

# Serum-Biomarker für die Diagnostik in Patienten mit peripheren Innenohr-Erkrankungen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Markus Rohde, geb. Lange  
aus Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz

München 2018

Diese Dissertation wurde angefertigt  
unter der Leitung von Prof. Dr. Hans Straka  
und Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Strupp  
im Bereich der Fakultät für Biologie, Department II – Neurobiologie  
und des Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrums  
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans Straka  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Anja Horn-Bochtler  
Sondergutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Micheal Strupp

Tag der Abgabe: 28.06.2018

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2019

## **Erklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass meine Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt worden ist.

Die vorliegende Dissertation wurde weder ganz, noch teilweise bei einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Ich habe noch zu keinem früheren Zeitpunkt versucht, eine Dissertation einzureichen oder an einer Doktorprüfung teilzunehmen.

München, den 28.06.2018

Markus Rohde

*In Liebe und Dankbarkeit  
meiner Familie gewidmet.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>IV</b>
<b>Summary</b> .....	<b>VI</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Das humane Innenohr</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Anatomie .....	1
1.1.2 Physiologie.....	2
<b>1.2 Periphere Innenohr-Erkrankungen</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Gutartiger paroxysmaler Lagerungsschwindel (BPPV) .....	7
1.2.2 Bilaterale Vestibulopathie .....	7
1.2.3 Morbus Menière.....	8
<b>1.3 Humane miRNAs</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 Ursprung und Funktion.....	10
1.3.2 Extrazelluläre miRNAs .....	12
1.3.3 miRNAs im Ohr .....	13
<b>1.4 Autoimmunität im Menschen</b> .....	<b>14</b>
1.4.1 Einleitung Immunsystem.....	14
1.4.2 Autoimmunität .....	16
<b>1.5 Ziele der Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>19</b>
2.1.1 Chemikalien .....	19
2.1.2 Antikörper und immunhistochemische Reagenzien .....	19
2.1.3 TaqMan miRNA Assays .....	20
2.1.4 Kits .....	20
2.1.5 Puffer und Lösungen .....	20
2.1.6 Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.7 Geräte.....	21
<b>2.2 Probensammlung und weitere Vorbereitungen</b> .....	<b>21</b>
2.2.1 Sammlung von Patientenseren .....	21
2.2.2 Probenvorbereitung des humanen Felsenbeines .....	22
<b>2.3 Immunhistochemie</b> .....	<b>23</b>

2.3.1 Immunhistochemie auf FFPE-Gewebe .....	24
2.3.2 Immunhistochemie auf Kryo-Schnitten.....	25
2.3.3 Detektion und Auswertung der Färbung.....	25
<b>2.4 Biochemische Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.4.1 Extraktion der Serum-RNA .....	26
2.4.2 Extraktion der Endo/Perilymph-RNA.....	26
2.4.3 Illumina Next Generation Sequenzierung (NGS) .....	27
2.4.4 TruSeq® Small RNA Library Generation.....	29
2.4.5 Erstellung der DeepSequencing-Pools .....	33
2.4.6 DeepSequencing am Illumina HiSeq 1000.....	35
2.4.7 Real-Time PCR zur miRNA Diagnostik.....	35
<b>2.5 Bioinformatik und Statistik.....</b>	<b>37</b>
2.5.1 miRDeep2 in der Galaxy-Umgebung .....	37
2.5.2 Bestimmung der differentiellen Expression mit DESeq2 .....	39
2.5.3 Weitere statistische Auswertung .....	39
<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Kryo-Immunhistochemie .....</b>	<b>40</b>
3.1.1 Statistik der Patientengruppen .....	40
3.1.2 Bestimmung der Färbung anhand von Kontrollen .....	40
3.1.3 Färbung mit Patientenseren.....	43
<b>3.2 FFPE-Immunhistochemie .....</b>	<b>45</b>
3.2.1 Statistik der Patientengruppen .....	45
3.2.2 Bestimmung der Färbung anhand von Kontrollen .....	45
3.2.3 Färbung mit Patientenseren.....	46
3.2.4 Färbung der Neuronen des Nervus cochlearis .....	48
<b>3.3 miRNA-Profil der humanen Endo- und Perilymphe .....</b>	<b>51</b>
3.3.1 Unterschiede zwischen Endo-/Perilymphe und Serum.....	53
<b>3.4 miRNA-Profil in Patienten mit BPPV, BVP und Morbus Menière .....</b>	<b>55</b>
3.4.1 Statistik und Übersicht .....	55
3.4.2 Unterschiede zwischen BPPV und BVP.....	56
3.4.3 Unterschiede zwischen BPPV und Morbus Menière.....	58
3.4.4 Unterschiede zwischen BVP und Morbus Menière.....	58
3.4.5 Übersicht der differentiellen miRNAs und Blindprobe .....	61
<b>3.5 RT-PCR Anwendung der differentiellen miRNAs.....</b>	<b>63</b>
3.5.1 Übersicht und Durchführung.....	63
3.5.2 Differentielle Expression der miRNAs in der RT-PCR .....	64

<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
4.1 Keine spezifischen Autoantikörper im humanen Serum.....	67
4.2 miRNA-Profil der humanen Endo-/Perilymphe .....	71
4.3 Differenzielle miRNAs im Serum von Patienten .....	76
<b>Referenzen.....</b>	<b>80</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>91</b>
<b>Publikation.....</b>	<b>95</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>96</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3'-untranslatierte Region der mRNA
AGO	Argonautenproteine
ath-159a	miRNA 159a der Pflanze <i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaare, Größenangabe für RNA/DNA-Fragmente
BPPV	Gutartiger paroxysmaler Lagerungsschwindel, engl. Benign paroxysmal positional vertigo
BSA	Bovines Serum-Albumin
BVP	Bilaterale Vestibulopathie
CANVAS	CANVAS-Syndrom, engl. Cerebellar Ataxia with Neuropathy and Vestibular Areflexia
cDNA	komplementäre DNA, durch Enzyme wie Reverse Transkriptase aus RNA-Fragmenten hergestellt
CRT	zyklische reversible Terminator-Chemie, Sequenzierertechnik
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit, engl. cerebro spinal fluid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin, chromogenes Substrat der Immunhistochemie
DESeq2	Softwarepaket zur Detektion von differenziell exprimierten Genen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	desoxy-Nukleotidtriphosphat-Mix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP, E/P	Mix der entnommenen Innenohrflüssigkeiten Endo- und Perilymphe
FFPE	Formalin-fixiertes, paraffin-eingebettetes Gewebe
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HIER	Hitze-induziertes Epitop-Retrieval
HIV1	Humanes Immundefizienz-Virus 1
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HRP	Horse radish peroxidase
hsa-miR-Zahl	Nomenklatur von miRNAs, hsa = <i>Homo sapiens</i>
Hsp70	Heat-Shock-Protein 70
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo-Dalton, atomare Masseneinheit, SI-Einheit, Zeichen <i>u</i>
MA-Plot	M = log ratio, A = mean average, Visuelle Repräsentation genomischer Daten,
MHC	Major Histocompatibility Complex, Zelloberflächenproteine der Immunerkennung
miRDeep2	Softwarepaket zur Detektion von miRNAs aus Sequenzierdaten
miRISC	miRNA-induced silencing complex
miRNAs	microRNAs, kurze nicht-kodierende RNA-Fragmente
NKs	natürliche Killerzellen
MM	Morbus Menière
mRNA	messenger-RNA, einzelsträngiges RNA-Transkript
PBS	Phosphat gepufferte NaCl-Lösung, engl. Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
Poly(A)	Fragment aus vielen (poly) Adenin-Nukleotiden der mRNA

Ras	G-Protein Ras (Rat sarcoma), Proto-Onkogen
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion
RNase	Ribonukleasen
TIFF	Tagged Image File Format, Dateiformat für Bilddaten
TNF- $\alpha$	Tumornekrose-Faktor $\alpha$ , Zytokin des Immunsystems

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
Abbildung 1: Rechtes humanes Ohr mit dem äußeren Ohr, sowie Mittel- und Innenohr.....	1
Abbildung 2: Schematische Übersicht des knöchernen und häutigen Labyrinths .....	2
Abbildung 3: Längsschnitt durch eine menschliche Cochlea .....	3
Abbildung 4: Endorgane des Hörens .....	4
Abbildung 5: Aufbau der sensorischen Organe in den Bogengängen und der Makulaorgane des Sacculus und Utriculus.....	5
Abbildung 6: miRNA-Biogenese.....	11
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
Abbildung 7: Entnahme von Endo-/Perilymphe.....	22
Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antikörper, sowie deren Arbeitsverdünnung.....	25
Abbildung 8: Festphasen-Amplifikation zur Generierung von Millionen Template-Clustern .....	27
Abbildung 9: Vier-Farben zyklische reversible Terminator Methode .....	28
Abbildung 10: TruSeq® Small RNA Library Vorbereitung .....	29
Abbildung 11: Rotiphorese® Sequenzier-Gele .....	31
Abbildung 12: Scale-Up-PCRs auf 6 % Rotiphorese® Sequenzier-Gel .....	32
Tabelle 2: Protokolle der TruSeq® Small RNA Library Vorbereitung .....	33
Abbildung 13: Beispiele für Elektropherogramme des Agilent Bioanalyzer 2100 .....	35
Abbildung 14: Ablauf der TaqMan Advanced miRNA Assays.....	37
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
Abbildung 15: Vertikale Kryo-Sektion eines humanen Felsenbeines mit Kontrollfärbungen .....	41
Abbildung 16: Vertikale Kryo-Sektion eines humanen Felsenbeines, gefärbt mit einer humanen IgG Isotyp-Kontrolle.....	42
Abbildung 17: Vertikale Kryo-Sektion eines humanen Felsenbeines, gefärbt mit Seren von Patienten mit BPPV, BVP und Morbus Menière.....	44
Abbildung 18: Vertikale FFPE-Sektion eines humanen Felsenbeines mit Kontrollfärbungen.....	46
Abbildung 19: Vertikale FFPE-Sektion eines humanen Felsenbeines, gefärbt mit Seren von Patienten mit BPPV, BVP und Morbus Menière.....	47
Abbildung 20.1: Vertikale FFPE-Sektion eines humanen Felsenbeines, gefärbt mit Seren von Patienten mit BPPV und BVP .....	49



Abbildung 20.2: Fortführung Abbildung 20.1 mit vertikaler FFPE-Sektion gefärbt mit Serum von Morbus Menière Patienten, sowie der Statistik aller ausgezählten Schnitte .....	50
Abbildung 21: Top 10 der abundanten miRNAs der humanen Endo-/Perilymphe.....	51
Tabelle 3: Resultate der DESeq2-Untersuchung humaner Endo-/Perilymphe .....	52
Abbildung 22: Differenzielle, geschlechts-spezifische Unterschiede der humanen Endo-/Perilymphe.....	53
Abbildung 23: Farbkodierte Heatmap der differenziell exprimierten miRNAs im Vergleich von Endo-/Perilymphe und humanem Serum .....	55
Abbildung 24: Top 10 der abundanten miRNAs des humanen Serums .....	56
Abbildung 25: Differenzielle Expression von miRNAs im Vergleich von BVP gegen BPPV.....	57
Abbildung 26: Differenzielle Expression von miRNAs beim Vergleich von MM gegen BPPV .....	59
Abbildung 27: Differenzielle Expression von miRNAs beim Vergleich von MM gegen BVP .....	60
Tabelle 4: Änderungen der im RT-PCR-Screen verwendeten, differenziell exprimierten miRNAs.....	61
Tabelle 5: Referenzwerte der miRNAs, aufgeteilt nach Versuchsgruppen .....	62
Tabelle 6: Normalisierte Werte der miRNAs der 10 Blindproben.....	62
Tabelle 7: Ergebnisse der Blindproben mit Änderung gegen die Referenzwerte, sowie Einordnung in die Versuchsgruppen .....	62
Tabelle 8: Berechnung der relativen Transkript-Zahl.....	64
Abbildung 28: Ergebnisse des RT-PCR-Screens für die untersuchten miRNAs.....	66
<b>Anhang.....</b>	<b>91</b>
Abbildung Anhang 1: Horizontale FFPE-Sektion eines humanen Felsbeines, gefärbt mit Streptavidin-HRP, ohne primären und sekundären Antikörper.....	91
Tabelle 9: Primersequenzen für die TreSeq® Small RNA Library-Vorbereitung.....	91
Tabelle 10: Liste der rechtsmedizinischen Autopsie-Proben .....	93
Tabelle 11: Liste aller Serum-Proben der High-Throughput Sequenzierung.....	93

## Zusammenfassung

Mit einer Lebenszeitprävalenz von etwa 30 % sind Schwindelsymptome im klinischen Alltag sehr häufig zu finden. Die Kombination diverser sensorischer und motorischer Einflüsse, darunter die Beeinflussung der Raumwahrnehmung, eine Beeinträchtigung der Körperstabilität und die Wahrnehmung einer nicht existenten Bewegung, führen dabei zum Symptom Schwindel. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit drei peripheren Schwindelerkrankungen, also pathologisch das Innenohr betreffenden Krankheiten. Untersucht wurden die Patientengruppen (1) gutartiger paroxysmaler Lagerungsschwindel (BPPV), (2) bilaterale Vestibulopathie (BVP) und (3) Morbus Menière (MM). Der BPPV entsteht bei einer Ablösung von organischem Material im Innenohr und der Reizung der Sinnesepithelien der Vestibularorgane durch freies Umherschwimmen des Materials. Da bisher nur strukturelle Veränderungen, wie Schädel-Hirn-Traumata als Auslöser für diese Erkrankung bekannt sind, kann diese Erkrankung als Kontrollgruppe verwendet werden. BVP zeichnet sich durch einen Totalausfall der Vestibularorgane oder der Gleichgewichtsnerven aus. Neben ototoxischen Antibiotika werden zunehmend neurodegenerative oder autoimmune Ursachen diskutiert, hauptsächlich gestützt durch die im Einzelfall wirksame Behandlung mit Kortikosteroiden. Der Morbus Menière ist nach dem BPPV die zweithäufigste Schwindelerkrankung. Pathologisch lässt sich eine Vermehrung der Endolymphe in der Cochlea feststellen, wodurch die korrekte Reizweiterleitung an das Gehirn beeinträchtigt wird. Auch für den MM werden neben infektiösen Ursachen autoimmune oder degenerative Gründe aufgeführt. In diversen Studien konnten Antikörper im Serum von MM-Patienten gegen Innenohrstrukturen gefunden werden und stützen so die These einer Autoimmunerkrankung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Detektion von Autoantikörpern in Patientenseren auf Gewebsschnitten von *humanen* Innenohren. Das Gewebe wurde dazu mit Seren der drei Gruppen behandelt und auf IgG-spezifische Färbungen hin untersucht. Im Vergleich zur BPPV-Kontrollgruppe konnten keine gruppenspezifischen Unterschiede festgestellt werden. Bei allen Seren zeigten sich Färbungen der Neuronen des Nervus cochlearis, sowie des Osseum laminae spiralis und des Spiralligaments. Zusätzlich konnten in den Randbereichen des Felsenbeines markierte Osteone, sowie die umgebenden Osteozyten detektiert werden. Eine genauere Untersuchung der Neuronen des N. cochlearis konnte keine Unterschiede in der Verteilung von starken, schwachen und ungefärbten Neuronen innerhalb der drei Versuchsgruppen feststellen. In dieser Studie konnten somit keine Autoantikörper gegen Innenohrstrukturen detektiert werden. Auch Patienten, bei denen am ehesten von einer autoimmunen Genese der Erkrankung ausgegangen werden konnte, zeigten keine spezifischen Unterschiede bei ihrer Untersuchung auf den Gewebsschnitten.

Neben den Untersuchungen auf Autoantikörper sollte in dieser Studie auch die Verwendung von High-Throughput-Sequenzierungen bei peripheren Schwindelerkrankungen evaluiert werden.

Speziell wurden dazu miRNAs verwendet, kurze nicht-kodierende RNA-Fragmente, die eine besondere Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen. Für eine Vielzahl von Erkrankungen, darunter mehrere Krebsarten, aber auch systemische Erkrankungen, können miRNAs aus dem Serum von Patienten als Biomarker für diese Krankheiten genutzt werden. Ob miRNAs auch eine zusätzliche, neue Methode für die Diagnostik von Innenohrerkrankungen darstellen, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Es wurden verschiedene differenziell exprimierte miRNAs in den Seren der drei Versuchsgruppen detektiert und deren Verwendung für die Unterscheidung der Erkrankungen evaluiert. Durch die vorkommenden biologischen Schwankungen war eine Einordnung von Blindproben nur zu 60 % erfolgreich. Um die diagnostische Verwendung ausgewählter miRNAs zu bestimmen, wurden diese in allen untersuchten Seren zusätzlich noch einmal mittels einer miRNA-RT-PCR nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung konnten die High-Throughput-Resultate nicht bestätigen und können daher mit der gewählten Methode nicht für eine unterstützende Diagnostik im Rahmen der Patientenuntersuchung genutzt werden.

Zusätzlich wurde im Verlauf dieser Arbeit erstmalig das vollständige miRNA-Profil der humanen Innenohrflüssigkeiten bestimmt. Dazu wurde aus den Felsenbeinen im Rahmen von Autopsien die Endo-/Perilymphe extrahiert und alle vorkommenden miRNAs detektiert. Die am häufigsten gefundenen miRNAs sind für deren Funktion in der Zellzyklusregulation und Immunmodulation bekannt. Signifikante Unterschiede konnten auch im Vergleich der Innenohrflüssigkeiten mit dem humanen Serum festgestellt werden, wobei eine Vielzahl von miRNAs ausschließlich in der Endo-/Perilymphe zu finden waren. Das miRNA-Profil der humanen Innenohrflüssigkeiten ist somit einzigartig und unterscheidet sich stark von anderen Körperflüssigkeiten. Die vorliegende Arbeit kann als Grundlage für zukünftige Studien der Innenohrflüssigkeiten dienen, welche im Rahmen von operativen Eingriffen entnommen und krankheitsspezifisch untersucht werden können. Die hier angewendete Technik ist dabei nutzbar, um miRNAs aus Patienten mit vestibulären Erkrankungen zu detektieren und deren Verwendung als potentielle Biomarker für degenerative oder autoimmungesteuerte Krankheitsursachen zu evaluieren.

## Summary

With a lifetime prevalence of approximately 30 %, dizziness and vertigo are frequently found in clinical routine. The combination of several sensory and motor influences, like impact on spatial perception, impairment of body stability and perception of non-existent movement, lead to the symptom of vertigo. The present study focuses on three peripheral inner ear diseases. The following three patient cohorts were investigated: (1) benign paroxysmal positional vertigo (BPPV), (2) bilateral vestibulopathy (BVP) and (3) Menière's disease (MM). BPPV originates from the detachment of organic material in the inner ear and the subsequent excitation of the sensory epithelia of the vestibular system by the free-floating material. To date only structural changes like concussion are known as triggers for BPPV, thus making these patients an ideal control group for peripheral inner ear diseases. BVP is characterized by a complete failure of the vestibular organs or the vestibular nerves. Besides ototoxic antibiotics, there is mounting evidence that neurodegenerative or autoimmune causes can contribute to BVP. In individuals the treatment with corticosteroids is efficient to improve the disease. The second most common inner ear disease after BPPV is Menière's disease. Pathologic findings show an increase of endolymphatic fluid within the cochlea of these patients, resulting in an improper transmission of the sensory stimuli. As with BVP the causes of MM range from infections to autoimmune or degenerative ones. Several studies found antibodies against inner ear structures in the serum of MM patients and therefore support the thesis of MM as an autoimmune disease.

The aim of the present study was to detect autoantibodies in the serum of patients with the help of *human* inner ear sections. Therefore, the tissue was treated with sera of the three patient cohorts and IgG-specific stains were investigated. No group-specific differences were detected when compared to the BPPV-control group. All examined sera showed stains of the neurons of the nervus cochlearis, as well as of the spiral lamina of cochlea and the spiral ligament. Additional stains were detected in the periphery of the temporal bone and marked osteons and the surrounding osteocytes. Closer examination of the neurons of the n. cochlearis was not able to detect any variation in the distribution of strong, weak and unstained neurons within the three experimental cohorts. Taken together, the present study did not detect any autoantibodies against inner ear structures. Patients with a disorder most likely of autoimmune origin likewise showed no specific differences during the investigation of the inner ear sections.

In addition to examining autoantibodies, this study also evaluated the usage of high-throughput sequencing techniques in peripheral inner ear diseases. In particular, short non-coding RNA-fragments called miRNAs were used. The regulation of gene expression is heavily dependent on these miRNAs. They also serve as promising biomarkers in the patient sera for a variety of diseases including several cancers and systemic diseases. The study aimed to examine whether miRNAs can be

used as a reliable, new and additional diagnostic system for inner ear disorders. Several differentially expressed miRNAs were detected within the sera of the patient cohorts and their ability to discriminate the diseases was evaluated. Due to high biological variations, a randomized blind test was only 60 % successful at classifying the correct patient cohort. A second approach was to evaluate the usage of selected miRNAs for diagnostic purposes within the daily lab routine during an RT-PCR screen. The results of this experiment did not confirm those of the high-throughput sequencing. Therefore, this method is not suitable to support the routine diagnostics of the medical examination of patients with inner ear diseases.

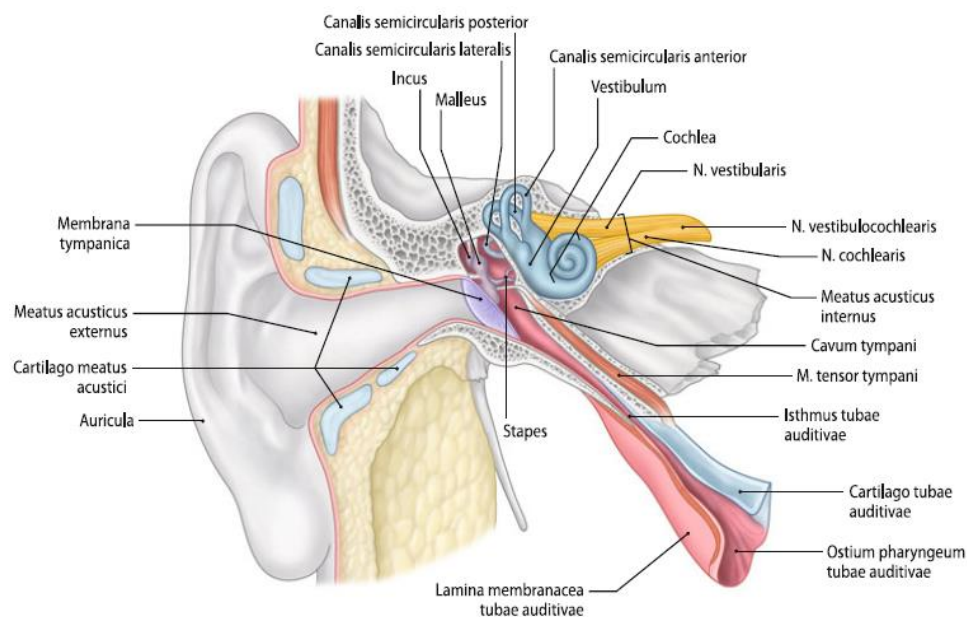
The present study also provides for the first time the complete miRNA profile of the human inner ear fluids, the endo- and perilymph. The inner ear fluids were extracted from the petrosal bone removed at autopsy and all occurring miRNAs were detected by high-throughput sequencing. The most frequent miRNAs are known for their function during cell cycle regulation and modulation of the immune system. Significant differences were also detected by comparing the inner ear fluids with the serum of BPPV patients, the control group used in this study. Therefore, one can state that the miRNA profile of the inner ear fluids is unique and distinct from serum. The present study can serve as a basis for further investigations of the inner ear fluids, in which they are collected within the scope of inner ear surgery and examined for specific diseases. The technique applied in this study can be used to detect inner ear miRNAs from patients suffering from inner ear disorders and to evaluate their use as biomarkers for degenerative or autoimmune mediated disease etiologies.

## Einleitung

### 1.1 Das humane Innenohr

#### 1.1.1 Anatomie

Das menschliche Ohr ist aus drei Abschnitten aufgebaut, dem äußeren Ohr, dem Mittelohr und dem Innenohr (Abbildung 1) (1-3). Dabei bilden die Ohrmuschel (*Auricula*), der äußere Gehörgang (*Meatus acusticus externus*) und das Trommelfell (*Membrana tympanica*) das äußere Ohr. Dessen Hauptfunktion besteht in der Weiterleitung der akustischen Signale an das Mittelohr. Das Mittelohr besteht aus den Hauptstrukturen der Paukenhöhle (*Cavum tympani*) sowie den drei Gehörknöchelchen, Hammer (*Malleus*), Amboss (*Incus*) und Steigbügel (*Stapes*). Die Gehörknöchelchen sind über feine Gelenke sowie Bänder und Muskeln miteinander verbunden und ermöglichen so eine koordinierte Bewegung (1). Die Transduktion der akustischen Signale erfolgt dabei durch die Übertragung der Schwingungen des Trommelfells, hervorgerufen durch Schallwellen, auf das mit dem Steigbügel verbundene ovale Fenster (*Fenestra vestibuli*) und die dahinter liegende Perilymphe. Die grundlegenden Prozesse für Hören und Gleichgewicht finden dabei im Innenohr statt.

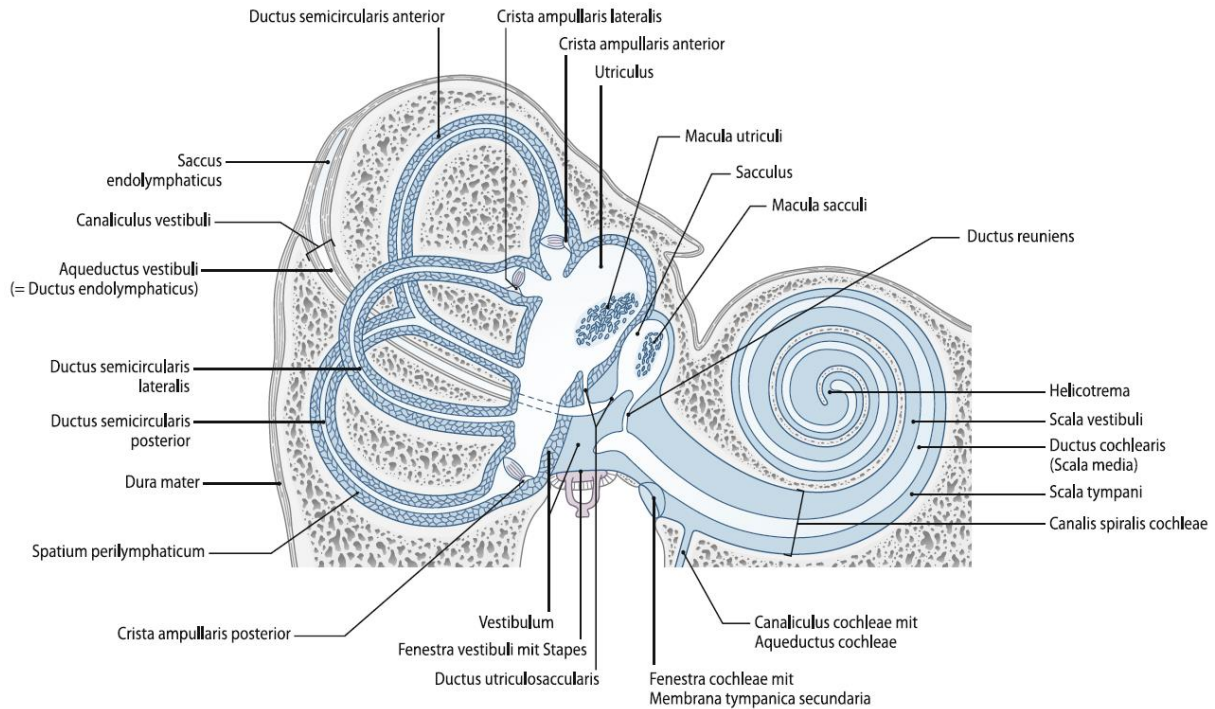


**Abbildung 1: Rechtes humanes Ohr mit dem äußeren Ohr, sowie Mittel- und Innenohr.** Sicht von vorne (aus (1), Seite 693). Abdruck genehmigt von Springer Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Anatomie, Kapitel 17 Nervensystem und Sinnesorgane, K. Amunts, I. Bechmann, R. Nitsch et al, Copyright 2010

Das menschliche Innenohr und auch das Mittelohr befinden sich im Felsenbein (*Pars petrosa*) als Teil des Schläfenbeines (*Os temporale*) auf beiden Seiten der Schädelbasis. Strukturell bildet das Felsenbein eine dreiseitige Pyramide, deren Spitze in Richtung rostromedial weist und dabei zum Teil in der mittleren, zum anderen in der hinteren Schädelgrube liegt (4). Das Innenohr selbst wird durch einen knöchernen Bereich (*Labyrinthus osseus*) gebildet, der das häutige Labyrinth (*Labyrinthus membranaceus*) umschließt. Das knöcherne Labyrinth gliedert sich in drei Abschnitte: den Vorhof (*Vestibulum*), die schneckenförmige Cochlea (*Cochlea*), sowie die drei nahezu kreisförmigen

## Einleitung

Bogengänge (*Canales semicirculares*) (3). Diese Bereiche bilden die strukturelle Grundlage für das mit Endolymphe gefüllte häutige Labyrinth, welches aus dem Sacculus und dem Utriculus, den drei Bogengängen, sowie dem Ductus cochlearis, auch Scala media genannt, besteht. Der Bereich zwischen den beiden Labyrinth ist ein mit Perilymphe gefüllter Bindegewebsraum (*Spatium perilymphaticum*) (5).



**Abbildung 2: Schematische Übersicht des knöchernen und häutigen Labyrinths.** Die Endolymphe ist weiß dargestellt, die Perilymphe blau (aus (1), Seite 699). Abdruck genehmigt von Springer Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Anatomie, Kapitel 17 Nervensystem und Sinnesorgane, K. Amunts, I. Bechmann, R. Nitsch et al, Copyright 2010

### 1.1.2 Physiologie

#### 1.1.2.1 Aufbau und Funktion der Cochlea

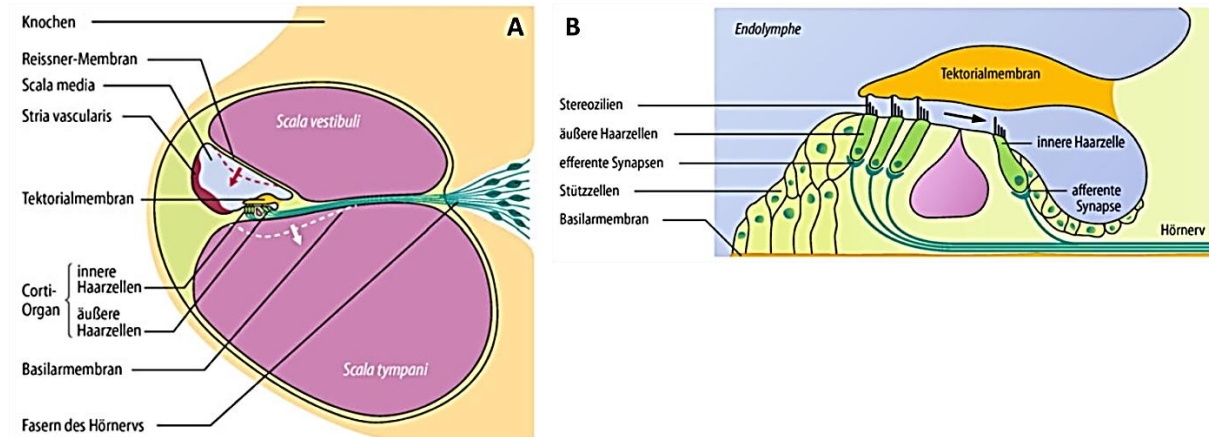
Die Cochlea im Innenohr bildet die strukturelle Grundlage des akustischen Systems und gliedert sich als spiralförmiges, gewundenes Schlauchsystem mit zweieinhalb Windungen in das Felsenbein ein. Die Gesamtlänge des cochleären Schlauchs beträgt etwa 22 mm (6). Der funktionelle Aufbau der Cochlea lässt sich am besten an einem Querschnitt erkennen (Abbildung 3), welcher drei flüssigkeitsgefüllte Schläuche erkennen lässt. Die mit Endolymphe gefüllte Scala media macht dabei nur den kleineren Teil des Querschnitts aus, während sie von den beiden mit Perilymphe gefüllten Scala vestibuli und Scala tympani begrenzt wird. Diese beiden bilden genau genommen einen einzigen Schlauch, da sie an der Spitze der Cochlea (*Helicotrema*) ineinander übergehen (1). Die Begrenzung des Perilymph-Raumes erfolgt auf der einen Seite durch das mit dem Mittelohr verbundene ovale Fenster (*Fenestra vestibuli*), auf der anderen Seite durch das runde Fenster (*Fenestra cochleae*) (Abbildung 2). Die Grenzschichten zwischen Perilymph-Raum und dem





## Einleitung

pendelt das System permanent zwischen Auslenkungszustand und Ruhezustand hin und her, wodurch ein ununterbrochenes Hören ermöglicht wird (12-14).

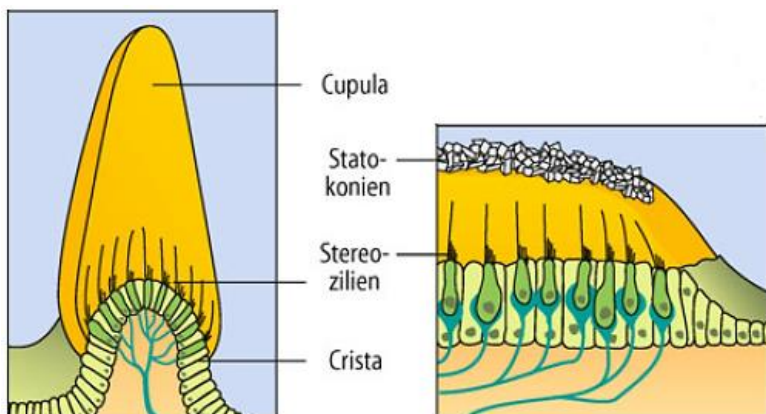


**Abbildung 4: Endorgane des Hörens** (aus (13), Seiten 322, 323). **A:** Querschnitt durch die Cochlea mit eingetragener Auslenkung der Reissner-Membran (roter Pfeil), sowie der Corti-Organ (weißer Pfeil) beim Übertragen der Schallenergie durch das Mittelohr. **B:** Querschnitt durch das Corti-Organ. Anordnung der äußeren und inneren Haarzellen mit efferenten und afferenten Nervenbahnen. Nur die äußeren Haarzellen haben Kontakt zur darüber liegenden Tektorialmembran. Die inneren Haarzellen werden durch die äußeren gesteuert. Abdruck genehmigt von Springer Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Physiologie des Menschen, Kapitel 16 Die Kommunikation des Menschen: Hören und Sprechen, H.P. Zenner, Copyright 31.Auflage 2010

Die Corti-Organen bestehen aus einzelnen Reihen äußerer Haarzellen, der darüber liegenden Tektorialmembran, dem subtektorialen Spalt sowie einer Reihe von inneren Haarzellen (Abbildung 4 B). Insgesamt reihen sich so etwa 15.000 Haarzellen entlang der cochleären Windungen aneinander (15). Der Name „Haarzelle“ leitet sich dabei von einer besonderen Struktur auf der Oberfläche der Zellen ab, nämlich etwa 100 Sinneshärchen (Stereozilien). Diese Stereozilien sind mechanosensitiv, das heißt, eine Auslenkung oder Deformation durch mechanischen Druck führt zu einem bestimmten intrazellulären Signal (16, 17). Beim Vorgang des Hörens führt die Auslenkung der Corti-Organen und der Tektorialmembran zu einer Stimulation der äußeren Haarzellen, wodurch die Zelle ihr Membranpotential ändert. Die inneren Haarzellen haben keinen Kontakt zur sich bewegenden Tektorialmembran, aber man vermutet, dass sich durch die Bewegung auch die Flüssigkeit im subtektorialen Spalt bewegt, was zu einer Abscherung der Stereozilien und damit zur Reizung führt (Abbildung 4 B, Pfeil) (12, 13). Die Haarzellen sind extrem sensibel und eine Auslenkung von etwa 1 nm reicht aus, um einen adäquaten Reiz zu setzen (18, 19). Die Bewegung der Stereozilien führt dabei zu einer Öffnung von mechanosensitiven  $K^+$ -Kanälen, wodurch  $K^+$ -Ionen in die Zellen einströmen und diese depolarisieren. Die Haarzellen reagieren daraufhin mit der Ausschüttung von Glutamat an die afferenten Nerven und damit mit einer Weitergabe der Schallinformation an das Gehirn über den VIII. Hirnnerv (1, 12, 13, 20). Die Repolarisation der Zellen erfolgt durch die Öffnung von  $K^+$ -induzierten  $K^+$ -Kanälen in den  $K^+$ -armen Perilymph-Raum, wodurch die  $K^+$ -Ionen aus der Zelle hinausströmen und der Ruhezustand wiederhergestellt wird (13).

## 1.1.2.2 Aufbau und Funktion des vestibulären Systems

Wie schon oben beschrieben, setzt sich das vestibuläre System aus den strukturellen knöchernen Bereichen des Vestibulums sowie den drei Bogengängen zusammen. Darin eingelagert liegen bei den Säugetieren die mit Endolymphe gefüllten, funktionellen Bereiche, der Sacculus und der Utriculus im Vestibulum sowie die Ductus semicirculares in den Bogengängen (Abbildung 2). Diese 5 Abschnitte enthalten die sensorischen Epithelien (21). Die grundlegende Funktion des vestibulären Systems ist die Detektion der Information, die zur Bestimmung der Ausrichtung und Lage des Kopfes im dreidimensionalen Raum benötigt werden. Dabei detektieren der Sacculus vertikale und der Utriculus horizontale Linearbeschleunigungen, zum Beispiel die Schwerkraft oder das Anfahren in einem Auto (22). Die Bogengänge hingegen sind für die Perzeption von Rotationsbewegungen zuständig. Durch die Lage der Bogengänge, sowohl im Kopf als auch zueinander, ist eine dreidimensionale Erkennung von Drehbewegungen möglich (23, 24). Die Sinnesorgane des Vestibulums und der Bogengänge besitzen einen unterschiedlichen systematischen Aufbau, aber die eigentlichen Sinneszellen sind bei beiden wieder Haarzellen, die denen in der Cochlea sehr ähnlich sind. Auch diese Zellen haben auf ihrer Zelloberfläche haarähnliche Fortsätze, die Stereozilien, zusätzlich aber auch noch ein längeres Kinozilium auf einer Zellseite (25). Anders als in der Cochlea ragen die Sinneshärchen in den Vestibularorganen in eine gallertartige, mukopolysaccharid-reiche Masse hinein (13). Diese Masse wird in den Bogengängen Cupula genannt, in den Makulaorganen des Sacculus und Utriculus Otolithenmembran, aufgrund eingelagerter Calciumcarbonat-Kristalle, die Statokonien. Umgeben werden die Sinnesorgane in den Bogengängen und im Vestibulum von Endolymphe (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Aufbau der sensorischen Organe in den Bogengängen (links) und der Makulaorgane des Sacculus und Utriculus (rechts)** (aus (13), Seite 338). Die Stereozilien der Sinneszellen ragen in eine gallertartige Masse (gelb) hinein. Abdruck genehmigt von Springer Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Physiologie des Menschen, Kapitel 17 Der Gleichgewichtssinn und die Bewegungs- und Lageempfindung des Menschen, H.P. Zenner, Copyright 31.Auflage 2010

Die Detektion von Translationsbeschleunigungen erfolgt durch die Reizung der Sinneshärchen in den Makulaorganen. Durch die aufgelagerten Statokonien erhöht sich das spezifische Gewicht der Otolithenmembran gegenüber der Endolymphe. Kopfbewegungen führen zu einer Bewegung der Endolymphe, die in den Otolithenmembranen nicht so stark ausfällt. Durch diese Bewegung werden die Stereozilien ausgeschert, was zu einer Reizübertragung führt (13). Bei einer aufrechten Kopfhaltung wird der senkrecht stehende Sacculus durch die stetige Schwerkraft permanent stimuliert und die Otolithenmembran ist leicht nach unten versetzt. Dementgegen wird der horizontale Utriculus durch die Schwerkraft nicht beeinflusst. Bei einer Lageänderung des Kopfes im Raum ändert sich der gravitative Einfluss auf die beiden Makulaorgane, was deren Stimulation und damit die Reizweiterleitung beeinflusst. Die Perzeption von Rotationsbewegungen erfolgt nach einem ähnlichen Prinzip. Die Cupula reicht dabei weit in den Bogengang hinein, eine direkte physische Verbindung konnte bisher allerdings noch nicht nachgewiesen werden (1). Da hier keine Statokonien zu finden sind, haben Cupula und Endolymphe die gleiche Dichte, weswegen sie sich bei Translationsbeschleunigungen gleich bewegen und keine Reizung erfolgt. Bei Drehbewegungen des Kopfes hingegen kommt es zu einer relativen Bewegung der Endolymphe, da diese aufgrund der Trägheit der Flüssigkeit gegenüber den knöchernen Bogengängen zurückbleibt. Da die Cupula und die Haarzellen fest mit dem Bogengang verbunden sind und dadurch mit bewegt werden, kommt es zu einer Verschiebung der Cupula und damit zum Ausscheren der Sinneshärchen (26). Durch die drei Bogengänge können Drehbewegungen räumlich wahrgenommen werden und die spezifischen Muster aller 6 Bogengänge werden im Gehirn weiterverarbeitet, um die Lage des Kopfes im Raum zu bestimmen. Sowohl bei Translations- als auch Rotationsbewegungen kann der Körper dabei nicht zwischen aktiver und passiver Bewegung (Fahrzeug, Drehstuhl) unterscheiden und eine entsprechende exogene Reizung der Nerven über Elektroden führt zu einer Wahrnehmung, auch wenn keine Bewegung stattfindet (24, 27).

## 1.2 Periphere Innenohr-Erkrankungen

Erkrankungen des Innenohres, begleitend mit dem Symptom Schwindel, sind im klinischen Alltag sehr häufig zu finden. Groß angelegte Studien zeigen, dass die Lebenszeitprävalenz, also die Wahrscheinlichkeit, einmal im Leben am Symptom Schwindel zu leiden, etwa 20-30 Prozent beträgt (28-30). Ein Schwindelanfall zeichnet sich durch eine Beeinflussung der Raumwahrnehmung, eine Beeinträchtigung der Körperstabilität und die Wahrnehmung einer nicht existierenden Bewegung aus. Unterschieden werden dabei Drehschwindel (Karussell fahren) oder Schwankschwindel (Boot fahren). Die Ursache dieser Wahrnehmung kann in allen Bereichen der Perzeption, Reizweiterleitung oder auch der Verarbeitung im Gehirn liegen. Dadurch lassen sich die Schwindelsymptome in zwei generelle Klassen einteilen: (1) periphere, also das Innenohr betreffende Erkrankungen und (2)

zentrale, also das Balance-System des zentralen Nervensystems betreffende (31, 32). Die in dieser Studie vorkommenden Erkrankungen sollen in den folgenden Abschnitten kurz beschrieben werden.

### **1.2.1 Gutartiger paroxysmaler Lagerungsschwindel (BPPV)**

Der BPPV ist mit einer Häufigkeit von 17.8 % die am häufigsten diagnostizierte Schwindelerkrankung in der Spezialambulanz des Klinikums der Universität München (32). Er zeichnet sich durch kurze Drehschwindelattacken, teilweise auch durch Übelkeit aus. Dabei tritt er nur bei Lageänderungen des Kopfes auf, zum Beispiel beim Hinlegen oder Aufsetzen im Bett oder auch beim Bücken. Pathophysiologisch lässt sich der BPPV am besten mit der Theorie von Brandt *et al.* erklären, die das freie Umherschwimmen von organischen Materialien und eine damit einhergehende Reizung der Sinnesepithelien in den Bogengängen als Ursache ansieht (33). Das organische Material kann dabei zum Teil aus Statokonen, also den Kristallen der Makulaorgane (Utriculus) bestehen, die sich zum Beispiel bei Schädel-Hirn-Traumata aus den Organen ablösen und so in den Bogengang geraten können. Neuere Untersuchungen zeigen auch Hinweise auf einen Einfluss von Osteoporose oder Diabetes mellitus auf die Entstehung von BPPV (34, 35). Zur Therapie des BPPV werden physikalische Kopfmanöver durchgeführt, mit dem Ziel das Konglomerat aus den Bogengängen auszuschwemmen und so eine neue Reizung der Cupula zu unterbinden (36-38). Da die Schwindelattacken beim BPPV ausschließlich durch freies Material im Bogengang ausgelöst werden, wurden Patienten mit dieser Erkrankung als Kontrollgruppe für die Arbeit ausgesucht.

### **1.2.2 Bilaterale Vestibulopathie**

Die bilaterale Vestibulopathie (BVP) ist mit 7.3 % eine recht häufige Ursache für eine Schwindelerkrankung (32). Dabei kommt es zu einer Störung beziehungsweise einem Totalausfall in beiden Vestibularorganen oder in den Gleichgewichtsnerve (39). Typische Symptome sind dabei ein Schwankschwindel, sowie Gangunsicherheiten und Fallneigung, die beim Laufen auftreten. In Ruhelage (Sitzen) herrscht meist Beschwerdefreiheit. Ein Teil der Patienten klagt außerdem über unscharfes Sehen während der Bewegung. Dabei wird eine Scheinbewegung der Umwelt wahrgenommen, da eine Fixierung auf einen festen Punkt durch das Auge nicht mehr möglich ist (Oszillopsie) (40). Der Krankheitsverlauf zeigt meist eine teilweise sehr langsame, fortschreitende Verschlechterung der Vestibularfunktion bis hin zum Ausfall auf, wobei die beiden Seiten unterschiedlich stark betroffen sein können. Eine Besserung der Funktionsdefizite wurde kaum beobachtet (41). Ätiologisch tritt BVP bei einer Reihe verschiedener Erkrankungen auf. Ursachen für die Entwicklung einer BVP können ototoxische Antibiotika, wie Gentamicin, sein oder das Auftreten eines Morbus Menière. Allerdings zeigen etwa 50 % der Patienten eine idiopathische BVP, bei der keine genaue Ursache gefunden werden kann (39). Auch die Bildung von Tumoren

(Vestibularisschwannom) oder verschiedene Autoimmunerkrankungen, z.B. Cogan-Syndrom, können eine BVP auslösen (32, 42). Des Weiteren finden sich bei BVP-Patienten oft auch zerebellare Störungen, bei denen von einer neurodegenerativen Erkrankung ausgegangen werden kann, die sowohl die Vestibularganglien, als auch das Balance-Zentrum des Gehirnes betreffen können. Diese Symptomkombination wird als CANVAS-Syndrom (Cerebellar Ataxia with Neuropathy and Vestibular Areflexia) bezeichnet und tritt bei etwa 20 % aller BVP-Fälle auf (43). Eine wichtige Maßnahme ist die Prävention, besonders bei der Verwendung von ototoxischen Antibiotika oder anderen Medikamenten, um eine BVP weitestgehend zu verhindern. Dazu zählt die Verwendung solcher Mittel nur bei dringender Indikation sowie unter strenger Überwachung. Bei potentiellen autoimmunen Ursachen für BVP kann auch eine Medikation mit Kortikosteroiden erfolgen, die aufgrund ihrer anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung die Fortschreitung der Krankheit verzögern können, wobei deren Wirkung noch nicht sicher geklärt ist (44, 45). Bei fortschreitender BVP wird ein physikalisches Training zur Kompensation des Vestibularausfalls immer wichtiger, um so den visuellen und somatosensorischen Input für die Stabilisation der Körperhaltung zu nutzen. Besonders bei einseitigen Ausfällen konnte eine Wirksamkeit dieser Therapie belegt werden (46-48).

### **1.2.3 Morbus Menière**

In der Ambulanz des Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrums führen etwa 10 % aller Schwindelsymptome zu der abschließenden Diagnose eines Morbus Menière (MM). Damit ist der MM nach dem BPPV die zweihäufigste periphere Innenohrerkrankung (32). Der MM ist durch spontane, immer wiederkehrende Drehschwindelattacken mit begleitender Hörminderung und Tinnitus gekennzeichnet (49). Diese Attacken können zwischen 20 Minuten, aber auch bis zu 12 Stunden andauern. Zumeist treten die Beschwerden unilateral auf, verlagern sich aber im Laufe der Erkrankung meist auf beide Seiten (50). Pathophysiologisch findet sich beim Morbus Menière ein Endolymph-Hydrops, also eine Flüssigkeitsansammlung von Endolymph im Labyrinth (51, 52). Dabei wird entweder zu viel Endolymph produziert oder zu wenig resorbiert, was den Druck auf die Reissner-Membran der Scala media erhöht. Dies kann entweder zu einer Ruptur derselben führen, aber auch die Aktivierung von drucksensitiven Ionenkanälen in der Membran wurde bereits nachgewiesen (53). Im Folgenden wird der streng regulierte Ionenhaushalt der Cochlea gestört und der physiologisch K<sup>+</sup>-arme Perilymph-Raum wird mit K<sup>+</sup>-Ionen aus der Endolymph gefüllt. Durch diese Störung der Ionen-Homöostase und der damit einhergehenden Beeinflussung des elektrochemischen Potentials zwischen Endo- und Perilymph kommt es zu einer Fehlweiterleitung von Signalen aus der Cochlea an das Hörzentrum im Gehirn. Diese werden vom Patienten dann als Hörminderung oder Tinnitus wahrgenommen (32). Die Ursachen für die Bildung des Endolymph-

## Einleitung

Hydrops sind noch nicht abschließend geklärt. Neue Studien richten ihr Augenmerk auf verschiedene infektiöse Modelle, aber auch autoimmunologische Ursachen wurden bereits untersucht. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass Patienten mit MM eine stark verringerte Anzahl an Haarzellen, sowohl in der Cochlea, als auch in den Bogengängen aufwiesen (54). Außerdem konnten einige histopathologische Studien nachweisen, dass auch die Anzahl an Neuronen des Vestibularganglions, sowie die Anzahl an vorhandenen Synapsen reduziert waren (55, 56). Dass der endolymphatische Sack, ein Ableitungskanal für die Endolymphe, den Ort eines lokal agierenden Immunsystems bildet, steht daher in engem Zusammenhang mit möglichen degenerativen Vorgängen durch Infektionen oder Autoimmunitäten (57, 58). Bei post-mortem Studien mit humanen Innenohren wurden verschiedene Viren, sowie Antikörper gegen einige Viren gefunden, darunter Viren des Typus *Herpes simplex* und *Varizella zoster* (59, 60). Dass diese Viren die Vestibularganglien im Menschen befallen können, ist bekannt und eine Reaktivierung kann im Zuge der Immunantwort die Zerstörung der Vestibularganglien zur Folge haben (61, 62). Eine antivirale Therapie in Patienten mit MM konnte bei 91 % eine Verbesserung der Schwindelattacken belegen, was eine infektiöse Ursache für einige Fälle von Morbus Menière wahrscheinlich macht (63). Andere Fälle von MM zeigten eine Verbesserung nach der Gabe von Steroidhormonen, die auf deren immunsuppressive Wirkung zurückzuführen ist (64). Allerdings zeigten einige retrospektive Studien nur einen geringen Hinweis auf die Wirksamkeit dieser Glukokortikoide (32). Theorien zu einer immunologischen Ursache des MM berufen sich auf die Spezifität von Antigenen des Innenohres sowie die Tatsache, dass das Innenohr ein in sich abgeschlossener Bereich des Körpers ist. Daher sind mögliche Antigene nur im Innenohr zu finden und werden vom restlichen Immunsystem des Körpers als fremd und potentiell schädlich erkannt, was deren immunologische Bekämpfung zur Folge hat (65, 66). Schon vor Jahrzehnten wurden in Tiermodellen (Ratte, Rind) einige solcher Antigene beschrieben, darunter Proteine mit der Molekulargröße 68 kDa, auf die das Serum von MM-Patienten positiv reagierte (67, 68). Eine erneute Untersuchung des 68 kDa Antigens, auch bekannt als Heat-Shock-Protein 70 (Hsp70), ergab, dass der Informationsgehalt dieser Untersuchungen recht gering war, da auch gesunde Kontrollpatienten zu einem hohen Prozentsatz Antikörper im Serum aufwiesen (69). Derzeit werden immunologische Ursachen ausschließlich auf die Wirkung der Glukokortikoide sowie einige genetische Faktoren und positive Familienanamnesen gestützt. Eine weitere Therapiemöglichkeit für MM-Patienten besteht in der intratympanalen Gabe von Gentamycin zur Zerstörung der vestibulären Haarzellen, um die Schwindelanfälle durch die Zerstörung der peripheren Vestibularorgane zu verhindern (70). Da diese Therapie bei etwa 20 % aller Fälle eine begleitende Hörschädigung nach sich zieht, wird empfohlen, diese nur bei Patienten mit schon vorhandener Hörminderung anzuwenden (71). Die Behandlung von MM-Patienten mit Betahistin zeigt einen offensichtlichen prophylaktischen Effekt auf die Attacken-Frequenz. Randomisierte Doppelblindstudien wurden

allerdings noch nicht durchgeführt, sondern die Wirksamkeit beruht auf klinischen Beobachtungen (72). Man vermutet, dass durch Betahistin der Blutfluss im Innenohr erhöht wird, wodurch das Ungleichgewicht zwischen Produktion und Resorption der Endolymphe positiv beeinflusst wird (73).

### 1.3 Humane miRNAs

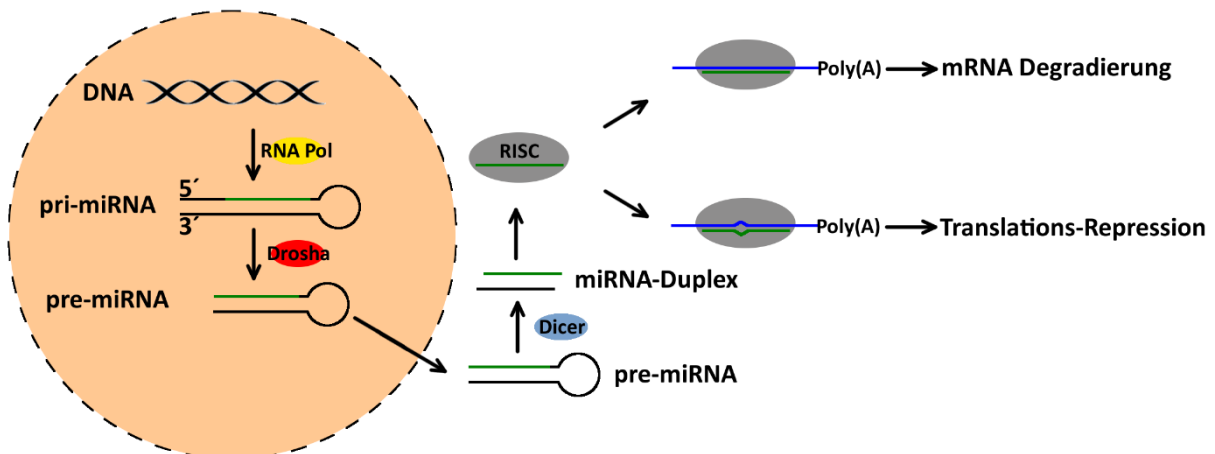
#### 1.3.1 Ursprung und Funktion

Die Forschung an micro-RNAs (miRNAs) begann mit der Entdeckung kurzer Ribonukleinsäure-Fragmente (RNA), die keine Proteine kodierte, aber trotzdem eine zelluläre Funktion ausüben konnten (74). Diese 19-24 Nukleotide langen RNA-Fragmente wurden zunächst nur in *C. elegans* gefunden und dort im Zusammenhang mit der Entwicklung der Nematoden untersucht. Anfang des neuen Jahrtausends wurden Homologe einiger dieser miRNAs sowohl bei der Fruchtfliege *D. melanogaster* als auch im menschlichen Genom detektiert (75). Sehr schnell wuchs die Anzahl der miRNAs in den Genomen auf mehrere Hundert an, wobei nicht nur entwicklungspezifische, sondern auch zelltypspezifische miRNAs detektiert wurden (76, 77). Viele miRNAs zeigten hochspezifische Expressionsmuster, die nur zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung oder in bestimmten Gewebe-/Zelltypen auftraten. Auch die Anzahl an miRNA-Transkripten einzelner miRNAs konnte innerhalb einer Zelle von einigen zehn bis hin zu mehreren zehntausend reichen (77, 78). Studien zur Funktion dieser miRNAs beschrieben eine post-transkriptionelle Regulation durch die negative Regulation der mRNA-Expression (79, 80).

Die Biogenese der funktionellen miRNAs beginnt mit der Expression aus dem Genom [Reviews (81, 82)]. Die miRNA-kodierenden Gene liegen dabei häufig in Introns anderer Gene, können aber unabhängig von diesen exprimiert werden (83, 84). Zunächst werden die pri-miRNAs aus dem Genom abgelesen, wodurch Fragmente von mehreren hundert Basenpaaren gebildet werden. Noch im Nukleus werden diese durch die Drosha RNase III prozessiert, was die pre-miRNAs zur Folge hat. Diese 60-70 Nukleotide langen Fragmente bilden einen Stem-Loop als Intermediärstruktur und werden danach aus dem Zellkern exportiert (85). Im Zytoplasma werden diese pre-miRNAs durch die RNase III Dicer in einen 19-24 Nukleotid langen Doppelstrang gespalten (86). Dieser RNA-Duplex wird anschließend zusammen mit AGO-Proteinen zu einem Komplex zusammengelagert, dem miRNA-induced silencing complex (miRISC) (87). Das humane Genom kodiert für 4 AGO-Proteine, die alle zusammen mit den miRNAs den miRISC bilden können. Dabei besitzt AGO2 als einziges eine Endonuklease-Aktivität, die eine Spaltung der Ziel-mRNA steuern kann (88). Nach der Beladung der AGO-Proteine mit dem miRNA-Duplex wird ein Strang abgespalten und höchstwahrscheinlich schnell degradiert, während der andere, die reife (mature) miRNA, für die komplementäre Erkennung der Ziel-mRNA genutzt wird. Der fertige miRISC-Komplex kann die Translation der mRNAs in verschiedener Weise regulieren (Abbildung 6).

## Einleitung

Bei einer miRISC-Bildung mit dem AGO2-Protein und einer hohen Komplementarität zwischen miRNA und mRNA kommt es zu einer Spaltung der mRNA durch die AGO2-Endonuklease-Aktivität, deren Fragmente danach schnell durch zytoplasmatische Exonukleasen degradiert werden (89). Bei einer geringeren Komplementarität zwischen miRNA und mRNA kommt es zu einer translationalen Repression entweder durch eine Inhibierung der Translation oder Verstärkung der mRNA-Degradierung. Bei der Translationsinhibierung wird vermutet, dass die Ribosomen an der mRNA entweder komplett aufgehalten oder so stark verlangsamt werden, dass das entstehende Protein schneller degradiert als gebildet wird (90). Die Komplexität der miRNA:mRNA-Regulation wird durch die komplementäre Erkennung der Ziel-mRNA weiter erhöht. Studien belegen, dass nur ein kurzer Abschnitt der miRNA tatsächlich für die Erkennung der Ziel-mRNA genutzt wird. Diese Seed-Region ist meist sechs Nukleotide lang, aber auch acht Nukleotid lange Basenpaarungen zwischen miRNA:mRNA wurden schon beschrieben (91). Untersuchungen verschiedener Spezies ergaben, dass diese Seed-Regionen bei homologen miRNAs hochgradig konserviert sind (78). Zumeist finden sich die komplementären Abschnitte zur miRNA-Seed-Region in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) der Ziel-mRNA. Durch die kurzen Seed-Regionen sowie der Möglichkeit einer imperfekten Komplementarität können einzelne miRNAs eine Vielzahl an unterschiedlichen mRNAs als Ziel haben (92). Gleichzeitig können einzelne mRNAs in ihrer 3'UTR mehrere Bindestellen für eine oder auch mehrere verschiedene miRNAs aufweisen, was eine komplexe Regulation auf post-transkriptioneller Ebene ermöglicht.



**Abbildung 6: miRNA-Biogenese.** Transkription und intranukleäre Prozessierung zur Stem-Loop-Intermediärstruktur. Export aus dem Zellkern und Spaltung durch RNAse III Dicer zum miRNA-Duplex. Einlagerung der reifen miRNA in den RISC-Komplex zur komplementären Erkennung der Ziel-mRNA. Je nach Komplementarität wird die Ziel-mRNA entweder degradiert oder die Translation reprimiert.



Neben den Studien zur Wirkungsweise der miRNAs wurden auch die Funktionen diverser miRNAs auf zellulärer Ebene untersucht. Gefunden wurden die miRNAs bei Untersuchungen zur Entwicklung von *C. elegans*, wo diese die zeitliche Entwicklung steuern. Dabei wirken die miRNAs an Prozessen zur Kontrolle der Stammzell-Differenzierung oder auch bei der korrekten Differenzierung von Zellen zur Organogenese mit (93). Andere miRNAs sind in die Regulation des Zellwachstums oder des programmierten Zelltodes involviert (94). Fehlfunktionen von miRNAs, also die Fehlregulation von bestimmten Genen, spielen daher eine immer größere Rolle im Verständnis von Krankheiten. MiRNAs, die bei der Kontrolle des Zellwachstums mitwirken, zeigen in einigen Tumoren eine Fehlfunktion. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass eine Überexpression der miRNA miR-17 die Tumorentwicklung eines B-Zell-Lymphoms deutlich beschleunigt und damit onkogenes Potential besitzt (95).

### 1.3.2 Extrazelluläre miRNAs

Extrazelluläre miRNAs wurden nahezu gleichzeitig durch zwei Arbeitsgruppen entdeckt. Einmal wurden miRNAs im Blutplasma aus der Plazenta gefunden, andererseits detektierten Forscher tumorspezifische miRNAs im Serum von Patienten (96, 97). Schnell wurde bekannt, dass nahezu alle Bioflüssigkeiten miRNAs enthielten, darunter Tränen, Speichel, Urin oder auch die Zerebrospinalflüssigkeit (98). Untersuchungen an Patienten belegten, dass sich die miRNA-Profile bei vielen Krankheiten von denen gesunder Kontrollprobanden deutlich unterschieden. Seitdem wurden viele extrazelluläre miRNAs als Biomarker für bestimmte Krankheiten detektiert und verwendet (98, 99). Im Rahmen der Untersuchungen stellte sich heraus, dass miRNAs in verschiedenen Varianten in extrazellulären Flüssigkeiten vorkommen. Zum einem wurde nachgewiesen, dass sich miRNAs in Exosomen, Mikrovesikeln und apoptotischen Körperchen anreichern, die von den Zellen im Zuge ihrer normalen zellulären Funktion gebildet werden. Zum anderen fand sich eine große Population an miRNAs, die nur an AGO-Proteine gebunden war und frei im Serum und Plasma vorkamen (100, 101).

Durch die Detektion von miRNAs in Exosomen und Mikrovesikeln kam die Frage auf, ob es selektive Sekretionswege in den Zellen gibt, um spezifische miRNAs auszuschleusen und ob diese miRNAs eine extrazelluläre Funktion übernehmen können. Zahlreiche *in vitro* Studien konnten nachweisen, dass ein interzellulärer Transport von miRNAs in Mikrovesikeln möglich ist. Gleichzeitig konnte eine Änderung der Genexpression in den Empfänger-Zellen festgestellt werden (100, 102). Die Frage nach einem selektiven Sekretionsweg bleibt allerdings bis heute unbeantwortet, jedoch konnten erste Indizien hierfür gefunden werden (103). Ein funktioneller Einfluss von extrazellulären miRNAs wurde unter anderem für Immunprozesse und die Tumorprogression beschrieben. Eine neue Studie konnte nachweisen, dass zwei immunregulatorische miRNAs (miR-155 und miR-146a) in Exosomen vorkommen, zwischen dendritischen Zellen ausgetauscht werden und die Empfänger-

Zellen modulieren können (104). Bei Untersuchungen einer humanen Glioblastom-Zelllinie wurden tumorspezifische miRNAs in Mikrovesikeln detektiert, die wiederum die Proliferation der Gliazellen anregen konnten. Außerdem wurde die Sekretion von tumorsuppressiven miRNAs aus gastrischen Tumorzellen beobachtet (105, 106).

Neben der Hypothese einer potentiellen Zell-Zell-Kommunikation finden sich viele Unterstützer einer Hypothese, die extrazelluläre miRNAs nur als Nebenprodukt der physiologischen und pathologischen Zellfunktion ansehen. Vor allem die AGO-gebundenen miRNAs können im Rahmen der Apoptose oder einer Ruptur der Zellmembran in den extrazellulären Raum gelangen. Belege für diese Theorie basieren auf der außerordentlichen Stabilität von AGO:miRNA-Komplexen gegenüber extrazellulären Nukleasen und damit deren Langlebigkeit, die auch nach Monaten der Aufbewahrung bei Raumtemperatur noch gegeben war (107). Des Weiteren zeigten Studien, dass die Konzentration von gewebsspezifischen miRNAs nach Verletzungen von Leber, Herz und Gehirn im Serum von Patienten stark anstieg, was eine passive Freisetzung bei Zellschäden impliziert (108). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass AGO:miRNA-Komplexe im Rahmen der Mikrovesikel-Bildung als passive Inhaltsstoffe des aufgenommenen Zytosols in diesen vorkommen. Einer physiologischen Funktion von extrazellulären miRNAs widersprechen auch Studien zur Bestimmung der Konzentrationen im Blutplasma und Serum. Während intrazellulär etwa 1000 Kopien der miRNA für eine signifikante Genregulation notwendig sind, kommen im Blutplasma statistisch gesehen weniger als eine miRNA pro Zellvolumen vor. Die dadurch erreichte Konzentration liegt weit unter der, die hochpotente Hormone erreichen müssen, um gerade noch wirksam zu sein (109-111). Und auch die Konzentration von miRNAs in Exosomen ist zu gering, um eine physiologische Funktion zu erreichen. Im Durchschnitt kommt auf 100 Exosome gerade einmal eine Kopie einer einzelnen miRNA. Daher scheinen Exosomen nicht in der Lage zu sein genügend miRNAs zu transportieren, um *in vivo* einen funktionellen, interzellulären Mechanismus zu gewährleisten (112). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die biologische Rolle extrazellulärer miRNAs weiterhin nicht geklärt ist, da sowohl Hinweise auf eine Zell-Zell-Kommunikation bestehen, aber viele Studien extrazelluläre miRNAs nur als Nebenprodukte in Körperflüssigkeiten ansehen.

### 1.3.3 miRNAs im Ohr

Bei Untersuchungen von miRNAs mit einer entwicklungspezifischen Rolle in Zebrafischen konnten diese auch im Innenohr nachgewiesen werden. Besonders eine spezielle miRNA-Triade aus miR-96, miR-182 und miR-183 wurde detektiert, die in den Haarzellen und Innenohrneuronen exprimiert wurde (113). Es folgten weitere Studien zur Entwicklung des Innenohres im Mausmodell, wobei die gewebsspezifischen und zeitenspezifischen Expressionsmuster verschiedener miRNAs aufgezeichnet wurden (114). Der miRNA-Cluster (96, 182, 183) konnte auch hier gewebsspezifisch in

den Haarzellen der Cochlea und des Vestibulums, sowie in den Neuronen der Spiral- und Vestibularganglien nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen dieses Clusters konnten die Wichtigkeit dieser miRNAs in der korrekten Entwicklung des Innenohres, speziell der Haarzellen aufzeigen. Konditionale Knock-Out-Mäuse, bei denen die Dicer-Prozessierung der miRNAs ausgeschaltet wurde, zeigten schwere Defekte in der Morphogenese des Innenohres und der Cochlea (115). Ein spezielleres Knock-Out-System mit der Abschaltung von Dicer in den Haarzellen führte zur Taubheit der Mäuse. Eine morphologische Untersuchung der Haarzellen zeigte sowohl eine Deformation der Haarzellen als auch den vollständigen Verlust der Stereozilien (116). Die Besonderheit der miR-96 wird deutlich, da Mutationen in der Seed-Region, also in der Zielerkennung, zu einer erblich und genetisch bedingten Form des Hörverlustes führen können (117). Untersuchungen zum pathologischen Verlust von Haarzellen im Rahmen eines altersbedingten Hörverlustes konnten nachweisen, dass pro-apoptische miRNAs im Alter verstärkt exprimiert wurden, während die Expression von pro-proliferativen miRNAs deutlich abnahm (118). Daher lässt sich sagen, dass die regulatorische Funktion der miRNAs auch im Innenohr stattfindet und dort Prozesse wie die Entwicklung, Zelldifferenzierung und Homöostase die Zellfunktionen steuert.

## **1.4 Autoimmunität im Menschen**

### **1.4.1 Einleitung Immunsystem**

Das Immunsystem schützt den Körper durch die Steuerung der Abwehr gegen pathogene Erreger und exogene Fremdstoffe. Dazu gehört der Schutz gegen Erreger aller Arten, wie Bakterien, Viren und Pilze, aber auch gegen Giftstoffe. Nicht nur exogene Fremdkörper können den Körper schädigen, auch endogene Faktoren, wie tote Zellen oder Tumorzellen müssen vom Körper beseitigt werden. Dazu nutzt der Körper ein kompliziertes System aus Immunzellen, aktivierenden und inhibierenden Faktoren, Antikörpern und physikalischen Mechanismen, um eine Schädigung des Organismus zu verhindern (119).

Die erste Verteidigungslinie des Körpers hat die Aufgabe, das Eindringen von Erregern in den Körper zu verhindern. Dazu gehört die physikalische Hautbarriere, die aufgrund ihrer Epithelstruktur das Durchdringen von Pathogenen verhindern kann. Auch die Schleimhäute der Atemwege mit antibakteriellen Substanzen sowie die Flimmerhärchen der Bronchien dienen einer ersten Abwehr gegen Erreger. Sollten trotzdem Fremdstoffe in den Körper eindringen, etwa durch Hautverletzungen, geht dies meist mit der Zerstörung lokaler Körperzellen einher. Dies löst im Körper eine Aktivierung lokaler Immunzellen aus und das Immunsystem beginnt mit der Bekämpfung der Infektion. Dabei spielen sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem eine tragende Rolle (120). Dem angeborenen Immunsystem unterstehen unter anderem alle Arten von Phagozyten. Deren primäre Funktion ist die Erkennung von körperfremden Zellen, deren Phagozytose und

## Einleitung

Zerstörung im Zellinneren. Dazu gehören Granulozyten, aber auch antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen. Nach der Zerstörung von Pathogenen werden deren Abbauprodukte auf der Zelloberfläche präsentiert und erlauben so die Aktivierung und Rekrutierung weiterer Immunzellen zum Infektionsort (121). Auch die natürlichen Killerzellen (NKs) tragen einen Teil zur Immunabwehr bei. Diese erkennen infizierte Zellen, schalten diese durch zytotoxische Substanzen aus und aktivieren weitere Immunzellen. Dabei hilft ihnen die Erkennung von durch Infektionen veränderten Zelloberflächenstrukturen der MHC-Klasse-I-Moleküle, die auf nahezu allen körpereigenen Zellen exprimiert werden. Diese präsentieren ein Abbild aller in der Zelle synthetisierten Proteine, wobei aktive Infektionen neue, körperfremde Proteine bilden (122). Einige Viren und Tumore können die Expression von MHC-I-Molekülen herunterregulieren, um einer Immunantwort zu entgehen, werden dadurch aber anfälliger für NK-Zellen (119). Neben den zellulären Faktoren gibt es eine Vielzahl löslicher Komponenten (Zytokine, Chemokine), die von Immunzellen ausgeschüttet werden und zur Kommunikation mit anderen Immunzellen dienen. Diese werden sowohl zur Aktivierung als auch Rekrutierung und als Schnittstelle zum erworbenen Immunsystem verwendet.

Das erworbene Immunsystem besteht hauptsächlich aus B- und T-Zellen, die hochgradig spezifisch auf Erreger reagieren können und das Immungedächtnis zur Immunität gegen Re-Infektionen ausbilden. Die T-Zellen reifen im Thymus heran und werden dort doppelt selektioniert. Einmal wird getestet, ob sie an die MHC-Moleküle von Zellen binden können, danach, ob sie auf körpereigene Antigene reagieren. In diesem Fall werden die autoreaktiven T-Zellen abgetötet, da sie für den Körper potentiell schädlich sind. Man unterscheidet zytotoxische T-Zellen ( $CD8^+$ ), die auf MHC-I-Moleküle reagieren und so den Infektionsstatus ähnlich wie NK-Zellen erkennen. Daneben gibt es T-Helferzellen ( $CD4^+$ ), die Antigene auf MHC-II-Molekülen erkennen. MHC-II-Moleküle werden von antigen-präsentierenden Zellen (u.a. Makrophagen) gebildet und zeigen extrazelluläre Erreger im Körper an. T-Helferzellen schütten daraufhin Zytokine aus und tragen so zur Immunkoordination bei (119, 120, 123). B-Zellen werden bei ihrer Reifung im Knochenmark genau wie T-Zellen doppelt selektioniert. Da B-Zellen die Entstehungsorte der Antikörper sind, wird zunächst überprüft, ob ein funktioneller Antikörper in der Zelle gebildet werden kann, danach ob sie an körpereigene Antigene binden. Dadurch können autoreaktive B-Zellen frühzeitig erkannt und abgetötet werden. Naive, fertige B-Zellen können danach unter der Aktivierung durch T-Helferzellen spezifische Antikörper gegen fremde Antigene bilden und in den Körper ausschütten. Diese Antikörper können dann im entzündeten Gewebe an ihr entsprechendes Antigen binden und so zum Beispiel eine Infektion von Zellen verhindern oder umgebende Immunzellen auf das Pathogen aufmerksam machen. Ein Teil der B-Zellen entwickelt sich zu Gedächtniszellen weiter, die das Immungedächtnis bilden. Damit kann bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen eine schnellere und spezifischere Immunantwort ausgelöst werden (124, 125).

### 1.4.2 Autoimmunität

Die oben beschriebenen Selektionsmechanismen bei der Entwicklung von T- und B-Zellen werden auch zentrale Toleranz genannt. Ziel ist die Verhinderung von autoreaktiven Zellen. Sollten diese Mechanismen einer erlernten Selbst-Toleranz versagen, können autoreaktive Zellen im Körper freigesetzt werden, die wiederum körpereigene Zellen angreifen. Neben der zentralen Toleranz können autoreaktive Zellen noch durch die periphere Toleranz abgeschaltet werden (126). Bei einer Erkennung eines Autoantigens ohne Infektion im Körper fehlen pro-inflammatorische Komponenten wie Zytokine, wodurch eine verstärkende Aktivierung der autoreaktiven Zellen ausbleibt. Dies führt zum Abschalten der Zellen und zur Verhinderung einer Autoimmunität. Doch auch beide Toleranzmechanismen können autoreaktive Zellen nicht immer verhindern. Deren Angriffe führen zu einer Vielzahl von chronischen Erkrankungen, die häufig ganze Gewebearten oder Organe betreffen und autoimmune Erkrankungen genannt werden. Auch Allergien gehören im weitesten Sinne zu Autoimmundefekten, da hier der Körper unverhältnismäßig stark gegen eigentlich ungefährliche Antigene, wie Pollen, Medikamente oder Nahrungsmittel reagiert (127).

Defekte in der Selbst-Toleranz sind häufig nicht die grundlegende Ursache dieser Erkrankungen. Zumeist spielen andere Faktoren eine Rolle, die sich durch diese Defekte bemerkbar machen. So können genetische Prädispositionen, also bestimmte genetische Anlagen, durch fehlerhafte oder nicht-funktionelle Proteine die zentrale oder periphere Toleranz stören. So können Mutationen in Transkriptionsfaktoren die T-Zell-Differenzierung beeinflussen oder eine Störung der Expression von Zytokinen und ko-stimulierenden Faktoren zu einer Gewebsschädigung führen. Sehr häufig sind geringfügige Mutationen der MHC-Proteine Auslöser für Immunerkrankungen. Ein Beispiel für solche Erkrankungen ist die rheumatoide Arthritis, welche sich durch chronische Gelenkentzündungen manifestiert. Auch bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ-I wird oft eine spezifische MHC-Kombination vorgefunden, die die autoreaktive Zerstörung der  $\beta$ -Zellen im Pankreas und somit einen Insulinmangel auslöst. Eine Vielzahl von Untersuchungen konnte auch die Beteiligung von Hormonen, besonders der Sexualhormone Östrogen und Testosteron, an Autoimmundefekten belegen. So steuert Östrogen sowohl die Thymus-Entwicklung als auch die B-Zell-Regulation, was zu einer Erhöhung der B-Zell-Aktivität und damit zu mehr Antikörpern führen kann (128). Da Östrogen das Hauptsexualhormon bei Frauen ist, erklärt sich auch die leichte Prävalenz (65 %) von Autoimmunerkrankungen in jungen Frauen, besonders in Phasen hormoneller Umstellungen (127). Neben diesen endogenen Faktoren spielen auch exogene Faktoren, wie bakterielle und virale Infektionen eine Rolle in der Entwicklung von autoimmunen Defekten. Das bei Infektionen aktivierte Immunsystem kann durch bestimmte Eigenschaften der exogenen Proteine auf den eigenen Körper fehlgeleitet werden. Molekulares Mimikry besteht, wenn Proteine von Pathogenen teilweise Strukturen von körpereigenen Antigenen aufweisen. Dieser Mechanismus

dient eigentlich dem Schutz der Erreger, kann aber bei der Herstellung von Antikörpern dazu führen, dass körpereigene Strukturen mit erkannt werden. Zum Beispiel kann eine Infektion mit dem Scharlach-Erreger *S. pyogenes* zu einer autoreaktiven Schädigung der Herzklappen führen (129). Auch die infektionsbedingte Nekrose der Zellen, besonders bei viralen Infektionen, kann zu einer Freisetzung von normalerweise vom Immunsystem abgeschirmten Antigenen führen, die dann als fremd erkannt werden und autoreaktive Mechanismen auslösen können.

Mechanistisch können Autoimmunerkrankungen in vier Typen eingeteilt werden. Typ-I sind die typischen Allergien, deren Mechanismus hier nicht weiter ausgeführt werden soll. Erkrankungen des Typ-II basieren auf der Reaktivität von Autoantikörpern gegen Zelloberflächen- oder Matrixproteine. Beispiele sind die autoimmune hämolytische Anämie mit Antikörpern gegen die Erythrozyten oder chronische Schilddrüsenentzündungen (Hashimoto-Thyreoiditis). Typ-III Erkrankungen bilden große Immunkomplexe durch Autoantikörper gegen lösliche Antigene, die normalerweise durch Makrophagen erfolgreich entfernt werden. Im Zusammenspiel mit angeborenen Immundefekten können diese Komplexe nicht oder nur unvollständig entfernt werden, was deren Ablagerung an die Haut, in Gelenken und an den Blutgefäßen zur Folge hat. Diese Ablagerungen aktivieren wiederum das lokale Immunsystem, was zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und damit zur Gewebsschädigung durch autoreaktive zytotoxische T-Zellen führt. Ein Beispiel für diesen Typ ist der systemische Lupus erythematodes, dessen Autoantikörper hauptsächlich gegen Zellkernbestandteile (DNA, freie Nukleotide, Histone) gerichtet sind. Chronische schwere Entzündungen der Haut, aber auch der Gelenke und Nieren sind typische Folgen der ständigen Reaktivität des Immunsystems gegen körpereigene Zellen und Immunkomplexe. Autoimmunerkrankungen des Typ-IV sind hauptsächlich durch das Vorhandensein autoreaktiver T-Zellen (zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen), sowie die Aktivierung autoreaktiver B-Zellen gekennzeichnet. Beispiele sind der Diabetes mellitus Typ-I mit autoreaktiven zytotoxischen T-Zellen, sowie Autoantikörpern gegen das körpereigene Insulin. Eine weitere, häufige Immunerkrankung ist die Multiple Sklerose, eine chronische Entzündung des zentralen Nervensystems. Hauptsächlich durch T-Helfer-Zellen gesteuerte Überreaktionen der lokalen Makrophagen, sowie deren Vertreter im Gehirn, die Mikrogliazellen, führen zu einer Zerstörung der Myelinscheide von Nerven. Dadurch wird die korrekte Signalweiterleitung gestört, besonders Lähmungen, sowie Sprach- und Sehstörungen treten dabei auf. Außerdem werden vermehrt zytotoxische Zytokine, wie TNF- $\alpha$  ausgeschüttet, welche in den Nervenzellen das apoptotische Programm auslösen (127).

### **1.5 Ziele der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit wurde in zwei Hauptziele unterteilt. 1. Patientenseren sollten auf mögliche Autoantikörper für spezifische Innenohr-Strukturen hin untersucht werden. Die Grundannahme war, dass periphere Innenohr-Erkrankungen mit autoimmuner Genese, wie auch andere Autoimmunerkrankungen, über Antikörper im Serum nachgewiesen werden können. Anders als frühere Studien zu diesem Thema sollte der Nachweis direkt auf vorher präparierten humanen Innenohren stattfinden und nicht auf Gewebe von Maus oder Ratte. 2. sollten neuartige Hochdurchsatz-Sequenzier-Methoden genutzt werden, um das Verständnis für das humane Innenohr sowie periphere Innenohr-Erkrankungen zu verbessern. Zu diesem Zwecke sollte erstmalig ein vollständiges miRNA-Profil der humanen Endo- und Perilymphe erstellt werden und dieses dann auf Besonderheiten untersucht werden. Außerdem wurde diese Technik auf die gesammelten Patientenseren angewendet, um neben den Antikörpern weitere Biomarker zu finden. Die Erstellung von miRNA-Profilen, beziehungsweise der Nachweis einzelner miRNAs, ist bereits für eine Vielzahl von anderen Erkrankungen beschrieben worden und führt dort zu verlässlichen, diagnostischen Ergebnissen. Unter Verwendung von Kontrollpatienten sollten die miRNA-Profile von Patienten mit bilateraler Vestibulopathie (BVP) und Morbus Menière (MM) auf differenziell exprimierte miRNAs untersucht werden. Diese Ergebnisse sollten dann für diagnostische Zwecke in ein RT-qPCR Experiment überführt werden. Die diagnostische Validierung sollte im Rahmen der standardmäßig durchgeführten Patientenuntersuchung unterstützend angewendet werden, um den Patienten eine sichere Diagnose zu gewährleisten.

## Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Ammoniak (NH <sub>3</sub> )	Roth # 2610.1
Ammoniumsulfat	Merck # 1.01211.1000
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck # 101200
Adenosintriphosphat, ATP, 100 mM	ThermoFisher Scientific # R0441
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma # A3059
Chloroform	Roth # 3313.1
Dimethylsulfoxid (DMSO), 100 %	ThermoFisher Scientific # F-515
dNTP, 10 mM	ThermoFisher Scientific # R0191
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	AppliChem # A3678
Ethidiumbromid	Roth # 7870.1
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth # 8040.2
Formaldehyd-Lösung, 4 %	MicroCos GmbH RegNr: 29188
Glycogen, RNA grade	ThermoFisher Scientific # R0551
Isopropanol	Roth # 9866.1
Kaiser´s Glyceringelatine	Merck # 1.09242.0100
Methanol	Sigma # 322415
O´RangeRuler, 20 bp DNA Ladder	ThermoFisher Scientific # SM1323
Rotiphorese® Sequenziergel Konzentrat	Roth # 3043.1
Rotiphorese® Sequenziergel Verdünner	Roth # 3047.1
T4 RNA Ligase I (ssRNA Ligase)	New England Biolabs® Inc. # M0204
TEMED (N,N,N',N' - tetramethylethan-1,2-diamin)	Roth # 2367
Xylene Substitute	Sigma # A5597
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma # H1009

#### 2.1.2 Antikörper und immunhistochemische Reagenzien

DAB Enhancer	Abcam # ab675
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Dako # K3468
Hase-anti-Calbindin, 1 mg/ml, polyklonal	Abcam # ab11426
Hase IgG Isotyp-Kontrolle, 5 mg/ml, polyklonal	Abcam # ab37415
Humane IgG Isotyp-Kontrolle	ThermoFisher Scientific # 12000C
Maus-anti-Mensch IgG-Biotin, Fc-spezifisch, monoklonal	Sigma-Aldrich # B3773



## Material und Methoden

Normal Maus Serum	ThermoFisher Scientific # 10410
Streptavidin-HRP (Verwendung 1:300)	BioLegend® Cat: 405210
Target Retrieval Solution, ph 6, 10x Konzentrat	Dako # S1669
Ziege-anti-Hase Ig-Biotin, polyklonal	Dako # E0432

### 2.1.3 TaqMan miRNA Assays

ath-miR-159a	ThermoFisher Scientific #478411_miR
ath-miR-159a Kontrol-RNA, kundenspezifisch	Invitrogen Nr.: 10620310
hsa-miR-27a-3p	ThermoFisher Scientific #478384_miR
hsa-miR-93-5p	ThermoFisher Scientific #478210_miR
hsa-miR-143-3p	ThermoFisher Scientific #477912_miR
hsa-miR-223-3p	ThermoFisher Scientific #477983_miR
hsa-miR-584-5p	ThermoFisher Scientific #478167_miR
hsa-miR-622	ThermoFisher Scientific #479106_miR

### 2.1.4 Kits

miRNeasy Serum/Plasma Kit	Qiagen # 217184
SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix	Invitrogen # 18080400
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	ThermoFisher Scientific # F530
TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit	ThermoFisher Scientific # A28007

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Elutionspuffer:	0.3 M NaCl
	2 mM EDTA
10x Ligationspuffer:	0.1 M MgCl <sub>2</sub>
	0.1 M β-Mercaptoethanol
	0.5 M Tris Base pH 7.6
	1 mg/ml BSA (acetyliert/ Nuklease-frei)
10x PBS	0.1 M Dinatriumhydrogenphosphat
	1.5 M Natriumchlorid
	10 mM Kaliumdihydrogenphosphat

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies # 5067-4626
Agilent High Sensitivity DNA Reagenzien	Agilent Technologies # 5067-4627
Biosphere® SafeSeal Tube, 0.5 mL	Sarstedt # 72.704.200
Corning® Costar® Spin-X® Zentrifugen-Filter Röhrchen	Sigma-Aldrich® # CLS8163
Eppendorf® DNA LoBind Tubes, 1.5 mL	Sigma-Aldrich® # EP0030108051
MicroAmp® Fast Optical 96 well Plate mit Barcode, 0.1 ml	Applied Biosystems™ # 4346906
MicroAmp® Optical Adhesive Film, PCR kompatibel	Applied Biosystems™ # 4311971
SuperFrost™ Plus Mikroskop-Objektträger	ThermoFisher Scientific # J1800AMNZ
Sterican® Kanülen 1.20x40 mm	B.Braun Melsungen AG

### 2.1.7 Geräte

Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700	ThermoFisher Scientific
Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System	ThermoFisher Scientific
NanoDrop 1000 und 2000	ThermoFisher Scientific
Biowave Mikrowelle	Pelko
Eppendorf Zentrifugen 5415D und 5430R	Eppendorf
peqStar2x Thermocycler	peqlab

## 2.2 Probensammlung und weitere Vorbereitungen

### 2.2.1 Sammlung von Patientenseren

Die in dieser Studie verwendeten Seren wurden Patienten entnommen, die aufgrund einer Schwindelsymptomatik im Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum, Abteilung für Neurologie, des Klinikums der Universität München, Standort Großhadern, vorstellig wurden. Alle Patienten wurden einer standardisierten Untersuchung unterzogen. Diese enthält neben der neurologischen und otologischen Untersuchung auch eine Abschlussdiagnose sowie mögliche Behandlungsstrategien. Die Studie wurde durch das Ethik-Komitee der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt und alle Patienten haben ihre mündliche und schriftliche Zustimmung zur Verwendung ihrer Proben erteilt.

Patienten mit folgenden Krankheiten wurden in die Studie eingeschlossen: Morbus Menière (MM) und bilaterale Vestibulopathie (BVP) jeglichen Ursprungs. Als Kontrollgruppe wurden Seren von Patienten mit benignem paroxysmalem Lagerungsschwindel (BPPV) verwendet. Alle Diagnosen wurden nach 6 und 12 Monaten erneut überprüft, um eine korrekte Zuordnung zur jeweiligen Patientengruppe zu gewährleisten.

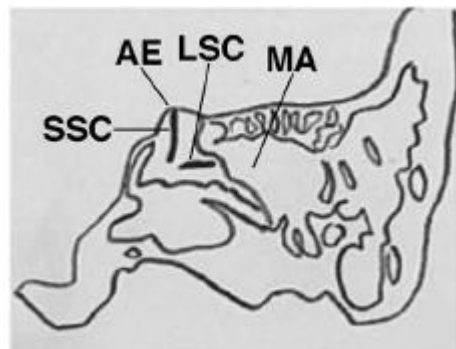
## Material und Methoden

Das Serum wurde von den anwesenden Ärzten oder Medizinstudenten für 30 Minuten bei Raumtemperatur koaguliert. Dazu wurden sterile S-Monovette® Blutentnahme-Röhrchen verwendet. Das koagulierte Blut wurde zentrifugiert (1800 g, 13 min, 6 °C) und der gelbliche, klare Serumüberstand in neue Eppendorf-Röhrchen überführt. Zur Entfernung von möglichen Verunreinigungen durch verbliebene, zelluläre Rückstände wurde das Serum erneut zentrifugiert (16.000 g, 5 min, 4 °C). Das daraus resultierende klare Serum wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.2.2 Probenvorbereitung des humanen Felsenbeines

Die Nutzung von Autopsie-Proben wurde durch das Ethik-Komitee der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt und die Autopsien am Institut für Rechtsmedizin (Direktor Prof. Dr. M. Graw) durch die Rechtsmedizinerin PD Dr. med. Inga Sinicina durchgeführt. Im Zuge der Autopsien wurden dazu Felsenbeine mit Cochlea, dem knöchernen Labyrinth, dem äußerem sowie innerem Gehörgang aus dem Schädel entfernt. Die Felsenbeine wurden nach der Probenentnahme zurück in den Körper gegeben.

#### 2.2.2.1 Entnahme von Endolymphe und Perilymphe



**Abbildung 7:** Links: Humanes Felsenbein mit eröffnetem superiorem Bogengang (Sicht von kaudal). Rechts: Seitenansicht des linken Felsenbeines mit superiorem und lateralem Bogengang (SSC, LSC), der Eminentia arcuata (AE) und dem Antrum mastoideum (MA). Bearbeitet nach Seo *et al.*, 2007 (130).

Um die Endo- und Perilymphe zu gewinnen, wurde der superiore Bogengang eröffnet und die darin enthaltene Flüssigkeit mit einer 10 µl Pipette entnommen. Dazu wurde das Felsenbein in einem Schraubstock fixiert und die Eminentia arcuata von Blut und Knochenhaut gereinigt. Diese Erhöhung auf der Oberfläche des Felsenbeins konnte zu einer groben Lagebestimmung des superioren Bogenganges genutzt werden (130). Nach der Reinigung wurde der

Knochen mit Hilfe eines HNO-Spatels und eines Hammers vorsichtig entfernt und der Bogengang freigelegt. Die entnommene Flüssigkeit, in etwa 40-60 µl, wurde zentrifugiert (16.000 g, 2 min, 20 °C), um Zelltrümmer und rote Blutkörperchen zu entfernen und danach bei -80 °C gelagert.

### *2.2.2.2 Vorbereitungen der Schnitte für die Immunhistochemie*

Die im Rahmen der Autopsien entnommenen Felsenbeine wurden zunächst für zwei Wochen in 4 % PFA bei 4 °C fixiert. Danach erfolgte die Entkalkung des Gewebes in 25 %-iger EDTA-Lösung bei Raumtemperatur. Die EDTA-Lösung wurde alle zwei Wochen gewechselt. Zur Kontrolle der vollständigen Entkalkung wurden die Felsenbeine alle drei Monate geröntgt. Außerdem wurden die Felsenbeine nach und nach gekürzt, um die eigentliche Schnittfläche mit den Innenohr-Strukturen am Ende möglichst klein zu halten. Nach etwa 10-monatiger Entkalkungszeit wurde die EDTA-Konzentration auf 12.5 % gesenkt und der Wechselturnus beibehalten. Um das Felsenbein am Kryostat schneiden zu können, wurde es zuerst für eine Woche in Leitungswasser gewässert und anschließend in PBS, pH 7.4 überführt und dort drei Tage bei täglichem Wechsel inkubiert. Die folgende Entwässerung wurde mit einer aufsteigenden Konzentration an Sucrose (10 %, 20 %, 30 %) bei 4-tägigem Wechsel durchgeführt. Das Felsenbein wurde danach in Gefrierbettmedium eingeschlossen und anschließend am Kryostat, mit einer speziellen Klinge für harte Gewebe, in 25 µm dicke Schnitte geschnitten. Das Felsenbein, welches in Paraffin eingebettet werden sollte, wurde mit Leitungswasser gewässert und anschließend eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe und Xylol vorgenommen und das Gewebe danach direkt in flüssiges Paraffin eingegossen. Der Paraffinblock wurde danach an einem Schlitten-Mikrotom mit einer Schnittdicke von 12 µm geschnitten. Sowohl Gefrier- als auch Paraffinschnitte wurden auf SuperFrost™ Plus Objektträger aufgezogen. Die Gefrierschnitte wurden danach bei -20 °C, die Paraffin-Schnitte bei Raumtemperatur gelagert.

## **2.3 Immunhistochemie**

Immunhistochemische Techniken werden seit einigen Jahrzehnten verwendet, um mit Hilfe von hoch spezifischen Antikörpern, Antigene im Gewebe spezifisch nachzuweisen und zu visualisieren (131, 132). Diese basieren auf der hohen Affinität einzelner Antikörper gegenüber in Geweben enthaltenen bestimmten Charakteristiken, wie etwa definierte Gruppen und Strukturen von Aminosäuresequenzen. Die Visualisierung des gebundenen Antikörpers kann entweder über eine direkte Konjugation von Fluorophoren oder über indirekte Methoden, wie die später beschriebene Streptavidin-Biotin-Methode, erfolgen (133). Die direkten Methoden bieten zwar einen Zeitvorteil, aber die Sensitivität gegenüber Antigenen, die nur in geringer Anzahl vorhanden sind, ist stark limitiert. Daher wurde in dieser Studie die indirekte Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode

verwendet, welche die hohe Bindeaffinität von Streptavidin an Biotin ausnutzt und so die Sensitivität stark erhöht. Diese Methode verwendet einen primären Antikörper, einen Biotin-konjugierten sekundären Antikörper, der den ersten bindet, sowie den Verstärkungsschritt über Streptavidin, um das Vorhandensein spezifischer Antigene zu detektieren. Zur eigentlichen Detektion wird eine an Streptavidin-gekoppelte Peroxidase (Horseradish peroxidase, HRP) verwendet, welche aufgrund ihrer Aktivität eine kolorimetrische Umsetzung eines Substrates (DAB) ermöglicht. Diese Methode ist für eine hohe Sensitivität und ein gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis bekannt (133, 134).

### **2.3.1 Immunhistochemie auf FFPE-Gewebe**

Formalin-fixierte, paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebsschnitte des humanen Felsenbeins wurden mittels Xylol-Substitut für dreimal 5 Minuten entparaffiniert. Danach wurden die Schnitte in Ethanol mit absteigenden Konzentrationen (100 %, 96 %, 70 %) gewaschen und anschließend in PBS überführt. Es erfolgte die Refixierung mit 4 % PFA (10 min, 20 °C) und ein erneuter Waschgang mit PBS. Um vorhandene endogene Peroxidasen zu blocken, wurden die Schnitte mit 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 10 Minuten behandelt. Durch die genutzte Fixierungsmethode kann davon ausgegangen werden, dass es an vielen Proteinen zu Veränderungen der Konformation durch Quervernetzungen zwischen Proteinen und dem Formaldehyd während der Fixierung kommen kann (135). Um diese Veränderungen zu entfernen und Proteine in ihre physiologische Form zurückzuführen, wurde in dieser Studie eine hitzeinduzierte Epitop-Retrieval (HIER) Methode verwendet (136). Die Proben wurden dazu in eine vorgewärmte Antigen-Retrieval-Lösung (DAKO) überführt und für 20 Minuten in der Mikrowelle bei 85 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Lösung wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 2 % BSA oder 5 % Normal-Maus-Serum behandelt, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Der primäre Antikörper wurde danach auf die Schnitte gegeben und die Proben über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Vor Zugabe des sekundären Antikörpers wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und der Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur zu den Proben gegeben. Zuletzt wurden die Proben erneut gewaschen und für 30 Minuten mit dem Streptavidin-HRP-Komplex behandelt. Die kolorimetrische Detektion erfolgte mittels des DAB+ Substrates nach Angaben des Herstellers unter Zugabe von 50 µl DAB Enhancer, um die Färbung zu verstärken. Dabei färbte sich das Gewebe von transparent zu hellbraun, woraufhin die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt wurde. Die Schnitte wurden abschließend zweimal mit Wasser gewaschen und danach mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckt.

### 2.3.2 Immunhistochmie auf Kryo-Schnitten

Kryo-Schnitte, welche bei -20 °C gelagert wurden, wurden für 10 Minuten auf Raumtemperatur gebracht und anschließend bei 37 °C für 20 Minuten getrocknet. Der 20-minütigen Fixierung mittels 4 % PFA folgte dreimaliges Waschen mit PBS. Das Blocken der endogenen Peroxidasen und der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte nach dem Protokoll für FFPE-Gewebe. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Die weitere Prozessierung erfolgte wie oben beschrieben.

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antikörper, sowie deren Arbeitsverdünnung**

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
Humanes Serum (150 µl, unbehandelt)	Maus-anti-Human IgG-Biotin, 1:100
Humane IgG Isotyp-Kontrolle (1:100)	Maus-anti-Human IgG-Biotin, 1:100
Hase-anti-Calbindin (Verwendung 1 µg/ml)	Ziege-anti-Hase IgG-Biotin, 1:100
Hase IgG Isotyp-Kontrolle (Verwendung 1 µg/ml)	Ziege-anti-Hase IgG-Biotin, 1:100

### 2.3.3 Detektion und Auswertung der Färbung

Die Färbung wurde mit Hilfe des Keyence BZ-8000 Kompakt-Mikroskops und der dazugehörigen Software kontrolliert. Die Schnitte wurden mittels Hellfeld-Optik untersucht und ein Übersichtsbild des Gewebes, sowie Vergrößerungen bestimmter interessanter Bereiche, angefertigt. Die im Gewebe enthaltenen Neuronen wurden zusätzlich noch mit der Fluoreszenz-Optik des Gerätes, bei einer Anregung gegen GFP (480 nm), untersucht. Dies diente der Visualisierung von Lipofuscin-Aggregaten, welches sich als Alterspigment in den Zellen anlagert und dabei gelblich-braune Granula bildet. Diese Ablagerungen können von der DAB-Färbung durch die Autofluoreszenz derselben unterschieden werden (137, 138).

Die Auswertung der Färbung erfolgte durch Vergleichen der einzelnen Bilder verschiedener Seren untereinander, um mögliche Unterschiede in Farbintensität sowie in der Färbung einzelner Strukturen festzustellen. Zusätzlich wurden auf den FFPE-Schnitten die Neuronen des VIII. Hirnnerv auf differenzielle Färbungen hin untersucht. Dazu wurde das frei verfügbare, Java-basierte, Bildauswertungsprogramm Image J verwendet (online verfügbar: <https://imagej.nih.gov/ij/>) (139). Dieses Programm ermöglicht eine wissenschaftliche Auswertung von Hellfeld-, aber auch von Fluoreszenzbildern mit verschiedenen Methoden. Für die Neuronenauswertung wurden Hellfeld-Bilder verwendet, die alle mit denselben Belichtungszeiten und Einstellungen aufgenommen wurden. Diese lagen im 8-bit-TIFF-Format und im RGB-Farbraum vor, welcher die Intensitäten der drei Grundfarben Rot, Grün und Blau abbildet. Dadurch kann die Farbe jedes Pixels des Bildes mit drei Komponenten beschrieben werden. Dazu wird zu jedem Pixel die Intensität jeder Farbe mit Werten zwischen 0 und 255 abgespeichert. Ein rein weißer Pixel erhält dabei den Wert 255, 255, 255; ein

schwarzer Pixel den Wert 0, 0, 0. Alle Farben dazwischen werden durch unterschiedliche Kombinationen beschrieben, wobei die Werte kleiner werden, je dunkler ein Pixel ist. Eine Messung dieser Intensität erlaubt dadurch die Differenzierung zwischen hellen, ungefärbten und dunklen, gefärbten Pixeln. Für die Bestimmung der Neuronen-Färbung wurden Linienscans mit einer Breite von 25 Pixeln durchgeführt. Die daraus resultierenden Linien konnten durch das Setzen selbst bestimmter Grenzwerte für die Evaluierung der Färbung verwendet werden. Neuronen, welche eine durchschnittliche Helligkeit von über 150 aufwiesen, wurden als ungefärbt gezählt, da diese Neuronen im Autofluoreszenzbild fast vollständig fluoreszierten. Eine starke Färbung wurde bei Werten von unter 100 gewertet, Werte dazwischen als schwach gefärbt. Die daraus resultierende Statistik wurde für eine Detektion einer differenziellen Färbung verwendet.

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Extraktion der Serum-RNA

Die RNA wurde mit dem Qiagen miRNeasy Serum/Plasma Kit nach Herstellerangaben extrahiert. Dazu wurden 200 µl Serum aufgetaut und zentrifugiert, um mögliche Kryo-Präzipitate zu entfernen. Nach Zugabe von Qiazol und Chloroform wurde der klare Überstand durch die im Kit enthaltenen RNeasy MinElute Zentrifugenröhrchen aufgereinigt. Für das Serum, welches für die Hochdurchsatz-Sequenzierung verwendet werden sollte, wurde die im Protokoll vorgeschlagene Zugabe einer Serum/Plasma Kontroll-RNA ausgelassen, da diese die Resultate der miRNA Sequenzierung stören würde. Bei der RNA-Extraktion der Real-Time PCR-Proben wurde als Kontroll-RNA, die im humanen Genom nicht vorkommende miRNA ath-159a der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, verwendet (140). Die Zugabe einer definierten Menge dieser Kontrolle erlaubte eine Normierung der Real-Time PCR-Ergebnisse. Die extrahierte Total-RNA wurde anschließend bei -80 °C gelagert.

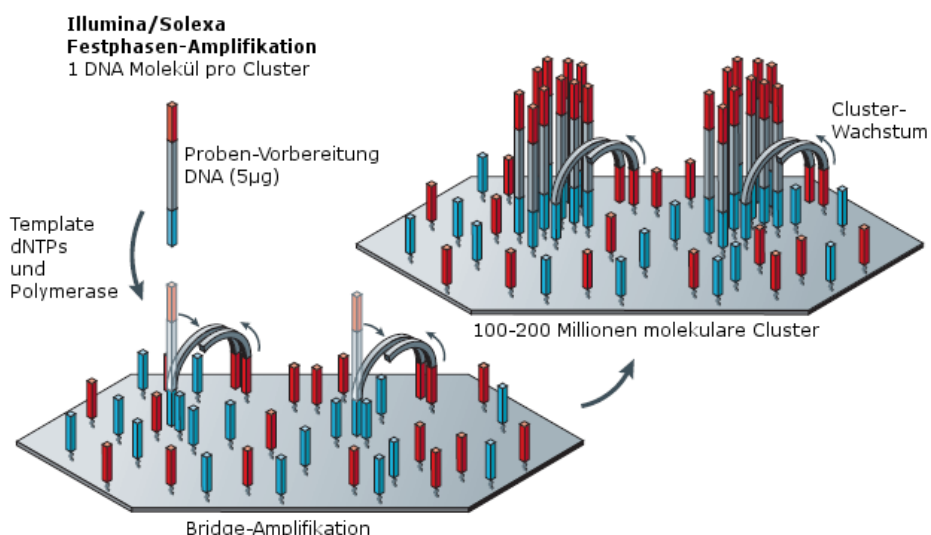
### 2.4.2 Extraktion der Endo/Perilymph-RNA

Die Proben wurden zunächst auf Eis aufgetaut, anschließend mit der zehnfachen Menge an Qiazol Lysis-Reagenz versetzt und für 5 Minuten unter regelmäßigem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Chloroform (1/5 der Qiazol-Menge) wurden die Proben per Hand geschüttelt und erneut 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Trennung der RNA von DNA und Proteinen wurden die Proben zentrifugiert (12.000 g, 15 min, 4 °C) und der klare Überstand vorsichtig abgenommen. Die Proben wurden mit Isopropanol (1/2 der Qiazol-Menge) und 1 µl Glycogen versetzt, kurz gevortext und die RNA durch Zentrifugation ausgefällt (12.000 g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit eiskaltem 75 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (7.500 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für etwa

5 Minuten luftgetrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in RNase-freiem Wasser gelöst und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4.3 Illumina Next Generation Sequenzierung (NGS)

Next-Generation-Sequenzierungs-Techniken bieten eine optimale Basis, um Analysen gesamter Genome durchzuführen, darunter die differenzielle Genexpression, Veränderungen der Genfunktion durch alternatives Splicing und der Effekt von genetischen Variationen auf Gesundheit und Krankheit (141, 142). Die Illumina Methode basiert dabei auf der schon früher beschriebenen Technik der zyklischen reversiblen Terminator (CRT) Chemie, einer Methode, die die Sequenzierung im Rahmen einer Neusynthese ermöglicht (143). Zuerst werden 3' und 5' Adapter an die zu sequenzierenden DNA-Fragmente ligiert und danach eine Festphasen-Amplifikation durchgeführt. Dazu werden die vorbereiteten DNA-Fragmente denaturiert und auf der Oberfläche von Flusszell-Kanälen immobilisiert. Daraus resultieren Felder von Einzelstrang DNA-Fragmenten, welche über Adapter-komplementäre Oligonukleotide gebunden sind. Durch die sogenannte Bridge-Amplifikation werden 3' und 5' Adapter in unmittelbare Nähe gebunden und der Einzelstrang in 3'→5' Richtung durch unmodifizierte Nukleotide verlängert. Eine darauffolgende Denaturierung erzeugt wieder Einzelstränge, welche durch eine ständige Wiederholung dieses Zyklus zu Clustern mit mehreren hundert DNA-Templates anwachsen. Von diesen Template-Clustern können 100-200 Millionen auf jedem Kanal der Flusszelle gebunden werden. Diese Cluster sind dicht genug, um beim folgenden Sequenzierungsschritt detektiert zu werden.

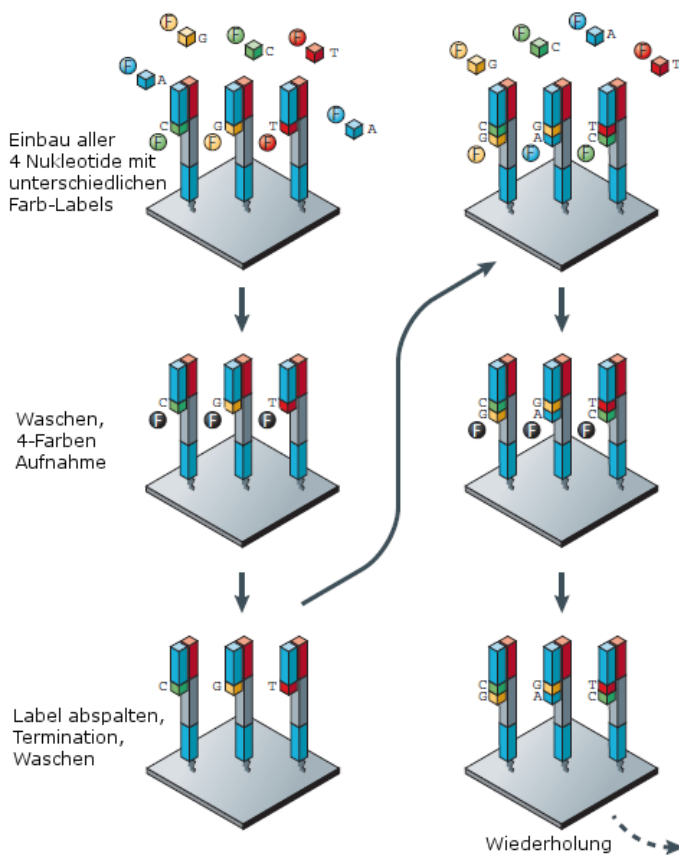


**Abbildung 8: Festphasen-Amplifikation zur Generierung von Millionen von Template-Clustern**, verändert nach (141). Übersetzung und Bearbeitung genehmigt von Springer Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Review Genetics, Sequencing techniques – the next generation, Micheal L. Metzker, Copyright 2008



Die Sequenzierung selbst erfolgte durch Polymerase-gesteuerte Erweiterung mit einzelnen 3'-modifizierten, fluoreszenz-markierten dNTPs. Diese Nukleotide wurden in die Fluss-Zelle gegeben, komplementär an den sekundären Strang eingebaut und die überzähligen durch Waschen entfernt. Durch die Detektion des Fluoreszenz-Signals einzelner Cluster konnten die eingebauten dNTPs bestimmt werden. Das Fluoreszenz-Label wurde anschließend chemisch entfernt, wodurch eine freie 3'-Hydroxyl-Gruppe hergestellt wurde, welche für den nächsten Polymerase-Zyklus benötigt wurde. Dieser Zyklus wurde mehrfach wiederholt, wodurch mehrere Millionen detektierbare, räumlich fixierte, fluoreszente Punkte in jedem Zyklus generiert wurden. Die Systemsoftware war dadurch in der Lage, die Sequenz der ursprünglich eingesetzten Templates zu bestimmen.

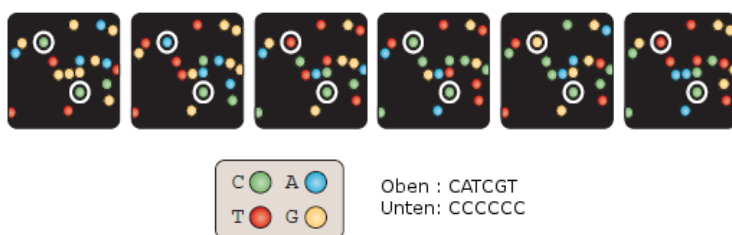
**a Illumina/Solexa - Reversible Terminatoren**



**Abbildung 9: Vier-Farben zyklische reversible Terminator Methode.**

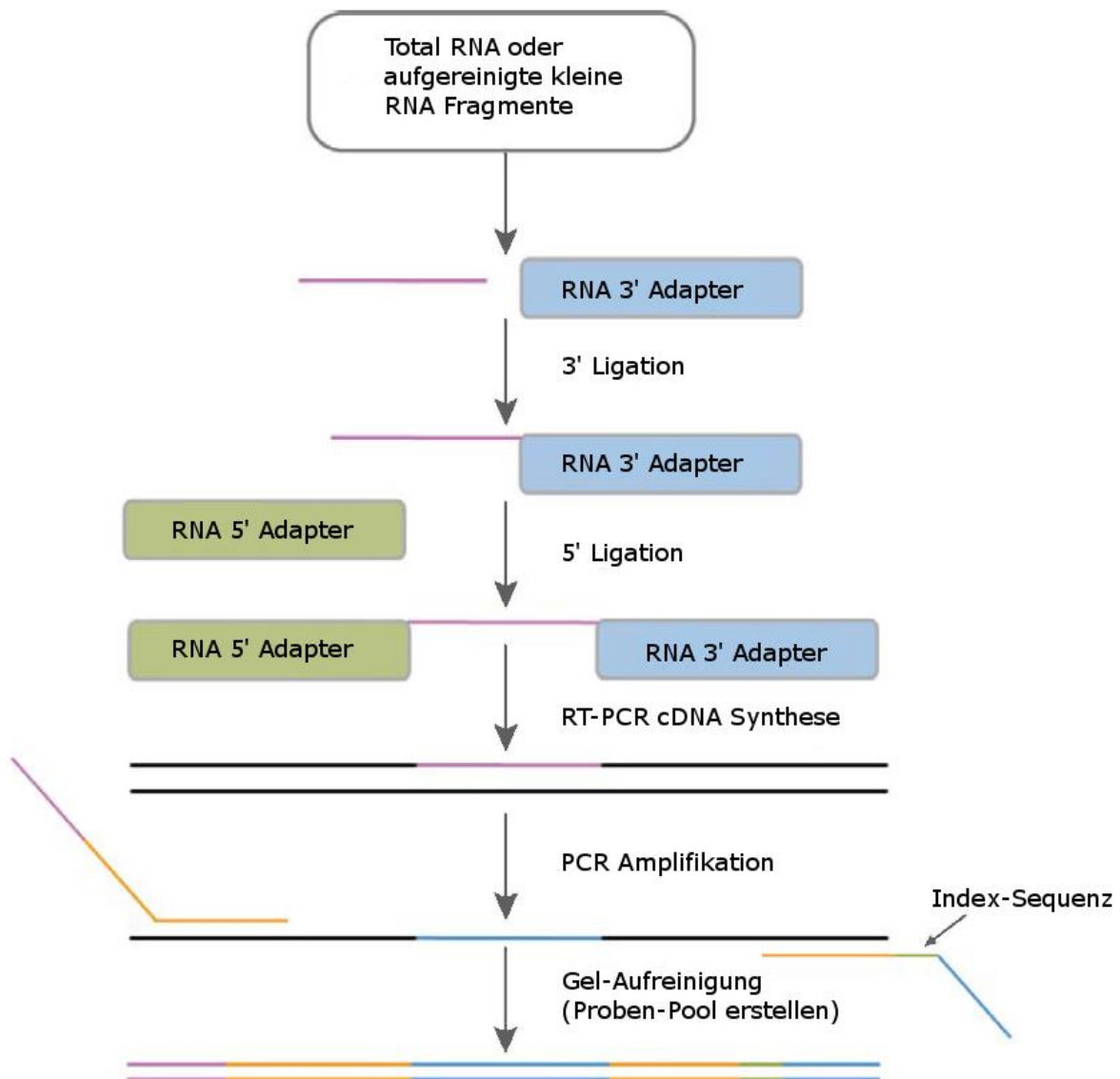
**A:** Template Cluster wurden der Einfachheit halber als einzelne Templates dargestellt. Fluoreszenz-markierte dNTPs wurden eingebaut, der Überschuss entfernt und die Fluoreszenz detektiert. Eine reduzierende Chemikalie spaltet das Label ab und stellt eine freie 3'-Hydroxyl-Gruppe für den nächsten Zyklus her. **B:** Vier-Farben-Aufnahme von zwei markierten Template-Clustern und dazugehörige Sequenzen. Verändert nach (141). Übersetzung und Bearbeitung genehmigt von Springer Customer Service Centre GmbH: Springer Nature, Nature Review Genetics, Sequencing techniques – the next generation, Micheal L. Metzker, Copyright 2008

**b**



#### 2.4.4 TruSeq® Small RNA Library Generation

Zur Generierung der cDNA-Bibliothek wurde das Illumina TruSeq® Klonierungsprotokoll mit einigen Änderungen und selbsthergestellten Reagenzien und Primern verwendet. Das Protokoll setzt sich dabei aus 4 entscheidenden Schritten zusammen: 1) Ligation der 3' RNA Adapter, 2) Ligation der 5' RNA Adapter, gefolgt von der 3) cDNA-Synthese und 4) der PCR-Amplifikation (Abbildung 10).



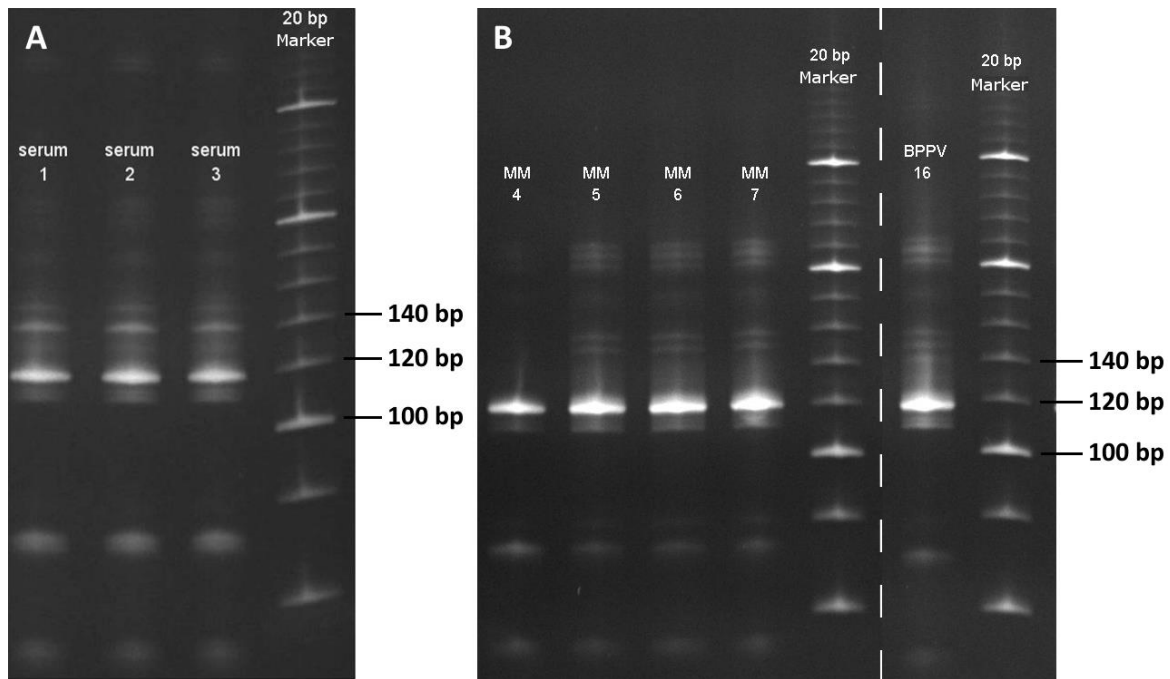
**Abbildung 10: TruSeq® Small RNA Library Vorbereitung.** Abdruck und Übersetzung genehmigt von Illumina Inc: Illumina®, TruSeq® Small RNA Library Prep Guide, Copyright Revision G 2014

Das vollständige TruSeq® Klonierungsprotokoll wird im folgenden Abschnitt beschrieben, die Primerliste findet sich im Anhang. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis ausgeführt, sofern es nicht anders angegeben war. Das gesamte Protokoll war für 1 µg einer Total-RNA Extraktion optimiert. Da die Menge an RNA einer zellfreien Serum-Extraktion nicht ausreichte, wurden für den ersten Schritt 12 µl der Serum-RNA verwendet. Diese Menge wurde mit 2 µl des 10x Ligationspuffers, 3 µl DMSO

## Material und Methoden

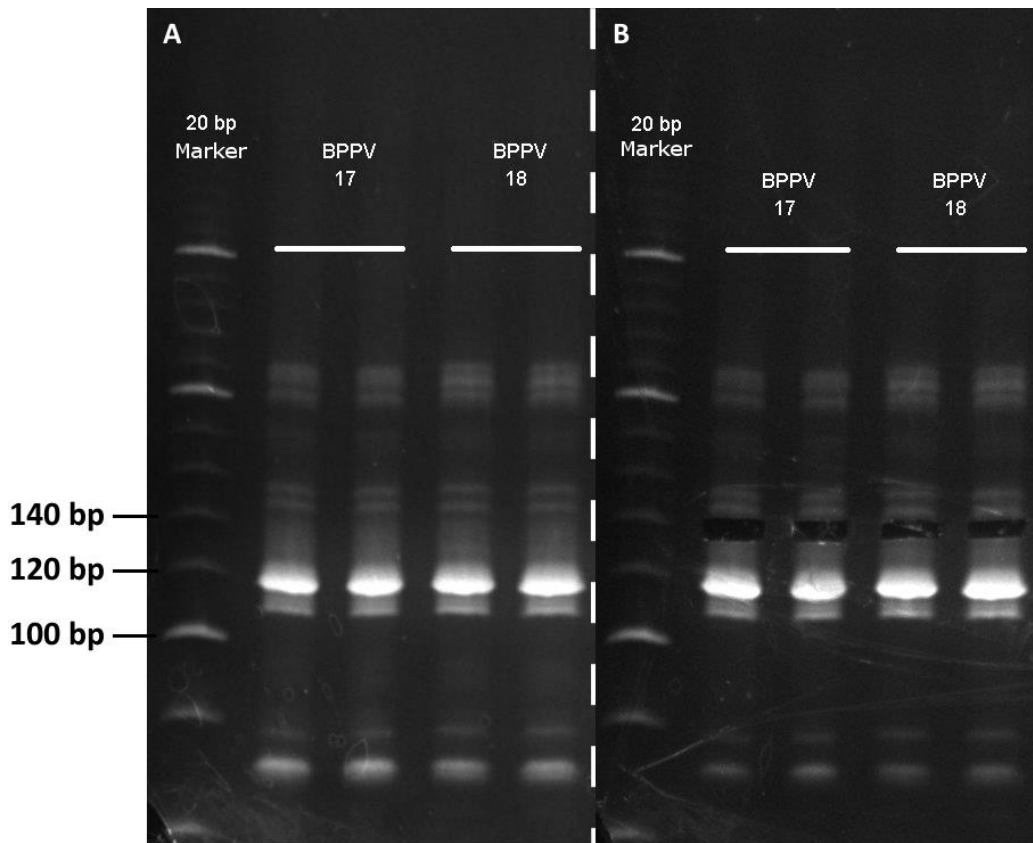
und 1 µl des 3'-adenylierten Adapters vermischt. Die Proben wurden danach für 30 Sekunden auf 90 °C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Die Ligation erfolgte nach Zugabe von 2 µl einer speziell gekürzten T4 RNA Ligase 2 (144) über Nacht bei 4 °C. Die Ligase wurde anschließend für 10 Minuten bei 65 °C inaktiviert und die Proben auf Eis gestellt. Alle Komponenten der 5' Adapter Ligation wurden gleichzeitig zu den Proben gegeben und erneut für 30 Sekunden auf 90 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Proben mit 2 µl einer T4 RNA Ligase 1 vermischt, für 1.5 Stunden auf Eis und abschließend für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach diesen beiden Ligationsschritten wurde die Einzelstrang-RNA mittels reverser Transkription in für die nachfolgende Amplifikation benötigte cDNA umgeschrieben. Dazu wurden die Proben mit RT-Primern und dem Annealingpuffer vermischt und für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt, um eine korrekte Binding der Primer zu ermöglichen. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden der First-Strand-Mix und das Enzym SuperScript III / RNase Out hinzugegeben, die Proben gut gemischt und für 50 Minuten bei 50 °C inkubiert. Es folgte die Deaktivierung der Enzyme bei 85 °C für 5 Minuten. Die cDNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Nach der cDNA-Synthese wurde für jede Probe eine Pilot-PCR durchgeführt, um die Ligation zu überprüfen und die korrekte Zyklusanzahl für die Scale-Up-PCR zu bestimmen. Dazu wurden 10 µl der Pilot-PCR mit 2 µl 6x Ladebuffer und 0.5 µl Rotiphorese®-Verdünner vermischt und auf ein 6 %-iges Polyacrylamid Rotiphorese® Sequenziergel geladen. Die Gele liefen zunächst bei 250 V, später bei 300 V, bis der untere Marker des Ladebuffers aus dem Gel heraus gelaufen war. Die Gele wurden anschließend für 10 Minuten mit Ethidiumbromid gefärbt und mit Hilfe von UV-Licht visualisiert. Auf Höhe von 120 bp erschien bei allen Proben eine starke Bande, welche leere Adapter-Adapter Dimere enthielt. Eine korrekte Ligation erzeugte cDNA-Fragmente, die auf einer Höhe von etwa 140 bp zu finden waren. Für Proben, bei denen eine Bande bei 140 bp deutlich zu erkennen war, wurde die Zyklusanzahl für die Scale-Up-PCR auf 18 reduziert (Abbildung 11 A). Bei Proben ohne erkennbare 140 bp Bande wurde die Zyklusanzahl auf 21 Zyklen reduziert (Abbildung 11 B, MM 5-7). Diese Verringerung war notwendig, um eine Amplifikation der Adapter-Adapter Dimere zu verhindern, welche im nachfolgenden Gel einen stark verwaschenen Bereich zwischen 140 und 120 bp zur Folge gehabt hätten.



**Abbildung 11: Rotiphorese® Sequenzier-Gele (6 %).** Pilot-PCRs, um eine erfolgreiche Ligation zu überprüfen. **A:** Drei unterschiedliche Test-Seren mit gut detektierbaren Banden bei 140 bp. **B:** Verschiedene Seren von Patienten mit Morbus Menière oder BPPV. Die 140 bp Bande ist in der BPPV 16-Probe schwach zu erkennen, während sie in den Spuren MM 5-7 nicht zu erkennen ist. Die Probe MM 4 zeigt eine misslungene Ligation (fehlende Banden im Bereich über 140 bp) und wurde daher von einer weiteren Bearbeitung ausgeschlossen.

Nach der Pilot-PCR und der Überprüfung auf dem Gel wurde für alle erfolgreichen Ligationen die Scale-Up-PCR durchgeführt, um die endgültigen cDNA-Bibliotheken für die weitere Sequenzierung zu erstellen. Dazu wurde für jede Probe ein anderer, einmaliger Index-Primer verwendet (siehe PCR-Protokolle). Die Scale-Up-PCRs wurden wiederum auf einem 6 %-igen Rotiphorese® Sequenzier-Gel aufgetrennt. Die miRNA enthaltenden Bereiche (136-140 bp) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und weiter aufgereinigt (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Scale-Up-PCRs auf 6 % Rotiphorese® Sequenzier-Gel.** A: Gel-Dokumentation vor dem Ausschneiden. Zwei Spalten pro Probe, Adapter-Adapter Dimere bei 120 bp sind klar erkennbar. B: Gel-Dokumentation nach dem Ausschneiden. Der obere Schnitt wurde direkt unterhalb der Doppelbande bei etwa 140 bp gesetzt, der untere Schnitt bei etwa 135 bp, so dass ein Bereich zwischen 136 und 140 bp ausgeschnitten werden konnte.

Die Gelstücke wurden in vorher vorbereitete Eppendorf-Gefäße überführt. Dazu wurde bei 0.5 ml Eppendorf-Gefäßen mittels einer Kanüle der Boden mehrfach punktiert und diese dann in 1.5 ml Eppendorf-Gefäße gesteckt. Die Proben wurden zentrifugiert (17.000 g, 1 min, 4 °C), wodurch die Gelstücke komplett geschreddert wurden und sich in dem 1.5 ml Eppendorf-Gefäß ansammelten. Die kleineren Eppendorf-Gefäße wurden anschließend verworfen und die cDNA nach Zugabe von 300 µl Elutionspuffer über Nacht, unter ständigem Schütteln (1000 rpm), aus den Gelstücken herausgelöst. Um die Gelstücke vom Eluat zu trennen, wurde das Eluat/Gel-Gemisch in SpinX Zentrifugen-Filter überführt. Um das gesamte Eluat aufzufangen, wurden die Filter zentrifugiert (10.000 g, 1 min, 4 °C), um 180° gedreht und erneut zentrifugiert (12.000 g, 1 min, 4 °C). Das klare Eluat wurde in frische Low-Bind-Eppendorf-Gefäße überführt und die cDNA unter Zugabe des 2.5-fachen Volumens 100 % Ethanol über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Die cDNA-Bibliothek wurde anschließend durch Zentrifugation (17.000 g, 1 min, 4 °C) pelletiert, mit eiskaltem 80 %-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett entfernt und das Pellet für etwa 5 Minuten an der Luft getrocknet. Zum Auflösen der Pellets wurden 18 µl RNase-freies Wasser in die

## Material und Methoden

Eppendorf-Gefäße gegeben und die cDNA bei -20 °C gelagert. Dieses Protokoll wurde in der gleichen Weise auch für die Sequenzierung der Endo-/Perilymphe angewandt.

**Tabelle 2: Protokolle der TruSeq® Small RNA Library**

3' Adapter Ligation		5' Adapter Ligation	
12 µl	Total-RNA	2 µl	10 x Ligationspuffer
2 µl	10 x Ligationspuffer	0.4 µl	ATP (100 mM)
3 µl	DMSO (100 %)	3 µl	DMSO (100 %)
1 µl	3'adenylierter Adapter (5 pmol)	11,6 µl	H <sub>2</sub> O
+ 2 µl	gekürzte RNA Ligase 2	1 µl	5' Adapter RNA Oligos (10 µM)
		+ 2 µl	T4 RNA-Ligase 1

cDNA-Synthese	Pilot-PCR	Scale-Up-PCR	
6 µl RNA Ligation	6.25 µl	27.25 µl	H <sub>2</sub> O
1 µl RT Primer (100 µM)	2 µl	10 µl	5 x Phusion HF Puffer
1 µl Annealingpuffer	0.2 µl	1 µl	5' Primer
+ 10 µl 2x First-Strand Mix	0.2 µl	1 µl	TruSeq Index-Primer (1 von 48)
+ 2 µl SuperScript III/RNase Out	0.25 µl	1.25 µl	dNTP Mix (10 mM)
	0.1 µl	0.5 µl	Phusion Polymerase
	+ 1 µl	+ 9 µl	cDNA

PCR-Programm			Pilot	Scale Up
Denaturierung	98 °C	1 min	22 Zyklen	21 Zyklen
Denaturierung	98 °C	10 sec		
Annealing	60 °C	10 sec		
Elongation	72 °C	30 sec		
Finale Elongation	72 °C	10 min		

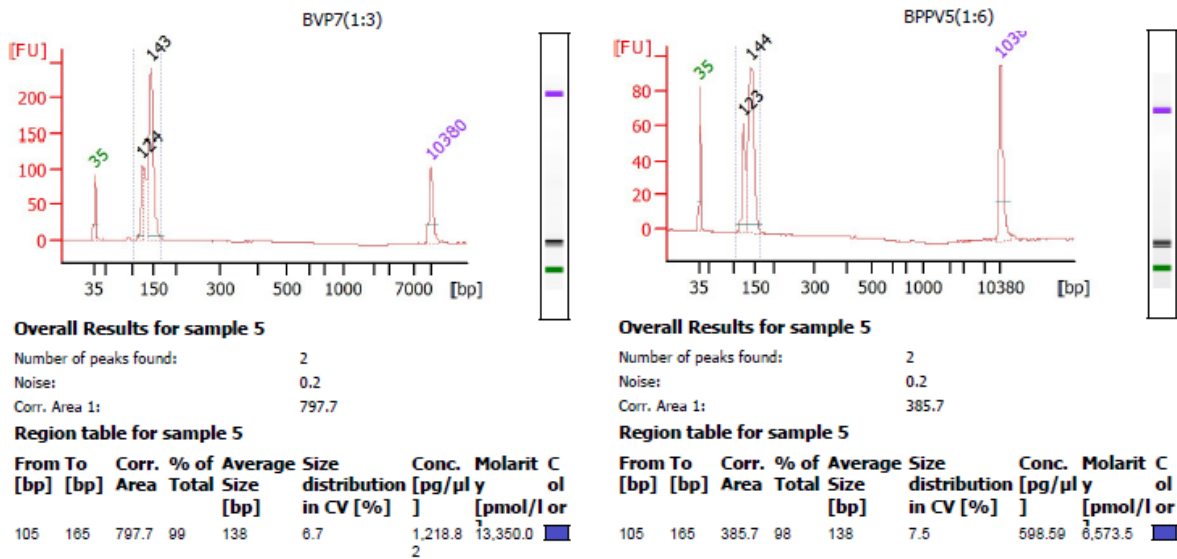
### 2.4.5 Erstellung der DeepSequencing-Pools

Jede Flusszelle des Illumina HiSeq 1000 war in der Lage, einen Pool mit der kompletten Liste der TruSeq Primer 1-48 zu sequenzieren. Um eine Über-/Unterrepräsentation einzelner Proben zu verhindern, war es notwendig, die Pools aus jeweils äquimolaren Mengen der einzelnen cDNA-Bibliotheken zu erstellen. Dazu wurden die Konzentrationen und die Reinheit der Proben mittels Nanodrop und anschließender Analyse im Agilent Bioanalyzer bestimmt. Die am Nanodrop bestimmten Konzentrationen konnten nur für eine Abschätzung genutzt werden, da bei den meisten

## Material und Methoden

Proben die 140 bp Bande nicht sichtbar war. Dadurch musste der Bereich zum Ausschneiden etwas größer gewählt werden, wodurch eine Kontamination durch leere Adapter-Adapter Dimere aus dem Gelschmier nicht verhindert werden konnte. Diese Kontamination erlaubte keine korrekte Bestimmung der miRNA-Konzentration der Proben. Für zuverlässigere Resultate wurden alle Proben daher mit einem Agilent Bioanalyzer 2100 und dem High Sensitivity DNA-Assay untersucht. Um eine Überladung der Assay-Chips zu verhindern, wurden alle Proben anhand der im Nanodrop gemessenen Konzentration auf eine Konzentration von etwa 2.5 ng/µl eingestellt.

Das Arbeitsprinzip des Bioanalyzers ist gleichzusetzen mit dem Prinzip der elektrophoretischen Größentrennung von DNA-Fragmenten auf einem Gel. Die Assay-Chips sind dabei aus mehreren, mit Mikrokanälen verbundenen, kleinen Löchern aufgebaut. Diese Kanäle werden mit einem Polymer und einem DNA-interkalierenden Farbstoff gefüllt und bilden so die Basis für die On-Chip Gelelektrophorese. Nachdem die Proben in die einzelnen Löcher gegeben wurden, entstanden so einzelne voneinander unabhängige Mikrokanal-Gelsegmente. Durch ein nachfolgendes Anlegen einer Spannung wurden die DNA-Fragmente innerhalb dieser Gelsegmente voneinander getrennt und durch laserinduzierte Fluoreszenz detektiert. Ein Standardmarker mit bekannten Fragmentgrößen und Konzentrationen wurde zur internen Kalibration verwendet, um ein Vergleichsschema für die Migrationszeiten einzelner Fragmente zu erstellen. Jede Probe enthält zusätzlich zur cDNA-Bibliothek zwei Marker mit bekannter Konzentration, um einen Vergleich zum Standard zu gewährleisten. Jedes Fragment innerhalb der Bibliothek, welches innerhalb der Mikrokanäle durch den Detektionspunkt läuft, wird detektiert und erzeugt dadurch einen spezifischen Peak im so erstellten Elektropherogramm. Aus den Migrationszeiten der Fragmente konnte die Größe berechnet werden und der obere Marker jeder Probe erlaubte eine Kalkulation der Fragment-Konzentration. Aus diesen Werten ergab sich ein Elektropherogramm mit exakt bestimmter Größe und Konzentration jedes Fragmentes innerhalb der einzelnen Proben. Abbildung 13 zeigt zwei Beispiele dieser Ergebnisse. Um die Proben-Molarität zu bestimmen, wurden die Berechnungen zwischen den Grenzwerten 105 bp und 165 bp durchgeführt. Dadurch konnte eine vollständige Abdeckung aller miRNAs innerhalb der Probe gewährleistet werden. Die berechnete Molarität wurde dann mit der probenspezifischen Verdünnung zurück gerechnet. Alle Proben innerhalb der Pools wurden dann in äquimolaren Konzentrationen gemischt und so für die Sequenzierung fertig gestellt.



**Abbildung 13: Beispiele für Elektropherogramme des Agilent Bioanalyzer 2100.** Links: Diagramm einer Probe, mit einem sehr guten Verhältnis zwischen miRNA (143 bp) und Adapter-Adapter Dimeren (124 bp) (ca. 240/100 [FU] = 2,4). Rechts: Diagramm einer Probe mit einer hohen Rate an enthaltenen Adapter-Adapter Dimeren. Das Verhältnis an miRNA-Fragmenten (144 bp) zu Adapter-Adapter-Dimeren (123 bp) (ca. 90/60 [FU] = 1,5) ist deutlich in Richtung Dimere verschoben. Dimere sind Rückstände aus dem Gelschmier, die beim Ausschneiden teilweise mit ausgeschnitten wurden.

#### 2.4.6 DeepSequencing am Illumina HiSeq 1000

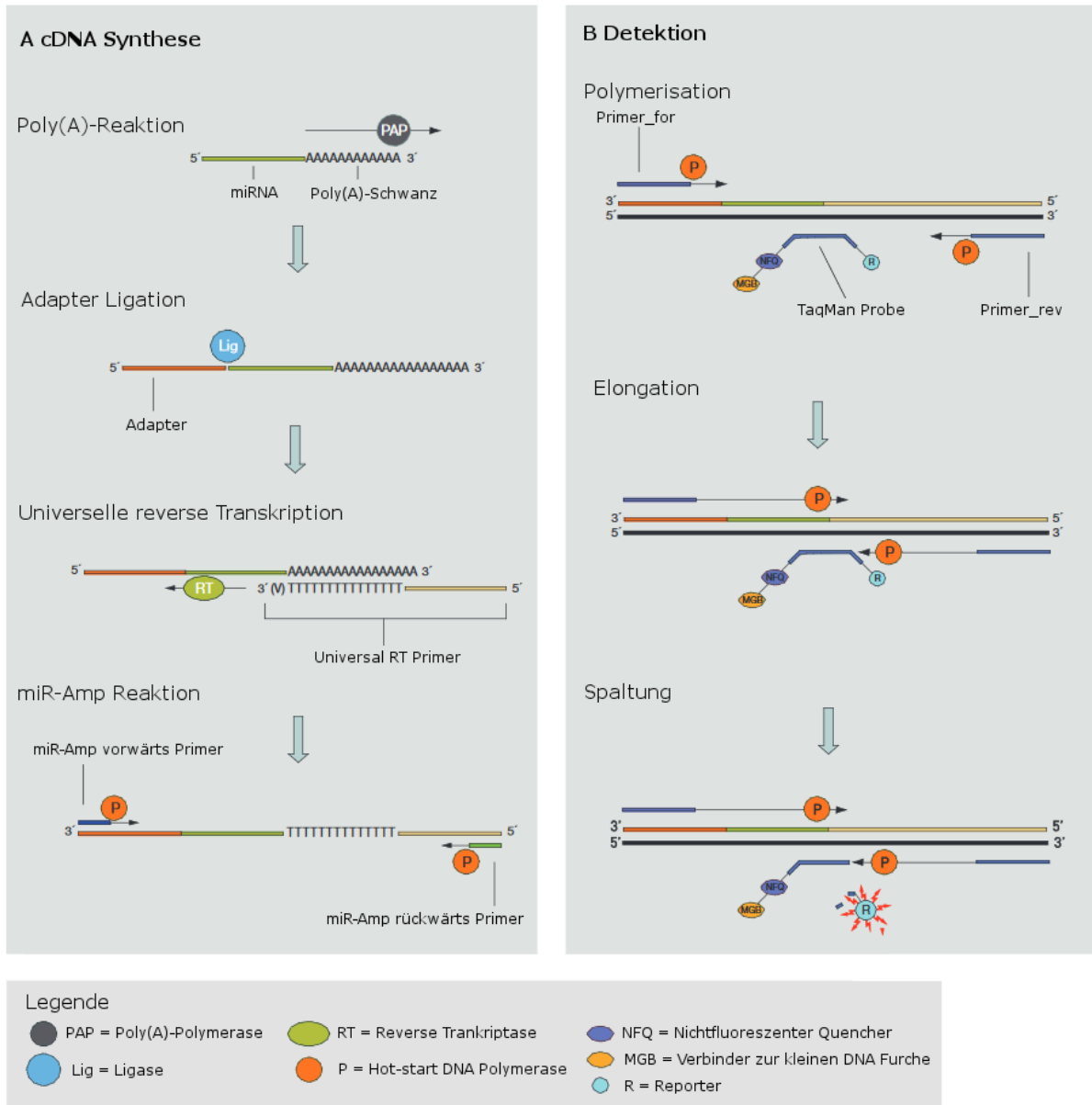
Die cDNA-Pools wurden auf einem Illumina HiSeq 1000 am Kompetenzzentrum Fluoreszenz Bioanalytik (KFB, Universität Regensburg, Deutschland) sequenziert. Die resultierenden fastq-Dateien wurden anschließend mit der miRDeep2 Software unter Galaxy analysiert (siehe Abschnitt 2.5.1).

#### 2.4.7 Real-Time PCR zur miRNA Diagnostik

Zur Untersuchung einer diagnostischen Verwertbarkeit der Ergebnisse der Hochdurchsatz-Sequenzierung wurde eine Real-Time PCR aller Proben mit mehreren Markern durchgeführt. Dazu wurden aus allen Seren erneut die Total-RNA extrahiert (siehe Abschnitt 2.4.1), diesmal unter der Zugabe der exogenen, im humanen Serum nicht vorkommenden, Kontroll-miRNA ath-159a (140). Die extrahierten Seren wurden dann unter Verwendung der TaqMan® Advanced Chemikalien mit Hilfe des Advanced miRNA cDNA Synthese-Kits und den Advanced miRNA Assays weiter prozessiert. Das miRNA cDNA-Synthese-Kit besteht dabei aus 4 Schritten: 1) dem Anhängen eines Poly(A)-Schwanzes, um die kurzen miRNAs zu verlängern, 2) einer Adapter-Ligation gefolgt von 3) der universellen reversen Transkription und 4) einem Prä-Amplifikationsschritt (Abbildung 14A). Danach wurden die Proben auf einem Real-Time PCR Gerät untersucht, um spezifische miRNAs zu detektieren, welche während der Hochdurchsatz-Sequenzierung signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten-Gruppen aufwiesen (siehe Resultate). Die Detektion spezifischer miRNAs wurde dabei mit TaqMan-Proben und einer zugehörigen Polymerase sichergestellt. Die TaqMan-Proben bestanden aus einer kurzen komplementären Nukleotidsequenz, einem gebundenen Reporter-Farbstoff und



einem nicht-fluoreszenten Quencher. Solange sich diese Proben ungebunden in der Reaktionslösung befanden, wurde das Fluoreszenz-Signal des Reporters teilweise durch den Quencher unterdrückt, wodurch ein konstantes Hintergrund-Signal detektiert werden konnte. Bei einem Vorhandensein der zur TaqMan-Probe korrespondierenden miRNA konnten diese miteinander interagieren und so ein kurzes doppelsträngiges DNA-Fragment bilden. Im Rahmen der PCR wurde eine zweite Eigenschaft der DNA-Polymerase verwendet. Neben der 5'→3' Polymerase-Aktivität besitzen diese Polymerasen auch eine 5'→3' Exonuklease-Aktivität. Diese Funktion erlaubt ein Zerschneiden von doppelsträngiger DNA am freien 5'-Ende während der Elongation des Primers (145). Durch das Zerschneiden der TaqMan-Proben wurden der Quencher und der Reporter voneinander getrennt, wodurch das Fluoreszenz-Signal des Reporters nicht mehr unterdrückt werden konnte (Abbildung 14B). Durch die Detektion des Verhältnisses von Hintergrund und freier Fluoreszenz nach jedem PCR-Zyklus konnte das Vorhandensein einer spezifischen miRNA innerhalb der Probe nachgewiesen werden. Alle Experimente wurden auf einem StepOnePlus Real-Time PCR-System mit gleichen Einstellungen und PCR-Bedingungen durchgeführt. Alle 96-Loch Platten enthielten zusätzlich mehrere Proben, um eine Kalibrierung innerhalb einzelner Läufe zu ermöglichen. Dadurch wurde der Einfluss einer gerätespezifischen Variabilität bei aufeinander folgenden Experimenten minimiert.



**Abbildung 14: Ablauf der TaqMan Advanced miRNA Assays. A:** cDNA-Synthese mit Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes, Adapter-Ligation, reverser Transkription mit universellen Primern und miRNA-Amplifikations-Reaktion. **B:** Detektion der TaqMan-Proben mit gebundenem Reporter und Quencher. Während der DNA-Elongation wurde die Probe durch die 5'→3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase gespalten und die Fluoreszenz des freien Reporters detektiert. Abdruck und Übersetzung genehmigt von Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH: White paper: TaqMan Advanced miRNA Assays – superior performance for miRNA detection and quantification, Copyright 2016

## 2.5 Bioinformatik und Statistik

### 2.5.1 miRDeep2 in der Galaxy-Umgebung

Die fastq-Dateien wurden mit verschiedenen Software-Paketen im Rahmen einer lokal installierten Galaxy-Umgebung analysiert. Beim Galaxy-Projekt handelt es sich um eine offene, webbasierte Bioinformatik-Plattform für datenintensive Genomforschung, welche sich durch ihre Reproduzierbarkeit und Transparenz auszeichnet (146, 147). Das Tool-Sheed der Galaxy-Umgebung erlaubt ein einfaches Teilen und Konfigurieren von informatischen Tools, sodass auch Personen ohne

Programmierkenntnisse mit der Komplexität der Genomforschung zurecht kommen können (148). Galaxy ist online verfügbar auf <http://galaxyproject.org/>.

Zuerst wurden alle fastq-Dateien in die Galaxy-Umgebung geladen und dort unter Verwendung des Tools FastQC einem kurzen Qualitätscheck unterzogen (149). Diese Software war in der Lage, Informationen, wie die Gesamtanzahl aller sequenzierten Fragmente (Read-Count), die Sequenzqualität und das Vorhandensein von überrepräsentierten Sequenzen bereitzustellen. Bei allen analysierten Proben wurde eine generelle Qualitäts-Punktzahl von über 37 festgestellt, wobei Werte über 30 eine gute Sequenzierqualität darstellten. Weiterhin war in den FastQC-Dateien der Anteil an überrepräsentierten Fragmenten erkennbar, in diesem Fall die Adapter-Adapter Dimere, die beim Ausschneiden der miRNA-Banden aus den Gelen mit überführt wurden. Innerhalb der Proben wurde dabei ein Prozentsatz zwischen 35 % und 60 % solcher Dimere festgestellt, der Rest verteilte sich auf die in den Proben enthaltenen miRNAs.

Der zweite Analyseschritt war die Erstellung von Tabellen, welche zu jeder bekannten miRNA in jeder Probe die Gesamtanzahl der gezählten sequenzierten Fragmente auflisteten. Dazu wurde das miRDeep2-Softwarepaket innerhalb der Galaxy-Umgebung mit dem Mapper-Modul und dem Quantifier-Modul verwendet, detaillierte Information sind online verfügbar (150, 151). Das Mapper-Modul konvertiert die Illumina Sequenzdaten in ein geeignetes Format und schneidet gleichzeitig die vorher eingegebene 3' Adapter-Sequenz (TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG) aus den Sequenzen heraus. Die so gekürzten Fragmente wurden anschließend mit dem humanen Genom verglichen und das Ergebnis direkt mit dem Quantifier-Modul weiterverarbeitet. Dieses Modul vergleicht die Dateien mit bekannten miRNA-Vorläufer-Sequenzen und physiologisch wirksamen miRNA-Sequenzen, die zuvor in die Software eingespeist wurden. Beide Datensätze sind auf der miRBase Website online verfügbar (<http://mirbase.org>, Release 21, 06/14), welche eine Liste aller bekannten miRNAs verschiedener Spezies bereitstellt (152-154). Die dort verfügbaren Datensätze enthielten Vorläufer- und reife miRNA-Sequenzen aller bekannten miRNA und wurden so angepasst, dass nur diejenigen übrigblieben, welche im humanen Genom bekannt waren. Das Quantifier-Modul vergleicht dabei zuerst die physiologischen Sequenzen mit den Vorläufern und anschließend die Sequenzierdaten mit den Vorläufer-Sequenzen. Bei der Verwendung des Moduls wurden die vorkonfigurierten Optionen verwendet. Dabei wurde bei dem Sequenzvergleich eine Fehlpaarung innerhalb eines Intervalls von 2 Nukleotiden upstream und 5 Nukleotiden downstream der eigentlichen physiologischen Sequenz zugelassen. Durch diese Einstellung konnte auch die korrekte Detektion von miRNAs ermöglicht werden, welche durch eine unpräzise Dicer-Prozessierung geringfügig verändert wurde (150). Die resultierenden Tabellen enthielten den Namen der miRNA, den dazugehörigen Vorläufer und die exakte und normalisierte Anzahl der gezählten Fragmente jeder einzelnen Probe. Die normalisierten Werte repräsentieren dabei die Anzahl an miRNA-Fragmenten jeder miRNA bei einer Gesamtzahl von

einer Million gemessenen Fragmenten. Einige der Fragmente wurden doppelt in den Tabellen aufgeführt, da sich die Vorläufer-Sequenzen minimal unterschieden, während die physiologischen Sequenzen exakt gleich waren. Deswegen wurden nur die Datensätze mit der höheren Gesamtanzahl behalten und die anderen aus den Tabellen gelöscht.

### **2.5.2 Bestimmung der differentiellen Expression mit DESeq2**

Um differentiell exprimierte miRNAs in den Proben zu bestimmen, wurde das DESeq2-Softwarepaket innerhalb der R-Statistik-Software verwendet. R ist eine kostenlose, frei verfügbare Software für statistische Datenverarbeitung und erlaubt die Verwendung einer Vielzahl von unterschiedlichen Paketen, darunter auch die grafische Illustration von Daten und Ergebnissen (155). Das DESeq2 Paket wird zur Detektion systematischer Unterschiede zwischen bestimmten Bedingungen verwendet. Detaillierte Informationen zu den einzelnen Berechnungen finden sich bei Love *et al.* (156). Die Analyse berechnet auf Grundlage des Wald-Tests die signifikanten, statistischen Änderungen bei verschiedenen Test-Gruppen und führt auch eine Korrektur für multiple Proben mittels der Prozedur nach Benjamini und Hochberg durch (157, 158). Für die Analyse wurde zuvor eine Datei mit allen nicht modifizierten Sequenzier-Werten aller miRNAs und aller Proben erstellt.

### **2.5.3 Weitere statistische Auswertung**

Zusätzliche statistische Auswertungen wurden entweder mit SPSS 24 von IBM oder Excel 2013 von Microsoft durchgeführt.

## Ergebnisse

### **3.1 Kryo-Immunhistochemie**

#### **3.1.1 Statistik der Patientengruppen**

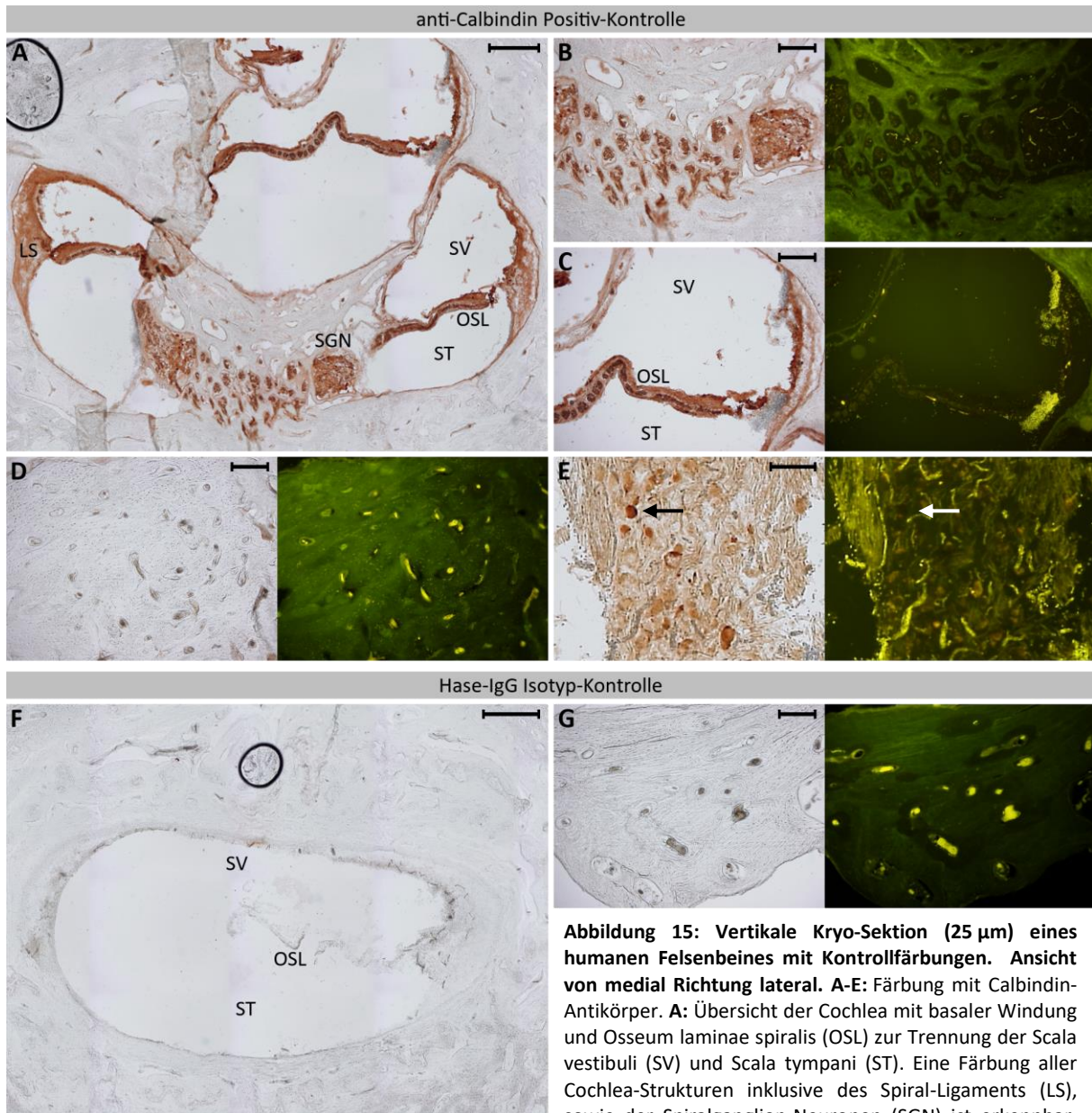
Auf den Kryo-Schnitten wurden insgesamt 79 Patientenserien, davon 47 (59.5 %) männlich und 32 (40.5 %) weiblich, untersucht. Die Versuchsgruppen enthielten 21 Proben für die BPPV-Kontrollgruppe, 21 Proben für die BVP-Gruppe und 37 Proben für die Morbus Menière-Gruppe. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei  $62.15 \pm 13.7$  Jahren. Aufgrund der Probengröße ( $n=79$ ) wurde zur Abschätzung der Normalverteilung der Chi-Quadrat-Test angewendet. Sowohl das Geschlecht ( $p=0.091$ ) als auch das Alter ( $p=0.942$ ) zeigten dabei eine Normalverteilung. Anschließend wurde der Levene-Test zur Bestimmung der Varianzhomogenität angewendet. Auch hierbei bestätigte sich bei beiden Variablen, Geschlecht ( $p=0.349$ ) und Alter ( $p=0.151$ ), dass von einer Varianzhomogenität ausgegangen werden konnte. Dadurch waren die Grundvoraussetzungen für die Verwendung einer einfaktoriellen Varianzanalyse erfüllt. Diese ergab, dass sich sowohl in der Variable Geschlecht ( $p=0.182$ ) als auch beim Alter ( $p=0.051$ ) innerhalb der Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede zeigten, wodurch entsprechende Post-Hoc-Tests nicht durchgeführt wurden.

#### **3.1.2 Bestimmung der Färbung anhand von Kontrollen**

Anhand von Kontrollen wurde bestimmt, wie eine etablierte Färbung von nicht gefärbten Strukturen unterschieden werden kann. Zusätzlich wurden Schnitte angefertigt, die für eine Hintergrund-Bestimmung der humanen Serien verwendet wurden. Alle gezeigten Bilder repräsentieren die Ergebnisse aller Wiederholungen der jeweiligen Antikörper. Dazu wurde als Positivkontrolle ein Hase-anti-Calbindin-Antikörper verwendet, welcher das 28 kDa Protein Calbindin, ein Mitglied der Calcium-bindenden Proteine, erkennt und spezifisch bindet. Gleichzeitig wurde eine entsprechende Hase-IgG Isotyp-Kontrolle als korrespondierende Negativkontrolle genutzt. Die Nutzung des Calbindin-Antikörpers führte zu einer intensiven Färbung der cochleären Strukturen, wie des Osseum lamina spiralis und des Spiralligamentes (Abbildung 15 A, C). Außerdem wurden intensive Färbungen der Nervengewebe sowie der Neuronen festgestellt, darunter die Spiralganglion-Neuronen und die Neuronen des Nervus cochlearis (Abbildung 15 B, E). Bei allen Neuronen wurde noch ein Autofluoreszenz-Bild aufgenommen, um eine Unterscheidung zwischen einer etablierten Färbung und der Lipofuscin-Autofluoreszenz sicherzustellen. Lipofuscin, ein Alterspigment, lagert sich in postmitotischen Zellen wie Neuronen an und bildet dort braun-gelbe Aggregate, die durch die Autofluoreszenz von der DAB-Färbung unterschieden werden konnten (137). Neuronen, die eine DAB-Färbung aufwiesen, konnten im Autofluoreszenz-Bild durch eine Abschwächung bis hin zum Fehlen derselben detektiert werden. Weitere Färbungen wurden mit dem

## Ergebnisse

Calbindin-Antikörper nicht festgestellt, der gesamte knöcherne Bereich um die Cochlea herum war ungefärbt. Bei der Verwendung der Hase-IgG Isotyp-Kontrolle konnten keine Färbungen festgestellt werden. Das gesamte Gewebe inklusive Cochlea, Nerven, Neuronen und knöcherne Bereiche war vollständig transparent (Abbildung 15 F, G).



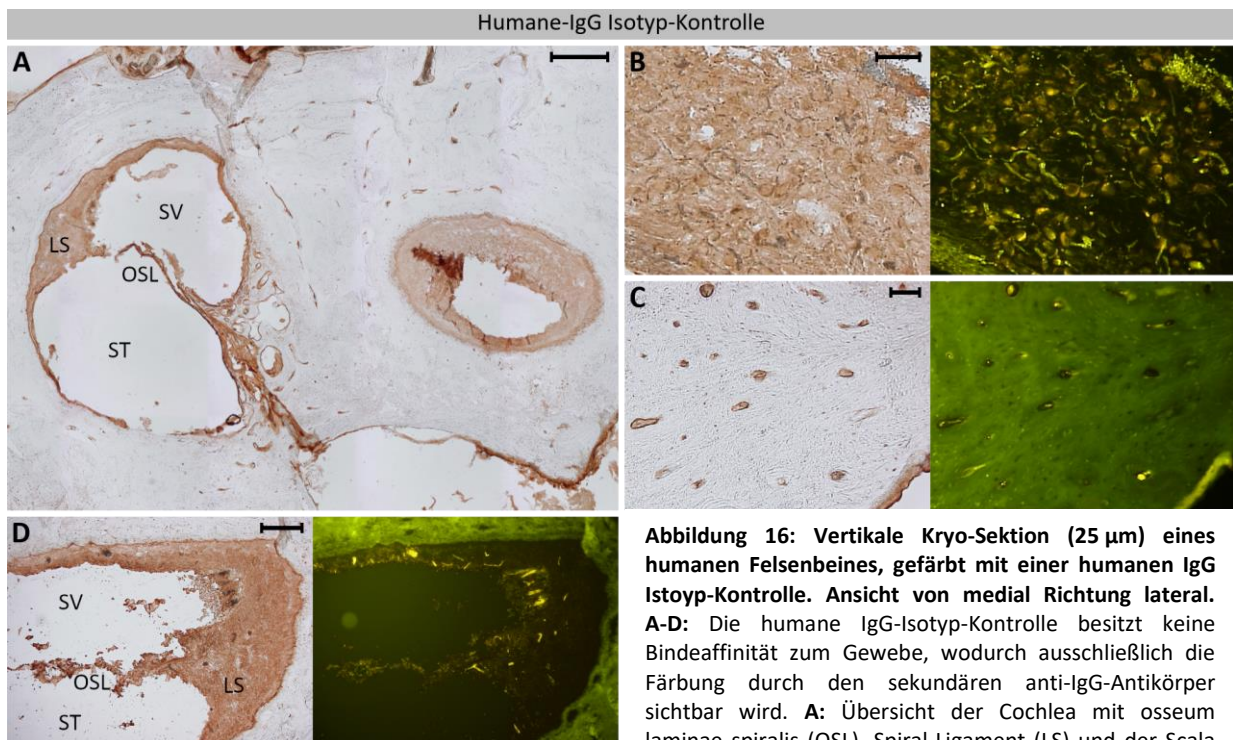
**Abbildung 15: Vertikale Kryo-Sektion (25 µm) eines humanen Felsenbeines mit Kontrollfärbungen. Ansicht von medial Richtung lateral. A-E:** Färbung mit Calbindin-Antikörper. **A:** Übersicht der Cochlea mit basaler Windung und Osseum laminae spiralis (OSL) zur Trennung der Scala vestibuli (SV) und Scala tympani (ST). Eine Färbung aller Cochlea-Strukturen inklusive des Spiral-Ligaments (LS), sowie der Spiralganglion-Neuronen (SGN) ist erkennbar.

Maßstabsbalken entspricht 500 µm. **B:** Detailansicht des Modiolus mit eingelagertem und gefärbtem Spiralganglion (keine Autofluoreszenz). Maßstab 250 µm. **C:** Detailansicht der Osseum laminae spiralis mit gefärbten Nervenfasern. Maßstab 250 µm. **D:** Knöcherne Bereiche der Cochlea, Autofluoreszenz überdeckt eine mögliche Färbung. Maßstab 250 µm. **E:** Neuronen des Nervus cochlearis. Gefärbte Neuronen (schwarzer Pfeil) verlieren ihre Autofluoreszenz (weißer Pfeil). Maßstab 100 µm. **F-G:** Kontrolle der Calbindin-Färbung durch entsprechende IgG-Isotyp-Kontrolle, welche keine Bindeaffinität zu dem Gewebe aufweist. **F:** Übersicht der Cochlea, es wurde keine Färbung detektiert. Maßstab 500 µm. **G:** Knöcherne Bereiche der Cochlea, ausschließlich Autofluoreszenz erkennbar. Maßstab 250 µm.



## Ergebnisse

Als Negativ-Färbung für die humanen Seren wurde eine dem sekundären Antikörper anti-Human-IgG angepasste IgG-Isotyp-Kontrolle zur Bestimmung der Hintergrundfärbung verwendet. Da die Isotyp-Kontrolle keine Bindeaffinität für das Gewebe aufweist, konnte so die alleinige Färbung des sekundären Antikörpers untersucht werden. Dieser führte zu einer vergleichbaren Färbung wie der Calbindin-Antikörper. Gefärbt waren nahezu alle Strukturen der Cochlea, aber auch das Nervengewebe (Abbildung 16 A, B, D). Eine Färbung der Neuronen wurde hingegen nicht festgestellt. Alle Neuronen konnten im Autofluoreszenzbild eindeutig identifiziert werden, außerdem konnten keine Unterschiede zwischen einzelnen Neuronen detektiert werden. Im Gegensatz zur Positivkontrolle wurde eine Färbung innerhalb der knöchernen Bereiche der Cochlea festgestellt, welche durch das Fehlen der Autofluoreszenz verifiziert werden konnte (Abbildung 16 C). Anhand ihrer Struktur sowie deren Umgebung lässt sich diese Färbung den Osteonen zuweisen. Diese Mikrostrukturen entstehen bei der Osteogenese im Zuge der Remodellierung der primären Geflechtknochen zum Lamellenknochen (1, 159). Die Osteone mit ihrem zentralen Havers-Kanal, sowie den umgebenden Lamellen und kreisförmig angeordneten Osteozyten sind in den FFPE-Schnitten noch besser zu erkennen (siehe Abschnitt 3.2.2 und 3.2.3). Zusätzlich wurden einmalig Experimente ohne den primären und sekundären Antikörper durchgeführt, ausschließlich der Streptavidin-HRP-Komplex wurde auf die Schnitte gegeben. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die Färbung durch endogenes Biotin im Gewebe verursacht wurde (Abbildung Anhang 1).



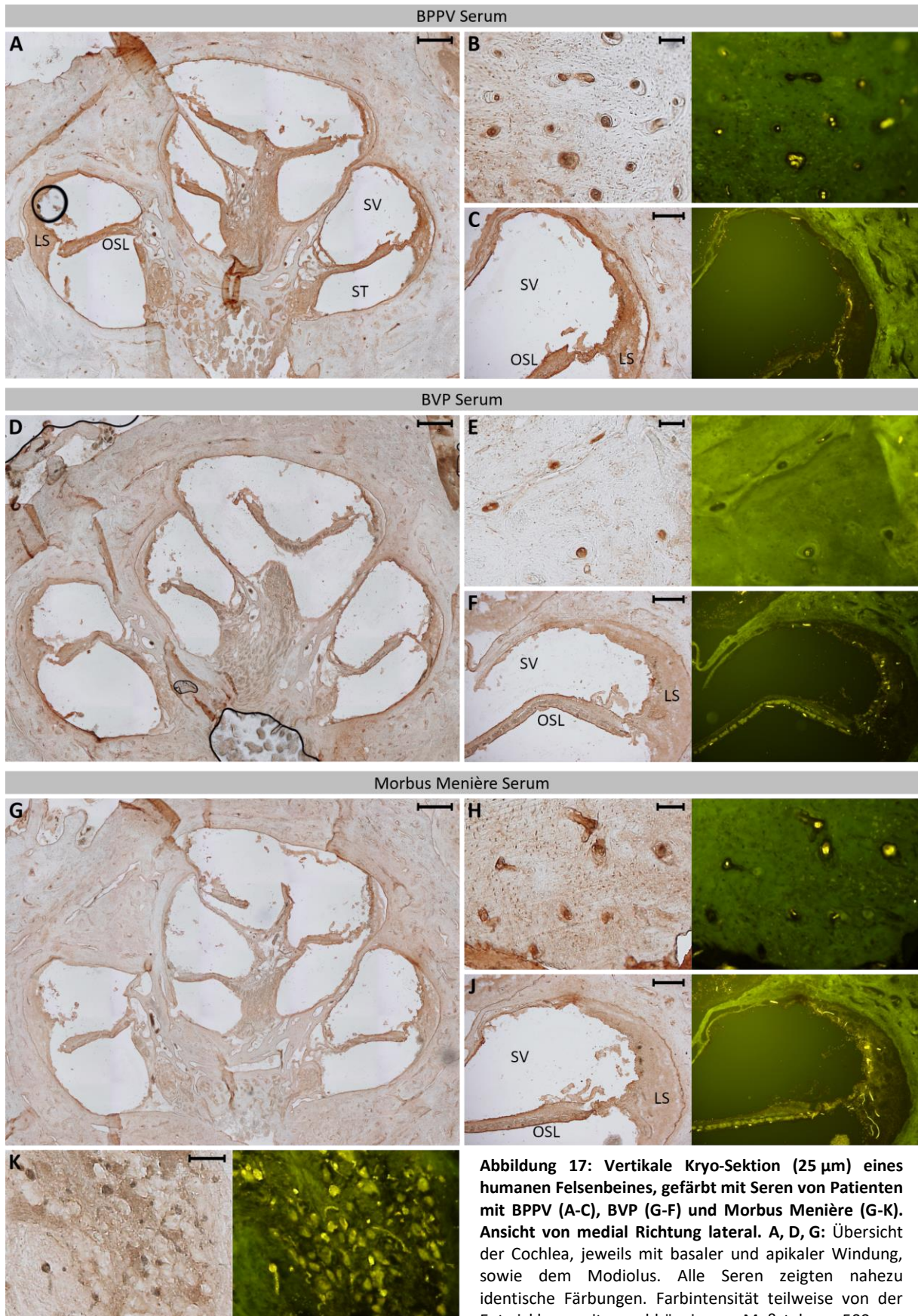
**Abbildung 16: Vertikale Kryo-Sektion (25 µm) eines humanen Felsenbeines, gefärbt mit einer humanen IgG Isotyp-Kontrolle. Ansicht von medial Richtung lateral. A-D: Die humane IgG-Isotyp-Kontrolle besitzt keine Bindeaffinität zum Gewebe, wodurch ausschließlich die Färbung durch den sekundären anti-IgG-Antikörper sichtbar wird. A: Übersicht der Cochlea mit osseum laminae spiralis (OSL), Spiral-Ligament (LS) und der Scala vestibuli, sowie der Scala tympani. Cochlea-Strukturen zeigen eine Färbung. Maßstab 500 µm. B: Detailsicht der Neuronen des Nervus cochlearis. Alle Neuronen können im Autofluoreszenz-Bild identifiziert werden und sind daher ungefärbt. Maßstab 100 µm. C: Knöcherne Bereiche der Cochlea zeigen eine Färbung, die die Autofluoreszenz vollständig überdeckt. Maßstab 100 µm. D: Detailsicht auf das gefärbte Spiral-Ligament (LS). Maßstab 250 µm.**

### 3.1.3 Färbung mit Patientenseren

Die Kryo-Schnitte wurden mit unverdünnten Seren von Patienten mit folgenden Krankheiten gefärbt: (1) BPPV als rein funktioneller, pathologischer Schwindel als Kontrollgruppe, (2) BVP, welche unter anderem auch autoimmune Ursachen haben kann und (3) Morbus Menière, bei welchem schon Serum-Antikörper beschrieben wurden (67, 68). Als Sekundär-Antikörper wurde ein anti-Human-IgG-Antikörper und zur Verstärkung der Streptavidin-HRP-Komplex verwendet. Alle gezeigten Bilder repräsentieren die einzelnen Patientengruppen und wurden aufgrund der Bild- und Schnittqualität ausgewählt. Alle Schnitte wurden am Mikroskop überprüft, um Auffälligkeiten einzelner Seren zu erkennen. Die Intensität der Färbung war hauptsächlich von der Zeitdauer der DAB+-Entwicklung abhängig. Die BPPV-Seren wurden als Kontrollgruppe verwendet, um die Reaktivität von Seren ohne autoimmune Komponenten zu bestimmen. Ähnlich der Färbung der humanen Isotyp-Kontrolle waren auch hier alle Strukturen der Cochlea angefärbt (Abbildung 17 A, C). Es konnten keine Unterschiede zur Negativkontrolle festgestellt werden. Die Nerven und Neuronen zeigten die gleiche Färbung, die auch in der Negativkontrolle detektiert wurde (Abbildung 17 K, repräsentativ für alle Seren). Dem hingegen zeigten sich Unterschiede in den knöchernen Bereichen der Cochlea. Die dabei angefärbten Strukturen, die gleichen wie in der Negativkontrolle, zeigten eine erheblich intensivere Färbung (Abbildung 17 B). Insgesamt waren die Schnitte etwas intensiver, die knöchernen Bereiche wesentlich intensiver gefärbt als bei der Negativkontrolle. Die gleichen Färbemuster konnten auch für die beiden anderen Patientengruppen festgestellt werden. Auch hier zeigte sich eine Färbung der cochleären Strukturen (Abbildung 17 D, F [BVP]; G, J [MM]), sowie der knöchernen Bereiche (Abbildung 17 E [BVP]; H [MM]). Die Schnitte waren, wie auch die BPPV-Kontrollgruppe etwas intensiver gefärbt als die Isotyp-Kontrolle. Innerhalb der drei Gruppen wurden keine Unterschiede in den Färbungen festgestellt. Alle Schnitte zeigten die gleichen gefärbten Strukturen, sowie gleiche Intensitäten. Experiment-abhängige Unterschiede durch die Dauer der DAB+-Entwicklung zeigten in allen Gruppen die gleichen Änderungen der Intensitäten. Einzelne, spezifische Unterschiede konnten innerhalb der Gruppen nicht beobachtet werden, beziehungsweise waren nicht gruppenspezifisch. Dazu gehörte zum Beispiel eine intensivere Färbung der Strukturen der knöchernen Bereiche der Cochlea.



## Ergebnisse



**Abbildung 17:** Vertikale Kryo-Sektion (25 µm) eines humanen Felsenbeines, gefärbt mit Seren von Patienten mit BPPV (A-C), BVP (G-F) und Morbus Menière (G-K). Ansicht von medial Richtung lateral. A, D, G: Übersicht der Cochlea, jeweils mit basaler und apikaler Windung, sowie dem Modiolus. Alle Seren zeigten nahezu identische Färbungen. Farbintensität teilweise von der Entwicklungszeit abhängig. Maßstab 500 µm.

B, E, H: Knöchernen Bereiche der Cochlea, mit intensiv gefärbten Strukturen, welche keine Autofluoreszenz aufweisen. Maßstab 100 µm. C, F, J: Detailansicht auf das Osseum laminae spiralis (OSL) und das Spiral-Ligament (LS). Färbung in allen Seren nahezu identisch. Farbintensität teilweise von der Entwicklungszeit abhängig. Maßstab 250 µm. K: Detailansicht der Neuronen des Nervus facialis. Alle Neuronen sind im Autofluoreszenz-Bild erkennbar und ungefärbt. Bild ist beispielhaft für Seren aus anderen Patientengruppen. Maßstab 100 µm.

## 3.2 FFPE-Immunhistochemie

### 3.2.1 Statistik der Patientengruppen

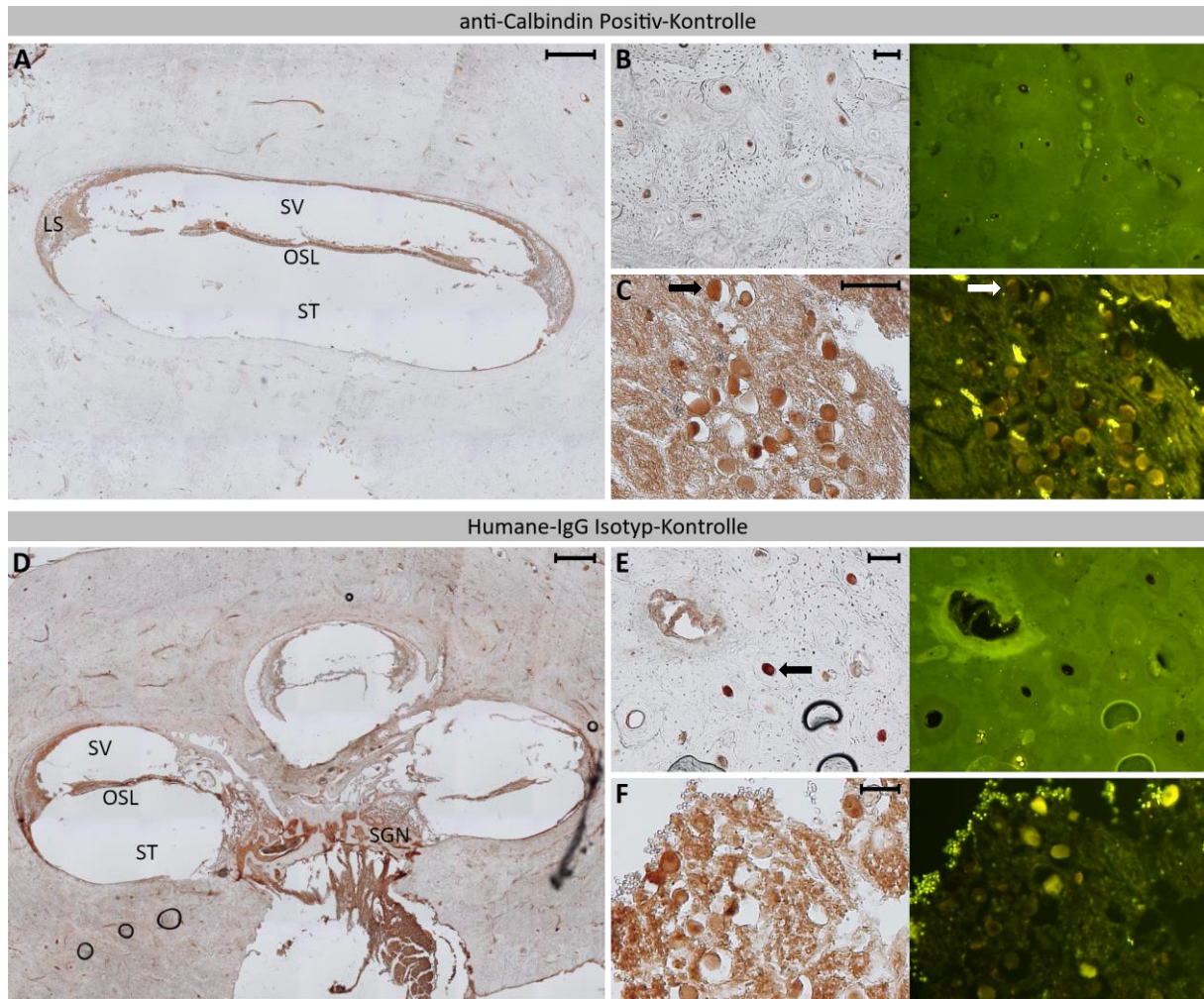
Auf den Schnitten mit FFPE-Gewebe wurden insgesamt 52 Seren von Patienten untersucht. Davon waren 29 (55.8 %) männlich und 23 (44.2 %) weiblich. Die Versuchsgruppen verteilten sich auf 15 BPPV-Patienten, 19 BVP-Patienten und 18 Patienten mit Morbus Menière. Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei  $63.06 \pm 14.6$  Jahren. Aufgrund der Probengröße ( $n=52$ ) wurde der Chi-Quadrat-Test zur Kontrolle der Normalverteilung verwendet, welcher diese bei beiden Variablen, Geschlecht ( $p=0.405$ ) und Alter ( $p=0.981$ ), bestätigte. Der darauffolgende Levene-Test auf Varianzhomogenität ergab sowohl beim Geschlecht ( $p=0.743$ ) als auch beim Alter ( $p=0.16$ ), dass eine Varianzhomogenität vorlag. Somit war das Durchführen einer einfaktoriellen Varianzanalyse möglich. Es wurden keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen bei Geschlecht ( $p=0.702$ ) oder Alter ( $p=0.486$ ) festgestellt. Entsprechende Post-Hoc-Tests wurden daraufhin nicht durchgeführt.

### 3.2.2 Bestimmung der Färbung anhand von Kontrollen

Die FFPE-Schnitte wurden zuerst mit Kontrollen behandelt, um eine Positivkontrolle sowie entsprechende Negativkontrollen zu etablieren. Auch hier wurde als Positivkontrolle der anti-Calbindin-Antikörper verwendet. Die entsprechende Isotyp-Kontrolle wurde durchgeführt und zeigte die gleiche Reaktivität wie sie für die Kryo-Schnitte oben beschrieben wurde. Es wurde daher darauf verzichtet, diese erneut in den Abbildungen darzustellen. Bei der Positivkontrolle wurden die gleichen gefärbten Strukturen wie auf den Kryo-Sektionen detektiert. Die Färbung der Cochlea-Strukturen war nahezu identisch (Abbildung 18 A). Anders als auf den Kryo-Schnitten konnte auf dem FFPE-Gewebe eine Färbung der Osteone der knöchernen Bereiche festgestellt werden, welche im Autofluoreszenz-Bild verifiziert wurde (Abbildung 18 B). Des Weiteren waren die Neuronen des Nervus cochlearis unterschiedlich stark angefärbt (Abbildung 18 C). Einige zeigten eine intensive Färbung, die die Autofluoreszenz nahezu vollständig überdeckte, während andere ungefärbt waren und eine starke Autofluoreszenz aufwiesen. Auch die Färbung der humanen IgG Isotyp-Kontrolle war mit der Färbung auf den Kryo-Schnitten vergleichbar. Es zeigte sich eine intensive Färbung der Cochlea, zusätzlich konnte auch hier eine Färbung der Nerven sowie der Neuronen festgestellt werden (Abbildung 18 D, F). Die knöchernen Bereiche zeigten die gleichen angefärbten Strukturen, wenn auch intensiver als auf den Kryo-Sektionen (Abbildung 18 E). Die Färbungen auf den FFPE-Schnitten erschienen insgesamt intensiver und dadurch deutlicher als auf den Kryo-Schnitten.



## Ergebnisse



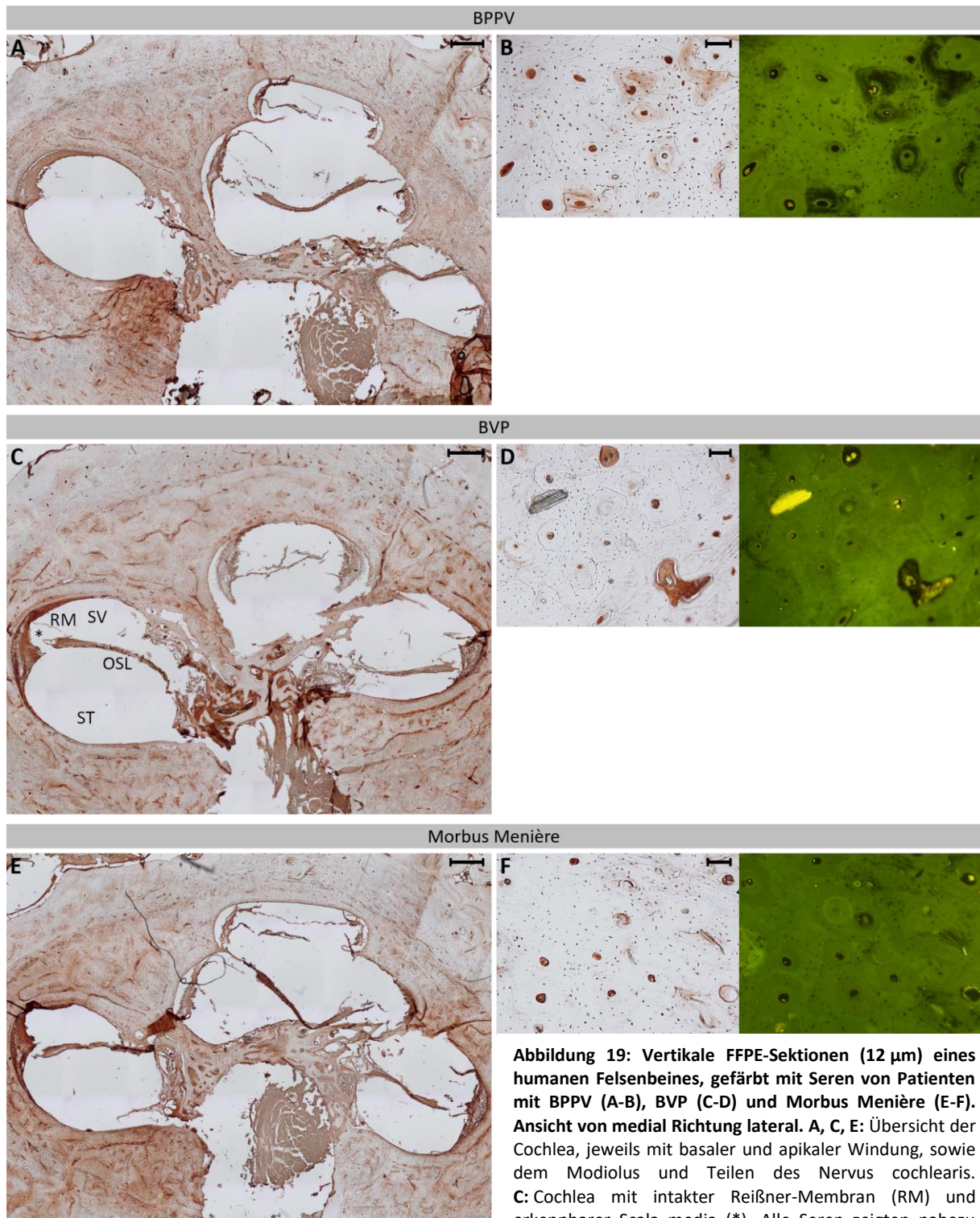
**Abbildung 18: Vertikale FFPE-Sektion (12 µm) eines humanen Felsenbeines mit Kontrollfärbungen. Ansicht von medial Richtung lateral. A-C:** Anti-Calbindin-Färbung als Positivkontrolle. **A:** Übersicht über die Cochlea (basale Windung), Osseum laminae spiralis (OSL) und Spiral-Ligament (LS) zeigen eine leichte Färbung. Maßstab 500 µm. **B:** Knöcherne Bereiche der Cochlea mit Osteonen, Färbungen zeigen keine Autofluoreszenz. Maßstab 100 µm. **C:** Neuronen des Nervus cochlearis sind teilweise gefärbt. Überlagerung der Autofluoreszenz ist abhängig von der Stärke der Färbung. Schwarzer bzw. weißer Pfeil zeigen ein Neuron mit starker Färbung, die die Autofluoreszenz überlagert. Am oberen Rand des Neurons befinden sich Lipofuszin-Ablagerungen, die im Fluoreszenz-Bild als leuchtender Rand erkennbar sind. Maßstab 100 µm. **D-F:** Felsenbein gefärbt mit humaner IgG-Isotyp-Kontrolle. Es fehlt die Bindeaffinität zum Gewebe, daher ist nur die Färbung des sekundären anti-IgG Antikörpers sichtbar. **D:** Übersicht des humanen Felsbeins mit basaler und apikaler Windung, sowie des Modiolus und Teile des Nervus cochlearis. Alle Bereiche zeigen charakteristische Hintergrundfärbung. Maßstab 500 µm. **E:** Knöcherne Bereiche der Cochlea mit Osteonen und markiertem zentralen Havers-Kanal (schwarzer Pfeil), Färbungen zeigen keine Autofluoreszenz. Maßstab 100 µm. **F:** Neuronen des Nervus cochlearis mit Autofluoreszenz je nach Stärke der Färbung. Maßstab 50 µm.

### 3.2.3 Färbung mit Patientenseren

Die FFPE-Schnitte wurden mit unverdünnten Seren von Patienten mit BPPV, BVP und Morbus Menière behandelt und mit dem sekundären Antikörper sowie dem Streptavidin-HRP-Komplex weiterbearbeitet. Alle gezeigten Bilder repräsentieren die entsprechenden Patientengruppen und wurden aufgrund der Bild- und Schnittqualität ausgewählt. Die BPPV-Kontrollgruppe zeigte eine deutliche Färbung der Cochlea sowie der Nerven und Neuronen (Abbildung 19 A). Zusätzlich konnte eine intensive Färbung der knöchernen Bereiche detektiert werden (Abbildung 19 B). Neben den stark gefärbten runden Osteonen konnten dazwischen kleine, punktförmige, regelmäßig verteilte

## Ergebnisse

Färbungen festgestellt werden, deren kreisförmige Anordnung der Anordnung von Osteozyten um den zentralen Havers-Kanal entspricht. Die gleichen Färbungen wurden auch für BVP (Abbildung 19 C, D) und Morbus Menière (Abbildung 19 E, F) gefunden. Insgesamt zeigten die Seren auf den FFPE-Schnitten eine intensivere, sowie deutlichere Färbung als auf den Kryo-Schnitten. Einzelne, probenspezifische oder gruppenspezifische Unterschiede konnten nicht detektiert werden.



**Abbildung 19:** Vertikale FFPE-Sektionen (12 µm) eines humanen Felsenbeines, gefärbt mit Seren von Patienten mit BPPV (A-B), BVP (C-D) und Morbus Menière (E-F). Ansicht von medial Richtung lateral. A, C, E: Übersicht der Cochlea, jeweils mit basaler und apikaler Windung, sowie dem Modiolus und Teilen des Nervus cochlearis. C: Cochlea mit intakter Reißner-Membran (RM) und erkennbarer Scala media (\*). Alle Seren zeigten nahezu identische Färbungen. Farbintensität teilweise von der Entwicklungszeit abhängig. Maßstab 500 µm. B, D, F: Knöchernen Bereiche der Cochlea mit Osteonen, Färbungen zeigten keine Autofluoreszenz. Alle Seren zeigten gleiche Färbungen. Maßstab 100 µm.



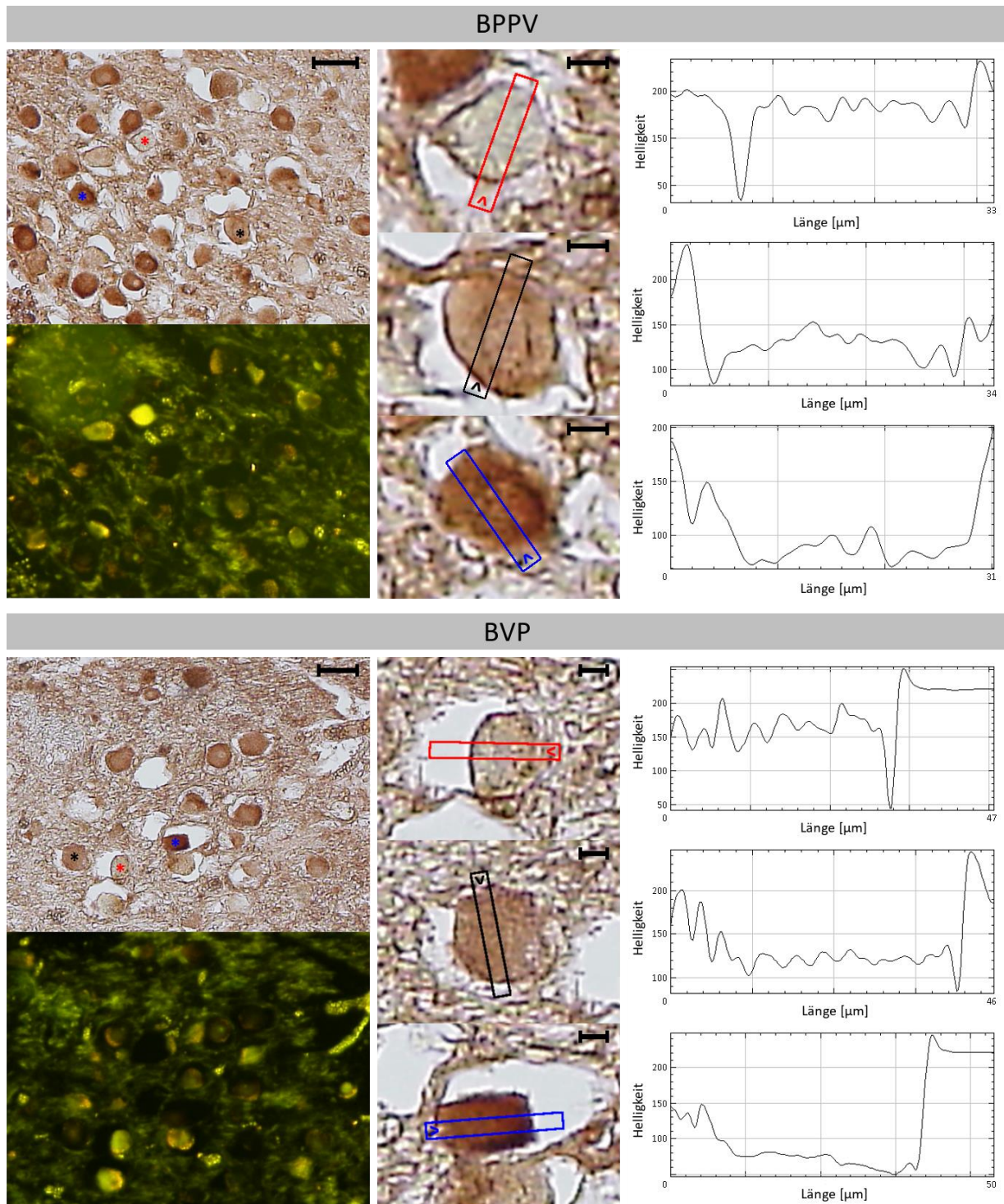
### 3.2.4 Färbung der Neuronen des Nervus cochlearis

Alle Schnitte, die Neuronen des Nervus cochlearis enthielten, zeigten Färbungen. Dabei waren die Neuronen unterschiedlich intensiv gefärbt. Einige zeigten keine Färbung und leuchteten im Autofluoreszenz-Bild sehr stark. Andere hingegen waren stark gefärbt und die DAB+-Färbung überdeckte die Autofluoreszenz. Daneben gab es Neuronen, die eine schwache Färbung aufwiesen, was im Autofluoreszenz-Bild nur zu einer Abschwächung derselben führte. Aufgrund dieser Unterschiede wurden von allen Neuronen Aufnahmen mit dem gleichen Zoom sowie der gleichen Belichtungszeit aufgenommen, um diese auf Unterschiede zwischen den Patientengruppen zu untersuchen. Die Neuronen wurden durch Linienscans auf ihre Helligkeit und damit auf ihre Färbung hin untersucht und in ungefärbt, schwach gefärbt und stark gefärbt unterteilt.

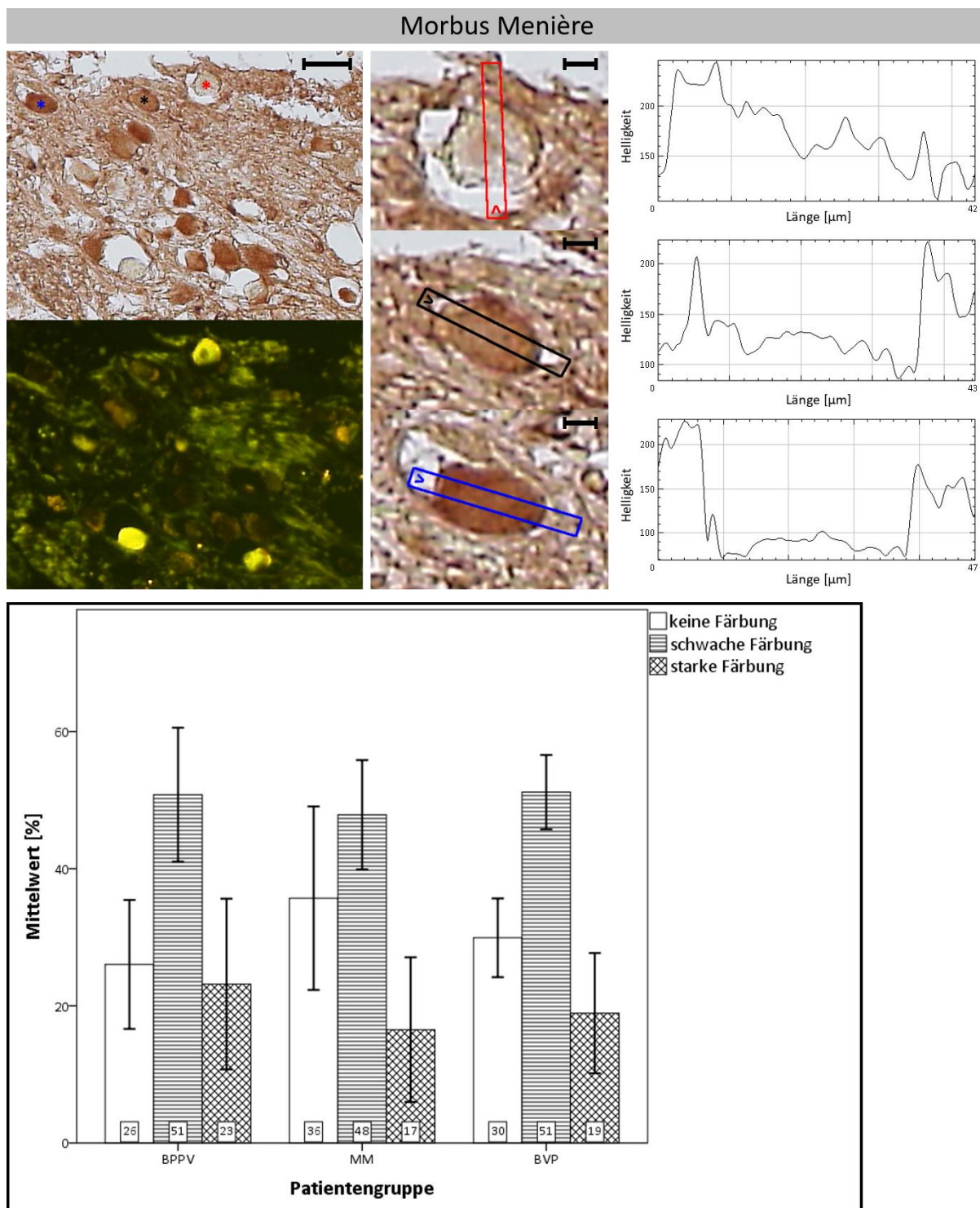
Die nachfolgenden Abbildungen zeigen jeweils eine repräsentative Aufnahme der jeweiligen Patientengruppe mit unterschiedlich stark gefärbten Neuronen (Abbildung 20.1 und 20.2 linke Seite). Dabei wurden auf jedem einzelnen Schnitt Neuronen aller drei Intensitäten vorgefunden. Innerhalb der Gruppen konnten durch die Aufnahmen keine Unterschiede per Auge festgestellt werden. Diese Beobachtung sollte anschließend durch die Linienscans verifiziert werden. Zu allen drei Patientengruppen wurde jeweils ein einzelnes Neuron der unterschiedlichen Färbungen stark vergrößert und der Linienscan, sowie die Scanrichtung eingezeichnet (Abbildung 20.1 und 20.2 Mitte). Anhand der Linienscans (Abbildung 20.1 und 20.2, rechte Seite) konnten die meisten Neuronen eindeutig in eine der drei Gruppen eingeordnet werden. Bei unklaren Scans wurden die Neuronen in die Gruppe der schwach gefärbten Neuronen eingeordnet. Aufgrund der Schnittdicke und der Hellfeld-Mikroskopie war bei vielen Neuronen ein dunkler Rand erkennbar. Dieser war auf den Linienscans als dunkle Inzision erkennbar und wurde daher als Marker für die eigentliche Größe des Neurons verwendet. Neuronen mit einer durchschnittlichen Helligkeit von über 150 wurden als ungefärbt gezählt, Neuronen mit Werten unter 100 als stark gefärbt. Von allen untersuchten Serien wurden die Prozentangaben der jeweiligen Färbeintensitäten der Neuronen berechnet und diese auf signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen untersucht. Bei der BPPV-Gruppe waren im Durchschnitt 26 % der Neuronen ungefärbt, 51 % schwach gefärbt und 23 % stark gefärbt. Eine ähnliche Verteilung konnte für BVP (30 %, 51 %, 19 %) und für Morbus Menière (36 %, 48 %, 17 %) festgestellt werden (Abbildung 20.2 Diagramm). Bei der statistischen Untersuchung wurde eine Varianzhomogenität der Gruppen festgestellt, jedoch keine Normalverteilung. Da die einfaktorielle Varianzanalyse jedoch gegenüber Verletzungen der Normalverteilung recht robust ist, wurde diese trotzdem durchgeführt. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Verteilung der Neuronen in die verschiedenen Intensitäten bei den Patientengruppen festgestellt (keine Färbung  $p=0.387$ , schwache Färbung  $p=0.800$  und starke Färbung  $p=0.708$ ). Die Statistik bestätigte damit die

## Ergebnisse

schon während der Analyse gefundene Beobachtung, dass keine Unterschiede zwischen den Patientengruppen bestehen.



**Abbildung 20.1:** Vertikale FFPE-Sektionen (12 μm) eines humanen Felsenbeines, gefärbt mit Seren von Patienten mit BPPV und BVP. Ansicht von medial Richtung lateral. Links: Neuronen des Nervus cochlearis mit Autofluoreszenzbild. Neuronen zeigten unterschiedliche Intensitäten der Färbung. Ein ungefärbtes (rot), schwach gefärbtes (schwarz) und stark gefärbtes (blau) Neuron ist jeweils markiert. Maßstab 50 μm. Mitte: Detailansicht einzelner Neuronen mit eingetragenen Linienscan durch das Neuron. Die Scan-Richtung ist durch einen Pfeil angegeben. Farbkodierung wie angegeben. Maßstab 10 μm. Rechts: Profile der entsprechenden Linienscans. Eine Helligkeit über 150 wurde als ungefärbt angenommen, eine Helligkeit kleiner 100 als stark gefärbt.



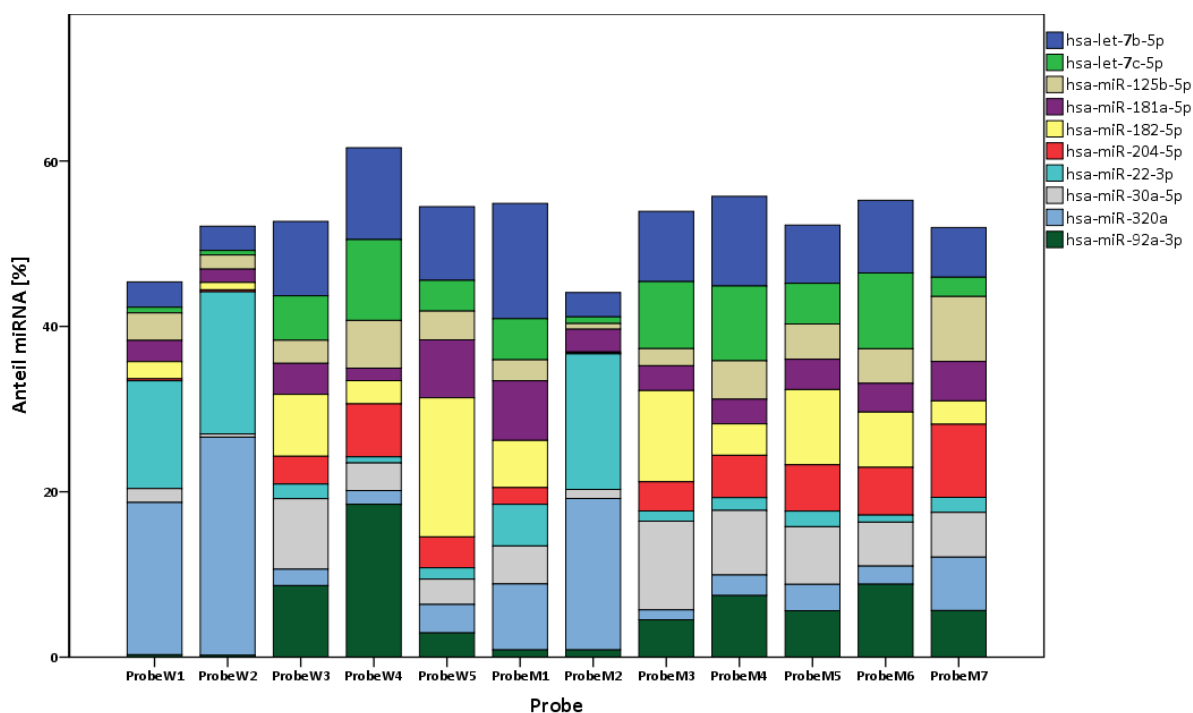
**Abbildung 20.2:** Fortführung Abbildung 20.1 mit vertikaler FFPE-Sektion gefärbt mit Serum von Morbus Menière Patienten (Ansicht von medial Richtung lateral), sowie der Statistik aller ausgezählten Schnitte. **Oben links:** Neuronen des Nervus cochlearis mit Autofluoreszenzbild. Neuronen zeigten unterschiedliche Intensitäten in der Färbung. Ein ungefärbtes (rot), schwach gefärbtes (schwarz) und stark gefärbtes (blau) Neuron ist jeweils markiert. Maßstab 50 µm. **Oben Mitte:** Detailansicht einzelner Neuronen mit eingetragenen Linienscan durch das Neuron. Die Scan-Richtung ist durch einen Pfeil angegeben. Farbkodierung wie angegeben. Maßstab 10 µm. **Oben rechts:** Profile der entsprechenden Linienscans. **Unten:** Balkendiagramm mit Auftragung der Patientengruppe (X-Achse) gegen die Mittelwerte der Anzahl an unterschiedlich gefärbten Neuronen pro Serum in Prozent. Die exakten Prozentwerte sind innerhalb der Balken angegeben (gerundet). Fehlerbalken zeigen den 2-fachen Standardfehler an. Die Ergebnisse sind statistisch nicht signifikant ( $p > 0.05$ ), da alle Seren nahezu identische Färbungen zeigen.



### 3.3 miRNA-Profil der humanen Endo- und Perilymphe

Für die Untersuchung des miRNA-Profiles der Endo-/Perilymphe wurden insgesamt 12 Proben aus humanen Felsenbeinen entnommen, davon 5 (42 %) Frauen und 7 (58 %) Männer. Der Altersdurchschnitt lag bei  $56.5 \pm 18.8$  Jahre. Nach dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung bei kleinen Stichproben lag eine Normalverteilung der Alterswerte vor ( $p=0.573$ ) und auch der Levene-Test der Varianzgleichheit bestätigte diese ( $p=0.148$ ). Dementsprechend waren die Voraussetzungen für einen T-Test für unabhängige Stichproben gegeben. Aus diesem ergab sich, dass sich die beiden Gruppen (männlich und weiblich) hinsichtlich der Altersverteilung nicht signifikant voneinander unterschieden ( $p=0.919$ ).

Die miRNA-Profile wurden unter Verwendung der Illumina Next-Generation-Sequenzierung und miRDeep2 erstellt und danach unter anderem mit DESeq 2 analysiert. Dabei zeigte sich innerhalb der einzelnen Proben eine hohe biologische Variabilität, welche anhand der Verteilung der zehn miRNAs mit den höchsten Sequenzier-Werten festgestellt wurde (Abbildung 21). Insgesamt betrug der Anteil der 10 abundanten miRNAs bei den Endo-/Perilymph-Proben  $52.8 \pm 4.4$  % aller sequenzierten miRNAs. Einzelne miRNAs zeigten dabei eine wesentlich höhere Variabilität als andere. Während die miRNA hsa-miR-320a zwischen den Extremwerten 26.4 % (ProbeW2) und 1.2 % (ProbeM3) schwankte, ergab die Analyse der miRNA hsa-miR-181a-5p Schwankungen zwischen 1.5 % (ProbeW4) und 7.2 % (ProbeM1). Insgesamt konnten 528 verschiedene miRNAs in allen 12 Proben nachgewiesen werden.



**Abbildung 21: Top 10 der abundanten miRNAs der humanen Endo-/Perilymphe.** Relative Verteilung der 10 höchstexprimierten miRNAs, welche etwa 50 % aller gefundenen miRNAs ausmachen. Die einzelnen Proben sind nach Frauen (W) und Männern (M) getrennt. Die Y-Achse repräsentiert den Anteil der einzelnen miRNAs an der Gesamtheit aller gefundenen miRNAs. Die Legende enthält alle miRNAs mit der entsprechenden Farbkodierung.

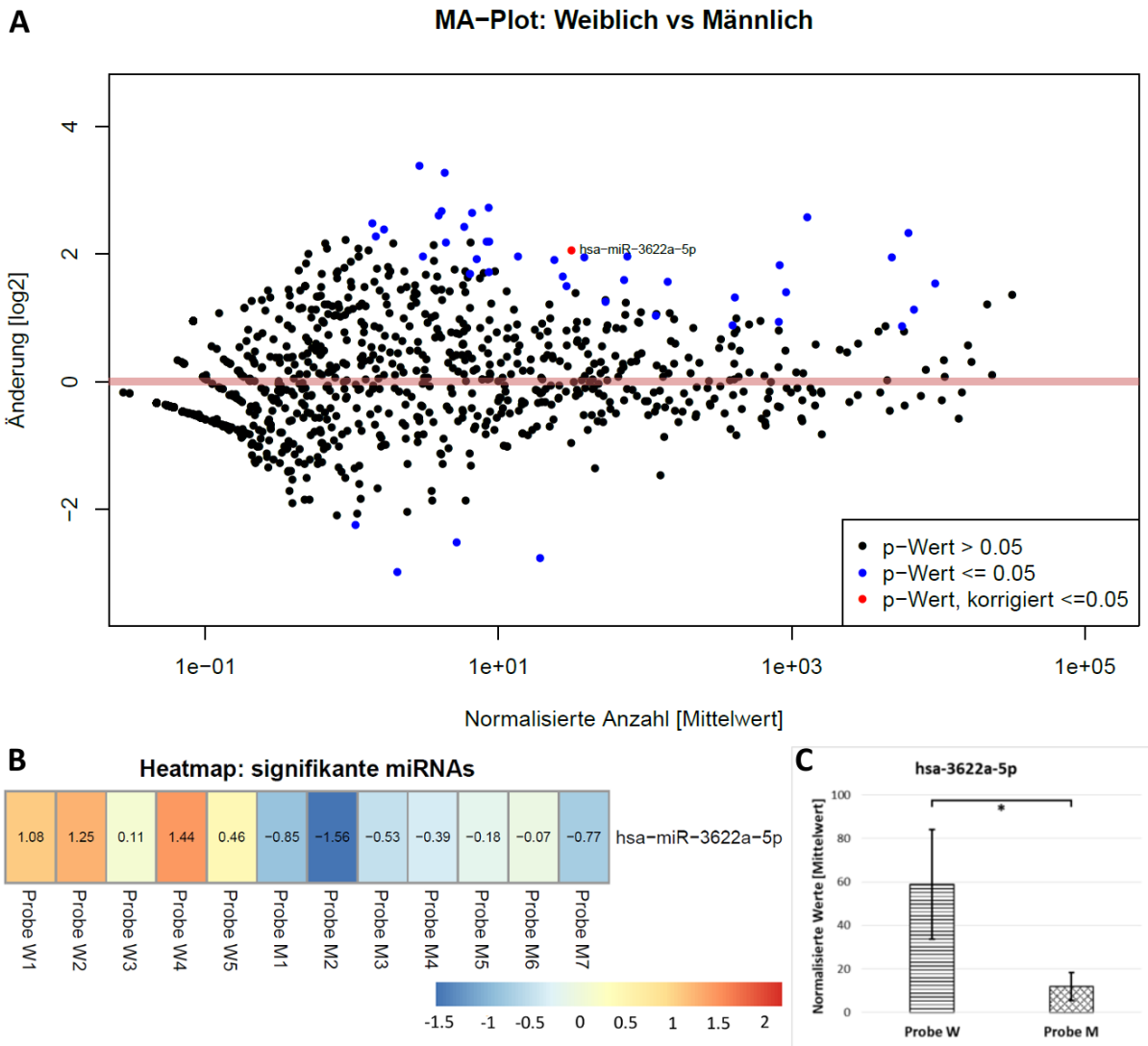


## Ergebnisse

**Tabelle 3: Resultate der DESeq2-Untersuchung humaner Endo-/Perilymphe (Top 10; geordnet nach p-Wert, korrigiert)**

<b>miRNA Name</b>	<b>Normalisierte Werte</b>	<b>Änderung</b>	<b>Änderung</b>	<b>p-Wert</b>	<b>p-Wert</b>
	<b>[Mittelwert]</b>	<b>[log2]</b>	<b>Standardfehler</b>	<b>Signifikanz</b>	<b>korrigiert</b>
hsa-miR-3622a-5p	31,5	2,1	0,497	0,00003449	0,03296968
hsa-miR-129-2-3p	8,7	2,2	0,604	0,00028192	0,11369309
hsa-miR-550a-3p	4,3	3,3	0,915	0,00035678	0,11369309
hsa-miR-7977	38,5	1,9	0,598	0,00113335	0,27087016
hsa-miR-125a-3p	24,1	1,9	0,618	0,00201044	0,27456918
hsa-miR-128-1-5p	8,6	1,7	0,547	0,00178419	0,27456918
hsa-miR-34c-5p	19,2	-2,8	0,881	0,00174757	0,27456918
hsa-miR-5187-5p	8,6	2,7	0,921	0,00305359	0,36490427
hsa-miR-2277-5p	2,9	3,4	1,179	0,00417705	0,44369527
hsa-miR-320c	1.277,8	2,6	0,923	0,00533425	0,50385601

Des Weiteren wurde untersucht, ob es zwischen den Proben geschlechtsspezifische Unterschiede gab. Die DESeq2-Software berechnete dazu aus gegebenen Originaldaten die entsprechenden normalisierten Werte zu jeder miRNA sowie den Mittelwert aller Proben. Durchschnittliche Änderungen der einzelnen Versuchsgruppen wurden daraufhin auf statistische Signifikanz überprüft, sowie eine Benjamini-Hochberg-Korrektur durchgeführt. Tabelle 3 zeigt entsprechende Resultate, wobei der korrigierte p-Wert für alle Aussagen zu Rate gezogen wurde. Zur visuellen Darstellung möglicher Unterschiede wurden sogenannte MA-Plots erstellt. Diese Grafiken erlaubten den direkten Vergleich der Expressionsänderung gegenüber der durchschnittlichen Expressionsstärke innerhalb zweier Versuchsgruppen. Dabei ergab sich bei der Sequenzierung der Endo-/Perilymphe eine signifikante Erhöhung einer einzigen miRNA, hsa-miR-3622a-5p (Abbildung 22 A). Der MA-Plot visualisierte dabei alle in den Proben gefundenen miRNAs mit einem Punkt. Schwarze Punkte standen für miRNAs, die keine signifikanten Änderungen zeigten, wohingegen blaue Punkte miRNAs darstellten, deren Änderung als statistisch signifikant berechnet wurden. Die roten Punkte waren alle miRNAs, die nach der Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Tests noch immer eine statistische Signifikanz zeigten. Eine genauere Betrachtung der miRNA has-miR-3622a-5p konnte mit Hilfe einer Heatmap erfolgen. Dabei wurden die Expressionsänderungen in den einzelnen Proben gegenüber der mittleren Expressionsstärke aufgetragen und farbkodiert dargestellt (Abbildung 22 B). Bei allen Frauen zeigte sich dabei eine Erhöhung der Expression, während Männer eine verringerte Expression der miRNA zeigten. Insgesamt ließ sich erkennen, dass die mittlere Expressionsstärke der miRNA hsa-miR-3622a-5p in der humanen Endo-/Perilymphe bei Frauen signifikant höher war als bei Männern (Abbildung 22 C).



**Abbildung 22: Differenzielle, geschlechtsspezifische Unterschiede der humanen Endo-/Perilymphe.** **A:** MA-Plot mit Auftragung der durchschnittlichen Expressionsstärke (X-Achse) gegen die Expressionsänderung innerhalb der beiden Gruppen (Y-Achse). Jeder schwarze Punkt steht für eine einzelne miRNA, welche keine signifikante Änderung aufweist. Jeder blaue Punkt zeigt eine miRNA mit einer signifikanten Änderung ( $p \leq 0.05$ ). Die roten Punkte stehen für miRNAs, die nach einer Korrektur für multiple Tests (Benjamini-Hochberg-Korrektur) eine tatsächliche signifikante Änderung anzeigen und sind mit dem Namen der miRNA beschriftet. **B:** Farbkodierte Heatmap der differenziell exprimierten miRNAs. Dabei sind die x-fachen Änderungen gegenüber der mittleren Expressionsstärke innerhalb aller Proben aufgetragen. Dabei zeigte sich eine erhöhte Expression bei Frauen (Probe W1-W5) und eine erniedrigte Expression bei Männern (Probe M1-M7). Die exakten Änderungen sind innerhalb der Boxen angegeben und die Farben entsprechen der farbkodierten Legende. **C:** Normalisierte Mittelwerte der Expressionsstärke der miRNA hsa-miR-3622a-5p mit aufgetragener Standardabweichung und Signifikanz (korrigiert nach Benjamini-Hochberg,  $p \leq 0.05$ ).

### 3.3.1 Unterschiede zwischen Endo-/Perilymphe und Serum

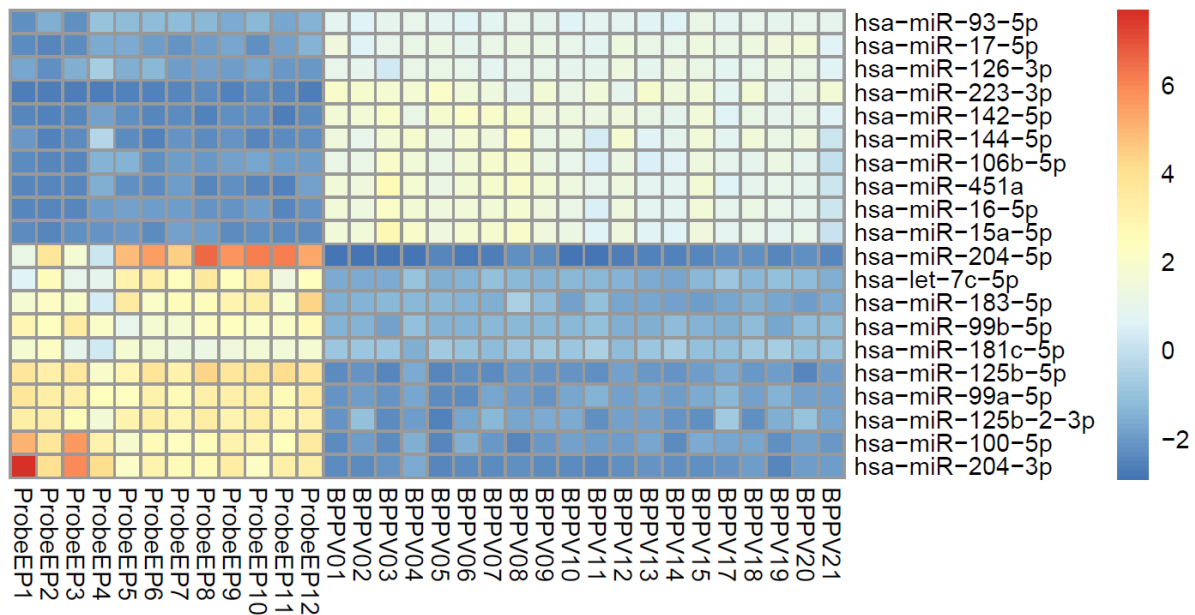
Die Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen den Endo-/Perilymphe-Proben und humanen Seren, einschließlich BPPV-Kontrollgruppe, erfolgte unter Verwendung des DESeq2 Software-Paketes. Dazu wurden die 12 Endo-/Perilymphe-Proben und 21 BPPV-Proben analysiert. Das Durchschnittsalter aller Proben lag bei  $61.7 \pm 14$  Jahren bei 17 (51.5 %) Frauen und 16 (48.5 %) Männern. Um die Versuchsgruppen korrekt zu definieren, wurden sowohl für die

## Ergebnisse

Geschlechterverteilung als auch für den Altersdurchschnitt die Tests zur Normalverteilung sowie zur Varianzgleichheit durchgeführt. Für die Altersverteilung konnte von einer Normalverteilung ausgegangen werden ( $p=0.11$ , Shapiro-Wilk-Test), für die Geschlechterverteilung hingegen nicht ( $p=0.000$ , Shapiro-Wilk-Test). Der Levene-Test auf Varianzgleichheit ergab für die Altersverteilung eine Varianzheterogenität ( $p=0.022$ ) und für die Geschlechterverteilung eine Varianzhomogenität ( $p=0.896$ ). Aufgrund dieser Vor-Tests wurden verschiedene Tests angewandt, um die Gruppen zu vergleichen. Für die Altersverteilung wurde daher der Welch's T-Test verwendet, welcher keine signifikanten Unterschiede der beiden Versuchsgruppen ergab ( $p=0.177$ ). Für die nicht normalverteilte Variable des Geschlechts wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Auch dieser ergab für die Geschlechterverteilung innerhalb der Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede ( $p=0.399$ ). Schlussfolgernd waren beide Versuchsgruppen korrekt definiert und konnten somit weiter verglichen werden.

Um signifikante Unterschiede zu detektieren, wurde erneut das DESeq2-Paket verwendet. Anders als bei der geschlechtsspezifischen Untersuchung der Endo-/Perilymphe wurden beim Vergleich mit den BPPV-Kontrollseren insgesamt 481 miRNAs gefunden, die differenzielle Expressionsmuster zeigten ( $p$ -Wert, korrigiert  $\leq 0.05$ ). Davon zeigten 246 (51.1 %) eine erniedrigte Expression, beziehungsweise 235 (48.9 %) eine erhöhte Expression in den Endo-/Perilymph-Proben im Vergleich zu den Serum-Proben. Aufgrund dieser Menge an signifikanten Unterschieden zeigte der dazugehörige MA-Plot keine Übersichtlichkeit und wurde daher nicht verwendet. Bei der Visualisierung der Ergebnisse zeigte sich, dass die Heatmap wesentlich besser geeignet war. Um die Übersichtlichkeit zu gewährleisten, wurden nur die 20 signifikantesten miRNAs in den Plot aufgenommen (Abbildung 23). Dabei ergab sich sowohl für stark erhöhte, als auch stark verringerte miRNAs eine Gruppierung der Versuchsgruppen in Endo-/Perilymphe und Serum. Die miRNAs, die in der Endo-/Perilymphe zu finden waren, konnten in den Serum-Proben teilweise kaum detektiert werden, andersherum genauso. Insgesamt lässt sich daraus ableiten, dass sich diese beiden Körperflüssigkeiten in ihrer miRNA-Zusammensetzung sehr stark voneinander unterscheiden, wobei einige miRNAs ausschließlich in den Endo-/Perilymphe-Proben zu finden sind.

## Heatmap: Top 20 signifikante miRNAs



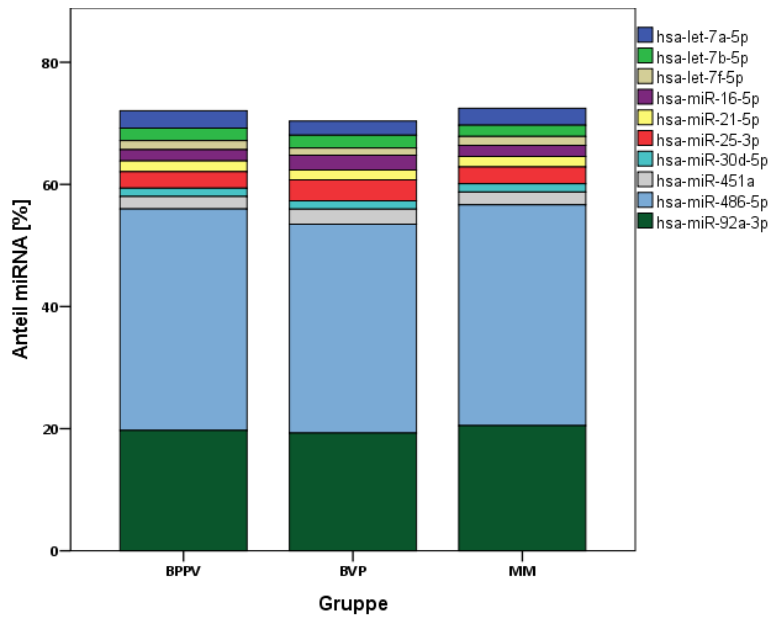
**Abbildung 23:** Farbkodierte Heatmap der differenziell exprimierten miRNAs im Vergleich von Endo-/Perilymphe und humanem Serum. Auftragung der Expressionsänderung einzelner Proben gegenüber der mittleren Expressionsstärke aller Proben mit farbkodierter Legende. Der obere Abschnitt zeigt miRNAs, die in den Endo-/Perilymph-Proben fast nicht detektiert wurden (blaue Farbtöne). Im unteren Abschnitt finden sich einige miRNAs, die ausschließlich in den Endo-/Perilymph-Proben zu finden (gelbe/rötliche Farben) waren, während diese in den Serum-Proben kaum detektiert wurden.

### 3.4 miRNA-Profil in Patienten mit BPPV, BVP und Morbus Menière

#### 3.4.1 Statistik und Übersicht

Die Versuchsgruppen waren identisch mit denen aus der Kryo-Immunhistochemie und die Statistik wurde unter Punkt 3.1.1 schon durchgeführt. Die Versuchsgruppen zeigten keine Unterschiede in Alters- und Geschlechterverteilung. Bei der Verteilung der Top 10 abundanten miRNAs zeigte sich sowohl innerhalb der Seren als auch innerhalb der Versuchsgruppen eine sehr homogene Verteilung (Abbildung 24). Die beiden meist gefundenen miRNAs waren die miRNA hsa-miR-486-5p ( $35.7 \pm 6.7\%$ ) und hsa-miR-92a-3p ( $20.0 \pm 3.0\%$ ). An diesen lässt sich die geringe Variabilität beispielhaft erkennen, welche sich letztendlich auch in den Mittelwerten der Versuchsgruppen widerspiegelt. Insgesamt trugen die 10 höchstexprimierten miRNAs etwa  $71.8 \pm 5.4\%$  aller miRNAs im humanen Serum bei. Auch hier lässt sich die geringe biologische Variabilität erkennen, anders als es für die Endo-/Perilymph-Proben gemessen wurde. Alle Signifikanz-Werte in den nachfolgenden Abschnitten beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf die korrigierten p-Werte, die mit der Benjamini-Hochberg-Korrektur für multiple Tests berechnet wurden.

## Ergebnisse

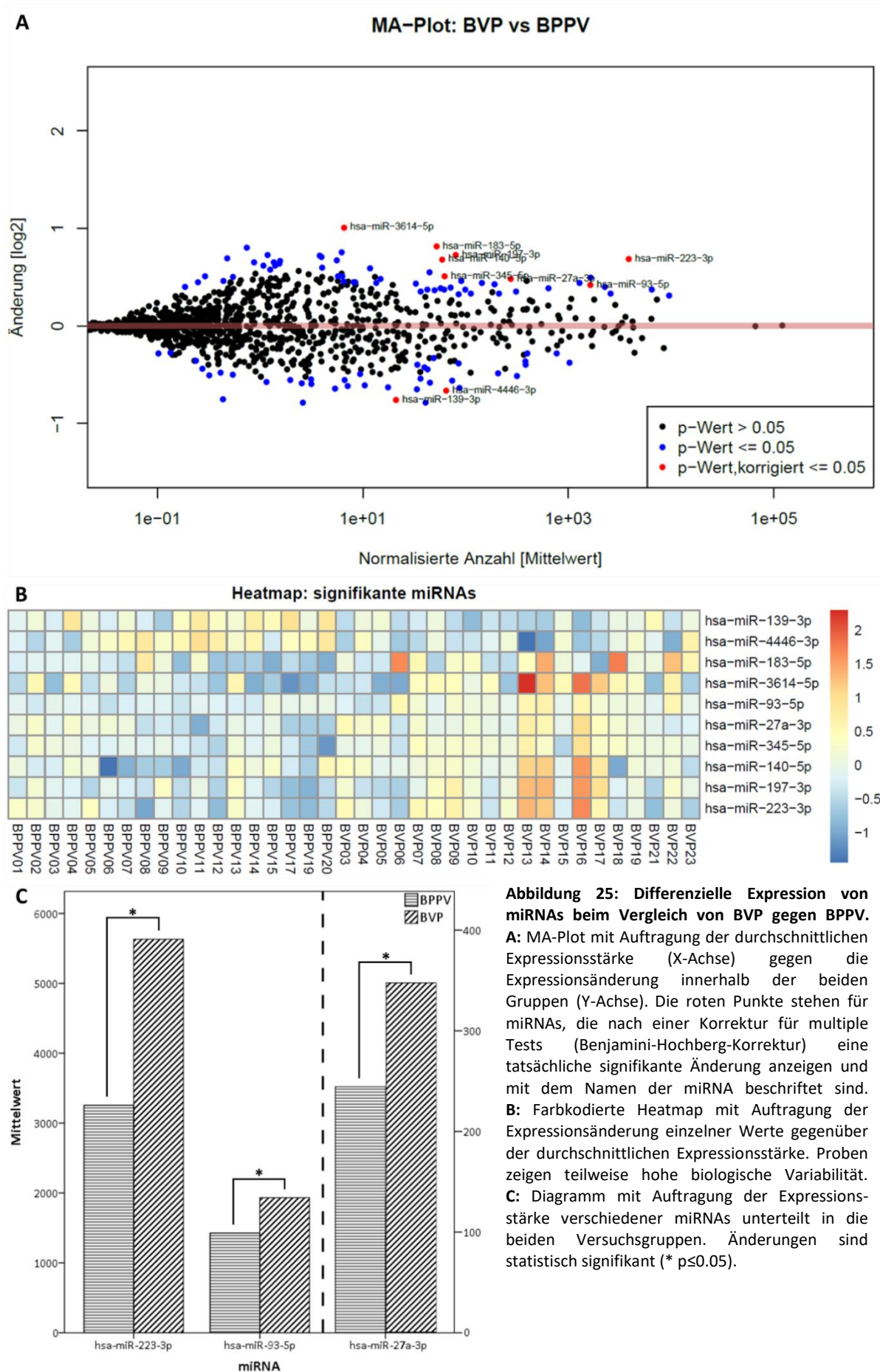


**Abbildung 24: Top 10 der abundanten miRNAs des humanen Serums.** Relative Verteilung der 10 höchstexprimierten miRNAs, welche etwa 72 % aller gefundenen miRNAs ausmachen. Die drei Versuchsgruppen (BPPV, BVP und MM) sind jeweils zusammengefasst. Die Y-Achse repräsentiert den Anteil der einzelnen miRNAs an der Gesamtheit aller gefundenen miRNAs. Die Legende enthält alle miRNAs mit der entsprechenden Farbkodierung.

### 3.4.2 Unterschiede zwischen BPPV und BVP

Die Originaldaten aller drei Versuchsgruppen wurden im DESeq2-Paket auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. Dabei ergab sich für die Versuchsgruppen BPPV und BVP ein statistischer Unterschied in 10 miRNAs. Der MA-Plot zeigte direkt die miRNAs mit ihrer entsprechenden Änderung gegenüber der durchschnittlichen Expressionsstärke (Abbildung 25 A). Bei der Auftragung der miRNAs in die Expressions-Heatmap ergab sich ein eher heterogenes Bild und keine klare Abgrenzung der Versuchsgruppen voneinander (Abbildung 25 B). Die signifikanten Änderungen wurden über die Gesamtheit aller Proben ermittelt, wobei einzelne Proben durchaus Abweichungen zeigten, die eine Zuordnung zu einer Versuchsgruppe nur über das miRNA-Profil erschweren. Um aus diesen Ergebnissen eine mögliche diagnostische Verwendung zu erhalten, wurden die miRNAs ausgewählt, die entweder eine recht hohe durchschnittliche Expressionsstärke oder eine hohe Änderung derselben aufweisen konnten. Dies war notwendig, um eine sichere Detektion im Rahmen der RT-PCR zu gewährleisten. Für die Diagnostik wurden die miRNAs hsa-miR-223-3p (Expression: 3888, Änderung BVP +0.7[log2], p=0,036), hsa-miR-93-5p (Expression: 1641, Änderung BVP +0.4[log2], p=0.047) und hsa-miR-27a-3p (Expression: 275, Änderung BVP +0.5[log2], p=0.036) verwendet. Die Unterschiede der Versuchsgruppen sind in Abbildung 25 C aufgetragen. Insgesamt waren die Signifikanzen statistisch recht gering, was auch durch die biologische Variabilität bedingt war.

# Ergebnisse



**Abbildung 25: Differenzielle Expression von miRNAs beim Vergleich von BVP gegen BPPV.**  
**A:** MA-Plot mit Auftragung der durchschnittlichen Expressionsstärke (X-Achse) gegen die Expressionsänderung innerhalb der beiden Gruppen (Y-Achse). Die roten Punkte stehen für miRNAs, die nach einer Korrektur für multiple Tests (Benjamini-Hochberg-Korrektur) eine tatsächliche signifikante Änderung anzeigen und mit dem Namen der miRNA beschriftet sind.  
**B:** Farbkodierte Heatmap mit Auftragung der Expressionsänderung einzelner Werte gegenüber der durchschnittlichen Expressionsstärke. Proben zeigen teilweise hohe biologische Variabilität.  
**C:** Diagramm mit Auftragung der Expressionsstärke verschiedener miRNAs unterteilt in die beiden Versuchsgruppen. Änderungen sind statistisch signifikant (\* p<0.05).

### 3.4.3 Unterschiede zwischen BPPV und Morbus Menière

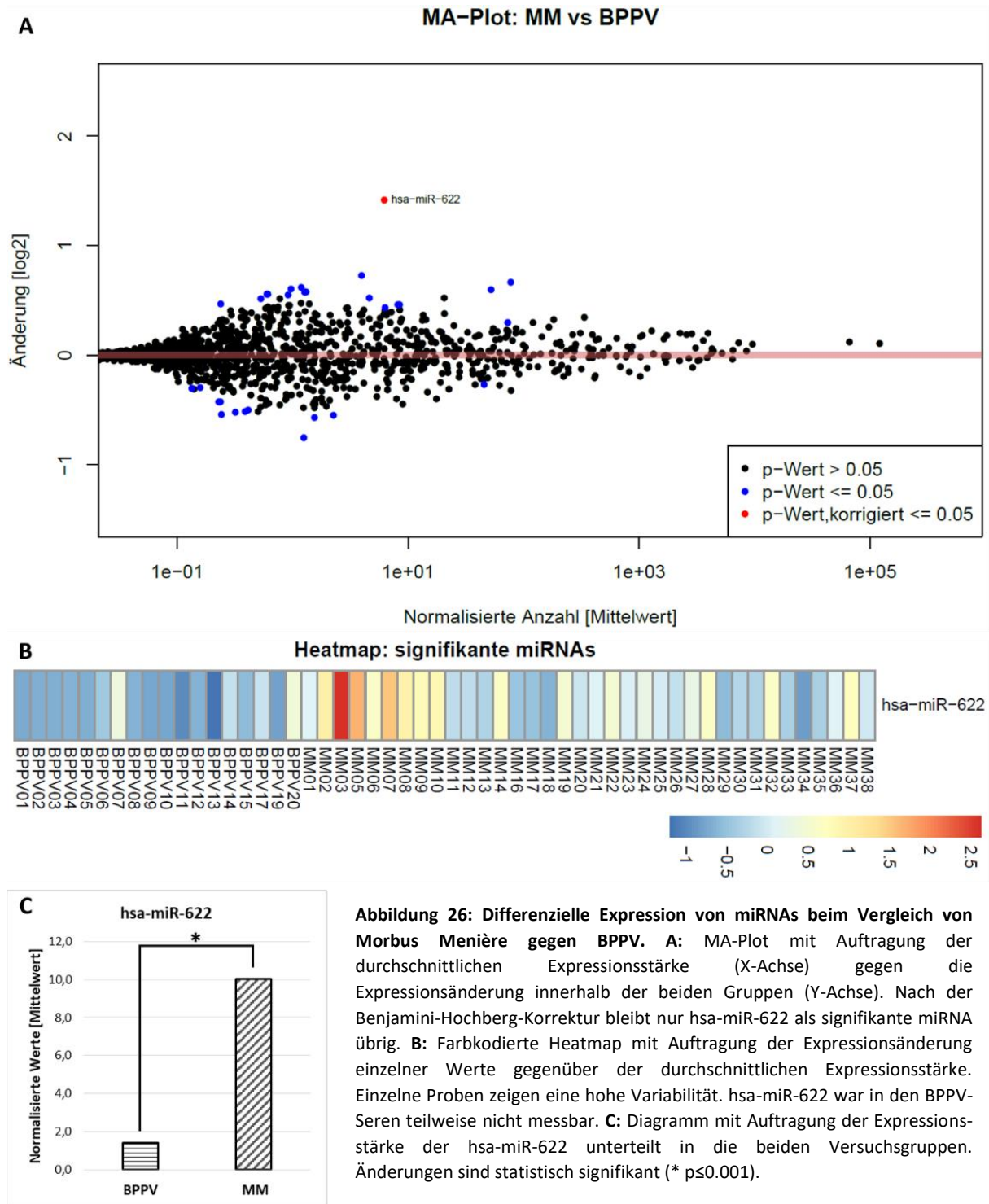
Bei der Auswertung der beiden Versuchsgruppen BPPV und Morbus Menière ergab sich eine statistisch signifikante differenzielle Expression einer einzigen miRNA, hsa-miR-622. Sowohl der MA-Plot (Abbildung 26 A) als auch die entsprechende Heatmap (Abbildung 26 B) zeigten die deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. In der Heatmap sind auch einzelne biologische Schwankungen innerhalb der Proben zu erkennen. Die miRNA hsa-miR-622 wurde in den Proben der BPPV-Kontrollgruppe teilweise nicht nachgewiesen (BPPV 08-13). Insgesamt war die Expressionsstärke dieser miRNA sehr gering (Expression: 3.2, Änderung MM +1.4[log2], p=0.0006) (Abbildung 26 C). Trotz der geringen Expressionsstärke konnte diese miRNA in den folgenden RT-PCR Experimenten nachgewiesen werden und wurde daher weiter untersucht.

### 3.4.4 Unterschiede zwischen BVP und Morbus Menière

Bei der Untersuchung dieser beiden Versuchsgruppen wurden insgesamt 28 miRNAs mit statistisch signifikanten differenziellen Expressionsmustern gefunden (Abbildung 27 A, B), wobei auch hier eine hohe biologische Variabilität innerhalb der Proben zu finden war. Interessanterweise fanden sich bei den signifikanten miRNAs einige aus den beiden anderen Vergleichen wieder. So wurde die miRNA hsa-miR-622 erneut als statistisch signifikant beschrieben. Diese miRNA zeigte im Vergleich zwischen BVP und BPPV keine Signifikanz, war allerdings in den Morbus Menière-Proben stark erhöht. Der Vergleich zwischen BVP und MM detektierte eine erhöhte Expression in den MM-Proben und eine BPPV entsprechende Expression in den BVP-Proben (Expression: 6.2, Änderung MM +0.9[log2], p=0.048). Außerdem wurden die beiden miRNAs hsa-miR-27a-3p (Expression: 275, Änderung MM -0.4[log2], p=0.02) und hsa-miR-223-3p (Expression: 3888, Änderung MM -0.7[log2], p=0.016) als statistisch signifikant detektiert. Diese konnten in den BVP-Proben im Vergleich zu BPPV vermehrt detektiert werden, allerdings zeigten sich keine Unterschiede bei BPPV gegen Morbus Menière. Dementsprechend konnten diese miRNAs in den Morbus Menière-Proben gegen BVP vermindert nachgewiesen werden. Zusätzlich zu diesen drei miRNAs wurden zwei miRNAs für die nachfolgende RT-PCR Untersuchung ausgewählt, die eine hohe durchschnittliche Expressionsstärke aufwiesen und damit sehr gut geeignet waren. Dazu wurden die miRNAs hsa-miR-143-3p (Expression: 1646, Änderung MM -0.5[log2], p=0.047) und hsa-miR-584-5p (Expression: 1026, Änderung MM +0.5[log2], p=0.016) in die Liste für die RT-PCR aufgenommen. Alle 5 differenziellen miRNAs sind in Abbildung 27 C, unterteilt nach den Versuchsgruppen, dargestellt.

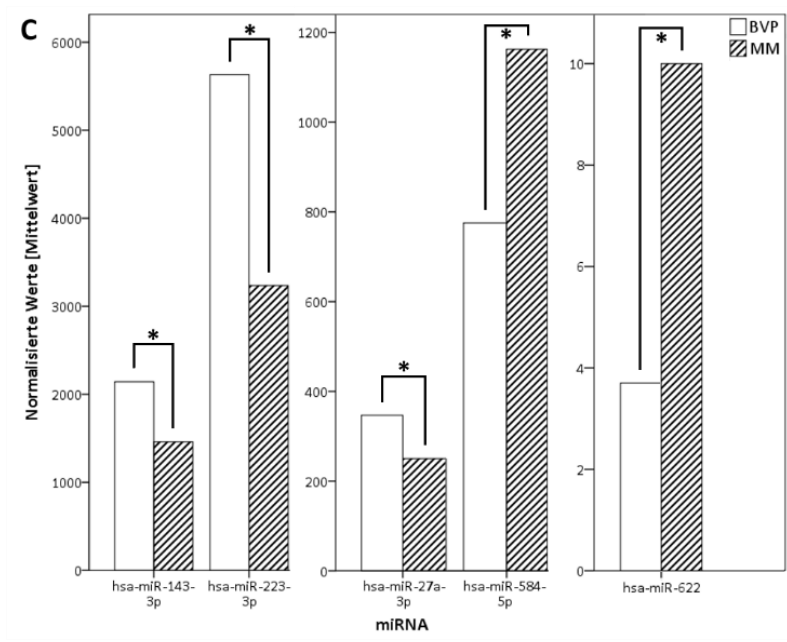
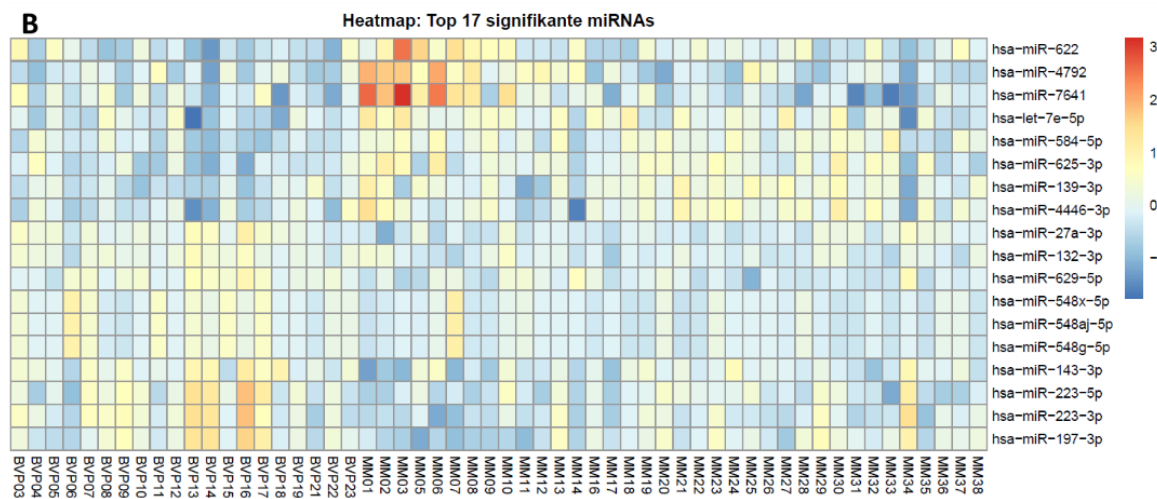
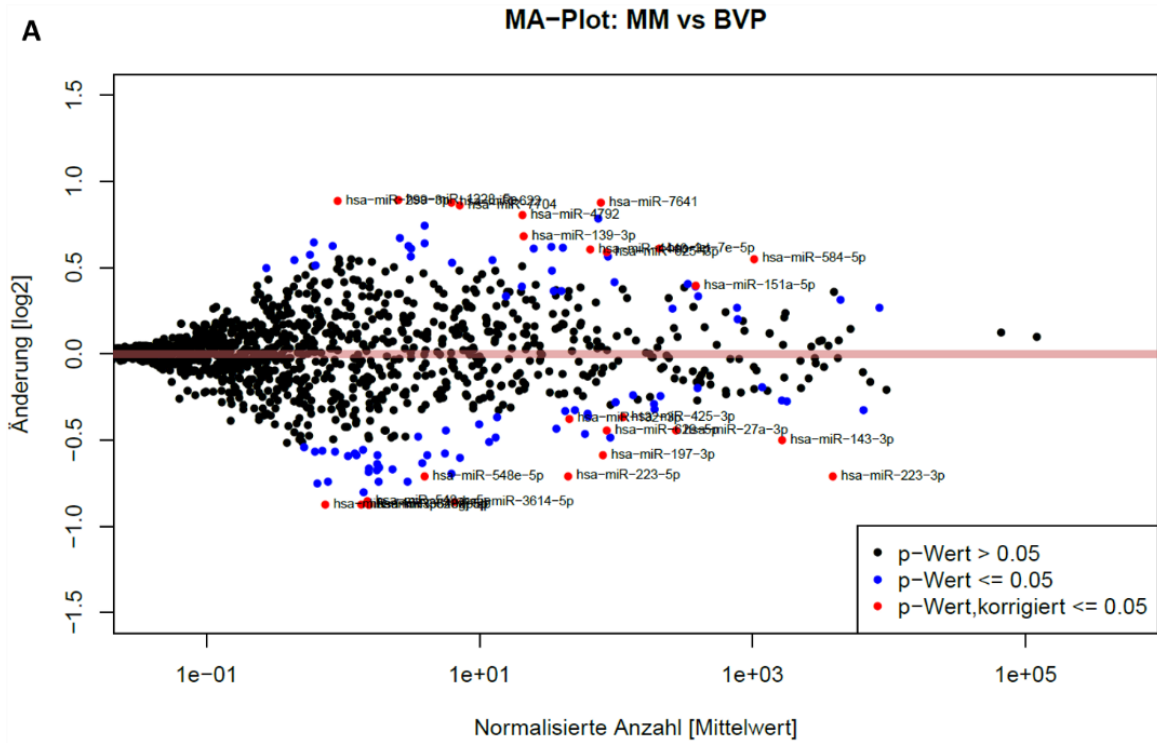


## Ergebnisse





# Ergebnisse



## Ergebnisse

**Abbildung 27: Differenzielle Expression von miRNAs beim Vergleich von Morbus Menière gegen BVP.** **A:** MA-Plot mit Auftragung der durchschnittlichen Expressionsstärken (X-Achse) gegen die Expressionsänderung innerhalb der beiden Gruppen (Y-Achse). Nach der Korrektur blieben insgesamt 28 miRNAs signifikant, darunter einige, die auch schon eine Unterscheidung zwischen BVP und BPPV zuließen. **B:** Farbkodierte Heatmap mit Auftragung der Expressionsänderung einzelner Werte gegenüber der durchschnittlichen Expressionsstärke. Einzelne Proben zeigen eine hohe Variabilität. **C:** Diagramm mit Auftragung der Expressionsstärke einzelner miRNAs, unterteilt in die beiden Versuchsgruppen (\*  $p \leq 0.05$ ).

### 3.4.5 Übersicht der differenziellen miRNAs und Blindprobe

Zur besseren Übersicht sollen hier die Ergebnisse der miRNA-Sequenzierung und den damit einhergehenden Voraussetzungen für den RT-PCR-Screen herausgestellt werden. Die differenziell exprimierten miRNAs wurden hauptsächlich nach ihrer Expressionsstärke ausgewählt, um eine sichere Detektion in den PCRs zu gewährleisten. Die Ausnahme davon bildete die miRNA hsa-miR-622, die eine sehr geringe Expression zeigte und daher vorab in einem Nebenversuch auf ihre Detektierbarkeit hin untersucht wurde. Diese war gegeben und die Verwendung im nachfolgenden Screen möglich. Die Änderungen, die für den Screen verwendeten miRNAs sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 4: Änderungen der im RT-PCR-Screen verwendeten, differenziell exprimierten miRNAs**

	Gegen $\emptyset$ BPPV		Gegen $\emptyset$ MM		Gegen $\emptyset$ BVP	
<b>BVP</b>	miR-27a-3p $\uparrow$ miR-223-3p $\uparrow$ miR-93-5p $\uparrow$		miR-27a-3p $\uparrow$ miR-223-3p $\uparrow$ miR-143-3p $\uparrow$	miR-622 $\downarrow$ miR-584-5p $\downarrow$		
<b>MM</b>	miR-622 $\uparrow$				miR-622 $\uparrow$ miR-584-5p $\uparrow$	miR-27a-3p $\downarrow$ miR-223-3p $\downarrow$ miR-143-3p $\downarrow$
<b>BPPV</b>				miR-622 $\downarrow$		miR-27a-3p $\downarrow$ miR-223-3p $\downarrow$ miR-93-5p $\downarrow$

Neben den 74 Serum-Proben der drei Versuchsgruppen wurden auch 11 Proben sequenziert, welche bis zum Sequenzierdatum keine eindeutige Diagnose aufwiesen. Diese sollten dann anhand ihres miRNA-Profiles in die vorhandenen Gruppen eingeordnet werden. Zunächst wurde jedoch überprüft, ob eine Einordnung anhand dieser 6 miRNAs möglich war. Dafür wurden 10 Proben willkürlich von einer zweiten Person ausgesucht und unter Änderung der Reihenfolge und des Namens randomisiert. Diese sollten als Grundlage dienen, ob eine Einordnung möglich und wie hoch die Genauigkeit ist. Die nachfolgenden Tabellen geben die 10 Blindproben, die Referenzwerte der miRNAs sowie die Ergebnisse samt Entscheidung wieder.

## Ergebnisse

**Tabelle 5: Referenzwerte [Mittelwerte, normalisiert] der miRNAs, aufgeteilt nach Versuchsgruppen**

miRNA-Name	BPPV	BVP	MM	Gesamt
hsa-miR-27a-3p	244,4	346,9	250,2	274,9
hsa-miR-223-3p	3255,1	5631,7	3235,6	3887,9
hsa-miR-143-3p	1465	2141,9	1462	1646,5
hsa-miR-584-5p	1031,7	775,3	1162,7	1026,1
hsa-miR-622	1,4	3,7	10	6,2
hsa-miR-93-5p	1426,1	1932,8	1586,2	1640,9

**Tabelle 6: Normalisierte Werte der miRNAs der 10 Blindproben**

	Blind1	Blind2	Blind3	Blind4	Blind5	Blind6	Blind7	Blind8	Blind9	Blind10
hsa-miR-27a-3p	257,8	356,2	116,4	203,6	334,8	260,6	185,6	250,3	212,5	352,7
hsa-miR-223-3p	3.599,1	3.511,3	3.333,7	2.101,4	4.876,3	5.812,1	2.546,0	1.494,7	1.790,5	4.083,8
hsa-miR-143-3p	1.538,5	1.945,3	1.942,0	906,2	1.380,5	1.651,0	1.271,0	604,5	1.071,2	1.914,8
hsa-miR-584-5p	1.645,5	832,7	502,0	741,7	863,9	1.374,3	1.105,6	800,5	1.062,4	1.410,7
hsa-miR-622	0,8	0,0	0,0	5,5	6,7	1,1	14,9	28,3	0,0	1,1
hsa-miR-93-5p	1.523,1	1.491,9	1.468,1	2.703,0	1.748,8	1.456,2	1.391,5	1.676,5	1.352,3	1.123,7

**Tabelle 7: Ergebnisse der Blindproben mit Änderung gegen die Referenzwerte, sowie Einordnung in die Versuchsgruppen**

	Änderungen	Entscheidung	Korrekte Gruppe
<b>Blind1</b>	27 = ; 223 = ; 143 = ; 584 + ; 622 - ; 93 =	BPPV	BPPV
<b>Blind2</b>	27 + ; 223 = ; 143 + ; 584 =- ; 622 - ; 93 =	BVP	BPPV
<b>Blind3</b>	27 + ; 223 = ; 143 + ; 584 - ; 622 - ; 93 =	BPPV	BPPV
<b>Blind4</b>	27 - ; 223 - ; 143 - ; 584 - ; 622 = ; 93 +	BVP	BVP
<b>Blind5</b>	27 + ; 223 + ; 143 = ; 584 =- ; 622 + ; 93 =	MM	BVP
<b>Blind6</b>	27 = ; 223 + ; 143 = , 584 + ; 622 - ; 93 =	BPPV	BVP
<b>Blind7</b>	27 - , 223 - ; 143 = ; 584 = ; 622 ++ ; 93 =	MM	MM
<b>Blind8</b>	27 = ; 223 - ; 143 - ; 584 - ; 622 ++ ; 93 =	MM	MM
<b>Blind9</b>	27 - ; 223 - ; 143 - ; 584 = ; 622 - ; 93 =	BPPV	BPPV
<b>Blind10</b>	27 + ; 223 =+ ; 143 + ; 584 =+ ; 622 - ; 93 -	BPPV	BVP

## Ergebnisse

Bei der Blindprobe konnten 6 von 10 Proben der korrekten Versuchsgruppe zugeordnet werden, darunter 3 von 4 BPPV-Proben, 1 von 4 BVP-Proben und 2 von 2 Morbus Menière-Proben. Die beiden MM-Proben wurden ausschließlich durch die höhere Expression von hsa-miR-622 der Versuchsgruppe zugeordnet. Bei der Probe Blind5 überstieg der Wert für die hsa-miR-622 die durchschnittlichen Werte, daher wurde diese Probe falsch in die MM-Gruppe eingeordnet. Bei der Probe Blind2 wurde zunächst Morbus Menière ausgeschlossen. Von den drei signifikanten Änderungen von BVP gegenüber BPPV zeigten zwei Werte keine Änderung, doch aufgrund der leicht erhöhten hsa-miR-143-3p Expression wurde diese Probe falsch in die BVP-Gruppe eingeteilt. Auch bei der Probe Blind6 konnte zuerst Morbus Menière ausgeschlossen werden. Bei den Änderungen BVP gegenüber BPPV zeigten zwei Werte keine Unterschiede, daher wurde diese Probe falsch der BPPV-Gruppe zugeteilt. Auch die Probe Blind10 wurde falsch beim Vergleich BVP gegen BPPV zugeordnet. Während die hsa-miR-27-3p erhöht war, zeigte die hsa-miR-223-3p nur eine kleine Erhöhung, während die hsa-miR-93-5p sogar eine Verringerung zeigte. Daher wurde die Probe falsch in die BPPV-Gruppe eingeordnet. Die Fehleinordnung betraf alle Versuchsgruppen, ausschließlich die Einordnung von Morbus Menière kann über die erhöhte Expression der hsa-miR-622 relativ sicher getroffen werden. Die beiden Gruppen BVP und BPPV konnten nur mit einer Sicherheit von 50 % korrekt zugeordnet werden. Aufgrund dieser Daten wurde die Einordnung der unsicheren Diagnosen durch das miRNA-Profil nicht weiter durchgeführt, da die Zuordnung durch die unsichere klinische Diagnostik auch nicht weiter überprüft werden konnte.

### 3.5 RT-PCR Anwendung der differentiellen miRNAs

#### 3.5.1 Übersicht und Durchführung

Um die drei Versuchsgruppen voneinander zu unterscheiden, wurde die Detektion von 6 signifikanten miRNAs in allen 74 Serum-Proben in Dupletts vorgenommen. Zusätzlich wurden alle Proben mit einer Positivkontrolle bekannter Konzentration versetzt, um eine Kalibrierung der Proben sowie der PCR-Platten zu ermöglichen. Bei allen PCR-Platten wurden zwei Proben der vorangegangenen Platte erneut mit aufgetragen, um eine Inter-Kalibrierung zu gewährleisten. Bei der Auswertung wurden diese Kalibratoren immer so eingestellt, dass sie den Werten der vorherigen Platte entsprachen. Dadurch konnten alle Proben auf eine vergleichbare Basis gesetzt werden. Dies erfolgte durch eine Anpassung der Detektions-Grenzwerte, also dem Wert, der für eine Detektion überschritten werden musste. Dieser wurde in die Mitte der exponentiellen Amplifikationsphase gesetzt. Die daraus resultierenden  $C_t$ -Werte entsprachen der Zyklusnummer, die gerade diesen Grenzwert überschritt. Diese  $C_t$ -Werte wurden für die weitere Auswertung verwendet und normalisiert. Dafür wurde die durchschnittliche RNA-Extraktionseffizienz ( $C_t$ -Wert) anhand der spike-in miRNA ath-159a aller Proben bestimmt. Aus dem Quotient (Mittelwert  $C_t$  [ath-159a]) /

## Ergebnisse

(Probe Ct [ath-159a]) wurde so der Extraktionsfaktor berechnet, der auf alle Ct-Werte der verschiedenen miRNAs dieser Probe angewendet wurde. Danach erfolgte die Berechnung des  $\Delta C_t$  aus der Differenz ( $C_t$  [miRNA]) – (Mittelwert  $C_t$  [ath-159a]). Die Berechnung der relativen Transkript-Zahl erfolgte durch die Formel:  $[2^{(-\Delta C_t)}] * 10^5$ . Diese relative Transkript-Zahl wurde für die Statistik verwendet. Die nachstehende Tabelle zeigt die Berechnungen an drei Beispielen.

**Tabelle 8: Berechnung der relativen Transkript-Zahl**

Serum 1	Gemessene Ct-Werte [Mittelwerte]	$\frac{\emptyset C_t [ath - 159a]}{C_t [ath - 159a]}$	$= C_t[Probe]$ $* Faktor[ath$ $- 159a]$	$\Delta C_t$ $= (C_t[miRNA]$ $- (\emptyset C_t[ath - 159a]))$	$= [2^{-\Delta C_t}]$ $* 10^5$
ath-159a	19.33	0.9 [ $\emptyset C_t = 17.48$ ]			
hsa-miR-93-5p	28.8		25.92	8.44	287.9
hsa-miR-223-3p	23.88		21.49	4.01	6206
hsa-miR-622	32.69		29.42	11.94	25.5

### 3.5.2 Differenzielle Expression der miRNAs in der RT-PCR

Nach der Berechnung der relativen Transkripte wurden diese Proben einer einfaktoriellen Varianzanalyse unterzogen. Die Statistik zur Alters- und Geschlechtsverteilung war identisch mit der aus Punkt 3.1.1. Die Untersuchung aller miRNA-Gruppen auf eine Normalverteilung der relativen Transkript-Zahl ergab für alle Gruppen, dass von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte ( $p \leq 0.000$ , Kolmogorov-Smirnov-Test). Zusätzlich wurde für alle miRNA-Gruppen die Varianzhomogenität nach dem Levene-Test bestimmt. Dabei ergab sich nur für die Gruppe hsa-miR-93-5p eine Varianzhomogenität ( $p=0.143$ ), während die anderen miRNAs eine Varianzheterogenität aufwiesen ( $p \leq 0.05$ ). Aus diesen statistischen Vorversuchen wurden die Untersuchungsmethoden für die verschiedenen miRNA-Gruppen angepasst und für alle Gruppen der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Dieser entspricht der einfaktoriellen Varianzanalyse, setzt aber weder eine Normalverteilung der Ergebnisse noch eine Varianzhomogenität voraus. Dieser ergab für alle miRNA-Gruppen, außer für die miRNA hsa-miR-622 ( $p=0.099$ ), dass es innerhalb der drei Patientengruppen signifikante Unterschiede in den Transkript-Zahlen gab ( $p \leq 0.05$ ). Welche Patientengruppen diese Unterschiede zeigten, konnte mit den paarweisen Post-Hoc-Tests und nachfolgender Bonferroni-Korrektur für multiple Tests nachvollzogen werden.

Dabei ergab sich für die miRNA hsa-miR-143-3p, dass sich sowohl die beiden Patientengruppen MM-BPPV ( $p=0.031$ ) als auch MM-BVP ( $p=0.022$ ) signifikant voneinander unterschieden (Abbildung 28 A). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von der miRNA-Sequenzierung,

## Ergebnisse

wo eine Änderung in den Gruppen MM-BVP und BVP-BPPV als signifikant bewertet wurde (vgl. Abbildung 27C).

Die Untersuchung der miRNA hsa-miR-223-3p ergab andere Ergebnisse als in der Sequenzierung. Während dort die Unterschiede zwischen den Gruppen BVP-BPPV und MM-BVP signifikant waren, zeigten die Post-Hoc-Tests dieser miRNA in den Transkript-Zahlen eine differenzielle Expression bei den Patientengruppen BVP-BPPV ( $p \leq 0.001$ ) und MM-BPPV ( $p = 0.009$ ) (Abbildung 28 B).

Die Ergebnisse der miRNA hsa-miR-27a-3p gaben die, auch in der Sequenzierung gefundene, erhöhte Expression bei BVP-Patienten gegenüber BPPV-Patienten wieder ( $p \leq 0.001$ ). Zusätzlich wurde eine erhöhte Transkript-Zahl in den Morbus Menière-Patienten festgestellt, die in der Sequenzierung nicht gefunden wurde (Abbildung 28 C).

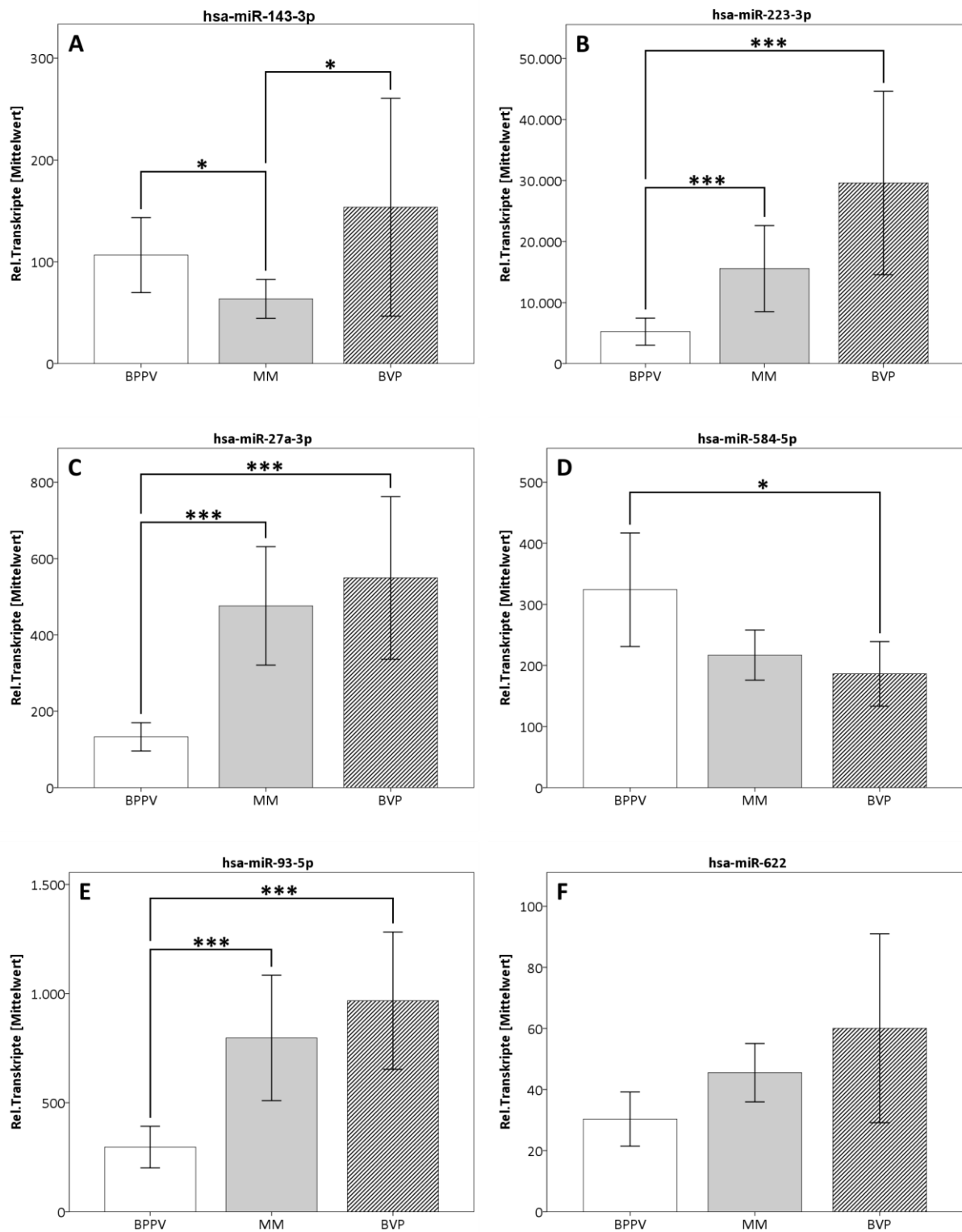
Während die vorangegangenen miRNAs teilweise die Ergebnisse der Sequenzierung widerspiegeln, konnte dies bei der miRNA hsa-miR-584-5p nicht detektiert werden. Die Sequenzierung ergab eine signifikante Verringerung in der BVP-Gruppe gegenüber der MM-Gruppe, jedoch nicht gegenüber der BPPV-Gruppe. Die Ergebnisse der RT-PCR widersprachen diesen komplett. Hier wurde eine signifikante Verringerung der Transkript-Zahlen in dem Pärchen BVP-BPPV detektiert ( $p = 0.025$ ), während der Unterschied zwischen BVP und MM, aufgrund der ebenfalls verringerten Transkript-Zahl in MM nur sehr gering war (Abbildung 28 D).

Ähnliche Abweichungen von den Sequenzier-Ergebnissen wurden auch für hsa-miR-93-5p gefunden. Während die erhöhte Expression von BVP gegenüber BPPV noch übereinstimmte ( $p \leq 0.001$ ), wurde zusätzlich noch eine signifikante Erhöhung in der Morbus Menière-Gruppe gegenüber BPPV gemessen ( $p \leq 0.001$ ), die während der Sequenzierung nicht detektiert wurde (Abbildung 28 E).

Im Gegensatz zur Sequenzierung konnten bei der miRNA hsa-miR-622 in der RT-PCR keine Unterschiede zwischen den Gruppen bestimmt werden. Die beobachtete Erhöhung in den MM-Patienten konnte nicht detektiert werden. Die BVP-Gruppe zeigte sogar eine nicht signifikante Erhöhung dieser miRNA (Abbildung 28 F).

Insgesamt entsprachen die Ergebnisse des RT-PCR-Screens nur teilweise denen aus der Sequenzierung, wobei bei den miRNAs zusätzliche Signifikanzen zwischen den Gruppen festgestellt wurden. Aufgrund der Diskrepanzen zwischen den beiden Experimenten wurde für den RT-PCR-Screen auf eine Blind-Einteilung von Proben verzichtet.

## Ergebnisse



**Abbildung 28: Ergebnisse des RT-PCR-Screens für die untersuchten miRNAs.** Alle Werte stellen die Mittelwerte der berechneten relativen Transkript-Zahlen der einzelnen Gruppen dar. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die 2-fachen Standardfehler. Der Name der untersuchten miRNA befindet sich jeweils über dem Diagramm. Die signifikant unterschiedlichen Gruppen sind gekennzeichnet (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

## Diskussion

### **4.1 Keine spezifischen Autoantikörper im humanen Serum**

Über die Jahrzehnte wurde eine Vielzahl an Untersuchungen zum Thema Serum-Antikörper gegen Innenohrstrukturen in Patienten mit Morbus Menière oder BVP durchgeführt. Dazu wurden verschiedene immunhistochemische Techniken angewandt, um Serum-Antikörper zu detektieren. Häufig wurden dazu Innenohren von Ratten oder Meerschweinchen verwendet und diese dann mit humanen Patientenserum behandelt. Des Weiteren wurden systematische Screenings mittels Western- und Immunoblot Techniken durchgeführt. Dabei wurden Antikörper gegen verschiedene Innenohrstrukturen, darunter Utrikel sowie Bogengänge gefunden, die nicht näher definiert wurden (42). Andere Untersuchungen mit MM-Patienten konnten Antikörper gegen ein Antigen der Größe 28 kDa nachweisen, welches später als das Proto-Onkogen Raf-1 bestimmt wurde (160, 161). Eine Vielzahl weiterer Antigene wurde im Laufe der Untersuchungen bestimmt und so das Vorhandensein multipler Autoantikörper bei autoimmunen Innenohrerkrankungen festgestellt (162). Neuere Untersuchungen fokussieren sich auf ein Protein der extrazellulären Matrix, das Cochlin. Dieses Protein wird im Innenohr hauptsächlich in den Makulaorganen des Sakkulus und Utrikulus sowie den Cristae der Bogengänge exprimiert und fungiert dort höchstwahrscheinlich als Unterstützer des Hauptmatrixproteins Collagen bei der strukturellen Erhaltung der sensorischen Organe (163, 164). Eine Studie mit MM-Patienten konnte dabei eine erhöhte Expression im Innenohr nachweisen. Es wurde vermutet, dass eine fehlerhafte Homöostase der sensorischen Organe eine Rolle bei der MM-Erkrankung spielt (165). Gründe dafür könnten in der Struktur von Cochlin gefunden werden, welche Homologien mit einigen *Aspergillus* und *Penicillium* Spezies zeigt. Diese Ähnlichkeit kann vom Körper im Rahmen einer Kreuzreaktion auf die potentiell exogenen Antigene als Angriffsfläche von Antikörpern genutzt werden. Die darauffolgende Stimulation des Immunsystems sowie die erhöhte Freisetzung zytotoxischer Zytokine kann so zur Neurodegeneration und damit zum Hörverlust beitragen (166). Außerdem konnten Modelle zum Antikörper-induzierten Hörverlust etabliert werden, wodurch bewiesen wurde, dass ähnlich aufgebaute Autoantikörper durchaus eine Rolle im Rahmen eines autoimmunen Hörverlustes spielen können (167). All diese Untersuchungen werden gestützt durch die Wirksamkeit von Steroidhormonen zur Behandlung von potentiell autoimmunen Erkrankungen, welche mit ihrer anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung teilweise zu einer Verbesserung der Beschwerden führen (45). In der vorliegenden Studie sollte daher das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen spezifische Innenohrstrukturen erneut untersucht werden, um diese dann im Rahmen einer Diagnostik nutzbar zu machen. Anders als in früheren Studien sollten die Serum-Antikörper dabei auf Gewebsschnitten von humanen Innenohren nachgewiesen werden. Dazu wurden humane Felsenbeine im Rahmen von Autopsien entnommen



und anschließend bis zur vollständigen Entkalkung in EDTA-Lösung aufbewahrt. Die Entkalkung sollte sicherstellen, dass sich das Gewebe sowohl als Kryo- als auch als Paraffinschnitte vernünftig verarbeiten lässt. Das Nutzen beider Methoden sollte einem potentiellen Verlust der antigenen Reaktivität durch die weitere Behandlung der Schnitte entgegenwirken. Potentielle Autoantikörper sollten auf beiden Geweben eine Reaktivität zeigen. In die Studie eingeschlossen wurden Patienten mit BVP, darunter auch einige mit einer potentiellen autoimmunen Genese, sowie Patienten mit Morbus Menière, um früher beschriebene immunhistologische Färbungen zu verifizieren. Des Weiteren wurde eine Kontrollgruppe aus BPPV-Patienten erstellt, eine nicht autoimmune, rein strukturell pathologisch hervorgerufene Schwindelerkrankung. Zur Bestimmung der Hintergrundfärbung wurden sowohl Positivkontrollen als auch nicht reaktive Isotyp-Kontrollen durchgeführt. Die humanen Seren wurden im Rahmen der im Methodenteil beschriebenen Protokolle unverdünnt auf die Schnitte gegeben und als Sekundärantikörper ein anti-human-IgG Antikörper verwendet.

Auf den Kryo-Schnitten konnte mittels einer Calbindin-Positivkontrolle eine Färbung in den Spiralganglion-Neuronen, der Lamina spiralis ossea sowie den Neuronen des Nervus cochlearis nachgewiesen werden. In diesen Bereichen liegen besonders viele Neuronen mit langen Axon-Verbindungen, die für die Signalweiterleitung verantwortlich sind und eine hohe Calbindin-Expression aufweisen (168). Außerdem wurden Färbungen in den Bereichen des Spiral-Ligaments gefunden, also dem Übergang zwischen den flüssigkeitsgefüllten Hohlräumen der Cochlea und dem umgebenden knöchernen Gewebe. Diese Färbung ist höchstwahrscheinlich auf spezielle Fibroblasten innerhalb dieses Gewebes zurückzuführen, deren Funktion eine Regulation der Calcium-Konzentration der Perilymphe sein könnte (169). In den knöchernen Bereichen der Cochlea konnten keine weiteren Färbungen festgestellt werden. Eine entsprechende Isotyp-Kontrolle zeigte keinerlei Färbung des Gewebes, was die Calbindin-Färbung verifizieren konnte. Zur Verifizierung der Serum-Proben wurde eine humane IgG-Isotyp-Kontrolle etabliert, die aufgrund fehlender Bindeaffinitäten an das Gewebe keine Färbung zeigen sollte. Die sichtbaren Färbungen sollten daher hauptsächlich durch den sekundären anti-IgG-Antikörper, also von natürlich vorhandenen IgGs oder durch rein strukturelle, passive Anlagerungen des Sekundärantikörpers, des Verstärkers Streptavidin-HRP oder der anschließenden DAB-Färbung verursacht werden. Es konnten erneut Färbungen in der Lamina spiralis ossea, sowie dem Spiral-Ligament festgestellt werden, allerdings war die Intensität der Färbung etwas geringer als bei der Calbindin-Positivkontrolle. Die vorhandenen Neuronen zeigten keine Färbung und konnten im Autofluoreszenzbild anhand ihrer Lipofuscin-Anlagerung eindeutig identifiziert werden. Interessanterweise konnten Färbungen im peripheren knöchernen Bereich der Cochlea festgestellt werden. Deren runde Form sowie die umgebenden Strukturen konnten diese Bereiche als Osteone klassifizieren (1, 159). Deren Aufbau sowie das Vorhandensein von Mikro-

Blutgefäßen zur Versorgung und Nervenfasern zur Reizübertragung ermöglichen das Vorhandensein natürlicher IgGs aus den anliegenden Neuronen und damit eine positive Färbung dieser Strukturen (170-172). Eine falsch-positive Färbung, zum Beispiel durch eine Anlagerung des Streptavidin-HRP-Komplexes und anschließender DAB-Färbung, kann durch das Fehlen dieser Färbung auf der Calbindin-Isotyp-Kontrolle ausgeschlossen werden. Das resultierende Färbemuster wurde daher als Grundfärbung herangenommen und entsprechende Serumproben wurden auf Veränderungen gegenüber diesem Muster hin untersucht. Bei der Verwendung von Patientenseren wurden keine neuen spezifischen Färbemuster gefunden. Sowohl die Färbung mit BPPV-Kontrollserum als auch mit MM- oder BVP-Serum zeigte die gleichen Färbungen wie die humane IgG-Isotyp-Kontrolle. Alle drei Gruppen zeigten die gleichen Färbeintensitäten sowie Muster, daher wurden keine gruppenspezifischen Unterschiede festgestellt. Insgesamt war die Färbeintensität höher als bei der humanen IgG-Isotyp-Kontrolle, außerdem waren die knöchernen Bereiche rund um die Cochlea über den gesamten Schnitt hinweg leicht angefärbt. Alle auf den Schnitten vorhandenen Neuronen konnten über die Autofluoreszenzbilder identifiziert werden, eine Färbung aufgrund natürlicher IgG-Expression konnte nicht beobachtet werden. Bei allen gekauften Antikörpern wurde auf die Einsetzbarkeit in beiden Immunotechniken geachtet, bei den im Serum vorhandenen Antikörpern konnte davon nicht sicher ausgegangen werden. Zur Umgehung dieses Problems wurden die Positivkontrolle, die Isotyp-Kontrollen und die Patientenseren zusätzlich auf FFPE-Schnitten des humanen Felsenbeines untersucht. Sowohl die Färbungen mit der Calbindin-Positivkontrolle als auch der humanen IgG-Isotyp-Kontrolle konnten ähnliche Ergebnisse wie bereits auf den Kryo-Schnitten hervorbringen. Auch hier waren sowohl das Spiral-Ligament als auch die Lamina spiralis ossea angefärbt. Zusätzlich wurden Färbungen der Osteone auf beiden Kontrollen sowie eine verschieden starke Anfärbung der Neuronen des Nervus cochlearis detektiert. Dabei konnten stark, schwach und ungefärbte Neuronen beobachtet werden. Auch die Experimente mit den Patientenseren konnten, zusätzlich zu den schon auf den Kryo-Schnitten beobachteten Färbungen, verschieden starke Färbungen der Neuronen des N. cochlearis aufzeigen. Generell erschienen die Färbungen auf dem FFPE-Gewebe intensiver als auf den Kryo-Schnitten, wobei keine gruppenspezifischen Unterschiede festgestellt wurden. Um einen möglichen neurodegenerativen Effekt durch Autoantikörper im Serum von Patienten mit BVP oder MM zu bestimmen, wurden die Neuronen des N. cochlearis anhand ihrer Färbeintensität eingeteilt und die Verteilung dieser Intensitäten ermittelt. Dabei ergaben sich keine gruppenspezifischen signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Neuronen-Färbung. Etwa 50 % waren schwach angefärbt, während stark gefärbte Neuronen ca. 20 % ausmachten. Bei einer erhöhten Anzahl an Autoantikörpern gegen neuronale Antigene, wie man es für autoimmune Erkrankungen erwarten würde, hätte sich die Verteilung im Vergleich zur BPPV-Kontrollgruppe hin zu schwach oder stark gefärbten Neuronen verschieben müssen. Diese Annahme konnte mit den

Experimenten nicht bestätigt werden. Vielmehr konnten auf verschiedenen Geweben keine gruppenspezifischen Unterschiede und damit auch keine neuen Autoantikörper gegen Innenohr-Strukturen gefunden werden.

Aufgrund der fehlenden neuen Ergebnisse sollen im Folgenden kurz die methodischen Herausforderungen der Immunhistochemie am humanen Felsenbein dargestellt werden. Knöchernes Gewebe muss vor dem Schneiden routinemäßig entkalkt werden, um die Härte des Gewebes zu verringern. Im generellen werden dazu Calcium-bindende Substanzen wie EDTA verwendet, um das Calcium aus den Knochen herauszulösen. Die vollständige Entkalkung der humanen Felsenbeine mit der schonenden EDTA-Methode dauerte für diese Experimente mehr als ein Jahr. Frühe Experimente konnten keinen Einfluss der Entkalkungsdauer (bis zu einem Monat) auf die Antigenität des Gewebes feststellen (173). Trotzdem kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass einzelne Antigene über die Dauer eines Jahres hinweg ihre Antigenität verloren. Eine Verkürzung der Entkalkungsdauer mit aggressiveren Chemikalien oder anderen Protokollen (Mikrowelle) könnte dafür eine Lösung sein. Mikrowellen-Protokolle erlauben die Entkalkung innerhalb weniger Wochen, ohne die Antigenität zu stören (174). Ob ein anderes Protokoll die Anzahl zu detektierender Antigene über eine Nachweisgrenze hinaus erhöhen kann, ist dennoch nicht gesichert. Wenn nur bestimmte Strukturen des Innenohres untersucht werden sollen, stellt die Mikrodissektion eine schnelle Methode dar, die teilweise auch auf eine Entkalkung verzichten kann (Review dazu (175)). Beim Schneiden der Gewebe wurden Schnittdicken von 25  $\mu\text{m}$  (Kryo) und 12  $\mu\text{m}$  (FFPE) verwendet. Dünnere Schnitte konnten nicht hergestellt werden, da das Gewebe dabei, aufgrund der trotz Entkalkung noch vorhandenen Härte, immer wieder einriss. Die Schnittdicken entsprechen in etwa denen, die in Praxislehrbüchern für knöchernes Gewebe vorgeschlagen oder verwendet werden (133, 176). Je geringer die Schnittstärke, desto besser ist die Durchdringung mit den genutzten Antikörpern, was deren spezifische Anlagerung erleichtert. Durch die Positivkontrollen konnte eine ausreichende Anlagerung der Antikörper an vorhandene Antigene sichergestellt werden. Methodisch unterscheiden sich die beiden Protokolle durch die Notwendigkeit eines hitze-induzierten Antigen-Retrievals bei der Verwendung des FFPE-Gewebes, welches die Quervernetzungen der Proteine nach der PFA-Fixierung wieder löst. Praxislehrbücher raten dabei zu einem Protokoll, bei welchem die Schnitte bei etwa 100 °C in der Retrieval-Lösung gekocht werden (133, 136, 177). Bei Vorexperimenten lösten sich die Gewebeschnitte dabei vom Objektträger ab und konnten nicht weiterverwendet werden. Daher wurde das Protokoll so modifiziert, dass sich das beste Verhältnis aus Hitze, Dauer und Beständigkeit der Schnitte ergab. Aufgrund der wesentlich geringeren Temperatur von 80 °C kann bei diesem Protokoll nicht ausgeschlossen werden, dass potentielle Antigene für die Serum-Antikörper nur unvollkommen oder gar nicht von den Quervernetzungen befreit werden und so nicht für die Immunhistochemie zur Verfügung stehen. Die Ablösung der Schnitte war auch durch deren Dicke,

und damit Gewicht, sowie der Größe der Gewebstücke bedingt. Eine Anpassung der Größe oder das Verwenden anderer Objektträger mit noch besseren, adhäsiven Eigenschaften kann die Nutzung höherer Temperaturen ermöglichen und damit weitere Antigene zugänglich machen. Technisch lässt sich auch an der Konzentration der Serum-Antikörper arbeiten. Eine Verdünnung der Seren kann die Hintergrund-Färbung reduzieren, die Anzahl potentieller Autoantikörper allerdings auch unter die Nachweisgrenze drücken. Eine Aufkonzentrierung der Antikörper mittels Ultrafiltrationssäulen konzentriert neben kaum vorhandenen Autoantikörpern allerdings auch unspezifische Antikörper, welche die Hintergrund-Färbung verstärken. Diese Methoden sind allerdings nur bei bekannten Antigenen sinnvoll, um deren Detektion zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst darauf verzichtet, da keine Kenntnisse über mögliche Antigene bestanden. Stattdessen wurden die Gewebe mit unbehandeltem Serum versetzt, um dem Verlust der Antikörper durch Verdünnung vorzubeugen. Aufgrund der starken Hintergrundfärbung, sowohl bei den Isotyp-Kontrollen als auch bei der BPPV-Kontrollgruppe erschien eine Aufkonzentrierung nicht weiter sinnvoll. Gruppenspezifische Autoantikörper sollten in den Experimenten durch den Vergleich mit der BPPV-Kontrollgruppe sowie über die Anzahl der verwendeten Seren untersucht werden. Da mit den hier verwendeten Methoden keine neuen Autoantikörper gegen humane Innenohrstrukturen detektiert werden konnten, erscheint die Anpassung der Protokolle oder die Verwendung anderer Techniken, wie dem Western Blot, sinnvoll.

## **4.2 miRNA-Profil der humanen Endo-/Perilymphe**

Die Endo- und Perilymphe des Innenohres bilden ein in sich abgeschlossenes System und stehen nicht mit anderen extrazellulären Flüssigkeiten des Körpers in Verbindung. Daher ist es nicht überraschend, dass die Zusammensetzung dieser Flüssigkeiten einzigartig ist. Eine Vielzahl von Studien untersuchte sowohl die ionische Zusammensetzung als auch das Proteom, also die Protein-Zusammensetzung. Während die Endolymphe in ihrer ionischen Zusammensetzung dem Zytosol der Zellen ähnelt, weist die Perilymphe typische Konzentrationen anderer extrazellulärer Flüssigkeiten auf (10, 11). Auch im Proteom lassen sich viele Gemeinsamkeiten mit dem Blutplasma oder der Rückenmarksflüssigkeit nachweisen (178, 179). In dieser Arbeit wurden erstmalig das miRNA-Profil der humanen Endo-/Perilymphe erstellt und vergleichende Untersuchungen zum miRNA-Profil des humanen Serums durchgeführt. Die miRNAs sind kurze, 19-24 Nukleotid lange, nicht-kodierende RNA-Fragmente, die eine tragende Rolle in der Regulation der Genexpression bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen spielen. Im Rahmen vieler Studien konnte die Verwendung von extrazellulären miRNAs aus Körperflüssigkeiten für die Diagnostik verschiedener Krankheiten, darunter auch Krebs, nachgewiesen werden (98, 180). Für die vorliegende Arbeit wurden im Zuge von Autopsien humane Felsenbeine verwendet, um aus den Bogengängen einen Mix aus Endo- und

Perilymphe zu gewinnen. Die EP-Proben wurden innerhalb eines Zeitintervalls von 24 Stunden post-mortem gesammelt, sofort weiterbearbeitet und bei -80 °C gelagert. In früheren Studien konnte die außerordentliche Stabilität von miRNAs auch über längere post-mortem Intervalle von bis zu fünf Tagen festgestellt werden. Die miRNAs waren dabei resistent gegenüber Degradierung oder einer Verschlechterung der miRNA-Qualität (181, 182). Durch den gewählten Zeitraum der Probenentnahme konnte so sichergestellt werden, dass das generierte miRNA-Profil auch die *in vivo* Situation widerspiegelt und die Ergebnisse somit verwertbar waren. Die miRNA-Profile wurden daraufhin mit dem Illumina Next-Generation-Sequencing System erstellt und mit den Programmen miRDeep2 und DESeq2 weiter untersucht. Insgesamt konnten 528 verschiedene miRNAs in allen Proben detektiert werden, wobei die 10 meist gefunden miRNAs etwa 50 % repräsentieren. Die drei häufigsten miRNAs waren hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-320a und hsa-let7b-5p. Trotz einer sehr hohen biologischen Variabilität innerhalb der verschiedenen Proben konnten kaum Unterschiede zwischen Frauen und Männern festgestellt werden. Lediglich eine miRNA (hsa-miR-3622a-5p) zeigte eine um 4.3-fache signifikant erhöhte Expression in der Innenohrflüssigkeit von Frauen. Eine systematische und bioinformatische Analyse der einzelnen miRNAs ist aufgrund der Menge an verfügbaren genetischen Informationen nur bedingt sinnvoll. So können über das Programm TargetScan (TargetScan Human, Release 7.1, online verfügbar: [www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) alleine für die miRNA miR-3622a-5p 2365 verschiedene Targets abgerufen werden. Alle diese Targets sind Gene, deren 3'UTR wenigstens eine mögliche Bindestelle für diese miRNA aufweisen und damit ein mögliches Ziel für die Regulation sind. Auch ein Vergleich dieser Targets mit einem vorhandenen Gen-Expressions-Atlas (SHIELD, Shared Harvard Inner-Ear Laboratory Database) würde kaum verwertbare Informationen liefern (183). Die vorhandenen Datenbanken liefern für die Haarzellen der humanen Cochlea Informationen über die Expression von über 41.000 Datensätzen, darunter über 25.000 eindeutige. Die Wahrscheinlichkeit, dass die über TargetScan ermittelten Gene auch in diesen Genexpressionsstudien auftauchen, ist zu hoch, um eine vernünftige Validierung durchführen zu können. Eine experimentelle Untersuchung der Genexpression bei Über- oder Unterexpression der miRNAs mit etablierten Zelllinien aus Innenohren wurde im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt (184). Der experimentelle Wert solcher Studien sowie deren Beitrag zum Verständnis des Innenohres kann der Bestandteil von Überlegungen zu fortführenden Experimenten sein. Da extrazelluläre miRNAs von einigen Forschern als passive Nebenprodukte der physiologischen und pathologischen Zellfunktion angesehen werden, kann das Vorhandensein spezifischer miRNAs in den Innenohrflüssigkeiten auf zelluläre Vorgänge der anliegenden Zelltypen hinweisen. Die Untersuchung der Freisetzung von miRNAs im Rahmen von autoimmunen, zytotoxischen oder neurodegenerativen Vorgängen kann zum Verständnis dieser beitragen.

Eine Einordnung der gefundenen miRNAs anhand der vorhandenen Literatur soll einen ersten Einblick in deren intrazelluläre Wirkungsweise geben. Soweit nicht gesondert angegeben, können alle Informationen über die miRBase Datenbank abgerufen werden. Eine neuere Studie zum miRNA-Profil der sensorischen Epithelien im Innenohr konnte die Expression der miRNAs miR-92a und miR-let7b in der Maus nachweisen. Die miR-320a wurde hingegen nicht detektiert (185). Die Mitglieder der miR-92a Familie sind bekannt für ihre regulatorische Rolle innerhalb der Zellzyklus-Regulation und im Zellwachstum. Studien konnten nachweisen, dass die Phosphatase PTEN (Phosphatase Tensin Homolog), ein negativer Regulator des PI3K/AKT Wachstumssignals, ein direktes Target der miRNA-92a ist. Eine Überexpression verstärkte den Phasenübergang von Epithelzellen zu invasiven Tumorzellen sowie die Wachstumsrate von Tumoren durch eine Down-Regulation der intrazellulären PTEN-Level (186). Die let7-Familie codiert im humanen Genom für 8 miRNAs mit ähnlichen Seed-Sequenzen für die Target-Erkennung (76). Generell sind diese für eine korrekte zeitliche Abfolge der Entwicklung zuständig, ihnen werden aber auch tumorsuppressive Funktionen zugeschrieben, da ihre Expression in Krebszellen signifikant reduziert ist (187). Dazu gehört die negative Regulation der RAS-Onkogene, aber auch Gene der Zellzyklus-Progression sind als Targets verifiziert worden (188). Weiterhin konnten Studien einen Einfluss der let7-Familie auf das Immunsystem nachweisen. Auf eine bakterielle Infektion reagieren Makrophagen mit einer Abschaltung der let7-Expression, um die Freisetzung immunmodulatorischer Zytokine zu ermöglichen (189). Eine tumorsuppressive, anti-metastasierende Wirkung konnte auch für die miRNA miR-320a bewiesen werden. Besonders immunmodulatorische Proteine, wie das High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1), sind als Targets für miR-320a bestimmt worden (190). HMGB1 kann bei nekrotischen Prozessen freigesetzt werden und wirkt als Aktivator des angeborenen Immunsystems. Da es auch von Zellen des angeborenen Immunsystems sekretiert werden kann, wird auch eine autoimmune Rolle diskutiert (191). Zur miRNA miR-3622a ist bisher nur sehr wenig bekannt. Nachgewiesen werden konnten eine tumorsuppressive Wirkung und eine negative Regulation des Phasenübergangs von Epithelzellen zu invasiven Tumorzellen (192). Diese Ergebnisse gelten bislang allerdings nur für Prostata-Epithelzellen. Die genetischen Informationen für miR-3622a liegen auf dem Chromosom 8 und damit nicht auf dem geschlechtsspezifischen Y-Chromosom. Ein wissenschaftlicher Grund für die erhöhte Konzentration in Innenohrflüssigkeiten von Frauen lässt sich aus den wenigen bekannten Informationen nicht ableiten.

Neben dem miRNA-Profil der Innenohrflüssigkeiten sollten auch die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu humanen Serum untersucht werden. Dabei wurden 481 miRNAs festgestellt, die ein signifikant differenzielles Expressionsmuster in den EP-Proben im Vergleich zu den BPPV-Proben aufwiesen. Bei einer Cluster-Analyse der beiden Gruppen konnten eine Reihe von miRNAs festgestellt werden, die in den EP-Proben eine sehr hohe Expression aufwiesen, während sie in den Serum-

Proben kaum detektiert werden konnten, sowie eine Gruppe, die genau das gegenteilige Muster aufwies. Während 378 miRNAs in beiden Körperflüssigkeiten zu finden waren, konnten 191 nur in den EP-Proben und 106 ausschließlich in den Serum-Proben nachgewiesen werden. Aufgrund der Volumenverteilung der Endo- und Perilymphe im Ohr, mit einem 4-5-fach erhöhten Perilymph-Volumen, konnten die gefundenen Ergebnisse eher der Perilymphe zugeordnet werden als der Endolympe (193). Während es bei der ionischen Komposition und dem Proteom Ähnlichkeiten zwischen der Perilymphe und anderen extrazellulären Körperflüssigkeiten gibt, unterscheiden sich die miRNA-Profile deutlich voneinander. Diese gravierenden Unterschiede lassen sich am ehesten durch die Spezifität der Innenohrflüssigkeiten sowie durch die Einflussmöglichkeiten auf die Körperflüssigkeiten erklären. Im Blutserum lassen sich alle möglichen löslichen Bestandteile des Blutes finden. Durch die Vernetzung des Blutstromes mit allen Körperregionen, Organen oder Zelltypen wird das miRNA-Profil durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst und bildet daher ein Gesamtbild des Organismus ab. Der Ursprung der Innenohrflüssigkeiten hingegen ist weitaus weniger bekannt. Neben der Blut-Hirn-Schranke, die das Blut aus dem Rest des Körpers vom zerebellaren Blutstrom trennt und so ein spezifisches Hirnmilieu aufrechterhält, trennt eine weitere epithelgebildete Barriere, die Blut-Perilymph-Barriere, den Perilymph-Raum von den Gefäßen des Innenohr-Blutflusses ab (194, 195). Dadurch wird ein Einfluss aus intravenösem Blut doppelt selektioniert und nur kleine, lösliche Stoffe können in das Gehirn gelangen, was einen Schutz gegenüber Krankheitserregern gewährleistet, jedoch die benötigten Nährstoffe passieren lässt (196). Dadurch bildet sich für die Perilymphe ein nahezu abgeschlossenes System, dessen Wasser und Ionen-Komposition hauptsächlich aus dem Blutplasma und dem Zerebrospinalfluid stammen. Auch die Sekretion der Perilymphe durch Zellen im Bereich der Lamina spiralis ossea, genauer des Spirallimbus, wurde durch verschiedene Studien nahegelegt (195, 197). Die Endolympe wird dagegen nur lokal im Innenohr gebildet, zum einen durch die Diffusion von Perilymphe in den Endolymphraum, zum anderen durch eine mögliche Sekretion aus Zellen der Stria vascularis (198, 199). Da hauptsächlich lokale Einflussmöglichkeiten auf das miRNA-Profil der Innenohrflüssigkeiten bestehen, lässt sich der Ursprung der meisten extrazellulären miRNAs dieses Milieus auf Zellen des Innenohrs zurückführen. Eine hohe Konzentration organspezifischer miRNAs, in diesem Fall aus den hochspezialisierten, einzigartigen Zellen des Innenohres, kann daher als sicher angenommen werden. Dieser Ursprung würde diejenigen miRNAs erklären, die im Blutserum kaum bis gar nicht zu finden waren, in den Innenohrflüssigkeiten jedoch eine scheinbar größere Rolle spielen.

Die stark differentiell exprimierten miRNAs miR-204, miR-125b und miR-99 wurden in den sensorischen Innenohr-Epithelien schon zuvor nachgewiesen (185). Wie schon andere miRNAs zuvor wurde miR-204 hauptsächlich im Zusammenhang mit Krebsstudien untersucht. Dabei konnten tumorsuppressive Funktionen durch eine Kontrolle des Zellwachstums und einer Down-Regulation

anti-apoptotischer Faktoren verifiziert werden (200). Auch Gene, die den Phasenübergang von Epithelzellen zu invasiven Tumorzellen steuern, konnten als Targets von miR-204 bestimmt werden (201). Die miRNA miR-125b gehört in eine Familie mit miR-125a. Diese miRNA liegt auf einem chromosomalen Cluster zusammen mit miR-99b und hsa-let-7e. Sowohl miR-99b als auch miR-125a werden signifikant differenziell exprimiert, während hsa-let-7e in der Perilymphe keine Rolle spielt, da diese kaum detektiert werden konnte. Auch die Mitglieder der miR-125-Familie spielen in der Tumorgenese eine wichtige Rolle, wobei sowohl tumorsuppressive als auch tumorprogressive Funktionen nachgewiesen werden konnten (Review dazu (202)). Zusätzlich dazu spielen miR-125 miRNAs eine regulatorische Rolle sowohl bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen als auch bei der Abwehr von bakteriellen und viralen Krankheitserregern. So konnte eine Fehlregulation von miR-125a in der Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus erythematodes und miR-125b im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung nachgewiesen werden (203, 204). Bei der Immunabwehr scheint die Differenzierung von B-Lymphozyten teilweise durch die miR-125b reguliert zu werden, da eine Überexpression die Differenzierung verhinderte (205). In HIV-1 Infektionsmodellen konnte eine anti-HIV-Wirkung durch Verstärkung der Viruslatenz nachgewiesen werden, indem miR-125b an die HIV eigenen mRNAs bindet, deren Translation verhindert und somit einer aktiven Virusproduktion entgegenwirkt (206). Zur Familie der miR-99 gehören miR-99a und miR-99b, welche wiederum zusammen mit miR-100 zur miR-10-Familie gehören. Die miR-99a wird in einem engen Cluster zusammen mit hsa-let-7c auf dem gleichen Chromosom kodiert. Beide miRNAs wurden in der Endo-/Perilymphe als signifikant erhöht detektiert, während sie im Serum fast nicht nachgewiesen werden konnten. Auch miR-100 wurde in den Top 20 der signifikanten miRNAs als stark erhöht im EP-Mix vorgefunden. Die miRNAs miR-99a und miR-99b zeigen tumorsuppressive Wirkungen in einigen Krebsarten durch eine Suppression der Proliferations-Signalwege innerhalb der Zellen (207). Des Weiteren konnten mögliche tumorfördernde Funktionen nachgewiesen werden, indem in die Regulation der Zelldifferenzierung eingegriffen wird (208, 209). Die gefundenen miRNAs greifen stark in die Regulation der Zellproliferation und -Differenzierung ein, was eine wichtige Rolle in der Zellhomöostase nahelegt. Damit scheinen sie für die Aufrechterhaltung des zellulären, aber auch extrazellulären Milieus im Innenohr eine zentrale Rolle zu spielen. Die potentiell immunmodulatorischen miRNAs stehen wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem lokalen Immunsystem des Innenohres. Dessen Existenz wurde schon früh beschrieben und es kann auf Infektionen mit einer lokalen Immunantwort, inklusive der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen sowie Antikörpern reagieren (210-212).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das miRNA-Profil der humanen Innenohrflüssigkeiten einzigartig ist und sich stark vom Serum unterscheidet. Die vorliegende Arbeit konnte die Grundlagen legen, um die Innenohrflüssigkeiten weiter zu untersuchen. So können im



Rahmen von Operationen am Innenohr, zum Beispiel bei Cochlea-Implantationen, Perilymphproben entnommen werden und die miRNAs bei Patienten mit Innenohrerkrankungen analysiert werden. Die beschriebenen miRNAs können dabei als potentielle Biomarker verwendet werden, um zwischen degenerativen und autoimmunen Innenohrerkrankungen zu unterscheiden.

### **4.3 Differenzielle miRNAs im Serum von Patienten**

Wie schon in der Einleitung beschrieben, können Serum-miRNAs als Biomarker für eine Reihe verschiedener Krankheiten und Krebsarten genutzt werden, darunter auch verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen wie Diabetes (180, 213). Ein differenzieller Nachweis zirkulierender miRNAs im Serum von Patienten mit BVP und MM kann daher eine weitere Methode sein, um eine sichere Diagnostik zu gewährleisten. Sowohl für BPV als auch für MM werden verschiedene autoimmune oder genetische Ursachen diskutiert. Besonders inflammatorische Prozesse sollten als Abbild des Organismus im Serum zu detektieren sein. Differenzielle miRNAs könnten so als Biomarker für periphere Innenohrerkrankungen genutzt werden. Um dies zu bestätigen, wurden Seren von Patienten mit BVP, MM und BPPV auf die jeweiligen miRNA-Profile hin untersucht. Im Durchschnitt repräsentierten die 10 häufigsten miRNAs im Serum etwa 70 % aller gefundenen. Von diesen zeigte keine eine differenzielle Expression innerhalb der Versuchsgruppen. Signifikante Änderungen betreffen daher nur einen kleinen Prozentsatz aller miRNA, was deren Spezifität aber deutlich erhöht. In der Tat konnten signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Beim Vergleich zwischen BVP und BPPV wurden acht miRNAs vermehrt und zwei vermindert detektiert. Aufgrund der teilweise recht geringen Expressionszahlen im Serum lassen sich diese miRNAs nicht eindeutig zu gruppenspezifischen Clustern zusammenlagern. Die Unterschiede ergeben sich daher aus der Probenanzahl pro Versuchsgruppe. Noch spezifischer fiel das Resultat bei den Gruppen MM und BPPV aus. Dort konnte nur eine einzige miRNA als statistisch signifikant nachgewiesen werden, während alle anderen detektierten miRNAs ähnliche Expressionsmuster zeigten. Auch der Vergleich zwischen MM und BVP konnte Unterschiede nachweisen. Wichtig dabei ist zu erwähnen, dass die signifikant erhöhte miRNA im Vergleich zu BPPV auch hier in den MM-Proben verstärkt exprimiert wurde. Außerdem konnten einige miRNAs, die in den BVP-Proben signifikant gegen BPPV waren, auch hier als signifikant gegen MM beschrieben werden. Daraus lässt sich ableiten, dass diese als spezifisch für BVP gelten und damit das Potential für Biomarker besitzen.

Zur Überprüfung dieser These wurden spezifische miRNAs in einem RT-PCR-Screen erneut untersucht, um festzustellen, ob die signifikanten Unterschiede auch hier nachgewiesen werden können. Dazu wurden alle Proben auf alle sechs ausgewählten signifikanten Marker hin untersucht und mittels statistischen Tests die differenzielle Expression ermittelt. Der PCR-Screen konnte die

Ergebnisse der miRNA-Sequenzierung nur teilweise bestätigen. Für die miRNA miR-143 konnte der signifikante Anstieg in der BVP-Gruppe gegenüber der MM-Gruppe bestätigt werden. Allerdings zeigte sich auch ein Anstieg in der BPPV-Gruppe gegenüber der MM-Gruppe, die im miRNA-Profil nicht beobachtet werden konnte. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für miR-223 und miR-27a, welche den Anstieg BVP-BPPV zeigten, aber nicht den erwarteten Rückgang im MM-Serum. Gänzlich den Ergebnissen der Sequenzierung widersprachen die Ergebnisse der miR-584 und miR-622. Statt der erwarteten höchsten Expression von miR-584 in der MM-Gruppe und damit einer Abgrenzung zu BVP, war hier kein Unterschied feststellbar. Stattdessen wurde in der BPPV-Gruppe die höchste durchschnittliche Konzentration gefunden. Auch miR-622 zeigte die höchste Konzentration in einer anderen Patientengruppe, nämlich in der BVP-Gruppe, anstatt einen signifikanten Unterschied zwischen MM und BPPV darzustellen. Für miR-93 konnte der signifikante Anstieg bei BVP-BPPV bestätigt werden, allerdings zusätzlich auch ein signifikanter Anstieg bei MM-BPPV. Dieser Anstieg wurde zwar auch in der Sequenzierung gefunden, allerdings nicht als signifikant bewertet. Keines der Ergebnisse des RT-Screens konnte die Resultate der Sequenzierung vollständig verifizieren. Daraus lässt sich ableiten, dass die verwendeten miRNAs zumindest innerhalb dieses Experiment-Aufbaus nicht als diagnostische Biomarker verwendet werden können.

Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen die Frage aufkommen, warum die Resultate den Erwartungen nicht entsprachen und welche Änderungen an den Experimenten vorgenommen werden können, um zuverlässigere Daten zu erhalten. Beginnend bei der miRNA-Sequenzierung lässt sich am einfachsten die Anzahl der Stichproben jeder Patientengruppe erhöhen. Eine Erhöhung der Probenanzahl führt zu einem verlässlicheren Ergebnis, da probenspezifische, biologische Schwankungen über die Gesamtmenge keinen so großen Einfluss haben. Dadurch könnten Unterschiede, die aufgrund weniger Ausreißer entstehen, etwas abgemildert werden und so die signifikanten miRNAs genauer bestimmt werden. Die miRNAs, die in den bestehenden Ergebnissen nur eine geringe Signifikanz zeigten, lassen sich dadurch noch genauer untersuchen und in die Unterschiede zwischen den Gruppen einordnen. Bei einer genaueren Betrachtung der Ergebnisse zeigte sich auch, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nur sehr geringe Signifikanzen aufwiesen. Alle detektierten Unterschiede wiesen korrigierte p-Werte zwischen 0.05 und 0.01 auf, wobei 0.05 das obere Ende der Signifikanz darstellte. Ausnahme hiervon war nur miRNA miR-622, welche zwischen den Gruppen MM und BPPV eine sehr hohe Signifikanz aufweisen konnte ( $p < 0.001$ ). Die geringen Signifikanzen bedeuteten auch, dass die Unterschiede der Expression einzelner miRNAs innerhalb der Gruppen teilweise sehr gering waren. Beispielsweise erhöhte sich die Expression von miR-93 bei BVP nur um  $0.4[\log_2]$  im Vergleich zu BPPV. Das entsprach einem nur 1.32-fachen Anstieg der durchschnittlichen Expression. Innerhalb der biologischen Variabilität schwankten die einzelnen normierten Werte zwischen  $1426 \pm 161$  für BPPV und  $1932 \pm 580$  in der BVP-

Gruppe. Die anderen miRNAs konnten mit vergleichbaren Werten bestimmt werden, wobei der größte Unterschied bei dem 1.63-fachen Anstieg von miRNA-223 zwischen BVP und BPPV vorhanden war. Dadurch ist es möglich, dass einzelne Proben aufgrund ihrer Werte-Konstellation nur sehr geringe Unterschiede zur Vergleichsgruppe aufweisen und daher bei der Bestimmung der statistischen Signifikanz zu falschen Resultaten führen. Auch hier kann die Erhöhung der Probenanzahl jeder Versuchsgruppe eine Besserung bringen, da damit zumeist eine höhere Genauigkeit innerhalb der Standardabweichung einhergeht. Des Weiteren ließen die Werte nur bei einigen wenigen Proben eine Blindeinteilung in die drei Versuchsgruppen zu. Von zehn Blindproben konnten sechs in die richtige Gruppe eingeordnet werden. Die damit einhergehende Fehlerquote schließt damit die Ergebnisse der Sequenzierung für eine direkte Diagnostik aus. Doch auch die PCR-Ergebnisse konnten keinen Nutzen der verwendeten miRNAs als diagnostische Biomarker aufzeigen, da die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zum Teil deutliche Abweichungen von denen der Sequenzierung aufwiesen.

Daher stellt sich die Frage, ob mit Anpassungen des Protokolls bessere und vor allem verlässlichere Ergebnisse geliefert werden können. Zuerst ist zu erwähnen, dass alle RNA-Proben für den PCR-Screen genau einmal isoliert, dann in cDNA umgeschrieben und zuletzt in Duplikaten gemessen wurden. Die Abweichungen innerhalb der Duplikate lagen alle in tolerierbaren Bereichen, da sie auch bei den Kalibrator-Proben innerhalb der verschiedenen Platten nur sehr gering waren. Aufgrund der Menge an Proben wurden daher keine unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Ob diese die erhaltenen Ergebnisse bestätigen können oder sehr stark davon abweichen, kann innerhalb dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Des Weiteren lässt sich die Methodik der Normalisierung anhand einer exogenen spike-in-Kontrolle diskutieren. Der Vorteil solcher Kontrollen ist vor allem die bekannte und in allen Proben gleich zugesetzte Konzentration. Daraus lässt sich die Extraktionseffizienz der einzelnen Probanden-Proben berechnen. Dies wurde ebenfalls für die Auswertung durchgeführt, indem die mittlere Extraktionseffizienz aller Proben berechnet wurde und so ein probenspezifischer Extraktionsfaktor in den Resultaten verrechnet werden konnte. Problematisch an dieser Methode kann der miRNA-Gehalt einzelner Proben sein, da auch bei dem gleichen Ausgangsvolumen unterschiedliche Gesamt-miRNA-Konzentrationen vorkommen können. Die Verwendung einer endogenen Kontrolle, welche sich durch eine invariante Expression innerhalb der einzelnen Proben auszeichnet, kann zu einer besseren Normalisierung der Ergebnisse beitragen. In verschiedenen Studien wurde untersucht, welche miRNAs als endogene Kontrollen genutzt werden können. Dabei wurde eine Vielzahl verschiedener miRNAs verwendet, die sich aber später zum Teil als variabel bei bestimmten Krankheitsbedingungen herausstellten. So wird miRNA-16 als endogene Kontrolle vorgeschlagen, aber gleichzeitig auch als Biomarker für rheumatoide Arthritis diskutiert (214-216). Über eine Kombination an verschiedenen exogenen und mehreren endogenen

Kontrollen kann die Variabilität innerhalb der einzelnen Proben ausgeglichen werden, um dadurch die Ergebnisse möglicherweise noch zu verbessern (217). In der vorliegenden Arbeit wurde die Normalisierung ausschließlich über die exogene Kontrolle durchgeführt. Eine Re-Evaluierung der Ergebnisse mit gleichzeitigem Heranziehen von endogenen Kontrollen kann daher verlässlichere Resultate liefern. Es ist auch zu überlegen, ob bei der Menge an eingesetztem Serum besser vorher eine miRNA-Konzentrationsbestimmung, zum Beispiel über eine Messung mittels des Agilent Bioanalyzers, durchgeführt werden sollte, um bei allen Proben mit der gleichen Gesamt-miRNA-Menge in die Experimente zu starten. Dieses Vorgehen sollte sich auch bei der Verwendung der endogenen Kontrollen durch deren Invariabilität innerhalb der verschiedenen Proben als Verbesserung erweisen. Des Weiteren kann eine Erweiterung des PCR-Screens überdacht werden, indem nach der Re-Evaluierung des Versuchsaufbaus alle Proben in unabhängigen, biologischen Replikaten erneut untersucht werden. Dadurch können einzelne Ausreißer, die entweder systembedingt oder durch Pipettierfehler auftreten, ausgeglichen und das Ergebnis wissenschaftlich exakter bestimmt werden.

Mit den Möglichkeiten zur Verifizierung der Sequenzierungsergebnisse sowie einer Re-Evaluierung der im Anschluss verwendeten miRNAs für den PCR-Screen und der Anpassung des Screening-Setups kann das vorliegende Ergebnis noch genauer bestimmt werden. Ohne diese Anpassungen sind die bisher erhaltenen Resultate nicht geeignet, um ein Set aus spezifischen miRNAs zu definieren, die sich als diagnostische Biomarker im Rahmen der Routineuntersuchung bei Patienten mit peripheren Innenohrerkrankungen verwenden lassen.

Referenzen

1. Zilles, Tillmann. 2010. Anatomie, vol 1. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
2. Lenarz T, Boenninghaus H. 2012. HNO, vol 14. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
3. Juliano AF, Ginat DT, Moonis G. 2013. Imaging review of the temporal bone: part I. Anatomy and inflammatory and neoplastic processes. *Radiology* 269:17-33.
4. Yilmaz U. 2014. [Anatomy of the petrous portion of the temporal bone]. *Radiologe* 54:323-6.
5. Amano KW. 1931. The labyrinth of *bufo vulgaris japonicus* larva. Especially, upon the morphologic study of the perilymphatic space, in connection with the membranous labyrinth and auditory capsule. *Journal of Morphology* 51:207-242.
6. Ekdale EG. 2013. Comparative Anatomy of the Bony Labyrinth (Inner Ear) of Placental Mammals. *PLoS One* 8:e66624.
7. Mangabeira-Albernaz PL. 1961. Histochemistry of the connective tissue of the cochlea. *Laryngoscope* 71:1-18.
8. Chou JTY. 1963. Respiration of Reissner's Membrane of the Guinea Pig. *The Journal of Laryngology & Otology* 77:374-380.
9. Qvortrup K, Rostgaard J. 1990. Three-dimensional organization of a transcellular tubulocisternal endoplasmic reticulum in epithelial cells of Reissner's membrane in the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 261:287-99.
10. Davies DG. 1968. Biochemistry of the inner ear fluids--experimental and clinical observations. *J Laryngol Otol* 82:301-11.
11. Ghanem TA, Breneman KD, Rabbitt RD, Brown HM. 2008. Ionic composition of endolymph and perilymph in the inner ear of the oyster toadfish, *Opsanus tau*. *Biol Bull* 214:83-90.
12. Stover T, Diensthuber M. 2011. Molecular biology of hearing. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 10:Doc06.
13. Schmidt R, Lang F, Heckmann M. 2010. Physiologie des Menschen. Springer Medizin Verlag Heidelberg 31. Auflage.
14. Békésy Gv. 1932. Zur Theorie des Hörens bei der Schallaufnahme durch Knochenleitung. *Annalen der Physik* 405:111-136.
15. Santi P, Tsuprun V. 2001. Cochlear microanatomy and ultrastructure. In: Jahn AF, Santos-Sacchi J, eds *Physiology of the Ear*, San Diego, CA: Singular Publishing.
16. Hudspeth AJ, Corey DP. 1977. Sensitivity, polarity, and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:2407-11.
17. Pickles JO, Comis SD, Osborne MP. 1984. Cross-links between stereocilia in the guinea pig organ of Corti, and their possible relation to sensory transduction. *Hear Res* 15:103-12.
18. Rhode WS, Geisler CD. 1967. Model of the displacement between opposing points on the tectorial membrane and reticular lamina. *J Acoust Soc Am* 42:185-90.
19. Ashmore J. 2008. Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev* 88:173-210.
20. Ottersen OP, Takumi Y, Matsubara A, Landsend AS, Laake JH, Usami S. 1998. Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear. *Prog Neurobiol* 54:127-48.
21. Khan S, Chang R. 2013. Anatomy of the vestibular system: a review. *NeuroRehabilitation* 32:437-43.
22. Fernandez C, Goldberg JM. 1976. Physiology of peripheral neurons innervating otolith organs of the squirrel monkey. I. Response to static tilts and to long-duration centrifugal force. *J Neurophysiol* 39:970-84.
23. Barret K, Barman S, Boitano S, Brooks H. 2012. Chapter 10. Hearing & Equilibrium. *Ganong's Review of Medical Physiology* 24e.
24. Mergner T, Siebold C, Schweigart G, Becker W. 1991. Human perception of horizontal trunk and head rotation in space during vestibular and neck stimulation. *Exp Brain Res* 85:389-404.

## Referenzen

25. Bagger-Sjoberg D, Lundquist PG, Galey F, Ylikoski J. 1983. The sensory epithelia of the human labyrinth. A freeze-fracturing and transmission electron microscopic study. *Am J Otol* 4:203-13.
26. Van Egmond AA, Groen JJ, Jongkees LB. 1949. The mechanics of the semicircular canal. *J Physiol* 110:1-17.
27. Jamali M, Sadeghi SG, Cullen KE. 2009. Response of vestibular nerve afferents innervating utricle and saccule during passive and active translations. *J Neurophysiol* 101:141-9.
28. Neuhauser HK. 2007. Epidemiology of vertigo. *Curr Opin Neurol* 20:40-6.
29. Neuhauser HK. 2016. The epidemiology of dizziness and vertigo. *Handb Clin Neurol* 137:67-82.
30. Hannaford PC, Simpson JA, Bisset AF, Davis A, McKerrow W, Mills R. 2005. The prevalence of ear, nose and throat problems in the community: results from a national cross-sectional postal survey in Scotland. *Fam Pract* 22:227-33.
31. Baloh RW. 1998. Differentiating between peripheral and central causes of vertigo. *Otolaryngol Head Neck Surg* 119:55-9.
32. Brandt T, Dieterich M, Strupp M. 2013. *Vertigo - Leitsymptom Schwindel*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2. Auflage.
33. Brandt T, Stedden S. 1993. Current view of the mechanism of benign paroxysmal positioning vertigo: cupulolithiasis or canalolithiasis? *J Vestib Res* 3:373-82.
34. Cohen HS, Kimball KT, Stewart MG. 2004. Benign paroxysmal positional vertigo and comorbid conditions. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 66:11-5.
35. Vibert D, Kompis M, Hausler R. 2003. Benign paroxysmal positional vertigo in older women may be related to osteoporosis and osteopenia. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112:885-9.
36. Epley JM. 1992. The canalith repositioning procedure: for treatment of benign paroxysmal positional vertigo. *Otolaryngol Head Neck Surg* 107:399-404.
37. Semont A, Freyss G, Vitte E. 1988. Curing the BPPV with a liberatory maneuver. *Adv Otorhinolaryngol* 42:290-3.
38. Strupp M, Brandt T. 2008. Diagnosis and Treatment of Vertigo and Dizziness. *Deutsches Ärzteblatt International* 105:173-180.
39. Zingler VC, Cnyrim C, Jahn K, Weintz E, Fernbacher J, Frenzel C, Brandt T, Strupp M. 2007. Causative factors and epidemiology of bilateral vestibulopathy in 255 patients. *Ann Neurol* 61:524-32.
40. Kim S, Oh YM, Koo JW, Kim JS. 2011. Bilateral vestibulopathy: clinical characteristics and diagnostic criteria. *Otol Neurotol* 32:812-7.
41. Zingler VC, Weintz E, Jahn K, Mike A, Huppert D, Rettinger N, Brandt T, Strupp M. 2008. Follow-up of vestibular function in bilateral vestibulopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:284-8.
42. Arbusow V, Strupp M, Dieterich M, Stocker W, Naumann A, Schulz P, Brandt T. 1998. Serum antibodies against membranous labyrinth in patients with "idiopathic" bilateral vestibulopathy. *J Neurol* 245:132-6.
43. Kirchner H, Kremmyda O, Hufner K, Stephan T, Zingler V, Brandt T, Jahn K, Strupp M. 2011. Clinical, electrophysiological, and MRI findings in patients with cerebellar ataxia and a bilaterally pathological head-impulse test. *Ann N Y Acad Sci* 1233:127-38.
44. Deutschlander A, Glaser M, Strupp M, Dieterich M, Brandt T. 2005. Immunosuppressive treatment in bilateral vestibulopathy with inner ear antibodies. *Acta Otolaryngol* 125:848-51.
45. Schüler O, Strupp M, Arbusow V, Brandt T. 2003. A case of possible autoimmune bilateral vestibulopathy treated with steroids. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 74:825.
46. Dieterich M, Bauermann T, Best C, Stoeter P, Schindwein P. 2007. Evidence for cortical visual substitution of chronic bilateral vestibular failure (an fMRI study). *Brain* 130:2108-16.

## Referenzen

47. Fujimoto C, Murofushi T, Chihara Y, Ushio M, Suzuki M, Yamaguchi T, Yamasoba T, Iwasaki S. 2013. Effect of severity of vestibular dysfunction on postural instability in idiopathic bilateral vestibulopathy. *Acta Otolaryngol* 133:454-61.
48. McDonnell MN, Hillier SL. 2015. Vestibular rehabilitation for unilateral peripheral vestibular dysfunction. *Cochrane Database Syst Rev* 1:Cd005397.
49. Lopez-Escamez JA, Carey J, Chung WH, Goebel JA, Magnusson M, Mandala M, Newman-Toker DE, Strupp M, Suzuki M, Trabalzini F, Bisdorff A. 2015. Diagnostic criteria for Meniere's disease. *J Vestib Res* 25:1-7.
50. Huppert D, Strupp M, Brandt T. 2010. Long-term course of Meniere's disease revisited. *Acta Otolaryngol* 130:644-51.
51. Merchant SN, Adams JC, Nadol JB, Jr. 2005. Pathophysiology of Meniere's syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops? *Otol Neurotol* 26:74-81.
52. Rauch SD, Merchant SN, Thedinger BA. 1989. Meniere's syndrome and endolymphatic hydrops. Double-blind temporal bone study. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 98:873-83.
53. Yeh TH, Herman P, Tsai MC, Tran Ba Huy P, Van den Abbeele T. 1998. A cationic nonselective stretch-activated channel in the Reissner's membrane of the guinea pig cochlea. *Am J Physiol* 274:C566-76.
54. Tsuji K, Velazquez-Villasenor L, Rauch SD, Glynn RJ, Wall C, 3rd, Merchant SN. 2000. Temporal bone studies of the human peripheral vestibular system. Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 181:26-31.
55. Kariya S, Cureoglu S, Fukushima H, Kusunoki T, Schachern PA, Nishizaki K, Paparella MM. 2007. Histopathologic changes of contralateral human temporal bone in unilateral Meniere's disease. *Otol Neurotol* 28:1063-8.
56. Nadol JB, Jr., Thornton AR. 1987. Ultrastructural findings in a case of Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 96:449-54.
57. Altermatt HJ, Gebbers JO, Muller C, Arnold W, Laissue JA. 1990. Human endolymphatic sac: evidence for a role in inner ear immune defence. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 52:143-8.
58. Wackym PA, Friberg U, Linthicum FH, Jr., Bagger-Sjoback D, Bui HT, Hofman F, Rask-Andersen H. 1987. Human endolymphatic sac: morphologic evidence of immunologic function. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 96:276-81.
59. Arnold W, Niedermeyer HP. 1997. Herpes simplex virus antibodies in the perilymph of patients with Meniere disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123:53-6.
60. Selmani Z, Marttila T, Pyykko I. 2005. Incidence of virus infection as a cause of Meniere's disease or endolymphatic hydrops assessed by electrocochleography. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 262:331-4.
61. Himmelein S, Lindemann A, Sinicina I, Horn AKE, Brandt T, Strupp M, Hufner K. 2017. Differential Involvement during Latent Herpes Simplex Virus 1 Infection of the Superior and Inferior Divisions of the Vestibular Ganglia: Implications for Vestibular Neuritis. *J Virol* 91.
62. Sawtell NM. 1998. The probability of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 increases with the number of latently infected neurons in the ganglia. *J Virol* 72:6888-92.
63. Gacek RR. 2009. Meniere's disease is a viral neuropathy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 71:78-86.
64. McCabe BF. 2007. Autoimmune sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 116:875-9.
65. Dornhoffer JL, Arenberg IK. 1997. Immune mechanisms in Meniere's syndrome. *Otolaryngol Clin North Am* 30:1017-26.
66. Gloddek B, Arnold W. 2002. Clinical and experimental studies of autoimmune inner ear disease. *Acta Otolaryngol Suppl*:10-4.
67. Rauch SD, San Martin JE, Moscicki RA, Bloch KJ. 1995. Serum antibodies against heat shock protein 70 in Meniere's disease. *Am J Otol* 16:648-52.
68. Yoo TJ. 1984. Etiopathogenesis of Meniere's disease: a hypothesis. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 113:6-12.

## Referenzen

69. Rauch SD, Zurakowski D, Bloch DB, Bloch KJ. 2000. Anti-heat shock protein 70 antibodies in Meniere's disease. *Laryngoscope* 110:1516-21.
70. Postema RJ, Kingma CM, Wit HP, Albers FW, Van Der Laan BF. 2008. Intratympanic gentamicin therapy for control of vertigo in unilateral Meniere's disease: a prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Acta Otolaryngol* 128:876-80.
71. Flanagan S, Mukherjee P, Tonkin J. 2006. Outcomes in the use of intra-tympanic gentamicin in the treatment of Meniere's disease. *J Laryngol Otol* 120:98-102.
72. Strupp M, Hupert D, Frenzel C, Wagner J, Hahn A, Jahn K, Zingler VC, Mansmann U, Brandt T. 2008. Long-term prophylactic treatment of attacks of vertigo in Meniere's disease-- comparison of a high with a low dosage of betahistine in an open trial. *Acta Otolaryngol* 128:520-4.
73. Ihler F, Bertlich M, Sharaf K, Strieth S, Strupp M, Canis M. 2012. Betahistine exerts a dose-dependent effect on cochlear stria vascularis blood flow in guinea pigs in vivo. *PLoS One* 7:e39086.
74. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-54.
75. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86-9.
76. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-8.
77. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12:735-9.
78. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP. 2003. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 17:991-1008.
79. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engel P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433:769-73.
80. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466:835-40.
81. Bartel DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-97.
82. Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, Lange T, Samatov TR, Turchinovich AA, Tonevitsky AG. 2016. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem* doi:10.1016/j.proghi.2016.06.001.
83. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. 2004. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research* 14:1902-1910.
84. Godnic I, Zorc M, Jevsinek Skok D, Calin GA, Horvat S, Dovc P, Kovac M, Kunej T. 2013. Genome-Wide and Species-Wide In Silico Screening for Intragenic MicroRNAs in Human, Mouse and Chicken. *PLOS ONE* 8:e65165.
85. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-9.
86. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106:23-34.
87. Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y. Hsc70/Hsp90 Chaperone Machinery Mediates ATP-Dependent RISC Loading of Small RNA Duplexes. *Molecular Cell* 39:292-299.
88. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15:185-97.



## Referenzen

89. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. 2004. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304:594-6.
90. Olsen PH, Ambros V. 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 216:671-80.
91. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20.
92. Bartel DP. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215-33.
93. Alvarez-Garcia I, Miska EA. 2005. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 132:4653-62.
94. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. 2003. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113:25-36.
95. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435:828-33.
96. Chim SSC, Shing TKF, Hung ECW, Leung T-y, Lau T-k, Chiu RWK, Dennis Lo YM. 2008. Detection and Characterization of Placental MicroRNAs in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry* 54:482.
97. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. 2008. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 141:672-5.
98. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How Huang K, Jen Lee M, Galas DJ, Wang K. 2010. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry* 56:1733.
99. Kim YK. 2015. Extracellular microRNAs as Biomarkers in Human Disease. *Chonnam Med J* 51:51-7.
100. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* 9:654.
101. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:5003-5008.
102. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, Bernad A, Sanchez-Madrid F. 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2:282.
103. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, Martínez-Herrera DJ, Pascual-Montano A, Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. 2013. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications* 4:2980.
104. Alexander M, Hu R, Runtsch MC, Kagele DA, Mosbrugger TL, Tolmachova T, Seabra MC, Round JL, Ward DM, O'Connell RM. 2015. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin. *Nature Communications* 6:7321.
105. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10:1470-6.
106. Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, Muramatsu K, Fukuda Y, Ogura S, Yamaguchi K, Mochizuki T. 2010. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 5:e13247.

## Referenzen

107. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 39:7223-33.
108. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, Johnson JM, Sina JF, Fare TL, Sistare FD, Glaab WE. 2009. Plasma MicroRNAs as Sensitive and Specific Biomarkers of Tissue Injury. *Clinical Chemistry* 55:1977.
109. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foà R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Müller R-U, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter H-I, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, et al. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell* 129:1401-1414.
110. Turchinovich A, Tenevitsky AG, Burwinkel B. 2016. Extracellular miRNA: A Collision of Two Paradigms. *Trends Biochem Sci* 41:883-92.
111. Williams Z, Ben-Dov IZ, Elias R, Mihailovic A, Brown M, Rosenwaks Z, Tuschl T. 2013. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4255-60.
112. Chevillet JR, Kang Q, Ruf IK, Briggs HA, Vojtech LN, Hughes SM, Cheng HH, Arroyo JD, Meredith EK, Gallichotte EN, Pogosova-Agadjanyan EL, Morrissey C, Stirewalt DL, Hladik F, Yu EY, Higano CS, Tewari M. 2014. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:14888-14893.
113. Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH. 2005. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309:310-1.
114. Weston MD, Pierce ML, Rocha-Sanchez S, Beisel KW, Soukup GA. 2006. MicroRNA gene expression in the mouse inner ear. *Brain Res* 1111:95-104.
115. Soukup GA, Fritsch B, Pierce ML, Weston MD, Jahan I, McManus MT, Harfe BD. 2009. Residual microRNA expression dictates the extent of inner ear development in conditional Dicer knockout mice. *Dev Biol* 328:328-41.
116. Friedman LM, Dror AA, Mor E, Tenne T, Toren G, Satoh T, Biesemeier DJ, Shomron N, Fekete DM, Hornstein E, Avraham KB. 2009. MicroRNAs are essential for development and function of inner ear hair cells in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7915-20.
117. Mencia A, Modamio-Hoybjor S, Redshaw N, Morin M, Mayo-Merino F, Olavarrieta L, Aguirre LA, del Castillo I, Steel KP, Dalmay T, Moreno F, Moreno-Pelayo MA. 2009. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nat Genet* 41:609-13.
118. Zhang Q, Liu H, McGee J, Walsh EJ, Soukup GA, He DZ. 2013. Identifying microRNAs involved in degeneration of the organ of Corti during age-related hearing loss. *PLoS One* 8:e62786.
119. Kruse A. 2015. Das Immunsystem: eine Übersicht, p 1-14. *In* Rink L, Kruse A, Haase H (ed), *Immunologie für Einsteiger* doi:10.1007/978-3-662-44843-4\_1. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
120. Gulati P. 2009. Janeway's Immunobiology, 7th Edition by Kenneth Murphy, Paul Travers, and Mark Walport. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 37:134-134.
121. Medzhitov R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-26.
122. Hansen TH, Bouvier M. 2009. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nat Rev Immunol* 9:503-13.
123. Iwasaki A, Medzhitov R. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 16:343-53.
124. Hardy RR, Hayakawa K. 2001. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19:595-621.
125. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. 2013. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 131:959-71.

## Referenzen

126. Jeker LT, Bour-Jordan H, Bluestone JA. 2012. Breakdown in peripheral tolerance in type 1 diabetes in mice and humans. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a007807.
127. Kruse A. 2015. Autoimmunität, p 141-152. *In* Rink L, Kruse A, Haase H (ed), *Immunologie für Einsteiger* doi:10.1007/978-3-662-44843-4\_9. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
128. Fu Y, Li L, Liu X, Ma C, Zhang J, Jiao Y, You L, Chen ZJ, Zhao Y. 2011. Estrogen promotes B cell activation in vitro through down-regulating CD80 molecule expression. *Gynecol Endocrinol* 27:593-6.
129. Wagner M, Wagner B, Dhikidze EK. 1979. Immunofluorescent and immunoelectron microscopic demonstration of primate heart muscle antigens cross-reactive with *Streptococcus pyogenes*. *Exp Pathol (Jena)* 17:420-8.
130. Seo Y, Ito T, Sasaki T, Nakagawara J, Nakamura H. 2007. Assessment of the anatomical relationship between the arcuate eminence and superior semicircular canal by computed tomography. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 47:335-9; discussion 339-40.
131. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. 1941. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 47:200-202.
132. Ramos-Vara JA, Miller MA. 2014. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along. *Veterinary Pathology* 51:42-87.
133. Lang G. 2013. *Histotechnik - Praxislehrbuch für Biomedizinische Analytik, vol 2*. SpringerWienNewYork.
134. Elias JM, Margiotta M, Gaborc D. 1989. Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP), avidin-biotin peroxidase complex (ABC), and peroxidase-labeled avidin-biotin (LAB) methods. *Am J Clin Pathol* 92:62-7.
135. Fraenkel-Conrat H, Olcott HS. 1948. Reaction of formaldehyde with proteins; cross-linking of amino groups with phenol, imidazole, or indole groups. *J Biol Chem* 174:827-43.
136. Shi SR, Key ME, Kalra KL. 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 39:741-748.
137. Brunk UT, Terman A. 2002. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 33:611-9.
138. Terman A, Brunk UT. 1998. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *Apmis* 106:265-76.
139. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671-5.
140. Biosystems A. 2016. *TaqMan® Advanced miRNA Assays - User Guide*.
141. Metzker ML. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11:31-46.
142. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10:57-63.
143. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, Hall KP, Evers DJ, Barnes CL, Bignell HR, Boutell JM, Bryant J, Carter RJ, Keira Cheetham R, Cox AJ, Ellis DJ, Flatbush MR, Gormley NA, Humphray SJ, Irving LJ, Karbelashvili MS, Kirk SM, Li H, Liu X, Maisinger KS, Murray LJ, Obradovic B, Ost T, Parkinson ML, Pratt MR, Rasolonjatovo IM, Reed MT, Rigatti R, Rodighiero C, Ross MT, Sabot A, Sankar SV, Scally A, Schroth GP, Smith ME, Smith VP, Spiridou A, Torrance PE, Tzonev SS, Vermaas EH, Walter K, Wu X, Zhang L, Alam MD, Anastasi C, et al. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456:53-9.
144. Ho CK, Shuman S. 2002. Bacteriophage T4 RNA ligase 2 (gp24.1) exemplifies a family of RNA ligases found in all phylogenetic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12709-14.
145. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:7276-7280.

## Referenzen

146. Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Cech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Eberhard C, Gruning B, Guerler A, Hillman-Jackson J, Von Kuster G, Rasche E, Soranzo N, Turaga N, Taylor J, Nekrutenko A, Goecks J. 2016. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res* 44:W3-W10.
147. Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, Zhang Y, Blankenberg D, Albert I, Taylor J, Miller W, Kent WJ, Nekrutenko A. 2005. Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res* 15:1451-5.
148. Blankenberg D, Von Kuster G, Bouvier E, Baker D, Afgan E, Stoler N, Taylor J, Nekrutenko A. 2014. Dissemination of scientific software with Galaxy ToolShed. *Genome Biology* 15:403.
149. Andrews S. 2010. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
150. Friedlander MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. 2012. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res* 40:37-52.
151. Mackowiak SD. 2002. Identification of Novel and Known miRNAs in Deep-Sequencing Data with miRDeep2, *Current Protocols in Bioinformatics* doi:10.1002/0471250953.bi1210s36. John Wiley & Sons, Inc.
152. Griffiths-Jones S. 2004. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32:D109-11.
153. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34:D140-4.
154. Kozomara A, Griffiths-Jones S. 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42:D68-73.
155. Team RDC. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria <http://www.R-project.org>.
156. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550.
157. Wald A. 1943. Tests of Statistical Hypotheses Concerning Several Parameters When the Number of Observations is Large. *Transactions of the American Mathematical Society* 54:426-482.
158. Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 57:289-300.
159. Hennig C, Thomas CDL, Clement JG, Cooper DML. 2015. Does 3D orientation account for variation in osteon morphology assessed by 2D histology? *Journal of Anatomy* 227:497-505.
160. Cheng KC, Matsuoka H, Lee KM, Kim N, Krug MS, Kwon SS, Mora M, Yoo TJ. 2000. Proto-oncogene Raf-1 as an autoantigen in Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109:1093-8.
161. Suzuki M, Krug MS, Cheng KC, Yazawa Y, Bernstein J, Yoo TJ. 1997. Antibodies against inner-ear proteins in the sera of patients with inner-ear diseases. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 59:10-7.
162. Yoo TJ, Shea J, Jr., Ge X, Kwon SS, Yazawa Y, Sener O, Mora F, Mora R, Mora M, Barbieri M, Du X. 2001. Presence of autoantibodies in the sera of Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110:425-9.
163. Ikezono T, Shindo S, Ishizaki M, Li L, Tomiyama S, Takumida M, Pawankar R, Watanabe A, Saito A, Yagi T. 2005. Expression of Cochlin in the Vestibular Organ of Rats. *ORL* 67:252-258.
164. Robertson NG, Hamaker SA, Patriub V, Aster JC, Morton CC. 2003. Subcellular localisation, secretion, and post-translational processing of normal cochlin, and of mutants causing the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9. *Journal of Medical Genetics* 40:479.
165. Calzada AP, Lopez IA, Beltran Parrazal L, Ishiyama A, Ishiyama G. 2012. Cochlin expression in vestibular endorgans obtained from patients with Meniere's disease. *Cell and Tissue Research* 350:373-384.

## Referenzen

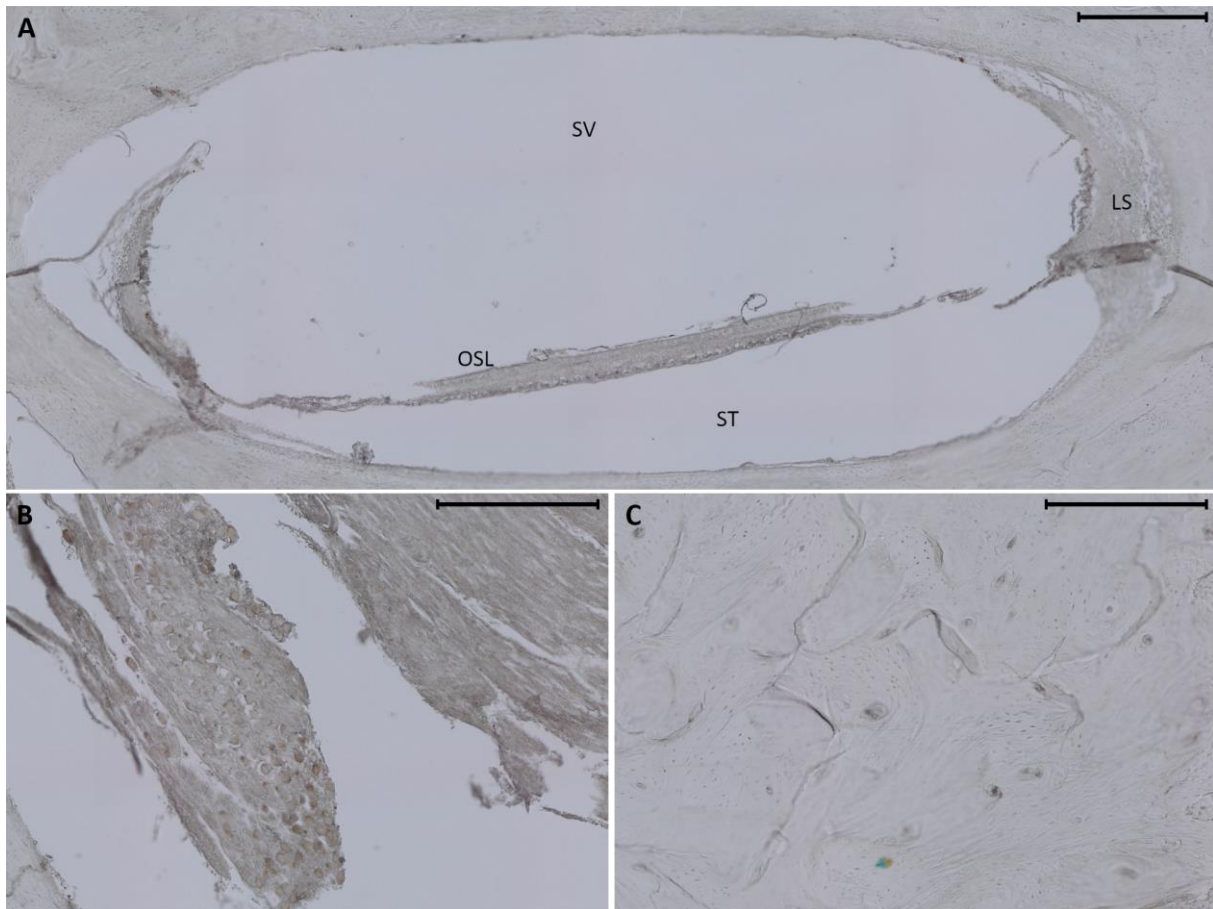
166. Baek M-J, Park H-M, Johnson JM, Altuntas CZ, Jane-wit D, Jaini R, Solares CA, Thomas DM, Ball EJ, Robertson NG, Morton CC, Hughes GB, Tuohy VK. 2006. Increased Frequencies of Cochlin-Specific T Cells in Patients with Autoimmune Sensorineural Hearing Loss. *The Journal of Immunology* 177:4203.
167. Nair TS, Kozma KE, Hoefling NL, Kommareddi PK, Ueda Y, Gong TW, Lomax MI, Lansford CD, Telian SA, Satar B, Arts HA, El-Kashlan HK, Berryhill WE, Raphael Y, Carey TE. 2004. Identification and characterization of choline transporter-like protein 2, an inner ear glycoprotein of 68 and 72 kDa that is the target of antibody-induced hearing loss. *J Neurosci* 24:1772-9.
168. Celio MR. 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375-475.
169. Usami S, Shinkawa H, Inoue Y, Kanzaki J, Anniko M. 1995. Calbindin-D28K localization in the primate inner ear. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 57:94-9.
170. Huang J, Sun X, Mao Y, Zhu X, Zhang P, Zhang L, Du J, Qiu X. 2008. Expression of immunoglobulin gene with classical V-(D)-J rearrangement in mouse brain neurons. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1604-15.
171. Zhang J, Niu N, Li B, McNutt MA. 2013. Neuron-derived IgG protects neurons from complement-dependent cytotoxicity. *J Histochem Cytochem* 61:869-79.
172. Fabian RH. 1988. Uptake of plasma IgG by CNS motoneurons: comparison of antineuronal and normal IgG. *Neurology* 38:1775-80.
173. Mukai K, Yoshimura S, Anzai M. 1986. Effects of decalcification on immunoperoxidase staining. *Am J Surg Pathol* 10:413-9.
174. Cunningham CD, 3rd, Schulte BA, Bianchi LM, Weber PC, Schmiedt BN. 2001. Microwave decalcification of human temporal bones. *Laryngoscope* 111:278-82.
175. Lopez IA, Ishiyama G, Hosokawa S, Hosokawa K, Acuna D, Linthicum FH, Ishiyama A. 2016. Immunohistochemical techniques for the human inner ear. *Histochem Cell Biol* 146:367-87.
176. Merchant SN, Nadol JB, Jr. 2010. *Schuknecht's Pathology of the Ear*, vol Third Edition. People's Medical Publishing House-USA, Shelton, CT.
177. Shi SR, Cote C, Kalra KL, Taylor CR, Tandon AK. 1992. A technique for retrieving antigens in formalin-fixed, routinely acid-decalcified, celloidin-embedded human temporal bone sections for immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 40:787-92.
178. Lysaght AC, Kao SY, Paulo JA, Merchant SN, Steen H, Stankovic KM. 2011. Proteome of human perilymph. *J Proteome Res* 10:3845-51.
179. Swan EE, Peppi M, Chen Z, Green KM, Evans JE, McKenna MJ, Mescher MJ, Kujawa SG, Sewell WF. 2009. Proteomics analysis of perilymph and cerebrospinal fluid in mouse. *Laryngoscope* 119:953-8.
180. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. 2008. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997-1006.
181. Nagy C, Maheu M, Lopez JP, Vaillancourt K, Cruceanu C, Gross JA, Arnovitz M, Mechawar N, Turecki G. 2015. Effects of postmortem interval on biomolecule integrity in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 74:459-69.
182. Gantier MP, McCoy CE, Rusinova I, Saulep D, Wang D, Xu D, Irving AT, Behlke MA, Hertzog PJ, Mackay F, Williams BR. 2011. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res* 39:5692-703.
183. Chen Z-Y, Corey DP. 2002. An Inner Ear Gene Expression Database. *JARO: Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 3:140-148.
184. Rivolta MN, Holley MC. 2002. Cell lines in inner ear research. *J Neurobiol* 53:306-18.
185. Rudnicki A, Isakov O, Ushakov K, Shivatzi S, Weiss I, Friedman LM, Shomron N, Avraham KB. 2014. Next-generation sequencing of small RNAs from inner ear sensory epithelium identifies microRNAs and defines regulatory pathways. *BMC Genomics* 15:484.

## Referenzen

186. Lu C, Shan Z, Hong J, Yang L. 2017. MicroRNA-92a promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in non-small cell lung cancer metastasis. *Int J Oncol* 51:235-244.
187. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-69.
188. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120:635-47.
189. Schulte LN, Eulalio A, Mollenkopf HJ, Reinhardt R, Vogel J. 2011. Analysis of the host microRNA response to Salmonella uncovers the control of major cytokines by the let-7 family. *Embo j* 30:1977-89.
190. Lv G, Wu M, Wang M, Jiang X, Du J, Zhang K, Li D, Ma N, Peng Y, Wang L, Zhou L, Zhao W, Jiao Y, Gao X, Hu Z. 2017. miR-320a regulates high mobility group box 1 expression and inhibits invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 37:1354-1364.
191. Campana L, Bosurgi L, Rovere-Querini P. 2008. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Curr Opin Immunol* 20:518-23.
192. Bucay N, Bhagirath D, Sekhon K, Yang T, Fukuhara S, Majid S, Shahryari V, Tabatabai Z, Greene KL, Hashimoto Y, Shiina M, Yamamura S, Tanaka Y, Deng G, Dahiya R, Saini S. 2017. A novel microRNA regulator of prostate cancer epithelial-mesenchymal transition. *Cell Death Differ* 24:1263-1274.
193. Buckingham RA, Valvassori GE. 2001. Inner ear fluid volumes and the resolving power of magnetic resonance imaging: can it differentiate endolymphatic structures? *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110:113-7.
194. Kellerhals B. 1979. Perilymph production and cochlear blood flow. *Acta Otolaryngol* 87:370-4.
195. Sterkers O, Ferrary E, Amiel C. 1988. Production of inner ear fluids. *Physiol Rev* 68:1083-1128.
196. Ohtsuki S. 2004. New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. *Biol Pharm Bull* 27:1489-96.
197. Ishiyama E, Keels EW, Weibel J. 1970. New anatomical aspects of the vasculo-epithelial zone of the spiral limbus in mammals. An electron microscopic study. *Acta Otolaryngol* 70:319-28.
198. Konishi T, Hamrick PE. 1978. Ion transport in the cochlea of guinea pig. II. Chloride transport. *Acta Otolaryngol* 86:176-84.
199. Kujpers W. 1974. Na-K-ATPase activity in the cochlea of the rat during development. *Acta Otolaryngol* 78:341-4.
200. Li T, Pan H, Li R. 2016. The dual regulatory role of miR-204 in cancer. *Tumour Biol* 37:11667-11677.
201. Imam JS, Plyler JR, Bansal H, Prajapati S, Bansal S, Rebeles J, Chen HI, Chang YF, Panneerdoss S, Zoghi B, Buddavarapu KC, Broaddus R, Hornsby P, Tomlinson G, Dome J, Vadlamudi RK, Pertsemlidis A, Chen Y, Rao MK. 2012. Genomic loss of tumor suppressor miRNA-204 promotes cancer cell migration and invasion by activating AKT/mTOR/Rac1 signaling and actin reorganization. *PLoS One* 7:e52397.
202. Sun Y-M, Lin K-Y, Chen Y-Q. 2013. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *Journal of Hematology & Oncology* 6:6.
203. Zhao X, Tang Y, Qu B, Cui H, Wang S, Wang L, Luo X, Huang X, Li J, Chen S, Shen N. 2010. MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 62:3425-35.
204. Lukiw WJ, Alexandrov PN. 2012. Regulation of complement factor H (CFH) by multiple miRNAs in Alzheimer's disease (AD) brain. *Mol Neurobiol* 46:11-9.
205. Gururajan M, Haga CL, Das S, Leu CM, Hodson D, Josson S, Turner M, Cooper MD. 2010. MicroRNA 125b inhibition of B cell differentiation in germinal centers. *Int Immunol* 22:583-92.

## Referenzen

206. Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, Huang W, Squires K, Verlinghieri G, Zhang H. 2007. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med* 13:1241-7.
207. Oneyama C, Ikeda J, Okuzaki D, Suzuki K, Kanou T, Shintani Y, Morii E, Okumura M, Aozasa K, Okada M. 2011. MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. *Oncogene* 30:3489-501.
208. Turcatel G, Rubin N, El-Hashash A, Warburton D. 2012. MIR-99a and MIR-99b Modulate TGF- $\beta$  Induced Epithelial to Mesenchymal Plasticity in Normal Murine Mammary Gland Cells. *PLOS ONE* 7:e31032.
209. Khalaj M, Woolthuis CM, Hu W, Durham BH, Chu SH, Qamar S, Armstrong SA, Park CY. 2017. miR-99 regulates normal and malignant hematopoietic stem cell self-renewal. *The Journal of Experimental Medicine* 214:2453.
210. Harris JP. 1984. Immunology of the inner ear: evidence of local antibody production. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 93:157-62.
211. Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. 2003. Proinflammatory cytokine expression in the endolymphatic sac during inner ear inflammation. *J Assoc Res Otolaryngol* 4:139-47.
212. Fujioka M, Okano H, Ogawa K. 2014. Inflammatory and immune responses in the cochlea: potential therapeutic targets for sensorineural hearing loss. *Front Pharmacol* 5:287.
213. Pescador N, Perez-Barba M, Ibarra JM, Corbaton A, Martinez-Larrad MT, Serrano-Rios M. 2013. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS One* 8:e77251.
214. Filkova M, Aradi B, Senolt L, Ospelt C, Vettori S, Mann H, Filer A, Raza K, Buckley CD, Snow M, Vencovsky J, Pavelka K, Michel BA, Gay RE, Gay S, Jungel A. 2014. Association of circulating miR-223 and miR-16 with disease activity in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 73:1898-904.
215. Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, Kerin MJ, Miller N. 2008. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Molecular Biology* 9:76.
216. McDermott AM, Kerin MJ, Miller N. 2013. Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer studies. *PLoS One* 8:e83718.
217. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, Piper M. 2014. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med* 18:371-90.

Anhang

**Abbildung Anhang 1: Horizontale FFPE-Sektion (12 µm) eines humanen Felsenbeines, gefärbt mit Streptavidin-HRP, ohne primären und sekundären Antikörper. Ansicht von medial Richtung lateral. A:** Detailansicht auf das Osseum laminae spiralis (OSL) und das Spiral-Ligament (LS). Keine Färbung erkennbar. Maßstab 500 µm. **B:** Keine Färbung des Nervus vestibulocochlearis. Maßstab 500 µm. **C:** Knöcherne Bereiche der Cochlea mit Osteonen. Maßstab 500 µm. Keine Färbung nachweisbar. Durch diese Behandlung der Schnitte konnte eine Hintergrundfärbung durch endogenes Biotin ausgeschlossen werden.

**Tabelle 9: Primersequenzen für die TruSeq® Small RNA Library-Vorbereitung** (aus dem Illumina Customer Sequence Letter)

Name	Sequenzen
RNA 3' Adapter	5' TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG
RNA 5' Adapter	5' GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC
Universal-RT-Primer	5' GCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
PCR-Primer (Pilot+Scale-Up)	5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGA
Index-Primer 1	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTGATGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 2	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 3	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCCTAAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 4	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGTCAAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 5	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCACTGTGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 6	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATTGGCGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 7	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGATCTGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 8	5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCAAAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA



## Anhang

Index-Primer 9	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGATCGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 10	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAGCTAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 11	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTAGCCGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 12	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACAAGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 13	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTGACTGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 14	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAAGTGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 15	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGACATGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 16	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGACGGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 17	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTTACTGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 18	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGGACGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 19	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTTACGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 20	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGCCACGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 21	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAAACGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 22	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTACGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 23	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCACTCGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 24	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCTACCGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 25	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCAGTGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 26	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCTCATGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 27	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGGAATGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 28	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGGAATGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 29	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGTTGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 30	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCGGTGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 31	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCGTGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 32	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGAGTGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 33	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGCCTGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 34	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCCATGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 35	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAAAATGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 36	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTTGGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 37	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCCGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 38	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTAGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 39	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTATAGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 40	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGAGGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 41	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTCGTCTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 42	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGATTAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 43	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCTGTAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 44	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATTATAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 45	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAATGAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 46	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCGGGAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 47	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTTCGAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA
Index-Primer 48	5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCCGAGTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA

## Anhang

**Tabelle 10: Liste der rechtmedizinischen Autopsie-Proben**

Probennummer	Alter	Geschlecht	Todesursache
EP1	24	Weiblich	Polytrauma
EP2	46	Männlich	Intoxikation
EP3	89	Weiblich	Lungenentzündung
EP4	67	Männlich	Ertrinken
EP5	59	Männlich	Erhängen
EP6	61	Männlich	Kardiogener Schock
EP7	63	Weiblich	Polytrauma
EP8	70	Weiblich	Bauchfellentzündung
EP9	71	Männlich	Herzinsuffizienz
EP10	28	Männlich	Drogenintoxikation
EP11	60	Männlich	Herzinsuffizienz
EP12	40	Weiblich	Betäubungsmittel

**Tabelle 11: Liste aller Serum-Proben der High-Throughput Sequenzierung** (fehlende Werte wurden aufgrund misslungener Ligation während der TruSeq® Library Erstellung nicht weiterbearbeitet)

Patient	Alter	Geschlecht	Patient	Alter	Geschlecht	Patient	Alter	Geschlecht
BPPV1	61	Weiblich	BVP3	73	Männlich	MM1	34	Männlich
BPPV2	79	Männlich	BVP4	52	Männlich	MM2	52	Männlich
BPPV3	68	Weiblich	BVP5	84	Männlich	MM3	48	Männlich
BPPV4	71	Männlich	BVP6	76	Männlich	MM5	63	Männlich
BPPV5	59	Weiblich	BVP7	67	Weiblich	MM6	70	Männlich
BPPV6	52	Weiblich	BVP8	59	Männlich	MM7	82	Männlich
BPPV7	79	Männlich	BVP9	79	Weiblich	MM8	66	Männlich
BPPV8	58	Männlich	BVP10	77	Männlich	MM9	74	Weiblich
BPPV9	46	Männlich	BVP11	59	Männlich	MM10	74	Männlich
BPPV10	55	Männlich	BVP12	48	Weiblich	MM11	56	Weiblich
BPPV11	56	Weiblich	BVP13	88	Weiblich	MM12	36	Männlich
BPPV12	77	Männlich	BVP14	64	Männlich	MM13	48	Weiblich
BPPV13	58	Weiblich	BVP15	67	Männlich	MM14	77	Weiblich
BPPV14	64	Weiblich	BVP16	51	Männlich	MM16	66	Männlich
BPPV15	81	Weiblich	BVP17	95	Männlich	MM17	43	Männlich
BPPV17	69	Männlich	BVP18	74	Weiblich	MM18	32	Weiblich



## Publikation

Teile dieser Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

**Rohde, M.**, Sinicina, I., Horn, A., Eichner, N., Meister, G., Strupp, M., Himmelein, S. (2018).  
MicroRNA profile of human endo-/perilymph. *Journal of Neurology*, Letter to the editors, published  
online 17 April 2018

## Danksagung

Mein Dank geht zu allererst an das gesamte Deutsche Schwindel- und Gleichgewichtszentrum und dessen Direktor Prof. Dr. Dr. h. c. Thomas Brandt für die Aufnahme in das Zentrum und die Zurverfügungstellung der Labore und Kontakte, die für das Gelingen dieser Arbeit maßgeblich waren. Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Michael Strupp für die Betreuung der Doktorarbeit sowie die Bereitstellung des sehr interessanten Forschungsthemas und die sehr hilfreichen Gespräche zur Planung weiterführender Experimente. Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Hans Straka für die fakultätsinterne Betreuung und Verantwortung der Dissertation. Ein ganz besonderer Dank geht an meine Projekt-Betreuerin Frau Dr. Susanne Himmelein für die langjährige tolle Zusammenarbeit im Labor und im Büro. Danke für die immer sehr angenehme Stimmung am Arbeitsplatz und die vielen tollen Gespräche, sowohl menschlich als auch fachlich. Ein weiterer Dank geht an Rechtsmedizinerin PD Dr. Inga Sinicina für die Zusammenarbeit zum Sammeln der Gewebeproben sowie der Innenohrflüssigkeiten. Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Anja Horn-Bochtler und Christine Unger für die Unterstützung und die Hilfe bei der Vorbereitung und Bearbeitung der Gewebsschnitte für die Immunhistochemie bedanken. Zusätzlich bedanke ich mich bei Prof. Dr. Gunter Meister, Norbert Eichner, Gerhard Lehmann sowie deren Team der Universität Regensburg für die tolle Zeit, die Unterstützung und Hilfe bei der Bearbeitung der Next-Generation-Sequencing Experimente und der bioinformatischen Auswertung. Ein Dank geht auch an alle Ärzte, Doktoranden sowie das gesamte Team des Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum für die Unterstützung beim Sammeln der Patientenproben und die schöne Zeit. Besonders danken möchte ich auch meinen Eltern, welche mir das Studium erst ermöglicht haben und meiner Frau Franziska für ihre Liebe und Unterstützung während des gesamten Studiums und der folgenden Promotion.