

Aus dem Institut für Humangenetik
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Vergleichende molekularbiologische Untersuchung des *IGHMBP2*-Gens bei Patienten mit plötzlichem Säuglingstod (SIDS) und Säuglingen mit erklärter Todesursache (non-SIDS)

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Alexander Erich Volk
aus Herten (Westfalen)

Gutachter: 1. Gutachter: Prof. Dr. K. Sperling
 2. Gutachter: Prof. Dr. C. Kubisch
 3. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. A. von Moers

Datum der Promotion: 14.06.2009

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die infantile spinale Muskelatrophie (SMA) und die infantile spinale Muskelatrophie mit Atemnot (SMARD)	1
1.1.1	Klinik und Klassifikation spinaler Muskelatrophien	1
1.1.2	Die infantile spinale Muskelatrophie mit Atemnot (SMARD)	2
1.1.3	Molekulargenetische Grundlagen spinaler Muskelatrophien	5
1.1.4	Die Prävalenz der SMARD1	10
1.2	Der plötzliche Säuglingstod/Sudden Infant Death Syndrome (SIDS)	10
1.2.1	Allgemeine Definition und historische Beschreibungen	10
1.2.2	Epidemiologische Aspekte und Risikofaktoren	11
1.2.3	Leichenschau und Obduktionsbefunde	12
1.2.4	Pathophysiologische Hypothesen	12
1.2.5	Forensische Einteilung	14
2	ZIELSETZUNG	16
3	MATERIAL	18
3.1	Patienten	18
3.2	Geräte	19
3.3	Computer-Software	20
3.4	Chemikalien und Biochemikalien	20
3.5	Verwendete Kits	21
3.6	Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer	21
3.6.1	Agarosegelelektrophorese	21
3.6.2	DNA-Extraktion	21
3.6.3	Wave™	22
3.6.4	Zellkulturmedien	23
3.7	Verbrauchsmaterialien	23
3.8	Primer	23
4	METHODEN	25
4.1	Fließschema der Arbeitsschritte	25
4.2	Zellkultivierung, Kryokonservierung und DNA-Extraktion	25
4.2.1	Auftauen von Zellen	25

4.2.2	Fibroblastenzellkultivierung	26
4.2.3	Kryokonservierung	26
4.2.4	DNA-Extraktion	26
4.3	Molekulargenetische Arbeitsmethoden	28
4.3.1	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
4.3.2	Agarosegelelektrophorese	30
4.3.3	Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (DHPLC, WAVE™)	30
4.3.4	Sequenzierung	32
5	ERGEBNISSE	35
5.1.1	Klinische Daten und molekulargenetische Ergebnisse der Familienuntersuchung	35
5.1.2	Etablierung der PCR-Bedingungen und der WAVE™-Analysebedingungen für die Screeninguntersuchung des GeSID-Patientenkollektives	36
5.1.3	WAVE™-Screening und Sequenzierung	40
5.1.4	Zusammenfassung der molekulargenetischen Ergebnisse	62
5.1.5	Klinische Befunde der Patienten mit heterozygoten Missense-Varianten im <i>IGHMBP2</i> -Gen	69
6	DISKUSSION	72
6.1	Bewertung der zum Mutationscreening verwendeten Methoden	72
6.1.1	Sensitivität, Spezifität und Zuverlässigkeit der DHPLC	72
6.1.2	Sequenzierung	73
6.2	Ergebnisse der Untersuchungen des GeSID-Kollektivs	74
6.2.1	Häufigkeit der gefundenen Veränderungen	74
6.2.2	Haben die gefundenen Missense-Veränderungen pathogenetische Relevanz?	74
6.3	SMARD1 als ätiologischer Faktor des Sudden Infant Death Syndrome?	75
6.3.1	Betrachtung der SIDS- und non-SIDS-Patienten mit genetischen Veränderungen im <i>IGHMBP2</i> -Gen	75
6.3.2	Pathogenetische Überlegungen	77
6.4	Bewertung der Familienuntersuchung	78
6.5	Auswirkungen auf die klinische Arbeit und SMARD-Forschung	79
7	ZUSAMMENFASSUNG	80
8	LITERATURVERZEICHNIS	83
9	LEBENS LAUF	90
10	DANKSAGUNG	91

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptophan
A	Adenin
A	Alanin
a.-p.	anterior-posterior
AS	Aminosäure
B. taurus	Bos taurus
bp	Basenpaare
C	Cystein
C	Cytosin
D	Aspartat
D. rerio	Danio rerio
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DHPLC	engl. denaturing high-performance liquid chromatography
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
Ex	Exon
Exo I	Exonuklease I
F	engl. forward
FAO	engl. Fatty acid oxidation disorders
FKS	Fetales Kälberserum
G	Glycin
G	Guanin
G. gallus	Gallus gallus
GeSID	engl. German study on Sudden Infant Death
<i>GF-1</i>	engl. glial factor 1
H. sapiens	Homo sapiens
het.	heterozygot
hom.	homozygot
I	Isoleucin
<i>IGHMBP2</i>	engl. Immunoglobulin μ -binding protein 2
IL-10	Interleukin 10
IVS	engl. intervening sequence
K	Lysin
kb	Kilobasenpaare
L	Leucin

LQTS	engl. long QT-syndrome
M	Methionin
M. musculus	Mus musculus
<i>MCAD</i>	engl. medium-chain acyl-CoA dehydrogenase
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
mtDNA	engl. mitochondrial DNA
N	Asparagin
<i>nmd</i>	engl. neuromuscular degeneration
P	Prolin
PBS	engl. phosphat buffered saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
Q	Glutamin
R	engl. reverse
R	Arginin
RNA	engl. ribonucleic acid
RSV	engl. respiratory syncytial virus
S	Serin
<i>Subp2/Ighmbp2</i>	engl. S μ -binding protein 2/immunoglobulin μ -binding protein 2
SAP	engl. shrimp alkaline phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIDS	engl. sudden infant death syndrome
SMA	engl. spinal muscular atrophy
SMARD1	engl. spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1
<i>SMN</i>	engl. survival motoneuron
SNP	engl. single nucleotide polymorphism
snRNP	engl. spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins
SUDI	engl. sudden, unexpected death in infancy
T	Thymin
T	Threonin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TD	engl. touch down
TE	Tris-EDTA
TEAA	Triethylammonium-Acetat
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tri(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	engl. untranslated region
V	Valin
W	Tryptophan
X	Stop-Codon
Y	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Die infantile spinale Muskelatrophie (SMA) und die infantile spinale Muskelatrophie mit Atemnot (SMARD)

1.1.1 Klinik und Klassifikation spinaler Muskelatrophien

Spinale Muskelatrophien umfassen eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe neuromuskulärer Krankheiten. Ein Untergang der motorischen Vorderhornanglienzellen des Rückenmarkes führt zu einer Degeneration der zugehörigen Axone und Denervation der abhängigen Muskelfasern. Klinische Hauptsymptome sind eine zunehmende, meist symmetrisch ausgeprägte Muskelschwäche und Muskelatrophie ¹. Die autosomal-rezessiven, infantilen spinalen Muskelatrophien (engl.: spinal muscular atrophy/SMA) gehören mit einer Inzidenz von 1:10000 zu den häufigsten genetischen Erkrankungen des Kindesalters ². Neben autosomal-rezessiven werden auch autosomal-dominante spinale Muskelatrophien beschrieben, die hauptsächlich im Erwachsenenalter auftreten ³. Im Folgenden werden nur die autosomal-rezessiven Formen betrachtet. Die Erstbeschreibungen erfolgten in den Jahren 1891 und 1893 durch Guido Werdnig und Johann Hoffmann ⁴. Verschiedene Phänotypen werden nach Manifestationsalter, Ausprägungsgrad und Begleitsymptomen unterschieden ⁵. Das heute gängigste Klassifikationsschema autosomal-rezessiver, klassischer, spinaler Muskelatrophien unterscheidet die Subtypen I bis IV ⁶. Die Zuordnung erfolgte dabei nach maximal erreichten motorischen Fähigkeiten und dem Alter bei Krankheitsbeginn ⁷. Zusätzliche, hier nicht aufgeführte Untergruppen und Varianten werden beschrieben. Ein vereinfachtes Klassifikationsschema ist in Tab.1 aufgeführt.

Kongenitale SMA/SMA Typ 0	pränataler Krankheitsbeginn, klinische Manifestation mit Gesichtslähmungen, Muskelschwäche bei Geburt
SMA Typ I	Krankheitsbeginn 1.-6. Lebensmonat; Betroffene können niemals sitzen
SMA Typ II	Krankheitsbeginn vor dem 18. Lebensmonat; Sitzen oder Laufen sind ohne Hilfe nicht möglich
SMA Typ III	Krankheitsbeginn nach dem 18. Lebensmonat; Laufen wird erlernt
SMA Typ IV	Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter nach dem 30. Lebensjahr

Tabelle 1: Klassifikation der autosomal-rezessiven, klassischen spinalen Muskelatrophien nach ^{2,6-9}.

Der klinische Verlauf unterscheidet sich je nach SMA-Typ: Die kongenitale SMA/SMA Typ 0 geht mit der schlechtesten Prognose einher. Bei der SMA Typ I überlebt der Großteil der Patienten ohne Hilfsmittel das zweite Lebensjahr nicht ¹⁰⁻¹². SMA Typ II-Patienten können das Ju-

gendalter oder frühe Erwachsenenalter erreichen¹³. Patienten mit einer SMA Typ III und IV haben die beste Prognose und eine kaum eingeschränkte Lebenserwartung^{13,14}.

1.1.2 Die infantile spinale Muskelatrophie mit Atemnot (SMARD)

1.1.2.1 Klinische Befunde sprechen für eine von der klassischen SMA abgrenzbare Erkrankung

Im Jahr 1974 beschrieben Mellins et al. erstmals eine Variante der SMA Typ I, bei der zwei vormals unauffällige Säuglinge im Alter von einem bzw. zwei Monaten lebensbedrohliche Atemprobleme entwickelten. Ursache war eine Lähmung des Zwerchfells¹⁵. Weitere Arbeiten folgten und sicherten das Vorhandensein einer diaphragmalen Form einer infantilen spinalen Muskelatrophie¹⁶⁻²³.

1.1.2.2 Das Leitsymptom der SMARD1 ist die Atemnot

Das Leitsymptom der diaphragmalen infantilen spinalen Muskelatrophie ist die Atemnot. Diese Erkrankung wurde mit der Genidentifikation SMARD1 genannt, dem Akronym der englischen Krankheitsbezeichnung „spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1“^{24,25}. Die Ateminsuffizienz ist Folge einer Diaphragmalähmung, die radiologisch als Zwerchfellhochstand zu erkennen ist (s. Abb. 1)²⁴.

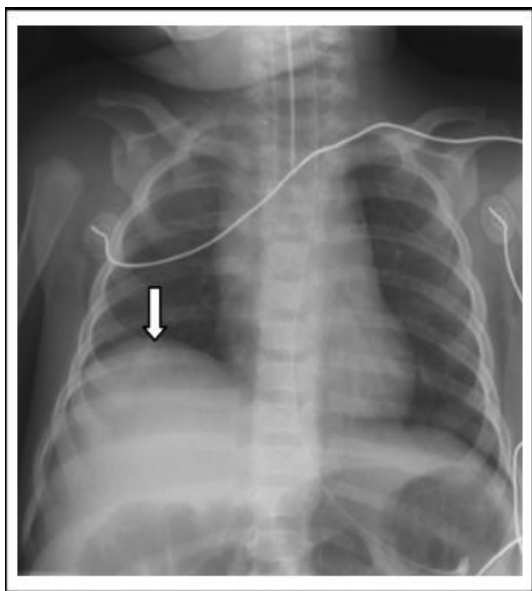


Abbildung 1: Röntgenaufnahme des Thorax a.-p. eines Patienten im Alter von 8 Wochen. Markiert ist der Zwerchfellhochstand rechts.

Erste Symptome der Atemfunktionsstörung können inspiratorischer Stridor oder leises Schreien sein^{26,27}. Atembeschwerden können sich progredient entwickeln oder ohne Vorwarnungen entstehen. Im letzteren Fall ist häufig eine notfallmäßige Intubation notwendig²⁶⁻²⁹. Oftmals treten mit den ersten Anzeichen von Atembeschwerden respiratorische Infekte auf^{16,29-32}. Die Atembeschwerden beginnen meist in den ersten sechs Lebensmonaten, seltener in den ersten Lebenswochen²⁶⁻³³. Nur eine Langzeitbeatmung über ein Tracheostoma gewährleistet das Überleben (s. Abb. 2). Versuche, SMARD1-Betroffene von der Beatmungsmaschine zu entwöhnen, scheiterten²⁶⁻³¹. Im Gegensatz zur SMA Typ I, bei der eine Interkostalmuskelschwäche zu einer langsam fortschreitenden Atemnot und zur Ausbildung eines Glockenthorax führt, bleibt bei SMARD1-Patienten mit der oft abrupten Diaphragmalähmung die Bildung eines Glockenthorax aus^{27,30}.

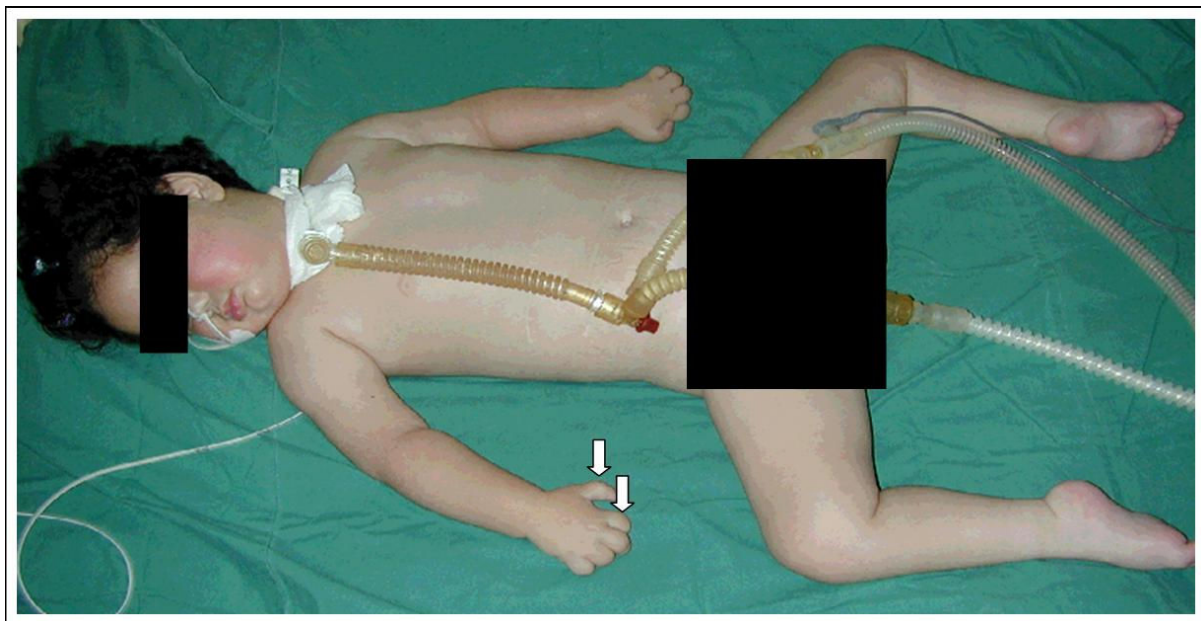


Abbildung 2: Über ein Tracheostoma beatmete Patientin im Alter von 4 Jahren. Charakteristisch ist die distal betonte Muskellähmung mit Krallenhand und Spitzfuß sowie für das fortgeschrittene Krankheitsstadium die Froschschenkelhaltung der Beine aufgrund der geschwächten proximalen Extremitätenmuskulatur. Gekennzeichnet sind "fatty pads" am rechten Daumen und Zeigefinger (s. auch Abb. 3).

1.1.2.3 Neuromuskuläre Symptome

Muskelschwäche und -atrophie bei SMARD1 sind im Gegensatz zur SMA Typ I zunächst distal betont. Die untere Extremität ist früher und stärker betroffen. Im Verlauf kommt es in der Regel zu einer kompletten Tetraparese unter Einbeziehung der Rumpf- und proximalen Muskulatur mit Fuß- und Fingerkontrakturen sowie Skoliosen (s. Abb. 2)^{24-27,29,31}. Durch Fettvakatwucherungen können sich an den Fingern „Fatty Pads“ bilden. (s. Abb. 2,3)^{27,30}.

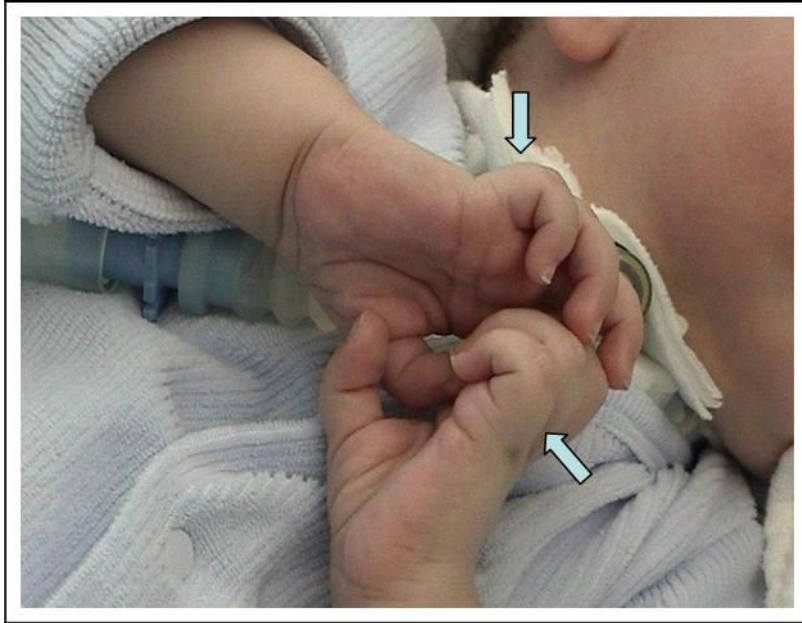


Abbildung 3: Patient G. im Alter von 14 Monaten. Markiert sind "fatty pads" im Bereich der Grundphalangen.

Eine Beteiligung des sensorischen und autonomen Nervensystems manifestiert sich durch verminderte Schmerzperzeption, Obstipation, Blaseninkontinenz, exzessives Schwitzen und arterielle Hypertonie^{27,29,30,34}. Bei einigen Patienten treten Herzrhythmusstörungen auf^{27,30}. Ob diese Folge autonomer Störungen oder struktureller Herzmuskelveränderungen sind, ist nicht abschließend geklärt^{27,30,35}.

1.1.2.4 Elektrophysiologische und neuropathologische Befunde

Dem klinischen Erscheinungsbild entsprechend bestehen elektroneurographische, elektromyographische und histologische Auffälligkeiten. Im Sinne neuropathischer Veränderungen finden sich bei motorischen und sensiblen Nerven verminderte Nervenleitgeschwindigkeiten^{26,27,29,30}. Im Elektromyogramm sind die Muskelaktionspotentiale vergrößert und das Interferenzmuster ist gelichtet^{26,28-31}. Histologisch gleichen die Befunde denen der SMA Typ I: neben Atrophien beider Muskelfasertypen finden sich hypertrophierte Typ-I-Muskelfasern^{6,26-28,30,36}. Die typischerweise als Zeichen von Reinnervation auftretende Fasertypengruppierung fehlt bei SMARD1³⁶. Die motorischen und sensorischen Nerven sind im Sinne einer Waller'schen Degeneration verändert. Dem Untergang der motorischen Vorderhornzellen folgt eine Degeneration der Axone und - im Unterschied zur SMA Typ I - treten auch Myelinveränderungen auf^{26,30,31,36}. Im Diaphragma weisen Muskelfasern eine große Variation ihrer Durchmesser auf^{26,36}.

1.1.2.5 Schwangerschaft und frühkindliche Entwicklung

Retrospektive Befragungen der Eltern SMARD1-Betroffener zu Schwangerschaft und Geburt ergaben, dass Dreiviertel der Kinder ein vermindertes Geburtsgewicht (unterhalb der 10. Perzentile) besaß. Ein Viertel der Kinder kamen als Frühgeborene zur Welt (<37. Schwangerschaftswoche) oder zeigten verminderte intrauterine Bewegungen^{26,27,30,32}. Andere SMARD1-Patienten waren zum Zeitpunkt der Geburt und während der ersten Lebenswochen klinisch unauffällig^{26,28,30,31}.

1.1.2.6 Langzeitprognose der SMARD1

Die Prognose der SMARD1 ist wie die der SMA Typ I schlecht²⁵⁻²⁸. Es finden sich in der Literatur aus der Zeit vor der Genidentifikation keine SMARD1-Betroffenen, die das vierte Lebensjahr überlebten. Meist starben die Kinder innerhalb weniger Monate nach Krankheitsbeginn³⁰. Therapeutische Versuche mit Zwerchfellraffungen verliefen erfolglos^{26,30}. Die Patienten können nur durch Dauerbeatmung überleben^{25-27,29-31}. Es sind derzeit sechs Patienten beschrieben, die viereinhalb bis elf Jahre überlebten³⁰. Bei diesen war zu beobachten, dass nach einer Phase rascher Progression mit der Ausbildung einer Tetraparese und eines schnellen körperlichen Verfalls, eine Verlaufsstabilisierung, wenn auch auf einem niedrigen funktionellen Niveau, folgte. In keinem der beschriebenen Fälle gelang eine Entwöhnung von der Beatmung.

1.1.3 Molekulargenetische Grundlagen spinaler Muskelatrophien

Vergleichbaren pathophysiologischen Vorgängen und einem sowohl bei der SMA Typ I als auch bei der SMARD1 autosomal-rezessivem Erbgang stehen nicht nur klinische Unterschiede (s. Tab. 2), sondern auch genetische Unterschiede gegenüber. Im folgenden Abschnitt werden die molekulargenetischen Grundlagen der SMA Typ I und der SMARD1 dargestellt. Auf die Betrachtung genetischer Besonderheiten anderer SMA-Varianten mit autosomal-dominantem^{37,38} oder X-chromosomalem Erbgang³⁹ wird verzichtet.

Klassische SMA Typ I	SMARD1
Proximal verstärkt ausgeprägte Schwäche der Rumpfmuskulatur	Distal stärker ausgeprägte Muskelschwäche mit Beginn in den Beinen und später folgender Befall der oberen Extremität
Respiratorische Beschwerden resultieren aus einer Lähmung der Interkostalmuskulatur; das Diaphragma ist nicht betroffen; es kann sich ein so genannter Glockenthorax bilden	Respiratorische Beschwerden sind ein initiales Krankheitssymptom und resultieren aus einer Zwerchfelllähmung; ein Glockenthorax bildet sich nicht
Kontrakturen finden sich v. a. an proximalen Gelenken, z.B. Knie- oder Ellenbogengelenk	Kontrakturen sind meist an distalen Extremitätenabschnitten ausgebildet, d.h. im Bereich der Finger oder Füße

Tabelle 2: Gegenüberstellung klinischer Unterschiede von klassischer SMA Typ I und SMARD1.

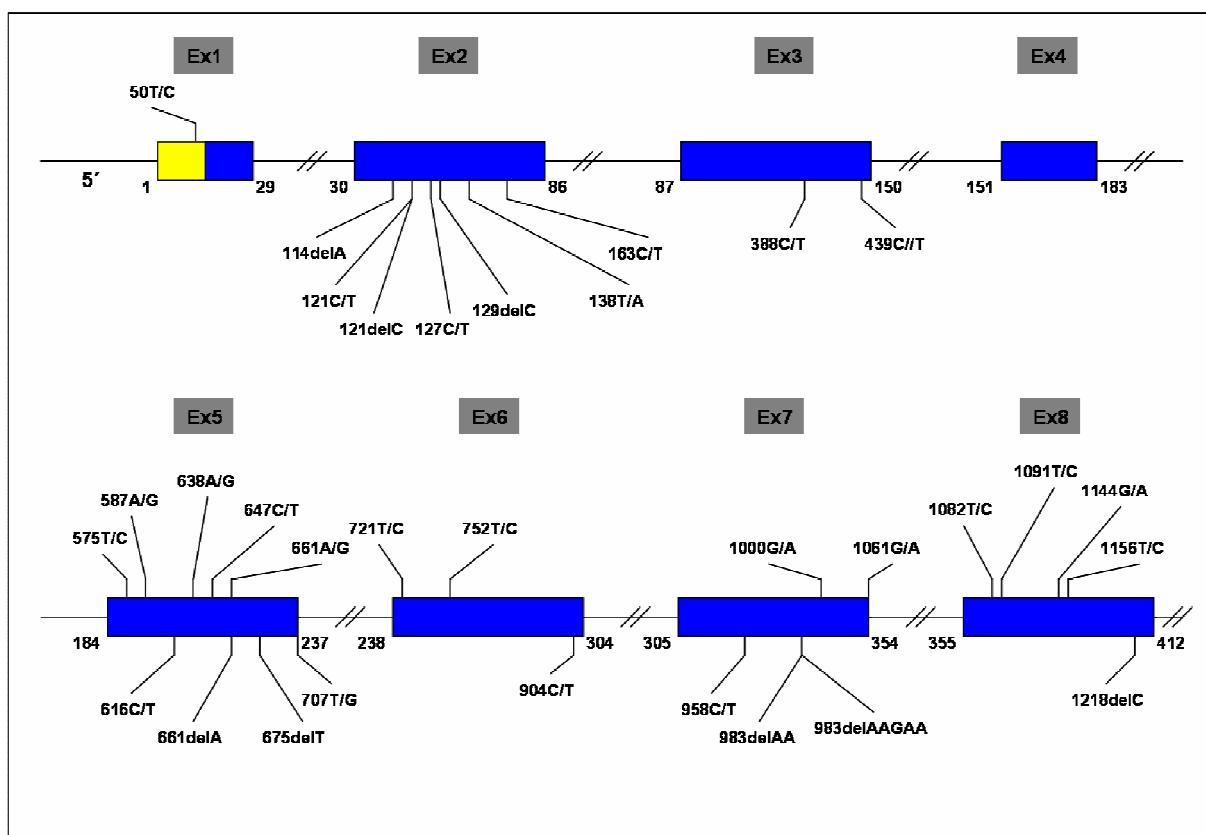
1.1.3.1 Molekulare Grundlagen der klassischen SMA Typ I

Die meisten Fälle von proximaler SMA sind durch Veränderungen im *Survival Motoneuron*-Gen (*SMN*) auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q13) verursacht. Dieser chromosomale Abschnitt hat eine komplexe Struktur mit der invertierten Duplikation eines 500kb großen DNA-Abschnittes. Dieser Abschnitt enthält Kopien des *SMN*-Gens - eine telomerische (*SMN1*) und mindestens eine zentromerische Kopie (*SMN2*)⁴⁰. Homozygote Mutationen oder Deletionen der telomerischen Kopie des *SMN*-Gens/*SMN1* können bei SMA Typ I in 96% nachgewiesen werden^{9,23}. Das zentromerische *SMN2*-Gen unterscheidet sich vom *SMN1*-Gen in nur fünf Nukleotiden. Ein „single nucleotide polymorphism“ (SNP) in der Spleißregion von Exon 7 ist jedoch dafür verantwortlich, dass das Exon 7 des *SMN2*-Transkriptes bei einem Großteil der betreffenden RNAs herausgespleißt wird. Das translatierte Protein (SMN Δ 7) ist verkleinert und wird vorzeitig abgebaut^{41,42}. Die *SMN2*-Kopienanzahl variiert und hat einen entscheidenden Einfluss auf die Krankheitsmanifestation. Je mehr *SMN2*-Kopien vorliegen, desto mehr funktionelles SMN-Protein wird gebildet, das zu einer Abschwächung des Krankheitsbildes führt². Die Funktion des *SMN*-Genproduktes ist unklar und wird kontrovers diskutiert². Einige Gruppen weisen dem SMN eine tragende Rolle im RNA-Metabolismus, genauer in der Produktion von „spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins“ (snRNP) und dem prä-mRNA-Splicing, im Sinne einer „housekeeping“-Funktion zu^{43,44}. Andere Gruppen gehen von einer spezifisch neuronalen SMN-Funktion aus⁴⁵⁻⁴⁷.

1.1.3.2 SMARD1 ist bedingt durch Mutationen im *Immunoglobulin μ -binding protein 2 (IGHMBP2)*-Gen

Kopplungsanalysen für bestimmte SMA-Varianten u.a. auch für die SMA mit respiratorischen Beschwerden deuteten auf eine genetische Heterogenität bei spinalen Muskelatrophien hin^{22,48}. Weiterführende genetische Untersuchungen konnten die SMARD1 dem Chromosomenbereich 11q13-q21 zuordnen²⁴. Mutationen im *Immunoglobulin μ -binding protein 2 (IGHMBP2)*-Gen wurden als Ursache der SMARD1 identifiziert²⁵. Allerdings konnten Veränderungen im *IGHMBP2*-Gen nicht bei allen SMARD-Erkrankten gefunden werden^{24,28}. Aufgrund der genetischen Heterogenität werden SMARD-Betroffene mit *IGHMBP2*-Mutationen der SMARD1 zugeordnet und von SMARD-Fällen, in denen das *IGHMBP2*-Gen keinerlei Veränderungen aufweist, abgegrenzt²⁵.

Bisher sind mehr als 50 SMARD1-Patienten beschrieben worden. Es fanden sich dabei im *IGHMBP2*-Gen homozygote oder compound heterozygote Missense-, Nonsense- und Frameshift-Mutationen sowie Inframe-Deletionen und Insertionen. Veränderungen traten in allen Exons mit Ausnahme der Exons 4 und 14 auf^{25-29,31-33}. Eine intronische Veränderung im Intron 13 ist als „splice donor-site“-Mutation charakterisiert worden²⁵. Zur Übersicht der bisher beschriebenen Mutationen s. Abb. 4.



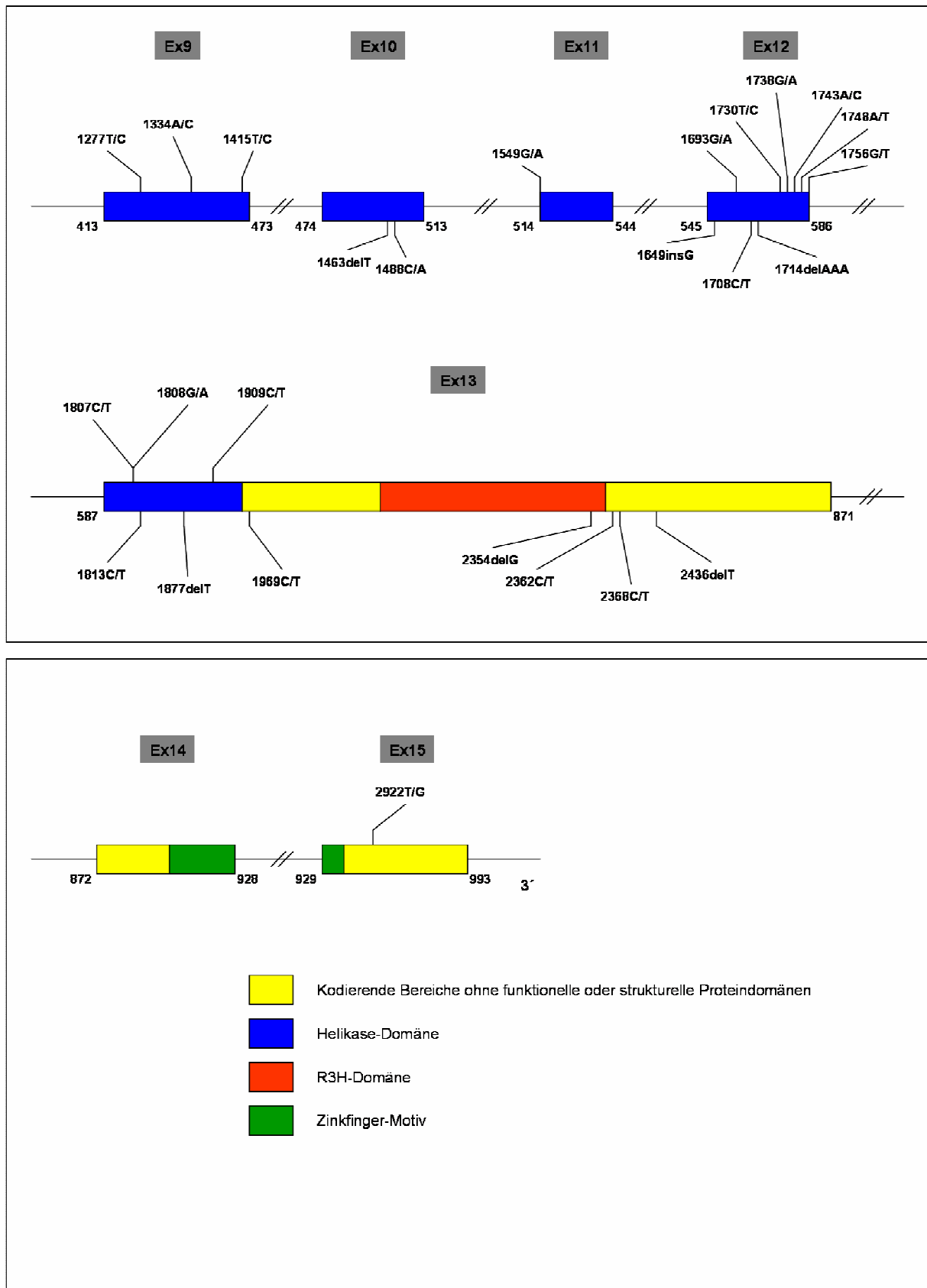


Abbildung 4: Übersicht bisher veröffentlichter Mutationen im *IGHMBP2*-Gen nach ^{25-29,31-33}.

Verschiedene Autoren berichten, dass bei einigen Patienten mit dem klinischen Bild der SMARD1 *IGHMBP2*-Mutationen jeweils nur auf einem Allel nachweisbar sind²⁶⁻²⁸. Die molekulargenetischen Untersuchungen bei diesen Arbeiten beschränkten sich allerdings auf die Exons und die exonflankierenden Intronbereiche. In einer nachfolgenden Arbeit konnten „genomische Rearrangements“ bei den zwei von Grohmann et al.²⁷ beschriebenen Fällen auf dem anderen Allel nachgewiesen werden³².

Das Genprodukt von *IGHMBP2* besteht aus 993 Aminosäuren und enthält drei verschiedene funktionelle Domänen: eine Helikase-Domäne^{49,50}, eine R3H-Domäne⁵¹ und ein Zinkfinger-Motiv²⁷. Die genaue zelluläre Funktion des *IGHMBP2* ist unbekannt. *IGHMBP2* wird in ubiquitär exprimiert; die höchsten Konzentrationen finden sich in den Testes. Der Helikase-Domäne wird eine Rolle bei der Umwandlung von prä-mRNA zu reifer mRNA im Spliceosomenkomplex zugesprochen⁵⁰. Auch für die R3H-Domäne wird eine Funktion im Polynukleotidmetabolismus vermutet⁵². Das Zinkfingermotiv ist als DNA-bindendes Motiv von vielen Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichen Spezies konserviert. Spezielle Zinkfinger werden auch mit dem RNA-Metabolismus oder Protein-Proteininteraktion in Verbindung gebracht⁵³. Andere Arbeitsgruppen vermuten aufgrund von Sequenzhomologien für das *IGHMBP2*-Genprodukt eine Rolle im Immunglobulin-Klassenwechsel^{49,54}. Eine Funktion als Transkriptionsfaktor wird sowohl *IGHMBP2*⁵⁵ als auch „glial factor 1“ (GF-1), einer verkürzten Proteinvariante des *IGHMBP2*, zugesprochen⁵⁶.

Das Tiermodell der SMARD1 ist die „neuromuscular degeneration“-(*nmd*)-Maus: Der Phänotyp ist bedingt durch Mutationen im *Subp2/Ighmbp2*-Gen^{25,35,57-61}. Ein Großteil der klinischen Symptome der *nmd*-Maus ist mit denen SMARD1-Betroffener vergleichbar. Unterschiede bestehen allerdings bei der Beteiligung des sensorischen Nervensystems, des Diaphragmas bzw. der Ateminsuffizienz und der Herzmuskulatur^{36,59,60}. Trotzdem konnten durch Untersuchung der *nmd*-Maus erste pathomechanistische Modelle erstellt und sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zur klassischen SMA bzw. dem entsprechenden Tiermodell deutlich gemacht werden⁶⁰: Dem *IGHMBP2*-Genprodukt wird wie dem *SMN*-Genprodukt eine Rolle im RNA-Metabolismus zugesprochen. Das *SMN*-Genprodukt soll allerdings neben einer Beteiligung am spliceosomalen Multienzymkomplex auch eine neuronenspezifische Wirkung haben (s.o.). Folge von *SMN*-Mutationen sollen u.a. Axondegeneration und Störung des Axonwachstums sein, wobei die Lebensdauer der Motoneurone unverändert ist⁴⁷. An kultivierten Motoneuronen der *nmd*-Maus fehlen Anhaltspunkte für Störungen des Axonwachstums oder der Axonterminalenintegrität. Histologisch kann im Rückenmark der *nmd*-Maus bereits vor der Entwicklung der Muskelschwäche ein Motoneuronverlust im Sinne eines verfrühten Zelltodes nachgewiesen werden⁶⁰.

Eine Bedeutung des IGHMBP2 außerhalb des Motoneurons lieferte die Beobachtung myopathischer Veränderungen im Bereich des Zwerchfells und der Herzmuskulatur^{35,59,60}.

Mutationen im *IGHMBP2*-Gen fanden sich nicht nur in primär als SMARD klassifizierten Krankheiten. Mutationen konnten auch bei der „Inherited early onset severe axonal polyneuropathy with respiratory failure and autonomic involvement“³⁴, bei der “severe infantile axonal neuropathy with respiratory failure”^{26,62} und der “distal hereditary motor neuronopathy type VI”⁶³ nachgewiesen werden. Diese Krankheitsbezeichnungen sind Synonyma für SMARD1. Die nosologische Heterogenität verdeutlicht jedoch nicht nur die terminologischen Probleme, sondern ist auch Ausdruck der klinischen Heterogenität^{26,27}.

1.1.4 Die Prävalenz der SMARD1

Genauere Angaben zur Prävalenz der SMARD1 gibt es nicht. Es wird geschätzt, dass SMARD-Erkrankungen etwa 1% der infantilen spinalen Muskelatrophien ausmachen³⁰. Es ist allerdings zu beachten, dass die klinische Heterogenität über die tatsächliche Prävalenz von *IGHMBP2*-gekoppelten Krankheiten in der Bevölkerung hinwegtäuschen kann²⁷.

1.2 Der plötzliche Säuglingstod/Sudden Infant Death Syndrome (SIDS)

1.2.1 Allgemeine Definition und historische Beschreibungen

Der plötzliche Säuglingstod/„sudden infant death syndrome“ (SIDS) ist definiert als der unerwartete Tod eines Säuglings im ersten Lebensjahr, bei dem sorgfältige postmortale Untersuchungen einschließlich Obduktion nicht zum Nachweis einer adäquaten Todesursache führen^{64,65}. Plötzliche Todesfälle von Kindern werden seit Jahrhunderten beschrieben und sind nach wie vor in den Industrienationen die häufigste Todesursache der Postneonatalperiode⁶⁶⁻⁶⁸. Eine erste Beschreibung findet sich nicht in medizinischer Fachliteratur, sondern ist ein Zitat aus dem Alten Testament (3. Kapitel im 1. Buch der Könige, Vers 16) und im Zusammenhang mit diesem Ereignis fällt König Salomon das sprichwörtlich gewordene „Salomonische Urteil“:

„Und der Sohn dieser Frau starb in der Nacht, denn sie hatte ihn im Schlaf erdrückt“

Im Florenz des 18. Jahrhunderts sollten so genannte „Arcuccios“ das Ersticken schlafender Säuglinge verhindern⁶⁹ (s. Abb. 5). Das Ersticken oder Erdrücken hat sich bis in das zwanzigste Jahrhundert als pathophysiologisches Konzept für den plötzlichen Säuglingstod gehalten^{70,71}.

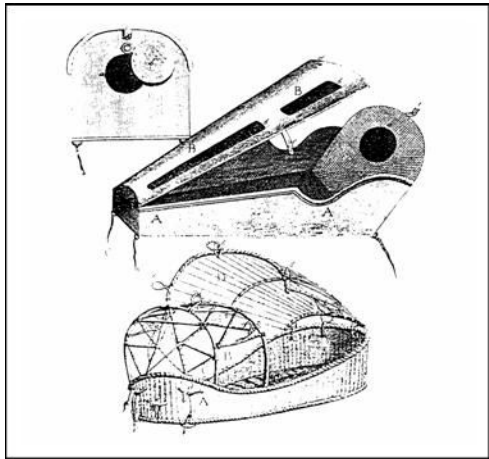


Abbildung 5: „Arcuccios“ sollten im Florenz des 18. Jahrhunderts das Ersticken schlafender Säuglinge verhindern ⁷².

Vielleicht wurden für keine andere Erkrankung mehr Ursachen und auslösende Faktoren diskutiert als für SIDS. Bis zum heutigen Tage wurde eine Vielzahl an pathophysiologischen Konzepten entwickelt ⁷¹. Während im Jahre 1969 auf der “Second International Conference on Causes of Sudden Deaths in Infants“ eine einzige Ursache bzw. ein einziger pathophysiologischer Mechanismus als Ursache für SIDS angenommen wurde ⁶⁵, wurden in den folgenden Jahren und Jahrzehnten unterschiedlichste Konzepte entworfen, verworfen, überarbeitet oder das SIDS als eigene Krankheitsentität sogar ganz in Frage gestellt ⁷³.

1.2.2 Epidemiologische Aspekte und Risikofaktoren

Das SIDS zeigt eine charakteristische Alters- und Geschlechtsverteilung. Einen Sterblichkeitsgipfel findet man vom zweiten bis fünften Lebensmonat ⁷⁴⁻⁷⁷; männliche Säuglinge sind häufiger betroffen ^{74,75}. Epidemiologische Studien in den neunziger Jahren identifizierten die Bauchschlafposition als einen Risikofaktor und durch die in vielen Ländern anschließend durchgeführten „Back to sleep“-Kampagnen konnte ein Einfluss der Schlafposition für SIDS bestätigt werden ^{74,78,79}. SIDS-Fälle ereignen sich gehäuft in der kalten, infektbelasteten Jahreszeit und treten häufiger bei Kindern jüngerer Mütter mit einem niedrigeren sozioökonomischen Status, geringerem Bildungsniveau und verminderter Inanspruchnahme pränataler Vorsorgeuntersuchungen auf ^{74,79-84}. Frühgeburtlichkeit und ein geringeres Geburtsgewicht korrelieren positiv mit SIDS ^{74,79}. Weiterhin sind Nikotinabusus der Mutter während der Schwangerschaft und nach der Geburt, Stillverzicht, Multiparität und verkürzte Intervalle zwischen aufeinander folgenden Schwangerschaften mit einer erhöhten Inzidenzrate verbunden ^{74,79}. Eine Übersicht der Risikofaktoren gibt Tab. 3.

Schlafen in Bauchlage
Frühgeburtlichkeit
Kalte Jahreszeit
Geringes Geburtsgewicht
Multiparität und geringes Intervall zwischen den Geburten
Mütterliches Alter unter 20 Jahren
Männliches Geschlecht
Zigarettenkonsum der Mutter während der Schwangerschaft und nach der Geburt
Geringer sozialer Familienstatus

Tabelle 3: Epidemiologische Risikofaktoren des SIDS nach ⁷¹

1.2.3 Leichenschau und Obduktionsbefunde

Das SIDS stellt per definitionem eine Ausschlussdiagnose dar. Leichenschau und Obduktion zeigen jedoch wiederkehrende, wenn auch nicht pathognomonische Befunde ⁶⁵: Die Säuglinge haben häufig zyanotisch veränderte Nagelbetten und Lippen ⁸⁵. Als Hinweise auf verstärktes Schwitzen in der Phase der Agonie sind feuchte Haare und Bekleidung zu beobachten ⁸⁶. Im Bereich des Hirnstamms kann eine Gliose vorhanden sein, die als Zeichen einer chronisch hypoxischen Stoffwechselsituation gewertet wird ⁸⁷. Inflammatorische Infiltrate als Hinweis auf Infekte finden sich häufig im Bereich des Respirationstrakts ⁸⁸.

1.2.4 Pathophysiologische Hypothesen

Kardiorespiratorische Störungen im weitesten Sinne gehören zu den traditionell vermuteten Ursachen des SIDS ^{67,71,89}. Störungen werden dabei bei den zentralen Chemorezeptoren, den peripheren Barorezeptoren, in den Kontrollzentren des Hirnstammes oder im Bereich der oberen und unteren Atemwege vermutet ⁷¹. Herzrhythmusstörungen und eine gestörte Herzfrequenzvariabilität sind kardiale Störungen, die mit SIDS in Verbindung gebracht werden ⁹⁰.

Ein Sterblichkeitsgipfel in der infektbelasteten, kalten Jahreszeit und histopathologische Auffälligkeiten v.a. im Respirationstrakt unterstützten so genannte Infekttheorien ^{91,92}.

Für eine Vielzahl menschlicher Erkrankung werden neben Umweltfaktoren genetische Einflussfaktoren vermutet ^{93,94}. Auch für SIDS werden genetische Einflüsse gefordert ⁹⁵. Genetische Veränderungen, die zu Krankheiten mit akuten lebensbedrohlichen Ereignissen führen, sind potentielle Ursachen des SIDS oder sind als prädisponierende Faktoren anzusehen ⁹⁶.

1.2.4.1 Genetische Veränderungen, die einen plötzlichen Säuglingstod auslösen können

Mutationen, die bei SIDS-Fällen nachgewiesen wurden, betreffen einerseits das mitochondriale „*medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*“-(*MCAD*)-Gen^{97,98} und andererseits Gene, die für kardiale Ionenkanäle kodieren (s. Abb. 6)⁹⁶. Neben dem *MCAD*-Gen werden auch Mutationen anderer Gene des Fettsäuremetabolismus mit dem SIDS in Verbindung gebracht⁹⁷. Genetisch bedingte Störungen des Fettstoffwechsels dürften für 3-5% aller SIDS-Fälle verantwortlich sein⁹⁶. Long QT-Syndrome (LQTS) sind seltene, genetisch heterogene Krankheiten, die durch Veränderungen verschiedener myokardialer Ionenkanäle bedingt sind⁹⁰. Bei einigen SIDS-Patienten konnten Mutationen in Genen, die ein LQTS bedingen, nachgewiesen werden⁹⁹⁻¹⁰³.

1.2.4.2 Genetische Polymorphismen, die zu SIDS prädisponieren

Man vermutet, dass das histopathologisch nachweisbar aktivierte Immunsystem in SIDS-Betroffenen (s.o.) Zeichen einer erhöhten Infektvulnerabilität ist⁹⁶. Genetische Polymorphismen, die eine derartige Vulnerabilität vermitteln können, wurden für den Komplementfaktor C4 und das Interleukin 10 (IL-10) nachgewiesen^{104,105}.

Mit der Bedeutung des Neurotransmitters Serotonin (5-HT) für die Regulation des kardiorespiratorischen Systems, der Körpertemperatur, des Schlaf-Wach-Rhythmus und als Vermittler zwischen Nerven- und Immunsystem wird der 5-HT-Metabolismus zu einem wichtigen Forschungsfeld¹⁰⁶. Veränderungen in verschiedenen Genen, die am Serotoninmetabolismus beteiligt sind, konnten bei SIDS-Fällen gezeigt werden¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Andere Studien konnten Mutationen in Genen identifizieren, die an der embryologischen Entwicklung des autonomen Nervensystems beteiligt sind¹¹⁰. Eine Übersicht der vermuteten Verteilung genetischer Ursachen bei SIDS gibt Abb. 6.

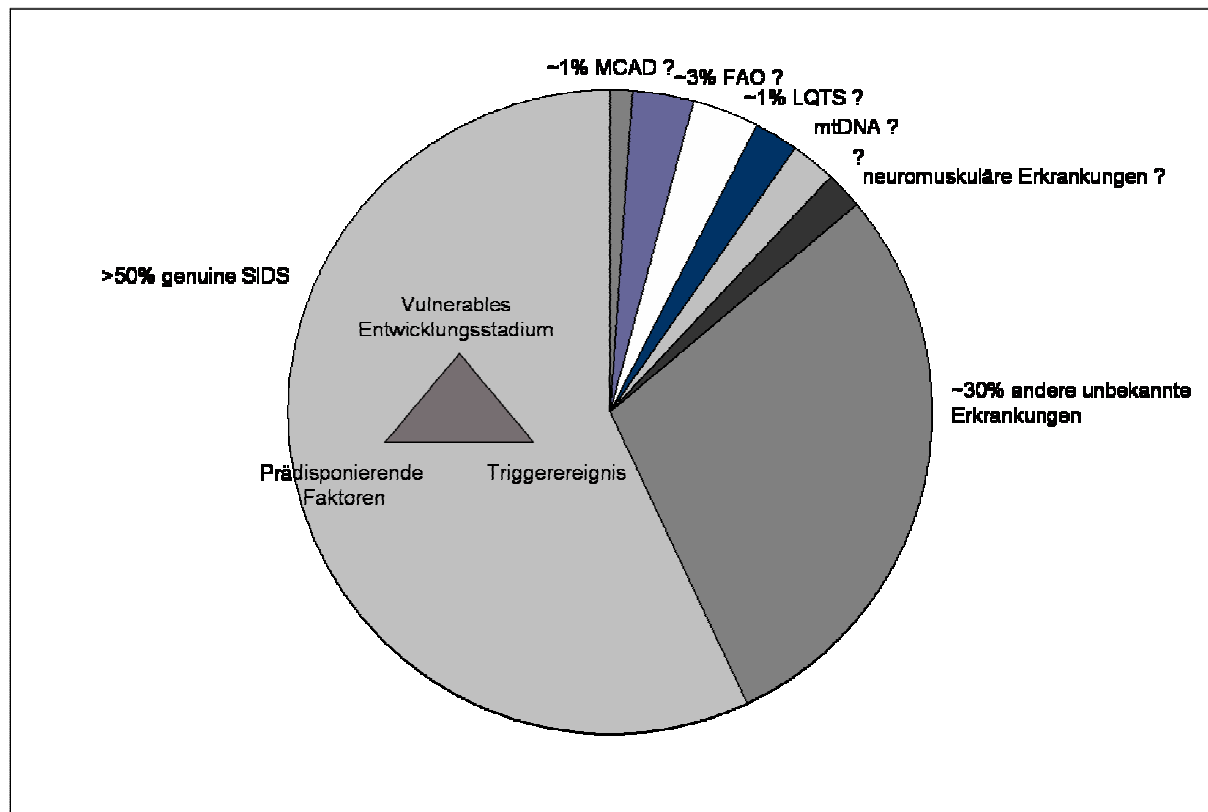


Abbildung 6: Opdal unterscheidet genuine SIDS-Fälle und erklärable SIDS-Fälle. Genuine SIDS-Fälle treten infolge einer Kombination aus Triggerereignis und prädisponierenden Faktoren in einem vulnerablen Entwicklungsstadium auf (linke Abbildungshälfte). Ursachen erklärbarer SIDS-Fälle sind Mutationen im *MCAD* (*medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*)-Gen, der mitochondrialen DNA (mtDNA), andere FAOs (Fatty acid oxidation disorders), LQTS (LongQT-Syndrome), neuromuskuläre oder bisher unbekannte Krankheiten⁹⁶.

1.2.4.3 Das Diaphragma und der Nervus phrenicus im Zusammenhang mit SIDS

Obwohl Atemfunktionsstörungen in verschiedensten Zusammenhängen mit SIDS in Verbindung gebracht werden, ist wenig über Veränderungen im Bereich des Diaphragmas und des Nervus phrenicus bekannt¹¹¹.

Histopathologische Studien bezüglich Zwerchfellentwicklung und Muskelfasergruppenverteilungen lieferten widersprüchliche Ergebnisse¹¹¹⁻¹¹³. Neuropathische Veränderungen des Nervus phrenicus konnten in einer Studie mit insgesamt 24 Patienten in einem Fall gefunden werden. Es wird vermutet, dass derartige Veränderungen über eine respiratorische Dekompensation SIDS verursachen können¹¹¹.

1.2.5 Forensische Einteilung

Todesfälle im Kindesalter, deren Autopsie die Zuordnung zu natürlichen (z.B. Infektionen) oder nicht-natürlichen Todesfällen (z.B. Kindesmissbrauch) ermöglicht (non-SIDS), werden gemein-

sam mit den Fällen des plötzlichen Säuglingstodes/„Sudden Infant Death Syndrome“ (SIDS), bei denen durch die Autopsie keine Todesursache nachweisen werden konnte, unter dem Oberbegriff „plötzliche, unerwartete Todesfälle im Kindesalter“/„Sudden, Unexpected Death in Infancy“/SUDI) zusammengefasst ¹¹⁴. Unter den „plötzlichen, unerwarteten Todesfällen im Kindesalter/Sudden Unexpected Death in Infancy/SUDI“ machen SIDS-Fälle mit 80-82% den Hauptanteil aus ¹¹⁵.

Um eine bessere internationale Vergleichbarkeit und Erleichterung von Forschungstätigkeiten zu ermöglichen, wurden definierte SIDS-Unterklassen mit Berücksichtigung epidemiologischer Aspekte, pathologischer Befunde und dem Ausmaß der durchgeführten Untersuchungsmaßnahmen eingeführt ^{65,73}. Für die Studie „Plötzlicher Säuglingstod“/„German study on Sudden Infant Death“ (GeSID) wurden alle Fälle in vier Kategorien eingeteilt, wobei SIDS mit Kategorie 1 keine pathologischen Auffälligkeiten besaßen, SIDS der Kategorie 2 geringe und der Kategorie 3 ausgeprägte Befunde aufwiesen. Fälle der Kategorie 4 hatten eine erklärbare Todesursache - sie wurden als non-SIDS klassifiziert ⁶⁸.

2 Zielsetzung

Im Zusammenhang mit dem plötzlichen Säuglingstod wurde in Einzelfällen über eine Verbindung zu verschiedenen neuromuskulären, genetischen Krankheiten berichtet^{96,111}. Plötzliche Todesfälle im Kindesalter traten bei Myophosphorylase-Defekten¹¹⁶, kongenitaler Myotonischer Dystrophie¹¹⁷ und dem Leigh-Syndrom auf¹¹⁸. Eine Vielzahl von Autoren vermutet Veränderungen im Bereich des Nervensystems als einen ätiologischen Faktor beim SIDS^{119,120}. Obwohl das Diaphragma der wichtigste Atemmuskel des Kindes ist, finden sich nur wenige und teilweise widersprüchliche Abhandlungen zu der Bedeutung des Zwerchfells für SIDS¹¹¹; genetische Untersuchungen fehlen.

Im Zusammenhang mit der SMARD1 finden sich Berichte, bei denen erste Krankheitsmanifestationen als Near-miss-SIDS-Fälle oder SIDS-Fälle eingeordnet wurden^{16,21,24,27}. Bei den in unserer Abteilung untersuchten 48 SMARD1-Patienten traten in zwei Familien jeweils plötzliche Todesfälle im Säuglingsalter bei einem älteren Geschwisterkind auf. Ein Vergleich der klinischen Manifestation verdeutlicht, dass sich der Phänotyp der SMARD1 und SIDS überschneiden kann und der Tod eines SMARD1-Patienten als SIDS fehldiagnostiziert werden könnte. Ein Sterblichkeitsgipfel bei SIDS besteht vom zweiten bis fünften Lebensmonat. Das klinisch wichtigste Hauptsymptom der SMARD1 ist die aus einer Zwerchfelllähmung resultierende Ateminsuffizienz. Diese tritt typischerweise im Alter zwischen 6 Wochen und 6 Monaten auf und kann sich akut, d.h., ohne Vorwarnungen und begleitende Krankheitssymptome entwickeln¹²¹. Infekte sind anfangs häufige Begleiterkrankung, aber auch erste Krankheitssymptome der SMARD1 werden häufig als Infekt fehlinterpretiert²⁶⁻²⁹. Inflammatorische Infiltrate als histologisches Zeichen von Infekten sind auch beim SIDS ein häufiger Obduktionsbefund⁸⁸. Neben respiratorischen gehören kardiale Störungen und da v.a. Herzrhythmusstörungen zu den traditionell vermuteten Ursachen des SIDS^{67,71,89}. Herzrhythmusstörungen sind auch bei SMARD1-Betroffenen ein anzutreffendes Symptom²⁷. Risikofaktoren, die bei dem SIDS regelmäßig auftreten, sind u.a. Frühgeburtlichkeit und ein geringeres Geburtsgewicht⁷⁴⁻⁷⁷. Diese finden sich auch häufig bei SMARD1-Betroffenen²⁷.

Ziel dieser Arbeit ist die:

- Zusammenfassung klinischer Befunde und molekulargenetischer Ergebnisse einer der zwei Familien, in denen neben SMARD1-Fällen ein SIDS-Fall auftrat.

-
- vergleichende molekulargenetische Untersuchung des *IGHMBP2*-Gens bei 155 SIDS-Fällen und 35 non-SIDS-Fällen nach Etablierung geeigneter Untersuchungsmethoden.
 - Diskussion, ob die SMARD1 als Beispiel einer neuromuskulären Erkrankung mit Zwerchfellbeteiligung in ätiologischem Zusammenhang mit dem plötzlichen Säuglingstod steht.

3 Material

3.1 Patienten

Die Patientenrekrutierung erfolgte im Rahmen der Studie „Plötzlicher Säuglingstod“/„German study on Sudden Infant Death“ (GeSID) unter Leitung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster im Zeitraum vom 01.11.1998 bis 30.10.2001. Nachdem eine Kooperation zwischen der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie der Charité zu Berlin und dem Referenzzentrum eingegangen wurde, wurden insgesamt 237 Fibroblastenkulturen zugesandt. Aufgrund der schlechten Qualität einiger Zelllinien misslang deren Anzucht und DNA konnte nur von 155 SIDS-Fällen und 35 non-SIDS-Fällen untersucht werden. Die ethnische Herkunft ist in 75% der von uns untersuchten Fälle durch die Studienzentrale erfragt worden. 87% der Probanden sind mitteleuropäischer Herkunft, in 13% der Fälle stammen die Eltern der Kinder aus anderen Kulturkreisen, wobei die meisten türkischer Herkunft sind. Die klinischen Daten der GeSID wurden bei Proben mit unbekanntem Missense-Veränderungen im *IGHMBP2*-Gen ausgewertet. Zur Auswertung diente ein Fragebogen, der bei der genetischen Beratung von SMARD1-Betroffenen in unserer Abteilung verwendet wird. Dieser enthält Fragen zur allgemeinen frühkindlichen Entwicklung und zur Schwangerschaft.

Die DNA-Proben der beschriebenen Familie wurden zur molekulargenetischen Untersuchung unserer Abteilung zugeschickt. Die klinischen Daten der aus dem Kosovo stammenden Familie wurden freundlicherweise von Herrn Oberarzt Dr. Dilch am Peyerschen Kinderspital Wien bereitgestellt.

Als Positivkontrollen für die Etablierung der DHPLC-Untersuchungen dienten SMARD1-Patientenproben mit Mutationen aus der Routinediagnostik. 148 gesunde Blutspender wurden als Kontrollpersonen untersucht. Zusätzlich wurden 308 Laborkontrollen einbezogen. Hierbei handelt es sich um Patienten mit der Verdachtsdiagnose SMARD1, die jedoch – abgesehen von den bekannten Polymorphismen – keine Mutationen aufwiesen.

Die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten bzw. derer Eltern zur diagnostischen, wissenschaftlichen und molekulargenetischen Untersuchung ist in allen Fällen gegeben.

3.2 Geräte

Geräte	Typ	Hersteller
CO ₂ -Inkubator	BIOSAFE eco	Integra Biosciences
Elektrophoresekammer	Sunrise 96	Life Technologies
	Horizon 1114	Gibco BRL
Netzgerät	Electrophoresis Power Supply	Gibco BRL
	ST 606 T	
Heizblock		Renner GmbH
	Thermostat 5320	Eppendorf
Invertmikroskop		Zeiss
Mikrowelle		Bosch
Photometer	Gene Quant II	Pharmacia Biotech
Pipetten		Eppendorf
		Gilson
		Finnpipette
Sequenzierer	ABI-Prism 310 bzw. 3100 Genetic Analyser	
Thermocycler	GeneAmp PCR-System (9600 bzw. 2400)	Perkin Elmer
	PCR Exprss HBPX 220	Thermo Hybaid GmbH
Überkopfmischer		Heidolph
UV-Flächenstrahler		Herolab
Videokamera		Herolab
Vortex	Vibrofix VF1 Electronic	Jahnke & Kunkel
Wasserbad		GFL
Waage	BP 3100 S	Satorius
WAVE™ DNA Fragment Analysis System		Transgenomic
Zentrifugen	5415 C	Eppendorf
	400 R	Heraeus
	Megafuge 2.0	Heraeus

3.3 Computer-Software

Programm	Verwendungszweck
EASY Plus	Agarosegeldarstellung
Sequencing Analysis 3.4.1.	Sequenzierungsauswertung
WAVE TM Maker 3.4.	DHPLC-Analysenauswertung
HWE-Berechnung	http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/snps.html
NNSPLICE 0.9	Spleißprädiktion http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

3.4 Chemikalien und Biochemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle/Hersteller
1-kb-DNA-Marker	Gibco BRL
Acetonitril (HPLC Ultra Gradient Grade)	Roth
Agarose (electrophoresis grade)	Invitrogen-Life Technologies
Antibiotika (Penicillin, Streptomycin)	Gibco
Chloroform	J.T.Baker
Earle MEM	Biochrom
Exonuklease I (Exo I) (20U/μl)	New England Bio Labs
Exonuklease I-Puffer (10x)	New England Bio Labs
dHPLC H ₂ O	J. T. Baker
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
dNTP-Set	Rapidozym
Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA)	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH
Gen Therm TM DNA-Polymerase (50U/μl)	Rapidozym
L- Glutamin	Biochrom
Isopropanol	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Natrium- Perchorat	Merck

Orange G (Ladepuffer)	Merck
Phenol	Merck
Proteinase K	Merck
SAP (shrimp alkaline phosphatase)	Roche
SAP- Puffer (10x)	Roche
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Saccharose (sucrose)	Merck
Taq-Polymerase-Puffer(10x)	InViTek
Triethylammonium-Acetat (TEAA)	Transgenomic
Tris-Base	Roth
Triton X-100	Serva
Trypsin/EDTA	Gibco BRL

3.5 *Verwendete Kits*

ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Applied Biosystems

3.6 *Zusammensetzung verwendeter Lösungen und Puffer*

3.6.1 *Agarosegelelektrophorese*

10x TBE-Puffer	540g	Tris-Base
	257g	Borsäure
	46,5g	EDTA
	ad 5l	H ₂ O

3.6.2 *DNA-Extraktion*

10x TE-Puffer	12g	Tris-Base
	3,7g	EDTA
	ad 1l	H ₂ O
10x PBS Puffer	10,9g	Na ₂ HPO ₄
	3,2g	NaH ₂ PO ₄

	90g	NaCl
	ad 1l	H ₂ O
Lösung A (DNA-Extraktion)	109,5g	Saccharose
	5ml	MgCl ₂ (1M)
	10ml	Triton X
	10ml	Tris-HCl (1M, pH 8,0)
	ad 1l	H ₂ O
Lösung B (DNA-Extraktion)	40ml	Tris-HCl (1M, pH 8,0)
	12ml	Na-EDTA (0,5M)
	15ml	NaCl (1M)
	5 ml	SDS (20%), Zugabe nach Autoklavierung
	ad 100ml	H ₂ O
Lösung C (DNA-Extraktion)	100g	Na-Perchlorat
	ad 142ml	H ₂ O

3.6.3 Wave™

Puffer A	100ml	2 M TEAA
	500µl	Acetonitril
	ad 2l	Milipore Wasser (18,2Ω)
Puffer B	100ml	2M TEAA
	500ml	Acetonitril
	ad 2l	Milipore Wasser (18,2Ω)
Puffer C (8% Acetonitril)	80ml	Acetonitril
	ad 2l	Milipore Wasser (18,2Ω)

Puffer D	750ml	Acetonitril
	ad 11	Milipore Wasser (18,2Ω)

3.6.4 Zellkulturmedien

Earle MEM	87,5ml Earle MEM
	12,5ml FKS
	1,0ml L- Glutamin
	Antibiotika (Penicillin, Streptomycin) in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration

3.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Blue Cap Röhrchen (50ml)	Falcon
Eppendorf Cups (0,5 und 1,5ml)	Sarstedt
Kryoröhrchen	Greiner
Falcon-Kulturflaschen	Becton Dickinson (50ml)
	TPP (250ml)
Pasteur-Pipetten	Sarstedt
PCR-Tubes	Biozym
Pipettenspitzen	Gilson
	Sarstedt
	Eppendorf
PPN-Röhrchen	Sarstedt
Thermopapier	Mitsubishi
96-Well Platten	ABgene
Zentrifugenröhrchen	Becton Dickinson

3.8 Primer

Oligonukleotidprimer wurden von der Firma Thermo Hybaid bezogen. Es wurden Stockverdünnungen (100pmol/μl) und Arbeitsverdünnungen (10pmol/μl) angelegt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

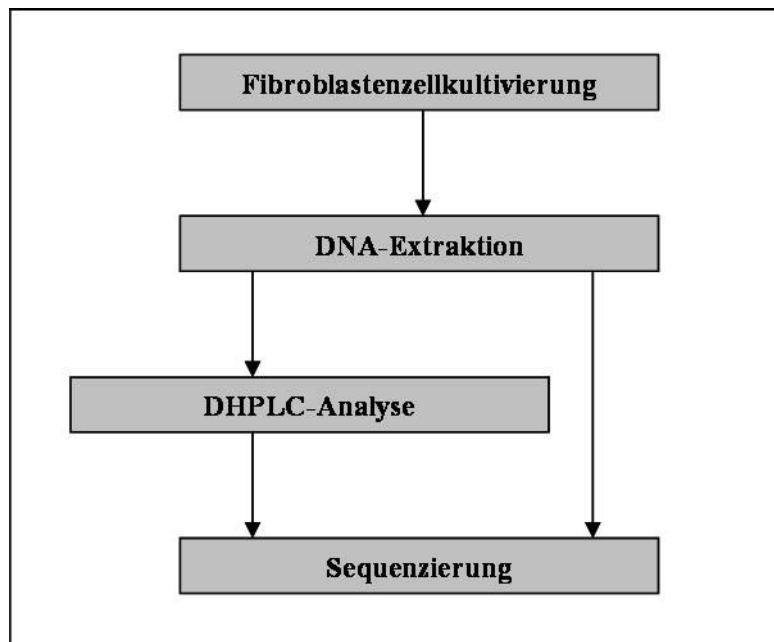
Die verwendeten Primer, die Länge der Amplifikationsprodukte sowie die verwendeten Annealingtemperaturen sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Primer	Nukleotidsequenz (in 5'-3'-Richtung)	Amplifikatlänge (bp)	Annealingtemperatur (in °C)
Ex 1 F	AGG TGA CCG TCA GGG AAG AT	412	57
Ex 1 R	GAG ACT GAC AAC T CG GGA GGT		
Ex 2 F	GGT GGG TGG AAG TAG AAA CTA GTA AA	334	51,5
Ex 2 R	GTA CAA GTC ACG GTC TGA ATG C		
Ex 3 F	TCC CCA GTG TCT TGT GTC ACT	278	TD 58- 52
Ex 3 R	TGT TGA AGG AAG ATG GTA CTT AGG A		
Ex 4 F	CAA GTC ATG GTG GGT GTG	276	57
Ex 4 R	CCC AAG GTC ACA CTG TTC TCT AT		
Ex 5 F	GAG GAA CAC CCA CAG AGC TCC CC	255	59
Ex 5 R	CTC TGA CAG GGA AGT GGC AT		
Ex 6 F	CAA CTT CAG TGG TTT GAT TAC	315	53
Ex 6 R	AAA GAC TGC AGA TCA GAG GC		
Ex 7 F	GAA CTG GAC TGA ATG ATA GAA GCA C	290	59
Ex 7 R	AAC TCC TTC TTC GAG GCC ACA C		
Ex 8 F	ATG CAA GCC TTG ATG AAA CC	279	57,5
Ex 8 R	GCG ACG TTG AGA TGA ATG AA		
Ex 9 F	TCC TCC TCA CTT GCT GTG GT	327	TD 58- 52
Ex 9 R	AAC AGG TGA CGC AGA GGA TTA G		
Ex 10 F	CCT ACC TAA GCC TTT TCC TCG	330	57
Ex 10 R	CAA CTG CTC TCA GCT CCT CC		
Ex 11 F	ATA GAC AGA AAC GTG CCC GA	223	TD 58- 52
Ex 11 R	AGC TGC TCT GTA GAG GGA CAA A		
Ex 12 F	AGG TCC TGG CTG TTT CAC AG	301	TD 58- 52
Ex 12 R	CCA ATA TGC CCC TCA ATC AA		
Ex 13 F	ACT ACA CTT TTG GTG GTG GTT ACT G	980	TD 58- 52
Ex 13 int.	TCA TCA CTG TGA GCA AGA GG		
Ex 13 R	CAG TTG ATT ATT CTT GAA CCC CGT		
Ex 14 F	GTC TTT CCG TTT GCC TGA GT	308	TD 58- 52
Ex 14 R	GTT CCG ACT GGA ACA AGT CTG		
Ex 15F	GTG AGC CCA GCA GTG ATT CT	421	TD 58- 52
Ex 15R	CTC CAC ATT GTG ACA TCG GA		

Tabelle 4: Primersequenzen, PCR-Produktlängen, Annealingtemperaturen

4 Methoden

4.1 Fließschema der Arbeitsschritte



4.2 Zellkultivierung, Kryokonservierung und DNA-Extraktion

4.2.1 Auftauen von Zellen

Tiefgefrorene Kryoröhrchen wurden aus flüssigem Stickstoff in ein 37°C-Wasserbad überführt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in 10ml Nährmedium aufgenommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde anschließend verworfen und die Zellen in 4ml Nährmedium resuspendiert und in 50ml-Kulturflaschen überführt. Es folgte die Inkubation im Brutschrank bei 37°C. In den ersten zwei Stunden wurde die Kulturflasche nicht fest verschlossen, damit eine pH-Wert-Einstellung stattfand. Ein erster Mediumwechsel wurde nach drei Tagen durchgeführt. Der Überstand mit nicht angewachsenen Zellen wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 1,5ml Kochsalzlösung resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und erneut zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt wurde, wurden die Röhrchen eingefroren. Bei Misslingen der Zellkultivierung konnte die DNA-Extraktion aus diesen Zellresten stattfinden.

4.2.2 Fibroblastenzellkultivierung

Das Nährmedium wurde regelmäßig gewechselt. Nach Erreichen vollständiger Konfluenz wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen mit etwa 2ml Trypsin/EDTA gespült und nach erneuter Zugabe von 1ml Trypsin kurz inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 7ml Medium gestoppt und die Zellsuspension zu etwa gleichen Teilen in der alten Kulturflasche belassen und in eine neue Kulturflasche überführt. Zunächst erfolgte die Zellanzucht in zwei 50ml-Kulturflaschen, bei adäquatem Zellwachstum erfolgte die Überführung mit angepassten Volumina auf zwei 250ml-Zellkulturflaschen. Die Zellen der großen Kulturflaschen dienten der DNA-Extraktion. Die Zellen der kleinen Kulturflaschen wurden kryokonserviert. Abweichungen von diesem Schema ergaben sich, wenn Zelllinien schlecht wuchsen, bzw. gar nicht anwuchsen oder bereits unmittelbar nach dem Auftauen Pilzmyxelien erkennbar waren.

4.2.3 Kryokonservierung

Kryoröhrchen wurden auf Eis vorgekühlt und ein Medium/10% DMSO-Gemisch wurde bei 4°C vorinkubiert. Einzufrierende Zellen wurden mittels Trypsinierung (s.o.) gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in etwa 1,5ml Medium/10% DMSO-Gemisch aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Im Anschluss wurden die Kryoröhrchen in einem Styroporbehälter für 24 Stunden bei – 80°C vorgefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

4.2.4 DNA-Extraktion

Zur Isolierung von DNA standen grundsätzlich zwei verschiedene Methoden zur Verfügung: die Phenol-Chloroform-(PC)-Methode und die schneller durchführbare Salzmethode. Grundprinzip beider Methoden ist nach Zellyse die Trennung der DNA von den Proteinen und anschließende DNA-Fällung.

Die angegebenen Volumina sind die, die für eine DNA-Extraktion aus 250ml-Zellkulturflaschen verwendet wurden. Falls eine DNA-Extraktion aus einer 50ml-Kulturflasche erfolgte, wurden die Volumina entsprechend angepasst.

4.2.4.1 Phenol-Chloroform-(PC)-Methode

Nachdem das Medium aus den Zellkulturflaschen verworfen wurde, wurde eine Verdauungslösung zur Deproteinisation mit 2ml H₂O (bidest.), 250µl TE (Tris-EDTA)-Puffer (10x), 5µl NaCl

(5M), 125ml SDS (Sodiumdodecylsulfat) (10%) und 12,5µl Proteinase K (10mg/ml) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 3-5h bei 37°C. Anschließend musste die DNA von Proteinen getrennt werden. Der Inhalt der Kulturflasche wurde dazu in Eppendorf-Röhrchen überführt. Nachdem zunächst 250µl Phenol hinzugegeben und die Röhrchen für 5min mit einem Überkopfmischer gemischt wurden, wurden 250µl Chloroform hinzugegeben und erneut gemischt. Nach Zentrifugation bei 4°C wurde der klare Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und der Phenol-Chloroform-Schritt in gleicher Weise wiederholt. Im Anschluss folgte die eigentliche DNA-Extraktion: Der Überstand wurde mit gleichem Volumen Isopropanol überschichtet und geschwenkt, bis der DNA-Faden ausfiel. Der DNA-Faden wurde in 70%igem Ethanol in einem Eppendorf-Cup gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Ethanol abgekippt und der Rest durch Erwärmung in einem Heizblock verdunstet. Die DNA in 1x TE-Puffer oder H₂O gelöst. Das jeweilige Volumen, in dem die DNA aufgenommen wurde, richtete sich nach der geschätzten Menge an DNA-Präzipitat. Bei durchschnittlicher Ausbeute erfolgte die Lösung in 300µl TE-Puffer bzw. H₂O

4.2.4.2 Salzmethode

Das Medium der Kulturflasche wurde verworfen und die Zellen mit PBS dreimal gewaschen. Die Kernlyse erfolgte durch Zugabe von 2ml Lösung B. Nach mehrmaligem Schwenken wurde die Lösung in 10ml-PPN-Röhrchen überführt. Zur Deproteinisation gab man 500µl Lösung C hinzu und schwenkte kurz. Nach Zugabe von 2ml Chloroform, Schwenken und Zentrifugation folgte die DNA-Extraktion, die der bei der PC-Methode gleicht: Der klare Überstand wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die DNA durch Isopropanol ausgefällt. Die sich anschließenden Schritte sind mit den Schritten bei der PC-Methode identisch (s.o.).

4.2.4.3 Qualitäts- und Quantitätsanalyse isolierter DNA mittels Photometrie

Die Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260nm ermöglicht die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung: Nachdem die DNA zunächst 1:100 verdünnt wurde, kann mit einem Photometer die Extinktion bestimmt werden und die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes errechnet werden. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors konnte die DNA-Konzentration der Stocklösung angegeben werden. Zusätzlich ermöglicht die Extinktionsbestimmung bei Wellenlängen von 230nm und 260nm Aussagen über die Menge von

RNA-, Protein- und Salzurückständen in der DNA-Lösung. Die Bestimmung der Ratio von A_{260}/A_{280} sollte Werte zwischen 1,8 und 2,0 ergeben.

Die DNA-Endkonzentrationen der Stammlösungen lagen gewöhnlich bei 300ng/ μ l bei einem Volumen von ca. 300 μ l.

Aufgrund der schlechten Qualität einiger Zelllinien misslang eine Anzucht teilweise komplett und die DNA konnte in diesen Fällen nur aus den nicht angewachsenen Zellen der primär aufgetauten Kulturen gewonnen werden. Auf DNA-Konzentrationsbestimmungen wurde in diesen Fällen aufgrund der geringen DNA-Ausbeute verzichtet.

4.3 Molekulargenetische Arbeitsmethoden

4.3.1 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.3.1.1 Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl: polymerase chain reaction/PCR) ermöglicht mit einem zyklischen Reaktionstemperaturprofil die *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte^{122,123}. Eine modifizierte PCR ist die so genannte Touch-Down-PCR: Dabei wird die Annealingtemperatur innerhalb eines definierten Temperaturintervalls von Zyklus zu Zyklus gesenkt. Durch die hohen Hybridisierungstemperaturen der ersten Reaktionszyklen wird die korrekte Primerhybridisierung begünstigt und die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte vermindert. In nachfolgenden Zyklen ist das gewünschte Amplifikationsprodukt bereits in gewissem Umfang in der Reaktionslösung vorhanden und kann nunmehr als Matrize für weitere Synthese dienen. Die Synthese ungewünschter PCR-Produkte wird somit vermindert¹²⁴.

4.3.1.2 Die PCR-Bedingungen für die verschiedenen Abschnitte des *IGHMBP2*-Gen

Folgender Standard-PCR-Ansatz wurde für die verschiedenen Abschnitte des *IGHMBP2*-Gens verwendet.

4.3.1.2.1 PCR-Ansatz

PCR-Puffer (10x)	5	μl
Primer F (10pmol/μl)	2	μl
Primer R (10pmol/μl)	2	μl
dNTP (10mM)	0,5	μl
Taq-Polymerase (5U/μl)	0,2	μl
H ₂ O	38,8	μl
DNA	1,5	μl
Gesamtvolumen	50	μl

Das Standard-PCR-Protokoll ist nachfolgend festgehalten. Für die Annealingtemperatur des jeweiligen Exons siehe Tab. 4.

4.3.1.2.2 PCR-Reaktionszyklus

Temperatur	Dauer	
95 °C	5 min	
95 °C	15 s	
AT °C	30 s	35 Zyklen
72 °C	45 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Für die Exons 3,9,11,12,14 und 15 wurde folgendes Touch-Down-PCR Protokoll verwendet:

4.3.1.2.3 Touch-Down-Reaktionsprotokoll

Temperatur	Dauer	
95 °C	5 min	
95 °C	15 s	
58- 52 °C	30 s	7 Zyklen
72 °C	45 s	
95 °C	15 s	
55 °C	30 s	28 Zyklen
72 °C	15 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

4.3.2 Agarosegelelektrophorese

4.3.2.1 Das Prinzip der Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wandern als negativ geladene Moleküle im elektrischen Feld. Die Wandergeschwindigkeit in der Gelmatrix ist dabei abhängig von der Molekülgröße und der Agarosegellkonzentration. Das Sichtbarmachen der DNA-Moleküle erfolgt mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid.

4.3.2.2 Vorbereitung und Durchführung der Gelelektrophorese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 2%ige Agarosegele verwendet: 2g Agarose wurden in 100ml 1x TBE (Tris-Borsäure-EDTA)-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung wurde Ethidiumbromid zugegeben und das Gel in einen Gelschlitten mit Gelkämmen auspolymerisiert. Anschließend wurden die Gelkämme entfernt und das Gel in einer Gelkammer mit 1x TBE-Puffer überschichtet. 5µl des PCR-Produktes wurden mit 5µl Ladepuffer (Orange G) vermischt und vorsichtig in die Geltaschen gefüllt. Anschließend wurde für etwa 15 Minuten eine Spannung von 180V angelegt. Eine fotografische Dokumentation erfolgte mittels UV-Flächenstrahler, Videokamera und der EASY Plus Software. Der gleichzeitig aufgetragene 1 kB-Marker erlaubte die Größen- und Konzentrationsabschätzung des PCR-Produktes.

4.3.3 Denaturierende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (DHPLC, WAVE™)

4.3.3.1 Das Prinzip der DHPLC

Die DHPLC (engl: denaturing high-performance liquid chromatography) ist eine schnelle und automatisierte Methode, um Veränderungen in der DNA-Sequenz zu finden. Sequenzabweichungen werden dabei nicht durch direkten Sequenzvergleich erkannt, sondern chemische und physikalische Konformationsveränderungen verursachen ein unterschiedliches chromatographisches Verhalten. Untersucht wird das normale PCR-Produkt¹²⁵.

Individuen, die heterozygot für einen Polymorphismus oder eine Mutation sind, besitzen ein 1:1-Verhältnis zwischen Wildtyp- und veränderter DNA. Nach Erhitzen und langsamer Abkühlung rehybridisieren die vier verschiedenen DNA-Einzelstränge zufällig miteinander; es bilden sich so genannte Homo- und Heteroduplices. Durch die unterschiedlichen Konformationen, die temperaturabhängigen Interaktionsstärken mit der stationären Phase der Chromatographiesäule und des während eines Chromatographielaufes steigenden Acetonitrilgradienten ergeben sich für Hetero-

und Homoduplices unterschiedliche Retentionszeiten. Die verschiedenen DNA-Fragmente werden mit einem UV-Detektor im Eluat nachgewiesen. Die graphische Auswertung erfolgt in Form eines Chromatogramms (s. Abb. 7).

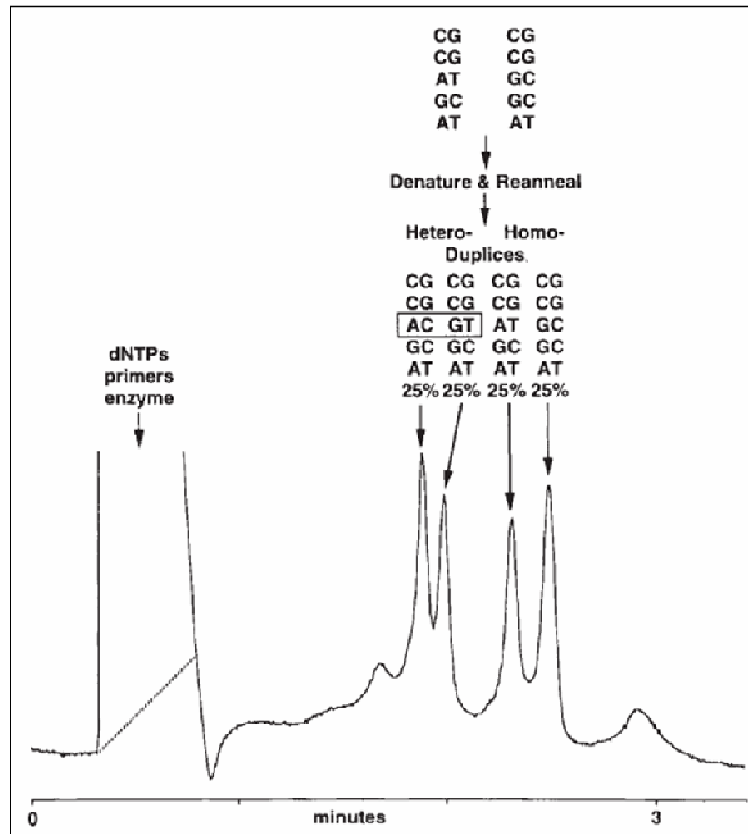


Abbildung 7: Auftrennung der Homo- und Heteroduplices durch DHPLC ¹²⁵.

Die optimale Temperatur zur chromatographischen Trennung verschiedener DNA-Komplexe ist jene, bei der die Denaturierung der DNA beginnt. Die Schmelztemperatur an verschiedenen Abschnitten des DNA-Moleküls ist dabei sequenzabhängig, d.h. es bestehen verschiedene Schmelzdomänen. Die Schmelzprofile können durch Computerprogramme (s.u.) errechnet werden. Um möglichst alle Molekülabschnitte in der Analyse zu erfassen, wird die Probe bei mehreren Temperaturen untersucht.

DNA-Proben, die in dem zu untersuchenden Abschnitt homozygote Veränderungen aufweisen, sind mit der DHPLC nicht von Proben mit Wildtyp-DNA-Sequenz zu unterscheiden. Um DNA-Veränderungen bei diesen Proben nachweisen zu können, ist es erforderlich, vor der Denaturierung potentiell homozygot veränderte Proben mit Wildtypproben im Verhältnis 1:1 zu mischen. Durch diesen Vorgang werden die oben beschriebenen Analysebedingungen erreicht.

4.3.3.2 Vorbereitung und Durchführung der DHPLC-Analysen

Nach der PCR wurden 25µl des PCR-Produktes der zu analysierenden Probe mit dem gleichen Volumen Wildtyp-PCR-Produkt vermischt und 5min auf 95°C erhitzt. Die Renaturierung erfolgte durch Abkühlung bei Raumtemperatur für etwa eine halbe Stunde. Die automatisierte Analyse auf dem WAVE™ DNA Fragment Analysis System folgte, nachdem sequenzspezifische Schmelzprofile errechnet wurden und ein „Sample Sheet“ mit den jeweiligen Probenamen, Injektionsvolumina und Analysetemperaturen erstellt wurde. Die Injektionsvolumina richteten sich nach den geschätzten Konzentrationen des jeweiligen PCR-Produktes.

4.3.4 Sequenzierung

Proben, die im DHPLC-Screening ein auffälliges Chromatogramm zeigten, wurden sequenziert. Außerdem wurde Exons, bei denen die Frequenz von Polymorphismen sehr hoch war oder die Etablierung der DHPLC-Analyse scheiterte (s.u.) direkt sequenziert.

4.3.4.1 Das Prinzip der Sequenzierung

Die Sequenzierung ist die genaueste Methode der Mutationsanalyse. Das Prinzip der Sequenzierung wurde von Sanger 1977 entwickelt und entspricht einer Kettenabbruchmethode¹²⁶.

Nachdem das PCR-Produkt aufgereinigt wurde, folgt die Sequenzierungs-PCR: neben einer Polymerase und Pufferlösungen enthält der Sequenzierungsansatz Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP), die DNA-Matrize und einen sequenzspezifischen Vorwärts- oder Rückwärtsoligonukleotidprimer. Die entscheidenden Reagenzien sind jedoch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTP): ddNTPs fehlen die Hydroxylgruppen am C2 und C3-Atom. Die Folge ist ein Kettenabbruch. Statistisch gesehen kann dieser an jeder Stelle des wachsenden Moleküls auftreten, so dass unterschiedlich lange DNA-Moleküle entstehen. Im Extremfall unterscheiden sich die Moleküle nur um ein Basenpaar. Nach der Sequenzierung werden die unterschiedlich langen DNA-Moleküle mit ihren 3'-OH-fluoreszenzmarkierten Enden elektrophoretisch aufgetrennt und die endständige Base laserdetektiert. Die graphische Auswertung erfolgt als Intensitätsprofil/Elektropherogramm.

4.3.4.2 Vorbereitung und Durchführung der Sequenzierung

4.3.4.2.1 Enzymatische Aufreinigung des PCR-Produkts

Das PCR-Produkt wurde vor der Sequenzreaktion enzymatisch aufgereinigt, um die Primer der PCR-Reaktion und dNTPs zu entfernen.

Reaktionsansatz			Reaktionsbedingungen	
Exo I (Exonuklease I)	0,05	μl	Temperatur	Dauer
SAP (shrimp alkaline phosphatase)	0,5	μl	37°C	45 min
SAP-Puffer	0,45	μl	80°C	15 min
H ₂ O	3,5	μl	4°C	∞
PCR-Produkt	5	μl		
Gesamtvolumen	10	μl		

4.3.4.2 Sequenzierung

Für die Sequenzierungsreaktion wurden folgender Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen verwendet:

Reaktionsansatz		
Big Dye-Mix	0,5	μl
Primer (10pmol/μl)	0,5	μl
Big Dye-Puffer	0,5	μl
H ₂ O	1,5	μl
PCR-Produkt (gereinigt)	2	μl
Gesamtvolumen	5	μl

Sequenzierungs-PCR

Temperatur		Dauer		
95	°C	10	s	
AT	°C	15	s	25 Zyklen
60	°C	4	min	
4	°C	∞		

4.3.4.2.3 Sequenzaufräumung

Die Sequenzaufräumung begann mit der Fällung. Nachdem zu dem Sequenzierungsansatz 100μl Präzipitationsmix gegeben wurde, wurde 30min bei 1500g zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und die Proben in 200µl 70%igem Ethanol gewaschen, indem diese erneut zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde erneut verworfen und der restliche Alkohol durch kurzes Erhitzen auf 95°C verdampft. Anschließend wurden die Proben in 20µl H₂O gelöst.

Für die automatische Sequenzierung wurde die DNA-Sequenzierer ABI PRISM 310 bzw. 3100 Genetic Analyser der Firma Applied Biosystems und die Software Sequencing Analysis 3.4.1. verwendet.

5 Ergebnisse

5.1.1 Klinische Daten und molekulargenetische Ergebnisse der Familienuntersuchung

5.1.1.1 Das klinische Bild der Indexpatientin

Die Indexpatientin der Familie wurde in der 37. Schwangerschaftswoche mit einem Gewicht von 1540g und einer Länge von 31cm geboren. Im vierten Lebensmonat entwickelte sich innerhalb von zwei Wochen eine zunehmende Ateminsuffizienz, so dass eine Intubation und mechanische Beatmung erfolgte. Radiologisch zeigte sich ein Zwerchfellhochstand rechts. Auffällig war eine allgemeine muskuläre Hypotonie und beidseitige Spitzfußstellung. Zeitgleich trat eine Pneumonie auf. Extubationsversuche scheiterten wiederholt. Letztendlich wurde der Verdacht auf eine SMARD1-Erkrankung gestellt und eine molekulargenetische Diagnostik veranlasst.

5.1.1.2 Familienanamnese

Die aus dem Kosovo stammenden und klinisch gesunden Eltern sind nicht konsanguin. Die Indexpatientin wurde nach zwei Fehlgeburten als viertes Kind geboren. Ein 4,5 Jahre älterer Bruder leidet ebenfalls an einer respiratorischen Insuffizienz. Diese trat bei ihm jedoch früher auf. Auch er wird seitdem mechanisch beatmet. Bevor eine molekulargenetische Diagnostik bei diesem Patienten durchgeführt wurde, war seine Erkrankung aufgrund histologischer Befunde als Mitochondriopathie klassifiziert. Eine zweieinhalb Jahre ältere Schwester ist klinisch gesund. Ein älterer Bruder verstarb mit 4 Monaten an SIDS (s. Abb. 8).

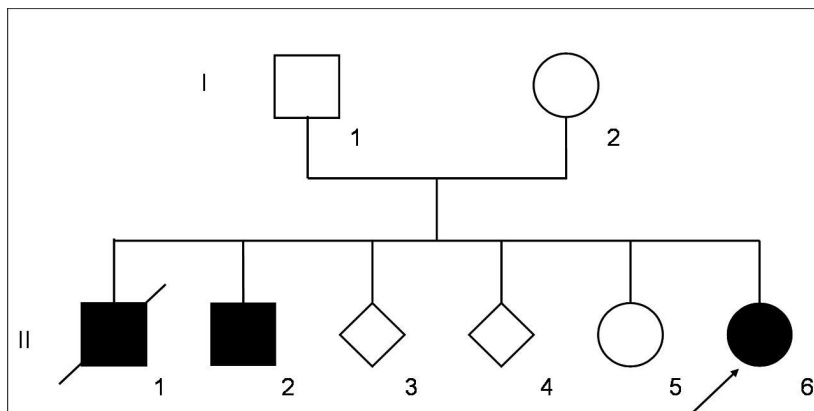


Abbildung 8: Stammbaum der Familie

5.1.1.3 Molekulargenetische Ergebnisse

Molekulargenetisch konnte die Verdachtsdiagnose der Indexpatientin bestätigt werden. Es fand sich die Nonsense-Mutation 138T→A (C46X), die bereits bei anderen SMARD1-Patienten ge-

funden wurde, homozygot. Folge ist ein vorzeitiger Proteinabbruch nach der 46. Aminosäure (s. Abb. 9).

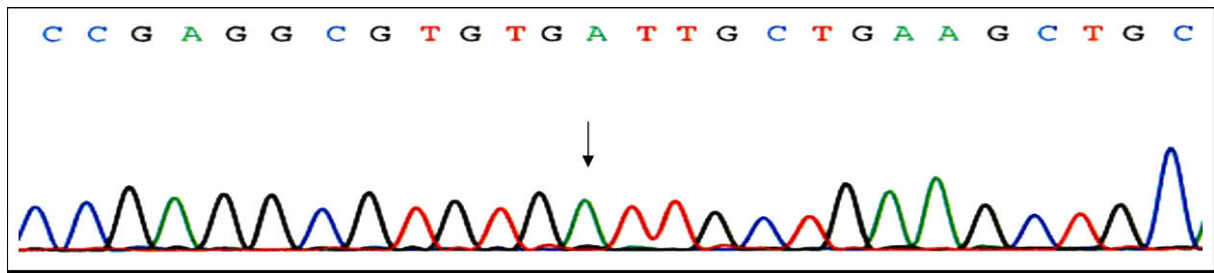


Abbildung 9: Elektropherogramm Exon 2R: Markiert ist die Nonsense-Mutation 138T→A (C46X) der Indexpatientin.

In der Familienuntersuchung konnte die Cosegregation dieser Veränderung festgestellt werden: Sowohl die Eltern als auch die gesunde Schwester sind heterozygot für diese Veränderung (s. Abb. 10).

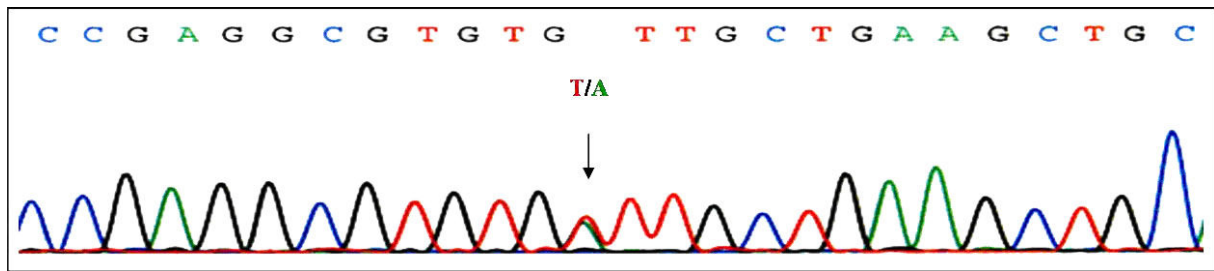


Abbildung 10: Elektropherogramm Exon 2R: Gezeigt ist die Heterozygotie der Mutter für die Nonsense-Mutation 138T→A (C46X).

Der Bruder, dessen Erkrankung initial als Mitochondriopathie klassifiziert wurde, ist ebenfalls homozygot für diese Mutation. Leider sind genetische Untersuchungen bei dem an SIDS verstorbenen älteren Bruder aufgrund fehlenden Untersuchungsmaterials nicht möglich gewesen.

5.1.2 Etablierung der PCR-Bedingungen und der WAVE™-Analysebedingungen für die Screeninguntersuchung des GeSID-Patientenkollektives

5.1.2.1 Etablierung der PCR-Bedingungen

Während für die Familienuntersuchung direkt sequenziert wurde, war es aufgrund der Größe des GeSID-Patientenkollektives notwendig, eine kosteneffizientere und zeitsparende Analysemethode zu wählen. Zum Mutationsscreening wurde die DHPLC eingesetzt.

Parallel zur Fibroblastenzellkultivierung wurde mit der Etablierung geeigneter PCR- und WAVE™-Analysebedingungen begonnen. Teilweise konnten die in der Diagnostik verwendeten Primer benutzt werden, teilweise wurden neue Primer entworfen. Die entsprechenden Annea-

lingtemperaturen wurden durch die Wallace-Regel ($T_m = 2^\circ\text{C} \times (A + T) + 4^\circ\text{C} \times (C + G)$) bestimmt und in anschließenden Testversuchen optimiert. Die ermittelten Werte und Reaktionsbedingungen sind im Methodenteil dargestellt (Tab.4).

5.1.2.2 Etablierung der WAVE™-Analysebedingungen

Neben den physikalischen und chemischen Eigenschaften des PCR-Produktes hat die Temperatur großen Einfluss auf das Elutionsverhalten. Sequenzspezifische Schmelzkurven und das längenabhängige Schmelzverhalten des jeweiligen Amplifikationsproduktes können durch das WAVE™-Analyseprogramm errechnet werden (s. Abb.11-21)

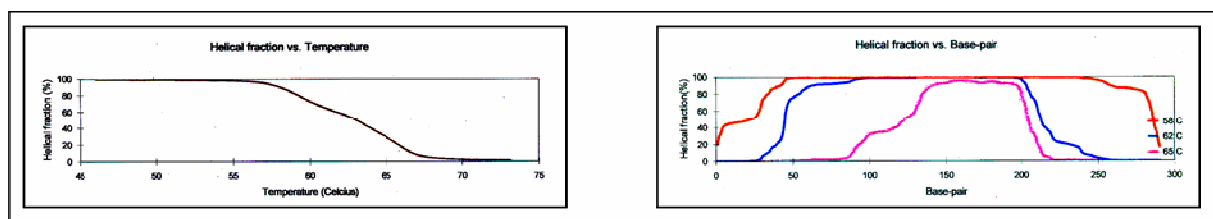


Abbildung 11: Schmelzkurven Exon 2

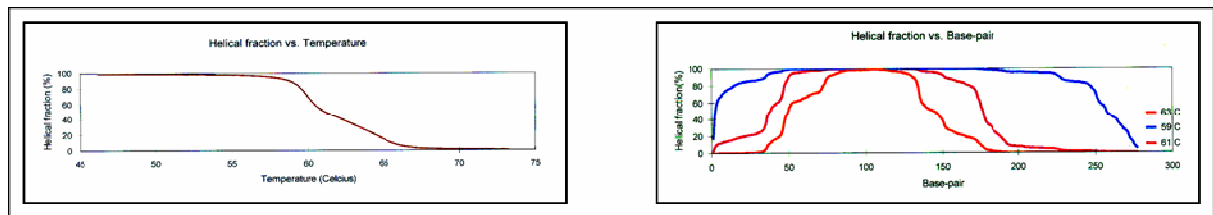


Abbildung 12: Schmelzkurven Exon 3

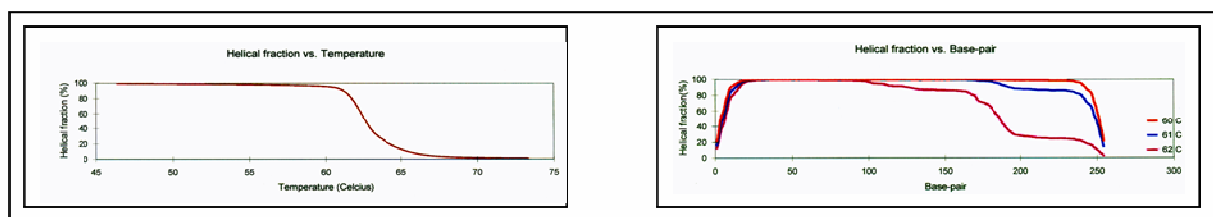


Abbildung 13: Schmelzkurve Exon 5

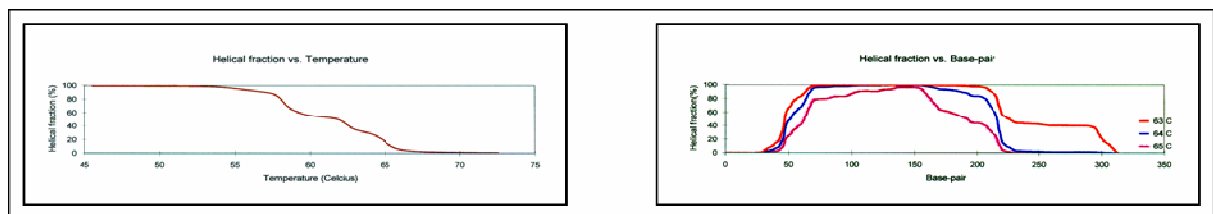


Abbildung 14: Schmelzkurven Exon 6

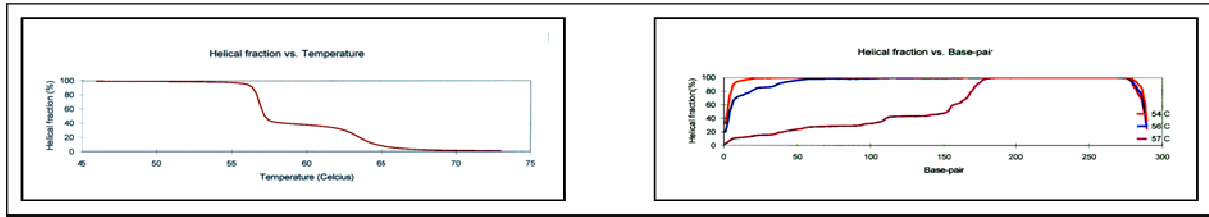


Abbildung 15: Schmelzkurven Exon 7

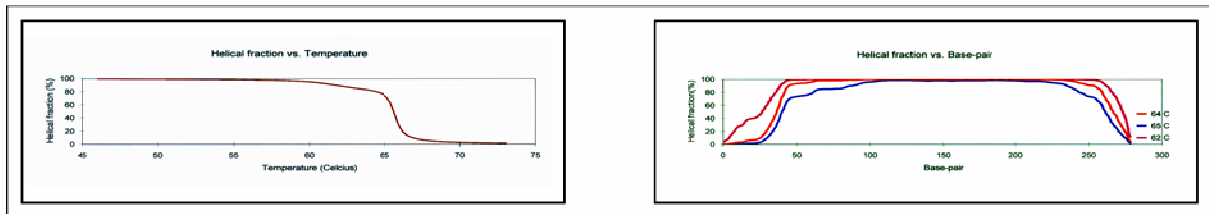


Abbildung 16: Schmelzkurven Exon 8

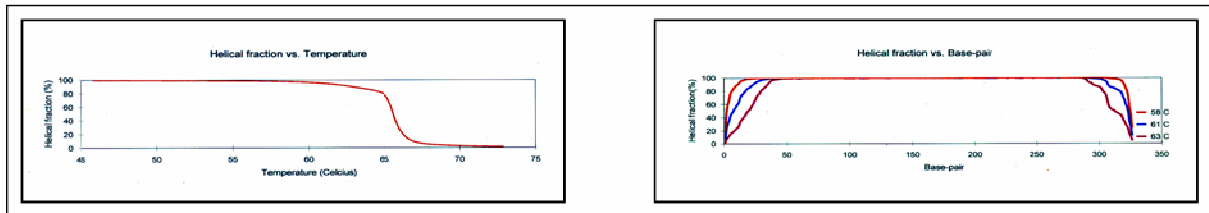


Abbildung 17: Schmelzkurven Exon 9

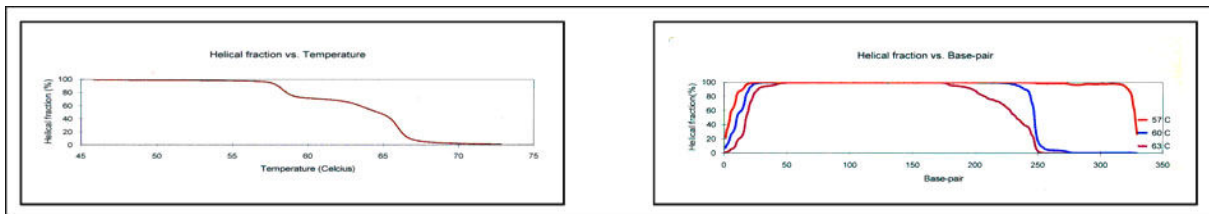


Abbildung 18: Schmelzkurven Exon 10

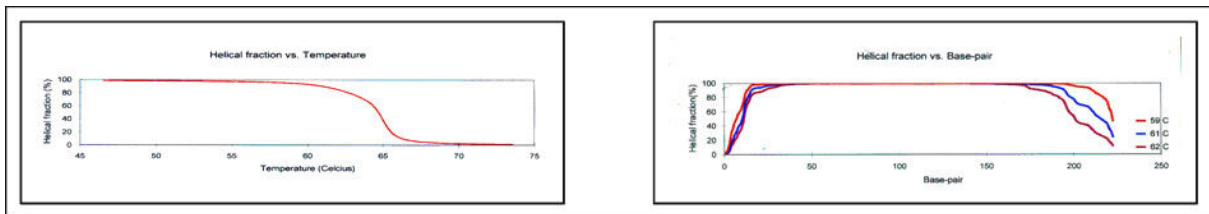


Abbildung 19: Schmelzkurven Exon 11

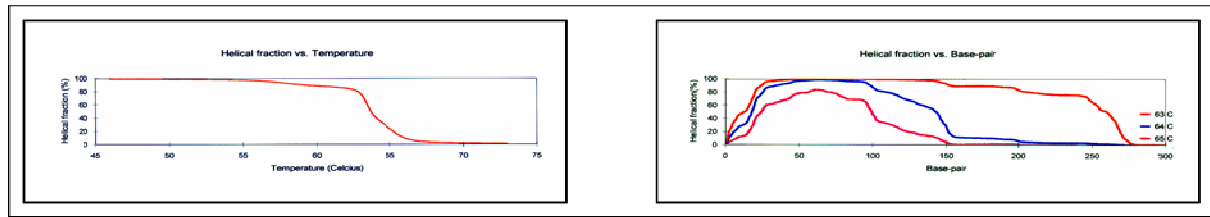


Abbildung 20: Schmelzkurven Exon 12

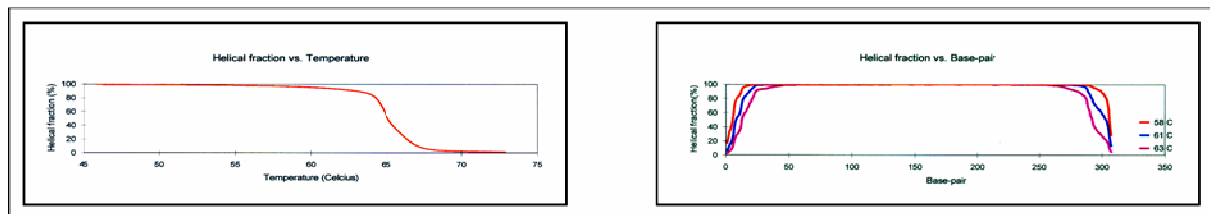


Abbildung 21: Schmelzkurven Exon 14

Als Anfangstemperatur wurde in Testversuchen jene Temperatur gewählt, bei der der Anteil an DNA-Doppelsträngen laut Schmelzkurve bei ca. 80% liegt. Da das Schmelzverhalten jeder einzelnen Schmelzdomäne unterschiedlich ist, war es notwendig, die Versuche bei mehreren Temperaturen durchzuführen, um falsch negative Ergebnisse zu verhindern. In Testversuchen wurden neben der Anfangstemperatur drei bis fünf weitere Temperaturen gewählt und das Elutionsverhalten von Wildtyp-DNA und Proben mit bekannten *IGHMBP2*-Genveränderungen untersucht. Bei erfolgreicher Etablierung wurden drei bis vier Temperaturen als Standardanalysetemperaturen festgelegt (s. Tab. 5).

Exon	Standardanalysetemperaturen in °C
1	s. Erläuterungen Text
2	58, 62, 65
3	59, 61, 63
4	s. Erläuterungen Text
5	60, 61, 62, 63
6	63, 66, 67
7	54, 56, 58, 61
8	59, 62, 65
9	58, 61, 63, 66
10	57, 60, 63, 65
11	59, 61, 63
12	62, 63, 65
13	s. Erläuterungen Text
14	58, 61, 63
15	s. Erläuterungen Text

Tabelle 5: WAVE™-Standardanalysebedingungen

5.1.3 WAVE™-Screening und Sequenzierung

Nach der DNA-Extraktion wurden die Patientenproben gemeinsam mit Positivkontrollen mittels PCR amplifiziert. Die Patientenproben wurden im Verhältnis 1:1 mit Wildtyp-Proben gemischt (s.o.). Bei auffälligem Elutionsprofil wurde die entsprechende Probe sequenziert. Abweichungen von diesem Untersuchungsablauf ergaben sich bei den Exons 1, 4, 13 und 15. Die Gründe dafür sind bei den jeweiligen Exons erörtert.

Beim Screening der 155 untersuchten SIDS- und 35 non-SIDS-Fällen zeigten sich in Exon 3, 6, 10, 13 und 15 vormals unbekannte, nicht beschriebene Missense-Veränderungen. Neue, synonyme Varianten fanden sich in Exon 6, 8, 13 und 14. Außerdem traten vormals nicht beschriebene Veränderungen in intronischen oder untranslatierten Bereichen auf. Die Gesamtergebnisse sind den Tabellen 17 und 18 zu entnehmen. Im Folgenden werden die Ergebnisse für jedes Exon einzeln beschrieben. Von Polymorphismen wird dabei, unabhängig von ihrer Frequenz, gesprochen, wenn diese Veränderungen bereits in der Literatur beschrieben oder in unseren Laborkontrollen gefunden wurden und ihnen kein pathogenetischer Charakter zugewiesen wird.

5.1.3.1 Exon 1

Für das Exon 1 scheiterte die Etablierung des DHPLC-Screenings. Mutationen in Positivkontrollen konnten in Testanalysen nicht detektiert werden. Alle Proben wurden deswegen sequenziert. Die Allelverteilungen der Polymorphismen 57 T→C (L19L) und 5'UTR-2 C→T sind in den Tabellen 6 und 7 aufgeführt.

Genotyp	SIDS- Kollektiv (n=155)	non-SIDS-Kollektiv (n=35)
T/T homozygot	0	0
T/C heterozygot	30 (≈ 19%)	11 (≈ 31%)
C/C homozygot	125 (≈ 81%)	24 (≈ 69%)
Abweichung vom HWE	p=0.363337	p=0.565622

Tabelle 6: Allelverteilung des Polymorphismus 57 T→C (L19L) im SIDS und non-SIDS-Kollektiv. Die Allelverteilung zeigt in beiden Gruppen im Fishers „exact test“ keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium (HWE).

Genotyp	SIDS- Kollektiv (n=155)	non-SIDS-Kollektiv (n=35)
C/C homozygot	111 (≈ 71%)	25 (≈ 71%)
C/T heterozygot	40 (≈ 26%)	10 (≈ 29%)
T/T homozygot	4 (≈ 3%)	0
Abweichung vom HWE	p=0.763888	p=1.000000

Tabelle 7: Allelverteilung des Polymorphismus 5' UTR-2 C→T im SIDS und non-SIDS-Kollektiv. Die Allelverteilung zeigt in beiden Gruppen im Fishers „exact test“ keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium (HWE).

Die Patienten 96/99 und 419/00 der SIDS-Gruppe zeigten die neue intronische Variante IVS1+113 C→G heterozygot. Aufgrund der Entfernung der Veränderung zur Spleißdonorstelle und fehlender Auswirkung auf den Spleiß-„score“ im Spleißprädiktionsprogramm NNSPLICE 0.9 wurden keine weitergehenden Untersuchungen für diese Veränderung vorgenommen.

5.1.3.2 Exon 2

Optimale Analysebedingungen für das WAVE™-Screening ergaben sich bei den Temperaturen 58, 62 und 65°C.

Bei dem SIDS-Patienten 305/00 und dem non-SIDS-Patienten 421/99 fand sich der Polymorphismus 151C→G (Q51E) heterozygot. Bei 421/99 trat zusätzlich der Polymorphismus IVS2+27 A→T heterozygot auf. Die Sequenzierung erfolgte in beiden Fällen aufgrund abnormer Elutionsprofile. Das Elektropherogramm und das Chromatogramm ist für den Patienten 421/99 gezeigt (Abb. 22, 23).

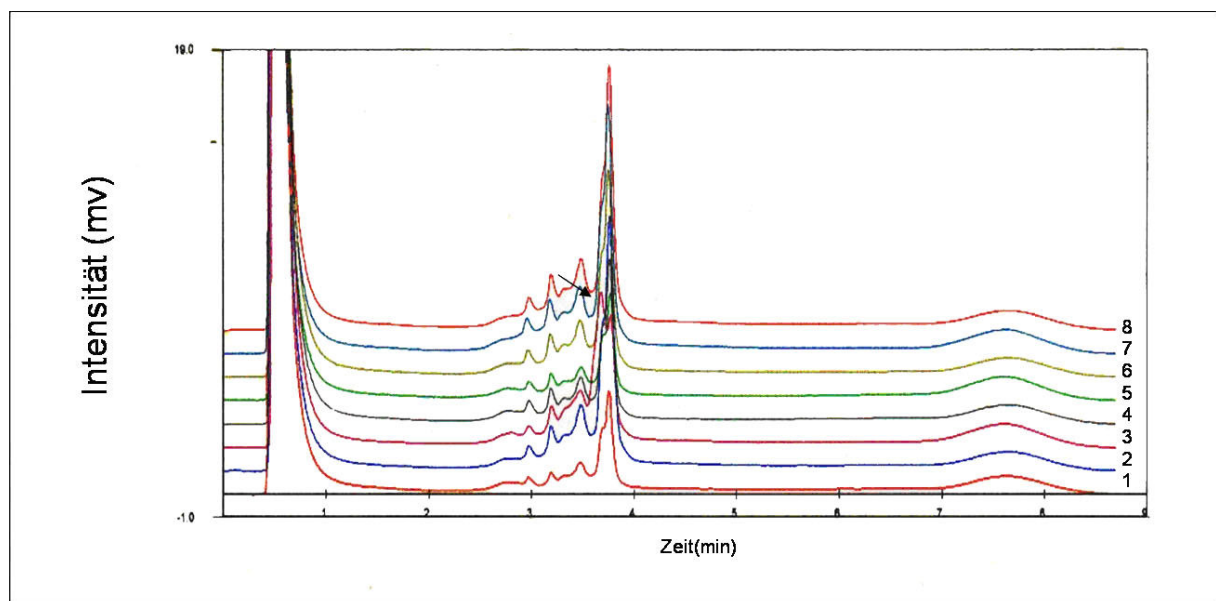


Abbildung 22: Chromatogramm Exon 2 (62°C): Wildtyp (1), 68/99 (2), 421/99 (3), 640/99 (4), 863/01 (5), 386/99 (6), 428/99 (7), 1195/99 (8). Markiert ist der abweichende Kurvenverlauf von 421/99 (3).

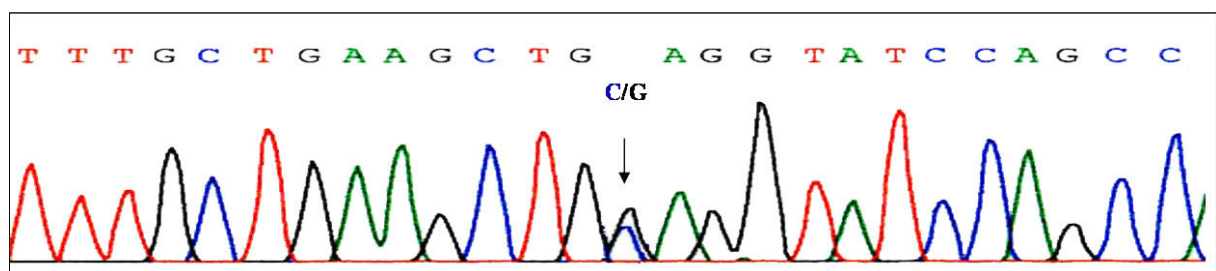


Abbildung 23: Elektropherogramm Exon 2F 421/99: Markiert ist der Polymorphismus 151 G→C het. (Q51E).

Der Polymorphismus 180 C→T (Y60Y) fand sich heterozygot bei den Patienten 35/99, 51/99, 96/99, 184/99 des SIDS- sowie bei den Patienten 359/00 und 63/99 des non-SIDS-Kollektives. Gezeigt ist das Chromatogramm für die Patienten 51/99 und 63/99 und das Elektropherogramm für den Patienten 51/99 (Abb. 24, 25).

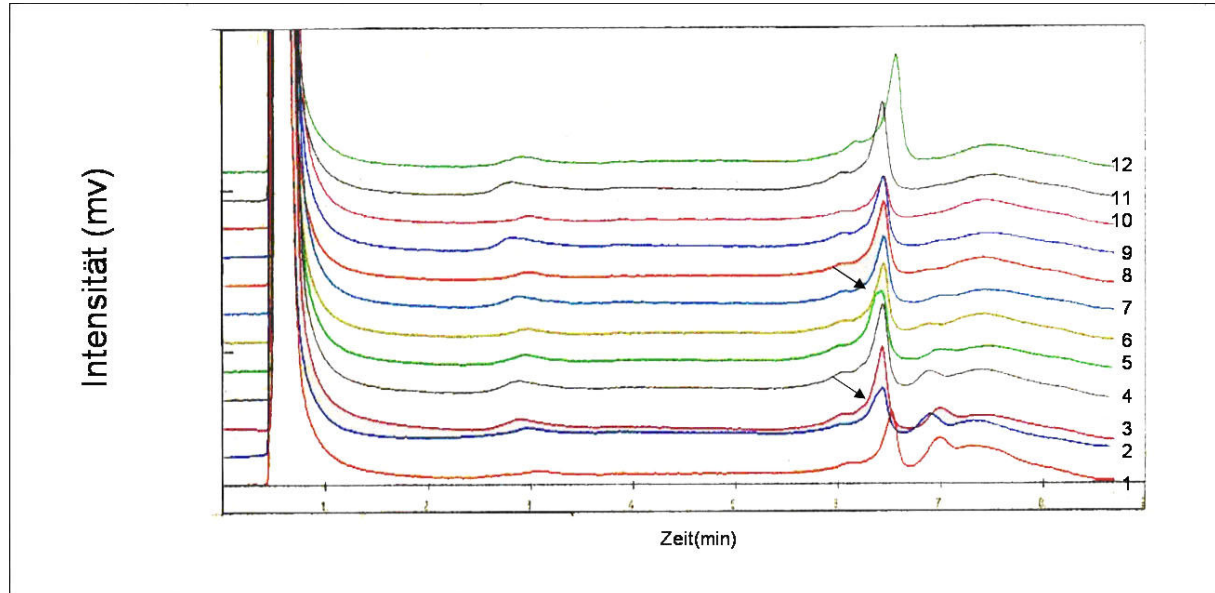


Abbildung 24: Chromatogramm Exon 2 (58°C): 396/98 (1), 51/99 (2), 58/99 (3), 59/99 (4), 63/99 (5), 80/99 (6), 85/99 (7), 96/99 (8), 126/99 (9), 286/99 (10), 201/00 (11), Wildtyp (12). Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die abgeflachten Elutionspeaks von 51/99 (2) und 63/99 (5).

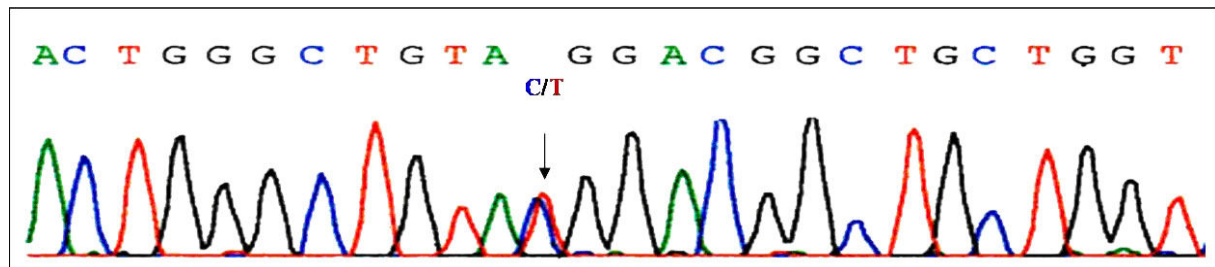


Abbildung 25: Elektropherogramm Exon 2F 51/99. Markiert der Polymorphismus 180 C→T het. (Y60Y).

Im intronischen Bereich trat bei dem SIDS-Patienten 1271/99 der Polymorphismus IVS2+9 G→A heterozygot auf.

5.1.3.3 Exon 3

Die optimalen Analysetemperaturen waren 59, 61 und 63°C.

Zwei Patienten zeigten abweichende Elutionsprofile (Abb. 26, 27). In der anschließenden Sequenzierung fanden sich zwei vormals nicht beschriebene Missense-Varianten: 277 G→A (D73N) und 344 C→T (T115M).

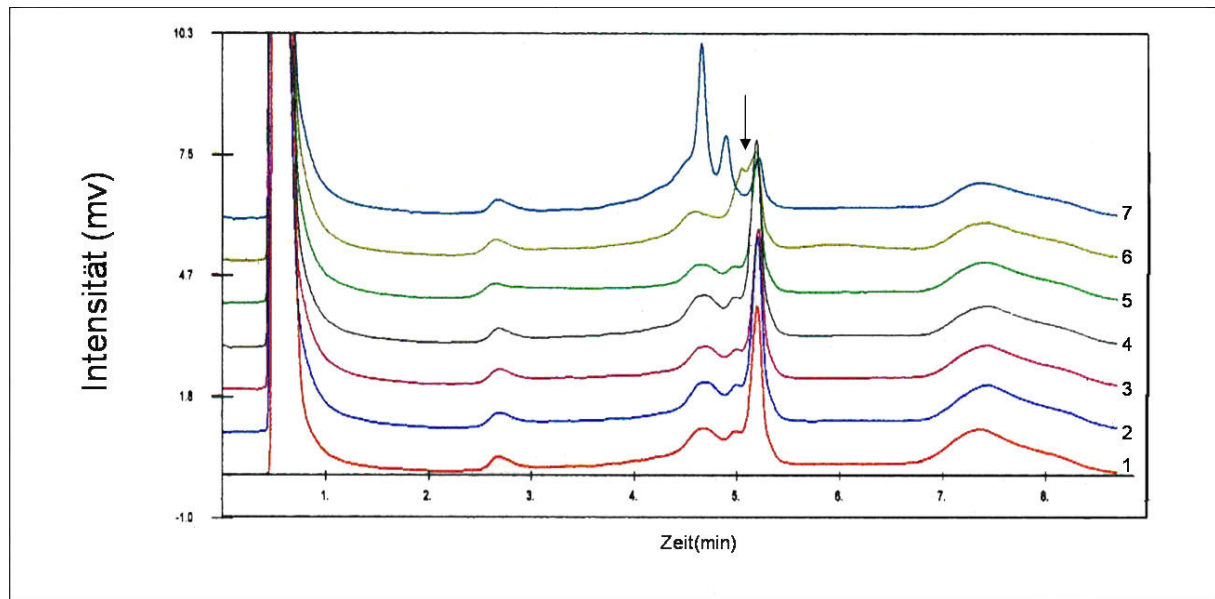


Abbildung 26: Chromatogramm Exon 3 (61°C) Wildtyp (1), 188/01 (2), 189/01 (3), 347/01 (4), 576/01 (5), 21/99 (6), Positivkontrolle R147X het. (7). Markiert ist das auffällige Elutionsprofil von 21/99 (6).

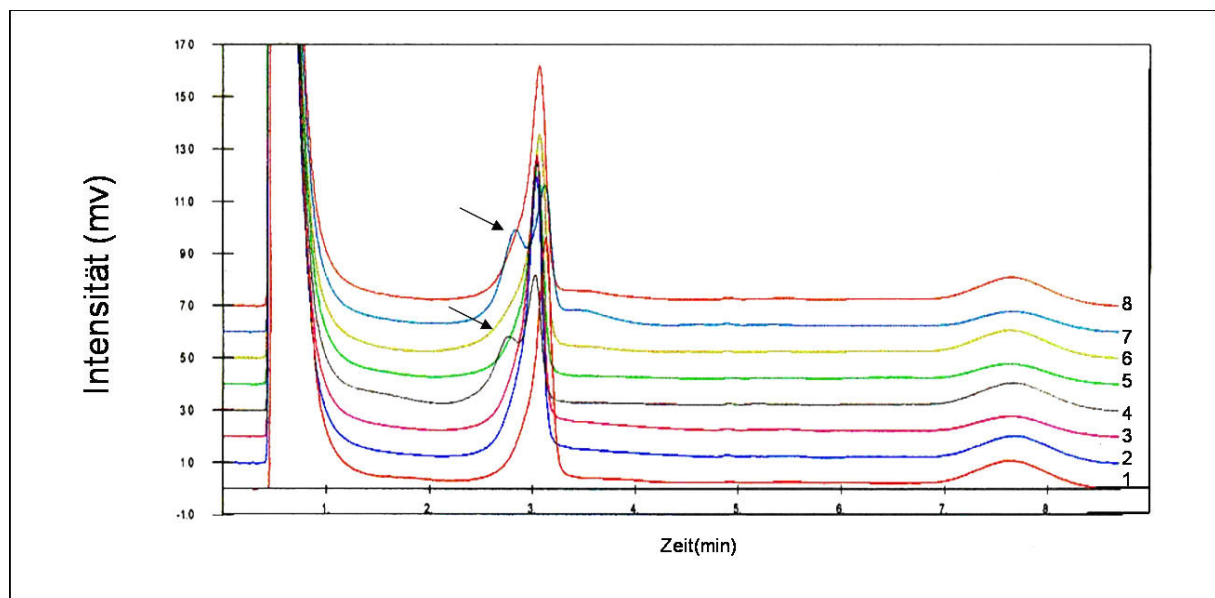


Abbildung 27: Chromatogramm Exon 3 (63°C). Wildtyp (1), 68/99 (2), 421/99 (3), 640/99 (4), 863/01 (5), 386/99 (6), 428/99 (7), 1195/99 (8). Gekennzeichnet die auffälligen Elutionsprofile von 640/99 (4) und 428/99 (7). Der Patient 428/99 (7) musste im Nachhinein von der Untersuchung ausgeschlossen werden, da die molekulargenetische Analyse bei diesem Patienten nicht in jedem Exon durchgeführt werden konnte.

Der non-SIDS-Patient 21/99 zeigte einen Basenaustausch an Position 277 der mRNA (s. Abb. 28). Guanin ist durch Adenin ersetzt, Folge ist der Austausch der Aminosäure Asparaginsäure gegen Asparagin an Position 73 des Proteins. In 148 Kontrollpersonen konnte diese Veränderung nicht gefunden werden.

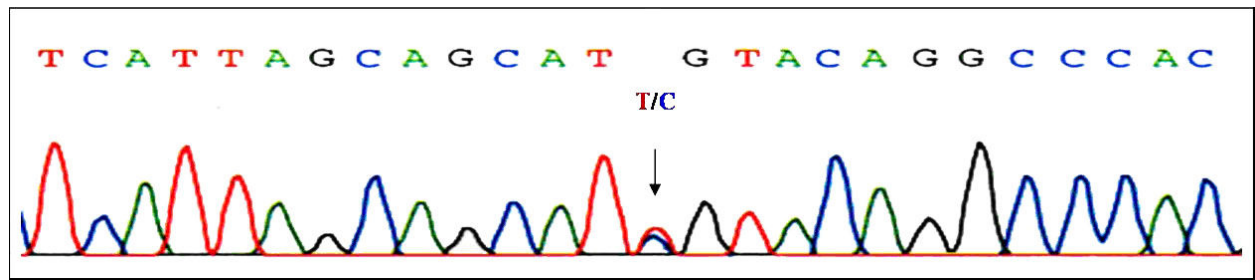


Abbildung 28: Elektropherogramm Exon 3R 21/99. Markiert ist die Einbasensubstitution 277G→A het. (D73N).

Der saure Carboxyl-Substituent wird gegen eine polare, ungeladene Amidseitengruppe ausgetauscht. Ein Sequenzvergleich orthologer Proteine an entsprechenden Positionen zeigt die Konservierung von Asparaginsäure mit Ausnahme des Zebrafisches (Abb. 29). Die Veränderung 277G→A (D73N) ist in der Helikase-Domäne, dem „hot spot“ für Missense-Mutationen, lokalisiert (s.u.)¹²¹.

AS-Position	AS-Sequenz										Spezies
88	I	V	G	L	Y	D	A	A	N	E	<i>H. sapiens</i>
88	I	V	G	L	Y	D	E	S	-	-	<i>B. taurus</i>
88	I	V	G	L	Y	D	T	N	-	N	<i>M. musculus</i>
84	I	V	G	L	Y	D	S	V	G	Q	<i>G. gallus</i>
88	I	I	G	L	Y	Q	A	E	G	Q	<i>D. rerio</i>

Abbildung 29: Vergleich der Aminosäuresequenz orthologer Proteine für die Missense-Veränderung 277G→A (D73N). Asparaginsäure ist mit Ausnahme des Zebrafisches bei den untersuchten Spezies konserviert.

Bei dem non-SIDS-Patienten 640/99, fand sich auf einem Allel die neue Missense-Variante 344C→T (T115M) (s. Abb. 30). Durch den Austausch von Cytosin gegen Thymin wird Threonin gegen Methionin an Position 115 des Proteins substituiert. In 148 Kontrollpersonen konnte diese Veränderung nicht gefunden werden.

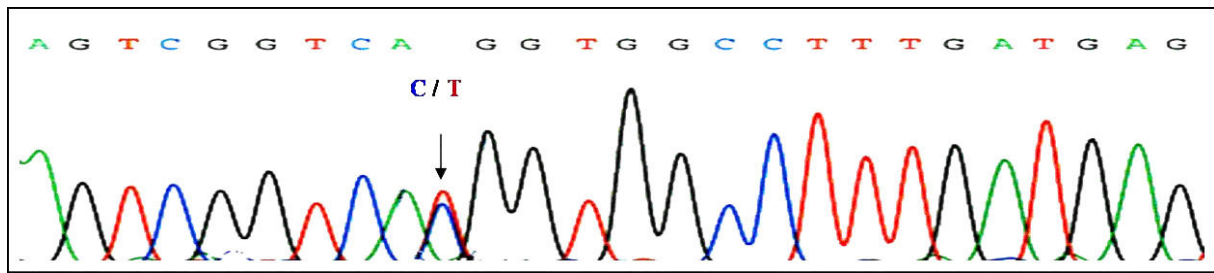


Abbildung 30 Elektropherogramm Exon 3F 640/99: Markiert ist die Missense-Veränderung 344C→T het. (T115M).

Threonin ist aufgrund seiner Hydroxylgruppe eine polare, ungeladene Aminosäure. Methionin mit seiner Thioetherbindung ist eine unpolare Aminosäure. Threonin ist phylogenetisch hoch konserviert (s. Abb. 31). Auch diese Missense-Veränderung liegt im Bereich der Helikase-Domäne.

AS-Position	AS-Sequenz										Spezies
110	T	Q	K	S	V	T	V	A	F	D	<i>H. sapiens</i>
107	T	Q	K	A	V	T	V	A	F	D	<i>B. taurus</i>
109	T	Q	K	S	V	T	V	A	F	D	<i>M. musculus</i>
106	T	S	K	A	V	T	V	A	F	E	<i>G. gallus</i>
112	T	Q	A	S	L	T	V	A	F	D	<i>D. rerio</i>

Abbildung 31: Vergleich der Aminosäuresequenz orthologer Proteine für die Missense-Veränderung 344C→T (T115M). Threonin ist phylogenetisch hoch konserviert.

5.1.3.4 Exon 4

Für die Etablierung der WAVE™-Analysebedingungen standen keine Positivkontrollen zur Verfügung. Zur Abdeckung eines möglichst breiten Analysespektrums wurden deshalb vier Standardanalysetemperaturen gewählt. Bei ersten Untersuchungsreihen zeigten einzelne Proben gering abweichende Elutionskurven. Beispielhaft ist das Chromatogramm des SIDS-Patienten 419/00 aufgeführt (Abb. 32). Die anschließende Sequenzierung wies den Polymorphismus IVS3-72 G→T in heterozygoter Ausprägung nach. Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, wurden anschließend alle Patientenproben direkt sequenziert. Der Polymorphismus IVS3-72 G→T konnte heterozygot bei insgesamt 26 SIDS-Patienten und 7 non-SIDS-Patienten gefunden werden.

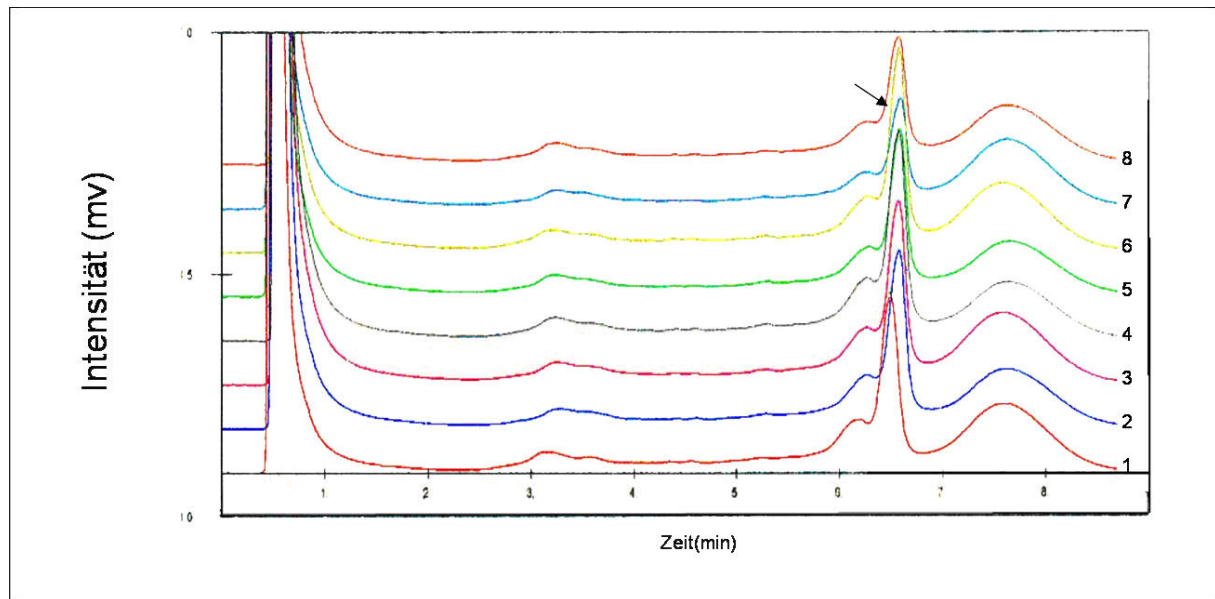


Abbildung 32: Chromatogramm Exon 4 (57°C). Die nur gering auffällige Probe 419/00 (7) des SIDS-Kollektivs zeigte bei der Sequenzierung den Polymorphismus IVS3-72 G→T heterozygot. Die anderen SIDS-Patienten: 83/99 (2), 110/99 (3), 184/99 (4), 186/99 (5), 550/99 (6), 824/00 (8) und der Wildtyp zeigten diese Veränderung nicht.

5.1.3.5 Exon 5

Die Etablierung lieferte vier Analysetemperaturen (s. Tab. 5). Exemplarisch für sämtliche Untersuchungen ist Abbildung 33 dargestellt. Der Polymorphismus 602C→T (S201L) konnte häufig nachgewiesen werden. Die Allelverteilung ist in Tabelle 8 aufgeführt. Detaillierte Ergebnisse sind den Tabellen 17 und 18 zu entnehmen.

Genotyp	SIDS- Kollektiv (n=155)	non-SIDS-Kollektiv (n=35)
C/C homozygot	120 (≈ 77%)	21 (≈ 60%)
C/T heterozygot	31 (≈ 20%)	12 (≈ 34%)
T/T homozygot	4 (≈ 3%)	2 (≈ 6%)
Abweichung vom HWE	p=0.265477	p=1.000000

Tabelle 8: Allelverteilung des Polymorphismus 602 C→T (S201L) im SIDS und non-SIDS-Kollektiv. Die Allelverteilung zeigt in beiden Gruppen im Fishers „exact test“ keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium (HWE).

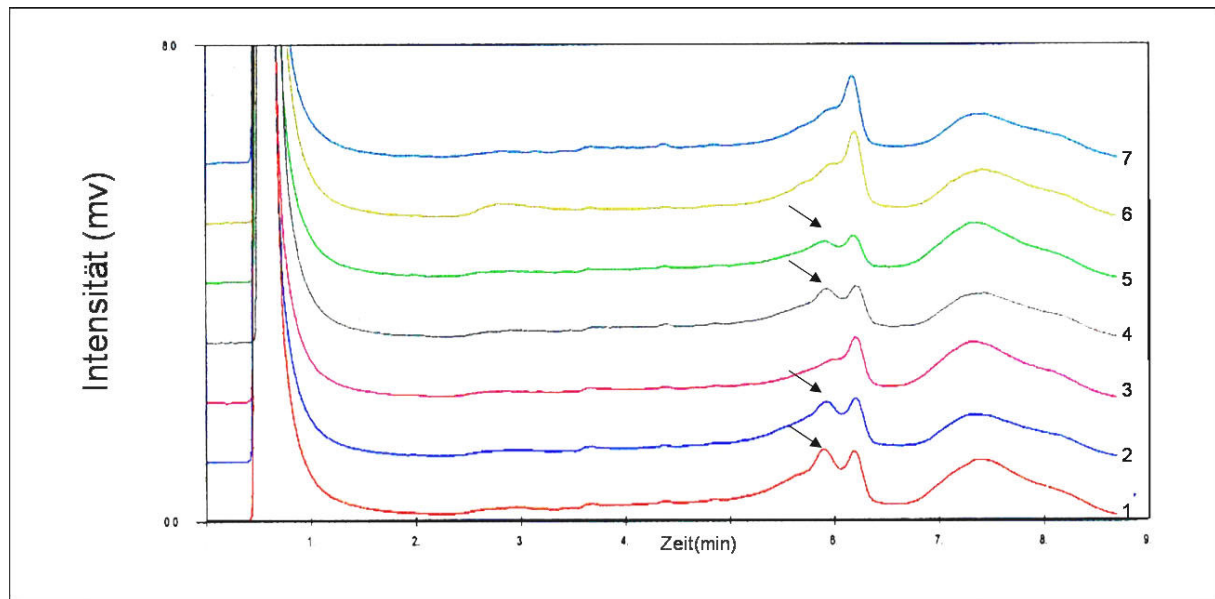


Abbildung 33: Chromatogramm Exon 5 (61°C). Markierte Proben sind heterozygot für den Polymorphismus 602 C→T (S201L) -aus dem SIDS-Kollektiv 251/00 (1) 59/00 (5) und 793/99 (2) aus der non-SIDS-Gruppe. Unauffällige Elutionsprofile zeigen der Wildtyp (7) und die SIDS-Patienten 370/00 (3) und 342/00 (7). 834/00 (4) musste im Nachhinein von der Untersuchung ausgeschlossen werden.

5.1.3.6 Exon 6

Optimale Analysebedingungen ergaben sich bei 63, 66 und 67°C. Durch Sequenzierung von Proben mit auffälligen Elutionsprofilen fanden sich neben bekannten Polymorphismen zwei vormals nicht beschriebene Missense-Varianten und eine synonyme Basenpaarsubstitution.

Die SIDS-Patienten 396/98 und 759/00 zeigten beide die vormals unbekannte Missense-Variante 767 C→G (A256G) in heterozygoter Ausprägung. Chromatogramm und Elektropherogramm sind für den Patienten 759/00 aufgeführt (Abb. 34, 35). Folge der Nukleotidsubstitution 767 C→G ist eine Aminosäuresubstitution von Alanin nach Glycin an Position 256 des Proteins. In 148 Kontrollpersonen konnte diese Veränderung nicht gefunden werden.

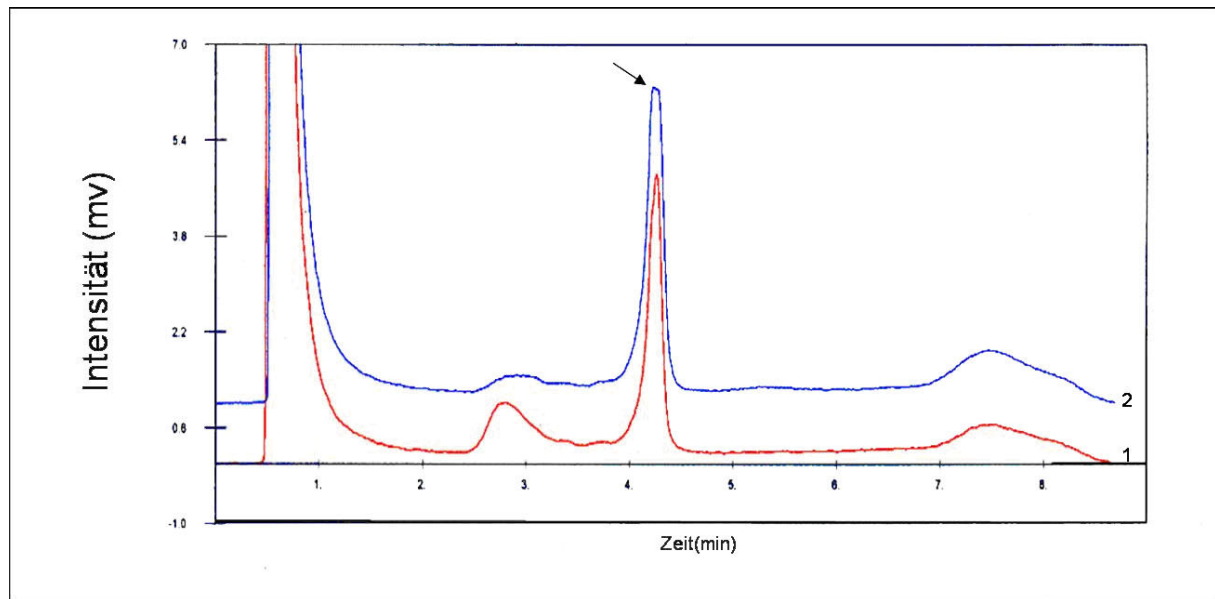


Abbildung 34: Chromatogramm Exon 6 (61°C). Markiert ist der abgeflachte Peak des Patienten 759/00 (2) im Vergleich zum Wildtypen (1).

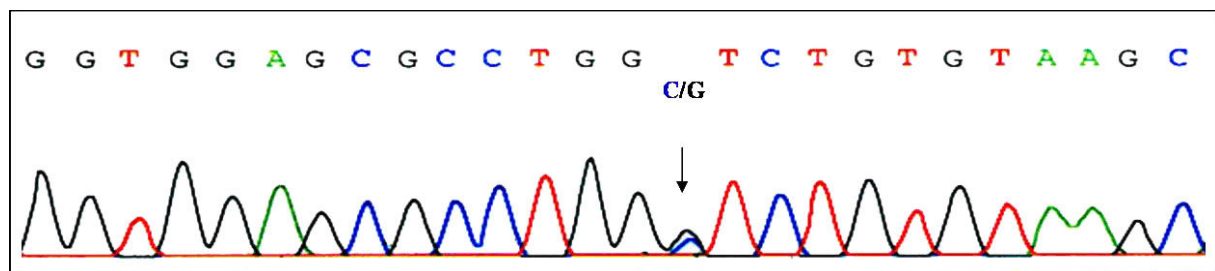


Abbildung 35: Elektropherogramm Exon 6F 759/00: Gekennzeichnet ist die neue Veränderung 767 C→G het. (A256G).

Sowohl Alanin als auch Glycin sind unpolare Aminosäuren. Der Austausch liegt im Bereich der Helikase-Domäne. Ein Sequenzvergleich orthologer Proteine zeigt die Konservierung des Alanins (Abb. 36).

AS-Position	AS-Sequenz										Spezies
251	L	V	E	R	L	A	L	C	K	Q	<i>H. sapiens</i>
248	L	V	E	R	L	A	Q	W	K	Q	<i>B. taurus</i>
250	L	V	E	R	L	A	L	C	K	K	<i>M. musculus</i>
252	L	V	E	R	L	A	K	N	K	V	<i>D. rerio</i>
247	L	V	E	R	L	A	G	Y	K	A	<i>G. gallus</i>

Abbildung 36: Vergleich der Aminosäuresequenz orthologer Proteine für die Missense-Variante 767 C→G (A256G). Alanin ist phylogenetisch hoch konserviert.

Ebenfalls bei einem SIDS-Patienten, dem Patienten 389/99, konnte durch ein auffälliges Elutionsprofil die neue Missense-Variante 838 C→G auf einem Allel identifiziert werden (L280V) (s. Abb. 37, 38). Folge ist der Austausch der Aminosäure Leucin gegen Valin an Position 280 des Proteins. Diese Veränderung wurde in 148 Kontrollpersonen nicht gefunden.

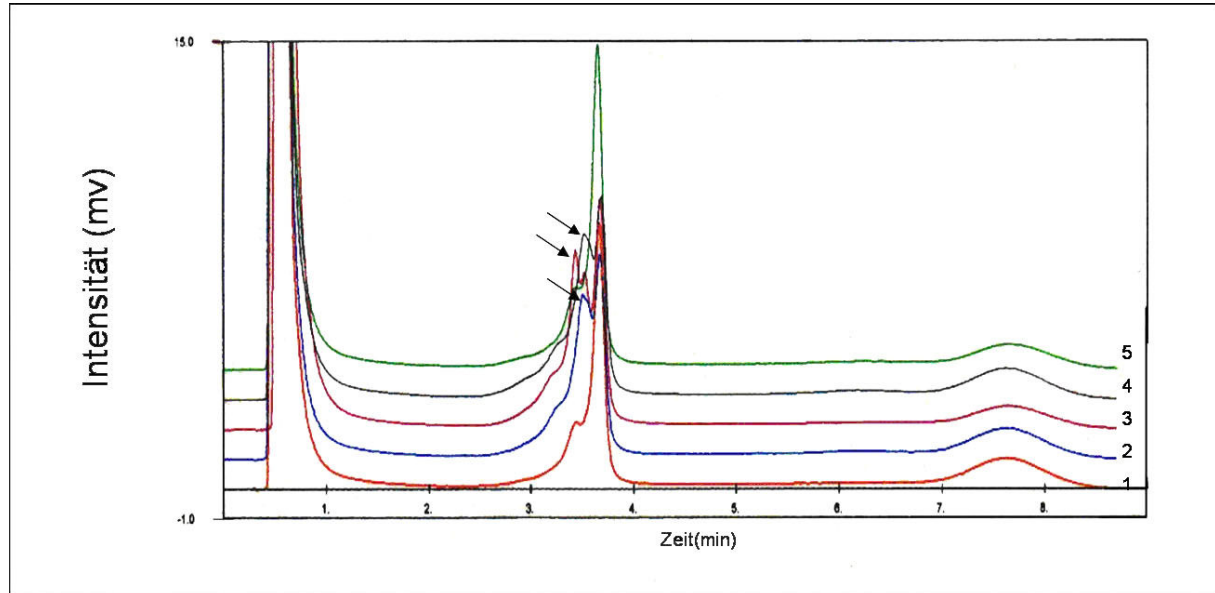


Abbildung 37: Chromatogramm Exon 6 (66°C): Wildtyp (1) und SIDS-Patienten 376/99 (2), 389/99 (3), 390/99 (4), 410/99 (5). Markiert sind auffällige Elutionsprofile. 376/99 (2) und 390/99 (4) sind heterozygot für den Polymorphismus 823 A→G (I275V), 389/99 (3) zeigte die neue Variante 838 C→G het. (L280V).

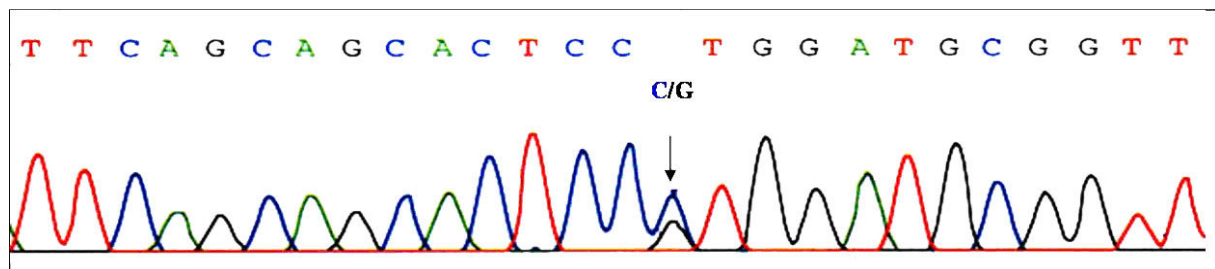


Abbildung 38: Elektropherogramm Exon 6F 389/99. Gekennzeichnet ist die Missense-Variante 838 C/G het. (L280V).

Leucin und Valin sind unpolare, aliphatische Aminosäuren, die sich nur durch eine CH₂-Gruppe unterscheiden. Die Veränderung liegt im Bereich der Helikase-Domäne. Abbildung 39 verdeutlicht die phylogenetische Konservierung.

AS-Position	AS-Sequenz										Spezies
275	V	Q	Q	H	S	L	D	A	V	L	<i>H. sapiens</i>
272	I	Q	Q	H	S	L	D	A	V	L	<i>B. taurus</i>
274	V	Q	H	H	S	L	D	A	V	L	<i>M. musculus</i>
271	I	Q	Q	H	S	L	D	A	V	L	<i>G. gallus</i>
276	I	Q	K	H	S	L	D	A	V	L	<i>D. rerio</i>

Abbildung 39: Vergleich der Aminosäuresequenz orthologer Proteine für die Missense-Variante 838 C/G (L280V). Leucin ist phylogenetisch konserviert.

Bei den SIDS-Patienten 96/99, 33/00, 419/00 und dem non-SIDS-Fall 34/99 fand sich die vor-mals nicht beschriebene, synonyme Basenpaarsubstitution 741C→T (A247A) heterozygot. Exemplarisch sind das Chromatogramm des Patienten 33/00 und Elektropherogramm des Patienten 96/99 aufgeführt (Abb. 40, 41).

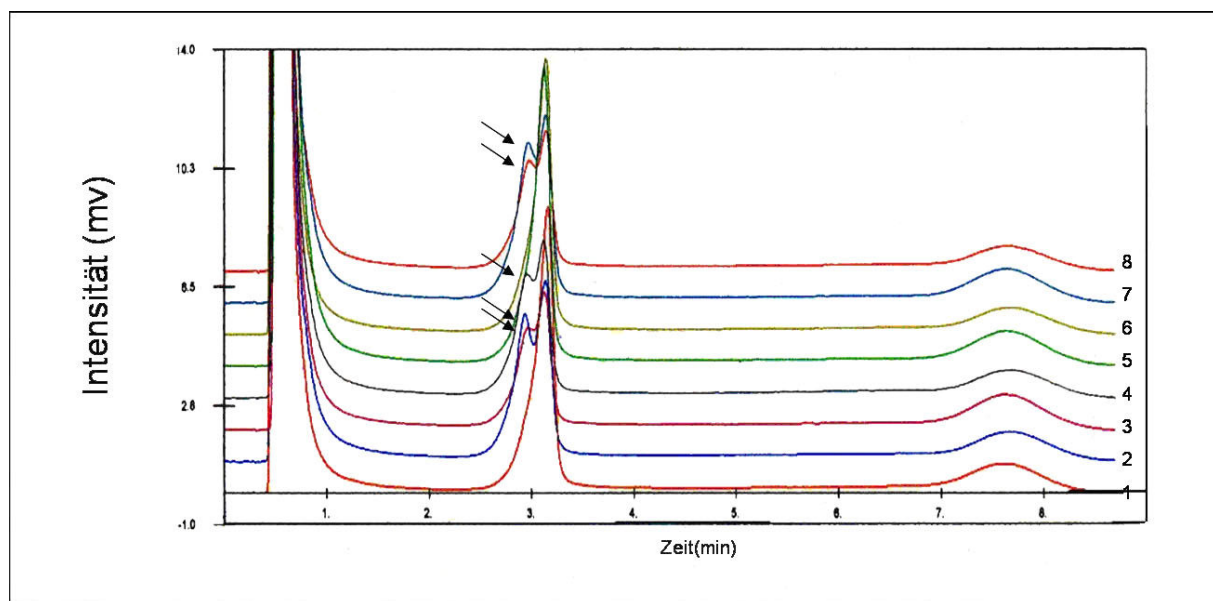


Abbildung 40: Chromatogramm Exon 6 (68°C): Wildtyp (1), 33/00 (2), 42/00 (3), 123/00 (4), 275/00 (5), 239/01 (6), 269/01 (7), 361/01 (8). Markiert sind auffällige Kurvenverläufe. Bei 33/00 (2) fand sich die neue Basenpaarsubstitution 741C→T het. (A247A). Bei den SIDS-Patienten 42/00 (3), 123/00 (4), 269/01 (7) und dem non-SIDS-Patienten 361/01 (8) zeigte sich der Polymorphismus 823 A→G het. (I275V). Der Patient 275/00 wurde im Nachhinein von der Untersuchung ausgeschlossen.

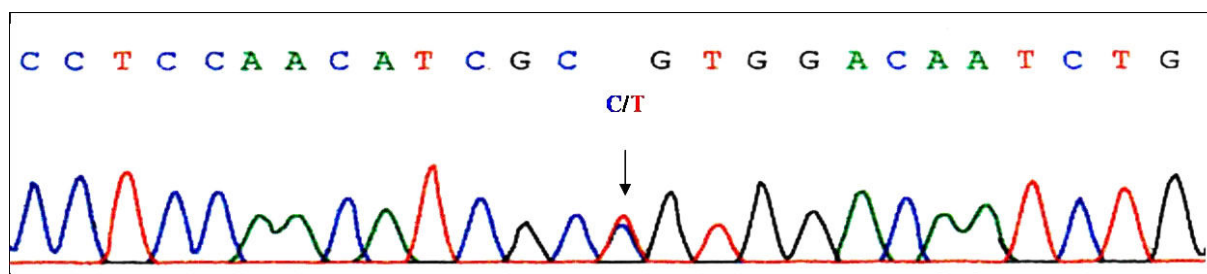


Abbildung 41: Elektropherogramm Exon 6F 96/99: Gezeigt ist die Basenpaarsubstitution 741C→T het. (A247A).

Die Allelverteilung des bekannten Polymorphismus 823 A→G (I275V) ist Tabelle 9 zu entnehmen. Als Beispiel für die chromatographische Analyse siehe Abbildungen 37 und 40.

Genotyp	SIDS- Kollektiv (n=155)	non-SIDS-Kollektiv (n=35)
A/A homozygot	105 (≈ 68%)	25 (≈ 71%)
A/G heterozygot	43 (≈ 28%)	9 (≈ 26%)
G/G homozygot	7 (≈ 4%)	1 (≈ 3%)
Abweichung vom HWE	p=0.417989	p=1.000000

Tabelle 9: Allelverteilung des Polymorphismus 823 A→G (I275V) im SIDS und non-SIDS-Kollektiv. Die Allelverteilung zeigt in beiden Gruppen im Fishers „exact test“ keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium (HWE).

5.1.3.7 Exon 7

Die Etablierung der WAVE™-Analysebedingungen brachte die in Tabelle 5 aufgeführten Ergebnisse. Es wurden keine Veränderungen im Bereich des Exons gefunden. Bei dem SIDS-Patienten 58/99 wurde eine neue intronische Variante IVS7+10 C→T heterozygot gefunden. Da laut Spleißprädiktionsprogramm keine Auswirkungen auf das Spleißen zu erwarten sind, sind weitergehenden Untersuchungen nicht durchgeführt worden.

5.1.3.8 Exon 8

Die WAVE™-Standardanalysebedingungen sind Tabelle 5 zu entnehmen. Im Bereich des Exons 8 wurden neben einem bekannten Polymorphismus eine vormals unbekannte Veränderung gefunden.

Der bekannte Polymorphismus 1143 C→T (L381L) lag heterozygot beim non-SIDS-Patienten 464/00 vor.

Bei den SIDS-Patienten 33/00 und 96/99 konnte die synonyme Basensubstitution 1104 C→T (Y368Y) auf einem Allel gefunden werden. Gezeigt ist das Chromatogramm für den Patienten 96/99, sowie das Elektropherogramm des Patienten 33/00 (Abb. 42, 43).

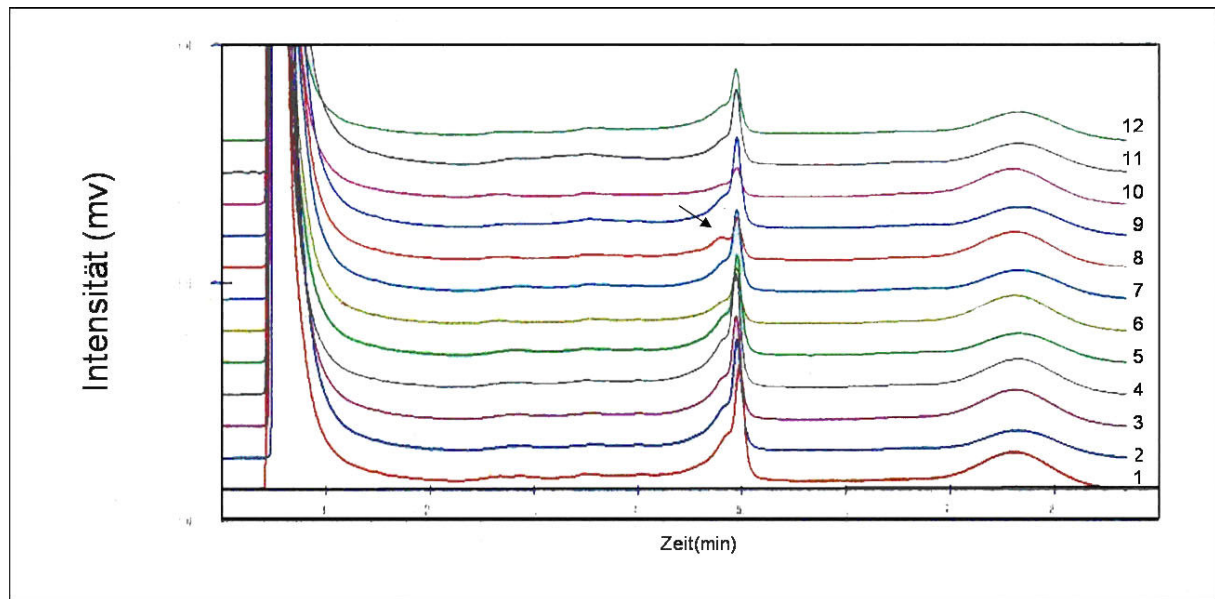


Abbildung 42: Chromatogramm Exon 8 (65°C). 396/98 (1), 51/99 (2), 58/99 (3), 59/99 (4), 63/99 (5), 80/99 (6), 85/99 (7), 96/99 (8), 126/99 (9), 286/99 (10), 286/99(11), Wildtyp (12). Markiert ist das Elutionprofil des SIDS-Patient 96/99 (8) mit verkleinertem Hauptpeak und deutlich ausgeprägtem Vorpeak. Mit Ausnahme des non-SIDS-Patienten 63/99 (5) sind alle anderen SIDS-Patienten.

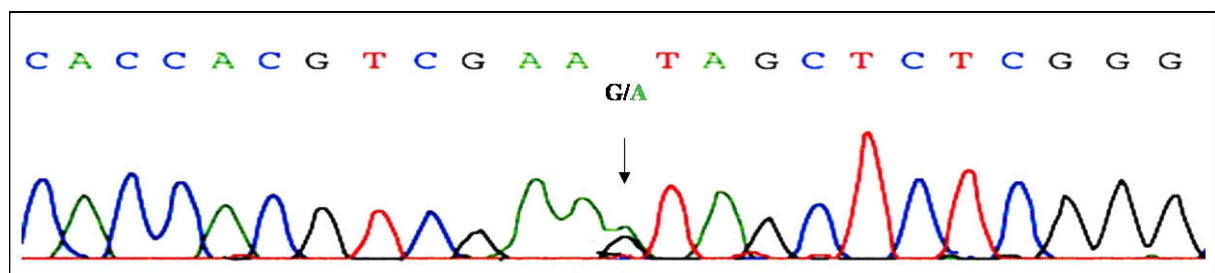


Abbildung 43: Elektropherogramm Exon 8R 33/00. Gekennzeichnet die synonyme Basensubstitution 1104 C→T het. (Y368Y).

Eine neue intronische Veränderung (IVS8+19 A→G) wurde beim SIDS-Patienten 1154/01 heterozygot gefunden. Auswirkungen auf das Spleißen sind laut Spleißprädictionsprogramm nicht zu erwarten, so dass weitergehende Untersuchungen nicht durchgeführt wurden.

5.1.3.9 Exon 9

Die Ergebnisse der WAVE™-Etablierung sind Tabelle 5 zu entnehmen. Bei 4 SIDS-Patienten und einem non-SIDS-Patienten wurde der Polymorphismus IVS9+17A→G heterozygot nachgewiesen.

5.1.3.10 Exon 10

Die WAVE™-Analysebedingungen sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Bei dem SIDS-Patienten 376/99 wurde die vormals unbekannte Missense-Variante 1483 G→C (G495R) durch direkte Sequenzierung auf einem Allel nachgewiesen (s. Abb. 44). Folge ist die Substitution der Aminosäure Glycin gegen Arginin. Diese Veränderung konnte in 148 Kontrollpersonen nicht gefunden werden.

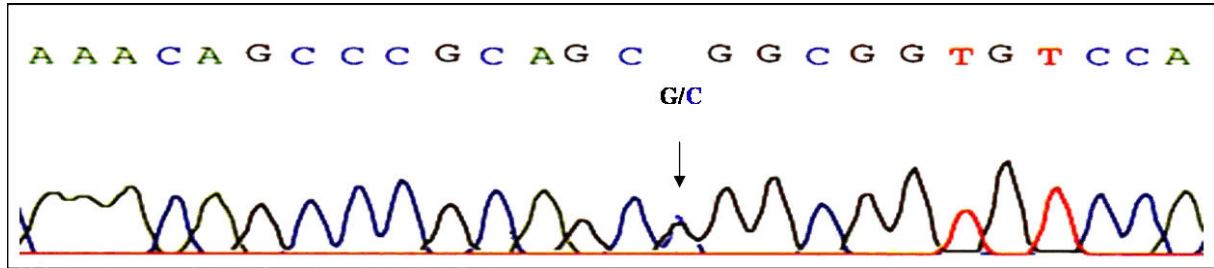


Abbildung 44: Elektropherogramm Exon 10F 376/99. Markiert ist die Missense-Veränderung 1483 G→C het (G495R).

Das konservierte, unpolare Glycin wird gegen das basische Arginin ausgetauscht (s. Abb. 45). Wie auch die anderen bisher dargestellten neuen Missense-Varianten ist diese in der Helikase-Domäne lokalisiert.

AS-Position	AS-Sequenz									Spezies	
490	L	V	D	T	A	G	C	G	L	F	<i>H. sapiens</i>
487	L	V	D	T	A	G	C	G	L	L	<i>B. taurus</i>
489	L	I	D	T	A	G	C	G	L	L	<i>M. musculus</i>
486	L	I	D	T	A	G	C	G	L	L	<i>G. gallus</i>
491	L	V	D	T	A	G	C	G	L	N	<i>D. rerio</i>

Abbildung 45: Vergleich der Aminosäuresequenz orthologer Proteine für die Missense-Variante 1483 G→C (G495R). Glycin ist in den betrachteten Spezies konserviert.

5.1.3.11 Exon 11

Die optimalen WAVE™-Analysetemperaturen waren 59°C, 61°C und 63°C. Die Allelverteilung des Polymorphismus 1554 C→T (V518V) ist in Tabelle 10 gezeigt. Exemplarisch für sämtliche Analysen ist das Chromato- und Elektropherogramm für den SIDS Patienten 342/00 aufgeführt (Abb. 46, 47).

Genotyp	SIDS- Kollektiv (n=155)	non-SIDS-Kollektiv (n=35)
C/C homozygot	102 (≈ 66%)	25 (≈ 71%)
C/T heterozygot	48 (≈ 31%)	10 (≈ 29%)
T/T homozygot	5 (≈ 3%)	0
Abweichung vom HWE	p=1.000000	p=1.000000

Tabelle 10: Allelverteilung des Polymorphismus 1554 C→T (V518V) im SIDS und non-SIDS-Kollektiv. Die Allelverteilung zeigt in beiden Gruppen im Fishers „exact test“ keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium (HWE).

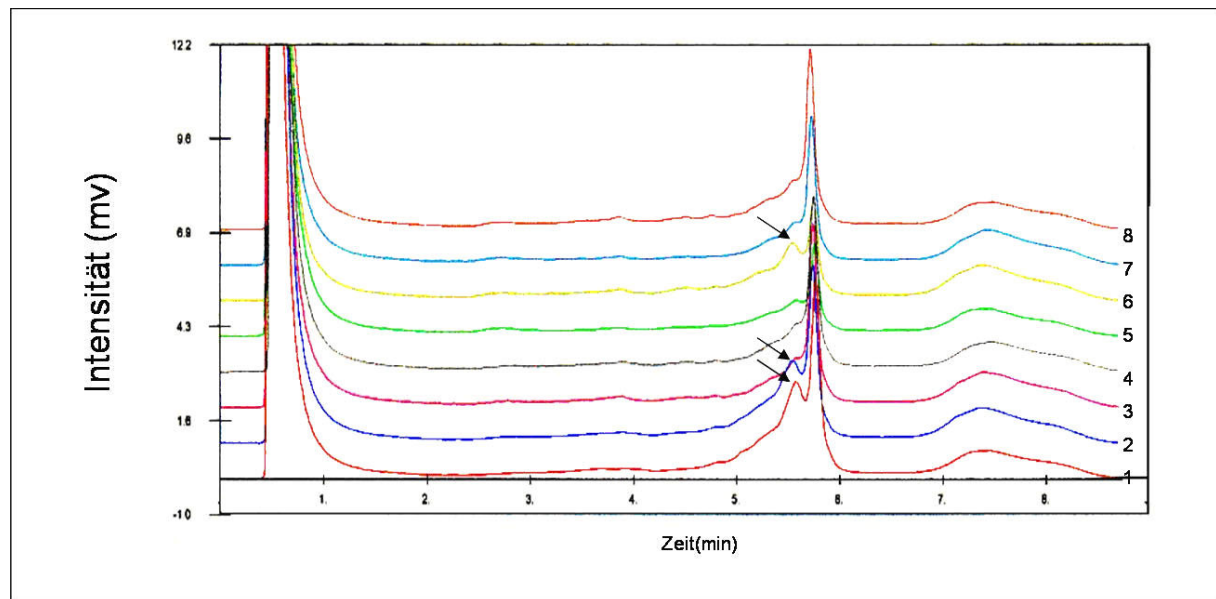


Abbildung 46: Chromatogramm Exon 11 (63°C). Dargestellt sind die Elutionsprofile der SIDS-Patienten 342/00 (1), 224/00 (2), 302/00 (3), 193/00 (4), 317/00 (5), 308/00 (6), 494/99 (7), und des Wildtyps (8). Markiert sind auffällige Kurvenverläufe mit Doppelpeaks bei den Patienten 342/00 (1), 224/00 (2) und 308/00 (3). In der Sequenzierung zeigten diese Patienten den Polymorphismus 1554 C→T het. (V518V).

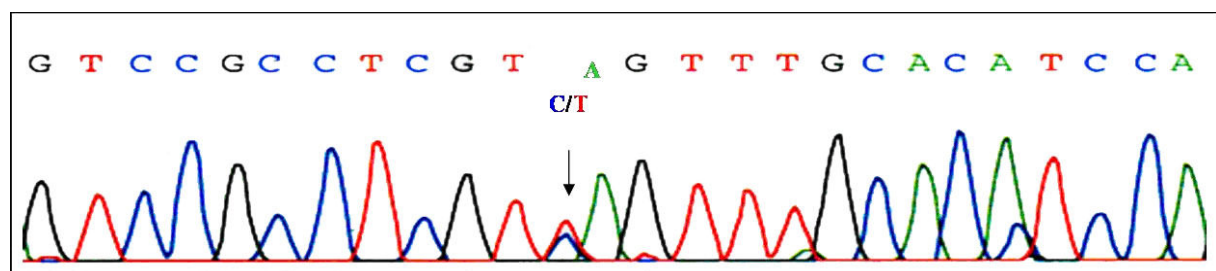


Abbildung 47: Elektropherogramm Exon 11F 342/00. Gekennzeichnet ist der Polymorphismus 1554 C→T het. (V518V).

5.1.3.12 Exon 12

Die Etablierung erbrachte optimale Untersuchungsbedingungen bei 61°C, 62°C und 63°C. Im Bereich des Exons 12 fanden sich weder bei SIDS-Patienten noch bei non-SIDS-Fällen Veränderungen. Als Beispiel einer Standarduntersuchung dient Abbildung 48.

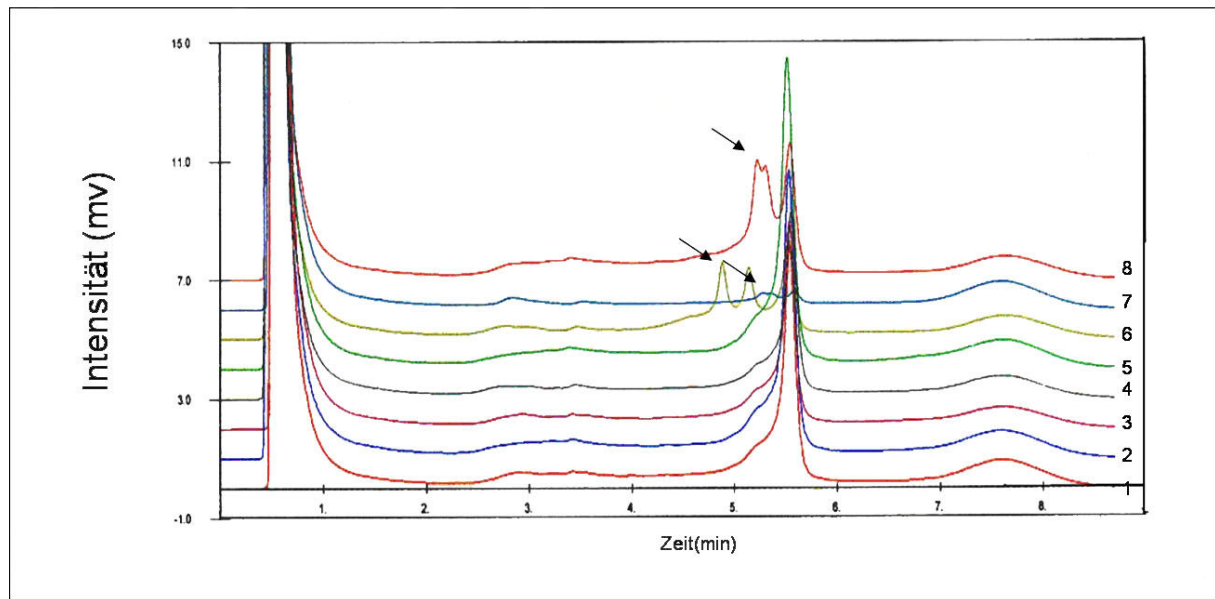


Abbildung 48: Beispielchromatogramm Exon 12 (62°C). Wildtyp (1), 731/00 (2), 759/00 (3), 1241/00 (4), 1534/00 (5), Positivkontrolle 1756 G→C het (G586C) (6), Positivkontrolle 1730 T→C het. (L577P) (7, 8). Alle Patientenproben sind unauffällig, die Positivkontrollen weisen auffällige Elutionskurven auf (Markierung).

5.1.3.13 Exon 13

Wie bei den anderen Exons wurde auch hier zu Studienbeginn versucht, das Mutationsscreening mittels DHPLC durchzuführen. Aufgrund der Größe hätte Exon 13 jedoch in vier Fragmente geteilt werden müssen. Alle Proben wurden wegen der hohen Frequenz der Polymorphismen und der Mehrkosten eines zusätzlichen Fragmentes direkt sequenziert. Die Allelverteilungen der jeweiligen Polymorphismen sind in den Tabellen 11-13 aufgeführt. Detaillierte Ergebnisse jedes einzelnen Patienten sind den Tabellen 17 und 18 zu entnehmen.

Genotyp	SIDS- Kollektiv (n=155)	non-SIDS-Kollektiv (n=35)
A/A homozygot	62 (≈ 40%)	13 (≈ 37%)
A/G heterozygot	75 (≈ 48%)	15 (≈ 43%)
G/G homozygot	18 (≈ 12%)	7 (≈ 20%)
Abweichung vom HWE	p=0.601332	p=0.497794

Tabelle 11: Allelverteilung des Polymorphismus 2011 A→G (T671A) im SIDS und non-SIDS-Kollektiv. Die Allelverteilung zeigt in beiden Gruppen im Fishers „exact test“ keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium (HWE).

Genotyp	SIDS- Kollektiv (n=155)	non-SIDS-Kollektiv (n=35)
C/C homozygot	105 (≈ 68%)	24 (≈ 68%)
C/T heterozygot	46 (≈ 30%)	10 (≈ 29%)
T/T homozygot	4 (≈ 2%)	1 (≈ 3%)
Abweichung vom HWE	p=1.000000	p=1.000000

Tabelle 12: Allelverteilung des Polymorphismus 2080 C→T (R694W) im SIDS und non-SIDS-Kollektiv. Die Allelverteilung zeigt in beiden Gruppen im Fishers „exact test“ keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium (HWE).

Genotyp	SIDS- Kollektiv (n=155)	non-SIDS-Kollektiv (n=35)
C/C homozygot	67 (≈ 43%)	14 (≈ 40%)
C/T heterozygot	71 (≈ 46%)	15 (≈ 43%)
T/T homozygot	17 (≈ 11%)	6 (≈ 17%)
Abweichung vom HWE	p=0.858811	p=0.720143

Tabelle 13: Allelverteilung des Polymorphismus 2316 C→T (S772S) im SIDS und non-SIDS-Kollektiv. Die Allelverteilung zeigt in beiden Gruppen im Fishers „exact test“ keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium (HWE).

Neben bekannten Polymorphismen fanden sich drei vormals nicht beschriebene Basensubstitutionen. Zwei gehen mit Veränderungen der Aminosäuresequenz einher. In 148 Kontrollpersonen wurden diese beiden Veränderungen nicht gefunden.

Bei dem SIDS-Patienten 439/99 fand sich die Missense-Variante 2269 C→T (R757W) heterozygot (s. Abb 49). Folge des Austausches von Cytosin gegen Thymin ist die Substitution von Arginin gegen Tryptophan an Position 757 des Proteins.

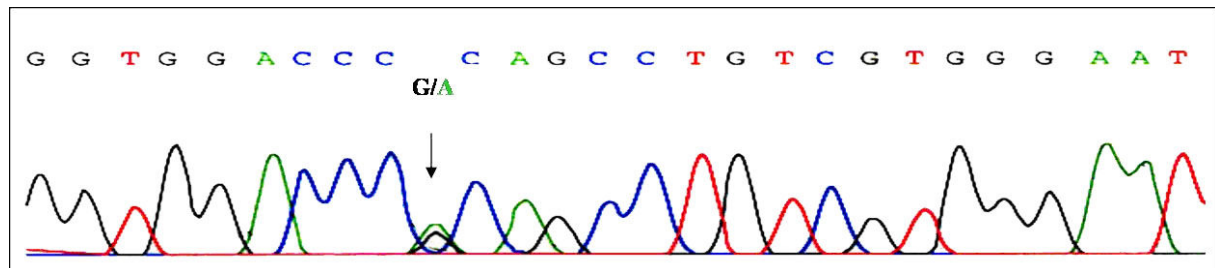


Abbildung 49: Elektropherogramm Exon 13.2R 439/99. Markiert die Missense-Variante 2269 C→T het. (R757W).

Die polar geladene, basische Aminosäure Arginin wird gegen das unpolar, ungeladene Tryptophan ausgetauscht. Der Austausch liegt im Bereich der R3H-Domäne. Bei den Säugetieren ist Arginin konserviert (s. Abb. 50).

AS-Position	AS-Sequenz										Spezies
752	S	H	D	R	L	R	V	H	Q	I	<i>H. sapiens</i>
737	P	R	D	R	L	R	V	H	Q	I	<i>B. taurus</i>
750	S	H	D	R	L	R	V	H	Q	L	<i>M. musculus</i>
720	P	H	D	R	M	L	I	H	L	L	<i>G. gallus</i>
749	S	H	D	R	L	L	V	H	E	L	<i>D. rerio</i>

Abbildung 50: Vergleich der Aminosäuresequenz orthologer Proteine für die Missense-Variante 2269C→T (R757W). Arginin ist unter den Säugetieren konserviert.

Die Sequenzierung bei dem SIDS-Patienten 138/00 zeigte die neue Missense-Variante 2360 C→T (P787L) auf einem Allel (s. Abb. 51). Folge ist der Austausch von Prolin gegen Leucin.

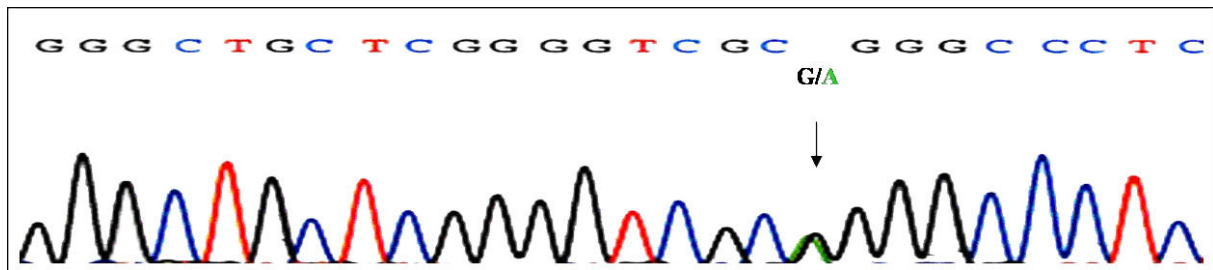


Abbildung 51: Elektropherogramm Exon 13.2R 138/00. Gekennzeichnet ist die Missense-Variante 2360 C→T (P787L) auf einem Allel.

Prolin und Leucin gehören zu den aliphatischen Aminosäuren. Prolin nimmt jedoch aufgrund seiner sekundären Aminogruppe eine Sonderstellung innerhalb dieser Gruppe ein, da es die Ausbildung der Proteinsekundärstruktur (α -Helix) beeinflusst. Phylogenetisch sind aliphatische Aminosäuren an den entsprechenden Positionen orthologer Proteine konserviert (s. Abb. 52). Die Veränderung liegt in der R3H-Domäne.

AS-Position	AS-Sequenz										Spezies
782	V	S	K	R	A	P	-	-	R	P	<i>H. sapiens</i>
767	V	S	K	R	P	P	-	-	P	T	<i>B. taurus</i>
779	V	S	R	R	S	P	-	-	-	A	<i>M. musculus</i>
750	V	R	K	K	E	F	G	Q	A	V	<i>G. gallus</i>
779	V	S	-	R	S	P	S	-	-	-	<i>D. rerio</i>

Abbildung 52: Vergleich der Aminosäuresequenz orthologer Proteine für die Missense-Veränderung 2360 C→T (P787L). An den entsprechenden Positionen sind aliphatische Aminosäuren konserviert.

Eine neue, synonyme Basensubstitution (2355 G→A (R785R)) lag beim non-SIDS-Patienten 361/01 heterozygot vor(s. Abb. 53).

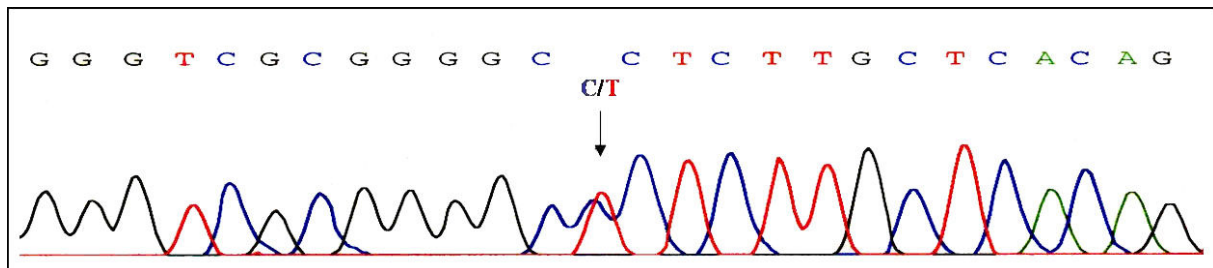


Abbildung 53: Elektropherogramm Exon 13.2R 361/01. Dargestellt ist die neue, synonyme Basensubstitution 2355 G→A (R785R) auf einem Allel.

5.1.3.14 Exon 14

Für das Exon 14 ergaben sich optimale DHPLC-Bedingungen bei den Temperaturen 58°C, 61°C und 63°C. Als Beispiel einer DHPLC-Analyse dient Abbildung 54.

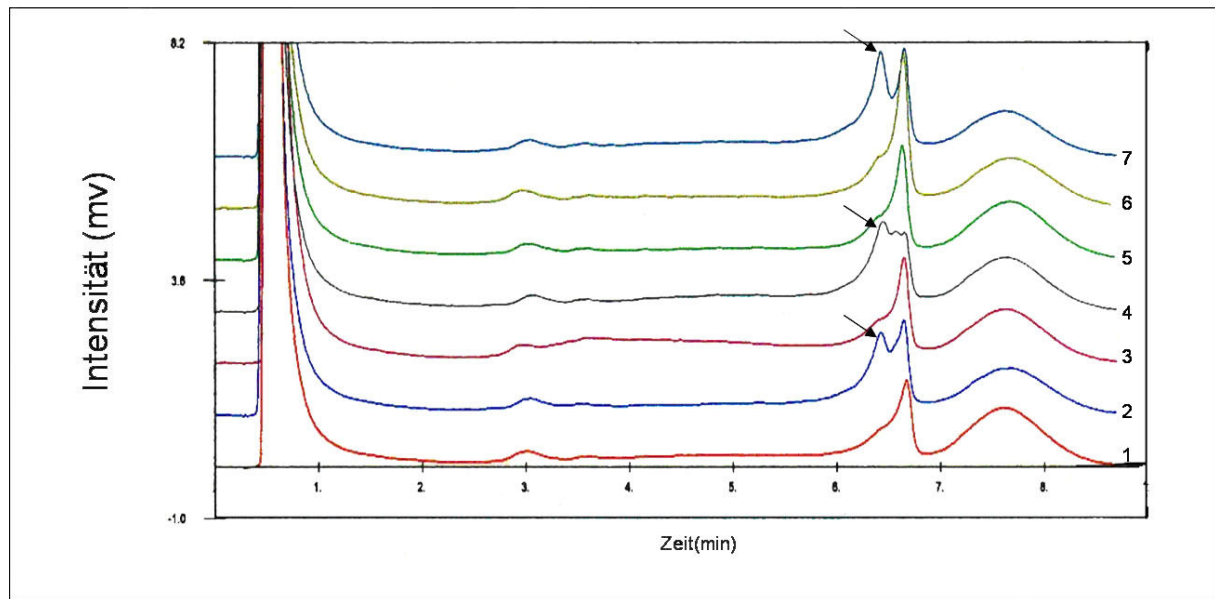


Abbildung 54: Chromatogramm Exon 14 61°C. SIDS-Patienten 277/01 (2), 144/99 (4) zeigten bei Sequenzierung den intronischen Polymorphismus IVS14+54 G→A und den Polymorphismus 2636 C→A (T879K) in heterozygoter Ausprägung. Beide Polymorphismen traten in homozygoter Ausprägung bei dem SIDS-Patienten 157/99 (7) auf. Auf die Darstellung der Elektropherogramme wird verzichtet. Unauffällige Kurvenverläufe zeigen die SIDS-Patienten 256/00 (5) und 1328/99 (6), der non-SIDS-Fall 411/99 (3) und der Wildtyp (1).

Die Allelverteilungen der Polymorphismen IVS14+54 G→A und 2636 C→A het. (T879K) sind in den Tabellen 11 und 12 aufgeführt. Bei dem Patienten 216/99 findet sich neben dem Polymorphismus 2636 C→A (T879K) in heterozygoter Ausprägung die neue synonyme Variante 2751C→T (S917S) ebenfalls heterozygot (s. Abb. 55).

Genotyp	SIDS- Kollektiv (n=155)	non-SIDS-Kollektiv (n=35)
G/G homozygot	120 (≈ 77%)	28 (≈ 80%)
G/A heterozygot	32 (≈ 21%)	6 (≈ 17%)
A/A homozygot	4 (≈ 2%)	1 (≈ 3%)
Abweichung vom HWE	p=0.282918	p=0.361764

Tabelle 14: Allelverteilung des Polymorphismus IVS14+54 G→A im SIDS und non-SIDS-Kollektiv. Die Allelverteilung zeigt in beiden Gruppen im Fishers „exact test“ keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium (HWE).

Genotyp	SIDS- Kollektiv (n=155)	non-SIDS-Kollektiv (n=35)
C/C homozygot	97 (≈ 63%)	25 (≈ 71%)
C/A heterozygot	54 (≈ 35%)	9 (≈ 26%)
A/A homozygot	4 (≈ 2%)	1 (≈ 3%)
Abweichung vom HWE	p=0.448441	p=1.000000

Tabelle 15: Allelverteilung des Polymorphismus 2636 C→A (T879K) im SIDS und non-SIDS-Kollektiv. Die Allelverteilung zeigt in beiden Gruppen im Fishers „exact test“ keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium (HWE).

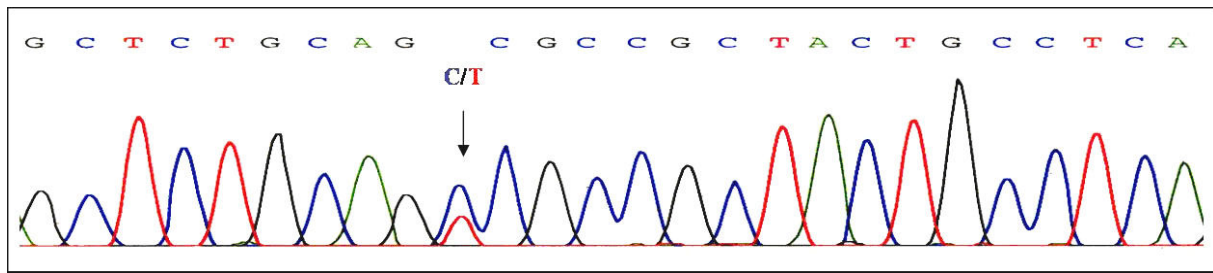


Abbildung 55: Elektropherogramm Exon 14F 216/99. Markiert die neue, synonyme Variante 2751C→T (S917S) in heterozygoter Ausprägung.

5.1.3.15 Exon 15

Die Etablierungsversuche für Exon 15 scheiterten, da die Elutionsprofile einiger Positivkontrollen unauffällig waren. Alle Proben wurden daher direkt sequenziert. Basensequenzabweichungen fanden sich bei dem Patienten 1123/00 des SIDS-Kollektives und bei dem Patienten 255/00 der non-SIDS-Gruppe.

Bei dem SIDS-Patienten 1123/00 fand sich die neue Missense-Variante 2863G→A (G955R) heterozygot (s. Abb. 56). Folge ist die Aminosäuresubstitution Glycin nach Arginin an Position 955 des Proteins. In 148 Kontrollpersonen wurde diese Veränderung nicht gefunden.

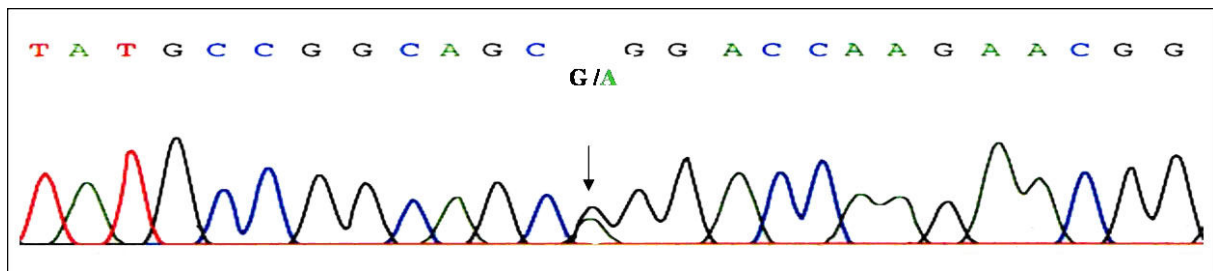


Abbildung 56: Elektropherogramm Exon 15F 1123/00. Gekennzeichnet ist die Missense-Veränderung 2863 G→A het (G955R).

Das unpolare, ungeladene Glycin wird durch das polare, geladene und basische Arginin ersetzt. Diese Veränderung liegt außerhalb funktioneller Domänen. Glycin ist an den entsprechenden Positionen orthologer Proteine von Säugetieren konserviert (s. Abb. 57).

AS-Position	AS-Sequenz										Spezies
950	L	Y	A	G	S	G	T	K	N	G	<i>H. sapiens</i>
936	L	Y	P	G	S	G	T	K	D	R	<i>B. taurus</i>
948	L	Y	A	G	S	G	T	K	D	R	<i>M. musculus</i>
928	L	Y	P	G	S	S	P	K	D	K	<i>G. gallus</i>
944	L	Y	A	G	S	G	Q	K	D	K	<i>D. rerio</i>

Abbildung 57: Vergleich der Aminosäuresequenz orthologer Proteine für die Missense-Variante 2863 G→A (G955R). Glycin findet sich an der entsprechenden Position bei den untersuchten Spezies mit Ausnahme des Huhns, bei dem Glycin gegen Serin substituiert ist.

Bei dem non-SIDS-Patienten 255/00 trat bei der Sequenzierung die Variante 2922T→C (D974E) heterozygot auf (s. Abb.58). Diese wurde bereits früher in der Routinediagnostik unserer Arbeitsgruppe gefunden. Der damals untersuchte SMARD1-Patient zeigte insgesamt drei unbekannte Missense-Varianten, so dass nicht klar war, ob es sich bei dieser Variante um einen seltenen Polymorphismus oder eine Mutation handelt. Bei einem anderen SMARD1-Patienten konnten jedoch kürzlich zwei bekannte Mutationen neben dieser Veränderung identifiziert werden, so dass davon auszugehen ist, dass es sich bei dieser Veränderung um einen seltenen Polymorphismus handelt.

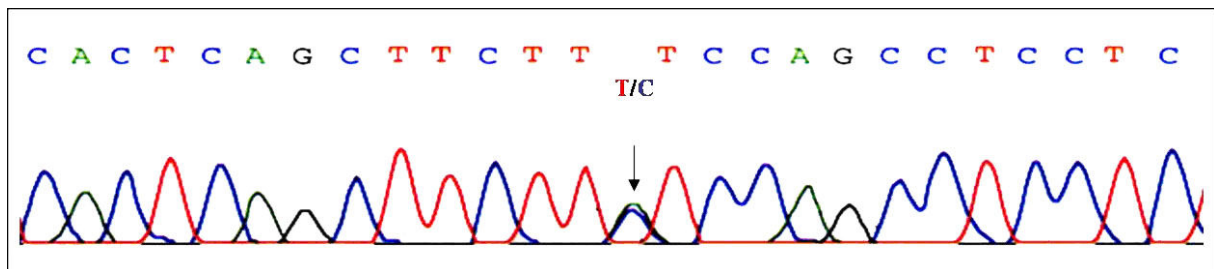


Abbildung 58: Elektropherogramm Exon 15F 255/00. Gekennzeichnet ist der seltene Polymorphismus 2922 T→C het. (D974E).

5.1.4 Zusammenfassung der molekulargenetischen Ergebnisse

Eine Gesamtübersicht von vormals nicht beschriebenen Varianten in intronischen, untranslatierten und exonischen Bereichen ist in Tabelle 16 gegeben.

Exon	SIDS-Kollektiv(n=155)	non-SIDS-Kollektiv (n=35)
1	IVS1+113 C→G het. (2)	
3		277 G→A het. (D73N) (1); 344 C→T het. (T115M) (1)
6	741 C→T het. (A247A) (3); 767 C→G het. (A256G) (2); 838 C→G het. (L280V) (1)	741 C→T het. (A247A) (1)
7	IVS7+10 C→T het. (1)	
8	IVS8+19 A→G het (1); 1104 C→T het. (Y368Y) (2)	
10	1483 G→C het. (G495R) (1)	
13	2269 C→T het. (R757W) (1) 2360 C→T het. (P787L) (1)	2355 G→A het (R785R) (1)
14		2751 C→T het (S917S) (1)
15	2863 G→A het. (G955R) (1)	

Tabelle 16: Gesamtübersicht vormals nicht beschriebener Veränderungen. Rot markiert sind Veränderungen, die eine Aminosäuresubstitution verursachen und in Kontrollproben nicht gefunden wurden.

Die molekulargenetischen Ergebnisse zu den SIDS- und non-SIDS-Gruppen sind in den Tabellen 17 und 18 zusammengestellt.

Patient	Exon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
398/98		1a	-	-	-	-	8b	-	-	-	-	-	-	18a	-	-
410/98		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
4/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a	-	-
35/99		1a	3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
37/99		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51/99		1a	3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
58/99		1a	-	-	-	-	9b	33b	-	35b	-	14b	-	16b	36b	-
59/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
85/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18b	-	-
96/99		1b, 28b	3b	-	-	6b	7b	-	11b	-	-	-	-	-	-	-
110/99 I		1b	-	-	-	6b	-	-	-	35b	-	-	-	-	36b	-
110/99 II		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
123/99		1a	-	-	31a	-	9a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
126/99		1a	-	-	31a	-	-	-	-	-	-	14a	-	-	-	-
140/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
144/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
150/99		1a, 27b	-	-	31b	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
157/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23a, 36a	-
184/99		1a	3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
186/99		1a	-	-	-	6a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
193/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 16b, 22b	-	-
220/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
267/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b	23b	-
286/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
298/99		1b, 27b	-	-	31b	6b	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	-	-
305/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
322/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
371/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
376/99		1a, 27b	-	-	31b	6b	9b	-	-	-	13 b	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
389/99		1b	-	-	-	-	10b	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
390/99		1a, 27b	-	-	31b	-	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	23b, 36b	-
410/99		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	23b	-
419/99		1b, 27b	-	-	-	6b	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	-	-
439/99		1a, 27b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b, 20b	-	-

Patient	Exon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
440/99		1a	-	-	-	6a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
447/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b	-
449/99		1a, 27b	-	-	31b	-	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	23b	-
494/99		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	23b, 36b	-
519/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a-	-	-
550/99		1a, 27a	-	-	-	-	9a	-	-	-	-	14a	-	16a	-	-
568/99		1a, 27b	-	-	31b	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
693/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
960/99		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
1136/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
1184/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23b	-
1185/99		1a, 27b	-	-	31b	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18a	-	-
1195/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b	-
1230/99		1a, 27a	-	-	31a	-	9a	-	-	-	-	14b	-	16a	-	-
1258/99		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	16b, 18b	-	-
1271/99		1a	29b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23a	-
1328/99		1a, 27a	-	-	-	-	9a	-	-	-	-	14a	-	16a	-	-
1645/99		1b, 27b	-	-	31b	6b	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	-	-
1685/99		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
2133/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
01/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33/00		1a	-	-	-	-	7b	-	11b	35b	-	-	-	-	23b, 36b	-
42/00		1b, 27b	-	-	31b	6b	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	-	-
59/00		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
71/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
79/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
90/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
91/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
94/00		1b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 18b	-	-
105/00		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	23b	-
110/00		1a, 27b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
119/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23a, 36a	-
122/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
123/00		1a, 27b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
125/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
130/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
133/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
138/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a, 21b	-	-

Patient	Exon	1	-2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
141/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
174/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
193/00		1a	-	-	6a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
201/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
223/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
224/00		1a, 27b	-	-	-	9b	-	-	-	-	-	14b	-	15b, 18b	-	-
240/00		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	23b, 36b	-
251/00		1b	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
256/00		1b	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
262/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
293/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
302/00		1b	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
305/00		1a	2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
308/00		1a, 27b	-	-	-	9b	-	-	-	-	-	14b	-	16b	23b, 36b	-
309/00		1b, 27b	-	-	31b	6b	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	-	-
310/00		1a	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	-	-	-
331/00		1a, 27b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	23b, 36b	-
342/00		1a, 27b	-	-	31b	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
343/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
359/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
370/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
377/00		1a, 27b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
419/00		1a, 28b	-	-	31b	-	7b	-	-	-	-	-	-	-	23b, 36b	-
470/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
475/00		1a, 27b	-	-	31b	-	-	-	-	-	-	14b	-	16b	23b,	-
482/00		1a, 27b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	23b, 36b	-
498/00		1a, 27b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
500/00		27b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	23b, 36b	-
729/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b-	-
759/00		1a	-	-	-	-	8b	-	-	-	-	14b	-	-	-	-
947/00		1a, 27b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
1114/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
1123/00		1a, 27b	-	-	31b	-	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	23b	25b
1236/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b	-
1814/00		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b	-	-
9/01		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	23b	-
13/01		1a, 27b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	23b	-
17/01		1a, 27b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-

Patient	Exon	1	-2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
34/01		1a, 27b	-	-	-	9b	-	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
66/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
68/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b	-
70/01		1a, 27b	-	-	31b	9b	-	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
140/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
146/01		1a	-	-	-	9b	-	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
161/01		1a, 27b	-	-	31b	9b	-	-	-	-	-	14b	-	16b	23b, 36b	-
188/01		1a, 27b	-	-	-	9b	-	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
189/01		1a, 27b	-	-	-	9b	-	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
211/01		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
228/01		1a, 27b	-	-	31b	-	-	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
238/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
247/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
259/01		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
263/01		1a, 27b	-	-	31b	9b	-	-	-	-	-	14b	-	16b	23b	-
269/01		1a, 27b	-	-	31b	9b	-	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
277/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b	23b, 36b	-
304/01		1a, 27a	-	-	-	9a	-	-	-	-	-	14a	-	16a	-	-
331/01		1a, 27b	-	-	31b	9b	-	-	-	-	-	14b	-	16b	23b	-
339/01		1a	-	-	-	9b	-	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
347/01		1a, 27b	-	-	-	9b	-	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
362/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	35b	-	-	-	-	23b, 36a	-
366/01		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	16b	23b, 36b	-
370/01		1a, 27b	-	-	-	9b	-	-	-	-	-	14b	-	16b	23b, 36b	-
384/01		1a, 27b	-	-	31b	9b	-	-	-	-	-	14b	-	15b	-	-
403/01		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	23b	-
412/01		1a	-	-	-	6a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
417/01		1a	-	-	31a	9a	-	-	-	-	-	14a	-	16a	-	-
447/01		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	23b, 36b	-
453/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
463/01		1a, 27b	-	-	31b	9b	-	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	36b	-
512/01		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	23b	-
565/01		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
576/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b	-
583/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b	-
595/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b	-
731/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b	-
824/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b	-

Exon Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
910/01	1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b	-
1154/01	1a	-	-	-	-	-	-	34b	-	-	-	-	15b, 18b	23a, 36a	-
371/01	1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 17: Gesamtübersicht molekulargenetischer Ergebnisse der SIDS-Patienten.

Patient	Exon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
412/98		1b, 27b	-	-	-	-	9b	-	-	-	-	14b	-	16b, 18b	23b, 36b	-
15/99		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
21/99		1b	-	4b	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
34/99		1a	-	-	-	-	7b	-	-	35b	-	-	-	15b, 18b	-	-
63/99		1a	3b	-	-	-	-	-	-	-	-	14b	-	-	-	-
216/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 24b	-
236/99		1a, 27b	-	-	31b	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
290/99		27b	-	-	-	6b	9b	-	-	-	-	-	-	16b	-	-
342/99		1a	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
411/99		1b, 27b	-	-	-	6b	9a	-	-	-	-	14b	-	16b	-	-
421/99		1a	2b, 30b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18b	-	-
485/99		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
640/99		1a	-	5b	-	6a	-	-	-	-	-	-	-	19b	-	-
793/99		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
2080/99		1b, 27b	-	-	31b	6b	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	-	-
36/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
63/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16a	23b, 36b	-
116/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
118/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	-	-
132/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
144/00		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
255/00		1b, 27b	-	-	31b	6b	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	-	26b
269/00		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
359/00		1a	3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23a, 36a	-
464/00		1a	-	-	-	-	-	-	12b	-	-	-	-	15b, 18b	23b	-
483/00		1a	-	-	-	6a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44/01		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	-	23b, 36b	-
205/01		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	-	-
239/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15b, 18b	23b, 36b	-
289/01		1a, 27b	-	-	31b	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b	-	-
335/01		1a, 27b	-	-	31b	-	9b	-	-	-	-	14b	-	16b	23b	-
337/01		1a, 27b	-	-	31b	-	9b	-	-	-	-	14b	-	15b, 16b, 18b, 20b	23b	-
361/01		1a, 27b	-	-	31b	-	9b	-	-	-	-	14b	-	-	-	-
630/01		1b	-	-	-	6b	-	-	-	-	-	-	-	15a, 18a	23b	-
863/01		1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 18: Gesamtübersicht molekulargenetischer Ergebnisse der non-SIDS-Patienten.

Veränderung	dbSNP rs# cluster ID (falls vorhanden)	Codierung
57T→C (L19L)	rs1249463	1
151C→G (Q51E)		2
180C→T (Y60Y)	rs34617762	3
277G→A (D73N)		4
344C→T (T115M)		5
602C→T (S201L)	rs560096	6
741C→T (A247A)		7
767C→G (A256G)		8
823A→G (I275V)		9
838C→G (L280V)		10
1104C→T (Y368Y)		11
1143C→T (L381L)		12
1483G→C (G495R)		13
1554C→T (V518V)	rs11228413	14
2011A→G (T671A)	rs622082	15
2080C→T (R694W)	rs2236654	16
2269C→T (R757W)		17
2316C→T (S772S)	rs546382	18
2322A→G (E774E)		19
2355G→A (R757R)		20
2360C→T (P787L)		21
2439G→A (A813A)		22
2636C→A (T879K)	rs17612126	23
2751C→T (S917S)		24
2863G→A (G955R)		25
2922T→C (D974E)		26
5'UTR-2 C→T		27
IVS1+113 C→G		28
IVS2+9 G→A		29
IVS2+27 A→T		30
IVS3-72 G→T		31
IVS6+32 G→A		32
IVS7+10 C→T		33
IVS8+19 G→A		34
IVS9+17 A→G		35
IVS14+54 G→A		36
homozygot *		a
heterozygot		b

Tabelle 19: Legende Gesamtübersichtstabellen. *Homozygot für das vom Wildtyp abweichende Allel.

5.1.5 Klinische Befunde der Patienten mit heterozygoten Missense-Varianten im *IGHMBP2*-Gen

Bei sieben Patienten des SIDS-Kollektives und zwei Patienten der non-SIDS-Gruppe wurden *IGHMBP2*-Veränderungen gefunden, die mit Veränderungen der Aminosäuresequenz einhergehen und in Kontrollpersonen nicht gefunden werden konnten.

Die SIDS-Patientin **396/98** (767 C→G het. (A256G)) wurde nach einer unkomplizierten Schwangerschaft in der 40. Schwangerschaftswoche mit einem Gewicht von 3615g und 51cm spontan geboren. Der plötzliche Tod trat in einem Alter von 4 Monaten auf. Bei Auffinden war die Patientin stark verschwitzt. Die kindliche Entwicklung war bis zum Todeszeitpunkt unauffällig. In den Vorsorgeuntersuchungen konnten keine Anhaltspunkte für eine respiratorische Insuffizienz oder neuromuskuläre Erkrankung gefunden werden. Forensisch wurde dieser Fall der

SIDS-Kategorie 2 zugeordnet. Die Patientin hat zwei gesunde Geschwister. Die Mutter hatte eine Fehlgeburt. Beide Eltern sind Kaukasier.

Die SIDS-Patientin **389/99** ((838 C→G het. (L280V)) wurde in der 24. Schwangerschaftswoche mit einem Geburtsgewicht von 650g bei einer Länge von 32cm verfrüht geboren. Bei dem anschließenden 4 1/2 Monate dauernden Krankenhausaufenthalt traten rezidivierend Atemprobleme mit Sättigungsabfällen und kardialen Arrhythmien auf. Nach der Entlassung wurde ein Heimmonitoring durch die Eltern nicht weitergeführt. Das Kind verstarb in einem Alter von 8,5 Monaten. Bei Auffinden war das Kind stark verschwitzt. Die Sektion zeigte eine leichte Tracheitis, fokale Bronchiolitis und eine geringgradige Glomerulosklerose. Virologisch konnte ein CMV-Infekt nachgewiesen werden. Forensisch wurde dieser Fall der SIDS-Kategorie 2 zugeordnet. Die Mutter dieser türkischstämmigen Familie hatte eine Fehlgeburt. Ein älteres Geschwisterkind ist gesund.

Der SIDS-Patient **759/00** (767 C→G het. (A256G)) wurde nach unkomplizierter Schwangerschaft in der 39. Schwangerschaftswoche mit einem Gewicht von 3010g und einer Länge von 49cm spontan geboren. Die frühkindliche Entwicklung war unauffällig. Bei den Vorsorgeuntersuchungen fanden sich keine Auffälligkeiten. Im Alter von 11 Monaten verstarb der Junge plötzlich. Auffällig war das exzessive Schwitzen bei Auffinden der Leiche. In der Obduktion fanden sich eine leichte Tracheitis, eine Bronchitis und eine Pneumonie. Forensisch wurde dieser Fall der SIDS-Kategorie 3 zugeordnet. Die Eltern des Patienten sind Kaukasier. Ein älteres Geschwisterkind ist gesund.

Der Patient **376/99** (1483 G→C het. (G495R)) wurde als Zwilling in der 36. Schwangerschaftswoche mit einem Gewicht von 1410g bei einer Größe von 40cm durch Kaiserschnitt geboren. Die kindliche Entwicklung verlief verzögert und alle Körpermaße lagen zum Todeszeitpunkt mit fast 8 Monaten unterhalb der 3. Perzentile. Bei der Sektion zeigte sich neben einem Infekt der oberen Atemwege eine periventrikuläre Leukomalazie. Forensisch wurde dieser Fall der Kategorie 2 zugeordnet. Der Zwilling des Patienten lebt noch und hat eine neurologische Erkrankung, die mit einer Spastik einhergeht. Genauere Angaben zur Erkrankung sind im Studienzentrum nicht vorhanden. Ob es sich bei diesem Zwillingenpaar um eineiige Zwillinge handelt, ist nicht dokumentiert. Ein älteres Kind der aus Russland und Kasachstan stammenden Eltern ist gesund.

Der SIDS-Patient **439/99** (2269 C→T het. (R757W)) wurde in der 42. Schwangerschaftswoche durch Kaiserschnitt geboren. Das Geburtsgewicht war 3450g bei einer Länge von 49cm. Der Junge verstarb nach unauffälliger Entwicklung im Alter von zwei Monaten. Bei Auffinden war das Kind stark verschwitzt. Bei Sektion zeigten sich ein Infekt der oberen Atemwege und eine beginnende Pneumonie. Histopathologisch fanden sich Schockäquivalente und Myokardinfiltra-

te. Forensisch wurde dieser Fall der Kategorie 3 zugeordnet. Die Frau dieser aus dem ehemaligen Jugoslawien stammenden Familie hatte eine Fehlgeburt. Ein älteres Geschwisterkind ist gesund.

Der SIDS-Patient **138/00** (2360 C→T het. (P787L)) wurde in der 38. Schwangerschaftswoche aufgrund einer Steißlage durch Kaiserschnitt geboren. Das Geburtsgewicht betrug 3270g bei einer Länge von 53cm. Die postnatale Entwicklung war unauffällig. Im Alter von 8 Monaten verstarb das Kind plötzlich. Es wurde von einem Infekt der Luftwege vor dem Tod berichtet. Mikrobiologisch konnten Pneumokokken nachgewiesen werden. Forensisch wurde dieser Fall der Kategorie 3 zugeordnet. Die Eltern dieses Kindes sind Kaukasier.

Die SIDS-Patientin **1123/00** (2863 G→A het. (G955R)) wurde als Erstgeborene spontan in der 43. Schwangerschaftswoche mit einem Gewicht von 3620g bei einer Länge von 51cm geboren. Bei unauffälliger frühkindlicher Entwicklung verstarb sie plötzlich im Alter von anderthalb Monaten. Histologisch zeigte sich eine lymphozytäre Infiltration des Lungeninterstitiums. Forensisch wurde dieser Fall der Kategorie 2 zugeordnet. Die Familie stammt aus der Türkei.

Die non-SIDS-Patientin **21/99** (277 G→A het. (D93N)) ist in der 43. Schwangerschaftswoche mit einem Gewicht von 4250g und einer Länge von 57cm durch Kaiserschnitt geboren worden. Im Alter von 19 Tagen verstarb sie plötzlich. Histologisch fanden sich eine Bronchopneumonie und eine bakterielle Epikarditis. Virologisch konnte ein RSV-Infekt nachgewiesen werden. Im Gehirn zeigten sich Ganglienzelluntergänge, die als Zeichen prolongierter Apnoephasen gewertet wurden. Forensisch erfolgte die Zuordnung zur Kategorie 4/geklärte Todesursache/non-SIDS. Die Mutter der Patientin ist deutscher Herkunft, der Vater stammt aus Italien. Aus der Anamnese ist bekannt, dass der Bruder der Mutter im Alter von 3 Monaten an SIDS verstarb.

Der non-SIDS-Patient **640/99** (344 C→T het. (T115M)) wurde als Zwilling mit einem Gewicht von 2050g bei einer Länge von 42cm verfrüht geboren. Die Mutter der Zwillinge war drogenabhängig, so dass nach der Geburt ein stationärer Aufenthalt zum Drogenentzug notwendig war. Zunehmend traten Gedeihstörungen auf. Der Patient hat nur 1300g in 3 Monaten zugenommen. Im Alter von 3 Monaten verstarb er an einer eitrigen Herdpneumonie mit Sepsis. Mikrobiologisch konnte eine Mischinfektion mit Pseudomonaden und Haemophilus influenzae nachgewiesen werden. Der andere Zwilling verstarb ebenfalls bei einer Pflegefamilie. Über die Krankengeschichte des Zwillings ist nichts bekannt. Forensisch wurde dieser Fall als geklärter Todesfall der Kategorie 4 zugeordnet.

6 Diskussion

6.1 Bewertung der zum Mutationsscreening verwendeten Methoden

6.1.1 Sensitivität, Spezifität und Zuverlässigkeit der DHPLC

Die DHPLC ist eine halbautomatisierte Methode zum Nachweis genetischer Veränderungen. In Bezug auf Sensitivität und Spezifität ist die DHPLC der früher verwandten Einzelstrangkonnformationspolymorphismusanalyse (single stranded conformation polymorphism oder analysis SSCP bzw. SSCA) weit überlegen¹²⁵. Für das WAVE™-Analysesystem wird eine Sensitivität von 93-100% beschrieben, wobei der Temperatur eine herausragende Bedeutung zukommt^{127,128}. Angaben zur Sensitivität dieser Arbeit lassen sich nicht geben, da die Überprüfung der DHPLC-Ergebnisse die Sequenzierung aller Proben erfordert hätte. Eine orientierende Einschätzung erlauben jedoch die Etablierungsversuche. Bei diesen waren mit Ausnahme der Exons 1, 4 und 15 alle Sequenzvariationen in Positivkontrollen detektierbar.

Aussagen über die in dieser Arbeit erreichte Spezifität lassen sich nicht machen, da „richtig negative Ergebnisse“ nicht durch Sequenzierung bestätigt wurden. „Falsch positive Ergebnisse“ traten gelegentlich v.a. zu Beginn der Screeninguntersuchung durch fehlende Erfahrung des Untersuchers auf.

Genetische Veränderungen an unterschiedlichen Positionen, d.h. Schmelzdomänen des zu untersuchenden Abschnittes, machen verschiedene Analysetemperaturen notwendig, um falsch negative Ergebnisse zu verhindern. In der Regel wurden durch Etablierungsversuche drei Analysetemperaturen ausgewählt. Die besten Analysebedingungen wurden bei einem Anteil von 60-90% denaturierter DNA erreicht. Die ermittelten Analysetemperaturen lagen im Bereich von 54-67°C. Diese Ergebnisse decken sich mit den bisher veröffentlichten Angaben zum Analysetemperaturbereich von 50-70°C¹²⁹.

Als Vorteile der DHPLC werden weiterhin die Analysegeschwindigkeit und die einfache Anwendung und Auswertung genannt¹²⁵. Teilweise müssen die genannten Vorteile jedoch kritisch betrachtet werden: Die reine Analysedauer einer Probe bei einer Temperatur beträgt ohne Vorbereitungen ca. 10min. Geht man von 3 Analysetemperaturen aus, ergibt sich eine Analysezeit von 30min. je Probe. Bei 48 Proben entspräche dies einer Laufzeit von etwa 24h. Ein Zeitvorteil ist bei Sequenzierung in einem 48 Kapillarsequenzierautomaten, in dem die Sequenzierung von 48 Proben parallel innerhalb einer Stunde erfolgt, nicht mehr vorhanden. Bei eingeschränktem Zugang zu modernen Sequenzierautomaten ist die DHPLC als Alternative jedoch weiterhin in

Betracht zu ziehen. Der schnellen und einfachen Chromatogrammauswertung stehen Auswertungsunsicherheiten bei gering abweichenden Kurvenverläufen gegenüber.

Einige Autoren beschreiben, dass mutationsspezifische Elutionsprofile eine anschließende Sequenzierung überflüssig machen – „*genotyping by DHPLC*“¹³⁰. Diese Annahme konnte durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt werden. So werden in Abbildung 40 im Ergebnisteil fünf auffällige Elutionskurven vorgestellt. Diese unterscheiden sich nicht oder nur geringfügig. Vier der fünf Proben wiesen den gleichen Polymorphismus und die fünfte Probe eine neue Variante auf. Durch das „*genotyping by DHPLC*“ wäre diese Patientenprobe falsch analysiert worden. Dieses Beispiel unterstützt jedoch Beobachtungen anderer Autoren, die ähnliche Elutionskurven bei unterschiedlichen Varianten einer Schmelzdomäne beschreiben^{125,128}.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die DHPLC älteren Screeningmethoden wie z.B. der SSCP weit überlegen ist. Nach Etablierung der Analysebedingungen ist die DHPLC ein schnelles und kostengünstiges Screeningverfahren. In dieser Arbeit wurde die DHPLC nach erfolgreicher Etablierung zur Screeninguntersuchung in 11 von 15 Exons eingesetzt. Als Schwäche dieser Methode müssen Auswertungsunsicherheiten bei gering abweichenden Kurvenverläufen, die z.B. durch Ofentemperaturschwankungen verursacht sein können, genannt werden. Es können falsch positive Ergebnisse entstehen, die überflüssige Sequenzierungen bedingen. Ein von einigen Autoren beschriebenes „*genotyping by DHPLC*“ ist für das *IGHMBP2*-Gen nicht möglich.

6.1.2 Sequenzierung

Die von Sanger entwickelte Kettenabbruchmethode zur Sequenzierung entspricht der genauesten Mutationsanalyse¹²⁶. Nachteilig sind auf den ersten Blick der relativ große Zeitaufwand zur Sequenzierungsvorbereitung, die anschließende Analyse in einem Sequenzierungsautomaten und die zeitaufwendige Auswertung der Elektropherogramme. Neuere Sequenzierungsautomaten (z.B. 96-capillary 3730xl DNA Analyzer der FA. Applied Biosystems) ermöglichen jedoch die gleichzeitige Analyse größerer Probenmengen und neu entwickelte Computersoftware (z.B. DNASTAR Lasergene der FA. GATC Biotech) verringert den Aufwand der Auswertung. Bei vorhandenen technischen Ressourcen sollte die Sequenzierung aufgrund von Sensitivität und Arbeitsaufwand der DHPLC als Screeningverfahren vorgezogen werden.

6.2 Ergebnisse der Untersuchungen des GeSID-Kollektivs

6.2.1 Häufigkeit der gefundenen Veränderungen

Es wurden beim Mutationsscreening des GeSID-Kollektivs eine Vielzahl unbekannter genetischer Varianten sowohl in exonischen als auch in intronischen Bereichen gefunden (s. Tab.16). Die gefundenen Veränderungen entsprechen ausnahmslos Missense-Varianten. In mindestens 148 Kontrollpersonen wurden diese Veränderungen nicht gefunden und können somit als häufige Polymorphismen ausgeschlossen werden¹³¹. Auch in 308 Patienten, bei denen die Verdachtsdiagnose SMARD1 durch Sequenzierung aller Exons und exonflankierender Bereiche ausgeschlossen wurde, wurden weder diese Varianten beschrieben noch andere Missense-Varianten gefunden. Im SIDS-Kollektiv traten heterozygote Missense-Veränderungen in 4,5% und in der non-SIDS-Gruppe in 5,7% der Fälle auf. Neue synonyme Varianten fanden sich in der SIDS-Gruppe in 5,8% der Fälle und im non-SIDS-Kollektiv in 8,6% der Fälle.

6.2.2 Haben die gefundenen Missense-Veränderungen pathogenetische Relevanz?

Bei SMARD1-Patienten fanden sich Missense-Mutationen nur im Bereich der Helikase-Domäne und traten homozygot oder als compound-heterozygote Veränderung mit jeder anderen Art von Mutation auf^{25-29,31-33,121}. Einige Autoren berichten, dass bei einigen Patienten bekannte *IGHMBP2*-Genmutationen auf nur einem Allel nachweisbar waren²⁶⁻²⁸. In einer nachfolgenden Arbeit gelang u.a. mittels RNA-Untersuchungen der Nachweis „genomischer Rearrangements“ auf dem anderen Allel³². Untersuchungen auf RNA-Ebene waren für die hier gefundenen, neuen Missense-Varianten aufgrund der schlechten Qualität der Zelllinien nicht möglich. Alle 8 Mutationen betreffen in Säugetieren konservierte Aminosäuren, 7 davon liegen zudem in funktionellen Domänen (Helikase-Domäne, R3H-Domäne). Eine Ausnahme bildet G955R im Exon 15, knapp außerhalb des Zinkfingermotivs. Hier wird eine unpolare gegen eine polare Aminosäure ausgetauscht. In Verbindung mit der hohen Konservierung von Glycin an dieser Position könnte dies dafür sprechen, dass es sich um eine funktionell relevante Variante handelt.

6.3 SMARD1 als ätiologischer Faktor des Sudden Infant Death Syndrome?

6.3.1 Betrachtung der SIDS- und non-SIDS-Patienten mit genetischen Veränderungen im IGHMBP2-Gen

Unspezifische Befunde, die bei der SIDS-Patientin **396/98** mit einer SMARD1 vereinbar wären, sind der Todeszeitpunkt und das Verschwitztsein bei Auffindung. Beide Eltern sind Kaukasier. Die Herkunft aus einem anderen Kulturkreis mit einem von Kaukasiern abweichenden Muster genetischer Polymorphismen/Varianten ist somit als Ursache für die unbekannte Missense-Variante 767 C→G (A256G) ausgeschlossen. Alanin ist an der entsprechenden Position orthologer Proteine konserviert. Glycin und Alanin sind beide aliphatische, unpolare und ungeladene Aminosäuren. Glycin besitzt in dieser Gruppe jedoch unter sterischen Gesichtspunkten aufgrund seines Wasserstoffatoms eine Sonderrolle. Klinische Hinweise auf eine SMARD1-Erkrankung finden sich nicht. Auch bei dem SIDS-Patienten **759/00**, der die gleiche molekulargenetische Veränderung wie die SIDS-Patientin 396/98 zeigte, fanden sich zum Todeszeitpunkt im 11. Monat keine Anzeichen, die auf eine SMARD1-Erkrankung hingewiesen hätten. Exzessives Schwitzen und ein respiratorischer Infekt der oberen Atemwege können mit der SMARD1 assoziiert sein. Dieses sind allerdings äußerst unspezifische Symptome.

Die SIDS-Patientin **389/99** kam als Frühgeborenes zur Welt. In der Krankengeschichte werden rezidivierende Atemprobleme mit Sättigungsabfällen und kardialen Arrhythmien berichtet. Das Kind verstarb im Alter von 8,5 Monaten. Beim Auffinden war es stark verschwitzt. Bei Obduktion fanden sich Hinweise auf einen respiratorischen Infekt. Die türkische Abstammung der Familie könnte die Ursache sein, dass die Missense-Variante (838C→G (L280V)) bisher nicht beschrieben wurde. Die phylogenetische Konservierung des Leucins könnte einen Hinweis auf einen pathogenetischen Charakter geben. Die Diagnose einer SMARD1 kann jedoch nicht gestellt werden.

Der Zwilling **376/99** kam ebenfalls als Frühgeborenes zur Welt. Während der frühkindlichen Entwicklung traten nicht näher definierte Gedeihstörungen auf. Bei der Sektion nach dem Tod im 8. Lebensmonat fand sich neben einem Infekt der oberen Atemwege eine periventrikuläre Leukomalazie. All diese Symptome könnten mit einer SMARD1-Erkrankung assoziiert sein, wobei die Leukomalazie Folge einer Hypoxie sein könnte. Der Zwilling des Patienten lebt noch. Anamnestisch wird bei ihm zum Interviewzeitpunkt (kurz nach dem Tode des anderen Zwilings) eine Spastik beschrieben, wobei die Ursache nicht geklärt ist bzw. über weitere Krankheitssymptome keine Informationen vorliegen. Ob es sich um ein eineiiges Zwillingsspaar handelt, war nicht dokumentiert. Die phylogenetische Konservierung der Veränderung (1483G→C

(G495R)) könnte Hinweise auf einen pathogenetischen Charakter geben. Weiterführende molekulargenetische Untersuchungen auf RNA-Ebene wären aufgrund der klinischen Daten und der Familienanamnese interessant gewesen. Die Diagnose einer SMARD1 kann mit den vorliegenden unspezifischen Befunden nicht gestellt werden.

Der SIDS-Patient **439/99** verstarb nach unauffälliger Entwicklung im Alter von zwei Monaten. SIDS-typische Befunde waren Verschwitztsein und ein Infekt der oberen Atemwege. Hinweise auf eine neuromuskuläre Erkrankung fanden sich nicht. Die Veränderung (2269C→T (R757W)) ist im Bereich der R3H-Domäne lokalisiert und unter Säugetieren konserviert. Eine basische Aminosäure wird gegen eine unpolare Aminosäure mit Indol-Ringsystem ausgetauscht. Auch der SIDS-Patient **138/00** (2360 C→T het. (P787L)) entwickelte sich bis zum Todeszeitpunkt im 8. Lebensmonat unauffällig. Anhaltspunkte für eine neurologische Erkrankung fanden sich nicht. Der respiratorische Infekt konnte mikrobiologisch einem Pneumokokkeninfekt zugeordnet werden. Prolin ist bei den Säugetieren phylogenetisch konserviert. Es nimmt aufgrund seiner sekundären Aminogruppe eine Sonderstellung ein, da es die Ausbildung der Proteinsekundärstruktur (α -Helix) stört. Klinisch erscheint eine SMARD1-Erkrankung in beiden letztgenannten Fällen als Todesursache unwahrscheinlich.

Die frühkindliche Entwicklung der SIDS-Patientin **1123/00** war unauffällig. Der plötzliche Tod trat außerhalb des Hauptmanifestationsalters der SMARD1 im Alter von 6 Wochen auf. Auch anamnestisch ergeben sich keine Hinweise auf eine SMARD1-Erkrankung. Die Veränderung 2863 G→A (G955R) geht mit einem Austausch des unpolaren, ungeladenen Glycins durch das polare, geladene und basische Arginin einher. Der Austausch findet 18 Aminosäuren hinter dem Zinkfingermotiv statt. Glycin ist an den entsprechenden Positionen orthologer Proteine von Säugetieren konserviert.

Die non-SIDS-Patientin **21/99** verstarb in einem Alter von 19 Tagen. Der Tod wurde als Folge eines RSV-Infekt erklärt. Der frühe Todeszeitpunkt spricht gegen eine SMARD1-Erkrankung. In der Anamnese wird berichtet, dass ein Bruder der Mutter an SIDS verstarb. Ob dieser die gefundene Missense-Veränderung (277G→A (D73N)) und eine zweite Veränderung auf dem anderen Allel trug, wäre reine Spekulation. Familienuntersuchungen waren aufgrund des Aufbaus der GeSID nicht möglich. Die Veränderung liegt im Bereich der Helikase-Domäne und ist mit Ausnahme des Zebrafisches konserviert.

Der non-SIDS-Patient **640/99** war ein Zwilling, wobei nicht bekannt ist, ob das Zwillingsspaar eineiig oder zweieiig war. Der Patient wurde verfrüht mit vermindertem Geburtsgewicht geboren. Aufgrund einer Sepsis verstarb der Patient im Alter von 3 Monaten. Auch der Zwilling ver-

starb in einer Pflegefamilie. Anhaltspunkte für eine SMARD1-Erkrankung liegen nicht vor. Entwicklungsstörung, Infektanfälligkeit und letztendlich der Tod beider Zwillinge könnten durch Folgen des mütterlichen Drogenabusus bedingt sein.

6.3.2 Pathogenetische Überlegungen

Bei keinem unserer SIDS-Patienten mit potentiell pathogenen Missense-Varianten liegen spezifische Hinweise auf das Vorliegen von SMARD1 vor. Entsprechend hat sich auch in keinem Fall eine Homo- oder Compound-Heterozygotie für eine Mutation im *IGHMBP-2* Gen nachweisen lassen. Nimmt man an, dass SMARD1-Patienten als SIDS fehldiagnostiziert werden könnten, so erscheint das von uns untersuchte Kollektiv zu klein: Das SIDS hat eine Inzidenz von etwa 1 auf 1000 Geburten. Die SMARD1 mit einem geschätzten Anteil von 1% an autosomal-rezessiven spinalen Muskelatrophien hätte demnach eine Inzidenz von etwa 1:1.000.000. Dabei würden allerdings alle SMARD1-Fälle im Säuglingsalter an SIDS sterben und könnten nicht mehr das Krankheitsbild der SMARD1 entwickeln.

Signifikante Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium sind bei den untersuchten Polymorphismen (s. Tab. 6-15) nicht zu finden, so dass das Vorliegen eines bestimmten Risikoallels eher unwahrscheinlich ist. Einschränkend muß allerdings berücksichtigt werden, dass die ethnische Herkunft des untersuchten Kollektives nicht einheitlich war und Nicht-Kaukasier im Kontrollkollektiv unterrepräsentiert sind.

In der Literatur finden sich in letzter Zeit mehr und mehr Arbeiten, die einen Zusammenhang von seltenen Varianten oder auch bekannten krankheitsauslösenden Mutationen auf einem Allel bei autosomal-rezessiven Krankheiten für eine Krankheitsprädisposition beschreiben^{132,133}.

Unter 155 SIDS-Fällen wurden 7 Missense-Varianten gefunden, die bei 148 Kontrollpersonen nicht vorlagen. Im Fishers „exact test“ ist dieser Unterschied signifikant ($P = 0,015$). Unterstrichen wird dieses Ergebnis noch durch den Vergleich mit den „Laborkontrollen“, bei denen unter 308 Patienten mit klinischem Verdacht auf SMARD1 keine dieser 6 verschiedenen Missense-Varianten oder andere Missense-Varianten gefunden wurde ($P = 0,0004$). Zur Bestimmung der „Odds ratio“ muss bei den Kontrollen eine Mutation (statt 0) eingegeben werden. Sie beträgt dann 6,95 (Konfidenz Intervall: 1,1 – 43,7), dürfte also tatsächlich noch darüber liegen. Auch unter den 35 non-SIDS Fällen fanden sich zwei unbekannte Missense-Varianten. Gegenüber den 148 Kontrollen ist auch dieser Unterschied signifikant ($P = 0,036$). Es ist demnach nicht auszu-

schließen, dass die Heterozygotie für Mutationen im *IGHMBP2*-Gen eine Prädisposition für plötzliche Todesfälle im Kindesalter also sowohl für SIDS, als auch für non-SIDS darstellt. Über einen möglichen Mechanismus kann man nur spekulieren. So kann man eine Haploinsuffizienz oder ein „gain of function“ bei heterozygoten Mutationen im *IGHMBP2*-Gen nicht ausschließen. Neben der genetischen Prädisposition könnten z.B. Infektionen, die bei fast allen unserer Patienten mit Missense-Varianten und auch bei den non-SIDS-Fällen auftraten und dort eine Klassifikation als non-SIDS-Fall bedingten, als Triggerfaktor in Frage kommen. Das von Opdal einwickelte Modell mit einem Zusammenwirken eines prädisponierenden Faktors an einem vulnerablen Entwicklungsstadium und bestimmten Triggerfaktoren kann als Vorbild dienen (s. Abb. 6) ⁹⁶. Es könnte erklären, dass auf der einen Seite Eltern von SMARD1-Patienten mit *IGHMBP2*-Genmutationen nicht im Kindesalter versterben und auf der anderen Seite non-SIDS-Fälle, bei denen z.B. eine Infektion das prägende Bild ist, heterozygote Missense-Varianten aufweisen. Aus diesen Überlegungen geht hervor, dass die von uns untersuchten non-SIDS-Fälle in diesem Fall nicht das optimale „interne“ Kontrollkollektiv sind. Man müsste molekulargenetisch SIDS-Fälle mit Fällen von Kindstötungen vergleichen. Letztendlich könnte aber auch die geringe Größe des non-SIDS-Kollektives einen statistischen Zusammenhang vortäuschen.

Insgesamt erscheint das Patientenkollektiv zu klein, um einen monogenen Zusammenhang, d.h. die Fehldiagnose eines SIDS bei SMARD1-Patienten sicher auszuschließen. Ein komplexgenetischer Zusammenhang im Sinnen einer Prädisposition für SIDS durch heterozygote *IGHMBP2*-Mutationen müsste in einem größeren Kollektiv repliziert werden. Weiterhin könnten funktionelle und Untersuchungen auf RNA-Ebene Anhaltspunkte für einen pathogenetischen Charakter geben.

6.4 Bewertung der Familienuntersuchung

Im Ergebnisteil wurden die molekulargenetischen und klinischen Ergebnisse einer weiteren Familie mit zwei SMARD1-Erkrankten und einem SIDS-Fall berichtet. Leider war kein Untersuchungsmaterial des SIDS-Patienten zu erhalten. Die Familie hat mit der anderen SMARD1-SIDS-Familie gemeinsam, dass SIDS bei einem älteren Geschwisterkind diagnostiziert wurde, d.h. bevor die Diagnose einer SMARD1-Erkrankung in der Familie gestellt wurde. Hinweise auf eine SMARD1 fanden sich bei beiden SIDS-Betroffenen nicht. Sowohl eine Prädisposition durch Heterozygotie für Mutationen im *IGHMBP2*-Gen als auch die Fehldiagnose SIDS bei SMARD1-

Patienten mit Homozygotie im *IGHMBP2*-Gen sind in diesen beiden Familien nicht auszuschließen.

6.5 Auswirkungen auf die klinische Arbeit und SMARD-Forschung

Die Etablierung der DHPLC-Analyse für das *IGHMBP2*-Gen kann in Zukunft für die Diagnostik und v.a. für das Mutationsscreening größerer Patientenkollektive genutzt werden.

Der klinische Vergleich des SIDS mit der SMARD1 zeigte, dass das SMARD1 als SIDS fehldiagnostiziert werden kann. Diese Untersuchung hat hierfür jedoch keinen direkten Beleg geliefert. Ursache könnte die Größe des untersuchten Kollektivs sein. Bei SIDS-Patienten sollte die Leichenschau, Obduktion und Anamnese eine eventuelle SMARD1-Erkrankung miterfassen, da weiterhin nicht auszuschließen ist, dass homozygote Mutationen im *IGHMBP2*-Gen in Einzelfällen Ursache von SIDS sein können. Überraschenderweise fand sich unter den SIDS-Fällen eine signifikante Zunahme heterozygoter Mutationen im *IGHMBP2*-Gen, so dass auch eine Prädisposition durch heterozygote Mutationen nicht ausgeschlossen werden kann. In Familien mit SMARD1-Erkrankungen in der Anamnese, sollte daher bei Auftreten von SIDS während der Leichenschau einmal auf Krankheitsmanifestationen, die auf eine SMARD1-Erkrankung hinweisen, geachtet, zum anderen aber auch molekulargenetisch das Vorliegen von Heterozygotie überprüft werden, um eine mögliche Prädisposition durch heterozygote Mutationen im *IGHMBP2*-Gen zu bestätigen.

Die SMARD ist eine genetisch heterogene Erkrankung. Auch andere SMARD-Typen, deren molekulare Ursache derzeit noch nicht geklärt ist, haben wie die SMARD1 ebenfalls Symptome, die sich mit dem SIDS überschneiden. Diese SMARD-Erkrankungen sind somit ebenfalls als potentielle Ursache des SIDS in Erwägung zu ziehen. SIDS-Patienten sollten, wenn die molekularen Grundlagen dieser SMARD-Typen geklärt wird, auf Mutationen in den entsprechenden Genen überprüft werden.

7 Zusammenfassung

Die Spinale Muskelatrophie mit Atemnot/SMARD1 wird autosomal-rezessiv vererbt und ist eine genetisch heterogene Erkrankung. Die SMARD1 ist bedingt durch biallelische Mutationen im *IGHMBP2*-Gen²⁵. Das Leitsymptom ist Atemnot, die Folge einer Zwerchfelllähmung ist und sich langsam progredient entwickeln oder akut auftreten kann. Die Atembeschwerden beginnen meist in den ersten sechs Lebensmonaten, seltener in den ersten Lebenswochen. Neben den Atembeschwerden entwickeln sich eine distal betonte Muskelschwäche und -atrophie. Herzrhythmusstörungen sind ebenfalls ein häufiges Begleitsymptom. Ein Langzeitüberleben der Patienten ist nur durch mechanische Beatmung möglich. In zwei Familien mit SMARD1-Patienten traten gleichzeitig plötzliche Säuglingstodesfälle auf^{27,32}.

Der plötzliche Säuglingstod/Sudden Infant Death Syndrome/SIDS ist nach wie vor die häufigste Todesursache der Postnatalperiode in der westlichen Welt. Die zugrunde liegenden Pathomechanismen sind ungeklärt⁶⁶. In einigen Fällen wurde eine Verbindung zu genetisch bedingten, neuromuskulären Erkrankungen oder kardiorespiratorischen Störungen hergestellt^{71,96}. Nur wenige Untersuchungen finden sich zum Diaphragma, dem wichtigsten Atemmuskel des Säuglings¹¹¹. Untersuchungen zu genetisch bedingten Zwerchfellstörungen fehlen gänzlich. Ein Vergleich der klinischen Manifestation des SIDS und der SMARD1 verdeutlicht, dass sich der Phänotyp der SMARD1 und SIDS überschneidet und der Tod eines SMARD1-Patienten als SIDS fehldiagnostiziert werden könnte.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob ein ätiologischer Zusammenhang zwischen der SMARD1 und dem Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) besteht.

Molekulargenetisch konnte in einer aus dem Kosovo stammenden Familie mit zwei von einer Muskelerkrankung betroffenen Kindern die Diagnose einer SMARD1-Erkrankung gestellt werden. Die beiden Kinder sind homozygot für die Nonsense-Mutation 138T→A (C46X). Das älteste Geschwisterkind dieser Familie war an SIDS verstorben. Diese Familie ist die zweite, von uns untersuchte SMARD1-Familie, in der ein älteres Geschwisterkind an SIDS verstorben ist. Ob homozygote Mutationen im *IGHMBP2*-Gen auch ursächlich für den plötzlichen Tod des älteren Geschwisterkindes waren, konnte aufgrund fehlenden Untersuchungsmaterials leider nicht geklärt werden. Weiterführende Erkenntnisse konnten jedoch durch die Untersuchung eines Teils des Patientenkollektives der Studie „Plötzlicher Säuglingstod“/German Study on Sudden Infant

Death (GeSID) molekulargenetisch auf Veränderungen im *IGHMBP2*-Gen gewonnen werden. Insgesamt wurden 155 SIDS-Fälle und 35 Säuglingstodesfälle mit „geklärter Todesursache“/non-SIDS-Fälle untersucht. Neben einer Vielzahl von bekannten Polymorphismen und unbekanntem, synonymen Varianten wurden im SIDS-Kollektiv in 4,5% der Fälle und in der non-SIDS-Gruppe in 5,7% der Fälle heterozygote Missense-Varianten gefunden. In mindestens 148 gesunden Kontrollenpersonen konnten diese Veränderungen nicht gefunden werden. Genetische Veränderungen auf beiden Allelen fanden sich nicht. Es war aufgrund der schlechten Qualität des Untersuchungsmaterials leider nicht möglich, die Auswirkung dieser Veränderungen auf RNA-Ebene zu überprüfen. Die gefundenen Missense-Varianten betrafen in Säugetieren konservierte Aminosäuren und lagen mit einer Ausnahme in funktionellen Domänen des *IGHMBP2*-Gens. Im Fishers „exact test“ ist der Unterschied zu den Kontrollen signifikant ($P = 0,015$). Unterstrichen wird dieses Ergebnis noch durch den Vergleich mit 308 Patienten, die mit Verdacht auf SMARD1 molekulargenetisch untersucht wurden und bei denen keine dieser 6 verschiedenen Varianten oder andere seltene Missense-Varianten gefunden wurde ($P = 0,0004$). Diese Befunde könnten dafür sprechen, dass die gefundenen, heterozygoten Missense-Varianten im *IGHMBP2*-Gen eine Disposition für den plötzlichen Säuglingstod darstellen. Die „Odds ratio“ beträgt mindestens 6,95 (Konfidenz Intervall: 1,1 – 43,7). Auch unter den 35 non-SIDS Fällen fanden sich zwei unbekannte Missense-Varianten. Gegenüber den 142 Kontrollen ist auch dieser Unterschied signifikant ($P = 0,036$). Über einen möglichen Pathomechanismus kann man nur spekulieren. So kann man eine Haploinsuffizienz oder ein „gain of function“ bei heterozygoten Mutationen im *IGHMBP2*-Gen nicht ausschließen. Neben der genetischen Prädisposition könnten z.B. Infektionen, die bei fast allen unserer Patienten mit Missense-Varianten und auch bei den non-SIDS Fällen auftraten, als Triggerfaktor in Frage kommen.

Der klinische Vergleich des SIDS mit der SMARD1 zeigte, dass das SMARD1 als SIDS fehlagnostiziert werden kann. Diese Untersuchung hat hierfür jedoch keinen direkten Beleg geliefert. Ursache könnte die Größe des untersuchten Kollektivs sein. Bei SIDS-Patienten sollte die Leichenschau, Obduktion und Anamnese eine SMARD1-Erkrankung miteinbeziehen, da weiterhin nicht auszuschließen ist, dass homozygote Mutationen im *IGHMBP2*-Gen in Einzelfällen Ursache von SIDS sein können. Überraschenderweise fand sich unter den SIDS-Fällen eine signifikante Zunahme heterozygoter Mutationen im *IGHMBP2*-Gen, so dass auch eine Prädisposition durch heterozygote Mutationen nicht ausgeschlossen werden kann. In Familien mit SMARD1-Erkrankungen in der Anamnese, sollte daher bei Auftreten von SIDS während der Leichenschau einmal auf Krankheitsmanifestationen, die auf eine SMARD1-Erkrankung hinweisen, geachtet,

zum anderen aber auch molekulargenetisch das Vorliegen von Heterozygotie überprüft werden, um eine mögliche Prädisposition durch heterozygote Mutationen im *IGHMBP2*-Gen zu bestätigen.

8 Literaturverzeichnis

1. Emery, A. E. et al. International collaborative study of the spinal muscular atrophies. Part 1. Analysis of clinical and laboratory data. *J Neurol Sci* **29**, 83-94 (1976).
2. Monani, U. R. Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* **48**, 885-96 (2005).
3. Pearn, J. Autosomal dominant spinal muscular atrophy: a clinical and genetic study. *J Neurol Sci* **38**, 263-75 (1978).
4. Werdnig, G. Two early infantile hereditary cases of progressive muscular atrophy simulating dystrophy, but on a neural basis. 1891. *Arch Neurol* **25**, 276-8 (1971).
5. Dubowitz, V. Chaos in classification of the spinal muscular atrophies of childhood. *Neuromuscul Disord* **1**, 77-80 (1991).
6. Zerres, K. & Davies, K. E. 59th ENMC International Workshop: Spinal Muscular Atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria 17-19 April 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* **9**, 272-8 (1999).
7. Munsat, T. L. & Davies, K. E. International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord* **2**, 423-8 (1992).
8. Zerres, K. & Rudnik-Schoneborn, S. Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol* **52**, 518-23 (1995).
9. Zerres, K., Wirth, B. & Rudnik-Schoneborn, S. Spinal muscular atrophy--clinical and genetic correlations. *Neuromuscul Disord* **7**, 202-7 (1997).
10. Dubowitz, V. Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. *Eur J Paediatr Neurol* **3**, 49-51 (1999).
11. Ignatius, J. The natural history of severe spinal muscular atrophy--further evidence for clinical subtypes. *Neuromuscul Disord* **4**, 527-8 (1994).
12. Thomas, N. H. & Dubowitz, V. The natural history of type I (severe) spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* **4**, 497-502 (1994).
13. Zerres, K. et al. A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *J Neurol Sci* **146**, 67-72 (1997).
14. Pearn, J. H., Hudgson, P. & Walton, J. N. A clinical and genetic study of spinal muscular atrophy of adult onset: the autosomal recessive form as a discrete disease entity. *Brain* **101**, 591-606 (1978).
15. Mellins, R. B., Hays, A. P., Gold, A. P., Berdon, W. E. & Bowdler, J. D. Respiratory distress as the initial manifestation of Werdnig-Hoffmann disease. *Pediatrics* **53**, 33-40 (1974).
16. McWilliam, R. C., Gardner-Medwin, D., Doyle, D. & Stephenson, J. B. Diaphragmatic paralysis due to spinal muscular atrophy. An unrecognised cause of respiratory failure in infancy? *Arch Dis Child* **60**, 145-9 (1985).
17. Murphy, N. P., Davidson, D. C. & Bouton, J. Diaphragmatic paralysis due to spinal muscular atrophy. *Arch Dis Child* **60**, 495 (1985).
18. Schapira, D. & Swash, M. Neonatal spinal muscular atrophy presenting as respiratory distress: a clinical variant. *Muscle Nerve* **8**, 661-3 (1985).
19. Bove, K. E. & Iannaccone, S. T. Atypical infantile spinomuscular atrophy presenting as acute diaphragmatic paralysis. *Pediatr Pathol* **8**, 95-107 (1988).
20. Bertini, E. et al. Distal infantile spinal muscular atrophy associated with paralysis of the diaphragm: a variant of infantile spinal muscular atrophy. *Am J Med Genet* **33**, 328-35 (1989).

21. Poets, C., Heyer, R., von der Hardt, H. & Walter, G. F. [Acute respiratory insufficiency as the initial clinical manifestation of spinal muscular atrophy]. *Monatsschr Kinderheilkd* **138**, 157-9 (1990).
22. Novelli, G. et al. Neonatal spinal muscular atrophy with diaphragmatic paralysis is unlinked to 5q11.2-q13. *J Med Genet* **32**, 216-9 (1995).
23. Rudnik-Schoneborn, S., Forkert, R., Hahnen, E., Wirth, B. & Zerres, K. Clinical spectrum and diagnostic criteria of infantile spinal muscular atrophy: further delineation on the basis of SMN gene deletion findings. *Neuropediatrics* **27**, 8-15 (1996).
24. Grohmann, K. et al. Diaphragmatic spinal muscular atrophy with respiratory distress is heterogeneous, and one form is linked to chromosome 11q13-q21. *Am J Hum Genet* **65**, 1459-62 (1999).
25. Grohmann, K. et al. Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet* **29**, 75-7 (2001).
26. Pitt, M. et al. Severe infantile neuropathy with diaphragmatic weakness and its relationship to SMARD1. *Brain* **126**, 2682-92 (2003).
27. Grohmann, K. et al. Infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Ann Neurol* **54**, 719-24 (2003).
28. Maystadt, I. et al. Allelic heterogeneity of SMARD1 at the IGHMBP2 locus. *Hum Mutat* **23**, 525-6 (2004).
29. Giannini, A. et al. Respiratory failure in infants due to spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Intensive Care Med* **32**, 1851-5 (2006).
30. Rudnik-Schoneborn, S. et al. Long-term observations of patients with infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Neuropediatrics* **35**, 174-82 (2004).
31. Wong, V. C., Chung, B. H., Li, S., Goh, W. & Lee, S. L. Mutation of gene in spinal muscular atrophy respiratory distress type I. *Pediatr Neurol* **34**, 474-7 (2006).
32. Guenther, U. P. et al. Genomic rearrangements at the IGHMBP2 gene locus in two patients with SMARD1. *Hum Genet* **115**, 319-26 (2004).
33. Appleton, R. E., Hubner, C., Grohmann, K. & Varon, R. 'Congenital peripheral neuropathy presenting as apnoea and respiratory insufficiency: spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1)'. *Dev Med Child Neurol* **46**, 576 (2004).
34. Mohan, U. et al. Inherited early onset severe axonal polyneuropathy with respiratory failure and autonomic involvement. *Neuromuscul Disord* **11**, 395-9 (2001).
35. Maddatu, T. P., Garvey, S. M., Schroeder, D. G., Hampton, T. G. & Cox, G. A. Transgenic rescue of neurogenic atrophy in the nmd mouse reveals a role for Ighmbp2 in dilated cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* **13**, 1105-15 (2004).
36. Diers, A., Kaczinski, M., Grohmann, K., Hubner, C. & Stoltenberg-Didinger, G. The ultrastructure of peripheral nerve, motor end-plate and skeletal muscle in patients suffering from spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Acta Neuropathol (Berl)* **110**, 289-97 (2005).
37. van der Vleuten, A. J. et al. Localisation of the gene for a dominant congenital spinal muscular atrophy predominantly affecting the lower limbs to chromosome 12q23-q24. *Eur J Hum Genet* **6**, 376-82 (1998).
38. Antonellis, A. et al. Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet* **72**, 1293-9 (2003).
39. Dressman, D. et al. X-linked infantile spinal muscular atrophy: clinical definition and molecular mapping. *Genet Med* **9**, 52-60 (2007).
40. Lefebvre, S. et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80**, 155-65 (1995).

41. Lorson, C. L., Hahnen, E., Androphy, E. J. & Wirth, B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6307-11 (1999).
42. Coover, D. D. et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **6**, 1205-14 (1997).
43. Gubit, A. K., Feng, W. & Dreyfuss, G. The SMN complex. *Exp Cell Res* **296**, 51-6 (2004).
44. Winkler, C. et al. Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev* **19**, 2320-30 (2005).
45. Tizzano, E. F., Cabot, C. & Baiget, M. Cell-specific survival motor neuron gene expression during human development of the central nervous system: implications for the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *Am J Pathol* **153**, 355-61 (1998).
46. Fan, L. & Simard, L. R. Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet* **11**, 1605-14 (2002).
47. Rossoll, W. et al. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* **163**, 801-12 (2003).
48. Cobben, J. M. et al. Apparent SMA I unlinked to 5q. *J Med Genet* **31**, 242-4 (1994).
49. Mizuta, T. R., Fukita, Y., Miyoshi, T., Shimizu, A. & Honjo, T. Isolation of cDNA encoding a binding protein specific to 5'-phosphorylated single-stranded DNA with G-rich sequences. *Nucleic Acids Res* **21**, 1761-6 (1993).
50. Molnar, G. M. et al. Association of the mammalian helicase MAH with the pre-mRNA splicing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7831-6 (1997).
51. Grishin, N. V. The R3H motif: a domain that binds single-stranded nucleic acids. *Trends Biochem Sci* **23**, 329-30 (1998).
52. Liepinsh, E., Leonchiks, A., Sharipo, A., Guignard, L. & Otting, G. Solution structure of the R3H domain from human Smubp-2. *J Mol Biol* **326**, 217-23 (2003).
53. Chen, Y. & Varani, G. Protein families and RNA recognition. *Febs J* **272**, 2088-97 (2005).
54. Fukita, Y. et al. The human S mu bp-2, a DNA-binding protein specific to the single-stranded guanine-rich sequence related to the immunoglobulin mu chain switch region. *J Biol Chem* **268**, 17463-70 (1993).
55. Mohan, W. S. et al. Human S mu binding protein-2 binds to the drug response element and transactivates the human apoA-I promoter: role of gemfibrozil. *J Lipid Res* **39**, 255-67 (1998).
56. Chen, N. N., Kerr, D., Chang, C. F., Honjo, T. & Khalili, K. Evidence for regulation of transcription and replication of the human neurotropic virus JCV genome by the human S(mu)bp-2 protein in glial cells. *Gene* **185**, 55-62 (1997).
57. Cook, S. A., Johnson, K. R., Bronson, R. T. & Davisson, M. T. Neuromuscular degeneration (nmd): a mutation on mouse chromosome 19 that causes motor neuron degeneration. *Mamm Genome* **6**, 187-91 (1995).
58. Cox, G. A., Mahaffey, C. L. & Frankel, W. N. Identification of the mouse neuromuscular degeneration gene and mapping of a second site suppressor allele. *Neuron* **21**, 1327-37 (1998).
59. Maddatu, T. P. et al. Dilated cardiomyopathy in the nmd mouse: transgenic rescue and QTLs that improve cardiac function and survival. *Hum Mol Genet* **14**, 3179-89 (2005).
60. Grohmann, K. et al. Characterization of Ighmbp2 in motor neurons and implications for the pathomechanism in a mouse model of human spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Hum Mol Genet* **13**, 2031-42 (2004).

61. Corti, S. et al. Transplanted ALDHhiSSClo neural stem cells generate motor neurons and delay disease progression of nmd mice, an animal model of SMARD1. *Hum Mol Genet* **15**, 167-87 (2006).
62. Wilmshurst, J. M. et al. Severe infantile axonal neuropathy with respiratory failure. *Muscle Nerve* **24**, 760-8 (2001).
63. McEntagart, M. et al. Localization of the gene for distal hereditary motor neuropathy VII (dHMN-VII) to chromosome 2q14. *Am J Hum Genet* **68**, 1270-6 (2001).
64. Willinger, M., James, L. S. & Catz, C. Defining the sudden infant death syndrome (SIDS): deliberations of an expert panel convened by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatr Pathol* **11**, 677-84 (1991).
65. Beckwith, J. B. Defining the sudden infant death syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* **157**, 286-90 (2003).
66. Byard, R. W. Sudden infant death syndrome - a 'diagnosis' in search of a disease. *J Clin Forensic Med* **2**, 121-8 (1995).
67. Hunt, C. E. & Hauck, F. R. Sudden infant death syndrome. *Cmaj* **174**, 1861-9 (2006).
68. Findeisen, M. et al. German study on sudden infant death (GeSID): design, epidemiological and pathological profile. *Int J Legal Med* **118**, 163-9 (2004).
69. Russell-Jones, D. L. Sudden infant death in history and literature. *Arch Dis Child* **60**, 278-81 (1985).
70. Byard, R. W. Is co-sleeping in infancy a desirable or dangerous practice? *J Paediatr Child Health* **30**, 198-9 (1994).
71. Byard, R. W. & Krous, H. F. Sudden infant death syndrome: overview and update. *Pediatr Dev Pathol* **6**, 112-27 (2003).
72. Erler, T. (2002).
73. Krous, H. F. et al. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* **114**, 234-8 (2004).
74. Vennemann, M. M. et al. Modifiable risk factors for SIDS in Germany: results of GeSID. *Acta Paediatr* **94**, 655-60 (2005).
75. Mitchell, E. A. et al. Results from the first year of the New Zealand cot death study. *N Z Med J* **104**, 71-6 (1991).
76. Nicholl, J. P. & O'Cathain, A. Epidemiology of babies dying at different ages from the sudden infant death syndrome. *J Epidemiol Community Health* **43**, 133-9 (1989).
77. Norvenius, S. G. Sudden infant death syndrome in Sweden in 1973-1977 and 1979. *Acta Paediatr Scand Suppl* **333**, 1-138 (1987).
78. Changing concepts of sudden infant death syndrome: implications for infant sleeping environment and sleep position. American Academy of Pediatrics. Task Force on Infant Sleep Position and Sudden Infant Death Syndrome. *Pediatrics* **105**, 650-6 (2000).
79. Mitchell, E. A. et al. Risk factors for sudden infant death syndrome following the prevention campaign in New Zealand: a prospective study. *Pediatrics* **100**, 835-40 (1997).
80. Douglas, A. S., Allan, T. M. & Helms, P. J. Seasonality and the sudden infant death syndrome during 1987-9 and 1991-3 in Australia and Britain. *Bmj* **312**, 1381-3 (1996).
81. Beal, S. & Porter, C. Sudden infant death syndrome related to climate. *Acta Paediatr Scand* **80**, 278-87 (1991).
82. Beal, S., Need, M. & Byard, R. W. Which infants are no longer dying because of avoidance of prone sleeping? *Med J Aust* **160**, 660 (1994).
83. Hoffman, H. J. & Hillman, L. S. Epidemiology of the sudden infant death syndrome: maternal, neonatal, and postneonatal risk factors. *Clin Perinatol* **19**, 717-37 (1992).
84. Peterson, D. R., vanBelle, G. & Chinn, N. M. Sudden infant death syndrome and maternal age: etiologic implications. *Jama* **247**, 2250-2 (1982).

85. Valdes-Dapena, M. The sudden infant death syndrome: pathologic findings. *Clin Perinatol* **19**, 701-16 (1992).
86. Kleemann, W. J., Schlaud, M., Poets, C. F., Rothamel, T. & Troger, H. D. Hyperthermia in sudden infant death. *Int J Legal Med* **109**, 139-42 (1996).
87. Becker, L. E. & Takashima, S. Chronic hypoventilation and development of brain stem gliosis. *Neuropediatrics* **16**, 19-23 (1985).
88. Vennemann, M. M. et al. Infection, health problems, and health care utilisation, and the risk of sudden infant death syndrome. *Arch Dis Child* **90**, 520-2 (2005).
89. Hunt, C. E. The cardiorespiratory control hypothesis for sudden infant death syndrome. *Clin Perinatol* **19**, 757-71 (1992).
90. Valdes-Dapena, M. & Gilbert-Barness, E. Cardiovascular causes for sudden infant death. *Pediatr Pathol Mol Med* **21**, 195-211 (2002).
91. Vege, A. & Rognum, T. O. Inflammatory responses in sudden infant death syndrome -- past and present views. *FEMS Immunol Med Microbiol* **25**, 67-78 (1999).
92. Goldwater, P. N. SIDS: more facts and controversies. *Med J Aust* **174**, 302-4 (2001).
93. Guttmacher, A. E. & Collins, F. S. Welcome to the genomic era. *N Engl J Med* **349**, 996-8 (2003).
94. Guo, S. W. Gene-environment interaction and the mapping of complex traits: some statistical models and their implications. *Hum Hered* **50**, 286-303 (2000).
95. Hunt, C. E. Gene-environment interactions: implications for sudden unexpected deaths in infancy. *Arch Dis Child* **90**, 48-53 (2005).
96. Opdal, S. H. & Rognum, T. O. The sudden infant death syndrome gene: does it exist? *Pediatrics* **114**, e506-12 (2004).
97. Boles, R. G. et al. Retrospective biochemical screening of fatty acid oxidation disorders in postmortem livers of 418 cases of sudden death in the first year of life. *J Pediatr* **132**, 924-33 (1998).
98. Santer, R. et al. The prevalence of the G985 allele of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency among sudden infant death victims and healthy newborns in northern Germany. *Eur J Pediatr* **154**, 497 (1995).
99. Arnestad, M. et al. Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation* **115**, 361-7 (2007).
100. Schwartz, P. J. et al. Molecular diagnosis in a child with sudden infant death syndrome. *Lancet* **358**, 1342-3 (2001).
101. Piippo, K. et al. A founder mutation of the potassium channel KCNQ1 in long QT syndrome: implications for estimation of disease prevalence and molecular diagnostics. *J Am Coll Cardiol* **37**, 562-8 (2001).
102. Ackerman, M. J. et al. Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome. *Jama* **286**, 2264-9 (2001).
103. Wedekind, H. et al. De novo mutation in the SCN5A gene associated with early onset of sudden infant death. *Circulation* **104**, 1158-64 (2001).
104. Schneider, P. M. et al. Possible association of sudden infant death with partial complement C4 deficiency revealed by post-mortem DNA typing of HLA class II and III genes. *Eur J Pediatr* **149**, 170-4 (1989).
105. Summers, A. M. et al. Association of IL-10 genotype with sudden infant death syndrome. *Hum Immunol* **61**, 1270-3 (2000).
106. Weese-Mayer, D. E. Sudden infant death syndrome: is serotonin the key factor? *Jama* **296**, 2143-4 (2006).
107. Narita, N. et al. Serotonin transporter gene variation is a risk factor for sudden infant death syndrome in the Japanese population. *Pediatrics* **107**, 690-2 (2001).

108. Weese-Mayer, D. E. et al. Sudden infant death syndrome: association with a promoter polymorphism of the serotonin transporter gene. *Am J Med Genet A* **117**, 268-74 (2003).
109. Weese-Mayer, D. E. et al. Association of the serotonin transporter gene with sudden infant death syndrome: a haplotype analysis. *Am J Med Genet A* **122**, 238-45 (2003).
110. Weese-Mayer, D. E. et al. Sudden infant death syndrome: case-control frequency differences at genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development. *Pediatr Res* **56**, 391-5 (2004).
111. Weis, J., Weber, U., Schroder, J. M., Lemke, R. & Althoff, H. Phrenic nerves and diaphragms in sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int* **91**, 133-46 (1998).
112. Lamont, P., Chow, C., Hilton, J. & Pamphlett, R. Differences in diaphragm fiber types in SIDS infants. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**, 32-7 (1995).
113. Tennyson, S. A., Pereyra, P. M. & Becker, L. E. The development of the diaphragm in infants with sudden infant death syndrome. *Early Hum Dev* **37**, 1-8 (1994).
114. Hunt, C. E. Sudden infant death syndrome and other causes of infant mortality: diagnosis, mechanisms, and risk for recurrence in siblings. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 346-57 (2001).
115. Platt, M. W. et al. A clinical comparison of SIDS and explained sudden infant deaths: how healthy and how normal? CESDI SUDI Research Group. Confidential Inquiry into Stillbirths and Deaths in Infancy study. *Arch Dis Child* **82**, 98-106 (2000).
116. el-Schahawi, M. et al. Sudden infant death syndrome (SIDS) in a family with myophosphorylase deficiency. *Neuromuscul Disord* **7**, 81-3 (1997).
117. Wesstrom, G., Bensch, J. & Schollin, J. Congenital myotonic dystrophy. Incidence, clinical aspects and early prognosis. *Acta Paediatr Scand* **75**, 849-54 (1986).
118. Pastores, G. M. et al. Leigh syndrome and hypertrophic cardiomyopathy in an infant with a mitochondrial DNA point mutation (T8993G). *Am J Med Genet* **50**, 265-71 (1994).
119. Anderson-Huntington, R. B. & Rosenblith, J. F. Central nervous system damage as a possible component of unexpected deaths in infancy. *Dev Med Child Neurol* **18**, 480-92 (1976).
120. Kinney, H. C., Filiano, J. J. & Harper, R. M. The neuropathology of the sudden infant death syndrome. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* **51**, 115-26 (1992).
121. Guenther, U. P. et al. Clinical and mutational profile in spinal muscular atrophy with respiratory distress (SMARD): defining novel phenotypes through hierarchical cluster analysis. *Hum Mutat* (2007).
122. Saiki, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4 (1985).
123. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50 (1987).
124. Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. & Mattick, J. S. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* **19**, 4008 (1991).
125. Xiao, W. & Oefner, P. J. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* **17**, 439-74 (2001).
126. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7 (1977).
127. Klein, B., Weirich, G. & Brauch, H. DHPLC-based germline mutation screening in the analysis of the VHL tumor suppressor gene: usefulness and limitations. *Hum Genet* **108**, 376-84 (2001).
128. O'Donovan, M. C. et al. Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* **52**, 44-9 (1998).

-
129. Oefner, P. J. & Huber, C. G. A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene-divinylbenzene copolymers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **782**, 27-55 (2002).
 130. Gross, E., Arnold, N., Pfeifer, K., Bandick, K. & Kiechle, M. Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC. *Hum Mutat* **16**, 345-53 (2000).
 131. Collins, J. S. & Schwartz, C. E. Detecting polymorphisms and mutations in candidate genes. *Am J Hum Genet* **71**, 1251-2 (2002).
 132. Ji, W. et al. Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat Genet* **40**, 592-9 (2008).
 133. Kaser, A. et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* **134**, 743-56 (2008).

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Karl Sperling und Herrn Prof. Dr. Christoph Hübner sowohl für die Überlassung des Dissertationsthemas als auch für die Worte der Ermutigung recht herzlich danken.

Allen Mitarbeitern des Humangenetischen Institutes möchte ich für die außerordentlich freundliche Aufnahme, die praktische Ausbildung und stete Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danken. Von den vielen Mitarbeitern des Institutes seien nur einige genannt: Emeli Bektas, Ralf Eckhardt, Catrin Janetzki, Mohsen Karbasiyan, Christina Steglich aus der Abteilung Molekulargenetik; Frau Prof. Dr. Heidemarie Neitzel, Antje Gerlach, Britta Teubner aus der Abteilung Zytogenetik.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Raymonda Varon für die intensive Betreuung bei Bearbeitung des Themas und die Unterstützung beim Verfassen der Arbeit. Oliver Henes danke ich nicht nur für die technische und fachliche Unterstützung während dieser Arbeit. Véronique Dutrannoy danke ich für Ihre Hilfe und Unterstützung im Labor. Dr. Ulf Günther danke für die wertvolle Hinweise, Anregungen und Diskussionen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Freunden.

Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst verfasst wurde ohne Hilfe Dritter. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Alexander Volk