

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Peter Falkai

**Assoziationsuntersuchung von Polymorphismen des CTLA4- und
PTPN22-Gens mit Morbus Menière**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sarah Lisa Clement

aus

Eggenfelden

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin:	PD Dr. Ina Giegling
Mitberichterstatter/in:	PD Dr. Marlene Reithmair
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. Annette M. Hartmann
Dekan:	Prof. Dr. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	16.03.2023

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1 Übersicht zum Morbus Menière	3
1.1.1 Symptomatik und aktuelle Klassifizierung	3
1.1.2 Epidemiologie	6
1.1.3 Pathogenese	7
1.1.4 Einflussfaktoren	10
1.2 Genetische Faktoren	13
1.2.1 Molekulargenetische Hintergründe	13
1.2.2 Familienanalysen	14
1.2.3 Genomweite Assoziationsstudien	15
1.2.4 Kandidatengenassoziationsstudien	15
1.3 CTLA4 und PTPN22	18
1.3.1 CTLA4	18
1.3.2 PTPN22	21
2. Zielsetzung	25
3. Material und Methoden	26
3.1 Vorbedingungen der Studie	26
3.2 Studienteilnehmer*innen	26
3.2.1 Kontrollgruppe	26
3.2.2 Patient*innengruppe	27
3.3 Laborverfahren	28
3.3.1 DNA-Extraktion	28
3.3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung	30
3.3.3 Genotypisierung	31
3.4 Qualitätskontrollen	33
3.5 Selektion der SNPs	35
3.6 Statistische Methoden	35

4. Ergebnisse	36
4.1 Fall/Kontroll-Stichprobe.....	36
4.2 CTLA4-Gen.....	37
4.2.1 Beschreibung der Polymorphismen	37
4.2.2 Fall/Kontroll-Assoziationen	38
4.2.3 Haplotypanalyse.....	44
4.3 PTPN22-Gen	45
4.3.1 Beschreibung der Polymorphismen	45
4.3.2 Fall/Kontroll-Assoziationen	46
5. Diskussion.....	49
5.1 Diskussion der Ergebnisse.....	49
5.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	49
5.1.2 Interpretation der Ergebnisse bezüglich CTLA4.....	49
5.1.3 Interpretation der Ergebnisse bezüglich PTPN22	52
5.2 Diskussion der Methoden.....	54
5.2.1 Studiendesign.....	54
5.2.2 Studienpopulation.....	55
5.2.3 Ein- und Ausschlusskriterien	57
5.2.4 Stichprobengröße	58
5.2.5 Qualitätskriterien.....	59
5.3 Ausblick	61
6. Literaturverzeichnis	62
7. Abkürzungen und Fachbegriffe.....	75
Eidesstattliche Versicherung	III
Danksagung	IV

Zusammenfassung

Der Morbus Menière ist eine chronische Innenohrerkrankung, welche sich durch Schwindelepisoden, Schwerhörigkeit, Ohrdruck und Tinnitus äußert. Diese Symptome bedeuten für viele Patient*innen eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität im Alltag. Obwohl die Ursachen des Morbus Menière noch unklar sind, wird eine multifaktorielle Genese angenommen, wobei genetische Faktoren eine Rolle zu spielen scheinen. Zwar konnten in betroffenen Familien verschiedene krankheitsassoziierte Genloci identifiziert werden, was für die Heterogenität der Krankheitsentstehung spricht, jedoch gibt es bisher keine abschließenden Erkenntnisse zu Varianten in Genen, die das Krankheitsrisiko erhöhen.

Verschiedene Kandidatengene wurden in der Vergangenheit im Zusammenhang mit Morbus Menière untersucht, wobei insbesondere solche Gene betrachtet wurden, für die eine Beteiligung an der Pathogenese diskutiert wird. Aufgrund bisheriger Befunde, die eine Beteiligung des Immunsystems bei der Entstehung des Morbus Menière nahelegen, standen unter anderem dem Immunsystem zugeordnete Gene im Fokus. Darunter zählen das *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4)*-Gen und das *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid) (PTPN22)*-Gen.

CTLA4 gehört zu den T-Zellrezeptormolekülen und spielt eine wichtige hemmende Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort. Bei PTPN22 handelt es sich um eine Proteintyrosinphosphatase, welche ebenfalls an der Regulation der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist. Für Polymorphismen in beiden Genen wurden in der Vergangenheit signifikante Assoziationen mit autoimmunvermittelten Erkrankungen beschrieben. Beide Gene wurden in einer Studie von Lopez-Escamez et al. (2010) im Zusammenhang mit Morbus Menière untersucht. Hierbei konnte eine signifikante Assoziation eines Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) im *PTPN22*-Gen mit der Erkrankung gezeigt werden. Eine Assoziation mit genetischen Varianten des *CTLA4*-Gens fand sich in dieser Studie nicht. Aufgrund dieser vermuteten Zusammenhänge und erhobenen Ergebnisse wurden die beiden Gene für die hier vorliegende Studie ausgewählt.

In der hier durchgeführten Fall-Kontroll-Assoziationsstudie wurden sechs SNPs in der *CTLA4*-Genregion und fünfzehn SNPs in der *PTPN22*-Genregion bezüglich ihrer Assoziation mit Morbus Menière untersucht. Hierfür wurde eine Stichprobe von 314 Menièrepatient*innen und 494 gesunden Proband*innen rekrutiert. Die Genotypisierung der Polymorphismen erfolgte nach Blutgewinnung und DNA-Extraktion mittels SNP-Chips. Die Assoziationsanalyse wurde mittels einer logistischen Regression durchgeführt.

Zusammenfassung

Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

1. Die genetischen Varianten rs11571317 ($p=0,033$) und rs3087243 ($p=0,019$) sowie die Haplotypen AG (Block 1: rs11571315, rs733618) und AAAG (Block 2: rs11571317, rs231775, rs3087243, rs231726) im *CTLA4*-Gen zeigten nominal signifikante Assoziationen mit der Erkrankung.
2. Für das *PTPN22*-Gen konnten keine signifikanten Ergebnisse gezeigt werden.

Diese Ergebnisse sprechen für eine mögliche Rolle des *CTLA4*-Gens als Kandidatenlocus für den Morbus Menière, während die Studie von Lopez-Escamez et al. (2010) einen Hinweis für die Beteiligung des *PTPN22*-Gens identifizierte.

Die heterogenen Ergebnisse lassen sich am ehesten mit den für die Untersuchung komplexer Erkrankungen relativ niedrigen Stichproben, sowohl in der vorliegenden Studie als auch in der Studie von Lopez-Escamez et al. (2010), erklären. Auch die unterschiedlichen Populationen mit vorwiegend deutschen Personen in der vorliegenden Studie versus spanischen Patient*innen bei Lopez-Escamez et al. (2010) können zu unterschiedlichen Ergebnissen beitragen. Es bedarf deshalb in Zukunft multizentrischer multinationaler Studien mit sehr großen Stichproben, auch mit Kohorten unterschiedlicher Abstammung, um diese Fragestellungen detaillierter untersuchen zu können.

Neue Erkenntnisse zu genetischen Einflussfaktoren bei der Entstehung des Morbus Menière können helfen, die Pathomechanismen der Erkrankung besser zu verstehen und somit diagnostische und therapeutische Möglichkeiten zu spezifizieren.

1. Einleitung

1.1 Übersicht zum Morbus Menière

1.1.1 Symptomatik und aktuelle Klassifizierung

Der Morbus Menière ist eine chronische Erkrankung des Innenohrs, welche typischerweise mit rezidivierenden Schwindelepisoden, einer Hörminderung im Tieftonbereich, Ohrdruck und Tinnitus einhergeht (Harcourt et al., 2014). Die Krankheit ist nach dem französischen Arzt Prosper Menière (1799-1862) benannt. Er führte die Krankheitssymptome, welche bis dahin einer Erkrankung des Gehirns zugeschrieben worden waren, im Jahre 1861 erstmals auf eine Störung im Innenohr zurück (Hawkins, 2005). 1938 konnten zwei Forschungsgruppen an post-mortem-Präparaten die Erweiterung des mit Endolymphe gefüllten Saccus endolymphaticus im Os temporale als pathologisches Korrelat des Morbus Menière darstellen (Hallpike & Cairns, 1938; Yamakawa, 1938).

Die 1995 von der AAO-HNS (*American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*) entwickelten Diagnosekriterien fanden lange Zeit Anwendung (Committee on Hearing and Equilibrium, 1995). Die Diagnosestellung nach den Kriterien der AAO-HNS erfolgte nach folgender Einteilung:

- Sichere Menièreerkrankung: Eindeutige Menièreerkrankung plus histopathologischer Nachweis eines Endolymphhydrops

- Eindeutige Menièreerkrankung
 - Zwei oder mehr eindeutige spontane Schwindelepisoden von mindestens 20 Minuten Dauer
 - Audiometrisch nachgewiesene Hörminderung zu mindestens einem Zeitpunkt
 - Tinnitus oder Druckgefühl im betroffenen Ohr
 - Nicht auf eine andere Erkrankung zurückzuführen

- Wahrscheinliche Menièreerkrankung
 - Eine eindeutige Schwindelepisode
 - Audiometrisch nachgewiesene Hörminderung zu mindestens einem Zeitpunkt
 - Tinnitus oder Druckgefühl im betroffenen Ohr
 - Nicht auf eine andere Erkrankung zurückzuführen

Einleitung

- Mögliche Menièreerkrankung
 - Menièreetypische Schwindelepisoden ohne audiometrisch nachgewiesene Hörminderung oder
 - Fluktuierender oder dauerhafter sensorineuraler Hörverlust mit Gleichgewichtsstörung, aber ohne eindeutige Schwindelepisoden
 - Nicht auf eine andere Erkrankung zurückzuführen

2015 wurde eine überarbeitete Liste von Diagnosekriterien von einem internationalen Komitee mehrerer Forschungsgruppen, das von der *Bárány Society* gegründet wurde, herausgegeben, die die Diagnosestellung vereinfachen soll (Lopez-Escamez et al., 2015).

Hierbei wurde sich auf zwei Gruppen beschränkt: Patient*innen mit sicherem Morbus Menière und Patient*innen mit wahrscheinlichem Morbus Menière. Es wurde sich auf klinische und apparative Parameter für die Diagnosestellung geeinigt, der Nachweis eines Endolymphhydrops spielt aufgrund der beschränkten Durchführbarkeit in der Praxis keine Rolle mehr. Die aktuellen Kriterien der Bárány-Gesellschaft lauten wie folgt (Lopez-Escamez et al., 2015):

- Morbus Menière
 - A) Zwei oder mehr Schwindelattacken von 20 Minuten bis 12 Stunden Dauer
 - B) Nachgewiesene Hörminderung (<2000 Hz, mindestens -30 dB), assoziiert mit Schwindelattacke, d.h. +/- 24h
 - C) Fluktuierende Ohrsymptome (Hörminderung, Tinnitus oder Ohrdruck im betroffenen Ohr)
 - D) Nicht besser erklärt durch andere Erkrankungen
- Wahrscheinlicher Morbus Menière
 - A) Zwei oder mehr Episoden mit Dreh- oder Schwankschwindel von 20 Minuten bis 24 Stunden Dauer.
 - B) Fluktuierende Ohrsymptome (Hörminderung, Tinnitus oder Ohrdruck im betroffenen Ohr)
 - C) Nicht besser erklärt durch andere Erkrankungen

Der Krankheitsfortschritt wird nach Empfehlung der AAO-HNS in 4 Stadien eingeteilt. Hierfür wird der Mittelwert der Hörschwellen für die Tonhöhen 0,5, 1, 2 und 3 kHz gebildet. Bei einer durchschnittlichen Hörschwelle von ≤ 25 dB spricht man von Stadium 1, bei 26-40 dB handelt es sich um Stadium 2, bei 41-70 dB um Stadium 3 und bei einer ermittelten Hörschwelle von >70 dB um Stadium 4 (Committee on Hearing and Equilibrium, 1995). Der Hörverlust war in

Einleitung

Untersuchungen häufig von fluktuierendem Charakter, das Hörvermögen verschlechterte sich in einer Studie von Havia et al. (2002) an 243 Patient*innen mit eindeutig diagnostiziertem Morbus Menière bei 55% der untersuchten Personen während einer Schwindelattacke. Langfristig nahm das Hörvermögen, wie Huppert et al. (2010) aufzeigten, in der Anfangsphase der Erkrankung ab und stabilisierte sich nach 5-10 Jahren Krankheitsdauer bei einer Hörminderung mit einer durchschnittlichen Hörschwelle von 50 bis 60 dB. Typischerweise sind vor allem tiefe Frequenzen betroffen, es konnte allerdings gezeigt werden, dass im Verlauf der Erkrankung tendenziell das Hörvermögen im kompletten Frequenzbereich eingeschränkt sein kann (Zhang et al., 2016).

Die Tinnitussymptomatik blieb laut einer Studie von Zhang et al. (2016) im Laufe der Zeit oft auch außerhalb der Erkrankungsattacken erhalten. Es handelte sich hierbei meist um Tinnitusfrequenzen, die sich, wie der typische Hörverlust, im Tieftonbereich bewegten. Ein die Schwindelattacken begleitendes Ohrdruckgefühl ist ein häufiges Symptom. Laut Gürkov et al. (2019) gab mehr als die Hälfte der untersuchten Proband*innen in einer Studie an 249 Patient*innen mit kernspintomographisch nachgewiesenem Endolymphhydrops Ohrdruck als Symptom an.

Der Schwindel bei Morbus Menière tritt typischerweise attackenförmig auf. Laut einer Studie von Gürkov et al. (2019) litten 81,1% der Patient*innen unter einem Drehschwindel, 46,6% gaben einen Schwankschwindel an (gegebenenfalls in Kombination mit Drehschwindel) und 32,5% beschrieben ein Benommenheitsgefühl. Bei etwa einem Viertel der Teilnehmer*innen kam es hierdurch zu einer erhöhten Sturzneigung. Die Dauer der Schwindelepisoden betrug meist zwischen 20 Minuten und 4 Stunden. Selten wurde aber auch eine Dauer bis zu 48 Stunden angegeben. Die häufigsten vegetativen Begleitsymptome waren Übelkeit, Erbrechen und starkes Schwitzen.

In einer retrospektiven Studie an Patient*innen einer chinesischen HNO-Klinik mit nach AAO-HNS-Kriterien eindeutig diagnostiziertem Morbus Menière äußerte sich die Erkrankung bei über der Hälfte der Patient*innen zu Beginn ausschließlich mit cochleären Symptomen wie Hörverlust und Tinnitus (Zhang et al., 2016). Diese Beobachtung konnte in einer Studie des Deutschen Schwindelzentrums bestätigt werden (Gürkov et al., 2019). Wie in einer finnischen Studie gezeigt werden konnte, entwickelten etwa 20% der Patient*innen erst nach über 5 Jahren Erkrankungsdauer den kompletten Symptomkomplex aus Schwindel und Hörverlust (Pyykkö et al., 2013).

Die Erkrankung kann uni- oder bilateral auftreten, wobei etwa 50% der einseitigen Formen laut einer Studie von Paparella (1991) im Laufe des Lebens auf beide Ohren übergangen. Ein Review von Huppert et al. (2010), der 46 Studien mit insgesamt 7852 Patient*innen betrachtete, konnte diese Zahlen bestätigen. Hier betrug der Anteil der Patient*innen, bei

denen es innerhalb von 10 Jahren zu einem beidseitigen Auftreten der Erkrankung kam, bis zu 35%. Innerhalb von 20 Jahren waren bei bis zu 47% der Patient*innen beide Ohren betroffen. Hinzu kommt, dass gehäuft Begleiterkrankungen wie vestibuläre Migräne dokumentiert werden konnten, deren Symptome denen von Morbus Menière ähneln können (Tyrrell et al., 2014) und deren Diagnosestellung meist noch ausschließlich auf klinischen Kriterien beruht (Pyykkö et al., 2013). Deshalb ist es vor allem in frühen Krankheitsstadien schwierig, eine sichere Diagnose zu stellen. Laut Zhang et al. (2016) betrug die Zeit bei einem Kollektiv von 115 Menièrepatient*innen vom ersten Auftreten von Symptomen bis zur endgültigen Diagnosestellung im Median 3 Jahre. Die Darstellung eines Endolymphhydrops kann die Diagnosestellung unterstützen und wird in Zukunft möglicherweise durch den Einsatz der MRT-Bildgebung erleichtert werden. Zuvor war dieser Nachweis erst post mortem mittels histologischer Schnitte möglich (Naganawa & Nakashima, 2014).

Viele Menière-Patient*innen erleiden durch ihre Erkrankung starke Einschränkungen im Alltag und psychische Belastungen. Vor allem die unvorhersehbaren Schwindelanfälle führten in mehreren Studien zu einer reduzierten Lebensqualität, da aus Angst vor einem Anfall alltägliche Aktivitäten wie Autofahren oder Treppensteigen vermieden wurden, was zum Verlust sozialer Kontakte, eingeschränkten Freizeitaktivitäten und Problemen am Arbeitsplatz führte (Yardley et al., 2003; Petri et al., 2017). Patient*innen mit Morbus Menière hatten signifikant häufiger Angststörungen und Depressionen als gesunde Kontrollen (Wu et al., 2012).

1.1.2 Epidemiologie

Da nur wenige epidemiologische Studien zum Vorkommen von Morbus Menière existieren (Tyrrell et al., 2014) und die Prävalenzwerte innerhalb dieser stark schwanken, lässt sich die Häufigkeit der Erkrankung nur abschätzen. In Studien, die in Ländern mit vorwiegend weißer Population durchgeführt wurden, bewegte sich die Prävalenz zwischen 0,043% in einer finnischen Population (Kotimäki et al., 1999) und 0,12% in einer deutschen Population (Radtke et al., 2008). Eine andere Studie aus Südfinnland fand sogar Prävalenzwerte von 0,513% (Havia et al., 2005). Eine retrospektive Studie aus Japan zeigte für die Jahre 1990-2004 eine durchschnittliche Prävalenz von nur 0,035% (Shojaku et al., 2005). Um die Prävalenz von Morbus Menière in den USA zu schätzen, wurden in einer Studie von Harris & Alexander (2010) Datenbanken mit über 60 Millionen Patient*innen analysiert. Hier zeigten sich Werte von 0,19%. Es zeigen sich also erhebliche Schwankungen in der Prävalenz bei unterschiedlichen Ethnizitäten.

Frauen hatten in einer Querschnittsstudie im Vereinigten Königreich ein etwa 1,4fach erhöhtes Erkrankungsrisiko im Vergleich zu Männern, weiterhin waren häufiger Weiße und

Übergewichtige an Morbus Menière erkrankt (Tyrrell et al., 2014). Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung befand sich laut Harcourt et al. (2014) im vierten bis sechsten Lebensjahrzehnt. Die meisten Fälle von Morbus Menière treten sporadisch auf, allerdings gibt es auch familiär gehäufte Erkrankungen, in einer Studie von Requena et al. (2014) betraf dies in der europäischen Bevölkerung etwa acht Prozent der Patient*innen.

1.1.3 Pathogenese

Die gängige Hypothese zur Pathogenese des Morbus Menière besagt, dass es zu einer Ausdehnung der Endolymphräume im Innenohr kommt. Man spricht hierbei von einem Endolymphhydrops. Zum weiteren Verständnis ist eine grundlegende Kenntnis der Anatomie des Innenohrs wichtig, die nachfolgend zusammengefasst erläutert wird.

Anatomie des Innenohrs

Das Innenohr befindet sich im Felsenbein und beinhaltet sowohl das Hör- als auch das Gleichgewichtsorgan. Abbildung 1 zeigt den Aufbau des Innenohrs mit den Gleichgewichts- und Hörorganen. Es kann in ein knöchernes und ein häutiges Labyrinth eingeteilt werden. Das knöcherne Labyrinth ist mit kaliumarmer, natriumreicher Perilymphe gefüllt. In diese eingebettet liegt das häutige Labyrinth, welches mit kaliumreicher, natriumarmer Endolymph gefüllt ist.

Das Hörorgan befindet sich in der Cochlea, welche in drei Gänge aufgeteilt werden kann. In Abbildung 2 ist ein Querschnitt durch die Cochlea zu sehen. Die äußeren, mit Perilymphe gefüllten Gänge werden Scala vestibuli und Scala tympani genannt. Die oben liegende Scala vestibuli kommuniziert über das ovale Fenster, welches vom Steigbügel verschlossen wird, mit dem Mittelohr. Die unten liegende Scala tympani ist durch das mit einer Membran verschlossene runde Fenster vom Mittelohr getrennt. Zwischen Scala vestibuli und Scala tympani befindet sich die mit Endolymph gefüllte Scala media. Die Reissnermembran trennt Scala media und Scala vestibuli voneinander. Zwischen Scala media und Scala tympani liegt die Basilarmembran, auf der sich das Corti-Organ, das eigentliche Hörorgan mit den Haarzellen, befindet. Die äußere Wand der Scala media wird Ligamentum spirale genannt, hier sitzt die Stria vascularis, der Ort der Endolymphproduktion.

Zwischen Cochlea und Bogengängen befindet sich das Vestibulum. Dieses beinhaltet Sacculus und Utriculus, die Vorhofsäckchen, welche lineare Beschleunigungsbewegungen wahrnehmen. Ans Vestibulum schließen sich die drei Bogengänge zur Wahrnehmung von Drehbeschleunigungen an.

Auch im Gleichgewichtsorgan können knöchernes Labyrinth (gefüllt mit Perilymphe) und häutiges Labyrinth (gefüllt mit Endolymph) unterschieden werden. Neben dem Sacculus

Einleitung

verläuft der Ductus endolymphaticus zur Ableitung von Endolymphe in den Saccus endolymphaticus an der Hinterwand des Felsenbeines (Ekdale, 2016; Pfaff et al., 2019).

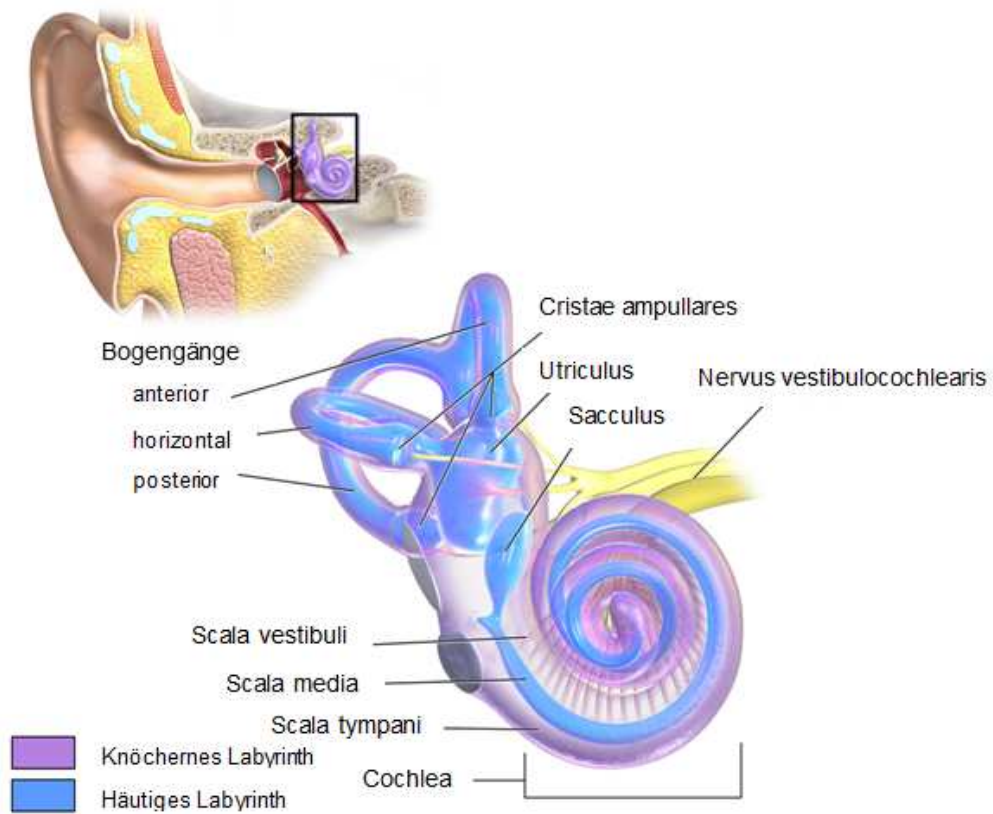


Abbildung 1: Anatomie des Innenohrs
(Aus dem Englischen nach Blausen.com staff: BruceBlaus, 2014)

Einleitung

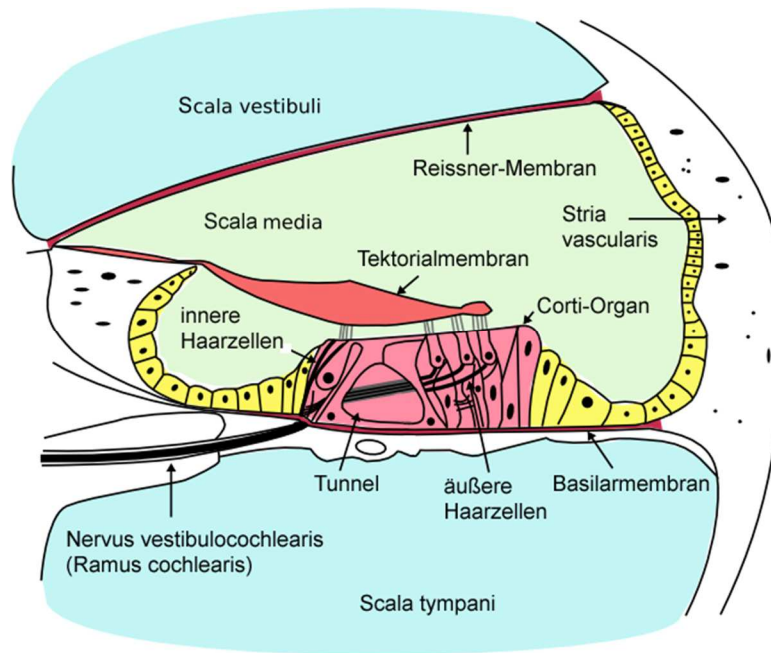


Abbildung 2: Querschnitt durch die Cochlea
Blau eingefärbte Bereiche sind mit Perilymphe gefüllt, grün eingefärbte Bereiche mit Endolymphe. (Wikimedia Commons contributors: en-us Oarih, 2017)

Pathogenese des Morbus Menière

Zu einem Endolymphhydrops kann es durch eine eingeschränkte Absorption der Endolymphe im Ductus und Saccus endolymphaticus oder durch eine übermäßige Produktion in der Stria vascularis kommen. Durch den aus dem Hydrops folgenden Überdruck kann es zu einer erhöhten Membrandurchlässigkeit und dadurch zur Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts zwischen der kaliumreichen Endolymphe und der kaliumarmen Perilymphe kommen. Dieses Ungleichgewicht könnte für die Krankheitssymptome ursächlich sein. In etwa einem Drittel der Fälle ließ sich sogar ein Einriss der Reissner-Membran zwischen Scala media und Scala vestibuli nachweisen (Paparella & Djalilian, 2002). Die Symptome könnten laut Mancini et al. (2002) aber auch durch eine mechanische Beeinträchtigung der Hör- und Gleichgewichtsorgane durch die räumliche Ausdehnung des Endolymphraums hervorgerufen werden. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung eines Endolymphhydrops.

Einleitung

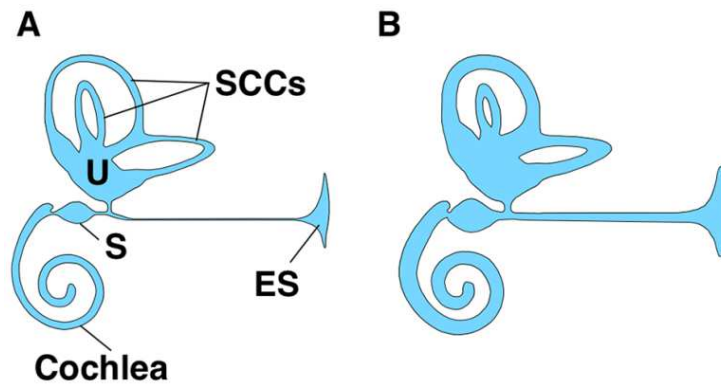


Abbildung 3: Schematische Zeichnung des Innenohrs und des Endolymphhydrops als Mechanismus bei Morbus Menière
Das Innenohr besteht aus Cochlea, Vestibulum und Saccus endolymphaticus (ES). Der Utriculus (U), Sacculus (S) und die Bogengänge (SCCs) bilden das vestibuläre Organ. A: Normale Innenohrstruktur. B: Endolymphhydrops bei Patient*innen mit Morbus Menière.
aus dem Englischen nach Kim et al. (2014)

Es scheint jedoch nicht jeder Endolymphhydrops zu Symptomen eines Morbus Menière zu führen. Im Rahmen einer Doppelblindstudie von Merchant et al. (2005), bei der Temporalknochenpräparate auf das Vorliegen eines Endolymphhydrops hin untersucht wurden, konnte dieser zwar bei allen 28 Patient*innen mit klinisch diagnostiziertem Morbus Menière nachgewiesen werden, allerdings waren bei 9 von 35 Proband*innen mit histopathologisch nachgewiesenem idiopathischem Endolymphhydrops nie klinische Zeichen von Morbus Menière aufgetreten. Ein endolymphatischer Hydrops sollte somit laut Merchant (2005) eher als Marker der Erkrankung angesehen werden denn als direkte Ursache.

1.1.4 Einflussfaktoren

Morbus Menière wird als idiopathische Erkrankung angesehen, da die genauen Ursachen und die Pathophysiologie bis heute ungeklärt sind. Es konnten verschiedene mit der Erkrankung assoziierte Einflussfaktoren wie Allergien, Infektionen, Autoimmunvorgänge oder genetische Veranlagungen identifiziert werden, die zur multifaktoriellen Entstehung der Krankheit beitragen könnten (Gates, 2006; Paparella, 1991).

Allergene

Der Einfluss von Allergenen auf die Entstehung von Morbus Menière wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Es konnte bis jetzt kein kausaler Zusammenhang nachgewiesen werden, allerdings deutet vieles darauf hin, dass es eine Assoziation zwischen allergischen Reaktionen des Immunsystems und einem Endolymphhydrops gibt. In einer Studie von Derebery & Berliner (2000) wiesen Menièrepatient*innen signifikant häufiger Inhalations- oder Lebensmittelallergien auf als die Kontrollgruppe, welche aus Patient*innen mit anderen Ohrenerkrankungen als Morbus Menière bestand. Bei über einem Drittel der

Einleitung

Patient*innengruppe lag eine positive Allergietestung vor. Banks et al. (2012) konnten bei 56,9% der getesteten Menièrepatient*innen einen positiven Pricktest bei einer Exposition mit Gliadin, einem Weizenprotein, nachweisen. Dieses Ergebnis zeigt sich auch bei einer Weizenallergie. Keine der Kontrollpersonen wies einen positiven Pricktest auf Gliadin vor.

Weiterhin konnten Savastano et al. (2007) bei 56,5% der von ihnen untersuchten, an Morbus Menière erkrankten Personen eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden Immunkomplexen messen. Demgegenüber wies keine der 50 Kontrollpersonen diese Veränderung im Blut auf. Zirkulierende Immunkomplexe werden bei Typ-III-Allergien und Autoimmunerkrankungen typischerweise vermehrt gebildet und können sich in der Gefäßwand ablagern, wo sie eine Entzündungsreaktion auslösen. Die Ablagerung findet vor allem in Organen mit starker Durchblutung und transkapillärer Filterfunktion statt, wozu der Saccus endolymphaticus gehört. Die Entzündung könnte dort zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität beziehungsweise einem Endolymphhydrops führen (Derebery et al., 1991).

Ein weiterer Hinweis auf eine allergische Genese der Krankheit resultiert aus der Erkenntnis, dass eine antiallergische Therapie zu einer Reduktion der Innenohrsymptome führt. In einer Untersuchung von Derebery (2000) wurden 113 Patient*innen mit Morbus Menière und nachgewiesenen Allergien mit einer Hyposensibilisierung bzw. einer Vermeidung der Allergene behandelt. Es konnte eine signifikante Verbesserung der Menièresymptome nach Behandlung der Allergie festgestellt werden.

Virale Infektionen

Ein weiterer häufig diskutierter Einflussfaktor für die Entwicklung eines Endolymphhydrops sind Virusinfektionen. Viren können das Zielorgan direkt schädigen oder bei einer latenten Infektion im Körper verweilen und reaktiviert werden, wie es bei Herpesviren der Fall ist (Pyykkö & Zou, 2008). Vrabec (2003) konnte in einer Untersuchung des Ganglion vestibulare von Patient*innen, die sich einer Vestibularisneurektomie unterzogen hatten, bei allen 25 Patient*innen mit nach AAO-HNS-Kriterien diagnostizierter eindeutigem Morbus Menière Herpes simplex-Virus-DNA im Ganglion nachweisen. Bei den 37 Proband*innen ohne Morbus Menière war diese nur bei 81% nachweisbar, der Unterschied war mit einem p-Wert von 0,02 statistisch signifikant.

Außerdem können sich im Rahmen einer molekularen Mimikry antivirale Antikörper auch gegen der Virusoberfläche ähnliche körpereigene Strukturen richten und so Autoimmunerkrankungen auslösen. So könnten Virusinfektionen in der frühen Kindheit eine jahrelang schwelende Entzündung hervorrufen, die einen Endolymphhydrops begünstigt (Derebery & Berliner, 2000). Für Mumpsviren konnte in Tierversuchen von Davis & Johnson

(1976) beispielsweise gezeigt werden, dass bevorzugt Strukturen des endolymphatischen Systems befallen wurden.

Autoimmunvorgänge

Weiterhin werden Autoimmunvorgänge im Innenohr als mögliche Einflussgröße bei der Entstehung eines Morbus Menière angesehen. Mehrere Studien unterstützen diese Hypothese. So konnten beispielsweise Suchan et al. (2016) bei 44% der untersuchten Patient*innen mit diagnostiziertem Morbus Menière Antikörper gegen Antigene des Innenohrs nachweisen, während diese bei gesunden Proband*innen nicht vorkamen. Eine daraufhin erfolgte immunsuppressive Therapie mit Glukokortikoiden erbrachte bei 81% der Patient*innen mit Antikörpernachweis ein Verschwinden beziehungsweise eine deutliche Reduktion der Frequenz der Schwindelattacken nach 18 und 24 Monaten. Bei 45% der Patient*innen verbesserte sich durch die Therapie auch die durchschnittliche Hörschwelle um mindestens 10 dB beziehungsweise die Sprachdiskrimination um mindestens 12%. Auch intratympanische Steroidgaben linderten in einigen Studien signifikant die Krankheitssymptome. Dies konnte in einer Metaanalyse von drei randomisierten, kontrollierten Studien gezeigt werden (Syed et al., 2015).

Kim et al. (2014) konnten im Serum von Menièrepatient*innen ebenfalls Autoantikörper gegen im Innenohr exprimierte Proteine nachweisen, welche in der Kontrollgruppe nicht gefunden werden konnten. Die Proteine waren allerdings nicht innenohrspezifisch.

Die schon erwähnte signifikante Erhöhung von zirkulierenden Immunkomplexen im Serum von Patient*innen mit Morbus Menière (Savastano et al., 2007) kann neben einer allergischen Genese auch für autoimmune Vorgänge sprechen. Für diese Theorie spricht die Beobachtung, dass Menièrepatient*innen in einer Studie von Gazquez et al. (2011) im Vergleich zur kaukasischen Allgemeinbevölkerung eine 2- bis 8-fach erhöhte Prävalenz für systemische Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes und Spondylitis ankylosans aufwiesen.

In einer Studie von Yoo et al. (1983) konnte bei Meerschweinchen ein Endolymphhydrops induziert werden, indem ihnen bovines Typ II-Kollagen injiziert wurde. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Reaktion des Immunsystems gegen Typ II-Kollagen eine Rolle bei der Entstehung eines Endolymphhydrops spielen könnte.

Auch die klinischen Merkmale des Morbus Menière legen die Vermutung nahe, dass autoimmune Vorgänge eine Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen könnten. Der fluktuierende, schubförmige Verlauf zeigt Parallelen zu anderen Autoimmunerkrankungen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder zur Multiplen Sklerose.

Die Beobachtung, dass ein großer Teil der Erkrankungen im Laufe der Zeit beide Ohren betrifft (Paparella, 1991), kann ebenfalls einen Hinweis darauf geben, dass es sich um eine systemische Reaktion des Immunsystems handelt (Kim et al., 2014).

1.2 Genetische Faktoren

Neben möglichen extrinsischen Einflussfaktoren für die Entwicklung der Erkrankung gibt es zahlreiche Hinweise auf genetische Einflüsse. Für eine genetische Beeinflussung spricht, dass die Krankheit in bestimmten ethnischen Gruppen häufiger auftritt als in anderen. Morbus Menière trat in einer Studie von Ohmen et al. (2013), die 376 Menièrepatient*innen unterschiedlicher ethnischer Herkunft einschloss, am häufigsten bei Kaukasier*innen auf, während Asiat*innen und Afrikaner*innen nur selten betroffen waren. In der Studie wurden 376 Patient*innen mit eindeutig diagnostiziertem Morbus Menière nach den AAO-HNS-Kriterien auf ihre ethnische Herkunft untersucht. 82,4% der Patient*innen waren Kaukasier*innen, gegenüber 69,0% der nicht an Morbus Menière erkrankten Kontrollgruppe. Bei 4,3% der Patient*innengruppe handelte es sich um Personen asiatischer Herkunft, gegenüber 11,9% der Kontrollgruppe. Der Anteil an Afrikaner*innen in der Patient*innengruppe betrug 1,3%, in der Kontrollgruppe 3,2%.

Wie im Abschnitt Epidemiologie (1.1.2) erläutert, bestehen auch laut zahlreichen weiteren Studien erhebliche Schwankungen in der Krankheitsprävalenz bei unterschiedlichen ethnischen Gruppen. Außerdem spricht das Auftreten von familiärem Morbus Menière, bei dem Verwandte ersten Grades betroffen sind, für einen genetischen Einfluss bei der Krankheitsentstehung. In einer Studie mit 1245 europäischen Patient*innen konnte bei 8,4% eine familiäre Häufung nachgewiesen werden (Requena et al., 2014). In Kopplungsanalysen bei Familien mit mehreren Betroffenen in verschiedenen Generationen, in denen ein autosomal-dominanter Erbgang vermutet wurde, wurden zudem verschiedene Genloci detektiert, die mit der Erkrankung assoziiert waren (Arweiler-Harbeck et al., 2011; Requena et al., 2015; Martin-Sierra et al., 2016, 2017). Es deutet insgesamt einiges darauf hin, dass es verschiedene molekulargenetische Veränderungen gibt, die für einen Morbus Menière prädisponieren können, eventuell auch in Interaktion miteinander (Chiarella et al., 2015).

1.2.1 Molekulargenetische Hintergründe

Etwa 90% der molekulargenetischen Varianten machen Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) aus, bei denen es zu einer Variation eines einzelnen Basenpaares kommt. Man spricht von einem SNP, wenn die Variante bei über einem Prozent der Bevölkerung auftritt (Victor, 2007). Es sind bereits über 680 Millionen SNPs im menschlichen Genom beschrieben (dbSNP, 2020).

Diese genetischen Varianten sind aufgrund ihrer Häufigkeit im Genom und ihrer Stabilität bei der Vererbung gut geeignet für die molekulargenetische Forschung (Gray et al., 2000). Mit Hilfe von Assoziationsstudien ist es möglich, häufige genetische Varianten mit bestimmten Phänotypen in Zusammenhang zu bringen. Die Detektion eines Suszeptibilitätsgens ermöglicht nachfolgend die gezielte Erforschung von potenziellen Kandidatengenen mit Hilfe molekularbiologischer und biochemischer Ansätze. Dies kann dazu beitragen, die Hintergründe einer bestimmten Erkrankung besser zu verstehen.

1.2.2 Familienanalysen

Familiärer Morbus Menière kann durch Kopplungsstudien untersucht werden. Hierfür werden Studien bei Familien durchgeführt, in denen die Erkrankung über mehrere Generationen bei verwandten Familienmitgliedern auftritt. Es wird das Vorhandensein von genetischen Markern, z.B. SNPs, untersucht, welche gehäuft gemeinsam mit der krankheitsverursachenden genetischen Variante vererbt werden. Diese befinden sich typischerweise in der näheren Umgebung (bis zu 100 Kilobasenpaare) des Krankheitslokus. So kann der Krankheitslokus im Genom örtlich eingegrenzt werden (Ott et al, 2015).

Zudem gibt es die Möglichkeit, Exomsequenzierungen durchzuführen. Hier wird der gesamte kodierende Bereich des Genoms sequenziert und auf genetische Varianten untersucht, welche nur bei erkrankten Familienmitgliedern vorhanden sind (Goh & Choi, 2012).

In den letzten Jahren wurden mehrere Genvarianten in betroffenen Familien entdeckt. In 19 deutschen Familien wurde eine Kopplungsstudie durchgeführt, hierbei konnte eine Region auf Chromosom 5 bei 95,8 Megabasen als mögliche Kandidatenregion für familiären Morbus Menière bestimmt werden (Arweiler-Harbeck et al., 2011).

Die Gene *FAM136A* (*Family With Sequence Similarity 136 Member A*) und *DTNA* (*Dystrobrevin alpha*) wurden bei drei spanischen Patient*innen aus einer betroffenen Familie mit autosomal dominant vererbtem Morbus Menière mittels Exomsequenzierung als krankheitsassoziierte Gene identifiziert. Die Proteine FAM136A und Dystrobrevin alpha konnten im Innenohr von Ratten im Gleichgewichtsorgan, genauer in den Cristae ampullares, lokalisiert werden (Requena et al., 2015).

In einer Exomsequenzierung, die von Martin-Sierra et al. (2016) an drei betroffenen männlichen Familienmitgliedern einer spanischen Familie durchgeführt wurde, konnte das Gen *PRKCB* (*Protein kinase C beta*) als Kandidatengen bestimmt werden. In diesem Gen wurde eine Missense-Variante gefunden, welche exklusiv bei den untersuchten Proband*innen auftrat. Es konnte zudem gezeigt werden, dass das *PRKCB*-Gen im menschlichen Innenohr exprimiert wird.

Außerdem führten Martin-Sierra et al. (2017) eine Exomsequenzierung in zwei spanischen Familien durch, die von einem autosomal dominant vererbten familiären Morbus Menière betroffen waren. Hierbei konnten sie zwei neue Kandidatengene namens *SEMA3D* (*Semaphorin 3D*) und *DPT* (*Dermatopontin*) identifizieren, die beide auch im Innenohr exprimiert werden.

1.2.3 Genomweite Assoziationsstudien

Skuladottir et al. (2021) identifizierten in einer genomweiten Assoziationsstudien-Metaanalyse mit 48072 Proband*innen und 894541 Kontrollpersonen aus Island, dem Vereinigten Königreich, den USA und Finnland sechs Genloci, die mit Schwindel assoziiert waren. Es handelte sich um Varianten mit einer minoren Allelfrequenz >5%. Bei vier Varianten handelte es sich um missense-Varianten, welche sich in den Genen *ZNF91* (*Zinc Finger Protein 1*), *TECTA* (*Tectorin alpha*), *OTOG* (*Otogelin*) und *OTOGL* (*Otogelin like*) befanden. Zwei Varianten lagen jeweils *upstream* des *ARMC9* (*Armadillo Repeat Containing 9*)- und *OTOP1* (*Otopetrin 1*)-Gens. Alle beteiligten Gene spielen vermutlich eine Rolle im Aufbau des Innenohrs.

1.2.4 Kandidatengenassoziationsstudien

In den meisten Fällen tritt die Erkrankung sporadisch auf. Hier wurden verschiedene Kandidatengene untersucht, denen aufgrund ihrer Funktion oder ihrer Expression im Innenohr eine Rolle bei der Entstehung von Morbus Menière zugesprochen wurde. Es handelt sich dabei um einen hypothesengeleiteten Ansatz, der die Frequenz eines Merkmals, z.B. der Genotyp- oder Allelfrequenz eines SNPs zwischen zwei unabhängigen Gruppen, z.B. Erkrankte vs. Gesunde vergleicht. Eine erhöhte Merkmalsfrequenz in der Patient*innengruppe stellt eine Risikovariante für die Erkrankung dar.

Es wurden Gene untersucht, die für Ionenkanäle kodieren, welche im Innenohr exprimiert werden. So gerieten Varianten der KCNE-Kaliumkanäle (*Potassium voltage-gated channel subfamily E*) als mögliche Mitverursacher von Morbus Menière in den Fokus der Forschung, da diese eine Rolle beim Ionen- und Wassertransport im Innenohr spielen (Vetter et al., 1996). Der Kaliumtransport ist ein wichtiger Faktor bei der Aufrechterhaltung des endocochleären Membranpotentials, welches für die Signalübertragung im Innenohr benötigt wird.

Bei den KCNE-Kanälen handelt es sich um Subgruppen von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen, welche an der Regulation des Kaliumtransports beteiligt sind (McCrossan & Abbott, 2004).

Bestimmte Formen von erblicher Taubheit werden durch Mutationen im *KCNE1*-Gen ausgelöst (Wangemann, 2002). Doi et al. (2005) konnten signifikante Unterschiede in der

Einleitung

Genotypfrequenz für den SNP 112G/A (rs1805127) im Gen *KCNE1* und für den SNP 198T/C (rs2270676) im Gen *KCNE3* beim Vergleich von 63 japanischen Menièrepatient*innen und 237 gesunden Kontrollproband*innen nachweisen. Der homozygote Genotyp 112GG kam in der Patient*innengruppe signifikant seltener vor als 112GA bzw. 112AA. Auch der Genotyp 198TT für den SNP rs2270676 kam in der Patient*innengruppe signifikant seltener vor als die übrigen Varianten. Die signifikanten Ergebnisse für den SNP 112G/A im *KCNE1*-Gen konnte in einer weiteren Studie in einer finnischen Population bestätigt werden. Außerdem wurden im Rahmen dieser Studie vier neue SNPs im *KCNE1*-Gen entdeckt, die eine Assoziation mit der Erkrankung zeigten (Hietikko et al., 2012). Campbell et al. (2010) untersuchten die beiden SNPs rs1805127 und rs2270676 auf eine Assoziation mit Morbus Menière in einer kaukasischen Population. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patient*innen und gesunden Kontrollproband*innen erhoben werden. Eine Metaanalyse aller drei erwähnten Studien von Li et al. (2016), die insgesamt 302 Menièrepatient*innen und 515 Kontrollpersonen umfasste, konnte ebenfalls keine signifikanten Assoziationen zeigen.

Aquaporine sind Transmembranproteine, welche als Wasserkanäle fungieren. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Flüssigkeitsbalance und des Membranpotentials im menschlichen Körper, unter anderem auch im Innenohr. Deshalb kommen die Aquaporingene als Kandidatengene für die Entstehung von Morbus Menière in Frage (Ishiyama et al., 2006). Asmar et al. (2018) konnten eine signifikante Überexpression des *Aquaporin 2*-Gens im Saccus endolymphaticus von Menièrepatient*innen im Vergleich zu Kontrollpersonen zeigen. In einer Studie mit 86 Menièrepatient*innen und 2136 gesunden Kontrollen von Nishio et al. (2013) wirkte das minore G-Allel im SNP rs3736309 im *Aquaporin 5*-Gen unter Annahme eines additiven Modells krankheitsprotektiv. Die Variante c.105G>C im *Aquaporin 3*-Gen konnte in einer Untersuchung von Candraia et al. (2010) bei etwa einem Drittel der 34 untersuchten Menièrepatient*innen nachgewiesen werden, jedoch bei keiner der 100 gesunden Kontrollpersonen. Insgesamt ist die Studienlage bezüglich der Aquaporine bisher nicht eindeutig.

Aufgrund der vermuteten Beteiligung des Immunsystems in der Pathogenese des Morbus Menière werden genetische Varianten der *HLA* (Humane Leukozytenantigene) als mögliche Einflussfaktoren angesehen. Die *HLA*-Gene präsentieren den T-Lymphozyten körperfremde Zellbestandteile und setzen dadurch die Reaktion des Immunsystems in Gang. Es konnten bereits mehrere Assoziationen von bestimmten *HLA*-Allelen mit einem Morbus Menière nachgewiesen werden.

So fanden Khorsandi et al. (2011) eine signifikant höhere Frequenz des Allels HLACw*04 bei Proband*innen mit definitiv diagnostiziertem Morbus Menière als bei der Kontrollgruppe. Eine Patient*innengruppe aus dem Mittelmeerraum mit beidseitiger Innenohrbeteiligung trug

signifikant häufiger das Allel HLA-DRB1*1101 als die gesunden Proband*innen (Lopez-Escamez et al., 2007). Auch das den HLA verwandte und benachbarte *MICA* (*MHC class I polypeptide-related sequence A*)-Gen zeigte laut einer Studie von Gazquez et al. (2012) signifikante Assoziationen mit einem langsameren Hörverlust bei Menièrepatient*innen.

Ein weiteres Kandidatengen ist das *MIF* (*Macrophage migration inhibitory factor*)-Gen. MIF hat einen proinflammatorischen Effekt, indem es Makrophagen an der Migration hindert. Bestimmte Polymorphismen innerhalb des zugehörigen Gens waren in mehreren Studien mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert (Renner et al., 2005). Yazdani et al. (2013) konnten in ihrer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie bezüglich Morbus Menière in der untersuchten Patient*innengruppe, bestehend aus 72 iranischen Patient*innen mit eindeutigem oder wahrscheinlichem Morbus Menière nach den Diagnosekriterien der AAO-HNS, wesentlich häufiger den Genotyp MIF-173GG nachweisen als in der Kontrollgruppe ($p=0,009$). In einer spanischen Population konnte gezeigt werden, dass bei Menièrepatient*innen die fünffache Wiederholung des Mikrosatelliten CATT signifikant häufiger auftrat als bei gesunden Kontrollen. Dieses Ergebnis konnte jedoch in einer amerikanischen Patient*innengruppe nicht reproduziert werden (Gazquez et al., 2013).

Aufgrund seiner regulatorischen Funktion im Immunsystem wurde der Transkriptionsfaktor NF κ B (*Nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) bezüglich seiner Assoziation mit dem Hörverlust bei Menièrepatient*innen von Cabrera et al. (2014) untersucht. Hierbei handelte es sich um eine Studie an 716 Patient*innen mit eindeutig diagnostiziertem Morbus Menière, die in spanischen Krankenhäusern rekrutiert wurden. Es konnten zwei SNPs (rs3774937 und rs4648011) im *NF κ B1*-Gen identifiziert werden, die häufiger mit einem schnelleren Hörverlust bei Menièrepatient*innen assoziiert waren. Die Autoren vermuteten, dass genetische Varianten im *NF κ B1*-Gen regulatorisch auf die Entzündungsaktivität bei Morbus Menière wirken und dadurch die Ausprägung des Hörverlusts beeinflussen könnten (Cabrera et al., 2014).

In einer RNA-Sequenzierungsstudie konnte gezeigt werden, dass das *GSTM1* (*Glutathione S-transferase Mu 1*)-Gen bei drei chinesischen Menièrepatient*innen hoch signifikant häufiger exprimiert wurde als in der gesunden Kontrollgruppe und auch höhere Konzentrationen des Proteins GSTM1 im Patient*innenserum nachweisbar waren (Sun et al., 2018). Polymorphismen im *GSTM1*-Gen waren mit entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Diabetes mellitus und Colitis ulcerosa assoziiert (Ji & Lee, 2013; Zhang et al., 2013; Moini et al., 2017).

Lopez-Escamez et al. (2010) untersuchten SNPs in den Genen der Proteintyrosinphosphatase PTPN22 (*Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)*) und des Proteins CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein*) auf ihre Assoziation mit beidseitigem

Morbus Menière an 52 Patient*innen und 348 gesunden Kontrollproband*innen. Beide Gene wurden aufgrund ihrer bekannten Assoziationen mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen und ihrer Rolle im Immunsystem ausgewählt. Während für den SNP rs231775 im *CTLA4*-Gen keine signifikante Assoziation bestand, konnten für den SNP rs2476601 (Chromosom 1: 113834946, GRCh38) im *PTPN22*-Gen signifikante Unterschiede gezeigt werden. In der Patient*innengruppe trat der heterozygote Genotyp 1858CT signifikant häufiger auf als in der Kontrollgruppe. Bezogen auf die Allelfrequenz bestanden keine signifikanten Assoziationen (Lopez-Escamez et al., 2010).

1.3 CTLA4 und PTPN22

Im Folgenden sollen die Proteine CTLA4 und PTPN22 näher vorgestellt werden. Diese sind besonders interessant in Bezug auf Morbus Menière, da sie auch als „Generalschlüssel“ zu autoimmunen Vorgängen bezeichnet werden und mit vielen Autoimmunerkrankungen assoziiert sind (Brand et al., 2005).

1.3.1 CTLA4

CTLA4 ist die Kurzform für *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (National Center for Biotechnology Information, 2004a), eine andere Bezeichnung ist CD152 (*cluster of differentiation 152*). Das Protein gehört zur Superfamilie der Immunglobuline, wozu die Immunglobuline selbst, die MHC (*Major histocompatibility complex*)-Moleküle und T-Zellrezeptormoleküle, wie CTLA4, zählen. Das *CTLA4*-Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 2q33 (National Center for Biotechnology Information, 2004a). Es besitzt 4 Exons, wobei Exon 1 für die Signalsequenz des Proteins kodiert, Exon 2 für die ligandenbindende Domäne, Exon 3 für die Transmembrandomäne und Exon 4 für den zytoplasmatischen Schwanz (Teft et al., 2006). CTLA4 trägt eine V-ähnliche extrazelluläre Domäne, also einen Abschnitt, der der variablen Region von Immunglobulinen ähnlich ist (Lindsten et al., 1993). Beim Menschen existieren drei Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen, wobei die Isoform 1 die eben beschriebene Struktur zeigt und als Homodimer vorliegt, welches durch eine Disulfidbrücke verbunden ist. Die Isoform 2 trägt hingegen ein Exon weniger, was zu einem Fehlen der Transmembrandomäne führt. Isoform 2 ist somit ein lösliches Protein und liegt als Monomer vor (National Center for Biotechnology Information; Accession Number: NP_005205.2). Außerdem gibt es eine dritte Isoform, bei der nur Exon 1 und 4 vorhanden sind (Teft et al., 2006).

CTLA4 gehört zu den Transmembranproteinen, besteht aus 223 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 41-43 kDa (Kilodalton) (Brunet et al., 1987). Das Protein wird hauptsächlich von T-Zellen, vor allem in Lymphknoten und im Appendix, aber auch in anderen Organen exprimiert (National Center for Biotechnology Information, Accession Number: NP_005205.2; Brunet et

al., 1987). Dabei tragen hauptsächlich CD25+, CD4+ regulatorische T-Zellen CTLA4, welche hemmende Effekte auf konventionelle T-Zellen haben (Al Dulaijan et al., 2018; Takahashi et al., 2000).

Eine T-Zelle exprimiert neben CTLA4 einen weiteren Rezeptortyp namens CD28, der dieselben Liganden bindet, nämlich CD80 (auch B7-1 genannt) und CD86 (auch B7-2 genannt) (Walker, 2017). Bei der konventionellen T-Zellaktivierung erkennt eine zytotoxische T-Zelle zunächst mittels ihres T-Zellrezeptors Antigene, die auf MHC Klasse I-Molekülen an der Oberfläche von Zellen präsentiert werden. Zusätzlich bindet der CD28-Rezeptor der T-Zelle an die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der antigenpräsentierenden Zelle, was die Aktivierung der T-Zelle verstärkt. Nach der Aktivierung wird CTLA4 an der Oberfläche des zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert und bindet ebenfalls an CD80 und CD86, wodurch die Aktivierung der T-Zelle gehemmt und somit die T-Zellaktivität im Gleichgewicht gehalten wird (Webb et al., 2018). Außerdem hemmt CTLA4 die Produktion verschiedener Proteine, die für ein Fortschreiten der T-Zelle im Zellzyklus wichtig sind, wie Cyclin D3 und Cdk4 (*Cyclin-dependent kinase 4*) (Brunner et al., 1999).

Einen etwas anderen Effekt hat CTLA4, wenn es von den regulatorischen T-Zellen exprimiert wird. Diese machen etwa 5-10% der CD4-positiven T-Helferzellen aus und spielen eine wichtige Rolle bei der Selbsttoleranz des Körpers (Takahashi et al., 2000). Ein Fehlen von regulatorischen T-Zellen scheint ein Ungleichgewicht des Immunsystems mit einer überschießenden Aktivierung von unspezifischen folliculären T-Helferzellen und B-Zellen auszulösen (Wing et al., 2014). Regulatorische T-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead box P3*), durch den wiederum vermehrt CTLA4 exprimiert wird (Sakaguchi et al., 2008). Es scheint nach Ansicht mancher Autoren, dass regulatorische T-Zellen die suppressorische Wirkung von CTLA4 auf CD80 und CD86 benötigen, um konventionelle T-Zellen und dendritische Zellen hemmen zu können (Wing et al., 2008; Chen et al., 2017).

Mäuse, die ohne jegliche CTLA4-Aktivität gezüchtet werden, sterben nach 3 bis 4 Wochen an einer starken Lymphozytenproliferation, die Organe befällt und zu schweren Myokarditiden und Pankreatitiden führt (Klocke et al., 2016). Mäuse, die ohne *CTLA4*-Gen auf regulatorischen T-Zellen gezüchtet werden, zeigen ähnliche überschießende Autoimmunreaktionen mit einer Überproduktion von Immunglobulin E (Wing et al., 2008).

CTLA4 spielt zusammenfassend eine wichtige hemmende Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort, welche von großer Bedeutung für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen ist (Walker, 2017).

Einleitung

Assoziation von CTLA4 mit Autoimmunerkrankungen

Die zuvor theoretisch besprochene Rolle von CTLA4 bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen lässt sich dadurch untermauern, dass Veränderungen im *CTLA4*-Gen in zahlreichen Studien Assoziationen mit autoimmuninduzierten Krankheiten zeigten. Geht man von der Hypothese aus, dass Autoimmunvorgänge einen Einfluss bei der Entstehung des Morbus Menière haben, ließe sich daraus auch eine mögliche Beteiligung an der Prädisposition für einen Morbus Menière ableiten. In der einzigen Studie, die bis jetzt zum *CTLA4*-Gen in Bezug auf Morbus Menière veröffentlicht wurde, zeigten sich keine signifikanten Assoziationen (Lopez-Escamez et al., 2010).

Der häufig untersuchte SNP rs231775, der sich im Exon 1 befindet, zeigte laut einer Metaanalyse, die über 4000 Patient*innen und über 6000 gesunde Kontrollen aus 19 Studien einschloss, eine hochsignifikante Assoziation mit dem Vorkommen von verschiedenen Autoimmunerkrankungen. Die Träger des Risikoallels G am genannten SNP litten signifikant häufiger an Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematodes oder Diabetes mellitus Typ 1. Dies traf sowohl für den Vergleich von Allelfrequenzen zwischen Patient*innen und Kontrollen, als auch für das dominante (Genotyp GG/AG im Vergleich zu Genotyp AA) und rezessive Modell (Genotyp GG im Vergleich zu Genotyp AA/AG) zu. Kaukasier*innen wie auch Asiat*innen zeigten ähnliche signifikante Ergebnisse (Wang et al., 2017). Der untersuchte SNP befindet sich auf Position 49 des *CTLA4*-Gens und führt zu einem Austausch von Adenin und Guanin. Dies wiederum führt zu einem Austausch von Threonin zu Alanin in der Aminosäuresequenz des zugehörigen Proteins. Derselbe Polymorphismus war in einer Metaanalyse von Eskandari-Nasab et al. (2015), in der 3661 Patient*innen und 4427 gesunde Kontrollen untersucht wurden, in der kaukasischen Population signifikant mit der autoimmunvermittelten Lebererkrankung primär biliäre Zirrhose assoziiert (G-Allel). Der SNP rs231775 zeigte auch Assoziationen mit der Autoimmunerkrankung SLE (systemischer Lupus erythematodes). Eine Metaanalyse mit 18 eingeschlossenen Fall-Kontrollstudien zeigte dies für das Risikoallel G bezogen auf asiatische Proband*innen. Es waren insgesamt 1806 Patient*innen und 2490 Kontrollen eingeschlossen (Chang et al., 2012). In einer südindischen Population besaßen ebenfalls signifikant mehr der 211 SLE-Patient*innen als der 323 nach Alter, Geschlecht und Ethnizität gematchten Kontrollen das Allel G beziehungsweise den Genotyp GG am SNP rs231775 (Katkam et al., 2016).

Auch bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen, wozu die Hashimoto-Thyreoiditis und der Morbus Basedow zählen, zeigte sich ein signifikant häufigeres Vorkommen des Genotyps GG und Risikoallels G im SNP rs231775. Die betreffende Studie schloss 235 Patient*innen mit autoimmunbedingten Schilddrüsenerkrankungen und 235 nach Alter und Geschlecht gematchte gesunde Kontrollen ein (Ramgopal et al., 2018). Ting et al. (2016) konnten ebenfalls eine signifikante Assoziation zwischen dem Risikoallel G im SNP rs231775 des *CTLA4*-Gens

und Morbus Basedow bei Kindern wie auch bei Erwachsenen feststellen. Dasselbe galt für das Risikoallel G am SNP rs3087243. Für die Studie wurden 289 erwachsene und 265 pädiatrische Patient*innen mit Morbus Basedow mit 1085 gesunden Kontrollproband*innen verglichen. Sowohl Patient*innen als auch Kontrollen kamen aus der Han-chinesischen Population.

In mehreren Studien wurden Assoziationen zwischen SNPs im *CTLA4*-Gen und rheumatoider Arthritis gezeigt. In einer ägyptischen Populationsgruppe trugen 112 Patient*innen mit der Gelenkerkrankung signifikant häufiger das Allel G (rs231775) als die 122 gesunden Proband*innen (Elshazli et al., 2015). Dieses Ergebnis bestätigte sich auch in einer Studie mit 1489 Patient*innen und 1200 gesunden Kontrollen in einer Han-chinesischen Population (Tang & Zhou, 2013). Der heterozygote Genotyp GA beim SNP rs3087243 wirkte hingegen in einer mexikanischen Studie mit 200 Patient*innen und 200 Kontrollpersonen ohne Autoimmunerkrankung krankheitsprotektiv, während der Haplotyp 319C/+49G/CT60G im *CTLA4*-Gen mit einem erhöhten Auftreten von rheumatoider Arthritis assoziiert war (Torres-Carrillo et al., 2013).

1.3.2 PTPN22

Die *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)*, kurz PTPN22, wird im menschlichen Lymphgewebe von hämatopoetischen Zellen exprimiert. Eine andere Bezeichnung ist LYP, kurz für *Lymphoid-specific tyrosine phosphatase* (National Center for Biotechnology Information, 2004c). Das entsprechende orthologe Gen bei der Maus ist das *PEP (PEST domain-enriched tyrosine phosphatase)*-Gen (Holmes et al., 2015). Das Protein besitzt eine Masse von 105 kDa. Es besteht aus einem N-terminalen katalytischen Abschnitt und einem C-terminalen nicht-katalytischen Bereich. Seine Aminosäuresequenz ist im *PTPN22*-Gen verschlüsselt, welches sich auf Chromosom 1p13 befindet (Cohen et al., 1999). Beim Menschen sind drei Isoformen des Enzyms bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen (LYP1, LYP2 und LYP3) (Wang et al., 2010).

PTPN22 interagiert spezifisch mit Tyrosin als Substrat und befindet sich als *non-receptor*-Typ einer Proteintyrosinphosphatase im Inneren der Zelle. Dieser Typ besitzt häufig Bindungsstellen zur Interaktion mit anderen Proteinen (Alonso et al., 2004).

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Tyrosin ist wichtig bei der Zellkommunikation im menschlichen Körper. Durch sie werden die Transkription von DNA in RNA, die RNA-Prozessierung und der Transmembrantransport koordiniert. Ein Ungleichgewicht zwischen Tyrosinphosphatasen und Tyrosinkinase kann zur Entwicklung von verschiedenen Krankheiten beitragen (Alonso et al., 2004).

Einleitung

Die wichtige Rolle von PTPN22 im Immunsystem entsteht durch seine Beteiligung an der Regulation der Aktivierung von T-Zellen durch den T-Zellrezeptor. Ausgelöst durch die Signalübertragung am T-Zellrezeptor dephosphoryliert zunächst die Rezeptor-Typ Proteintyrosinphosphatase CD45 die Proteintyrosinkinasen Lck (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) und Fyn (*Src family tyrosine kinase*) und aktiviert diese dadurch (Saunders & Johnson, 2010). Auf der anderen Seite werden Lck und Fyn durch die Proteintyrosinkinase CSK (*C-terminal Src kinase*) phosphoryliert und dadurch gehemmt. Lck und Fyn spielen eine wichtige verstärkende Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen (Chow et al., 1993). Die SH3 (*Src-homology 3*)-Domäne von CSK bindet an PTPN22 und wird dadurch reguliert. Es wird vermutet, dass PTPN22 und CSK eine gemeinsame Hemmung der T-Zellaktivierung bewirken (Cloutier & Veillette, 1996).

Mäuse, die ohne *PEP*-Expression gezüchtet wurden, zeigten nach etwa sechs Monaten eine Lymphadenopathie und Splenomegalie. Außerdem entwickelten sie eine erhöhte Zahl an autoreaktiven T-Zellen, die Autoimmunerkrankungen bedingen können (Hasegawa et al., 2004).

Diese Erkenntnisse erlauben die Hypothese, dass Veränderungen im *PTPN22*-Gen eine Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen spielen könnten. Somit ist das *PTPN22*-Gen von Interesse für die Forschung über Morbus Menière, wenn man von der Annahme ausgeht, dass die Erkrankung durch autoimmune Vorgänge mitverursacht wird.

Assoziation von PTPN22 mit Autoimmunerkrankungen und Morbus Menière

Varianten im *PTPN22*-Gen sind mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert, was seine wichtige Rolle im Immunsystem unterstreicht. Der SNP 1858C/T, welcher in einem Genabschnitt liegt, der für eine der SH3-Bindungsstellen des Proteins kodiert, zeigte in einer Studie mit 294 nordamerikanischen Patient*innen und 395 nach Alter und Herkunft gematchten gesunden Kontrollen eine Assoziation mit Diabetes mellitus Typ 1. Das Risikoallel T kam in der Patient*innengruppe signifikant häufiger vor. Der Polymorphismus trägt auch die Bezeichnung rs2476601 und führt zum Aminosäureaustausch von Arginin zu Tryptophan an Position 620. PTPN22-Proteine mit dem Allel 1858T scheinen nicht an die Proteintyrosinkinase CSK zu binden (Bottini et al., 2004). Diabetes mellitus Typ 1-Patient*innen trugen in einer Studie in einer brasilianischen Population von Tavares et al. (2015), welche 205 Patient*innen und 308 Kontrollproband*innen ohne Autoimmunerkrankungen einschloss, signifikant häufiger das Allel 1858T. Dies passt zu der Hypothese, dass eine fehlende Hemmung der T-Zellen durch CSK eine Autoimmunerkrankung begünstigen könnte.

Auf der anderen Seite gibt es die Vermutung, dass das Allel 1858T eine Verstärkung der Enzymfunktion bewirkt. Durch die vermehrte Hemmung von regulatorischen T-Zellen könnte

der Abbau von autoimmunreaktiven T-Zellen gestört sein, was wiederum zu Autoimmunerkrankungen führen könnte (Vang et al., 2005; Zheng & Kissler, 2013).

Auch für die rheumatoide Arthritis konnte ein Zusammenhang mit *PTPN22*-Polymorphismen gezeigt werden. Patient*innen mit rheumatoider Arthritis, die im SNP rs2476601 Adenin und im SNP rs2488457 die Base Guanin besaßen, zeigten eine signifikant verringerte Expression von *PTPN22*-mRNA (messenger-RNA) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies traf sowohl für jeden SNP für sich betrachtet zu, als auch für den Haplotyp GA, der sich aus beiden oben genannten Allelen zusammensetzt. Es wurden hierfür Blutproben von 89 Patient*innen und 43 gesunden Kontrollpersonen entnommen, wobei die Proband*innen in zwei spanischen Krankenhäusern rekrutiert wurden (Remuzgo-Martinez et al., 2017). Für den SNP rs33996649 (G788A) konnte ebenfalls eine Assoziation mit der Gelenkerkrankung nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um eine Funktionsverlustvariante, die zu einer eingeschränkten Aktivität von *PTPN22* führt (Liu et al., 2012). Lopez-Cano et al. (2017) konnten für diesen SNP in einer mexikanischen Populationsgruppe an 388 Patient*innen und 336 gesunden Kontrollproband*innen einen protektiven Effekt für das Allel A bezüglich rheumatoider Arthritis zeigen.

Eine weitere Autoimmunerkrankung, für die Assoziationen mit genetischen Varianten im *PTPN22*-Gen nachgewiesen wurden, ist der Morbus Basedow. Der bereits vorgestellte SNP rs2476601 zeigte eine signifikante Assoziation mit der autoimmunreaktiven Schilddrüsenerkrankung. In einer Studie in einer lateinamerikanischen Population (83 Patient*innen und 336 gesunde Kontrollpersonen) besaßen signifikant mehr Patient*innen als Kontrollen das Risikoallel T im betreffenden SNP (Lopez-Cano et al., 2017). Dieses Ergebnis wurde auch durch eine Metaanalyse von 11 Studien zu *PTPN22* und autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen mit insgesamt 3764 Patient*innen und 3328 Kontrollen bestätigt. Hier war das T-Allel bei der Patient*innengruppe ebenfalls signifikant häufiger nachweisbar als bei der Kontrollgruppe. Es handelte sich um asiatische und kaukasische Proband*innen (Luo et al., 2012).

Auch der systemische Lupus erythematodes, eine Autoimmunerkrankung, die alle Organe betreffen kann, zeigte Assoziationen mit verschiedenen SNPs im *PTPN22*-Gen. Namjou et al. (2013) führten eine Genotypisierung verschiedener SNPs bei 8220 SLE-Patient*innen und 7369 Kontrollproband*innen verschiedener Ethnizitäten durch. Es konnte sowohl für den bereits vorgestellten SNP rs2476601 (Risikoallel A) als auch für rs1217414 (Risikoallel G) in einer europäischen Stichprobe eine signifikante Assoziation mit SLE gezeigt werden. Für eine hispanische Patient*innengruppe zeigte sich eine signifikante Assoziation mit dem SNP rs3765598 (Risikoallel T). Eine Metaanalyse, die vier Fall-Kontrollstudien mit insgesamt 772 Patient*innen und 1092 Kontrollen verschiedener Ethnizitäten einschloss, konnte eine

Einleitung

Assoziation für den bereits erwähnten SNP rs2476601 mit SLE bestätigen. Der heterozygote Genotyp war mit einer erhöhten Suszeptibilität für SLE assoziiert (Shi et al., 2013). Lopez-Cano et al. (2017) zeigten, dass in einer mexikanischen Kohorte das Allel A und der heterozygote Genotyp GA im bereits vorgestellten SNP rs33996649 mit einem selteneren Auftreten von SLE vergesellschaftet waren, was auf einen protektiven Effekt hindeutet, wie auch schon bei der rheumatoiden Arthritis beobachtet. Die Studie umfasste 405 SLE-Patient*innen und 336 gesunde Kontrollproband*innen.

Auch für Morbus Menière konnte eine Assoziation mit Polymorphismen im *PTPN22*-Gen gezeigt werden. Oh et al. (2019) sequenzierten 45 potentielle Kandidatengene für Morbus Menière bei 68 Patient*innen einer südkoreanischen Klinik sowie 100 gesunden Kontrollproband*innen. Hierunter befand sich auch das *PTPN22*-Gen. Die Patient*innen erfüllten die diagnostischen Kriterien der *Bárány Society* für einen sicheren Morbus Menière. Die Forschungsgruppe konzentrierte sich auf seltene Varianten mit einer minoren Allelfrequenz < 0,01, stille Varianten wurden ausgeschlossen. Es konnten in der Patient*innengruppe drei seltene Varianten im *PTPN22*-Gen gefunden werden, die in der Kontrollgruppe nicht vorkamen und eine signifikante Assoziation mit Morbus Menière zeigten. Hierbei handelte es sich um c.829G>T (*nonsense*-Variante), c.1356delT (Deletion) und c.205A>G (*missense*-Variante).

Lopez-Escamez et al. (2010) wiesen nach, dass der heterozygote Genotyp CT im SNP rs2476601 mit signifikant höherer Frequenz bei den Menièrepatient*innen vorkam als bei den Kontrollen. Es handelte sich um eine kaukasische Kohorte, bestehend aus 52 Patient*innen mit bilateralem Morbus Menière und 348 gesunden Kontrollpersonen. Diese Assoziation des Morbus Menière mit dem SNP rs2476601, welcher, wie zuvor dargestellt, mit zahlreichen autoimmunbedingten Erkrankungen assoziiert ist, unterstützt die Hypothese, dass autoimmune Vorgänge einen Einfluss bei der Entwicklung eines Morbus Menière haben.

2. Zielsetzung

Morbus Menière ist eine chronische Erkrankung des Innenohrs, deren Ursachen bis heute ungeklärt und die Gegenstände aktueller Forschung sind. Ätiologisch handelt es sich um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, bei der vermutlich sowohl genetische Faktoren als auch autoimmune Vorgänge im Innenohr eine Rolle spielen. Mit Hilfe von Kandidatengenstudien wurden Assoziationen von möglicherweise für die Pathogenese relevanten Genen mit Morbus Menière untersucht, welche auch einen Einfluss bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen haben sollen.

Dazu gehören das *CTLA4*-Gen und das *PTPN22*-Gen. Veränderungen im *CTLA4*-Gen, einem Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, welches eine wichtige Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort spielt, waren in zahlreichen Studien mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert. In der einzigen Studie, die bis heute in Bezug auf Morbus Menière veröffentlicht wurde, bestanden keine signifikanten Assoziationen (Lopez-Escamez et al., 2010). Auch die Tyrosinphosphatase *PTPN22*, welche ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf die T-Zell-rezeptorvermittelte Signalübertragung und Aktivierung von T-Zellen ausübt, zeigte in mehreren Studien signifikante Assoziationen mit autoimmunbedingten Erkrankungen sowie in Studien von Lopez-Escamez et al. (2010) und Oh et al. (2019) mit Morbus Menière.

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie im Sinne einer Replikationsstudie von Lopez-Escamez et al. (2010). Ziel der Arbeit war es, folgende Frage zu untersuchen: Bestehen Assoziationen zwischen sechs untersuchten SNPs im *CTLA4*-Gen sowie fünfzehn SNPs im *PTPN22*-Gen und Morbus Menière? Hierzu wurden die entsprechenden Genotypfrequenzen von 314 Menièrepatient*innen und 494 gesunden Kontrollproband*innen kaukasischer Abstammung miteinander verglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Vorbedingungen der Studie

Vor Studienbeginn wurde die Zustimmung der lokalen Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München eingeholt (Projektnummer 379-11). Alle potenziellen Teilnehmer*innen wurden ausführlich über Art und Inhalt der Studie und die Anonymisierung der Daten aufgeklärt, sowie über mögliche Risiken informiert. Es wurde darauf hingewiesen, dass es sich um eine freiwillige Teilnahme handelt und bei Ablehnung keinerlei Nachteile entstehen. Auch ein nachträgliches Zurückziehen der Einwilligung war ohne Angabe von Gründen möglich. Das Einverständnis der Proband*innen wurde durch eine schriftliche Einverständniserklärung dokumentiert. Die Studie wurde nach den Vorgaben der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

3.2 Studienteilnehmer*innen

3.2.1 Kontrollgruppe

Für die Rekrutierung gesunder Proband*innen wurde eine zufällig gewählte Stichprobe von im Großraum München gemeldeten Personen postalisch angeschrieben und zur Teilnahme an der Studie eingeladen. Bei bestehendem Interesse wurde mittels eines standardisierten Telefonscreenings die Eignung zur Teilnahme überprüft. So mussten die Teilnehmer*innen mindestens 18 Jahre alt sowie deutscher Abstammung sein und es durften keine psychiatrischen oder neurologischen Vorerkrankungen vorliegen, weder bei den Proband*innen selbst noch bei Verwandten ersten Grades.

Konnten keine Ausschlusskriterien ermittelt werden, bekamen die Interessent*innen einen schriftlichen Anamnesebogen zugesandt. Darin wurden detailliert Vorerkrankungen aus dem psychiatrischen und neurologischen Bereich erfasst, sowohl bei den Teilnehmer*innen selbst als auch bei den Verwandten ersten, zweiten und dritten Grades. Weiterhin wurden Informationen über Abstammung, Schulbildung und Familienstand gesammelt.

Ergaben sich weiterhin keine Ausschlusskriterien, wurden die Proband*innen zum ausführlichen persönlichen Interview in die Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU eingeladen. Hierbei wurden mehrere strukturierte Interviews eingesetzt, um relevante Vorerkrankungen standardisiert zu erheben. Durchgeführt wurde die deutsche Version des SKID (Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV) (Wittchen et al., 1997). Im SKID I werden Störungen der Achse I laut dem DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) (Wittchen et al., 1996), das heißt psychische Störungen abgefragt, im SKID II Störungen der Achse II, wobei es sich um Persönlichkeitsstörungen handelt. Mittels des LEBI (Leipziger Ereignis- und Belastungsinventar) (Richter & Guthke,

1996) wurden belastende Lebensereignisse in der Vergangenheit erfasst. Weiterhin wurde das FHAM (*Family History Assessment Module*) (Rice et al., 1995) verwendet, um psychiatrische Erkrankungen bei Verwandten zu eruieren. Ergab sich nach diesen ausführlichen, strukturierten Interviews kein Vorliegen von neurologischen oder psychiatrischen Erkrankungen bei den Proband*innen und ihrer Familie, erfolgten der Studieneinschluss und die Blutentnahme.

3.2.2 Patient*innengruppe

Die Proband*innen der Patient*innengruppe wurden im DSGZ (Deutsches Schwindel- und Gleichgewichtszentrum) im Klinikum Großhadern rekrutiert. Es handelte sich bei diesem Zentrum um ein IFB (Integriertes Forschungs- und Behandlungszentrum), das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert wurde.

Patient*innen, die als Teilnehmer*innen für die Studie in Frage kamen, wurden bei ihrem Erstbesuch in der Klinik ausführlich aufgeklärt. Nur einwilligungsfähige Patient*innen, die mindestens 18 Jahre alt und kaukasischer Abstammung waren, wurden ausgewählt. Dabei wurden folgende Schwindelerkrankungen in die Datenbank aufgenommen: Benigner peripherer paroxysmaler Lagerungsschwindel, Neuritis vestibularis, bilaterale Vestibulopathie, Vestibularisparoxysmie, vestibuläre Migräne, Downbeatnystagmus-Syndrom, cerebelläre Ataxie, Akustikusneurinom, sowie Morbus Menière. Primär psychosomatische Schwindelformen galten als Ausschlusskriterium.

Für die vorliegende Studie wurden aus der beschriebenen Datenbank die Patient*innen mit Morbus Menière ausgewählt. Eingeschlossen wurden nach den Diagnosekriterien der AAO-HNS (siehe Seite 3 f.) als eindeutig oder wahrscheinlich eingestufte Menièrepatient*innen. Proband*innen, bei denen Morbus Menière lediglich als Verdachts- oder Differentialdiagnose geäußert worden war, wurden ausgeschlossen. Die in die Studie eingeschlossenen Patient*innen wurden in die Gruppe MMgesamt eingeordnet. In die Untergruppe MMmono wurden nur Patient*innen der Gruppe MMgesamt ohne zusätzliche Schwindeldiagnosen (z.B. Benigner paroxysmaler Lagerungsschwindel, Neuritis vestibularis, Bilaterale Vestibulopathie) aufgenommen.

Nach Einholen des Einverständnisses wurde bei allen Patient*innen eine ausführliche standardisierte Anamnese erhoben. Dabei wurden allgemeine Daten wie Abstammung, Geburtskomplikationen, Nikotinabusus und Medikamenteneinnahme erfasst. Weiterhin beantworteten die Teilnehmer*innen gezielte Fragen zu psychischen und neurologischen Vorerkrankungen und insbesondere zu Schwindelerkrankungen, Migräne, Muskelerkrankungen, Hörstürzen und Schwerhörigkeit. Zum Schwindel wurden auch Angaben wie die Schwindelintensität, -qualität, -dauer, -frequenz und der Erstmanifestationszeitpunkt

aufgenommen, sowie die Akuität des Auftretens, eventuelle Auslöser und Zusatzsymptome. Darunter zählten Tinnitus, Ohrdruck, Oszilopsien, Gang-/Seh-/Bewegungsstörungen, Kopfschmerz, Aurasymptome, Licht-/Geräuschempfindlichkeit und Übelkeit/Erbrechen. Es wurde außerdem ein Vorkommen oben genannter Erkrankungen sowie eventueller genetischer Erkrankungen bei Verwandten ersten bis zweiten Grades erfasst. Falls diese bereits verstorben waren, wurden Todesalter und –ursache dokumentiert. Nach der Durchführung der Anamnese fand eine Blutabnahme von venösem Blut statt.

3.3 Laborverfahren

3.3.1 DNA-Extraktion

Um die Genotypisierung der zu untersuchenden SNPs durchführen zu können, wurden jedem Teilnehmer/jeder Teilnehmerin insgesamt circa 55 ml venöses Blut entnommen. Die Blutproben wurden zur Wahrung der Anonymität mit einem den Teilnehmer*innen zugeordneten Code versehen. Anschließend wurden die EDTA- und Serum-Monovetten mit 3000 rpm (Umdrehungen pro Minute) für 13 Minuten bei 6°C zentrifugiert, das EDTA-Plasma beziehungsweise das Serum in Matrixplatten mit 48 Röhrchen à 200 µl abpipettiert und gemeinsam mit dem verbleibenden Blutkuchen bei -80°C eingefroren. Für die Extraktion der DNA wurde das koagulierte Blut aus 3 Serum-Monovetten gepoolt und das QIAamp DNA Blood Maxi Kit laut der Vorgaben des Herstellers verwendet (Qiagen, 2005). In Tabelle 1 sind die verwendeten Reagenzien und Materialien für die DNA-Extraktion aufgeführt.

Tabelle 1: Reagenzien, Materialien und Geräte für die DNA-Extraktion

Reagenz/Material	Hersteller
EDTA/Serum-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
50 ml Zentrifugenröhre	Sarstedt, Nümbrecht
Micro-Schraubröhre, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
QIAamp 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
1x PBS-Puffer: 8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ 0,24 g KH ₂ PO ₄ Ad 1 l mit Aqua dest. Mit NaOH auf pH 7,4	Eigene Herstellung: Reagenzien von Carl Roth, Hamburg

EDTA=Ethylendiamintetraessigsäure, p.a.=pro analysi, PBS=Phosphat-gepufferte Salzlösung, NaOH=Natriumhydroxid

1) Zellyse

Zur Vorbereitung wurden die bei -80°C gelagerten Serum-Blutkuchen aufgetaut, mit 1x PBS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und gemischt, um die Zellen zu resuspendieren und ein einheitliches Ausgangsvolumen für die weitere Bearbeitung zu erreichen. Nun wurden 500 μl der Qiagen Protease hinzugefügt. Die Qiagen Protease verdaut Proteine der Zellmembranen und trägt so zur Lyse der Zellen bei. Außerdem wurden 12 ml des Guanidin-HCl-haltigen Lysepuffers AL zugesetzt, der durch chaotrope Salze die Freisetzung der DNA verstärkt. Die entstandene Lösung wurde für 60 Sekunden auf dem Vortexer durchmischt und daraufhin 30 Minuten lang im 70°C warmen Wasserbad unter ständigem Schütteln inkubiert, um optimale Bedingungen für die Zellyse zu schaffen (Qiagen, 2005).

2) DNA-Bindung an Silikagelmembran

Zunächst wurde die Lösung mit 10 ml Ethanol (96-100%ig) versetzt und für 2 Minuten auf dem Vortexer durchmischt, um die DNA von ihrer Hydrathülle zu befreien und sie dadurch auszufällen. Daraufhin wurde die DNA-Lösung schrittweise auf die Silikagel-Membran (QIAamp Maxi Säule) aufgetragen und bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Eluat, in dem RNA und nukleinsäurebindende Proteine verblieben, wurde verworfen. Die DNA haftete dank der herrschenden Salz- und sauren pH-Bedingungen selektiv an der Silikamembran (Qiagen, 2005).

3) Waschen der DNA

Eventuelle Protein- und RNA-Reste wurden durch Zugabe von 5 ml Guanidin-HCl-haltigem Puffer (Waschpuffer AW1) und Zentrifugation für 2 Minuten bei 4000 rpm bei Raumtemperatur entfernt. Das Eluat wurde verworfen. Mithilfe von 5 ml eines zweiten, ethanolhaltigen Waschpuffers (Waschpuffer AW2) wurden dann verbleibende Guanidinsalze des ersten Puffers beseitigt. Diese Lösung wurde für 15 Minuten bei 4000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Eluat wurde wiederum verworfen und die Silikagelmembran getrocknet (Qiagen, 2005).

4) DNA-Elution

Um die gereinigte DNA von der Silikagel-Membran zu lösen, wurden 750 μl eines basischen TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)-haltigen Elutionspuffers (Elutionspuffer AE) zugesetzt und so die pH-Bedingungen verändert. Es erfolgte eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 5000 rpm für 2 Minuten. Anschließend wurde der Waschschrift noch einmal wiederholt (Qiagen, 2005). Die im sauren

an die Membran gebundene DNA konnte im basischen Milieu eluiert werden. Die so entstandene Stammlösung wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Tabelle 2: Reagenzien, Materialien und Geräte für die DNA-Konzentrationsbestimmung

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

Um die genaue DNA-Konzentration in jeder Probe zu ermitteln, wurde mit der Picogreen-Fluoreszenzmessung gearbeitet. Picogreen ist ein Fluorophor, der spezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 480 nm emittiert dieser Picogreen-DNA-Komplex grünes Licht mit der Wellenlänge 520 nm. Die Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Menge an gebundener DNA (Qiagen, 2005). Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Reagenzien, Materialien und Geräte für die DNA-Konzentrationsbestimmung.

1) Herstellung der Eichkurve aus DNA-Standard-Lösungen

Um eine Referenzkurve für die anschließende Konzentrationsmessung herzustellen, wurde eine 8-Punkt-Kalibrierung mittels einer 1:2-Verdünnungsreihe einer Standardlösung mit bekannter DNA-Konzentration (100 ng/μl) durchgeführt. Dazu wurden auf einer 96 Well-Mikrotiterplatte in Vertiefung A 200 μl des bekannten Standards pipettiert, in Vertiefung B bis H je 100 μl Aqua bidest (zweifach destilliertes Wasser). Sodann wurden von Vertiefung A ausgehend in das jeweils folgende *Well* 100 μl pipettiert und durch Aufziehen der Pipette gemischt. Dieser Vorgang wurde bis zum *Well* G wiederholt, Vertiefung H wurde ausgespart und diente als Referenzwert. So ergaben sich Konzentrationen der Standardverdünnungsreihe von 100 ng/μl, 50 ng/μl, 25 ng/μl, 12,5 ng/μl, 6,25 ng/μl, 3,125 ng/μl, 1,5625 ng/μl, 0 ng/μl (Qiagen, 2005).

2) Herstellung der Messplatte

Die zu messenden DNA-Stammlösungen wurde im Verhältnis 1:10 vorverdünnt. Dazu wurden auf einer 96 *Well*-Platte 45 µl Aqua bidest und 5 µl der jeweiligen DNA-Lösung vermischt. Daraufhin wurden in eine schwarze 96 *Well*-Mikrotiterplatte 50 µl Aqua bidest pro Vertiefung einpipettiert. Hierzu wurden je 5 µl der verdünnten DNA-Stammlösung bzw. 5 µl der erstellten Standardverdünnungsreihe jeweils in doppelter Ausführung pipettiert.

Das PicoGreen-Reagenz wurde vor Licht geschützt bei Raumtemperatur aufgetaut und mit Aqua bidest im Verhältnis 1:156 verdünnt. Von dieser Lösung wurden je 145 µl zu den mit DNA-Lösung befüllten *Wells* gegeben. Somit ergab sich eine Endverdünnung des Fluorophors von 1:200 (Qiagen, 2005).

3) Durchführung der Fluoreszenzmessung

Die so vorbereitete Platte wurde von der Janus Automated Workstation automatisch in den Victor 3 Multilabel Counter transportiert. Um eine möglichst gleichmäßige Konzentration der Probenlösungen zu erzielen, wurde die Messplatte zunächst für 30 Sekunden horizontal in Doppellellipsen geschwenkt. Dann wurde der Picogreen-DNA-Komplex mit Licht einer Wellenlänge von 485 nm angeregt, die Emissionen der Wellenlänge 520 nm vom Fluoreszenzmessgerät gemessen und die Fluoreszenzwerte an einen Rechner übermittelt. Dieser berechnete daraus mithilfe der Werte der Standardreihe automatisch die jeweiligen DNA-Konzentrationen. Vom Computer wurden schließlich die nötigen Mengen an DNA-Lösung und Aqua bidest errechnet, die für eine Einstellung der endgültigen Arbeitslösung auf 50 ng/µl nötig waren. Die Verdünnung wurde von der Janus Workstation automatisch in einem Volumen von 500 µl hergestellt.

3.3.3 Genotypisierung

Für die Genotypisierung der untersuchten SNPs wurde ein *Assay* der Firma Illumina verwendet. Es handelt sich dabei um ein Multiplex-Verfahren, bei dem eine große Anzahl von SNPs in einer einzigen DNA-Probe gleichzeitig untersucht werden kann. Es wurde der *HumanOmniExpress-24 BeadChip* verwendet, welcher 716376 SNPs umfasst. Das Besondere an der Methode ist, dass die Hybridisierungssonden auf perlenförmigen *Beads* angebracht sind, wodurch eine größere Anzahl von SNP-Loci auf kleinerem Raum untergebracht werden kann (Fan et al., 2006). Die Genotypisierung wurde vom Unternehmen deCODE in Island durchgeführt und die Genotypen für die Auswertung zur Verfügung gestellt. Nachfolgend wird das Prinzip der Genotypisierung zusammenfassend erläutert.

1) Amplifizierung der DNA

Die gereinigte DNA wurde zunächst amplifiziert, um ausreichend Ausgangsmaterial für die Genotypisierung zu schaffen. Die Proben wurden denaturiert und neutralisiert. Anschließend wurde mittels einer Inkubation über Nacht das gesamte Genom tausendfach vervielfältigt.

2) Vorbereitung für die Hybridisierung

Durch eine kontrollierte Enzymreaktion wurde die amplifizierte DNA in kleinere Fragmente zerlegt. Daraufhin wurde die DNA mithilfe von Isopropanol ausgefällt und anschließend in Hybridisierungspuffer resuspendiert.

3) Hybridisierung der DNA an die Beads

Beim verwendeten *BeadChip (HumanOmniExpress-24 BeadChip)* handelt es sich um einen DNA-Microarray, der mit 716376 verschiedenen Oligonukleotidsonden bestückt ist (Illumina Inc, 2014). Jede Sonde besteht aus 50-meren Oligonukleotiden, die komplementär zu einem SNP-Locus sind, jeder *Bead*-Typ entspricht somit einem SNP. Die Sonde endet eine Base vor dem betrachteten Einzelnukleotidpolymorphismus. Der *BeadChip* wurde mit den unmarkierten DNA-Fragmenten von bis zu 24 Proband*innen beladen und über Nacht inkubiert. Dabei banden die Probenfragmente an die locuspezifischen Oligonukleotide, die sich am *Bead* befanden.

4) Einzelbasenverlängerung und Färbung der Oligonukleotidsonden

Daraufhin erfolgte die Verlängerung des Oligonukleotidstrangs mit Einzelbasen durch eine DNA-Polymerase, die hybridisierten DNA-Fragmente dienten dabei als Matrize (Illumina Inc, 2012). Die eingebauten Nukleotide wurden zur späteren Fluoreszenzmarkierung mit Haptenen gekennzeichnet, Adenin und Thymin durch angehängte Biotingruppen, Guanin und Cytosin mittels Dinitrophenol. Anschließend wurde der verlängerte Oligonukleotidstrang in mehreren Schritten angefärbt, Guanin und Cytosin mit einem Fluorophor, das Licht im rot sichtbaren Bereich emittierte, Adenin und Thymin mit Emissionen im grün sichtbaren Wellenlängenbereich (Steemers et al., 2006).

5) Scannen der BeadChips und Dekodierung der Beads

Die Fluorophore wurden in einem Scanner zur Emission angeregt. Da die *Beads* zufällig in den Vertiefungen des *Microarrays* angeordnet waren, war ein Algorithmus nötig, um die jeweilige Sequenz der Oligonukleotidsonde und damit die Identität des SNPs zu entschlüsseln. Dazu wurde sich eine Methode aus der Kombinatorik zunutze gemacht.

Es wurden mehrere Hybridisierungsvorgänge mit den fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden durchgeführt, die an die Sequenzen auf den *Beads* banden. Bei jedem Durchgang wurde ein anderer Sondenpool benutzt, wobei in jedem Pool dieselben Nukleotidsequenzen enthalten waren, diese aber bei Anregung entweder rotes oder grünes Licht aussandten. So entstand für jeden *Bead* ein Farbkode, je nachdem in welchem Durchgang eine rote oder grüne Lichtemission beobachtet werden konnte.

Dieser wurde im Dualsystem mit den Ziffern 0 (entspricht der Farbe Grün) und 1 (entspricht der Farbe Rot) dargestellt und konnte anhand einer Dekodierungstabelle ausgewertet werden, in der die möglichen Codes den jeweiligen Nukleotidsequenzen zugeordnet waren.

Die Fluoreszenzmarkierung war so konstruiert, dass nach 20 Durchgängen die Oligonukleotidsequenz des *Beads* mit einer Fehlerquote von unter 1×10^{-4} festgestellt werden konnte (Gunderson et al., 2004).

3.4 Qualitätskontrollen

Um Fehler in der Analyse zu vermeiden, welche zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen können, wurden ausführliche Qualitätskontrollen durchgeführt (Anderson et al., 2010).

Zunächst wurden alle erhobenen Genotypen für einen SNP mittels eines *clusterplots* dargestellt. Um die Qualitätskriterien zu erfüllen, mussten die jeweiligen *cluster* für die heterozygoten und die homozygoten Genotypen in sich geschlossen und sauber voneinander getrennt sein. Zudem wurden SNPs mit falsch positiven Signalen in einer Blindprobe verworfen.

Daraufhin wurde die sogenannte *sample callrate* ermittelt. Hierfür wurde überprüft, wie viele der untersuchten SNPs bei einem Probanden/einer Probandin bestimmt werden konnten. Proband*innen, bei denen die *sample callrate* unter 98 % lag ($n=26$), wurden ausgeschlossen. Eine zu niedrige *sample callrate* kann in einer ungenügenden DNA-Qualität oder Fehlern im Genotypisierungsprozess begründet sein.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob das angegebene Geschlecht mit dem genetischen Geschlecht übereinstimmte. Hierfür wurden X-chromosomale Marker verwendet, für welche bei männlichen Probanden nur ein hemizygoter Genotyp vorliegen kann, da diese nur ein X-Chromosom besitzen. Indem der Anteil heterozygoter Genotypen eines Probanden/einer Probandin für die X-chromosomalen Marker berechnet wurde, konnte abgeschätzt werden, welches genetische Geschlecht der jeweilige Proband besaß. Hierfür wurden Schwellenwerte bestimmt, über bzw. unter welchen der Proband als männlich oder weiblich angesehen wurde. Liegt der Anteil heterozygoter Genotypen zwischen den Schwellenwerten, kann es sich um

einen Fehler bei der Genotypisierung oder eine Probenkontamination handeln. Solche Proband*innen wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Wenn das bestimmte genetische Geschlecht vom angegebenen Geschlecht abwich, wurde überprüft, ob Proben vertauscht worden waren. War die Probe nicht zweifelsfrei korrekt identifizierbar, wurden betroffene Proband*innen ebenfalls ausgeschlossen.

Unter den Proband*innen, die eine ausreichende *sample callrate* vorwiesen, wurde nun die *SNP callrate* bestimmt. Hier wurde für jeden SNP der Anteil an erfolgreich bestimmten Genotypen in der Gesamtstichprobe berechnet. SNPs mit einer *SNP callrate* unter 99% wurden von der weiteren Untersuchung ausgenommen (n=100798).

Anschließend wurden SNPs mit einer minoren Allelfrequenz unter 0,01 ausgeschlossen. Dies war notwendig, weil die Wahrscheinlichkeit für Genotypisierungsfehler bei sehr seltenen Varianten erhöht ist, wenn die Analyse auf den Genotypen weniger Individuen basiert.

In einem weiteren Schritt wurde das HWE (Hardy-Weinberg-Equilibrium) berechnet. In einer ausreichend großen Population wird angenommen, dass das HWE erfüllt ist. Es wird von einer idealen Population ausgegangen, in der sich die Allel- und Genotypfrequenzen über die Populationen über Generationen hinweg nicht verändern, da man ein Fehlen von Evolutionseinflüssen annimmt. Ist das HWE nicht erfüllt, kann dies ein Hinweis auf Genotypisierungsfehler sein. SNPs mit einem mittels exakten Test nach Fisher ermittelten p-Wert unter 0,01 wurden ausgeschlossen.

Des Weiteren wurden SNPs ausgeschlossen, bei denen es aufgrund nicht-zufälliger Ursachen zu fehlenden Werten kam. Hierfür wurde ein Test genutzt, welcher mithilfe der Genotypen der benachbarten SNPs vorhersagte, ob es am betreffenden SNP zu fehlenden Werten kam. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass der Referenz-SNP und die benachbarten SNPs in einem hohen Kopplungsungleichgewicht miteinander standen. Bei einer Assoziation der Haplotypen der flankierenden SNPs mit dem Genotypisierungsausfall des Referenz-SNPs wurde davon ausgegangen, dass die fehlenden Daten möglicherweise durch nicht-zufällige Ursachen begründet waren. SNPs mit einem p-Wert kleiner 1×10^{-6} in diesem Test wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Um unbekannte Verwandtschaftsverhältnisse zu detektieren, wurde die Proportion gleicher Allele an allen Markern gemessen. Liegt diese bei verschiedenen Proband*innen über dem durch Zufall zu erwartenden Durchschnitt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um ein Verwandtschaftsverhältnis oder Duplikate handelt. Diese können in einer Fall-Kontroll-Studie falsche Ergebnisse verursachen, da die in der Familie vorliegenden Genotypen übermäßig repräsentiert wären. Proband*innen mit einer Metrik $\hat{\pi} > 0,2$ wurden ausgeschlossen, da dies für ein Verwandtschaftsverhältnis mindestens zweiten Grades sprach.

Eine erhöhte Heterozygotenfrequenz kann durch verunreinigte Proben entstehen (Rujescu et al., 2018). Deshalb wurden Proband*innen mit einer Abweichung von der zu erwartenden Heterozygotenfrequenz ($|F_{het}| \geq 0.2$) von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

3.5 Selektion der SNPs

Aus den erfolgreich genotypisierten SNPs des Illumina Bead Chips wurden die SNPs extrahiert, die in den Genen *PTPN22* und *CTLA4* lagen. Dazu wurden die Gengrenzen aus dem chromosomalen Build GRCh37 übernommen und alle in dem genotypisierten Datensatz vorhandenen SNPs innerhalb dieser Grenzen ausgewählt und um jeweils drei vor und hinter der Grenze liegende SNPs erweitert. Für *PTPN22* standen so insgesamt 15 und für *CTLA4* 6 SNPs für die Analysen zur Verfügung.

3.6 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung wurde die Software PLINK v1.07 (Purcell, 2009; Purcell et al., 2007) und R v2.13.0 (R Development Core Team, 2011) verwendet. Die Abweichung der beobachteten Genotypfrequenzen bei Patient*innen und Kontrollen von den zu erwartenden Frequenzen nach dem HWE wurde mittels des exakten Tests nach Fisher berechnet. Als Grenzwert wurde ein p-Wert $< 0,01$ festgelegt. Die Assoziationsanalyse zwischen Patient*innen und Kontrollen, mit Alter und Geschlecht als Kovariablen, wurde mittels einer logistischen Regression durchgeführt. Dabei wurden zum einen alle Menièrepatient*innen (MMgesamt) und zum anderen alle Menièrepatient*innen ohne komorbide weitere Schwindeldiagnosen (MMmono) gegen die gesunden Kontrollen getestet.

Die Haplotypanalyse wurde mit der Software Haploview 4.2 durchgeführt (Barrett et al., 2005; Gabriel et al., 2002). Die Haplotypfrequenzen wurden mittels logistischer Regression unter Einbezug von Alter und Geschlecht als Kovariablen zum Erkrankungsstatus in Beziehung gesetzt. Der p-Wert wurde nach 50.000 Permutationen bestimmt. Haplotypen mit einer Frequenz von weniger als 1% wurden nicht berücksichtigt.

Als Signifikanzniveau wurde für alle Assoziationsrechnungen ein p-Wert von unter 0,05 festgelegt. Aufgrund der Abhängigkeit der vier Rechenmodelle, der Stichprobenstruktur (eine Subpopulation aus der Gesamtstichprobe) und der LD (*Linkage disequilibrium*)-Struktur der untersuchten SNPs wurde auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet.

4. Ergebnisse

4.1 Fall/Kontroll-Stichprobe

Um eine Assoziation von Polymorphismen im *CTLA4*- und *PTPN22*-Gen mit Morbus Menière zu überprüfen, wurde bei 314 Patient*innen mit Morbus Menière und bei 494 gesunden Kontrollen eine Genotypisierung dieser Varianten durchgeführt und die Verteilung von Genotypen und Allelen verglichen.

Das Patient*innenkollektiv wurde in zwei Gruppen unterteilt, um einen Bias durch zusätzliche Schwindeldiagnosen aufzudecken. Die Gruppe MMgesamt umfasste alle Menièrepatient*innen. Es handelte sich in der Gruppe der Erkrankten um 165 (52,5%) männliche und 149 (47,5%) weibliche Proband*innen, das Alter betrug im Mittel 60,15 Jahre.

Es wurde eine zusätzliche Gruppe gebildet, welche Patient*innen einschloss, bei denen komorbide Schwindelerkrankungen ausgeschlossen wurden und lediglich die Diagnose eines Morbus Menière gestellt wurde (MMmono). Diese Gruppe bestand aus 269 Proband*innen. Es handelte sich dabei um 145 Männer (53,9 %) und 124 Frauen (46,1%) mit einem durchschnittlichen Alter von 59,30 Jahren.

Die beiden Patient*innengruppen wurden jeweils mit der Kontrollgruppe verglichen. In dieser Gruppe waren 194 Personen (39,3%) männlichen, 300 (60,7%) weiblichen Geschlechts. Der Altersdurchschnitt betrug 30,58 Jahre. Tabelle 3 stellt die Alters- und Geschlechtsverteilung aller Gruppen dar.

Tabelle 3: Alters- und Geschlechtsverteilung der untersuchten Fall/Kontroll-Stichprobe, Gruppe MMgesamt und MMmono

Gruppe	Alter (Jahre) Mittelwert (SD)	Geschlecht n (%)		Gesamt n
		männlich	weiblich	
Kontrollen	30,58 (6,51)	194 (39,3)	300 (60,7)	494
Patient*innen MMgesamt	60,15 (13,39)	165 (52,5)	149 (47,5)	314
Patient*innen MMmono	59,30 (13,68)	145 (53,9)	124 (46,1)	269

4.2 CTLA4-Gen

4.2.1 Beschreibung der Polymorphismen

Im *CTLA4*-Gen (6173 Basenpaare lang), das auf dem langen Arm von Chromosom 2 liegt, und seiner näheren Umgebung wurden 6 SNPs untersucht. Abbildung 4 zeigt die Lage der untersuchten Polymorphismen im *CTLA4*-Gen.

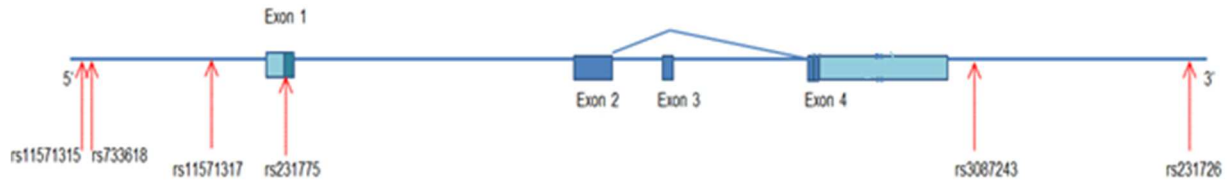


Abbildung 4 (nach National Center for Biotechnology Information, 2004a): Struktur des *CTLA4*-Gens (ca. 6200 Basenpaare) und seiner unmittelbaren Umgebung auf Chromosom 2q33; Dunkelblaue Rechtecke stellen Exons, die verbindenden Linien die Introns dar; hellblaue Rechtecke stehen für untranslatierte Bereiche. Pfeile zeigen die Position der untersuchten Polymorphismen an. Die Linien oberhalb des Gens zeigen die unterschiedlichen Isoformen an.

Die SNPs rs11571315, rs733618 und rs11571317 befinden sich 5'-*upstream* des *CTLA4*-Gens. Ein SNP (rs231775) liegt in Exon 1 des Gens. Diese Variante führt zu einem Basenaustausch von Adenin zu Guanin. Dabei handelt es sich um eine sinnverändernde Mutation, die in der Aminosäuresequenz einen Austausch von Alanin zu Threonin bewirkt. Die SNPs rs3087243 und rs231726 liegen *downstream* des Gens.

Die Genotypverteilung lag für alle untersuchten SNPs für die Kontrollgruppe wie auch für die beiden Patient*innengruppen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Tabelle 4).

Tabelle 4: HWE der *CTLA4*-SNPs in den verschiedenen Gruppen

SNP	Position	Allele	Kontrollen				MMgesamt				MMmono			
			A1A1	A1A2	A2A2	HWE	A1A1	A1A2	A2A2	HWE	A1A1	A1A2	A2A2	HWE
rs11571315	204730901	A/G	73	243	176	0,51	48	145	121	0,72	39	128	102	1,00
rs733618	204730944	G/A	3	76	413	1,00	1	36	277	1,00	1	30	238	1,00
rs11571317	204732008	A/G	1	76	412	0,35	4	50	260	0,32	4	45	220	0,30
rs231775	204732714	G/A	59	239	194	0,28	41	141	132	0,71	34	124	111	1,00
rs3087243	204738919	A/G	93	257	142	0,24	85	132	97	0,01	69	117	83	0,04
rs231726	204740866	A/G	42	213	234	0,59	28	141	145	0,51	25	121	123	0,58

Position nach GRCh37, A1=selteneres Allel, A2=häufigeres Allel, HWE=p-Wert des HWE

4.2.2 Fall/Kontroll-Assoziationen

Im Folgenden werden die Genotypfrequenzen unter Verwendung verschiedener Modelle miteinander verglichen. Es wurden das genotypische, das dominante, das rezessive und das additive Modell angewandt. Bei A1 handelt es sich jeweils um das seltenere Allel (*minor allele*), bei A2 um das häufiger vorkommende Allel (*major allele*). Alter und Geschlecht wurden jeweils als Kovariable in die Rechnung miteinbezogen.

Genotypisches Modell

Im genotypischen Modell wird die Assoziation der drei verschiedenen Genotypen mit einem Morbus Menière unabhängig voneinander betrachtet. So kann der Fall eintreten, dass die heterozygote Gruppe ein höheres oder geringeres Risiko für die Erkrankung besitzt als die homozygoten Allelträger. Die Verteilung und Frequenz der Genotypen in den beiden Patient*innenkollektiven im Vergleich zur Kontrollgruppe werden in Tabelle 5 und 6 aufgeführt. Es zeigten sich in beiden Stichproben signifikante Zusammenhänge zwischen den beiden SNPs rs11571317 (MMgesamt $p=0,029$, MMmono $p=0,033$) und rs3087243 (MMgesamt $p=0,024$, MMmono $p=0,019$) bezüglich ihrer Genotypfrequenzen und dem Auftreten von Morbus Menière.

Tabelle 5: Genotypfrequenz der untersuchten SNPs im *CTLA4*-Gen für die Stichprobe MMgesamt

SNP	A1	A2	Genotypfrequenz A1A1/A1A2/A2A2 (%)			
			Pat	Kon	Odds Ratio (95%-KI)	p-Wert
rs11571315	A	G	48 (15,29%)	73 (14,84%)	0,77 (0,41-1,46)	0,423
			145 (46,18%)	243 (49,39%)		
			121 (38,54%)	176 (35,77%)		
rs733618	G	A	1 (0,32%)	3 (0,61%)	3,91 (0,01-1193,90)	0,640
			36 (11,46%)	76 (15,45%)		
			277 (88,22%)	413 (83,94%)		
rs11571317	A	G	4 (1,27%)	1 (0,20%)	0,18 (0,04-0,84)	0,029
			50 (15,92%)	76 (15,54%)		
			260 (82,80%)	412 (84,25%)		
rs231775	G	A	41 (13,06%)	59 (11,99%)	0,75 (0,39-1,47)	0,407
			141 (44,90%)	239 (48,58%)		
			132 (42,04%)	194 (39,43%)		
rs3087243	A	G	85 (27,07%)	93 (18,90%)	0,50 (0,28-0,91)	0,024
			132 (42,04%)	257 (52,24%)		
			97 (30,89%)	142 (28,86%)		

Ergebnisse

SNP	A1	A2	Genotypfrequenz A1A1/A1A2/A2A2 (%)			
			Pat	Kon	Odds Ratio (95%-KI)	p-Wert
rs231726	A	G	28 (8,92%)	42 (8,59%)	0,69 (0,34-1,43)	0,324
			141 (44,90%)	213 (43,56%)		
			145 (46,18%)	234 (47,85%)		

SNP=Single Nucleotide Polymorphism, Pat=Patient*innen, Kon=Kontrollen, A1=Allel 1, A2=Allel 2, KI=Konfidenzintervall

Tabelle 6: Genotypfrequenz der untersuchten SNPs im *CTLA4*-Gen für die Stichprobe MMmono

SNP	A1	A2	Genotypfrequenz A1A1/A1A2/A2A2 (%)			
			Pat	Kon	Odds Ratio (95%-KI)	p-Wert
rs11571315	A	G	39 (14,50%)	73 (14,84%)	0,76 (0,40-1,44)	0,393
			128 (47,58%)	243 (49,39%)		
			102 (37,92%)	176 (35,77%)		
rs733618	G	A	1 (0,37%)	3 (0,61%)	3,47 (0,01-809,19)	0,655
			30 (11,15%)	76 (15,45%)		
			238 (88,48%)	413 (83,94%)		
rs11571317	A	G	4 (1,49%)	1 (0,20%)	0,19 (0,04-0,87)	0,033
			45 (16,73%)	76 (15,54%)		
			220 (81,78%)	412 (84,25%)		
rs231775	G	A	34 (12,64%)	59 (11,99%)	0,77 (0,39-1,51)	0,448
			124 (46,10%)	239 (48,58%)		
			111 (41,26%)	194 (39,43%)		
rs3087243	A	G	69 (25,65%)	93 (18,90%)	0,49 (0,27-0,89)	0,019
			117 (43,49%)	257 (52,24%)		
			83 (30,86%)	142 (28,86%)		
rs231726	A	G	25 (9,29%)	42 (8,59%)	0,69 (0,33-1,42)	0,313
			121 (44,98%)	213 (43,56%)		
			123 (45,72%)	234 (47,85%)		

SNP=Single Nucleotide Polymorphism, Pat=Patient*innen, Kon=Kontrollen, A1=Allel 1, A2=Allel 2, KI=Konfidenzintervall

Die Frequenz des selteneren Genotypen war bei rs11571317 (AA) und rs3087243 (AA) jeweils in der Patient*innengruppe höher (Abbildung 5 und 6).

Ergebnisse

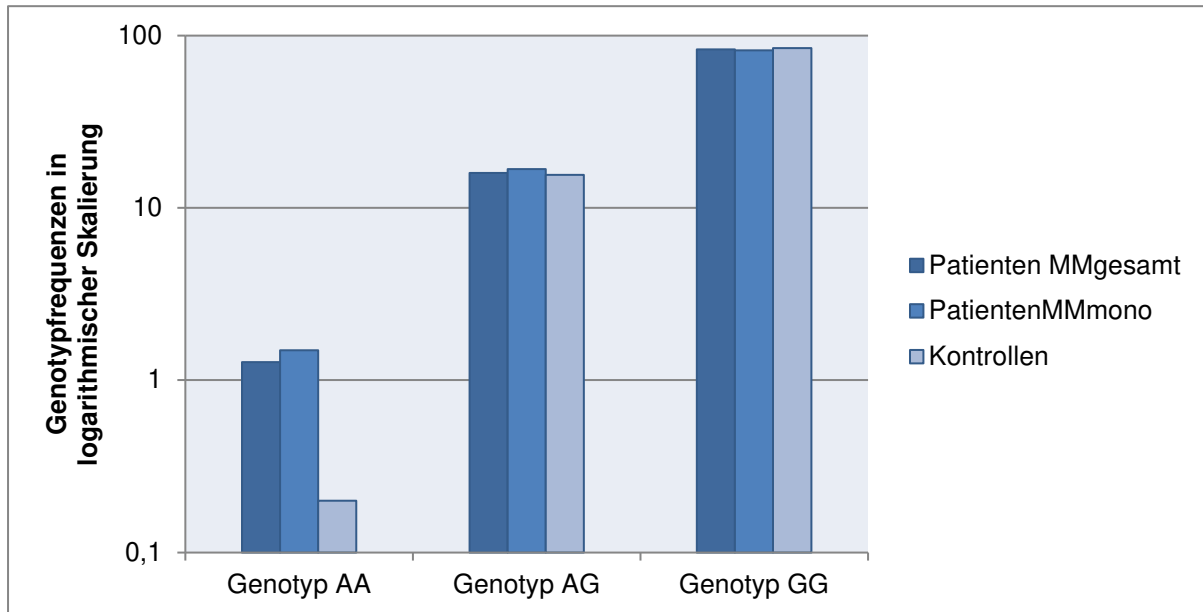


Abbildung 5: Graphische Darstellung der Genotypfrequenzen von Patient*innen versus Kontrollen für SNP rs11571317. Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit.

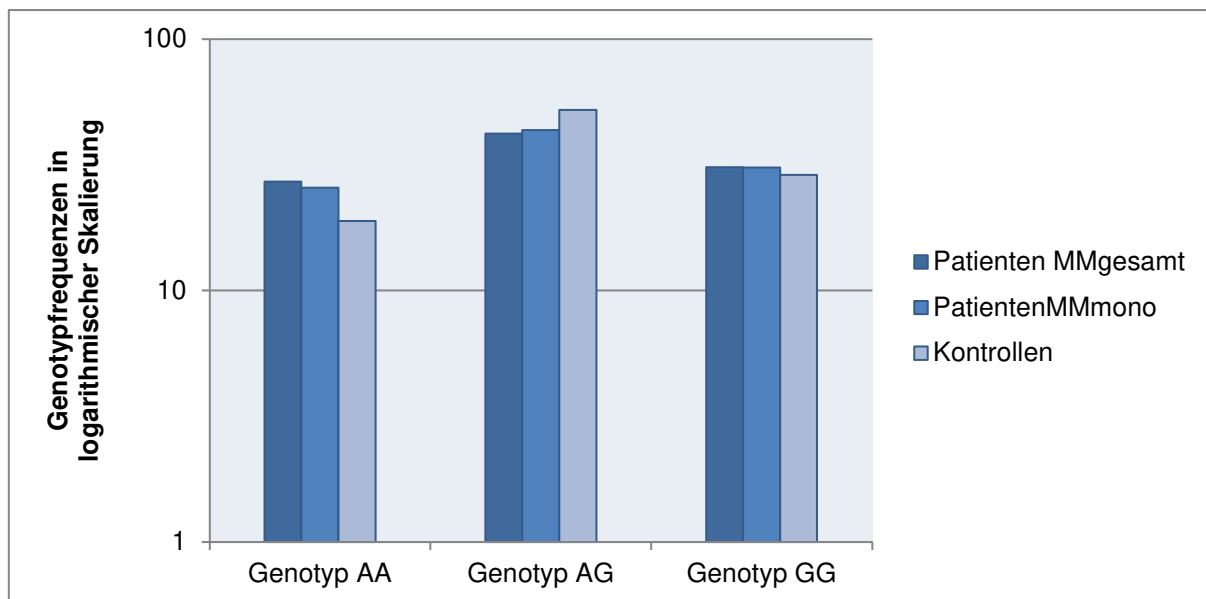


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Genotypfrequenzen von Patient*innen versus Kontrollen für SNP rs3087243. Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit.

Dominantes Modell

Im dominanten Modell wurden die Genotypfrequenzen aller Träger*innen des selteneren Allels mit den homozygoten Träger*innen des häufigeren Allels verglichen. Dabei zeigten sich für keinen der SNPs signifikante Unterschiede zwischen der Patient*innen- und der Kontrollgruppe, weder im Gesamtkollektiv noch in der Stichprobe ohne weitere Schwindeldiagnosen.

Ergebnisse

Rezessives Modell

Im rezessiven Modell wurden die homozygoten Träger*innen des selteneren Allels mit den Träger*innen des häufigeren Allels verglichen. In diesem Modell zeigten sich ebenfalls in beiden Stichproben nominal signifikante Zusammenhänge zwischen den beiden SNPs rs11571317 (MMgesamt und MMmono $p=0,007$) und rs3087243 (MMgesamt $p=0,044$, MMmono $p=0,035$) bezüglich ihrer Genotypverteilung und dem Auftreten von Morbus Menière. Tabelle 7 und 8 zeigen die erhobenen Ergebnisse auf.

Tabelle 7: Genotypverteilung der untersuchten SNPs im *CTLA4*-Gen für die Stichprobe MMgesamt im rezessiven Modell

SNP	A1	A2	Genotypverteilung (A1A1 vs (A1A2+A2A2))			
			Pat	Kon	Odds Ratio (95%-KI)	p-Wert
rs11571315	A	G	48 (15,29%) 266 (84,71%)	73 (14,84%) 419 (85,16%)	0,97 (0,40-2,36)	0,951
rs733618	G	A	1 (0,32%) 313 (99,68%)	3 (0,61%) 489 (99,39%)	0,02 (2,81E-07- 2174,21)	0,524
rs11571317	A	G	4 (1,27%) 310 (98,73%)	1 (0,20%) 488 (99,80%)	46,12 (2,89-735,20)	0,007
rs231775	G	A	41 (13,06%) 273 (86,94%)	59 (11,99%) 433 (88,01%)	1,14 (0,44-2,97)	0,792
rs3087243	A	G	85 (27,07%) 229 (72,93%)	93 (18,90%) 399 (81,10%)	1,92 (1,02-3,63)	0,044
rs231726	A	G	28 (8,92%) 286 (91,08%)	42 (8,59%) 447 (91,41%)	1,70 (0,56-5,22)	0,350

SNP=Single Nucleotide Polymorphism, Pat=Patient*innen, Kon=Kontrollen, A1=Allel 1, A2=Allel 2, KI=Konfidenzintervall

Ergebnisse

Tabelle 8: Genotypverteilung der untersuchten SNPs im *CTLA4*-Gen für die Stichprobe MMmono im rezessiven Modell

SNP	A1	A2	Genotypverteilung (A1A1 vs (A1A2+A2A2))			
			Pat	Kon	Odds Ratio (95%-KI)	p-Wert
rs11571315	A	G	39 (14,50%) 230 (85,50%)	73 (14,84%) 419 (85,16%)	0,95 (0,39-2,34)	0,919
rs733618	G	A	1 (0,37%) 268 (99,63%)	3 (0,61%) 489 (99,39%)	0,03 (5,68E-07- 1454,51)	0,521
rs11571317	A	G	4 (1,49%) 265 (98,51%)	1 (0,20%) 488 (99,80%)	44,95 (2,88-700,37)	0,007
rs231775	G	A	34 (12,64%) 235 (87,36%)	59 (11,99%) 433 (88,01%)	1,11 (0,42-2,94)	0,832
rs3087243	A	G	69 (25,65%) 200 (74,35%)	93 (18,90%) 399 (81,10%)	1,99 (1,05-3,76)	0,035
rs231726	A	G	25 (9,29%) 244 (90,71%)	42 (8,59%) 447 (91,41%)	1,73 (0,57-5,24)	0,332

SNP=Single Nucleotide Polymorphism, Pat=Patient*innen, Kon=Kontrollen, A1=Allel 1, A2=Allel 2, KI=Konfidenzintervall

Dabei zeigten sich homozygote Träger*innen des jeweils selteneren Allels (sowohl für rs11571317 als auch für rs3087243 ist dies ein A-Allel) im Vergleich zu den Träger*innen des häufigeren Allels (für beide SNPs AG+GG) öfter in der Patient*innengruppe.

Die Ergebnisse für SNP rs11571317 sind im Säulendiagramm in Abbildung 7 dargestellt, Abbildung 8 verdeutlicht die Genotypfrequenzen für SNP rs3087243.

Ergebnisse

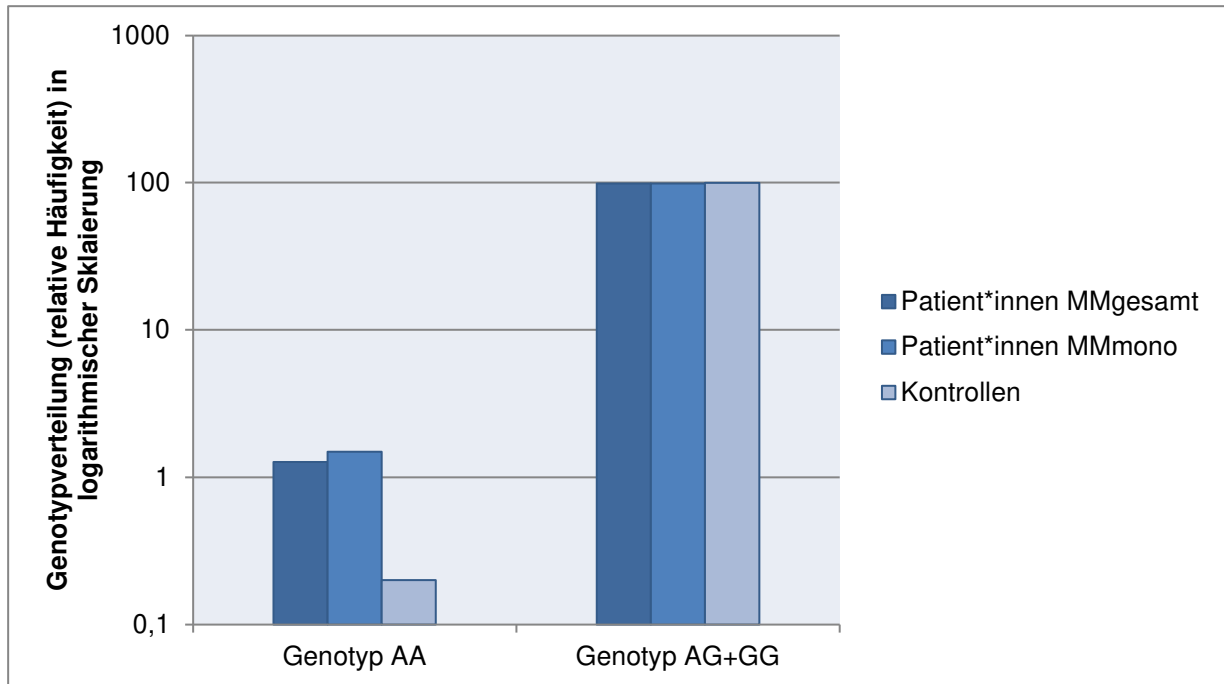


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Genotypverteilung von Patient*innen versus Kontrollen für SNP rs11571317 im rezessiven Modell. Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit.

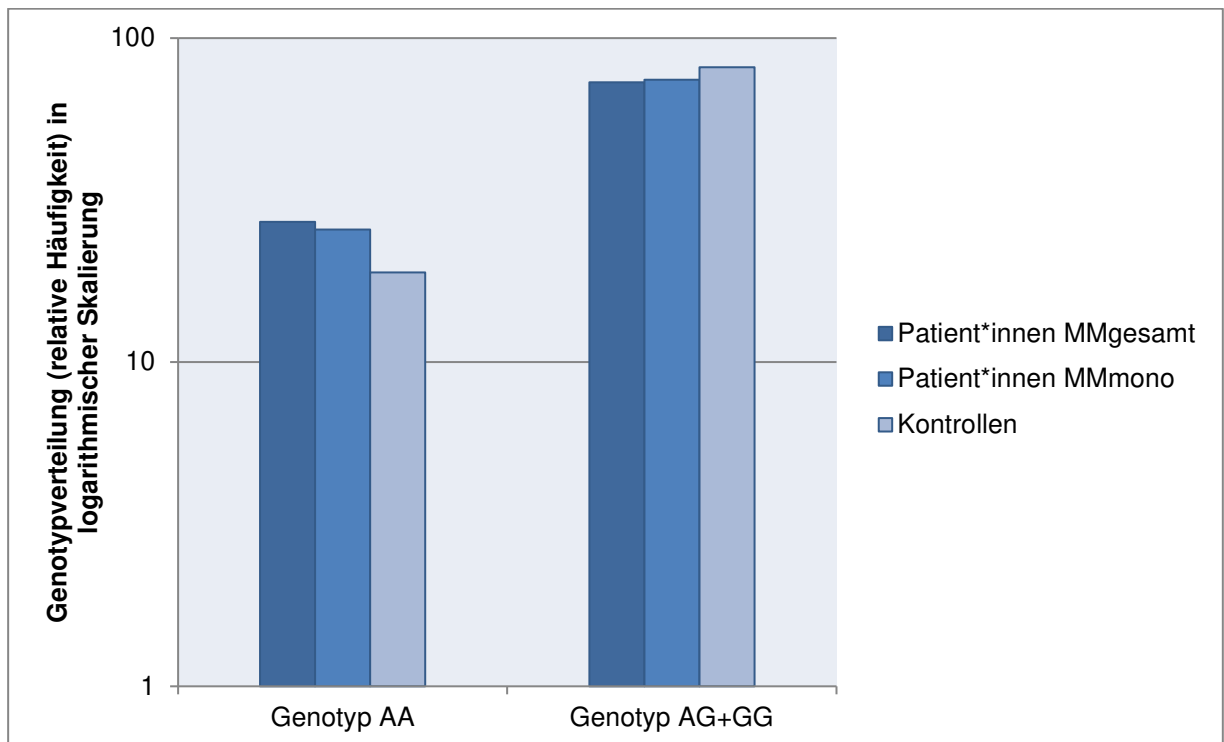


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Genotypverteilung von Patient*innen versus Kontrollen für SNP rs3087243 im rezessiven Modell. Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit.

Additives Modell

Für das additive Modell wird ein Gen-Dosis-Effekt angenommen, wobei davon ausgegangen wird, dass jede Kopie des selteneren Allels additiv zur Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Phänotyp auszubilden, beiträgt. Um diesen Effekt darzustellen, werden die Genotypen nach ihrem Einfluss kodiert: 0 für die homozygoten Träger*innen des häufigeren Allels, 1 für die Heterozygoten und 2 für die homozygoten Träger*innen des selteneren Allels.

Es zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Genotypfrequenzen und dem Vorliegen von Morbus Menière. Für die beiden SNPs mit signifikanten Ergebnissen im genotypischen und rezessiven Modell lagen die Ergebnisse für rs11571317 bei $p=0,073$ (MMgesamt) und $p=0,058$ (MMmono) und für rs3087243 bei $p=0,372$ (MMgesamt) und $p=0,347$ (MMmono).

4.2.3 Haplotypanalyse

In der Haplotypanalyse wurden miteinander gekoppelte Genabschnitte anhand der LD-Struktur bestimmt. Dabei konnten 2 Blöcke identifiziert werden (Abbildung 9).

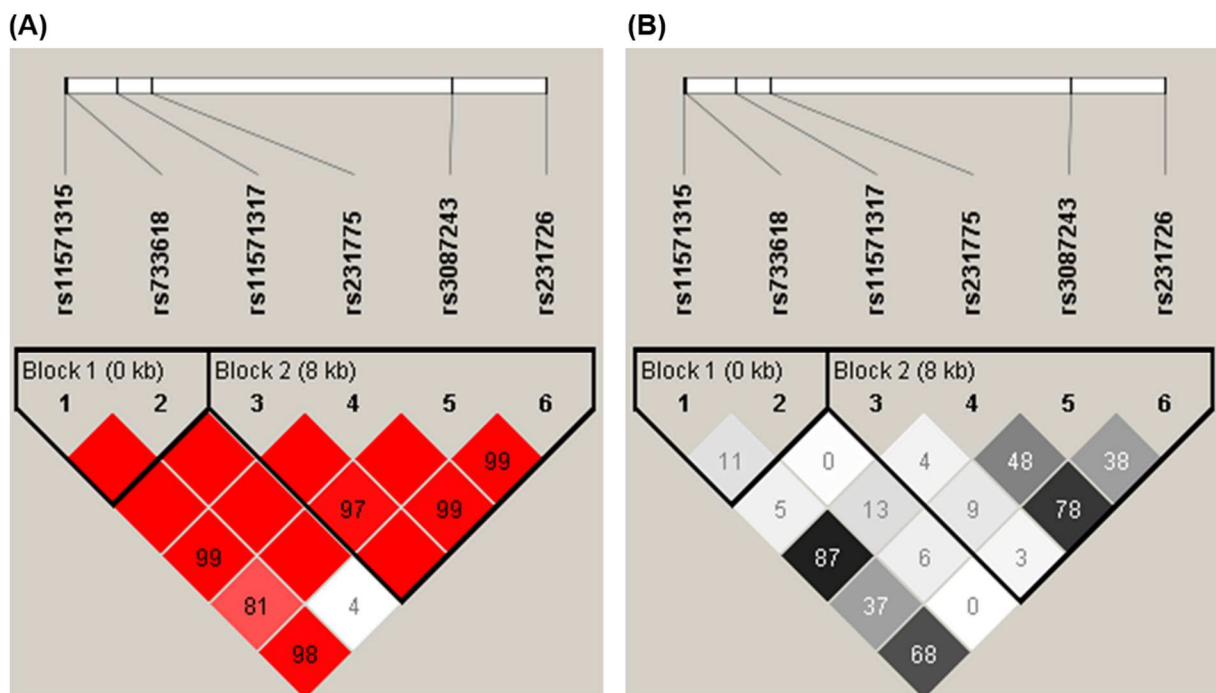


Abbildung 9: LD-Blockstruktur der CTLA4-SNPs.

Die fetten Umrahmungen stellen die LD-Blöcke dar. Die Zahlen in den Rauten bezeichnen die prozentuale Vererbungshäufigkeit, wobei tiefrot oder schwarz ohne Ziffer ein LD von 100% bedeutet. (A) D prime. (B) r²-Werte innerhalb der auf Basis von D prime zugewiesenen LD-Blöcke

Ergebnisse

Die Assoziationsanalyse ergab zwei nominal signifikant mit Morbus Menière assoziierte Haplotypen (Tabelle 9). Dabei war der auf Block 1 gelegene Haplotyp AG in Patient*innen seltener zu finden (MMgesamt: $p_{sim}=0,042$, Score -2,028), der auf Block 2 gelegene Haplotyp AAAG dagegen häufiger (MMgesamt: $p_{sim}=0,019$, Score 2,275). Beide Haplotypen zeigen eine geringe Frequenz (<10% der Stichprobe).

Tabelle 9: Assoziation der *CTLA4*-Haplotypen mit Morbus Menière

Phänotyp	Block	Haplotyp	Freq	Score	Psim
MMgesamt	1: rs11571315, rs733618	AG	0,0727	-2,028	0,042
MMmono			0,0734	-1,877	0,061
MMgesamt	2: rs11571317, rs231775, rs3087243, rs231726	AAAG	0,0840	2,275	0,019
MMmono			0,0861	2,369	0,015

Freq=Frequenz des Haplotyps, Psim=simulierter p-Wert

4.3 PTPN22-Gen

4.3.1 Beschreibung der Polymorphismen

Das Gen *PTPN22* ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 lokalisiert und umfasst 57943 Basenpaare. Im Rahmen dieser Dissertation wurden 15 Einzelnukleotidpolymorphismen in der *PTPN22*-Genregion analysiert. Drei der SNPs, die aufgrund ihrer räumlichen Nähe zu und damit potentiellen Relevanz für das *PTPN22*-Gen ausgewählt wurden, liegen im benachbarten Gen *RSBN1* (*Round spermatid basic protein 1*). Die SNPs rs998315 und rs6537798 befinden sich im Intron dieses Gens, der SNP rs3195954 liegt in einem Exon des *RSBN1*-Gens und führt zu einem Basenaustausch von Adenin zu Guanin an Position 381. Dies hat keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge. Die Variante rs3811021 liegt im 3'-untranslatierten Bereich des *PTPN22*-Gens. Die SNPs rs2476599, rs1217388, rs1217389, rs3789607, rs2797416, rs2476600 (Chromosom 1: 113827112, GRCh38), rs1217395 und rs3765598 befinden sich in Introns des *PTPN22*-Gens. Die SNPs rs6665194, rs1217385 und rs12566340 liegen 5'-*upstream* des Gens, wobei sich rs12566340 im 3'-untranslatierten Bereich des Gens *BCL2L15* befindet. Abbildung 10 zeigt die Lokalisation der SNPs im Bezug zum *PTPN22*-Gen.

Ergebnisse

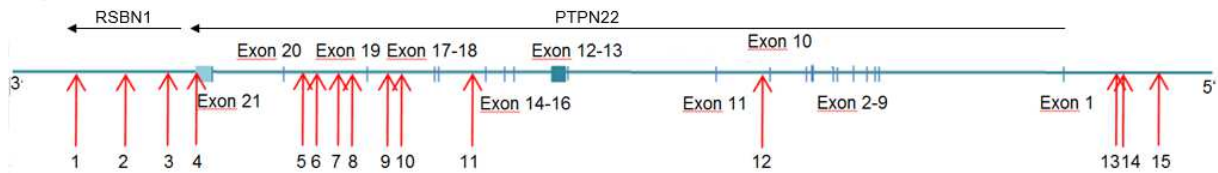


Abbildung 10 (nach National Center for Biotechnology Information, 2004c):

SNPs 1-3 im RSBN1-Gen: 1: rs998315; 2: rs6537798; 3: rs3195954; SNPs 4-15 im PTPN22-Gen: 4: rs3811021; 5: rs2476599; 6: rs1217388; 7: rs1217389; 8: rs3789607; 9: rs2797416; 10: rs2476600; 11: rs1217395; 12: rs3765598; 13: rs6665194; 14: rs1217385; 15: rs12566340

Struktur des *PTPN22*-Gens (57943 bp) und seiner unmittelbaren Umgebung auf Chromosom 1p13.2 Dunkelblaue Rechtecke stellen Exons, die verbindenden Linien die Introns dar; hellblaue Rechtecke stehen für untranslatierte Bereiche. Pfeile zeigen die Position der untersuchten Polymorphismen an.

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bezüglich der Genotypverteilung wurde für alle SNPs in beiden Stichproben erfüllt (s. Tabelle 10). Geringe Unterschiede in der Gesamtzahl der in die Analyse einbezogenen Proband*innen resultieren durch den Ausfall der Genotypisierung einzelner SNPs.

Tabelle 10: HWE der *PTPN22*-SNPs in den verschiedenen Gruppen

SNP	Position	Allele	Kontrollen				MMgesamt				MMmono			
			A1A1	A1A2	A2A2	HWE	A1A1	A1A2	A2A2	HWE	A1A1	A1A2	A2A2	HWE
rs998315	114348156	G/A	0	11	481	1,00	0	13	300	1,00	0	12	256	1,00
rs6537798	114351706	C/A	109	218	165	0,02	59	152	103	0,82	50	128	91	0,71
rs3195954	114354654	G/A	25	137	330	0,04	10	102	201	0,59	7	87	174	0,42
rs3811021	114356663	G/A	25	137	328	0,04	10	103	200	0,59	7	87	174	0,42
rs2476599	114363459	A/G	39	175	276	0,16	24	115	173	0,46	23	101	143	0,44
rs1217388	114364476	G/A	33	183	275	0,72	20	108	186	0,43	18	91	160	0,31
rs1217389	114365752	G/A	33	183	272	0,81	20	108	186	0,43	18	91	160	0,31
rs3789607	114366434	G/A	42	211	238	0,67	36	121	157	0,11	30	102	137	0,11
rs2797416	114369259	A/G	108	218	164	0,03	60	151	103	0,73	50	128	91	0,71
rs2476600	114369734	A/G	109	218	165	0,02	60	151	103	0,73	50	128	91	0,71
rs1217395	114374435	G/A	35	181	276	0,48	20	108	185	0,43	18	91	159	0,31
rs3765598	114394463	A/G	25	135	332	0,03	10	103	201	0,59	7	87	175	0,42
rs6665194	114417843	A/G	106	216	170	0,02	58	144	112	0,35	48	121	100	0,31
rs1217385	114418205	A/C	106	215	170	0,02	58	144	112	0,35	48	121	100	0,31
rs12566340	114420328	A/G	33	176	283	0,47	19	101	194	0,25	17	85	167	0,21

Position nach GRCh37, A1=selteneres Allel, A2=häufigeres Allel, HWE=p-Wert des HWE

4.3.2 Fall/Kontroll-Assoziationen

Für die 15 Polymorphismen der *PTPN22*-Genregion wurden ebenfalls die verschiedenen Rechenmodelle (genotypisch, dominant, rezessiv und additiv) unter Einbezug der Kovariablen Alter und Geschlecht zur Überprüfung der Assoziation mit Morbus Menière in der Gesamtgruppe und der mit Morbus Menière ohne weitere Schwindelbegleiterkrankungen fokussierten Substichprobe verwendet.

Ergebnisse

Es konnte für keinen der untersuchten SNPs ein signifikanter Zusammenhang mit der Erkrankungswahrscheinlichkeit identifiziert werden (Tabellen 11 und 12). Bestes Ergebnis zeigte im Vergleich der Gruppe aller Menièrepatient*innen mit den Kontrollen der SNP rs3789607 im dominanten Modell ($p=0,11$, OR = 0,62 (KI 0,35 - 1,11)).

Tabelle 11: Assoziation der SNPs in der *PTPN22*-Genregion in der Gesamtstichprobe (MMgesamt vs. Kontrollen)

SNP	A1	P_add	OR (KI)	P_dom	OR (KI)	P_gen	OR (KI)	P_rez	OR (KI)
rs998315	G	0,51	1,81 (0,31 - 10,45)	0,51	1,81 (0,31 - 10,45)	NA	NA	NA	NA
rs6537798	C	0,31	1,23 (0,82 - 1,85)	0,21	1,50 (0,80 - 2,83)	0,42	1,27 (0,71 - 2,28)	0,76	1,12 (0,54 - 2,31)
rs3195954	G	0,85	0,95 (0,55 - 1,64)	0,90	1,04 (0,56 - 1,92)	0,28	1,97 (0,57 - 6,82)	0,31	0,31 (0,03 - 2,97)
rs3811021	G	0,85	0,95 (0,55 - 1,64)	0,90	1,04 (0,56 - 1,91)	0,28	1,97 (0,57 - 6,79)	0,31	0,31 (0,03 - 2,96)
rs2476599	A	0,93	1,02 (0,66 - 1,58)	0,88	0,96 (0,53 - 1,72)	0,58	0,82 (0,41 - 1,65)	0,65	1,25 (0,48 - 3,25)
rs1217388	G	0,20	1,35 (0,85 - 2,13)	0,40	1,28 (0,72 - 2,30)	0,42	0,75 (0,37 - 1,52)	0,13	2,19 (0,78 - 6,09)
rs1217389	G	0,20	1,35 (0,85 - 2,13)	0,40	1,29 (0,72 - 2,31)	0,43	0,75 (0,37 - 1,53)	0,13	2,19 (0,78 - 6,09)
rs3789607	G	0,22	0,75 (0,48 - 1,19)	0,11	0,62 (0,35 - 1,11)	0,24	0,65 (0,32 - 1,32)	0,97	1,02 (0,37 - 2,81)
rs2797416	A	0,31	1,24 (0,82 - 1,86)	0,21	1,50 (0,80 - 2,82)	0,45	1,25 (0,70 - 2,25)	0,74	1,13 (0,55 - 2,35)
rs2476600	A	0,31	1,23 (0,82 - 1,85)	0,21	1,50 (0,80 - 2,83)	0,42	1,27 (0,71 - 2,28)	0,76	1,12 (0,54 - 2,31)
rs1217395	G	0,20	1,34 (0,85 - 2,12)	0,38	1,30 (0,72 - 2,33)	0,48	0,78 (0,38 - 1,57)	0,15	2,10 (0,76 - 5,75)
rs3765598	A	1,00	0,56 (0,56 - 1,67)	0,84	1,06 (0,58 - 2,00)	0,27	2,02 (0,58 - 6,97)	0,31	0,31 (0,03 - 2,97)
rs6665194	A	0,73	1,07 (0,71 - 1,62)	0,60	1,18 (0,64 - 2,18)	0,66	1,14 (0,63 - 2,06)	0,99	0,99 (0,47 - 2,10)
rs1217385	A	0,73	1,07 (0,71 - 1,61)	0,60	1,18 (0,64 - 2,17)	0,66	1,14 (0,63 - 2,06)	0,99	0,99 (0,47 - 2,10)
rs12566340	A	0,45	1,20 (0,75 - 1,90)	0,66	1,14 (0,64 - 2,05)	0,52	0,78 (0,38 - 1,64)	0,31	1,74 (0,59 - 5,10)

A1=(minores) Referenzallel, P=p-Wert, add=additive, dom=dominant, geno=genotypisch, rez=rezessives Modell, OR=Odds Ratio, KI= 95%-Konfidenzintervall

Ergebnisse

Tabelle 12: Assoziation der SNPs in der *PTPN22*-Genregion in der Substichprobe (MMmono vs. Kontrollen)

SNP	A1	P_add	OR (KI)	P_dom	OR (KI)	P_gen	OR (KI)	P_rez	OR (KI)
rs998315	G	0,49	1,85 (0,33 - 10,51)	0,49	1,85 (0,33 - 10,51)	NA	NA	NA	NA
rs6537798	C	0,29	1,25 (0,83 - 1,88)	0,18	1,54 (0,82 - 2,92)	0,40	1,29 (0,72 - 2,33)	0,75	1,12 (0,54 - 2,33)
rs3195954	G	0,87	0,96 (0,55 - 1,66)	0,88	1,05 (0,57 - 1,94)	0,30	1,91 (0,57 - 6,44)	0,33	0,34 (0,04 - 3,02)
rs3811021	G	0,87	0,95 (0,55 - 1,65)	0,89	1,04 (0,56 - 1,93)	0,30	1,91 (0,57 - 6,42)	0,33	0,34 (0,04 - 3,01)
rs2476599	A	0,87	1,04 (0,67 - 1,61)	0,93	0,97 (0,54 - 1,75)	0,56	0,81 (0,40 - 1,63)	0,60	1,29 (0,50 - 3,33)
rs1217388	G	0,19	1,36 (0,86 - 2,15)	0,39	1,30 (0,72 - 2,34)	0,42	0,74 (0,37 - 1,52)	0,12	2,22 (0,80 - 6,17)
rs1217389	G	0,19	1,36 (0,86 - 2,16)	0,39	1,30 (0,72 - 2,34)	0,42	0,75 (0,37 - 1,52)	0,12	2,22 (0,80 - 6,17)
rs3789607	G	0,17	0,72 (0,45 - 1,15)	0,11	0,61 (0,34 - 1,11)	0,37	0,72 (0,35 - 1,48)	0,81	0,88 (0,30 - 2,54)
rs2797416	A	0,28	1,25 (0,83 - 1,89)	0,19	1,54 (0,81 - 2,92)	0,42	1,28 (0,71 - 2,30)	0,73	1,14 (0,55 - 2,37)
rs2476600	A	0,29	1,25 (0,83 - 1,88)	0,18	1,54 (0,82 - 2,92)	0,40	1,29 (0,72 - 2,33)	0,75	1,12 (0,54 - 2,33)
rs1217395	G	0,19	1,36 (0,86 - 2,14)	0,37	1,31 (0,73 - 2,36)	0,48	0,77 (0,38 - 1,57)	0,14	2,12 (0,77 - 5,82)
rs3765598	A	0,92	0,97 (0,56 - 1,68)	0,83	1,07 (0,58 - 1,99)	0,28	1,95 (0,58 - 6,58)	0,33	0,34 (0,04 - 3,02)
rs6665194	A	0,71	1,08 (0,72 - 1,63)	0,56	1,20 (0,65 - 2,23)	0,62	1,16 (0,64 - 2,11)	0,98	0,99 (0,47 - 2,11)
rs1217385	A	0,71	1,08 (0,72 - 1,63)	0,56	1,20 (0,65 - 2,23)	0,62	1,16 (0,64 - 2,11)	0,98	0,99 (0,47 - 2,11)
rs12566340	A	0,43	1,20 (0,76 - 1,92)	0,65	1,15 (0,63 - 2,07)	0,50	0,78 (0,37 - 1,62)	0,29	1,77 (0,61 - 5,17)

A1=(minores) Referenzallel, P=p-Wert, add=additive, dom=dominant, geno=genotypisch, rez=rezessives Modell, OR=Odds Ratio, KI= 95%-Konfidenzintervall

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse

5.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das *CTLA4*- und *PTPN22*-Gen waren schon in einer vorherigen Studie als Kandidatengene für Morbus Menière in Betracht gezogen worden, es zeigte sich dort eine signifikante Assoziation des SNP rs2476601 im *PTPN22*-Gen mit Morbus Menière. (Lopez-Escamez et al., 2010). Auch in einer Studie von Oh et al. (2019) bestand eine signifikante Assoziation von drei Varianten im *PTPN22*-Gen mit Morbus Menière. Die beiden Gene waren aufgrund ihrer wichtigen Rolle im Immunsystem von Interesse in Bezug auf den Morbus Menière.

In der hier durchgeführten Fall-Kontroll-Assoziationsstudie konnten nominal signifikante Assoziationen der Polymorphismen rs11571317 und rs3087243, sowie der Haplotypen AG (Block 1: rs11571315, rs733618) und AAAG (Block 2: rs11571317, rs231775, rs3087243, rs231726) im Gen *CTLA4* mit Morbus Menière gezeigt werden.

Bezüglich der SNPs rs11571317 und rs3087243 traten die homozygoten Genotypen der selteneren A-Allele im Patient*innenkollektiv signifikant häufiger auf als bei den gesunden Kontrollen, sowohl in der Gesamtgruppe als auch nach Ausschluss von Patient*innen mit weiteren Schwindeldiagnosen. Noch deutlicher zeigte sich die Signifikanz bei beiden SNPs im rezessiven Modell, sowohl für die Gesamtgruppe als auch für die Patient*innengruppe ohne weitere Schwindeldiagnosen. Diese Allele waren auch in dem signifikant mit Menière assoziierten Haplotypen AAAG (LD-Block 2) enthalten.

Für das Gen *PTPN22* ergaben sich keine signifikanten Assoziationen bezüglich der untersuchten Polymorphismen.

5.1.2 Interpretation der Ergebnisse bezüglich CTLA4

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs SNPs im *CTLA4*-Gen auf ihre Assoziation mit Morbus Menière hin untersucht. Das *CTLA4*-Gen ist aufgrund seiner wichtigen regulativen Funktion im Immunsystem ein Kandidatengen für die Erkrankung. Autoimmune Vorgänge gelten u.a. aufgrund des gehäufteten Auftretens von Autoantikörpern gegen Proteine des Innenohrs bei Patient*innen und aufgrund klinischer Charakteristika der Erkrankung als mögliche Einflussgröße bei der Pathogenese von Morbus Menière (Suchan et al., 2016; Syed et al., 2015; Kim et al., 2014; Gazquez et al., 2011).

Das *CTLA4*-Gen kodiert für das *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, welches eine wichtige Rolle bei der Hemmung der T-Zell-vermittelten Immunantwort spielt (Webb et al., 2018). Ein Mangel an CTLA4 kann zu schweren Autoimmunreaktionen führen. Es wird

angenommen, dass es ohne die regulatorische Wirkung von CTLA4 auf die T-Zellaktivierung zu einer überschießenden Lymphozytenproliferation kommt, die zu einem schweren Organbefall führt (Klocke et al., 2016; Horvat et al., 2015; Webb et al., 2018).

Bis 2021 wurde nur eine Kandidatengenstudie veröffentlicht, welche die Assoziation des *CTLA4*-Gens mit Morbus Menière untersucht hat. Hier konnten keine signifikanten Ergebnisse erhoben werden (Lopez-Escamez et al., 2010). Skuladottir et al. (2021) führten eine Metaanalyse genomweiter Assoziationsstudien mit 48072 Proband*innen europäischer Abstammung mit dem Leitsymptom Schwindel durch, von denen etwa 7% an einem diagnostizierten Morbus Menière litten. Es bestand keine signifikante Assoziation mit dem *CTLA4*-Gen. Auch in der Subpopulation der 3516 Menièrepatient*innen gab es keine Hinweise auf eine Beteiligung des *CTLA4*-Gens. Nachdem in GWAS (genomweite Assoziationsstudien) in der Regel nur die genomweit signifikanten Ergebnisse dargestellt werden, ist es jedoch durchaus möglich, dass Varianten des *CTLA4*-Gens unterschwellige Assoziationen zeigen, die bei weiterer Erhöhung der Stichprobe signifikant werden, oder aber durch eine Häufung innerhalb des Gens auf dessen Beteiligung hinweisen.

Lopez-Escamez et al. (2010) untersuchten den SNP rs231775, welcher in einem Exon des *CTLA4*-Gens liegt und deshalb von besonderem Interesse ist, an Kaukasier*innen (vgl. Abbildung 4, Seite 37). Dieser SNP besteht aus einem Basenaustausch von Adenin zu Guanin. Dabei handelt es sich um eine kodierende Mutation, die einen Aminosäurenwechsel von Threonin zu Alanin bewirkt. Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Assoziation dieses SNPs mit der Erkrankung festgestellt werden. Allerdings sind viele Assoziationen dieses SNPs mit verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, Diabetes mellitus Typ 1 oder SLE bei Proband*innen kaukasischer Abstammung bekannt (Wang et al., 2017; Eskandari-Nasab et al., 2015; Dong et al., 2014).

In der hier vorliegenden Studie zeigte jedoch der SNP rs11571317 eine signifikante Assoziation mit Morbus Menière. Zu diesem SNP gibt es in der bis 2021 vorliegenden Literatur keine weiteren Kandidatengenstudien, in denen signifikante Ergebnisse bezüglich Morbus Menière oder Autoimmunerkrankungen erhoben werden konnten. Der SNP liegt zwar in einem hohen Kopplungsungleichgewicht zum SNP rs231775 ($D'=1,0$), allerdings zeigt er nur einen r^2 -Wert von 0,04. Interessanterweise liegt rs11571317 in einer potenziellen Promoterregion und könnte in die Regulation der Genexpression von *CTLA4* involviert sein.

Auch der SNP rs3087243 war in der hier durchgeführten Studie signifikant mit Morbus Menière assoziiert, mit einer Häufung des selteneren Genotyps AA in Patient*innen. Laut einer Untersuchung von Houcken et al. (2018) kam der komplementäre Genotyp GG am SNP rs3087243 signifikant häufiger bei Patient*innen mit einem polyglandulären Autoimmunsyndrom im Vergleich zu Kontrollproband*innen vor. Bei dieser Erkrankung sind

mehrere Organsysteme betroffen. Für die Studie wurden 543 kaukasische Proband*innen eingeschlossen (Houcken et al., 2018). Beide Varianten rs11571317 und rs3087243 liegen auf einem LD-Block, der mit einem Haplotyp (AAAG) ebenfalls mit Morbus Menière assoziiert war.

In der bereits erwähnten genomweiten Assoziationsstudie von Skuladottir et al. (2021) konnte für keinen der SNPs, die in der hier vorliegenden Studie signifikante Assoziationen mit Morbus Menière zeigten, eine genomweit signifikante Assoziation mit Schwindel nachgewiesen werden, auch nicht in der Subgruppe der Menièrepatient*innen. Eine unterschwellige Assoziation kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Auch für weitere Polymorphismen im *CTLA4*-Gen, welche in dieser Arbeit keine signifikante Assoziation mit Morbus Menière zeigten, sind aus anderen Studien Assoziationen mit diversen Autoimmunerkrankungen bekannt. Der Polymorphismus rs733618, welcher sich in der Promotorregion des Gens befindet, schien in einer Studie von Wang et al. (2008) die Bindungsaktivität des nuklearen Transkriptionsfaktors NF-1 (*Nuclear factor 1*) zu erhöhen. Es wurde vermutet, dass dies zu einem alternativen Spleißvorgang führen könnte. Darauf deutete eine vermehrte Expression der membranständigen Isoform von CTLA4 hin. Der untersuchte SNP war assoziiert mit Myasthenia gravis bei kaukasischen Patient*innen (Wang et al., 2008). Außerdem zeigte der SNP in einer Metaanalyse bei Asiat*innen signifikante Assoziationen mit dem systemischen Lupus erythematodes (Liu & Zhang, 2013). Der SNP rs733618 liegt auf einem LD-Block mit dem ebenfalls in der hier vorliegenden Studie untersuchten SNP rs11571315. Der Haplotyp AG war bei Menièrepatient*innen seltener zu finden als bei der Kontrollgruppe. Für die Variante rs231726 sind Assoziationen mit systemischem Lupus erythematodes aus einer genomweiten Kopplungsstudie in englischen Familien und mit Morbus Addison in einer norwegischen Proband*innengruppe bekannt (Cunningham Graham et al., 2006; Wolff et al., 2015). Dieser SNP liegt im LD-Block 2, welcher in der hier vorliegenden Studie identifiziert wurde (SNPs rs11571317, rs231775, rs3087243 und rs231726) und dessen Haplotyp AAAG signifikant mit Morbus Menière assoziiert war.

Die hier vorliegende Untersuchung ist die erste Studie, die eine signifikante Assoziation der Haplotypen AG im LD-Block 1 (rs11571315, rs733618) und AAAG im LD-Block 2 (rs11571317, rs231775, rs3087243, rs231726) sowie der darin enthaltenen SNPs rs11571317 und rs3087243 in der Einzelanalyse mit Morbus Menière zeigen konnte.

Bezüglich der hier vorliegenden signifikanten Assoziation des Haplotyps AG im LD-Block 1 mit Morbus Menière ist es denkbar, dass die SNPs rs11571315 und rs733618 einzeln betrachtet nur geringe Effektgrößen besitzen und erst durch die gemeinsame Betrachtung bei überzufällig häufiger gemeinsamer Vererbung als Haplotyp eine Assoziation zeigten.

Diese Ergebnisse unterstützen unter der Annahme, dass ein Morbus Menière durch autoimmunreaktive Vorgänge ausgelöst werden kann, die wichtige Rolle des *CTLA4*-Gens als

mögliches Kandidatengen für Autoimmunerkrankungen. Allerdings muss aufgrund der vermuteten genetischen Heterogenität von Morbus Menière (Chiarella et al., 2015) davon ausgegangen werden, dass auch bei wiederholt bestätigten signifikanten Assoziationen die betroffenen SNPs nicht für alle Patient*innen eine Rolle spielen.

Eine andere Erklärung für die in dieser Studie nominal signifikant mit Morbus Menière assoziierten SNPs oder Haplotypen wäre, dass sie selbst keinen Einfluss auf die Krankheitsentstehung haben, sondern nur in einem hohen Kopplungsungleichgewicht mit anderen, tatsächlich funktionell wichtigen Varianten stehen.

Rs11571317 liegt in einem hohen Kopplungsungleichgewicht ($D'=1,0$) mit den SNPs rs13001790, rs34435794, rs11571300 und rs10932029, wird also überzufällig häufig gemeinsam mit diesen vererbt (Johnson et al., 2008). Rs13001790, rs34435794 und rs11571300 liegen im nichtkodierenden 3'-Ende des *CTLA4*-Gens, befinden sich allerdings teilweise näher am 5'-Ende des *ICOS* (*Inducible T-cell costimulator*)-Gens, auf welches ein regulatorischer Einfluss ausgeübt werden könnte. Rs10932029 befindet sich in einem Intron des *ICOS*-Gens. Introns werden normalerweise beim Spleißvorgang der RNA herausgeschnitten, welcher wiederum durch SNPs beeinflusst werden kann. Unter Umständen können durch SNPs die Exon-Introngrenzen so verändert werden, dass der Spleißapparat z.B. statt eines Introns ein neues Exon erkennt und so dazu führt, dass dieses doch abgelesen wird und als alternatives Exon fungiert (Kelemen et al., 2013).

Das *ICOS*-Gen kodiert für den *inducible T cell costimulator*, ein Protein, das zur CTLA4-Rezeptorfamilie gehört. Es spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung zwischen Zellen sowie im Immunsystem und wird, wie auch *CTLA4*, hauptsächlich im Lymphgewebe exprimiert (National Center for Biotechnology Information, 2004b). Um den Einfluss des *ICOS*-Gens auf die Entstehung von Morbus Menière weiter zu untersuchen, könnten weitere Assoziationsstudien mit dem *ICOS*-Gen als Kandidatengen für die Erkrankung durchgeführt werden.

Bei der Interpretation der hier erhobenen signifikanten Ergebnisse ist auch zu bedenken, dass eine mögliche Assoziation der SNPs mit gleichzeitig vorliegenden Autoimmunerkrankungen neben Morbus Menière die Ergebnisse verfälschen könnte. Weitere Autoimmunerkrankungen galten nicht als explizite Ausschlusskriterien für die Studie.

5.1.3 Interpretation der Ergebnisse bezüglich PTPN22

Im *PTPN22*-Gen wurden fünfzehn SNPs bezüglich ihrer Assoziation mit Morbus Menière untersucht. Das Kandidatengen ist unter der Annahme, dass die Erkrankung durch autoimmune Vorgänge ausgelöst werden könnte, interessant für die Forschung zu Morbus

Menière, da es für die *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22* kodiert, eine Proteintyrosinphosphatase, die eine wichtige Funktion bei der T-Zell-vermittelten T-Zellaktivierung hat.

In der hier vorliegenden Studie ergaben sich für keinen SNP in einem der angewandten statistischen Modelle signifikante Ergebnisse oder Trends zur Signifikanz.

Im Gegensatz dazu fanden Oh et al. (2019) drei seltene Varianten im *PTPN22*-Gen, welche signifikant mit Morbus Menière assoziiert waren. Lopez-Escamez et al. (2010) untersuchten einen SNP (rs2476601) im *PTPN22*-Gen in Bezug auf Morbus Menière und konnten eine signifikante Assoziation des Genotyps CT mit Morbus Menière feststellen, während die Patient*innen signifikant seltener den Genotyp CC trugen. SNPs, wie in diesem Fall rs2476601, die signifikant mit einer Erkrankung assoziiert sind, spielen häufig keine funktionelle Rolle bei der Pathogenese, sondern stehen in einem hohen Kopplungsungleichgewicht mit anderen, tatsächlich funktionellen SNPs, werden also überzufällig häufig gemeinsam mit diesen vererbt (Clarke et al., 2011).

Rs2476601 liegt in einem relativ hohen Kopplungsungleichgewicht ($D'=0,90-1,0$; $r^2=0,43-0,50$) mit den in der vorliegenden Studie untersuchten SNPs rs1217388, rs1217389, rs1217395, rs12566340 (Johnson et al., 2008). Im Gegensatz zur Studie von Lopez-Escamez et al. (2010) konnten für diese SNPs in der vorliegenden Studie keine signifikanten Assoziationen repliziert werden. Die unterschiedlichen Rahmenbedingungen der Studien können dabei eine Rolle spielen. Im Vergleich zur Stichprobengröße von 52 Patient*innen und 348 gesunden Kontrollproband*innen war die Stichprobe vor allem der Patient*innengruppe in der vorliegenden Studie deutlich größer (314 Patient*innen und 494 Kontrollproband*innen).

Ein weiterer Unterschied ist, dass in der Studie von Lopez-Escamez et al. (2010) spanische Patient*innen untersucht wurden, während es sich in der hier durchgeführten Studie vorwiegend um deutsche Personen handelte. Obwohl beide Populationsgruppen aus Kaukasier*innen bestehen, kann es bei unterschiedlichen Populationsgruppen abweichende Allelfrequenzen bezüglich der untersuchten SNPs geben (Anderson et al., 2010).

Allerdings sollte das vorliegende Kopplungsungleichgewicht der SNPs nicht überbewertet werden, da bei den vorliegenden Werten von r^2 die jeweiligen Allele eine sehr unterschiedliche Frequenz besitzen und deshalb trotz der hohen Werte von D' nicht zusammen vorliegen müssen. Hinzu kommt noch, dass in der Vergleichsstudie nur Patient*innen mit bilateralem Morbus Menière eingeschlossen wurden (Lopez-Escamez et al., 2010), während in der vorliegenden Untersuchung Patient*innen mit uni- und bilateraler Erkrankung als Patient*innengruppe zusammengefasst wurden. Für zukünftige Vergleichsstudien wäre es sinnvoll, möglichst gleiche Voraussetzungen für Patient*innen- und Kontrollgruppen zu schaffen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Weitere Studien zum *PTPN22*-Gen und Morbus Menière liegen nicht vor. In der Literatur lassen sich jedoch für einige der in der vorliegenden Studie betrachteten Polymorphismen Assoziationen mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen finden. Es wird vermutet, dass Autoantikörper eine Rolle bei der Entstehung von Morbus Menière spielen könnten, da diese in mehreren Studien bei Patient*innen gehäuft nachgewiesen wurden und da die Erkrankung typische Zeichen einer Autoimmunerkrankung aufweist (Suchan et al., 2016; Syed et al., 2015; Kim et al., 2014; Gazquez et al., 2011).

So war der SNP rs3811021 in zwei Studien in einer Han-chinesischen bzw. kaukasischen Population assoziiert mit rheumatoider Arthritis (Carlton et al., 2005; Tang et al., 2016), während der Genotyp GG am SNP rs6665194 bei Chinesen laut einer Studie von Goh et al. (2017) einen protektiven Effekt bezüglich der Erkrankung zeigte. Beim Polymorphismus rs1217388 wirkte das seltenere Allel krankheitsprotektiv gegen Autoimmunhepatitiden bei japanischen Proband*innen (Umemura et al., 2016). Der SNP rs3765598 wirkte bei Han-chinesischen und hispanischen Patient*innen als Risikofaktor für systemischen Lupus erythematodes (Tang et al., 2016; Namjou et al., 2013). In einer chinesischen Populationsgruppe war der Genotyp GG bezüglich der Variante rs1217385 mit einem häufigeren Auftreten von Diabetes Typ 1 assoziiert (Pei et al., 2014).

Alle genannten SNPs wurden in der hier vorliegenden Studie untersucht, zeigten allerdings keine Assoziation mit Morbus Menière.

5.2 Diskussion der Methoden

5.2.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie zu zwei Kandidatengenen. Bei solchen Studien werden Genotypfrequenzen von genetischen Markern, in diesem Fall SNPs, von erkrankten und nicht erkrankten Personen miteinander verglichen. Im Vergleich zu genomweiten Assoziationsstudien wird bei diesen Studien hypothesengeleitet vorgegangen und nicht das gesamte Genom untersucht, somit ist die Anzahl an untersuchten SNPs geringer.

Geeignete Kandidatengene für Studien zum Morbus Menière auszuwählen, ist dadurch erschwert, dass die Pathogenese der Erkrankung noch unklar ist und bis jetzt für keinen Kandidatenlocus signifikante Ergebnisse verlässlich in mehreren Studien repliziert werden konnten. Im vorliegenden Fall wurden aufgrund ihrer Rolle im Immunsystem und einer vorhergehenden Assoziationsstudie von Lopez-Escamez et al. (2010) die Gene *CTLA4* und *PTPN22* für die Untersuchung gewählt.

Während hier nur die Assoziation von ausgewählten SNPs in den Kandidatengenomen mit dem Bestehen eines Morbus Menière untersucht wurde, dokumentierten Lopez-Escamez et al. (2010) in der Vergleichsstudie zusätzlich verschiedene klinische Parameter wie das Ausmaß des Hörverlusts, kardiovaskuläre, psychiatrische und osteoartikuläre Begleiterkrankungen, das Auftreten von Kopfschmerzen und funktionelle Einschränkungen durch die Erkrankung. Hierzu konnten keine signifikanten Ergebnisse erhoben werden. Dennoch könnten durch Einbeziehung klinischer Parameter in zukünftigen Replikationsstudien eventuell zusätzliche Erkenntnisse gewonnen werden. So könnten möglicherweise bestehende Zusammenhänge zwischen genetischen Gesichtspunkten und etwa dem Ausmaß des Hörverlusts, der Häufigkeit von Schwindelepisoden oder der Geschwindigkeit des Krankheitsfortschritts entdeckt werden. Hierfür wäre es sinnvoll, bezüglich verschiedener klinischer Parameter möglichst homogene Subgruppen in der Patient*innenpopulation zu bilden und diese getrennt voneinander zu untersuchen.

5.2.2 Studienpopulation

In der hier durchgeführten Studie wurden nur Proband*innen kaukasischer Abstammung für die Teilnahme sowohl in der Kontroll- als auch in der Patient*innengruppe ausgewählt. Diese waren meist Deutsche, allerdings waren andere Nationalitäten kein Ausschlusskriterium.

Eine möglichst einheitliche genetische Herkunft der Proband*innen bei Fall-Kontroll-Assoziationsstudien ist wichtig, da es sonst aufgrund von Populationsstratifikationen zu falschen Ergebnissen kommen kann. Von Populationsstratifikation spricht man, wenn Kontrollproband*innen und Patient*innen vermehrt unterschiedlicher ethnischer Herkunft sind (Clarke et al., 2011). Wenn ein SNP bei einer ethnischen Gruppe häufiger vorkommt, kann dies als Störfaktor wirken und eine falsch positive Assoziation mit der untersuchten Erkrankung entstehen. Vergleicht man die in der vorliegenden Studie erhobenen Genotypfrequenzen der untersuchten SNPs mit den entsprechenden Genotypfrequenzen anderer kaukasischer Populationen, lassen sich keine starken Abweichungen feststellen. Man kann also davon ausgehen, dass es sich nicht um falsch positive Ergebnisse durch Populationsstratifikationen handelt.

In Bezug auf die SNPs, welche in der hier vorliegenden Studie signifikante Assoziationen zeigten, ähneln die erhobenen Genotypfrequenzen für rs3087243 den Daten von kaukasischen Bewohnern. Für rs11571317 zeigen die vorliegenden Genotypfrequenzen ebenfalls die größte Ähnlichkeit zu kaukasischen Stichproben. Im Vergleich fällt jedoch auf, dass der Anteil der homozygoten A-Allelträger*innen im Vergleich zur europäischen Populationsgruppe geringer ist (0,2 vs. 1,2%). Die Vergleichswerte stammen aus den Daten des 1000 Genomes Project, dessen Ziel es war, das vollständige Genom von etwa 2500

Diskussion

Individuen verschiedener Populationen zu sequenzieren und genetische Varianten zu erfassen (Auton et al., 2015). Tabelle 13 veranschaulicht die Genotypfrequenzen verschiedener Populationsgruppen des 1000 Genomes Project im Vergleich zu den gesunden Kontrollproband*innen der hier durchgeführten Studie für die SNPs rs11571317 und rs3087243.

Tabelle 13: Vergleich der Genotypfrequenzen für rs11571317 und rs3087243 der Kontrollgruppe und verschiedener Populationsgruppen

SNP	A1	A2	Genotypfrequenz A1A1/A1A2/A2A2 (%)					
			Kon	Eur	Amr	Eas	Afr	Sas
rs11571317	A	G	1 (0,20%)	6 (1,2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
			76 (15,54%)	71 (14,1%)	28 (8,1%)	0 (0%)	3 (0,5%)	7 (1,4%)
			412 (84,25%)	426 (84,7%)	319 (91,9%)	504 (100%)	658 (99,5%)	482 (98,6%)
rs3087243	A	G	93 (18,90%)	108 (21,5%)	46 (13,3%)	37 (7,3%)	15 (2,3%)	192 (39,3%)
			257 (52,24%)	257 (51,1%)	172 (49,6%)	191 (37,9%)	203 (30,7%)	229 (46,8%)
			142 (28,86%)	138 (27,4%)	129 (37,2%)	276 (54,8%)	443 (67,0%)	68 (13,9%)

SNP=Single Nucleotide Polymorphism, A1=Allel 1, A2=Allel 2, Kon= Kontrollen, Eur=European, Amr=American, Eas=East Asian, Afr=African, Sas=South Asian

Laut Ziegler et al. (2008) ist bei einer ausschließlichen Datenerhebung im Raum Bayern generell nur mit einer sehr geringen Heterogenität der Stichprobenpopulation zu rechnen. Da es bei unterschiedlicher ethnischer Herkunft teils sehr abweichende Allelfrequenzen bei SNPs gibt, ist es wichtig, auch beim Vergleich von Studien auf die Herkunft der Proband*innen zu achten. Die Studienpopulation bei der Vergleichsstudie von Lopez-Escamez et al. (2010) war ebenfalls kaukasischer Herkunft, jedoch handelte es sich um spanische Proband*innen, sodass leichte Abweichungen der Allelfrequenzen im Vergleich zur hier durchgeführten Studie denkbar sind.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Verteilung von männlichen und weiblichen Studienteilnehmer*innen in der Patient*innen- und Kontrollgruppe. Dies ist insbesondere wichtig, da Frauen ein etwas erhöhtes Erkrankungsrisiko im Vergleich zu Männern besitzen (Tyrrell et al., 2014). Während in der Patient*innengruppe 52,5% (in der Gruppe MMgesamt) bzw. 53,9% (in der Gruppe MMmono) männlich waren, war das Geschlechterverhältnis in der Kontrollgruppe nicht in dem Maße ausgewogen. Hier waren 39,3% Männer und 60,7% Frauen vertreten. Da das Erkrankungsrisiko bei Frauen erhöht ist (Tyrrell et al., 2014) und ein Morbus Menière theoretisch bei den gesunden Kontrollproband*innen noch nach dem

Untersuchungszeitraum ausbrechen könnte, kann das Überwiegen weiblicher Proband*innen in der Kontrollgruppe die Ergebnisse verfälschen.

Auch das durchschnittliche Alter der Proband*innen kann als Störfaktor wirken, da der Morbus Menière eine Erkrankung des mittleren Alters ist (Harcourt et al., 2014) und bei zu jungen Proband*innen die Gefahr besteht, dass ein eventuell noch nicht ausgebrochener Morbus Menière bei erhöhter genetischer Suszeptibilität die Ergebnisse verfälscht oder eine Erkrankung im Frühstadium aufgrund einer fehlenden Erfüllung der Diagnosekriterien noch nicht festgestellt wurde. Hier muss kritisch betrachtet werden, dass das durchschnittliche Alter der Patient*innengruppe mit 60,15 bzw. 59,30 Jahren deutlich über dem Durchschnittsalter der Kontrollgruppe von 30,58 Jahren liegt. Für zukünftige Studien wäre es beispielsweise sinnvoll, die Proband*innengruppen besser zu matchen oder Verlaufsuntersuchungen durchzuführen und später an Morbus Menière erkrankte Personen nachträglich aus der Kontrollgruppe auszuschließen.

Es wurde jedoch in den genutzten statistischen Modellen für Alter und Geschlecht korrigiert, indem diese als Kovariablen definiert wurden.

5.2.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Eine klar festgelegte Diagnosestellung ist wichtig, um die Patient*innengruppe zu definieren und eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu ermöglichen. In dieser Studie wurden nur Patient*innen eingeschlossen, die die Diagnosekriterien nach der AAO-HNS von 1995 (Committee on Hearing and Equilibrium, 1995) für einen „sicheren“, „eindeutigen“ oder „wahrscheinlichen“ Morbus Menière erfüllten. In der Vergleichsstudie von Lopez-Escamez et al. (2010) wurden dieselben Diagnosekriterien genutzt, wobei nicht genauer spezifiziert wurde, welche Untergruppen eingeschlossen wurden. Für zukünftige Studien wäre es wünschenswert, beispielsweise nur Patient*innen mit „sicherer“ und „eindeutiger“ Diagnose einzuschließen, um eine möglichst homogene Gruppe von Erkrankten mit möglichst sicherer Diagnose zu schaffen. Eine Beschränkung auf Patient*innen mit „sicherer“ Diagnose nach den Kriterien der AAO-HNS, also mit einem nachgewiesenem Endolymphhydrops im MRT, wäre zwar in der Praxis sehr aufwendig, allerdings auch besonders genau.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Ausschluss bestimmter Subgruppen der Erkrankung. In der hier durchgeführten Studie wurden keine Subgruppen berücksichtigt, sowohl Patient*innen mit uni- als auch mit bilateralem Morbus Menière wurden eingeschlossen. Außerdem wurde keine Unterscheidung zwischen familiären und sporadischen Fällen gemacht. Bei Lopez-Escamez et al. (2010) wurden hingegen nur Patient*innen, bei denen beide Ohren betroffen waren, eingeschlossen. Auch hier wurde nicht zwischen sporadischen und familiären Erkrankungsfällen unterschieden. Geht man davon aus, dass unilaterale

Formen im Laufe der Zeit meist in bilaterale Formen übergehen (Paparella, 1991) und dieselbe Ätiologie haben, spielen die unterschiedlichen Einschlusskriterien keine Rolle. Sollte es aber Unterschiede in der Entstehung von ein- und beidseitigem Morbus Menière bzw. zwischen einem sporadischen und familiären Auftreten geben, wäre es sinnvoller, diese Subgruppen getrennt voneinander zu betrachten, um genauer differenzieren zu können.

Um neurologische – insbesondere Schwindelerkrankungen – und psychiatrische Erkrankungen bei der Kontrollgruppe möglichst auszuschließen, wurden solche Erkrankungen sowohl direkt für den Probanden/die Probandin und seine/ihre Familienmitglieder abgefragt als auch standardisierte Interviews durchgeführt. Hierbei wurden eine ausführliche Anamnese, eine orientierende neurologische Untersuchung und das SKID-Interview (Wittchen et al., 1997) zum Ausschluss von Erkrankungen bei den Proband*innen selbst eingesetzt. Um psychische Erkrankungen in der Familie aufzudecken, wurde das FHAM-Modul verwendet (Rice et al., 1995). So konnte eine bezüglich neurologischer und psychischer Erkrankungen möglichst gesunde Kontrollgruppe etabliert werden. In der Studie von Lopez-Escamez et al. (2010) wurde die Kontrollgruppe nicht genauer beschrieben und ist somit nur eingeschränkt vergleichbar. Da die Kandidatengene in der vorliegenden Studie aufgrund ihrer Rolle im Immunsystem ausgewählt wurden, wäre ein zusätzlicher Ausschluss von Autoimmunerkrankungen in der Kontrollgruppe wünschenswert. Zudem wären Verlaufsuntersuchungen sinnvoll, um Personen in der Kontrollgruppe zu identifizieren, welche im Verlauf noch einen Morbus Menière entwickeln und so die Ergebnisse verfälschen können.

Um einen Einfluss von weiteren Erkrankungen mit dem Symptom Schwindel außer Morbus Menière auf die Ergebnisse auszuschließen, wurden in der vorliegenden Studie zwei Patient*innengruppen definiert. In der Gruppe MMgesamt waren alle Patient*innen mit Morbus Menière eingeschlossen, unabhängig von weiteren Schwindelerkrankungen. In der Gruppe MMmono wurden hingegen Patient*innen mit komorbiden Schwindelerkrankungen ausgeschlossen. Beim Vergleich der Genotypfrequenzen beider Gruppen mit der Kontrollgruppe zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede, die darauf hindeuten würden, dass gleichzeitig bestehende weitere Schwindelerkrankungen als Störfaktoren agieren. In der ausgewählten Vergleichsstudie wurde die Patient*innengruppe nicht weiter spezifiziert, hier waren solche Komorbiditäten möglicherweise kein Ausschlusskriterium (Lopez-Escamez et al., 2010).

5.2.4 Stichprobengröße

Eine ausreichend große Stichprobengröße ist wichtig, um kleine Effekte der Genvarianten feststellen zu können (Cornelis et al., 2010). Bei zu geringen Proband*innenzahlen gibt es häufiger Diskrepanzen bei den Ergebnissen von Vergleichs- und Replikationsstudien, vor

allem bei Assoziationsstudien mit einer Stichprobengröße von unter 150 Personen (Ioannidis et al., 2001). In der vorliegenden Studie wurden 314 Patient*innen und 494 Kontrollproband*innen untersucht. Im Vergleich zur Studie von Lopez-Escamez et al. (2010) mit 52 Patient*innen und 348 gesunden Kontrollen ist dies ein deutlich größerer Stichprobenumfang.

Vergleicht man die hier gewählte Stichprobengröße mit weiteren Fall-Kontroll-Assoziationsstudien zum *CTLA4*-Gen und Autoimmunerkrankungen in der Literatur, liegt diese im Vergleich meist etwas über den betrachteten Studien (Torres-Carrillo et al., 2013; Elshazli et al., 2015; Katkam et al., 2016).

Auch im Vergleich mit Assoziationsstudien zum *PTPN22*-Gen in Bezug auf autoimmunreaktive Krankheiten lässt sich feststellen, dass die Proband*innenanzahl der Vergleichsstudien meist unter der hier bestehenden Stichprobengröße liegt (Tavares et al., 2015; Remuzgo-Martinez et al., 2017; Lopez-Cano et al., 2017). Dennoch sind deutlich größere Proband*innenzahlen generell notwendig, um eine höhere statistische Power zu erreichen.

5.2.5 Qualitätskriterien

Um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse möglichst zu vermeiden, wurden ausführliche Qualitätskontrollen durchgeführt. Es erfolgte ein strukturiertes Vorgehen unter anderem mit der Überprüfung von Proband*innen-*callrates*, SNP-*callrates* und Abweichungen vom HWE.

Hierbei ist es wichtig, sinnvolle Grenzwerte anzuwenden, ab denen SNPs oder Proband*innen von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Bei zu niedrig angesetzten Grenzwerten besteht die Gefahr vermehrter Genotypisierungsfehler. Bei zu strengen Grenzwerten wird diese Gefahr verringert, jedoch kann die Power der Studie bei vermehrten Ausschlüssen von SNPs oder Proband*innen eingeschränkt werden. Besonders beim Ausschluss von SNPs können möglicherweise bestehende Assoziationen unentdeckt bleiben (Anderson et al., 2010). In der hier vorliegenden Studie wurden zunächst Proband*innen mit zu geringer *sample callrate* oder widersprüchlicher Geschlechtsbestimmung von der weiteren Analyse ausgeschlossen und erst im nächsten Schritt SNPs mit zu geringer *SNP callrate* bestimmt. Durch dieses standardisierte Vorgehen wird der fälschliche Ausschluss von SNPs aufgrund fehlerhafter Proband*innendaten verhindert. Eine Abweichung eines SNPs vom HWE kann auf eine Kontamination hindeuten, aber möglicherweise auch mit der untersuchten Erkrankung zusammenhängen. Um einen fälschlichen Ausschluss von SNPs zu verhindern, die aufgrund einer Assoziation mit Morbus Menière eine Abweichung vom HWE zeigten, wurden die

Grenzwerte in der Patient*innengruppe in der initialen Qualitätskontrolle weniger streng gesetzt als in der Kontrollgruppe.

Im Vergleich der erhobenen Genotypfrequenzen der signifikanten SNPs mit Referenzproben aus dem 1000 Genomes-Projekt von Auton et al. (2015) (vgl. Seite 56) zeigt sich eine große Ähnlichkeit mit der kaukasischen Referenzprobe. Dies spricht ebenfalls für eine hohe Qualität in der Selektion der Kontrollproband*innen.

Es ist zu bedenken, dass in der hier vorliegenden Studie keine Korrektur für multiples Testen durchgeführt wurde. Das Risiko einer Akkumulation des Alpha-Fehlers steigt mit zunehmender Anzahl an Tests, die durchgeführt werden. In der hier durchgeführten Studie wurden sechs SNPs im *CTLA4*-Gen bzw. fünfzehn SNPs im *PTPN22*-Gen getestet. Diese stehen teilweise in einem hohen Kopplungsungleichgewicht zueinander und sind somit nicht unabhängig voneinander. Zusätzlich waren auch die beiden untersuchten Stichproben klar voneinander abhängig, da es sich um eine Subpopulation handelte. Dennoch besteht das Risiko, die Nullhypothese aufgrund einer Alphafehlerakkumulation abzulehnen. Eine mögliche Methode, dieser entgegenzuwirken, wäre eine Bonferroni-Korrektur. Hierbei wird der p-Wert jedes Tests mit der Anzahl an Tests multipliziert, um das Signifikanzniveau zu korrigieren. Die Bonferroni-Korrektur gilt allerdings als sehr konservativ und kann mit zunehmender Anzahl an Tests zu falsch-negativen Ergebnissen führen (Curtin & Schulz, 1998). Da es sich hier um eine explorative Studie handelt, wurde auf die Korrektur für multiples Testen verzichtet, die Ergebnisse müssen entsprechend vorsichtig interpretiert werden.

5.3 Ausblick

Bislang konnte für den Morbus Menière kein eindeutiger Suszeptibilitätslocus nachgewiesen werden, auch wenn davon ausgegangen wird, dass genetische Einflüsse eine Rolle bei der multifaktoriellen Krankheitsentstehung spielen. In der vorliegenden Untersuchung konnten erstmals signifikante Assoziationen für die SNPs rs11571317 und rs3087243 sowie für zwei Haplotypen im *CTLA4*-Gen mit der Erkrankung gefunden werden. Aufgrund der dünnen Studienlage zum *CTLA4*- und *PTPN22*-Gen in Bezug auf Morbus Menière wären weitere Fall-Kontroll-Assoziationsstudien sehr wünschenswert, insbesondere um die hier erhobenen signifikanten Ergebnisse, wenn möglich, zu replizieren. Ein weiteres interessantes Kandidatengen wäre das *ICOS*-Gen. Die beiden SNPs im *CTLA4*-Gen, die in der vorliegenden Studie signifikant mit der Erkrankung assoziiert waren, stehen in einem hohen Kopplungsungleichgewicht mit SNPs, die in der Nähe des bzw. im *ICOS*-Gen liegen. Studien zu diesen Genvarianten könnten eventuell funktionelle SNPs aufdecken, die eine Rolle bei der Entstehung von Morbus Menière spielen.

Auch eine differenzierte Untersuchung von Patient*innensubgruppen wäre interessant, um eventuell abweichende Faktoren in der Pathogenese aufzudecken. Für zukünftige Studien wäre es beispielsweise sinnvoll, Patient*innen mit uni- und bilateralem Morbus Menière einzuschließen und diese getrennt auf Assoziationen mit Kandidatenloci zu untersuchen. Auch eine getrennte Betrachtung von familiären und sporadisch auftretenden Fällen könnte von Vorteil sein. Dasselbe gilt für Patient*innen mit und ohne begleitende Autoimmunerkrankungen.

In Zukunft könnten mithilfe von weiteren genomweiten Assoziationsstudien nicht nur Kandidatengene für Morbus Menière betrachtet werden, sondern man könnte hypothesenfrei sehr viele SNPs im gesamten Genom untersuchen. Auch eine Sequenzierung des gesamten Genoms wäre denkbar.

Trotz der unsicheren Datenlage könnten durch erweiterte Forschung in der Zukunft eventuell suszeptibilitätserhöhende oder krankheitsverursachende genetische Varianten für den Morbus Menière identifiziert werden und mit diesem Wissen die gezielte Diagnostik und Therapie der Erkrankung verbessert werden.

6. Literaturverzeichnis

Al Dulaijan, B., Mansouri, A., Karnyski, J., & Azzi, J. (2018). *Regulatory T cells: from the bench to the clinic and back*. *Curr Opin Organ Transplant*. 23, 1-7

Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., & Mustelin, T. (2004). *Protein tyrosine phosphatases in the human genome*. *Cell*. 117, 699-711

Anderson, C., Pettersson, F., Clarke, G., Cardon, L., Morris, A., & Zondervan, K. (2010). *Data quality control in genetic case-control association studies*. *Nat Protoc*. 5, 1564-1573

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

Asmar, M., Gaboury, L., & Saliba, I. (2018). *Meniere's Disease Pathophysiology: Endolymphatic Sac Immunohistochemical Study of Aquaporin-2, V2R Vasopressin Receptor, NKCC2, and TRPV4*. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 158, 721-728

Auton, A., Brooks, L., Durbin, R., Garrison, E., Kang, H., Korbel, J., Marchini, J., McCarthy, S., McVean, G., & Abecasis, G. (2015). *A global reference for human genetic variation*. *Nature*. 526, 68-74

Banks, C., McGinness, S., Harvey, R., & Sacks, R. (2012). *Is Allergy Related to Meniere's Disease?* *Current Allergy and Asthma Reports*. 12, 255-260

Barrett, J., Fry, B., Maller, J., & Daly, M. (2005). *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps*. *Bioinformatics*. 21, 263-265

Blausen.com staff, BruceBlaus (2014). *File: Blausen 0329 EarAnatomy InternalEar.png*. Medical gallery of Blausen Medical 2014. *WikiJournal of Medicine*. (https://de.wikipedia.org/wiki/Innenohr#/media/File:Blausen_0329_EarAnatomy_InternalEar.png). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436. Lizenziert unter Creative Commons Attribution 3.0 Unported. Zugriff vom: [16.11.2018] (Original aus dem Englischen übersetzt).

Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., Rahmouni, S., Nika, K., Rostamkhani, M., MacMurray, J., Meloni, G., Lucarelli, P., Pellecchia, M., Eisenbarth, G., Comings, D., & Mustelin, T. (2004). *A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes*. *Nat Genet*. 36, 337-338

Brand, O., Gough, S., & Heward, J. (2005). *HLA , CTLA-4 and PTPN22 : the shared genetic master-key to autoimmunity?* *Expert Rev Mol Med*. 7, 1-15

Brunet, J., Denizot, F., Luciani, M., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M., & Golstein, P. (1987). *A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4*. *Nature*. 328, 267-270

Brunner, M., Chambers, C., Chan, F., Hanke, J., Winoto, A., & Allison, J. (1999). *CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation*. *J Immunol*. 162, 5813-5820

Literaturverzeichnis

- Cabrera, S., Sanchez, E., Requena, T., Martinez-Bueno, M., Benitez, J., Perez, N., Trinidad, G., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Martin-Sanz, E., Fraile, J., Perez, P., Alarcon-Riquelme, M., Batuecas, A., Espinosa-Sanchez, J., Aran, I., & Lopez-Escamez, J. (2014). *Intronic variants in the NFKB1 gene may influence hearing forecast in patients with unilateral sensorineural hearing loss in Meniere's disease*. PLoS One. 9, e112171
- Campbell, C., Della Santina, C., Meyer, N., Smith, N., Myrie, O., Stone, E., Fukushima, K., Califano, J., Carey, J., Hansen, M., Gantz, B., Minor, L., & Smith, R. (2010). *Polymorphisms in KCNE1 or KCNE3 are not associated with Meniere disease in the Caucasian population*. Am J Med Genet A. 152a, 67-74
- Candreia, C., Schmuziger, N., & Gürtler, N. (2010). *Molecular analysis of aquaporin genes 1 to 4 in patients with Meniere's disease*. Cell Physiol Biochem. 26, 787-792
- Carlton, V., Hu, X., Chokkalingam, A., Schrodi, S., Brandon, R., Alexander, H., Chang, M., Catanese, J., Leong, D., Ardlie, K., Kastner, D., Seldin, M., Criswell, L., Gregersen, P., Beasley, E., Thomson, G., Amos, C., & Begovich, A. (2005). *PTPN22 genetic variation: evidence for multiple variants associated with rheumatoid arthritis*. Am J Hum Genet. 77, 567-581
- Chang, W., Zhang, L., Yao, Y., & Su, H. (2012). *Association between CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism and systemic lupus erythematosus: an updated analysis*. Mol Biol Rep. 39, 9159-9165
- Chen, X., Du, Y., Hu, Q., & Huang, Z. (2017). *Tumor-derived CD4+CD25+regulatory T cells inhibit dendritic cells function by CTLA-4*. Pathol Res Pract. 213, 245-249
- Chiarella, G., Petrolo, C., & Cassandro, E. (2015). *The genetics of Meniere's disease*. Appl Clin Genet. 8, 9-17
- Chow, L., Fournel, M., Davidson, D., & Veillette, A. (1993). *Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk*. Nature. 365, 156-160
- Clarke, G., Anderson, C., Pettersson, F., Cardon, L., Morris, A., & Zondervan, K. (2011). *Basic statistical analysis in genetic case-control studies*. Nat Protoc. 6, 121-133
- Cloutier, J., & Veillette, A. (1996). *Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells*. Embo j. 15, 4909-4918
- Cohen, S., Dadi, H., Shaoul, E., Sharfe, N., & Roifman, C. (1999). *Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp*. Blood. 93, 2013-2024
- Committee on Hearing and Equilibrium (1995). *Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Meniere's disease*. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc. Otolaryngol Head Neck Surg. 113, 181-185

- Cornelis, M., Agrawal, A., Cole, J., Hansel, N., Barnes, K., Beaty, T., Bennett, S., Bierut, L., Boerwinkle, E., Doheny, K., Feenstra, B., Feingold, E., Fornage, M., Haiman, C., Harris, E., Hayes, M., Heit, J., Hu, F., Kang, J., Laurie, C., Ling, H., Manolio, T., Marazita, M., Mathias, R., Mirel, D., Paschall, J., Pasquale, L., Pugh, E., Rice, J., Udren, J., Van Dam, R., Wang, X., Wiggs, J., Williams, K., & Yu, K. (2010). *The Gene, Environment Association Studies consortium (GENEVA): maximizing the knowledge obtained from GWAS by collaboration across studies of multiple conditions*. *Genet Epidemiol.* 34, 364-372
- Cunninghame Graham, D., Wong, A., McHugh, N., Whittaker, J., & Vyse, T. (2006). *Evidence for unique association signals in SLE at the CD28-CTLA4-ICOS locus in a family-based study*. *Hum Mol Genet.* 15, 3195-3205
- Curtin, F., & Schulz, P. (1998). *Multiple correlations and Bonferroni's correction*. *Biol Psychiatry.* 44, 775-777
- Davis, L., & Johnson, R. (1976). *Experimental viral infections of the inner ear. I. Acute infections of the newborn hamster labyrinth*. *Lab Invest.* 34, 349-356
- Derebery, M. (2000). *Allergic management of Meniere's disease: an outcome study*. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 122, 174-182
- Derebery, M., & Berliner, K. (2000). *Prevalence of Allergy in Meniere's Disease*. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery.* 123, 69-75
- Derebery, M., Rao, V., Siglock, T., Linthicum, F., & Nelson, R. (1991). *Meniere's disease: an immune complex-mediated illness?* *Laryngoscope.* 101, 225-229
- 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*. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 67, 289-293
- Dong, F., Yang, G., Pan, H., Huang, W., Jing, L., Liang, W., Zhang, N., Zhang, B., Wang, M., Liu, Y., Zhang, L., Zhang, S., Li, H., Chen, C., Nie, L., & Jing, C. (2014). *The association of PTPN22 rs2476601 polymorphism and CTLA-4 rs231775 polymorphism with LADA risks: a systematic review and meta-analysis*. *Acta Diabetol.* 51, 691-703
- Ekdale, E. (2016). *Form and function of the mammalian inner ear*. *J Anat.* 228, 324-337
- Elshazli, R., Settin, A., & Salama, A. (2015). *Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) +49 A>G gene polymorphism in Egyptian cases with rheumatoid arthritis*. *Gene.* 558, 103-107
- Eskandari-Nasab, E., Tahmasebi, A., & Hashemi, M. (2015). *Meta-Analysis: The Relationship Between CTLA-4 +49 A/G Polymorphism and Primary Biliary Cirrhosis and Type I Autoimmune Hepatitis*. *Immunological Investigations.* 44, 331-348
- Fan, J.-B., Gunderson, K., Bibikova, M., Yeakley, J., Chen, J., Wickham Garcia, E., Lebruska, L., Laurent, M., Shen, R., & Barker, D. (2006). *Illumina Universal Bead Arrays*. *Methods Enzymol.* 410, 57-73

- Frejo, L., Giegling, I., Teggi, R., Lopez-Escamez, J., & Rujescu, D. (2016). *Clinical Subgroups in Bilateral Meniere Disease*. *Front Neurol.* 7, 182
- Gabriel, S., Schaffner, S., Nguyen, H., Moore, J., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., Liu-Cordero, S., Rotimi, C., Adeyemo, A., Cooper, R., Ward, R., Lander, E., Daly, M., & Altshuler, D. (2002) *The structure of haplotype blocks in the human genome*. *Science.* 296, 2225-2229
- Gates, G. (2006). *Meniere's disease review 2005*. *J Am Acad Audiol.* 17, 16-26
- Gazquez, I., Moreno, A., Aran, I., Soto-Varela, A., Santos, S., Perez-Garrigues, H., Lopez-Nevot, A., Requena, T., Lopez-Nevot, M., & Lopez-Escamez, J. (2012). *MICA-STR A.4 is associated with slower hearing loss progression in patients with Meniere's disease*. *Otol Neurotol.* 33, 223-229
- Gazquez, I., Moreno, A., Requena, T., Ohmen, J., Santos-Perez, S., Aran, I., Soto-Varela, A., Perez-Garrigues, H., Lopez-Nevot, A., Batuecas, A., Friedman, R., Lopez-Nevot, M., & Lopez-Escamez, J. (2013). *Functional variants of MIF, INFG and TFNA genes are not associated with disease susceptibility or hearing loss progression in patients with Meniere's disease*. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 270, 1521-1529
- Gazquez, I., Soto-Varela, A., Aran, I., Santos, S., Batuecas, A., Trinidad, G., Perez-Garrigues, H., Gonzalez-Oller, C., Acosta, L., & Lopez-Escamez, J. (2011). *High prevalence of systemic autoimmune diseases in patients with Meniere's disease*. *PLoS One.* 6, e26759
- Goh, G., & Choi, M. (2012). *Application of whole exome sequencing to identify disease-causing variants in inherited human diseases*. *Genomics Inform.* 10, 214-219
- Goh, L., Yong, M., See, W., Chee, E., Lim, P., Koh, E., & Leong, K. (2017). *NLRP1, PTPN22 and PADI4 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in ACPA-positive Singaporean Chinese*. *Rheumatol Int.* 37, 1295-1302
- Gray, I., Campbell, D., & Spurr, N. (2000). *Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics*. *Hum Mol Genet.* 9, 2403-2408
- Gunderson, K., Kruglyak, S., Graige, M., Garcia, F., Kermani, B., Zhao, C., Che, D., Dickinson, T., Wickham, E., Bierle, J., Doucet, D., Milewski, M., Yang, R., Siegmund, C., Haas, J., Zhou, L., Oliphant, A., Fan, J.-B., Barnard, S., & Chee, M. (2004). *Decoding randomly ordered DNA arrays*. *Genome Res.* 14, 870-877
- Gürkov, R., Jerin, C., Flatz, W., & Maxwell, R. (2019). *Clinical manifestations of hydropic ear disease (Menière's)*. *Eur Arch Otorhinolaryngol,* 276(1), 27-40.
- Hallpike, C., & Cairns, H. (1938). *Observations on the Pathology of Meniere's Syndrome: (Section of Otology)*. *Proc R Soc Med.* 31, 1317-1336
- Harcourt, J., Barraclough, K., & Bronstein, A. (2014). *Meniere's disease*. *Bmj.* 349, g6544
- Harris, J., & Alexander, T. (2010). *Current-day prevalence of Meniere's syndrome*. *Audiol Neurootol.* 15, 318-322

Literaturverzeichnis

- Hasegawa, K., Martin, F., Huang, G., Tumas, D., Diehl, L., & Chan, A. (2004). *PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells*. *Science*. 303, 685-689
- Havia, M., Kentala, E., & Pyykkö, I. (2002). *Hearing loss and tinnitus in Meniere's disease*. *Auris Nasus Larynx*. 29, 115-119
- Havia, M., Kentala, E., & Pyykkö, I. (2005). *Prevalence of Meniere's disease in general population of Southern Finland*. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 133, 762-768
- Hawkins, J. (2005). *Sketches of othistory: part 5: Prosper Meniere: physician, botanist, classicist, diarist and historian*. *Audiol Neurootol*. 10, 1-5
- Hietikko, E., Kotimäki, J., Okuloff, A., Sorri, M., & Mannikko, M. (2012). *A replication study on proposed candidate genes in Meniere's disease, and a review of the current status of genetic studies*. *Int J Audiol*. 51, 841-845
- Holmes, D., Suto, E., Lee, W., Ou, Q., Gong, Q., Smith, H., Caplazi, P., & Chan, A. (2015). *Autoimmunity-associated protein tyrosine phosphatase PEP negatively regulates IFN-alpha receptor signaling*. *J Exp Med*. 212, 1081-1093
- Horvat, T., Adel, N., Dang, T., Momtaz, P., Postow, M., Callahan, M., Carvajal, R., Dickson, M., D'Angelo, S., Woo, K., Panageas, K., Wolchok, J., & Chapman, P. (2015). *Immune-Related Adverse Events, Need for Systemic Immunosuppression, and Effects on Survival and Time to Treatment Failure in Patients With Melanoma Treated With Ipilimumab at Memorial Sloan Kettering Cancer Center*. *J Clin Oncol*. 33, 3193-3198
- Houcken, J., Degenhart, C., Bender, K., König, J., Frommer, L., & Kahaly, G. (2018). *PTPN22 and CTLA-4 Polymorphisms are Associated with Polyglandular Autoimmunity*. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Huppert, D., Strupp, M., & Brandt, T. (2010). *Long-term course of Meniere's disease revisited*. *Acta Otolaryngol*. 130, 644-651
- Illumina Inc (2012). *Illumina Advances Genomic Research with the Infinium Assay*. (<https://www.youtube.com/watch?v=IVG04dAAyvY>). Stand: 04.03.2016
- Illumina Inc (2014). *Data Sheet DNA Analysis: HumanOmniExpress-24 Bead Chips*. San Diego, USA: Illumina Inc
- Ioannidis, J., Ntzani, E., Trikalinos, T., & Contopoulos-Ioannidis, D. (2001). *Replication validity of genetic association studies*. *Nat Genet*. 29, 306-309
- Ishiyama, G., Lopez, I., & Ishiyama, A. (2006). *Aquaporins and Meniere's disease*. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 14, 332-336
- Ji, J., & Lee, W. (2013). *Association between the polymorphisms of glutathione S-transferase genes and rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. *Gene*. 521, 155-159

Literaturverzeichnis

- Johnson, A., Handsaker, R., Pulit, S., Nizzari, M., O'Donnell, C., & de Bakker, P. (2008). *SNAP: A web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap*. *Bioinformatics*. 24, 2938-2939
- Katkam, S., Kumaraswami, K., Rupasree, Y., Thishya, K., Rajasekhar, L., & Kutala, V. (2016). *Association of CTLA4 exon-1 polymorphism with the tumor necrosis factor-alpha in the risk of systemic lupus erythematosus among South Indians*. *Hum Immunol*. 77, 158-164
- Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Falaleeva, M., & Stamm, S. (2013). *Function of alternative splicing*. *Gene*. 514, 1-30
- Khorsandi, M., Amoli, M., Borghei, H., Emami, H., Amiri, P., Amirzargar, A., & Yazdani, N. (2011). *Associations between HLA-C alleles and definite Meniere's disease*. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 10, 119-122
- Kim, S., Kim, J., Lee, H., Gi, M., Kim, B., & Choi, J. (2014). *Autoimmunity as a candidate for the etiopathogenesis of Meniere's disease: detection of autoimmune reactions and diagnostic biomarker candidate*. *PLoS One*. 9, e111039
- Klocke, K., Sakaguchi, S., Holmdahl, R., & Wing, K. (2016). *Induction of autoimmune disease by deletion of CTLA-4 in mice in adulthood*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113, E2383-2392
- Kotimäki, J., Sorri, M., Aantaa, E., & Nuutinen, J. (1999). *Prevalence of Meniere disease in Finland*. *Laryngoscope*. 109, 748-753
- Li, Y., Jin, Z., & Xu, X. (2016). *Variants in the KCNE1 or KCNE3 gene and risk of Meniere's disease: A meta-analysis*. *J Vestib Res*. 25, 211-218
- Lindsten, T., Lee, K., Harris, E., Petryniak, B., Craighead, N., Reynolds, P., Lombard, D., Freeman, G., Nadler, L., & Gray, G. (1993). *Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells*. *J Immunol*. 151, 3489-3499
- Liu, J., Chen, M., Li, R., Yang, F., Shi, X., Zhu, L., Wang, H., Yao, W., Liu, Q., Meng, F., Sun, J., Pang, Q., & Yu, X. (2012). *Biochemical and functional studies of lymphoid-specific tyrosine phosphatase (Lyp) variants S201F and R266W*. *PLoS One*. 7, e43631
- Liu, J., & Zhang, H. (2013). *-1722T/C polymorphism (rs733618) of CTLA-4 significantly associated with systemic lupus erythematosus (SLE): a comprehensive meta-analysis*. *Hum Immunol*. 74, 341-347
- Lopez-Cano, D., Cadena-Sandoval, D., Beltran-Ramirez, O., Barbosa-Cobos, R., Sanchez-Munoz, F., Amezcua-Guerra, L., Juarez-Vicuna, Y., Aguilera-Cartas, M., Moreno, J., Bautista-Olvera, J., Valencia-Pacheco, G., Lopez-Villanueva, R., & Ramirez-Bello, J. (2017). *The PTPN22 R263Q polymorphism confers protection against systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, while PTPN22 R620W confers susceptibility to Graves' disease in a Mexican population*. *Inflamm Res*. 66, 775-781
- Lopez-Escamez, J., Carey, J., Chung, W., Goebel, J., Magnusson, M., Mandala, M., Newman-Toker, D., Strupp, M., Suzuki, M., Trabalzini, F., & Bisdorff, A. (2015). *Diagnostic criteria for Meniere's disease*. *J Vestib Res*. 25, 1-7

Literaturverzeichnis

- Lopez-Escamez, J., Saenz-Lopez, P., Acosta, L., Moreno, A., Gazquez, I., Perez-Garrigues, H., Lopez-Nevot, A., & Lopez-Nevot, M. (2010). *Association of a functional polymorphism of PTPN22 encoding a lymphoid protein phosphatase in bilateral Meniere's disease*. *Laryngoscope*. 120, 103-107
- Lopez-Escamez, J., Vilchez, J., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Perez-Garrigues, H., Aran, I., & Lopez-Nevot, M. (2007). *HLA-DRB1*1101 allele may be associated with bilateral Meniere's disease in southern European population*. *Otol Neurotol*. 28, 891-895
- Luo, L., Cai, B., Liu, F., Hu, X., & Wang, L. (2012). *Association of Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor 22 (PTPN22) C1858T gene polymorphism with susceptibility to autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis*. *Endocr J*. 59, 439-445
- Mancini, F., Catalani, M., Carru, M., & Monti, B. (2002). *History of Meniere's disease and its clinical presentation*. *Otolaryngol Clin North Am*. 35, 565-580
- Martin-Sierra, C., Requena, T., Frejo, L., Price, S., Gallego-Martinez, A., Batuecas-Caletrio, A., Santos-Perez, S., Soto-Varela, A., Lysakowski, A., & Lopez-Escamez, J. (2016). *A novel missense variant in PRKCB segregates low-frequency hearing loss in an autosomal dominant family with Meniere's disease*. *Hum Mol Genet*. 25, 3407-3415
- Martin-Sierra, C., Gallego-Martinez, A., Requena, T., Frejo, L., Batuecas-Caletrio, A., & Lopez-Escamez, J. (2017). *Variable expressivity and genetic heterogeneity involving DPT and SEMA3D genes in autosomal dominant familial Meniere's disease*. *Eur J Hum Genet*. 25, 200-207
- McCrossan, Z., & Abbott, G. (2004). *The MinK-related peptides*. *Neuropharmacology*. 47, 787-821
- Merchant, S., Adams, J., & Nadol, J., Jr. (2005). *Pathophysiology of Meniere's syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops?* *Otol Neurotol*. 26, 74-81
- Moini, M., Saadat, M., Saadat, H., Esmailnejad, A., & Safarpour, A. (2017). *Association Study of Glutathione S-transferases Gene Polymorphisms (GSTM1 and GSTT1) with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease in the South of Iran*. *Adv Biomed Res*. 6, 67
- Naganawa, S., & Nakashima, T. (2014). *Visualization of endolymphatic hydrops with MR imaging in patients with Meniere's disease and related pathologies: current status of its methods and clinical significance*. *Jpn J Radiol*. 32, 191-204
- Namjou, B., Kim-Howard, X., Sun, C., Adler, A., Chung, S., Kaufman, K., Kelly, J., Glenn, S., Guthridge, J., Scofield, R., Kimberly, R., Brown, E., Alarcon, G., Edberg, J., Kim, J., Choi, J., Ramsey-Goldman, R., Petri, M., Reveille, J., Vila, L., Boackle, S., Freedman, B., Tsao, B., Langefeld, C., Vyse, T., Jacob, C., Pons-Estel, B., Niewold, T., Moser Sivils, K., Merrill, J., Anaya, J., Gilkeson, G., Gaffney, P., Bae, S., Alarcon-Riquelme, M., Harley, J., Criswell, L., James, J., & Nath, S. (2013). *PTPN22 association in systemic lupus erythematosus (SLE) with respect to individual ancestry and clinical sub-phenotypes*. *PLoS One*. 8, e69404

Literaturverzeichnis

Nishio, N., Teranishi, M., Uchida, Y., Sugiura, S., Ando, F., Shimokata, H., Sone, M., Otake, H., Kato, K., Yoshida, T., Tagaya, M., Hibi, T., & Nakashima, T. (2013). *Polymorphisms in genes encoding aquaporins 4 and 5 and estrogen receptor alpha in patients with Meniere's disease and sudden sensorineural hearing loss*. *Life Sci.* 92, 541-546

Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. Zugriff vom [26.04.2020]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

Protein [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] -.NP_005205.2, cytotoxic T-lymphocyte protein 4 isoform CTLA4-TM precursor [Homo sapiens]; Zugriff vom [28.01.2018]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/21361212>

Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [2004a] -.NG_011502.1, CTLA4 cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 [Homo sapiens (human)] Zugriff vom [17.02.2018]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1493>

Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [2004b] -.NP_036224.1, ICOS inducible T cell costimulator [Homo sapiens (human)] Zugriff vom [25.02.2018]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29851>

Gene [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [2004c] -.Q9Y2R2.2, PTPN22 protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 [Homo sapiens (human)]; Zugriff vom [16.02.2018]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26191>

Oh, E., Shin, J., Kim, H., Cho, J., Choi, S., Choi, K., Rhee, J., Lee, S. Lee, C., & Choi, H. (2019). Rare Variants of Putative Candidate Genes Associated With Sporadic Meniere's Disease in East Asian Population. *Front Neurol.* 10, 1424 Ohmen, J et al. (2013). *Genetic evidence for an ethnic diversity in the susceptibility to Meniere's disease*. *Otol Neurotol.* 34, 1336-1341

Ott, J., Wang, J., & Leal, S. (2015). *Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing*. *Nat Rev Genet.* 16, 275-284

Paparella, M. (1991). *Pathogenesis and pathophysiology of Meniere's disease*. *Acta Otolaryngol Suppl.* 485, 26-35

Paparella, M., & Djalilian, H. (2002). *Etiology, pathophysiology of symptoms, and pathogenesis of Meniere's disease*. *Otolaryngol Clin North Am.* 35, 529-545, vi

Pei, Z., Chen, X., Sun, C., Du, H., Wei, H., Song, W., Yang, Y., Zhang, M., Lu, W., Cheng, R., & Luo, F. (2014). *A novel single nucleotide polymorphism in the protein tyrosine phosphatase N22 gene (PTPN22) is associated with Type 1 diabetes in a Chinese population*. *Diabet Med.* 31, 219-226

Petri, M., Chirila, M., Bolboaca, S., & Cosgarea, M. (2017). *Health-related quality of life and disability in patients with acute unilateral peripheral vestibular disorders*. *Braz J Otorhinolaryngol.* 83, 611-618

Literaturverzeichnis

Pfaff, C., Schultz, J., & Schellhorn, R. (2019). *The vertebrate middle and inner ear: A short overview*. *J Morphol.* 280, 1098-1105

Purcell, S. (2009). *PLINK v1.07*. <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P., Daly, M., & Sham, P. (2007). *PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses*. *Am J Hum Genet.* 81, 559-575

Pyykkö, I., Nakashima, T., Yoshida, T., Zou, J., & Naganawa, S. (2013). *Meniere's disease: a reappraisal supported by a variable latency of symptoms and the MRI visualisation of endolymphatic hydrops*. *BMJ Open.* 3

Pyykkö, I., & Zou, J. (2008). *Do viruses cause inner ear disturbances?* *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 70, 32-40; discussion 40-31

Qiagen (2005). *QIAamp® DNA Blood Midi/Maxi Handbook*. Hilden: Qiagen GmbH

R Development Core Team (2011). *R: A language and environment for statistical computing*. Wien, Österreich: R Foundation for Statistical Computing. 3- 900051- 07- 0. <https://www.r-project.org/>

Radtko, A., von Brevern, M., Feldmann, M., Lezius, F., Ziese, T., Lempert, T., & Neuhauser, H. (2008). *Screening for Meniere's disease in the general population - the needle in the haystack*. *Acta Otolaryngol.* 128, 272-276

Ramgopal, S., Rathika, C., Padma, M., Murali, V., Arun, K., Kamaludeen, M., & Balakrishnan, K. (2018). *Interaction of HLA-DRB1* alleles and CTLA4 (+49 AG) gene polymorphism in Autoimmune Thyroid Disease*. *Gene.* 642, 430-438

Remuzgo-Martinez, S., Genre, F., Castaneda, S., Corrales, A., Moreno-Fresneda, P., Ubilla, B., Mijares, V., Portilla, V., Gonzalez-Vela, J., Pina, T., Ocejo-Vinyals, G., Irure-Ventura, J., Blanco, R., Martin, J., Llorca, J., Lopez-Mejias, R., & Gonzalez-Gay, M. (2017). *Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 and C-Src tyrosine kinase genes are down-regulated in patients with rheumatoid arthritis*. *Sci Rep.* 7, 10525

Renner, P., Roger, T., & Calandra, T. (2005). *Macrophage migration inhibitory factor: gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory diseases*. *Clin Infect Dis.* 41 Suppl 7, S513-519

Requena, T., Cabrera, S., Martín-Sierra, C., Price, S., Lysakowski, A., & Lopez-Escamez, J. (2015). *Identification of two novel mutations in FAM136A and DTNA genes in autosomal-dominant familial Meniere's disease*. *Human molecular genetics.* 24, 1119-1126

Requena, T., Espinosa-Sanchez, J., Cabrera, S., Trinidad, G., Soto-Varela, A., Santos-Perez, S., Teggi, R., Perez, P., Batuecas-Caletrio, A., Fraile, J., Aran, I., Martin, E., Benitez, J., Perez-Fernandez, N., & Lopez-Escamez, J. (2014). *Familial clustering and genetic heterogeneity in Meniere's disease*. *Clin Genet.* 85, 245-252

Literaturverzeichnis

- Rice, J., Reich, T., Bucholz, K., Neuman, R., Fishman, R., Rochberg, N., Hesselbrock, V., Nurnberger Jr, J., Schuckit, M., & Begleiter, H. (1995). *Comparison of direct interview and family history diagnoses of alcohol dependence*. Alcohol Clin Exp Res. 19, 1018-1023
- Richter, V., & Guthke, J. (1996). *Leipziger Ereignis- und Belastungsinventar (LEBI)*. Göttingen: Hogrefe
- Rujescu, D., Hartmann, A., 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*. Front Neurol. 9, 591
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell. 133, 775-787
- Saunders, A. & Johnson, P. (2010). *Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45*. Cell Signal. 22, 339-348
- Savastano, M., Giacomelli, L., & Marioni, G. (2007). *Non-specific immunological determinations in Meniere's disease: any role in clinical practice?* Eur Arch Otorhinolaryngol. 264, 15-19
- Shi, L., Wei, Y., Xun, W., & Han, D. (2013). *Meta-analysis of the correlation between PTPN22 gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus*. Asia-Pacific journal of public health. 25, 22S-29S
- Shojaku, H., Watanabe, Y., Fujisaka, M., Tsubota, M., Kobayashi, K., Yasumura, S., & Mizukoshi, K. (2005). *Epidemiologic Characteristics of Definite Ménière's Disease in Japan*. ORL. 67, 305-309
- Shojaku, H., Watanabe, Y., Fujisaka, M., Tsubota, M., Kobayashi, K., Yasumura, S., & Mizukoshi, K. (2006). *Whole-genome genotyping with the single-base extension assay*. Nat Methods. 3, 31-33
- Skuladottir, A., Bjornsdottir, G., Nawaz, M., Petersen, H., Rognvaldsson, S., Moore, K., Olafsson, P., Magnusson, S., Bjornsdottir, A., Sveinsson, O., Sigurdardottir, G., Saevarsdottir, S., Ivarsdottir, E., Stefansdottir, L., Gunnarsson, B., Muhlestein, J., Knowlton, K., Jones, D., Nadauld, L., Hartmann, A., Rujescu, D., Strupp, M., Walters, G., Thorgeirsson, T., Jonsdottir, I., Holm, H., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D., Sulem, P., Stefansson, H., Stefansson, K. (2021). *A genome-wide meta-analysis uncovers six sequence variants conferring risk of vertigo*. Commun Biol. 4, 1148
- Suchan, M., Kaliarik, L., Krempaska, S., & Koval, J. (2016). *Immune-mediated cochleovestibular disease*. Bratisl Lek Listy. 117, 87-90
- Sun, Y., Zhang, D., Sun, G., Lv, Y., Li, Y., Li, X., Song, Y., Li, J., Fan, Z., & Wang, H. (2018). *RNA-sequencing study of peripheral blood mononuclear cells in sporadic Meniere's disease patients: possible contribution of immunologic dysfunction to the development of this disorder*. Clin Exp Immunol. 192, 33-45
- Syed, M., Ilan, O., Nassar, J., & Rutka, J. (2015). *Intratympanic therapy in Meniere's syndrome or disease: up to date evidence for clinical practice*. Clin Otolaryngol. 40, 682-690

- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T., & Sakaguchi, S. (2000). *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. *J Exp Med.* 192, 303-310
- Tang, L., Wang, Y., Zheng, S., Bao, M., Zhang, Q., & Li, J. (2016). *PTPN22 polymorphisms, but not R620W, were associated with the genetic susceptibility of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Chinese Han population*. *Hum Immunol.* 77, 692-698
- Tang, M., & Zhou, Z. (2013). *Association of the CTLA-4 +49A/G polymorphism with rheumatoid arthritis in Chinese Han population*. *Mol Biol Rep.* 40, 2627-2631
- Tavares, N., Santos, M., Moura, R., Araujo, J., Guimaraes, R., Crovella, S., & Brandao, L. (2015). *Association of TNF-alpha, CTLA4, and PTPN22 polymorphisms with type 1 diabetes and other autoimmune diseases in Brazil*. *Genet Mol Res.* 14, 18936-18944
- Teft, W., Kirchhof, M., & Madrenas, J. (2006). *A molecular perspective of CTLA-4 function*. *Annu Rev Immunol.* 24, 65-97
- Ting, W., Chien, M., Lo, F., Wang, C., Huang, C., Lin, C., Lin, W., Chang, T., Yang, H., Chen, W., Lien, Y., Cheng, B., Lin, C., Chen, C., Wu, Y., Hung, C., Li, H., Chan, C., & Lee, Y. (2016). *Association of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA4) Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease in Children and Adults: Case-Control Study*. *PLoS One.* 11, e0154394
- Torres-Carrillo, N., Ontiveros-Mercado, H., Torres-Carrillo, N.M., Parra-Rojas, I., Rangel-Villalobos, H., Ramirez-Duenas, M., Gutierrez-Urena, S., Valle, Y., & Munoz-Valle, J. (2013). *The -319C/+49G/CT60G haplotype of CTLA-4 gene confers susceptibility to rheumatoid arthritis in Mexican population*. *Cell Biochem Biophys.* 67, 1217-1228
- Tyrrell, J., Whinney, D., Ukoumunne, O., Fleming, L., & Osborne, N. (2014). *Prevalence, associated factors, and comorbid conditions for Meniere's disease*. *Ear Hear.* 35, e162-169
- Umemura, T., Joshita, S., Yamazaki, T., Komatsu, M., Katsuyama, Y., Yoshizawa, K., Tanaka, E., & Ota, M. (2016). *Genetic Association of PTPN22 Polymorphisms with Autoimmune Hepatitis and Primary Biliary Cholangitis in Japan*. *Sci Rep.* 6, 29770
- Vang, T., Congia, M., Macis, M., Musumeci, L., Orru, V., Zavattari, P., Nika, K., Tautz, L., Tasken, K., Cucca, F., Mustelin, T., & Bottini, N. (2005). *Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant*. *Nat Genet.* 37, 1317-1319
- Vetter, D., Mann, J., Wangemann, P., Liu, J., McLaughlin, K., Lesage, F., Marcus, D., Lazdunski, M., Heinemann, S., & Barhanin, J. (1996). *Inner ear defects induced by null mutation of the isk gene*. *Neuron.* 17, 1251-1264
- Victor, A. (2007). *Bewertung genetischer Forschungsergebnisse-Methoden und vermeidbare Fehler*. *G+G Wissenschaft.* 6, 14-22
- Vrabec, J. (2003). *Herpes simplex virus and Meniere's disease*. *Laryngoscope.* 113, 1431-1438

Walker, L. (2017). *EFIS Lecture: Understanding the CTLA-4 checkpoint in the maintenance of immune homeostasis*. Immunol Lett. 184, 43-50

Wang, K., Zhu, Q., Lu, Y., Lu, H., Zhang, F., Wang, X., & Fan, Y. (2017). *CTLA-4 +49 G/A Polymorphism Confers Autoimmune Disease Risk: An Updated Meta-Analysis*. Genet Test Mol Biomarkers. 21, 222-227

Wang, S., Dong, H., Han, J., Ho, W., Fu, X., & Zhao, Z. (2010). *Identification of a variant form of tyrosine phosphatase LYP*. BMC Mol Biol. 11, 78

Wang, X., Pirskanen, R., Giscombe, R., & Lefvert, A. (2008). *Two SNPs in the promoter region of the CTLA-4 gene affect binding of transcription factors and are associated with human myasthenia gravis*. J Intern Med. 263, 61-69

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

Webb, E. S., Liu, P., Baleeiro, R., Lemoine, N. R., Yuan, M., & Wang, Y. H. (2018). *Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy*. J Biomed Res, 32(5), 317-326

Wikimedia Commons contributors, en-user Oarih (2017). *File:Cochlea-crosssection-de.png*. Wikimedia Commons, the free media repository. (<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Cochlea-crosssection-de.png&oldid=259796096>). Lizenziert unter Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported license. Zugriff vom [16.11.2018] (Original ohne Änderung).

Wing, J., Ise, W., Kurosaki, T., & Sakaguchi, S. (2014). *Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4*. Immunity. 41, 1013-1025

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2008). *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function*. Science. 322, 271-275

Wittchen, H.-U., Saß, H., & Zaudig, M. (1996). *Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen IV (DSM-IV)*. Göttingen, Bern, Toronto, Seattle: Hogrefe

Wittchen, H.-U., Zaudig, M., & Fydrich, T. (1997). *SKID Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV Achse I und II*. Göttingen: Hogrefe

Wolff, A., Mitchell, A., Cordell, H., Short, A., Skinningsrud, B., Ollier, W., Badenhop, K., Meyer, G., Falorni, A., Kampe, O., Undlien, D., Pearce, S., & Husebye, E. (2015). *CTLA-4 as a genetic determinant in autoimmune Addison's disease*. Genes Immun. 16, 430-436

Wu, P., Wang, H., & Wu, Z. (2012). *The assessment of anxiety and depression state in Meniere's disease patients*. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 26, 516-518

Yamakawa, K. (1938). *Über pathologische Veränderungen bei einem Menière-Kranken*. J Otolaryngl Soc Jap. 4, 2310-2312

Literaturverzeichnis

- Yardley, L., Dibb, B., & Osborne, G. (2003). *Factors associated with quality of life in Meniere's disease*. Clin Otolaryngol Allied Sci. 28, 436-441
- Yazdani, N., Khorsandi Ashtiani, M., Zarandy, M., Mohammadi, S., Ghazavi, H., Mahrampour, E., Amiri, P., & Amoli, M. (2013). *Association between MIF gene variation and Meniere's disease*. Int J Immunogenet. 40, 488-491
- Yoo, T., Yazawa, Y., Tomoda, K., & Floyd, R. (1983). *Type II collagen-induced autoimmune endolymphatic hydrops in guinea pig*. Science. 222, 65-67
- Zhang, J., Liu, H., Yan, H., Huang, G., & Wang, B. (2013). *Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to increased risk of diabetes mellitus: a meta-analysis*. Gene. 518, 405-411
- Zheng, P., & Kissler, S. (2013). *PTPN22 silencing in the NOD model indicates the type 1 diabetes-associated allele is not a loss-of-function variant*. Diabetes. 62, 896-904
- Zhang, Y., Liu, B., Wang, R., Jia, R., & Gu, X. (2016). *Characteristics of the Cochlear Symptoms and Functions in Meniere's Disease*. Chin Med J (Engl). 129, 2445-2450
- Ziegler, A., König, I., & Thompson, J. (2008). *Biostatistical aspects of genome-wide association studies*. Biom J. 50, 8-28

7. Abkürzungen und Fachbegriffe

A	Adenin
AAO-HNS	American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery
AE	Elutionspuffer
AL	Lysepuffer
ARMC9	Armadillo Repeat Containing 9
AW1	Waschpuffer 1
AW2	Waschpuffer 2
bidest	Zweifach destilliert
C	Cytosin
CD	Cluster of differentiation
Cdk4	Cyclin-dependent kinase 4
CSK	C-terminal Src kinase
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
D	Kopplungsungleichgewicht
D'	D/Dmax (größtmögliche Differenz zwischen beobachteten und erwarteten Allelfrequenzen)
DPT	Dermatopontin
DSGZ	Deutsches Schwindel- und Gleichgewichtszentrum
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV
DTNA	Dystrobrevin alpha
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAM136A	Family With Sequence Similarity 136 Member A
FHAM	Family History Assessment Module
Foxp3	Forkhead-box-protein P3
Fyn	Src family tyrosine kinase
G	Guanin
GSTM1	Glutathione S-transferase Mu 1
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HLA	Human leukocyte antigen
HWE	Hardy–Weinberg Equilibrium
ICOS	Inducible T-cell costimulator
IFB	Integriertes Forschungs- und Behandlungszentrum

Abkürzungen und Fachbegriffe

KCNE	Potassium voltage-gated channel subfamily E
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LD	Linkage disequilibrium
LEBI	Leipziger Ereignis- und Belastungsinventar
LYP	Lymphoid-specific tyrosine phosphatase
MHC	Major histocompatibility complex
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
mRNA	Messenger RNA
NaOH	Natriumhydroxid
NF-1	Nuclear factor 1
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
OTOG	Otogelin
OTOGL	Otogelin like
OTOP1	Otopetrin 1
p.a.	Pro analysi
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEP	PEST domain-enriched tyrosine phosphatase
PP2A	Protein phosphatase 2
PRKCB	Protein kinase C beta
PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)
RSBN1	Round spermatid basic protein 1
SEMA3D	Semaphorin 3D
SH3	Src-homology 3
SKID	Strukturiertes Klinisches Interview für Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SNP	Single nucleotide polymorphism
T	Thymin
TECTA	Tectorin alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ZNF91	Zinc Finger Protein 1

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Sarah Clement, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Assoziationsuntersuchung von Polymorphismen des CTLA4- und PTPN22-Gens mit 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, 29.03.2023

Sarah Clement

Danksagung

Hiermit möchte ich allen herzlich danken, die mir die Fertigstellung dieser Doktorarbeit ermöglicht haben:

Frau Prof. Dr. med. Marianne Dieterich für die Ermöglichung der Durchführung der Arbeit am Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum der LMU.

Herrn Prof. Dr. med. Dan Rujescu, dass ich die Arbeit unter seiner Leitung durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Strupp für die freundliche und konstruktive Zusammenarbeit im Deutschen Schwindelzentrum, das Korrekturlesen und die Mitbetreuung der Arbeit.

Frau Privatdozentin Dr. rer. biol. hum. Ina Giegling für die Betreuung dieser Arbeit.

Frau Dr. rer. biol. hum. Annette Hartmann, die als Mitbetreuerin und Ansprechpartnerin bei Fragen während der praktischen Phase und dem Schreiben dieser Arbeit immer geduldig zur Verfügung stand.

Herrn Dr. Stephan Maul für das ausführliche Korrekturlesen und die konstruktiven Vorschläge.

Allen Proband*innen, die sich für diese Studie zur Verfügung gestellt haben.

Meiner Familie, Freund*innen und meinem Mann, die mir immer zur Seite stehen.