvollständigkeit der Daten (keine Daten zu Alters- und Geschlechterverteilung) wurden die Ergebnisse der Studie von Hietikko et al. im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Eine 2015

veröffentlichte Meta-Analyse der chinesischen Arbeitsgruppe um Li, welche die letztgenannten Studien von Doi et al. (2005), Campbell et al. (2010) und Hietikko et al. (2012) berücksichtigte, konnte weder eine Assoziation des SNPs rs1805127 im KCNE1-Gen noch des SNPs rs2270676 im KCNE3-Gen zur Erkrankung Morbus Menière nachweisen (Li et al, 2016).

Die Inkonsistenz der Ergebnisse der bisher durchgeführten Kandidatengenstudien kann verschiedene Gründe haben, auf die nachfolgend eingegangen werden soll.

### Diagnosekriterien

Die Diagnose des Morbus Menière beruht auf klinischen Kriterien, die über die letzten Jahrzehnte mehrfach modifiziert worden sind. In dieser und in den vorherigen Studien wurden die Probanden der Patientengruppe nach den Kriterien der AAO-HNS von 1995 beurteilt. Diese Kriterien zeichnen sich zwar durch eine hohe Sensitivität aus, sie besitzen jedoch nur eine geringe Spezifität (Stapleton & Mills, 2008). Dadurch bergen sie ein relativ hohes Risiko für falsch positive Diagnosen. In Bezug auf die hier diskutierten Studien ist also davon auszugehen, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht alle der teilnehmenden Probanden tatsächlich an Morbus Menière erkrankt waren. Dieser Sachverhalt erschwert die Analyse der Ergebnisse. Neueste MRT-Untersuchungen des Felsenbeins nach intratympanaler Injektion von Gadolinium haben es zwar ermöglicht, den endolymphatischen Hydrops visuell darzustellen, dieses diagnostische Verfahren war jedoch weder in der vorliegenden Studie, noch in den Studien von Doi et al. (2005) oder Campbell et al. (2010) Einschlusskriterium für die Patientengruppe. Der endolymphatische Hydrops gilt als histopathologisches Korrelat der Erkrankung, wird aber nicht ausschließlich bei an Morbus Menière erkrankten Patienten beobachtet. Insbesondere bei Patienten mit sensorineuraler Hörminderung >45 dB kann in etwa 40% ebenfalls ein endolymphatischer Hydrops nachgewiesen werden (Attye et al, 2018). Folglich eignet sich die MRT-Untersuchung nicht als standardmäßiges Diagnoseverfahren des Morbus Menière für zukünftige Studien eignet. Eine Verbesserung der Diagnosestellung unter Verwendung klinischer und apparativer Kriterien würde eine Assoziationsanalyse jedoch konkretisieren, da die Heterogenität des Patientenkollektivs sowie die Rate an falsch positiv diagnostizierten Patienten abnehmen würden.



### Zusammensetzung der Studienpopulation

Im Rahmen zahlreicher epidemiologischer Studien zu Morbus Menière konnten bestimmte prädisponierende Faktoren wie beispielsweise weibliches Geschlecht bestimmt werden (Harris & Alexander, 2010; Ohmen et al, 2013). Auch das durchschnittliche Alter der Erstmanifestation der Erkrankung konnte auf die 4. bis 5. Lebensdekade eingegrenzt werden (Pyykko et al, 2013). Die unterschiedlichen Ergebnisse der bisher durchgeführten Assoziationsstudien für die Polymorphismen im KCNE1- und KCNE3-Gen könnten also möglicherweise in der verschiedenen Zusammensetzung der Studienpopulationen begründet sein.

In der japanischen Patientengruppe von Doi (2005) kann ein deutliches Überwiegen des weiblichen Geschlechts mit 81% im Vergleich zu männlichen Patienten (19%) verzeichnet werden. Dass in dieser Studie eine signifikante Assoziation der untersuchten SNPs zu Morbus Menière hergestellt werden konnte, lässt Spekulationen über eine möglicherweise geschlechtsspezifische Assoziation zu. Sowohl im Patientenkollektiv der amerikanischen Studienpopulation als auch im Patientenkollektiv der vorliegenden Studie waren die Geschlechter annähernd gleich verteilt (Campbell et al. (2010): 46% Männer, 54% Frauen; vorliegende Studie: 54% Männer, 46% Frauen).

Auch das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer spielt eine Rolle bei der Beurteilung und Interpretation der generierten Daten. In der vorliegenden Stichprobe lag das Durchschnittsalter mit 60,5 Jahren in der Patientengruppe bzw. mit 58,6 Jahren in der Kontrollgruppe deutlich über dem durchschnittlichen Alter der Erstmanifestation der Erkrankung (4. Bis 5. Lebensdekade). Im Gegensatz dazu lag das Durchschnittsalter der Kontrollgruppen in der japanischen Studienpopulation von Doi bei 35,8 bzw. bei 36,5 Jahren. Demnach lag das durchschnittliche Alter der Kontrollprobanden unter dem typischen Manifestationsalter des Morbus Menière. Es ist also möglich, dass sich potentielle, phänotypisch noch unauffällige Patienten im Kontrollkollektiv befinden könnten, da noch keine Erstmanifestation erfolgt war. Dieser Umstand würde die Ergebnisse der Assoziationsstudie verzerren.

### Kontrollprobanden

Auch die genauen Ein- und Ausschlusskriterien der Kontrollprobanden neben Alter und Geschlecht können für die Ergebnisse der Studien entscheidend sein. Im Rahmen

von genetischen Assoziationsstudien ist die Familienanamnese für das Auftreten der untersuchten Erkrankung in der Kontrollgruppe bedeutend, um eine familiäre Prädisposition zu der untersuchten Erkrankung auszuschließen. Vermeintlich gesunde Kontrollprobanden mit positiver Familienanamnese für die untersuchte oder mit dieser in Verbindung stehenden Erkrankungen könnten möglicherweise in der Zukunft erkranken oder bei unvollständiger Penetranz den mit der Erkrankung assoziierten Genotyp trotz gesundem Phänotyp aufweisen. Auf diese Weise würden die Ergebnisse der Studie verzerrt. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar das Vorkommen von neurologischen Erkrankungen im nahen Verwandtenkreis erfragt, nicht jedoch gezielt das Auftreten von Morbus Menière oder anderer Schwindelerkrankungen in der Familie. Dies stellt einen Nachteil der vorliegenden Arbeit dar, da eine positive Familienanamnese für Morbus Menière in der Kontrollgruppe nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Diese wiederum könnte die Ergebnisse der Assoziationsstudie verzerren. In den Publikationen von Doi (2005) und Campbell (2010) wird nicht näher auf die Ausschlusskriterien der Kontrollprobanden eingegangen, so dass an dieser Stelle keine Aussage zu einer möglichen Verzerrung der Ergebnisse getroffen werden kann.

In der vorliegenden Studie gab es außerdem eine zweite Kontrollgruppe, die sich aus Patienten zusammensetzte, die aufgrund anderer peripherer Schwindelerkrankungen (z.B. benigner paroxysmaler Lagerungsschwindel oder vestibuläre Migräne) zum Zeitpunkt der Rekrutierung am DSGZ in Behandlung waren. Diese Gruppe wurde mit der Patientengruppe der Morbus Menière-Monodiagnosen verglichen. Diese zweite Kontrollgruppe beinhaltet jedoch ein sehr heterogenes Kollektiv, da Schwindelerkrankungen nicht nur phänotypisch sehr heterogen sind, sondern auch ätiologisch unterschiedliche Hintergründe haben. Aufgrund der klinischen und ätiologischen Heterogenität dieser Schwindelerkrankungen und der trotzdem oftmals schwierigen Diagnosestellung kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass sich unter den Probanden dieser Gruppe auch solche mit nicht-diagnostiziertem Morbus Menière befanden. Zwar wurden Patienten, die an Morbus Menière leiden, explizit aus dieser Gruppe ausgeschlossen, es konnte jedoch beispielsweise auch bei Patienten mit vestibulärer Migräne ein endolyphatischer Hydrops und menière-ähnliche Symptome nachgewiesen werden (Lopez-Escamez et al, 2015). Es ist also nicht auszuschließen, dass es histopathologisch und dadurch möglicherweise auch

ätiologisch gewisse Überlappungen zwischen den peripheren Schwindelerkrankungen gibt. Dieser Sachverhalt könnte ebenfalls zur Verzerrung der Ergebnisse der Assoziationsstudie führen.

### Ethnische Abstammung

Des Weiteren kann die unterschiedliche ethnische Abstammung der verschiedenen Patienten- bzw. Kontrollgruppen in den Studien von Doi (2005), Campbell (2010) und der vorliegenden Studie Einfluss auf die Inkonsistenz der Forschungsergebnisse haben.

Die Suszeptibilität der Erkrankung Morbus Menière variiert unter den verschiedenen Ethnien dahingehend, dass Kaukasier häufiger betroffen sind als Populationen aus Asien oder Südamerika (Ohmen et al, 2013). Ebenso variiert die Allel- und Genotypverteilung zwischen den verschiedenen ethnischen Gruppen, was einen Vergleich von genetischen Assoziationsstudien erschwert. Die inkonsistenten Ergebnisse der bisher durchgeführten Assoziationsstudien zu den SNPs rs1805127 im KCNE1-Gen und rs2270676 im KCNE3-Gen könnten also unter anderem in einer unterschiedlichen Allel- und Genotypverteilung zwischen Kaukasiern und Asiaten begründet sein. Doi et al. (2005) genotypisierten eine japanische Studienpopulation, während das Patienten- und Kontrollkollektiv von Campbell und seiner Arbeitsgruppe (2010) aus US-Amerikanern kaukasischer Abstammung bestand. In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls ausschließlich Probanden und Patienten kaukasischer Abstammung untersucht. Die Allel- und Genotypverteilungen der verschiedenen Ethnien wurden im Rahmen des internationalen HapMap-Projekts (2003) analysiert und katalogisiert, was einen Vergleich dieser Ergebnisse mit den einzelnen Studienergebnissen hinsichtlich der Allel- und Genotypverteilung ermöglicht. Die Tabellen 22 und 23 stellen die Datenlage zur Verteilung der beiden untersuchten SNPs des HapMap-Projekts für Nord- und Westeuropäer und für Japaner, sowie die Verteilung in den Studienpopulationen der Kontrollgruppen der Publikation von Doi (2005) und Campbell (2010) und der vorliegenden Studie dar.

**Tabelle 22:** Allel- und Genotypverteilung des Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen in der vorliegenden Studie, in der Studie von Doi et al. (2005) und Campbell et al. (2010) und in der japanischen und nord- und westeuropäischen Bevölkerung (HapMap, 2005)

<b>rs1805127 (KCNE1)</b>					
	<b>Allelfrequenz %</b>		<b>Genotypfrequenz %</b>		
	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>
<b>HapMap CEU</b>	38,3	61,7	11,7	53,3	35,0
<b>HapMap JPT</b>	29,6	70,4	9,1	40,9	50,0
<b>Doi et al. KON</b>	13,7	86,3	8,4	10,6	81,0
<b>Campbell et al. KON</b>	37,8	62,2	12,8	50,0	37,2
<b>vorliegende Studie KON</b>	37,1	62,9	14,4	45,4	40,2

HapMap CEU = repräsentative Gruppe aus Nord- und Westeuropäern nach HapMap

HapMap JPT = repräsentative Gruppe aus Japanern nach HapMap

KON = Kontrollgruppe

Bei dem Vergleich der Allelfrequenzen der HapMap-Gruppen fällt eine Häufung des G-Allels im SNP rs1805127 in der japanischen (70,4%) gegenüber der europäischen Population (61,7%) auf (siehe Tabelle 22). Auch der Genotyp GG ist mit 50,0% wesentlich häufiger in der japanischen HapMap-Gruppe vertreten als in der europäischen mit 35,0%. Möglicherweise konnte also weder die Studie von Campbell noch die vorliegende Studie die Ergebnisse von Doi vollständig replizieren, da sich die Allel- und Genotypfrequenzen innerhalb der verschiedenen ethnischen Gruppen per se unterscheiden. Es fällt jedoch auf, dass die Allelfrequenz der Studienpopulation in der Kontrollgruppe von Doi (2005) mit 86,3% für das G-Allel nicht nur stark von den Allelfrequenzen der Studienpopulationen der Kontrollgruppen von Campbell (2010) mit 62,2% und der vorliegenden Studie mit 62,9%, sondern auch von der Allelfrequenz der japanischen HapMap-Gruppe mit 70,4% für das G-Allel abweicht. Auch die Genotypfrequenzen für den Genotyp GG variieren mit 81,0% bei Doi (2005) im Vergleich zu 37,2% bei Campbell (2010), 40,2% in der vorliegenden Studie und 50,0% in der japanischen HapMap-Gruppe stark voneinander.

**Tabelle 23:** Allel- und Genotypverteilung des Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen in der vorliegenden Studie, in der Studie von Doi et al., 2005 und Campbell et al., 2010 und in der japanischen und nord- und westeuropäischen Bevölkerung (HapMap, 2005)

<b>rs2270676 (KCNE3)</b>					
	<b>Allelfrequenz %</b>		<b>Genotypfrequenz %</b>		
	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>
<b>HapMap CEU</b>	88,3	11,7	78,3	20,0	1,7
<b>HapMap JPT</b>	80,0	20,0	68,9	22,2	8,9
<b>Doi et al. KON</b>	96,8	3,2	95,6	2,4	2,0
<b>Campbell et al. KON</b>	88,3	11,7	77,8	21,1	1,1
<b>vorliegende Studie KON</b>	89,1	10,9	79,1	19,9	1,0

HapMap CEU = repräsentative Gruppe aus Nord- und Westeuropäern nach HapMap

HapMap JPT = repräsentative Gruppe aus Japanern nach HapMap

KON = Kontrollgruppe

Bei dem Vergleich der Allelfrequenzen für den SNPs rs2270676 im KCNE3-Gen fällt eine deutliche Häufung des C-Allels mit 20,0% in der japanischen HapMap-Gruppe im Vergleich zu 11,7% in der europäischen HapMap-Gruppe auf. Die Allelfrequenzen der Kontrollgruppen der Studienpopulationen von Campbell (2010) mit 11,7% und der vorliegenden Studie mit 10,9% für das C-Allel entsprechen in etwa der Allelfrequenz der europäischen HapMap-Gruppe. Auch der Genotyp CC ist mit einer Häufigkeit von 8,9% in der japanischen HapMap-Gruppe wesentlich häufiger als in der europäischen HapMap-Gruppe (1,7%) und in den Kontrollgruppen von Campbell (1,1%) und der vorliegenden Studie (1,0%) vertreten. Es kann also auch für den SNP rs2270676 im KCNE3-Gen von einer unterschiedlichen Allel- und Genotypverteilung innerhalb der verschiedenen ethnischen Gruppen ausgegangen werden.

Bei der Betrachtung der Allelfrequenz der Kontrollgruppe der Studienpopulation von Doi (2005) mit 3,2% für das C-Allel fällt jedoch eine starke Abweichung nicht nur im Vergleich mit den Kontrollgruppen der anderen Studienpopulationen, sondern vor allem im Vergleich zur japanischen HapMap-Gruppe (20,0%) auf.

Da die Daten des HapMap-Projekts die Allel- und Genotypverteilung der Grundgesamtheit einer Population widerspiegeln, sollte eine weitest gehende Übereinstimmung der Allel- und Genotypfrequenzen der Kontrollgruppen mit derer der HapMap-Gruppe für die jeweilige ethnische Gruppe erwartet werden. Aufgrund der starken Abweichung Allelfrequenz der Kontrollgruppe von Doi (2005) im Vergleich zur Allelfrequenz der japanischen HapMap-Gruppe muss hier eine starke Selektion des Kontrollkollektivs in Betracht gezogen werden. Eine Selektion innerhalb der Kontrollgruppe könnte wiederum zu einer Verzerrung der Ergebnisse der Assoziationsstudie führen. Da in der Arbeit von Doi et al. (2005) keine Angaben zu Rekrutierung oder Herkunft des Kontrollkollektivs gemacht wurden, können an dieser Stelle keine Spekulationen über vermeintliche Gründe für die starke Selektion getroffen werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit genotypisierten Studienteilnehmer stammten aus dem Raum München und ihre kaukasische Herkunft wurde bis zur Großeltern-generation überprüft. Die Allel- und Genotypverteilung dieser Studie sowie die von Campbell (2010) erhobenen Ergebnisse stimmen in etwa mit der Allel- und Genotypverteilung der HapMap-Gruppe für Nord- und Westeuropäer überein.

### Stichprobengröße

Auch die Größe der Studienpopulation hat einen Einfluss auf die Beurteilung der Ergebnisse im Vergleich zu anderen Assoziationsstudien. Es handelt sich bei allen drei Studien um kleine Stichprobengrößen, was als limitierender Faktor für die Herstellung einer signifikanten Assoziation zu betrachten ist.

Je kleiner die Stichprobe, desto größer ist die Unsicherheit für falsch positive oder falsch negative Ergebnisse. Kleine Effekte werden zudem erst mit zunehmender Stichprobengröße statistisch signifikant. Die Aussagekraft von Studien mit sehr kleinen Studienpopulationen wie bei Doi (2005) mit 63 Probanden in der Patientengruppe ist deswegen als geringer einzustufen.

Eine positive Assoziation des SNPs rs2270676 im KCNE3-Gen zu Morbus Menière konnte in dieser Arbeit für die Gruppe der ausschließlich linksseitig an Morbus Menière erkrankten Patienten im additiven und dominanten Modell sowie für die Gruppe der Monodiagnose im rezessiven Modell beobachtet werden. Insbesondere die Gruppe

der ausschließlich linksseitig erkrankten Patienten ist mit einer Stichprobengröße von 103 ebenfalls klein, so dass eine statistische Unsicherheit resultiert.

### Subgruppenbildung

Weiterhin könnten Unterschiede in der Ätiopathogenese der Erkrankung Einfluss auf die Ergebnisse der Assoziationsstudie nehmen. Der endolymphatische Hydrops wird zwar als histopathologisches Korrelat der Erkrankung akzeptiert, die genaue Ätiologie ist jedoch nach wie vor unklar (Foster & Breeze, 2013). Es existiert eine Vielzahl an Theorien zur Ätiopathogenese des Morbus Menière: von Autoimmungeschehen (Greco et al, 2012; Kim et al, 2014) über Virusinfektion (Selmani et al, 2005) bis hin zu Ionenkanalerkrankungen (Gates, 2005), die von den jeweiligen Autoren als ursächlich für die Erkrankung betrachtet werden. Möglicherweise gibt es also verschiedene Entitäten, die zur gleichen oder ähnlichen klinischen Symptomatik führen. Auch die klinische Heterogenität der Erkrankung würde für dieses Erklärungsmodell sprechen. Ein multikausales Geschehen in der Krankheitsentstehung mit ätiologisch unterschiedlichen Hintergründen würde unter anderem die inkonsistenten Ergebnisse der bisher durchgeführten Assoziationsstudien nicht nur zum KCNE1- und 3-Gen, sondern auch zu anderen potentiellen Kandidatengenen erklären.

Durch Untergliederung der Patientengruppe in fünf phänotypisch ähnliche Subgruppen wurde in der vorliegenden Studie versucht, die Problematik der klinischen Heterogenität zu minimieren. Da die klinischen Subgruppen möglicherweise auch ätiologisch unterschiedliche Hintergründe aufweisen, wäre es möglich, dass ein SNP nur mit einer bestimmten Subgruppe der Erkrankung assoziiert ist. An dieser Stelle wären auch weitere Gruppierungen der Patienten mit ähnlichem Phänotyp wie beispielsweise gleiches Alter der Erstmanifestation oder klinisches Leitsymptom bei Erkrankungsbeginn denkbar gewesen. Möglicherweise ergeben sich hier Unterschiede zwischen Patienten, bei denen sich die Erkrankung gleich zu Beginn in ihrer vollen Symptomtrias präsentiert im Vergleich zu Patienten mit monosymptomatischem Beginn.

Tatsächlich konnte in dieser Arbeit eine Assoziation des SNP rs2270676 im KCNE3-Gen zur Subgruppe der ausschließlich linksseitig Erkrankten sowie zur Subgruppe der Monodiagnosen hergestellt werden. Für den SNP rs1805127 im KCNE1-Gen konnte zumindest ein Trend zur Assoziation in der Gruppe der beidseitig Erkrankten

beobachtet werden. Diese Ergebnisse stützen die Theorie einer multikausalen Ätiologie der Erkrankung Morbus Menière. Weder in der Studie von Doi et al. (2005) noch in der Studie von Campbell et al. (2010) wurde die Patientengruppe in Subgruppen unterteilt und die Assoziation der Polymorphismen differenziert betrachtet. Es liegen also keine vergleichbaren Arbeiten zu den Ergebnissen dieser Studie vor. Eine weitere Erforschung des Einflusses der hier beschriebenen SNPs insbesondere auf klinisch homogene Subgruppen des Morbus Menière in zukünftigen Studien wäre demnach sinnvoll. Eine Untergliederung in unilateralen und bilateralen Morbus Menière mit jeweils 5 Subgruppen, wie sie 2017 vom *Menière's Disease Consortium* vorgenommen wurde, wäre hier ebenso denkbar (Frejo et al, 2017). Die Differenzierung bezieht sich hier auf die Entität (sporadisch oder familiär), den zeitlichen Zusammenhang zwischen Schwindel und Hörverlust sowie mögliche Komorbiditäten (Vestibuläre Migräne, Autoimmunerkrankungen). Ebenso denkbar wären Untergliederungen im Hinblick auf die Qualität der Symptome (links- oder rechtsseitig), aber auch auf Dauer, Frequenz oder Intensität.

#### Laborverfahren und statistische Auswertung

Um die Ergebnisse verschiedener Assoziationsstudien miteinander vergleichen zu können, sollten die laborchemischen und statistischen Methoden, mit welchen die Ergebnisse generiert wurden, untereinander vergleichbar sein. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genotypisierung der Patienten und Kontrollprobanden mittels iPLEX-Verfahren und MALDI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführt. Zu den genauen laborchemischen Verfahren liegen sowohl in der Publikation von Doi (2005) als auch in der Publikation von Campbell (2010) wenig Informationen vor, jedoch war die statistische Auswertung der Ergebnisse der Genotypisierung in allen Studien vergleichbar. Die Allel- und Genotypverteilung wurde zunächst auf Übereinstimmung mit dem (HWE) überprüft und das Signifikanzniveau auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Sowohl in der Studie von Campbell und seiner Forschungsgruppe (2010) als auch in der vorliegenden Studie lagen die Genotypverteilungen für alle Gruppen sowohl für den SNP rs1805127 im KCNE1-Gen als auch für den SNP rs2270676 im KCNE3-Gen im HWE (siehe Tabellen 24 und 25). Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Studie von Doi et al. (2005) fällt eine starke Abweichung der Genotypverteilung vom HWE in der Kontrollgruppe im SNP rs1805127 (siehe Tabelle 24) auf ( $p = 7,560 \times 10^{-13}$ ), so dass



diese Ergebnisse nur eingeschränkt aussagekräftig sind. Die Genotypverteilung der japanischen Menièrepatienten war mit einem p-Wert von  $p=0,779$  unauffällig. Die Genotypverteilung der europäischen sowie der japanischen HapMap-Gruppe lag ebenfalls im HWE.

**Tabelle 24:** HWE des Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen in den Studienpopulationen der vorliegenden Studie, von Doi et al., 2005, Campbell et al., 2010 und in der nord- und westeuropäischen und japanischen Bevölkerung nach HapMap (2005)

<b>rs1805127</b>				
<b>Gruppe</b>	<b>Genotyp n (%)</b>			<b>p-Wert HWE</b>
	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	
<b>HapMap CEU</b>	7 (11,7)	32 (53,3)	21 (35,0)	0,778
<b>HapMap JPT</b>	4 (9,1)	18 (40,9)	22 (50,0)	0,997
<b>Doi et al. MM</b>	8 (12,7)	27 (42,9)	28 (44,4)	0,779
<b>Doi et al. KON</b>	20 (8,4)	25 (10,6)	192 (81,0)	7,560 x 10 <sup>-13</sup>
<b>Campbell et al. MM</b>	22 (12,2)	81 (45,0)	77 (42,8)	0,998
<b>Campbell et al. KON</b>	23 (12,8)	90 (50,0)	67 (37,2)	0,832
<b>Vorliegende Studie MM*</b>	35 (11,0)	146 (46,1)	136 (42,9)	0,709
<b>Vorliegende Studie KON</b>	134 (14,4)	421 (45,4)	373 (40,2)	0,399

HWE = Hardy-Weinberg-Equilibrium  
HapMap CEU = repräsentative Gruppe aus Nord- und Westeuropäern nach HapMap  
HapMap JPT = repräsentative Gruppe aus Japanern nach HapMap  
MM = Patientengruppe der an Morbus Menière erkrankten Probanden  
KON = Kontrollgruppe  
\* = Gruppe der an Morbus Menière und zusätzlicher Schwindelerkrankung leidender Patienten  
rot markiert: Abweichungen vom HWE

Ähnliche Ergebnisse fallen bei der Betrachtung der Genotypverteilung im SNP rs2270676 im KCNE3-Gen auf. Die Genotypverteilung der Studienpopulation von Doi

(2005) innerhalb der Kontrollgruppe liegt mit einem p-Wert von  $p=4,875 \times 10^{-6}$  signifikant außerhalb des HWE (siehe Tabelle 25).

**Tabelle 25:** HWE des Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen in den Studienpopulationen der vorliegenden Studie, von Doi et al., 2005, Campbell et al., 2010 und in der nord- und westeuropäischen und japanischen Bevölkerung nach HapMap (2005)

<b>rs2270676</b>				
<b>Gruppe</b>	<b>Genotyp n (%)</b>			<b>p-Wert HWE</b>
	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>	
<b>HapMap CEU</b>	47 (78,3)	12 (20,0)	1 (1,7)	0,988
<b>HapMap JPT</b>	31 (68,9)	10 (22,2)	4 (8,9)	0,426
<b>Doi et al. MM</b>	52 (82,5)	8 (12,7)	3 (4,8)	<b>0,020</b>
<b>Doi et al. KON</b>	196 (95,6)	5 (2,4)	4 (2,0)	<b><math>4,875 \times 10^{-6}</math></b>
<b>Campbell et al. MM</b>	144 (80,0)	34 (18,9)	2 (1,1)	1,000
<b>Campbell et al. KON</b>	140 (77,8)	38 (21,1)	2 (1,1)	0,972
<b>Vorliegende Studie MM*</b>	244 (79,2)	57 (18,5)	7 (2,3)	0,154
<b>Vorliegende Studie KON</b>	725 (79,1)	182 (19,9)	9 (1,0)	0,612

HWE = Hardy-Weinberg-Equilibrium

HapMap CEU = repräsentative Gruppe aus Nord- und Westeuropäern nach HapMap

HapMap JPT = repräsentative Gruppe aus Japanern nach HapMap

MM = Patientengruppe der an Morbus Menière erkrankten Probanden

KON = Kontrollgruppe

\* Gruppe der an Morbus Menière und zusätzlicher Schwindelerkrankung leidender Patienten

rot markiert: Abweichungen vom HWE

Auch die Genotypverteilung innerhalb der Patientengruppe von Doi liegt für diesen SNP signifikant außerhalb des HWE ( $p=0,020$ ). Diese Abweichung der Genotypverteilungen vor allem in den Kontrollgruppen von Doi et al. (2005) wirft Zweifel an der Validität der in dieser Studie generierten Ergebnisse auf. Eine

mangelhafte Selektion der Population durch beispielsweise Einschluss miteinander verwandter Probanden oder die Selektion einer homogenen Schicht innerhalb der Population können möglicherweise für diesen Wert verantwortlich sein. Da weder zu den durchgeführten laborchemischen Verfahren noch zur statistischen Auswertung der Daten von Doi (2005) ausreichend Informationen vorliegen, kann an dieser Stelle keine Aussage zu vermeintlichen Fehlerquellen auch im Rahmen der molekularbiologischen Analyse getroffen werden. Ein Vergleich der Genotypverteilung dieser Kontrollgruppe mit der Genotypverteilung der Patientengruppe ist durch die Verzerrung nicht möglich. Durch Genotypisierung einer neuen Kontrollgruppe wäre es eventuell möglich gewesen, valide Ergebnisse zu generieren.

### Studiendesign

Im Gegensatz zu Kopplungsanalysen in betroffenen Familien, die sich zur Identifizierung von monogenen Erkrankungen eignen, finden Assoziationsstudien vor allem in der Erforschung komplexer Erkrankungen wie Morbus Menière zunehmend Anwendung. Bei der Interpretation der Ergebnisse von Assoziationsstudien müssen jedoch auch deren limitierende Faktoren berücksichtigt werden.

Wie in jeder Fall-Kontroll-Studie gibt es zahlreiche Bias, welche die Beurteilbarkeit der Ergebnisse erschweren. Wie bereits angeführt, ist eine sorgfältige Auswahl von Fall- und Kontrollprobanden von großer Wichtigkeit. Außerdem können ätiologische oder genetische Heterogenität der Erkrankung, wie sie bei Morbus Menière vermutet wird, zu falsch-negativen Ergebnissen führen und somit eine tatsächliche Assoziation der untersuchten Polymorphismen verschleiern. Dies ist unter Umständen einer der Gründe, warum initiale Assoziationen von darauffolgenden Studien oftmals nicht repliziert werden können, wie es auch bei Doi et al. (2005) und Campbell et al. (2010) und der Assoziation der hier untersuchten SNPs zu Morbus Menière der Fall war. Schließlich liegt die Limitation von genetischen Fall-Kontroll-Assoziationsstudien auch in der Auswahl der genetischen Marker begründet. Viele der bisher untersuchten SNPs haben keinen funktionellen Effekt auf das Genprodukt und somit auch nicht auf die Entstehung der Erkrankung. Auch der in dieser Arbeit untersuchte SNP im KCNE3-Gen führt nicht zu einem veränderten Genprodukt. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass solche neutralen SNPs im Kopplungsungleichgewicht mit funktionellen Genvarianten liegen, die tatsächlich an der Ausprägung der Erkrankung

durch Veränderung des Genprodukts beteiligt sein könnten. Vielversprechend sind dahingehend hypothesenfreie genomweite Assoziationsstudien (GWAS), da hier keine Vorselektion von möglicherweise, den Phänotyp beeinflussenden, Genen stattfindet und dadurch auch Gene, die einen a priori nicht erwarteten Zusammenhang mit dem zu untersuchenden Phänotyp aufweisen, untersucht werden können. GWAS benötigen allerdings wesentlich größere Studienpopulationen, die sich meist nur im Rahmen von Konsortien generieren lassen.

### Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Assoziation des Polymorphismus rs1805127 im KCNE1-Gen zur Innenohrerkrankung Morbus Menière nachgewiesen werden. Für den Polymorphismus rs2270676 im KCNE3-Gen konnte eine Assoziation in der Gruppe der linksseitig Erkrankten und der Monodiagnosen nachgewiesen werden. Ein Einfluss des KCNE3-Gens in der Krankheitsentstehung des Morbus Menière wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt.

Eine Differenzierung innerhalb der Patientengruppe, die die Untersuchung möglichst gleicher Phänotypen erlaubt, so wie sie in der vorliegenden Studie vorgenommen wurde, wäre auch für zukünftige Studien empfehlenswert, zumal die hier generierte Assoziation in weiteren Studien repliziert werden sollte. Es bleibt weiterhin zu klären, ob Patienten, die rechtsseitig bzw. linksseitig erkrankt sind, pathophysiologische Unterschiede in der Krankheitsausprägung aufweisen, um festzustellen, ob eine dahingehende Differenzierung sinnvoll ist.

Da sich der Morbus Menière in Klinik und Verlauf sehr variabel präsentiert, ist auch die Bildung von anderen klinisch homogenen Subgruppen beispielsweise nach Niveau des Hörverlusts oder Schwere des Tinnitus im Hinblick auf eine mögliche Korrelation zwischen Ausprägung der Erkrankung und den zu untersuchenden SNPs denkbar. Durch das Generieren von Patientengruppen mit gleichem Phänotyp erhält man womöglich auch ähnliche genetische Voraussetzungen innerhalb einer Gruppe und valide Ergebnisse für genetische Assoziationsstudien. Hier stellt beispielsweise die Subtypisierung des *Menière's Disease Consortium* eine sinnvolle Orientierung für künftige Assoziationsstudien dar.

Außerdem wäre die Durchführung weiterer Assoziationsstudien der hier untersuchten SNPs insbesondere an größeren Stichproben zur Erhöhung der statistischen

Aussagekraft für die weitere Erforschung der genetischen Komponente des Morbus Menière hilfreich. Im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien könnten so neben weiteren Polymorphismen der KCNE1- und 3-Gene das gesamte Genom auf assoziierte Varianten untersucht werden. Es ist ebenso denkbar, dass die anderen Gene der KCNE-Familie (KCNE 2, 4 und 5), die alle für regulatorische  $\beta$ -Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle kodieren und somit eine Rolle in der Kaliumhomöostase spielen, an der Krankheitsentstehung beteiligt sind. Der genaue Einfluss der verschiedenen KCNE- $\beta$ -Untereinheiten und der mit ihnen interagierenden  $\alpha$ -Untereinheiten der Kaliumkanäle im Innenohr auf die Elektrolytkonzentrationen der Peri- und Endolymph sollte im Hinblick auf ihre Rolle in der Entstehung des endolymphatischen Hydrops am Tiermodell genauer untersucht werden. An Knock-out-Mäusen kann der Einfluss dieser Gene auf die anatomische und physiologische Funktionsfähigkeit des Innenohrs erforscht werden, um so eventuell Informationen über die Pathophysiologie des Endolymphhydrops zu erhalten.

Der Morbus Menière ist eine komplexe Erkrankung mit einer Vielzahl von sich wechselseitig beeinflussenden Faktoren. Die Frage, welchen Einfluss die genetische Komponente dabei auf die Entstehung der Erkrankung hat, ist Gegenstand aktueller und zukünftiger Forschung. Die vorgeschlagene Einteilung in verschiedene Subtypen ist dabei wohl klinisch als auch pathophysiologisch von Relevanz.

## 7 Literaturverzeichnis

AAO-HNS (1995) American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 113(3), 181-5.

Abbott, G. W., Butler, M. H., Bendahhou, S., Dalakas, M. C., Ptacek, L. J. & Goldstein, S. A. (2001) MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. *Cell*, 104(2), 217-31.

Abbott, G. W. & Goldstein, S. A. (1998) A superfamily of small potassium channel subunits: form and function of the MinK-related peptides (MiRPs). *Q Rev Biophys*, 31(4), 357-98.

Adrion, C., Fischer, C.S., Wagner, J., Gurkov, R., Mansmann, U., Strupp, M.: Efficacy and safety of betahistine treatment in patients with Meniere's disease: primary results of a long term, multicentre, double blind, randomised, placebo controlled, dose defining trial (BEMED trial). *BMJ* 2016, 352:h6816.

Angelo, K., Jespersen, T., Grunnet, M., Nielsen, M. S., Klaerke, D. A. & Olesen, S. P. (2002) KCNE5 induces time- and voltage-dependent modulation of the KCNQ1 current. *Biophys J*, 83(4), 1997-2006.

Arweiler-Harbeck, D., Horsthemke, B., Jahnke, K. & Hennies, H. C. (2011) Genetic aspects of familial Meniere's disease. *Otol Neurotol*, 32(4), 695-700.

Atrache Al Attrache, N., Krstulovic, C., Perez Guillen, V., Morera Perez, C. & Perez Garrigues, H. (2016) Response Over Time of Vertigo Spells to Intratympanic Dexamethasone Treatment in Meniere's Disease Patients. *J Int Adv Otol*, 12(1), 92-7.

Attye, A., Eliezer, M., Medici, M., et al. In vivo imaging of saccular hydrops in humans reflects sensorineural hearing loss rather than Meniere's disease symptoms. *Eur Radiol*, 28:2916 – 2922.

Barath, K., Schuknecht, B., Naldi, A. M., Schrepfer, T., Bockisch, C. J. & Hegemann, S. C. (2014) Detection and grading of endolymphatic hydrops in Meniere disease using MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*, 35(7), 1387-92.

Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M. & Romey, G. (1996) K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature*, 384(6604), 78-80.

Barro-Soria, R., Rebolledo, S., Liin, S. I., Perez, M. E., Sampson, K. J., Kass, R. S. & Larsson, H. P. (2014) KCNE1 divides the voltage sensor movement in KCNQ1/KCNE1 channels into two steps. *Nat Commun*, 5, 3750.

Berezin, C., Glaser, F., Rosenberg, J., Paz, I., Pupko, T., Fariselli, P., Casadio, R. & Ben-Tal, N. (2004) ConSeq: the identification of functionally and structurally important residues in protein sequences. *Bioinformatics*, 20(8), 1322-4.

Bruderer, S.G., Bodmer, D., Stohler, N.A., et al. (2017) Population-based study on the epidemiology of Meniere's disease. *Audiol Neurootol*, 22:74 – 82.

Cabrera, S., Sanchez, E., Requena, T., Martinez-Bueno, M., Benitez, J., Perez, N., Trinidad, G., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Martin-Sanz, E., Fraile, J., Perez, P., Alarcon-Riquelme, M. E., Batuecas, A., Espinosa-Sanchez, J. M., Aran, I. & Lopez-Escamez, J. A. (2014) Intronic Variants in the NFKB1 Gene May Influence Hearing Forecast in Patients with Unilateral Sensorineural Hearing Loss in Meniere's Disease. *PLoS One*, 9(11), e112171.

Campbell, C. A., Della Santina, C. C., Meyer, N. C., Smith, N. B., Myrie, O. A., Stone, E. M., Fukushima, K., Califano, J., Carey, J. P., Hansen, M. R., Gantz, B. J., Minor, L. B. & Smith, R. J. (2010) Polymorphisms in KCNE1 or KCNE3 are not associated with Meniere disease in the Caucasian population. *Am J Med Genet A*, 152a(1), 67-74.

Casani, A. P., Dallan, I., Navari, E., Sellari Franceschini, S. & Cerchiai, N. (2015) Vertigo in childhood: proposal for a diagnostic algorithm based upon clinical experience. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 35(3), 180-5.

Cha, Y. H., Brodsky, J., Ishiyama, G., Sabatti, C. & Baloh, R. W. (2007) The relevance of migraine in patients with Meniere's disease. *Acta Otolaryngol*, 127(12), 1241-5.

Chiarella, G., Petrolo, C. & Cassandro, E. (2015) The genetics of Ménière's disease. *Appl Clin Genet*, 8, 9-17.

Ciorba, A., Skarżyński, P. H., Corazzi, V., Bianchini, C., Aimoni, C. & Hatzopoulos, S. (2017) Assessment Tools for Use in Patients with Ménière Disease: An Update. *Med Sci Monit*, 23, 6144-6149.

da Costa, S. S., de Sousa, L. C. & Piza, M. R. (2002) Meniere's disease: overview, epidemiology, and natural history. *Otolaryngol Clin North Am*, 35(3), 455-95.

de Castro, M. P., Aranega, A. & Franco, D. (2006) Protein distribution of Kcnq1, Kcnh2, and Kcne3 potassium channel subunits during mouse embryonic development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 288(3), 304-15.

Delpon, E., Cordeiro, J. M., Nunez, L., Thomsen, P. E., Guerchicoff, A., Pollevick, G. D., Wu, Y., Kanters, J. K., Larsen, C. T., Hofman-Bang, J., Burashnikov, E., Christiansen, M. & Antzelevitch, C. (2008) Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 1(3), 209-18.

- Dias Da Silva, M. R., Cerutti, J. M., Arnaldi, L. A. & Maciel, R. M. (2002) A mutation in the KCNE3 potassium channel gene is associated with susceptibility to thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(11), 4881-4.
- Doi, K., Sato, T., Kuramasu, T., Hibino, H., Kiahara, T., Horii, A., Matsushiro, N., Fuse, Y. & Kubo, T. (2005) Menière's Disease Is Associated with Single Nucleotide Polymorphisms in the Human Potassium Channel Genes, KCNE1 and KCNE3. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.*, 67(5), 289-93.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. & MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, 280(5360), 69-77.
- Dziadziola, J. K., Laurikainen, E. L., Rachel, J. D. & Quirk, W. S. (1999) Betahistine increases vestibular blood flow. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 120(3), 400-5.
- Ehmke, H. (2002) Physiological functions of the regulatory potassium channel subunit KCNE1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282(3), R637-8.
- Foster, C. A. & Breeze, R. E. (2013) Endolymphatic hydrops in Meniere's disease: cause, consequence, or epiphenomenon? *Otol Neurotol*, 34(7), 1210-4.
- Fransen, E., Verstreken, M., Verhagen, W. I., Wuyts, F. L., Huygen, P. L., D'Haese, P., Robertson, N. G., Morton, C. C., McGuirt, W. T., Smith, R. J., Declau, F., Van de Heyning, P. H. & Van Camp, G. (1999) High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. *Hum Mol Genet*, 8(8), 1425-9.
- Frejo, L., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Aran, I., Batuecas-Caletrio, A., Perez-Guillen, V., Perez-Garrigues, H., Fraile, J., Martin-Sanz, E., Tapia, M. C., Trinidad, G., García-Arumi, A. M., González-Aguado, R., Espinosa-Sanchez, J. M., Marques, P., Perez, P., Benitez, J. & Lopez-Escamez, J. A. (2016) Clinical Subgroups in Bilateral Meniere Disease. *Front Neurol*, 7, 182.
- Frejo, L., Giegling, I., Teggi, R., Lopez-Escamez, J.A., Rujescu, D. (2016) Genetics of vestibular disorders: pathophysiological insights. *J Neurol*, 263 (Suppl 1): 45
- Frykholm, C., Larsen, H. C., Dahl, N., Klar, J., Rask-Andersen, H. & Friberg, U. (2006) Familial Meniere's disease in five generations. *Otol Neurotol*, 27(5), 681-6.
- Furuta, T., Teranishi, M., Uchida, Y., Nishio, N., Kato, K., Otake, H., Yoshida, T., Tagaya, M., Suzuki, H., Sugiura, M., Sone, M., Hiramatsu, M., Sugiura, S., Ando, F., Shimokata, H. & Nakashima, T. (2011) Association of interleukin-1 gene polymorphisms with sudden sensorineural hearing loss and Meniere's disease. *Int J Immunogenet*, 38(3), 249-54.



- Gabrikova, D., Frykholm, C., Friberg, U., Lahsaee, S., Entesarian, M., Dahl, N. & Klar, J. (2010) Familial Meniere's disease restricted to 1.48 Mb on chromosome 12p12.3 by allelic and haplotype association. *J Hum Genet*, 55(12), 834-7.
- Gallego-Martinez, A., Espinosa-Sanchez, J.M. & Lopez-Escamez, J.A. (2018) Genetic contribution to vestibular diseases. *J Neurol*, 265(Suppl 1): 29
- Garcia-Purrinos, F. J., Ferri, E., Rosell, A. & Calvo, J. (2005) [Combined intratympanic and intravenous dexamethasone to control vertigo in Meniere disease]. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 56(2), 74-7.
- Garduno-Anaya, M. A., Couthino De Toledo, H., Hinojosa-Gonzalez, R., Pane-Pianese, C. & Rios-Castaneda, L. C. (2005) Dexamethasone inner ear perfusion by intratympanic injection in unilateral Meniere's disease: a two-year prospective, placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 133(2), 285-94.
- Gates, P. (2005) Hypothesis: could Meniere's disease be a channelopathy? *Intern Med J*, 35(8), 488-9.
- Gazquez, I. & Lopez-Escamez, J. A. (2011) Genetics of recurrent vertigo and vestibular disorders. *Curr Genomics*, 12(6), 443-50.
- Gazquez, I., Lopez-Escamez, J. A., Moreno, A., Campbell, C. A., Meyer, N. C., Carey, J. P., Minor, L. B., Gantz, B. J., Hansen, M. R., Della Santina, C. C., Aran, I., Soto-Varela, A., Santos, S., Batuecas, A., Perez-Garrigues, H., Lopez-Nevot, A., Smith, R. J. & Lopez-Nevot, M. A. (2011) Functional variants in NOS1 and NOS2A are not associated with progressive hearing loss in Meniere's disease in a European Caucasian population. *DNA Cell Biol*, 30(9), 699-708.
- Gazquez, I., Moreno, A., Requena, T., Ohmen, J., Santos-Perez, S., Aran, I., Soto-Varela, A., Perez-Garrigues, H., Lopez-Nevot, A., Batuecas, A., Friedman, R. A., Lopez-Nevot, M. A. & Lopez-Escamez, J. A. (2013) Functional variants of MIF, INFG and TFNA genes are not associated with disease susceptibility or hearing loss progression in patients with Meniere's disease. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 270(4), 1521-9.
- Gbahou, F., Davenas, E., Morisset, S. & Arrang, J. M. (2010) Effects of betahistine at histamine H3 receptors: mixed inverse agonism/agonism in vitro and partial inverse agonism in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 334(3), 945-54.
- Greco, A., Gallo, A., Fusconi, M., Marinelli, C., Macri, G. F. & de Vincentiis, M. (2012) Meniere's disease might be an autoimmune condition? *Autoimmun Rev*, 11(10), 731-8.

- Grunnet, M., Jespersen, T., Rasmussen, H. B., Ljungstrom, T., Jorgensen, N. K., Olesen, S. P. & Klaerke, D. A. (2002) KCNE4 is an inhibitory subunit to the KCNQ1 channel. *J Physiol*, 542(Pt 1), 119-30.
- Guerra-Jiménez, G., Arenas Rodríguez, A., Falcón González, J. C., Pérez Plasencia, D. & Ramos Macías, Á. (2017) Epidemiology of vestibular disorders in the otoneurology unit. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 68(6), 317-322.
- Gurkov, R., Pyyko, I., Zou, J. & Kentala, E. (2016) What is Meniere's disease? A contemporary re-evaluation of endolymphatic hydrops. *J Neurol*, 263 Suppl 1, S71-81.
- Güneri, E. A., Çakır, A. & Mutlu, B. (2016) Validity and Reliability of the Diagnostic Tests for Ménière's Disease. *Turk Arch Otorhinolaryngol*, 54(3), 124-130.
- Hamann, K. F. & Haarfeldt, R. (2006) [Vestibular evoked myogenic potentials]. *HNO*, 54(5), 415-26; quiz 427.
- Harris, J. P. & Alexander, T. H. (2010) Current-day prevalence of Meniere's syndrome. *Audiol Neurootol*, 15(5), 318-22.
- Havia, M. & Kentala, E. (2004) Progression of symptoms of dizziness in Meniere's disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 130(4), 431-5.
- Havia, M., Kentala, E. & Pyykko, I. (2002) Hearing loss and tinnitus in Meniere's disease. *Auris Nasus Larynx*, 29(2), 115-9.
- Havia, M., Kentala, E. & Pyykko, I. (2005) Prevalence of Meniere's disease in general population of Southern Finland. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 133(5), 762-8.
- Hegele, R. A. (2002) SNP judgments and freedom of association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(7), 1058-61.
- Hietikko, E., Kotimäki, J., Kentala, E., Klockars, T., Sorri, M. & Mannikko, M. (2011) Finnish familial Meniere disease is not linked to chromosome 12p12.3, and anticipation and cosegregation with migraine are not common findings. *Genet Med*, 13(5), 415-20.
- Hietikko, E., Kotimäki, J., Okuloff, A., Sorri, M. & Mannikko, M. (2012) A replication study on proposed candidate genes in Meniere's disease, and a review of the current status of genetic studies. *Int J Audiol*, 51(11), 841-5.
- Hietikko, E., Kotimäki, J., Sorri, M. & Männikkö, M. (2013) High incidence of Meniere-like symptoms in relatives of Meniere patients in the areas of Oulu University Hospital and Kainuu Central Hospital in Finland. *Eur J Med Genet*, 56(6), 279-85.

Hillman, T. M., Arriaga, M. A. & Chen, D. A. (2003) Intratympanic steroids: do they acutely improve hearing in cases of cochlear hydrops? *Laryngoscope*, 113(11), 1903-7.

Horner, K. C. & Cazals, Y. (2005) Stress hormones in Meniere's disease and acoustic neuroma. *Brain Res Bull*, 66(1), 1-8.

Huang, Y., Teranishi, M., Uchida, Y., Nishio, N., Kato, K., Otake, H., Yoshida, T., Sone, M., Sugiura, S., Ando, F., Shimokata, H. & Nakashima, T. (2013) Association between polymorphisms in genes encoding methylenetetrahydrofolate reductase and the risk of Meniere's disease. *J Neurogenet*, 27(1-2), 5-10.

Huppert, D., Strupp, M. & Brandt, T. (2010) Long-term course of Meniere's disease revisited. *Acta Otolaryngol*, 130(6), 644-51.

Ibekwe, T. S., Fasunla, J. A., Ibekwe, P. U., Obasikene, G. C., Onakoya, P. A. & Nwaorgu, O. G. (2008) Migraine and Meniere's disease: two different phenomena with frequently observed concomitant occurrences. *J Natl Med Assoc*, 100(3), 334-8.

Ishiyama, G., Lopez, I., Baloh, R. W. & Ishiyama, A. (2007) Histopathology of the vestibular end organs after intratympanic gentamicin failure for Meniere's disease. *Acta Otolaryngol*, 127(1), 34-40.

James, A. L. & Burton, M. J. (2001) Betahistine for Meniere's disease or syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD001873.

Jespersen, T., Grunnet, M. & Olesen, S. P. (2005) The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology (Bethesda)*, 20, 408-16.

Kim, H. H., Wiet, R. J. & Battista, R. A. (2005) Trends in the diagnosis and the management of Meniere's disease: results of a survey. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 132(5), 722-6.

Kim, S. H., Kim, J. Y., Lee, H. J., Gi, M., Kim, B. G. & Choi, J. Y. (2014) Autoimmunity as a candidate for the etiopathogenesis of Meniere's disease: detection of autoimmune reactions and diagnostic biomarker candidate. *PLoS One*, 9(10), e111039.

Kitahara, T., Okamoto, H., Fukushima, M., Sakagami, M., Ito, T., Yamashita, A., Ota, I. & Yamanaka, T. (2016) A Two-Year Randomized Trial of Interventions to Decrease Stress Hormone Vasopressin Production in Patients with Meniere's Disease-A Pilot Study. *PLoS One*, 11(6), e0158309.

Klar, J., Frykholm, C., Friberg, U. & Dahl, N. (2006) A Meniere's disease gene linked to chromosome 12p12.3. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 141B(5), 463-7.

- Klockars, T. & Kentala, E. (2007) Inheritance of Meniere's disease in the Finnish population. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 133(1), 73-7.
- Lamounier, P., Gobbo, D. A., Souza, T. S., Oliveira, C. A. & Bahmad, F. (2014) Electrocochleography for Ménière's disease: is it reliable? *Braz J Otorhinolaryngol*, 80(6), 527-32.
- Lee, J. M., Kim, M. J., Jung, J., Kim, H. J., Seo, Y. J. & Kim, S. H. (2015) Genetic aspects and clinical characteristics of familial Meniere's disease in a South Korean population. *Laryngoscope*, 125(9), 2175-80.
- Lee, M. P., Ravenel, J. D., Hu, R. J., Lustig, L. R., Tomaselli, G., Berger, R. D., Brandenburg, S. A., Litzzi, T. J., Bunton, T. E., Limb, C., Francis, H., Gorelikow, M., Gu, H., Washington, K., Argani, P., Goldenring, J. R., Coffey, R. J. & Feinberg, A. P. (2000) Targeted disruption of the *Kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J Clin Invest*, 106(12), 1447-55.
- Letts, V. A., Valenzuela, A., Dunbar, C., Zheng, Q. Y., Johnson, K. R. & Frankel, W. N. (2000) A new spontaneous mouse mutation in the *Kcne1* gene. *Mamm Genome*, 11(10), 831-5.
- Li, Y. J., Jin, Z. G. & Xu, X. R. (2016) Variants in the *KCNE1* or *KCNE3* gene and risk of Meniere's disease: A meta-analysis. *J Vestib Res*, 25(5-6), 211-8.
- Lopez-Escamez, J. A., Carey, J., Chung, W. H., Goebel, J. A., Magnusson, M., Mandala, M., Newman-Toker, D. E., Strupp, M., Suzuki, M., Trabalzini, F., Bisdorff, A., Classification Committee of the Barany, S., Japan Society for Equilibrium, R., European Academy of, O., Neurotology, Equilibrium Committee of the American Academy of, O.-H., Neck, S. & Korean Balance, S. (2015) Diagnostic criteria for Meniere's disease. *J Vestib Res*, 25(1), 1-7.
- Lopez-Escamez, J. A., Saenz-Lopez, P., Acosta, L., Moreno, A., Gazquez, I., Perez-Garrigues, H., Lopez-Nevot, A. & Lopez-Nevot, M. A. (2010) Association of a functional polymorphism of *PTPN22* encoding a lymphoid protein phosphatase in bilateral Meniere's disease. *Laryngoscope*, 120(1), 103-7.
- Lundquist, A. L., Turner, C. L., Ballester, L. Y. & George, A. L., Jr. (2006) Expression and transcriptional control of human *KCNE* genes. *Genomics*, 87(1), 119-28.
- Lvov, A., Gage, S. D., Berrios, V. M. & Kobertz, W. R. (2010) Identification of a protein-protein interaction between *KCNE1* and the activation gate machinery of *KCNQ1*. *J Gen Physiol*, 135(6), 607-18.
- Magnan, J., Özgirgin, O.N., Trabalzini, F., Lacour M., Lopez Escamez, J.A., Magnusson, M., Güneri, E.A., Guyot, J.P., Nuti, D., Mandalà, M. (2018) European position statement on diagnosis, and treatment of Meniere's disease. *J Int Adv Otol* 2018, 14:317-321.

Martin-Sierra, C., Gallego-Martinez, A., Requena, T., Frejo, L., Batuecas-Caletrio, A. & Lopez-Escamez, J. A. (2017) Variable expressivity and genetic heterogeneity involving DPT and SEMA3D genes in autosomal dominant familial Meniere's disease. *Eur J Hum Genet*, 25(2), 200-207.

McCrossan, Z. A. & Abbott, G. W. (2004) The MinK-related peptides. *Neuropharmacology*, 47(6), 787-821.

Megerian, C. A., Heddon, C., Melki, S., Momin, S., Paulsey, J., Obokhare, J. & Alagramam, K. (2010) Surgical induction of endolymphatic hydrops by obliteration of the endolymphatic duct. *J Vis Exp*(35).

Melman, Y. F., Um, S. Y., Krumerman, A., Kagan, A. & McDonald, T. V. (2004) KCNE1 binds to the KCNQ1 pore to regulate potassium channel activity. *Neuron*, 42(6), 927-37.

Merchant, S. N., Adams, J. C. & Nadol, J. B., Jr. (2005) Pathophysiology of Meniere's syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops? *Otol Neurotol*, 26(1), 74-81.

Minor, L. B., Schessel, D. A. & Carey, J. P. (2004) Meniere's disease. *Curr Opin Neurol*, 17(1), 9-16.

Muzzi, E., Rinaldo, A. & Ferlito, A. (2008) Meniere disease: diagnostic instrumental support. *Am J Otolaryngol*, 29(3), 188-94.

Nabi, S. & Parnes, L. S. (2009) Bilateral Meniere's disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 17(5), 356-62.

Naganawa, S. & Nakashima, T. (2014) Visualization of endolymphatic hydrops with MR imaging in patients with Ménière's disease and related pathologies: current status of its methods and clinical significance. *Jpn J Radiol*, 32(4), 191-204.

Naganawa, S., Satake, H., Iwano, S., Fukatsu, H., Sone, M. & Nakashima, T. (2008) Imaging endolymphatic hydrops at 3 tesla using 3D-FLAIR with intratympanic Gd-DTPA administration. *Magn Reson Med Sci*, 7(2), 85-91.

Nakajo, K. & Kubo, Y. (2007) KCNE1 and KCNE3 stabilize and/or slow voltage sensing S4 segment of KCNQ1 channel. *J Gen Physiol*, 130(3), 269-81.

Nakashima, T., Naganawa, S., Sugiura, M., Teranishi, M., Sone, M., Hayashi, H., Nakata, S., Katayama, N. & Ishida, I. M. (2007) Visualization of endolymphatic hydrops in patients with Meniere's disease. *Laryngoscope*, 117(3), 415-20.

- Naples, J.G., Henry, L., Brant, J.A., Eliades, S.J., Ruckenstein, M.J. (2019) Intratympanic Therapies in Meniere Disease: Evaluation of Outcomes and Early Vertigo Control. *Laryngoscope*, 129:216-221.
- Nicolas, S., Kmeid, M., Mansour, C., Fraysse, B., Deguine, O., Marx, M., Fraysse, M.E. (2019) Long-term Vertigo Control and Vestibular Function After Low-dose On-demand Transtympanic Gentamicin for Refractory Meniere's Disease. *Otol Neurotol.*, 40:218-225.
- Nishio, N., Teranishi, M., Uchida, Y., Sugiura, S., Ando, F., Shimokata, H., Sone, M., Otake, H., Kato, K., Yoshida, T., Tagaya, M., Hibi, T. & Nakashima, T. (2013) Polymorphisms in genes encoding aquaporins 4 and 5 and estrogen receptor alpha in patients with Meniere's disease and sudden sensorineural hearing loss. *Life Sci*, 92(10), 541-6.
- Ohmen, J. D., White, C. H., Li, X., Wang, J., Fisher, L. M., Zhang, H., Derebery, M. J. & Friedman, R. A. (2013) Genetic evidence for an ethnic diversity in the susceptibility to Meniere's disease. *Otol Neurotol*, 34(7), 1336-41.
- Osteen, J. D., Gonzalez, C., Sampson, K. J., Iyer, V., Rebolledo, S., Larsson, H. P. & Kass, R. S. (2010) KCNE1 alters the voltage sensor movements necessary to open the KCNQ1 channel gate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(52), 22710-5.
- Pawelczyk, M., Rajkowska, E., Kotylo, P., Dudarewicz, A., Van Camp, G. & Sliwinska-Kowalska, M. (2012) Analysis of inner ear potassium recycling genes as potential factors associated with tinnitus. *Int J Occup Med Environ Health*, 25(4), 356-64.
- Pawelczyk, M., Van Laer, L., Fransen, E., Rajkowska, E., Konings, A., Carlsson, P. I., Borg, E., Van Camp, G. & Sliwinska-Kowalska, M. (2009) Analysis of gene polymorphisms associated with K ion circulation in the inner ear of patients susceptible and resistant to noise-induced hearing loss. *Ann Hum Genet*, 73(Pt 4), 411-21.
- Perez-Garrigues, H., Lopez-Escamez, J. A., Perez, P., Sanz, R., Orts, M., Marco, J., Barona, R., Tapia, M. C., Aran, I., Cenjor, C., Perez, N., Morera, C. & Ramirez, R. (2008) Time course of episodes of definitive vertigo in Meniere's disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 134(11), 1149-54.
- Pourrier, M., Schram, G. & Nattel, S. (2003) Properties, expression and potential roles of cardiac K<sup>+</sup> channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KChAP. *J Membr Biol*, 194(3), 141-52.
- Pyykko, I., Nakashima, T., Yoshida, T., Zou, J. & Naganawa, S. (2013) Meniere's disease: a reappraisal supported by a variable latency of symptoms and the MRI visualisation of endolymphatic hydrops. *BMJ Open*, 3(2).

Radtke, A., Lempert, T., Gresty, M. A., Brookes, G. B., Bronstein, A. M. & Neuhauser, H. (2002) Migraine and Meniere's disease: is there a link? *Neurology*, 59(11), 1700-4.

Ray, J., Carr, S. D., Popli, G. & Gibson, W. P. (2016) An epidemiological study to investigate the relationship between Meniere's disease and migraine. *Clin Otolaryngol*, 41(6), 707-710.

Requena, T., Cabrera, S., Martin-Sierra, C., Price, S. D., Lysakowski, A. & Lopez-Escamez, J. A. (2015) Identification of two novel mutations in FAM136A and DTNA genes in autosomal-dominant familial Meniere's disease. *Hum Mol Genet*, 24(4), 1119-26.

Requena, T., Espinosa-Sanchez, J. M., Cabrera, S., Trinidad, G., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Teggi, R., Perez, P., Batuecas-Caletrio, A., Fraile, J., Aran, I., Martin, E., Benitez, J., Perez-Fernandez, N. & Lopez-Escamez, J. A. (2014) Familial clustering and genetic heterogeneity in Meniere's disease. *Clin Genet*, 85(3), 245-52.

Requena, T., Gazquez, I., Moreno, A., Batuecas, A., Aran, I., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Perez, N., Perez-Garrigues, H., Lopez-Nevot, A., Martin, E., Sanz, R., Perez, P., Trinidad, G., Alarcon-Riquelme, M. E., Teggi, R., Zagato, L., Lopez-Nevot, M. A. & Lopez-Escamez, J. A. (2013) Allelic variants in TLR10 gene may influence bilateral affectation and clinical course of Meniere's disease. *Immunogenetics*, 65(5), 345-55.

Risch, N. J. (2000) Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405(6788), 847-56.

Sajjadi, H. & Paparella, M. M. (2008) Meniere's disease. *The Lancet*, 372(9636), 406-414.

Salt, A. N. & Plontke, S. K. (2010) Endolymphatic hydrops: pathophysiology and experimental models. *Otolaryngol Clin North Am*, 43(5), 971-83.

Sanchez, E., Lopez-Escamez, J. A., Lopez-Nevot, M. A., Lopez-Nevot, A., Cortes, R. & Martin, J. (2004) Absence of COCH mutations in patients with Meniere disease. *Eur J Hum Genet*, 12(1), 75-8.

Sand, P. G., Langguth, B. & Kleinjung, T. (2011) Deep resequencing of the voltage-gated potassium channel subunit KCNE3 gene in chronic tinnitus. *Behav Brain Funct*, 7, 39.

Sanguinetti, M. C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P. S., Atkinson, D. L. & Keating, M. T. (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*, 384(6604), 80-3.

Schroeder, B. C., Waldegger, S., Fehr, S., Bleich, M., Warth, R., Greger, R. & Jentsch, T. J. (2000) A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3. *Nature*, 403(6766), 196-9.

Schuknecht, H. F., Suzuka, Y. & Zimmermann, C. (1990) Delayed endolymphatic hydrops and its relationship to Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 99(11), 843-53.

Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q., Sun, Y., Rubie, C., Hordt, M., Towbin, J. A., Borggrefe, M., Assmann, G., Qu, X., Somberg, J. C., Breithardt, G., Oberti, C. & Funke, H. (1997) KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet*, 17(3), 267-8.

Schwartz, P. J., Spazzolini, C., Crotti, L., Bathen, J., Amlie, J. P., Timothy, K., Shkolnikova, M., Berul, C. I., Bitner-Glindzicz, M., Toivonen, L., Horie, M., Schulze-Bahr, E. & Denjoy, I. (2006) The Jervell and Lange-Nielsen syndrome: natural history, molecular basis, and clinical outcome. *Circulation*, 113(6), 783-90.

Selmani, Z., Marttila, T. & Pyykko, I. (2005) Incidence of virus infection as a cause of Meniere's disease or endolymphatic hydrops assessed by electrocochleography. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 262(4), 331-4.

Seyed Tootoonchi, S. J., Ghiasi, S., Shadara, P., Samani, S. M. & Fouladi, D. F. (2016) Hearing function after betahistine therapy in patients with Meniere's disease. *Braz J Otorhinolaryngol*, 82(5), 500-6.

Shojaku, H., Watanabe, Y., Fujisaka, M., Tsubota, M., Kobayashi, K., Yasumura, S. & Mizukoshi, K. (2005) Epidemiologic characteristics of definite Meniere's disease in Japan. A long-term survey of Toyama and Niigata prefectures. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 67(5), 305-9.

Splawski, I., Shen, J., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Lehmann, M. H. & Keating, M. T. (1998) Genomic structure of three long QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, and KCNE1. *Genomics*, 51(1), 86-97.

Stapleton, E. & Mills, R. (2008) Clinical diagnosis of Meniere's disease: how useful are the American Academy of Otolaryngology Head and Neck Surgery Committee on Hearing and Equilibrium guidelines? *J Laryngol Otol*, 122(8), 773-9.

Strupp, M. & Brandt, T. (2013) Peripheral vestibular disorders. *Curr Opin Neurol*, 26(1), 81-9.

Strupp, M., Dieterich, M. & Brandt, T. (2013) The treatment and natural course of peripheral and central vertigo. *Dtsch Arztebl Int*, 110(29-30), 505-15; quiz 515-6.



- Strupp, M., Kraus, L., Schautzer, F., Rujescu, D. (2018) Meniere's disease: combined pharmacotherapy with betahistine and the MAO-B inhibitor selegiline-an observational study. *J.Neurol*, 265:80-85.
- Syed, I. & Aldren, C. (2012) Meniere's disease: an evidence based approach to assessment and management. *Int J Clin Pract*, 66(2), 166-70.
- Tabor, H. K., Risch, N. J. & Myers, R. M. (2002) Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*, 3(5), 391-7.
- Takahashi, M., Odagiri, K., Sato, R., Wada, R. & Onuki, J. (2005) Personal factors involved in onset or progression of Meniere's disease and low-tone sensorineural hearing loss. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 67(5), 300-4.
- Takumi, T., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. (1988) Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science*, 242(4881), 1042-5.
- Takumida, M., Kakigi, A., Takeda, T. & Anniko, M. (2006) Meniere's disease: a long-term follow-up study of bilateral hearing levels. *Acta Otolaryngol*, 126(9), 921-5.
- Teranishi, M., Uchida, Y., Nishio, N., Kato, K., Otake, H., Yoshida, T., Suzuki, H., Sone, M., Sugiura, S., Ando, F., Shimokata, H. & Nakashima, T. (2013) Polymorphisms in genes involved in the free-radical process in patients with sudden sensorineural hearing loss and Meniere's disease. *Free Radic Res*, 47(6-7), 498-506.
- The International HapMap Consortium (2003). The International HapMap Project. *Nature*, 426, 789-796
- Thorp, M. A. & James, A. L. (2005) Prosper Ménière. *The Lancet*, 366(9503), 2137-2139.
- Tinel, N., Diochot, S., Borsotto, M., Lazdunski, M. & Barhanin, J. (2000) KCNE2 confers background current characteristics to the cardiac KCNQ1 potassium channel. *EMBO J*, 19(23), 6326-30.
- Tyrell, J.S., Whinney, D.J., Ukoumunne, O.C., Fleming, L.E., Osborne, N.J. (2014) Prevalence, associated factors, and comorbid conditions for Ménière's disease. ***Ear and Hearing*. 35(4) 162-169**
- Usami, S., Takahashi, K., Yuge, I., Ohtsuka, A., Namba, A., Abe, S., Fransen, E., Patthy, L., Otting, G. & Van Camp, G. (2003) Mutations in the COCH gene are a frequent cause of autosomal dominant progressive cochleo-vestibular dysfunction, but not of Meniere's disease. *Eur J Hum Genet*, 11(10), 744-8.

Valk, W. L., Wit, H. P. & Albers, F. W. (2006) Rupture of Reissner's membrane during acute endolymphatic hydrops in the guinea pig: a model for Meniere's disease? *Acta Otolaryngol*, 126(10), 1030-5.

Valk, W. L., Wit, H. P., Segenhout, J. M., Dijk, F., van der Want, J. J. & Albers, F. W. (2005) Morphology of the endolymphatic sac in the guinea pig after an acute endolymphatic hydrops. *Hear Res*, 202(1-2), 180-7.

Van Laer, L., Carlsson, P. I., Ottschytsch, N., Bondeson, M. L., Konings, A., Vandeveld, A., Dieltjens, N., Franssen, E., Snyders, D., Borg, E., Raes, A. & Van Camp, G. (2006) The contribution of genes involved in potassium-recycling in the inner ear to noise-induced hearing loss. *Hum Mutat*, 27(8), 786-95.

Vassiliou, A., Vlastarakos, P. V., Maragoudakis, P., Candiloros, D. & Nikolopoulos, T. P. (2011) Meniere's disease: Still a mystery disease with difficult differential diagnosis. *Ann Indian Acad Neurol*, 14(1), 12-8.

Vrabec, J. T. (2010) Genetic investigations of Meniere's disease. *Otolaryngol Clin North Am*, 43(5), 1121-32.

Wang, W., Kim, H. J., Lee, J. H., Wong, V., Sihm, C. R., Lv, P., Perez Flores, M. C., Mousavi-Nik, A., Doyle, K. J., Xu, Y. & Yamoah, E. N. (2014) Functional significance of K<sup>+</sup> channel beta-subunit KCNE3 in auditory neurons. *J Biol Chem*, 289(24), 16802-13.

Wangemann, P. (2002) K<sup>(+)</sup> cycling and its regulation in the cochlea and the vestibular labyrinth. *Audiol Neurootol*, 7(4), 199-205.

Wangemann, P., Liu, J. & Marcus, D. C. (1995) Ion transport mechanisms responsible for K<sup>+</sup> secretion and the transepithelial voltage across marginal cells of stria vascularis in vitro. *Hear Res*, 84(1-2), 19-29.

Warth, R. & Barhanin, J. (2002) The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282(3), R639-48.

Wit, H. P., Warmerdam, T. J. & Albers, F. W. (2000) Measurement of the mechanical compliance of the endolymphatic compartments in the guinea pig. *Hear Res*, 145(1-2), 82-90.

Xenellis, J., Papadimitriou, N., Nikolopoulos, T., Maragoudakis, P., Segas, J., Tzagaroulakis, A. & Ferekidis, E. (2006) Intratympanic steroid treatment in idiopathic sudden sensorineural hearing loss: a control study. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 134(6), 940-5.

- Yamamoto, M., Teranishi, M., Naganawa, S., Otake, H., Sugiura, M., Iwata, T., Yoshida, T., Katayama, N., Nakata, S., Sone, M. & Nakashima, T. (2010) Relationship between the degree of endolymphatic hydrops and electrocochleography. *Audiol Neurootol*, 15(4), 254-60.
- Yazdani, N., Khorsandi Ashtiani, M. T., Zarandy, M. M., Mohammadi, S. J., Ghazavi, H., Mahrampour, E., Amiri, P. & Amoli, M. M. (2013) Association between MIF gene variation and Meniere's disease. *Int J Immunogenet*, 40(6), 488-91.
- Yazdani, N., Mojbafan, M., Taleba, M., Amiri, P., Nejadian, F., Ashtiani, M. K. & Amoli, M. M. (2015) Sex-specific association of RANTES gene -403 variant in Meniere's disease. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 272(9), 2221-5.
- Yeh, T. H., Herman, P., Tsai, M. C., Tran Ba Huy, P. & Van den Abbeele, T. (1998) A cationic nonselective stretch-activated channel in the Reissner's membrane of the guinea pig cochlea. *Am J Physiol*, 274(3 Pt 1), C566-76.
- Yetişer, S. (2018) Intratympanic Gentamicin for Intractable Ménière's Disease - A Review and Analysis of Audiovestibular Impact. *Int Arch Otorhinolaryngol*, 22(2), 190-194.
- Zingler, V. C., Cnyrim, C., Jahn, K., Weintz, E., Fernbacher, J., Frenzel, C., Brandt, T. & Strupp, M. (2007) Causative factors and epidemiology of bilateral vestibulopathy in 255 patients. *Ann Neurol*, 61(6), 524-32.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AAO-HNS	American Academy of Otolaryngology, Head & Neck Surgery
A	Adenin
ADH	Antidiuretisches Hormon
AP	Summenaktionspotential
AQP4	Aquaporine 4
AQP5	Aquaporine 5
BEAR	brainstem-evoked auditory responses
Cav1	Caveoline 1
CM	Mikrophonpotential
COCH	Cochlin
C	Cytosin
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DPOAE	Distorsionsprodukte von Otoakustischen Emissionen
DSGZ	Deutsches Schwindel- und Gleichgewichtszentrum
ECochG	Elektrocochleographie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalographie
GHCl	Guanidiumhydrochloride
G	Guanin
HSP70	Hitzeschockprotein 70
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL1A	Interleukine 1A
IL1B	Interleukine 1B
INFG	Interferone Gamma
KCNE1 - 5	Potassium voltage-gated channel subfamily E member 1 – 5
KCNQ1	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1
KCNQ4	Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 4
Kon	Kontrollen
Kv-Kanal	spannungsabhängiger Kanal
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time Of Flight
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
MM	Morbus Menière
MRT	Magnetresonanztomographie
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reductase
NFKB1	Nuclear Factor Kappa B1
NOS1	Nitric Oxide Synthase 1

NOS2A	Nitric Oxide Synthase 2A
NOS3	Nitric Oxide Synthase 3
OAE	Otoakustische Emissionen
Pat	Patienten
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PTPN22	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22
Rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SBE	Single Base Extension
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOAE	spontane otoakustische Emissionen
SP	Summationspotential
T	Thymin
TLR10	Toll-like Receptor 10
TNFA	Tumor Nekrose Factor Alpha
TOAE	transitorisch evozierte otoakustische Emissionen
VEMPs	vestibulär evozierte myogene Potentiale

## 9 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass es sich bei der von mir eingereichten schriftlichen Arbeit mit dem Titel

„Der Einfluss von Polymorphismen in den spannungsabhängigen Kaliumkanalgenen KCNE1 und KCNE3 auf Morbus Menière“

um eine von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasste Arbeit handelt. Ich erkläre weiterhin, dass ich mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung einer akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort/Datum: München, den 29.04.2020

Unterschrift: Inga Schmude

## **10 Danksagung**

Mein persönlicher Dank gilt Frau Professor Dr. med. Marianne Dieterich, die mir als Direktorin der neurologischen Klinik und Poliklinik für Neurologie und dem Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit gab.

Zudem danke ich Herrn Professor Dr. Dan Rujescu für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation sowie für die Möglichkeit zur Teilnahme an seiner Forschungsgruppe, sowie Herrn Professor Dr. Michael Strupp für seine Unterstützung im Rahmen der Patientenrekrutierung am DSGZ.

Mein besonderer Dank gilt allen voran Frau Dr. rer. biol. hum. Hartmann und Frau Privatdozentin Dr. rer. biol. hum. Giegling, die durch ihre exzellente Betreuung sowohl der praktischen Arbeit am DSGZ als auch der theoretischen Ausarbeitung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere Frau Dr. Hartmann stand mir während der gesamten Dissertation zu jeder Zeit mit viel Engagement zur Seite, war zur Beantwortung meiner zahlreichen Fragen zu erreichen und hat mich schließlich durch das Korrekturlesen der Arbeit maßgeblich unterstützt.

Des Weiteren möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die exzellente Arbeit im Rahmen dieser Studie, sowie bei allen Studienteilnehmern für ihre Mithilfe in diesem Projekt bedanken.

Danke an meine Familie und Freunde, die mich immer wieder zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit ermutigt haben.