

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

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

**Genetischer Zusammenhang von Morbus Menière  
und Polymorphismen der Aquaporingene 3, 4 und 5**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Elena Kalb

aus Forchheim

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Robert Gürkov

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. Annette Hartmann

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>11</b>
2.1	Anatomie und Physiologie des Innenohrs .....	11
2.2	Morbus Menière .....	14
2.2.1	Krankheitsbild.....	14
2.2.2	Epidemiologie.....	14
2.2.3	Diagnosekriterien .....	15
2.2.4	Subgruppenbildung .....	18
2.2.5	Ätiopathogenese: Der endolymphatische Hydrops .....	19
2.3	Aquaporine .....	22
2.3.1	Aufbau und Funktion .....	22
2.3.2	Aquaporine im Innenohr.....	26
2.4	Genetische Studien zu Polymorphismen der Aquaporingene 3, 4 und 5 und Morbus Menière .....	28
2.5	Zielsetzung .....	30
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>31</b>
3.1	Studiendesign.....	31
3.1.1	Voraussetzungen .....	31
3.1.2	Datengewinnung .....	31
3.1.3	Studienteilnehmer der Fall-Kontroll-Studie .....	31
3.2	Laborverfahren .....	33
3.2.1	DNA-Extraktion .....	33
3.2.2	DNA-Konzentrationseinstellung .....	35
3.2.3	Genotypisierung .....	37
3.3	Qualitätskontrolle.....	39
3.4	Imputation von Genotypen und Zusammenfügen der Daten .....	43
3.5	Untersuchte Einzelnukleotidpolymorphismen .....	44
3.6	Statistische Analyse .....	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>47</b>
4.1	Assoziationsanalyse mit mindestens klinisch möglichem Morbus Menière .....	48
4.2	Assoziationsanalyse mit mindestens klinisch wahrscheinlichem Morbus Menière ....	54
4.3	Assoziationsanalyse mit klinisch eindeutigem Morbus Menière.....	56

4.4	Assoziationsanalyse des Symptoms Schwerhörigkeit bei klinisch möglichem Morbus Menière .....	58
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>61</b>
5.1	Diskussion der Methoden.....	61
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	67
5.3	Ausblick.....	75
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole</b> .....	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>93</b>

## 1 Zusammenfassung

Morbus Menière ist eine Erkrankung des Innenohrs, welche durch die Symptomtrias aus Drehschwindelattacken, Tieftonschwerhörigkeit und weiterer auraler Symptomatik, wie Tinnitus oder Druckgefühl, gekennzeichnet ist, und oft mit einem hohen Leidensdruck für die Betroffenen einhergeht. Histopathologische Studien identifizierten den endolymphatischen Hydrops als pathophysiologisches Korrelat, wobei eine multifaktorielle Entstehung diskutiert wird. Eine Theorie der Entstehung ist, dass Dysregulationen der Ionenhomöostase und des Wasserhaushaltes zu Flüssigkeitsverschiebungen zwischen Endo- und Perilymphe führen. In vielen Geweben, unter anderem auch dem Innenohr, konnten Aquaporine (AQP) als Regulatoren des Wasserhaushalts nachgewiesen werden. Die Region-spezifische Expression sowie die Funktion der AQPs machen eine Beteiligung dieser an der Flüssigkeitshomöostase im Innenohr wahrscheinlich. Veränderungen auf molekularer Ebene könnten an einer gestörten Endolymphhomöostase und somit der Entstehung eines Endolymphhydrops beteiligt sein. Epidemiologische Daten, wie Krankheitshäufung in bestimmten ethnischen Gruppen und Altersstufen, sowie weibliche Dominanz in der Prävalenz, deuten zudem auf eine genetische Komponente hin. All dies führte dazu, dass einige Forschungsgruppen nach Mutationen in den Aquaporinen und nach Assoziationen dieser mit der Innenohrerkrankung Morbus Menière suchten. Vor allem die Aquaporine 3, 4 und 5 wurden bisher auf Assoziationen mit Morbus Menière analysiert. Bisherige Studien lieferten jedoch inkonsistente Befunde, welche möglicherweise den kleinen Fallzahlen und inhomogenen Stichproben unterschiedlicher Ethnien geschuldet waren.

In dieser Arbeit wurden im Rahmen einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie vier Einzelnukleotidpolymorphismen in den AQPs 3, 4 und 5, welche bereits in anderen Studien untersucht worden waren, auf Verknüpfungen mit Morbus Menière geprüft. Hierfür wurde im Vergleich zu den bisherigen Studien eine größere Fallzahl von über 300 kaukasischen Menière-Patienten des deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrums und der Neurologischen Poliklinik in München rekrutiert. Von allen Probanden wurde die DNA isoliert und mittels Microarrays genotypisiert. Nach erfolgter Qualitätskontrolle wurden die vier Polymorphismen aus dem Gesamtdatenset extrahiert und es erfolgte die Assoziationsanalyse unter Berücksichtigung 2615 kaukasischer Kontrollprobanden mittels additiver, dominanter und rezessiver logistischer Modelle.

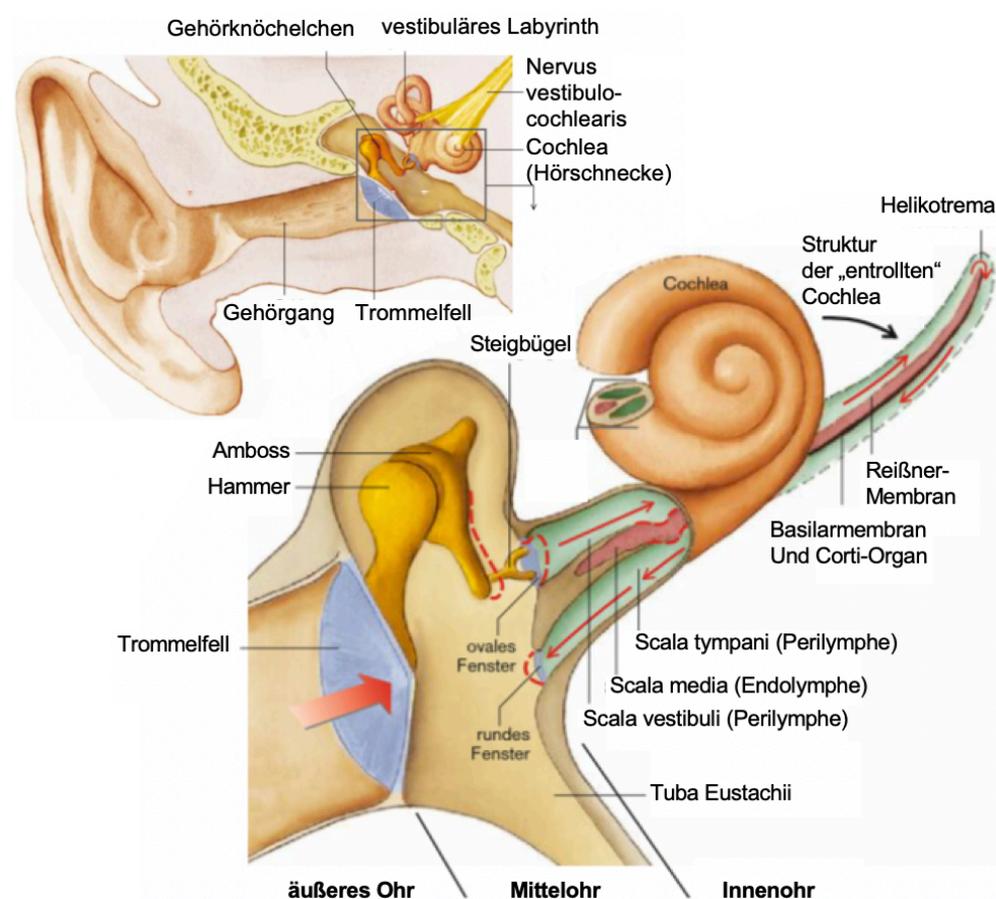
Es zeigte sich eine nominal signifikante Assoziation des Polymorphismus rs376309 im AQP 5-Gen und Morbus Menière bei Betrachtung der gesamten Patientengruppe. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass das G-Allel mit einem erhöhten

Erkrankungsrisiko für Morbus Menière einhergeht (additives Modell:  $p = 0,027$ ,  $OR = 1,33$ ,  $95\% \text{ KI} = 1,03-1,72$ ). In weiteren Analysen in Gruppen mit zunehmender Diagnosesicherheit wie mindestens klinisch wahrscheinlichem oder eindeutigem Morbus Menière blieb diese Assoziation jedoch nicht bestehen. Eine Assoziation in diesem Polymorphismus und Morbus Menière wurde bereits von Nishio et al. 2013 beschrieben, zeigte in deren Studie allerdings eine Assoziation mit dem umgekehrten Risikoallel. Unter Berücksichtigung des Flip-Flop-Phänomens könnten auch Assoziationen mit unterschiedlichen Risikoallelen verschiedener Studien auf eine Beteiligung des Aquaporin 5 in der Krankheitsentstehung des Morbus Menière hinweisen. Zukünftige Replikationsstudien sollten die Ergebnisse verifizieren oder falsifizieren, um Kandidatengene als diagnostische Marker oder die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie ableiten zu können.

## 2 Einleitung

### 2.1 Anatomie und Physiologie des Innenohrs

Eine Voraussetzung für das Verständnis der Pathophysiologie des Morbus Menière sind genaue Kenntnisse der Anatomie und Physiologie des Innenohrs. Vestibularorgan und Cochlea entstehen aus einer gemeinsamen Anlage, sind anatomisch ähnlich aufgebaut und stehen über den Ductus reuniens in Verbindung. Im knöchernen Labyrinth des Innenohrs befindet sich ein häutiges, mit Endolymphe gefülltes Labyrinth, welches vom Perilymphraum, gefüllt mit Perilymphe, umgeben wird (Abbildung 2.1). Endolymphe ist eine kaliumreiche und natriumarme Flüssigkeit. Bei Perilymphe handelt es sich, wie bei Extrazellulärflüssigkeit, um eine natriumreiche und kaliumarme Flüssigkeit. Die unterschiedlichen Ionenzusammensetzungen der zwei Flüssigkeiten haben zur Folge, dass die Endolymphe gegenüber der Perilymphe ein Potenzial von circa +80 mV besitzt (wuHibino & Kurachi, 2006; Ekdale, 2016; Pape *et al.*, 2018).



**Abbildung 2.1:** Aufbau des Hörorgans. Die Cochlea ist entrollt, um die Skalen besser darstellen zu können. Bewegungen des Steigbügels übertragen sich auf die Perilymphe der Scala vestibuli. Mit freundlicher Genehmigung des © Georg Thieme Verlag KG (Pape *et al.*, 2018).

Um die Entstehung sowie Auswirkung des endolymphatischen Hydrops, dem histopathologischen Korrelat der Erkrankung Morbus Menière, zu verstehen, werden die Grundlagen der Schallübertragung in der Cochlea zusammengefasst.

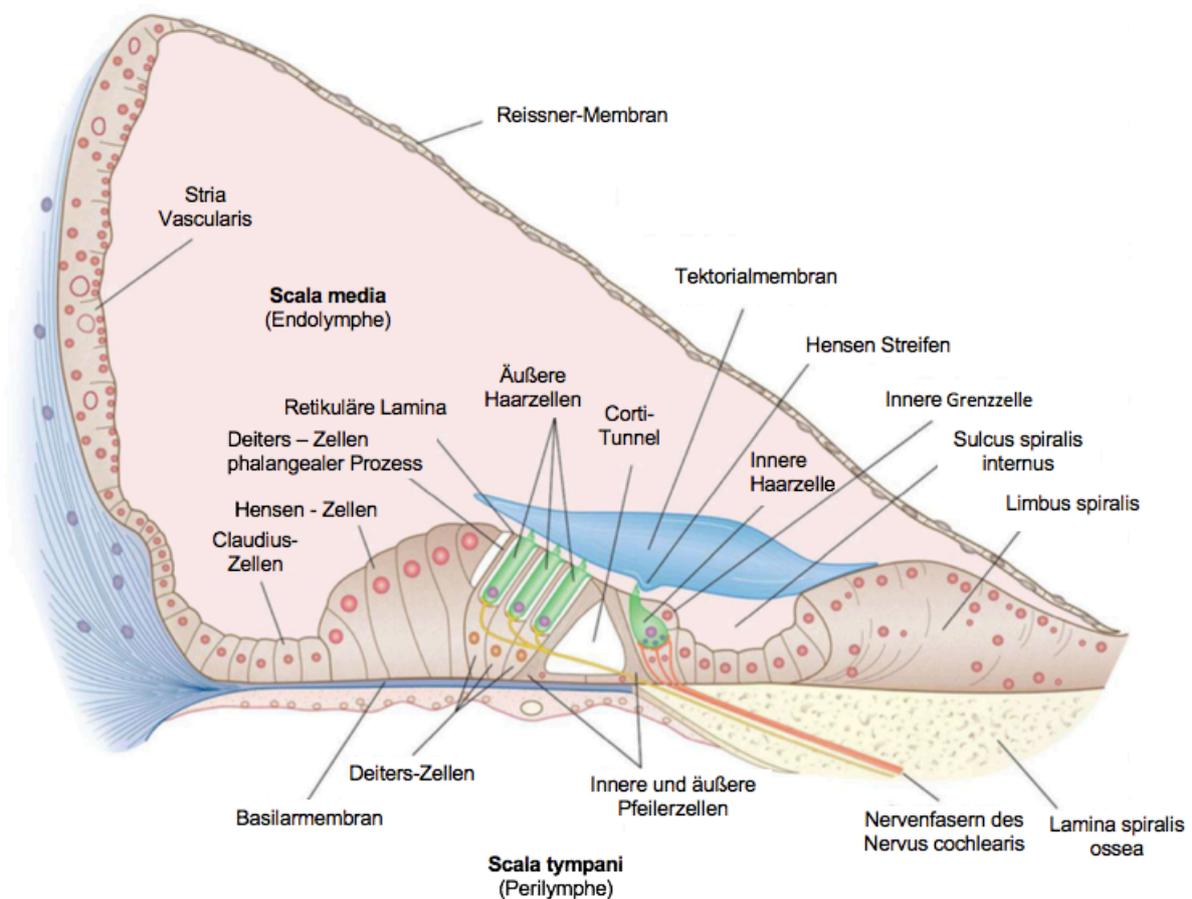
In der Cochlea werden mechanische Schallreize, welche über Ohrmuschel, Gehörgang und Mittelohr in das Innenohr geleitet werden, in neuronale Erregungen übertragen. Die Cochlea besteht aus drei Kanälen: der Scala media, gefüllt mit Endolymphe, und den beiden sie umgebenden Scala tympani und Scala vestibuli, welche Perilymphe enthalten (Braun *et al.*, 2012; Ekdale, 2016; Pape *et al.*, 2018). Die Potenzialdifferenz zwischen den beiden Flüssigkeitskompartimenten, das sogenannte endocochleäre Potenzial, beträgt in der Cochlea etwa 80 mV (Bekesy, 1952b; Hibino & Kurachi, 2006). Da dieses Potenzial für die neuronale Erregung essenziell ist, wird es stets durch verschiedene Ionenpumpen und Ionentransportmechanismen aufrecht erhalten (Wangemann, 2006). Neben homöostatischen Ionenkonzentrationen bedarf es auch der Aufrechterhaltung der Flüssigkeitsvolumina in den verschiedenen Kompartimenten, wozu Wasserkanäle, wie die Aquaporine (vgl. Kapitel 2.3), dienen.

Die Basilarmembran, welche die Scala media und die Scala tympani voneinander trennt, trägt den Sinnesapparat, das Corti-Organ (Abbildung 2.2) (Pape *et al.*, 2018). Die Haarzellen tragen auf ihrer freien Oberfläche feine Härchen unterschiedlicher Größe, die Stereozilien, welche durch feinste Fäden, sogenannte Tip-Links, miteinander verbunden sind (Hudspeth, 1989; Pape *et al.*, 2018). Ein Schallreiz, welcher über die Gehörknöchelchen des Mittelohrs auf das Innenohr übertragen wird, versetzt die Basilarmembran in Schwingungen. Die Schwingungen laufen als sogenannte Wanderwelle die Basilarmembran entlang und bilden nach dem Prinzip der Tonotopie für bestimmte Frequenzen an bestimmten Orten der Membran Schwingungsmaxima (Bekesy, 1952a; Ehret, 1978). Hohe Frequenzen werden dabei an der Schneckenbasis und tiefe Frequenzen an der Schneckenspitze abgebildet (Hudspeth, 1989). Da bei Menière-Erkrankten initial typischerweise die Hörstörung im Tieftonbereich auftritt, wird auf pathophysiologischer Ebene der Beginn der Hydropsformation an der Schneckenspitze vermutet, was bereits in Tiermodellen nachgewiesen werden konnte (Megerian *et al.*, 2008).

Am Ort des Schwingungsmaximums werden durch Scherbewegungen der Basilar- und Tektorialmembran die Stereovilli zuerst der äußeren, anschließend auch der inneren Haarzellen abgebogen und dadurch Ionenkanäle an den Tip-Links geöffnet (Hudspeth, 1989). Die Potenzialdifferenz von 150 mV zwischen endocochleärem Potenzial in der Scala media (+80 mV) und negativem Membranpotenzial der äußeren Haarzellen (-70 mV) treibt durch die Ionenkanäle an den abgebogenen Stereozilien einen Kaliumstrom in die äußeren und inneren Haarzellen, wodurch diese depolarisieren (He *et al.*, 2004; Hibino & Kurachi, 2006; Fettiplace, 2017). Dies hat zur Folge, dass von den inneren Haarzellen präsynaptisch der

Neurotransmitter Glutamat ausgeschüttet wird, durch den die postsynaptischen afferenten Fasern des Hörnervs erregt werden (Safieddine *et al.*, 2012; Fettiplace, 2017). Über den Hörnerv und die Hörbahn wird die neuronale Erregung schließlich an die Hörrinde im Gehirn geleitet, wo die Information verarbeitet wird.

Der komplexe Prozess der Schallweiterleitung, der neuronalen Erregung und schließlich Wahrnehmung eines Tons bedarf einer genauen Regulation der Ionenkonzentrationen und der Flüssigkeitsvolumina in den Kompartimenten des Innenohrs. Kleine Abweichungen, wie eine Volumenzunahme der Endolymphe, wie sie beim Morbus Menière beobachtet wird, können mechanische Störungen am Corti-Organ hervorrufen und die Signalkaskade unterbrechen.



**Abbildung 2.2:** Die zelluläre Struktur der Scala media. Begrenzungen der Scala media sind die Reissner-Membran, die Basilarmembran und das spirale Ligament. Gefüllt ist die Scala media mit kaliumreicher Endolymphe (rosa). Auf der Basilarmembran sitzt das Corti-Organ, welches aus den Sinneszellen, inneren und äußeren Haarzellen, und Stützzellen besteht. Die Haarzellen sind mit den Nervenfasern des 8. Hirnnervs und somit über einige Zwischenschaltpunkte in der Hörbahn mit der Hörrinde im Großhirn verbunden. © (Fettiplace, 2017)

Analog zu den Vorgängen in der Cochlea werden die Reize im Vestibularorgan (Linear- und Drehbeschleunigungen) verarbeitet und über ähnliche Signalkaskaden und den Nervus vestibularis in das Gehirn geleitet (Khan & Chang, 2013; Ekdale, 2016). Kommt es in den Strukturen des Vestibularorgans zu einem Ungleichgewicht der Volumina und Flüssigkeitskonzentrationen, kann es auch hier zu einer Störung kommen, welche sich bei Menière-Patienten typischerweise als Drehschwindelepisoden manifestieren (Foster & Breeze, 2013).

## **2.2 Morbus Menière**

### **2.2.1 Krankheitsbild**

Morbus Menière ist eine multifaktorielle Innenohrerkrankung, welche vermutlich durch eine Kombination aus genetischen-, Umwelt-, immunologischen- und/oder allergologischen Faktoren verursacht wird. Pathophysiologisch wird die Erkrankung mit einem Endolymphhydrops, einer Wasseransammlung im Endolymphraum des Innenohrs, assoziiert. Klinisch zeigt sich Morbus Menière typischerweise mit der Symptomtrias spontan ausgelöster Drehschwindelepisoden, unilateral fluktuierendem sensorineuralen Hörverlust und weiteren Ohrsymptomen, wie Tinnitus und Druckgefühl (Lopez-Escamez J. A. 2015). Normalerweise treten zu Beginn des Krankheitsverlaufs die Schwindelattacken am häufigsten auf, wobei im Anfangsstadium die auralen Symptome und der Hörverlust zwischen den Attacken nahezu komplett regredient sind (Harcourt *et al.*, 2014; Kutlubaev *et al.*, 2020). Typischerweise nehmen die Schwindelattacken im Verlauf ab, die Schwerhörigkeit und die auralen Symptome nehmen jedoch zu und persistieren in späteren Krankheitsstadien auch unabhängig von den episodischen Schwindelattacken (Harcourt *et al.*, 2014; Kutlubaev *et al.*, 2020). Generell kann die Symptomatik von Patient zu Patient sehr variabel sein, weshalb die Diagnosestellung nicht immer einfach ist. Der Krankheitsverlauf ist progressiv und momentan nicht heilbar. Die Patienten weisen in der Regel einen sehr hohen Leidensdruck auf (Talewar *et al.*, 2019). Therapeutisch gibt es verschiedene Ansätze, chirurgisch oder medikamentös, wobei ein individuelles Abwägen, je nach klinischer Ausprägung, Leidensdruck sowie möglichen Komplikationen und Nebenwirkungen, der spezifischen Therapie nötig ist.

### **2.2.2 Epidemiologie**

In der Epidemiologie des Morbus Menière zeigt sich eine differente Studienlage (Harris & Alexander, 2010). Einerseits wird dies dadurch begründet, dass es wenige epidemiologische Studien zu der Erkrankung gibt (Bruderer *et al.*, 2017), andererseits, dass die Erkrankung, gerade in frühen Stadien, nicht eindeutig diagnostizierbar ist (Sajjadi & Paparella, 2008).

Die Spannweite der Prävalenzangaben verschiedener Studien reicht von 17/100000 bis 513/100000 (Watanabe *et al.*, 1995; Havia *et al.*, 2005; Radtke *et al.*, 2008; Harris &

Alexander, 2010; Kim & Cheon, 2020). Diese große Variabilität beruht auf methodischen Differenzen, Änderungen in den Diagnosekriterien und der Betrachtung unterschiedlicher Populationen und Ethnizitäten (Radtke *et al.*, 2008; Harris & Alexander, 2010; Kim & Cheon, 2020). Die wahre Prävalenz liegt am ehesten zwischen den zwei Extremwerten, da bei Watanabe *et al.* die Prävalenz durch eine nicht populationsbasierte Stichprobe eher unterschätzt wurde (Watanabe *et al.*, 1995) und bei Havia *et al.* diese durch eine ungenaue Fragetechnik und zu offene Einschlusskriterien eher überschätzt wurde (Havia *et al.*, 2005). Die meisten Erkrankungsfälle treten sporadisch auf, nur etwa 5 – 9 % sind familiär gehäuft (Requena *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Frejo *et al.*, 2016a). Die meisten Studien stimmten darüber ein, dass generell mehr Frauen als Männer von der Erkrankung betroffen sind (Shojaku *et al.*, 2005; Harris & Alexander, 2010; Ohmen *et al.*, 2013; Tyrrell *et al.*, 2014; Simo *et al.*, 2015; Bruderer *et al.*, 2017; Muelleman *et al.*, 2017). Eine Überschätzung des weiblichen Geschlechts kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da Fehldiagnosen von Morbus Menière bei weiblichen Patienten mit vestibulärer Migräne vermutet werden, da beide Erkrankungen gerade in frühen Stadien sehr ähnlich verlaufen (Lopez-Escamez *et al.*, 2014; Becker-Bense *et al.*, 2019). Mit steigendem Alter zeigen sich zunehmende Krankheitsprävalenzen (Simo *et al.*, 2015), wobei die meisten Diagnosen im Altersbereich zwischen 40-60 Jahren gestellt werden (Sajjadi & Paparella, 2008; Tyrrell *et al.*, 2014; Simo *et al.*, 2015; Bruderer *et al.*, 2017; Suh *et al.*, 2019). Interessanterweise wurde neben Geschlecht und Alter ein deutlicher Trend bei der Ethnizität festgestellt. Morbus Menière scheint eine Erkrankung der Kaukasier zu sein, da die weiße Bevölkerung deutlich häufiger betroffen ist, als asiatisch- oder afrikanisch-stämmige Personen (Ohmen *et al.*, 2013; Tyrrell *et al.*, 2014; Simo *et al.*, 2015).

Bruderer *et al.* und Tyrrell *et al.* untersuchten zudem weitere und für viele Erkrankungen sehr typische Risikofaktoren, wie Rauchen, Alkohol-, Salz- und Kaffeekonsum, und stellten fest, dass diese nicht mit der Krankheitsentstehung assoziiert sind (Tyrrell *et al.*, 2014; Bruderer *et al.*, 2017).

Bezüglich Komorbiditäten zeigte sich häufigeres Auftreten von Begleiterkrankungen aus dem allergischen und autoimmunen Formenkreis sowie Migräne (Tyrrell *et al.*, 2014; Kangasniemi & Hietikko, 2018). Erhöhte Prävalenzen wurden für systemische Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoide Arthritis, Lupus erythematosus, ankylosierende Spondylitis, Hypothyreose und Psoriasis beschrieben (Gazquez *et al.*, 2011; Tyrrell *et al.*, 2014). Bei familiären Menière-Fällen und bei Menière-Patienten mit Migräne stellte man zusätzlich eine erhöhte Prävalenz von Autoimmunerkrankungen fest (Gazquez *et al.*, 2011; Hietikko *et al.*, 2014).

### 2.2.3 Diagnosekriterien

In den Jahren 1972 und 1985 wurden vom Committee on Hearing and Equilibrium of the American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery (AAO-HNS) erstmals

Leitlinien für die Diagnose des Morbus Menière veröffentlicht. 1995 wurden diese revidiert, um sie besser kompatibel und so einfach wie möglich zu gestalten (Foundation, 1995). Sie sollten sowohl für Settings in Universitätskliniken, als auch für niedergelassene Hausärzte anwendbar sein.

Definiert wurde Morbus Menière in der Leitlinie von 1995 als idiopathisches Syndrom des endolymphatischen Hydrops. Bevor sich die Visualisierung des Innenohrs mittels Magnetresonanztomographie (*MRT*) etablierte, konnte der endolymphatische Hydrops nur post mortem histopathologisch gesichert werden. Die Diagnosekriterien basieren somit hauptsächlich auf klinischen Beobachtungen, mit Ausnahme des audiometrischen Befundes. Der Symptomkomplex sich wiederholender, spontaner Schwindelattacken, Schwerhörigkeit, Druckgefühl auf dem Ohr und/oder Tinnitus bildet die Grundlage der Diagnose. Entweder Tinnitus oder Druckgefühl auf dem betroffenen Ohr (oder beides) muss vorhanden sein, um die Diagnose zu stellen.

Schwindel wird definiert als die Wahrnehmung von Bewegung, wenn tatsächlich keine Bewegung in Relation zur Schwerkraft stattfindet. Die Diagnose nach den Kriterien der AAO-HNS bei Morbus Menière fordert spontane Drehschwindelattacken, welche mindestens 20 min, meistens jedoch mehrere Stunden, andauern. Diese können mit gestörtem Gleichgewicht, Übelkeit und Erbrechen einhergehen, ein Bewusstseinsverlust muss ausgeschlossen werden. Für die Diagnose eines klinisch sicheren Morbus Menière müssen mindestens zwei Schwindelattacken mit je 20 Minuten aufgetreten sein. Sensorineuraler Hörverlust sollte mittels 4-Ton-Audiometrie objektiviert werden. In der Leitlinie wurde genau definiert, welche Befunde als Menière-typischer Hörverlust gelten. Verallgemeinert handelt es sich um eine Schallempfindungsstörung (sensorineural) im Tieftonbereich, welche fluktuieren kann. Tinnitus und aurales Druckgefühl sind schwierig zu messen, weshalb das Komitee den Untersuchern einen großen Spielraum zur eigenen Erstellung und Validierung von Messkriterien überließ. Generell gilt, dass Differentialdiagnosen, wie Neuritis vestibularis, primäre Autoimmun- oder allergische Erkrankungen, stets auszuschließen sind.

Im Jahr 2015 wurden unter der Obhut des Klassifikationskomitees der Bárány-Gesellschaft, neue Diagnosekriterien verabschiedet, welche zwischen klinisch sicherem und klinisch wahrscheinlichem Morbus Menière unterscheiden (Lopez *et al.*, 2015; Lopez-Escamez *et al.*, 2017). Einer der Hauptunterschiede der neueren im Vergleich zu den älteren Kriterien ist die Festlegung von zeitlichen Begrenzungen der Menière typischen Schwindelepisoden auf maximal 12 bzw. 24 h. Zudem wird in den Kriterien der Bárány-Gesellschaft nur beim klinisch sicheren und nicht beim klinisch wahrscheinlichen Morbus Menière das Vorliegen des typischen audiometrischen Befunds gefordert.

Die Tabelle 2.1 stellt die Diagnosekriterien der AAO-HNS und der Bárány-Gesellschaft in deutscher Fassung gegenüber. In der vorliegenden Arbeit wurden die Diagnosekriterien der AAO-HNS von 1995 verwendet.

**Tabelle 2.1** Diagnosekriterien des Morbus Menière gemäß den Leitlinien der AAO-HNS (Foundation, 1995) im Vergleich zu den Leitlinien der Bárány-Gesellschaft (Lopez *et al.*, 2015; Lopez-Escamez *et al.*, 2017)

	<b>Diagnosekriterien Morbus Menière der AAO-HNS</b>	<b>Diagnosekriterien Morbus Menière der Bárány-Gesellschaft</b>
Klinisch gesichert	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klinisch sicherer Morbus Menière und histopathologischer Endolymphhydrops</li> </ul>	
Klinisch sicher	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zwei oder mehr spontane Schwindelepisoden, davon jede mit einer Dauer von mindestens 20 min</li> <li>• Im betroffenen Ohr liegt audiometrisch gesicherter sensorineuraler Hörverlust im tiefen bis mittleren Frequenzbereich zu mindestens einem Zeitpunkt vor, während oder nach einer Schwindelepisode</li> <li>• (Fluktuierende) Aurasymptome (Hörverlust, Tinnitus, Druckgefühl) im betroffenen Ohr</li> <li>• Nicht auf eine andere Erkrankung zurückzuführen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zwei oder mehr spontane Schwindelepisoden, davon jede mit einer Dauer von 20 min bis 12 h</li> <li>• Im betroffenen Ohr liegt audiometrisch gesicherter sensorineuraler Hörverlust im tiefen bis mittleren Frequenzbereich zu mindestens einem Zeitpunkt vor, während oder nach einer Schwindelepisode</li> <li>• (Fluktuierende) Aurasymptome (Hörverlust, Tinnitus, Druckgefühl) im betroffenen Ohr</li> <li>• Nicht auf eine andere Erkrankung zurückzuführen</li> </ul>

**Tabelle 2.1** (Fortsetzung)

<p>Klinisch wahrscheinlich</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eine oder mehr spontane Schwindelepisoden, davon jede mit einer Dauer von mindestens 20 min</li> <li>• Im betroffenen Ohr liegt audiometrisch gesicherter sensorineuraler Hörverlust im tiefen bis mittleren Frequenzbereich zu mindestens einem Zeitpunkt vor, während oder nach einer Schwindelepisode</li> <li>• (Fluktuierende) Aurasymptome (Hörverlust, Tinnitus, Druckgefühl) im betroffenen Ohr</li> <li>• Nicht auf eine andere Erkrankung zurückzuführen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zwei oder mehr spontane Schwindelepisoden, davon jede mit einer Dauer von 20 min bis 24 h</li> <li>• (Fluktuierende) Aurasymptome (Hörverlust, Tinnitus, Druckgefühl) im betroffenen Ohr</li> <li>• Nicht auf eine andere Erkrankung zurückzuführen</li> </ul>
<p>Klinisch möglich</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwindelepisode(n) <u>ohne</u> audiometrisch gesicherten Hörverlust ODER</li> <li>• (fluktuierender) audiometrisch gesicherter sensorineuraler Hörverlust mit Gleichgewichtsstörung aber <u>ohne</u> gesicherte Schwindelepisoden</li> <li>• Nicht auf eine andere Erkrankung zurückzuführen</li> </ul>	

#### 2.2.4 Subgruppenbildung

Aufgrund der variablen Symptomausprägung bei Menière-Erkrankten wird von einem heterogenen Phänotyp gesprochen. In den bisher offiziell publizierten Diagnosekriterien werden häufige Komorbiditäten, wie Autoimmunerkrankungen oder Migräne, nicht berücksichtigt. Eine Klassifizierung des Patientenguts anhand dieser Kriterien wäre gemäß einiger Forschungsgruppen jedoch sinnvoll, um das Verständnis der pathophysiologischen

Vorgänge im Innenohr zu steigern und zielgerichtete Therapiemöglichkeiten zu entwickeln (Frejo *et al.*, 2016a; Phillips *et al.*, 2018).

Sowohl in einer spanischen Kohorte als auch in einer amerikanischen Stichprobe ergaben sich mittels einer Clusteranalyse fünf Subgruppen (Frejo *et al.*, 2016b; Frejo *et al.*, 2017; Crossley *et al.*, 2020). Diese wurden durch die Parameter begleitende Autoimmunerkrankungen, familiäres bzw. sporadisches Auftreten, Hörverlust und Migräne gebildet (Frejo *et al.*, 2016a; Frejo *et al.*, 2016b; Crossley *et al.*, 2020).

### **2.2.5 Ätiopathogenese: Der endolymphatische Hydrops**

Die Pathophysiologie von Morbus Menière ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Ursprung findet die Beschreibung der Erkrankung im Jahr 1861, als Prosper Menière (1799-1862) erstmalig Patienten mit episodischem Schwindel, Hörverlust und Tinnitus von einer zentralen, Schlaganfall ähnlichen Erkrankung abgrenzte und die These aufstellte, dass die Ursache dieser Symptome eine periphere Läsion des Innenohres darstelle (Thorp & James, 2005). Ab den 1870ern, etwa 10 Jahre nach dem Tod des französischen Arztes, etablierte sich der Term „Morbus Menière“ für die Bezeichnung des Symptomkomplex aus plötzlichem Schwindel und Hörstörung (Atkinson, 1961; Thorp & James, 2005). 1938 beobachteten Yamakawa in Japan, zeitgleich mit Hallpike und Cairns in England, unabhängig voneinander in histopathologischen Untersuchungen des Innenohrs, dass bei Menière-Patienten die Flüssigkeit im Endolymphraum gestaut war (Hallpike & Cairns, 1938; Yamakawa, 1938). Somit legten sie den Grundstein für die weitere Forschungsarbeit zur Pathophysiologie und Therapie des sogenannten endolymphatischen Hydrops.

#### **2.2.5.1 Zusammenhang des endolymphatischen Hydrops mit den klinischen Eigenschaften des Morbus Menière**

Viele weitere Studien konnten den Zusammenhang zwischen den klinischen Symptomen von Morbus Menière und dem Auftreten des endolymphatischen Hydrops reproduzieren und etablierten diesen zum histopathologischen Korrelat der Erkrankung (Merchant *et al.*, 2005; Foster & Breeze, 2013). Merchant *et al.* wiesen bei allen ihrer 28 untersuchten Patienten, welche nach den Kriterien der AAO-HNS von 1995 in die Kategorie klinisch sicherer Morbus Menière eingestuft worden sind (Foundation, 1995), histopathologisch einen endolymphatischen Hydrops nach (Merchant *et al.*, 2005). Foster und Breeze schlussfolgerten in ihrem Review, dass der endolymphatische Hydrops weder Begleitphänomen, noch Folge, sondern Ursache der Erkrankung ist. Zugleich postulierten sie, dass dieser allein nicht zur Ausbildung der Erkrankung ausreicht, da auch bei wenigen asymptomatischen Patienten der endolymphatische Hydrops vorlag. Hieraus folgerten sie,

dass es noch weitere ursächliche Faktoren geben muss und diese zusammen zur Krankheitsausprägung beitragen (Foster & Breeze, 2013).

Im Jahr 2007 gelang es erstmalig mittels MRT den endolymphatischen Hydrops bei lebenden Individuen zu visualisieren (Nakashima *et al.*, 2007). Ähnlich wie bei den histopathologischen Studien zeigte sich bei verschiedenen endolymphatischen Hydrops Bildgebungsstudien mittels MRT, dass ein starker Zusammenhang zwischen dem Symptomkomplex des Morbus Menière und dem Vorhandensein des endolymphatischen Hydrops besteht (Naganawa & Nakashima, 2014; Wu *et al.*, 2016; Bernaerts & De Foer, 2019; Pai *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Gurkov *et al.*, 2022).

Signifikante Assoziationen konnten vor allem bei Untersuchung der in der MRT dargestellten Hydropsausprägung im Zusammenhang mit Krankheitsdauer und Hörminderung festgestellt werden (Gurkov *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2016; de Pont *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). Der Grad des Hydrops könnte somit einen Hinweis auf die Krankheitsdauer geben und als Marker des Krankheitsprozesses dienen. Bei differenzierter Betrachtung des isoliert cochleären Hydrops zeigte sich, dass dieser vor allem mit Hörminderung im Tieftonbereich, auralem Druckgefühl, sowie Tinnitus, jedoch nicht mit Schwindel einherging (Alonso *et al.*, 2021). Patienten mit sacculärem endolymphatischen Hydrops wiesen meist eine volle Symptomausprägung auf (Maxwell *et al.*, 2021).

Dominguez *et al.* zeigten bei der Untersuchung von 170 Patienten verschiedener Krankheitsstadien (83 mit klinisch sicherem Morbus Menière, 38 mit fluktuierendem sensorineuralen Hörverlust, 34 mit rezidivierenden Schwindelattacken und 15 mit idiopathischem plötzlichen Hörverlust) eine direkte Korrelation zwischen Ausprägungsgrad des Hydrops und Schweregrad der Symptomatik. Das heißt, dass Patienten mit voller Symptomausprägung, also Erfüllung der klinisch sicheren Menière-Kriterien, einen eher höhergradigen Hydrops aufweisen, als Patienten mit milderer, beziehungsweise unvollständiger Symptomatik (Dominguez *et al.*, 2021).

Einige Fälle, bei welchen initial zwar ein voll ausgeprägter Hydrops in der MRT vorlag, die klinisch sicheren Menière-Kriterien jedoch erst im Verlauf erfüllt waren, deuten darauf hin, dass der Hydrops als prognostischer Marker für den zukünftigen Krankheitsverlauf dienen könnte (Alonso *et al.*, 2021; Dominguez *et al.*, 2021).

In einem veröffentlichten Konsensus mehrerer internationaler Experten wurden neben der klaren Empfehlung zur Durchführung einer MRT zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit auch spezifische Empfehlungen zur genauen Ausführung der MRT, wie technische Einstellungen, medizinische Kontraindikationen, Kontrastmittelapplikation und Bildauswertung, gegeben (Liu *et al.*, 2022).

### 2.2.5.2 Mögliche Ursachen der Entstehung des endolymphatischen Hydrops

Die Ursachensuche für den Hydrops gab viel Raum für ein breites Spektrum an Spekulationen. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass es sich bei dem Hydrops nicht um eine Volumenzunahme selbst, sondern eher um eine Flüssigkeitsverschiebung zwischen den zwei Kompartimenten Endolymph und Perilymphe handelt (Merchant *et al.*, 2005). Verschiedene Hypothesen sind zur Entstehung des Hydrops und somit zur Ausbildung der Erkrankung vertreten.

Erhöhte Prävalenzen von Autoimmunerkrankungen bei Menière-Patienten deuten auf eine autoimmunologische Komponente in der Krankheitsentstehung hin (Gazquez *et al.*, 2011; Tyrrell *et al.*, 2014). Unterstützt wird die Hypothese dadurch, dass in Blutseren von Menière-Patienten erhöhte Antikörper- und Immunkomplexniveaus gefunden wurden (Kim *et al.*, 2014; Kangasniemi & Hietikko, 2018). In experimentellen Studien konnte der endolymphatische Hydrops durch Injektionen von Antigenen und monoklonalen Antikörpern induziert werden (Matsuoka *et al.*, 2002; Flook & Lopez Escamez, 2018). Zudem reagieren viele Patienten positiv auf die Therapie mit Immunsuppressiva, wie Glukokortikoiden, weshalb in Zusammenschau mit den oben genannten anderen Befunden, eine immunologische Krankheitskomponente als wahrscheinlich erscheint (Phillips & Westerberg, 2011; Patel *et al.*, 2016; Harcourt *et al.*, 2019; Rogha *et al.*, 2019; Kutlubayev *et al.*, 2020). Ebenso lässt die fluktuierende Symptomatik mit den in Attacken auftretenden Schwindelepisoden und der langsamen progressiven Verschlechterung der Hörfunktion Parallelen zum Verlauf von Autoimmunerkrankungen erkennen (Kangasniemi & Hietikko, 2018).

Sowohl für Nahrungsmittel- als auch Umweltallergien wurde ein Zusammenhang mit Morbus Menière beschrieben (Perez-Carpena & Lopez-Escamez, 2020). In einer Studie von Derebery *et al.* zeigten von allen untersuchten Menière-Patienten 58 % eine positive Allergie-Anamnese und 41 % einen positiven Prick-Hauttest (Derebery, 2000; Weinreich & Agrawal, 2014). Zudem wurde bei Menière-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe ein erhöhter IgE-Titer ermittelt (Keles *et al.*, 2004). In einer experimentellen Tierstudie wurde einerseits die Entwicklung des endolymphatischen Hydrops nach Exposition mit einem Umweltantigen beschrieben. Andererseits wurde gezeigt, dass durch einen Leukotrienrezeptorantagonisten, ein Antiallergikum, welches beispielsweise beim allergischen Asthma eingesetzt wird, die Entstehung des endolymphatischen Hydrops verhindert werden kann (Takeda *et al.*, 2012). Probanden mit Allergie und Morbus Menière zeigten eine gebesserte Kontrolle der Menière-Symptome nach Behandlung der allergischen Grunderkrankung. Hieraus kann geschlossen werden, dass Morbus Menière direkt oder indirekt von antiallergischer Therapie beeinflusst werden kann (Derebery, 2000; Derebery & Berliner, 2010; Di Berardino *et al.*, 2013). Das Antihistaminikum Betahistin wird bezüglich Wirksamkeit kontrovers diskutiert (Egami *et al.*, 2014; Adrion *et al.*, 2016; Flook & Lopez Escamez, 2018).

Höhere Prävalenz bei Kaukasiern im Vergleich zu anderen Ethnien, familiäres Clustering, sowie das hohe Erkrankungsrisiko für Geschwister von Betroffenen suggerieren eine genetische Komponente in der Ausbildung des Hydrops und der Krankheitsentstehung von Morbus Menière (Ohmen *et al.*, 2013; Requena *et al.*, 2014; Chiarella *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015). Vor allem Gene, deren Proteine im Innenohr exprimiert sind und in der Entstehung des endolymphatischen Hydrops denkbar wären wurden als potentielle Kandidatengene auf Assoziationen mit Morbus Menière geprüft. Dazu zählen im Rahmen der Immunhypothese beispielsweise Tumornekrosefaktoren, Interleukine und Toll Like Rezeptoren (Gazquez *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2017). Ionentransporter und Zellmembrankanäle wurden durch viele Forschungsgruppen als Regulator der Flüssigkeits- und Ionenhomöostase und somit Mitverursacher des endolymphatischen Hydrops identifiziert. Beispielsweise gelten die spannungsabhängigen Kaliumkanäle KCNE1 und KCNE3 durch ihre tonotopisch spezifische Expression im Innenohr als suggestive Kandidatengene und rückten somit in den Fokus mehrerer Assoziationsanalysen. Außerdem wurde eine Variante von Adducin untersucht, durch welche die Induktion von Hyperosmolarität der Endolymphe zum Hydrops führen könnte (Teggi *et al.*, 2019; Gallego-Martinez & Lopez-Escamez, 2020).

Aquaporine wurden durch viele Forscher mit der Wasserregulation im Innenohr in Verbindung gebracht und als potentielle Verursacher einer Volumenzunahme der Endolymphe angesehen (Teggi *et al.*, 2019). Bevor genauer auf genetische Vorgängerstudien mit Assoziationen von AQPs und Morbus Menière eingegangen wird (Kapitel 2.4), werden im Folgenden Aufbau, Funktion und Expressionsmuster der Aquaporine beschrieben.

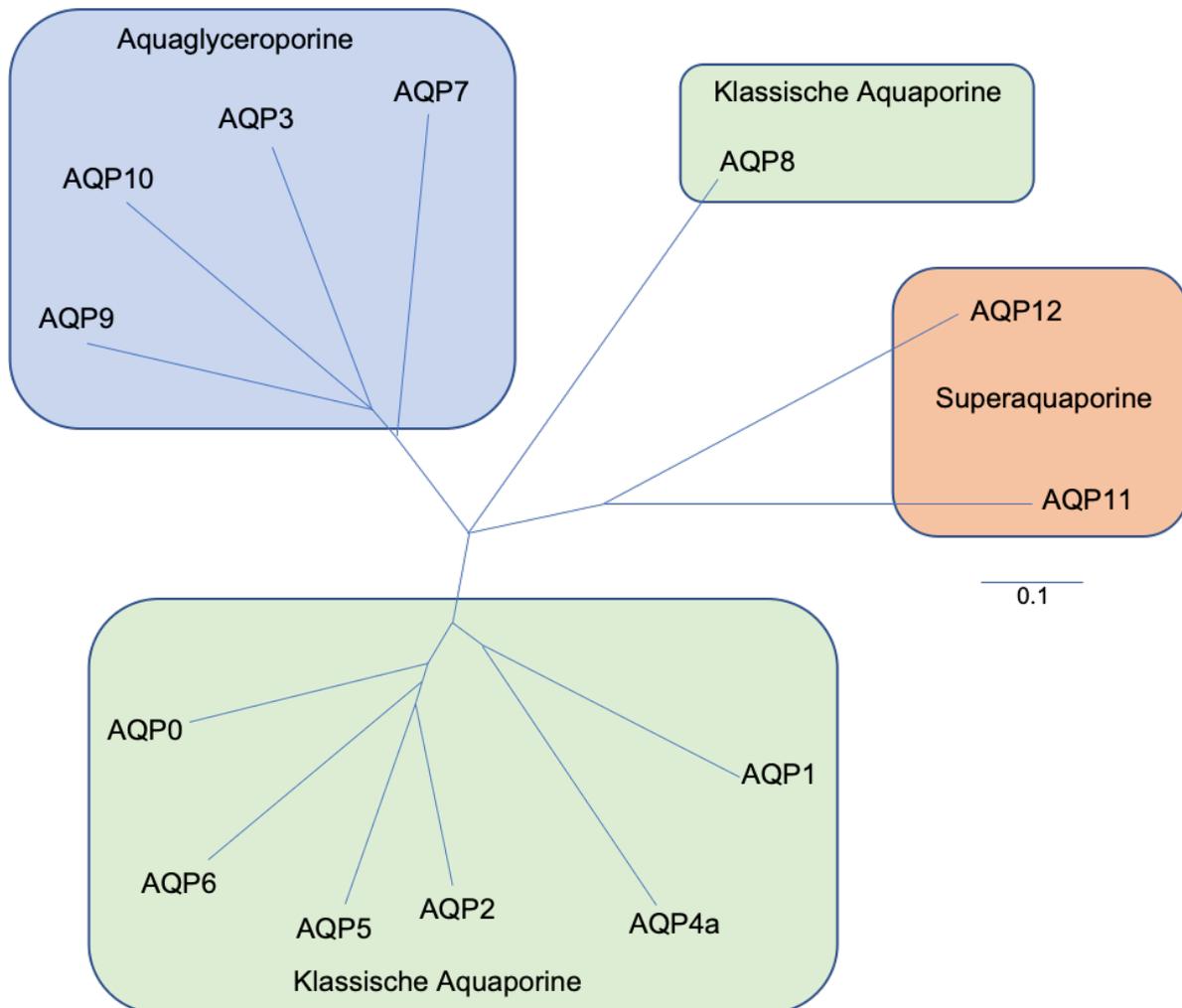
## **2.3 Aquaporine**

### **2.3.1 Aufbau und Funktion**

Aquaporine sind transmembrane Wasserkanäle, welche den interzellulären und intrazellulären Wasserfluss regulieren (Li & Wang, 2017). Bis zur Entdeckung dieser durch die Arbeitsgruppe um Peter Agre Anfang der 1990er Jahre (Preston *et al.*, 1992), ging man davon aus, dass der transzelluläre Wasseraustausch nur durch Diffusion über die hydrophobe Lipiddoppelmembran erfolgt.

AQP sind ubiquitär, das heißt in allen Lebewesen mit Zellmembranen zu finden (Li & Wang, 2017). Beim Menschen wurden 13 Aquaporinisoformen identifiziert (AQP 0 – AQP 12), welche initial in zwei Subgruppen eingeteilt wurden: die Aquaglyceroporine, welche neben Wasser auch für kleine Moleküle, wie Glycerol und Urea, durchlässig sind und die klassischen Aquaporine, welche spezifisch nur Wasser transportieren (Sorani *et al.*, 2008). Im Nachhinein wurde eine dritte Subfamilie entdeckt, deren Aquaporine teilweise strukturelle Abweichungen von den vorherig beschriebenen Aquaporinen aufweisen und als

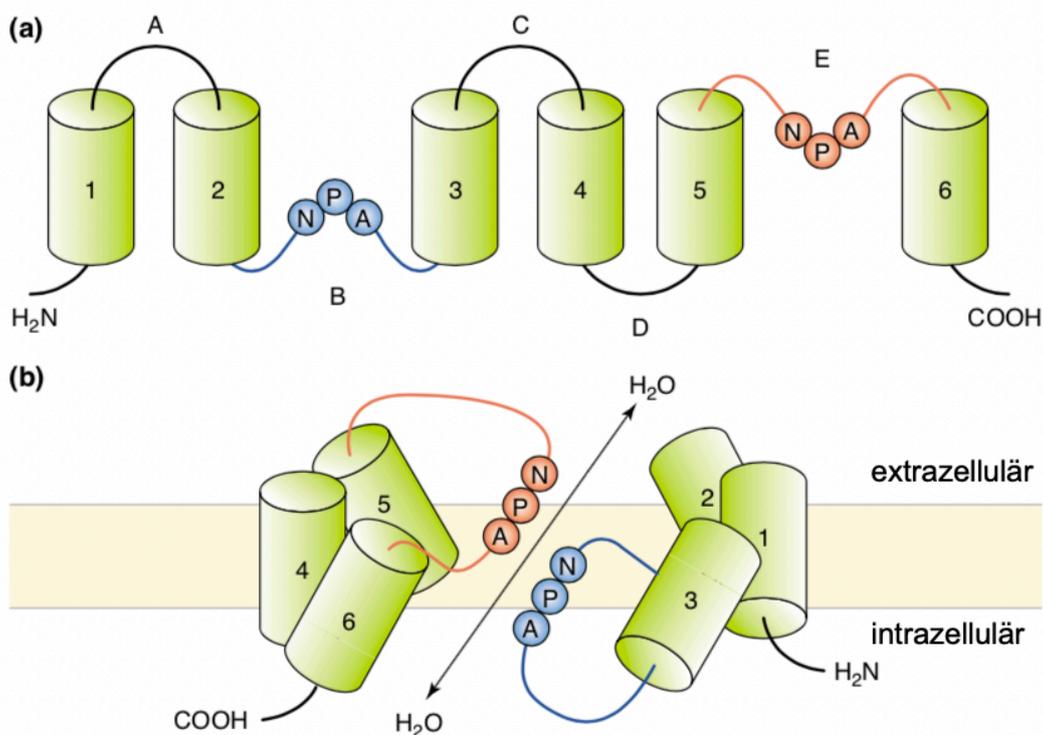
Superaquaporine bezeichnet werden (Li & Wang, 2017). Eine Einteilung der Aquaporine in die drei Subgruppen wird in Abbildung 2.3 dargestellt.



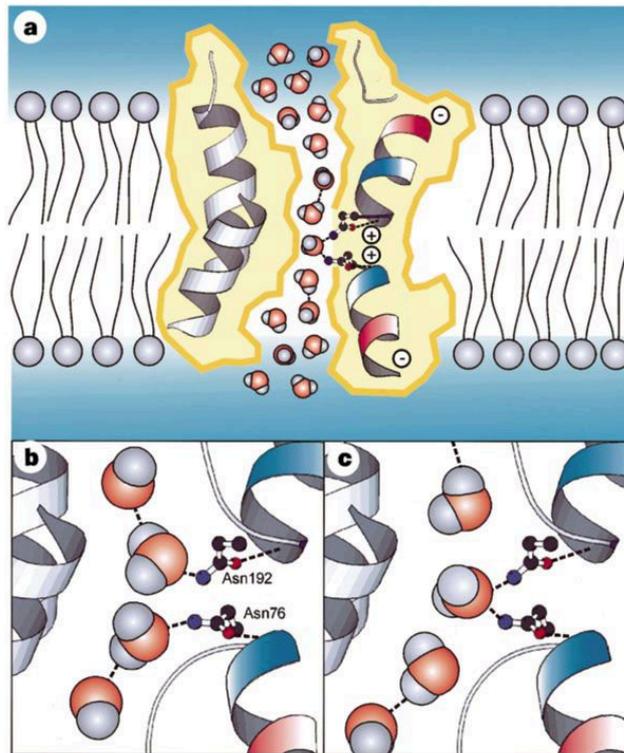
**Abbildung 2.3** Der Stammbaum der 13 humanen Aquaporine. Klassische Aquaporine in grün: AQP 0, AQP 1, AQP 2, AQP 4, AQP 5, AQP 6, AQP 8. Aquaglyceroporine in blau: AQP 3, AQP 7, AQP 9, AQP 10. Superaquaporine in rot: AQP 11, AQP 12. © (Ishibashi *et al.*, 2014)

Alle 13 humanen Aquaporine besitzen einen ähnlichen strukturellen Aufbau. Aquaporine sind homotetramere Proteine, welche sich aus vier identischen 30 kDa-Monomeren, die jeweils als unabhängige Wasserkanäle fungieren, zusammensetzen (Cheng *et al.*, 1997; Li & Wang, 2017). Jedes AQP-Monomer besteht aus sechs transmembranen alpha-Helices (H1-6), welche durch fünf, abwechselnd intra- und extrazelluläre, Loops (A-E) verbunden sind (Murata *et al.*, 2000; Eriksson *et al.*, 2013; Day *et al.*, 2014). Die Helices bilden ein Bündel um eine sehr enge Pore, durch welche das Wasser durchtritt (Cheng *et al.*, 1997; Day *et al.*, 2014). Die Loops B und E, welche jeweils von gegenüberliegenden Seiten bis zur Hälfte in die Membran eintauchen, besitzen beide ein charakteristisches Leitmotiv, bestehend aus den drei Aminosäuren Asparagin, Prolin und Arginin (*NPA-Sequenz*) (Murata *et al.*, 2000;

Eriksson *et al.*, 2013). Dieses doppelt vorkommende NPA-Strukturmotiv, welches zentral im Kanal liegt und die Pore konstringiert, bindet durch Wasserstoffbrücken nacheinander die Wassermoleküle. Somit wird durch den engen Durchmesser und durch das Bindungsverhalten sichergestellt, dass nur einzelne Wassermoleküle den Kanal der Reihe nach passieren (Li & Wang, 2017). Eine weitere Sequenz, welche als selektiver Filter fungiert, ist die Arginin/Aromatische-Sequenz (*Ar/R-Sequenz*), welche am extrazellulären Kanaleingang liegt. Wie die Bezeichnung Ar/R-Sequenz bereits suggeriert, findet sich an dieser Stelle meist ein Argininrest und eine aromatische Aminosäure, Phenylalanin oder Histidin (Verma *et al.*, 2014; Verma *et al.*, 2015). Die Eigenschaften dieser Aminosäuren, hydrophil, basisch und voluminös, haben zur Folge, dass große und positiv geladene Moleküle den Kanal nicht passieren können (Verma *et al.*, 2015). Aquaglyceroporine haben im Vergleich zu Aquaporinen eine etwas weitere Pore, so dass auch andere Moleküle den Kanal passieren können (Tornroth-Horsefield *et al.*, 2010; Beitz *et al.*, 2015). Auf den beiden folgenden Abbildungen wird der Aufbau der Aquaporine sowohl in der Sekundärstruktur (Abbildung 2.4), als auch in schematischer 3D-Struktur (Abbildung 2.5) veranschaulicht.



**Abbildung 2.4** Aufbau und Struktur des AQP1 a) Sechs transmembranäre Helices (H1-6) sind durch fünf Loops (A-E) miteinander verbunden. b) Die zwei hydrophilen Loops B und E ragen in das Kanalinnere und treffen dort aufeinander, um mit ihren NPA-Motiven den für Wasser selektiven Filter zu bilden. © (Zeuthen, 2001)



**Abbildung 2.5** Die Loops B und E liegen an der engsten Stelle des Kanalinneren und bilden ein positives elektrostatisches Feld, welches die Wassermoleküle in Richtung der Aminosäure Asparagin ausrichtet. Die Wassermoleküle bilden mit Asparagin Wasserstoffbrückenbindungen. So wird sichergestellt, dass nur Wassermoleküle den Kanal passieren können. © (Murata *et al.*, 2000)

Funktionell leisten die AQP einen großen Beitrag zur Regulation des transzellulären Wasserflusses und des Zellvolumens. Während der passive Fluss, lediglich durch den osmotischen Gradienten bestimmt und kaum regulierbar ist, kann die Anzahl und die Verteilung der Aquaporine in den verschiedenen Geweben je nach Bedarf angepasst werden. Diese Regulationsmechanismen finden auf Genexpressionsebene statt (Day *et al.*, 2014).

Da die Aquaporine in vielen humanen Geweben mit hohem Wasserfluss vorkommen, spielen sie eine große Rolle in physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen. Um die Relevanz von fehlfunktionierenden Aquaporinen darzustellen, folgen einige Beispiele von bisher erforschten Erkrankungen, welche auf mutierten Aquaporinen beruhen: Mutationen im Aquaporin 2 können zur Klinik des nephrogenen Diabetes insipidus führen. Dies ist eine Erkrankung, bei welcher es zu Polyurie aufgrund fehlender Rückresorptionskapazität des Primärharns im Sammelrohr der Niere kommt (Agre *et al.*, 2002; King & Yasui, 2002; Bockenhauer & Bichet, 2017; Milano *et al.*, 2017). Es wurden verschiedene Mutationen im Aquaporin 0 identifiziert, welche die Entstehung des Grauen Stars im Auge begünstigen (Agre *et al.*, 2002; King & Yasui, 2002; Senthil Kumar *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2016). Im Gehirn konnten Mutationen im AQP 4 für die Involvierung in Entstehung und Resorption eines Hirnödems verantwortlich gemacht werden (Agre *et al.*, 2002; Tang & Yang, 2016).

### 2.3.2 Aquaporine im Innenohr

Wie bereits im Abschnitt Pathophysiologie erläutert, wurde eine enge Assoziation zwischen dem Auftreten von Morbus Menière und dem endolymphatischen Hydrops vermutet. Kleine Änderungen im Zellvolumen können die mechanischen Eigenschaften im Cortiorgan und im vestibulären sensorischen Epithel beeinträchtigen. Eine präzise Volumenregulation in den Epithelzellen und eine Aufrechterhaltung des endocochleären Potenzials sind Voraussetzungen für eine intakte akustische und vestibuläre Signaltransduktion (Li & Verkman, 2001; Lopez *et al.*, 2007). Die seit Längerem existierende Vermutung, dass Störungen der Flüssigkeitshomöostase im Innenohr durch fehlfunktionierende Wasserkanäle verursacht werden, wurde nach Entdeckung der Aquaporine (Preston *et al.*, 1992) und dem Nachweis dieser im Innenohr weiter unterstützt.

Verschiedene Forschungsgruppen konnten eine Expression von 8 der 13 bis dato entdeckten Aquaporine, nämlich AQP 1-7 und AQP<sup>9</sup>, im menschlichen Innenohr nachweisen (Kakigi *et al.*, 2009; Hirt *et al.*, 2010; Maekawa *et al.*, 2010; Eckhard *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2019). Aufgrund der im Folgenden vorgestellten Ergebnisse vorheriger Studien, wird in dieser Arbeit genaueres Augenmerk auf die Verteilung der Aquaporine 3, 4 und 5 im Innenohr gelegt.

Aquaporin 3 konnte durch immunhistochemische Verfahren in der Cochlea im spiralen Ligament, in Fibrozyten des spiralen Limbus (Huang *et al.*, 2002; Nevoux *et al.*, 2015) und mit schwächerem Signal in der Stria vascularis (Zhong & Liu, 2004) nachgewiesen werden. Im Sacculus endolymphaticus zeigte sich, dass Aquaporin 3 zusammen mit den Aquaporinen 2 und 4 co-exprimiert wird (Beitz *et al.*, 1999). Ein ähnliches Verteilungsmuster der Aquaporine 2, 3 und 4 wurde auch im Sammelrohr der Niere gefunden, weshalb Ishiyama *et al.* die Vermutung aufstellten, dass diese Expressionskombination in denjenigen Zellen vorkommt, welche für Wasserresorption zuständig sind (Ishiyama *et al.*, 2006).

Aquaporin 4 wurde in cochleären Stützzellen, wie den äußeren und inneren Sulcuszellen, Hensen-, Deiter- und Claudiuszellen, nachgewiesen (Takumi *et al.*, 1998; Li & Verkman, 2001; Mhatre *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 2007; Eckhard *et al.*, 2012). In den Gleichgewichtsorganen konnte Aquaporin 4, analog zum Hörorgan, auch in den Stützzellen ausfindig gemacht werden (Takumi *et al.*, 1998; Mhatre *et al.*, 2002; Zhong & Liu, 2004; Lopez *et al.*, 2007). Es wurde zudem gezeigt, dass Aquaporin 4 vor allem in der basolateralen Membran der vestibulären Stützzellen angeordnet ist (Takumi *et al.*, 1998; Ishiyama *et al.*, 2010; Eckhard *et al.*, 2012). Zusätzlich konnte AQP 4 in den Stützzellen des zentralen Anteils des Nervus cochleovestibularis nachgewiesen werden (Takumi *et al.*, 1998; Mhatre *et al.*, 2002).

Ishiyama et al. überprüften zudem die quantitative Expression von AQP 4 in den Maculae utriculi in drei verschiedenen Studiengruppen. Die erste Gruppe wurde ausschließlich aus Menière-Patienten, die zweite Gruppe aus Kontrollprobanden mit blander audiovestibulärer Anamnese und die dritte Gruppe aus Patienten mit Akustikusneurinom, einem gutartigen Tumor der Myelinscheide des Nervus vestibulocochlearis, gebildet. Bei Gegenüberstellung und Vergleich dieser drei Gruppen stellte sich heraus, dass alle drei Gruppen im basalen Teil der Stützzellen des Utriculus AQP 4 exprimierten. In der Menière-Patienten-Gruppe zeigte sich jedoch eine statistisch signifikant verminderte Expression des Wasserkanals Aquaporin 4 im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. Dies deutet darauf hin, dass der verminderte AQP 4-Anteil einen primären oder sekundären Effekt auf den Wassertransport haben könnte und somit im Zusammenhang mit der Formation des endolymphatischen Hydrops bei Morbus Menière stehen könnte. (Ishiyama *et al.*, 2010)

Die potentielle Rolle von Aquaporin 4 im Hörprozess wurde von Li und Verkman und Mhatre et al. anhand von Knockout-Mäusen aufgezeigt. Sie erzeugten Mäuse ohne AQP 4-Gen und maßen deren akustische Hirnstammsignale (*Acoustic Brainstem Response, ABR*) nach Zuführung von Klickstimuli und Reintönen unterschiedlicher Frequenzen. Beide Forschungsgruppen konnten eine signifikant erhöhte frequenzunabhängige Hörschwelle bei AQP 4 Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen feststellen. Die schlechtere Hörleistung wurde, bei normaler Nervenleitgeschwindigkeit, primär einem Problem in der Cochlea, nämlich funktionsgeminderten Haarzellen, zugeschrieben. Li und Verkman erzeugten zudem AQP 1, 3 und 5 Knockout-Mäuse, bei welchen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Hörleistung im Vergleich zu Wildtypmäusen zeigte. (Li & Verkman, 2001; Mhatre *et al.*, 2002)

Aquaporin 5 konnte im Cortiorgan und der Reissner-Membran nachgewiesen werden (Beitz *et al.*, 1999). Hirt et al. konnten bei der Untersuchung einer menschlichen Cochlea, sowie von Cochleae vier verschiedener Nagetiere, Aquaporin 5 in den äußeren Sulcuszellen nachweisen (Hirt *et al.*, 2010; Eckhard *et al.*, 2014). Interessant dabei war, dass sowohl im humanen Gewebe, also auch in allen vier Tierspezies AQP 5 nur im oberen Viertel der Cochlea exprimiert wurde. Da im apikalen Teil der Cochlea tiefe Töne wahrgenommen, verarbeitet und weitergeleitet werden (Bekesy, 1952a; Hudspeth, 1989; Muller *et al.*, 2005), stellt sich die Frage, ob Aquaporin 5 Knockout-Mäuse eine beeinträchtigte Hörleistung im Tieftonfrequenzbereich aufweisen. Li und Verkman, sowie Merves et al. widerlegten dies jedoch mit normal hörenden und morphologisch unauffälligen AQP 5 Knockout-Mäusen (Li & Verkman, 2001; Merves *et al.*, 2003). Auf zellulärer Ebene wurde festgestellt, dass AQP 5 ausschließlich in der apikalen Membran und komplementär dazu AQP 4 ausschließlich in der basolateralen Membran der äußeren Sulcuszellen exprimiert werden (Hirt *et al.*, 2010). Die

unterschiedliche Lokalisierung der beiden Wasserkanäle AQP 4 und AQP 5 innerhalb des gleichen Zelltyps legt die Vermutung nahe, dass die Wasserkanäle dort einen transzellulären Wasserfluss durch die äußeren Sulcuszellen – und somit einen Fluss zwischen Peri- und Endolympe – ermöglichen (Hirt *et al.*, 2010; Eckhard *et al.*, 2015). Hypothetisch könnten somit vermehrt exprimierte AQP 5 zu einer Übersekretion von Wasser in die Endolympe und schließlich zu einem endolymphatischen Hydrops führen (Hirt *et al.*, 2010; Eckhard *et al.*, 2015).

#### **2.4 Genetische Studien zu Polymorphismen der Aquaporine 3, 4 und 5 und Morbus Menière**

Die Region-spezifische Expression der Aquaporin-Wasserkanäle im Innenohr sowie deren Funktion impliziert eine Beteiligung dieser in der Flüssigkeitshomöostase im Innenohr (Huang *et al.*, 2002; Candrea *et al.*, 2010). Veränderungen auf molekularer Ebene könnten an einer gestörten Endolymphhomöostase und der Entstehung eines Endolymphhydrops beteiligt sein. Aus diesem Grund begannen einige Forschungsgruppen nach Mutationen in den Aquaporinen und nach Assoziationen dieser mit der Innenohrerkrankung Morbus Menière zu suchen.

Candrea *et al.* detektierten bei einer Mutationsanalyse der kodierenden Bereiche und der Exon-Intron-Verbindungen der Aquaporine 1-4 eine potentiell aussagekräftige Variation. Sie fanden eine homozygote Punktmutation im Exon 1 des AQP 3 (rs591810) in 11 der 34 Patienten (32 %) und in keinem der 100 Kontrollprobanden. Als Stichprobe dienten Kaukasier, die im Kantonsspital Aarau und dem Universitätsspital Basel in der Schweiz vorstellig waren. In die Patientengruppe wurden Personen mit klinisch sicherem Morbus Menière, definiert nach AAO-HNS, eingeschlossen. Es wurden alle kodierenden Exons und Exon-Intron-Verbindungen sequenziert. (Candrea *et al.*, 2010)

Arweiler *et al.* überprüften einen möglichen Zusammenhang des Einzelnukleotidpolymorphismus (*Single nucleotide polymorphism, SNP*) rs3759129 in der Promoterregion des AQP 5 Gens und Morbus Menière. Hierfür wurden am Universitätsklinikum Essen 93 kaukasische Patienten mit klinisch gesichertem oder klinisch sicherem Morbus Menière nach AAO-HNS rekrutiert. Zusätzlich wurden 9 Patienten mit MRT-gesichertem endolymphatischen Hydrops eingeschlossen, die zwar eine Tieftonschwerhörigkeit aufwiesen, jedoch nicht unter vestibulären Beschwerden litten. 292 randomisierte gesunde kaukasische Personen wurden innerhalb des Transfusionszentrums Essen für die Kontrollgruppe rekrutiert. Nach Genotypisierung des AQP 5 Promotors via Pyrosequenzierung zeigten weder die Krankheitsprävalenz, noch die Schwere der Erkrankung eine Assoziation mit diesem SNP. (Arweiler-Harbeck *et al.*, 2012)

Nishio *et al.* untersuchten in einer japanischen Stichprobe Assoziationen der Polymorphismen des Aquaporins 4 (AQP 4, rs2075575), des Aquaporins 5 (AQP 5,

rs3736309) und des Östrogenrezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ 1, rs2234693; ER $\alpha$ 2, rs9340799) mit Morbus Menière und plötzlichem Hörverlust. Als Stichprobe dienten 86 Menière-Patienten und 85 Patienten mit plötzlichem Hörverlust, welche sich im Zeitraum November 2007 - März 2011 auf der Otorhinolaryngologie der Nagoya Universitätsklinik in Japan vorstellten. Morbus Menière wurde anhand der Diagnosekriterien der AAO-HNS definiert, wobei Patienten mit klinisch sicherem, wahrscheinlichem und möglichem Morbus Menière eingeschlossen wurden. Idiopathischer plötzlicher sensorineuraler Hörverlust wurde nach den Kriterien der Sudden Deafness Research Committee Study Group of the Ministry of Health and Welfare aus dem Jahr 1973 definiert. Die Kontrollgruppe bildeten 2136 Erwachsene ohne Menière- und Hörverlust-Anamnese, die ebenfalls in und um Nagoya wohnhaft waren und aus dem Datenpool einer populationsbasierten Studie des Älterwerdens extrahiert wurden. Nach Genotypisierung der Polymorphismen zeigte sich, dass das G-Allel des Polymorphismus rs3736309 im AQP 5 mit einem reduzierten Risiko an Morbus Menière zu erkranken assoziiert war. (Nishio *et al.*, 2013)

Lopes *et al.* untersuchte in einer brasilianischen Kohorte neben Prüfung von Polymorphismen des AQP 2 und des KCNE1 den Polymorphismus rs591810 des AQP 3 auf Assoziationen. Hierfür wurden 30 Patienten mit klinisch sicherem Morbus Menière, definiert nach den Diagnosekriterien der AAO-HNS, und 30 gesunde Kontrollprobanden innerhalb des Universitätsklinikums Sao Paulo untersucht. Es handelte sich um ein Probandenkollektiv unterschiedlicher Ethnien, größtenteils jedoch Kaukasiern. Für den Polymorphismus rs591810 des AQP 3 konnte kein signifikanter Unterschied in der Genotyp- und Allelverteilung zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe beobachtet werden. (Lopes *et al.*, 2016)

In den Vorgängerstudien wurden lediglich kleine Stichproben mit 100 oder weniger Menière-Patienten in der Fallgruppe untersucht. Replikationsstudien, welche die Ergebnisse der genannten Studien belegen oder widerlegen wurden bisher nicht publiziert.

## 2.5 Zielsetzung

Morbus Menière ist eine Innenohrerkrankung mit typischer Symptomtrias aus spontan ausgelösten Drehschwindelepisoden, unilateral fluktuierendem sensorineuralen Hörverlust und weiteren Ohrsymptomen, wie Tinnitus und Druckgefühl. Auf pathophysiologischer Ebene gilt der endolymphatische Hydrops als Korrelat der Erkrankung. Dessen Ätiopathogenese ist noch nicht abschließend erforscht. Verschiedene Hypothesen postulieren die Kombination aus Genetik und Umweltfaktoren für dessen Entstehung.

Aquaporine sind Wasserkanäle, welche in Geweben mit hohem Wasserfluss exprimiert sind. Aufgrund ihrer Expression und Funktion im Innenohr könnten sie in der Pathogenese des endolymphatischen Hydrops und somit der Krankheitsentstehung von Morbus Menière eine wichtige Rolle spielen. Genetische Varianten in den Aquaporinen wurden in früheren Studien untersucht.

In bisherigen Vorgängerstudien wurde eine signifikante Assoziation des Polymorphismus rs3736309 im AQP 5 publiziert (Nishio *et al.*, 2013). Für die anderen Polymorphismen rs591810 im AQP 3, rs2075575 im AQP 4 und rs3759129 im AQP 5 konnten signifikante Assoziationen mit Morbus Menière aufgrund kleiner Stichproben weder festgestellt noch ausgeschlossen werden (Candreia *et al.*, 2010; Arweiler-Harbeck *et al.*, 2012; Nishio *et al.*, 2013; Lopes Kde *et al.*, 2016). Da es sich um vielversprechende Kandidatengene handelt, war es Ziel dieser Doktorarbeit in einer größeren und homogen kaukasischen Stichprobe erneut den Zusammenhang zwischen genetischen Variationen in den Aquaporinen 3, 4 und 5 und der Innenohrerkrankung Morbus Menière zu untersuchen. Im Speziellen wurden die Genotypen der vier Polymorphismen rs591810, rs2075575, rs3759129 und rs3736309 der Aquaporine 3, 4 und 5 von sowohl 323 Patienten mit klinisch gesichertem, sicherem, wahrscheinlichem oder möglichem Morbus Menière nach den Diagnosekriterien der AAO-HNS als auch 2615 gesunden Kontrollprobanden bestimmt und auf Assoziationen mit Morbus Menière geprüft. Hierfür wurde initial das gesamte Patientenkollektiv und anschließend im Sinne einer zunehmenden Diagnosesicherheit Patienten mit mindestens klinisch wahrscheinlichem sowie die unter eindeutiger Morbus Menière zusammengefasste Gruppe aus Patienten mit klinisch gesichertem und sicherem Morbus Menière betrachtet.

Da es sich bei Morbus Menière um eine heterogene Symptomkombination mit damit einhergehender Präsentation vielseitiger Krankheitsbilder handelt, könnte durch die Gruppierung ähnlicher Phänotypen in Subgruppen die Erforschung des Krankheitspfades begünstigt werden (Frejo *et al.*, 2017; Crossley *et al.*, 2020). Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Schritt die Patientengruppe der klinisch möglichen Menière Patienten anhand des Parameters Schwerhörigkeit in zwei Gruppen gegliedert. Ziel war es das Symptom Schwerhörigkeit separat auf einen genetischen Zusammenhang mit den Polymorphismen der AQPs 3, 4 und 5 zu prüfen.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Studiendesign**

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang von vier verschiedenen Einzelnukleotidpolymorphismen der Aquaporingene 3,4 und 5 mit der Erkrankung Morbus Menière untersucht. Dafür wurden die *best guess* Genotypen der vier Polymorphismen, welche bereits in Vorgängerstudien untersucht wurden, aus dem imputierten Datensatz, dessen Rohgenotypen durch SNP-Arrays generiert wurden, extrahiert und zur Rechnung verwendet.

##### **3.1.1 Voraussetzungen**

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München zugelassen und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Probanden wurden über den Zweck, das Prozedere und das Ziel der Studie aufgeklärt. Die Bereitschaft zur freiwilligen Teilnahme wurde durch das Unterschreiben einer Einverständniserklärung vor Studienbeginn bestätigt.

##### **3.1.2 Datengewinnung**

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik Halle (Saale) und dem Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum der Universitätsklinik München Großhadern durchgeführt. Es wurde der Zusammenhang von vier verschiedenen Einzelnukleotidpolymorphismen der Aquaporingene 3, 4 und 5 mit der Erkrankung Morbus Menière untersucht. Hierzu wurden etwa 3000 Kontrollpersonen und etwa 350 Patienten europäischer Herkunft rekrutiert. Da es sich um ein fortlaufendes wissenschaftliches Projekt handelt wurden Daten, die von den wissenschaftlichen Mitarbeitern, Doktoranden und Ärzten gewonnen wurden, in einer Biodatenbank gesammelt.

##### **3.1.3 Studienteilnehmer der Fall-Kontroll-Studie**

###### **3.1.3.1 Kontrollgruppe**

Für die Kontrollgruppe wurden circa 2600 Probanden aus der PAGES (*Phenomics and Genomics Sample*) Stichprobe auf freiwilliger Basis aus der Münchner Bevölkerung ausgewählt. Bei diesen Kontrollen handelt es sich um psychiatrisch gesunde Personen, bei denen, neben einer Blutentnahme, zahlreiche anamnestische, neuropsychologische und elektrophysiologische Daten erhoben wurden. Bei den ausgewählten Probanden handelt es sich um nicht miteinander verwandte, deutschstämmige Personen beider Geschlechter. Um eine repräsentative Stichprobe zu erhalten, wurden per Zufall Einwohner im Großraum München mit Hilfe von Daten des Kreisverwaltungsreferats ausgewählt. Ein mehrstufiges

Verfahren hatte zum Ziel, alle Personen mit psychiatrischen und neurologischen Vorerkrankungen, wie auch Schwindelerkrankungen, auszuschließen.

Zunächst wurden die zufällig ausgewählten Personen postalisch kontaktiert und über Art und Umfang der Studie informiert. Alle interessierten Personen wurden daraufhin schrittweise, zunächst durch ein Telefonscreening und, wenn weiterhin die Einschlusskriterien erfüllt blieben, anschließend mittels eines ausführlichen Fragebogens, auf das Vorhandensein psychiatrischer und hirnerkrankungen geprüft. Alle Personen, die selbst oder deren biologische Verwandte ersten Grades jemals an neurologischen und psychiatrischen Störungen litten, wurden ausgeschlossen. Die verbliebenen Probanden wurden in die Klinik für die Erhebung einer ausführlichen Anamnese, die Durchführung einer orientierenden neurologischen Untersuchung und die Teilnahme an verschiedenen neuropsychologischen Tests eingeladen.

Nach einer orientierenden neurologischen Anamnese und Untersuchung, bei welcher Reflexe, Hirnnervenfunktionen, Sensorik, Motorik und Koordination getestet wurden, folgte das klinische Interview mittels Strukturiertem Klinischem Interview I und II (*SKID I und II*) (First *et al.*, 1996; First *et al.*, 1997), um Probanden mit psychiatrischen Erkrankungen während der bisherigen Lebensgeschichte auszuschließen. Um psychiatrische Erkrankungen innerhalb der Familie auszuschließen, durchliefen alle Teilnehmer das Family History Assessment Module (*FHAM*) (Rice *et al.*, 1995). Alle Personen über 60 Jahre, mussten, um in die Kontrollgruppe aufgenommen zu werden, zusätzlich den Mini Mental State Test (*MMST*) (Folstein *et al.*, 1975) absolvieren, welcher zur Detektion kognitiver Defizite aufgrund von Demenz diente.

### **3.1.3.2 Fallgruppe**

Die Probanden für die Patientengruppe wurden in Kooperation mit dem Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum (*DSGZ*) München, innerhalb der LMU-Universitätsklinik Großhadern, rekrutiert. Voraussetzungen zur Studienteilnahme waren, neben dem Vorhandensein der Erkrankung Morbus Menière, Volljährigkeit, europäische Ethnizität und das schriftliche Einverständnis zur Datenerhebung mittels Anamnese und venöser Blutentnahme.

Durch die Doktoranden wurden aus dem Patientenpool des *DSGZ* potentielle Studienteilnehmer herausgefiltert und über Ziele, Ablauf und Hintergrund der Studie informiert. Bei Interesse zur Studienteilnahme startete nach Unterschreiben der Einverständniserklärung die Befragung mittels standardisierter Anamnesebögen. Einerseits wurden Daten zur Person, wie Alter, Geschlecht, Herkunft und Familienanamnese erhoben. Andererseits wurden die medizinische Vorgeschichte und die Medikamenteneinnahme der Person erfragt. Außerdem waren Fragen zu psychiatrischen, neurologischen und genetischen Erkrankungen in der Familie Bestandteil des Fragebogens. Schwerpunkt der

Anamnese bildete die Befragung zum Symptom Schwindel und dessen Begleitsymptome, wie Gangunsicherheit, Sehstörungen, Migräne und Hörstörungen. Auch wurde nach Auftreten dieser Symptome bei einem der Familienmitglieder geforscht.

Alle Patienten mit Morbus Menière wurden anhand der anamnestisch erhobenen Symptome und der klinischen Befunde anhand der Diagnosekriterien der AAO-HNS (Foundation, 1995) eingestuft (vgl. Tabelle 2.1). In diese Studie wurden Patienten mit einem klinisch gesicherten, klinisch sicheren, klinisch wahrscheinlichen und klinisch möglichen Morbus Menière eingeschlossen. Bei allen Patienten der Diagnosekategorie klinisch gesichert lag ein mittels MRT nachgewiesener endolymphatischer Hydrops vor. Der Hörverlust war audiometrisch objektiviert. Das Vorhandensein von anderen Schwindelerkrankungen als zusätzliche Diagnose galt nicht als Ausschlusskriterium.

Nach Assoziationsprüfung von Patienten- und Kontrollgruppe wurde die Patientengruppe mit klinisch möglicher Menière Diagnose anhand des Parameters Schwerhörigkeit in zwei Subgruppen geteilt, um innerhalb dieser Gruppe das Symptom Schwerhörigkeit separat auf genetische Assoziation zu testen. Hierfür wurden die anamnestischen Informationen aus den Symptomfragebögen über das Vorliegen von Schwerhörigkeit extrahiert und die klinisch möglichen Menière Patienten mit subjektiv empfundener Schwerhörigkeit den klinisch möglichen Menière Patienten ohne subjektiv empfundene Schwerhörigkeit gegenübergestellt.

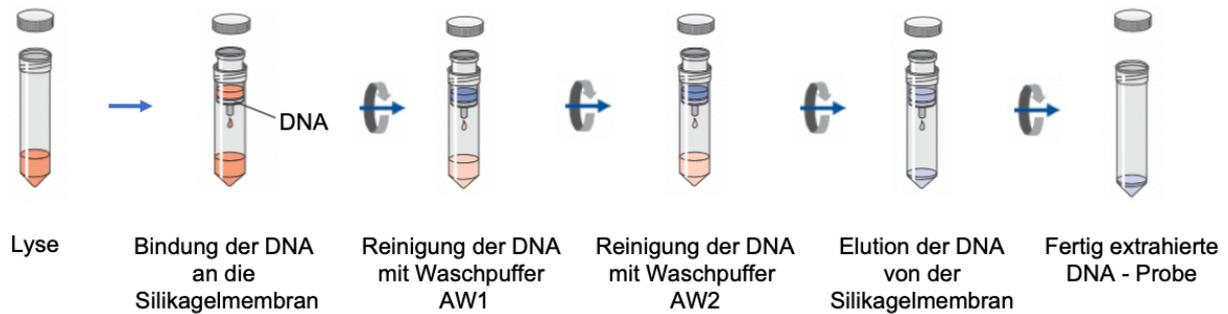
### **3.2 Laborverfahren**

Grundlage der genetischen Analyse bildete das von allen Probanden abgenommene venöse Vollblut. Die etwa 7-10 ml umfassenden Proben wurde in Ethylendiamintetraacetat (EDTA) - Monovetten bewahrt, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern. Alle Proben wurden zu Anonymisierungszwecken mit einem Code versehen.

Das venöse Vollblut in den EDTA - Monovetten wurde bei 6 °C für 12 min bei 3620 rpm zentrifugiert, das Plasma anschließend abpipettiert und der Blutkuchen bei -80 °C gelagert.

#### **3.2.1 DNA-Extraktion**

Voraussetzung für die Genotypisierung ist eine Isolierung der DNA, die mit dem Qiagen DNA Blood Maxi Kit nach Herstellerangaben durchgeführt wurde (Qiagen, 2005). Die Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über den Ablauf der DNA-Isolierung. Alle Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Geräte, welche für die DNA-Extraktion verwendet wurden, sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.



**Abbildung 3.1** DNA-Extraktion gemäß des Protokolls des QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Handbook. © QIAGEN, all rights reserved (Qiagen, 2005)

Zuerst wurde der Blutkuchen in der EDTA-Monovette bei Zimmertemperatur aufgetaut, mit 2 ml Phosphat gepufferter Salzlösung (*PBS*) aufgefüllt und gemischt. Das Gemisch wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und mit 1x *PBS* auf ein Volumen von 10 ml adjustiert. Für die Zelllyse wurden 500 µl Qiagen Protease und 12 ml Guanidinhydrochloridhaltiger (*GHCl*) Lysepuffer zugegeben. Das Blutgemisch wurde 60 s auf einem Vortex homogenisiert und bei 70 °C für 30 min im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml Ethanol und anschließend zweiminütigem Mischen auf dem Vortex wurde die Hydrathülle entzogen und die DNA ausgefällt. Nun konnte das DNA-Gemisch sukzessive auf eine QIAamp Maxi Säule überführt und bei 3000 rpm für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Die DNA wurde durch das saure Milieu und die Salzbedingung selektiv an die Silikagelmembran gebunden. RNA und Proteine wurden nicht an der Membran gehalten und wurden mit dem Eluat entsorgt. Um restliche Protein- und RNA-Kontaminationen auf der Membran zu entfernen, wurde die Probe mit 5 ml *GHCl*-haltigem Waschpuffer (Puffer AW1) 2 min bei 4000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. In einem zweiten Waschschriff mit 5 ml ethanolhaltigem, salzarmem Waschpuffer (Puffer AW2) und Zentrifugation für 15 min bei 4000 rpm wurden restliche *GHCl*-Salze ausgewaschen. Die Silikagelmembran wurde getrocknet. Abschließend wurde die DNA durch Änderung der pH-Bedingungen von der Membran eluiert. Hierfür wurde sie durch zweimalige Inkubation mit insgesamt 1,5 ml TRIS-haltigem AE-Puffer für jeweils 5 min und anschließender Zentrifugation für 2 min bei 5000 rpm (jeweils bei Raumtemperatur) von der Membran gelöst. Die DNA-Stammlösung wurde in 2 Microschraubröhrchen gelagert.

**Tabelle 3.1** Für die DNA-Extraktion verwendete Materialien, Reagenzien und Geräte

Material, Reagenz, Gerät	Hersteller
EDTA Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
50 ml Zentrifugenröhre	Sarstedt, Nümbrecht
Micro-Schraubröhre, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
1x PBS-Puffer: 8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Ad 1 l mit Aqua dest. Mit NaOH auf pH 7,4	Eigene Herstellung: Reagenzien von Carl Roth, Hamburg
Qiagen DNA Blood Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol Rotipurpur (<98 % p. A.)	Carl Roth, Karlsruhe
Vortex Genie	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad WNB 22	Memmert, Schwabhausen
Kühlzentrifuge CF108-GR	VWR Life Science Competence Center, Erlangen

### 3.2.2 DNA-Konzentrationseinstellung

Da für den weiteren Prozess alle eingesetzten DNA-Lösungen die gleiche Konzentration aufweisen mussten, wurden diese, wie im Folgenden beschrieben, auf eine Konzentration von 50 ng/µl eingestellt. In Tabelle 3.2 sind alle Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Geräte, welche für die DNA-Konzentrationseinstellung verwendet wurden, aufgelistet.

Zunächst wurden hierfür die unbekanntes Ausgangskonzentrationen der DNA-Proben mittels des Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen bestimmt. PicoGreen ist ein Fluorophor, welches selektiv an doppelsträngige DNA bindet und nur im DNA-gebundenen Zustand fluoresziert (Rengarajan *et al.*, 2002). Prinzip dieser Konzentrationsbestimmung ist die Intensitätsmessung des Fluoreszenzsignals, da sich dieses in einem spezifischen Messbereich proportional zur gebundenen DNA verhält (Li *et al.*, 2014). Durch Herstellung und Vergleich mit einer Standardkurve, generiert durch Referenzlösungen mit bekannten DNA-Konzentrationen, können die bis dato unbekanntes DNA-Konzentrationen der Proben

kalkuliert werden (Bhat *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014). Die Standardkurve wurde durch eine 1:2 Verdünnungsreihe, ausgehend von humaner genomischer DNA mit bekannter Konzentration (100 ng/μl), hergestellt. Die Referenz-DNA-Lösung wurde 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt und durch mehrmaliges Aufziehen in die Pipettenspitze gemischt. Die jeweilige Verdünnung diente als Ausgangssubstanz für die nächst niedrigere Konzentration. Die Verdünnungsreihe bestand aus 8 Punkten mit folgenden DNA-Konzentrationen: 100 ng/μl, 50 ng/μl, 25 ng/μl, 12,5 ng/μl, 6,25 ng/μl, 3,125 ng/μl, 1,5625 ng/μl, 0 ng/μl DNA.

Die zu messenden DNA-Stammlösungen wurden vorgängig in einer 96 *well* Platte mit destilliertem Wasser in einem Verhältnis 1:10 verdünnt, damit sie im zu messenden Bereich lagen. Die DNA-Lösungen der Standardkurve wurden nicht weiter verdünnt. In eine schwarze 96 *well* Platte mit flachem Boden wurden 50 μl autoklaviertes, destilliertes Wasser pro Vertiefung vorgelegt. Dazu wurden jeweils 5 μl DNA-Lösung der Standardverdünnungsreihe bzw. der verdünnten DNA-Proben in Duplikaten pipettiert. PicoGreen wurde 1:156 verdünnt. Pro Vertiefung wurden 145 μl des verdünnten Farbstoffs zu den Proben- bzw. Standard-DNA-Lösungen gegeben. Die Endverdünnung des PicoGreen Farbstoffs betrug 1:200. In jedem *well* waren 200 μl Lösung, bestehend aus 50 μl destilliertem Wasser, 5 μl DNA-Lösung und 145 μl PicoGreen Farbstoff.

Die schwarze 96 *well* Platte wurde durch den Greifarm von der Janus Workstation automatisch in den Victor 3 Multilabel Counter 1420 überführt. Die Platte wurde 30 s in horizontaler Ebene in Doppellellipsen geschüttelt, um die Lösungen homogen zu durchmischen. Für die Fluoreszenzmessung wurde der PicoGreen Farbstoff bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und bei 520 nm wurde die Emission gemessen. Die ermittelten Fluoreszenzwerte wurden vom Messgerät an einen Rechner übermittelt. Die Konzentrationen der DNA-Proben wurden anhand der Fluoreszenzwerte der Standardkurve berechnet. Ausgehend von diesen Konzentrationswerten wurde kalkuliert, welche Menge an Wasser addiert werden musste, um eine DNA-Konzentration von 50 ng/μl zu erreichen. Die Verdünnung erfolgte anschließend automatisch mit dem Pipettierroboter. Als Ausgangslösung wurden 500 μl Arbeitslösung mit einer DNA-Konzentration von 50 ng/μl hergestellt.

**Tabelle 3.2** Für die DNA-Konzentrationseinstellung verwendete Materialien, Reagenzien und Geräte

Material, Reagenz, Gerät	Hersteller
96 well Flat Bottom Plate Black	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Human genomic DNA 100 ng/μl	Clontech, Mountain View, USA
Janus Automated Workstation	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
Quant iT PicoGreen dsDNA reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Thermo Fast 96 well Plate	ABgene, Hamburg
Victor 3 Multilabel Counter 1420	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA

### 3.2.3 Genotypisierung

#### 3.2.3.1 Überblick

Die Genotypisierung wurde extern im Rahmen von Kooperationen, methodisch basierend auf SNP-Arrays, durchgeführt. Die DNA-Proben wurden in 7 Chargen (*Batches*) auf verschiedenen Plattformen durchgeführt. Auch die Qualitätskontrolle und die Imputation, das heißt die Schätzung nicht direkt genotypisierter Varianten auf der Basis der Linkage Disequilibrium-Struktur eines Referenzgenoms, fand zunächst innerhalb des jeweiligen *Batches* statt (Uitterlinden, 2016; Dehghan, 2018; Tam *et al.*, 2019).

Die Qualitätskontrolle und Imputation von *Batch 1* [Human610-Quad (Priebe *et al.*, 2013; Drago *et al.*, 2014), Human660W-Quad (Priebe *et al.*, 2013)], *Batch 2* [(HumanHap 300, (Need *et al.*, 2009)] und *Batch 3* [(Affymetrix 6.0, (Psychosis Endophenotypes International *et al.*, 2014)] erfolgten im Rahmen der bis dato größten Schizophrenie Assoziationsstudie des Psychiatric Genomics Consortium (PGC) (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, 2014). Die *Batches 4* [(HumanHap 300, (Stefansson *et al.*, 2008)], 5 [(Illumina Human OmniExpress, (Lencz *et al.*, 2014)], 6 [(Illumina Omni1-Quad, (Galfalvy *et al.*, 2015)] und 7 [(HumanOmniExpress-24, (Rujescu *et al.*, 2018)] wurden anhand derselben Kriterien qualitätskontrolliert und imputiert.

Nach der Qualitätskontrolle und Imputation wurden die Daten der 7 *Batches* zu einem großen Datenset zusammengeführt und es erfolgte eine erneute Qualitätskontrolle.

### 3.2.3.2 Prinzip eines SNP-Arrays am Beispiel des HumanOmniExpress-24 BeadChip (Illumina)

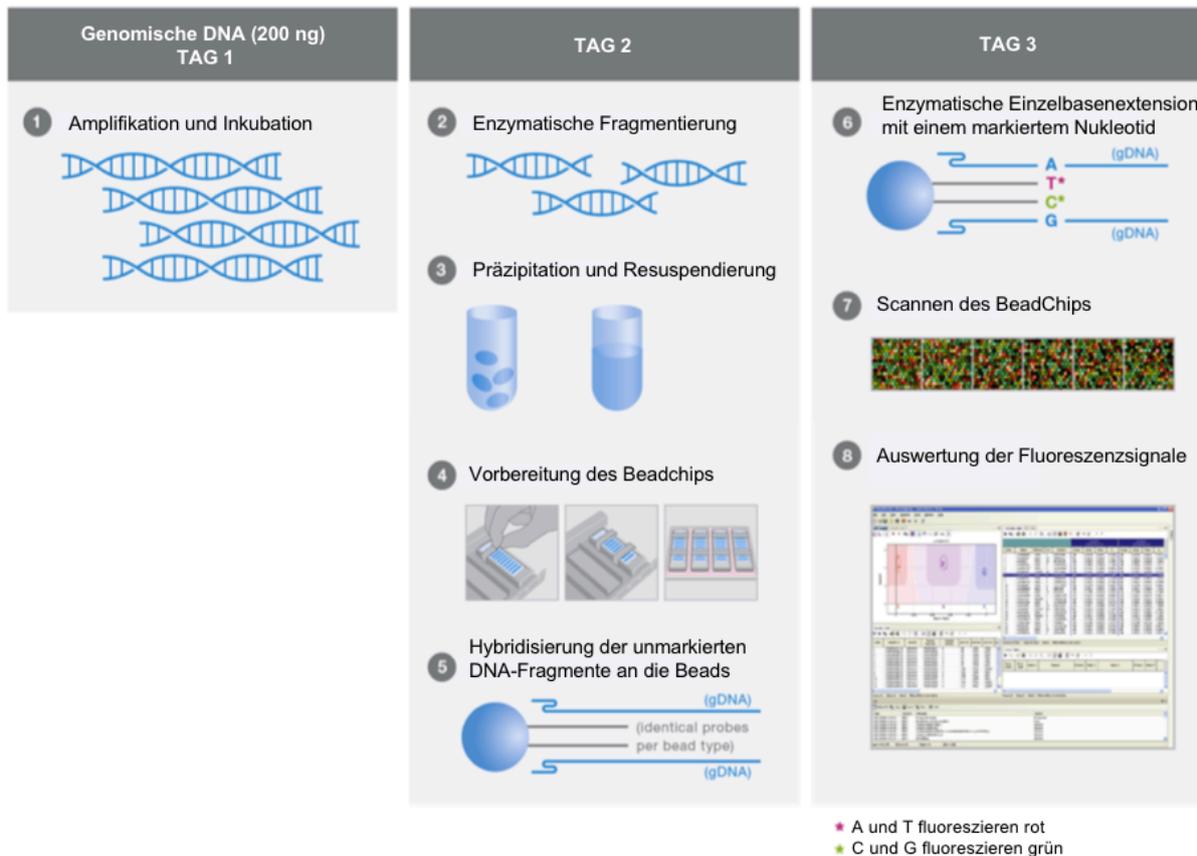
Das Prinzip eines SNP-Arrays und der Ablauf des Genotypisierungsprozesses wird am Beispiel des HumanOmniExpress-24 (Illumina, 2017) erläutert.

Auf dem Trägermaterial eines Beadchips sind über 700 000 verschiedene Beadtypen, welche aus synthetischen 50-mer Oligonukleotiden bestehen, fixiert. Diese hybridisieren mit denjenigen DNA-Fragmenten einer Probe, welche hierzu 100 % komplementär sind. Da jeder Beadtyp einem SNP Locus entspricht, kann anhand des Bindungsorts der DNA-Fragmente auf den Genotyp dieses SNPs beim jeweiligen Probanden geschlossen werden.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Genotypisierung gemäß der Anleitung der Firma Illumina (Illumina, 2017) erläutert.

Auf einem Beadchip können DNA-Proben von bis zu 24 Probanden gleichzeitig untersucht werden. Pro DNA-Probe werden 200 ng DNA-Material benötigt. Einfachheitshalber wird hier lediglich die Genotypisierung der DNA eines einzelnen Probanden erklärt.

Der Arbeitsablauf beginnt an Tag 1 mit der Amplifikation und Inkubation der DNA über Nacht (Abbildung 3.2, 1). An Tag 2 wird die DNA durch Restriktionsenzyme in Fragmente gespalten. Anschließend findet die Präzipitation der DNA-Fragmente mit Isopropanol und die Resuspendierung in Hybridisierungspuffer statt (Abbildung 3.2, 2-3). Nun können die aufbereiteten DNA-Fragmente auf den Beadchip geladen und über Nacht inkubiert werden (Abbildung 3.2, 4-5). Im Hybridisierungsofen binden die jeweiligen DNA-Fragmente an ihre komplementären Beadtypen. Um nicht oder unspezifisch hybridisierte DNA zu entfernen, folgen am dritten Tag mehrere Reinigungsschritte des Beadchips. Der nächste Schritt umfasst eine enzymatische Einzelbasenextension (*Single-base Extension, SBE*) mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden. Die an den Beadtypen hybridisierten DNA-Fragmente dienen hierfür als Matrize. Anhand dieser Matrize wird das auf dem Trägermaterial fixierte Oligonukleotid um genau eine Base, nämlich an der Stelle des zu untersuchenden SNPs, verlängert (Abbildung 3.2, 6). Die eingesetzten Nukleotide mit den Basen A und T fluoreszieren rot und die der Basen C und G grün. Beim Scannen des Beadchips werden die Fluorophore angeregt und deren Intensitäten gemessen (Abbildung 3.2, 7). Da die 50-mer Oligonukleotide auf dem Trägermaterial in einem mikroelektro-mechanischen System als Substratmuster aufgebracht sind, kann jedes Fluoreszenzsignal einem SNP zugeordnet werden. Anhand der Illumina Software können die Daten der einzelnen Proben ausgewertet und die Genotypfrequenzen verglichen werden (Abbildung 3.2, 8).



**Abbildung 3.2** Schematischer Ablauf der Genotypisierung des Infinium-Assays HumanOmniExpress-24 der Firma Illumina. © Courtesy of Illumina, Inc. (Illumina, 2017).

### 3.3 Qualitätskontrolle

Aufgrund der hohen Menge an Variablen gibt es bei SNP-Arrays eine Reihe von Fehlerquellen, wie z. B. Genotypisierungsfehler (Ziegler *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2018). Eine sorgfältige Qualitätskontrolle ist ein unabdingbarer Schritt, um diese Fehler zu erkennen. Es wird zwischen individueller Qualitätskontrolle, welche einen Ausschluss von Studienteilnehmern zur Folge hat, und einer Qualitätskontrolle auf SNP-Basis, bei welcher SNPs mit niedriger Qualität ausgeschlossen werden, unterschieden. Die Qualitätskontrolle der genotypisierten Daten erfolgte mit Hilfe der Software PLINK, Version 1.9 (Purcell *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2015). Im Folgenden werden die in dieser Studie durchgeführten Schritte der Qualitätskontrolle mit den dazugehörigen festgelegten Schwellenwerten erläutert, welche zum Ausschluss von Probanden und SNPs verwendet wurden.

Wichtige Kriterien zum Ausschluss von Probanden sind die Genotypisierungsrate (*call rate*), die Ermittlung der Heterozygotenfrequenz, der Abgleich von angegebenem und laborchemisch ermitteltem Geschlecht, der Verwandtschaftsgrad der Studienteilnehmer und die Populationszugehörigkeit.

Das DNA-Geschlecht der Probanden kann durch den Prozentsatz heterozygoter Genotypen bestimmter X-chromosomaler SNPs geschätzt werden (Zhao *et al.*, 2018). Oberhalb oder unterhalb eines bestimmten Schwellenwerts wird das DNA-Geschlecht als weiblich bzw. männlich definiert (Purcell *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2015). Liegt der Prozentsatz zwischen diesen Schwellenwerten, kann dies ein Hinweis auf Kontamination der Probe oder Genotypisierungsfehler sein. Stimmt das laborchemisch ermittelte DNA-Geschlecht nicht mit den anamnestischen Angaben zum Geschlecht überein, kann eine Vertauschung oder Verunreinigung der Probe nicht ausgeschlossen werden (Anderson *et al.*, 2010). Alle Probanden, bei welchen entweder das DNA-Geschlecht nicht eindeutig bestimmbar war oder eine diskordante Geschlechtsinformation vorlag, wurden ausgeschlossen.

Die Genotypisierungsrate der Probanden, genannt *call rate*, gibt an, wie viele SNPs einer DNA-Probe valide bestimmt werden konnten (Ziegler *et al.*, 2008). Sie ist hilfreich, um mangelhaft genotypisierte DNA-Proben zu identifizieren. Eine niedrige *call rate* kann auf einen fehlerhaften Chip, Prozessfehler bei der Genotypisierung oder auf eine ungenügende DNA-Qualität bzw. DNA-Konzentration hinweisen (Anderson *et al.*, 2010; Teo, 2010). In dieser Studie wurden alle Probanden ausgeschlossen, bei denen die *call rate* ihrer DNA-Probe weniger als 96 % in kleinen Stichproben, bzw. weniger als 99 % in großen Stichproben betrug.

Um unbekannte Verwandtschaft, Abweichungen von der Heterozygotenfrequenz und Populationsstratifikation zu detektieren, wurde ein stringent qualitätskontrolliertes Set an im Kopplungsungleichgewicht (*Linkage Disequilibrium, LD*) ( $r^2 < 0,2$ ) befindlichen autosomalen Markern verwendet (minore Allelfrequenz (MAF)  $\geq 0,05$ , HWE  $p \geq 0,05$ , *call rate*  $\geq 0,99$ ). Die Heterozygotenrate beschreibt den Anteil der heterozygoten Genotypen an allen generierten Genotypen der autosomalen Marker in einer DNA-Probe (Teo, 2010). Fällt der Prozentsatz heterozygoter Genotypen eines Probanden, im Vergleich zum Mittelwert aller Probanden, zu hoch oder zu niedrig aus, kann das ein Hinweis auf Kontamination der DNA-Probe oder auf eine nicht der Gesamtgruppe entsprechenden Ethnizität des Probanden sein (Anderson *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2018). Alle Probanden mit einer Heterozygotenrate von  $|IF_{het}| \geq 0,2$  wurden ausgeschlossen.

Ein weiterer Aspekt, der in Assoziationsstudien beachtet werden muss, ist die Populationsstratifikation. Populationsstratifikation bedeutet hier die Bildung von genetischen Subgruppen wegen geografisch und historisch unterschiedlicher Hintergründe der Probanden (Ziegler *et al.*, 2008). Durch differierende Allelfrequenzen zwischen den Subpopulationen kann es zu Verzerrungen der Genotypfrequenzen kommen. Dies kann in Assoziationsstudien dazu führen, dass Assoziationen genetischer Variationen gefunden werden, welche in Wirklichkeit nicht mit der jeweiligen Krankheit, sondern mit der Bevölkerungsstruktur verknüpft sind (Thomas & Witte, 2002; Ziegler *et al.*, 2008; Anderson *et*

al., 2010). Die Analyse der Populationszugehörigkeit der Probanden wurde mittels einer Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis, PCA*) der genetischen Daten durch die Verwendung der Software EIGENSTRAT durchgeführt (Price *et al.*, 2006; Price *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2018). Mit den ersten zwei Hauptkomponenten (*Principal Component, PC*) wurde durch ein Streudiagramm die Herkunft der einzelnen Probanden visualisiert. Probanden mit jeweils gleicher Populationszugehörigkeit bildeten ein gemeinsames Cluster. Ausreißer, also Probanden, die nicht eindeutig dieser Population zugeordnet werden konnten, wurden ausgeschlossen.

Eine populationsbasierte Assoziationsanalyse setzt voraus, dass die Probanden nicht miteinander verwandt sind. Duplikate und erst- oder zweitgradige Angehörige können die Analyse verfälschen, da die Genotypen der entsprechenden Familien überrepräsentiert wären und damit nicht mehr die Allelfrequenzen der gesamten Population wiedergeben (Anderson *et al.*, 2010). Um Duplikate oder verwandte Probanden zu identifizieren, wurden alle Probanden miteinander gepaart und deren Anteil identischer Allele vom gleichen gemeinsamen Vorfahren (*Identity by descent, IBD*) eruiert (Zhao *et al.*, 2018). Verwandte Probanden haben mehr identische Allele, als durch Zufall zu erwarten wäre. Der Anteil an identischen Allelen steigt proportional mit dem Verwandtschaftsgrad (Anderson *et al.*, 2010), weshalb dieser folgendermaßen abgeschätzt werden kann. Der IBD-Anteil wird als Wert von 0-1 ausgedrückt, wobei 0 „keine genetische Verbindung“, ein Wert über 0.125 „Verwandtschaft dritten Grades“, ein Wert über 0.25 „Verwandtschaft zweiten Grades“, ein Wert über 0.5 „Verwandtschaft ersten Grades“ und ein Wert nahe 1 das Vorhandensein von „Duplikaten“ oder „monozygotischen Zwillingen“ bedeutet (Anderson *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2018). Jeweils ein Individuum eines Probandenpaars mit einem IBD Wert über 0.2 wurde ausgeschlossen. Dabei wurden Individuen, bei welchen mehr Informationen über deren Phänotyp vorlagen, bevorzugt behalten, wobei generell Probanden aus der Patientengruppe denjenigen aus der Kontrollgruppe vorgezogen wurden.

Auch SNPs mit einer schlechten Qualität können dazu führen, die Daten der Fall-Kontroll-Studie zu verzerren und einen größeren Unterschied der Genotypfrequenzen zwischen Patienten- und Kontrollgruppe vorzutäuschen, als tatsächlich vorhanden ist. Um zu verhindern, dass Assoziationen fälschlicherweise angenommen werden, ist es somit notwendig, systematisch SNPs mit schlechter Qualität auszuschließen. Ein exzessiver SNP-Ausschluss sollte allerdings vermieden werden, da jeder heraus genommene SNP ein potentiell versäumter Erkrankungsmarker ist (Teo, 2010).

Die Qualitätskontrolle auf SNP Basis sollte bei einer GWA Studie die *call rate*, Tests auf Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und die Ermittlung der Allelfrequenz des selteneren Allels (*Minorallelfrequenz, MAF*) umfassen.

Als ein Maß für die erfolgreiche Typisierung autosomaler SNPs wurde eine SNP *call rate*  $\geq 99\%$  festgelegt. Ausgeschlossen wurden demnach alle SNPs, bei denen in weniger als 99 % der Proben ein Genotyp valide bestimmt werden konnte, oder anders ausgedrückt, bei denen mehr als 1 % der Proben nicht eindeutig einem Genotyp zugeordnet werden konnten. Außerdem wurden alle SNPs entfernt, bei welchen sich die *call rate* um mehr als 2 % zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe unterschied. Generell gilt für SNPs, bei denen für viele Probanden kein Genotyp bestimmt werden kann oder für deren Signalintensitäten keine eindeutigen Genotypen zugeordnet werden können, dass sie von fraglicher Qualität sind (Ziegler *et al.*, 2008). Mit steigender SNP *call rate* sinkt somit die Wahrscheinlichkeit für fehlerhafte Genotypisierungen von SNPs.

Die minore Allelfrequenz (MAF), also die Häufigkeit des selteneren Allels innerhalb einer Population, ist ein weiteres Instrument, um fehleranfälligeren Daten auszufiltern (Ziegler *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2019). Eine niedrige MAF geht mit niedrigen Frequenzen der dieses Allel enthaltenen Genotypen einher (Teo, 2010). Die niedrige Anzahl dieser Genotypen stellt für aktuelle Algorithmen zur Bestimmung von Genotypen eine Schwierigkeit dar und führt häufig zu falsch positiven Assoziationen (Anderson *et al.*, 2010). Echte Assoziationen sind meist hingegen durch die geringe Anzahl der Probanden mit dem jeweiligen Genotyp nicht aussagekräftig (Anderson *et al.*, 2010). Auch monomorphe SNPs, also Sequenzstellen, die bei allen Individuen der gegebenen Population den gleichen Genotyp aufweisen, werden durch die MAF Qualitätskontrolle erfasst (Ziegler *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurden alle SNPs mit einer MAF  $< 1\%$  ausgeschlossen.

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (*Hardy-Weinberg Equilibrium, HWE*) ist ein populationsgenetisches Modell, welches den Zusammenhang zwischen Allel- und Genotypfrequenzen beschreibt und als Instrument zur Qualitätssicherung benutzt wird (Ziegler *et al.*, 2008). Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht besagt, dass in einer idealen Population anhand der Allelfrequenzen die Genotypfrequenzen vorausgesagt werden können (Hardy, 1908). Wenn beispielsweise  $p$  und  $q$  ( $q = 1 - p$ ) die relativen Häufigkeiten der Allele  $A$  und  $a$  eines Genorts beschreiben und die Verteilung der Genotypen  $AA$ ,  $Aa$  und  $aa$  dem HWE folgt, lauten die relativen Häufigkeiten der Genotypen immer  $p^2 + 2pq + q^2$  (Crow, 1988; Waples, 2015). Eine Population gilt als ideal, wenn sie unendlich groß ist und wenn, Zufallspaarung vorausgesetzt, durch jedes Elternteil mit einer 50-prozentigen Wahrscheinlichkeit beide Allele weitervererbt werden. Störfaktoren, wie Migration oder Selektion sollten außerdem ausgeschlossen werden (Waples, 2015). Auch wenn dieses Modell primär für eine nicht reale Population gilt, kann man es für große Populationen anwenden (Hardy, 1908). Starke Abweichungen vom HWE können auf einen Qualitätsmangel im Genotypisierungsprozess hinweisen (Ziegler *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018). Um diese Fehler frühzeitig zu erkennen, steht das HWE meist am

Anfang der Datenanalyse und bildet daher die Grundlage populationsgenetischer Berechnungen (Waples, 2015). Da aber andere Faktoren, wie zum Beispiel Selektion, Mutation oder Immigration ebenfalls Abweichungen vom HWE verursachen können, sollten nur SNPs mit extremen Abweichungen vom HWE ausgeschlossen werden (Zhao *et al.*, 2018). Die p-Werte wurden deshalb mit  $p \leq 10^{-6}$  in der Kontroll- und  $p \leq 10^{-10}$  in der Fallgruppe so niedrig gewählt, dass ein fälschliches Ausschließen qualitativ hochwertiger SNPs vermieden wird. Die Abweichungen wurden in der Patientengruppe weniger stringent überprüft als in der Kontrollgruppe, da sich in der Patientengruppe bei mit der Erkrankung assoziierten Loci sehr wohl HWE Abweichungen ergeben können (Anderson *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2018).

Abweichungen der Genotypverteilung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden mittels exaktem Test nach Fischer geprüft.

Bei x-chromosomalen Markern galt als Ausschlusskriterium eine haploide Heterozygotenrate  $> 2\%$ , sowie eine *call rate*  $< 0.95$  und ein HWE  $p \leq 10^{-6}$ .

Nach Abschluss der chipweisen Qualitätskontrolle wurden bekannte Duplikate, welche auf verschiedenen Chips genotypisiert wurden, auf Übereinstimmung geprüft. Hier galt eine Konkordanzrate unter  $99\%$  als Ausschlusskriterium beider Proben. Lag die Konkordanzrate bei oder über  $99\%$  wurde die Probe mit der schlechteren Qualität von weiteren Analysen ausgeschlossen.

### 3.4 Imputation von Genotypen und Zusammenfügen der Daten

SNPs, die selbst nicht genotypisiert worden sind, können mit Hilfe der Struktur des Kopplungsungleichgewichts (*Linkage Disequilibrium, LD*) eines Referenzsamples geschätzt und ergänzt werden. Dies ist möglich, da auch bei Individuen, welche nicht verwandt sind, kurze DNA-Abschnitte existieren, in denen kaum Rekombination stattfindet und somit gemeinsam vererbt werden. Dieser Vorgang wird als Imputation bezeichnet (Uitterlinden, 2016; Dehghan, 2018; Tam *et al.*, 2019). Die Datensätze der einzelnen *Batches* wurden mit Hilfe der Software SHAPEIT (Delaneau *et al.*, 2011) und IMPUTE2 (Howie *et al.*, 2009; Howie *et al.*, 2011) auf das 1000 Genom Referenzsample (Phase 1 Version 3) imputiert. Die Imputation für das X-Chromosom wurde für Frauen und Männer separat durchgeführt.

Nach der Imputation wurden die 7 *Batches* zu einem großen Datensatz zusammengefügt. Die zuvor beschriebenen Qualitätskontrollen wurden für den Gesamtdatensatz erneut durchgeführt. Nur SNPs mit einem INFO Wert  $\geq 0.6$ , sowohl im jeweiligen *Batch*, als auch im kombinierten Datensatz, wurden verwendet. Der INFO-Wert gibt die Güte der Schätzung nicht direkt genotypisierter, also imputierter, SNPs an. Zusätzlich wurden alle Marker ausgeschlossen, deren Allelfrequenzen um mehr als  $10\%$  zwischen den verschiedenen

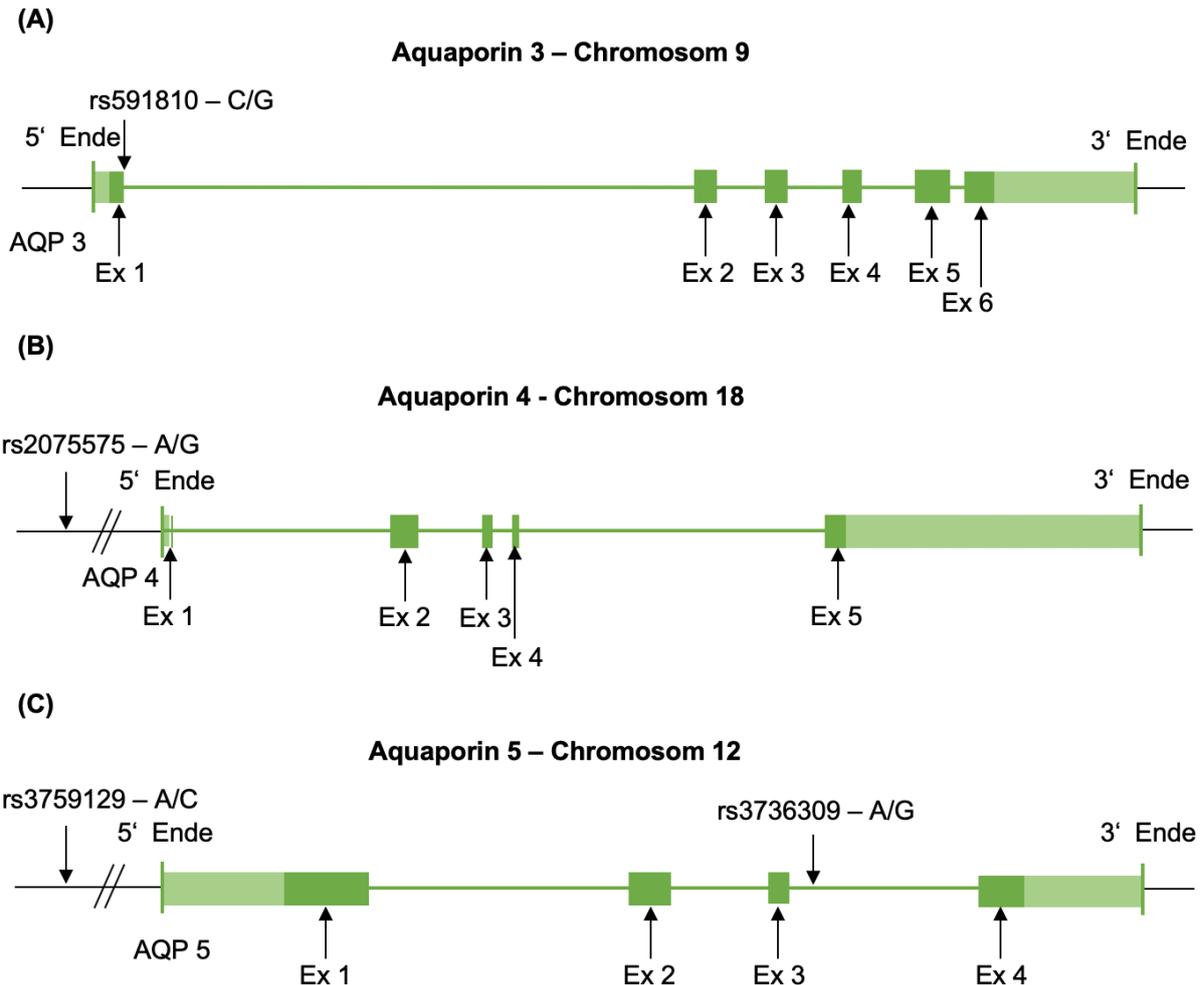
*Batches* variierten. Aus dem imputierten Datensatz konnten die geschätzten Genotypen als Grundlage für die weitere Analyse extrahiert werden.

### **3.5 Untersuchte Einzelnukleotidpolymorphismen**

In Anlehnung an die Ergebnisse bisheriger Assoziationsuntersuchungen bei Morbus Menière (vgl. Kapitel 2.4) in den Aquaporingenen wurden in dieser Arbeit die vier mittels SNP-Arrays genotypisierten SNPs rs591810, rs2075575, rs3759129 und rs3736309 aus dem imputierten Mega-Datensatz extrahiert und auf Assoziationen mit Morbus Menière überprüft.

Die vier ausgewählten SNPs liegen in den drei Genen AQP 3, 4 und 5. Beim Marker rs591810 handelt es sich um eine stumme Mutation im ersten Exon des AQP 3, welches wiederum auf Chromosom 9 lokalisiert ist. Der SNP rs2075575 befindet sich außerhalb des AQP 4-Gens in der 5'-Genregion auf dem Chromosom 18. Zwei Marker gehören zum AQP 5 auf Chromosom 12. Der SNP rs3736309 ist in Intron 3 dieses Gens lokalisiert. Der SNP rs3759129 befindet sich im 5'-Genbereich, circa 2 Kilobasen vor dem AQP 5-Gen (NCBI, 2019).

Die Abbildung 3.3 zeigt die AQP 3, 4, und 5 -Gene mit deren Exon/Intron Struktur und die Positionen der ausgewählten SNPs.



**Abbildung 3.3** Die grünen Balken stellen Exons dar. Bei den Bereichen zwischen den Exons handelt es sich um Introns (grüne Linien). (NCBI, 2019) **(A)** Lage des SNP rs591810 auf dem AQP 3-Gen des Chromosoms 9. **(B)** Lage des SNP rs2075575 in der 5'-Region vor dem AQP 4-Gen des Chromosoms 18. **(C)** Lage der zwei SNPs rs3759129 und rs3736309 vor bzw. auf dem AQP 5-Gen des Chromosoms 12.

### 3.6 Statistische Analyse

Die statistische Assoziationsanalyse erfolgte in PLINK 1.9 (Purcell *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2015). Die Überprüfung des Einflusses der Genotypen auf das Auftreten der Erkrankung erfolgte anhand logistischer Regression, wobei das additive, dominante und rezessive Modell gerechnet wurden. Die Werte wurden für Alter, Geschlecht und Hauptkomponente 1 (*Principal component, PC*) adjustiert. Durch das Programm EIGENSTRAT (Price *et al.*, 2006) wurden zwei Achsen identifiziert (PC1 und PC2). Da nur PC1 mit dem Phänotyp assoziiert war, wurde auch nur diese als Kovariable in die Berechnung miteinbezogen.

Beim additiven Modell wird ein Gen-Dosis-Effekt angenommen. Für die Analyse der möglichen Assoziationen der Genotypverteilung mit der Erkrankung wurden die Genotypen entsprechend der Anzahl der Effekt-Allele (0,1 und 2) kodiert, so dass laut Modellvorstellung jede Kopie des selteneren Allels additiv zum Risiko bzw. Phänotyp beiträgt. Im dominanten

Modell wird der Effekt des selteneren Allels in der Genotypverteilung untersucht. Da beim dominanten Erbgang das Allel bei homozygoten und heterozygoten Allel-Trägern zur Merkmalsausprägung führt, wurden die Träger des selteneren Allels den Nicht-Trägern des Allels gegenübergestellt. In umgekehrter Weise wurden im rezessiven Modell die homozygoten Minorallel-Träger mit den homo- und heterozygoten Majorallel-Trägern verglichen.

Als statistische Berechnungsgrundlage wurde ein nominales Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt. Ergebnisse mit  $p < 0,1$  wurden als Trend gewertet. Da es sich bei den vorliegenden Ergebnissen um explorative Einschätzungen handelt, wurde auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet.

#### 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen den vier genetischen Markern rs591810 (AQP 3), rs2075575 (AQP 4), rs3759129 und rs3736309 (AQP 5) und Morbus Menière überprüft (vgl. Abb. 3.3).

Hierzu wurden aus einem kaukasischen Kollektiv Patienten mit Morbus Menière, welche gemäß den Diagnosekriterien der AAO-HNS von 1995 eingeteilt wurden (Foundation, 1995), und Kontrollprobanden innerhalb einer GWAS mittels SNP-Arrays genotypisiert und untersucht. Nach den vorausgegangenen Qualitätskontrollen wurden die Genotypen für die vier untersuchten SNPs für 2615 Kontrollprobanden und 323 Probanden der Fallgruppe extrahiert.

Die Patientengruppe bestand aus 141 Patienten mit einem klinisch eindeutigen Morbus Menière (darunter 33 mit gesichertem und 108 mit klinisch sicherem Morbus Menière), 35 Patienten der Kategorie klinisch wahrscheinlich und 147 Patienten der Kategorie klinisch möglich (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1** Einteilung der Patientengruppe gemäß den Diagnosekriterien der AAO-HNS von 1995 (Foundation, 1995)

		Klinisch eindeutig	Klinisch wahrscheinlich	Klinisch möglich
<b>N (Anzahl)</b>		141	35	147
<b>Alter (Standardabweichung)</b>		59,14 (12,4)	62,91 (12,4)	60,98 (14,1)
<b>Geschlecht</b>	<b>Frauen</b>	62 (44,0 %)	20 (57,1 %)	73 (49,7 %)
	<b>Männer</b>	79 (56,0 %)	15 (42,9 %)	74 (50,3 %)

Aufgrund der angenommenen Hypothese, dass Morbus Menière durch fehlregulierte Aquaporine und einem damit einhergehenden Ungleichgewicht der Ionen- und Flüssigkeitshomöostase im Innenohr entsteht, wurden für diese Arbeit vier Polymorphismen der Aquaporine 3, 4 und 5 ausgewählt, welche bereits in vorgängigen Studien auf einen Zusammenhang mit Morbus Menière geprüft wurden.

In den folgenden Analysen wurde auf Assoziationen mit der Erkrankung durch Vergleich der Patienten- und Kontrollgruppe geprüft, wobei initial die Gruppe mit mindestens klinisch möglichem Morbus Menière (vgl. Kapitel 4.1) betrachtet wurde. Unter den Punkten 4.2 und 4.3 wurden zwei weitere Analysen eingefügt: Vergleich der Genotypfrequenzen der vier Polymorphismen zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen mit mindestens wahrscheinlicher (vgl. Kapitel 4.2), sowie eindeutiger (vgl. Kapitel 4.3) Menière Diagnose. In

einem weiteren Schritt wurde unter den klinisch möglichen Menière Patienten eine Assoziation mit dem Symptom Schwerhörigkeit analysiert (vgl. Kapitel 4.4).

#### 4.1 Assoziationsanalyse mit mindestens klinisch möglichem Morbus Menière

Die Zusammensetzung der Gruppe mit mindestens klinisch möglichem Morbus Menière ist in Tabelle 4.2 veranschaulicht. Der Altersdurchschnitt war in der Patientengruppe mit 60,39 Jahren höher als in der Kontrollgruppe (47,42 Jahre). Die Altersverteilung in den Gruppen wurde auf Unterschiede geprüft und zeigte sich als statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test = 239361,5,  $p < 0,001$ , bei mittlerer Effektstärke  $r = 0,23$ ). Bei der Geschlechterverteilung waren in der Kontrollgruppe mehr weibliche (53,8 %) und in der Fallgruppe mehr männliche (52,0 %) Probanden vertreten. Der Chi Quadrat Test zeigt, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Gruppenzugehörigkeit und Geschlecht bestand (Pearson-Chi-Quadrat: 3,856,  $p = 0,05$ ). Aufgrund der ungleichen Alters- und Geschlechterverteilung zwischen beiden Gruppen wurden die Parameter Alter und Geschlecht als Kovariablen in den Analysen berücksichtigt.

**Tabelle 4.2** Zusammensetzung der Patientengruppe mit mindestens klinisch möglichem Morbus Menière und der Kontrollgruppe.

		Patienten	Kontrollen
<b>N (Anzahl)</b>		323	2615
<b>Alter (Standardabweichung)</b>		60,39 (13,2)	47,42 (16,5)
<b>Geschlecht</b>	<b>Frauen</b>	155 (48,0 %)	1406 (53,8 %)
	<b>Männer</b>	168 (52,0 %)	1209 (46,2 %)

Die Patientengruppe mit mindestens klinisch möglichem Morbus Menière wurde hinsichtlich signifikanter Unterschiede in der Genotypverteilung im Vergleich zu der Genotypverteilung der Kontrollgruppe analysiert.

Vor der Datenanalyse wurden Abweichungen der Genotypverteilung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mittels exaktem Test nach Fischer geprüft. Für die im Folgenden analysierten Variationen wurde keine signifikante Abweichung von der beobachteten und der erwarteten Genotypverteilung festgestellt (Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3** HWE der 4 Polymorphismen der Aquaporingene 3,4 und 5 in der Patientengruppe mit mindestens klinisch möglichem Morbus Menière und in der Kontrollgruppe.

SNP	Gen	Allel		Patienten mindestens klinisch möglich		Kontrollen	
				MAF	p-Wert	MAF	p-Wert
rs591810	AQP 3	C	G	0,276	0,479	0,294	0,925
rs2075575	AQP 4	A	G	0,419	1,000	0,411	0,474
rs3759129	AQP 5	C	A	0,182	0,564	0,187	0,270
rs3736309	AQP 5	G	A	0,136	0,331	0,117	0,630

MAF=Minorallelfrequenz

Um zu überprüfen, ob die Polymorphismen der Aquaporingene mit Morbus Menière assoziiert sind, wurden die Genotypen der einzelnen SNPs entsprechend der Anzahl der Effekt-Allele (0,1 und 2) kodiert. Jede Kopie des selteneren Allels trägt nach dem additiven Modell zum Risiko bzw. Phänotyp bei.

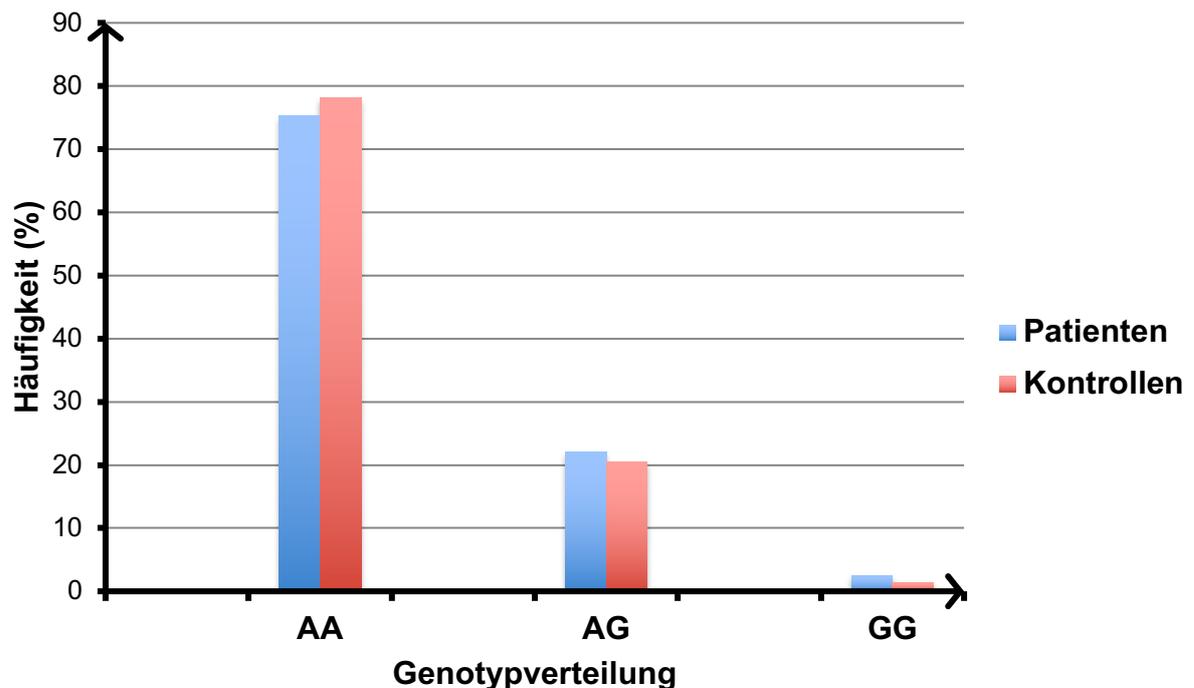
Beim SNP rs3736309 des Aquaporingens 5 zeigte sich ein nominal signifikantes Ergebnis ( $p = 0,027$ , OR = 1,33, 95 % KI = 1,03-1,72) (Tabelle 4.4). Der Genotyp GG trat mit 2,6 % bei den Menière Patienten mit mindestens klinisch möglicher Diagnose im Vergleich zu den Kontrollen (1,5 %) häufiger auf. Der Genotyp AA trat dementsprechend bei den Kontrollen häufiger auf. Die prozentuale Verteilung der Genotypen bei rs3736309 in beiden Gruppen wird in Abbildung 4.1 veranschaulicht.

Bei den anderen drei Markern gab es keine Assoziation mit Morbus Menière.

**Tabelle 4.4** Assoziation der 4 Polymorphismen der Aquaporingene 3,4 und 5 mit Menière Patienten mit mindestens klinisch möglicher Diagnose.

SNP (Gen)	Allel		Patienten mindestens klinisch möglich			Kontrollen			p- Wert	OR (95 % KI)
	a1	a2	a1a1 (%)	a1a2 (%)	a2a2 (%)	a1a1 (%)	a1a2 (%)	a2a2 (%)		
rs591810 (AQP 3)	C	G	26 (8,4)	119 (38,4)	165 (53,2)	224 (8,7)	1071 (41,4)	1291 (49,9)	0,364	0,92 (0,76-1,11)
rs2075575 (AQP 4)	A	G	51 (17,5)	142 (48,8)	98 (33,7)	415 (17,2)	1148 (47,7)	845 (35,1)	0,924	1,01 (0,84-1,21)
rs3759129 (AQP 5)	C	A	8 (2,6)	96 (31,2)	204 (66,2)	98 (3,8)	761 (29,8)	1697 (66,4)	0,674	0,95 (0,76-1,19)
rs3736309 (AQP 5)	G	A	8 (2,6)	69 (22,1)	235 (75,3)	37 (1,5)	516 (20,5)	1969 (78,1)	<b>0,027</b>	<b>1,33</b> <b>(1,03-1,72)</b>

a1 = Allel 1; a2 = Allel 2; OR = Odds Ratio; KI = Konfidenzintervall



**Abbildung 4.1** Genotypverteilung des SNP rs3736309 des AQP 5-Gens in der Patientengruppe mit mindestens klinisch möglicher Menière Diagnose (blau) und in der Kontrollgruppe (rot).

Zusätzlich wurden die Allele im dominanten und im rezessiven Modell auf Assoziation mit Morbus Menière untersucht. Ein dominantes Allel führt sowohl bei homozygoten, als auch bei heterozygoten Trägern zur Krankheitsausprägung. Wenn ein Allel rezessiv vererbt wird, sind heterozygote Träger unauffällig, da nur bei Personen, die beide Risikoallele tragen, die Erkrankung ausbricht.

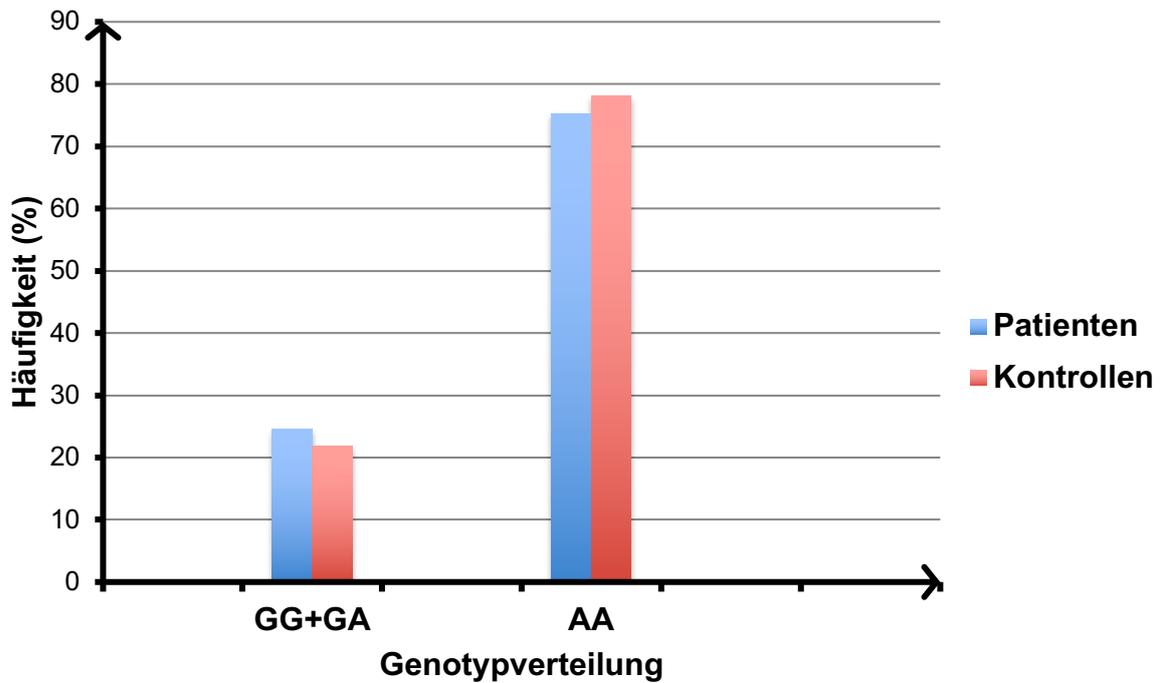
Zunächst wurden im dominanten Modell die Träger des mit niedrigerer Frequenz vorkommenden Allels 1 (homozygot Allel 1 + heterozygot Allel 1 und Allel 2) den Individuen ohne Allel 1 (homozygot Allel 2) gegenübergestellt (Tabelle 4.5).

**Tabelle 4.5** Assoziation der 4 Polymorphismen der Aquaporine 3,4 und 5 mit Morbus Menière (mindestens klinisch möglich) im dominanten Modell: Vergleich der Minorallel-Träger mit den Minorallel-Nichtträgern

SNP (Gen)	Allel		Patienten mindestens klinisch möglich		Kontrollen		p- Wert	OR (95 % KI)
	a1	a2	a1a1+a1a2 (%)	a2a2 (%)	a1a1+a1a2 (%)	a2a2 (%)		
rs591810 (AQP 3)	C	G	145 (46,8)	165 (53,2)	1295 (50,1)	1291 (49,9)	0,336	0,89 (0,69-1,13)
rs2075575 (AQP 4)	A	G	193 (66,3)	98 (33,7)	1563 (64,9)	845 (35,1)	0,791	1,04 (0,79-1,35)
rs3759129 (AQP 5)	C	A	104 (33,8)	204 (66,2)	859 (33,6)	1697 (66,4)	0,929	0,99 (0,76-1,28)
rs3736309 (AQP 5)	G	A	77 (24,7)	235 (75,3)	553 (21,9)	1969 (78,1)	<b>0,055</b>	<b>1,32</b> <b>(0,99-1,76)</b>

a1 = Allel 1; a2 = Allel 2; OR = Odds Ratio; KI = Konfidenzintervall

Es zeigte sich bei dem SNP rs3736309 des AQP 5 eine Tendenz in Richtung einer Assoziation ( $p = 0,055$ , OR = 1,32, 95 % KI = 0,99-1,76). Die Frequenz der Kombination der Genotypen (GG + GA) war in der Patientengruppe höher als in der Kontrollgruppe (24,7 % vs. 21,9 %) (Tabelle 4.5 und Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2** Genotypverteilung des SNP rs3736309 im dominanten Modell: G-Allel-Träger versus A-Allel-Homozygote bei Menière-Patienten mit mindestens klinisch möglicher Diagnose (blau) und Kontrollen (rot).

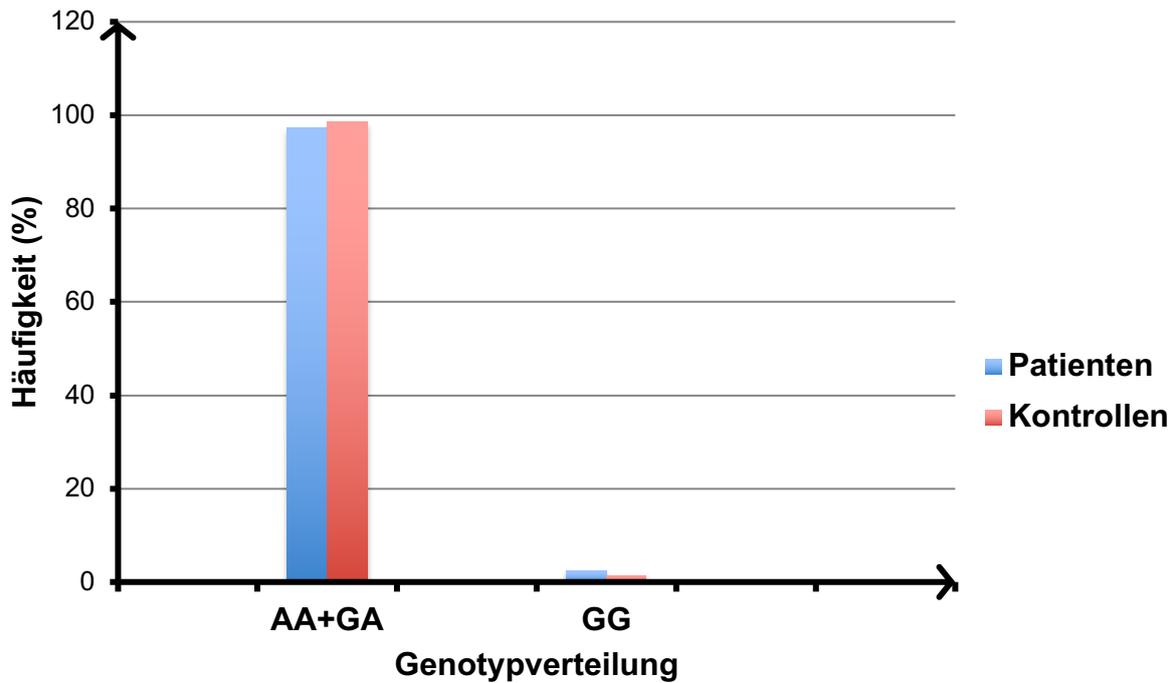
Analog zum dominanten Modell wurden im rezessiven Modell die homozygoten Träger des Minor-Allels (homozygot Allel 1) den Trägern des Major-Allels (heterozygot Allel 1 und Allel 2 und homozygot Allel 2) gegenübergestellt (Tabelle 4.6).

**Tabelle 4.6** Assoziation der 4 Polymorphismen der Aquaporingene 3,4 und 5 mit Morbus Menière (mindestens klinisch möglich) im rezessiven Modell: Vergleich der homozygoten Minorallel-Träger mit den homo- und heterozygoten Majorallel-Trägern.

SNP (Gen)	Allel		Patienten mindestens klinisch möglich		Kontrollen		p- Wert	OR (95 % KI)
	a1	a2	a1a1 (%)	a2a2+a1a2 (%)	a1a1 (%)	a2a2+a1a2 (%)		
rs591810 (AQP 3)	C	G	26 (8,4)	284 (91,6)	224 (8,7)	2362 (91,3)	0,704	0,92 (0,59-1,42)
rs2075575 (AQP 4)	A	G	51 (17,5)	240 (82,5)	415 (17,2)	1993 (82,8)	0,877	0,97 (0,70-1,36)
rs3759129 (AQP 5)	C	A	8 (2,6)	300 (97,4)	98 (3,8)	2458 (96,2)	0,308	0,68 (0,32-1,43)
rs3736309 (AQP 5)	G	A	8 (2,6)	304 (97,4)	37 (1,5)	2485 (98,5)	<b>0,079</b>	<b>2,10</b> <b>(0,92-4,82)</b>

a1 = Allel 1; a2 = Allel 2; OR = Odds Ratio; KI = Konfidenzintervall

Im rezessiven Modell zeigte sich ein Trend zur Assoziation des selteneren Allels des Markers rs3736309 des AQP 5 mit Morbus Menière ( $p = 0,079$ , OR = 2,10, 95 % KI = 0,92-4,82). Die Frequenz des Genotypen GG war in der Patientengruppe höher als in der Kontrollgruppe (2,6 % vs. 1,5 %). (Tabelle 4.6 und Abbildung 4.3)



**Abbildung 4.3** Genotypverteilung des SNP rs3736309 im rezessiven Modell: Homozygote G-Allel-Träger versus homozygote und heterozygote A-Allel-Träger bei Menière-Patienten (*mindestens klinisch möglich*) (blau) und Kontrollen (rot).

#### 4.2 Assoziationsanalyse mit mindestens klinisch wahrscheinlichem Morbus Menière

Aus dem Gesamtdatensatz mit insgesamt 323 Patienten wurden 176 Patienten mit mindestens klinisch wahrscheinlicher Menière Diagnose für die nachfolgende Assoziationsanalyse extrahiert, um eine zusammengefasste Gruppe der Diagnosekategorien klinisch gesichert, klinisch sicher und klinisch wahrscheinlich zu verwenden. Die Kontrollgruppe blieb unverändert (Tabelle 4.7).

In der Patientengruppe mit mindestens klinisch wahrscheinlicher Diagnose eines Morbus Menière lag der Altersdurchschnitt mit 59,89 Jahren über dem Altersdurchschnitt der Kontrollgruppe (47,42 Jahre). Die Altersverteilung zwischen diesen zwei Gruppen unterschied sich signifikant (Mann-Whitney-U-Test = 134939,5,  $p < 0,001$ , bei geringer Effektstärke  $r = 0,17$ ). Bei der Geschlechterverteilung ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Pearson-Chi-Quadrat = 3,411,  $p = 0,07$ ). Die Parameter Alter und Geschlecht wurden als Kovariablen in die Analyse einbezogen.

**Tabelle 4.7** Zusammensetzung der Stichprobe der Patientengruppe mit mindestens klinisch wahrscheinlichem Morbus Menière und der Kontrollgruppe

		<b>Menière Patienten mindestens klinisch wahrscheinlich</b>	<b>Kontrollen</b>
<b>N (Anzahl)</b>		176	2615
<b>Alter (Standardabweichung)</b>		59,89 (12,5)	47,42 (16,5)
<b>Geschlecht</b>	<b>Frauen</b>	82 (46,6 %)	1406 (53,8 %)
	<b>Männer</b>	94 (53,4 %)	1209 (46,2 %)

Innerhalb der Patientengruppe mit Menière Erkrankten mit mindestens klinisch wahrscheinlichem Morbus Menière lag die Genotypverteilung im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Tabelle 4.8).

**Tabelle 4.8** HWE der 4 Polymorphismen der Aquaporingene 3,4 und 5 in der Patientengruppe mit mindestens klinisch wahrscheinlichem Morbus Menière und der Kontrollgruppe

<b>SNP</b>	<b>Gen</b>	<b>Allel</b>		<b>Menière Patienten mindestens klinisch wahrscheinlich</b>		<b>Kontrollen</b>	
				<b>MAF</b>	<b>p-Wert</b>	<b>MAF</b>	<b>p-Wert</b>
rs591810	AQP 3	C	G	0,278	0,850	0,294	0,925
rs2075575	AQP 4	A	G	0,442	0,751	0,411	0,474
rs3759129	AQP 5	C	A	0,173	1,000	0,187	0,270
rs3736309	AQP 5	G	A	0,126	1,000	0,117	0,630

MAF=Minorallelfrequenz

Die Genotypverteilung beider Gruppen wurde miteinander verglichen und es wurde berechnet, ob ein signifikanter Unterschied und somit eine mögliche Assoziation einer dieser Polymorphismen mit den Patienten mit mindestens klinisch wahrscheinlicher Menière Diagnose bestand (Tabelle 4.9).

Es konnte keine signifikante Assoziation zwischen einem der vier SNPs und der Patientengruppe bestehend aus Patienten mit mindestens klinisch wahrscheinlichem Morbus Menière festgestellt werden.

**Tabelle 4.9** Assoziation der 4 Polymorphismen der Aquaporingene 3,4 und 5 mit der Patientengruppe mit mindestens klinisch wahrscheinlichem Morbus Menière

SNP (Gen)	Allel		Menière Patienten mindestens klinisch wahrscheinlich			Kontrollen			p- Wert	OR (95 % KI)
	a1	a2	a1a1 (%)	a1a2 (%)	a2a2 (%)	a1a1 (%)	a1a2 (%)	a2a2 (%)		
rs591810 (AQP 3)	C	G	14 (8,1)	68 (39,3)	91 (52,6)	224 (8,7)	1071 (41,4)	1291 (49,9)	0,571	0,93 (0,73-1,19)
rs2075575 (AQP 4)	A	G	33 (20,2)	78 (47,9)	52 (31,9)	415 (17,2)	1148 (47,7)	845 (35,1)	0,382	1,11 (0,88-1,39)
rs3759129 (AQP 5)	C	A	5 (2,9)	50 (28,9)	118 (68,2)	98 (3,8)	761 (29,8)	1697 (66,4)	0,517	0,91 (0,68-1,22)
rs3736309 (AQP 5)	G	A	2 (1,1)	40 (22,9)	133 (76,0)	37 (1,5)	516 (20,5)	1969 (78,1)	0,284	1,20 (0,86-1,68)

a1 = Allel 1; a2 = Allel 2; OR = Odds Ratio; KI = Konfidenzintervall

### 4.3 Assoziationsanalyse mit klinisch eindeutigen Morbus Menière

Eine zunehmende Diagnosesicherheit wurde durch die Reduktion der Stichprobe auf mindestens klinisch eindeutige Menière Patienten (zusammengefasste Gruppe aus Patienten mit klinisch gesicherter und klinisch sicherer Menière Diagnose) erreicht (Tabelle 4.10).

Aufgrund signifikanter Unterschiede innerhalb der Alters- und Geschlechterverteilung zwischen beiden Gruppen (Alter: Mann-Whitney-U-Test = 112850,0,  $p < 0,001$ , bei geringer Effektstärke  $r = 0,15$ ; Geschlecht: Pearson-Chi-Quadrat = 5,156,  $p = 0,02$ ) wurden die Parameter Alter und Geschlecht als Kovariablen in die Analyse einbezogen.

**Tabelle 4.10** Zusammensetzung der Patientengruppe mit klinisch eindeutigem Morbus Menière und der Kontrollgruppe

		Menière Patienten klinisch eindeutig	Kontrollen
<b>N (Anzahl)</b>		141	2615
<b>Alter (Standardabweichung)</b>		59,14 (12,4)	47,42 (16,5)
<b>Geschlecht</b>	<b>Frauen</b>	62 (44,0 %)	1406 (53,8 %)
	<b>Männer</b>	79 (56,0 %)	1209 (46,2 %)

Auch innerhalb der klinisch eindeutigen Menière Patienten lag die Genotypverteilung im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Tabelle 4.11).

**Tabelle 4.11** HWE der 4 Polymorphismen der Aquaporingene 3,4 und 5 in der Patientengruppe mit klinisch eindeutigem Morbus Menière und der Kontrollgruppe

SNP	Gen	Allel		Menière Patienten klinisch eindeutig		Kontrollen	
				MAF	p-Wert	MAF	p-Wert
rs591810	AQP 3	C	G	0,277	0,8311	0,294	0,925
rs2075575	AQP 4	A	G	0,435	1,000	0,411	0,474
rs3759129	AQP 5	C	A	0,170	1,000	0,187	0,270
rs3736309	AQP 5	G	A	0,136	1,000	0,117	0,630

MAF=Minorallelfrequenz

Es konnte keine signifikante Assoziation der Genotypverteilung der vier SNPs zwischen der Patientengruppe mit klinisch eindeutigem Morbus Menière und der Kontrollgruppe identifiziert werden (Tabelle 4.12).

**Tabelle 4.12** Assoziation der 4 Polymorphismen der Aquaporine 3, 4 und 5 mit klinisch eindeutigem Morbus Menière.

SNP (Gen)	Allel		Menière Patienten klinisch eindeutig			Kontrollen			p- Wert	OR (95 % KI)
	a1	a2	a1a1 (%)	a1a2 (%)	a2a2 (%)	a1a1 (%)	a1a2 (%)	a2a2 (%)		
rs591810 (AQP 3)	C	G	11 (7,9)	54 (38,8)	74 (53,2)	224 (8,7)	1071 (41,4)	1291 (49,9)	0,512	0,91 (0,70-1,20)
rs2075575 (AQP 4)	A	G	25 (19,1)	64 (48,9)	42 (32,1)	415 (17,2)	1148 (47,7)	845 (35,1)	0,623	1,07 (0,83-1,37)
rs3759129 (AQP 5)	C	A	4 (2,9)	39 (28,3)	95 (68,8)	98 (3,8)	761 (29,8)	1697 (66,4)	0,465	0,89 (0,64-1,23)
rs3736309 (AQP 5)	G	A	2 (1,4)	34 (24,3)	104 (74,3)	37 (1,5)	516 (20,5)	1969 (78,1)	0,150	1,3 (0,91-1,87)

a1 = Allel 1; a2 = Allel 2; OR = Odds Ratio; KI = Konfidenzintervall

#### 4.4 Assoziationsanalyse des Symptoms Schwerhörigkeit bei klinisch möglichem Morbus Menière

Innerhalb der Gruppe der klinisch möglichen Menière Patienten wurden anhand des Parameters Schwerhörigkeit zwei Untergruppen gebildet: Einerseits eine Gruppe mit Menière Erkrankten ohne Schwerhörigkeit und andererseits eine Gruppe Menière Erkrankter mit Schwerhörigkeit. Das Symptom Schwerhörigkeit wurde hierfür anamnestisch erhoben.

Aus den 147 klinisch möglichen Menière Patienten wurden 99 Personen in die Gruppe mit Schwerhörigkeit und 48 in die Gruppe ohne Schwerhörigkeit sortiert (Tabelle 4.13). In der Gruppe der Patienten mit Schwerhörigkeit lag der Altersdurchschnitt mit 62,48 Jahren über dem Altersdurchschnitt der Patientengruppe ohne Hörverlust (57,87 Jahre). Die Altersverteilung zwischen diesen zwei Gruppen unterschied sich signifikant (Mann-Whitney-U-Test = 1869,  $p = 0,04$ , bei geringer Effektstärke  $r = 0,17$ ). Bei der Geschlechterverteilung ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Pearson-Chi-Quadrat = 1,238,  $p = 0,27$ ). Die Parameter Alter und Geschlecht wurden als Kovariablen in die Analyse einbezogen

**Tabelle 4.13** Zusammensetzung der klinisch möglichen Menière Patienten mit Schwerhörigkeit und der klinisch möglichen Menière Patienten ohne Schwerhörigkeit

		Klinisch mögliche Menière - Patienten mit Schwerhörigkeit	Klinisch mögliche Menière – Patienten ohne Schwerhörigkeit
<b>N (Anzahl)</b>		99	48
<b>Alter (Standardabweichung)</b>		62,48 (14,5)	57,87 (12,7)
<b>Geschlecht</b>	<b>Frauen</b>	46 (46,5 %)	27 (56,3 %)
	<b>Männer</b>	53 (53,5 %)	21 (43,8 %)

Bei Überprüfung der Genotypverteilung zeigte sich eine leichte Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für den Polymorphismus rs3736309 des AQP 5 in der Gruppe der klinisch möglichen Menière Patienten ohne Schwerhörigkeit ( $p = 0,041$ ). Für die restlichen Genotypverteilungen innerhalb beider Subgruppen konnten keine Abweichungen festgestellt werden (Tabelle 4.14).

**Tabelle 4.14** HWE der 4 Polymorphismen der Aquaporine 3,4 und 5 in der Patientengruppe mit klinisch möglichem Morbus Menière mit und ohne Schwerhörigkeit

SNP	Gen	Allel		Klinisch mögliche Menière - Patienten mit Schwerhörigkeit		Klinisch mögliche Menière – Patienten ohne Schwerhörigkeit	
				MAF	p-Wert	MAF	p-Wert
rs591810	AQP 3	C	G	0,278	0,806	0,271	0,720
rs2075575	AQP 4	A	G	0,362	0,658	0,466	1,00
rs3759129	AQP 5	C	A	0,204	0,756	0,000	0,570
rs3736309	AQP 5	G	A	0,126	0,647	0,188	0,041

MAF=Minorallelfrequenz

Die Genotypverteilung beider Gruppen wurde miteinander verglichen und es wurde berechnet, ob ein signifikanter Unterschied und somit eine mögliche Assoziation einer dieser Polymorphismen mit anamnestisch erhobener Schwerhörigkeit besteht (Tabelle 4.15).

Es konnte keine signifikante Assoziation zwischen einem der vier SNPs und dem Parameter Schwerhörigkeit innerhalb der klinisch möglichen Menière Patienten festgestellt werden.

**Tabelle 4.15** Assoziation der 4 Polymorphismen der Aquaporingene 3, 4 und 5 mit dem Symptom Schwerhörigkeit innerhalb der Patientengruppe mit klinisch möglichem Morbus Menière

SNP (Gen)	Allel		Klinisch mögliche Menière - Patienten mit Schwerhörigkeit			Klinisch mögliche Menière – Patienten ohne Schwerhörigkeit			p- Wert	OR (KI)
	a1	a2	a1a1 (%)	a1a2 (%)	a2a2 (%)	a1a1 (%)	a1a2 (%)	a2a2 (%)		
rs591810 (AQP 3)	C	G	8 (8,1)	39 (39,4)	52 (52,5)	4 (8,3)	18 (37,5)	26 (54,2)	0,860	0,95 (0,53-1,69)
rs2075575 (AQP 4)	A	G	11 (11,7)	46 (48,9)	37 (39,4)	9 (20,5)	23 (52,3)	12 (27,3)	0,186	0,68 (0,38-1,21)
rs3759129 (AQP 5)	C	A	3 (3,1)	34 (34,7)	61 (62,2)	0 (0)	14 (29,8)	33 (70,2)	0,297	1,48 (0,71-3,1)
rs3736309 (AQP 5)	G	A	2 (2,0)	21 21,2	76 (76,8)	4 (8,3)	10 (20,8)	34 (70,8)	0,172	0,64 (0,33-1,22)

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen den vier SNPs rs591810, rs2075575, rs3759129 und rs3736309 der Aquaporingene 3, 4 und 5 und dem Auftreten der Erkrankung Morbus Menière untersucht. Hierfür wurden die Genotypverteilungen zwischen Patienten und Kontrollgruppe miteinander verglichen. Es wurde initial die gesamte Patientengruppe und anschließend Patientengruppen mit zunehmender Diagnosesicherheit betrachtet.

Die drei SNPs, rs591810 des Aquaporingens 3, rs2075575 des Aquaporingens 4 und rs3759129 des Aquaporingens 5 zeigten keine Assoziation mit der Erkrankung Morbus Menière.

Der SNP rs376309 im AQP 5-Gen zeigte im additiven Modell eine nominal signifikante Assoziation mit Morbus Menière. Der Genotyp GG trat signifikant häufiger in der gesamten Patientengruppe (2,6 %) als bei den gesunden Kontrollen (1,5 %) auf. Bei Weiterverfolgung der Assoziation unter stringenterer Diagnoseeinteilung konnte die nominal signifikante Assoziation nicht mehr beobachtet werden.

### 5.1 Diskussion der Methoden

#### Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde als Fall-Kontroll-Assoziationsstudie konzipiert. Bestimmte Stellen im Genom, nämlich vier Polymorphismen der AQP 3,4 und 5, wurden bezüglich ihrer Genotyp- und Allelverteilung bei an Morbus Menière erkrankten und nichterkrankten Personen verglichen. Es wird angenommen, dass die genetische Beteiligung an der Krankheitsentstehung komplex ist. Nicht eine einzige genetische Variante, sondern viel mehr eine Kombination, beziehungsweise Interaktion von genetischen Varianten und Umweltfaktoren scheint ursächlich zu sein (Dehghan, 2018). Das bedeutet, dass viele voneinander unabhängige Gene mit jeweils kleinem Risiko zur Krankheit beitragen könnten (Uitterlinden, 2016).

#### Ethnizität

Einen großen Einfluss auf die Aussagekraft einer Assoziationsstudie hat die ethnische Verteilung der Studienteilnehmer. Da Allel- und Genotypfrequenzen deutlich zwischen verschiedenen Populationen variieren, ist es essentiell, nur Probanden gleicher Abstammung miteinander zu vergleichen (Thomas & Witte, 2002; Tam *et al.*, 2019). In dieser Arbeit wurden sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe nur Personen kaukasischer Abstammung eingeschlossen. Um ein ethnisch homogenes Kollektiv zu erhalten, wurden zusätzlich alle Personen ausgeschlossen, deren Eltern und Großeltern nicht Kaukasier waren. Zudem beinhaltete die Qualitätskontrolle eine Prüfung auf Populationsstratifikation,

wo Ausreißer, das heißt Probanden, die nicht eindeutig einer Population zugeordnet werden konnten, ausgeschlossen wurden. Durch Wissenschaftler des internationalen HapMap Projekts und des 1000-Genome-Projekts wurde gezeigt, dass Allel- und Genotypverteilungen bei verschiedenen ethnischen Gruppen deutlich voneinander abweichen können (International HapMap, 2005; Genomes Project *et al.*, 2015). Um dies zu verdeutlichen, werden in Tabelle 5.1 für alle vier in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen die unterschiedlichen Allel- und Genotypverteilungen verschiedener Referenzpopulationen gezeigt. Die Daten für die Referenzgenome stammen aus dem Forschungsprojekt Ensembl, dessen Homepage öffentlich zugänglich und fortweilend aktualisiert und gepflegt wird (Zerbino *et al.*, 2018). Zum einen wird die genetische Heterogenität beim Vergleich der unterschiedlichen Regionen ersichtlich. Zum anderen wird deutlich, dass das in dieser Arbeit untersuchte Kontrollkollektiv eine ähnliche genetische Verteilung, wie die der europäischen Referenzpopulation aufweist. Das spricht dafür, dass die in dieser Arbeit untersuchte Population ethnisch homogen ist und deshalb diese Studie mit anderen Studien kaukasischen Ursprungs verglichen werden kann.

**Tabelle 5.1** Allel- und Genotyp-Verteilung der untersuchten SNP bei unterschiedlichen ethnischen Gruppen verglichen mit der Patienten- und Kontrollgruppe dieser Stichprobe. (Project, 2019)

<b>rs591810</b>	<b>Allel C</b>	<b>Allel G</b>	<b>Genotyp C/C</b>	<b>Genotyp C/G</b>	<b>Genotyp G/G</b>
Ensembl-AFR	21,6%	78,4%	4,8%	33,6%	61,6%
Ensembl-AMR	17,0%	83,0%	1,4%	31,1%	67,4%
Ensembl-EAS	23,7%	76,3%	6,0%	35,5%	58,5%
Ensembl-EUR	27,1%	72,9%	9,9%	34,4%	55,7%
Ensembl-SAS	38,9%	61,1%	16,0%	45,8%	38,2%
Patienten	27,6%	72,4%	8,4%	38,4%	53,2%
Kontrollen	29,4%	70,6%	8,7%	41,4%	49,9%
<b>rs2075575</b>	<b>Allel G</b>	<b>Allel A</b>	<b>Genotyp G/G</b>	<b>Genotyp A/A</b>	<b>Genotyp A/G</b>
Ensembl-AFR	94,6%	5,4%	89,7%	0,5%	9,8%
Ensembl-AMR	62,4%	37,6%	38,6%	13,8%	47,6%
Ensembl-EAS	75,3%	24,7%	56,0%	5,4%	38,7%
Ensembl-EUR	58,6%	41,4%	36,0%	18,7%	45,3%
Ensembl-SAS	68,4%	31,6%	47,6%	10,8%	41,5%
Patienten	58,1%	41,9%	33,7%	17,5%	48,8%
Kontrollen	58,9%	41,1%	35,1%	17,2%	47,7%

Tabelle 5.1 (Fortsetzung)

<b>rs3759129</b>	<b>Allel A</b>	<b>Allel C</b>	<b>Genotyp A/A</b>	<b>Genotyp A/C</b>	<b>Genotyp C/C</b>
Ensembl-AFR	95,0%	5,0%	90,2%	9,7%	0,2%
Ensembl-AMR	87,6%	12,4%	76,9%	21,3%	1,7%
Ensembl-EAS	98,3%	1,7%	96,8%	3,0%	0,2%
Ensembl-EUR	82,2%	17,8%	68,6%	27,2%	4,2%
Ensembl-SAS	93,6%	6,4%	87,5%	12,1%	0,4%
Patienten	81,8%	18,2%	66,2%	31,2%	2,6%
Kontrollen	81,3%	18,7%	66,4%	29,8%	3,8%
<b>rs3736309</b>	<b>Allel A</b>	<b>Allel G</b>	<b>Genotyp A/A</b>	<b>Genotyp A/G</b>	<b>Genotyp G/G</b>
Ensembl-AFR	99,2%	0,8%	98,3%	1,7%	0%
Ensembl-AMR	90,9%	9,1%	82,1%	17,6%	0,3%
Ensembl-EAS	67,5%	32,5%	46,2%	42,5%	11,3%
Ensembl-EUR	85,5%	14,5%	73,2%	24,7%	2,2%
Ensembl-SAS	77,5%	22,5%	60,1%	34,8%	5,1%
Patienten	86,4%	13,6%	75,3%	22,1%	2,6%
Kontrollen	88,3%	11,7%	78,1%	20,5%	1,1%

(Ensembl-AFR: afrikanische Populationsgruppe; Ensembl-AMR: amerikanische Populationsgruppe; Ensembl-EAS: ost-asiatische Populationsgruppe; Ensembl-EUR: europäische Populationsgruppe; Ensembl-SAS: süd-asiatische Populationsgruppe)

### Alter

Ein weiterer Aspekt der Qualitätssicherung ist die Beachtung der Altersstruktur beider Gruppen. Das Risiko, dass Personen der Kontrollgruppe bei Einschluss gesund sind, im Verlauf jedoch an Morbus Menière erkranken und somit bereits bei der Datenerhebung der Studie genetisch zur Patientengruppe gehören müssten, gilt es zu minimieren. Um dieses Problem komplett zu eliminieren, dürften nur Personen, welche das Prädilektionsalter von Morbus Menière bereits überschritten haben, in die Kontrollgruppe eingeschlossen werden. In unserem Kontrollkollektiv beträgt der Altersdurchschnitt 47,42 Jahre, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter von Morbus Menière zwischen 40-60 Jahren liegt (Sajjadi & Paparella, 2008; Tyrrell *et al.*, 2014; Simo *et al.*, 2015; Bruderer *et al.*, 2017). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Kontrollpersonen im Laufe ihres Lebens an Morbus Menière erkranken werden. Alternativ könnten alle Personen in der Kontrollgruppe longitudinal nachverfolgt und nachträglich ausgeschlossen werden, falls sich Menière-Symptome manifestieren würden. Dies wäre mit viel Zeitaufwand verbunden und daher nicht praktikabel. Zudem wäre aufgrund der niedrigen Krankheitsinzidenz nicht zu erwarten, dass viele Personen in der Kontrollgruppe nach Studieneinschluss an Morbus Menière erkranken, dennoch gilt dies als Schwäche der Studie.

Das Durchschnittsalter beider Gruppen sollte ähnlich ausfallen, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen herzustellen. In der Probandengruppe beträgt der Altersdurchschnitt 60,39 Jahre und in der Kontrollgruppe 47,42 Jahre, so dass, um den Unterschied zwischen den beiden Gruppen auszugleichen, das Alter als Kovariable einbezogen wurde.

### Geschlecht

Die epidemiologischen Daten zur Geschlechterverteilung bei Morbus Menière sind nicht komplett konsistent, wobei die meisten Studien eine weibliche Dominanz der Krankheitsprävalenz zeigten (Ohmen *et al.*, 2013; Tyrrell *et al.*, 2014; Simo *et al.*, 2015; Muelleman *et al.*, 2017).

Ein Ungleichgewicht in der Geschlechtsverteilung zwischen den beiden Gruppen könnte zur Verfälschung der Ergebnisse führen. In der Patientengruppe der vorliegenden Studie sind 48 % weiblich und 52 % männlich, in der Kontrollgruppe 46 % männlich und 54 % weiblich. Die Geschlechterverteilung in diesem Patientenkollektiv entspricht somit nicht der Verteilung, die aufgrund der epidemiologisch vorliegenden Daten zu erwarten wäre. Ebenso zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppenzugehörigkeit und Geschlecht. Deshalb wurde das Geschlecht als Kovariable in die Analyse miteinbezogen.

### Einschlusskriterien der Patientengruppe

Zur Diagnosestellung des Morbus Menière bedarf es neben objektivierbaren Befunden, wie Audiogramm und MRT, subjektive anamnestisch erhobene Kriterien. Dies und die vor allem in frühen Krankheitsstadien heterogene Präsentation der Symptomausprägung führen zu Schwierigkeiten bei der Diagnosestellung, weshalb Fehldiagnosen nicht ausgeschlossen werden können.

In dieser Studie wurden die Diagnosekriterien der AAO-HNS von 1995 verwendet und Patienten eingeschlossen, bei welchen die Diagnose als klinisch gesichert, sicher, wahrscheinlich oder möglich eingestuft worden ist (Foundation, 1995). Die Diagnosekriterien beinhalten unter anderem anamnestisch erhobene Symptome, wie Auftreten von Schwindelepisoden, Tinnitus und Druckgefühl (vgl. Tabelle 2.1). Vor allem in frühen Krankheitsstadien zeigen sich in der klinischen Untersuchung zwischen den Schwindelattacken oftmals keine Auffälligkeiten. Während oder direkt nach einer Schwindelepisode können Nystagmus, ein positiver Kopfpulstest oder eine Fallneigung zur betroffenen Seite hinweisend für eine vestibuläre Affektion im Rahmen eines Morbus Menière sein (Kutlubaev *et al.*, 2020). In dieser Studie wurden, um die Symptome möglichst spezifisch zu erfragen und somit die Diagnosesicherheit zu erhöhen, neben den

Informationen aus den Arztbriefen zusätzlich ein symptomorientierter ausführlicher Fragebogen bei allen Studienteilnehmern erhoben

Für die Diagnose des klinisch gesicherten, klinisch sicheren und klinisch wahrscheinlichen Morbus Menière muss zusätzlich das Kriterium sensorineuraler Hörverlust im tiefen bis mittleren Frequenzbereich erfüllt sein. Dieses Kriterium wird standardmäßig mittels Rein-Ton-Audiogramm objektiviert. Da der Hörverlust gerade in frühen Stadien oftmals nur während der Schwindelattacke besteht und anschließend in vielen Fällen komplett regredient ist, ist es nicht auszuschließen, dass sich innerhalb der Patientengruppe der Kategorie klinisch möglich Patienten befinden, die an einem passageren Hörverlust leiden, der jedoch nicht bis zum Studieneinschluss nachgewiesen werden konnte.

Für alle Patienten der Diagnosekategorie klinisch gesichert lag, wie in den verwendeten Diagnosekriterien gefordert, ein in der MRT nachgewiesener endolymphatischer Hydrops vor. Es ist zwar möglich, dass klinisch sichere Patienten erst nach Einschluss in diese Studie eine MRT mit Visualisierung eines Hydrops erhielten, sodass diese tatsächlich der Kategorie klinisch bewiesen zuzuordnen gewesen wären, für die vorliegende Assoziationsuntersuchung ist das jedoch von untergeordneter Bedeutung, da hier die Identifizierung von genetischen Risikofaktoren für die Gesamtdiagnose Morbus Menière im Vordergrund stand. Analysen mit einer genaueren Kategorisierung insbesondere auch auf Vorliegen sowie die Ausprägung eines endolymphatischen Hydrops wären zur Weiterverfolgung der Ergebnisse dieser Screeningstudie als nächste Schritte sinnvoll.

#### Stichprobengröße

Da die Krankheitsprävalenz sehr niedrig ist, ist die Stichprobenzahl vor allem in der Fallgruppe eingeschränkt. Da die Rekrutierung der Teilnehmer jedoch an einem Zentrum, nämlich dem Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum München innerhalb der LMU-Universitätsklinik Großhadern stattfand, konnten trotz geringer Krankheitsprävalenz und sorgfältiger Qualitätskontrolle 323 Patienten eingeschlossen werden.

Je kleiner die Stichprobe, desto vorsichtiger sind die Ergebnisse aufgrund von falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen zu betrachten. Im Vergleich zu den vorherigen Studien, bei welchen die Anzahlen der Menière Patienten 34 (Candreia *et al.*, 2010), 86 (Nishio *et al.*, 2013) und 93 (Arweiler-Harbeck *et al.*, 2012) betragen, wurden in der vorliegenden Studie deutlich mehr Patienten eingeschlossen und somit die statistische Unsicherheit reduziert.

#### Subgruppenanalyse

Generell zeigt sich das Krankheitsbild Morbus Menière sehr vielseitig, weshalb man auch von einem sehr heterogenen Phänotyp spricht (Gazquez *et al.*, 2012). Dies führt mit sich,

dass gerade in frühen Stadien, in denen noch nicht alle Symptome ausgeprägt sind, die Erkrankung nicht erkannt oder eine falsche Diagnose gestellt wird. Zudem gibt es eine hohe Ähnlichkeit und somit Verwechslungsgefahr mit anderen Schwindelerkrankungen, allen voran als wichtigste Differentialdiagnose die vestibuläre Migräne (Lopez *et al.*, 2015). Diese überlappt mit den Symptomen des Morbus Menière, so dass es nicht selten zu fälschlichen Menière-Diagnosen bei Patienten mit vestibulärer Migräne kommt (Lopez-Escamez *et al.*, 2014; Becker-Bense *et al.*, 2019). Mit dem Fortschreiten des Morbus Menière und Entwicklung der Schallempfindungsstörung im Tieftonbereich wird auch die Diagnosestellung sicherer (Kutlubaev *et al.*, 2020). Eine längerfristige Beobachtung der Personen in der Fallgruppe mit im Verlauf erneuter Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien und somit Re-evaluation des Studieneinschlusses könnte hier Abhilfe schaffen und die richtigen Gruppenzuordnungen verfeinern.

Letztendlich ist nicht abschließend geklärt, ob die heterogene Symptomkombination, die bei Menière beobachtet wird, aus einem gemeinsamen pathophysiologischen Weg entsteht oder ob unterschiedliche Pathomechanismen im gleichen Phänotyp münden (Phillips *et al.*, 2018). Durch die Bildung von Subgruppen könnte das Verständnis der Erkrankung und somit die Diagnose und die zielgerichteten Therapiemöglichkeiten verbessert werden (Phillips *et al.*, 2018). Das heißt, dass das Patientenkollektiv nicht mehr als Gesamtes, sondern mittels statistischer Clusteranalysen in ähnliche Phänotypen gruppiert und getrennt voneinander betrachtet wird. Frejo *et al.* und später an deren Einteilung orientierend auch Crossley *et al.* bildeten anhand spezifischer Begleitkriterien fünf Subgruppen der Menière-Patienten in einer europäischen bzw. nordamerikanischen Kohorte. Durch Klassifizierung der Patienten anhand der Parameter sporadisches Auftreten, begleitende Autoimmunerkrankung, Hörverlust, Migräne und familiäres Vorkommen kann eine verbesserte Patientenselektion für genetische und immunologische Studien erreicht werden (Frejo *et al.*, 2017; Crossley *et al.*, 2020). Die Durchführung klinischer Medikamentenstudien mit nur einzelnen Subgruppen könnten zielführende Ergebnisse bei Antihistaminika, Steroiden oder Diuretika liefern und somit zielgerichtete Therapien für die einzelnen Subgruppen ermöglichen (Crossley *et al.*, 2020). In der vorliegenden Studie wurde anhand des Parameters subjektiv empfundene Schwerhörigkeit bereits eine erste Unterteilung der klinisch möglichen Menière Patienten vorgenommen. Für zukünftige Studien wäre die Ergänzung der Daten um das Vorliegen von audiometrisch festgestellten Graden der Schwerhörigkeit, autoimmunologischer Begleiterkrankungen, Familienanamnese und Migränestatus erstrebenswert.

#### Standortvariabilität

Ein weiterer Punkt, der die Stör- und Fehleranfälligkeit bei dieser Studie erhöhen könnte, ist die Tatsache, dass die verschiedenen methodischen Schritte an unterschiedlichen Orten bearbeitet wurden. So wurden an mehreren Standorten Blutproben von Probanden

gewonnen, Fragebögen erhoben sowie die DNA isoliert. Zur Genotypisierung mittels Microarrays wurden die bearbeiteten Proben an verschiedene Standorte geschickt und die Genotypisierungen wurden anhand verschiedener Plattformen durchgeführt.

Die hohe Datenmenge der Biodatenbank erforderte das Mitwirken mehrerer Standorte und deren Fachpersonal. Um methodische Bias zu minimieren, wurde die Diagnose von erfahrenen Ärzten gestellt, die Datenerhebung standardisiert und das Laborverfahren durch geschultes Personal durchgeführt. Klare Ablaufregeln und Richtlinien sowie eine sehr gute Kommunikation zwischen den verschiedenen Standorten waren zur Qualitätssicherung notwendig.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

Epidemiologische Daten, wie familiäre Häufung, geografische und ethnische Unterschiede in den Prävalenzen, sowie Dominanz des weiblichen Geschlechts deuten auf eine genetische Rolle in der Krankheitsentstehung hin (Chiarella *et al.*, 2015). Die pathophysiologische Theorie des endolymphatischen Hydrops ist weit verbreitet und allgemein anerkannt, auch wenn die zugrundeliegende Ätiopathogenese noch nicht verstanden ist. Es wird davon ausgegangen, dass eine Kombination aus genetischen und Umweltfaktoren diesen begünstigt (Frejo *et al.*, 2016a).

Ein funktionierender Mechanismus der Wasser- und Ionenhomöostase ist notwendig, damit keine extremen Volumenverschiebungen, wie beim endolymphatischen Hydrops, entstehen. Aus diesem Grund scheint es plausibel, dass fehlfunktionierende Wasser- und Ionenkanäle, die für den Wasseraustausch und die Ionenhomöostase zwischen Endo- und Perilymphe notwendig sind, bei der Krankheitsentstehung eine große Rolle spielen könnten. Seit Entdeckung der Aquaporine im Innenohr (Kakigi *et al.*, 2009; Hirt *et al.*, 2010; Maekawa *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2019) und seit Studien an anderen Organen zeigten, dass Mutationen in diesen Kanälen zu Krankheiten führen können, rückten genetische Untersuchungen der AQP-Gene bei Menière-Patienten in den Fokus mehrerer Forschungsgruppen. Die Ergebnisse der bisherigen Studien sind jedoch inkonsistent.

In dieser Arbeit wurden vier Polymorphismen der Aquaporingene 3, 4 und 5 untersucht. Der Marker rs591810 liegt als einziger in einem Exon (Exon 1 des AQP 3, Chromosom 9). Ein Marker liegt in einem Intron (rs3736309 ist auf Intron 3, AQP 5) und zwei Marker liegen im 5'-Genbereich (SNP rs2075575 des AQP 4 und SNP rs3759129 des AQP 5).

### rs3736309

Der SNP rs3736309 (AQP 5) zeigte in dieser Studie eine nominal signifikante Assoziation mit Morbus Menière. Das G-Allel trat signifikant häufiger bei den mindestens klinisch möglichen Patienten als in der Kontrollgruppe auf. Erhöhte Odds Ratios (OR) zeigten sich sowohl im additiven als auch im dominanten und im rezessiven Modell (additives Modell:  $p = 0,027$ ,

OR = 1,33, 95 % KI = 1,03-1,72, dominantes Modell:  $p = 0,055$ , OR = 1,32, 95 % KI = 0,99-1,76, rezessives Modell:  $p = 0,079$ , OR = 2,10, 95 % KI = 0,92-4,82). Die Ergebnisse dieser Studie könnten darauf hindeuten, dass das G-Allel mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Morbus Menière einhergehen könnte. Bei Weiterverfolgung der Assoziation unter strengeren Diagnosekategorien, das heißt bei ausschließlicher Betrachtung der Patienten mit mindestens den Diagnosekategorien klinisch wahrscheinlich oder klinisch eindeutig, konnte die Assoziation allerdings nicht mehr nachgewiesen werden. Dies könnte entweder daran liegen, dass die Assoziation zu der Variation im AQP 5 eine eher untergeordnete Rolle spielt oder daran, dass eine statistische Signifikanz aufgrund der kleineren Stichprobe nicht mehr nachweisbar ist.

In einer vorgängigen Studie wurde bei 86 Menière-Patienten und 2136 Kontrollprobanden ebenfalls der Zusammenhang des SNP rs3736309 und Morbus Menière untersucht (Nishio *et al.*, 2013). In deren aus Japan stammender Studie wurde ein signifikantes Ergebnis gefunden. Die Forschungsgruppe um Nishio postulierte einen protektiven Effekt des G-Allels im Zusammenhang mit der Erkrankungswahrscheinlichkeit bei Morbus Menière (Nishio *et al.*, 2013). Die Patientengruppe bestand aus 86 Personen aus der Region Nagoya (Japan), welche nach den Diagnosekriterien der AAO-HNS einen klinisch sicheren, wahrscheinlichen oder möglichen Morbus Menière aufwiesen.

Es zeigte sich, dass die Ergebnisse dieser Studie und die von Nishios Arbeitsgruppe konträr sind. Bei Vergleich beider Stichproben fällt auf, dass die Studien gleiche Diagnosekriterien verwendeten und Patienten mit klinisch sicherem, wahrscheinlichem und möglichem Morbus Menière einschlossen. Unterschiede zeigten sich jedoch in der Stichprobengröße und der Ethnie der Probanden. Während in der vorliegenden Studie ausschließlich Kaukasier eingeschlossen wurden, waren es bei Nishio *et al.* vorwiegend asiatische Personen. Dies könnte eine Ursache der unterschiedlichen Ergebnislage sein.

Ein weiterer Grund der konträren Ergebnisse könnte sich im Flip-Flop-Phänomen begründen. Das Flip-Flop-Phänomen bezeichnet die Replikation einer zuvor berichteten Assoziation zwischen Krankheit und Marker jedoch mit dem umgekehrten Risikoallel (Lin *et al.*, 2007). Dies bedeutet jedoch nicht zwingend eine Widerlegung der früheren Assoziationsergebnisse. Sogar wurde postuliert, dass diese Assoziationen in der Tat Bestätigungen der vorherigen Ergebnisse sein könnten, dass aber Multilokus-Effekte und Variationen in den Interlokus-Korrelationen zu diesem Flip-Flop-Phänomen beitragen (Lin *et al.*, 2007). Bezogen auf diese Studie bedeutet dies, dass die Ergebnisse der vorherigen Studie von Nishio *et al.* durch diese Ergebnisse bekräftigt werden und somit der Hinweis für eine mögliche Assoziation zwischen rs3736309 (AQP 5) und Morbus Menière unterstützt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen also, dass das G-Allel mit der Erkrankung Morbus Menière assoziiert sein könnte. Der fehlende Assoziationsnachweis in Betrachtung der Patientengruppe mit stringenteren Diagnosekategorien weist jedoch darauf hin, dass es sich um einen eher untergeordneten Effekt handeln muss, wobei auch ein falsch positives Ergebnis nicht ausgeschlossen werden kann. In Zusammenschau mit der Vergleichsstudie von Nishio et al. kann gesagt werden, dass eine Involvierung im Mechanismus möglich, jedoch die Datenlage aktuell nicht konsistent ist. Weitere Assoziationsstudien mit diesem SNP sowie funktionelle Untersuchungen sind notwendig.

Nach Feststellung der Assoziation gilt es zu erörtern, inwieweit die statistisch berechnete Assoziation klinische Relevanz haben könnte. Der Polymorphismus rs376309 liegt im dritten Intron des AQP 5 Gens. Mutationen im nicht kodierenden Bereich haben keinen direkten Einfluss auf die Aminosäuresequenz bzw. die Proteinstruktur. Das heißt jedoch nicht, dass diese Assoziation bedeutungslos ist. Etwa 90 % der mit Erkrankungen assoziierten Polymorphismen liegen im nicht kodierenden Bereich. Oft liegen diese Polymorphismen in Bereichen, in denen sie potentiell die Genexpression beeinflussen können, also beispielsweise die Transkription, das Spleißen, oder die mRNA-Stabilität (Ku *et al.*, 2010; Gallagher & Chen-Plotkin, 2018). Auch durch den Polymorphismus rs3736309 könnte über veränderte Regulierungsmechanismen die Genexpression der AQP 5 Kanäle, die Kanaldurchlässigkeit oder die Anpassungsfähigkeit bei Osmolaritätsschwankungen beeinflusst werden. Möglich wäre außerdem, dass der Polymorphismus selbst keinen direkten Einfluss auf die Erkrankung hat, sondern dass eine Variante, welche mit dem Polymorphismus im Linkage Disequilibrium liegt, funktionelle Relevanz hat.

Bisherige molekularbiologische Studien stützen die Hypothese, dass AQP 5 in der Krankheitsentstehung des Morbus Menière involviert ist. Im Bereich des Innenohrs wurde sowohl in einigen Tierspezies, aber auch in humanem Gewebe AQP 5 immunhistochemisch in den äußeren Sulcuszellen der Cochlea nachgewiesen. Interessanterweise wird AQP 5 nur im oberen Viertel, dem Apex, der Cochlea exprimiert (Hirt *et al.*, 2010), was genau der Ort ist, wo die Wahrnehmung und Verarbeitung tiefer Töne stattfindet (Bekeasy, 1952a; Hudspeth, 1989; Muller *et al.*, 2005). Auf subzellulärer Ebene zeigte sich, dass AQP 5 ausschließlich auf der apikalen Membran der äußeren Sulcuszellen exprimiert ist (Hirt *et al.*, 2010). Die äußeren Sulcuszellen gehören zu den Stützzellen der Cochlea und sind am Apex an der Bildung der epithelialen Endolymph-Perilymph-Schranke beteiligt. Die apikale Zellmembran ist an dieser Stelle in direktem Kontakt mit der Endolymph und dem Lumen des Ductus cochlearis (Eckhard *et al.*, 2012). Bereits in anderen Epithelien wurde AQP 5 an den apikalen Membranen nachgewiesen. Bei diesen sekretorisch aktiven Epithelien wurde beobachtet, dass das Wasser über die AQP 5 Kanäle der apikalen Membranen direkt in die

Lumen, wie beispielsweise in das alveolare Lumen der Lunge oder die Gänge der Speichel-, Tränen- und Schweißdrüsen, sezerniert wurde (Nielsen *et al.*, 1997).

Komplementär zur AQP 5 Expression wurde AQP 4 jeweils auf der basolateralen Membran der äußeren Sulcuszellen nachgewiesen (Hirt *et al.*, 2010). Durch dieses spezielle Verteilungsmuster liegt die Vermutung nahe, dass an dieser Stelle ein perilymphatisch-endolymphatischer transzellulärer Wasser-Shunt liegt, der für das Volumengleichgewicht und die Ionenhomöostase der beiden Flüssigkeiten mitverantwortlich ist.

Bei Untersuchungen dieses potentiellen Wassershunts in der Cochlea von Mäusen und Menschen wurde heraus gefunden, dass bei Osmolaritätsschwankungen über diesen Shunt Ausgleichsflüsse zwischen den beiden Kompartimenten Endo- und Perilymphe stattfinden (Eckhard *et al.*, 2015). Wenn die Perilymphe hypoton ist, fließt Wasser, getrieben durch den osmotischen Gradienten, von der Perilymphe in die Endolympe, was in experimentellen Studien eine Volumenzunahme des Ductus cochlearis sowie teilweise eine Beschädigung der äußeren Sulcuszellen mit sich führte (Eckhard *et al.*, 2015). Die experimentellen Studien weisen also darauf hin, dass AQP 5 Teil eines Wassershunts zu sein scheint, welcher als Ausgleichflusssystem bei Volumen- oder Osmolaritätsschwankungen fungiert. Genetische Varianten im AQP 5 könnten auf dieses Flusssystem Einfluss haben und über fehlende Kompensationsmechanismen zu vermehrtem Volumen im Ductus cochlearis führen. Da AQP 5 nur im Apex der Cochlea nachgewiesen werden konnte und der Apex der Ort ist, wo die Tieftonverarbeitung stattfindet, welche bei Morbus Menière typischerweise beeinträchtigt ist, könnten Fehlfunktionen im AQP 5 mit der Erkrankung assoziiert sein.

#### rs3759129

Bei rs3759129, dem anderen untersuchten SNP des Aquaporinen 5, zeigte sich in unserer Stichprobe keine Assoziation mit Morbus Menière. Neben unserer Studie befassten sich bereits Arweiler und Harbeck mit diesem Polymorphismus des AQP 5 Gens und Morbus Menière und untersuchten hierfür 102 Patienten- und 292 Kontrollpersonen. In deren Studie konnte zwar in der Genotypverteilung zwischen den beiden Gruppen, Menière-Patienten und Kontrollprobanden, kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, bei Betrachtung der Subgruppen zeigte sich allerdings, dass in der Gruppe familiärer Morbus Menière der CC-Genotyp überzufällig häufig vertreten war. Die Forschungsgruppe bezweifelte jedoch eine wahre Assoziation, da sich weder für das A-Allel noch das C-Allel eine Assoziation mit familiärem Morbus Menière zeigte. (Arweiler-Harbeck *et al.*, 2012)

Der SNP rs3759129 liegt in der Promoterregion des AQP 5 Gens. Es konnte gezeigt werden, dass an dieser Stelle der Polymorphismus, also die Substitution von A durch C, zu einer reduzierten Expression von AQP 5 in unterschiedlichen Geweben führt (Adamzik *et al.*, 2008). Mehrere Forschungsgruppen befassten sich mit dem Genpromoter und konnten

mehrheitlich einen protektiven Effekt des C-Allels aufzeigen. Eine Studie, welche sich mit der 30-Tages-Überlebensrate bei Patienten mit schwerer Sepsis befasste, konnte eine signifikant erhöhte Überlebenschance bei Personen mit den AC/CC-Genotypen im Vergleich zu Personen mit dem Wildtyp (Genotyp AA) feststellen (Adamzik *et al.*, 2011). In einer Studie, welche sich Patienten bei akutem Lungenversagen (*Acute Respiratory Distress Syndrom, ARDS*) widmete, wurde bei den Probanden mit AC/CC-Genotypen eine verminderte Entzündungsaktivität im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe (Genotyp AA) festgestellt. Die vermindert ausgeprägte Entzündungsreaktion der C-Allelträger ging mit einer signifikant höheren 30-Tages-Überlebensrate dieser einher (Rahmel *et al.*, 2019b). Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der Untersuchung von ARDS-Patienten als auch bei der Untersuchung von septischen Patienten jeweils die Probanden mit AC/CC-Genotypen weniger häufig akutes Nierenversagen entwickelten als die Patienten mit dem Wildtyp (Genotyp AA) (Rahmel *et al.*, 2018; Bergmann *et al.*, 2020).

Die oben genannten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die protektive Wirkung einhergehend mit der reduzierten Entzündungsaktivität bei C-Allelträgern durch veränderte immunmodulatorische Mechanismen verursacht wird. Die genaue Interaktion von AQP 5 und dem Immunsystem ist allerdings noch nicht erforscht.

In einer experimentellen Studie wurde gezeigt, dass AQP 5 Knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf diverse Stimuli eine reduzierte Migration der neutrophilen Granulozyten aufwiesen (Rump *et al.*, 2016; Rump & Adamzik, 2018). Dies deckt sich mit den Ergebnissen klinischer Studien, welche bei C-Allelträgern eine verringerte AQP 5 Expression sowie eine reduzierte Migration der neutrophilen Granulozyten beschrieben (Adamzik *et al.*, 2008).

Die abgeschwächte Immunantwort scheint sich in einigen Fällen, wie bei den obig vorgestellten Studien bei Sepsis und ARDS positiv auf das Outcome auszuwirken. Als Ursache für ein schlechteres Outcome in der Wildtyp-Gruppe im Vergleich zur Gruppe der C-Allelträger wird eine überschießende Immunreaktion vermutet, durch welche es zu einer Schädigung des körpereigenen Gewebes kommt.

Konträr zu den bereits vorgestellten Studien wurde bei der Untersuchung des Infektionsrisikos mit dem Cytomegalievirus (*CMV*) bei nierentransplantierten Patienten ein besseres Outcome der Wildtyp-Gruppe beobachtet. Es zeigte sich eine verringerte Infektionsrate bei Wildtyp-Trägern (Rahmel *et al.*, 2019a). Das scheinbar widersprüchliche Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass Patienten nach einer Nierentransplantation immunsupprimiert sind und von einer Aktivierung des Immunsystems profitieren. Eine verstärkte Einwanderung von Immunzellen bedeutet auch eine erhöhte Eradikation der Pathogene, in diesem Fall der CMV-Viren (Rahmel *et al.*, 2019a).

Da bisher in keiner Studie eine Assoziation des Polymorphismus rs3759129 des AQP 5-Gen und Morbus Menière publiziert wurde, gibt es aktuell keine Hinweise dafür, dass der Polymorphismus in der Krankheitsentstehung des Morbus Menière eine Rolle spielt. In den bisherigen Studien wurden allerdings kleine Fallzahlen untersucht, was ursächlich für eine fehlende statistische Assoziation sein könnte und somit eine Involvierung des Polymorphismus in die Krankheitsentstehung nicht ausschließt. Aufgrund der vorgestellten Ergebnisse aus anderen medizinischen Bereichen, wäre sowohl eine Assoziation von Morbus Menière mit dem Wildtyp (Genotyp AA), als auch mit dem C-Allel (AC/CC-Genotypen) denkbar. Im Folgenden werden die zwei hypothetischen Zusammenhänge im Fall einer zukünftigen Assoziation vorgestellt.

Da auch bei Morbus Menière die Immunhypothese diskutiert wird, ist es trotz bisher nicht festgestellter Assoziation denkbar, dass der endolymphatische Hydrops durch eine überschießende Immunreaktion entsteht. In diesem Fall müsste sich eine Assoziation der Erkrankung mit der Wildtyp-Gruppe (Genotyp AA) zeigen.

Wenn sich in den zukünftigen Assoziationsstudien jedoch herausstellt, dass die C-Allelträger mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen, könnte dies bedeuten, dass eine reduzierte Immunantwort zum endolymphatischen Hydrops und somit zu Morbus Menière führt. Dies würde den Rückschluss zulassen, dass die Entstehung des endolymphatischen Hydrops auf eine ungenügende Eradikation von Pathogenen, wie beispielsweise Viren, zurückzuführen wäre. Zu dieser Hypothese würde die in der Metaanalyse von Dean *et al.* postulierte Assoziation von CMV und Morbus Menière passen (Dean *et al.*, 2019). Wenn man davon ausgeht, dass unter anderem eine Infektion mit Herpesviren, wie beispielsweise den CMV, für die Krankheitsentstehung ursächlich ist, wäre es durchaus denkbar, dass – ähnlich wie bei der Studie der nierentransplantierten Patienten – vor allem die C-Allelträger aufgrund der abgeschwächten Immunantwort anfällig für die Entwicklung des Morbus Menière wären. Das überzufällig häufige Auftreten des CC-Genotyps in der Gruppe familiärer Menière-Patienten in der Studie von Arweiler-Harbeck (Arweiler-Harbeck *et al.*, 2012) könnte durch diesen pathophysiologischen Pfad erklärt werden.

#### rs591810

Rs591810 liegt im ersten Exon des AQP 3 und somit im kodierenden Bereich. Bei diesem Polymorphismus kommt es zur Substitution von G durch C. Da es sich bei dem Basentausch allerdings um die 3. Stelle des Triplets handelt und sowohl CTG als auch CTC die Aminosäure Leucin kodieren, kommt es zu keinem Aminosäuretausch und somit zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz. Ein Einfluss auf die Erkrankung wäre trotzdem über einen zweiten Polymorphismus, welcher mit diesem Polymorphismus im Linkage Disequilibrium liegt und funktionelle Relevanz hat, möglich.

In dieser Studie zeigte sich keine Assoziation des Polymorphismus rs591810 des AQP 3 und Morbus Menière.

In der Studie von Candreia et al. wurden Polymorphismen der kodierenden Regionen der AQP 1-4 untersucht und hierbei beim Polymorphismus rs591810 eine Auffälligkeit gefunden. 11 der 34 untersuchten Menière Patienten trugen an dieser Stelle homozygot das C-Allel, wobei keiner der 100 Kontrollpersonen das C-Allel trug (Candreia *et al.*, 2010). Eine statistisch signifikante Assoziation wurde hierfür bei sehr kleiner Fallzahl zwar nicht beschrieben, dennoch wurde durch die Studiengruppe rs591810 als potentielles Kandidatengen titulierte.

In einer brasilianischen Studie wurde neben Prüfung der Polymorphismen des AQP 2 und des KCNE1 ebenfalls der Polymorphismus rs591810 des AQP 3 auf Assoziationen getestet. Hierfür wurden 30 Patienten mit definitivem Morbus Menière und 30 gesunde Kontrollprobanden untersucht. Es konnte bei diesem Polymorphismus allerdings kein signifikanter Unterschied in der Genotyp- und Allelverteilung zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe beobachtet werden (Lopes Kde *et al.*, 2016).

Auch wenn bisher genetische Studien keine signifikanten Ergebnisse publizierten stützen funktionelle Studien die Hypothese, dass AQP 3 in der Krankheitsentstehung des Morbus Menière involviert sein könnte. AQP 3 konnte sowohl in Zellen der Endolymph-Sekretion als auch der Endolymph-Reabsorption nachgewiesen werden (Nevoux *et al.*, 2015). Zudem wurde bei Mäusen ein Anstieg der AQP 3 Expression nach intraperitonealer Applikation von Dexamethason festgestellt (Nevoux *et al.*, 2015). Die AQP 3 Hochregulation durch Dexamethason wurde auch in humanen Zellen des Utriculus gezeigt. Die Forschungsgruppe um Nevoux ging davon aus, dass Glukokortikoide die AQP 3 Genexpression mittels Stimulation der Transkription regulieren (Nevoux *et al.*, 2015). Therapeutisch werden Steroide bei Menière-Patienten entweder oral verabreicht oder intratympanal injiziert, da damit Frequenz und Schweregrad der Schwindelattacken bei steroidsensitiven Patienten nachweislich reduziert werden können (Phillips & Westerberg, 2011; Kutlubaev *et al.*, 2020). Auf pathophysiologischer Ebene wird davon ausgegangen, dass Glukokortikoide die Wasserreabsorption über die AQP 3-Kanäle von der Endolymph zur Perilymphe stimulieren und somit eine Volumenreduktion des Hydrops erwirken (Nevoux *et al.*, 2015).

Diese Ergebnisse sprechen für eine mögliche Involvierung des AQP 3 in der Krankheitsentstehung des Morbus Menière, weshalb weitere Assoziationsstudien mit weiteren Polymorphismen des AQP 3 Gens in größeren Stichproben folgen sollten.

#### rs2075575

In dieser Studie wurde keine Assoziation des SNP rs2075575 (AQP 4) und Morbus Menière festgestellt. Nishio et al. untersuchten den Polymorphismus rs2075575 bei 86 Menière-

Patienten und 2136 Kontrollprobanden, fanden aber ebenso keine Assoziation. Bei der Untersuchung, ob der Polymorphismus mit Hörverlust assoziiert ist, zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied (Nishio *et al.*, 2013).

Genetische Studien anderer Krankheiten sowie die molekularbiologischen Eigenschaften des Aquaporin 4 lassen eine Involvierung dieses Polymorphismus und des Aquaporin 4 in der Ätiopathogenese des Morbus Menière trotz der bis dato negativen Studienlage als möglich erscheinen.

Bei genetischen Untersuchungen von Opfern des plötzlichen Kindstods (*Sudden Infant Death Syndrome, SIDS*) zeigte sich eine Assoziation des T-Allels des SNP rs2075575 (AQP 4) und SIDS (Opdal *et al.*, 2010). Im zentralen Nervensystem ist aus der Aquaporin-Gruppe vor allem das AQP 4 vertreten. Immunhistochemische Studien zeigten dessen Expression in der Blut-Hirn-Schranke und der Liquor-Hirn-Schranke (Amiry-Moghaddam & Ottersen, 2003). Opdal *et al.* vermuteten nach Feststellung der positiven Assoziation, dass die T-Allelträger zur Ausbildung eines SIDS genetisch prädisponiert sind. Pathophysiologisch erklärten sie dies damit, dass eine Dysregulation der AQP 4-Expression zu einem erhöhten Wasserfluss in das Hirngewebe und somit Ausbildung eines Hirnödems führe, was schließlich zusammen mit weiteren Risikofaktoren einen plötzlichen Kindstod zur Folge haben könnte (Opdal *et al.*, 2010).

Eine weitere Forschungsgruppe befasste sich mit der Genetik von Patienten mit Neuromyelitis optica (*NMO*), einer chronisch entzündlichen Erkrankung, welche mit Optikusneuritiden und Myelitis einhergeht. Es wurde eine statistisch signifikante Assoziation des T-Allels des rs2075575 (AQP 4) und dem Auftreten der Erkrankung publiziert. Auf pathophysiologischer Ebene wurde auch hier eine Dysregulation des Wasserhaushalts vermutet, welche zu einer Schädigung der Astrozyten führt (Ogasawara *et al.*, 2016).

Sowohl beim plötzlichen Kindstod als auch bei der Neuromyelitis optica gibt es Hinweise für eine genetische Beteiligung des Polymorphismus des AQP 4. Bei beiden Krankheitsentitäten wird durch genetische Prädisposition eine veränderte AQP 4-Expression vermutet, die zu einer veränderten Wasserhomöostase und dies wiederum zu einer Schädigung der Astrozyten bzw. Ausbildung eines Hirnödems führt.

Obwohl bei Morbus Menière bisher keine Assoziation mit rs2075575 beschrieben wurde, scheint das Aquaporin 4 Gen ein sehr vielversprechendes Kandidatengen der Erkrankung zu sein. Bereits die verminderte Hörleistung bei AQP 4 Knockout-Mäusen lässt eine Involvierung des Wasserkanals in die Krankheitsentstehung vermuten (Li & Verkman, 2001; Mhatre *et al.*, 2002). Ebenso die verminderte Expression von AQP 4 in den basalen Stützzellen des Utriculus bei Menière-Patienten gibt Hinweise auf einen Zusammenhang mit

der Erkrankung (Ishiyama *et al.*, 2010). Eine fehlregulierte Wasserhomöostase, ausgelöst durch eine veränderte Anzahl der Wasserkanäle und somit die Entstehung des Hydrops, scheint möglich und plausibel, ist aber aufgrund der bisher negativen Studienlage rein hypothetisch. Nachdem Ergebnisse aus bisherigen Assoziationsstudien insbesondere aufgrund der geringen Stichprobenzahlen unter Vorbehalt zu bewerten sind, könnte durch eine starke Vergrößerung der Stichproben und Erweiterung der untersuchten Varianten Klarheit in Hinblick auf eine genetische Beteiligung des Gens an der Suszeptibilität für Morbus Menière geschaffen werden.

### 5.3 Ausblick

In dieser Studie fanden sich Hinweise dafür, dass das Aquaporin 5 in der Krankheitsentstehung von Morbus Menière involviert sein könnte. Bereits in einer früheren Studie wurde für den Polymorphismus rs3736309 dieses Gens eine Assoziation beschrieben, allerdings zeigte sich dort das konträre Allel mit der Erkrankung assoziiert (Nishio *et al.*, 2013). Um die Hypothese einer Involvierung des AQP 5 in der Krankheitsentstehung des Morbus Menière zu verifizieren oder zu falsifizieren, sind zukünftig Replikationsstudien, welche die gleichen Assoziationen in einer unabhängigen Stichprobe im gleichen Studienaufbau sowie gleicher ethnischer Herkunft prüfen, notwendig. Zudem sind größere Stichproben nötig. Erst nach Bestätigung der Assoziation in Stichproben gleicher ethnischer Herkunft mit größeren Fallzahlen ist es sinnvoll, in anderen ethnischen Gruppen nach der selben Assoziation zu suchen (Dehghan, 2018). Auch für die anderen drei Polymorphismen der AQP 3, 4 und 5 erscheint es indiziert, erneute genetische Assoziationsstudien durchzuführen. Auch wenn in dieser Studie keine signifikanten Assoziationen gefunden wurden, gibt es viele Hinweise funktioneller Studien auf Involvierung dieser Gene in der Krankheitsentstehung von Morbus Menière.

Durch neue Sequenzierungstechnologien werden weitere Fortschritte für genetische Assoziationsstudien erwartet, da durch die Informationen der Sequenzierungen Referenzpanels präziser werden und somit die Qualität der Imputationen, vor allem für niedrig frequentierte Varianten, verbessert wird (Dehghan, 2018). Auch die Entdeckung neuer genetischer Varianten wird durch die neuen Sequenzierungstechnologien, wie Whole-Genome-Sequencing Arrays erwartet (Ku *et al.*, 2010; Tam *et al.*, 2019).

Neben der Möglichkeit über Sequenzierungstechniken neue Polymorphismen aufzudecken, wurden Algorithmen entwickelt, um den Kreis von Biomarkern auszuweiten. Ausgehend von bekannten mit Morbus Menière assoziierten Markern können anhand eines entwickelten Algorithmus neue Polymorphismen gesucht werden (Li *et al.*, 2017).

Eine größere Bedeutung sollte zukünftig auch der Bildung von Subgruppen des Morbus Menière zukommen. Eine Untergliederung in Endophänotypen könnte gerade bei dieser sehr heterogenen Erkrankung zum genaueren Verständnis der Pathophysiologie und zu personalisierter Therapie beitragen. Die Gruppen könnten wie in den bereits publizierten Studien anhand der Parameter sporadisches Auftreten, begleitende Autoimmunerkrankung, Hörverlust, Migräne und familiäres Vorkommen gebildet werden (Frejo *et al.*, 2017; Phillips *et al.*, 2018; Crossley *et al.*, 2020). Durch differenziertere Betrachtung könnte das Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge im Innenohr gesteigert werden, zielgerichtete Therapie entwickelt und dadurch eine verbesserte Symptomkontrolle mit positiven Auswirkungen auf Alltagsfunktionen und Arbeitsfähigkeit erreicht werden.

In einigen ethnischen Gruppen (z.B. Lateinamerikaner, Araber oder Südasiaten) sind bisher keine genetische Assoziationsstudien zur Identifikation von Markern für Morbus Menière durchgeführt worden. In diesen Gruppen ist die Erkrankung zwar deutlich seltener als bei Kaukasiern, aber dennoch könnten durch große Assoziationsstudien ethniespezifische Risikomarker aufgedeckt werden.

Durch Replikation oder Falsifikation der in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen und Identifikation weiterer Biomarker könnten in Zukunft genetische Hochrisikopatienten detektiert werden. Durch präventive Maßnahmen oder Diagnosestellungen in frühen Stadien könnten Krankheitsausbrüche verhindert und kurative Behandlungsansätze möglich werden. Zielgerichtete Medikation, welche direkt am Targetprotein ansetzt und somit das Nebenwirkungsprofil minimiert, wäre auf pharmakologischer Ebene erstrebenswert.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adamzik, M., Frey, U.H., Bitzer, K., Jakob, H., Baba, H.A., Schmieder, R.E., Schneider, M.P., Heusch, G., Peters, J. & Siffert, W. (2008) A novel-1364A/C aquaporin 5 gene promoter polymorphism influences the responses to salt loading of the renin-angiotensin-aldosterone system and of blood pressure in young healthy men. *Basic Res Cardiol*, **103**, 598-610.
- Adamzik, M., Frey, U.H., Mohlenkamp, S., Scherag, A., Waydhas, C., Marggraf, G., Dammann, M., Steinmann, J., Siffert, W. & Peters, J. (2011) Aquaporin 5 gene promoter--1364A/C polymorphism associated with 30-day survival in severe sepsis. *Anesthesiology*, **114**, 912-917.
- Adrion, C., Fischer, C.S., Wagner, J., Gürkov, R., Mansmann, U. & Strupp, M. (2016) 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*.
- Agre, P., King, L.S., Yasui, M., Guggino, W.B., Ottersen, O.P., Fujiyoshi, Y., Engel, A. & Nielsen, S. (2002) Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine. *The Journal of Physiology*, **542**, 3-16.
- Alonso, J.E., Ishiyama, G.P., Fujiwara, R.J.T., Pham, N., Ledbetter, L. & Ishiyama, A. (2021) Cochlear Meniere's: A Distinct Clinical Entity With Isolated Cochlear Hydrops on High-Resolution MRI? *Front Surg*, **8**, 680260.
- Amiry-Moghaddam, M. & Ottersen, O.P. (2003) The molecular basis of water transport in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, **4**, 991-1001.
- Anderson, C.A., Pettersson, F.H., Clarke, G.M., Cardon, L.R., Morris, A.P. & Zondervan, K.T. (2010) Data quality control in genetic case-control association studies. *Nat Protoc*, **5**, 1564-1573.
- Arweiler-Harbeck, D., Saidi, F., Lang, S., Peters, J., Siffert, W. & Adamzik, M. (2012) The -1364A/C Aquaporin 5 Gene Promoter Polymorphism Is Not Associated with Meniere's Disease. *ISRN Otolaryngol*, **2012**, 706896.
- Atkinson, M. (1961) The Famous Four and the Critical Commentary. *Acta Oto-Laryngologica*, **53**, 14-65.
- Becker-Bense, S., Wittmann, C. & Dieterich, M. (2019) Balanced sex distribution in patients with Meniere's disease. *J Neurol*, **266**, 42-46.
- Beitz, E., Gollmack, A., Rothert, M. & von Bulow, J. (2015) Challenges and achievements in the therapeutic modulation of aquaporin functionality. *Pharmacol Ther*, **155**, 22-35.
- Beitz, E., Kumagami, H., Krippeit-Drews, P., Ruppertsberg, J.P. & Schultz, J.E. (1999) Expression pattern of aquaporin water channels in the inner ear of the rat. The molecular basis for a water regulation system in the endolymphatic sac. *Hear Res*, **132**, 76-84.
- Bekesy, G. (1952a) Direct observation of the vibrations of the cochlear partition under a microscope. *Acta Otolaryngol*, **42**, 197-201.

- Bekeasy, G. (1952b) Resting Potentials Inside the Cochlear Partition of the Guinea Pig. *Nature*, **169**, 241-242.
- Bergmann, L., Nowak, H., Siffert, W., Peters, J., Adamzik, M., Koos, B. & Rahmel, T. (2020) Major Adverse Kidney Events Are Associated with the Aquaporin 5 -1364A/C Promoter Polymorphism in Sepsis: A Prospective Validation Study. *Cells*, **9**.
- Bernaerts, A. & De Foer, B. (2019) Imaging of Meniere Disease. *Neuroimaging Clin N Am*, **29**, 19-28.
- Bhat, S., Curach, N., Mostyn, T., Bains, G.S., Griffiths, K.R. & Emslie, K.R. (2010) Comparison of methods for accurate quantification of DNA mass concentration with traceability to the international system of units. *Anal Chem*, **82**, 7185-7192.
- Bockenbauer, D. & Bichet, D.G. (2017) Nephrogenic diabetes insipidus. *Curr Opin Pediatr*, **29**, 199-205.
- Braun, K., Bohnke, F. & Stark, T. (2012) Three-dimensional representation of the human cochlea using micro-computed tomography data: presenting an anatomical model for further numerical calculations. *Acta Otolaryngol*, **132**, 603-613.
- Bruderer, S.G., Bodmer, D., Stohler, N.A., Jick, S.S. & Meier, C.R. (2017) Population-Based Study on the Epidemiology of Meniere's Disease. *Audiol Neurootol*, **22**, 74-82.
- Candreia, C., Schmuziger, N. & Gurtler, N. (2010) Molecular analysis of aquaporin genes 1 to 4 in patients with Meniere's disease. *Cell Physiol Biochem*, **26**, 787-792.
- Chang, C.C., Chow, C.C., Tellier, L.C., Vattikuti, S., Purcell, S.M. & Lee, J.J. (2015) Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*, **4**, 7.
- Chen, B., Cole, J.W. & Grond-Ginsbach, C. (2017) Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error. *Front Genet*, **8**, 167.
- Cheng, A., van Hoek, A.N., Yeager, M., Verkman, A.S. & Mitra, A.K. (1997) Three-dimensional organization of a human water channel. *Nature*, **387**, 627-630.
- Chiarella, G., Petrolo, C. & Cassandro, E. (2015) The genetics of Meniere's disease. *Appl Clin Genet*, **8**, 9-17.
- Crossley, J., Hussaini, A.S., Kim, H.J. & Hoa, M. (2020) Meniere's disease clinical subtypes in a population from the USA. *J Laryngol Otol*, **134**, 24-28.
- Crow, J.F. (1988) Eighty years ago: The beginnings of population genetics. *Genetics*, **119**, 473-476.
- Day, R.E., Kitchen, P., Owen, D.S., Bland, C., Marshall, L., Conner, A.C., Bill, R.M. & Conner, M.T. (2014) Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. *Biochim Biophys Acta*, **1840**, 1492-1506.
- de Pont, L.M.H., van Steekelenburg, J.M., Verhagen, T.O., Houben, M., Goeman, J.J., Verbist, B.M., van Buchem, M.A., Bommelje, C.C., Blom, H.M. & Hammer, S. (2021) Hydropic Ear Disease: Correlation Between Audiovestibular Symptoms, Endolymphatic Hydrops and Blood-Labyrinth Barrier Impairment. *Front Surg*, **8**, 758947.

- Dean, N.J., Pastras, C., Brown, D. & Camp, A. (2019) Are viral-infections associated with Meniere's Disease? A systematic review and meta-analysis of molecular-markers of viral-infection in case-controlled observational studies of MD. *PLoS One*, **14**, e0225650.
- Dehghan, A. (2018) Genome-Wide Association Studies. *Methods Mol Biol*, **1793**, 37-49.
- Delaneau, O., Marchini, J. & Zagury, J.F. (2011) A linear complexity phasing method for thousands of genomes. *Nat Methods*, **9**, 179-181.
- Derebery, M.J. (2000) Allergic management of Meniere's disease: an outcome study. *Otolaryngol Head Neck Surg*, **122**, 174-182.
- Derebery, M.J. & Berliner, K.I. (2010) Allergy and its relation to Meniere's disease. *Otolaryngol Clin North Am*, **43**, 1047-1058.
- Di Berardino, F., Filippini, E., Alpini, D., O'Bryan, T., Soi, D. & Cesarani, A. (2013) Ménière disease and gluten sensitivity: Recovery after a gluten-free diet. *American Journal of Otolaryngology*, **34**, 355-356.
- Dominguez, P., Manrique-Huarte, R., Suarez-Vega, V., Lopez-Laguna, N., Guajardo, C. & Perez-Fernandez, N. (2021) Endolymphatic Hydrops in Fluctuating Hearing Loss and Recurrent Vertigo. *Front Surg*, **8**, 673847.
- Dong, S.H., Kim, S.S., Kim, S.H. & Yeo, S.G. (2019) Expression of aquaporins in inner ear disease. *Laryngoscope*.
- Drago, A., Giegling, I., Schafer, M., Hartmann, A.M., Konte, B., Friedl, M., Serretti, A. & Rujescu, D. (2014) Genome-wide association study supports the role of the immunological system and of the neurodevelopmental processes in response to haloperidol treatment. *Pharmacogenet Genomics*, **24**, 314-319.
- Eckhard, A., Dos Santos, A., Liu, W., Bassiouni, M., Arnold, H., Gleiser, C., Hirt, B., Harteneck, C., Muller, M., Rask-Andersen, H. & Lowenheim, H. (2015) Regulation of the perilymphatic-endolymphatic water shunt in the cochlea by membrane translocation of aquaporin-5. *Pflugers Arch*, **467**, 2571-2588.
- Eckhard, A., Gleiser, C., Arnold, H., Rask-Andersen, H., Kumagami, H., Müller, M., Hirt, B. & Löwenheim, H. (2012) Water channel proteins in the inner ear and their link to hearing impairment and deafness. *Molecular Aspects of Medicine*, **33**, 612-637.
- Eckhard, A., Muller, M., Salt, A., Smolders, J., Rask-Andersen, H. & Lowenheim, H. (2014) Water permeability of the mammalian cochlea: functional features of an aquaporin-facilitated water shunt at the perilymph-endolymph barrier. *Pflugers Arch*, **466**, 1963-1985.
- Egami, N., Kakigi, A., Takeda, T., Takeda, S., Nishioka, R., Hyodo, M. & Yamasoba, T. (2014) Type 1 allergy-induced endolymphatic hydrops and the suppressive effect of H1-receptor antagonist (olopatadine hydrochloride). *Otol Neurotol*, **35**, e104-109.
- Ehret, G. (1978) Stiffness gradient along the basilar membrane as a basis for spatial frequency analysis within the cochlea. *J Acoust Soc Am*, **64**, 1723-1726.
- Ekdale, E.G. (2016) Form and function of the mammalian inner ear. *J Anat*, **228**, 324-337.

- Eriksson, U.K., Fischer, G., Friemann, R., Enkavi, G., Tajkhorshid, E. & Neutze, R. (2013) Subangstrom resolution X-ray structure details aquaporin-water interactions. *Science*, **340**, 1346-1349.
- Fettiplace, R. (2017) Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea. *Compr Physiol*, **7**, 1197-1227.
- First, M., Gibbon, M., Spitzer, R., Williams, J. & Benjamin, L. (1997) *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis II Personality Disorders, (SCID-II)*. American Psychiatric Press, Inc., Washington, DC.
- First, M., Spitzer, R., Gibbon, M. & Williams, J. (1996) *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Clinician Version (SCID-CV)*. American Psychiatric Press, Inc., Washington, DC.
- Flook, M. & Lopez Escamez, J.A. (2018) Meniere's Disease: Genetics and the Immune System. *Current Otorhinolaryngology Reports*, **6**, 24-31.
- Folstein, M.F., Folstein, S.E. & McHugh, P.R. (1975) Mini-Mental State- A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*, **12**, 189-198.
- Foster, C.A. & Breeze, R.E. (2013) Endolymphatic hydrops in Meniere's disease: cause, consequence, or epiphenomenon? *Otol Neurotol*, **34**, 1210-1214.
- Foundation, A.A.o.O.-H.a.N. (1995) Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Menière's disease. *Inc. Otolaryngol Head Neck Surg*, **113**, 181-185.
- Frejo, L., Giegling, I., Teggi, R., Lopez-Escamez, J.A. & Rujescu, D. (2016a) Genetics of vestibular disorders: pathophysiological insights. *J Neurol*, **263 Suppl 1**, S45-53.
- Frejo, L., Martin-Sanz, E., Teggi, R., Trinidad, G., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Manrique, R., Perez, N., Aran, I., Almeida-Branco, M.S., Batuecas-Caletrio, A., Fraile, J., Espinosa-Sanchez, J.M., Perez-Guillen, V., Perez-Garrigues, H., Oliva-Dominguez, M., Aleman, O., Benitez, J., Perez, P., Lopez-Escamez, J.A. & Meniere's disease, C. (2017) Extended phenotype and clinical subgroups in unilateral Meniere disease: A cross-sectional study with cluster analysis. *Clin Otolaryngol*, **42**, 1172-1180.
- 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., Garcia-Arumi, A.M., Gonzalez-Aguado, R., Espinosa-Sanchez, J.M., Marques, P., Perez, P., Benitez, J. & Lopez-Escamez, J.A. (2016b) Clinical Subgroups in Bilateral Meniere Disease. *Front Neurol*, **7**, 182.
- Galfalvy, H., Haghighi, F., Hodgkinson, C., Goldman, D., Oquendo, M.A., Burke, A., Huang, Y.Y., Giegling, I., Rujescu, D., Bureau, A., Turecki, G. & Mann, J.J. (2015) A genome-wide association study of suicidal behavior. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, **168**, 557-563.
- Gallagher, M.D. & Chen-Plotkin, A.S. (2018) The Post-GWAS Era: From Association to Function. *Am J Hum Genet*, **102**, 717-730.
- Gallego-Martinez, A. & Lopez-Escamez, J.A. (2020) Genetic architecture of Meniere's disease. *Hear Res*, **397**, 107872.

- 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**, 1521-1529.
- Gazquez, I., Requena, T., Espinosa, J.M., Batuecas, A. & Lopez-Escamez, J.A. (2012) Genetic and clinical heterogeneity in Meniere's disease. *Autoimmunity Reviews*, **11**, 925-926.
- Gazquez, I., Soto-Varela, A., Aran, I., Santos, S., Batuecas, A., Trinidad, G., Perez-Garrigues, H., Gonzalez-Oller, C., Acosta, L. & Lopez-Escamez, J.A. (2011) High prevalence of systemic autoimmune diseases in patients with Meniere's disease. *PLoS One*, **6**, e26759.
- Genomes Project, C., Auton, A., Brooks, L.D., Durbin, R.M., Garrison, E.P., Kang, H.M., Korbel, J.O., Marchini, J.L., McCarthy, S., McVean, G.A. & Abecasis, G.R. (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature*, **526**, 68-74.
- Gurkov, R., Flatz, W., Louza, J., Strupp, M., Ertl-Wagner, B. & Krause, E. (2012) In vivo visualized endolymphatic hydrops and inner ear functions in patients with electrocochleographically confirmed Meniere's disease. *Otol Neurotol*, **33**, 1040-1045.
- Gurkov, R., Lutsenko, V., Babkina, T., Valchyshyn, S. & Situkho, M. (2022) Clinical high-resolution imaging and grading of endolymphatic hydrops in Hydroptic Ear Disease at 1.5 T using the two-slice grading for vestibular endolymphatic hydrops in less than 10 min. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **279**, 751-757.
- Hallpike, C.S. & Cairns, H. (1938) Observations on the Pathology of Meniere's Syndrome: (Section of Otology). *Proc R Soc Med*, **31**, 1317-1336.
- Harcourt, J., Barraclough, K. & Bronstein, A.M. (2014) Meniere's disease. *BMJ*, **349**, g6544.
- Harcourt, J.P., Lambert, A., Wong, P.Y., Patel, M., Agarwal, K., Golding, J.F. & Bronstein, A.M. (2019) Long-Term Follow-Up of Intratympanic Methylprednisolone Versus Gentamicin in Patients With Unilateral Meniere's Disease. *Otol Neurotol*, **40**, 491-496.
- Hardy, G.H. (1908) Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, **28**, 49-50.
- Harris, J.P. & Alexander, T.H. (2010) Current-day prevalence of Meniere's syndrome. *Audiol Neurootol*, **15**, 318-322.
- Havia, M., Kentala, E. & Pyykko, I. (2005) Prevalence of Meniere's disease in general population of Southern Finland. *Otolaryngol Head Neck Surg*, **133**, 762-768.
- He, D.Z., Jia, S. & Dallos, P. (2004) Mechano-electrical transduction of adult outer hair cells studied in a gerbil hemicochlea. *Nature*, **429**, 766-770.
- Hibino, H. & Kurachi, Y. (2006) Molecular and physiological bases of the K<sup>+</sup> circulation in the mammalian inner ear. *Physiology (Bethesda)*, **21**, 336-345.
- Hietikko, E., Sorri, M., Mannikko, M. & Kotimäki, J. (2014) Higher prevalence of autoimmune diseases and longer spells of vertigo in patients affected with familial Meniere's disease: A clinical comparison of familial and sporadic Meniere's disease. *Am J Audiol*, **23**, 232-237.

- Hirt, B., Penkova, Z.H., Eckhard, A., Liu, W., Rask-Andersen, H., Muller, M. & Lowenheim, H. (2010) The subcellular distribution of aquaporin 5 in the cochlea reveals a water shunt at the perilymph-endolymph barrier. *Neuroscience*, **168**, 957-970.
- Howie, B., Marchini, J. & Stephens, M. (2011) Genotype imputation with thousands of genomes. *G3 (Bethesda)*, **1**, 457-470.
- Howie, B.N., Donnelly, P. & Marchini, J. (2009) A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet*, **5**, e1000529.
- Huang, D., Chen, P., Chen, S., Nagura, M., Lim, D.J. & Lin, X. (2002) Expression patterns of aquaporins in the inner ear: evidence for concerted actions of multiple types of aquaporins to facilitate water transport in the cochlea. *Hear Res*, **165**, 85-95.
- Hudspeth, A.J. (1989) How the ear's works work. *Nature*, **341**, 397-404.
- Illumina, I. (2017) Infinium Assay Workflow. Illumina, Inc., California, USA.
- International HapMap, C. (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature*, **437**, 1299-1320.
- Ishibashi, K., Tanaka, Y. & Morishita, Y. (2014) The role of mammalian supraaquaporins inside the cell. *Biochim Biophys Acta*, **1840**, 1507-1512.
- Ishiyama, G., Lopez, I.A., Beltran-Parrazal, L. & Ishiyama, A. (2010) Immunohistochemical localization and mRNA expression of aquaporins in the macula utriculi of patients with Meniere's disease and acoustic neuroma. *Cell Tissue Res*, **340**, 407-419.
- Ishiyama, G., Lopez, I.A. & Ishiyama, A. (2006) Aquaporins and Meniere's disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, **14**, 332-336.
- Kakigi, A., Nishimura, M., Takeda, T., Taguchi, D. & Nishioka, R. (2009) Expression of aquaporin1, 3, and 4, NKCC1, and NKCC2 in the human endolymphatic sac. *Auris Nasus Larynx*, **36**, 135-139.
- Kangasniemi, E. & Hietikko, E. (2018) The theory of autoimmunity in Meniere's disease is lacking evidence. *Auris Nasus Larynx*, **45**, 399-406.
- Keles, E., Godekmerdan, A., Kalidag, T., Kaygusuz, I., Yalcin, S., Cengiz Alpay, H. & Aral, M. (2004) Meniere's disease and allergy: allergens and cytokines. *J Laryngol Otol*, **118**, 688-693.
- Khan, S. & Chang, R. (2013) Anatomy of the vestibular system: a review. *NeuroRehabilitation*, **32**, 437-443.
- Kim, M.H. & Cheon, C. (2020) Epidemiology and Seasonal Variation of Meniere's Disease: Data from a Population-Based Study. *Audiol Neurootol*, **25**, 224-230.
- 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**, e111039.
- King, L.S. & Yasui, M. (2002) Aquaporins and disease: lessons from mice to humans. *Trends Endocrinol Metab*, **13**, 355-360.

- Ku, C.S., Loy, E.Y., Pawitan, Y. & Chia, K.S. (2010) The pursuit of genome-wide association studies: where are we now? *Journal of Human Genetics*, **55**, 195-206.
- Kutlubaeov, M.A., Pyykko, I., Hardy, T.A. & Gurkov, R. (2020) Meniere's disease. *Pract Neurol*.
- 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**, 2175-2180.
- Lencz, T., Knowles, E., Davies, G., Guha, S., Liewald, D.C., Starr, J.M., Djurovic, S., Melle, I., Sundet, K., Christoforou, A., Reinvang, I., Mukherjee, S., DeRosse, P., Lundervold, A., Steen, V.M., John, M., Espeseth, T., Raikkonen, K., Widen, E., Palotie, A., Eriksson, J.G., Giegling, I., Konte, B., Ikeda, M., Roussos, P., Giakoumaki, S., Burdick, K.E., Payton, A., Ollier, W., Horan, M., Donohoe, G., Morris, D., Corvin, A., Gill, M., Pendleton, N., Iwata, N., Darvasi, A., Bitsios, P., Rujescu, D., Lahti, J., Hellard, S.L., Keller, M.C., Andreassen, O.A., Deary, I.J., Glahn, D.C. & Malhotra, A.K. (2014) Molecular genetic evidence for overlap between general cognitive ability and risk for schizophrenia: a report from the Cognitive Genomics consortium (COGENT). *Mol Psychiatry*, **19**, 168-174.
- Li, C. & Wang, W. (2017) Molecular Biology of Aquaporins. *Adv Exp Med Biol*, **969**, 1-34.
- Li, J. & Verkman, A.S. (2001) Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels. *J Biol Chem*, **276**, 31233-31237.
- Li, L., Wang, Y., An, L., Kong, X. & Huang, T. (2017) A network-based method using a random walk with restart algorithm and screening tests to identify novel genes associated with Meniere's disease. *PLoS One*, **12**, e0182592.
- Li, X., Wu, Y., Zhang, L., Cao, Y., Li, Y., Li, J., Zhu, L. & Wu, G. (2014) Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem*, **451**, 18-24.
- Lin, P.I., Vance, J.M., Pericak-Vance, M.A. & Martin, E.R. (2007) No gene is an island: the flip-flop phenomenon. *Am J Hum Genet*, **80**, 531-538.
- Liu, Y., Pyykko, I., Naganawa, S., Marques, P., Gurkov, R., Yang, J. & Duan, M. (2022) Consensus on MR Imaging of Endolymphatic Hydrops in Patients With Suspected Hydropic Ear Disease (Meniere). *Front Surg*, **9**, 874971.
- Lopes Kde, C., Sartorato, E.L., da Silva-Costa, S.M., de Macedo Adamov, N.S. & Gananca, F.F. (2016) Meniere's Disease: Molecular Analysis of Aquaporins 2, 3 and Potassium Channel KCNE1 Genes in Brazilian Patients. *Otol Neurotol*, **37**, 1117-1121.
- Lopez, I.A., Ishiyama, G., Lee, M., Baloh, R.W. & Ishiyama, A. (2007) Immunohistochemical localization of aquaporins in the human inner ear. *Cell Tissue Res*, **328**, 453-460.
- Lopez, J.A., Carey, J., Chung, W., Goebel, J.A., Magnusson, M., Mandala, M., Newman, D.E., Strupp, M., Suzuki, M., Trabalzini, F. & Bisdorff, A. (2015) Diagnostic criteria for Meniere's disease. *J Vestib Res Equilib Orientat*, **25**, 1-7.
- 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. (2017) [Diagnostic criteria for Meniere's disease according to the Classification Committee of the Barany Society]. *HNO*, **65**, 887-893.

- Lopez-Escamez, J.A., Dlugaiczyk, J., Jacobs, J., Lempert, T., Teggi, R., von Brevern, M. & Bisdorff, A. (2014) Accompanying Symptoms Overlap during Attacks in Meniere's Disease and Vestibular Migraine. *Front Neurol*, **5**, 265.
- Maekawa, C., Kitahara, T., Kizawa, K., Okazaki, S., Kamakura, T., Horii, A., Imai, T., Doi, K., Inohara, H. & Kiyama, H. (2010) Expression and translocation of aquaporin-2 in the endolymphatic sac in patients with Meniere's disease. *J Neuroendocrinol*, **22**, 1157-1164.
- Matsuoka, H., Kwon, S.S., Yazawa, Y., Barbieri, M. & Yoo, T.J. (2002) Induction of endolymphatic hydrops by directly infused monoclonal antibody against type II collagen CB11 peptide. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, **111**, 587-592.
- Maxwell, A.K., Ishiyama, G., Karnezis, S. & Ishiyama, A. (2021) Isolated Saccular Hydrops on High-resolution MRI Is Associated With Full Spectrum Meniere's Disease. *Otol Neurotol*, **42**, 876-882.
- Megerian, C.A., Semaan, M.T., Aftab, S., Kisley, L.B., Zheng, Q.Y., Pawlowski, K.S., Wright, C.G. & Alagramam, K.N. (2008) A mouse model with postnatal endolymphatic hydrops and hearing loss. *Hear Res*, **237**, 90-105.
- 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**, 74-81.
- Merves, M., Krane, C.M., Dou, H., Greinwald, J.H., Menon, A.G. & Choo, D. (2003) Expression of aquaporin 1 and 5 in the developing mouse inner ear and audiovestibular assessment of an Aqp5 null mutant. *J Assoc Res Otolaryngol*, **4**, 264-275.
- Mhatre, A.N., Stern, R.E., Li, J. & Lalwani, A.K. (2002) Aquaporin 4 expression in the mammalian inner ear and its role in hearing. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 987-996.
- Milano, S., Carosino, M., Gerbino, A., Svelto, M. & Procino, G. (2017) Hereditary Nephrogenic Diabetes Insipidus: Pathophysiology and Possible Treatment. An Update. *Int J Mol Sci*, **18**.
- Muelleman, T., Shew, M., Subbarayan, R., Shum, A., Sykes, K., Staecker, H. & Lin, J. (2017) Epidemiology of Dizzy Patient Population in a Neurotology Clinic and Predictors of Peripheral Etiology. *Otol Neurotol*, **38**, 870-875.
- Muller, M., von Hunerbein, K., Hoidis, S. & Smolders, J.W. (2005) A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hear Res*, **202**, 63-73.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A. & Fujiyoshi, Y. (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, **407**, 599-605.
- Naganawa, S. & Nakashima, T. (2014) Visualization of endolymphatic hydrops with MR imaging in patients with Meniere's disease and related pathologies: current status of its methods and clinical significance. *Jpn J Radiol*, **32**, 191-204.
- 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**, 415-420.

- NCBI, N.C.f.B.I., National Library of Medicine (2019) Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP), Bethesda (MD), pp. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>  
Zuletzt aufgerufen am 07.05.2019.
- Need, A.C., Ge, D., Weale, M.E., Maia, J., Feng, S., Heinzen, E.L., Shianna, K.V., Yoon, W., Kasperaviciute, D., Gennarelli, M., Strittmatter, W.J., Bonvicini, C., Rossi, G., Jayathilake, K., Cola, P.A., McEvoy, J.P., Keefe, R.S., Fisher, E.M., St Jean, P.L., Giegling, I., Hartmann, A.M., Moller, H.J., Ruppert, A., Fraser, G., Crombie, C., Middleton, L.T., St Clair, D., Roses, A.D., Muglia, P., Francks, C., Rujescu, D., Meltzer, H.Y. & Goldstein, D.B. (2009) A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia. *PLoS Genet*, **5**, e1000373.
- Nevoux, J., Viengchareun, S., Lema, I., Lecoq, A.L., Ferrary, E. & Lombes, M. (2015) Glucocorticoids stimulate endolymphatic water reabsorption in inner ear through aquaporin 3 regulation. *Pflugers Arch*, **467**, 1931-1943.
- Nielsen, S., King, L.S., Christensen, B.M. & Agre, P. (1997) Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am J Physiol*, **273**, C1549-1561.
- 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**, 541-546.
- Ogasawara, M., Meguro, A., Sakai, T., Mizuki, N., Takahashi, T., Fujihara, K., Tsuneoka, H. & Shikishima, K. (2016) Genetic analysis of the aquaporin-4 gene for anti-AQP4 antibody-positive neuromyelitis optica in a Japanese population. *Japanese Journal of Ophthalmology*, **60**, 198-205.
- 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**, 1336-1341.
- Opdal, S.H., Vege, A., Stray-Pedersen, A. & Rognum, T.O. (2010) Aquaporin-4 gene variation and sudden infant death syndrome. *Pediatr Res*, **68**, 48-51.
- Pai, I., Mendis, S., Murdin, L., Touska, P. & Connor, S. (2020) Magnetic resonance imaging of Meniere's disease: early clinical experience in a UK centre. *J Laryngol Otol*, **134**, 302-310.
- Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S., Klinke, R., Brenner, B., Gay, R.d. & Rothenburger, A. (2018) *Physiologie*.
- Patel, M., Agarwal, K., Arshad, Q., Hariri, M., Rea, P., Seemungal, B.M., Golding, J.F., Harcourt, J.P. & Bronstein, A.M. (2016) Intratympanic methylprednisolone versus gentamicin in patients with unilateral Ménière's disease: a randomised, double-blind, comparative effectiveness trial. *The Lancet*, **388**, 2753-2762.
- Perez-Carpena, P. & Lopez-Escamez, J.A. (2020) Current Understanding and Clinical Management of Meniere's Disease: A Systematic Review. *Semin Neurol*, **40**, 138-150.
- Phillips, J.S., Murdin, L., Rea, P. & Sutton, L. (2018) Clinical Subtyping of Meniere's Disease. *Otolaryngol Head Neck Surg*, **159**, 407-409.

- Phillips, J.S. & Westerberg, B. (2011) Intratympanic steroids for Meniere's disease or syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*, CD008514.
- Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B. & Agre, P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, **256**, 385-387.
- Price, A.L., Patterson, N.J., Plenge, R.M., Weinblatt, M.E., Shadick, N.A. & Reich, D. (2006) Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet*, **38**, 904-909.
- Price, A.L., Zaitlen, N.A., Reich, D. & Patterson, N. (2010) New approaches to population stratification in genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*, **11**, 459-463.
- Priebe, L., Degenhardt, F., Strohmaier, J., Breuer, R., Herms, S., Witt, S.H., Hoffmann, P., Kulbida, R., Mattheisen, M., Moebus, S., Meyer-Lindenberg, A., Walter, H., Mossner, R., Nenadic, I., Sauer, H., Rujescu, D., Maier, W., Rietschel, M., Nothen, M.M. & Cichon, S. (2013) Copy number variants in German patients with schizophrenia. *PLoS One*, **8**, e64035.
- Project, T.E. (2019) Population Genetics *Release: 98*.
- Psychosis Endophenotypes International, C., Wellcome Trust Case-Control, C., Bramon, E., Pirinen, M., Strange, A., Lin, K., Freeman, C., Bellenguez, C., Su, Z., Band, G., Pearson, R., Vukcevic, D., Langford, C., Deloukas, P., Hunt, S., Gray, E., Dronov, S., Potter, S.C., Tashakkori-Ghanbaria, A., Edkins, S., Bumpstead, S.J., Arranz, M.J., Bakker, S., Bender, S., Bruggeman, R., Cahn, W., Chandler, D., Collier, D.A., Crespo-Facorro, B., Dazzan, P., de Haan, L., Di Forti, M., Dragovic, M., Giegling, I., Hall, J., Iyegbe, C., Jablensky, A., Kahn, R.S., Kalaydjieva, L., Kravariti, E., Lawrie, S., Linszen, D.H., Mata, I., McDonald, C., McIntosh, A., Myin-Germeys, I., Ophoff, R.A., Pariante, C.M., Paunio, T., Picchioni, M., Psychiatric Genomics, C., Ripke, S., Rujescu, D., Sauer, H., Shaikh, M., Sussmann, J., Suvisaari, J., Tosato, S., Touloupoulou, T., Van Os, J., Walshe, M., Weisbrod, M., Whalley, H., Wiersma, D., Blackwell, J.M., Brown, M.A., Casas, J.P., Corvin, A., Duncanson, A., Jankowski, J.A., Markus, H.S., Mathew, C.G., Palmer, C.N., Plomin, R., Rautanen, A., Sawcer, S.J., Trembath, R.C., Wood, N.W., Barroso, I., Peltonen, L., Lewis, C.M., Murray, R.M., Donnelly, P., Powell, J. & Spencer, C.C. (2014) A genome-wide association analysis of a broad psychosis phenotype identifies three loci for further investigation. *Biol Psychiatry*, **75**, 386-397.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I., Daly, M.J. & Sham, P.C. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*, **81**, 559-575.
- Qiagen (2005) *QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Handbook* Hilden, Germany.
- Qin, L., Guo, L., Wang, H., Li, T., Lou, G., Guo, Q., Hou, Q., Liu, H., Liao, S. & Liu, Z. (2016) A novel MIP mutation in familial congenital nuclear cataracts. *Eur J Med Genet*, **59**, 488-491.
- Radtko, A., von Brevern, M., Feldmann, M., Lezius, F., Ziese, T., Lempert, T. & Neuhauser, H. (2008) Screening for Meniere's disease in the general population - the needle in the haystack. *Acta Otolaryngol*, **128**, 272-276.

- Rahmel, T., Nowak, H., Rump, K., Koos, B., Schenker, P., Viebahn, R., Adamzik, M. & Bergmann, L. (2019a) The Aquaporin 5 -1364A/C Promoter Polymorphism Is Associated With Cytomegalovirus Infection Risk in Kidney Transplant Recipients. *Front Immunol*, **10**, 2871.
- Rahmel, T., Nowak, H., Rump, K., Siffert, W., Peters, J. & Adamzik, M. (2018) The aquaporin 5 -1364A/C promoter polymorphism impacts on resolution of acute kidney injury in pneumonia evoked ARDS. *Plos One*, **13**.
- Rahmel, T., Rump, K., Peters, J. & Adamzik, M. (2019b) Aquaporin 5 -1364A/C Promoter Polymorphism Is Associated with Pulmonary Inflammation and Survival in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Anesthesiology*, **130**, 404-413.
- Rengarajan, K., Cristol, S.M., Mehta, M. & Nickerson, J.M. (2002) Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores. *Mol Vis*, **8**, 416-421.
- 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**, 245-252.
- Rice, J.P., Reich, T., Bucholz, K.K., Neuman, R.J., Fishman, R., Rochberg, N., Hesselbrock, V.M., Nurnberger, J.I., Schuckit, M.A. & Begleiter, H. (1995) Comparison of Direct Interview and Family History Diagnoses of Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res*, **Vol. 19**, 1018-1023.
- Rogha, M., Abtahi, H., Asadpour, L., Ghazavi, H., Pourmohammadi, R., Maleki, M. & Ghadimi, K. (2019) Therapeutic Effect of Intratympanic Injection of Dexamethasone plus Hyaluronic Acid on Patients with Meniere's disease. *Iran J Otorhinolaryngol*, **31**, 217-223.
- Rujescu, D., Hartmann, A.M., Giegling, I., Konte, B., Herrling, M., Himmelein, S. & Strupp, M. (2018) Genome-Wide Association Study in Vestibular Neuritis: Involvement of the Host Factor for HSV-1 Replication. *Frontiers in Neurology*, **9**.
- Rump, K. & Adamzik, M. (2018) Function of aquaporins in sepsis: a systematic review. *Cell Biosci*, **8**, 10.
- Rump, K., Unterberg, M., Bergmann, L., Bankfalvi, A., Menon, A., Schafer, S., Scherag, A., Bazzi, Z., Siffert, W., Peters, J. & Adamzik, M. (2016) AQP5-1364A/C polymorphism and the AQP5 expression influence sepsis survival and immune cell migration: a prospective laboratory and patient study. *J Transl Med*, **14**, 321.
- Safieddine, S., El-Amraoui, A. & Petit, C. (2012) The auditory hair cell ribbon synapse: from assembly to function. *Annu Rev Neurosci*, **35**, 509-528.
- Sajjadi, H. & Paparella, M.M. (2008) Meniere's disease. *Lancet*, **372**, 406-414.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, C. (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, **511**, 421-427.
- Senthil Kumar, G., Kyle, J.W., Minogue, P.J., Dinesh Kumar, K., Vasantha, K., Berthoud, V.M., Beyer, E.C. & Santhiya, S.T. (2013) An MIP/AQP0 mutation with impaired trafficking and function underlies an autosomal dominant congenital lamellar cataract. *Exp Eye Res*, **110**, 136-141.

- 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**, 305-309.
- Simo, H., Yang, S., Qu, W., Preis, M., Nazzal, M. & Baugh, R. (2015) Meniere's disease: importance of socioeconomic and environmental factors. *Am J Otolaryngol*, **36**, 393-398.
- Sorani, M.D., Manley, G.T. & Giacomini, K.M. (2008) Genetic variation in human aquaporins and effects on phenotypes of water homeostasis. *Hum Mutat*, **29**, 1108-1117.
- Stefansson, H., Rujescu, D., Cichon, S., Pietilainen, O.P., Ingason, A., Steinberg, S., Fossdal, R., Sigurdsson, E., Sigmundsson, T., Buizer-Voskamp, J.E., Hansen, T., Jakobsen, K.D., Muglia, P., Francks, C., Matthews, P.M., Gylfason, A., Halldorsson, B.V., Gudbjartsson, D., Thorgeirsson, T.E., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Bjornsson, A., Mattiasdottir, S., Blondal, T., Haraldsson, M., Magnusdottir, B.B., Giegling, I., Moller, H.J., Hartmann, A., Shianna, K.V., Ge, D., Need, A.C., Crombie, C., Fraser, G., Walker, N., Lonnqvist, J., Suvisaari, J., Tuulio-Henriksson, A., Paunio, T., Touloupoulou, T., Bramon, E., Di Forti, M., Murray, R., Ruggeri, M., Vassos, E., Tosato, S., Walshe, M., Li, T., Vasilescu, C., Muhleisen, T.W., Wang, A.G., Ullum, H., Djurovic, S., Melle, I., Olesen, J., Kiemenev, L.A., Franke, B., Group, Sabatti, C., Freimer, N.B., Gulcher, J.R., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., Andreassen, O.A., Ophoff, R.A., Georgi, A., Rietschel, M., Werge, T., Petursson, H., Goldstein, D.B., Nothen, M.M., Peltonen, L., Collier, D.A., St Clair, D. & Stefansson, K. (2008) Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature*, **455**, 232-236.
- Suh, M.J., Jeong, J., Kim, H.J., Jung, J. & Kim, S.H. (2019) Clinical Characteristics of Bilateral Meniere's Disease in a Single Asian Ethnic Group. *Laryngoscope*, **129**, 1191-1196.
- Takeda, T., Takeda, S., Egami, N., Kakigi, A., Nishioka, R. & Yamasoba, T. (2012) Type 1 allergy-induced endolymphatic hydrops and the suppressive effect of leukotriene receptor antagonist. *Otol Neurotol*, **33**, 886-890.
- Takumi, Y., Nagelhus, E.A., Eidet, J., Matsubara, A., Usami, S., Shinkawa, H., Nielsen, S. & Ottersen, O.P. (1998) Select types of supporting cell in the inner ear express aquaporin-4 water channel protein. *Eur J Neurosci*, **10**, 3584-3595.
- Talewar, K.K., Cassidy, E. & McIntyre, A. (2019) Living with Meniere's disease: an interpretative phenomenological analysis. *Disabil Rehabil*, 1-13.
- Tam, V., Patel, N., Turcotte, M., Bosse, Y., Pare, G. & Meyre, D. (2019) Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*, **20**, 467-484.
- Tang, G. & Yang, G.Y. (2016) Aquaporin-4: A Potential Therapeutic Target for Cerebral Edema. *Int J Mol Sci*, **17**.
- Teggi, R., Carpini, S.D. & Zagato, L. (2019) Endolymphatic hydrops and ionic transporters: genetic and biohumoral aspects. *J Neurol*, **266**, 47-51.
- Teo, Y.Y. (2010) Exploratory data analysis in large-scale genetic studies. *Biostatistics*, **11**, 70-81.

- Thomas, D.C. & Witte, J.S. (2002) Point: population stratification: a problem for case-control studies of candidate-gene associations? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**, 505-512.
- Thorp, M.A. & James, A.L. (2005) Prosper Ménière. *The Lancet*, **366**, 2137-2139.
- Tornroth-Horsefield, S., Hedfalk, K., Fischer, G., Lindkvist-Petersson, K. & Neutze, R. (2010) Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation. *FEBS Lett*, **584**, 2580-2588.
- Tyrrell, J.S., Whinney, D.J., Ukoumunne, O.C., Fleming, L.E. & Osborne, N.J. (2014) Prevalence, associated factors, and comorbid conditions for Meniere's disease. *Ear Hear*, **35**, e162-169.
- Uitterlinden, A.G. (2016) An Introduction to Genome-Wide Association Studies. *Semin Reprod Med*, **34**, 196-204.
- Verma, R.K., Gupta, A.B. & Sankararamakrishnan, R. (2015) Major intrinsic protein superfamily: channels with unique structural features and diverse selectivity filters. *Methods Enzymol*, **557**, 485-520.
- Verma, R.K., Prabh, N.D. & Sankararamakrishnan, R. (2014) New subfamilies of major intrinsic proteins in fungi suggest novel transport properties in fungal channels: implications for the host-fungal interactions. *BMC Evolutionary Biology*, **14**.
- Wangemann, P. (2006) Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *The Journal of Physiology*, **576**, 11-21.
- Waples, R.S. (2015) Testing for Hardy-Weinberg proportions: have we lost the plot? *J Hered*, **106**, 1-19.
- Watanabe, Y., Mizukoshi, K., Shojaku, H., Watanabe, I., Hinoki, M. & Kitahara, M. (1995) Epidemiological and clinical characteristics of Meniere's disease in Japan. *Acta Otolaryngol Suppl*, **519**, 206-210.
- Weinreich, H.M. & Agrawal, Y. (2014) The link between allergy and Meniere's disease. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, **22**, 227-230.
- Wu, Q., Dai, C., Zhao, M. & Sha, Y. (2016) The correlation between symptoms of definite Meniere's disease and endolymphatic hydrops visualized by magnetic resonance imaging. *Laryngoscope*, **126**, 974-979.
- Yamakawa, K. (1938) Über die pathologische Veränderungen bei einem Meniere-Kranken. *J Otolaryngol Jpn*, **44**, 2310-2312.
- Zerbino, D.R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M.R., Barrell, D., Bhai, J., Billis, K., Cummins, C., Gall, A., Giron, C.G., Gil, L., Gordon, L., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O.G., Janacek, S.H., Juettemann, T., To, J.K., Laird, M.R., Lavidas, I., Liu, Z., Loveland, J.E., Maurel, T., McLaren, W., Moore, B., Mudge, J., Murphy, D.N., Newman, V., Nuhn, M., Ogeh, D., Ong, C.K., Parker, A., Patricio, M., Riat, H.S., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sparrow, H., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Walts, B., Zadissa, A., Frankish, A., Hunt, S.E., Kostadima, M., Langridge, N., Martin, F.J., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Staines, D.M., Trevanion, S.J., Aken, B.L., Cunningham, F., Yates, A. & Flicek, P. (2018) Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res*, **46**, D754-D761.

- Zeuthen, T. (2001) How water molecules pass through aquaporins. *Trends Biochem Sci*, **26**, 77-79.
- Zhang, W., Hui, L., Zhang, B., Ren, L., Zhu, J., Wang, F. & Li, S. (2020) The Correlation Between Endolymphatic Hydrops and Clinical Features of Meniere Disease. *Laryngoscope*.
- Zhao, S., Jing, W., Samuels, D.C., Sheng, Q., Shyr, Y. & Guo, Y. (2018) Strategies for processing and quality control of Illumina genotyping arrays. *Brief Bioinform*, **19**, 765-775.
- Zhong, S.-X. & Liu, Z.-H. (2004) Expression of Aquaporins in the Cochlea and Endolymphatic Sac of Guinea Pig. *Orl*, **65**, 284-289.
- Ziegler, A., Konig, I.R. & Thompson, J.R. (2008) Biostatistical aspects of genome-wide association studies. *Biom J*, **50**, 8-28.

## 7 Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AAO-HNS	American Academy of Otolaryngology - Head and Neck Surgery
ABR	Acoustic Brainstem Response
AQP	Aquaporin
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
Ar/R-Sequenz	Arginin/Aromatische-Sequenz
CMV	Cytomegalievirus
DSGZ	Deutsches Schwindel- und Gleichgewichtszentrum
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FHAM	Family History Assessment Module
GHCL	Guanidinhydrochlorid
GWAS	Genome Wide Association Studies
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium
IBD	Identity by descent
kDa	Kilodalton
LD	Linkage Disequilibrium
MAF	minore Allelfrequenz
MMST	Mini Mental State Test
MRT	Magnetresonanztomographie
NMO	Neuromyelitis optica
NPA	Asparagin, Prolin, Arginin
PAGES	Phenomics and Genomics Sample
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Principal Component
PCA	Principal Component Analysis
PGC	Psychiatric Genomics Consortium
mV	Millivolt
µl	Microliter
ng	Nanogramm
rpm	rounds per minute
SBE	Single-base Extension
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome
SKID I und II	Strukturiertes Klinisches Interview I und II
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

## **8 Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Elena Kalb, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Genetischer Zusammenhang von Morbus Menière und Polymorphismen der Aquaporine 3, 4 und 5**

selbstständig verfasst, 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 in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Zürich, 24.11.2022

Elena Kalb

## 9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich während der Entstehung dieser wissenschaftlichen Arbeit unterstützt haben. Ich habe viel über das wissenschaftliche Arbeiten gelernt und bin allen dankbar, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. med. Marianne Dietrich, der Direktorin der Neurologischen Klinik und Poliklinik und Herrn PD Dr. Zwergal vom Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum der LMU München, dass ich dort forschen durfte.

Ich danke meiner Doktormutter, Frau PD Dr. rer. hum. biol. Ina Giegling, dass sie mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Michael Strupp für die Hilfe bei der Rekrutierung der Patienten sowie die Betreuung vor Ort während meiner praktischen Tätigkeit.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. hum. biol. Annette Hartmann für die umfassende Betreuung und Begleitung während meiner gesamten Zeit als Doktorandin. Sie führte mich in das wissenschaftliche Arbeiten ein, stand mir stets mit „Rat und Tat“ zur Seite und hatte immer ein offenes Ohr für meine Anliegen. Mit ihr hatte ich sowohl während meiner praktischen Tätigkeit an der Klinik Großhadern als auch in der Zeit der Fertigstellung der Dissertation eine zuverlässige und kompetente Ansprechpartnerin.

Mein Dank geht auch an Herrn Dr. med. Stephan Maul, der diese Arbeit Korrektur gelesen hat und mit vielen Verbesserungsvorschlägen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Vielen Dank auch an Bettina Konnte für das Zusammenstellen der genetischen Daten und ihre Anleitung zur statistischen Auswertung.

Zuletzt möchte ich meiner liebsten Familie danken, die mir stets neue Energie und Motivation für die Verfassung der Arbeit schenkte.