

Johann Gross

## **SNP-Analyse und individuelles Risiko für erworbene Schwerhörigkeit (Alters-, Lärm- und Medikamenten bedingte Schwerhörigkeit)**

### **1. Einleitung**

Das menschliche Genom weist eine erhebliche Variabilität auf; diese Variabilität ist Grundlage für die molekulare und biochemische Einzigartigkeit von Individuen. Die Variabilität von Individuum zu Individuum existiert auf allen Ebenen der biologischen Organisation wie DNS, RNS, Proteine, Regulation von Proteinaktivitäten und Zell-Zell-Interaktionen. Gegenstand der „personalisierten Medizin“ von heute ist die Frage, inwieweit die molekulare und biochemische Individualität in Verbindung steht mit der Disposition für Erkrankungen und die Ansprechbarkeit auf Medikamente. Die Identifikation von individuellen Genvarianten kann sowohl für die Diagnose als auch die Therapie und die Prävention von Erkrankungen genutzt werden. Von aktueller Bedeutung ist die Frage, ob die Bestimmung genetischer Varianten aus der Gruppe der häufigen Einzel Nukleotid Polymorphismen (SNP, single nucleotide polymorphism) geeignet ist, das individuelle Risiko für komplexe Erkrankungen, z. B. eine erworbene Schwerhörigkeit (ESH), zu ermitteln. Da eine Schwerhörigkeit (SH) eine signifikante Einschränkung der Lebensqualität in der sozialen, familiären und beruflichen Umgebung darstellt<sup>[17]</sup>, gewinnt die Prävention an Bedeutung. Durch Beeinflussung der Umweltfaktoren und die Änderung des Lebensstils kann der Entstehung einer SH vorgebeugt werden. Wenn eine SH eingetreten ist, ist diese in der Regel irreversibel.

Ziel dieses Beitrages ist es, die Herangehensweise, die bisherigen Fortschritte und die Möglichkeiten der individualisierten Medizin für die Prävention von ESH vorzustellen. Drei Formen der ESH werden be-

handelt: Alters-bedingte (ASH; engl. age related hearing loss, ARHL), Lärm-induzierte (LISH; engl. noise-induced hearing loss, NIHL) und Medikamenten-induzierte SH.

## 2. Assoziationsstudien

Die Analyse des potentiellen Risikos von Gen-Varianten für die Entwicklung einer ESH in größeren Bevölkerungsgruppen erfolgt über „Assoziations-Studien“. Bei Assoziations-Studien wird nach einer Korrelation zwischen dem Polymorphismus im Genotypus und dem Polymorphismus im Phänotypus gesucht. Man unterscheidet zwei Arten von Assoziations-Studien: a) Studien, die Genvarianten im gesamten Genom untersuchen (GWAS; Genom-weite Assoziations-Studien); b.) Studien, die Genvarianten nur in bestimmten „Kandidatengenen“ untersuchen. Im Gegensatz zu Familienanalysen, die in der Regel eindeutige Erkenntnisse über monogenetisch bedingte Erkrankungen liefern, sind die Ergebnisse von Assoziations-Studien stärker abhängig von der untersuchten Population. Eine Beziehung zwischen einer SNP-Variante und einer ESH gilt daher erst dann als gesichert, wenn diese Beziehung in anderen Populationen bestätigt wurde. Bisher sind nur wenige GWAS durchgeführt worden, da der Aufwand sehr groß ist. Eine Alternative für Human-Studien zum Einfluss von Gen-Polymorphismen auf ESH sind GWAS-Studien an Mäusen<sup>[29]</sup>.

Die Auswahl von Kandidatengenen für Assoziations-Studien ist kompliziert, da bei der komplexen Struktur des Hörorgans und der Vielzahl von Faktoren, die die Entwicklung einer ESH fördern, viele Gene in Betracht kommen. Die Auswahl geeigneter Kandidaten-Gene für klinische Untersuchungen erfolgt bisher a) auf der Grundlage von Kenntnissen über erbliche SH oder b.) über die Funktion einzelner Proteine oder Enzyme für die Pathobiochemie der jeweiligen Form der ESH. Es sind etwa 140 vererbare Formen der SH bekannt, bei denen die Variation in einem einzigen Gen notwendig und ausreichend für die Entstehung einer SH ist. Diese Formen der SH werden nach den Mendelschen Gesetzen vererbt und werden als Mutationen bezeichnet. Diese sind im Internet (<http://hereditaryhearingloss.org>) auffindbar. Da die molekularen und biochemischen Mechanismen der Entstehung von ESH z. T. unbekannt sind, ist die Auswahl von

relevanten Kandidatengen aus der Gruppe der Mechanismus-Gene komplizierter.

## 2.1 Altersbedingte Schwerhörigkeit (ASH)

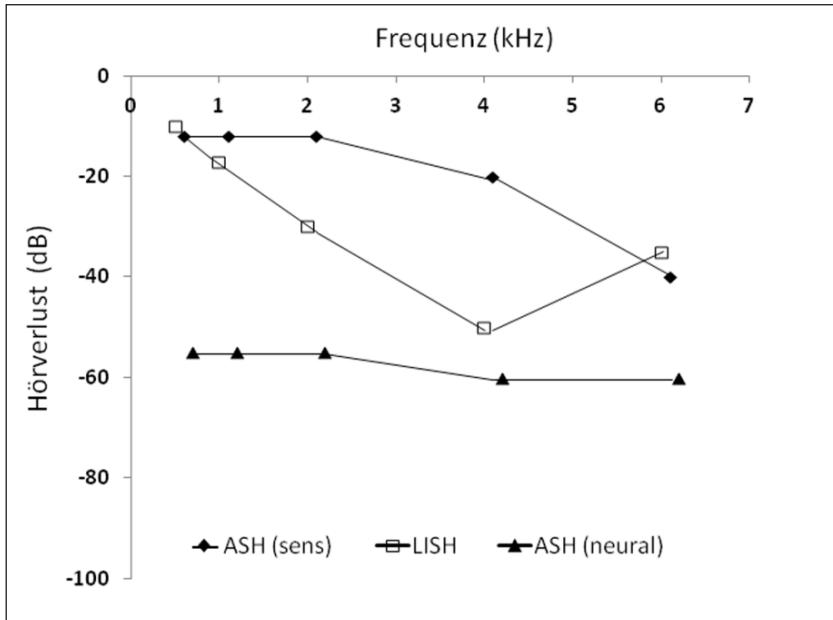
### *Vorkommen*

ASH oder Presbycusis zeigt eine Erblichkeit von etwa 25–75%, d.h. genetische Faktoren sind an der Entwicklung der Krankheit beteiligt<sup>[14, 24, 26, 40]</sup>. Zugleich ist die ASH von zahlreichen Umweltfaktoren abhängig wie Lärm, ototoxische Substanzen, Chemikalien, Rauchen und Alkohol-Abusus. Dazu kommen noch Einflüsse durch Erkrankungen wie Diabetes, Herz-, Kreislauf- und Nieren- Erkrankungen. Männer neigen stärker zu ASH als Frauen. Das scheint mit Umweltfaktoren, aber auch hormonellen Faktoren zusammen zu hängen; Östrogene scheinen schützend auf das Hörorgan zu wirken. Im Kontext mit der zunehmenden Lebenserwartung der Menschen, gewinnt die Vorbeugung von ASH eine große Bedeutung da SH besonders im Alter zu sozialer Isolierung, Depression und reduzierter physischer und kognitiver Aktivität führt<sup>[13]</sup>.

### *Kandidatengene*

ASH ist eine bilaterale SH, bei 10–30% der Personen über 60 Jahre erreicht sie Krankheitswert. Es werden vier verschiedene Formen unterschieden: sensorische (d. h. Haarzellen sterben und werden nicht ersetzt), metabolische (Beeinträchtigung der Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nahrungsstoffen über die Stria vascularis), neurale (Degeneration von Neuronen der Spiralganglien) und mechanische (Basalmembran und Stereozilien). **Abb. 1** zeigt die Schwellenverschiebung bei verschiedenen Formen der ASH. Die sensorische Form ist gekennzeichnet durch eine starke Schwellenverschiebung jenseits der Frequenz von drei kHz, d. h. Haarzellen, die für die Reizaufnahme von hohen Frequenzen verantwortlich sind, fehlen. Dieses Muster stimmt z.T. mit dem von LISH überein. Im vorliegenden Fall sind besonders Haarzellen betroffen, die auf Frequenzen von etwa 4 kHz reagieren. Bei der metabolischen und der neuralen Form der ASH sind sowohl hochfrequente als auch niederfrequente Regionen der Cochlea betroffen.

Die bloße Existenz der verschiedenen Formen der ASH weist darauf hin, dass mit einer Vielzahl von Kandidatengen zu rechnen ist<sup>[5, 31, 39]</sup>.



**Abb. 1:** Typische Verschiebung der Hörschwelle bei verschiedenen Frequenzen bei Patienten mit einer Altersschwerhörigkeit (ASH) und einer Lärm induzierten Schwerhörigkeit (LISH). Zahlen geschätzt aus Konings et al. (2009)<sup>[17]</sup>.

Studien weisen drauf hin, dass die Produktion reaktiver Sauerstoffspecies und eine eingeschränkte antioxidative Funktion das Altern der Cochlea und damit ihren Funktionsverlust fördern. Bei Labormäusen kann eine kalorische Begrenzung oder die Substitution mit Antioxidantien die ASH vermindern<sup>[8]</sup>. Da Glutamat ein wichtiger Neurotransmitter im Innenohr ist und dieser an der Schädigung von Haarzellen und Spiralneuronen beteiligt ist, sind Kandidaten-Gene dieses Systems von Interesse<sup>[7, 38]</sup>. Mausmodelle deuten auf mehr als 20 Gene hin, die zu ASH führen können, darunter Cadherin 23 (Cdh23), einem Bestandteil der Stereozilien, Glutathion Peroxydase (Gpx1), Superoxyd Dismutase (Sod1) und Plasma Membran Calcium ATPase 2 (PMCA)<sup>[5]</sup>. Es ist sehr schwierig, reine genetische Einflüsse von Umwelt-Effekten zu trennen. Eine kürzlich veröffentlichte Zwillingsstudie weist drauf hin, dass für

die Entwicklung einer ASH Umweltfaktoren eine größere Bedeutung haben als genetische Faktoren<sup>[3]</sup>.

### Ausgewählte SNP-Varianten

Auf der Grundlage von GWAS Studien wurde eine Liste von 683 SNPs erarbeitet, die eine signifikante Beziehung zum physiologischen Prozess des Hörens haben, hiervon wurden bisher für klinische Assoziations-Studien 12 SNPs ausgewählt<sup>[9, 10]</sup>; hiervon zeigt **Tab. 1** drei SNP-Varianten, die eine Assoziation zu ASH aufweisen.

**Tab. 1:** SNP-Varianten mit signifikanten Beziehungen zur Entwicklung einer ASH.

Gen/SNP	Untersuchte Population	Risiko für Entwicklung einer ASH	Literatur
<i>GRM7</i> ; rs11928865 TTCAA A T TGCCC NM_000844.3:c.520-32437T>A	3434 Personen aus 6 europäischen Zentren	Erhöhtes Risiko	Friedmann et al. (2009) <sup>[7]</sup>
	Han-Chinesen; 982 Männer mit ASH und 324 Probanden ohne Hörverlust	Erhöhtes Risiko; OR = 1.599 (1.229 - 2.081)	Luo et al. (2013) <sup>[24]</sup>
<i>GRHL2</i> ; rs10955255 AGCAT A G AAGTG NM_024915.3:c.21-19064A>G	2418 Probanden aus 9 europ. Zentren	Erhöhtes Risiko für Männer; OR = 1.56 (1.10 - 2.21)	Van Laer et al. (2008) <sup>[40]</sup>
<i>SOD2</i> ; rs5746092 CTCCC C G GCGCT NM_000636.2:c.-112C>G	679 Patienten mit ASH und 488 gesunde Probanden (beide Varianten sind in der Promoterregion lokalisiert)	Erhöhtes Risiko; OR = 1.35 (1.05 - 1.73)	Nolan et al., (2013) <sup>[27]</sup>

OR – Odds Ratio. In Klammern 95% CI (Confidence-Interval). Vergleiche auch Legende von Tab. 2.

**GRM7:** Die SNP-Variante rs11928865 des GRM7 (metabotropic glutamate receptor type 7) Gens erwies sich in einer GWAS als eine Variante mit signifikanter Assoziation für die Entwicklung einer ASH<sup>[7]</sup>. Es handelt sich bei GRM7 um ein Protein-kodierendes Gen, das funktionell in Beziehung zur Aktivität von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen an Synapsen steht. Damit ist das Gen ein Beispiel für ein Kandidatengen aus der Gruppe der pathobiochemisch mit ASH assoziierten Gene. Histochemische Untersuchungen zeigten, dass das GRM7 Gen in Haarzellen und Spiralganglien exprimiert wird. Ursache für die Assoziation könnte eine erhöhte Glutamat-Freisetzung und Excitotoxizität sein.

Am Beispiel dieser Variante soll die Nomenklatur von SNP-Varianten und ihre Beschreibung in der SNP- und OMIM- Datenbank illustriert werden (**Tab.2**). *GRM7* SNP *rs11928865* befindet sich auf Chromosom 3, es handelt sich um eine Basenveränderung im Intron2, d. h. die Aminosäure –Sequenz von *GRM7* ist nicht verändert. Die globale MAF (Minor Allele Frequency) beträgt 0.26. In der SNP-Datenbank wird unter *Validated* ein Hinweis auf die Qualitätskontrolle gegeben. Unter *HGVS* (*Human Genome Variation Society*) werden Links zu Datenbanken angeboten (z. B. „NC...g.. T>A“, komplettes Gen mit dem Hinweis, dass A durch ein T ersetzt ist; „NM.. c...T>A“ enthält die Sequenz der mRNA mit dem Hinweis, dass A durch ein T ersetzt ist). Bei Genvarianten im Exon findet man noch Angaben zur Auswirkung auf das entsprechende Protein, z. B. „NP...p...Val16Ala“, d. h. Alanin ist durch Valin ersetzt, s. **Tab. 4**). Weiter werden Links zu den Datenbanken *PubMed*, *Varview* (Varianten auf dem Chromosom) und *OMIM* angeboten mit umfangreichen Informationen über das Gen, z. B. *Gene summaries*, *Genetic tests* (mit Hinweisen zur Diagnostik, einschließlich der Laboratorien, die die Diagnostik durchführen) und *Medical literature*.

**Tab. 2:** Charakterisierung von *GRM7* SNP *rs11928865* in der SNP und OMIM Datenbank

<p>(<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/</a>)  TGAACAGATATTTATCTGATTTCAA[A/T]TGCCTAAATACAGCTACTATGCAT  Chromosome:3:7114015  Gene:GRM7 (<a href="#">GeneView</a>)  Functional Consequence: intron variant  Validated:by 1000G,by 2hit 2allele,by cluster,by frequency,by hapmap  Global MAF: A=0.2564/1284  <sup>1</sup>HGVS:NC_000003.11:g.7155702T&gt;A, NC_000003.12:g.7114015T&gt;A, NG_029781.1:g.257901T&gt;A, NM_000844.3:c.520-32437T&gt;A, NM_181874.2:c.520-32437T&gt;A, XM_005265095.1:c.520-32437T&gt;A, XM_005265095.2:c.520-32437T&gt;A  PubMed, OMIM</p>
<p>(<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/</a>)  <sup>2</sup>OMIM 612976; AGE-RELATED HEARING IMPAIRMENT 2; ARH12;  Cytogenetic location:3p26.1-p25.1; Genomic coordinates (GRCh37):3:4,000,000-16,400,000  Gene summaries; Genetic tests, Medical literature</p>

*Kennzeichnung der Varianten entsprechend der Nomenklatur der Human Genome Variation Society (HGVS)[28]:*

<sup>1</sup> Genbank Nummer mit folgenden Informationen: c oder g - codierende oder genomische DNS; das Zeichen > bedeutet Veränderung, hier Nucleotid A anstelle von T.

<sup>2</sup> OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) ist eine Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>), die umfangreiche Informationen über humane Gene, deren Varianten und die Auswirkungen auf den Phänotyp enthält.

Die Assoziation zwischen GRM7-Varianten und ASH wurde in mehreren Studien untersucht<sup>[7, 24, 26]</sup> (**Tab. 1**). In einer Studie zeigte sich, dass Männer und Frauen eine unterschiedliche Empfindlichkeit auf ASH in Abhängigkeit vom GRM7 Genotyp aufweisen<sup>[26]</sup>. Es wird über eine Interaktion von Sexualhormonen und synaptischer Aktivität der Glutamat Signal-Übertragung spekuliert. In einer anderen repetitiven Studie wurde die Assoziation zwischen dieser Variante (SNP *rs11928865* Allel, **Tab. 1**) auf die ASH in einer chinesischen Population untersucht<sup>[24]</sup>. Bei einem globalen Vergleich wurde in dieser Studie kein Unterschied in der ASH- und einer normalhörenden Population gefunden. Eine genauere Untersuchung (statistische Elimination aller nicht-genetischen Faktoren) zeigte, dass *GRM7* SNP *rs11928865* (A>T) verbunden ist mit einem Hörverlust,  $p = 0.000472$ , OR = 1.599. Verschiedene Audiogramm-Subtypen korrelierten signifikant mit dem Vorkommen des TT-Genotyps von SNP *rs11928865*.

**GRHL2:** GRHL2 (Grainy head like 2; auch TFPCP2L3; transcription factor cellular promoter 2-like 3) ist ein Beispiel für ein Kandidatengen aus der Gruppe der Gene, die zu einem monogenetisch bedingten, nicht-syndromalen Hörverlust führen. Ursache für diese autosomal dominante SH sind zwei Mutationen des GRHL2 Gens<sup>[41]</sup> [DFNA28; OMIM: 608641]. GRHL2 ist ein Transkriptionsfaktor, der in verschiedenen Epithelzellen exprimiert wird und eine Rolle in der embryonalen Entwicklung spielt. Der Transkriptionsfaktor steuert die Morphogenese des Innenohres und spielt eine Rolle in der embryonalen Entwicklung<sup>[36]</sup>. Im Erwachsenenalter ist GRHL2 in Reparaturprozesse der epithelialen Barriere involviert<sup>[30]</sup>.

Van Laer et al. (2008)<sup>[40]</sup> untersuchten in einer Assoziations-Studie 2418 ASH Proben aus neun verschiedenen europäischen Zentren. Insgesamt wurden 70 Kandidaten-Gene und 768 SNPs untersucht, darunter GRHL2. Als signifikant erwies sich die GRHL2-SNP Variante *rs10955255*; Träger dieser SNP-Variante zeigten ein höheres Risiko für eine ASH als Probanden ohne diese SNP (OR von 1.02- 1.76). Chinesische Autoren<sup>[22]</sup> prüften den Einfluss dieser SNP-Variante in einer Han Population von 310 Probanden mit einer ASH und 308 Kontrollen und konnten keinen Einfluss dieses Polymorphismus nachweisen. Im Gegenteil, das A-Allel des GRHL2 *rs10955255* zeigte eher eine Tendenz zur Protektion.

**SOD2:** Dem in Mitochondrien produzierten Superoxyd-Radikal, das durch die mitochondriale Superoxid Dismutase SOD2 eliminiert wird, kommt offensichtlich eine besondere Bedeutung für die Schädigung äußerer Haarzellen zu<sup>[20]</sup>. Daher gingen Nolan et al. (2013)<sup>[27]</sup> davon aus, dass eine veränderte Regulation des Promoters von SOD2 durch Transkriptionsfaktoren (TF) einen Einfluss auf die ASH haben könnte. Zunächst untersuchten sie in einem Zellmodell (OC-2, Zellen des Innenohres) die Bindung von verschiedenen TF an die entsprechende Varianten des Promoters. Danach wurde in einer Kohorte einer Londoner Population (2177 Probanden) nach jenen Varianten gesucht, die einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von TF hatten. Die SNP-Varianten von *rs5746092* und *rs2758343* veränderten die Affinität des SOD2 Promoters zu den TF *AP-2a* und *SPI*. In der Londoner Kohorte zeigte sich eine signifikante Beziehung zwischen *rs5746092* und ASH. Der Effekt war besonders bei Männern ausgeprägt und war unabhängig von einer LISH.

Sehr ernüchternd waren die Ergebnisse einer kürzlich durchgeführten GWAS; sie erbrachte keine signifikanten Beziehungen zwischen SNPs und ASH<sup>[6]</sup>. Varianten, die in früheren Studien als signifikant identifiziert wurden, konnten nicht bestätigt werden. Die Autoren schlussfolgern, dass die ASH ausgesprochen polygen determiniert ist, ohne dass spezifische Gene involviert sind. Der Phänotyp ist das Resultat einer Vielzahl von SNPs, bei der einzelnen Person ist ein Effekt nicht nachweisbar.

## 2.2 Lärm induzierte Schwerhörigkeit (LISH)

### *Vorkommen*

Konings et al.<sup>[17]</sup> haben in einer Übersichtsarbeit die epidemiologische Bedeutung, die grundlegenden Mechanismen der Entstehung von LISH und potentielle Möglichkeiten einer Prävention zusammengefasst. LISH ist eine komplexe Erkrankung, die unter dem Einfluss von Umwelt- und genetischen Faktoren entsteht. Hinsichtlich der Häufigkeit nimmt sie den zweiten Platz nach der ASH ein. Neben Lärm sind wichtige zusätzliche Umweltfaktoren für die Entstehung von LISH verantwortlich, z. B. Chemikalien (organische Lösungsmittel, ototoxische Substanzen), Hitzeeinwirkung, Rauchen, aber auch medizinische Faktoren wie Bluthochdruck und der Lipidstatus.



LISH ist häufig eine berufsbedingte Erkrankung; sie ist Folge der Industrialisierung. Etwa 20% der Arbeiter Europas sind während ihrer Berufstätigkeit starkem Lärm ausgesetzt. Neben Industrielärm stellt der Freizeitlärm (laute Musik, vor allem von jungen Leuten, aber auch Straßenverkehr und Flugverkehr) eine Hauptursache für LISH dar. Auch die Gruppe der Berufsmusiker ist gefährdet. Wichtiges Kennzeichen der LISH ist der Hörverlust bei hohen Frequenzen<sup>[17]</sup> (**Abb. 1**).

Die Vermeidung von Lärm ist die beste und wichtigste Methode zur Vorbeugung von LISH. Hierzu existieren im Rahmen des Arbeitsschutzes zahlreiche Vorschriften zur Lärmvermeidung. Wenn Lärm aber nicht vermieden werden kann, sollten Betroffene unbedingt Maßnahmen zum persönlichen Lärmschutz ergreifen (z.B. Gehörschutzstöpsel, Kapselgehörschützer). Die Kenntnis des individuellen (d.h. genetischen) Risikos für die Entwicklung einer LISH könnte eine zusätzliche Motivation für die konsequente Lärmvermeidung bzw. für die Nutzung eines spezifischen Lärmschutzes sein.

### *Kandidatengene*

Bei Lärm werden Haarzellen kontinuierlich aktiviert, diese Daueraktivierung ist eine hohe metabolische und mechanische Belastung der Haarzellen und ist verbunden mit einer intermittierenden Hypoxie, der Aktivierung der Atmungskette in den Mitochondrien, einer Imbalanz zwischen HIF-1 und HIF-2 alpha Aktivierung und einer verstärkten ROS-Bildung<sup>[32]</sup>. Weitere Mechanismen, die zum Haarzell-Tod führen können, sind die Aktivierung von mechano-elektrischen Transduktionskanälen, der erhöhte Einstrom von  $\text{Ca}^{++}$  Ionen in die Haarzellen, die mechanische Schädigung der Stereocilien, die veränderte Bildung von Stressproteinen bis hin zur Aktivierung von Apoptose-Genen und damit Zelltod (vor allem der äußeren Haarzellen<sup>[11, 12]</sup>). Bisher konnten nur wenige Varianten identifiziert werden, die eine signifikante Assoziation von Lärmbelastung und Entwicklung einer LISH zeigen<sup>[15, 16, 37]</sup>. Von 27 Genen, die den Mechanismen Oxydativer Stress, Aktivität von Ionenkanälen und Stressproteine zuzuordnen sind, zeigten 9 SNPs (Varianten der Gene Superoxid Dismutase 2/SOD2, Katalase/CAT, Glutathion-S-Transferase/GSTM1, Paraoxonase-2/PON2, Potassium channel, voltage-gated /KCNQ1, KCNQ4, KCNE1, Heat shock 70 kD protein/HSP70, Protocadherin/PCDH15 und Myosin, heavy chain 14/MYH14) eine signifikante Assoziation zu LISH.

### *Ausgewählte SNP Varianten*

**SOD2:** Da bei Lärm vor allem äußere Haarzellen absterben und hierfür Superoxyd Radikale von besonderer Bedeutung sind, ist die mitochondriale Superoxid Dismutase (SOD2) ein wichtiges Kandidatengen (**Tab. 3**)<sup>[20]</sup>. Liu et al. (2010)<sup>[23]</sup> wählten aus 2400 Fabrikarbeitern, die Lärm ausgesetzt waren, die 10 % der resistentesten Probanden (normales Hörvermögen) und 10 % der Probanden mit der stärksten Schwerhörigkeit aus. Der Lärm wurde entsprechend des internationalen Standard ISO1999 in drei Kategorien eingeteilt: <85 dB (A), 86–91 dB (A), >92 dB (A) (8 h, 5 Tage pro Woche). Kriterium für das Hörvermögen war der Verlust der Hörschwelle im linken Ohr bei einer Frequenz von 3 kHz. Von fünf genauer untersuchten SNPs zeigte nur SOD2-SNP *rs4880* eine signifikante Assoziation zu LISH mit einer ODDS-Ratio von 2.2; die Wahrscheinlichkeit, unter diesen Bedingungen eine SH zu entwickeln beträgt etwa 70%. In **Tab. 3** sind vier weitere SNP-Varianten genannt, die mit einem erhöhten Risiko von LISH assoziiert sind. LISH bei Katalase-Varianten (CAT) könnten mit einer Störung im Redox-System zusammenhängen, ähnlich wie SOD2. Das CDH (Cadherin) Gen kodiert ein Zell-Zell-Adhäsions-Glykoprotein in den Haarzellen und ist wichtig für die Bildung von Stereocilien und tip-Links. Mutationen führen bei der Maus zur SH<sup>[18]</sup>. Das erhöhte Risiko für LISH vor allem bei Impulslärm lässt sich aus der Funktion des Proteins für das Hören gut erklären. Hitze Schock Proteine (HSP) werden ubiquitär exprimiert<sup>[15]</sup>. Sie haben eine Chaperon-Funktion, d. h. sie wirken mit bei der Synthese, der Faltung, der Anordnung und dem intrazellulären Transport von Proteinen. Bei Stress, Ischämie und ototoxischen Substanzen wird eine erhöhte Expression gefunden.

Neben den in **Tab. 3** genannten SNPs können weitere Gene und Varianten mit der Entwicklung einer LISH verbunden sein. Rabinowitz et al. (2002)<sup>[34]</sup> berichten, dass der Polymorphismus von Glutathion-S-transferase (GSTM1 und GSST1) ein Risiko für die Entwicklung einer LISH darstellt; Wang et al. (2014)<sup>[42]</sup> berichten, dass bestimmte Allele und Genotypen von insgesamt 8 SNPs, die den Genen CDH23, GSTP1 (Glutathione S-transferase P), GJB2 (Gap junction beta-2 protein), PMCA2 und CAT zuzuordnen sind, ein signifikant höheres Risiko aufweisen, nach Lärm-Exposition eine LISH zu entwickeln.

**Tab. 3:** SNP Varianten mit signifikanten Beziehungen zwischen Lärmexposition und Entwicklung einer LISH

Gen/SNP	Lärmexposition (LE) /untersuchte Population	Risiko für Entwicklung einer LISH	Literatur
<i>SOD2</i> ; rs4880 TCCGG[C/T]TTTGG NM_001024466.1:c.47T>C	Arbeitslärm (ISO1999); 2400 bzw. 611 chinesische Probanden; Vergleich von L-resistenten und L-sensitiven Probanden	Höheres Risiko; <b>OR</b> 2.18 (1.34–3.54), $P = 0.002$ für Probanden mit dem Genotyp CT	Liu et al.(2010) <sup>[23]</sup>
<i>CAT</i> ; rs494024 AAACC[A/G]TAAAG NM_001752.3:c.66+4122T>C <i>CAT</i> ; rs475043 AAGTT[A/G]GGGCA NM_001752.3:c.*821C>T	1261 schwedische und 4500 polnische Arbeiter mit LE; Vergleich von L-resistenten und L-sensitiven Probanden	Höheres Risiko (aber nur, wenn Grad der LE berücksichtigt wird)	Konings et al. (2007) <sup>[16]</sup>
<i>CDH23</i> ; rs3752752 TTGTC[A/G]TTGATG NM_001171930.1:c.2316T>C	3860 Arbeiter mit LE; Vergleich von L-resistenten und L-sensitiven Probanden	Höheres Risiko (höheres Risiko besonders bei Impulslärm)	Kowalski et al. (2014) <sup>[18]</sup>
<i>HSPAIL</i> ; rs2227956 AGCCA[C/T]GGACA NM_005527.3:c.1478C>T	206 schwedische und 238 polnische Arbeiter mit LE	Höheres Risiko in beiden Gruppen; 2 weitere SNPs zeigten höheres Risiko nur in der schwedischen Gruppe	Konings et al. (2009) <sup>[15]</sup>

OR – Odds ratio. In Klammern 95% CI (Confidence-Interval). L-Lärm.

### 2.3. Medikamenten induzierte Schwerhörigkeit

#### Vorkommen

Zwei Klassen von Arzneimitteln spielen eine besondere Rolle bei der Entstehung von toxisch induzierter SH durch Arzneimittel: Aminoglykosid-Antibiotika (AG) und anti-neoplastisch wirkende Mittel aus der Gruppe der Platin-Präparate<sup>[1, 44]</sup>. AG wurden in den 1940-er Jahren für die Behandlung von Tuberkulose eingeführt. Sie werden heute noch für die Behandlung Gram-negativer bakterieller Infektionen, vor allem in Entwicklungsländern eingesetzt. In Industrieländern werden sie vielfach durch Breitband Antibiotika ersetzt. Sie sind aber immer noch unentbehrlich bei der zystischen Fibrose, bei Multi-Drug resistant bakteriellen Infektionen, besonders bei Harnwegs-Infektionen und Tuberkulose.

Platinpräparate, vor allem Cisplatin, ist ein häufig benutztes Antitumor-Medikament; es dient u.a. der Behandlung von Tumoren im Kindesalter, z.B. Neuroblastome oder Osteosarcome. Das Risiko für die Cisplatin induzierte SH (CISH) liegt bei 23–54%<sup>[35]</sup>. Für behandeln-

de Ärzte stellt sich die wichtige Frage, welche Möglichkeiten es gibt, Risikopatienten im Vorfeld zu identifizieren um die iatrogen verursachte SH zu vermeiden.

### *Kandidatengene*

Die Ototoxizität von AG ist eine Nebenwirkung, die wahrscheinlich auf einer erhöhten Aufnahme der Medikamente in die Haarzellen und einer Interaktion mit der mitochondrialen Proteinsynthese basiert. Der molekulare Mechanismus der Aufnahme des Medikaments in die Haarzellen ist unklar, möglicherweise spielen das Glycoprotein Megalin oder mechano-elektrische Ionen-Kanäle hierbei eine Rolle<sup>[43]</sup>. AG wirken bei Patienten mit einer Disposition zu SH vor allem auf Mitochondrien schädigend<sup>[2]</sup>. Es kommt zur Verminderung der ATP-Synthese, der verstärkten Bildung von Sauerstoff-Radikalen, der verminderten mitochondrialen Protein-Synthese und zur Induktion von Apoptose von HZ<sup>[44]</sup>. In diese Prozesse ist mitochondriale ribosomale RNS involviert.

Der genaue Mechanismus der CISH ist ebenfalls nicht bekannt, auch hier scheint die Ototoxizität von einer erhöhten Aufnahme des Medikaments in die Haarzellen abzuhängen. Die Antitumorwirkung besteht darin, dass Cisplatin sich an DNA und Proteine bindet und Apoptose induziert. Die Konzentration der Platin-DNA Anlagerungen korreliert mit der Antitumor-Aktivität von Cisplatin.

### *Ausgewählte SNP-Varianten*

**Mitochondriale ribosomale RNS:** In einer Familie mit Aminoglycosid induzierter SH konnte gezeigt werden, dass das mitochondriale rRNA-Gen eine Mutation aufwies (Nucleotid 1555 *A>G* im 12S rRNA, MT-RNR1)<sup>[33]</sup>. Diese mitochondriale DNA Mutation manifestiert sich bei Applikation von AG als SH. Inzwischen wurde eine weitere Mutation des 12S rRNA Gens mit ähnlichen Wirkungen (*m.1494C>T*) nachgewiesen<sup>[44]</sup>.

**Megalin** (low density lipoprotein receptor-related protein 2, LRP2, auch Glycoprotein 330): Für die erhöhte Aufnahme von Platin-Medikamenten soll ein Multiligand – endocytotischer Rezeptor (= Megalin) verantwortlich sein. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass Varianten dieses Rezeptors für die individuelle Disposition für eine SH verantwortlich sein könnten. Für Megalin sind zahlreiche SNPs bekannt.

Riedemann et al. (2008)<sup>[35]</sup> untersuchten den Effekt von *rs2075252* weil diese Variante nicht-synonym ist (d.h. sie führt zu einem AS-Austausch) und weil die Frequenz dieser SNP der Häufigkeit von CISH entspricht. SNP *rs2075252* ist charakterisiert durch einen G-A Austausch, dies entspricht dem Austausch der Aminosäure Glutamat gegen Lysin. Eine Blast-Analyse ergibt, dass der Aminosäure-Austausch die Protein-Struktur beeinflusst, speziell die A-Kette der extrazellulären Domäne von Megalin. Das A-Allel von *rs2075252* erhöht die Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin und führt zu einer Hörminderung (Odds-ratio = 3.45, CI 1.11–11.2,  $p < 0.02$ ).

### 3. Zum diagnostischen Wert von SNP-Analysen

Den potentiellen Nutzen der genetischen Analyse von SNPs für die Diagnostik bzw. die Vorhersage des Auftretens einer SH kann man abschätzen, wenn man die diagnostischen Kenngrößen des „positiven und negativen Testes“ berechnet<sup>[21]</sup>. Als Beispiel soll die Abschätzung des Risikos für die Entwicklung einer LISH bei Vorhandensein oder Abwesenheit der SOD2 Variante *rs4880* dienen (**Tab. 4**). Liu et al. (2010)<sup>[23]</sup> untersuchten die Häufigkeit von Lärm (L)-resistenten und L-sensitiven Arbeitern bei zwei Allelen und drei Genotypen von *rs4880* (= Test). Das c-Allel mit der Konsequenz eines Aminosäure-Austausches tritt bei der L-sensitiven Gruppe häufiger auf als das t-Allel.

Die dazu gehörenden diagnostischen Kenngrößen sind in **Tab. 5** zusammengefasst. Sensitivität (Se) und Spezifität (Spe) sind Kenngrößen, die den Wert eines Testes in Bezug auf die Erkennung bzw. Erfassung der „Kranken“ bzw. „Gesunden“ beschreiben; sie sind unabhängig von der Prävalenz (= Häufigkeit einer Erkrankung in der Population). Im vorliegenden Fall sind 18% der LISH-sensitiven Probanden Träger des c-Allels (= „positiver Test“); sie entwickeln eine SH (= Sensitivität). Die niedrige Sensitivität ist Ausdruck der Tatsache, dass SH durch viele Faktoren beeinflusst wird und nicht nur durch diese Genvariante. Mit der Bestimmung des cc-Genotyps werden nur 4% der Probanden erfasst, die eine erhöhte Empfindlichkeit für die Entwicklung einer LISH haben. 80–90% der Probanden, die Träger des t-Allels (= negativer Test) sind, werden keine SH entwickeln (= Spezifität).

**Tab. 4:** Verteilung der SOD2 Allel- und Genotypen bei Probanden mit verschiedenem Risiko für LISH[23].

Allel/Genotyp	LISH sens. Prob. (n= 201; "krank")	LISH resist. Prob. (n = 202; "gesund")
5'-gct ccg gct ttg ggg-3' ... (c-Allel) A <sup>1</sup> P A L G...	17.7 % ( <sup>a</sup> 36; <b>a</b> = <sup>2</sup> rp)	10.9 % (22; <b>b</b> = fp)
5'-gct ccg gtt ttg ggg-3't ... (t-Allel) A P V L G	82.3 % (165; <b>c</b> = fn)	89.1% (180; <b>d</b> = rn)
...cc.....(cc-Genotyp)	4.0 % (8)	1.5 % (3)
...ct.....(ct-Genotyp)	27.3 % (55)	18.8 % (38)
...tt.....(tt-Genotyp)	68.7 % (138)	79.7 % (161)

LISH sens., resist.-sensitiv oder resistent hinsichtlich der Entwicklung einer SH bei Lärmeinwirkung.

<sup>1</sup> Aminosäuren: A-Alanin, P-Prolin, L-Leucin, G-Glycin, V-Valin.

<sup>2</sup> Absolutzahlen in Klammern;

<sup>3</sup> Abkürzungen: rp-richtig positiv, fp-falsch positiv; fn-falsch negativ, rn-richtig negativ.

Eine weitere Größe für die Einschätzung der Bedeutung der Variante zur Beurteilung der Disposition für die Entwicklung einer SH bei Lärm ist das Wahrscheinlichkeits-Verhältnis (LR<sup>+</sup> oder LR<sup>-</sup>, likelihood ratio des positiven oder negativen Testes). Diese Kenngröße berücksichtigt sowohl Sensitivität als auch Spezifität. Das LR kennzeichnet den Ausgawert des Testes (Effizienz des Testes) für die Entwicklung einer SH. Aus positiver und negativer LR kann man das Odds-Ratio (Chance) berechnen, ein in der Medizin übliches Maß für das relative Risiko. Die Träger der c-Allel-Variante (OR = 1.78) haben gegenüber jenen mit dem t-Allel ein um 78% höheres Risiko bei einer Lärmeinwirkung eine SH zu entwickeln.

Bei der Prävention geht es um die Frage nach der Veränderung der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer SH bei Lärmeinwirkung nach Durchführung der Analyse und Kenntnis des Ergebnisses des ausgewählten Testes. Dazu dienen der prädiktive Wert (Vorhersagewert, PW, predictive value des positiven und negativen Testes). Der PW macht eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit, eine SH zu entwickeln bei Vorliegen (= positiver Test) oder Fehlen (= negativer Test) der Variante. Nach dem Bayes Theorem geht in die Berechnung auch die Prävalenz ein. Je besser der Test, umso höher der PW des positiven Testes. Im vorliegenden Beispiel beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass der Proband bei positivem Test (c-Allel) eine SH entwickelt, 62%. Die

**Tab. 5:** Diagnostischer Wert der Allel- und Genotyp-Bestimmung der SOD2-Genvariante rs4880 für die Vorhersage einer SH (s. Tabelle 4)

	c-Allel	ct-Genotyp	cc-Genotyp
Gesamt (n)	403	403	403
Prävalenz (Präv)	0.50	0.50	0.50
Sensitivität (Se)	0.18	0.27	0.04
Spezifität (Spe)	0.89	0.81	0.99
Pos. Likelihood ratio (LR <sup>+</sup> )	1.64	1.45	2.68
Neg. Likelihood ratio (LR <sup>-</sup> )	0.92	0.89	0.97
Odds-Ratio (OR)	1.78	1.63	2.76
Prädiktiver Wert, positiver Test (PPW)	0.62	0.59	0.73
Prädiktiver Wert, negativer Test (NPW)	0.52	0.59	0.54

Berechnung auf der Grundlage der Vierfeldertafel von Tab. 4.

$Se = a / (a+c)$ ;  $Spe = d / (b+d)$ ;  $LR^+ = [a / (a+c)] / [b / (b+d)]$ ;

$LR^- = [c / (a+c)] / [d / (b+d)]$ ;  $OR = LR^+ / LR^-$ ;

$PPW = [Se \times Präv] / [(Se \times Präv) + [(1-Spe) \times (1-Präv)]]$ ;  $NPW = [(Spe \times (1-Präv)) / (Spe \times (1-Präv) + (1-Se) \times Präv)]$ .

Prävalenz in dem untersuchten Kollektiv beträgt 50%, d. h. das Vor-test-Risiko für die Entwicklung einer SH beträgt 50% (**Tab. 5**). Wird bei einer Person rs4880 nachgewiesen (c-Allel), dann erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer SH von 50% auf 62%, d. h. der Zuwachs an Information beträgt 12%. Wird der cc-Genotyp nachgewiesen, dann erhöht sich diese Wahrscheinlichkeit von 50% auf 73%. Das Odds Ratio von 2.8 entspricht im vorliegenden Fall einem Anstieg der SH-Wahrscheinlichkeit um etwa 25%.

Die Zahlen verdeutlichen, dass die Erfassung von Risikopatienten mit Hilfe der rs4880 Gendiagnostik sehr begrenzt ist. Mit der Allel-Diagnostik werden nur 20% der Risiko-Patienten erfasst, mit der Genotyp-Analyse fällt dieser Anteil sogar auf nur 5%. Die Spezifität steigt auf 98%, d. h. der Proband mit dem tt-Genotyp wird mit hoher Wahrscheinlichkeit keine SH entwickeln. Da aber eine Reihe anderer Varianten oder Faktoren die Entwicklung der SH verursachen können, ist diese hohe Spezifität kaum von Bedeutung. Die Zahlen verdeutlichen ebenfalls, dass genetische Screening-Untersuchungen für die behandelte Fragestellung wertlos sind, weil die Prävalenz bei solchen Untersuchungen sehr gering ist.

## Schlussfolgerungen

1. Die derzeitigen Kenntnisse über genetische Varianten und ihre Assoziationen zu erworbener Schwerhörigkeit sind z.Z. gering. Darüber hinaus sind die Aussagen einer Reihe von Studien mit einer großen Unsicherheit behaftet, da sie entweder an einer zu kleinen Population erhoben wurden, oder in Studien mit anderen Probandengruppen nicht bestätigt werden konnten. Konkrete Schlussfolgerungen für die Anwendung in der klinischen Praxis können noch nicht gegeben werden<sup>[21]</sup>.
2. Der diagnostische Wert der bisher bekannten SNP-Varianten für die Vorhersage der Entstehung einer SH ist zu gering für die Risikoeinschätzung einer gegebenen Person. Die konsequente Einhaltung der verfügbaren Mittel zum Schutz des Gehörs ist z.Z. wichtiger als jede individuelle genetische Diagnostik. Die erworbene Schwerhörigkeit gehört zu den sogenannten multifaktoriellen, komplexen Erkrankungen, da sie sowohl durch genetische und Umweltfaktoren bestimmt werden.
3. Die Weiterentwicklung der genetischen Diagnostik, insbesondere die Aufdeckung neuer Kandidatengene und die Möglichkeiten der Hochdurchsatz-Sequenzierung („next generation sequencing“; NGS) könnten diese Lücke in absehbarer Zeit zu schließen. Eine SH-Test-Kombination bei Bestimmung mehrerer SNPs und Einbeziehung von Risikofaktoren und der Familienanamnese könnte den diagnostischen Wert verbessern. Die Einbeziehung mehrerer SNP-Varianten in die Diagnostik muss nicht notwendigerweise zu einer Verbesserung der Vorhersage des Krankheitsrisiko führen<sup>[19, 25]</sup>.
4. Ausnahmen für den Einsatz der bisher bekannten SNP-Varianten könnten Personen mit Lärmexposition und positiver Familienanamnese sein. Für einzelne Personen, z.B. Berufsmusiker ist es sicherlich sinnvoll, eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Lärm zu kennen. Das bietet die Chance, konsequenten Lärmschutz von Jugend an zu pflegen. Möglicherweise stehen in absehbarer Zukunft auch Medikamente zur Verfügung, die protektiv auf Haarzellen wirken<sup>[43]</sup>.
5. Am vordringlichsten scheinen mir Forschungen zur Verhinderung einer iatrogenen SH, sei es durch die Verabreichung von Cisplatin oder Antibiotika. Es besteht eine hohe Verantwortung der Ärzte, um



diese Form der SH zu verhindern. Alle Möglichkeiten der Abschätzung eines Risikos im Vorfeld (Familienanamnese, ev. genetische Diagnostik) sollten genutzt werden, um eine Chemotherapie bei einem Kind nicht mit einer lebenslangen SH zu bezahlen<sup>[4]</sup>.

## Literatur

- [1] I. Audo and M. E. Warchol (2012) Retinal and cochlear toxicity of drugs: new insights into mechanisms and detection. *Curr.Opin.Neurol.*, 25, 76–85.
- [2] A. E. Barnhill, M. T. Brewer and S. A. Carlson (2012) Adverse effects of antimicrobials via predictable or idiosyncratic inhibition of host mitochondrial components. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 56, 4046–4051.
- [3] R. Bogo, A. Farah, A. C. Johnson, K. K. Karlsson, N. L. Pedersen, M. Svarstengen and A. Skjonsberg (2015) The Role of Genetic Factors for Hearing Deterioration Across 20 Years: A Twin Study. *J Gerontol.A Biol.Sci.Med. Sci.*, 70, 647–53.
- [4] C. Bokemeyer, C. C. Berger, J. T. Hartmann, C. Kollmannsberger, H. J. Schmoll, M. A. Kuczyk and L. Kanz (1998) Analysis of risk factors for cisplatin-induced ototoxicity in patients with testicular cancer. *Br.J Cancer*, 77, 1355–1362.
- [5] M. R. Bowl and S. J. Dawson (2015) The Mouse as a Model for Age-Related Hearing Loss – A Mini-Review. *Gerontology*, 61, 149–57.
- [6] E. Fransen, S. Bonneux, J. J. Corneveaux, I. Schrauwen, B. F. Di, C. H. White, J. D. Ohmen, P. Van de Heyning, U. Ambrosetti, M. J. Huettelman, C. G. Van and R. A. Friedman (2015) Genome-wide association analysis demonstrates the highly polygenic character of age-related hearing impairment. *Eur J Hum.Genet.*, 23, 110–115.
- [7] R. A. Friedman, L. L. Van, M. J. Huettelman, S. S. Sheth, E. E. Van, J. J. Corneveaux, W. D. Tembe, R. F. Halperin, A. Q. Thorburn, S. Thys, S. Bonneux, E. Fransen, J. Huyghe, I. Pyykko, C. W. Cremers, H. Kremer, I. Dhooge, D. Stephens, E. Orzan, M. Pfister, M. Bille, A. Parving, M. Sorri, P. H. Van de Heyning, L. Makmura, J. D. Ohmen, F. H. Linthicum, Jr., J. N. Fayad, J. V. Pearson, D. W. Craig, D. A. Stephan and C. G. Van (2009) GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Hum.Mol.Genet.*, 18, 785–796.

- [8] C. Fujimoto and T. Yamasoba (2014) Oxidative stresses and mitochondrial dysfunction in age-related hearing loss. *Oxid.Med.Cell Longev.*, 2014, 582849.
- [9] G. Girotto, N. Pirastu, R. Sorice, G. Biino, H. Campbell, A. P. d'Adamo, N. D. Hastie, T. Nutile, O. Polasek, L. Portas, I. Rudan, S. Ulivi, T. Zemunik, A. F. Wright, M. Ciullo, C. Hayward, M. Pirastu and P. Gasparini (2011) Hearing function and thresholds: a genome-wide association study in European isolated populations identifies new loci and pathways. *J.Med.Genet.*, 48, 369–374.
- [10] G. Girotto, D. Vuckovic, A. Buniello, B. Lorente-Canovas, M. Lewis, P. Gasparini and K. P. Steel (2014) Expression and replication studies to identify new candidate genes involved in normal hearing function. *PLoS. ONE.*, 9, e85352.
- [11] J. Gross (2012) Lärm induzierte Erkrankungen des Menschen. *Sitzungsberichte Leibniz-Sozietät der Wissenschaften*, 114, 175–191.
- [12] D. Henderson, E. C. Bielefeld, K. C. Harris and B. H. Hu (2006) The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear.*, 27, 1–19.
- [13] Q. Huang and J. Tang (2010) Age-related hearing loss or presbycusis. *Eur. Arch.Otorhinolaryngol.*, 267, 1179–1191.
- [14] J. R. Huyghe, L. L. Van, J. J. Hendrickx, E. Fransen, K. Demeester, V. Topsakal, S. Kunst, M. Manninen, M. Jensen, A. Bonaconsa, M. Mazzoli, M. Baur, S. Hannula, E. Maki-Torkko, A. Espeso, E. E. Van, A. Flaquer, C. Becker, D. Stephens, M. Sorri, E. Orzan, M. Bille, A. Parving, I. Pyykko, C. W. Cremers, H. Kremer, P. H. Van de Heyning, T. F. Wienker, P. Nurnberg, M. Pfister and C. G. Van (2008) Genome-wide SNP-based linkage scan identifies a locus on 8q24 for an age-related hearing impairment trait. *Am J Hum.Genet.*, 83, 401–407.
- [15] A. Konings, L. Van Laer, S. Michel, M. Pawelczyk, P. I. Carlsson, M. L. Bondeson, E. Rajkowska, A. Dudarewicz, A. Vandavelde, E. Fransen, J. Huyghe, E. Borg, M. Sliwinska-Kowalska and C. G. Van (2009) Variations in HSP70 genes associated with noise-induced hearing loss in two independent populations. *Eur.J.Hum.Genet.*, 17, 329–335.
- [16] A. Konings, L. Van Laer, M. Pawelczyk, P. I. Carlsson, M. L. Bondeson, E. Rajkowska, A. Dudarewicz, A. Vandavelde, E. Fransen, J. Huyghe, E. Borg, M. Sliwinska-Kowalska and C. G. Van (2007) Association between variations in CAT and noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations. *Hum.Mol Genet.*, 16, 1872–1883.

- [17] A. Konings, L. Van Laer and C. G. Van (2009) Genetic studies on noise-induced hearing loss: a review. *Ear Hear.*, 30, 151–159.
- [18] T. J. Kowalski, M. Pawelczyk, E. Rajkowska, A. Dudarewicz and M. Sliwinska-Kowalska (2014) Genetic variants of CDH23 associated with noise-induced hearing loss. *Otol.Neurotol.*, 35, 358–365.
- [19] H. Lango, C. N. Palmer, A. D. Morris, E. Zeggini, A. T. Hattersley, M. I. McCarthy, T. M. Frayling and M. N. Weedon (2008) Assessing the combined impact of 18 common genetic variants of modest effect sizes on type 2 diabetes risk. *Diabetes*, 57, 3129–3135.
- [20] C. G. Le Prell, D. F. Dolan, J. Schacht, J. M. Miller, M. I. Lomax and R. A. Altschuler (2003) Pathways for protection from noise induced hearing loss. *Noise.Health*, 5, 1–17.
- [21] Leopoldina (2010) Prädiktive genetische Diagnostik als Instrument der Krankheitsprävention . Stellungnahme der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina e.V.
- [22] Y. H. Lin, C. C. Wu, C. J. Hsu, J. H. Hwang and T. C. Liu (2011) The grainyhead-like 2 gene (GRHL2) single nucleotide polymorphism is not associated with age-related hearing impairment in Han Chinese. *Laryngoscope*, 121, 1303–1307.
- [23] Y. M. Liu, X. D. Li, X. Guo, B. Liu, A. H. Lin, Y. L. Ding and S. Q. Rao (2010) SOD2 V16A SNP in the mitochondrial targeting sequence is associated with noise induced hearing loss in Chinese workers. *Dis.Markers*, 28, 137–147.
- [24] H. Luo, T. Yang, X. Jin, X. Pang, J. Li, Y. Chai, L. Li, Y. Zhang, L. Zhang, Z. Zhang, W. Wu, Q. Zhang, X. Hu, J. Sun, X. Jiang, Z. Fan, Z. Huang and H. Wu (2013) Association of GRM7 variants with different phenotype patterns of age-related hearing impairment in an elderly male Han Chinese population. *PLoS.ONE.*, 8, e77153.
- [25] K. Miyaki, Y. Takahashi, Y. Song, L. Zhang, M. Muramatsu and T. Nakayama (2008) Increasing the number of SNP loci does not necessarily improve prediction power at least in the comparison of MTHFR SNP and haplotypes. *J Epidemiol.*, 18, 243–250.
- [26] D. L. Newman, L. M. Fisher, J. Ohmen, R. Parody, C. T. Fong, S. T. Frisina, F. Mapes, D. A. Eddins, F. D. Robert, R. D. Frisina and R. A. Friedman (2012) GRM7 variants associated with age-related hearing loss based on auditory perception. *Hear.Res.*, 294, 125–132.

- [27] L. S. Nolan, B. A. Cadge, M. Gomez-Dorado and S. J. Dawson (2013) A functional and genetic analysis of SOD2 promoter variants and their contribution to age-related hearing loss. *Mech.Ageing Dev.*, 134, 298–306.
- [28] S. Ogino, M. L. Gulley, J. T. den Dunnen and R. B. Wilson (2007) Standard mutation nomenclature in molecular diagnostics: practical and educational challenges. *J Mol Diagn.*, 9, 1–6.
- [29] J. Ohmen, E. Y. Kang, X. Li, J. W. Joo, F. Hormozdiari, Q. Y. Zheng, R. C. Davis, A. J. Lusis, E. Eskin and R. A. Friedman (2014) Genome-wide association study for age-related hearing loss (AHL) in the mouse: a meta-analysis. *J Assoc.Res.Otolaryngol.*, 15, 335–352.
- [30] A. Pare, M. Kim, M. T. Juarez, S. Brody and W. McGinnis (2012) The functions of grainy head-like proteins in animals and fungi and the evolution of apical extracellular barriers. *PLoS.ONE.*, 7, e36254.
- [31] P. Perez and J. Bao (2011) Why do hair cells and spiral ganglion neurons in the cochlea die during aging? *Aging Dis.*, 2, 231–241.
- [32] N. R. Prabhakar and G. L. Semenza (2012) Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev.*, 92, 967–1003.
- [33] T. R. Prezant, J. V. Agopian, M. C. Bohlman, X. Bu, S. Oztas, W. Q. Qiu, K. S. Arnos, G. A. Cortopassi, L. Jaber, J. I. Rotter and . (1993) Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat.Genet.*, 4, 289–294.
- [34] P. M. Rabinowitz, W. J. Pierce, Sr., M. B. Hur, P. G. Antonucci, C. Powell and M. Slade (2002) Antioxidant status and hearing function in noise-exposed workers. *Hear.Res.*, 173, 164–171.
- [35] L. Riedemann, C. Lanvers, D. Deuster, U. Peters, J. Boos, H. Jurgens and A. am Zehnhoff-Dinnesen (2008) Megalin genetic polymorphisms and individual sensitivity to the ototoxic effect of cisplatin. *Pharmacogenomics.J.*, 8, 23–28.
- [36] K. Senga, K. E. Mostov, T. Mitaka, A. Miyajima and N. Tanimizu (2012) Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol Biol.Cell*, 23, 2845–2855.
- [37] M. Sliwinska-Kowalska and M. Pawelczyk (2013) Contribution of genetic factors to noise-induced hearing loss: a human studies review. *Mutat. Res.*, 752, 61–65.
- [38] K. Tabuchi, B. Nishimura, S. Tanaka, K. Hayashi, Y. Hirose and A. Hara (2010) Ischemia-reperfusion injury of the cochlea: pharmacological strat-

- egies for cochlear protection and implications of glutamate and reactive oxygen species. *Curr.Neuropharmacol.*, 8, 128–134.
- [39] Van Eyken E., Van Camp G. and Van Laer L. (2007) The complexity of age-related hearing impairment: contributing environmental and genetic factors. *Audiol.Neurootol.*, 12, 345–358.
- [40] L. Van Laer., E. E. Van, E. Franssen, J. R. Huyghe, V. Topsakal, J. J. Hendrickx, S. Hannula, E. Maki-Torkko, M. Jensen, K. Demeester, M. Baur, A. Bonaconsa, M. Mazzoli, A. Espeso, K. Verbruggen, J. Huyghe, P. Huygen, S. Kunst, M. Manninen, A. Konings, A. N. Diaz-Lacava, M. Steffens, T. F. Wienker, I. Pyykko, C. W. Cremers, H. Kremer, I. Dhooge, D. Stephens, E. Orzan, M. Pfister, M. Bille, A. Parving, M. Sorri, P. H. Van de Heyning and C. G. Van (2008) The grainyhead like 2 gene (GRHL2), alias TFCP2L3, is associated with age-related hearing impairment. *Hum.Mol Genet.*, 17, 159–169.
- [41] B. Vona, I. Nanda, C. Neuner, T. Muller and T. Haaf (2013) Confirmation of GRHL2 as the gene for the DFNA28 locus. *Am J Med.Genet.A*, 161A, 2060–2065.
- [42] S. L. Wang, L. G. Yu, R. P. Liu, W. Z. Zhu, W. M. Gao, L. P. Xue, X. Jiang, Y. H. Zhang, D. Yi, D. Chen and Y. H. Zhang (2014) Gene-Gene Interaction of GJB2, SOD2, and CAT on Occupational Noise-induced Hearing Loss in Chinese Han Population. *Biomed.Enviro.n.Sci.*, 27, 965–968.
- [43] J. Xie, A. E. Talaska and J. Schacht (2011) New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. *Hear.Res.*, 281, 28–37.
- [44] J. Yu, J. Zheng, X. Zhao, J. Liu, Z. Mao, Y. Ling, D. Chen, C. Chen, L. Hui, L. Cui, Y. Chen, P. Jiang and M. X. Guan (2014) Aminoglycoside stress together with the 12S rRNA 1494C>T mutation leads to mitophagy. *PLoS.ONE.*, 9, e114650.

