

Chapter 7

Table S1: Differentially expressed genes in the OC/SGN in DKO mice.

Table S2: Differentially expressed genes in the SV/SL in DKO mice.

Table S3: Gene ontology analysis in the OC/SGN in DKO mice.

Table S4: Differentially expressed genes in the vestibule in DKO mice.

Supplementary tables for this chapter can be downloaded: https://umcgonline-my.sharepoint.com/:f:/g/personal/n_m_a_schubert_umcg_nl/Eh3yBB5-Dv1FqyPmXat7rU4BmWPwrGGgPcgfVeM8i6j6Hg?e=3gjlDW

Chapter 8

Table S1: Curated gene lists.

Table S2: Enriched processes in cochlear substructures at 6 weeks of age.

Table S3: Differentially expressed genes in the cochlear substructures with aging.

Table S4. Enriched processes in cochlear substructures in aged mice.

Supplementary tables for this chapter can be downloaded: https://umcgonline-my.sharepoint.com/:f:/g/personal/n_m_a_schubert_umcg_nl/Eh3yBB5-Dv1FqyPmXat7rU4BmWPwrGGgPcgfVeM8i6j6Hg?e=3gjlDW

Summary in Dutch / Nederlandse samenvatting

Het binnenoor is verantwoordelijk voor gehoor- en balans-functie. Aandoeningen van het binnenoor zoals gehoorverlies, tinnitus en vestibulaire disfunctie kunnen een negatieve invloed hebben op de kwaliteit van leven van patiënten. Gehoorverlies kan ervoor zorgen dat mensen minder goed kunnen communiceren en participeren in sociale activiteiten, dit kan uiteindelijk leiden tot sociale isolatie en depressie. Gehoorverlies geeft ook een grotere kans op het ontwikkelen van cognitieve achteruitgang en de ziekte van Alzheimer. Gehoorverlies door verlies van haarcellen en/of zenuwcellen in het binnenoor wordt gedefinieerd als perceptief gehoorverlies. Een aandoening die veel voorkomt bij gehoorverlies is tinnitus, ook wel oorsuizen genoemd. Dit is een aandoening waarbij patiënten geluid of suizen horen zonder dat dit objectief waarneembaar is voor anderen. Het waarnemen van tinnitus kan worden ervaren als angstig en kan leiden tot angststoornissen en slaapstoornissen. Uiteindelijk kan tinnitus een negatieve invloed op de kwaliteit van leven hebben. Vestibulaire disfunctie kan resulteren in disbalans en coördinatieproblemen, wat kan leiden tot een negatieve impact op het dagelijks functioneren en een grotere kans op vallen. Aandoeningen van het binnenoor zijn grotendeels leeftijds-gerelateerd, ook hebben deze aandoeningen een negatieve sociale en economische impact. Gehoorverlies kan behandeld worden middel hoorapparaten en cochleaire implantatie. Tinnitus behoeft ook regelmatig consultatie van een professional. Vestibulaire problemen kunnen onder andere worden behandeld middels revalidatie. Huidige behandelopties voor aandoeningen van het binnenoor richten zich voornamelijk op het verminderen van symptomen en revalidatie. Het restaureren van het gehoor en balans is tot dusver niet mogelijk. Er is een noodzaak nieuwe behandelopties te ontwikkelen voor gehoorverlies, tinnitus en vestibulaire disfunctie. Om deze ontwikkelingen mogelijk te maken is onderzoek naar moleculaire mechanismen van gehoorverlies, tinnitus en vestibulaire disfunctie essentieel.

Gehoorverlies, tinnitus en vestibulaire disfunctie kunnen in zowel mensen als in model organismen, zoals muizen, onderzocht worden. Beide soorten onderzoek hebben hun unieke voordelen en nadelen. Het binnenoor is een klein orgaan in het hoofd dat zowel de anatomische structuren bevat die belangrijk zijn voor gehoor, genaamd de cochlea of slakkenhuis, en balans namelijk het vestibulaire systeem. De meeste studies focussen alleen op of de cochlea of het vestibulum, terwijl deze twee structuren zowel overlap hebben in anatomie en fysiologie. Dit proefschrift probeert moleculaire mechanismen te bestuderen van gehoorverlies, tinnitus en vestibulaire

disfunctie in zowel muis modellen als in mensen, met als doel nieuwe moleculaire aanknopingspunten te identificeren die uiteindelijk vertaald kunnen worden naar nieuwe behandelopties voor binnen oorziekten. Ook probeert dit proefschrift zowel de auditieve als vestibulaire structuren te vergelijken ter bevordering van onze kennis over gehoorverlies, tinnitus en vestibulaire disfunctie.

Dit proefschrift begint met een uitgebreide introductie in **hoofdstuk 1** over de prevalentie en impact van gehoorverlies, tinnitus en vestibulaire disfunctie. Ook wordt de anatomie functie en pathofysiologie van auditieve en vestibulaire ziekten beschreven. De introductie beschrijft tevens de meest gebruikte onderzoeksmethoden van dit proefschrift. Het proefschrift is hierna opgebouwd uit 3 delen: deel 1 gaat over mechanismen van tinnitus in de algemene populatie, deel 2 over veranderingen van vestibulaire functie met het ouder worden en de vergelijking met het auditieve systeem. Deel 3 over moleculaire mechanismen van verworven perceptief gehoorverlies.

Deel 1 van dit proefschrift presenteert onderzoeken naar tinnitus in de algemene populatie. Voor deze studies is gebruik gemaakt van de populatie cohortstudie Lifelines. Dit cohort bevat meer dan 167.000 individuen en het doel is om deelnemers voor langere tijd te vervolgen. Lifelines bevat een breed scala aan zowel medische, sociale en genetische parameters waardoor Lifelines uitermate geschikt is voor het bestuderen van verschillende ziekten. **Hoofdstuk 2** laat zien dat individuen met tinnitus in de algemene populatie lager scoren op 'self-rated health' (SRH), een parameter waarbij deelnemers een eigen inschatting maken van hun gezond. SRH-scores zijn vergelijkbaar met een inschatting van de kwaliteit van leven. Het negatieve effect van tinnitus op SRH is vergelijkbaar met ziekten zoals depressie en kanker, wat betekent dat mensen over het algemeen veel hinder ervaren van tinnitus. Goede slaapkwaliteit, een hoger aantal sociale contacten en de afwezigheid van aandoeningen zoals prikkelbare darmsyndroom en fibromyalgie hebben een positief effect op de SRH-scores bij tinnitus. Deze resultaten zijn relevant voor zorgprofessionals die patiënten met tinnitus behandelen en begeleiden. **Hoofdstuk 3** bevestigt eerdere resultaten van andere studies, onder andere dat tinnitus veel voorkomt in de algemene populatie. Op basis van definitie van tinnitus wordt de prevalentie geschat tussen de 6,4%, bij constante tinnitus, en 31,8%, bij iedere vorm van tinnitus. Dit laat zien dat een goede definitie van tinnitus essentieel is om verschillende studies met elkaar te vergelijken. Om dit te bereiken zou gebruik gemaakt kunnen worden van gestandaardiseerde vragenlijsten zoals de 'Tinnitus Handicap Inventory (THI)', 'Tinnitus Functional Index (TFI)', 'Tinnitus Questionnaire (TQ)' of de 'European School for Interdisciplinary

Tinnitus Research Screening Questionnaire (ESIT-SQ)'. In dit hoofdstuk worden factoren geassocieerd met tinnitus met als doel om potentiële gemeenschappelijke ziekte-mechanismen te identificeren. Dit onderzoek bevestigt reeds bestaande factoren die correleren met tinnitus, zoals gehoorproblemen, psychiatrische aandoeningen, cardiovasculaire ziekten en diabetes mellitus. Ook toont dit onderzoek nieuwe associaties met tinnitus aan, waaronder schildklieraandoeningen, inflammatoire ziekten en functionele syndromen. Resultaten van dit onderzoek helpen om mogelijk gedeelde ziektemechanismen tussen tinnitus en de geassocieerde ziekten beter te begrijpen. Dit kan leiden tot de herkenning van nieuwe risicofactoren voor tinnitus. Ook kunnen deze resultaten bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe behandelmethoden voor tinnitus. Het belangrijk om deze geassocieerde factoren longitudinaal verder te onderzoeken om causale verbanden aan te kunnen tonen. **Hoofdstuk 4** gebruikt stamboom data en genetische data om de erfelijkheid en genetica van tinnitus verder te onderzoeken. De stamboom data toont aan dat erfelijkheid van tinnitus ligt tussen de 3,3 en 13,1%, afhankelijk van definitie van tinnitus, en deze resultaten zijn vergelijkbaar met uitkomsten van eerdere onderzoeken. Op basis van deze data heeft tinnitus een kleine erfelijke component, dus waarschijnlijk is het effect van omgevingsfactoren, zoals lawaai expositie, groter. Door gebruik te maken van de genetische data in Lifelines is het mogelijk om variatie in het DNA te associëren met tinnitus. Op basis van deze analyse wordt één statistisch significante variant van het DNA (ook wel 'single nucleotide polymorphism (SNP)' in het Engels) geassocieerd met tinnitus. Deze variant ligt in de regio van het gen *SLC35F3*, wat een rol speelt bij het transport van thiamine, wat op basis van ander onderzoek betrokken is bij gehoorverlies. Derhalve is het mogelijk dat thiamine transport een rol speelt bij de pathogenese van tinnitus. Dit resultaat zal moeten worden bevestigd in andere studies. Door middel van genetisch correlatieanalyse kan tinnitus genetisch gecorreleerd worden aan gehoorverlies, depressie en angststoornissen, wat mogelijk aanwijzingen geeft voor gemeenschappelijke genetische en/of moleculaire mechanismen onderliggend aan deze ziekten. Identificatie van genen en moleculaire mechanismen van tinnitus kan bijdrage aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor tinnitus en mogelijk ook bijdragen aan de counseling van patiënten met tinnitus.

In **Deel 2** van dit proefschrift worden veranderingen met ouderdom in de auditieve en vestibulaire structuren van het binnenoer onderzocht. Het doel is om gemeenschappelijk en unieke gevolgen van veroudering in deze structuren te identificeren om zo beter de onderliggende mechanismen te begrijpen en nieuwe behandelstrategieën te ontwikkelen. **Hoofdstuk 5** toont een overzicht van epidemiologische, anatomische, fysiologische en

moleculaire overeenkomsten in ouderdomsgerelateerde veranderingen in de cochlea en het vestibulaire systeem. Ouderdomslethorendheid (presbycusis) presenteert zich meestal op jongere leeftijd in vergelijking met verminderde functie van het vestibulaire systeem (presbyvestibulopathie). Beide aandoening komen veel voor in de algemene populatie en worden veroorzaakt door verval van sensorische cellen en zenuwen door een combinatie van genetische factoren en omgevingsfactoren. Dit hoofdstuk laat zien dat presbyvestibulopathie over het algemeen minder aandacht heeft gekregen in vergelijking met presbycusis. Er moet meer epidemiologisch en genetisch onderzoek opgezet worden om kennis te vergaren over presbyvestibulopathie. Toekomstige onderzoeken moeten gebruik maken van gestandaardiseerde testmethoden voor vestibulaire functie, wat zal leiden tot een betere vergelijking met andere studies en de ontwikkeling van diagnostische criteria voor vestibulaire disfunctie. Ook dienen centrale mechanismen van het evenwicht te worden meegenomen. In **Hoofdstuk 6** wordt een klinische studie gepresenteerd waarbij verandering van zowel auditieve als vestibulaire functie met de leeftijd is onderzocht. Hierbij is gebruik gemaakt van gegevens van patiënten met een brughoektumor waarbij metingen van het gehoor en vestibulaire functie van de niet-aangedane zijde zijn gebruikt. De leeftijd van de patiënten liep van 24 jaar tot 85 jaar. Gehoorfunctie is gemeten middels toonaudiometrie en vestibulaire functie is gemeten middels calorimetrie en de 'video head impulse test (vHIT)'. Een hogere leeftijd was gecorreleerd met een verminderde gehoorfunctie, echter hogere leeftijd was niet gecorreleerd met verminderde vestibulaire functie. Daarnaast laat deze studie niet zien dat gehoorverlies is geassocieerd met verminderde vestibulaire functie. Eerdere studies lieten een mogelijke correlatie zien tussen gehoorverlies en verminderde vestibulaire functie, echter hierbij werden andere testmethoden gebruikt waardoor een directe vergelijking lastig wordt gemaakt. Toekomstige studies die de correlatie tussen gehoorverlies en verminderde vestibulaire functie onderzoeken moeten gestandaardiseerde testmethoden gebruiken die de directe functie van het orgaan beoordelen. Indien gehoorverlies en verminderde vestibulaire functie kunnen worden gecorreleerd kan dit leiden tot betere en vroegere detectie van vestibulaire disfunctie.

Deel 3 bevat studies naar moleculaire mechanismen van perceptief gehoorverlies. In **hoofdstuk 7** wordt een genetisch muismodel gebruikt voor 'hidden hearing loss', een vorm van perceptief gehoorverlies die niet detecteerbaar is middels conventionele diagnostiek en waarbij een deel van de zenuwen in de cochlea niet functioneren of verloren zijn gegaan. In het muismodel ($K_{Na}1$ DKO) functioneren $K_{Na}1.1$ en $K_{Na}1.2$ niet meer, $K_{Na}1.1$ en $K_{Na}1.2$ zijn kaliumkanalen die belangrijk zijn voor het functioneren van de

zenuwen in de cochlea. Dit onderzoek toont aan dat $K_{Na}1$ DKO muizen, in vergelijking met wildtype muizen, kwetsbaarder zijn voor gehoorverlies door ouderdom en lawaai expositie. RNA sequencing toont aan dat voornamelijk type 1 neuronen in de cochlea, ook wel 'spiral ganglion neurons' genoemd, zijn aangedaan in $K_{Na}1$ DKO muizen. Moleculaire mechanismen die veranderd zijn in $K_{Na}1$ DKO muizen, in vergelijking met wildtype muizen op een leeftijd van 6 weken oud, zijn proteostase, actine-myosine interacties, veroudering, mitochondriële, vet en hormoon mechanismen. Ook is vestibulaire functie in deze studie onderzocht, maar $K_{Na}1$ DKO muizen lijken geen verminderde vestibulaire functie of moleculaire veranderingen in het vestibulaire systeem te laten zien in vergelijking met wildtype muizen. Deze studie toont mogelijk moleculaire mechanismen aan van 'hidden hearing loss' aan en geeft belangrijke inzichten voor toekomstige studies naar gehoorverlies. **Hoofdstuk 8** is een studie naar leeftijdsgerelateerde moleculaire veranderingen in de sensorische en metabole substructuren van de cochlea van muizen. RNA sequencing toont aan dat de sensorische en metabole substructuren van de cochlea unieke genen tot expressie brengen om de specifieke functies van deze substructuren te bewerkstelligen. Tijdens veroudering van deze substructuren worden zowel gemeenschappelijke als substructuur-specifieke veranderingen in genexpressie gedetecteerd. Inflammatoire genen komen tot expressie bij veroudering in beide structuren. Met veroudering is minder expressie van neuronale genen in de sensorische substructuur, terwijl structurele en morfologische mechanismen minder tot expressie komen in de metabole substructuur. Daarnaast toont deze studie aan dat op basis van deze genexpressie veranderingen bij veroudering er 27 geneesmiddelen, die reeds op de markt zijn, kunnen aangrijpen op de eiwitproducten van deze genen. Deze geneesmiddelen grijpen aan op inflammatoire processen, GABA en ATPasen. Aanvullende onderzoeken moeten aantonen of deze geneesmiddelen gebruikt kunnen worden om ouderdomslethorendheid te voorkomen en/of te vertragen. Het hergebruiken van geneesmiddelen die reeds op de markt zijn kan potentieel het proces om geneesmiddelen te ontdekken voor gehoorverlies significant versnellen.

In **hoofdstuk 9** worden de belangrijkste resultaten van dit proefschrift gepresenteerd. Ook wordt de impact van deze resultaten op toekomstige studies en de klinische praktijk beschreven. Een uiteenzetting over de voor- en nadelen van het gebruik van verschillende onderzoeksmodellen en onderzoeksmethoden wordt ook gegeven.