

Aus der neurologischen Klinik und Poliklinik

Klinik der Universität München

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

&

Aus dem Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum

Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Zwergal

**Eine Gen- und Gen-Set-basierte genomweite Assoziationsstudie
zum Morbus Menière**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franz Bauernschmitt

aus

Karlsruhe

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Canis
Prof. Dr. med. Ortrud Steinlein

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

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2022

Meiner Familie gewidmet.

Zusammenfassung

Der Morbus Menière ist eine Erkrankung des Innenohrs, die zu rezidivierenden Attacken mit Schwindel, Hörstörungen, Tinnitus und Ohrdruck führt. Da die Ätiopathogenese des Morbus Menière vielfältig ist und es Hinweise auf genetische Einflussfaktoren gibt, sind genetische Assoziationsstudien vielversprechende Verfahren, um hypothesenfrei nach derartigen Faktoren zu suchen und bisherige Hypothesen zu testen.

In der vorliegenden Arbeit wurde innerhalb einer genomweiten Assoziationsstudie das gemeinsame Auftreten des Morbus Menière mit genetischen Varianten innerhalb unterschiedlicher Gene und Gen-Sets untersucht.

Dazu wurde ein Probandenkollektiv aus 314 an Morbus Menière erkrankten Patienten und 2614 gesunden Kontrollprobanden genotypisiert, die Datensätze imputiert, zu einem Megadatensatz zusammengefügt und auf eine genomweite Assoziation überprüft. Die dadurch erhaltenen p-Werte dienten als Ausgangsbasis für die genbasierte Testung auf eine Assoziation zum Morbus Menière. Zudem wurden zu verschiedenen Hypothesen zur Entstehung des Morbus Menière vier Gen-Sets basierend auf einer Literaturrecherche ausgewählt und zusammengestellt.

Bei der Testung der Gene zeigte ein Gen, SNX20, nach der Korrektur für das multiple Testen eine signifikante Assoziation zum Morbus Menière. Bei der genaueren Untersuchung der Region um SNX20 und NOD2, einem eng benachbarten Gen, zeigte sich basierend auf der regionalen SNV-Testung eine Häufung signifikanter Assoziationen von SNVs in der überlappenden 5'-Genregion der beiden Gene. Für einen Teil der SNVs wurde in der Literatur bereits ein Einfluss auf die Expressionslevel der beiden Gene beschrieben. Zudem zeigten SNVs in NOD2 in anderen Studien eine Assoziation zum Morbus Crohn, einer Autoimmunerkrankung. Diese Ergebnisse stützen die bisherige Hypothese, dass autoimmune Pathomechanismen bei der Genese des Morbus Menière von Bedeutung sind. Notwendig ist jetzt eine unabhängige Replikation dieser Befunde.

Zwei der ausgewählten Gen-Sets basierten auf Ionenkanälen im Innenohr, ein Gen-Set auf dem Vasopressin/Aquaporin-System und ein viertes Gen-Set bildete einen Signalweg, der Funktionen bei Immunprozessen hat und für den eine Assoziation mit dem Morbus Menière vermutet wurde, ab. In der statistischen Testung zeigte keines der vier Gen-Sets eine signifikante Assoziation.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Morbus Menière.....	1
1.1.1 Diagnostik.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	4
1.1.3 Ätiologie und Pathophysiologie.....	5
1.1.4 Therapie.....	6
1.1.5 Aufbau und Funktion des Innenohrs.....	8
1.2 Hypothesen zur Entstehung des Morbus Menière.....	9
1.2.1 Endolymphatischer Hydrops.....	9
1.2.2 Autoimmune Genese.....	10
1.2.3 Ionenhomöostase der Endolymphe.....	12
1.2.4 Endokrine Genese.....	13
1.2.5 Vaskuläre Genese.....	14
1.3 Prinzip genetischer Assoziationsstudien.....	14
1.3.1 Einzelnukleotidpolymorphismen.....	15
1.3.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....	15
1.3.3 Kopplungsungleichgewicht.....	16
1.3.4 Populationsstruktur.....	18
1.3.5 Gen und Gen-Set Analysen.....	19
1.4 Fragestellung.....	21
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Probandenrekrutierung.....	22
2.1.1 Kontrollprobanden.....	22
2.1.2 Patienten.....	22
2.2 Probenverarbeitung.....	23
2.2.1 DNA-Extraktion.....	23
2.2.2 Konzentrationseinstellung der DNA.....	24
2.2.3 Genotypisierung.....	25
2.3 Statistische Auswertung.....	27
2.3.1 Qualitätskontrolle.....	27

2.3.2	Imputation und Kombination der Genotypisierungsgruppen	30
2.3.3	Genomweite Assoziationsanalysen	31
2.4	Gen und Gen-Set-Analyse	31
2.4.1	Zusammenstellung der Gen-Sets	31
2.4.2	Gen- und Gen-Set-Analysen	34
2.4.3	SNV-Analyse	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Stichprobenbeschreibung	37
3.2	Gen-Analyse	37
3.3	SNV-Analyse der SNX20-NOD2-Region	38
3.4	Gen-Set-Analyse	40
4	Diskussion	46
4.1	Methoden	46
4.2	Ergebnisse	54
4.3	Ausblick	57
	Literaturverzeichnis	58
	Tabellenverzeichnis	72
	Abbildungsverzeichnis	73
	Abkürzungsverzeichnis	74
	Danksagung	75
	Selbstständigkeitserklärung	76

1 Einleitung

1.1 Morbus Menière

Der Morbus Menière ist eine Erkrankung des Innenohrs, die sich durch Attacken von periodisch auftretendem Drehschwindel, sensorischem Hörverlust im Tieftonbereich und einem Tinnitus auszeichnet (Lopez-Escamez et al., 2015). Die Frequenz und Dauer der Episoden ist dabei variabel und es konnten bisher keine sicheren Auslöser gefunden werden (Nakashima et al., 2016). Typischerweise liegt die Dauer der Episoden zwischen 20 Minuten und 24 Stunden, am häufigsten ist eine Dauer von ein bis zwei Stunden (Syed & Aldren, 2012).

Meist liegt zunächst eine unilaterale Erkrankung vor, das Fortschreiten in eine bilaterale Form ist allerdings häufig (Huppert et al., 2010). Insbesondere in der Frühphase der Erkrankung kommen auch Verläufe mit ausschließlich cochleären oder vestibulären Symptomen vor (Baumgarten et al., 1983). Da die klassische Symptomtrias hier zunächst ausbleibt, ist in solchen Fällen die Diagnose des Morbus Menière deutlich erschwert.

Die beschriebenen Symptome führen für die Patienten zu einer deutlichen Reduktion der Lebensqualität (Söderman et al., 2002; van Crujisen et al., 2006).

1.1.1 Diagnostik

Die Diagnostik des Morbus Menière stützt sich primär auf die klinische Symptomatik des Patienten. Neben anamnestischen Angaben über abgelaufene Schwindelepisoden ist insbesondere die apparative Feststellung des sensorischen Hörverlustes im Tieftonbereich für die Diagnosestellung wichtig (Lopez-Escamez et al., 2015). Zudem erfolgt durch die neurologische Untersuchung ein Ausschluss möglicher Differenzialdiagnosen. Weiterhin kommen die magnetresonanztomographische Darstellung des Innenohrs zum Nachweis eines endolymphatischen Hydrops und einige spezialisiertere Verfahren, wie die vestibulär evozierten myogenen Potentiale zum Einsatz (Magnan et al., 2018).

Zu den Differenzialdiagnosen des Morbus Menière zählen zunächst die anderen peripheren Schwindelerkrankungen, wie der benigne periphere paroxysmale Lagerungsschwindel und die Akute unilaterale Vestibulopathie/Neuritis vestibularis. Hier unterscheidet sich der Morbus Menière von den anderen Erkrankungen durch das periodische Auftreten des Schwindels und den sensorischen Hörverlust. Hinzu kommen charakteristische Untersuchungsbefunde anderer

Einleitung

Schwindelerkrankungen wie der Lagerungsnystagmus beim benignen paroxysmalen Lagerungsschwindel. Insbesondere bei der erstmaligen Präsentation eines Patienten und einem gering ausgeprägtem Hörverlust, kann sich die Differentialdiagnose schwierig gestalten (Syed & Aldren, 2012).

Neben peripheren Schwindelerkrankungen können auch zentral-neurologische Erkrankungen dem Morbus Menière ähnelnde Symptome auslösen. Eine wichtige Differentialdiagnose ist die vestibuläre Migräne (Lempert et al., 2012), die in einigen Fällen schwer vom Morbus Menière unterschieden werden kann (Radtke et al., 2011). Weitere Differentialdiagnosen sind u. a. neurovaskuläre Erkrankungen des Hirnstamms, das Vestibularisschwannom und die Autoimmunerkrankung des Innenohrs (AIED) (Lopez-Escamez et al., 2015).

Um die Diagnose des Morbus Menière zu objektivieren, wurden mehrere Klassifikationssysteme zur Vereinheitlichung der Diagnosekriterien vorgeschlagen. Hierdurch soll die Standardisierung des klinischen Vorgehens erleichtert werden, um die Diagnose und Therapie des Morbus Menière möglichst evidenzbasiert durchführen zu können. Zudem erlauben es international verwendete Diagnosekriterien, die Ergebnisse epidemiologischer und therapeutischer Studien besser zu vergleichen.

Im Klassifikationssystem der American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery (AAO-HNS) aus dem Jahr 1995 wurden vier Kategorien vorgeschlagen, die sich nach der Sicherheit der Diagnose unterscheiden. Alle Kategorien fordern den Ausschluss alternativer Ursachen der Symptomatik. Die Kategorie des „Möglichen Morbus Menière“ verlangt ausschließlich eine periodische Schwindelsymptomatik. Die folgende Kategorie des „Wahrscheinlichen Morbus Menière“ verlangt neben einer einmaligen Anfallsdauer von mehr als 20 Minuten auch eine apparative Sicherung einer Hörminderung und einen Tinnitus oder Ohrdruck. Für das Vorliegen eines „Sicheren Morbus Menière“ müssen neben den Kriterien des „Wahrscheinlichen Morbus Menière“ mindestens zwei Schwindelepisoden mit einer Dauer von mehr als 20 Minuten vorgelegen haben. Der „Gesicherte Morbus Menière“ unterscheidet sich von dieser Kategorie durch den zusätzlich gesicherten endolymphatischen Hydrops. Die Kriterien sind in Tabelle 1 zusammengefasst (Committee on Hearing and Equilibrium, 1995).

Das neuere Klassifikationssystem aus dem Jahr 2015, das u. a. von der Bárány Society, der European Academy of Otolaryngology und der AAO-HNS entwickelt wurde, enthält dagegen nur zwei Kategorien. Diese unterscheiden sich ebenfalls nach der Sicherheit der Diagnose. Der

Einleitung

niederfrequente, sensorische Hörverlust ist hier definiert als eine Erhöhung der Hörschwelle der Knochenleitung bei zwei benachbarten Frequenzen unterhalb von 2000 kHz um mindestens 35 dB. Sowohl der „Wahrscheinliche Morbus Menière“ als auch der „Sichere Morbus Menière“ müssen mindestens zwei Anfallsepisoden mit einer Mindestdauer von 20 Minuten aufweisen. Zudem muss für beide Kategorien ein Hörverlust oder ein Tinnitus vom Patienten angegeben werden. Der „Sichere Morbus Menière“ zeichnet sich dadurch aus, dass der Hörverlust für diese Kategorie mindestens einmal audiometrisch dokumentiert werden muss. Der Nachweis des endolymphatischen Hydrops findet sich in diesem System nicht mehr. Die Kriterien sind in Tabelle 2 angegeben (Lopez-Escamez et al., 2015).

Tabelle 1: *Klassifikationssystem nach der AAO-HNS aus dem Jahr 1995*

Kategorie	Diagnosekriterien
Bewiesener Morbus Menière	<ul style="list-style-type: none">- Kriterien wie sicherer Morbus Menière- Dazu histopathologische Sicherung des endolymphatischen Hydrops
Sicherer Morbus Menière	<ul style="list-style-type: none">- Zwei oder mehr sichere Schwindelepisoden einer Dauer von mehr als 20 Minuten- Mindestens einmalig dokumentierter, audiometrisch gesicherter sensorischer Hörverlust- Tinnitus oder Ohrdruck auf der Seite des betroffenen Ohres- Ausschluss alternativer Ursachen
Wahrscheinlicher Morbus Menière	<ul style="list-style-type: none">- Mindestens eine sichere Schwindelepisoden einer Dauer von mehr als 20 Minuten- Mindestens einmalig dokumentierter, audiometrisch gesicherter Hörverlust- Tinnitus oder Ohrdruck auf der Seite des betroffenen Ohres- Ausschluss alternativer Ursachen
Möglicher Morbus Menière	<ul style="list-style-type: none">- Menière-typische, periodische Schwindelepisoden ohne Nachweis eines sensorischen Hörverlustes oder konstantem Hörverlust- Ausschluss alternativer Ursachen

Tabelle 2: *Bárány-Klassifikationssystem aus dem Jahr 2015 nach Lopez-Escamez et al.*

Kategorie	Diagnosekriterien
Sicherer Morbus Menière	<ul style="list-style-type: none"> - Mindestens zwei Schwindelepisoden mit einer Dauer von 20 Minuten bis 24 Stunden - Mindestens einmalig audiometrisch dokumentierter, nieder- bis mittelfrequenter sensorischer Hörverlust eines Ohres vor, während oder nach einer Schwindelepisode - Periodische Einschränkung des Hörvermögens oder Tinnitus auf der Seite des betroffenen Ohres - Ausschluss alternativer Ursachen
Wahrscheinlicher Morbus Menière	<ul style="list-style-type: none"> - Mindestens zwei Schwindelepisoden mit einer Dauer von 20 Minuten bis 24 Stunden - Periodische Einschränkung des Hörvermögens oder Tinnitus auf der Seite des betroffenen Ohres - Ausschluss alternativer Ursachen

1.1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz des Morbus Menière wurde mit 190/100.000 Einwohner beschrieben (Harris & Alexander, 2010), wobei in der Literatur eine weite Spanne von Prävalenzwerten angegeben wird. In bisherigen Studien zeigten sich Werte von 17/100.000 Einwohnern in einer japanischen Population (Watanabe et al., 1995), bis zu Werten von 513/100.000 Einwohnern in einer finnischen Population (Havia et al., 2005).

Es zeigte sich in mehreren Studien eine relativ geringere Prävalenz des Morbus Menière in japanischen Populationen im Vergleich zu kaukasischen Populationen. (Tokumasu et al., 1982; Watanabe et al., 1995). In einer aktuelleren Studie von Shojaku & Wanatabe ergab sich für eine weitere japanische Population von ca. 55 000 Personen ein leichter Anstieg der Prävalenzwerte von 27,6/100.000 Einwohnern im Zeitraum von 1990 – 1994 auf 38,0/100.000 Einwohnern von 2000 – 2004 (Shojaku et al., 2005).

Für nicht-japanische Populationen zeigten neben der bereits erwähnten Studie von Harris & Alexander (2010) an über 60 Millionen US-amerikanischen Probanden auch andere Studien Prävalenzwerte von deutlich über 100/100.000 Einwohnern (Havia et al., 2005; Wladislavosky-Waserman et al., 1984). Es gibt allerdings auch Untersuchungen, die für kaukasische Populationen geringere Prävalenzwerte von beispielsweise 43/100.000 Einwohnern für eine finnische Population zeigten (Kotimäki et al., 1999).

Diese abweichenden Prävalenzwerte könnten an der schwierigen Diagnostik und den zwischen verschiedenen Studien uneinheitlichen Diagnosekriterien des Morbus Menière liegen, da kein spezifischer diagnostischer Test zur Sicherung der Diagnose bekannt ist. Andererseits könnten auch Unterschiede der Ethnizität, eine Veränderung der Prävalenz im zeitlichen Verlauf oder eine unterschiedliche medizinische Versorgung für die variablen Ergebnisse ursächlich sein (da Costa et al., 2002).

Wie auch bei anderen chronischen Erkrankungen nimmt die Prävalenz des Morbus Menière mit dem Alter zu (Harris & Alexander, 2010). Der Häufigkeitsgipfel der Erstdiagnose wurde mit 53 Jahren und einer Standardabweichung von 14 Jahren beschrieben (Van Esch et al., 2016).

In epidemiologischen Untersuchungen zeigte sich meist ein leichtes Überwiegen der weiblichen Patienten, wie beispielsweise mit einem Verhältnis von 1,89:1 in der Studie von Harris & Alexander aus den USA oder 1,5:1 in einer schwedischen Studie (Stahle et al., 1978).

1.1.3 Ätiologie und Pathophysiologie

Die Ätiologie des Morbus Menière ist bis heute ungeklärt. Für die Entstehung wird ein multifaktorielles Geschehen aus Umweltfaktoren und genetischen Faktoren vermutet. Als möglicher Umweltfaktor konnte in einer Studie an der Population der UK Biobank eine Assoziation des Morbus Menière mit einem erhöhten Body-Mass-Index gezeigt werden (Tyrrell et al., 2014). Ob es sich hierbei um einen kausalen Einflussfaktor handelt, ist allerdings unklar.

Für das Vorhandensein von genetischen Faktoren in der Ätiologie des Morbus Menière spricht neben den abweichenden Prävalenzwerten verschiedener Populationen auch das Auftreten von familiären Fällen des Morbus Menière. In der Mehrzahl der Fälle des Morbus Menière handelt es sich um sporadische Manifestationen, allerdings zeigten einige Studien auch das Auftreten von familiär gehäuften Fällen. Diese traten meist mit einer Häufigkeit von ca. 5 bis 10 % auf (Morrison et al., 2009; Requena et al., 2014), wobei es auch Studien mit deutlich höheren Anteilen familiärer Fälle gab (Arweiler-Harbeck et al., 2011). In der Stammbaumanalyse zeigte sich meist ein Vererbungsmuster, das einem autosomal dominanten Erbgang entsprach (Morrison et al., 2009; Requena et al., 2014).

An familiären Fällen des Morbus Menière wurde in einigen Studien eine Kopplungsanalyse durchgeführt, um mit dem Auftreten des Morbus Menière assoziierte genomische Lokalisationen zu identifizieren. Bei der Untersuchung des Auftretens des Morbus Menière an drei schwedischen Familien zeigte sich die Kopplung mit Markern auf Chromosom 12, als Locus wurde 12p12.3

Einleitung

bestimmt (Klar et al., 2006). Dieser Locus zeigte in einer Studie an 16 finnischen Familien keine Kopplung mit dem Auftreten des Morbus Menière (Hietikko et al., 2011). Arweiler-Harbeck et al. (2011) führten eine Kopplungsanalyse bei 19 deutschen Familien mit gehäuftem Auftreten des Morbus Menière durch. Dabei konnten sie eine Region auf Chromosom 5 als Kandidatenregion identifizieren. Zudem zeigten sich schwächere Hinweise auf eine Kopplung mit Markern des Chromosom 12. Tendenziell sprechen die heterogenen Untersuchungsergebnisse für das Vorliegen polygenetischer Einflussfaktoren (Chiarella et al., 2015).

Aufgrund dieser Hinweise auf eine teilweise genetische Grundlage des Morbus Menière wurden in der Vergangenheit einige genetische Assoziationsstudien durchgeführt. Die meisten Studien untersuchten dabei die SNVs (*single nucleotide variant*) einzelner Kandidatengene oder einer begrenzten Anzahl funktionell verwandter Gene auf eine Assoziation. Die bisherigen Ergebnisse konnten häufig nicht repliziert werden. Mögliche Ursachen sind u.a. zu geringe Fallzahlen, variable Diagnosekriterien oder Unterschiede der Ethnizität der der Studie zugrundeliegenden Population (Chiarella et al., 2015).

In der Pathophysiologie des Morbus Menière zeigt sich als histopathologisches Korrelat ein endolymphatischer Hydrops (Hallpike & Cairns, 1938). Hierbei kommt es zu einer Volumenzunahme unterschiedlicher Teile des Endolymphraumes zu Ungunsten des Perilymphraumes. In bildgebenden Untersuchungen wurde in allen betroffenen Innenohren ein endolymphatischer Hydrops nachgewiesen (Morita et al., 2009). Andere Studien zeigten allerdings, dass auch bei Patienten, die ausschließlich unter einem sensorischen Hörverlust leiden, häufig ein endolymphatischer Hydrops dargestellt werden kann (Attyé et al., 2018).

1.1.4 Therapie

Aufgrund der ungeklärten Pathophysiologie verbleiben auch bei der Therapie des Morbus Menière einige Unklarheiten. Eine kurative Therapie wurde bisher nicht beschrieben.

Während einer Anfallsepisode steht meist die Schwindelsymptomatik im Vordergrund. Diese kann akut durch die kurzfristige Gabe von Antihistaminika oder, in schweren Fällen, mit Benzodiazepinen therapiert werden (Strupp et al., 2013).

Da die begonnenen Krankheitsepisoden allerdings nicht medikamentös verkürzt werden können und zu einem progressiven Hörverlust führen, ist besonders die Prävention der Episoden wichtig. Hierzu wurden verschiedene medikamentöse und operative Therapieverfahren entwickelt, wobei klinische Studien zum Therapieerfolg häufig zu keinen eindeutigen Ergebnissen führten

Einleitung

(Nakashima et al., 2016). Dies kann möglicherweise auf die schwierige Diagnostik und abweichende Definitionen des Therapieerfolges zurückgeführt werden. Allerdings erklärt auch eine multifaktorielle Pathophysiologie die unklaren Studienergebnisse, da unterschiedliche Therapien jeweils nur bei einem Teil der Patienten wirken (Nakashima et al., 2016).

Besonders in Europa ist die medikamentöse Therapie mit Betahistin weit verbreitet. In einigen klinischen Studien zeigten sich positive Effekte auf die Attackenfrequenz und -intensität (Mira et al., 2003), insbesondere bei höheren Dosierungen (Strupp et al., 2008). Der Evidenzgrad der meisten bisher durchgeführten Studien ist allerdings niedrig, was u.a. durch einen schwierigen Einsatz von Plazebokontrollen bei langen Therapiedauern und abweichende Einschlusskriterien für Patienten bedingt ist (James & Burton, 2001). Die Wirksamkeit der Betahistintherapie wird meist auf einen positiven Effekt auf die cochleäre Durchblutung zurückgeführt.

Sofern die medikamentöse Therapie zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis führt, kann durch destruktive Verfahren das betroffene Vestibularorgan ausgeschaltet werden. Hierzu wird Gentamicin, ein Aminoglykosidantibiotikum, intratympanal injiziert. Nach der Ablation kommt es zu einer zentralen Kompensation, sodass die Gleichgewichtsfunktion im Alltag weitestgehend unbeeinträchtigt bleibt. Entsprechend stellt ein bilateraler Morbus Menière eine Kontraindikation dar, da hier keine Kompensation stattfinden kann. Ein weiteres Problem der Gentamicintherapie ist ein schwer vorhersagbarer Hörverlust bei etwa 25 % der behandelten Patienten, der durch die anatomische Nähe der Cochlea bedingt ist (Colletti et al., 2007). Die Kontrolle des Schwindels ist allerdings meist erfolgreich, wie mehrere klinische Studien zeigten (Pullens & van Benthem, 2011).

Eine weitere untersuchte Therapie ist die intratympanale Injektion von Glucocorticoiden. Hier kommt es nicht zu einer irreversiblen Schädigung des Innenohrs. In neueren klinischen Studien zeigten sich bei dieser Therapieform eine ähnliche Kontrolle des Schwindels wie bei der Gentamicintherapie bei geringeren Nebenwirkungen (Patel et al., 2016). Andere Studien zeigten allerdings eine der Gentamicintherapie unterlegene Schwindelkontrolle. Während 93 % der mit Gentamicin behandelten Patienten eine erfolgreiche Schwindelkontrolle erreichten, war dies bei nur 63 % der mit Dexamethason behandelten Patienten der Fall (Casani et al., 2011). Die therapeutische Wirkung wird auf verschiedene mögliche Effekte zurückgeführt. Zum einen haben Glucocorticoide einen starken entzündungshemmenden Effekt und werden bei der Behandlung vieler Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Andererseits haben Glucocorticoide meist auch eine

Einleitung

mineralocorticoide Wirkung, womit sie Einfluss auf den Wasserhaushalt und die Ionenhomöostase nehmen könnten (Hamid & Trune, 2008).

Basierend auf der Beobachtung des endolymphatischen Hydrops wurden mehrere operative Verfahren zur Behandlung des Morbus Menière entwickelt. Bei der Saccotomie wird der endolymphatische Sack eröffnet und durch einen eingesetzten Shunt offengehalten. Dadurch soll der endolymphatische Hydrops reduziert und der Druck im Endolymphsystem abgesenkt werden (Shea, 1966). Alternativ wird bei der reinen Dekompression nur der endolymphatische Sack freigelegt. Durch die Ausdehnung soll auch hier der endolymphatische Druck gesenkt werden. Es gibt wenige hochwertige Studien zu den operativen Verfahren. In zwei randomisierten und kontrollierten Studien konnte allerdings kein Vorteil der jeweiligen Eingriffe gegenüber einer Placebooperation gezeigt werden (Pullens et al., 2013).

1.1.5 Aufbau und Funktion des Innenohrs

Die Funktionen des Innenohrs, die als relevant für die Hypothesen zur Entstehung des Morbus Menière angesehen werden, setzen sich aus dem Gleichgewichtssinn, vermittelt durch das Vestibularsystem, und dem Hörsinn, vermittelt durch die Cochlea, zusammen. Das Vestibularsystem besteht aus den drei Bogengängen, die die Rotationsbeschleunigung des Kopfes messen, und Sacculus und Utriculus, die Linearbeschleunigungen detektieren (Ekdale, 2016).

Das Innenohr befindet sich innerhalb eines Hohlraumes des Felsenbeins. Aufgrund seines komplexen Aufbaus wird dieser als knöchernes Labyrinth bezeichnet. Innerhalb des knöchernen Labyrinths befindet sich das mit Endolymphe gefüllte membranöse Labyrinth, welches durch eine membranöse Umhüllung von der umgebenden Perilymphe getrennt ist. Der Endolymphraum spiegelt den anatomischen Aufbau des Innenohrs wider und besteht aus Anteilen der Bogengänge, des Sacculus und Utriculus, und dem Ductus cochlearis. Alle Abschnitte des Endolymphraumes sind miteinander verbunden und bilden somit einen kontinuierlichen Bereich (Abbildung 1, Seite 9) (Paulsen & Waschke, 2010). Der Ductus cochlearis ist mit dem Sacculus durch den Ductus reuniens verbunden. Eine weitere Struktur des Endolymphraumes ist der endolymphatische Sack, der vermutlich an der Regulation des endolymphatischen Druckes (Swinburne et al., 2018) und immunologischen Prozessen beteiligt ist (Kämpfe Nordström et al., 2019). Verbunden ist er mit dem Sacculus durch den Ductus endolymphaticus.

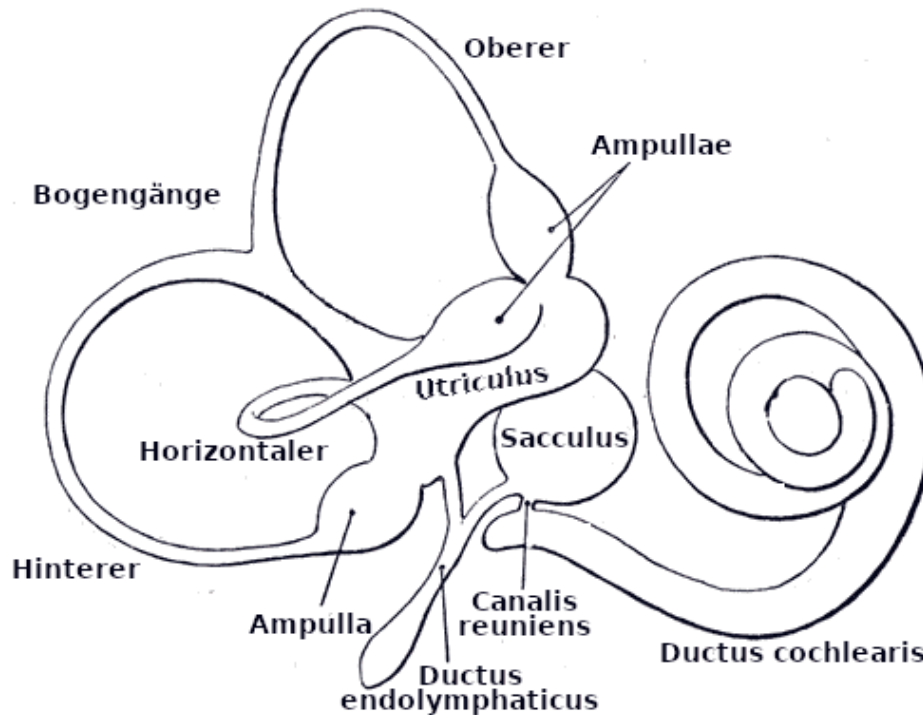


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Abschnitte des Endolymphraumes. Abbildung nach Gray's Anatomy, 20. Aufl. 1918, gemeinfrei nach UrhG §64

Die Zusammensetzung der Endolymphe ist für die sensorischen Funktionen des Innenohrs essenziell. Die Endolymphe zeichnet sich dabei durch eine von anderen extrazellulären Flüssigkeiten abweichende Ionenzusammensetzung aus. Die Zusammensetzung ähnelt der intrazellulären Flüssigkeit und weist hohe Kalium- und niedrige Natriumkonzentrationen auf. Die Perilymphe dagegen ist über den Ductus perilymphaticus mit dem Subarachnoidalraum verbunden und zeigt eine dem Liquor cerebrospinalis ähnliche Zusammensetzung mit hohen Natrium- und niedrigen Kaliumkonzentrationen (Bosher & Warren, 1968). Die Zusammensetzung der Endolymphe wird durch Ionenporter innerhalb der Stria vascularis aufrechterhalten (Anniko & Wróblewski, 1986).

1.2 Hypothesen zur Entstehung des Morbus Menière

1.2.1 Endolymphatischer Hydrops

Da die Symptomatik des Morbus Menière sich gut mit einer gestörten Funktion des Innenohrs erklären lässt, wird der endolymphatische Hydrops häufig als Ursache für die Symptomatik betrachtet. Dabei wird das unvermittelte Eintreten der Symptome zu Beginn einer Attacke durch das Einreißen der trennenden Membran zwischen Endo- und Perilymphraum erklärt. Durch die

Vermischung der Flüssigkeiten soll es zu einer Änderung der Ionenzusammensetzung und dadurch zu einer Störung der Sinneszellen kommen (Dohlman, 1980).

Ob unterschiedliche ätiologische Faktoren zur gemeinsamen Endstrecke des endolymphatischen Hydrops führen oder der Morbus Menière auf eine einzige Ursache zurückgeführt werden kann ist unklar (Flook & Lopez-Escamez, 2018; Oberman et al., 2017). Im Folgenden sollen einige der Hypothesen zur Pathogenese des Morbus Menière dargestellt werden.

1.2.2 Autoimmune Genese

Eine autoimmune Genese des Morbus Menière wurde vorgeschlagen. Dafür spricht eine epidemiologische Assoziation mit einigen Autoimmunerkrankungen. Dabei handelte es sich um die rheumatoide Arthritis, den systemischen Lupus erythematodes und die ankylosierende Spondylitis (Gazquez et al., 2011). In einer Studie auf der Basis der UK Biobank zeigte sich ebenfalls die Assoziation des Morbus Menière mit allergischen und autoimmunen Erkrankungen (Tyrrell et al., 2014). Zudem zeigt der Morbus Menière, wie auch viele Autoimmunerkrankungen (Ngo et al., 2014), ein häufigeres Auftreten bei Frauen. Neben epidemiologischen Hinweisen konnte auch in Tiermodellen an Meerschweinchen durch die Immunisierung mit Autoantigenen ein endolymphatischer Hydrops induziert werden (Yoo et al., 1983).

Basierend auf dem Verdacht einer autoimmunen Genese des Morbus Menière wurden die HLA-Gene in mehreren Studien untersucht. Bei einigen Autoimmunerkrankungen zeigten sich Häufungen verschiedener HLA-Haplotypen wie z. B. von HLA-B27 im Fall des Morbus Bechterew (Brewerton et al., 1973). Die Studien zum Morbus Menière zeigten bisher allerdings keine eindeutigen Ergebnisse. Auch wenn einige Assoziationen beschrieben wurden, konnten diese meist nicht repliziert werden. Insgesamt zeigten sich gehäuft Assoziationen von Allelen des HLA-C-Locus. In Tabelle 3 sind Ergebnisse von Assoziationsstudien, die die HLA-Typen von am Morbus Menière erkrankten Patienten untersucht haben, zusammengefasst.

Für SNVs der in Immunprozessen involvierten Gene TNF- α , Interferon- γ und „Macrophage migration inhibitory factor“ (MIF) konnte keine Assoziation zum Morbus Menière gezeigt werden (Gazquez et al., 2013). In einer Studie aus dem Jahr 2013 untersuchten Requena et al. sieben SNVs innerhalb von vier Kandidatengen. Dabei handelte es sich um die Gene der Toll-like-Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR10. Diese spielen eine Rolle in der angeborenen Immunität und sind in der Pathogenese einiger Autoimmunerkrankungen involviert (Farrugia & Baron, 2017). Von den untersuchten SNVs kam das C-Allel des SNVs rs11096955 innerhalb des

Einleitung

TLR10-Gens signifikant seltener bei am Morbus Menière erkrankten Patienten vor als in der Kontrollgruppe (Requena et al., 2013). Eine Studie an einer japanischen Population zeigte die Assoziation des Polymorphismus rs1800587, der sich im Interleukin-1-alpha-Gen befindet (Furuta et al., 2011). Interleukin-1-alpha ist ein Zytokin, das verschiedene Entzündungssignale vermittelt (Di Paolo & Shayakhmetov, 2016). In einer neueren Studie von Frejo et al. wurden gezielt SNPs genotypisiert, die in anderen Studien eine Assoziation mit Autoimmunerkrankungen gezeigt haben. Dabei wurde die Assoziation des C-Allels des SNPs rs4947296 mit dem bilateralen Morbus Menière identifiziert, der in weiteren Untersuchungen einen Effekt auf die Transkription vieler Gene in mononukleären Zellen des peripheren Blutes hatte. Weitere Analysen zeigten die Anreicherung von Genen des TWEAK/Fn14-Signalwegs unter den Genen mit veränderter Expression (Frejo et al., 2017).

Tabelle 3: *Ergebnisse von Assoziationsstudien zu HLA-Typen bei am Morbus Menière erkrankten Patienten*

Publikation	Population	Probanden	Untersuchte HLA-Typen	Assoziierte Allele
Xenellis et al. (1986)	britisch	41/187	A, B, C	HLA-CW7
Koyama et al. (1993)	japanisch	20/470	A, B, C, DR, DQ, DP	HLA-DRB1*1602
Lopez-Escamez et al. (2002)	spanisch	54/534	A, B, C, DR	keine
Melchiorri et al. (2002)	italienisch	41/101	A, B, C, DR	HLA-Cw*07
Yeo et al. (2002) ¹	koreanisch	39/199	A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1	HLA-B44 HLA-Cw*0303 HLA-Cw*0602 HLA-Cw*0102 HLA-DRB1*15
Lopez-Escamez et al. (2007)	spanisch	80/250	DRB1, DQB1	HLA-DRB1*1101
Khorsandi et al. (2011)	iranisch	22/91	C	HLA-Cw*04
Chan et al. (2018)	taiwanisch	35/70	A, B, C, DRB1, DQ	HLA-A*11

*Unter Probanden ist zunächst die Anzahl der Patienten und dann die der Kontrollprobanden angegeben. Das Signifikanzniveau lag für alle Studien bei $p < 0,05$
¹ohne Korrektur für multiples Testen*

1.2.3 Ionenhomöostase der Endolymphe

Das Vorkommen eines endolymphatischen Hydrops beim Morbus Menière legt eine Störung des Gleichgewichtes der Endolymphproduktion und -resorption nahe. Die Produktion der Endolymphe findet in der Stria vascularis statt (Salt et al., 1987), während für die Resorption eine Rolle des endolymphatischen Sacks vermutet wird. Dies basiert auf der Beobachtung, dass das Verschließen des Ductus endolymphaticus im Tiermodell zur Ausbildung eines endolymphatischen Hydrops führte (Horner, 1993).

Das Ionengleichgewicht wird durch den Transport von Ionen durch Ionentransporter aufrechterhalten. Entsprechend wurde eine Störung der Ionenkanäle als Ursache des endolymphatischen Hydrops vermutet. In Studien an humanen hydroptischen und physiologischen Innenohren konnte jedoch kein abweichendes Färbemuster für die Na-K-ATPase gezeigt werden (Keithley et al., 1995). Allerdings kann die Ionenzusammensetzung auch durch die Aktivität passiver Ionenkanäle beeinflusst werden.

Die KCNE-1- und KCNE-3-Gene kodieren für spannungsabhängige Kaliumkanäle, die auch im Innenohr exprimiert werden und bei einer Funktionsstörung zu auditiven und vestibulären Störungen führen (Warth & Barhanin, 2002). Bei der Sequenzierung der Exons der KCNE1- und KCNE3-Gene einer japanischen Studienpopulation fanden Doi et al. (2005) eine Assoziation von rs1805127 (KCNE1) und rs2270676 (KCNE3) mit dem Morbus Menière. Eine weitere Studie untersuchte je sieben SNVs innerhalb der beiden Gene an einer kaukasischen, US-amerikanischen Population. Dabei wurden auch die beiden von Doi et al. (2005) beschriebenen SNVs untersucht, es zeigte allerdings keiner der SNVs eine signifikante Assoziation zum Morbus Menière (Campbell et al., 2010). In einer Studie an einer finnischen Population, in der mehrere zuvor beschriebene SNVs in Kandidatengenen auf eine Assoziation zum Morbus Menière untersucht wurden, konnte nur die Assoziation von rs1805127 im KCNE1-Gen repliziert werden (Hietikko et al., 2012). Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2016, die auf den drei beschriebenen Studien basierte, zeigte keine signifikante Assoziation der zuvor beschriebenen SNVs mit dem Morbus Menière (Li et al., 2016).

Teggi et al. genotypisierten im Jahr 2017 SNVs in Genen mit bekannter Funktion für die Ionenhomöostase. Dabei wurden für 155 Patienten mit sicherem Morbus Menière und 186 Kontrollprobanden 33 SNVs genotypisiert. Die Kontrollprobanden waren Teilnehmer eines ambulanten Drogenentzugsprogramms und wurden wie die Patienten an zwei italienischen Universitätskliniken rekrutiert. Es zeigte sich für vier SNVs eine signifikante Assoziation zum Morbus Menière. In einem Replikationsexperiment wurden die gleichen Patienten mit anderen

Kontrollprobanden verglichen. Die zweite Kontrollgruppe bestand aus 413 Probanden, die im Rahmen einer niederländischen Studie genotypisiert wurden (Y.-P. Liu et al., 2015). In der zweiten Untersuchung zeigten weiterhin SNVs innerhalb von zwei Genen, SIK1 (rs3746951) und NCX1 (rs487119), eine signifikante Assoziation mit dem Auftreten des Morbus Menière (Teggi et al., 2017).

1.2.4 Endokrine Genese

Eine weitere Hypothese zur Entstehung des Morbus Menière geht von einer endokrinen Ursache aus. Genprodukte des Vasopressin/Aquaporin-Systems, das auch an der Wasserregulation in der Niere beteiligt ist, konnten im Innenohr nachgewiesen werden (Beitz et al., 2003). Bei den Aquaporinen handelt es sich um Transmembranproteine, welche den Fluss von Wasser über die Zellmembran hinweg ermöglichen. Die Aquaporine werden hormonell primär über Vasopressin (Antidiuretisches Hormon, ADH) reguliert (Knepper & Inoue, 1997). In einer Studie wurden erhöhte mRNA-Werte des Vasopressinrezeptors im endolymphatischen Sack von Menière-Patienten nachgewiesen (Kitahara et al., 2008). Einige klinische Studien zeigten erhöhte Vasopressinwerte im Blut betroffener Patienten (Aoki et al., 2005), wobei diese Ergebnisse in anderen Studien nicht repliziert werden konnten (Lim et al., 2003). In Mausmodellen führt die Gabe von Vasopressin zur Entstehung eines endolymphatischen Hydrops (Degerman et al., 2015).

Aufgrund der Rolle der Aquaporine in der Flüssigkeitshomöostase des Innenohrs wurden auch deren Gene auf genetische Varianten bei Menière-Patienten untersucht. In einer US-amerikanischen Studie wurden die Exons der Aquaporin-2-Gene von 12 am Morbus Menière erkrankten Patienten unklarer Ethnizität sequenziert, wobei sich keine Mutationen im Vergleich zur nicht spezifizierten Referenzsequenz zeigten (Mhatre et al., 2002).

Candreia et al. (2010) führten eine Mutationsanalyse der kodierenden Regionen von AQP1 – 4 für 34 am Morbus Menière erkrankten Patienten aus der Schweiz durch. Dabei zeigte sich im Vergleich zu den Sequenzen von 100 nicht näher beschriebenen Kontrollprobanden das Auftreten der konservativen Sequenzabweichung c.105G->C im AQP3-Gen bei 11 von 34 Patienten. Diese Variante kam in keiner der Kontrollsequenzen vor.

In einer Assoziationsstudie an einer japanischen Population wurden u. a. die SNVs rs2075575 (AQP4) und rs3736309 (AQP5) auf eine Assoziation zum Morbus Menière untersucht. Die 86 am Morbus Menière erkrankten Patienten wurden an einem Universitätsklinikum rekrutiert. Die Kontrollgruppe bestand aus 2136 Probanden, die aus einer Studie zu Alterungsprozessen

stammten. Bei der Untersuchung zeigte sich eine signifikante Risikoreduktion durch das G-Allel von rs3736309 im AQP5-Gen (Nishio et al., 2013).

1.2.5 Vaskuläre Genese

Als eine weitere mögliche Ursache des Morbus Menière wird eine Durchblutungsstörung des Innenohrs diskutiert. Zum einen konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass Betahistin den cochleären Blutfluss dosisabhängig steigern kann (Laurikainen, 2000), zum anderen zeigte Betahistin in der klinischen Anwendung positive Effekte auf die Attackenfrequenz des Morbus Menière (Strupp et al., 2008). Zudem zeigte sich bei der histologischen Untersuchung der Stria vascularis eine reduzierte Anzahl von Kapillargefäßen (Kariya et al., 2009). Die Stria vascularis ist ein kapillarisiertes Epithel innerhalb der Cochlea, das an der Produktion der Endolymphe und der Aufrechterhaltung ihrer Ionenzusammensetzung beteiligt ist (Salt et al., 1987).

Diese Hypothese lässt sich schwer von der Hypothese der autoimmunen Genese des Morbus Menière abgrenzen, da die Durchblutung des Innenohrs auch durch Entzündungsmediatoren beeinflusst wird (Trune & Nguyen-Huynh, 2012).

1.3 Prinzip genetischer Assoziationsstudien

Aufgrund der ungelösten Ätiologie und vermuteten genetischen Ursachen des Morbus Menière wurden in der Vergangenheit einige genetische Assoziationsstudien zu seinem Auftreten durchgeführt (Chiarella et al., 2015). Im Folgenden sollen die Grundlagen genetischer Assoziationsstudien erläutert werden.

In genetischen Assoziationsstudien wird versucht, eine statistische Häufung bestimmter genetischer Varianten bei Probanden mit einem untersuchten Phänotyp festzustellen. Der Phänotyp kann beispielsweise die Entwicklung einer bestimmten Krankheit oder auch eine quantitative Messung, wie die Höhe des arteriellen Blutdrucks, sein. Falls eine Variante (z. B. ein Allel eines SNVs) signifikant mit einem Phänotyp assoziiert ist, weist dies auf einen direkten, meist aber indirekten Effekt der Variante innerhalb der Entstehung des Phänotyps hin (Bush & Moore, 2012).

Zur Prüfung der Assoziation werden für ein Probandenkollektiv sowohl die untersuchten Phänotypen als auch die Genotypen bestimmt. Dazu werden zwei sich ergänzende Ansätze verwendet, zum einen Kandidatengenstudien, in denen basierend auf Hypothesen zur Pathophysiologie der untersuchten Erkrankung oder im Rahmen einer genaueren Kartierung einer chromosomalen Region ein bestimmtes Kandidatengen für die Genotypisierung ausgewählt wird. Genetische Marker dieses Gens, insbesondere auch seltene Varianten, werden daraufhin auf eine

Assoziation mit der Erkrankung untersucht (Kwon & Goate, 2000). Zum anderen werden in genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) bis zu einer Million unterschiedliche genetische Marker bestimmt und weitere 10 – 20 Millionen Marker basierend auf der Kopplungsstruktur des menschlichen Genoms und sequenzierter Referenzgenome geschätzt. Die so gewonnenen Genotypdaten werden anschließend auf eine Assoziation mit dem untersuchten Phänotyp getestet.

1.3.1 Einzelnukleotidpolymorphismen

Der Großteil der Varianten, die in GWAS bestimmt werden, besteht aus Einzelnukleotidvarianten (SNVs). Bei SNVs handelt es sich um den weitaus häufigsten Typ einer Variation innerhalb des menschlichen Genoms. SNVs beschreiben Variationen an einer definierten Position des Genoms. Neben dem Austausch einzelner Basen werden auch Insertionen und Deletionen weniger Basenpaare als SNV bezeichnet. Sofern ein SNV mit einer gewissen Mindestfrequenz, typischerweise 1 %, in einer Population vorkommt, wird er als Einzelnukleotidpolymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) bezeichnet (Tam et al., 2019). Die Häufigkeit der selteneren Variante innerhalb einer bestimmten Population wird dabei als „minor allele frequency“ (MAF) bezeichnet.

SNPs werden meist durch einen „reference snp identifier“ im Format rs##### bezeichnet. Die entsprechenden Nummern werden durch die dbSNP, ein Projekt des National Center for Biotechnology Information, vergeben (Sherry et al., 2001).

1.3.2 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz kann die Häufigkeit der Genotypen an einem Locus innerhalb einer Population unter gewissen Bedingungen aus den Allelfrequenzen an diesem Locus berechnet werden. Die Genotypfrequenzen ergeben sich dabei durch die probabilistische Kombination der einzelnen Allelfrequenzen (Hardy, 1908). Die erforderlichen Bedingungen sind u. a. eine unendlich große Population und die Abwesenheit evolutionärer Prozesse am untersuchten Locus. Auch wenn diese Bedingungen in der Realität nie vollständig erfüllt sind, kann das Hardy-Weinberg-Gesetz für viele Populationen näherungsweise angenommen werden (Ryckman & Williams, 2008).

Ein Locus befindet sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, wenn die beobachteten Genotypfrequenzen im Rahmen zufälliger Schwankungen den vorhergesagten Frequenzen entsprechen. Um zu testen, ob sich ein bestimmten Locus im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet, wurden verschiedene statistische Testverfahren entwickelt (Wigginton et al., 2005).

Eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht kann u. a. ein Indiz für einen ablaufenden evolutionären Prozess am untersuchten Locus oder eine Vermischung unterschiedlicher Ursprungspopulationen sein. Eine weitere Anwendung der Untersuchung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes ist die Detektion von Genotypisierungsfehlern bestimmter Loci (Turner et al., 2011).

1.3.3 Kopplungsungleichgewicht

Das Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) beschreibt die statistische Assoziation der Genotypen von zwei SNVs auf einem Chromosom. Diese Assoziation entsteht meist dadurch, dass die genetische Rekombination zwischen den diploiden Chromosomenpaaren aus populationsgenetischer Sicht langsam abläuft. Dadurch werden mehrere benachbarte SNVs häufig gemeinsam als sogenannter Haplotyp vererbt (Wall & Pritchard, 2003).

Mit jeder Generation kommt es im Verlauf der Meiose zu einigen Rekombinationsereignissen zwischen homologen Chromosomenpaaren. Dabei werden die Genotypen auf einer Seite des Rekombinationspunktes zwischen den Chromosomen ausgetauscht. Mehrere SNVs, zwischen denen keine Rekombination stattgefunden hat, werden daher gemeinsam vererbt (siehe Abbildung 2, Seite 17).

Zur exakten Bestimmung des LD müssen die zwei Allele jedes SNVs chromosomenspezifisch bestimmt werden, damit für beide homologen Chromosomen der jeweilige haploide Genotyp bekannt ist. Diese Information wird als die Phase der Genotypdaten bezeichnet. Die für GWAS verwendeten Genotypisierungsplattformen bestimmen typischerweise nicht die Phase der Genotypen, so dass das LD hier nur mit statistischen Methoden annäherungsweise bestimmt werden kann (Slatkin, 2008).

In GWAS kann das vorhandene LD dazu verwendet werden, die Genotypen nicht direkt bestimmter SNVs zu schätzen. Da die Genome vieler Probanden unterschiedlicher Populationen bereits vollständig sequenziert wurden (International HapMap, 2005; The Genomes Project Consortium, 2015), können an experimentell bestimmten Genotypen durch das Mappen auf ein Referenzgenom die vorkommenden Haplotypen bestimmt werden (Howie et al., 2012). Anhand der Haplotypen können dann auch für nicht direkt genotypisierte SNVs Genotypen angegeben werden (Howie et al., 2012). Diese Schätzung wird als Imputation bezeichnet. Durch die Imputation kann auch die Power zur Detektion assoziierter SNVs erhöht werden (Anderson et al., 2008). Da die Bestimmung der Haplotypen und die Imputation auf statistischen Grundlagen beruht,

Einleitung

sind die so bestimmten Genotypen nicht mit Sicherheit korrekt. Die folgenden Berechnungen werden in der Regel mit ausgegebenen Wahrscheinlichkeiten für die Existenz eines Alles durchgeführt, seltener mit dem auf dieser Basis zugeordneten wahrscheinlichsten Allel.

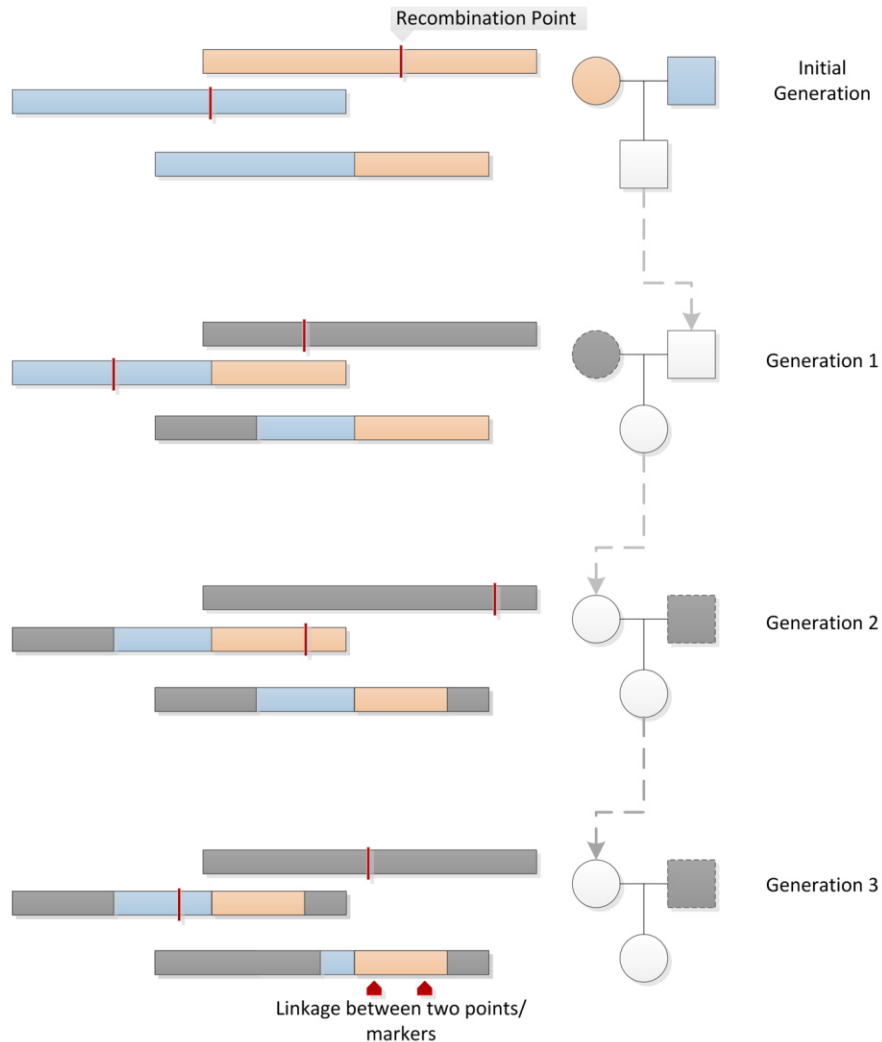


Abbildung 2: Auswirkung von Rekombinationsereignissen auf die Korrelation der Genotypen benachbarter Loci. Abbildung aus Bush und Moore (2012), Creative Commons Lizenz.

Bei der Interpretation von Assoziationsergebnissen muss das LD ebenfalls beachtet werden. Eine Assoziation eines bestimmten SNVs mit einer Erkrankung bedeutet nicht unbedingt, dass ein Effekt von diesem bestimmten Locus ausgeht. Die Assoziation kann auch durch ein LD des untersuchten Locus mit einem anderen, für den Effekt verantwortlichen SNV verursacht werden. Das können auch seltene Varianten sein, die bisher noch nicht charakterisiert wurden (Wang et al., 2010).

1.3.4 Populationsstruktur

Die häufigste Ursache für systematisch abweichende Allelfrequenzen innerhalb einer Population liegt in einer unterschiedlichen Abstammung und der dadurch bedingten Entstehung von Subpopulationen. Eine solche systematische Abweichung der Allelfrequenz innerhalb einer Population wird als Populationsstruktur bzw. „population stratification“ bezeichnet.

Die Populationsstruktur kann in genetischen Assoziationsstudien zu fehlerhaften, nicht-kausalen Assoziationen von SNVs mit der untersuchten Erkrankung führen (Hellwege et al., 2017). Sofern die Prävalenz der untersuchten Erkrankung sich zwischen verschiedenen Subpopulationen unterscheidet, fungiert die Zugehörigkeit zu einer Subpopulation als Confounder, der sowohl die Allelfrequenzen als auch die Erkrankungswahrscheinlichkeit beeinflusst und so zu einer statistischen Assoziation führt (Hellwege et al., 2017).

Aufgrund dieser Fehlerquellen ist es prinzipiell wünschenswert, dass alle Probanden eine möglichst homogene Abstammung aufweisen. Um in genetischen Assoziationsstudien Effekte der Populationsstruktur zu vermeiden, besteht eine Möglichkeit darin, ausschließlich Probanden aus einer relativ homogenen Population zu rekrutieren (Tian et al., 2008).

Zusätzlich zu diesem Verfahren oder auch als alleinige Maßnahme zur Reduktion von Effekten der Populationsstruktur kann in der logistischen Regression für die Populationsstruktur kontrolliert werden. Um die Populationsstruktur eines bestimmten Probandenkollektivs zu quantifizieren, wird anhand der Genotypdaten eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Dies ist ein mathematisches Verfahren, welches ermöglicht, einen möglichst großen Teil der Variabilität innerhalb eines Datensatzes durch möglichst wenige unabhängige Variablen (Dimensionen) zu erfassen (Jackson, 2005). Da die unterschiedliche Zugehörigkeit zu Subpopulationen meist der größte systematische Einflussfaktor auf die Abweichung von Allelfrequenzen ist, lässt sich die Populationsstruktur in der Regel in den ersten Dimensionen der Hauptkomponentenanalyse darstellen (Price et al., 2006).

Eine exemplarische Hauptkomponentenanalyse für Probanden inhomogener Abstammung ist in Abbildung 3 dargestellt. Nelis et al. (2009) untersuchten die Populationsstruktur der Bevölkerung Europas. Dazu sammelten sie Genotypdaten aus verschiedenen Studien an europäischen Populationen und führten diese zu einem Datensatz zusammen. An diesem wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, in der sich die Zugehörigkeit zu einem Herkunftsland anhand der ersten beiden Hauptkomponenten darstellen ließ.

Einleitung

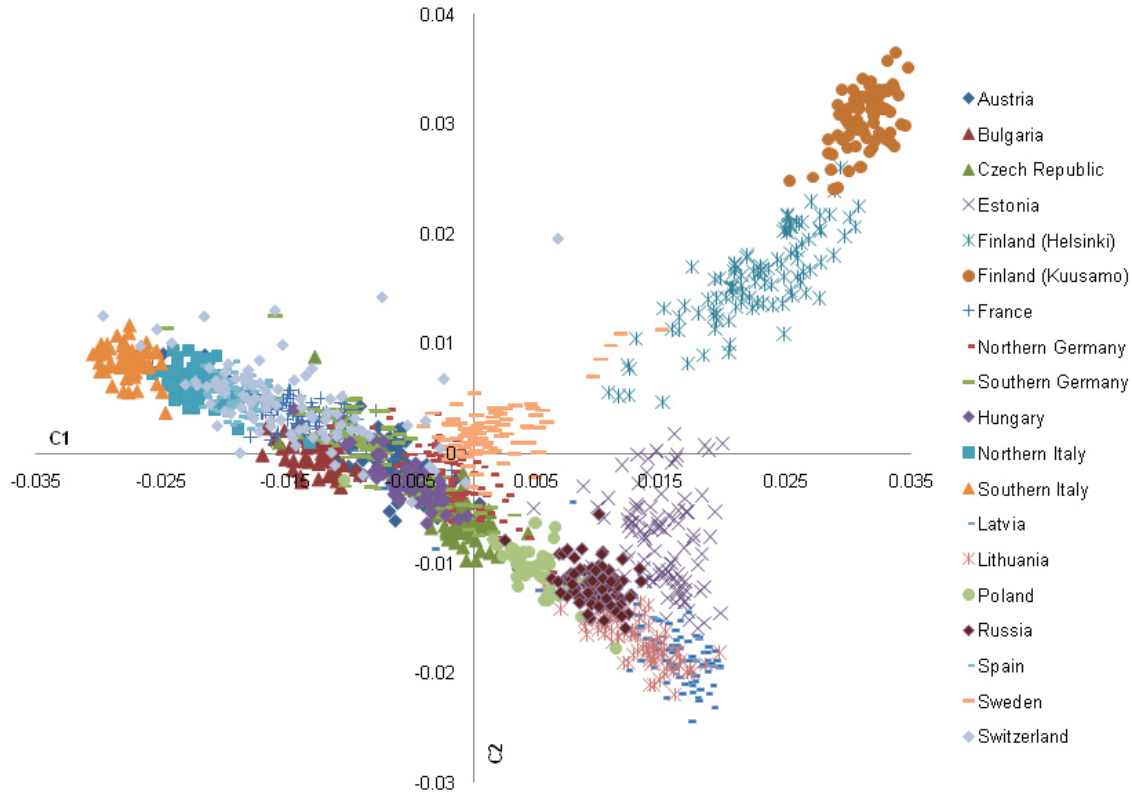


Abbildung 3: Darstellung der ersten zwei Dimensionen der Hauptkomponentenanalyse eines europäischen Probandenkollektivs. Jeder Marker entspricht einem Probanden, die Farben signalisieren das Herkunftsland. In den ersten zwei Dimensionen der Ergebnisse zeigt sich eine deutliche Gruppierung entsprechend den Herkunftsländern. Abbildung aus Nelis et al. (2009), Creative Commons Lizenz.

1.3.5 Gen und Gen-Set Analysen

Neben den SNV-basierten Analysen werden auch Untersuchungen basierend auf funktionell gruppierten SNVs durchgeführt. Grundlage für diese Studien ist die Annahme, dass klassische SNV-basierte Auswertungen nur einen Teil der genetischen Einflüsse erfassen. Diese Annahme beruht auf dem Phänomen der „missing snp heritability“. Aus den Ergebnissen einer GWAS lässt sich die zu erwartende Heritabilität des untersuchten Phänotyps berechnen. In vielen Studien ist der so errechnete Wert allerdings wesentlich geringer, als die tatsächlich beobachtete Heritabilität. Diese Differenz wird als „missing snp heritability“ bezeichnet (Manolio et al., 2009). Ihr Auftreten legt nahe, dass es weitere, bisher noch nicht detektierte genetische Einflussfaktoren gibt. Mögliche Ursache dafür, dass schwache Assoziationen in SNV-basierten Analysen nicht detektiert werden, liegen in einer konservativen Korrektur für das Testen vieler SNVs (Wang et al., 2011).

Aufgrund dieser Annahmen wurden weitere Verfahren entwickelt, um mehrere SNVs nach bestimmten Kriterien zusammenzufassen und gemeinsam auf eine Assoziation mit dem

Einleitung

untersuchten Phänotyp zu testen. Die Power zur Detektion einer Assoziation der SNV-Gruppe ist dabei höher als zur Detektion der Assoziation eines einzelnen SNVs (Wang et al., 2011). Beispielsweise können alle SNVs innerhalb eines Gens zusammengefasst werden und dann gemeinsam auf eine Assoziation getestet werden. So kann untersucht werden, ob die Varianten des Gens als Ganzes eine Assoziation mit dem Krankheitsphänotyp aufweisen. Da SNVs innerhalb regulatorischer Elemente wie Promotoren, Enhancern oder Silencern allerdings auch Effekte auf die Erkrankung haben können, und diese für viele Gene nicht genau charakterisiert sind, können mit dieser Methode nicht alle relevanten SNVs für jedes Gen erfasst werden. Alternativ können alle SNVs innerhalb einer gewissen Region um das Gen herum zusammengefasst werden. Wie groß diese Region gewählt werden muss, ist jedoch unklar, da Enhancer über sehr weite Distanzen von mehr als 100 Kilobasen wirken können (Spitz, 2016).

In einem weiteren Schritt können mehrere Gene in Gen-Sets zusammengefasst werden. Diese werden nach funktionellen Kriterien zusammengestellt, um so beispielsweise einen Zusammenhang mit bestimmten intrazellulären Signalwegen zu testen (Nam et al., 2010). Es gibt große Datenbanken, in denen Gen-Sets für unterschiedliche funktionelle Kategorien zusammengestellt wurden (Kanehisa et al., 2015). Für die eigentliche Analyse kann hypothesenfrei eine große Zahl von Gen-Sets ausgewählt werden, und auf eine Assoziation getestet werden. Alternativ können basierend auf vorher bekannten Hypothesen zur Pathophysiologie der untersuchten Erkrankung spezielle Gen-Sets für die Testung ausgewählt werden. Dadurch muss entsprechend für weniger Tests korrigiert werden. Die hierfür verwendeten Sets können entweder aus Datenbanken ausgewählt werden, oder basierend auf einer Literaturrecherche zusammengestellt werden (Mooney & Wilmot, 2015).

Bei der eigentlichen statistischen Testung der Gen-Sets kann nach unterschiedlichen Verfahren vorgegangen werden. Man kann zum einen testen, ob generell eine Assoziation der Gene des Sets mit der Erkrankung vorliegt. Zum anderen kann getestet werden, ob die Gene innerhalb des Sets stärker mit dem Phänotyp assoziiert sind als die Gene außerhalb. Dies wird als kompetitive Testung bezeichnet. Insbesondere bei einer hohen Heritabilität und Polygenie der untersuchten Erkrankung bietet die kompetitive Testung Vorteile, da unter diesen Bedingungen weniger falsch-positive Assoziationen gefunden werden (de Leeuw et al., 2016).

1.4 Fragestellung

Die wahrscheinlich multifaktorielle Ätiologie und Pathophysiologie des Morbus Menière ist bis heute ungeklärt. Als histopathologisches Korrelat lässt sich bei Patienten ein endolymphatischer Hydrops des Innenohrs nachweisen. Es existieren verschiedene Hypothesen zur Entstehung des Morbus Menière, wobei diese einander nicht ausschließen und damit zur gemeinsamen Endstrecke des endolymphatischen Hydrops führen könnten.

Das Auftreten familiärer Formen des Morbus Menière sowie die variable Prävalenz in Populationen unterschiedlicher Ethnizität, sprechen für das Vorliegen genetischer Einflussfaktoren in der Ätiologie des Morbus Menière. In Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien wurde versucht, bestimmte genomische Loci mit einem Einfluss auf die Krankheitsentstehung zu identifizieren. Die Studienergebnisse sind dabei heterogen und konnten in anderen Untersuchungen oft nicht repliziert werden. Mögliche Erklärungen dafür sind unterschiedliche genetischen Einflussfaktoren in verschiedenen Populationen oder eine zu geringe Power zur Detektion von Assoziationen aufgrund relativ geringer Fallzahlen. Um die Power zur Detektion von Assoziationen zu erhöhen, können die Ergebnisse einzelner SNVs basierend auf verschiedenen Kriterien in Gen- und Gen-Set-Analysen miteinander kombiniert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Assoziationsergebnisse (p-Werte bei etwa 8 Mio. SNVs) einer noch nicht publizierten GWAS an 314 Patienten mit Morbus Menière und 2614 Kontrollen verwendet, um eine Relevanz bestimmter Gene für die Erkrankung nachzuweisen. Dies wurde durch eine genbasierte Analyse untersucht, die eine Häufung signifikant assoziierter SNVs innerhalb eines Gens überprüft. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich für ausgewählte Hypothesen zur Pathophysiologie des Morbus Menière eine genetische Suszeptibilität nachweisen ließ. Dazu wurden hypothesenbasiert zu den verschiedenen Theorien zur Entstehung des Morbus Menière Gen-Sets in einer Literaturrecherche ausgewählt und falls kein passendes Gen-Set gefunden wurde erstellt. Anhand positiver Assoziationsergebnissen sollten dabei Rückschlüsse auf involvierte Prozesse in der Pathophysiologie des Morbus Menière gezogen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Probandenrekrutierung

2.1.1 Kontrollprobanden

Als Kontrollprobanden wurden ca. 3000 gesunde, nicht verwandte Probanden kaukasischer Abstammung aus dem Münchner Großraum rekrutiert.

Nach ihrer Einwilligung zur Teilnahme an der Studie wurde zunächst ein Leitfadenterview durchgeführt. Dabei wurden Informationen zu medizinischen und insbesondere neurologischen Vorerkrankungen bei den Probanden und erstgradigen Verwandten erhoben. Darauf folgte die Durchführung strukturierter Interviews, bestehend aus dem strukturierten klinischen Interview für DSM IV (SCID I und SCID II) (First, 1997; First et al., 1997) und dem „Family History Assessment Module“ (Rice et al., 1995).

Weiterhin wurde neben der Blutabnahme eine orientierende neurologische Untersuchung durchgeführt, um Patienten mit akuten und chronischen neurologischen Ausfällen aus der Studie auszuschließen. Zudem wurden alle Probanden ausgeschlossen, bei denen sich in den Interviews neurologische oder psychiatrische Vorerkrankungen zeigten.

2.1.2 Patienten

Die Rekrutierung der an Morbus Menière erkrankten Patienten erfolgte am Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum des Klinikums der Universität München. Die Patienten befanden sich dort aufgrund ihrer Schwindelbeschwerden in Behandlung. Die Diagnose wurde durch ärztliche Mitarbeiter der Schwindelambulanz anhand von klinischer Vorgeschichte, Hörschwellentest, neurologischer Untersuchung und kalorischer Testung gestellt.

Zur Diagnosestellung und -einteilung wurden die Diagnosekriterien aus Lopez-Escamez et al. (2015) angewendet. In die weitere Analyse wurden Patienten mit einem klinisch sicheren oder klinisch wahrscheinlichen Morbus Menière eingeschlossen. Dazu mussten anamnestisch eine periodische Höreinschränkung sowie mindestens zwei Schwindelepisoden einer Dauer von 20 Minuten bis 24 Stunden vorliegen. Patienten mit der Diagnose anderer peripherer Schwindelerkrankungen oder Hinweisen auf eine zentrale Schwindelerkrankung als potentielle Differentialdiagnose wurden aus den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Alle Probanden wurden über die Teilnahmebedingungen der Studie aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme. Die Blutabnahme und das Ausfüllen eines strukturierten Fragebogens erfolgten durch Medizinstudenten im Rahmen eines Promotionsvorhabens. Der Fragebogen beinhaltete u.a. Angaben zu Herkunft, Krankheitsverlauf, weiteren Vorerkrankungen und Erkrankungen erstgradiger Verwandter des Patienten.

2.2 Probenverarbeitung

Die nach der Aufklärung durchgeführte Blutentnahme erfolgte in EDTA-Monovetten. Diese wurden bei -80 °C eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die weitere Verarbeitung und Genotypisierung erfolgte durch geschultes Fachpersonal nach standardisierten Protokollen.

2.2.1 DNA-Extraktion

Zur Extraktion der DNA wurde nach dem Protokoll des Qiagen DNA Blood Maxi Kit (Qiagen, Hilden) verfahren. Das verwendete Material ist in Tabelle 4 aufgeführt.

In einer 50 ml Zentrifugenröhre wurde das EDTA-Blut mit PBS-Puffer auf 10 ml Volumen aufgefüllt. Zur Lyse der Zellen wurden daraufhin 500 µl Qiagen Protease und 12 ml Guanidinhydrochlorid-haltiger Lysepuffer hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 60 Sekunden auf dem Vortexmischer homogenisiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 30 Minuten in einem 70 °C warmen Wasserbad inkubiert.

Nach abgelaufener Inkubation wurde die DNA mittels Applikation von 10 ml Ethanol (96%–100%) und zweiminütiger Homogenisierung auf dem Vortexmischer gefällt. Die ausgefallene DNA wurde zusammen mit dem Überstand auf eine QIAmp Maxi Säule aufgebracht und mit 3000 rpm (Umdrehungen pro Minute) bei Raumtemperatur für 3 Minuten zentrifugiert. Dabei wurde die DNA an die Silikagelmembran in der QIAmp Maxi Säule gebunden.

Zur Entfernung verbliebener Protein- und RNA-Kontaminationen wurden zunächst 5 ml des Guanidin-HCl-haltigen Waschpuffers auf die QIAmp Maxi Säule aufgebracht und mit 4000 rpm bei Raumtemperatur für 2 Minuten zentrifugiert. In einem zweiten Waschschrift wurden 5 ml ethanolhaltiger und salzarmer Waschpuffer aufgebracht und für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 4000 rpm zentrifugiert. Hierdurch wurden verbleibende Salzreste des ersten Waschpuffers entfernt. Nachfolgend wurde die Silikagelmembran getrocknet.

Die gereinigte DNA wurde nun von der Silikagelmembran gelöst. Hierzu wurde die QIAmp Maxi Säule zweimal mit insgesamt 1,5 ml TRIS-haltigem AE-Puffer für 2 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die im Puffer gelöste DNA jeweils für 2 Minuten bei Raumtemperatur und 5000 rpm abzentrifugiert. Die so gewonnene DNA-Stammlösung wurde zur Lagerung in zwei Mikroschraubröhren überführt.

Tabelle 4: *Verwendetes Material für die Extraktion der DNA.*

Material, Reagenz, Gerät	Hersteller
EDTA Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
50 ml Zentrifugenröhre	Sarstedt, Nümbrecht
Mikro-Schraubröhre, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
1× PBS-Puffer:	
8 g NaCl	
0,2 g KCl	
1,44 g Na ₂ HPO ₄	Reagenzien von Carl Roth, Hamburg
0,24 g KH ₂ PO ₄	
Ad 1 l mit Aqua dest.	
Mit NaOH auf pH 7,4	
Qiagen DNA Blood Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol Rotipuran (>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

2.2.2 Konzentrationseinstellung der DNA

Für die Genotypisierung wurde eine einheitliche DNA-Konzentrationen benötigt. Da sich die Extraktionsausbeute zwischen den Proben unterschied, musste zunächst eine einheitliche Konzentration der DNA eingestellt werden. Die Zielkonzentration betrug dabei 50 ng/µl. Das zur Konzentrationseinstellung verwendete Material ist in Tabelle 5 aufgelistet.

Zur Messung der DNA-Konzentration wurde der Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen verwendet. Zudem wurde eine Standardreihe bekannter DNA-Konzentrationen ausgehend von 100 ng/µl „*human genomic DNA*“ angefertigt. Die verwendeten Konzentrationen waren 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 und 0 ng/µl, als Verdünnungsmittel wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

Zur Vorbereitung der Messung wurden 5 µl der DNA-Proben mit 45 µl Wasser verdünnt. In einer schwarzen 96-Well Platte mit flachem Boden wurden nun pro Well 50 µl autoklaviertes und destilliertes Wasser vorgelegt. Je 5 µl der Standardreihe wurden in Duplikaten in je ein Well hinzugegeben. Die vorverdünnte DNA wurde ebenfalls in Duplikaten und mit 5 µl pro Well verwendet. Pro Well der Standardverdünnungsreihe und DNA-Proben wurden nun 145 µl des im Verhältnis 1:156 verdünnten PicoGreen Farbstoffes zugegeben. Die so erreichten Endverdünnungen betragen 1:200 für PicoGreen und 1:400 für die DNA-Lösungen.

Die Messung erfolgte halbautomatisiert durch die „Janus Automated Workstation“. Die vorbereitete 96-Well Platte wurde durch den Greifarm des Pipettierroboters in das Fluoreszenzmessgerät (Victor 3 Multilabel Counter 1420) überführt. Das Messgerät führte vor der Messung für 30 Sekunden Schüttelbewegungen in Form einer Doppellellipse durch. Dadurch wurde eine homogene Verteilung der DNA-Lösungen erreicht. Zur Messung wurde der PicoGreen Farbstoff mit Licht einer Wellenlänge von 485 nm angeregt. Die Messung der Fluoreszenzstrahlung erfolgte bei einer Wellenlänge von 520 nm.

Die Messwerte wurden automatisch an einen Computer übermittelt, der anhand der Standardreihe die Konzentration der DNA-Proben ermittelte. Daraufhin wurde die für die Verdünnung benötigte Menge der DNA-Probe und des Wassers berechnet. Die Verdünnung wurde automatisiert durch einen Pipettierroboter durchgeführt.

Tabelle 5: *Verwendetes Material für die Konzentrationseinstellung der DNA.*

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

2.2.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung der SNVs erfolgte mittels SNV-Arrays. Dies ist ein Chipformat, das auf verschiedenen Plattformen durchgeführt werden kann und bei dem gleichzeitig eine große Zahl von SNVs eines Probanden bestimmt wird. Die Details der eingesetzten Methodik unterscheidet

sich dabei zwischen den Herstellern. Das zugrundeliegende Prinzip ähnelt sich allerdings meist. Auf einem Substrat sind viele Kugeln, an die jeweils definierte Oligonukleotid-Sonden gebunden sind, aufgebracht. Über die jeweiligen Sequenzen kann jeder Kugelposition auf dem Assay ein SNV zugeordnet werden. Die amplifizierte und fragmentierte Probanden-DNA wird auf den Chip aufgebracht und hybridisiert mit den Oligonukleotid-Sonden. Durch die abweichenden Nukleotidsequenzen an den SNV-Positionen, unterscheidet sich die Affinität der unterschiedlichen SNV-Allele für die Sonden. Diese Affinitätsunterschiede können durch die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen in ein messbares Lichtsignal umgewandelt werden. Welcher Bestandteil des Arrays markiert wird, unterscheidet sich zwischen den Herstellern. Neben der Markierung der Probanden-DNA wird auch die Einzelbasenextension am SNV-Locus mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden eingesetzt (LaFramboise, 2009; Steemers et al., 2006). Nach einem Waschschrift ergibt die Fluoreszenzmessung eine Matrix aus Lichtintensitätswerten, die über die vorbekannten Positionen der Oligonukleotid-Sonden den jeweiligen SNVs zugeordnet werden können.

Da die Genotypisierung in mehreren zeitlich aufeinanderfolgenden Gruppen (*Batches*) erfolgte, wurden unterschiedliche Genotypisierungschips und -plattformen verwendet. Die Daten wurden innerhalb ihrer jeweiligen Gruppe imputiert und der Qualitätskontrolle unterzogen, und daraufhin zu einem gemeinsamen Datensatz zusammengefügt. Insgesamt gab es sieben Gruppen. Aus den Gruppen 1–6 wurden nur die Daten der Kontrollprobanden in die Studie aufgenommen. Gruppe 7 enthielt Patienten mit unterschiedlichen Schwindelerkrankungen, wobei für die vorliegende Studie nur die an Morbus Menière erkrankten Patienten und die Kontrollprobanden ausgewertet wurden. Die verwendeten Plattformen und die jeweiligen Probandenzahlen sind in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: *Einteilung der Genotypisierungs-Gruppen.*

Gruppe	Genotypisierungsplattform	Post-Imputation	GWAS	
		N	N Kontrollen	N Fälle
1	Illumina Human610-Quad Illumina Human660W-Quad (Priebe et al., 2013)	319	0	0
2	Illumina HumanHap 300 (Need et al., 2009)	709	262	0
3	Affymetrix 6.0 (Bramon et al., 2014)	954	925	0
4	Illumina HumanHap 300 (Stefansson et al., 2008)	287	99	0
5	Illumina Human OmniExpress 12 (Lencz et al., 2014)	607	578	0
6	Illumina Omni1-Quad (Galfalvy et al., 2015)	352	267	0
7	Illumina HumanOmniExpress-24	1347	478	314

2.3 Statistische Auswertung

Die Qualitätskontrolle und Zusammenfassung der gruppenspezifischen Genotypen in einem Mega-Datensatz, sowie die genomweiten SNV-Analysen wurden innerhalb der Arbeitsgruppe als Grundlage für wissenschaftliche Publikationen durchgeführt (Rujescu et al., 2018) und für die weiteren Auswertungen zur Verfügung gestellt. Für alle Auswertungen wurde das GRCh37 Referenzgenom verwendet.

2.3.1 Qualitätskontrolle

Aufgrund der großen Anzahl bestimmter Marker können auch kleine Fehler bei der Genotypisierung zu falsch-positiven oder -negativen Ergebnissen führen. Daher wurden die erhobenen Genotyp-Daten vor der weiteren Auswertung einer stringenten Qualitätskontrolle unterzogen.

Die Rohdaten, die durch die Genotypisierungsplattform generiert wurden, sind typischerweise Lichtintensitätswerte für jeden SNV-Locus jedes Probanden. Aus diesen Werten wird dann mittels proprietärer Algorithmen die Wahrscheinlichkeit für die möglichen Genotypen

aa, aA oder AA berechnet. Sofern die Wahrscheinlichkeit eines Genotyps oberhalb eines bestimmten Grenzwertes liegt, wird der entsprechende Genotyp angegeben. Ansonsten wird das Ergebnis als „missing“ bezeichnet. Der relative Anteil an Loci, die erfolgreich bestimmt wurden, wird als „Call-rate“ bezeichnet. Die Call-rate eines SNVs gibt an, bei wie vielen Probanden der jeweilige SNV erfolgreich genotypisiert wurde. Die Call-rate eines Probanden dagegen bezeichnet den Anteil der SNVs eines Probanden, für die ein Genotyp bestimmt werden konnte. Eine häufige Ursache für niedrige Call-rates ist eine geringe DNA-Qualität. (Anderson et al., 2010)

Die Qualitätskontrolle erfolgte mit dem Programm PLINK Version 1.9 (Chang et al., 2015). Basierend auf allen SNVs mit einer SNV-Call-rate von über 95 % wurde für jeden Probanden die Probanden-Call-rate bestimmt. Je nach verwendeter Genotypisierungsplattform wurden die Probanden bei Werten von unter 96 bis 99 % von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die variablen Ausschlusskriterien wurden aufgrund der variierenden Probandenzahl in den verschiedenen *Batches* verwendet. Anhand der Auswertung der Heterozygotenfrequenz von SNVs des X-Chromosoms wurde das genetische Geschlecht der Probanden bestimmt. Sofern das so bestimmte Geschlecht vom angegebenen Geschlecht des Probanden abwich, wurde der Proband in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt. Durch diese Maßnahmen wurden Probanden mit zweifelhaften Genotypdaten noch vor der Qualitätskontrolle der SNVs ausgeschlossen, damit deren möglicherweise fehlerhaft genotypisierten Daten nicht die Qualitätskontrolle der SNVs verfälschen.

Anhand der verbliebenen Probanden wurde erneut die SNV-Call-rate bestimmt. SNVs mit einer Call-rate von unter 99 % wurden aus der weiteren Analyse entfernt. SNVs, deren Call-rate sich zwischen Patienten und Kontrollen um mehr als 2 % unterschied, wurden ebenfalls entfernt. Ein weiterer Schritt der Qualitätskontrolle, um mögliche Fehler während der Genotypisierung zu beseitigen, ist die Untersuchung der Abweichung der Genotypfrequenzen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für jeden SNV. Da auch eine evolutionäre Selektion zu einer solchen Abweichung führen kann, erfolgte die Testung bei Kontrollprobanden stringenter als bei Patienten. Bei der Testung der Abweichung wurde der exakte Test nach Fischer verwendet. Die Signifikanzniveaus lagen dabei bei $p < 10^{-6}$ für Kontrollen und $p < 10^{-10}$ für Patienten. Bei entsprechender Abweichung wurden die jeweiligen SNVs ausgeschlossen. Für die Qualitätskontrolle der X-chromosomalen SNVs wurden ausschließlich die Genotypen weiblicher Probanden verwendet. SNVs mit einer Call-rate von unter 95 % wurden entfernt. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde mit einem

Signifikanzniveau von $p < 10^{-6}$ überprüft. Zudem wurden alle SNVs entfernt, für die mehr als 2 % der männlichen Probanden einen heterozygoten Genotyp aufwiesen.

Für die Untersuchung der Heterozygotenfrequenz und der Populationsstruktur der Probanden wurden besonders stringent kontrollierte SNVs der Autosomen verwendet. Das Vorgehen zur Erzeugung dieses Marker-Sets ist im Folgenden beschrieben. Zunächst wurden alle SNVs mit einer Call-rate von weniger als 99 % entfernt. Zur Testung der Einhaltung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes wurde für dieses Set ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gewählt. Alle SNVs mit einer MAF von unter 5 % wurden ausgeschlossen. SNVs, die im Kopplungsungleichgewicht miteinander standen, wurden zudem durch „pruning“ aus dem Set entfernt. Dafür wurde der „indep pairwise“ Befehl von PLINK mit den Parametern $r^2 = 0,2$, „window size“ = 1500 und „step size“ = 150 SNVs verwendet. Zudem wurden die SNVs mehrerer Regionen mit einer erhöhten Rekombinationsrate, wie z. B. die HLA-Gene, entfernt. Anhand des so erzeugten Marker-Sets wurden die folgenden probandenbasierten Qualitätskontrollen durchgeführt.

Die Heterozygotenfrequenz beschreibt den Anteil der SNVs eines Probanden, die einen heterozygoten Genotyp aufweisen. Typische Ursache für eine besonders hohe Heterozygotenfrequenz ist die Kontamination der Probe des Probanden mit Fremd-DNA. Da diese fehlerhaften Daten die weitere Auswertung verfälschen würden, wurden alle Probanden, deren Heterozygotenfrequenz um mehr als 20 % vom durchschnittlichen Wert abwich, entfernt.

Eng verwandte Probanden und das mehrfache Einschließen eines Probanden (Duplikat) können zu fehlerhaften Ergebnissen der Assoziationsanalyse führen. Um den Grad der Verwandtschaft zwischen zwei Probanden zu bestimmen, kann anhand der Genotypen ein statistisches Maß der Übereinstimmung ($\hat{\pi}$) berechnet werden. Ein Wert von etwa 1 spricht dabei für ein Duplikat, 0,5 für erstgradige Verwandte und 0,25 für zweitgradige Verwandte. Der Wert für $\hat{\pi}$ wurde für alle Probandenkombinationen berechnet und für Paare mit $\hat{\pi} > 0,1875$ wurde einer der Probanden, vorzugsweise der Kontrollproband, entfernt.

Da die größte Ursache von Variabilität der Genotypen innerhalb eines Probandenkollektivs häufig die Zugehörigkeit der Probanden zu unterschiedlichen Populationen bzw. Subpopulationen ist, kann mittels einer Hauptkomponentenanalyse die Populationsstruktur innerhalb der ersten Dimensionen dargestellt werden. So kann grafisch die Zugehörigkeit von Patienten und Kontrollprobanden zur selben Population überprüft werden. Deutliche Ausreißer wurden aus der

weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm EIGENSTRAT (Price et al., 2006).

Nach der Entfernung der nicht den Qualitätskriterien entsprechenden Probanden wurden für die weiteren Analysen wieder die weniger stringent kontrollierten SNVs verwendet.

2.3.2 Imputation und Kombination der Genotypisierungsgruppen

Da die verschiedenen Gruppen mit unterschiedlichen Genotypisierungsplattformen genotypisiert wurden, wurden nicht für alle Probanden dieselben SNVs bestimmt. Um einen gemeinsamen Datensatz zur Auswertung zu erhalten und die Power zur Detektion assoziierter Varianten zu erhöhen, wurden die verbleibenden SNVs mithilfe bekannter Haplotypdaten imputiert. Zudem wurden auch einfache Insertions/Deletions-Varianten imputiert. Für die Imputation wurden die Daten des 1000 Genomes Referenzsamples (Phase 1 Version 3) verwendet (The Genomes Project Consortium, 2015). Da bei der Genotypisierung der SNVs nicht die Phase des Genotyps bestimmt wurde, müssen die wahrscheinlichsten Haplotypen mit statistischen Methoden bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde das Programm SHAPEIT (Delaneau et al., 2012) verwendet. Anhand der Haplotypen wurden dann mit dem Programm IMPUTE2 (Howie et al., 2012) die SNVs in Blöcken einer Größe von 3 Megabasen imputiert. Die Imputation des X-Chromosoms erfolgte dabei für Männer und Frauen getrennt. Bei der Imputation der SNVs hat der geschätzte Genotyp immer eine gewisse Unsicherheit; diese wird mit dem INFO-Score angegeben. Dabei entsprechen Werte nahe Eins einer hohen und Werte nahe Null einer niedrigen Sicherheit der Imputation.

Im nächsten Schritt wurden alle Gruppen zu einem gemeinsamen Mega-Datensatz zusammengefügt. Dabei wurden nur die imputierten SNVs verwendet, deren INFO-Score größer als 0,6 war. SNVs, deren MAF sich zwischen zwei der Gruppen um mehr als 10 % unterschied, wurden entfernt. Heterozygotenfrequenz, Verwandtschaftsgrad und die Populationsstruktur wurden erneut nach denselben Kriterien wie innerhalb der einzelnen Plattformen anhand der oben beschriebenen Qualitätskriterien überprüft. Die zwei ersten Komponenten der Hauptkomponentenanalyse zeigten keine Korrelation mit der Gruppe der Patienten [$p = 0,15$ (PC1) und $p = 0,07$ (PC2)], was gegen Unterschiede der Populationsstruktur zwischen den verschiedenen Gruppen spricht.

Nachdem, basierend auf der Populationsstruktur, 19 Ausreißer (10 Fälle und 9 Kontrollen) entfernt wurden, verblieben für die weitere Analyse 2928 Probanden (314 Fälle und 2 614 Kontrollen).

Da alle Patienten in einer Gruppe genotypisiert wurden, wurden nur die SNVs der Kontrollen auf Abweichungen der Genotypen zwischen den verschiedenen Plattformen untersucht. Sofern sich ein Unterschied eines SNVs zwischen zwei Gruppen mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.001$ zeigte, wurden diese SNVs ausgeschlossen. Von den 7 993 929 nach der Qualitätssicherung verbliebenen SNVs wurden dadurch 117 602 SNVs entfernt.

2.3.3 Genomweite Assoziationsanalysen

Die Auswertung der SNV-Assoziationen mit dem Krankheitsphänotyp erfolgte mit PLINK 1.9 (Chang et al., 2015). Für jeden SNV wurde ein Referenzallel festgelegt. Die Richtung der Assoziation wurde relativ zu diesem Referenzallel angegeben. Verwendet wurde eine logistische Regression, bei der für Alter, Geschlecht und die zwei ersten Dimensionen der Hauptkomponentenanalyse kontrolliert wurde. Die Analyse der Genotypen erfolgte nach einem additiven Modell. Dabei wird der Genotyp so codiert, dass die Häufigkeit des Referenzallels an jedem Locus als Parameter in die Regression einfließt. Dies basiert auf der Annahme, dass die Effektstärke direkt mit der Häufigkeit des Referenzallels zusammenhängt. Aus den Ergebnissen der logistischen Regression wurden p-Werte für eine signifikante Abweichung des Genotyps zwischen Patienten und Kontrollprobanden für jeden SNV bestimmt. Mit den Ergebnissen der Regressionsanalyse (i.e. *summary statistics*) wurden die weiteren Analysen durchgeführt.

2.4 Gen und Gen-Set-Analyse

2.4.1 Zusammenstellung der Gen-Sets

Aufgrund der begrenzten Probandenzahl wurde eine hypothesenbasierte Testung von Gen-Sets zu den Hypothesen zur Entstehung des Morbus Menière durchgeführt. Auf eine hypothesenfreie Testung verschiedener Gen-Sets wurde verzichtet, da für die Anzahl der getesteten Sets korrigiert werden muss und typische, unspezifische Set-Sammlungen Hunderte bis Tausende Sets enthalten (Liberzon et al., 2011). Somit wäre die Fähigkeit zur Detektion einer realen Assoziation aufgrund der konservativen Korrektur sehr gering (Mooney & Wilmot, 2015).

Die bei der Zusammenstellung der Gen-Sets berücksichtigten Hypothesen orientierten sich an den in der Einleitung vorgestellten Theorien zur Krankheitsentstehung. Diese waren die Hypothesen der autoimmunen Genese, der gestörten Ionenhomöostase, der endokrinen Genese und der vaskulären Genese.

Material und Methoden

In einer initialen Plausibilitätsanalyse wurde überprüft, für welche der Hypothesen das Erstellen eines validen Gen-Sets praktikabel erschien. Dazu mussten Proteine zellulärer Prozesse, deren Mitwirken bei der Entstehung des Morbus Menière von der Hypothese postuliert wurde, möglichst spezifisch abgrenzbar sein.

Für die Hypothese der gestörten Ionenhomöostase erschien dieses Kriterium erfüllt, da in der Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase die Funktion von Ionenkanälen des Innenohrs wahrscheinlich ist. Für die Hypothese der endokrinen Genese erschien es ebenfalls möglich, ein valides Gen-Set zu überprüfen, da die Regulierung der Aquaporinfunktion einen relativ gut abgrenzbaren Signalweg darstellt.

Die Auswahl eines bestimmten Signalweges zur Hypothese der autoimmunen Genese des Morbus Menière erschien zunächst nicht erfolgsversprechend, da die Prozesse, die im Verlauf autoimmuner Erkrankungen ablaufen, heterogen sind und eine Vielzahl unterschiedlicher Signalkaskaden in verschiedenen Zelltypen betreffen. Die Arbeit von Frejo et al. (2017) legt allerdings den TWEAK/Fn14-Signalweg als Kandidaten nahe, da sie für diesen bereits Hinweise auf einen Zusammenhang mit dem Morbus Menière erbringen konnten.

Bei der Hypothese der vaskulären Genese des Morbus Menière ergeben sich ähnliche Probleme wie bei der autoimmunen Genese. Viele verschiedene Signalwege in verschiedenen Zelltypen beeinflussen den funktionellen Zustand der Blutgefäße. Zudem gibt es im Bereich der Entzündungsmediatoren Überschneidungen mit möglichen Einflüssen des Immunsystems (Trune & Nguyen-Huynh, 2012). Es wurden basierend auf dieser Hypothese bis 2019 auch keine genetischen Assoziationsstudien zu Kandidatengenomen durchgeführt. Andere Hinweise auf bestimmte, möglicherweise beteiligte Signalwege waren bis zu diesem Zeitpunkt ebenfalls nicht vorhanden. Aufgrund dieser Einschränkungen wurde für die Hypothese vaskulärer Faktoren in der Pathogenese des Morbus Menière kein Gen-Set getestet.

Für die verbleibenden drei Hypothesen wurde die „Molecular Signatures Database“ (MSigDB) nach passenden Gen-Sets durchsucht. Die MSigDB ist eine Datenbank für Gen-Sets des Broad Institute und der University of California, San Diego. In diesem Projekt werden Gen-Sets aus verschiedenen Quellen gesammelt (Liberzon et al., 2015; Liberzon et al., 2011). Zum Durchsuchen der Gen-Sets wurde die „browse“-Funktion der Website der MSigDB mit der Version 7.0 (Veröffentlichung August 2019) verwendet.

Um Gen-Sets für den TWEAK/Fn14 Signalweg zur Überprüfung der autoimmunen Genese des Morbus Menière zu finden wurde der Suchbegriff „TWEAK“ verwendet. Dabei wurde ein Gen-Set gefunden. Dieses basierte auf einem Paper von Bhattacharjee et al. (2012).

Zur Untersuchung einer möglichen endokrinen Assoziation mit dem Morbus Menière wurde nach dem Suchbegriff „Vasopressin“ gesucht. Die Suche ergab vier Gen-Sets. Von diesen beinhalteten drei Sets nur das Vasopressin-Gen und dessen Rezeptoren. Das vierte Set befasste sich mit der renalen Wasserhomöostase durch Aquaporine und Vasopressin. Da die Regulierung der Aquaporine innerhalb des Innenohrs der Niere ähnelt (Beitz et al., 2003), wurde dieses Set zur Überprüfung der Hypothese der endokrinen Genese des Morbus Menière verwendet.

Für die Hypothese der gestörten Ionenhomöostase wurde separat nach den Suchbegriffen „endolymph“ und „inner ear“ gesucht. Die Suche nach „endolymph“ führte zu keinen Ergebnissen. Von den zehn Ergebnissen der Suche nach „inner ear“ beschäftigte sich keins der Gen-Sets mit Ionenkanälen des Innenohrs.

Da keine bereits definierten Gen-Sets zur Überprüfung der Hypothese der gestörten Ionenhomöostase gefunden wurden, wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, um Publikation als Grundlage zur Erstellung von Gen-Sets zu finden. Es wurde nach Studien gesucht, die die Expression von Ionenkanälen im Innenohr untersuchten. Ein Ablaufschema der Literaturrecherche findet sich in Abbildung 4.

Für die Literaturrecherche wurde PubMed verwendet, eine Datenbank für wissenschaftliche Publikationen aus dem Bereich der Biowissenschaften und Medizin des National Center for Biotechnology Information der USA (NCBI Resource Coordinators, 2018). Als Suchphrase wurde » „inner ear“ AND „ion channel“ AND „gene expression“ « verwendet und der durchsuchte Zeitraum auf 1950 – 2019 eingeschränkt. Die Suche lieferte 15 Ergebnisse. Die älteste Publikation stammte aus dem Jahr 1995, die neueste aus dem Jahr 2019.

Die Metadaten und Abstracts der Publikationen wurden darauf untersucht, ob es sich um primäre wissenschaftliche Arbeiten handelte. Dabei wurden zwei Reviews ausgeschlossen.

Material und Methoden

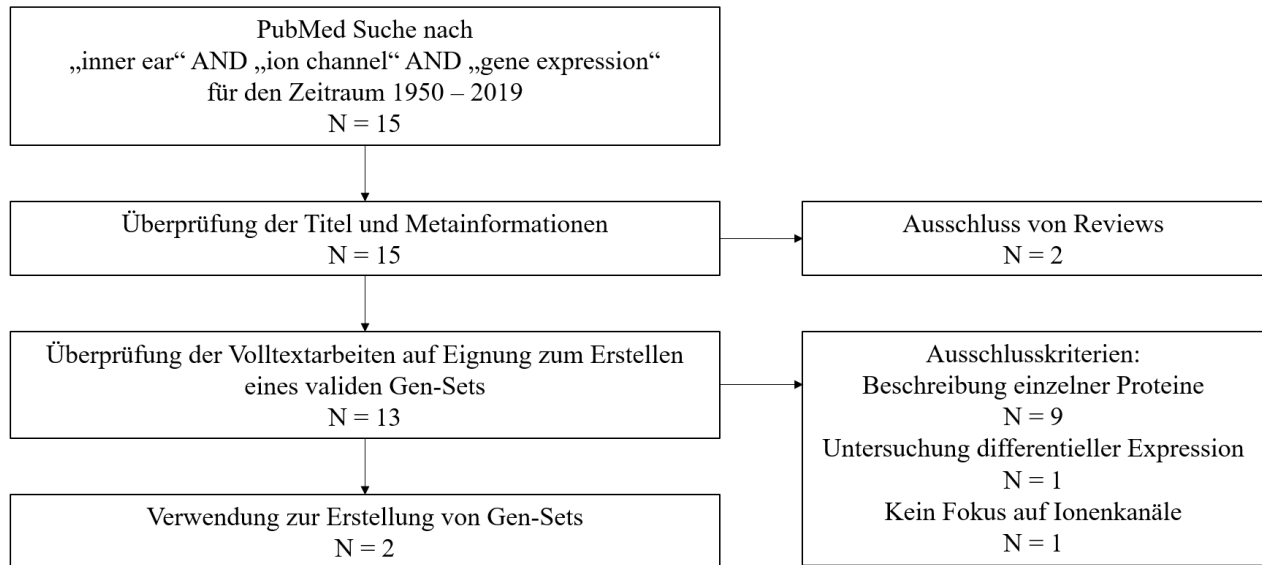


Abbildung 4: Ablaufschema der Literaturrecherche nach Publikationen zum Erstellen eines Gen-Sets zur Überprüfung der Hypothese einer gestörten Ionenhomöostase in der Entstehung des Morbus Menière

Daraufhin wurden die Volltextarbeiten auf ihre Eignung zum Erstellen eines validen Gen-Sets zur Überprüfung der Hypothese der gestörten Ionenhomöostase in der Pathophysiologie des Morbus Menière untersucht. Nachdem Arbeiten, die nur wenige Ionenkanäle beschrieben (9), Studien zu einer veränderten Genexpression unter experimentellen Veränderungen (1) und Arbeiten ohne eine Fokussierung auf Ionenkanäle (1) ausgeschlossen wurden, verblieben zwei Publikationen.

2.4.2 Gen- und Gen-Set-Analysen

Um die SNVs nach funktionellen Kategorien zusammenzustellen, wurden zunächst alle SNVs, die innerhalb von proteinkodierenden Genen liegen, mit dem Programm MAGMA (de Leeuw et al., 2015) zusammengefasst. Dazu wurden die in der SNV-Analyse untersuchten SNVs mithilfe der Gengrenzen den entsprechenden Genen zugeordnet. Hierfür wurden die Gengrenzen aus dem „NCBI Homo sapiens Annotation Release 105“ für das GRCh37 Referenzgenom verwendet. Diese werden durch die RefSeq Datenbank (O’Leary et al., 2016) bereitgestellt. Die Gengrenzen begannen beim ersten und endeten beim letzten transkribierten Nukleotid und wurden durch automatische Annotation und manuelle Kuration definiert (Pruitt et al., 2014). SNVs, die außerhalb von Genen lagen, wurden nicht berücksichtigt. Für die Gen-Analyse wurden die exakten Gengrenzen ohne umgebendes Fenster verwendet.

Um aus den p-Werten der SNVs die p-Werte für jedes Gen zu bestimmen, benötigt MAGMA ein Referenzsample von Genomen; hierfür wurden die Daten der Phase 3 des 1000 Genomes Projects verwendet. Mithilfe dieser Daten wird eine χ^2 -Teststatistik für jeden SNV berechnet. Die weiteren Berechnungen können in MAGMA mit verschiedenen Modellen durchgeführt werden. Im „snp-mean“ Modell wird für die genbasierte Teststatistik der Durchschnitt der SNV-Teststatistiken verwendet. Dadurch kommt es zu einer stärkeren Gewichtung der Assoziation von SNVs, die in starkem Kopplungsungleichgewicht miteinander stehen. Daneben kann das „snp-top“ Modell eingesetzt werden. In diesem werden die Teststatistiken je nach p-Wert unterschiedlich gewichtet. So wird zwar nicht die Durchschnittsassoziation der SNVs abgebildet, aber die Sensitivität für lokale Assoziationen kann erhöht werden. Zudem wird der Einfluss des Kopplungsungleichgewichts auf die Analyse reduziert. In der vorliegenden Arbeit wurde das „snp-mean“ Modell, die Standardeinstellung von MAGMA, verwendet, um die durchschnittliche Assoziation der SNVs zu bestimmen. Für die Auswertung wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni korrigiert. Dazu wurde das ursprüngliche Signifikanzniveau von $p < 0.05$ durch die Anzahl der Tests geteilt (Bland & Altman, 1995). Das so korrigierte Signifikanzniveau lag bei $0,05/18\,439 = 2,7 \times 10^{-6}$.

Zur Testung der Gen-Sets wurde ebenfalls MAGMA verwendet. Die Testung erfolgte nach dem Prinzip der kompetitiven Testung. Dabei wird getestet, ob die Gene innerhalb eines Sets stärker mit der Erkrankung assoziiert sind als Gene außerhalb des Sets. Für die Berechnungen wurden die Standardparameter von MAGMA verwendet. Das sind „-direction=pos“ und „-correct=all“. Bei der Testung können auch Interaktionseffekte der Gen-Sets untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings nur der direkte Einfluss der einzelnen Sets getestet, da Interaktionseffekte nur in geringem Ausmaß zu erwarten sind. Das nach Bonferroni korrigierte Signifikanzniveau betrug bei vier getesteten Gen-Sets $0,05/4 = 0,0125$.

2.4.3 SNV-Analyse

Im Falle einer signifikanten Assoziation eines Gens wurden zur genaueren Untersuchung der umgebenden Region die SNVs in einem Fenster einer Größe von 20 Kilobasen um das Gen auf eine Assoziation mit dem Morbus Menière getestet, um so mögliche regulatorische Regionen zu identifizieren. Es wurden dieselben Gengrenzen wie für die Gen-Analyse verwendet (siehe 2.4.2). Innerhalb dieser Region wurden alle SNVs erneut auf eine Assoziation mit dem Morbus Menière untersucht. Es wurden nur Patienten mit einer klinisch sicheren oder klinisch wahrscheinlichen

Material und Methoden

Diagnose des Morbus Menière in die Analyse eingeschlossen. Für die Assoziationsanalyse wurden die wahrscheinlichsten Genotypen (best-guess) der Probanden für die SNVs innerhalb dieser Region aus dem bestehenden Datensatz extrahiert. Die darauffolgende statistische Auswertung erfolgte wie die Gesamtauswertung mit einer logistischen Regression unter einem additiven Modell mit PLINK Version 1.9 (Chang et al., 2015). Als Kovariablen wurden Alter, Geschlecht und die erste Dimension der Hauptkomponentenanalyse (PC1) einbezogen. Für diesen Test wurde als Signifikanzniveau das ursprüngliche Signifikanzniveau von 0,05 durch die Anzahl der SNVs innerhalb der Region geteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Stichprobenbeschreibung

Die Studienpopulation bestand insgesamt aus 2928 Probanden. Darunter waren 314 am Morbus Menière erkrankte Patienten und 2614 gesunde Kontrollprobanden (Tabelle 7). Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 60,4 Jahren mit einer Standardabweichung von 13,3 Jahren. Die Kontrollprobanden wiesen ein Durchschnittsalter von 47,4 Jahren mit einer Standardabweichung von 16,5 Jahren auf. Damit unterschieden die beiden Gruppen sich bezüglich des Alters hochsignifikant voneinander ($p = 9,9 \times 10^{-45}$, Welch's t-Test) Der Frauenanteil unterschied sich mit 47,1 % und 47,4 % geringfügig aber signifikant ($p = 0,027$, Exakter Test nach Fisher) zwischen Patienten und Kontrollprobanden.

Tabelle 7: *Eigenschaften der an Morbus Menière erkrankten Patienten und Kontrollprobanden.*

	Patienten	Kontrollprobanden
Anzahl	314	2614
Durchschnittsalter in Jahren (Standardabweichung)	60,4 (13,3)	47,4 (16,5)
Frauenanteil in Prozent	47,1	47,4

3.2 Gen-Analyse

Von den 7 876 327 nach der Qualitätskontrolle verbleibenden SNVs konnten 3 087 421 (39,2 %) einem Gen zugeordnet werden. Insgesamt wurde für 18 439 Gene mindestens ein SNV bestimmt. Von den ursprünglichen 19 427 Genen konnte damit 988 (5,0 %) Genen kein SNV zugeordnet werden. Das Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur für das Testen aller Gene lag bei $0,05/18\,439 = 2,7 \times 10^{-6}$.

Bei diesem Signifikanzniveau zeigte eines der Gene, *sorting nexin 20* (SNX20) eine signifikante Assoziation mit dem Auftreten des Morbus Menière ($p = 1,6 \times 10^{-6}$). Die zehn Gene mit den niedrigsten p-Werten sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Gene mit niedrigstem *p*-Wert in der genbasierten Analyse.

Symbol	Entrez ID	Chromosom	Länge in bp	Anzahl SNVs	p-Wert
SNX20	124460	16	15 053	10	$1,62 \times 10^{-6*}$
TMEM200C	645369	18	5 962	16	$1,87 \times 10^{-5}$
CD300LD	100131439	17	12 259	29	$3,68 \times 10^{-5}$
MUC20	200958	3	50 711	44	$4,49 \times 10^{-5}$
C17orf77	146723	17	9 291	27	$1,12 \times 10^{-4}$
PRR34	55267	22	3 685	8	$1,41 \times 10^{-4}$
MARF1	9665	16	48 797	72	$1,58 \times 10^{-4}$
FARP2	9855	2	138 592	340	$2,74 \times 10^{-4}$
SPAG1	6674	8	83 869	127	$2,77 \times 10^{-4}$
FKBP5	2289	6	154 998	245	$3,03 \times 10^{-4}$

bp = Basenpaare. * : signifikant nach Bonferroni-Korrektur. Das korrigierte Signifikanzniveau beträgt $2,7 \times 10^{-6}$.

3.3 SNV-Analyse der SNX20-NOD2-Region

Zur Charakterisierung der Assoziation von SNX20 mit dem Morbus Menière wurden die SNVs der umgebenden genomischen Region separat auf eine Assoziation untersucht. Zudem wurde das eng benachbarte und funktionell mit SNX20 interagierende Gen „*nucleotide binding oligomerization domain containing 2*“ (NOD2) mit der umgebenden Region untersucht.

Dazu wurden die den beiden zugeordneten Regionen um je 20 Kilobasen in negative und positive Richtung erweitert. Aufgrund der engen Nachbarschaft der beiden Gene wurde so eine zusammenhängende Region von 106 779 Basenpaaren auf dem Chromosom 16 festgelegt (Abbildung 5, Seite 40). Die Region beginnt bei 50 680 211 Basenpaaren und endet bei 50 786 990 Basenpaaren (Build 37). In der Region um SNX20 wurden 73 SNVs untersucht. Die Region um NOD2 beinhaltete 118 SNVs. Von diesen SNVs lagen 44 in beiden untersuchten Regionen. Für die gesamte Region wurden die Genotypen von 147 SNVs aus dem imputierten Datensatz extrahiert und mittels logistischer Regression auf eine Assoziation mit dem Morbus Menière untersucht.

Es zeigte sich für 32 SNVs eine signifikante Assoziation mit dem Morbus Menière. Alle assoziierten SNPs standen im Kopplungsungleichgewicht mit dem am signifikant assoziierten SNP rs4785448. Der niedrigste r^2 -Wert eines signifikant assoziierten SNPs betrug 0,64. Die *p*-Werte

Ergebnisse

aller SNVs, deren LD zum am stärksten assoziierten SNV und das adjustierte Signifikanzniveau von $3,4 \times 10^{-4}$ sind in Abbildung 5 zusammen mit den Positionen der Gene SNX20 und NOD2 dargestellt. In Tabelle 9 finden sich die zehn SNVs mit den niedrigsten p-Werten.

Tabelle 9: SNVs der Region um SNX20 und NOD2 mit den niedrigsten p-Werten.

rs-Nummer	p-Wert	Allele	Referenz- -allel	Odds-Ratio	MAF Fälle	MAF Kontrollen	p-Wert HWE
rs4785448	$1,76 \times 10^{-5}$	A/G	G	1,67 (1,32 – 2,11)	0.298	0.21	0,62 (0,48)
rs9933594	$2,55 \times 10^{-5}$	C/G	G	1,65 (1,31 – 2,09)	0.288	0.203	1,00 (0,22)
rs2004804	$2,69 \times 10^{-5}$	A/G	G	1,65 (1,30 – 2,08)	0.299	0.213	0,61 (0,41)
rs11645448	$3,38 \times 10^{-5}$	G/A	A	1,65 (1,30 – 2,09)	0.283	0.201	1,00 (0,32)
rs8063362	$3,67 \times 10^{-5}$	T/A	A	1,63 (1,29 – 2,06)	0.286	0.203	1,00 (0,22)
rs34231814	$3,67 \times 10^{-5}$	T/A	A	1,65 (1,30 – 2,09)	0.283	0.201	1,00 (0,30)
rs12926429	$3,69 \times 10^{-5}$	A/G	G	1,64 (1,30 – 2,07)	0.288	0.205	1,00 (0,23)
rs35831008	$3,69 \times 10^{-5}$	A/G	G	1,64 (1,30 – 2,07)	0.288	0.205	1,00 (0,23)
rs7202124	$3,79 \times 10^{-5}$	A/G	G	1,62 (1,29 – 2,05)	0.298	0.213	0,61 (0,20)
rs4785223	$3,86 \times 10^{-5}$	G/A	A	1,63 (1,29 – 2,06)	0.295	0.211	0,73 (0,21)

Unter Allele wird zunächst das Major Allel und dann das Minor Allel angegeben. Hinter der Odds-Ratio ist in Klammern deren 95 %-Konfidenzintervall angegeben. Das korrigiertes Signifikanzniveau beträgt $3,4 \times 10^{-4}$. Der erste p-Wert des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes (HWE) gibt den Wert für die Patienten an, der Wert in Klammern den für die Kontrollprobanden.

Ergebnisse

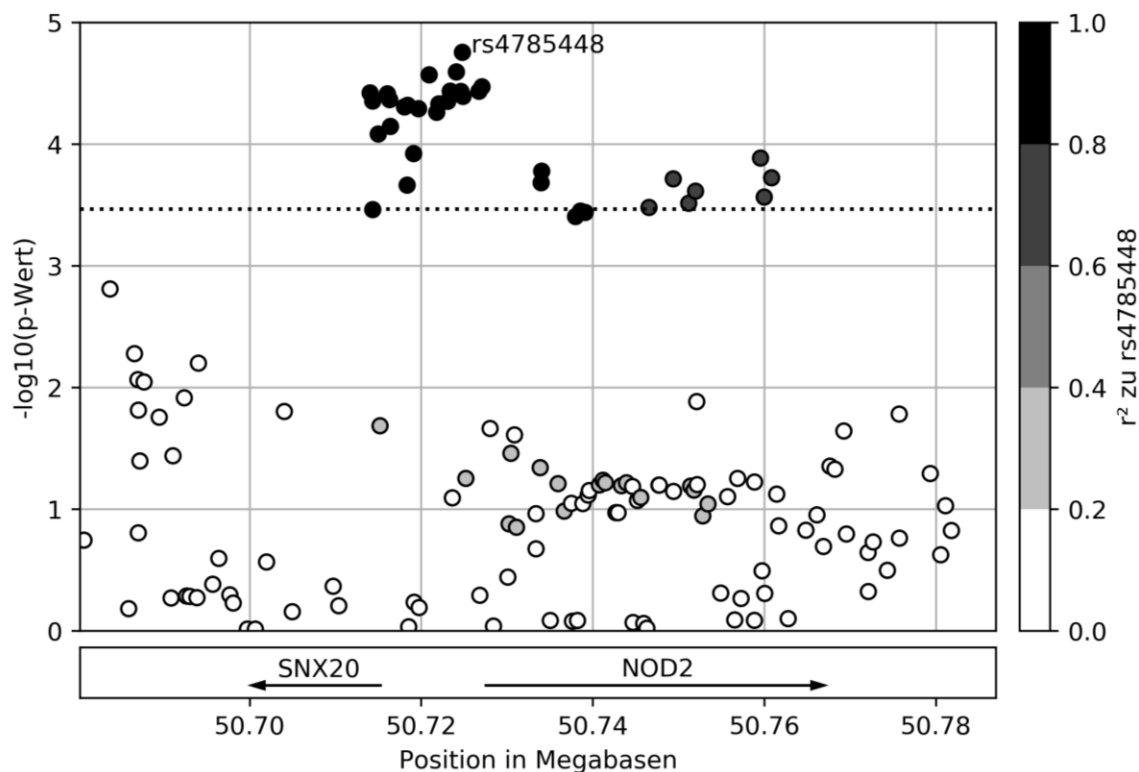


Abbildung 5: *p*-Werte der 147 untersuchten SNVs innerhalb der Region um SNX20 und NOD2 auf Chromosom 16. Die gepunktete Linie befindet sich auf Höhe des korrigierten Signifikanzniveaus von $3,4 \times 10^{-4}$. Die 32 signifikant assoziierten SNVs befinden sich oberhalb der Linie. Die Farben der Datenpunkte signalisiert das Kopplungsungleichgewicht zu rs4785448 innerhalb der CEU Population des 1000 Genomes Projects (The Genomes Project Consortium, 2015). Die Grafik wurde mit dem Programm Matplotlib (Hunter, 2007) erstellt.

3.4 Gen-Set-Analyse

Um die Relevanz verschiedener funktioneller Hypothesen in der Pathophysiologie des Morbus Menière zu untersuchen, wurden Gen-Sets ausgewählt bzw. zusammengestellt. Dazu wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Mit dieser sollten Gen-Sets gefunden bzw. erstellt werden, um die unterschiedlichen bisherigen Hypothesen möglichst valide abzubilden. Nach einer initialen Plausibilitätsüberprüfung wurde die Hypothese der vaskulären Genese aufgrund von Impraktikabilität von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Für die Hypothesen der autoimmunen und endokrinen Genese des Morbus Menière wurden vorbeschriebene Gen-Sets in der MSigDB gefunden. Um Gen-Sets zur Überprüfung der Hypothese der gestörten Ionenhomöostase in der Genese des Morbus Menière zu erstellen, wurde eine Literaturrecherche mit PubMed durchgeführt.

Ergebnisse

Das in MSigDB gefundene Gen-Set zur Hypothese der endokrinen Genese des Morbus Menière wurde der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) entnommen. In der KEGG-Datenbank wurden Gen-Sets zu unterschiedlichen Signalwegen und anderen Prozessen basierend auf einer manuellen Literaturrecherche zusammengestellt (Kanehisa et al., 2015). Das Gen-Set bestand neben Vasopressin, dem Vasopressinrezeptor Typ 2 und den Aquaporinen 2, 3 und 4 aus mehreren regulatorisch wirksamen Genen. Insgesamt setzte es sich aus 44 Genen zusammen (Tabelle 10).

Tabelle 10: *Gene des Vasopressin/Aquaporinsystems aus der Datenbank der KEGG.*

Symbol	Entrez Gen ID	Symbol	Entrez Gen ID
CREB3	10488	DCTN4	51164
DCTN2	10540	DYNC2LI1	51626
DCTN6	10671	AVP	551
ADCY3	109	AVPR2	554
ADCY6	112	PRKACA	5566
ADCY9	115	PRKACB	5567
CREB1	1385	PRKACG	5568
DYNLL2	140735	PRKX	5613
CREB3L4	148327	RAB5A	5868
DCTN1	1639	AC034102.1	5869
DYNC1H1	1778	RAB5C	5878
DYNC1I1	1780	CREB3L2	64764
DYNC1I2	1781	STX4	6810
DYNC1LI2	1783	VAMP2	6844
GNAS	2778	DYNC2H1	79659
AQP2	359	DCTN5	84516
AQP3	360	CREB3L3	84699
AQP4	361	DYNLL1	8655
ARHGDI A	396	RAB11A	8766
ARHGDI B	397	CREB3L1	90993
NSF	4905	RAB11B	9230

Ergebnisse

Das Gen-Set zur Testung der Hypothese der autoimmunen Genese des Morbus Menière besteht aus Genen des TWEAK/Fn14-Signalwegs. Die Gene für das Set wurden einem basierend auf einer Literaturrecherche speziell für diesen Signalweg kuriierten Gen-Set entnommen (Bhattacharjee et al., 2012), welches ebenfalls in MSigDB annotiert war. Die 46 Gene, für die eine Funktion im TWEAK/Fn14 Signalweg angenommen wurde, sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: *Gene des TWEAK/Fn14-Signalwegs nach Bhattacharjee et al. (2012)*

Symbol	Entrez Gen ID	Symbol	Entrez Gen ID
AKT1	207	MAPK8	5599
AKT2	208	MAPK9	5601
BAD	572	NFKB1	4790
BIRC2	329	NFKB2	4791
BIRC3	330	NFKBIA	4792
CASP3	836	NFKBIB	4793
CASP7	840	PARP1	142
CASP8	841	RAC1	5879
CASP9	842	RELA	5970
CD163	9332	RELB	5971
CHUK	1147	RHOA	387
CTNNB1	1499	RIPK1	8737
F3	2152	SERPINE1	5054
FADD	8772	STAT1	6772
GSK3B	2932	TNF	7124
HDAC1	3065	TNFRSF12A	51330
IKBKB	3551	TNFRSF25	8718
JUN	3725	TNFSF12	8742
MAP3K14	9020	TRAF1	7185
MAP3K7	6885	TRAF2	7186
MAPK1	5594	TRAF3	7187
MAPK14	1432	TRAF5	7188
MAPK3	5595	TRIM63	84676

Ergebnisse

Zur Erstellung von Gen-Sets zur Hypothese der gestörten Ionenhomöostase wurde eine Literaturrecherche mit PubMed durchgeführt. Dabei wurden mit der Suchphrase » „inner ear“ AND „ion channel“ AND „gene expression“ « 15 Publikationen gefunden. Es wurden ungeeignete Ergebnisse ausgeschlossen, falls es sich nicht um Primärarbeiten handelte (2), nur einzelne Proteine untersucht wurden (9), eine Expressionsänderung gemessen wurde (1) oder die Publikation sich nicht mit Ionenkanälen beschäftigte (1). Daraufhin verblieben zwei Studien, in denen die Expression von Ionenkanälen im Innenohr untersucht wurde. Da die beiden Studien verschiedene Abschnitte des Endolymphraumes untersuchten, wurden aus ihnen separate Gen-Sets erstellt.

In der ersten Studie (Gabashvili et al., 2007) wurde die mRNA-Expression der menschlichen embryonalen Cochlea mit der Genexpression der Cochlea der Maus verglichen. Aus den Expressionsdaten wurden nur die Gene ausgewählt, die für Ionenkanäle kodieren. Übernommen wurden nur die Kanäle, die verlässlich sowohl in der humanen als auch in der murinen Cochlea exprimiert wurden. Die 14 so ausgewählten Gene bestanden aus 9 Kationenkanälen (7 Kalium- und 2 Calciumkanäle) sowie 5 Anionenkanälen (3 Chloridkanäle, 2 unspezifisch) (Tabelle 12).

Tabelle 12: *Gene von Ionenkanälen, exprimiert in der Cochlea basierend auf den Expressionsdaten von Gabashvili et al. (2007)*

Symbol	Entrez Gen ID	Ion
CACNA1G	8913	Ca ²⁺
CLCN3	1182	Cl ⁻
CLIC4	25932	Cl ⁻
FXVD6	53826	Cl ⁻
GRIA4	2893	K ⁺
KCNA2	3737	K ⁺
KCNJ10	3766	K ⁺
KCNJ16	3773	K ⁺
KCNK1	3775	K ⁺
KCNMA1	3778	K ⁺
KCTD12	115207	K ⁺
TRPM3	80036	Ca ²⁺
VDAC1	7416	Anionen
VDAC2	7417	Anionen

Ergebnisse

In der zweiten Studie (Kim et al., 2015) wurde Gewebe des endolymphatischen Sacks, das während einer Operation gewonnen wurde, massenspektroskopisch auf die Proteinexpression untersucht. Für das Gen-Set wurden alle detektierten Ionenkanäle und -transporter verwendet. Die Spleißvarianten, die in der Massenspektroskopie ebenfalls detektiert werden, wurden ignoriert und jeweils auf ein Gen zurückgeführt. Die 29 Gene des so erstellten Gen-Sets setzten sich aus 28 Kationenkanälen (16 Calcium-, 4 Natrium-, 4 Kalium- und 4 unspezifische Ionenkanäle) und einem Anionenkanal (Chlorid-/Iodidkanal) zusammen (Tabelle 14, Seite 45).

Bei der kompetitiven Testung der Gen-Sets mittels MAGMA und den Parametern „-direction=pos“ und „-correct=all“ zeigte sich nach Korrektur für das vierfache Testen keine signifikante Assoziation eines Gen-Sets. Das Set mit dem niedrigsten p-Wert war das Set des Vasopressin/Aquaporin-Systems mit einem nominalen p-Wert von 0,13. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: *Ergebnisse der Gen-Set Analyse.*

Set	Anzahl Gene	nominaler p-Wert
Vasopressin-System	43 (44)	0,13
TWEAK/Fn14	46 (46)	0,73
Cochleäre Ionenkanäle	14 (14)	0,20
Ionenkanäle des endolymphatischen Sacks	29 (29)	0,90

Die Anzahl der Gene gibt die Anzahl der tatsächlich getesteten Gene an. In Klammern ist theoretische Anzahl der Gene des Sets angegeben. Die Differenz ergibt sich aus Genen, denen kein SNV zugeordnet werden konnte. Das korrigierte Signifikanzniveau beträgt 0,0125.

Ergebnisse

Tabelle 14: Gene von Ionenkanälen und -transportern, exprimiert im endolymphatischen Sack nach Kim et al. (2015)

Symbol	Entrez Gen ID	Ion
CACNA2D1	781	Ca ²⁺
CACNA1G	8913	Ca ²⁺
CACNA1A	773	Ca ²⁺
CACNA1C	775	Ca ²⁺
CACNA1D	776	Ca ²⁺
CACNA1E	777	Ca ²⁺
CACNA1I	8911	Ca ²⁺
CACNA1H	8912	Ca ²⁺
CACNA1F	778	Ca ²⁺
CACNA1B	774	Ca ²⁺
TRPM4	54795	Monovalente Kationen
TRPM3	80036	Ca ²⁺
TRPC4	7223	Ca ²⁺ , weitere Kationen
TRPC3	7222	Ca ²⁺ , weitere Kationen
NALCN	259232	Kationen
SCN7A	6332	Na ⁺
SCN3A	6328	Na ⁺
SCN11A	11280	Na ⁺
KCNN2	3781	K ⁺
KCNB1	3745	K ⁺
KCNC4	3749	K ⁺
KCNH1	3756	K ⁺
ATP1A1	476	K ⁺ , Na ⁺
ATP1A3	478	K ⁺ , Na ⁺
ATP2B4	493	Ca ²⁺
ATP2C2	9914	Ca ²⁺
SLC8A3	6547	Ca ²⁺ , Na ⁺
SLC26A4	5172	Cl ⁻ , I ⁻
ANO6	196527	Ca ²⁺

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die statistische Assoziation des Morbus Menière mit genetischen Varianten innerhalb von Genen und Gen-Sets an einer kaukasischen Stichprobe aus 314 Patienten und 2614 Kontrollen untersucht. In der genbasierten Testung zeigte sich eine signifikante Assoziation des Gens SNX20. Daraufhin wurde die Assoziation der SNVs der Region um SNX20 und das eng benachbarten Gen NOD2 zum Morbus Menière untersucht. Von den 147 dabei untersuchten SNVs zeigten nach der Bonferroni-Korrektur 32 SNVs eine signifikante Assoziation.

In der Gen-Set basierten Testung fand sich hingegen für keines der vier hypothesenbasiert zusammengestellten Gen-Sets (Cochleäre Ionenkanäle, Ionenkanäle des endolymphatischen Sacks, Vasopressin-System und TWEAK/Fn14) eine signifikante Assoziation zum Morbus Menière.

4.1 Methoden

Studienpopulation

Für die Validität von Fall-Kontroll-Studien ist die epidemiologische Ähnlichkeit von Patienten- und Kontrollgruppen wünschenswert, um den Einfluss von Störfaktoren zu minimieren (Jager et al., 2008). Während in der vorliegenden Arbeit der Geschlechteranteil und die Populationsstruktur von Patienten und Probanden gut übereinstimmten, zeigte das Alter eine deutliche Abweichung von einem Durchschnittsalter von 60,4 Jahren für Patienten und 47,4 Jahren für Kontrollprobanden. Eine Ursache für diesen Unterschied liegt im relativ hohen Alter der Erstdiagnose des Morbus Menière, welches von Van Esch et al. (2016) bei einem Häufigkeitsgipfel von ca. 53 Jahren angegeben wurde. Eine relevante Verfälschung der Ergebnisse hierdurch erscheint allerdings unwahrscheinlich, da zum einen in der logistischen Regression für das Alter der Probanden kontrolliert wurde und zum anderen ein gehäuftes Auftreten späterer Erkrankungen von Kontrollprobanden am Morbus Menière aufgrund der geringen Prävalenz unwahrscheinlich ist. Mit dem Prävalenzwert von 190/100.000 Personen aus der Studie von Harris und Alexander (2010) wären bei den 2614 Probanden nur ca. 5 Fälle des Morbus Menière zu erwarten. Zudem lag das Durchschnittsalter der Probanden mit ca. 47 Jahren relativ nah bei dem von Van Esch et al. (2016) beschriebenen durchschnittlichen Alter bei Erstmanifestation des Morbus Menière von 53 Jahren.

Diskussion

Damit wäre ein Teil dieser zu erwartenden Fälle bereits aufgetreten und es wäre eine noch geringere Anzahl von noch nicht manifestierten Menière-Erkrankungen bei Kontrollprobanden zu erwarten.

Der Frauenanteil von Patienten- und Kontrollgruppe unterschied sich nur geringfügig mit 47,1 % und 47,4 %. Auch wenn dieser Unterschied Signifikanz zeigte, erscheint ein relevanter geschlechtsspezifischer Einfluss unwahrscheinlich, da er nur 0,3 % betrug und zusätzlich als Kovariable in der Rechnung berücksichtigt wurde.

Auffällig ist, dass der Frauenanteil in der Patientengruppe mit 47,1 % knapp unter der Hälfte lag. Dies steht im Kontrast zu früheren Studienergebnissen, welche einen erhöhten Frauenanteil für am Morbus Menière erkrankte Patienten beschrieben. Die Werte lagen dabei etwa bei 1,89:1 (65,4 %) (Harris & Alexander, 2010) oder 1,5:1 (60,0 %) (Stahle et al., 1978). Dieses Ergebnis ist allerdings nicht unmittelbar vergleichbar, da es verschiedene Faktoren gibt, welche zu einer Verzerrung des beobachteten Frauenanteils geführt haben könnten. Mögliche Erklärungen für diese Abweichungen wären z. B. eine abweichende Tendenz zur Vorstellung in einer Spezialambulanz von Frauen und Männern oder eine variable Bereitschaft zur Teilnahme an der vorliegenden Studie. Dadurch wäre das Patientenkollektiv nicht repräsentativ für alle am Morbus Menière erkrankten Patienten. Eine systematische Verzerrung potentieller Subtypen der Patientengruppe basierend auf dem Geschlecht wäre daher möglich, sofern die genaue Ätiologie des Morbus Menière sich zwischen Männern und Frauen unterscheidet. Dafür gibt es aktuell allerdings keine Anhaltspunkte. Zudem ist die Abweichung von einem typischen Geschlechterverhältnis nur gering, womit eine Verfälschung der Ergebnisse durch diesen Faktor unwahrscheinlich ist.

Die vorliegende Studie hat im Vergleich zu anderen genetischen Assoziationsstudien zum Morbus Menière eine relative große Zahl von Patienten eingeschlossen (Chiarella et al., 2015). Im Vergleich zu GWAS zu häufigeren Krankheitsbildern ist die Stichprobengröße allerdings klein (Tam et al., 2019). Bei GWAS hängt die Power zur Detektion eines Effekts stark von der Stichprobengröße ab. Da allerdings auch die unbekannte Effektstärke und die MAF eines SNV einen Einfluss auf die Power hat, lässt diese sich nicht exakt berechnen (Hong & Park, 2012). Eine Möglichkeit zur Steigerung der Power einer GWAS besteht darin, mehr gesunde Kontrollprobanden als Patienten zu rekrutieren (Hong & Park, 2012). Gerade bei seltenen Erkrankungen wie dem Morbus Menière stellt dies eine Möglichkeit zur Erhöhung der Power dar. Das Verhältnis von Patienten zu Kontrollen lag für die Studienstichprobe bei ca. 1:8. Eine weitere Erhöhung dieses Verhältnisses erscheint allerdings nicht erfolgsversprechend, da sich in

Simulationen gezeigt hat, dass eine Steigerung des Fall-Kontroll-Verhältnisses ab einem Wert von ca. 1:4 nur noch einen geringen positiven Effekt auf die Power hat (Hong & Park, 2012).

Das Probandenkollektiv der vorliegenden Studie ist mitteleuropäische Herkunft, womit die Ergebnisse bisheriger genetischer Assoziationsstudien an nicht-europäischen Probandenkollektiven nur bedingt vergleichbar sind. Beispielsweise zeigte sich für den am stärksten assoziierten SNV rs4785448 in der Kontrollgruppe für das Allel G eine Allelfrequenz von 21 %. Im 1000 Genomes Project (The Genomes Project Consortium, 2015) betragen die entsprechenden Allelfrequenzen 27 % für europäische, 55 % für afrikanische und 90 % für ostasiatische Populationen. Diese abweichenden Allelfrequenzen führen zu einer abweichenden Power bei der Detektion einer populationsübergreifenden Assoziation (Tabangin et al., 2009) und führen dazu, dass die hier vorliegenden Ergebnisse im Rahmen einer geographischen Region zu interpretieren sind.

Diagnose

Neben der vorläufigen Einschränkung der Ergebnisse auf eine durch die Studienpopulation vorgegebene Region, ist für Fall-Kontroll-Studien insbesondere die Diagnosestellung relevant. Beim Morbus Menière ist die Diagnostik klinisch orientiert und muss bisher auf eindeutige laborchemische Diagnosekriterien verzichten. Durch die konsequente Anwendung der Diagnosekriterien von Lopez-Escamez et al. (2015) und die Durchführung der Diagnostik in einer Spezialambulanz kann in der vorliegenden Arbeit allerdings von einer hohen Validität der Diagnosen ausgegangen werden.

Ein anderes Problem der Diagnostik liegt in der Möglichkeit multipler Ätiologien des Morbus Menière. Sofern das Krankheitsbild des Morbus Menière nur die gemeinsame Präsentation des endolymphatischen Hydrops darstellt und dieser auf mehreren verschiedenen Ursachen beruht, würde man deutlich kleinere Effektstärken pro Locus erwarten. Diese wären in einer GWAS nur mit größeren Fallzahlen im Bereich mehrerer Zehntausend als signifikantes Assoziationssignal detektierbar.

Um in der Zukunft mögliche unterschiedliche Ätiologien zu untersuchen wäre es wichtig, diese anhand phänotypischer Merkmale erkennen zu können. Basierend auf der klinischen Präsentation, wie z. B. der ein- oder beidseitigen Symptomatik, lassen sich die am Morbus Menière erkrankten Patienten in unterschiedliche Untergruppen einordnen (Frejo et al., 2016). Ob es sich dabei um die Präsentation unterschiedlicher Ätiologien handelt ist allerdings unklar. Falls dies der

Fall wäre, wäre es möglich separate Assoziationsstudien je nach klinischer Präsentation durchzuführen, um so möglicherweise die verschiedenen Ätiologien isoliert zu untersuchen. Allerdings reduzieren sich bei diesem Vorgehen die Probandenzahlen innerhalb jeder Untergruppe, was wiederum die Power verringert.

Gen-Analyse

In der genbasierten Analyse wurden die SNV-basierten p-Werte einer vorgeschalteten GWAS zu Morbus Menière, die für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurden, mit dem Programm MAGMA (de Leeuw et al., 2015) zu genbasierten p-Werten zusammengefasst.

Die zuverlässige Zuordnung von SNVs zu Genen weist einige Schwierigkeiten auf. Bisherige genetische Assoziationsstudien haben gezeigt, dass multifaktorielle Erkrankungen selten durch SNVs mit einem Effekt auf die Aminosäuresequenz des Proteins verursacht werden. Hindorff et al. fanden 2009 in einer Literaturrecherche 465 unabhängige krankheitsassoziierte SNVs. Von diesen hatten 9 % einen nicht-synonymen Aminosäureaustausch zur Folge. Die verbleibenden SNVs befanden sich zwischen Genen (43 %), in Introns (45 %), in nicht translatierten Bereichen der mRNA (2 %) und in codierenden Bereichen mit synonymem Aminosäureaustausch (2 %) (Hindorff et al., 2009). Für die nicht-codierenden SNVs, bzw. die mit ihnen im LD stehenden Loci, ist ein kausaler Effekt auf die Krankheitsentstehung über regulatorische Einflüsse auf die Genexpression oder das Spleißen der primären RNA möglich (Edwards et al., 2013). Da regulatorische Elemente des Genoms wie z. B. Enhancer allerdings häufig weit von der Gensequenz entfernt und häufig nicht ausreichend charakterisiert sind, können SNVs die in solchen Bereichen liegen nicht eindeutig dem untersuchten Gen zugeordnet werden (Spitz, 2016). Eine Möglichkeit zur Umgehung dieses Problems stellt das Einschließen aller SNVs innerhalb eines gewissen Fensters um das Gen herum dar. So können regulatorische SNVs mit in die Analyse eingeschlossen werden. Die Region um das Gen herum beinhaltet allerdings auch viele nicht assoziierte SNVs, die im Fall eines zu groß gewählten Fensters in die Analyse eingeschlossen werden. Da der genbasierte p-Wert aus den Durchschnittswerten aller eingeschlossenen SNV-basierten Teststatistiken berechnet wurde, könnte dies eine möglicherweise vorhandene Assoziation maskieren. In der vorliegenden Arbeit wurde daher auf die Verwendung eines Fensters verzichtet.

Mögliche Verfahren zur genaueren Zuordnung von SNVs zu Genen ergeben sich aus der Chromatininteraktionsanalyse. Durch neuartige Verfahren der Chromatininteraktionsanalyse kann

untersucht werden, welche Bereiche des Genoms im Zellkern durch die Faltung der DNA in engem räumlichem Kontakt miteinander stehen (Ay & Noble, 2015). Ein solcher Kontakt einer Region mit dem Promotor eines Gens ist ein Indiz dafür, dass diese Region regulatorische Effekte auf die Expression dieses Gens ausüben kann. In einer Studie von Jung et al. aus dem Jahr 2019 wurden Regionen mit hoher Interaktionsfrequenz für 18 943 Promotoren humaner Gene in verschiedenen Zelltypen untersucht (Jung et al., 2019). Basierend auf solchen oder ähnlichen Daten wäre eine bessere Zuordnung von SNVs zu potentiell regulatorisch beeinflussten Genen möglich und sollte in zukünftigen Studien berücksichtigt werden.

SNV-Analyse der SNX20-NOD2-Genregion

Zur genaueren Charakterisierung der Ergebnisse der genbasierten Analyse erfolgte die Untersuchung der umgebenden SNVs auf eine Assoziation zum Morbus Menière. Nachdem das einzige assoziierte Gen SNX20 eng benachbart zu NOD2 auf Chromosom 16 liegt und die jeweiligen 5'-Genregionbereiche auf einem gemeinsamen LD-Block liegen, wurden die SNVs einer insgesamt 106 779 Basenpaaren umfassenden umliegenden Region untersucht. Die Testung kann nicht als unabhängig von der genbasierten Testung gesehen werden, da sie basierend auf der beobachteten verstärkten Assoziation von SNVs innerhalb von SNX20 durchgeführt wurde. Ziel war es, die Lokalisation des Assoziationssignals weiter einzuschränken, um so einen Vergleich mit vorbeschriebenen Funktionen dieses Locus durchzuführen.

Zur weiteren Einschränkung eines Assoziationssignals auf eine potentiell kausale Variante existieren weitere Verfahren (Spain & Barrett, 2015). Da diese allerdings meist Studien an unterschiedlichen Patientenkollektiven und große Fallzahlen benötigen (Schaid et al., 2018), sind sie für die Auswertung der Daten der vorliegenden Arbeit kaum verwendbar.

Gen-Set-Analyse

Basierend auf den Ergebnissen der Gen-Analyse wurde ebenfalls mit MAGMA (de Leeuw et al., 2015) eine Gen-Set-Analyse durchgeführt.

Die vier auf Assoziation zum Morbus Menière getesteten Gen-Sets wurden hypothesengeleitet und basierend auf einer Literaturrecherche zusammengestellt und orientierten sich an den Hypothesen der autoimmunen, der endokrinen und der ionenhomöostatischen Genese des Morbus Menière.

Die Validität verwendeter Gen-Sets bezüglich der zu untersuchenden intrazellulären Signalwege stellt in den meisten Gen-Set basierten Untersuchungen ein Problem dar (Mooney &

Wilmot, 2015). Dies liegt an der unzureichenden Kenntnis vieler zellulärer Prozesse und zum anderen an einem intrinsischen Überlappen vieler Signalwege.

Aufgrund dieser Überlappung muss entschieden werden, bis zu welcher Interaktionsdistanz Gene in ein Gen-Set aufgenommen werden sollen. Im komplexen Zusammenspiel vieler Signalwege im Inneren einer Zelle interagieren viele Signalwege miteinander. Zum sinnvollen Zusammenstellen eines Gen-Sets müssen dabei die Gene ausgewählt werden, die insbesondere innerhalb eines spezifischen Signalweges eine wichtige Rolle spielen (Maleki et al., 2020).

Grundsätzlich basiert die Gen-Set-Analyse auf der Annahme, dass einige bestimmte Signalwege eine besondere Rolle in der Pathogenese einer Erkrankung einnehmen. Falls dies nicht der Fall ist, sind keine signifikanten Assoziationen von Signalwegen zu erwarten. Ob diese Annahme für den Morbus Menière zutrifft, ist angesichts der ungeklärten Pathophysiologie kaum zu beurteilen. Zudem ist die Untersuchung von intrazellulären Signalwegen und der Genexpression innerhalb des menschlichen Innenohrs methodisch schwierig und entsprechen unzureichend erforscht. Daher weisen die zusammengestellten Gen-Sets einige Limitationen auf, welche im Folgenden dargestellt werden sollen.

Der endolymphatische Hydrops gilt als histopathologisches Korrelat des Morbus Menière und legt eine Störung des Gleichgewichts aus Produktion und Resorption von Endolymphe nahe. Wo genau innerhalb des Endolymphraumes diese Störung auftreten könnte, ist anhand des endolymphatischen Hydrops allerdings nicht festzustellen (Salt & Plontke, 2010). Die zusammengestellten Gen-Sets zu dieser Hypothese basierten auf Daten zur Cochlea und dem endolymphatischen Sack.

Das erste Gen-Set basierte auf einer Studie zur Expression von Ionenkanalgenen innerhalb der Cochlea. In der Studie von Gabashvili et al. (2007) wurde die Genexpression innerhalb der humanen fetalen Cochlea verglichen mit Expressionsdaten für das Corti-Organ der Maus. Als sicher exprimiert wurden die Gene angenommen, die in beiden Geweben als exprimiert nachgewiesen werden konnten.

Dies führt zu einer konservativen Annahme darüber, welche Gene exprimiert werden. Zwar werden falsch positiv eingeschlossene Gene vermieden, es ist allerdings auch wahrscheinlich, dass einige Gene von Ionenkanälen, die ausschließlich im humanen Gewebe exprimiert werden, aufgrund dieser Methodik nicht eingeschlossen wurden. Eine weitere Limitation dieses Gen-Sets stellt dar, dass die humanen Daten auf fetalem Gewebe und die murinen Daten auf dem Gewebe sehr junger Mäuse basierten (Pompeia et al., 2004). Hierdurch könnte das erstellte Gen-Set die

Diskussion

Zusammensetzung der Ionenkanäle der adulten humanen Cochlea fehlerhaft abbilden. Studien zur Genexpression von Ionenkanälen der menschlichen Cochlea im Altersverlauf um diese Vermutung zu überprüfen wurden nicht gefunden. Auch wenn es im Alter zu Veränderungen der Hörschwelle kommt, bleibt das generelle Hörvermögen bis ins höhere Alter erhalten (Gates et al., 1990). Daher erscheint es wahrscheinlich, dass sich die Zusammensetzung der Ionenkanäle nicht zu stark ändert und das Gen-Set auch für Fragestellungen zu adulten Probanden geeignet ist.

Das zweite Gen-Set basierte auf Daten zur Proteinzusammensetzung des humanen endolymphatischen Sacks. Dieser wurde in der Arbeit von Kim et al. im Jahr 2015 massenspektroskopisch untersucht. An während einer Operation gewonnenem Gewebe des endolymphatischen Sacks wurde eine Flüssigchromatographie mit Massenspektroskopie-Kopplung durchgeführt. Anhand der gewonnenen Daten wurden die vorhandenen Ionenkanäle und Transporter bestimmt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Gene für das zweite Gen-Set ausgewählt.

Limitation der Daten aus dieser Studie ist vor allem, dass Kim et al. nur die Ergebnisse für Kaliumkanäle unabhängig von der Massenspektroskopie anhand von Expressionsdaten exemplarisch validiert haben. Für die Expression der anderen Kanäle und Transporter sprechen nur die massenspektroskopischen Daten (Kim et al., 2015). Die unabhängige Validierung aller Ionenkanäle und Transporter wäre aufgrund der Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse der Massenspektroskopie (Nesvizhskii et al., 2007) wünschenswert. Falls es bei den verwendeten Ionenkanälen zu systemischen Fehlern gekommen ist könnte dies dazu geführt haben, dass die Ionenkanalzusammensetzung des endolymphatischen Sacks fehlerhaft abgebildet war. Damit wäre es selbst bei einer Rolle der Ionenkanäle bei der Entstehung des Morbus Menière zu keiner Assoziation des Gen-Sets gekommen.

Zur Hypothese der hormonellen Ursachen des Morbus Menière wurde ein kuriiertes Gen-Set der KEGG (Kanehisa et al., 2015) zum Vasopressin/Aquaporin-System verwendet. Das Gen-Set basiert auf den Daten zu den Verhältnissen innerhalb der Niere, da angenommen wird, dass die Signalwege des Vasopressin/Aquaporin-Systems sich innerhalb von Niere und Innenohr ähneln (Nishioka et al., 2010). Dennoch sind Besonderheiten der Signalwege innerhalb des Innenohrs wahrscheinlich (Beitz et al., 2003). Derartige Unterschiede führen dazu, dass das verwendete Gen-Set die Hypothese der gestörten Ionenhomöostase nicht optimal abbildet. Die von Nishioka et al. (2010) beschriebenen Ähnlichkeiten legen allerdings nahe, dass es zumindest große Überschneidungen der beteiligten Genen gibt. Das Ausmaß der Überschneidungen lässt sich

schwer beurteilen. Eine genauere Untersuchung der endokrinen Einflussfaktoren im Innenohr wäre wünschenswert und wie für die anderen Gen-Sets stellt auch die möglicherweise fehlerhafte Abbildung der Signalwege im Innenohr eine mögliche Erklärung für die nicht signifikante Assoziation des Gen-Sets dar.

Das Gen-Set zur Hypothese der autoimmunen Entstehung des Morbus Menière basierte auf den Genen des TWEAK/Fn14 Signalwegs. Der TWEAK-Signalweg wurde im Zusammenhang mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen beschrieben (Kamijo et al., 2008; Xia et al., 2015). Es zeigten sich auch abweichende Expressionswerte bei dem Lupus erythematoses (Schwartz et al., 2009) und der rheumatoiden Arthritis (van Kuijk et al., 2010).

Für diesen Signalweg wurden in einer genetischen Assoziationsstudie von (Frejo et al.) Hinweise auf einen Zusammenhang mit dem Morbus Menière erbracht. Frejo et al. hatten zunächst in einer Assoziationsstudie den signifikant mit dem bilateralen Morbus Menière assoziierten SNV rs4947296 in der Nähe der Gene HLA-A, -B und -C identifiziert. Für diesen SNV wurden daraufhin Genexpressionsprofile aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Patienten erstellt. Dazu wurden die Genexpressionsprofile zwischen den Trägern der beiden jeweiligen homozygoten Genotypen des identifizierten SNVs in Zellen von Patienten verglichen. Anhand der gewonnenen Daten wurde eine Signalwegsanalyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere Gene von Signalwegen des Immunsystems bei den verschiedenen Genotypen unterschiedlich stark exprimiert wurden. Das stärkste Assoziationssignal zeigte sich dabei für den TWEAK/Fn14-Signalweg. Das zur Testung verwendete Gen-Set wurde einer Arbeit von Bhattacharjee et al. (2012) entnommen. In der Publikation stellten sie basierend auf einer Literaturrecherche ein Gen-Set für den TWEAK/Fn14-Signalweg zusammen. Da dieser Signalwegs allerdings noch unzureichend charakterisiert ist (Burkly et al., 2011), muss auch hier von einer eingeschränkten Validität des Gen-Sets ausgegangen werden womit die ausgebliebene Assoziation des Gen-Sets nur eine beschränkte Aussagekraft hat.

Zur Hypothese der Durchblutungsstörung wurde kein Gen-Set zusammengestellt. Da die Durchblutung durch zahlreiche, in verschiedenen Geweben ablaufende zelluläre Prozesse beeinflusst wird, erschien die Auswahl eines oder weniger plausibler Signalwege als nicht erfolgsversprechend.

Neben den Schwierigkeiten bei der Definition der Gen-Sets führen auch alle Probleme einer reduzierten Power der genbasierten Testung, insbesondere durch eine geringe Probandenzahl, zu einer eingeschränkten Power der Gen-Set-Analyse (de Leeuw et al., 2015).

4.2 Ergebnisse

Da es Hinweise auf das Vorliegen genetischer Faktoren in der Entstehung des Morbus Menière gibt, wurde in dieser Arbeit eine Gen- und Gen-Set-basierte Analyse durchgeführt.

Gen-Analyse

Fast alle bisherigen genetischen Assoziationsstudien zum Morbus Menière basierten auf Kandidatengenomen. Dabei wurden nur die SNVs einiger weniger Gene oder einzelne SNVs genotypisiert, für die aufgrund der Hypothesen zur Pathophysiologie des Morbus Menière eine relativ hohe Wahrscheinlichkeit für eine Assoziation angenommen wurde (Doi et al., 2005; Furuta et al., 2011; Mallur et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Testung der Gene hypothesenfrei, wodurch auch bisher nicht vermutete mögliche Ätiologien untersucht werden konnten (Kitsios & Zintzaras, 2009). Insbesondere da beim Morbus Menière viele Unklarheiten in der Pathogenese vorliegen (Oberman et al., 2017), ist dies von Vorteil.

Bei der Testung zeigte sich eine Assoziation des Auftretens des Morbus Menière mit dem SNX20-Gen. Daraufhin wurden die SNVs der Region um SNX20 und NOD2 separat auf eine Assoziation zum Morbus Menière untersucht.

Untersuchung von SNX20 und NOD2

Bei der genaueren Betrachtung der SNVs in der Umgebung von SNX20 und NOD2 zeigten 32 SNVs eine signifikante Assoziation mit dem Morbus Menière. Aufgrund der Vorselektion dieser Region durch die genbasierte Testung ist dieses Assoziationssignal allerdings nicht als unabhängiges Ergebnis zu betrachten. Die assoziierten SNVs befanden sich größtenteils in dem Bereich zwischen den beiden Genen, die in entgegengesetzte Richtungen transkribiert werden. Der SNV mit dem niedrigsten p-Wert war rs4785448 mit einem p-Wert von $1,76 \times 10^{-5}$ bei einem Signifikanzniveau von $3,4 \times 10^{-4}$. Da sich alle signifikant assoziierten SNVs in der Population zentraleuropäischer Abstammung (CEU) des 1000 Genomes Projects (The Genomes Project Consortium, 2015) im Kopplungsungleichgewicht mit rs4785448 befanden, handelt es sich hierbei nicht um jeweils unabhängige Loci sondern um ein einziges Assoziationssignal eines Haplotypen, der Anteile beider Gene umfasst (siehe Abbildung 5, Seite 40).

In bisherigen Studien zeigten Varianten von NOD2 eine Assoziation zu verschiedenen Erkrankungen, in deren Pathogenese das Immunsystem involviert ist. Es zeigte sich die Assoziation mit dem Auftreten des Morbus Crohn, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung in deren Pathogenese immunologische Prozesse eine Rolle spielen (Barrett et al., 2008; Hugot et

al., 2001). Varianten von SNX20 und NOD2 zeigten in einer chinesischen Population eine Assoziation mit dem Auftreten von Lepra, einer chronischen bakteriellen Infektionskrankheit (H. Liu et al., 2015; Zhang et al., 2009). Zudem wird eine seltene erbliche Erkrankung, das Blau-Syndrom, durch Mutationen des NOD2-Gens verursacht. Diese Krankheit zeichnet sich durch das Auftreten von granulomatösen Entzündungen in unterschiedlichen Geweben aus (Wouters et al., 2014).

Neben diesen epidemiologischen Ergebnissen legen auch experimentelle Arbeiten immunologische Funktionen der beiden Gene nahe. Für das SNX20-Protein konnte bisher eine Funktion bei der endosomalen Lokalisation von PSGL-1 gezeigt werden (Schaff et al., 2008). PSGL-1 interagiert mit verschiedenen Membranproteinen von Leukozyten, die eine Rolle bei der Interaktion mit dem Endothel und der Rekrutierung in das umliegende Gewebe spielen (Carlow et al., 2009). Zusätzlich zu dieser Funktion von SNX20 konnte für NOD2 eine Funktion in verschiedenen immunologischen Prozessen gezeigt werden. NOD2 kann Muramyl-Dipeptid, ein bakterielles Zellprodukt, erkennen und daraufhin über RIPK2 den NF- κ B-Signalweg aktivieren (Park et al., 2007). Dieser ist ein wichtiger Mediator verschiedener Entzündungsprozesse (Lawrence, 2009). Zudem aktiviert NOD2 unabhängig von NF- κ B die Autophagozytose von Bakterien und lenkt sie an den Ort der Zellmembran, an dem bakterielle Produkte detektiert wurden (Travassos et al., 2010).

Bezüglich regulatorischer Elemente der beiden Gene konnte in einem Modell für die Aktivierung von Makrophagen durch Lipopolysaccharide gezeigt werden, dass SNX20 und NOD2 ein ähnliches Aktivierungsmuster aufweisen, was auf einen gemeinsamen regulatorischen Faktor hinweist (Baillie et al., 2017). Naranbhai et al. untersuchten an 101 gesunden europäischen Probanden den Einfluss von SNVs auf die Genexpression von neutrophilen Granulozyten. Dabei zeigte sich eine Assoziation von rs1981760-T mit einer erhöhten Expression von NOD2 und SNX20 in neutrophilen Granulozyten (Naranbhai et al., 2015). Dieses Ergebnis konnte auch in einem unabhängigen Probandenkollektiv repliziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Einfluss auf die Expression von NOD2 und SNX20 durch rs1981760 vermutlich über eine Modifikation der Bindungsaffinität von STAT3, einem Transkriptionsfaktor, vermittelt wird (Naranbhai et al., 2015). rs1981760 steht in der CEU-Population des 1000 Genomes Projects bezüglich r^2 und D' in vollständigem Kopplungsungleichgewicht zu rs4785448, dem in der vorliegenden Arbeit in der regionalen Analyse am stärksten mit dem Morbus Menière assoziierten

SNV. Der regulatorische Effekt von rs1981760 erscheint damit als plausibler Mechanismus zur Erklärung der Assoziationsergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Die Funktion von NOD2 und SNX20 wurde insbesondere in Immunzellen des Blutes gezeigt. Entsprechend erscheint als Wirkungsmechanismus des assoziierten Locus eine Beeinflussung der Genexpression und Aktivierbarkeit von Immunzellen am wahrscheinlichsten. Bisherige Arbeiten zu immunologischen Prozessen im Innenohr legten den endolymphatischen Sack als primären Ort immunologischer Reaktionen des Innenohrs nahe. In diesem Gewebe wurden auch Immunzellen nachgewiesen, was eine Involvierung dieser in der Entstehung des endolymphatischen Hydrops ermöglicht (Kämpfe Nordström et al., 2019).

Insgesamt lassen diese Ergebnisse eine Rolle immunologischer Prozesse in der Pathogenese des Morbus Menière plausibel erscheinen. Da es sich bei den vorliegenden Ergebnissen jedoch um statistische Resultate handelt, ist eine Replikation in einem weiteren Probandenkollektiv mit möglichst hohen Fallzahlen wünschenswert, um die externe Validität der Assoziation zu bestätigen.

Gen-Set-Analyse

Um die verschiedenen Hypothesen zur Entstehung des Morbus Menière zu testen, wurden Gen-Sets zum Vasopressin/Aquaporin-System, dem TWEAK/Fn14-Signalweg, den Ionenkanälen der Cochlea und den Ionenkanälen des endlymphatischen Sacks zusammengestellt und getestet. Das Gen-Set zum TWEAK/Fn14-Signalweg basierte dabei auf der Hypothese einer autoimmunen Ursache des Morbus Menière. Dieser Signalweg wurde ausgewählt, da Frejo et al. (2017) die Assoziation einer genetischen Variante, die regulatorische Effekte auf den TWEAK/Fn14-Signalweg hatte, mit dem Morbus Menière zeigen konnten.

In der Gen-Set-Analyse zeigte keines der untersuchten Gen-Sets in der kompetitiven Testung eine signifikante Assoziation zum Morbus Menière. Eine mögliche Ursache dafür könnte in einer zu geringen Power zur Detektion einer Assoziation aufgrund einer zu geringen Probandenzahl bestehen (Hong & Park, 2012).

Daneben kann das negative Ergebnis auch daran liegen, dass die Gen-Sets die unterschiedlichen Hypothesen nicht korrekt abbilden. Bei der Zusammenstellung von Gen-Sets stellt sich immer die Frage, inwiefern diese einen zu untersuchenden biologischen Prozess korrekt abbilden (Mooney & Wilmot, 2015). Mögliche Ursachen für eine fehlerhafte Abbildung wurden im Methodenabschnitt diskutiert. Neben diesem Problem kommt es auch bei der Zuordnung von

SNVs zu Genen dazu, dass nicht alle SNVs, die einen Einfluss auf ein bestimmtes Gen haben, tatsächlich diesem zugeordnet werden. Auch dieser Umstand reduziert die Power zur Detektion der Assoziation eines Gen-Sets. Zwar kann die Abwesenheit einer Assoziation auch dadurch bedingt sein, dass die Hypothesen tatsächlich nicht zutreffen (Fridley & Biernacka, 2011), angesichts der zwangsläufig eingeschränkten Validität der Gen-Sets und beschränkten Probandenzahl lassen sich die Ergebnisse allerdings nicht eindeutig interpretieren.

4.3 Ausblick

Die Pathophysiologie des Morbus Menière bleibt angesichts der inkonsistenten und negativen Ergebnisse verschiedener genetischer Assoziationsstudien und therapeutischer Ansätze weiterhin unklar. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Assoziation von SNX20 bzw. einem Haplotyp mit regulatorischem Effekt auf SNX20 und NOD2 liefert Hinweise darauf, dass in der Pathophysiologie des Morbus Menière immunologische Prozesse involviert sind.

Die jeweiligen Effektstärken durch genetische Varianten sind allerdings gering, womit der Morbus Menière weiterhin als multifaktorielle Erkrankung betrachtet werden muss. Zur weiteren Erforschung möglicher Umweltfaktoren, die zur Entstehung des Morbus Menière beitragen, wären klinische Fall-Kontroll-Studien zu möglichen auslösenden Faktoren und weitere Untersuchungen zur Komorbidität mit anderen, insbesondere autoimmunen, Erkrankungen wünschenswert.

Allgemein hat sich gezeigt, dass genomweite Assoziationsstudien insbesondere durch größere Fallzahlen eine erhöhte Power zur Detektion assoziierter Varianten erhalten. Aufgrund der relativen Seltenheit und schwierigen Diagnostik des Morbus Menière ergeben sich hier Probleme bei der Rekrutierung einer ausreichenden Anzahl von Patienten. Angesichts dieser Faktoren wären zum einen neue Studien mit größeren Fallzahlen und zum anderen Metaanalysen basierend auf mehreren Probandenkollektiven wünschenswert. Neben einer Erhöhung der Probandenzahl ist auch die Erfassung seltener SNVs eine vielversprechende Methode zur Detektion weiterer genetischer Einflussfaktoren auf den Morbus Menière.

Auch Methoden zur funktionellen Assoziationsanalyse auf dem Level von Genen und Gen-Sets durch bioinformatische Methoden könnten dazu beitragen, die Pathophysiologie des Morbus Menière aufzuklären, um so letztendlich neuartige therapeutische und diagnostische Möglichkeiten zu entwickeln.

Literaturverzeichnis

- Anderson, C. A./Pettersson, F. H./Barrett, J. C./Zhuang, J. J./Ragoussis, J./Cardon, L. R. & Morris, A. P. (2008). Evaluating the Effects of Imputation on the Power, Coverage, and Cost Efficiency of Genome-wide SNP Platforms. *The American Journal of Human Genetics*, 83(1), 112-119. doi:10.1016/j.ajhg.2008.06.008
- 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. *Nature Protocols*, 5(9), 1564-1573. doi:10.1038/nprot.2010.116
- Anniko, M. & Wróblewski, R. (1986). Ionic environment of cochlear hair cells. *Hearing Research*, 22(1), 279-293. doi:10.1016/0378-5955(86)90104-8
- Aoki, M./Ando, K./Kuze, B./Mizuta, K./Hayashi, T. & Ito, Y. (2005). The association of antidiuretic hormone levels with an attack of Meniere's disease. *Clinical Otolaryngology*, 30(6), 521-525. doi:10.1111/j.1749-4486.2005.01107.x
- Arweiler-Harbeck, D./Horsthemke, B./Jahnke, K. & Hennies, H. C. (2011). Genetic Aspects of Familial Ménière's Disease. *Otology & Neurotology*, 32(4).
- Attyé, A./Eliezer, M./Medici, M./Tropres, I./Dumas, G./Krainik, A. & Schmerber, S. (2018). In vivo imaging of saccular hydrops in humans reflects sensorineural hearing loss rather than Meniere's disease symptoms. *European Radiology*, 28(7), 2916-2922. doi:10.1007/s00330-017-5260-7
- Ay, F. & Noble, W. S. (2015). Analysis methods for studying the 3D architecture of the genome. *Genome Biology*, 16(1), 183. doi:10.1186/s13059-015-0745-7
- Baillie, J. K./Arner, E./Daub, C./De Hoon, M./Itoh, M./Kawaji, H./Lassmann, T./Carninci, P./Forrest, A. R. R./Hayashizaki, Y./Consortium, F./Faulkner, G. J./Wells, C. A./Rehli, M./Pavli, P./Summers, K. M. & Hume, D. A. (2017). Analysis of the human monocyte-derived macrophage transcriptome and response to lipopolysaccharide provides new insights into genetic aetiology of inflammatory bowel disease. *PLOS Genetics*, 13(3), e1006641. doi:10.1371/journal.pgen.1006641
- Barrett, J. C./Hansoul, S./Nicolae, D. L./Cho, J. H./Duerr, R. H./Rioux, J. D./Brant, S. R./Silverberg, M. S./Taylor, K. D./Barmada, M. M./Bitton, A./Dassopoulos, T./Datta, L. W./Green, T./Griffiths, A. M./Kistner, E. O./Murtha, M. T./Regueiro, M. D./Rotter, J. I./Schumm, L. P./Steinhart, A. H./Targan, S. R./Xavier, R. J./Consortium, N. I. G./Libioulle, C./Sandor, C./Lathrop, M./Belaiche, J./Dewit, O./Gut, I./Heath, S./Laukens, D./Mni, M./Rutgeerts, P./Van Gossum, A./Zelenika, D./Franchimont, D./Hugot, J.-P./de Vos, M./Vermeire, S./Louis, E./Belgian-French, I. B. D. C./Wellcome Trust Case Control, C./Cardon, L. R./Anderson, C. A./Drummond, H./Nimmo, E./Ahmad, T./Prescott, N. J./Onnie, C. M./Fisher, S. A./Marchini, J./Ghori, J./Bumpstead, S./Gwilliam, R./Tremelling, M./Deloukas, P./Mansfield, J./Jewell, D./Satsangi, J./Mathew, C. G./Parkes, M./Georges, M. & Daly, M. J. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics*, 40(8), 955-962. doi:10.1038/ng.175
- Baumgarten, D./Reker, U. & Rudert, H. (1983). Monosymptomatische Frühformen der Ménièreschen Krankheit. [Monosymptomatic Onset of Menière's Disease]. *Laryngo-Rhino-Otologie* 62(11), 505-507. doi:10.1055/s-2007-1008484

- Beitz, E./Zenner, H.-P. & Schultz, J. E. (2003). Aquaporin-mediated fluid regulation in the inner ear. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(3), 315-329.
- Bhattacharjee, M./Raju, R./Radhakrishnan, A./Nanjappa, V./Muthusamy, B./Singh, K./Kuppusamy, D./Lingala, B. T./Pan, A./Mathur, P. P./Harsha, H. C./Prasad, T. S. K./Atkins, G. J./Pandey, A. & Chatterjee, A. (2012). A Bioinformatics Resource for TWEAK-Fn14 Signaling Pathway. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 376470-376470. doi:10.1155/2012/376470
- Bland, J. M. & Altman, D. G. (1995). Multiple significance tests: the Bonferroni method. *British Medical Journal*, 310(6973), 170. doi:10.1136/bmj.310.6973.170
- Bosher, S. K. & Warren, R. L. (1968). Observations on the electrochemistry of the cochlear endolymph of the rat: a quantitative study of its electrical potential and ionic composition as determined by means of flame spectrophotometry. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 171(1023), 227-247. doi:10.1098/rspb.1968.0066
- 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./Dragović, 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./Ripke, S./Rujescu, D./Sauer, H./Shaikh, M./Sussmann, J./Suvisaari, J./Tosato, S./Toulopoulou, 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. *Biological Psychiatry*, 75(5), 386-397. doi:10.1016/j.biopsych.2013.03.033
- Brewerton, D. A./Hart, F. D./Nicholls, A./Caffrey, M./James, D. C. & Sturrock, R. D. (1973). Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet*, 1(7809), 904-907. doi:10.1016/s0140-6736(73)91360-3
- Burkly, L. C./Michaelson, J. S. & Zheng, T. S. (2011). TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses. *Immunological Reviews*, 244(1), 99-114. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01054.x
- Bush, W. S. & Moore, J. H. (2012). Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLOS Computational Biology*, 8(12), e1002822-e1002822. doi:10.1371/journal.pcbi.1002822
- Campbell, C. A./Della Santina, C. C./Meyer, N. C./Smith, N. B./Myrie, O. A./Stone, E. M./Fukushima, K./Califano, J./Carey, J. P./Hansen, M. R./Gantz, B. J./Minor, L. B. & Smith, R. J. H. (2010). Polymorphisms in KCNE1 or KCNE3 are not associated with Ménière disease in the Caucasian population. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152A(1), 67-74. doi:10.1002/ajmg.a.33114
- Candreia, C./Schmuziger, N. & Gürtler, N. (2010). Molecular analysis of aquaporin genes 1 to 4 in patients with Ménière's disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26(4-5), 787-792. doi:10.1159/000322346
- Casani, A. P./Piaggi, P./Cerchiai, N./Seccia, V./Sellari Franceschini, S. & Dallan, I. (2011). Intratympanic Treatment of Intractable Unilateral Ménière Disease: Gentamicin or Dexamethasone? A Randomized Controlled Trial. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 146(3), 430-437. doi:10.1177/0194599811429432

- Chan, K.-C./Wu, C.-M./Ho, W.-L. & Lai, P.-C. (2018). Association of Ménière Disease with Human Leukocyte Antigen in Taiwanese Population. *Ear, Nose & Throat Journal*, 97(12), 396-402. doi:10.1177/014556131809701208
- Chang, C. C./Chow, C. C./Tellier, L. C. A. M./Vattikuti, S./Purcell, S. M. & Lee, J. J. (2015). Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 4(1), 7. doi:10.1186/s13742-015-0047-8
- Chiarella, G./Petrolo, C. & Cassandro, E. (2015). The genetics of Ménière's disease. *The Application of Clinical Genetics*, 8, 9-17. doi:10.2147/TACG.S59024
- Colletti, V./Carner, M. & Colletti, L. (2007). Auditory Results After Vestibular Nerve Section and Intratympanic Gentamicin for Ménière's Disease. *Otology & Neurotology*, 28(2), 145-151. doi:10.1097/MAO.0b013e31802c7989
- Committee on Hearing and Equilibrium. (1995). Committee on Hearing and Equilibrium Guidelines for the Diagnosis and Evaluation of Therapy in Meniere's Disease. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 113(3), 181-185. doi:10.1016/S0194-5998(95)70102-8
- da Costa, S. S./de Sousa, L. C. A. & de Toledo Piza, M. R. (2002). Meniere's disease: overview, epidemiology, and natural history. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 35(3), 455-495. doi:10.1016/S0030-6665(02)00028-2
- de Leeuw, C. A./Mooij, J. M./Heskes, T. & Posthuma, D. (2015). MAGMA: generalized gene-set analysis of GWAS data. *PLOS Computational Biology*, 11(4), e1004219.
- de Leeuw, C. A./Neale, B. M./Heskes, T. & Posthuma, D. (2016). The statistical properties of gene-set analysis. *Nature Reviews Genetics*, 17, 353. doi:10.1038/nrg.2016.29
- Degerman, E./in 't Zandt, R./Pålbrink, A.-K. & Magnusson, M. (2015). Vasopressin induces endolymphatic hydrops in mouse inner ear, as evaluated with repeated 9.4 T MRI. *Hearing Research*, 330, 119-124. doi:10.1016/j.heares.2015.05.008
- Delaneau, O./Marchini, J. & Zagury, J.-F. (2012). A linear complexity phasing method for thousands of genomes. *Nature Methods*, 9(2), 179-181. doi:10.1038/nmeth.1785
- Di Paolo, N. C. & Shayakhmetov, D. M. (2016). Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nature Immunology*, 17(8), 906-913.
- Dohlman, G. F. (1980). Mechanism of the Ménière Attack. *Journal for Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery*, 42(1-2), 10-19. doi:10.1159/000275476
- Doi, K./Sato, T./Kuramasu, T./Hibino, H./Kitahara, T./Horii, A./Matsushiro, N./Fuse, Y. & Kubo, T. (2005). Meniere's disease is associated with single nucleotide polymorphisms in the human potassium channel genes, KCNE1 and KCNE3. *Journal for Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery*, 67(5), 289-293. doi:10.1159/000089410
- Edwards, S. L./Beesley, J./French, J. D. & Dunning, A. M. (2013). Beyond GWASs: illuminating the dark road from association to function. *American Journal of Human Genetics*, 93(5), 779-797. doi:10.1016/j.ajhg.2013.10.012
- Ekdale, E. G. (2016). Form and function of the mammalian inner ear. *Journal of Anatomy*, 228(2), 324-337. doi:10.1111/joa.12308
- Farrugia, M. & Baron, B. (2017). The Role of Toll-Like Receptors in Autoimmune Diseases through Failure of the Self-Recognition Mechanism. *International Journal of Inflammation*, 2017, 12. doi:10.1155/2017/8391230
- First, M. B. (1997). Structured clinical interview for DSM-IV axis I disorders. *Biometrics Research Department*.
- First, M. B./Gibbon, M./Spitzer, R. L./Williams, J. B. & Benjamin, L. S. (1997). *Structured Clinical Interview for DSM-IV® Axis II Personality Disorders SCID-II*: American Psychiatric Pub.

- Flook, M. & Lopez-Escamez, J. A. (2018). Meniere's disease: Genetics and the immune system. *Current Otorhinolaryngology Reports*, 6(1), 24-31.
- Frejo, L./Requena, T./Okawa, S./Gallego-Martinez, A./Martinez-Bueno, M./Aran, I./Batuecas-Caletrio, A./Benitez-Rosario, J./Espinosa-Sanchez, J. M./Fraile-Rodrigo, J. J./García-Arumi, A. M./González-Aguado, R./Marques, P./Martin-Sanz, E./Perez-Fernandez, N./Pérez-Vázquez, P./Perez-Garrigues, H./Santos-Perez, S./Soto-Varela, A./Tapia, M. C./Trinidad-Ruiz, G./del Sol, A./Alarcon Riquelme, M. E. & Lopez-Escamez, J. A. (2017). Regulation of Fn14 Receptor and NF- κ B Underlies Inflammation in Meniere's Disease. *Frontiers in Immunology*, 8(1739). doi:10.3389/fimmu.2017.01739
- Frejo, L./Soto-Varela, A./Santos-Perez, S./Aran, I./Batuecas-Caletrio, A./Perez-Guillen, V./Perez-Garrigues, H./Fraile, J./Martin-Sanz, E./Tapia, M. C./Trinidad, G./García-Arumi, A. M./González-Aguado, R./Espinosa-Sanchez, J. M./Marques, P./Perez, P./Benitez, J. & Lopez-Escamez, J. A. (2016). Clinical Subgroups in Bilateral Meniere Disease. *Frontiers in Neurology*, 7(182). doi:10.3389/fneur.2016.00182
- Fridley, B. L. & Biernacka, J. M. (2011). Gene set analysis of SNP data: benefits, challenges, and future directions. *European Journal of Human Genetics*, 19(8), 837-843. doi:10.1038/ejhg.2011.57
- Furuta, T./Teranishi, M./Uchida, Y./Nishio, N./Kato, K./Otake, H./Yoshida, T./Tagaya, M./Suzuki, H./Sugiura, M./Sone, M./Hiramatsu, M./Sugiura, S./Ando, F./Shimokata, H. & Nakashima, T. (2011). Association of interleukin-1 gene polymorphisms with sudden sensorineural hearing loss and Ménière's disease. *International Journal of Immunogenetics*, 38(3), 249-254. doi:10.1111/j.1744-313X.2011.01004.x
- Gabashvili, I. S./Sokolowski, B. H. A./Morton, C. C. & Giersch, A. B. S. (2007). Ion channel gene expression in the inner ear. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*, 8(3), 305-328. doi:10.1007/s10162-007-0082-y
- 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. *American Journal of Medical Genetics Part B*, 168(7), 557-563. doi:10.1002/ajmg.b.32330
- Gates, G. A./Cooper Jr, J./Kannel, W. B. & Miller, N. J. (1990). Hearing in the elderly: the Framingham cohort, 1983-1985. Part I. Basic audiometric test results. *Ear and Hearing*, 11(4), 247-256.
- Gazquez, I./Moreno, A./Requena, T./Ohmen, J./Santos-Perez, S./Aran, I./Soto-Varela, A./Pérez-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 Ménière's disease. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 270(4), 1521-1529. doi:10.1007/s00405-012-2268-0
- 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 Ménière's disease. *PLOS ONE*, 6(10), e26759-e26759. doi:10.1371/journal.pone.0026759
- Hallpike, C. S. & Cairns, H. (1938). Observations on the Pathology of Ménière's Syndrome: (Section of Otolaryngology). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 31(11), 1317-1336.
- Hamid, M. & Trune, D. (2008). Issues, indications, and controversies regarding intratympanic steroid perfusion. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 16(5), 434-440. doi:10.1097/MOO.0b013e32830ce796
- Hardy, G. H. (1908). Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, 28(706), 49-50.

- Harris, J. P. & Alexander, T. H. (2010). Current-Day Prevalence of Ménière's Syndrome. *Audiology and Neurotology*, 15(5), 318-322. doi:10.1159/000286213
- Havia, M./Kentala, E. & Pyykkö, I. (2005). Prevalence of Menière's Disease in General Population of Southern Finland. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 133(5), 762-768. doi:10.1016/j.otohns.2005.06.015
- Hellwege, J. N./Keaton, J. M./Giri, A./Gao, X./Velez Edwards, D. R. & Edwards, T. L. (2017). Population Stratification in Genetic Association Studies. *Current Protocols in Human Genetics*, 95, 1.22.21-21.22.23. doi:10.1002/cphg.48
- Hietikko, E./Kotimäki, J./Kentala, E./Klockars, T./Sorri, M. & Männikkö, M. (2011). Finnish familial Meniere disease is not linked to chromosome 12p12.3, and anticipation and cosegregation with migraine are not common findings. *Genetics in Medicine*, 13(5), 415-420. doi:10.1097/GIM.0b013e3182091a41
- Hietikko, E./Kotimäki, J./Okuloff, A./Sorri, M. & Männikkö, M. (2012). A replication study on proposed candidate genes in Ménière's disease, and a review of the current status of genetic studies. *International Journal of Audiology*, 51(11), 841-845. doi:10.3109/14992027.2012.705900
- Hindorff, L. A./Sethupathy, P./Junkins, H. A./Ramos, E. M./Mehta, J. P./Collins, F. S. & Manolio, T. A. (2009). Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), 9362-9367. doi:10.1073/pnas.0903103106
- Hong, E. P. & Park, J. W. (2012). Sample size and statistical power calculation in genetic association studies. *Genomics & Informatics*, 10(2), 117-122. doi:10.5808/GI.2012.10.2.117
- Horner, K. C. (1993). Functional changes associated with experimentally induced endolymphatic hydrops. *Hearing Research*, 68(1), 1-18. doi:10.1016/0378-5955(93)90059-A
- Howie, B./Fuchsberger, C./Stephens, M./Marchini, J. & Abecasis, G. R. (2012). Fast and accurate genotype imputation in genome-wide association studies through pre-phasing. *Nature Genetics*, 44(8), 955-959. doi:10.1038/ng.2354
- Hugot, J.-P./Chamaillard, M./Zouali, H./Lesage, S./Cézard, J.-P./Belaiche, J./Almer, S./Tysk, C./O'Morain, C. A./Gassull, M./Binder, V./Finkel, Y./Cortot, A./Modigliani, R./Laurent-Puig, P./Gower-Rousseau, C./Macry, J./Colombel, J.-F./Sahbatou, M. & Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411(6837), 599-603. doi:10.1038/35079107
- Hunter, J. D. (2007). Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science & Engineering*, 9(3), 90-95. doi:10.1109/MCSE.2007.55
- Huppert, D./Strupp, M. & Brandt, T. (2010). Long-term course of Menière's disease revisited. *Acta Oto-Laryngologica*, 130(6), 644-651. doi:10.3109/00016480903382808
- International HapMap, C. (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063), 1299-1320. doi:10.1038/nature04226
- Jackson, J. E. (2005). *A user's guide to principal components* (Vol. 587): John Wiley & Sons.
- Jager, K. J./Zoccali, C./MacLeod, A. & Dekker, F. W. (2008). Confounding: What it is and how to deal with it. *Kidney International*, 73(3), 256-260. doi:10.1038/sj.ki.5002650
- James, A. L. & Burton, M. J. (2001). Betahistine for Menière's disease or syndrome. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2001(1), CD001873-CD001873. doi:10.1002/14651858.CD001873
- Jung, I./Schmitt, A./Diao, Y./Lee, A. J./Liu, T./Yang, D./Tan, C./Eom, J./Chan, M./Chee, S./Chiang, Z./Kim, C./Masliah, E./Barr, C. L./Li, B./Kuan, S./Kim, D. & Ren, B. (2019).

- A compendium of promoter-centered long-range chromatin interactions in the human genome. *Nature Genetics*, 51(10), 1442-1449. doi:10.1038/s41588-019-0494-8
- Kamijo, S./Nakajima, A./Kamata, K./Kurosawa, H./Yagita, H. & Okumura, K. (2008). Involvement of TWEAK/Fn14 interaction in the synovial inflammation of RA. *Rheumatology*, 47(4), 442-450.
- Kämpfe Nordström, C./Danckwardt-Lillieström, N./Laurell, G./Liu, W. & Rask-Andersen, H. (2019). The Human Endolymphatic Sac and Inner Ear Immunity: Macrophage Interaction and Molecular Expression. *Frontiers in Immunology*, 9(3181). doi:10.3389/fimmu.2018.03181
- Kanehisa, M./Sato, Y./Kawashima, M./Furumichi, M. & Tanabe, M. (2015). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D457-D462. doi:10.1093/nar/gkv1070
- Kariya, S./Cureoglu, S./Fukushima, H./Nomiya, S./Nomiya, R./Schachern, P. A./Nishizaki, K. & Paparella, M. M. (2009). Vascular Findings in the Stria Vascularis of Patients With Unilateral or Bilateral Ménière's Disease: A Histopathologic Temporal Bone Study. *Otology & Neurotology*, 30(7), 1006-1012. doi:10.1097/MAO.0b013e3181b4ec89
- Keithley, E. M./Horowitz, S. & Ruckenstein, M. J. (1995). NA,K-ATPase in the Cochlear Lateral Wall of Human Temporal Bones with Endolymphatic Hydrops. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 104(11), 858-863. doi:10.1177/000348949510401106
- Khorsandi, M. T./Amoli, M. M./Borghei, H./Emami, H./Amiri, P./Amirzargar, A. & Yazdani, N. (2011). Associations between HLA-C alleles and definite Meniere's disease. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 10(2), 119-122.
- Kim, S. H./Kim, B. G./Kim, J. Y./Roh, K. J./Suh, M. J./Jung, J./Moon, I. S./Moon, S. K. & Choi, J. Y. (2015). Electrogenic transport and K(+) ion channel expression by the human endolymphatic sac epithelium. *Scientific Reports*, 5, 18110-18110. doi:10.1038/srep18110
- Kitahara, T./Doi, K./Maekawa, C./Kizawa, K./Horii, A./Kubo, T. & Kiyama, H. (2008). Meniere's Attacks Occur in the Inner Ear with Excessive Vasopressin Type-2 Receptors. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(12), 1295-1300. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01792.x
- Kitsios, G. D. & Zintzaras, E. (2009). Genome-wide association studies: hypothesis-“free” or “engaged”? *Translational Research*, 154(4), 161-164. doi:10.1016/j.trsl.2009.07.001
- Klar, J./Frykholm, C./Friberg, U. & Dahl, N. (2006). A Meniere's disease gene linked to chromosome 12p12.3. *American Journal of Medical Genetics Part B*, 141b(5), 463-467. doi:10.1002/ajmg.b.30347
- Knepper, M. A. & Inoue, T. (1997). Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(4), 560-564. doi:10.1016/S0955-0674(97)80034-8
- Kotimäki, J./Sorri, M./Aantaa, E. & Nuutinen, J. (1999). Prevalence of meniere disease in finland. *The Laryngoscope*, 109(5), 748-753. doi:10.1097/00005537-199905000-00013
- Koyama, S./Mitsuishi, Y./Bibee, K./Watanabe, I. & Terasaki, P. I. (1993). HLA Associations with Meniere's Disease. *Acta Oto-Laryngologica*, 113(5), 575-578. doi:10.3109/00016489309135866
- Kwon, J. M. & Goate, A. M. (2000). The candidate gene approach. *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 24(3), 164-168.
- LaFramboise, T. (2009). Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research*, 37(13), 4181-4193. doi:10.1093/nar/gkp552
- Laurikainen, E. (2000). Betahistine Effects on Cochlear Blood Flow: From the Laboratory to the Clinic. *Acta Oto-Laryngologica*, 120(539), 5-7. doi:10.1080/000164800750044407

- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), a001651-a001651. doi:10.1101/cshperspect.a001651
- Lempert, T./Olesen, J./Furman, J./Waterston, J./Seemungal, B./Carey, J./Bisdorff, A./Versino, M./Evers, S. & Newman-Toker, D. (2012). Vestibular migraine: diagnostic criteria. *Journal of Vestibular Research*, 22(4), 167-172. doi:10.3233/ves-2012-0453
- 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./Räikkönen, 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). *Molecular Psychiatry*, 19(2), 168-174. doi:10.1038/mp.2013.166
- Li, Y. J./Jin, Z. G. & Xu, X. R. (2016). Variants in the KCNE1 or KCNE3 gene and risk of Ménière's disease: A meta-analysis. *Journal of Vestibular Research*, 25(5-6), 211-218. doi:10.3233/ves-160569
- Liberzon, A./Birger, C./Thorvaldsdóttir, H./Ghandi, M./Mesirov, J. P. & Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Systems*, 1(6), 417-425. doi:10.1016/j.cels.2015.12.004
- Liberzon, A./Subramanian, A./Pinchback, R./Thorvaldsdóttir, H./Tamayo, P. & Mesirov, J. P. (2011). Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(12), 1739-1740. doi:10.1093/bioinformatics/btr260
- Lim, J. S./Lange, M. E. & Megerian, C. A. (2003). Serum Antidiuretic Hormone Levels in Patients With Unilateral Meniere's Disease. *The Laryngoscope*, 113(8), 1321-1326. doi:10.1097/00005537-200308000-00011
- Liu, H./Irwanto, A./Fu, X. a./Yu, G./Yu, Y./Sun, Y./Wang, C./Wang, Z./Okada, Y./Low, H./Li, Y./Liany, H./Chen, M./Bao, F./Li, J./You, J./Zhang, Q./Liu, J./Chu, T./Andiappan, A. K./Wang, N./Niu, G./Liu, D./Yu, X./Zhang, L./Tian, H./Zhou, G./Rotzschke, O./Chen, S./Zhang, X./Liu, J. & Zhang, F. (2015). Discovery of six new susceptibility loci and analysis of pleiotropic effects in leprosy. *Nature Genetics*, 47(3), 267-271. doi:10.1038/ng.3212
- Liu, Y.-P./Gu, Y.-M./Thijs, L./Knapen Marjo, H. J./Salvi, E./Citterio, L./Petit, T./Carpini Simona, D./Zhang, Z./Jacobs, L./Jin, Y./Barlassina, C./Manunta, P./Kuznetsova, T./Verhamme, P./Struijker-Boudier Harry, A./Cusi, D./Vermeer, C. & Staessen Jan, A. (2015). Inactive Matrix Gla Protein Is Causally Related to Adverse Health Outcomes. *Hypertension*, 65(2), 463-470. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04494
- 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. (2015). Diagnostic criteria for Menière's disease. *Journal of Vestibular Research*, 25(1), 1-7.
- Lopez-Escamez, J. A./Lopez-Nevot, A./Cortes, R./Ramal, L. & Lopez-Nevot, M. A. (2002). Expression of A, B, C and DR antigens in definite Meniere's disease in a Spanish population. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 259(7), 347-350. doi:10.1007/s00405-002-0463-0
- Lopez-Escamez, J. A./Vilchez, J. R./Soto-Varela, A./Santos-Perez, S./Perez-Garrigues, H./Aran, I. & Lopez-Nevot, M. A. (2007). HLA-DRB1*1101 allele may be associated with bilateral

- Ménière's disease in southern European population. *Otology & Neurotology*, 28(7), 891-895. doi:10.1097/MAO.0b013e3180dca1cc
- Magnan, J./Özgirgin, O. N./Trabalzini, F./Lacour, M./Lopez-Escamez, J. A./Magnusson, M./Güneri, E. A./Guyot, J. P./Nutti, D. & Mandalà, M. (2018). European Position Statement on Diagnosis, and Treatment of Meniere's Disease. *The Journal of International Advanced Otology*, 14(2), 317-321. doi:10.5152/iao.2018.140818
- Maleki, F./Ovens, K./Hogan, D. J. & Kusalik, A. J. (2020). Gene Set Analysis: Challenges, Opportunities, and Future Research. *Frontiers in Genetics*, 11(654). doi:10.3389/fgene.2020.00654
- Manolio, T. A./Collins, F. S./Cox, N. J./Goldstein, D. B./Hindorff, L. A./Hunter, D. J./McCarthy, M. I./Ramos, E. M./Cardon, L. R./Chakravarti, A./Cho, J. H./Guttmacher, A. E./Kong, A./Kruglyak, L./Mardis, E./Rotimi, C. N./Slatkin, M./Valle, D./Whittemore, A. S./Boehnke, M./Clark, A. G./Eichler, E. E./Gibson, G./Haines, J. L./Mackay, T. F. C./McCarroll, S. A. & Visscher, P. M. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 461(7265), 747-753. doi:10.1038/nature08494
- Melchiorri, L./Martini, A./Rizzo, R./Berto, A./Adinolfi, E. & Baricord, O. R. (2002). Human leukocyte antigen-A, -B, -C and -DR alleles and soluble human leukocyte antigen class I serum level in Ménière's disease. *Acta Oto-Laryngologica - Supplementum*(548), 26-29. doi:10.1080/00016480260094938
- Mhatre, A. N./Jero, J./Chiappini, I./Bolasco, G./Barbara, M. & Lalwani, A. K. (2002). Aquaporin-2 expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Meniere's disease. *Hearing Research*, 170(1), 59-69. doi:doi.org/10.1016/S0378-5955(02)00452-5
- Mira, E./Guidetti, G./Ghilardi, P./Fattori, B./Malannino, N./Maiolino, L./Mora, R./Ottoboni, S./Pagnini, P./Leprini, M./Pallestrini, E./Passali, D./Nutti, D./Russolo, M./Tirelli, G./Simoncelli, C./Brizi, S./Vicini, C. & Frasconi, P. (2003). Betahistine dihydrochloride in the treatment of peripheral vestibular vertigo. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 260(2), 73-77. doi:10.1007/s00405-002-0524-4
- Mooney, M. A. & Wilmot, B. (2015). Gene set analysis: A step-by-step guide. *American Journal of Medical Genetics. Part B*, 168(7), 517-527. doi:10.1002/ajmg.b.32328
- Morita, N./Kariya, S./Farajzadeh Deroee, A./Cureoglu, S./Nomiya, S./Nomiya, R./Harada, T. & Paparella, M. M. (2009). Membranous labyrinth volumes in normal ears and Ménière disease: a three-dimensional reconstruction study. *The Laryngoscope*, 119(11), 2216-2220. doi:10.1002/lary.20723
- Morrison, A. W./Bailey, M. E. S. & Morrison, G. A. J. (2009). Familial Ménière's disease: clinical and genetic aspects. *The Journal of Laryngology & Otology*, 123(1), 29-37. doi:10.1017/S0022215108002788
- Nakashima, T./Pyykkö, I./Arroll, M. A./Casselbrant, M. L./Foster, C. A./Manzoor, N. F./Megerian, C. A./Naganawa, S. & Young, Y.-H. (2016). Meniere's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16028. doi:10.1038/nrdp.2016.28
- Nam, D./Kim, J./Kim, S.-Y. & Kim, S. (2010). GSA-SNP: a general approach for gene set analysis of polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server issue), W749-W754. doi:10.1093/nar/gkq428
- Naranbhai, V./Fairfax, B. P./Makino, S./Humburg, P./Wong, D./Ng, E./Hill, A. V. S. & Knight, J. C. (2015). Genomic modulators of gene expression in human neutrophils. *Nature Communications*, 6(1), 7545. doi:10.1038/ncomms8545
- NCBI Resource Coordinators. (2018). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D8-D13. doi:10.1093/nar/gkx1095

- 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. E./Fisher, E. M. C./St Jean, P. L./Giegling, I./Hartmann, A. M./Möller, 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 Genetics*, 5(2), e1000373-e1000373. doi:10.1371/journal.pgen.1000373
- Nelis, M./Esko, T./Mägi, R./Zimprich, F./Zimprich, A./Toncheva, D./Karachanak, S./Piskáčková, T./Balašćák, I./Peltonen, L./Jakkula, E./Rehnström, K./Lathrop, M./Heath, S./Galan, P./Schreiber, S./Meitinger, T./Pfeufer, A./Wichmann, H. E./Melegh, B./Polgár, N./Toniolo, D./Gasparini, P./D'Adamo, P./Klovins, J./Nikitina-Zake, L./Kučinskas, V./Kasnauskienė, J./Lubinski, J./Debniak, T./Limborska, S./Khrunin, A./Estivill, X./Rabionet, R./Marsal, S./Julià, A./Antonarakis, S. E./Deutsch, S./Borel, C./Attar, H./Gagnebin, M./Macek, M./Krawczak, M./Remm, M. & Metspalu, A. (2009). Genetic Structure of Europeans: A View from the North–East. *PLOS ONE*, 4(5), e5472. doi:10.1371/journal.pone.0005472
- Nesvizhskii, A. I./Vitek, O. & Aebersold, R. (2007). Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nature Methods*, 4(10), 787-797. doi:10.1038/nmeth1088
- Ngo, S. T./Steyn, F. J. & McCombe, P. A. (2014). Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(3), 347-369. doi:10.1016/j.yfrne.2014.04.004
- 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 α in patients with Ménière's disease and sudden sensorineural hearing loss. *Life Sciences*, 92(10), 541-546. doi:10.1016/j.lfs.2013.01.019
- Nishioka, R./Takeda, T./Kakigi, A./Okada, T./Takebayashi, S./Taguchi, D./Nishimura, M. & Hyodo, M. (2010). Expression of aquaporins and vasopressin type 2 receptor in the stria vascularis of the cochlea. *Hearing Research*, 260(1), 11-19. doi:10.1016/j.heares.2009.09.011
- O'Leary, N. A./Wright, M. W./Brister, J. R./Ciuffo, S./Haddad, D./McVeigh, R./Rajput, B./Robbertse, B./Smith-White, B./Ako-Adjei, D./Astashyn, A./Badretin, A./Bao, Y./Blinkova, O./Brover, V./Chetvermin, V./Choi, J./Cox, E./Ermolaeva, O./Farrell, C. M./Goldfarb, T./Gupta, T./Haft, D./Hatcher, E./Hlavina, W./Joardar, V. S./Kodali, V. K./Li, W./Maglott, D./Masterson, P./McGarvey, K. M./Murphy, M. R./O'Neill, K./Pujar, S./Rangwala, S. H./Rausch, D./Riddick, L. D./Schoch, C./Shkeda, A./Storz, S. S./Sun, H./Thibaud-Nissen, F./Tolstoy, I./Tully, R. E./Vatsan, A. R./Wallin, C./Webb, D./Wu, W./Landrum, M. J./Kimchi, A./Tatusova, T./DiCuccio, M./Kitts, P./Murphy, T. D. & Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D733-745. doi:10.1093/nar/gkv1189
- Oberman, B. S./Patel, V. A./Cureoglu, S. & Isildak, H. (2017). The aetiopathologies of Ménière's disease: a contemporary review. [L'eziopatogenesi della Sindrome di Ménière: stato dell'arte]. *ACTA Otorhinolaryngologica Italica* 37(4), 250-263. doi:10.14639/0392-100X-793
- Park, J.-H./Kim, Y.-G./McDonald, C./Kanneganti, T.-D./Hasegawa, M./Body-Malapel, M./Inohara, N. & Núñez, G. (2007). RICK/RIP2 Mediates Innate Immune Responses

- Induced through Nod1 and Nod2 but Not TLRs. *The Journal of Immunology*, 178(4), 2380. doi:10.4049/jimmunol.178.4.2380
- 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(10061), 2753-2762. doi:10.1016/S0140-6736(16)31461-1
- Paulsen, F. & Waschke, J. (2010). *Sobotta, Atlas der Anatomie des Menschen, 23. Auflage* (Vol. 3). München: Elsevier.
- Pompeia, C./Hurle, B./Belyantseva, I. A./Noben-Trauth, K./Beisel, K./Gao, J./Buchhoff, P./Wistow, G. & Kachar, B. (2004). Gene expression profile of the mouse organ of Corti at the onset of hearing. *Genomics*, 83(6), 1000-1011. doi:10.1016/j.ygeno.2004.01.005
- 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. *Nature Genetics*, 38(8), 904-909. doi:10.1038/ng1847
- 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./Mössner, R./Nenadic, I./Sauer, H./Rujescu, D./Maier, W./Rietschel, M./Nöthen, M. M. & Cichon, S. (2013). Copy Number Variants in German Patients with Schizophrenia. *PLOS ONE*, 8(7), e64035. doi:10.1371/journal.pone.0064035
- Pruitt, K. D./Brown, G. R./Hiatt, S. M./Thibaud-Nissen, F./Astashyn, A./Ermolaeva, O./Farrell, C. M./Hart, J./Landrum, M. J./McGarvey, K. M./Murphy, M. R./O'Leary, N. A./Pujar, S./Rajput, B./Rangwala, S. H./Riddick, L. D./Shkeda, A./Sun, H./Tamez, P./Tully, R. E./Wallin, C./Webb, D./Weber, J./Wu, W./DiCuccio, M./Kitts, P./Maglott, D. R./Murphy, T. D. & Ostell, J. M. (2014). RefSeq: an update on mammalian reference sequences. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D756-D763. doi:10.1093/nar/gkt1114
- Pullens, B. & van Benthem, P. P. (2011). Intratympanic gentamicin for Ménière's disease or syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(3). doi:10.1002/14651858.CD008234.pub2
- Pullens, B./Verschuur, H. P. & van Benthem, P. P. (2013). Surgery for Ménière's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(2). doi:10.1002/14651858.CD005395.pub3
- Radtke, A./Neuhauser, H./von Brevern, M./Hottenrott, T. & Lempert, T. (2011). Vestibular migraine – validity of clinical diagnostic criteria. *Cephalalgia*, 31(8), 906-913. doi:10.1177/0333102411405228
- 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./Pérez-Fernández, N. & Lopez-Escamez, J. A. (2014). Familial clustering and genetic heterogeneity in Meniere's disease. *Clinical Genetics*, 85(3), 245-252. doi:10.1111/cge.12150
- Requena, T./Gazquez, I./Moreno, A./Batuecas, A./Aran, I./Soto-Varela, A./Santos-Perez, S./Perez, N./Perez-Garrigues, H./Lopez-Nevot, A./Martin, E./Sanz, R./Perez, P./Trinidad, G./Alarcon-Riquelme, M. E./Teggi, R./Zagato, L./Lopez-Nevot, M. A. & Lopez-Escamez, J. A. (2013). Allelic variants in TLR10 gene may influence bilateral affectation and clinical course of Meniere's disease. *Immunogenetics*, 65(5), 345-355. doi:10.1007/s00251-013-0683-z
- Rice, J. P./Reich, T./Buchholz, K. K./Neuman, R. J./Fishman, R./Rochberg, N./Hesselbrock, V. M./Nurnberger, J. I./Schuckit Jr., M. A. & Begleiter, H. (1995). Comparison of Direct

- Interview and Family History Diagnoses of Alcohol Dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 19(4), 1018-1023. doi:10.1111/j.1530-0277.1995.tb00983.x
- 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, 591-591. doi:10.3389/fneur.2018.00591
- Ryckman, K. & Williams, S. M. (2008). Calculation and Use of the Hardy-Weinberg Model in Association Studies. *Current Protocols in Human Genetics*, 57(1), 1.18.11-11.18.11. doi:10.1002/0471142905.hg0118s57
- Salt, A. N./Mlechar, I. & Thalmann, R. (1987). Mechanisms of endocochlear potential generation by stria vascularis. *The Laryngoscope*, 97(8), 984-991. doi:10.1288/00005537-198708000-00020
- Salt, A. N. & Plontke, S. K. (2010). Endolymphatic hydrops: pathophysiology and experimental models. *Otolaryngologic clinics of North America*, 43(5), 971-983. doi:10.1016/j.otc.2010.05.007
- Schaid, D. J./Chen, W. & Larson, N. B. (2018). From genome-wide associations to candidate causal variants by statistical fine-mapping. *Nature Reviews Genetics*, 19(8), 491-504. doi:10.1038/s41576-018-0016-z
- Schwartz, N./Rubinstein, T./Burkly, L. C./Collins, C. E./Blanco, I./Su, L./Hojaili, B./Mackay, M./Aranow, C. & Stohl, W. (2009). Urinary TWEAK as a biomarker of lupus nephritis: a multicenter cohort study. *Arthritis Research & Therapy*, 11(5), 1-10.
- Shea, J. J. (1966). Teflon Film Drainage of the Endolymphatic Sac. *JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 83(4), 316-319. doi:10.1001/archotol.1966.00760020318004
- Sherry, S. T./Ward, M. H./Kholodov, M./Baker, J./Phan, L./Smigielski, E. M. & Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 308-311. doi:10.1093/nar/29.1.308
- Shojaku, H./Watanabe, Y./Fujisaka, M./Tsubota, M./Kobayashi, K./Yasumura, S. & Mizukoshi, K. (2005). Epidemiologic Characteristics of Definite Ménière's Disease in Japan. *Journal for Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery*, 67(5), 305-309. doi:10.1159/000089413
- Slatkin, M. (2008). Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*, 9(6), 477-485. doi:10.1038/nrg2361
- Söderman, A. C./Bagger-Sjöbäck, D./Bergenius, J. & Langius, A. (2002). Factors influencing quality of life in patients with Ménière's disease, identified by a multidimensional approach. *Otology & Neurotology*, 23(6), 941-948. doi:10.1097/00129492-200211000-00022
- Spain, S. L. & Barrett, J. C. (2015). Strategies for fine-mapping complex traits. *Human Molecular Genetics*, 24(R1), R111-R119. doi:10.1093/hmg/ddv260
- Spitz, F. (2016). Gene regulation at a distance: From remote enhancers to 3D regulatory ensembles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 57, 57-67. doi:10.1016/j.semcd.2016.06.017
- Stahle, J./Stahle, C. & Arenberg, I. K. (1978). Incidence of Ménière's Disease. *JAMA Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 104(2), 99-102. doi:10.1001/archotol.1978.00790020041009
- Stemers, F. J./Chang, W./Lee, G./Barker, D. L./Shen, R. & Gunderson, K. L. (2006). Whole-genome genotyping with the single-base extension assay. *Nature Methods*, 3(1), 31-33. doi:10.1038/nmeth842
- Stefansson, H./Rujescu, D./Cichon, S./Pietiläinen, O. P. H./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./Möller, 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./Toulopoulou, T./Bramon, E./Di Forti, M./Murray, R./Ruggeri, M./Vassos, E./Tosato, S./Walshe, M./Li, T./Vasilescu, C./Mühleisen, 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./Nöthen, M. M./Peltonen, L./Collier, D. A./St Clair, D. & Stefansson, K. (2008). Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature*, 455(7210), 232-236. doi:10.1038/nature07229
- Strupp, M./Dieterich, M. & Brandt, T. (2013). The treatment and natural course of peripheral and central vertigo. *Deutsches Ärzteblatt International* 110(29-30), 505-515; quiz 515-506. doi:10.3238/arztebl.2013.0505
- Strupp, M./Hupert, D./Frenzel, C./Wagner, J./Hahn, A./Jahn, K./Zingler, V.-C./Mansmann, U. & Brandt, T. (2008). Long-term prophylactic treatment of attacks of vertigo in Menière's disease – comparison of a high with a low dosage of betahistine in an open trial. *Acta Oto-Laryngologica*, 128(5), 520-524. doi:10.1080/00016480701724912
- Swinburne, I. A./Mosaliganti, K. R./Upadhyayula, S./Liu, T.-L./Hildebrand, D. G. C./Tsai, T. Y. C./Chen, A./Al-Obeidi, E./Fass, A. K./Malhotra, S./Engert, F./Lichtman, J. W./Kirchhausen, T./Betzig, E. & Megason, S. G. (2018). Lamellar projections in the endolymphatic sac act as a relief valve to regulate inner ear pressure. *eLife*, 7, e37131. doi:10.7554/eLife.37131
- Syed, I. & Aldren, C. (2012). Meniere's disease: an evidence based approach to assessment and management. *International Journal of Clinical Practice*, 66(2), 166-170. doi:10.1111/j.1742-1241.2011.02842.x
- Tabangin, M. E./Woo, J. G. & Martin, L. J. (2009). The effect of minor allele frequency on the likelihood of obtaining false positives. *BMC proceedings*, 3 Suppl 7(Suppl 7), S41-S41. doi:10.1186/1753-6561-3-S7-S41
- Tam, V./Patel, N./Turcotte, M./Bossé, Y./Paré, G. & Meyre, D. (2019). Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*, 20(8), 467-484. doi:10.1038/s41576-019-0127-1
- Teggi, R./Zagato, L./Delli Carpini, S./Citterio, L./Cassandro, C./Albera, R./Yang, W.-Y./Staessen, J. A./Bussi, M./Manunta, P. & Lanzani, C. (2017). Genetics of ion homeostasis in Ménière's Disease. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 274(2), 757-763. doi:10.1007/s00405-016-4375-9
- The Genomes Project Consortium. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526, 68. doi:10.1038/nature15393
- Tian, C./Gregersen, P. K. & Seldin, M. F. (2008). Accounting for ancestry: population substructure and genome-wide association studies. *Human Molecular Genetics*, 17(R2), R143-R150. doi:10.1093/hmg/ddn268
- Tokumasu, K./Tashiro, N./author_in_Japanese/Saito, A./Kawano, R./Hirose, Y./Yoneda, S. & Goto, K. (1982). Incidence and Prevalence of Meniere's Disease in Sagami-hara City, Kanagawa-ken. *Practica Oto-Rhino-Laryngologica*, 75(5special), 1165-1173. doi:10.5631/jibirin.75.5special_1165
- Travassos, L. H./Carneiro, L. A. M./Ramjeet, M./Hussey, S./Kim, Y.-G./Magalhães, J. G./Yuan, L./Soares, F./Chea, E./Le Bourhis, L./Boneca, I. G./Allaoui, A./Jones, N. L./Nuñez, G./Girardin, S. E. & Philpott, D. J. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting

- ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature Immunology*, 11(1), 55-62. doi:10.1038/ni.1823
- Trune, D. R. & Nguyen-Huynh, A. (2012). Vascular Pathophysiology in Hearing Disorders. *Seminars in Hearing*, 33(3), 242-250. doi:10.1055/s-0032-1315723
- Turner, S./Armstrong, L. L./Bradford, Y./Carlson, C. S./Crawford, D. C./Crenshaw, A. T./de Andrade, M./Doheny, K. F./Haines, J. L./Hayes, G./Jarvik, G./Jiang, L./Kullo, I. J./Li, R./Ling, H./Manolio, T. A./Matsumoto, M./McCarty, C. A./McDavid, A. N./Mirel, D. B./Paschall, J. E./Pugh, E. W./Rasmussen, L. V./Wilke, R. A./Zuvich, R. L. & Ritchie, M. D. (2011). Quality control procedures for genome-wide association studies. *Current Protocols in Human Genetics*, Chapter 1, Unit1.19-Unit11.19. doi:10.1002/0471142905.hg0119s68
- Tyrrell, J. S./Whinney, D. J. D./Ukoumunne, O. C./Fleming, L. E. & Osborne, N. J. (2014). Prevalence, Associated Factors, and Comorbid Conditions for Ménière's Disease. *Ear and Hearing*, 35(4).
- van Crujisen, N./Jaspers, J. P. C./van de Wiel, H. B. M./Wit, H. P. & Albers, F. W. J. (2006). Psychological assessment of patients with Menière's disease. *International Journal of Audiology*, 45(9), 496-502. doi:10.1080/14992020600753239
- Van Esch, B. F./Van Benthem, P. P. G./Van Der Zaag-Loonen, H. J. & Brountjes, T. D. (2016). Age of onset of Ménière's disease in the Netherlands: data from a specialised dizziness clinic. *The Journal of Laryngology & Otology*, 130(7), 624-627. doi:10.1017/S0022215116007982
- van Kuijk, A. W./Wijbrandts, C. A./Vinkenoo, M./Zheng, T. S./Reedquist, K. A. & Tak, P. P. (2010). TWEAK and its receptor Fn14 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared to psoriatic arthritis and its response to tumour necrosis factor blockade. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(01), 301-304.
- Wall, J. D. & Pritchard, J. K. (2003). Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, 4(8), 587-597. doi:10.1038/nrg1123
- Wang, K./Dickson, S. P./Stolle, C. A./Krantz, I. D./Goldstein, D. B. & Hakonarson, H. (2010). Interpretation of association signals and identification of causal variants from genome-wide association studies. *American Journal of Human Genetics*, 86(5), 730-742. doi:10.1016/j.ajhg.2010.04.003
- Wang, L./Jia, P./Wolfinger, R. D./Chen, X. & Zhao, Z. (2011). Gene set analysis of genome-wide association studies: Methodological issues and perspectives. *Genomics*, 98(1), 1-8. doi:10.1016/j.ygeno.2011.04.006
- Warth, R. & Barhanin, J. (2002). The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(3), R639-R648. doi:10.1152/ajpregu.00649.2001
- Watanabe, Y./Mizukoshi, K./Shojaku, H./Watanabe, I./Hinoki, M. & Kitahara, M. (1995). Epidemiological and clinical characteristics of Meniere's disease in Japan. *Acta Oto-Laryngologica*, 115(sup519), 206-210.
- Wigginton, J. E./Cutler, D. J. & Abecasis, G. R. (2005). A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *American Journal of Human Genetics*, 76(5), 887-893. doi:10.1086/429864
- Wladislavosky-Waserman, P./Facer, G. W./Mokri, B. & Kurland, L. T. (1984). Meniere's disease: A 30-Year epidemiologic and clinical study in rochester, mn, 1951-1980. *The Laryngoscope*, 94(8), 1098-1102. doi:10.1288/00005537-198408000-00020
- Wouters, C. H./Maes, A./Foley, K. P./Bertin, J. & Rose, C. D. (2014). Blau syndrome, the prototypic auto-inflammatory granulomatous disease. *Pediatric Rheumatology Online Journal*, 12, 33-33. doi:10.1186/1546-0096-12-33

- Xenellis, J./Morrison, A. W./McClowskey, D. & Festenstein, H. (1986). HLA antigens in the pathogenesis of Ménière's disease. *The Journal of Laryngology & Otology*, 100(1), 21-24. doi:10.1017/S0022215100098698
- Xia, Y./Herlitz, L. C./Gindea, S./Wen, J./Pawar, R. D./Misharin, A./Perlman, H./Wu, L./Wu, P. & Michaelson, J. S. (2015). Deficiency of fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14) preserves the filtration barrier and ameliorates lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(5), 1053-1070.
- Yeo, S. W./Park, S. N./Jeon, E. J./Lee, H. Y./Pyo, C. W. & Kim, T. G. (2002). Influence of human leukocyte antigen in the pathogenesis of Ménière's disease in the South Korean population. *Acta Oto-Laryngologica*, 122(8), 851-856.
- Yoo, T./Yazawa, Y./Tomoda, K. & Floyd, R. (1983). Type II collagen-induced autoimmune endolymphatic hydrops in guinea pig. *Science*, 222(4619), 65-67. doi:10.1126/science.6623056
- Zhang, F.-R./Huang, W./Chen, S.-M./Sun, L.-D./Liu, H./Li, Y./Cui, Y./Yan, X.-X./Yang, H.-T./Rong-De, Y./Chu, T.-S./Zhang, C./Zhang, L./Han, J.-W./Yu, G.-Q./Quan, C./Yu, Y.-X./Zhang, Z./Shi, B.-Q./Zhang, L.-H./Cheng, H./Wang, C.-Y./Lin, Y./Zheng, H.-F./Fu, X.-A./Zuo, X.-B./Wang, Q./Long, H./Sun, Y.-P./Cheng, Y.-L./Tian, H.-Q./Zhou, F.-S./Liu, H.-X./Lu, W.-S./He, S.-M./Du, W.-L./Shen, M./Jin, Q.-Y./Wang, Y./Low, H.-Q./Erwin, T./Yang, N.-H./Li, J.-Y./Zhao, X./Jiao, Y.-L./Mao, L.-G./Yin, G./Jiang, Z.-X./Wang, X.-D./Yu, J.-P./Hu, Z.-H./Gong, C.-H./Liu, Y.-Q./Liu, R.-Y./Wang, D.-M./Wei, D./Liu, J.-X./Cao, W.-K./Cao, H.-Z./Li, Y.-P./Yan, W.-G./Wei, S.-Y./Wang, K.-J./Hibberd, M. L./Yang, S./Zhang, X.-J. & Liu, J.-J. (2009). Genomewide Association Study of Leprosy. *New England Journal of Medicine*, 361(27), 2609-2618. doi:10.1056/NEJMoa0903753

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Klassifikationssystem nach der AAO-HNS aus dem Jahr 1995</i>	3
Tabelle 2: <i>Bárány-Klassifikationssystem aus dem Jahr 2015 nach Lopez-Escamez et al.</i>	4
Tabelle 3: <i>Ergebnisse von Assoziationsstudien zu HLA-Typen bei am Morbus Menière erkrankten Patienten</i>	11
Tabelle 4: <i>Verwendetes Material für die Extraktion der DNA.</i>	24
Tabelle 5: <i>Verwendetes Material für die Konzentrationseinstellung der DNA.</i>	25
Tabelle 6: <i>Einteilung der Genotypisierungs-Gruppen.</i>	27
Tabelle 7: <i>Eigenschaften der an Morbus Menière erkrankten Patienten und Kontrollprobanden.</i>	37
Tabelle 8: <i>Gene mit niedrigstem p-Wert in der genbasierten Analyse.</i>	38
Tabelle 9: <i>SNVs der Region um SNX20 und NOD2 mit den niedrigsten p-Werten.</i>	39
Tabelle 10: <i>Gene des Vasopressin/Aquaporinsystems aus der Datenbank der KEGG.</i>	41
Tabelle 11: <i>Gene des TWEAK/Fn14-Signalwegs nach Bhattacharjee et al. (2012)</i>	42
Tabelle 12: <i>Gene von Ionenkanälen, exprimiert in der Cochlea basierend auf den Expressionsdaten von Gabashvili et al. (2007)</i>	43
Tabelle 13: <i>Ergebnisse der Gen-Set Analyse.</i>	44
Tabelle 14: <i>Gene von Ionenkanälen und -transportern, exprimiert im endolymphatischen Sack nach Kim et al. (2015)</i>	45

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Schematische Darstellung der Abschnitte des Endolymphraumes.</i>	9
Abbildung 2: <i>Auswirkung von Rekombinationsereignissen auf die Korrelation der Genotypen benachbarter Loci.</i>	17
Abbildung 3: <i>Darstellung der ersten zwei Dimensionen der Hauptkomponentenanalyse eines europäischen Probandenkollektivs.</i>	19
Abbildung 4: <i>Ablaufschema der Literaturrecherche nach Publikationen zum Erstellen eines Gen-Sets zur Überprüfung der Hypothese einer gestörten Ionenhomöostase in der Entstehung des Morbus Menière.</i>	34
Abbildung 5: <i>p-Werte der 147 untersuchten SNVs innerhalb der Region um SNX20 und NOD2</i>	40

Abkürzungsverzeichnis

AAO-HNS	American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery
ADH	Vasopressin; Antidiuretisches Hormon
AIED	Autoimmunerkrankung des Innenohrs
AQP	Aquaporin
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
Fn14	“FGF-inducible molecule 14”
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
HLA	Humane Leukozytenantigene
HWE	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
KCNE	“Potassium voltage-gated channel subfamily E”
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LD	Kopplungsungleichgewicht
MAF	“minor allele frequency”
MIF	“Macrophage migration inhibitory factor”
mRNA	messenger RNA
MSigDB	„Molecular Signatures Database“
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NCX1	“Sodium/Calcium Exchanger 1”
NOD2	“Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2”
PSGL-1	“Selectin P Ligand”
SCID	“Strukturiertes Klinisches Interview”
SIK1	“Salt Inducible Kinase 1”
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
SNV	Einzelnukleotidvariante
SNX20	“Sorting Nexin 20”
STAT3	“Signal Transducer And Activator Of Transcription 3”
TLR	“toll-like receptor”
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TWEAK	“TNF-like Weak Inducer of Apoptosis”

Danksagung

Zunächst möchte ich Frau PD Dr. rer. biol. hum. Ina Giegling für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und die Betreuung des Projekts danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. biol. hum. Annette Hartmann für die schnelle und kompetente Betreuung bei Fragen während dem Anfertigen der Dissertation, die Koordination der Arbeit im Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Strupp möchte ich für die freundliche Zusammenarbeit bei der Rekrutierung der Patienten am Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum danken. Für die Ermöglichung der Durchführung der Arbeit am Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum und der Neurologischen Klinik möchte ich Herrn PD Dr. Andreas Zwergal und Frau Prof. Dr. med. Marianne Dieterich danken.

Außerdem danke ich Herrn Dr. med. Stephan Maul für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die angenehme Zusammenarbeit und bei den Studienprobanden für deren Teilnahme an der Studie bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für deren Unterstützung und Beratung auf meinem gesamten Ausbildungsweg, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Selbstständigkeitserklärung

Bauernschmitt, Franz

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Eine Gen- und Gen-Set-basierte genomweite Assoziationsstudie zum Morbus Menière“

selbständig 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.

München, den 01.02.23

Ort, Datum

Franz Bauernschmitt

Unterschrift