

Aus dem CharitéCentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit
Perinatalzentrum und Humangenetik

Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Klinische Langzeitbeobachtung von Patienten mit spinaler
Muskelatrophie und Atemnot Typ 1 (SMARD1)

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maria Eckart

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Chr. Hübner
2. Prof. Dr. med. M. C. Walter
3. Priv.-Doz. Dr. med. U. Schara

Datum der Promotion: 03.06.2012

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
ZUSAMMENFASSUNG	5
1. EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	6
2. METHODIK	7
a. Erhebung und Auswertung der klinischen Daten	7
b. Genetische und biochemische Untersuchungen	8
3. ERGEBNISSE	9
4. DISKUSSION	11
LITERATURVERZEICHNIS	13
ANHANG	15

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATPase	Adenosintriphosphatase
DNA	deoxyribonucleic acid (deutsch: DNS, Desoxyribonukleinsäure)
DSMA1	distale spinale Muskelatrophie Typ1
EBV	Epstein-Barr-Virus
IGHMBP2	Immunoglobulin μ -bindendes Protein 2
(m)RNA	(messenger) ribonucleic acid (deutsch: RNS, Ribonukleinsäure)
nmd-Maus	neuromuscular degeneration-Maus, Tiermodell der SMARD1
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man Internet: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim
PEG	perkutane endoskopische Gastrostomie
SD	standard deviation
SMA (Typ 1)	spinale Muskelatrophie Typ 1 (Werdnig-Hoffmann-Syndrom)
SMARD1	spinale Muskelatrophie mit respiratorischem Distress Typ1

ZUSAMMENFASSUNG

Zielstellung: Die spinale Muskelatrophie mit Atemnot Typ 1 (SMARD1, MIM: #604320) ist eine progrediente, autosomal-rezessive Erkrankung, die auf Mutationen des *IGHMBP2*-Gens beruht, welches auf Chromosom 11q13.3 das Immunglobulin μ -bindende Protein 2 (MIM: #600502) kodiert. Das für die Erkrankung verantwortliche Gen konnte von Grohmann et al. 2001 in der Kinderneurologie der Charité identifiziert und die SMARD1 als Krankheit benannt werden. Erste Symptome sind eine distal betonte Muskelschwäche mit Fußdeformitäten sowie akut einsetzende Atemnot. Das Ziel der Studien war es, Symptome zu finden, durch die sich eine SMARD1 von anderen neuromuskulären Erkrankungen des Kindesalters abgrenzen lässt und von Einzelbeobachtungen den Verlauf und die Prognose einer infantilen SMARD1 abzuleiten.

Methodik und Ergebnisse: Die Daten der ersten Publikation wurden anhand einer Literaturrecherche gewonnen. Die SMARD1 wird hier der klassischen spinalen Muskelatrophie Typ 1 (SMA1) gegenübergestellt, und es wird detailliert auf die akute Atemnot, die pränatalen und neuromuskulären Symptome, die Beteiligung des zentralen, sensiblen und autonomen Nervensystems, die Genetik und Neuropathologie sowie mögliche Differentialdiagnosen eingegangen. Darauf aufbauend werden in einer zweiten Publikation Symptome beschrieben, die die SMARD1 von anderen sich früh manifestierenden neuromuskulären Erkrankungen abgrenzt. Hierfür wurde retrospektiv auf Daten von 141 Patienten mit Atemnot und dem Phänotyp einer spinalen Muskelatrophie zurückgegriffen, welche mithilfe einer hierarchischen Clusteranalyse analysiert wurden. Es ergaben sich bestimmte Konstellationen, die für oder gegen das Vorliegen einer SMARD1 und *IGHMBP2*-Mutation sprechen. Das Symptom „Beginn der Atemnot zwischen 6 Wochen und 6 Monaten postnatal“ spricht mit einer Sensitivität von 87% und einer Spezifität von 96% für eine *IGHMBP2*-Mutation, während eine „kongenitale Atemnot“ mit einer Sensitivität von 66% und einer Spezifität von 96% gegen die Diagnose einer SMARD1 spricht. Die Konstellation „Beginn der Atemnot zwischen 6 Wochen und 6 Monaten postnatal“ sowie „Zwerchfelleventration“ oder „Frühgeburt“ spricht mit einer Sensitivität von 98% und einer Spezifität von 92% für das Vorliegen von *IGHMBP2*-Mutationen. In einer dritten Publikation wird der Langzeitverlauf der infantilen SMARD1 von elf Patienten vorgestellt. Die Daten wurden mithilfe eines Fragebogens und durch persönliche Patientenbesuche über einen Gesamtzeitraum von 7,8 (SD 3,2) Jahren gesammelt. Anhand sich im Verlauf in ihrer Ausprägung ändernder Leitsymptome, stellten wir den Krankheitsverlauf der SMARD1 dar. Trotz einer insgesamt sehr heterogenen Entwicklung der Patienten besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Erkrankungsschwere mit etwa drei Monaten, einem Jahr und vier Jahren. Weiterhin wurden für die zweite Studie sechs SMARD1-Mutanten hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften analysiert. Bei Patienten mit „milderen“ Krankheitsverläufen konnten wir eine höhere enzymatische Restaktivität des *IGHMBP2*-Proteins nachweisen.

Schlussfolgerung: Die gesammelten Informationen und prognostischen Hinweise erlauben es, betroffene Familien und Ärzte schon in einer frühen Phase der Erkrankung darin zu unterstützen, Entscheidungen in Bezug auf Diagnostik, Behandlung oder Betreuung ihres erkrankten Kindes bzw. ihres Patienten zu treffen.

1. EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Die drei Arbeiten beschäftigen sich mit der spinalen Muskelatrophie mit Atemnot Typ 1 (engl. Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress Type 1, SMARD1; Synonym DSMA1). Charakteristische Symptome sind akute Atemnot aufgrund einer Lähmung des Zwerchfells innerhalb der ersten 13 Lebensmonate sowie eine initial distale, später generalisierte Muskelschwäche. In der Röntgen-Thoraxaufnahme fällt ein Zwerchfelloberhochstand auf. Prä- oder perinatale Symptome wie intrauterine Wachstumsretardierung, verminderte Kindsbewegungen sowie Frühgeburt können im Kontext als diagnostische Hinweise dienen. Weitere frühe Symptome der SMARD1 sind ein inspiratorischer Stridor, schwaches Schreien und eine Trinkschwäche. Weiterhin können Schwäche bzw. Kontrakturen der Hand- und Fußmuskeln, Dysfunktionen des autonomen und sensorischen Nervensystems sowie Krampfanfälle auftreten.¹⁻⁵ Eine Kardiomyopathie, die bei der nmd-Maus, dem Tiermodell der SMARD1, vorkommt, konnte jedoch bisher echokardiographisch bei keinem unserer Patienten nachgewiesen werden. Die mentale Entwicklung der Kinder ist abhängig von Alter und Förderung individuell verschieden, scheint aber bei vielen Patienten subjektiv nicht beeinträchtigt zu sein.

Die SMARD1 wird durch autosomal-rezessive Mutationen im *IGHMBP2*-Gen hervorgerufen.¹ Obwohl das *IGHMBP2*-Gen beim Menschen und im Mausmodell ubiquitär exprimiert wird, führen Mutationen primär zu einer Degeneration der alpha-Motoneurone.⁶ Das IGHMBP2-Protein ist eine RNA- und DNA-Helikase, welche mit den Ribosomen assoziiert ist. Allerdings ist bisher ungeklärt, wie der Ausfall der Helikasefunktion zu einer präferentiellen Degeneration der alpha-Motoneurone führt.

Ziel der Untersuchungen war es, eine genaue Beschreibung des Phänotyps der SMARD1 zu Beginn der Erkrankung und in ihrem Langzeitverlauf vorzunehmen, um Eltern und Ärzte nach der Diagnosestellung in den weiteren Entscheidungen hinsichtlich möglicher Therapieoptionen und Betreuung bestmöglich unterstützen und beraten zu können. Des Weiteren sollten Symptomkonstellationen definiert werden, welche für oder gegen das Vorliegen einer *IGHMBP2*-Mutation sprechen, um Ärzten und Genetikern eine Hilfestellung zu geben, wann es sinnvoll ist, eine molekulargenetische SMARD1-Diagnostik zu veranlassen. Im molekulargenetischen Teil meiner Arbeit wurden 14 neue, innerhalb unseres Patientenkollektivs gefundene *IGHMBP2*-Mutationen beschrieben sowie eine neue Splice-site-Mutation näher untersucht. Parallel dazu untersuchten wir den Zusammenhang zwischen der Höhe der enzymatischen Restaktivität des IGHMBP2-Proteins und der Schwere des Krankheitsverlaufs der SMARD1.

2. METHODIK

Vor Beginn aller drei Studien wurden die Genehmigung der Ethikkommission der Charité (04.08.2002) sowie das schriftliche Einverständnis der Eltern eingeholt.

Im Rahmen der ersten Studie wurden klinische Informationen aller uns bis zum Zeitpunkt der Anfertigung des Manuskriptes bekannten SMARD1-Patienten ausgewertet. Für die zweite Studie wurden alle klinischen und genetischen Informationen von 141 Patienten mit „Atemstörung“ in Verbindung mit dem „Phänotyp einer spinalen Muskelatrophie“ (SMARD-ähnlicher Phänotyp) berücksichtigt, deren DNA-Proben uns zuvor zugesandt wurden. Für die Teilnahme an der dritten Studie wurden der Nachweis einer *IGHMBP2*-Mutation und die Vervollendung des ersten Lebensjahres als Einschlusskriterien gewählt (11 Patienten).

a. Erhebung und Auswertung der klinischen Daten

Der Inhalt der ersten Publikation basiert auf einer Literaturrecherche der zum damaligen Zeitpunkt vorliegenden Publikationen und stellt eine zusammenfassende Beschreibung des Krankheitsbildes der SMARD1 dar. Wir verwendeten u.a. die Datenbank *Pubmed* (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/).

Die klinischen und genetischen Informationen der Patienten für die zweite Publikation wurden einer Datenbank (Programm FileMaker Pro, Beschreibung folgt unten) entnommen, welche Informationen aus zuvor verwandten Fragebögen enthält. Für eine statistische Analyse der Daten wandten wir die hierarchische Clusteranalyse als mathematische Methode an. Die Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit von Items wird hierbei auf der Basis von bestimmten Merkmalen analysiert. Eine Gruppe von Items bildet ein „Cluster“. Merkmale innerhalb eines Clusters weisen eine höhere Ähnlichkeit zueinander auf als zu Merkmalen in einem anderen Cluster. Zusammenfassend werden beim hierarchischen Verfahren zunächst die Distanzen zwischen den einzelnen Clustern berechnet. So werden beispielsweise Patienten mit ähnlichen Konstellationen durch kurze Vektoren und umgekehrt Patienten mit unähnlichen Symptomen durch lange Vektoren verbunden. Anschließend werden jene Cluster fusioniert, die die geringste Distanz zueinander aufweisen. Wir wählten folgende Symptome aus: „Beginn der Atemnot“ (kongenital, 6 Wochen bis 6 Monate, 6-13 Monate, nach 13 Monaten), „Muskelschwäche“ (distal, v.a. in den unteren Extremitäten, generalisiert), „multiple kongenitale Kontrakturen“, „Pes equinovarus“, „Frühgeburt“ und „intrauterine Wachstumsretardierung“. Diese Punkte mussten mit +1 bzw. -1 bestätigt oder negiert werden, da die hierarchische Clusteranalyse nur mit Zahlen arbeitet. Die Daten wurden mit der GNU lizenzierten Software „*Gene Cluster v3.0*“ (von Michiel de Hoon; <http://bonsai.ims.u-tokyo.ac.jp/~mdehoon/software/>) bearbeitet. Die darauffolgenden Dendrogramme wurden mit dem GNU lizenzierten Programm „*TreeView v1.0.13*“ (von Alok Saldanha; <http://jtreeview.sourceforge.net>) erstellt.⁴

Die Datenerfassung des Patientenkollektivs der dritten Publikation erfolgte mithilfe eines von uns entwickelten, speziell auf die Langzeitbeobachtung ausgerichteten Fragebogens, welcher an Patienten mit zuvor diagnostizierter *IGHMBP2*-Mutation verschickt wurde. Die zurückgesandten Informationen wurden in einer FileMaker Pro Datenbank gesammelt. Der Fragebogen wurde vornehmlich an Ärzte oder Eltern von SMARD1-Patienten versandt, von denen im Rahmen der humangenetischen Diagnostik bereits klinische Angaben gesammelt worden waren, so dass longitudinale

Krankheitsdaten erfasst werden konnten. Einen ergänzenden Einblick in die aktuellen klinischen Befunde und die Lebenssituation der Kinder konnten wir durch persönliche Besuche gewinnen. Insgesamt besuchten wir neun Kinder in Deutschland, Italien und Belgien. Wir versandten 17 Verlaufsfragebögen und erhielten vollständig ausgefüllte Bögen und das elterliche Einverständnis von elf Patienten zurück. Der Verlaufsfragebogen liegt neben der deutschen auch in einer englischen und italienischen Fassung vor und ist im Anhang beigelegt. Um eine übersichtlichere Darstellung der einzelnen Symptome zu erhalten, wurden klinisch relevante Punkte tabellarisch aufgelistet und den einzelnen Patienten zugeordnet sowie eine Aussage über das prozentuale Vorkommen des jeweiligen Merkmals in unserer Population getroffen (*Publikation 3; Table 1-3*). Aus den Tabellen wählten wir zehn Punkte aus, die sich während unseres Beobachtungszeitraums in der klinischen Entwicklung der Patienten veränderten. Diese Punkte sind: 1) Beginn der künstlichen Beatmung, 2) Beginn der Muskelschwäche, 3) erhaltene Bewegungen gegen die Schwerkraft in den 3) Armen und 4) Beinen, 5) Sitzen ohne Unterstützung, 6) aufrechte Kopfhaltung in sitzender Position, 7) reduzierte Mimik, 8) vorhandene Sprachentwicklung, 9) Krampfanfälle in der Anamnese und 10) Dysfunktionen des autonomen Nervensystems. Aus diesen Angaben berechneten wir im ersten Lebensjahr jeweils einen monatlichen und in den Folgejahren einen jährlichen Summen-Score. Trifft ein Punkt zu, wird diesem der Wert 1 zugeordnet, trifft er nicht zu erfolgt die Zuordnung 0. Diesen Summen-Score setzen wir prozentual ins Verhältnis zu dem maximal erreichbaren Score eines gesund entwickelten, gleichaltrigen Kindes.

b. Genetische und biochemische Untersuchungen

In der zweiten Publikation wurden 14 neue Mutationen im *IGHMBP2*-Gen beschrieben. DNA von Patienten mit dem Phänotyp einer SMARD1 wurde durch klassische DNA-Extraktionsmethoden aus weißen Blutzellen gewonnen. Die Sequenzierung der gesamten kodierenden Region sowie der flankierenden Intronsequenzen des *IGHMBP2*-Gens erfolgte wie bei Grohmann et al. (2001) beschrieben.¹ Für die Untersuchung einer spezifischen Splice-site-Mutation (c.1235+3A>G) wurde RNA, wie bei Guenther et al. (2004) beschrieben, aus EBV-immortalisierten lymphoblastoiden Zellen einer Zelllinie des Patienten isoliert und sequenziert, sowie die absolute mRNA Kopienanzahl bestimmt.¹⁵

In der dritten Publikation untersuchten wir sechs *IGHMBP2*-Mutationen (p.H213R (c.638A>G), p.C241R (c.721T>C), p.L361P (c.1082T>C), p.D565N (c.1693G>A), p.L577P (c.1730T>C), und p.V580I (c.1738G>A)). Diese Mutationen liegen alle innerhalb der Helikase-Domäne des *IGHMBP2* und kommen bei SMARD1-Patienten mit unterschiedlich stark ausgeprägter Klinik vor. Dafür exprimierten und reinigten wir, wie von Guenther et al. (2009) beschrieben, rekombinante *in-vitro* mutierte Proteine auf und untersuchten sie in einem ATPase- und einem RNA-Helikase-Assay hinsichtlich ihrer enzymatischen Restaktivität.⁷

3. ERGEBNISSE

In der ersten Veröffentlichung wird das Krankheitsbild der SMARD1 anhand der zum damaligen Zeitpunkt vorliegenden Erkenntnisse beschrieben und von der klassischen infantilen spinalen Muskelatrophie Typ1 Werdnig-Hoffmann (SMA1) differentialdiagnostisch abgegrenzt. Anders als bei der SMA1, kommt es bei SMARD1-Patienten typischerweise zwischen dem zweiten und elften Lebensmonat zu akut einsetzender, schwerer Atemnot sowie distal beginnender und später generalisierter Muskelschwäche. Ähnlich wie bei der SMA bestimmt eine frühinfantile Manifestation eine schwere und eine spätkinfantile oder juvenile Manifestation eine mildere Verlaufsform.

Wie in der zweiten Veröffentlichung beschrieben, fanden wir in 33% der 141 Patienten mit Atemnot und dem Phänotyp einer spinalen Muskelatrophie auf beiden Allelen Mutationen im *IGHMBP2*-Gen. Mithilfe einer hierarchischen Clusteranalyse wiesen wir nach, dass das Symptom „Beginn der Atemnot zwischen 6 Wochen und 6 Monaten postnatal“ mit einer Sensitivität von 87% und einer Spezifität von 96% eine *IGHMBP2*-Mutation vorhersagt. Am ehesten dagegen spricht ein „kongenitaler Beginn der Atemnot“ mit einer Sensitivität von 66% und einer Spezifität von 96%. Die Kombination der Symptome „Beginn der Atemnot zwischen 6 Wochen und 6 Monaten postnatal“ sowie „Zwerchfelleventration“ oder „Frühgeburt“ spricht mit einer Sensitivität von 98% und einer Spezifität von 92% für das Vorliegen einer infantilen SMARD1 mit *IGHMBP2*-Mutationen. Wir definierten drei SMARD-Hauptcluster.

Dem ersten „SMARD1-Cluster“ gehören mit 86% die meisten Patienten mit einer Mutation des *IGHMBP2*-Gens an. Entscheidende Symptome sind „Beginn der Atemnot innerhalb von 6 Wochen bis 6 Monaten postnatal“, „Muskelschwäche der unteren Extremitäten“ sowie „distale Muskelschwäche“. Eine Zwerchfelleventration tritt bei 80% aller Patienten unseres Kollektivs auf, ist jedoch mit 91% am häufigsten im SMARD1-Cluster vertreten. Innerhalb des SMARD1-Clusters fanden wir eine große klinische Heterogenität unter den Patienten. So variiert beispielsweise bei drei Geschwisterkindern, die von der gleichen Mutation (c.121delC/c.388C>T) betroffen sind, der Beginn der Atemnot zwischen 2,8 und 13 Monaten.

Im zweiten „späten“ Cluster sind die Hauptkriterien der „Beginn der Atemnot nach 6 Monaten“ sowie „kein Vorhandensein kongenitaler Kontrakturen“.

Einen „kongenitalen Beginn der Atemnot“ und „multiple kongenitale Kontrakturen“ weisen die Patienten im dritten, „kongenitalen“ Cluster auf. In diesem Cluster findet sich die höchste Frühgeburt-Inzidenz (42%). Des Weiteren stellt das Paper 14 neue Mutationen von SMARD1-Patienten dieser Testpopulation vor. Es handelt sich um Missense- und zwei Splice-site-Mutationen (c.1060+1G>T, c.1235+3A>G), sowie Nonsense- oder Frameshift-Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon führen. Des Weiteren untersuchten wir die c.1235+3A>G-Splice-site-Mutation näher, um deren klinische Relevanz nachzuweisen. Der betroffene Patient trägt auf dem zweiten Allel die Missense-Mutation c.1334A>C. Wir fanden heraus, dass die Mutation ein korrektes Splicing nicht vollständig unterdrückt und eine Wildtyp-*IGHMBP2*-mRNA Kopienanzahl von $24.4 \pm 6.9\%$ zulässt, welche aber nicht ausreicht, um den klinischen Phänotyp der SMARD1 bei dem Patienten zu unterdrücken.

In einer dritten Studie wird der Langzeitverlauf von sechs weiblichen und fünf männlichen Patienten mit einer infantilen SMARD1 im Alter von zwei bis vierzehn Jahren innerhalb eines mittleren Beobachtungszeitraumes von 7,8 (SD 3,2) Jahren beschrieben. Eine Konsanguinität der Eltern wurde bei 2/11 (18%) der Patienten festgestellt. 3/11 (27%) der Kinder wurden vor Beginn der 37. Schwangerschaftswoche geboren, und 5/11 (45%) lagen mit dem Geburtsgewicht und der Größe für den jeweiligen Entbindungstermin unterhalb der 3. Perzentile. Den frühesten Beginn der Atemnot konnten wir mit zwei und den spätesten mit neun Monaten verzeichnen. Zur Initiierung permanenter künstlicher Beatmung kam es dementsprechend ebenfalls zwischen dem zweiten und neunten Lebensmonat. Eine beginnende Muskelschwäche wurde bei unseren Patienten zwischen dem zweiten und achten Monat bemerkt, und bei 7/11 (64%) der Patienten kam es im Verlauf zu einer vorübergehenden oder permanenten Verbesserung der Muskelkraft. Mit neun Monaten waren alle Kinder bis auf Patientin #9 künstlich beatmet. Die Kinder erreichen folgende motorischen Meilensteine: a) eigenständige, aufrechte Kopfhaltung im Sitzen (4/11 der Patienten, 36%), b) Kopfhochhalten in liegender Position (5/9 der Patienten, 56%) und c) Sitzen ohne Unterstützung ab einem Alter von 12 Monaten (4/11 der Patienten, 36%). 5/11 der Patienten (45%) haben in der oberen Extremität erhaltene Bewegungen gegen die Schwerkraft, aber nur 2/11 (18%) erreichen dies noch in den unteren Extremitäten. Keines der Kinder kann mit Unterstützung laufen, alle können jedoch im Rollstuhl mobilisiert werden. Alle elf Patienten werden ergänzend über eine PEG-Sonde ernährt. Die Anlage einer ersten PEG-Sonde erfolgte zwischen dem vierten Lebensmonat und dem elften Lebensjahr. Krampfanfälle in der Anamnese gab es bei 5/10 (50%) der Patienten im Zeitraum von 0-3 Jahren. Eine reduzierte Mimik wurde bei 4/11 der Patienten (36%) bis zu einem Alter von 2 Jahren dokumentiert. Das „Alter bei Entlassung aus dem Krankenhaus nach Diagnosestellung“ lag zwischen 6,5 und 16 Monaten, ein Kind wird dauerhaft in einer betreuenden Einrichtung für beatmungspflichtige Kinder versorgt. Zu einer Sprachentwicklung kam es bei 6/11 der Patienten (55%), und 7/10 der Patienten (70%) besuchen regelmäßig den Kindergarten oder die Schule. Eine altersgerechte mentale Entwicklung konnten wir bei 6/10 der Patienten (60%) feststellen. Die kognitive Entwicklung wurde bisher nur subjektiv eingeschätzt und wird aktuell in einer weiteren Studie untersucht.

Ähnlich wie bei der SMA1 ist die infantile SMARD1 in den ersten zwei Lebensjahren rasch progredient, bevor anders als bei der SMA1 in allen beobachteten Fällen eine für die Erkrankung charakteristische Plateauphase einsetzt (*Publikation 3, Abb. 1b*). Wir stellten innerhalb der Patientenpopulation Schwankungen zwischen 10 und 70 Prozent der maximal möglichen Punktzahl fest. Der im Alter von drei Monaten berechnete Summen-Score korrelierte statistisch mit den errechneten Werten im Alter von 12 und 48 Monaten (*Publikation 3, Abb. 1C*). In *Abb. 2 (Publikation 3)* wird anhand von Fotos die unterschiedliche Entwicklung von vier Patienten mit Ergebnissen von 10, 40 und 70 Prozent des maximal zu erreichenden Wertes veranschaulicht. Patienten #3 (40%) und #4 (70%), beide betroffen von der infantilen SMARD1, werden jeweils in zwei unterschiedlichen Entwicklungsstadien abgebildet. Patientin #9 mit einem Summen-Score von 70% konnte mit vier Jahren bis zu 6,5 Stunden täglich und mittlerweile sogar für insgesamt 12 Stunden täglich von der künstlichen Beatmung entwöhnt werden, ein Verlauf wie er bei der klassischen SMA1 gar nicht denkbar ist.

In Kaplan-Meier-Kurven sind die Verläufe der Symptome „Atmung“, „Muskelkraft“, „Bewegungen gegen die Schwerkraft“ sowie „normale Mimik“, „Auftreten von

Krampfanfällen“, „Spracherwerb“, „Aufrechterhalten des Kopfes in sitzender Position, „normale Funktion des autonomen Nervensystems“ und „Sitzen ohne Unterstützung“ aufgezeichnet (*Abb. 1A; zusätzliche Abb. 4 der dritten Publikation*). Es ist unter anderem zu erkennen, dass der früheste Zeitpunkt des Beginns der künstlichen Beatmung bei zwei Monaten und der späteste zwischen acht und neun Monaten liegen. Der Verlust der Muskelkraft verläuft parallel zum Beginn der Atemnot.

Im biochemischen Teil der Studie stellten wir erstmalig einen Zusammenhang zwischen klinischem Schweregrad und der enzymatischen Restaktivität des *IGHMBP2*-Gens her. Bei drei der Patienten (*Publikation 3; Pat. #4, #8 und #9*) mit einem „milden“ Krankheitsverlauf, bzw. einem Score über 50%, fanden wir *IGHMBP2*-Mutationen mit katalytischer Restaktivität. Die p.D565N-, p.T493I-¹³ sowie p.H213R-Mutation besitzen *in vitro* noch ATPase-Aktivität, die p.H213R- und p.T493I-Mutationen außerdem noch Helikase-Aktivität.

4. DISKUSSION

In vielen Studien wird das klinische Erscheinungsbild der SMARD1 bei Manifestation der Erkrankung vorgestellt.^{1-5; 8-17} Es gibt aber bisher nur eine weitere Studie von Rudnik-Schöneborn et al. (2004) zur Langzeitentwicklung der Kinder (im Alter von 4,5 bis 11 Jahren).¹¹ Die meist akut einsetzende Atemnot bei SMARD1-Patienten, die aufgrund ihres plötzlichen Beginns in der Vergangenheit nicht selten zu einem plötzlichen Kindstod führte,² sowie die kurz darauf folgende progressive Muskelschwäche lassen Eltern und Ärzten nicht ausreichend Zeit, die Gründe für und wider eine Dauerbeatmung des betroffenen Kindes abzuwägen. Die Diagnose wird daher häufig erst nach Beginn der künstlichen Beatmung durch genetische Testverfahren gestellt. Das Wissen um die Ursache der Erkrankung kann demnach erst in folgenden Schwangerschaften berücksichtigt werden.

Der anfängliche Krankheitsverlauf der SMARD1 ist häufig fulminanter als der der klassischen SMA Typ1 Werdnig-Hoffmann, bei welcher im Unterschied zur SMARD1 eine proximal betonte Muskelschwäche, sowie eine im klinischen Verlauf progrediente Atemnot aufgrund einer Atrophie der Interkostalmuskulatur (und nicht primär des Zwerchfells) im Vordergrund stehen. Die Lebenserwartung der Kinder, die von der SMA Typ 1 betroffen sind, ist dennoch deutlich eingeschränkt. Sie versterben häufig bereits innerhalb der ersten zwei Lebensjahre aufgrund einer schweren Ateminsuffizienz oder Infektion. Unter der Voraussetzung einer Dauerbeatmung werden viele der Kinder mit einer infantilen SMARD1 zehn Jahre alt. Es gibt gar einen Fallbericht eines Patienten mit einer infantilen SMARD1, der das Erwachsenenalter erreicht hat.¹⁸ Eine exakte Aussage über die Prognose und den Verlauf der Erkrankung war bisher nicht möglich. Im Rahmen unserer Studien stellten wir fest, dass Patienten mit einer früh manifesten infantilen SMARD1 drei unterschiedliche Verlaufsformen annehmen können, welche wir als eher „mild“, „moderat“ oder „schwer“ definierten. Wir konnten beobachten, dass bereits im Alter von drei Monaten ein vorsichtiger Rückschluss auf den möglichen klinischen Verlauf mit einem und vier Jahren gezogen werden kann.

Des Weiteren beschäftigten wir uns näher mit den Todesursachen elf verstorbener SMARD1-Patienten (*Patienten #12-22; zusätzliche Tab. 4 in Publikation 3*) um fest-

zustellen, ob ein früh verstorbener Patient *per se* durch einen schweren klinischen Verlauf auffiel. Anhand der Tabelle ist zu erkennen, dass 5/11 der Patienten an respiratorischem Versagen nach Extubation verstorben sind. Weitere vier Patienten verstarben, weil sie primär nicht intubiert wurden, z.B. weil sich die Eltern (mit zum Teil mehreren an SMARD1 erkrankten Kindern) gegen eine Intubation entschieden haben, oder weil es zu einer fulminanten Manifestation der Atemnot kam. Ein Kind verstarb im Rahmen einer Sepsis und ein anderes aufgrund einer schweren Pneumonie. Aufgrund der Tatsache, dass nur zwei der elf Patienten an „rein medizinischen“ Ursachen und der Großteil aufgrund von Komplikationen im Rahmen der künstlichen Beatmung verstorben sind, sind definitive Rückschlüsse schwierig. Wir vermuten aber nicht, dass die verstorbenen Patienten von einem schwereren Phänotyp betroffen waren als die Kinder, die von Anfang an dauerhaft beatmet wurden und blieben.

Das kleine Patientenkollektiv der dritten Studie ist aus unserer Sicht ein denkbarer Kritikpunkt an dieser Arbeit. Da wir zu Beginn unserer Untersuchungen möglichst viel auch über noch fragliche Symptome der Erkrankung herausfinden wollten, führt der versandte Verlaufsfragebogen die verschiedenen Symptome der SMARD1 sehr detailliert auf und ist in seiner Bearbeitung dementsprechend aufwendig. Dies war vermutlich die Hauptursache der „Incompliance“ beim Ausfüllen durch die ärztlichen Kollegen. Nur ein Teil der zurückgesandte Bögen (11/17) war ausreichend detailliert ausgefüllt. Mit Hilfe eines komprimierten, auch dem „medizinischen Laien“ verständlichen und somit von den sehr engagierten Eltern auszufüllenden Exemplars des Fragebogens, hätten wir unser Patientenkollektiv -wenn auch unter Informationseinbußen- vergrößern können. Ebenfalls hätten häufigere, allerdings nicht zuletzt wegen der weiten regionalen Verstreung der Patienten sehr aufwendige Patientenbesuche unser Informationsspektrum noch zusätzlich erweitern können.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Grohmann K, Schuelke M, Diers A, Hoffmann K, Lucke B, Adams C, Bertini E, Leonhardt-Horti H, Muntoni F, Ouvrier R, Pfeufer A, Rossi R, Van Maldergem L, Wilmshurst JM, Wienker TF, Sendtner M, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Hübner C. Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet* 2001;29:75-7.
- 2 Grohmann K, Varon R, Stolz P, Schuelke M, Janetzki C, Bertini E, Bushby K, Muntoni F, Ouvrier R, Van Maldergem L, Goemans NM, Lochmüller H, Eichholz S, Adams C, Bosch F, Grattan-Smith P, Navarro C, Neitzel H, Polster T, Topaloglu H, Steglich C, Guenther UP, Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Hübner C. Infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Ann Neurol* 2003;54:719-24.
- 3 Pitt M, Houlden H, Jacobs J, Mok Q, Harding B, Reilly M, Surtees R. Severe infantile neuropathy with diaphragmatic weakness and its relationship to SMARD1. *Brain* 2003;126:2682-92.
- 4 Guenther UP, Varon R, Schlicke M, Dutrannoy V, Volk A, Hubner C, von Au K, Schuelke M. Clinical and mutational profile in spinal muscular atrophy with respiratory distress (SMARD): defining novel phenotypes through hierarchical cluster analysis. *Hum Mutat* 2007;28:808-15.
- 5 Kaindl AM, Guenther UP, Rudnik-Schöneborn S, Varon R, Zerres K, Schuelke M, Hübner C, von Au K. Spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *J Child Neurol* 2008;23:199-204.
- 6 Grohmann K, Rossoll W, Kobsar I, Holtmann B, Jablonka S, Wessig C, Stoltenburg-Didinger G, Fischer U, Hübner C, Martini R, Sendtner M. 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* 2004;13:2031-42.
- 7 Guenther UP, Handoko L, Lagerbauer B, Jablonka S, Chari A, Alzheimer M, Ohmer J, Plöttner O, Gehring N, Sickmann A, von Au K, Schuelke M, Fischer U. IGHMBP2 is a ribosome-associated helicase inactive in the neuromuscular disorder distal SMA type 1 (DSMA1). *Hum Mol Genet* 2009;18:1288-300.
- 8 Grohmann K, Wienker TF, Saar K, Rudnik-Schöneborn S, Stoltenburg-Didinger G, Rossi R, Novelli G, Nürnberg G, Pfeufer A, Wirth B, Reis A, Zerres K, Hübner C. Diaphragmatic spinal muscular atrophy with respiratory distress is heterogeneous, and one form is linked to chromosome 11q13-q21. *Am J Hum Genet* 1999;65:1459-62.
- 9 Maystadt I, Zarhrate M, Landrieu P, Boespflug-Tanguy O, Sukno S, Collignon P, Melki J, Verellen-Dumoulin C, Munnich A, Viollet L. Allelic heterogeneity of SMARD1 at the IGHMBP2 locus. *Hum Mutat* 2004;23:525-6.

- 10 Guenther UP, Handoko L, Varon R, Stephani U, Tsao CY, Mendell JR, Lützkendorf S, Hübner C, von Au K, Jablonka S, Dittmar G, Heinemann U, Schuetz A, Schuelke M. Clinical variability in distal spinal muscular atrophy type 1 (DSMA1): determination of steady-state IGHMBP2 protein levels in five patients with infantile and juvenile disease. *J Mol Med* 2009;87:31-41.
- 11 Rudnik-Schoneborn S, Stolz P, Varon R, Grohmann K, Schachtele M, Ketelsen UP, Stavrou D, Kurz H, Hübner C, Zerres K. Long-term observations of patients with infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Neuropediatrics* 2004;35:174-82.
- 12 Appleton RE, 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* 2004;46:576.
- 13 Giannini A, Pinto AM, Rossetti G, Prandi E, Tiziano D, Brahe C, Nardocci N. Respiratory failure in infants due to spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Intensive Care Med* 2006;32:1851-5.
- 14 Wong VC, Chung BH, Li S, Goh W, Lee SL. Mutation of gene in spinal muscular atrophy respiratory distress type I. *Pediatr Neurol* 2006;34:474-7.
- 15 Guenther UP, Schuelke M, Bertini E, D'Amico A, Goemans N, Grohmann K, Hübner C, Varon R. Genomic rearrangements at the IGHMBP2 gene locus in two patients with SMARD1. *Hum Genet* 2004;115:319-26.
- 16 Joseph S, Robb SA, Mohammed S, Lillis S, Simonds A, Manzur AY, Walter S, Wraige E. Interfamilial phenotypic heterogeneity in SMARD1. *Neuromuscul Disord* 2009;19:193-5.
- 17 AlSaman A, Tomoum H. Infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1: a case report. *J Child Neurol* 2010;25:764-9.
- 18 Pierson TM, Tart G, Adams D, Toro C, Golas G, Tifft C, Gahl W. Infantile-onset spinal muscular atrophy with respiratory distress-1 diagnosed in a 20-year-old man. *Neuromuscul Disord*. 2011 May;21(5):353-5. Epub 2011 Feb 25.

ANHANG

SMARD1 – Fragebogen zur Verlaufsbeobachtung**Betreff:** Vorname, Nachname

Positives Ergebnis der IGHMBP2- Mutation:

Brief vom:

Anschrift der Eltern des Patienten/ bzw. des betreuenden Arztes

Die folgende Adresse ist von:	Eltern des Patienten: betreuendem Arzt:
Name, Vorname	
E-Mail Adresse	
Institut / Krankenhaus / Praxis	
Straße	
Stadt und PLZ	
Land	
Telefonnummer	
Bemerkungen	

SMARD1 Patient und Familienanamnese

Name, Vorname	
Geschlecht	Weiblich: Männlich:
Geboren am (Tag/Monat/Jahr):	
Gestorben am (Tag/Monat/Jahr):	
Anzahl gesunder Geschwister:	Weiblich: Männlich:
Anzahl an SMARD1 erkrankter Geschwister	Weiblich: Männlich:
Fehlgeburten der Mutter	Weiblich: Männlich:
Bemerkungen	

Datum der Untersuchung (Tag/Monat/Jahr):**Atmung** (t=tage; w=wochen; m=monate; n=nein; nb=nicht bestimmt; j=ja; jr=jahre)

Ständige Beatmung im Krankenhaus	Seit:
Ständige Beatmung zu Hause	Seit:
CPAP im Krankenhaus	Seit:
CPAP zu Hause	Seit:
CPAP am Tag und ständige Beatmung während der Nacht	Seit:
Andere Form der Beatmung?	
Entwöhnung von der Beatmung	Seit:
Bemerkungen	

Muskelschwäche (t=tage; w=wochen; m=monate; n=nein; nb=nicht bestimmt; j=ja; jr=jahre)

Distal ausgeprägt	Seit:
Proximal ausgeprägt	Seit:
Ausgeprägt in den oberen Extremitäten	Seit:
Ausgeprägt in den unteren Extremitäten	Seit:
Generalisierte Schwäche	Seit:
Generalisierte Paralyse	Seit:
Vorübergehende Verbesserung der Muskelkraft	Beginn/ Ende
Permanente Verbesserung der Muskelkraft	Seit:
Reflexe abgeschwächt/ erloschen	Seit:
Ellbogen Kontrakturen	Seit:
Finger/Hand Kontrakturen	Seit:
Hüft Kontrakturen	Seit:
Knie Kontrakturen	Seit:
Fuß Kontrakturen/ Deformitäten	Seit:
Skoliose	Seit:
Motorische Meilensteine, die das Kind erreicht hat, z.B. Kopf im Sitzen halten (N 4 Monate)	Seit:
Kopf heben aus Rückenlage (N 5-6 Monate)	Seit:
Läuft mit Unterstützung (N 11-12 Monate)	Seit:
Läuft selbstständig, fällt leicht (N 13-15 Monate)	Seit:
Steigt Stufen mit Unterstützung (N 18 Mo-	Seit:

nate)	
Bemerkungen	

Andere Kennzeichen (t=tage; w=wochen; m=monate; n=nein; nb=nicht bestimmt; j=ja; jr=jahre)

Ptosis	Seit:	
Gesichtsschwäche	Seit:	
Zungenfaszikulationen	Seit:	
Schluckbeschwerden	Seit:	
Sondenernährung	Seit:	
Vermindertes Schmerzempfinden	Seit:	
Vermindertes Vibrationsempfinden	Seit:	
Exzessives Schwitzen	Seit:	
Arrhythmie	Seit:	
Blutdruckschwankungen	Seit:	
Temperaturinstabilität	Seit:	
Obstipation	Seit:	
ZNS- Beteiligung	Seit:	Kennzeichen:
Kardiomyopathie/ Herzfehler	Seit:	Kennzeichen:
Organomegalie	Seit:	
Kryptorchismus		
Fehlbildungen (bitte beschreiben)		
Bemerkungen		

Pubertät - Mädchen – (t=tage; w=wochen; m=monate; n=nein; nb=nicht bestimmt; j=ja; jr=jahre)

(Laborparameter siehe unten)

Pubarche	Seit:
Thelarche	Seit:
Menarche	Seit:
Pubertas praecox (GnRH erhöht)	Beginn:
Pseudopubertas praecox (GnRH nicht erhöht)	Beginn:
Ursache (hereditär, unbekannt)	
Größen- und Gewichts- Perzentilen Röntgenaufnahme der linken Hand zur Bestimmung des Knochenalters	

Ultraschall Ovarien 24 h Blutdruckprofil	
Bemerkungen	

Pubertät – Jungen – (t=tage; w=wochen; m=monate; n=nein; nb=nicht bestimmt; j=ja; jr=jahre)

Pubarche	Seit:
Hodenwachstum	
Pubertas praecox (GnRH erhöht)	Beginn:
Pseudopubertas praecox (GnRH nicht erhöht)	Beginn:
Ursache (hereditär, unbekannt)	
Größen- und Gewichts- Perzentilen Röntgenaufnahme der linken Hand zur Bestimmung des Knochenalters Ultraschall Ovarien 24 h Blutdruckprofil	
Bemerkungen	

Pubertät – Mädchen & Jungen – Untersuchungen im Serum

Na, K, Cortisol, 17-Hydroxy-Progesteron, Androstendion, DHEA-S, Testosteron, freies Testosteron, Sexualhormon bindendes Globulin, LH, FSH, Östradiol Bitte informieren Sie uns über veränderte Laborwerte oder auffällige Untersuchungsergebnisse (siehe oben).

Elektrophysiologie (n=nein; nb=nicht bestimmt; j=ja)

Myogene Veränderungen im EMG	
Neurogene Veränderungen im EMG	
Motorische Nervenleitgeschwindigkeit	Verlangsamt: Nicht ableitbar:
Sensorische Nervenleitgeschwindigkeit	Verlangsamt: Nicht ableitbar
Motorische Aktionspotentiale (Amplitudenabnahme, abwesend)	
Sensorische Aktionspotentiale (Amplitudenabnahme, abwesend)	
Bemerkungen	

Histologie (n=nein; nb=nicht bestimmt; j=ja)

Muskelbiopsie (bitte beschreiben, bitte senden Sie uns eine Kopie des Ergebnisses)	
--	--

Bemerkungen	
-------------	--

Soziale Entwicklung

Entlassung aus dem Krankenhaus ?	Alter:
Art der Betreuung	
Sprachentwicklung/ Art der Kommunikation	
Kontakt zu anderen Kindern	
Mobilisierung (Rollstuhl?)	
Geistiger Entwicklungszustand	

Bemerkungen:

ERKLÄRUNG ÜBER DEN ANTEIL AN DEN FOLGENDEN DREI PUBLIKATIONEN

Maria Eckart, geboren am 20.09.1981, hatte folgenden Anteil an den Publikationen:

PUBLIKATION 1

Hübner C, von Au K, Schlicke M, Diers A, Guenther UP, Bassir C, Martelli M, Stoltenburg-Didinger G, Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Varon R, Schuelke M. Die spinale Muskelatrophie mit Atemnot oder „Respiratory distress“ Typ 1 (SMARD1). Neuropädiatrie in Klinik und Praxis 2007; 6: 99-102

Internet:

www.medbioworld.com/country/Germany.html,

www.index-medicus.com,

www.zbmed.de,

www.schmidt-roemhild.de.

gelistet in Index Medicus, Medline, National Library of Medicine: <http://locatorplus.gov>

Anteil 30 %

Beitrag im Einzelnen:

Zusammenstellen der klinischen Daten

PUBLIKATION 2

Guenther UP, Varon R, Schlicke M, Dutrannoy V, Volk A, Hübner C, von Au K, Schulke M. Clinical and mutational profile in spinal muscular atrophy with respiratory distress (SMARD): defining novel phenotypes through hierarchical cluster analysis. Hum Mutat 2007; 28: 808-815

Impact Factor: 5,956

Anteil 30 %

Beitrag im Einzelnen:

Tabellarische Erfassung sämtlicher Daten aus der FileMaker Pro-Datenbank als Basis für die hierarchische Clusteranalyse, Textbeitrag, Korrekturen

PUBLIKATION 3

Eckart M, Guenther UP, Idkowiak J, Varon R, Hübner C, Schuelke M, von Au K. The natural course of infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). Pediatrics 2012; 129:e148-156.

<http://pediatrics.aappublications.org/content/early/2011/12/07/peds.2011-0544>

Impact Factor: 5,391 (2010)

Anteil 80 %

Beitrag im Einzelnen:

Entwurf des Fragebogens, Erfassung der Daten, Patientenbesuche, Erstellung des Manuskripts, Korrekturen des Manuskripts

**Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version
dieser Arbeit nicht veröffentlicht.**

VOLLSTÄNDIGE PUBLIKATIONSLISTE

Originalartikel

Hübner C, von Au K, Schlicke M, Diers A, Guenther UP, Bassir C, Martelli M, Stoltenburg-Didinger G, Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Varon R, Schuelke M. Die spinale Muskelatrophie mit Atemnot oder „Respiratory distress“ Typ 1 (SMARD1). Neuropädiatrie in Klinik und Praxis 2007;6:99-102

Guenther UP, Varon R, Schlicke M, Dutrannoy V, Volk A, Hübner C, von Au K, Schulke M. Clinical and mutational profile in spinal muscular atrophy with respiratory distress (SMARD): defining novel phenotypes through hierarchical cluster analysis. Hum Mutat 2007;28:808-815

Eckart M, Guenther UP, Idkowiak J, Varon R, Grolle B, Boffi P, Van Maldergem L, Hübner C, Schuelke M, von Au K. The natural course of infantile spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). Pediatrics 2012;129:e148-156

Poster

Gegenüberstellung des Krankheitsverlaufs von zwei SMARD1 Patienten (Case Report). Schlicke M, Polster T, Albani M, Hübner C, von Au K. Mannheim, 32. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie, 20.-22.09.2006

Vorträge

„Verlaufsbeobachtung an vier SMARD1 Patienten“, gehalten im Rahmen des Forschungsseminars Molekulargenetik in der Neuropädiatrie im Campus Virchow Klinikum (Dezember 2005)

„SMARD1-spinale Muskelatrophie mit Atemnot (respiratory distress) Typ 1- psychosoziale Auswirkungen“, gehalten im Rahmen des Wahlseminars zum Fachgebiet Kinder- und Jugendpsychiatrie am Campus Virchow Klinikum (Juni 2006)

„Natural history of SMARD1/DSMA-a follow-up study“, Vortrag noch ausstehend am 12.05.2012 im Rahmen des 190. ENMC (European Neuromuscular Centre) International Workshop in Naarden, Niederlande

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

„Ich, Maria Eckart, geb. Schlicke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Klinische Langzeitbeobachtung von Patienten mit spinaler Muskelatrophie und Atemnot Typ 1 (SMARD1)

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

20.02.2012

Maria Eckart

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Christoph Hübner, der mir mit seinem Fachwissen jederzeit zur Seite stand und mir die Arbeit an diesem interessanten Thema überließ.

Zu größtem Dank verpflichtet bin ich auch meiner Betreuerin Frau Dr. Katja von Au, die mir in all den Jahren eine sehr kompetente, geduldige und hilfreiche Ansprechpartnerin war und viele ihrer freien Stunden für mich opferte.

Ich danke Herrn Professor Dr. Markus Schülke und Herrn Dr. Ulf-Peter Günther für die vielen wissenschaftlichen Anregungen und die konstruktive Kritik während der Arbeit an unserem Paper.

Außerdem danke ich Frau Kerstin Knappe für ihre große Hilfe bei der Reiseplanung und allen weiteren organisatorischen Angelegenheiten.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch bei allen Patienten und den Familien sowie bei Herrn Professor Dr. Michael Albani und Frau Sabine Schenk aus dem Zwerg-Nase-Haus in Wiesbaden für die langjährige Mitarbeit an unserer Studie.