

Aus der Abteilung Rechtsmedizin
(Prof. Dr. med. W. Grellner)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Genetische Polymorphismen der mtDNA als Risiko-
faktoren für das SIDS (Sudden Infant Death Syndrome)**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Claudia Mareike Harr
aus
Bielefeld

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Promotor: Prof. Dr. med. Martin Oppermann

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Klintschar

II. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Birgit Zirn

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	SIDS - Sudden Infant Death Syndrome.....	1
1.1.1	Definition.....	2
1.1.2	Diagnostik.....	6
1.1.3	Epidemiologie	7
1.1.4	Ätiologie	10
1.1.5	Präventionsstrategien.....	14
1.2	Das Mitochondrium	15
1.2.1	Aufbau des Mitochondriums.....	15
1.2.2	Oxidative Phosphorylierung (OXPHOS)	17
1.2.3	Die mitochondriale DNA	21
1.2.4	Mitochondriopathien.....	23
1.2.5	Genetische Polymorphismen der mtDNA.....	25
1.3	Ziele der Arbeit	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Probenmaterial: Die SIDS-Fälle und die Kontrollgruppe.....	28
2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion zur Amplifikation der mtDNA-Sequenzen	30
2.3	RFLP-Analyse zum Schneiden der mtDNA-Fragmente mit Restriktionsenzymen.....	35
2.4	Fragmentlängenuntersuchung mittels Elektrophorese.....	39
2.5	Statistik.....	41
3	Betrachtung der Ergebnisse.....	42
3.1	Epidemiologie und Verteilung der Risikofaktoren.....	42
3.2	Analyse der Genotypenverteilung der mitochondrialen Polymorphismen	44
3.3	Kombination der mitochondrialen Polymorphismen	49
3.4	Mitochondriale Polymorphismen und epidemiologische Risikofaktoren für das SIDS	51
3.5	Verifizierung der Datenerhebung	54
4	Diskussion	56
4.1	Diskussion der Ergebnisse	56

4.1.1	Genetische Polymorphismen der mtDNA im Zusammenhang mit SIDS ..	57
4.1.2	Genetische Polymorphismen der mtDNA in Bezug auf epidemiologische Risikofaktoren für SIDS-Fälle	63
4.2	Diskussion des angewandten Probenmaterials.....	65
4.3	Betrachtung der angewandten Methoden zur Genotypisierung	67
4.4	Ausblick	69
5	Zusammenfassung.....	70
6	Anhang.....	72
7	Literaturverzeichnis	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Triple-Risk-Modell.....	11
Abbildung 2: Oxidative Phosphorylierung	19
Abbildung 3: Das humane mitochondriale Genom.....	21
Abbildung 4: Darstellung des SNPs G3010A in der mtDNA.....	35
Abbildung 5: Darstellung des SNPs T16519C in der mtDNA.....	36
Abbildung 6: Darstellung des SNPs C7028T in der mtDNA	37
Abbildung 7: Geschlechtsverteilung der untersuchten SIDS-Proben (n=176)	42
Abbildung 8: Jahreszeitliche Verteilung der Göttinger SIDS-Fälle (n=42)	42
Abbildung 9: Altersverteilung der Göttinger SIDS-Fälle (n=42)	43
Abbildung 10: Amplifikationserfolg des SNPs T16519C	44
Abbildung 11: RFLP-Ergebnisse des SNPs T16519C	45
Abbildung 12: PCR- und RFLP-Ergebnisse des T16519C-Polymorphismus.....	45
Abbildung 13: Amplifikationserfolge G3010A	46
Abbildung 14: RFLP-Ergebnisse G3010A (Gelelektrophorese)	46
Abbildung 15: RFLP- und PCR-Ergebnisse G3010A	47
Abbildung 16: Mitochondriale Polymorphismen der SIDS-Fälle und der Kontrollgruppe hinsichtlich der Genotypverteilung	48
Abbildung 17: Geschlechtsverteilung der SIDS-Fälle in der vorliegenden SNP-Kombination aus 3010A und 16519C	51
Abbildung 18: Jahreszeit zum Sterbezeitpunkt der SIDS-Fälle	52
Abbildung 19: Sterbealter der SIDS-Fälle	52
Abbildung 20: Übersicht Geräte, Reagenzien und Material.....	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung des SIDS.....	5
Tabelle 2: Todesursachenstatistik im Verlauf in Deutschland.....	9
Tabelle 3: Todesursachenstatistik im Verlauf in Niedersachsen	9
Tabelle 4: Primersequenzen der SNPs G3010A, T16519C und C7028T	31
Tabelle 5: PCR-Ansatz für den Primer G3010A	32
Tabelle 6: Amplifizierungsprogramm für den Primer G3010A	32
Tabelle 7: PCR-Ansatz für den Primer T16519C.....	33
Tabelle 8: Amplifizierungsprogramm für den Primer T16519C.....	33
Tabelle 9: PCR-Ansatz für den Primer C7028T.....	33
Tabelle 10: Amplifizierungsprogramm für den Primer C7028T	34
Tabelle 11: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des Primers G3010A.....	36
Tabelle 12: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des Primers T16519C	36
Tabelle 13: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des Primers C7028T	38
Tabelle 14: Anleitung der 5x-TBE-Puffer Herstellung.....	40
Tabelle 15: Genotypverteilung der mitochondrialen Polymorphismen bei SIDS-Fällen und Kontrollen	47
Tabelle 16: Kombination der mitochondrialen Polymorphismen der SIDS-Fälle und Kontrollen.....	49
Tabelle 17: Kombination der mitochondrialen Polymorphismen T16519C und G3010A	50
Tabelle 18: Chi-Quadrat-Test der Polymorphismus-Kombination der SNPs T16519C und G3010A.....	50
Tabelle 19: Die jahreszeitliche Sterbeverteilung. Erhoben an 42 SIDS-Fällen und in Abhängigkeit der SNPs 3010A und 16519C.....	51
Tabelle 20: Ergebnisse der Verifizierung durch die SNaPSHOT-Analyse	54
Tabelle 21: Übersicht der Rohdaten.....	79

Abkürzungsverzeichnis

10x	zehnfach konzentriert
A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
dH ₂ O	destilliertes Wasser
D-Loop-Region	engl. <i>displacement-loop</i> , Kontrollregion
DNA	engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
g	Gramm
G	Guanin
H ₂ O	Wasser
Haplo-H	Haplogruppe H
5-H	5-Hydroxytryptamin
HVR	hypervariable Region
ICD	<i>International Classification of Diseases</i>
l	Liter
LQTS	Long-QT-Syndrom
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mtDNA	mitochondriale DNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nDNA	nukleäre DNA
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung

PCR	engl.: <i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
SIDS	engl.: <i>Sudden Infant Death Syndrome</i> ; Plötzlicher Kindstod
SNP	engl.: <i>Single nucleotide polymorphism</i>
STR	engl.: <i>Short-Tandem-Repeat</i> , kurze hintereinander wiederholte bp
T	Thymin
U	engl.: <i>Unit</i> ; Einheit für vorliegende Enzymaktivität
USID	engl.: <i>Unclassified Sudden Infant Death</i>
V	Volt

1 Einleitung

1.1 SIDS - Sudden Infant Death Syndrome

“Die Welt wird jedes Mal neu erschaffen, wenn ein Kind geboren wird. Geboren zu werden bedeutet, dass uns eine ganze Welt geschenkt wird.“

(Jostein Gaarder, 1996)

Wie schon in der Literatur betrachtet, bedeutet die Geburt eines Säuglings das Geschenk einer ganzen Welt. Umso schlimmer ist es, wenn das Phänomen des plötzlichen Kindstodes eintritt und nicht nur dem Säugling, auch seiner Familie diese Welt plötzlich und unerwartet wieder genommen wird. Rognum und Willinger (1995) sprechen hier von SIDS (*Sudden Infant Death Syndrome*) als einem Syndrom, dessen erstes und einziges Symptom der Tod ist.

Der plötzliche Kindstod ist die häufigste Todesursache bei Säuglingen innerhalb des ersten Lebensjahres. Die Ursachen für das Eintreten des plötzlichen Todes sind bis heute noch ungeklärt. Dieses Unwissen stellt gerade für die Familie des Säuglings eine große Belastung, beziehungsweise Herausforderung dar, wie es zum Eintritt des plötzlichen Todes kommen konnte oder wie er durch die Eltern hätte verhindert werden können.

Unterschiedliche Untersuchungsansätze wurden seither verfolgt, eine Ursache des plötzlichen Kindstodes ist nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft weiterhin ungeklärt. Die Forschung machte es jedoch möglich, Risikofaktoren mit dem Eintreten des plötzlichen Kindstodes in einen Zusammenhang zu stellen. Durch die von Filiano und Kinney (1994) entwickelte „Triple-Risk-Hypothese“, die exogene Faktoren, genetische Prädispositionen, sowie die kritische Entwicklungsphase des Säuglings umfasst, konnte der plötzliche Kindstod als multifaktorielles Syndrom klassifiziert werden.

Das Vorliegen genetischer Prädispositionen konnte in früheren Studien nachgewiesen werden. Ein Fokus liegt auf dem Genom der mitochondrialen DNA (mtDNA). Nicht nur die Fälle des plötzlichen Kindstodes auch andere Krankheitsbilder, Mitochondriopathien, konnten mit Polymorphismen der mtDNA in einen Zusammenhang gestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen drei Polymorphismen der mtDNA und mögliche Risikofaktoren im Bezug zu SIDS-Fällen untersucht werden. Die Folge eines mitochondrialen Polymorphismus kann beispielsweise die verminderte Genexpression der Untereinheiten der Atmungskette zur Folge haben. Daraus kann ein Defizit in der ATP (Adenosintriphosphat)-Produktion resultieren. Der physiologische Kreislauf einer menschlichen Zelle ist durch diesen Defizit nur eingeschränkt gewährleistet. Ausgewählt wurden die drei zu untersuchenden Genorte nach einer Studie von Camilleri et al. aus dem Jahr 2009, die die Polymorphismen in Bezug auf gastrointestinale Funktionsstörungen untersucht haben. In Bezug auf den plötzlichen Kindstod wurden diese drei Polymorphismen noch nicht abschließend evaluiert. Zwar wurde berichtet, dass sowohl G3010A als auch T16519C mit dem plötzlichen Kindstod assoziiert wären (Boles et al. 2010). Da diese Ergebnisse jedoch an einer sehr kleinen Fallgruppe erzielt wurden und keine ausführliche Publikation zu dieser Frage vorliegt, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle dieser Polymorphismen in Bezug auf den plötzlichen Kindstod gemeinsam mit der (bei Europäern) häufigsten Variation C7028T erneut zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in vier Hauptkapitel. Im ersten Kapitel soll auf die Grundlagen der Thematik eingegangen werden, um nachfolgend auf die verwendeten Methoden und die Vorstellung der gewonnenen Forschungsergebnisse einzugehen. Das vierte Kapitel schließt mit der Diskussion ab, es erfolgt hier eine kritische Auseinandersetzung mit den gewonnenen Ergebnissen und eine Interpretation im Hinblick auf mögliche Implikationen in Theorie und Praxis.

Im folgenden Abschnitt soll daher zunächst die Thematik des plötzlichen Kindstodes ausführlich betrachtet werden. Es erfolgt eine definitorische Erörterung, um später auf die Diagnostik, die Epidemiologie, die Risikofaktoren und Präventionsstrategien des plötzlichen Kindstodes einzugehen.

1.1.1 Definition

SIDS, hierbei handelt es sich um eine Abkürzung des englischen Fachbegriffes „*Sudden Infant Death Syndrome*.“ Im Deutschen bekannt unter dem Begriff „Plötzlicher Kindstod“ oder auch „Krippentod“. Nicht nur in Klassifikationssystemen, wie dem ICD-

Schlüssel (ICD 10–R95), sondern auch in internationalen Studien wird die Abkürzung SIDS wissenschaftlich verwendet (WHO 2012; Beckwith 2003). Trotz intensiver Forschung ist die Ursache des plötzlichen Kindstodes bis heute nicht abschließend geklärt. Nicht nur die Ursache des SIDS, auch die Definition stellt die Wissenschaft vor eine Herausforderung (Krous et al. 2004). Grundlegende Diskrepanzen herrschen vor allem in der Festlegung allgemein gültiger Kriterien, die zu einer einheitlichen Definition zusammengefügt werden sollen.

Beckwith stellte 1969 (Beckwith 1970) im Rahmen der zweiten internationalen Konferenz des plötzlichen Kindstodes in Seattle die erste in der Forschung anerkannte Definition auf:

„The Sudden Infant Death of any infant or young child which is unexpected by history, and in which a thorough postmortem examination fails to demonstrate an adequate cause of death.“

Beckwith (1970) definiert SIDS als den plötzlichen Tod eines Kindes, der unerwartet eintritt und sich auch nach ausführlichen postmortalen Untersuchungen nicht medizinisch begründen lässt.

Auf Grundlage späterer Forschungsergebnisse und der Kenntnis neuer epidemiologischer Risikofaktoren wurde die Definition regelmäßig optimiert und verändert. Laut Riße (2001) kommt es zur stetigen Optimierung der Definition aufgrund der Tatsache, dass zum einen viele Fachrichtungen an der Definitionsfindung beteiligt sind, zum anderen, dass viele exogene und endogene Einflüsse eine entscheidende Rolle bei SIDS spielen, die berücksichtigt werden müssen.

Aufgrund der Vielzahl der bis dato aufgestellten Definitionen soll nachfolgend ein kurzer Überblick über die relevanten theoretischen Überlegungen im chronologischen Zeitablauf gegeben werden.

1989 konkretisiert eine Gruppe von Experten aus pädiatrischen Fachärzten und forensischen Pathologen des *National Institute of Child Health and Human Development (NICHD)* in Seattle die Definition Beckwiths aus dem Jahre 1969. Die Postneonatalzeit und somit der Todeszeitraum werden begrenzt auf den 8. bis 365. Lebensstag. Zusätzlich zur Autopsie sind Untersuchungen der Todesumstände, sowie eine klinische und familiäre Anamnese durchzuführen (Willinger et al. 1991).

Aufgrund von Reflexionsbewegungen ist es möglich, dass die Auffindeposition des leblosen Säuglings mit der Position des fatalen Ereignisses nicht übereinstimmt. Nur durch die genaue Rekonstruktion der „Todesszene“ kann die Todesursache geklärt werden (Krous et al. 2004). Auf der dritten internationalen Konferenz in Stavanger/Norwegen im Jahre 1995 entschied ein Gremium erneut über die Akzeptanz einer allgemeinen Definition. Unter der Vorlage mehrerer Definitionsvorschläge bewährte sich jedoch letztlich die von Beckwith verfasste Definition aus dem Jahre 1969.

Auf einer Konferenz im Jahre 2004 in San Diego fügten Krous et al. hinzu, dass das fatale Ereignis während des Schlafes des Säuglings eintritt. Die Definition lautete wie folgt:

“The sudden unexpected death of an infant <1 year of age, with onset of the fatal episode apparently occurring during sleep, that remains unexplained after a thorough investigation including performance of a complete autopsy and review of the circumstances of death and the clinical history” (Krous et al. 2004, S.235).

Krous et al. (2004) leitet dazu an, im Interesse der Vergleichbarkeit von Untersuchungs- und Diagnosekriterien, eine einheitliche Definition gewissenhaft und universell zu verwenden. Nur unter Einhaltung der genauen Kriterien ist eine sichere Diagnosestellung durchführbar. Schon in der Vergangenheit kam es in internationalen Studien zu Diskrepanzen aufgrund uneinheitlicher Definitionsgrundlagen.

Die folgende Tabelle führt eine festgelegte Klassifizierung für SIDS-Fälle auf. Diese umfasst Richtlinien, die zur der Diagnostik eines möglichen SIDS-Falles als Grundlage genutzt werden sollten. Die Klassifizierung erfolgt in drei Kategorien.

	Clinical:	Circumstances of death:	Autopsy:
Category IA SIDS Classic features of SIDS present and completely documented	<ul style="list-style-type: none"> ▪ More than 21 days and <9 months of age ▪ Normal clinical history, including term pregnancy (gestational age of <37 weeks) ▪ Normal growth and development ▪ No similar deaths among siblings, close genetic relatives (uncles, aunts, or first-degree cousins), or other infants in the custody of the same caregiver 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Investigation of the various scenes where incidents leading to death might have occurred and determination that they do not provide an explanation for the death ▪ Found in a safe sleeping environment, with no evidence of accidental death 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Absence of potentially fatal pathologic findings. Minor respiratory system inflammatory infiltrates are acceptable; intrathoracic petechial hemorrhage is a supportive but not obligatory or diagnostic finding ▪ No evidence of unexplained trauma, abuse, neglect, or unintentional injury ▪ No evidence of substantial thymic stress effect (thymic weight of <15 g and/or moderate/severe cortical lymphocyte depletion). Occasional “starry sky” macrophages or minor cortical depletion is acceptable. ▪ Negative results of toxicologic, microbiologic, radiologic, vitreous chemistry, and metabolic screening studies
Category IB SIDS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Classic features of SIDS present but incompletely documented ▪ Requirements of the general definition met ▪ All of the criteria for category IA met except the investigation of the various scenes and/or one of the following analyses were not performed: toxicologic, microbiologic, radiologic, vitreous chemistry, or metabolic screening studies 		
Category II SIDS Category II includes infant deaths that meet category I criteria except for <1 of the following:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Age range outside that of category IA or IB (i.e., 0–21 days or 270 days (9 months) through first birthday) ▪ Similar deaths among siblings, close relatives, or other infants in the custody of the same caregiver that are not considered suspect for infanticide or recognized genetic disorders ▪ Neonatal or perinatal conditions (e.g., those resulting from pre-term birth) that have resolved by the time of death 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mechanical asphyxia or suffocation caused by overlaying not determined with certainty. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Abnormal growth and development not thought to have contributed to death ▪ Marked inflammatory changes or abnormalities not sufficient to be unequivocal causes of death

Tabelle 1: Klassifizierung des SIDS

Quelle: modifiziert nach Krous et al. (2004, S. 235-236)

Krous et al. (2004) warnen davor, nicht eindeutige Todesursachen eines Säuglings voreilig als SIDS-Fall zu klassifizieren. Die Definition und deren Kriterien sollen uneingeschränkt als Diagnostikgrundlage verwendet werden, um keine SIDS-Fälle zu übersehen, aber auch um keine Todesfälle fälschlicherweise als SIDS einzustufen. Für Kindstodfälle, die nicht den SIDS-Kriterien, aber auch keinem natürlichen und unnatürlichen Tod entsprechen, wurde die Definition des *Unclassified Sudden Infant Death (USID)* erstellt. Organische Grunderkrankungen des Säuglings sind hier möglich, dürfen jedoch keine Todesursache darstellen (Krous et al. 2004).

1.1.2 Diagnostik

Die Diagnostik des plötzlichen Kindstodes stellt die Rechtsmedizin vor eine große Herausforderung. Viele Leitkriterien sind zu beachten, um einen möglichen SIDS-Fall nicht fälschlicherweise als natürlichen Tod zu klassifizieren. Eine Obduktion ist bei Säuglingen mit SIDS-Verdachtsdiagnose unentbehrlich. Der Ablauf orientiert sich an einem international standardisierten Autopsieprotokoll (Bajanowski und Poets 2004).

Zusätzlich zur Autopsie beinhaltet die Diagnostik eine gründliche äußerliche Begutachtung des Leichnams einschließlich einer radiologischen Untersuchung. Um endogene Faktoren auszuschließen, zieht man zu einer ausführlichen Diagnostik mikrobiologische, virologische und neuropathologische Untersuchungen hinzu (Mitchell et al. 2000).

Auch die Anamnese und Auffindesituation des Säuglings spielt eine relevante Rolle, um eine klare Diagnostik zu erheben (Krous et al. 2004). Die klinische Vorgeschichte vom Schwangerschaftsverlauf bis zum Tod des Säuglings sollte erfragt werden, um alle vorangegangenen Ereignisse und Erkrankungen zu berücksichtigen (Bajanowski und Poets 2004).

Nach der Definition Beckwiths ist der ausschlaggebende Richtwert zur Diagnose des plötzlichen Kindstodes eine unauffällige Anamnese. Entsprechend ergeben sich der Nachweis keiner oder nur geringfügiger pathologischer Zeichen, die zum Nachweis einer Todesursache jedoch nicht ausreichen (Beckwith 1970). Äußerlich zeigen sich Merkmale, die häufig bei SIDS-Fällen zu beobachten sind. Die Säuglinge sind meist altersgerecht entwickelt und befinden sich in einem guten Ernährungszustand. Häufig

feststellbar ist eine vor dem Tode aufgetretene Hyperhidrose (starkes Schwitzen), bedingt durch eine Hyperthermie. Nachweisen lässt sich dieses bei 35% der Säuglinge durch feuchte Haare, durchnässte Kleidung und Bettwäsche (Kleemann et al. 1996). Zentrale zyanotische Veränderungen an Lippen und Zunge können vermehrt nachgewiesen werden (Zinka et al. 2004). Betrachtet man die Organbefunde der Säuglinge zeigen sich auch hier charakteristische Veränderungen. Nachweisen lassen sich petechiale Blutungen an Thymus, viszeraler Pleura oder Epikard in 85% der Fälle (Hunt und Hauck 2006).

Eine aktuelle Studie von Jensen et al. aus dem Jahr 2012 zeigt welche Bedeutung der Einhaltung des Diagnosestandards zukommt. Von 138 untersuchten Säuglingstodesfällen wurden 23% als SIDS-Fälle eingestuft. Diese Ergebnisse wurden für weitere Forschungszwecke erneut validiert. Nach Überprüfung der Klassifikationskriterien wurden nunmehr 38% dieser Fälle als SIDS-Fälle klassifiziert (Jensen et al. 2012). Derartige Diskrepanzen stellen keinen Einzelfall dar. Durchaus kommt es vor, dass nur 40% der möglichen SIDS-Fälle obduziert werden, was unabdingbar für die SIDS-Diagnostik ist (Tursz et al. 2010). Auch zusätzliche Testverfahren, wie metabolische Analysen wurden nur in 30% der möglichen SIDS-Fälle durchgeführt. Eine Kategorisierung der SIDS-Fälle in die Klasse Ia war demnach ausgeschlossen und verfälscht somit gänzlich die Vergleichbarkeit. Die Konsequenz daraus ist die Sicherstellung regelmäßiger Kontrollen der Institute, um die Einhaltung des Diagnosestandards zu garantieren (Jensen et al. 2012). Diese inkonsequente Durchführung der Diagnose- bzw. Klassifikationskriterien stellt den Vergleich zwischen westl. Ländern vor eine große Problematik (Byard 2010).

1.1.3 Epidemiologie

Viele epidemiologische Faktoren stehen im Zusammenhang mit dem Eintreten des plötzlichen Todes eines Säuglings. Epidemiologische Studien stellten dar, dass der Schlaf des Säuglings in Rückenlage das Risiko eines SIDS deutlich verringert (Moon et al. 2007; Saternus 1985). Schon im Jahre 1985 machte Saternus deutlich, dass die Bauchlage des Säuglings eine mögliche Rolle als Ursache des plötzlichen Kindstodes spielt. Trotz diverser Präventionsmaßnahmen, die unter anderem vor einer Bauchlage während des Schlafes warnen, ist der plötzliche Kindstod in Industrienationen nach wie

vor die häufigste Todesursache bei Säuglingen (Mitchell et al. 1994; Opdal und Rognum 2004).

Mitte der 80er Jahre lag die SIDS-Rate in Ländern mit hohem Gesundheitsstandard bei einem bis drei Fällen pro 1000 Lebendgeburten. Durch die Einführung von Präventionsmaßnahmen und die Erkennung neuer Risikofaktoren war ein Absinken der Inzidenz zu beobachten. Anfang der 90er Jahre wurden "Back-to-sleep-Kampagnen" eingeführt, um die Gefahr der Bauchlage für den Säugling publik zu machen. Der Erfolg dieser Kampagne war erkennbar und es ließ sich ein Rückgang der Sterberaten von 50-90% erzielen (Moon et al. 2007). Im Jahre 2002 ergab sich eine Rate von 0,46 Sterbefällen pro 1000 Lebendgeburten (Kleemann und Bajanowski 2004). Einen erkennbaren Einfluss auf die Inzidenz haben nicht nur regionale, sondern auch ethnische Faktoren. In Neuseeland und den Niederlanden liegt die Mortalität mit 0,8 bzw. 0,9 SIDS-Fällen pro 1000 Lebendgeburten am Höchsten. Die USA hat eine Sterberate von 0,57 SIDS-Fällen pro 1000 Lebendgeburten. Japan hingegen weist mit einer Rate von 0,09 SIDS-Fällen pro 1000 Lebendgeburten die geringste Sterberate auf (Kinney und Thach 2009). Moon et al. (2007) zeigen in Betracht der ethnischen Herkunft ein erhöhtes Risiko für die Ureinwohner Nordamerikas, die Aborigines in Australien, sowie für die Maoris in Neuseeland auf. Eine Ursache für diese Feststellung ist bislang nicht bekannt, kulturelle Gegebenheiten werden als Hintergrund vermutet.

Laut Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes Wiesbadens ist der Fall des plötzlichen Kindstodes im Jahre 2010 in Deutschland 164 Mal festgestellt worden (Statistisches Bundesamt 2012). Darunter fallen 103 männliche und 61 weibliche Säuglinge, siehe Tabelle 2. Die erhöhte Jungensterblichkeit konnte bei der Betrachtung der Geschlechtsverteilung mehrfach festgestellt werden. Das Verhältnis liegt nach Literaturangaben bei 60:40 (Kleemann und Bajanowski 2004). Einen Zusammenhang zwischen der SIDS-Inzidenz und einer höheren Jungengeburtensrate gibt es nicht. Die Häufung der betroffenen Jungen ist kein spezifisches Phänomen des plötzlichen Kindstodes, lässt sich jedoch vermehrt beobachten und durch Studien nachweisen (Byard und Krous 2003; Kleemann und Bajanowski 2004; Moon et al. 2007).

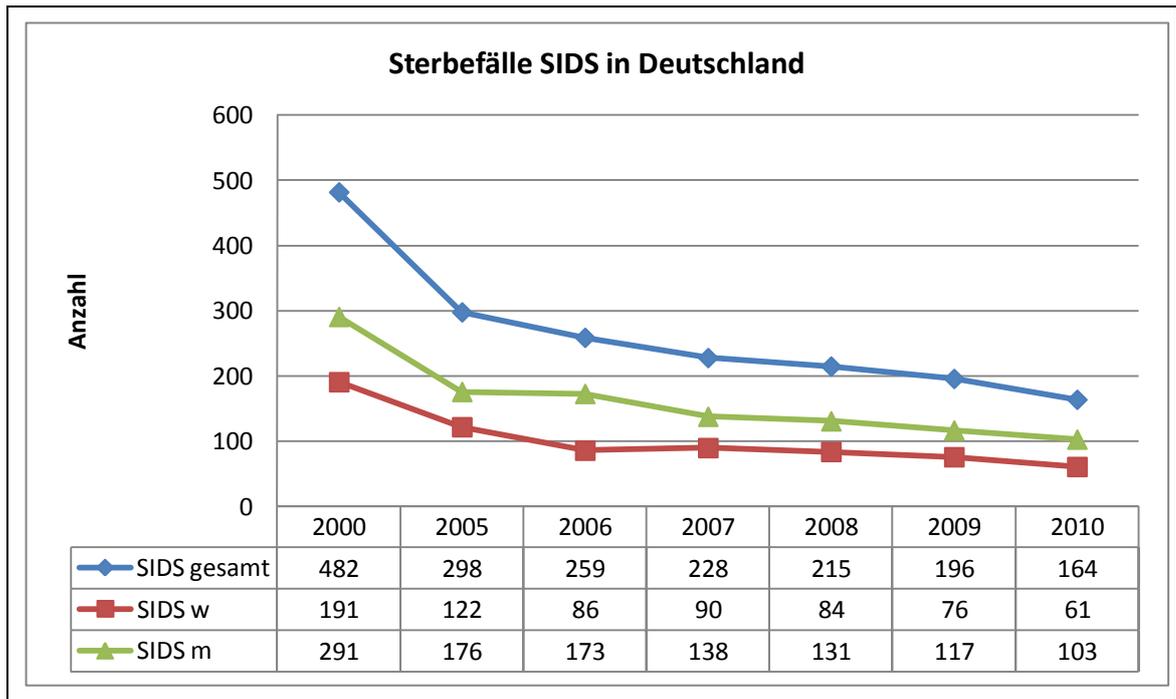


Tabelle 2: Todesursachenstatistik im Verlauf in Deutschland
Quelle: Statistisches Bundesamt (2012)

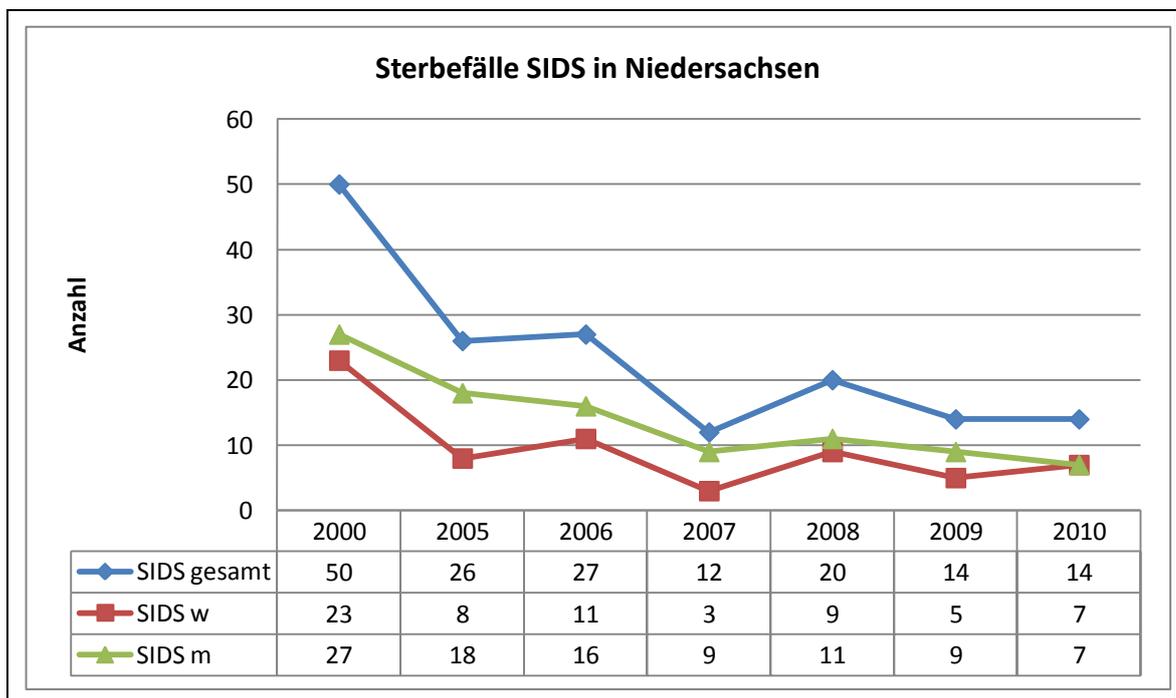


Tabelle 3: Todesursachenstatistik im Verlauf in Niedersachsen
Quelle: Statistisches Bundesamt (2012)

Eine deutlich erhöhte Sterberate lässt sich zwischen dem 2. und 4. Lebensmonat feststellen, sowie ein weiterer Peak um den 6. Lebensmonat des Säuglings (Mitchell et al. 1997). Nur 2% der Todesfälle treten im ersten Monat auf (Moon et al. 2007). Das

Geschlecht des Säuglings steht in keinem Zusammenhang mit dem Sterbealter (Goldberg et al. 1986).

Charakteristisch für SIDS-Fälle ist das Auftreten in den Wintermonaten zwischen November und April. Diese Häufung während der kalten Jahreszeit lässt sich bei keiner anderen Todesursache nachweisen (Kleemann und Bajanowski 2004). Atemwegserkrankungen der Säuglinge treten in kalten Monaten vermehrt auf und können ein Grund für die erhöhte Sterblichkeit während dieses Zeitraumes sein. Nachweislich litten um den Todeszeitpunkt etwa die Hälfte der SIDS-Säuglinge an einem bronchialen Infekt (Kinney und Thach 2009). Weiterhin zu begründen ist dieses Phänomen aufgrund zu hoher Raumtemperaturen, zu warmer Kleidung und einer daraus entstehenden Hyperthermie (Kleemann und Bajanowski 2004).

1.1.4 Ätiologie

Nach wie vor bleibt die Ursache des plötzlichen Kindstodes trotz jahrelanger Forschung bis heute ungeklärt. Viele Studien gehen davon aus, dass es sich beim Plötzlichen Kindstod um ein multifaktorielles Syndrom handeln muss. Der plötzlich eintretende Tod beruht nicht auf einer Ursache, sondern dem Zusammenwirken dreier sich überlappender Faktoren (Willinger et al. 1991; Horne et al. 2010). Viele Hypothesen wurden im Laufe der Zeit aufgestellt, um die Ursache des plötzlichen Kindstodes zu erfassen. Filiano und Kinney entwickelten im Jahre 1994 die „Triple-Risk-Hypothese“. Diese Hypothese gliedert sich in drei Einflussfaktoren. Sie beinhaltet die genetische Prädisposition, exogene Stressoren, sowie die kritische Entwicklungsphase. Althoff stellte 1986 den Zusammenhang der Entwicklung zum Alter des Säuglings her. Der Säugling befindet sich während der ersten Lebensmonate in einer kritischen Entwicklungsphase. Der Körper des Säuglings ist vielen Einflüssen ausgesetzt und muss erst lernen mit diesen umzugehen und Immunität zu entwickeln (Althoff 1986). Befindet sich ein Säugling in dieser kritischen Entwicklungsphase mit erhöhter Vulnerabilität und besteht eine besondere Prädilektion, beispielsweise durch eine Mutation der mtDNA, reicht ein zusätzlicher exogener Stressor, wie der Schlaf in Bauchlage oder ein viraler Infekt aus, um einen plötzlichen Kindstod auszulösen (Horne et al. 2010).

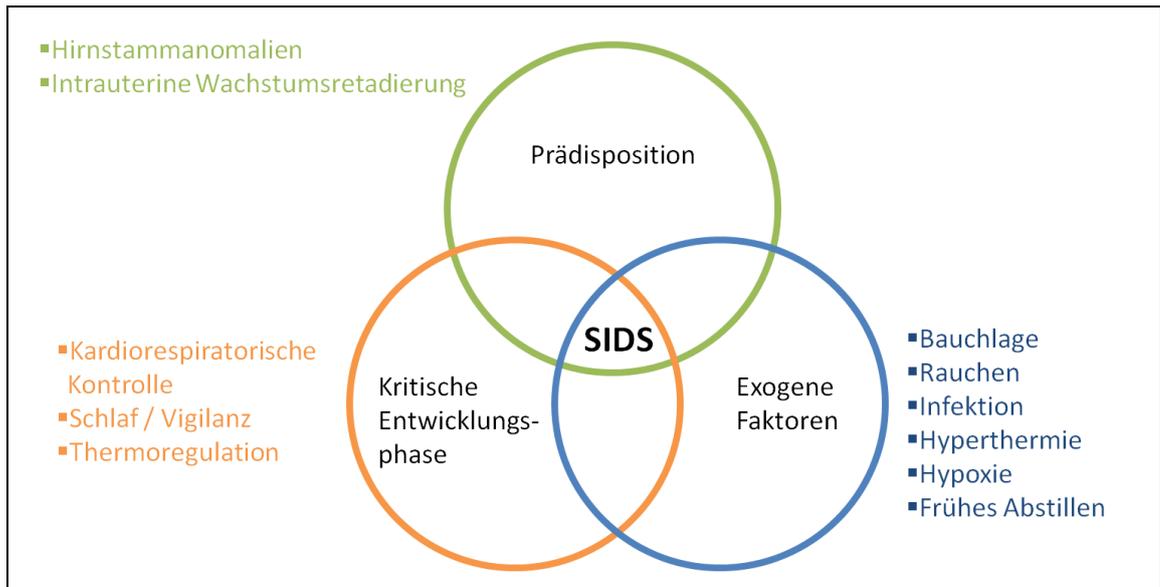


Abbildung 1: Triple-Risk-Modell

Quelle: modifiziert nach Filiano und Kinney (1994, S. 196)

Zur Gruppe der exogenen Stressoren zählt man physische Faktoren, die auf den Säugling Einfluss nehmen und für ein Risiko des Ersticken oder eines homöostatischen Ungleichgewichtes sorgen können (Kinney und Thach 2009). Einer der wichtigsten exogenen Faktoren ist die von Saturnus beobachtete Bauchlage des Säuglings während des Schlafes (Saturnus 1985). 30 bis 50% der SIDS-Säuglinge werden in Bauchlage aufgefunden (Mitchell et al. 2008). Auch eine seitliche Lagerung ist als präventive Maßnahme unzureichend, da sich eine Drehung des Säuglings in die Bauchlage dadurch nicht vermeiden lässt. Präventionskampagnen, die zu einer Rückenlage als Schlafposition des Säuglings in den Niederlanden, Neuseeland und Großbritannien aufforderten, führten zu einem Rückgang der SIDS-Häufigkeit. Der Säugling hat in Rückenlage einen leichten Schlaf, somit eine niedrigere Weckschwelle (Arousal) und kann schneller auf lebensbedrohende Situationen reagieren, als in Bauchlage (Galland et al. 2002). Mitchell und Blair (2012) berichten von 3000 Kinderleben, die durch die Änderung der Bauchlage in die Rückenlage, in den letzten 20 Jahren gerettet werden konnten.

Nach der wirkungsvollen „Back-to-Sleep-Kampagne“ soll der Fokus auf das *Bedsharing* gelegt werden. Um auf mögliche Komplikationen schnell reagieren zu können und ihrem Kind nahe zu sein, lassen Eltern ihren Säugling bei sich im Bett schlafen. Die Gefahr, dass sie ihr Kind erdrücken oder mit einer Bettdecke „ersticken“ ist jedoch viel größer. Besonders hoch ist das Risiko des *Bedsharings* für Säuglinge rauchender

Mütter in den ersten Lebenswochen (Kleemann und Poets 2004). Sollte das Risiko des *Bedsharings* durch die Bedeckung des Kindes und den thermischen Stress verursacht sein, so sind ältere Säuglinge eher in der Lage aufzuwachen und ihre Eltern zu alarmieren oder sich aus der kritischen Situation zu befreien (Vennemann et al. 2012). Das geringste Risiko haben Säuglinge, die in ihrem eigenen Kinderbett im Schlafzimmer der Eltern schlafen (Hunt und Hauck 2006).

Erhöhte Raumtemperaturen, sowie dicke, weiche Decken und Kissen können die Gefahr einer Hyperthermie des Kindes in sich verbergen. In der Wissenschaft wird das Risiko des Sauerstoffmangels, wenn der Säugling durch die Bettwäsche bedeckt wird als ein ausschlaggebender Faktor angesehen, der einen plötzlichen Kindstod zur Folge haben kann (Kleemann und Bajanowski 2004; Schlaud et al. 2010). Um die Gefahr der Verdeckung von Mund und Nase durch Kissen und Bettdecken zu vermeiden, wird die Verwendung von Babyschlafsäcken empfohlen (L' Hoir et al. 1998). Weitere Erkenntnisse zeigen, dass die CO₂-Durchlässigkeit der Matratzen von Babybetten vom Material abhängt. Durch diese Untersuchung und die Verwendung qualitativ hochwertigen Materials lässt sich die Wahrscheinlichkeit einer CO₂-Akkumulation und damit einer CO₂-Rückatmung in Bauchlage mindern (Bar-Yishay et al. 2011).

Neben den äußeren Einflüssen wie die Bauchlage und das *Bedsharing* existieren weitere Faktoren. Nachweislich spielen auch der Nikotinabusus der Mutter und das frühe Abstillen eine Rolle (Mitchell 1991). Eine Mutter erhöht das Risiko für ihren Säugling, am plötzlichen Kindstod zu sterben, um das 3-fache, wenn Sie während und nach der Schwangerschaft raucht (Mc Donnel-Naughton et al. 2012). Negativ beeinflusst wird die kardiorespiratorische Kontrolle, das neuronale Neurotransmittersystem und somit die homöostatische Balance des Säuglings (Mitchell und Milerad 2006). Auch der Konsum anderer Drogen wirkt auf das Eintreten eines SIDS fördernd. Nachweislich ist die intrauterine Kokain-Exposition mit einem 4,1-fach erhöhten SIDS-Risiko verbunden (Carvajal et al. 1996).

Häufig zu beobachten sind Risikofaktoren, die das familiäre Umfeld des Kindes betreffen. Junge Familien mit einem geringeren Bildungsgrad, einer schlechteren Schwangerschaftsvorsorge, kurzen Pausen zwischen den Schwangerschaften sind mit einem erhöhten Risiko assoziiert (Mitchell und Blair 2012).

Genetische Prädispositionen wurden in bisherigen Studien häufig mit dem plötzlichen Kindstod in einen Zusammenhang gestellt. Ein Fokus lag dabei auf autonomen Genen, die mit dem Herz-Kreislauf-System, der Atmung, dem Immunsystem, sowie dem zentral-neuronalen System assoziiert sind. Unterschieden wird hierbei zwischen Genen, bei denen eine Anomalität tödlich sein kann, und Genen, die eine Prädisposition darstellen. Im Vergleich zu letalen Anomalitäten stehen Genmutationen, die im Zusammenspiel mit anderen Faktoren ein erhöhtes SIDS Risiko darstellen (Opdal und Rognum 2010). Beispielsweise sei eine Mutation im kardialen Ionenkanal-Gen (LQT1-9), durch die das Long-QT-Syndrom (LQTS) entstehen kann, genannt. Eine Studie zeigt, dass bei einem Teil aller SIDS-Säuglinge ein LQTS nachzuweisen ist (Millat et al. 2009). Katecholamine, meist Noradrenalin, fungieren im Hirnstamm und den Basalganglien als wichtige Neurotransmitter in der Atemregulation und der Arousal-Antwort. Auch für den Stoffwechsel und das Organsystem sind Katecholamine unentbehrlich. Die Hirnstammhypothese von Kinney et al. (2009) geht von einem Defizit im Neurotransmittersystem als Ursache für SIDS aus. Die Tyrosin-Hydroxylase nimmt in der Biosynthese von Tyrosin zu Noradrenalin einen wichtigen Stellenwert ein. Klitschar et al. (2008) untersuchten einen Polymorphismus im THO1 Allel 9.3, einem Gen der Tyrosin-Hydroxylase, im Zusammenhang mit SIDS. Durch diesen Polymorphismus kommt es zu einer verminderten Tyrosin-Hydroxylase-Expression und folglich zu einer reduzierten Konzentration von Noradrenalin. Dieser Polymorphismus lässt sich bei SIDS-Fällen vermehrt nachweisen. Im Zusammenspiel mit Noradrenalin wirkt das Serotoninsystem (5-HT). Serotonin hat nicht nur einen Einfluss auf das respiratorische System, sondern auch auf den Wärmehaushalt und den Schlaf-Wach-Rhythmus des Körpers. Auch in diesem System zeigen sich übermäßige Anomalitäten bei SIDS-Fällen. Paterson et al. (2006) bestätigen eine verminderte Bindungsfähigkeit des Serotonintransporters (5-HTT), sowie eine hohe Anzahl von kurzen, sich wiederholenden Basenpaaren (*Short-Tandem-Repeat; STR*) in der Promotorregion. Einen Zusammenhang zwischen den genannten und möglichen anderen Anomalitäten im neuronalen System sehen Kinney et al. (2012), der auf einer Störung der medullären Hämostase beruht. Durch diese Störung im Neurotransmittersystem kommt es in der frühen Entwicklungsphase des Säuglings zu Fehlfunktionen in lebensnotwendigen Schutzmechanismen während des Schlafes.

Ein weiterer grundlegender Forschungsbereich, der auch gleichzeitig der Schwerpunkt dieser Dissertation sein soll, umfasst das Mitochondrium und seine DNA. Die mtDNA umfasst 16569 Basenpaare (bp) und stellt sich in Form eines zirkulären DNA-Moleküls dar. Diese DNA enthält unter anderem Gene für mitochondriale Proteine, die einen Teil der Atmungskette bilden. Vermutet wird eine Minderung der ATP-Bildung, die durch die Atmungskette gesteuert wird (Deixler 2009). In Einzelfällen konnte ein Zusammenhang zwischen *Single-Nucleotide-Polymorphism* (SNPs) und SIDS-Fällen nachgewiesen werden. Divne et al. (2003) berichten von 20% unspezifischer SNPs in der mtDNA. Eine einzelne Mutation kann beispielsweise zu einem Mangel an exprimierenden Genen und somit zu einer geringeren Energieproduktion durch die Atmungskette führen (Courts und Madea 2010).

1.1.5 Präventionsstrategien

Aufgrund der mangelnden Ursachenkenntnis ist es derzeit nicht möglich, den plötzlichen Kindstod gänzlich zu verhindern. Lediglich die Vermeidung oder Minimierung der Risikofaktoren stellt eine effektive Präventionsmaßnahme dar und konnte in der Vergangenheit etliche Kindstodfälle verhindern (Mitchell und Blair 2012).

Die Basis einer effektiven Prävention ist die Identifizierung von Risikofaktoren. Auf diesem Wege ist es Eltern, Großeltern und allen das Kind umgebenden Personen möglich, keine unnötigen Risiken einzugehen. Sollte die Hypothese stimmen, dass das Versagen des Schutzmechanismus „Arousal“ ein Faktor sei, der zum plötzlichen Kindstod führen kann, ist entscheidend, dass jede kritische Situation umgangen wird, die diesen Schutzmechanismus auslöst. Es unterliegt dem ärztlichen Aufgabenbereich, die Eltern diesbezüglich zu informieren und zu begleiten (Bajanowski und Poets 2004). Eine Begleitung und Beratung sollte neo- und postnatal stattfinden. Bei Kindern einer Risikogruppe wäre die vorsorgliche Durchführung einer Polysomnographie möglich (Scholle et al. 1990). Diese Maßnahmen stellen jedoch keine Garantie dar, um einen SIDS-Fall zu verhindern, aber eine Grundlage, um mögliche Risiken einzuschätzen und so gut wie möglich zu vermeiden.

1.2 Das Mitochondrium

Jede Zelle des menschlichen Körpers enthält eine hohe Anzahl von differenzierten Organellen. Hinsichtlich ihrer Morphologie und der Funktion lassen sich deutliche Unterschiede festmachen. Im Fokus der nachfolgenden Betrachtung soll das Mitochondrium vorgestellt werden.

Mitochondrien sind strukturierte Organellen, die mit einer Größe von 1-2 μm einen erheblichen Anteil des Zytoplasmavolumens einer eukaryotischen Zelle einnehmen. Aufgrund ihrer Hauptaufgabe, der ATP-Bildung, werden sie als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet. Darüber hinaus gehören viele weitere essentielle Stoffwechselwege zu den Funktionen des Mitochondriums (Alberts et al. 2007). Durch die Forschung an der Mitochondrium-eigenen DNA, sind mittlerweile mehr als 50 Krankheiten bekannt, die auf mitochondriale Fehlfunktionen zurückgehen (Mitochondriopathien). In der Forschung wird dem Mitochondrium somit immer mehr an Bedeutung beigemessen (Opdal und Rognum 2010).

1.2.1 Aufbau des Mitochondriums

Mitochondrien, aus dem altgriechischen „*Mitos*“ – der Faden, sowie „*Chondros*“ – der Kern, sind bewegliche Zellorganellen, die ihre Form ändern und miteinander verschmelzen können. Die Form, Anzahl, Größe und Lage der Mitochondrien zeigt sich in Abhängigkeit der jeweiligen Zellaktivität und deren energetischen Ansprüchen. Zellen des Zentralnervensystems (ZNS) beispielweise enthalten aufgrund ihres hohen ATP-Bedarfes eine hohe Anzahl von großen Mitochondrien, die alleinstehen und in einer Position verbleiben (Alberts et al. 2007; Plattner und Hentschel 2011). Umhüllt ist jedes Mitochondrium von einer Doppellipidmembran. Sie besitzt eine hochspezialisierte innere und äußere Membran, zwischen denen der Intermembranraum liegt. Im Inneren des Mitochondriums befindet sich die Matrix. Diese enthält das eigene Genom der Mitochondrien, die mtDNA. Auf das mitochondriale Genom wird im Abschnitt 1.2.3 (S. 21) ausführlich eingegangen.

Die äußere Membran ist glatt und trennt das Mitochondrium vom Zytosol. Durch eine Vielzahl von Porinen in der Membran ist sie permeabel für Ionen und Moleküle von

einer Größe bis zu 10kDA. Diese Permeabilität stellt den Austausch zwischen Zytosol und dem Mitochondrium sicher.

Die innere Membran dagegen ist sehr viel strukturierter und aus funktionellen Gründen impermeabel für Moleküle. Um einen Austausch zwischen Matrix und Intermembranraum sicherzustellen, benötigt sie Transportsysteme, wie beispielsweise den Pyruvat-Shuttle. Die innere Membran weist starke Falten auf, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Man unterscheidet den Tubulus- und den Cristae-Faltungstyp. Die Ausprägung der Falten zeigt sich in Abhängigkeit der Zellfunktionalität. In stark stoffwechselaktiven Zellen, beispielweise Myokardzellen, sind Mitochondrien des Cristae-Faltungstypes nachweisbar. Fingerförmige Einstülpungen sind in steroidsynthetisierenden Zellen vorzufinden, die als Tubulus-Typ bezeichnet werden. Charakteristisch für die innere Mitochondrienmembran ist das membranstabilisierende Glycerophospholipid Cardiolipin (Diphosphatidylglycerin), welches nur in der inneren Mitochondrienmembran zu finden ist und für die Impermeabilität der Membran sorgt (Alberts et al. 2007).

Viele essentielle Zellvorgänge sind in der Innenmembran und der Matrix der Mitochondrien lokalisiert. Dazu zählen Reaktionen, die unter anderem Einfluss auf die Biosynthese von Häm, Pyrimidin oder Steroiden, aber auch auf die Hämostase von Calcium und Eisen nehmen.

Die wichtigste Aufgabe der Mitochondrien umfasst die Synthese und Bereitstellung von ATP. Durch die aerobe Oxidation wasserstoffübertragender Coenzyme wird Energie gewonnen und der Zelle in Form von ATP zur Verfügung gestellt. Den größten Teil der Energiegewinnung übernimmt im Organismus die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS). Die benötigten Enzymsysteme dieser Reaktion sind in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert. Für Stoffwechselzwischenprodukte, für die die innere Membran nicht permeabel ist, enthält diese Transportsysteme. Zusätzlich zum erwähnten Pyruvat-Shuttle befinden sich in der Membran unter anderem der ADP/ATP-Translokator oder der Malat-Aspartat-Shuttle. Die benötigte Energie der Transportvorgänge über die impermeable innere Membran wird durch die Atmungskette aufrechterhalten.

Die Enzyme des Citratzyklus, der Pyruvatdehydrogenase und der β -Oxidation, sowie die meisten Enzyme des Harnstoffzyklus und der Porphyrinsynthese sind in der mitochondrialen Matrix zu finden. Durch die Lokalisation in einem Kompartiment können die entstehenden Reduktionsäquivalente direkt in die Atmungskette eingeschleust werden. Die Matrix stellt einen wichtigen zellulären Calciumspeicher dar, der bei Bedarf Ca^{2+} -Ionen ins Zytosol abgeben kann.

1.2.2 Oxidative Phosphorylierung (OXPHOS)

Die hochkomplexen biologischen Aktivitäten eines Organismus sind von einer ständigen Energiezufuhr abhängig. Die Höhe des Energieverbrauches hängt dabei von der Art der Zelle und ihrer physiologischen Funktion ab (Koopman et al. 2012). Im menschlichen Energiestoffwechsel wird ATP hauptsächlich durch die Atmungskette und die ATP-Synthase zur Verfügung gestellt. Diese beiden Mechanismen lassen sich als oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) zusammenfassen. Mehr als 80 Proteine sind an der OXPHOS beteiligt, von denen 13 mitochondrial kodiert werden. Die Verteilung der nukleär und mitochondrial kodierten Abschnitte kann bei jedem Individuum variieren (Chen und Butow 2005). Durch die Oxidation von Nahrungsmolekülen entsteht die notwendige Energie zur Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP). Als Begleitprodukt der OXPHOS seien noch die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*; ROS) zu erwähnen, die einen Einfluss auf Proteinmodifikationen haben oder Genomschäden entstehen lassen können (Murphy et al. 2011).

Ohne Mitochondrien würde der Organismus sein gesamtes ATP aus der anaeroben Glykolyse erhalten, welches im Normalfall nur einen geringen Anteil ausmacht. Erst im Mitochondrium wird der Zuckerstoffwechsel komplettiert (Alberts et al. 2007).

Die Energiegewinnung aus Glucose läuft über den Abbauweg der Glykolyse. Es entstehen aus einem Molekül Glucose, zwei Moleküle Pyruvat. Ist Sauerstoff vorhanden, kann in den Mitochondrien das Pyruvat über den aeroben Glykolyseweg zu einer Energiebilanz von 30 ATP abgebaut werden. Die aerobe Glykolyse umfasst die Pyruvatdehydrogenase, den Citratzyklus, sowie die OXPHOS. Diese Energiebilanz stellt im Vergleich zu der anaeroben Glykolyse einen wesentlich effektiveren Weg dar.

1.2.2.1 Die Atmungskette

Die Atmungskette ist ein Teil der OXPHOS und somit unerlässlich für die Energiegewinnung des Organismus. Durch die Decarboxylierung von Pyruvat, dem aus oxidierten Fettsäuren und abgebauten Aminosäuren gewonnenen Acetyl-CoA entsteht im Citratzyklus CO_2 . Beim Durchlaufen des Citratzyklus entstehen Reduktionsäquivalente in Form von NADH/H^+ bzw. FADH_2 , die in die Atmungskette ihre Elektronen einspeisen.

Die Atmungskette setzt sich aus vier Proteinkomplexen zusammen:

- Komplex I: (NADH-Dehydrogenase)
- Komplex II: (Succinat-Dehydrogenase)
- Komplex III: (Cytochrom b-c1-Komplex)
- Komplex IV (Cytochrom-Oxidase)

Diese Komplexreihe ermöglicht die Übertragung von energiereichen Elektronen, die aus der Oxidation von Nahrungsbestandteilen entstanden sind. Durch das Pumpen von Protonen (H^+) wird ein elektrochemischer Gradient über der inneren Mitochondrienmembran erzeugt, der für die ATP-Synthase und damit für die Energiegewinnung unerlässlich ist. Würde diese exogene Reaktion nicht in kleinen Schritten ablaufen, würde es zu einer Knallgasreaktion kommen. Die entstandene Energie ginge als Wärme verloren und die Zellen würden zerstört werden (Ganten und Ruckpaul 2007).

Die Komplexe I-IV sind in die innere Mitochondrienmembran eingebettet und bestehen aus Coenzymen und prosthetischen Gruppen. Die Komplexe I, III und IV arbeiten als Protonenpumpen und beteiligen sich direkt am Aufbau des Protonengradienten. Ihre Energie beziehen sie aus Elektronen, die in vorangegangenen Stoffwechselwegen entstanden sind. Diese Elektronen werden vom Komplex IV auf molekularen Sauerstoff (O_2) unter der Bildung von H_2O übertragen, der mit der Atemluft aufgenommen wird. Eine graphische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung erfolgt in Abbildung 2.

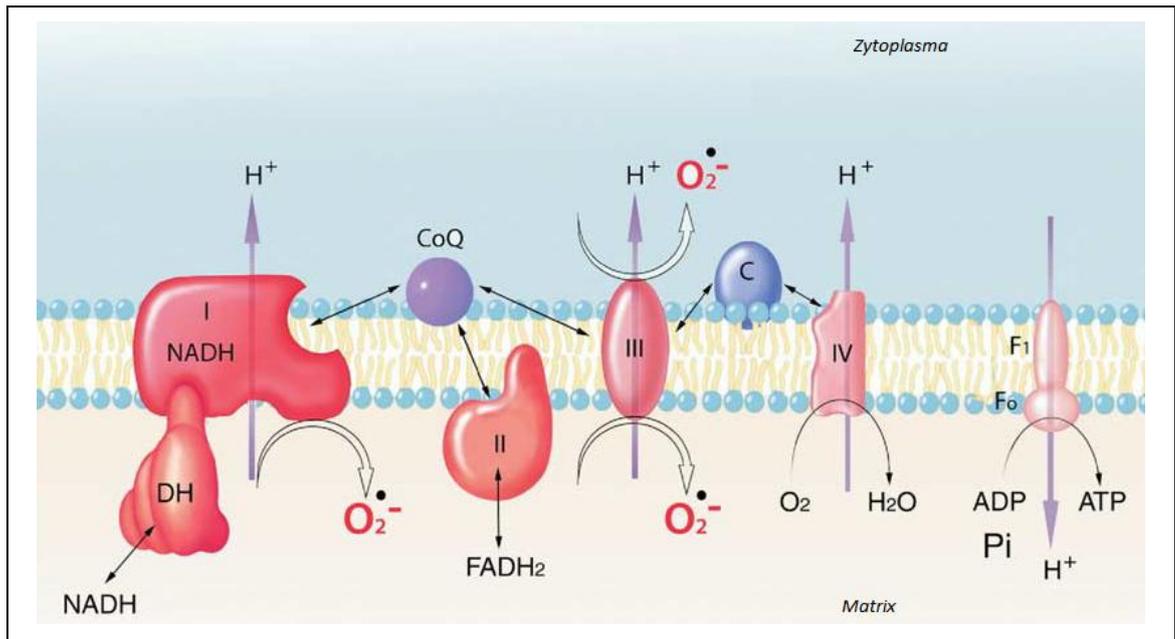


Abbildung 2: Oxidative Phosphorylierung

Quelle: modifiziert nach Balaban et al. (2005, S. 485)

Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase):

Der größte der vier Komplexe ist aus 43 Untereinheiten aufgebaut, sieben davon werden durch das mitochondriale Genom kodiert (Saraste 1999). Er besteht aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Anteil. Der hydrophile Teil enthält, neben Flavinmononucleotid (FMN), acht Eisen-Schwefel-Komplexe. In Komplex I werden die H⁺-Atome, über FMN, von NADH/H⁺ auf das Ubichinon (Coenzym Q) übertragen. Ubichinon überträgt die Elektronen zum zweiten Enzymkomplex. In Komplex I werden vier Protonen vom Matrixraum in den Intermembranraum gepumpt.

Komplexreaktion: $NADH + H^+ + Ubichinon \rightarrow NAD^+ + Ubichinol$

Komplex II (Succinat-Dehydrogenase):

Dieser Komplex wird nukleär kodiert und ist ein Enzym des Citratzyklus. Succinat überträgt seine Elektronen auf die Succinat-Dehydrogenase und wird dabei zu Fumarat oxidiert. Die H⁺-Atome werden durch die prosthetische Gruppe Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) von Succinat auf Ubichinon übertragen. Im Vergleich zu den anderen Komplexen bildet die Succinat-Dehydrogenase einen Quereinstieg für Elektronen in die Atmungskette, besitzt jedoch keine Protonenpumpenfunktion.

Komplexreaktion: $Succinat + Ubichinon \rightarrow Fumarat + Ubichinol$

Komplex III (Cytochrom-bc1-Komplex):

Dieser Komplex besteht aus elf Untereinheiten. Zu diesen gehören das Cytochrom b, das Cytochrom c₁, sowie das Rieske-Eisen-Schwefel-Atom. Mitochondrial kodiert wird als einzige Untereinheit das Cytochrom b. In diesem Komplex werden Elektronen von Ubichinol auf zwei Cytochrom c übertragen. Erstmals kommen die Wasserstoffatome nicht von vorangegangenen Stoffwechselwegen, sondern werden aus den Komplexen I und II gebildet. Im sogenannten Q-Zyklus werden Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum geschleust.

Komplexreaktion: Ubichinol + 2 Cytochrom c_{ox} → Ubichinon + 2 Cytochrom c_{red}

Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase):

Die zentrale Struktur wird aus der Häm-Gruppe und dem gegenüberliegenden Kupfer-Ion Cu_B gebildet. Zwischen diesen beiden bindet der Sauerstoff. Unter Bildung von Wasser nimmt Komplex IV die vom Cytochrom c kommenden Elektronen auf und überträgt sie auf Sauerstoff. Die einzelnen Abläufe des Protonentransportes sind nicht gänzlich bekannt (Rassow et al. 2008).

Komplexreaktion: 2 Cytochrom c_{red} + ½ O₂ + 2 H⁺ → 2 Cytochrom c_{ox} + H₂O

1.2.2.2 Die ATP-Synthase

Die ATP-Synthase ist ein Multienzymkomplex aus 17 Aminosäurenketten und wird auch als F₀F₁-ATPase bezeichnet. Eingebettet in der inneren Mitochondrienmembran ragt der Komplex in die mitochondriale Matrix. Das Prinzip der ATP-Synthase beinhaltet den Protonenrückfluss entlang des in der Atmungskette aufgebauten Protonengradienten und katalysiert dabei die Phosphorylierung von ADP zu ATP (Alberts et al. 2007). Der Komplex V setzt sich aus einem F₀- und einem F₁-Teil zusammen. Der F₀-Teil ist in die innere Mitochondrienmembran integriert und enthält als wichtigste Komponente einen Protonenkanal, durch den die H⁺-Ionen in die Matrix zurückdiffundieren. Der F₁-Teil ragt in die mitochondriale Matrix und stellt die eigentlich ATP-Synthase dar. Durch das Zurückfließen der Protonen durch den F₀-Teil entlang des elektrochemischen Gradienten, entsteht eine Konformationsänderung der ATP-Synthase (F₁-Teil). Diese Konformationsänderung ist für die Aktivität des Enzyms

verantwortlich, das aus ADP und anorganischem Phosphat (P_a) ATP bildet. Das Enzym dreht sich dabei wie eine Turbine über dem F_0 -Teil und öffnet sich nach Abschluss der Synthese, um das entstandene ATP in die Matrix freizusetzen. Pro Zyklus entstehen 3 Moleküle ATP (Rassow et al. 2008).

1.2.3 Die mitochondriale DNA

Jede eukaryotische Zelle enthält eine Kopie des nukleären Genoms. Im Vergleich dazu enthält jede Zelle eine große Zahl, manchmal Tausende, von Mitochondrien. Diese Organellen spielen nicht nur eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel, sie sind halb autonome Organellen und besitzen ihr eigenes Genom. 1963 konnte erstmals durch Nass und Nass (1963) nachgewiesen werden, dass Mitochondrien ihre eigene DNA besitzen. Durch eine Komplettssequenzierung konnte 1981 die Komplexität der mtDNA deutlich gemacht werden. Die damals entwickelte Sequenz mit einer Länge von 16.569 Nukleotiden gilt noch heute als Referenzsequenz (Anderson et al. 1981).

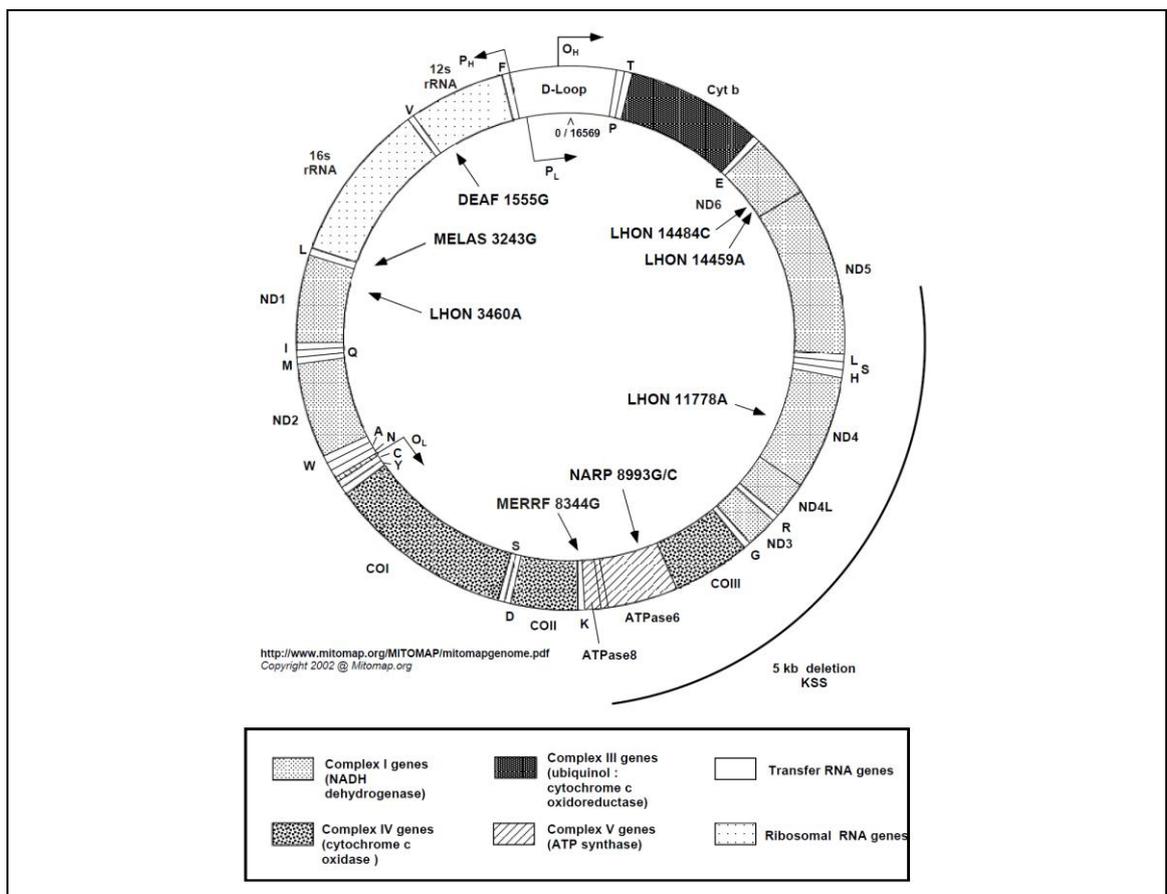


Abbildung 3: Das humane mitochondriale Genom

Quelle: MITOMAP (2012)

Das mitochondriale Genom ist ein zirkuläres doppelsträngiges Molekül. Das Ringmolekül besteht aus einem H- (*heavy*) und einem L- (*light*) Strang. Die Bezeichnung leitet sich aus der Dichtebestimmung der einzelnen Stränge ab. Die beiden komplementären Stränge bestehen aus einer unterschiedlichen Basenverteilung. Während der H-Strang einen hohen Guanin- und Thymin-Gehalt aufweist und damit eine höhere Dichte, besteht der L-Strang aus Adenin und Cytosin. Die mtDNA enthält 37 Gene, darunter die Gene für die 12S- und 16S-rRNAs, 22 tRNAs und für 13 proteinkodierende Gene. Die Gene kodieren ausschließlich für Untereinheiten der Oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS): Komplex I, III und IV der Atmungskette, sowie Untereinheiten der ATP-Synthase. Die überwiegende Anzahl der mitochondrialen Gene wird vom H-Strang kodiert (28 der 37 Gene), lediglich 9 der 37 Gene vom L-Strang (Anderson et al. 1981).

Im Vergleich zur nukleären DNA (nDNA) enthält die mitochondriale DNA kaum nicht-kodierende Bereiche und damit grenzen kodierende Sequenzen direkt aneinander (Scarpulla 2006). Nicht-kodierende Bereiche umfassen lediglich einen ca. 1000bp langen Abschnitt, die Kontrollregion, auch D-Loop (*displacement-loop*) genannt. Sie beinhaltet Transkriptionsstartsequenzen, sowie die Replikations-regulierenden Elemente (Wallace 2005). Lokalisiert ist der D-Loop zwischen nt16028 und nt577, begrenzt durch die Gene für tRNA^{Pro} und tRNA^{Phe}. Diese Kontrollregion enthält den Replikationsursprung des H-Stranges, sowie den Promotor für die Transkription des gesamten mitochondrialen Genoms, kodiert aber für keine Gene und wird aus diesem Grund auch als „nicht-kodierende-Region“ bezeichnet (Wallace 1992). Die Bezeichnung des D-Loops resultiert aus der Assoziation mit einem Loop während der Replikation des H- Stranges. Unter der Verdrängung des Original-H-Stranges bindet der neu synthetisierte 700bp große H-Strang (7S-DNA) an den L-Strang und bildet den typischen 3-strängigen D-Loop (Scarpulla 2006). Die D-Loop-Region ist in Bezug auf Größe und Basenzusammensetzung eine sehr variable Region und nimmt aus diesem Grund in der forensischen Medizin eine wichtige Position ein. Die Regionen, die die meisten Polymorphismen aufweisen sind die sogenannten hypervariablen Regionen (HVR) HVR I, HVR II und HVR III. Der in dieser Arbeit verwendete Polymorphismus C16519T befindet sich in der D-Loop-Region.

Es zeigt sich im Vergleich zur nukleären DNA in der mtDNA eine 10-fach erhöhte Mutationsrate (Neckelmann et al. 1987). Dies ist nicht nur durch die Komplexität der

mtDNA bedingt, sondern auch dadurch, dass das Mitochondrium über kein effektives Reparatursystem verfügt wie die nukleäre DNA. Auch die schützenden Histone, die die nukleäre DNA verpacken und eine Art Schutzwall bieten, sind nicht zu finden (Opdal et al. 1998). Als einziger Schutz sind im Mitochondrium Chaperone und Proteasen zu finden, die mögliche Defekte beseitigen können (Rugarli und Langer 2012). Auf diesem Wege ist die mtDNA den in der OXPHOS entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies weitestgehend ungeschützt ausgesetzt. Neu entstehende Mutationen können so eine Vielfalt aus normaler und mutierter mtDNA entstehen lassen. Die Rede ist von Heteroplasmie (Brandon et al. 2005). Fast jede Mutation hat eine Funktionseinschränkung oder einen Funktionsverlust zur Folge. Diese Funktionsverluste bzw. –einschränkungen beziehen sich im Fall des Mitochondriums auf die OXPHOS und die proteinkodierenden Gene.

1.2.4 Mitochondriopathien

Mutationen des mitochondrialen Genoms können für eine Vielzahl von Erkrankungen verantwortlich gemacht werden. 1988 wurde erstmals eine Mutation in der mitochondrialen DNA als Ursache einer menschlichen Erkrankung beschrieben. Durch molekulargenetische Analysen konnten nunmehr mehr als 100 Mutationen definiert und infolgedessen eine Reihe von schwerwiegenden Erkrankungen begründet werden. Die Forschung an der mtDNA nimmt in der Wissenschaft eine immer größer werdende Bedeutung ein (Opdal und Rognum 2010).

Pathogenetisch sind Mitochondriopathien durch ein Energiegewinnungsdefizit gekennzeichnet. Da die Kodierung mitochondrialer Enzymbestandteile sowohl nukleär als auch mitochondrial erfolgen kann, können Mitochondriopathien sowohl eine Folge von Mutationen nukleärer als auch mitochondrialer Gene sein (Hentze et al. 2000). Mitochondriale Punktmutationen nehmen Einfluss auf die Atmungskette und auch auf die ATP-Synthase. Zumeist betroffen ist das Herz oder das neuronale und muskuläre System. Eine Vielzahl von Einflussfaktoren lässt die Symptomatik der Erkrankungen sehr variabel erscheinen und erschwert eine Diagnostik (Opdal und Rognum 2010).

Eine Besonderheit der Mitochondrien zeigt sich in der maternalen Vererbung. Dieses Phänomen beruht auf der Tatsache, dass Mitochondrien des Spermiums während der

Befruchtung in der Regel nicht in die Eizelle gelangen. Aufgrund dieses maternalen Erbganges wird die Mutation, falls vorhanden, unabdingbar an Nachfolgegenerationen vererbt. Unterschiede können sich jedoch in der Expressivität und Penetranz der Mutationen zeigen. Ausschlaggebend ist hierfür, ob die Gesamtheit oder nur ein Teil der mtDNA betroffen ist (Homoplasmie vs. Heteroplasmie). Eine Mutter mit einer heteroplasmischen mtDNA-Mutation gibt an ihre Kinder einen ganz unterschiedlichen Anteil mutierter Mitochondrien weiter, eine Mutter mit homoplasmischem Genom vererbt dagegen ausschließlich mutierte Formen. Nicht nur die Quantität mutierter mtDNA spielt eine wesentliche Rolle, auch die Art des Gewebes, in dem die mutierte mtDNA zu finden ist. Durch die unterschiedliche Abhängigkeit von einer effizienten Energiegewinnung, nämlich durch die OXPHOS, zeigen sich Variationen in der klinischen Symptomatik.

Deletionen oder Duplikationen sind Ursache für charakteristische Krankheitsbilder, wie beispielsweise das Pearson-Syndrom (Erkrankungen des Knochenmarks und der Schilddrüse), das *Kearns-Sayre-Syndrom* (KSS), oder die progressive externe Ophthalmoplegie (PEO, Myopathie der äußeren Augenmuskeln). Die Ursache dieser Mitochondriopathien wird nicht durch eine, sondern durch mehrere Deletionen beschrieben. Die Ausdehnung liegt zwischen 1 und 10 bp (Ganten und Ruckpaul 2007).

Wie auch in dieser Arbeit beschrieben werden soll, liegt eine Vielzahl von Veränderungen der mtDNA in pathogenen Punktmutationen (SNPs). Viele dieser Punktmutationen konnten in den letzten Jahren erforscht werden. Im Vergleich zu sporadisch vorkommenden Deletionen lassen sich Punktmutationen durch die maternale Vererbung begründen (Ganten und Ruckpaul 2007). Das Ausmaß der Erbllichkeit hängt, wie schon erläutert, von Faktoren wie der Homoplasmie oder Heteroplasmie der Mutation ab. Die Gene der mitochondrialen tRNAs zeigen nachweislich die meiste Anzahl an Punktmutationen. Beispiel hierfür ist das MELAS-Syndrom (*mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*), mit einer Mutation im Gen für die tRNA^{Leu}. Auch Krankheitsbilder wie Diabetes mellitus, Migräne oder Myopathien (Skelett- und Herzmyopathien, oder Enzephalopathien) sind mit Punktmutationen der tRNA assoziiert.

Den Einfluss mitochondrialer Mutationen auf neurodegenerative Erkrankungen des Alters, wie der Parkinson- oder Alzheimer-Erkrankung, spaltet die Meinungen der

forensischen Forscher. Zwar konnten Defekte der Atmungskettenkomplexe I und II bei genannten Patienten nachgewiesen werden, doch ob diese Defekte ursächlich sind, ist bislang nicht eindeutig zu erklären. Mutmaßungen gehen von einem Zusammenspiel verschiedener Sequenzvarianten der mtDNA als erhöhtes Risiko neurodegenerativer Erkrankungen aus (Meissner 2007).

Eine Vielzahl von Faktoren lässt vermuten, dass die mtDNA auch eine Rolle bei SIDS-Fällen spielt. Die nachgewiesene höhere Wiederholungsrate von SIDS-Fällen in der mütterlichen gegenüber der väterlichen Vererbungslinie lässt auf einen Zusammenhang mit der mtDNA und ihrer maternalen Vererbung schließen (Beal und Blundell 1988).

Die Betrachtung einer Vielzahl von Anamnesen zeigte, dass Säuglinge, die später an SIDS verstorben sind, eine geringere Aktivität und schläfriger als andere Säuglinge waren. Eine Begründung könnte der schleichende Mangel an ATP sein, welches mitochondrial synthetisiert wird (Kahn et al. 1992; Kelmanson 1996).

1.2.5 Genetische Polymorphismen der mtDNA

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen handelt es sich um SNPs. Sie umfassen eine Punktmutation, die lediglich eine Base im Genom beeinflusst. Verändert wird die ursprüngliche Gensequenz durch einen Basenaustausch.

Die Lokalisation jedes einzelnen Gens und deren regulatorische Funktion sind genau definiert durch ihren Sequenzbeginn und ihr Sequenzende. Diese Daten werden durch die Plattform MITOMAP.ORG organisiert und fachlich aktualisiert. Bei den in dieser Arbeit betrachteten Genloci handelt es sich um die SNPs G3010A, T16519C und C7028T. Im folgenden Abschnitt werden die mitochondrialen Genloci genauer betrachtet.

Der SNP C7028T eignet sich durch seine geringe Sequenzvariabilität für genetische Studien (Camilleri et al. 2009). 7028C stellt die häufigste Haplogruppe der Mitochondrien in der europäischen Bevölkerung dar, die Haplogruppe H. Die Haplogruppe H lässt sich bei 40-50% der Europäer nachweisen. Kommt es im Falle einer Mutation zu einem Basenaustausch an Position 7028 von Cytosin zu Tyrosin, ist die Rede von der non-Haplogruppe-H (Camilleri et al. 2009). Der SNP C7028T liegt im Genabschnitt MT-COI,

welcher für eine Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase I kodiert (Anderson et al. 1981). Diese Untereinheit gehört zum Komplex IV der Atmungskette und kann durch das Auftreten einer Mutation funktionell eingeschränkt sein. Ein ATP-Mangel kann daraus resultieren und die Energiegewinnung der Zelle limitieren.

Der SNP T16519C liegt in der mitochondrialen D-Loop-Region, einem nicht-kodierenden-Bereich. Dieser Abschnitt ist für keine Kodierung bestimmter Gene zuständig, beinhaltet jedoch den Replikationsursprung für den H-Strang, sowie den Promotor für die Transkription der mtDNA (Wallace 1992). Der SNP G3010A liegt im Abschnitt MT-RNR2 des mitochondrialen Genoms und kodiert die 16sRNA (Anderson et al. 1981). Die 16sRNA ist ein großer Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit 30S der prokaryotischen Ribosomen und spielt eine wichtige Rolle in der Initiationsphase der Translation. Liegt im Falle einer Mutation ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin vor, können die mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskette in der Translation nicht mehr übersetzt werden (Camilleri et al. 2009). Auch diese Mutation hätte einen ATP-Mangel zur Folge und eine ausreichende Energieversorgung der Zellen wäre nicht mehr gewährleistet.

1.3 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit zum Thema „Genetische Polymorphismen der mtDNA als Risikofaktoren für das SIDS“ nimmt sich als Ziel, einen möglichen Zusammenhang genetischer Prädispositionen durch Polymorphismen der mtDNA mit dem Phänomen des plötzlichen Kindstodes herzustellen. Um die „Triple-Risk-Hypothese“ zu unterstreichen, werden mitochondriale Polymorphismen mit den in Abschnitt 1.1.3. (S.7) beschriebenen epidemiologischen Risikofaktoren in Verbindung gebracht. Durch die Betrachtung einer möglichen genetischen Prädisposition, exogener Stressoren und der bestehenden vulnerablen Phase, werden alle Bestandteile der „Triple-Risk-Hypothese“ integriert.

Auf Grundlage der oben erwähnten Erkenntnisse ließ sich ein Zusammenhang von SIDS und mtDNA schon in früheren Studien aufzeigen, der auf genetische Mutationen zurückzuführen ist. Das erhöhte Vorkommen von SIDS-Fällen in der mütterlichen Linie, als auch die geringe Aktivität der Säuglinge lässt auf einen Einfluss der mtDNA schließen (Boles et al. 2010; Divne et al. 2003; Opdal et al. 1998; Opdal et al. 1999; Opdal et al. 2002; Opdal und Rognum 2010).

In den Studien von Opdal und Rognum (2010) konnten höhere Punktmutationen der mtDNA bei SIDS-Fällen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Auch diese vorliegende Arbeit soll durch die Untersuchung der SNPs G3010A, T16519C und C7028T der Hypothese nachgehen, ob sich eine vermehrte Anzahl von Mutationen bei SIDS-Fällen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachweisen lassen. Als mitochondriale Referenzgrundlage dient die *Cambridge-Reference-Sequence*, mit der alle zu untersuchenden Sequenzen verglichen wurden (Anderson et al. 1981).

Zusätzlich wurde bei ausgewählten SIDS-Fällen ein Zusammenhang zwischen den mtDNA-Variationen und den bekannten epidemiologischen Faktoren, wie dem Geschlecht, dem Sterbealter und der Jahreszeit, zum jeweiligen Todeszeitpunkt hergestellt.

2 Material und Methoden

Für die notwendige Genotypisierung wurde die DNA von 175 am plötzlichen Kindstod verstorbenen Säuglingen an den mitochondrialen Genorten G3010A, T16519C und C7028T mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und dem Verdau durch Restriktionsenzyme untersucht. Dargestellt wurden die Ergebnisse anhand verschiedener Elektrophoresemethoden.

Die folgenden Abschnitte sollen einen Überblick über die verwendeten Proben und die angewandten Methoden geben. Eine ausführliche Auflistung der verwendeten Materialien, aufgeteilt nach den beiden Laborstandorten Göttingen und Hannover, ist im Anhang aufgeführt.

2.1 Probenmaterial: Die SIDS-Fälle und die Kontrollgruppe

Die für die Versuche genutzten SIDS-Proben stammen aus Obduktionen der Jahre 1989 - 2009 aus dem Institut für Rechtsmedizin der Georg-August-Universität Göttingen, sowie der Medizinischen Hochschule Hannover. Diese wurden bei bestätigter Verdachtsdiagnose des SIDS während der Obduktion entnommen und archiviert. Bei den untersuchten Proben handelt es sich um aus Blut oder Gewebe extrahierte DNA von 176 verstorbenen Säuglingen. Nach Betrachtung der Geschlechtsverteilung wurde eine möglichst angegliche Kontrollgruppe aus 113 Erwachsenen an denselben drei Genorten untersucht.

Die Kontrollgruppe bildet sich aus einer Gruppe von Menschen kaukasischer Herkunft, die die kritische Phase des plötzlichen Kindstodes überlebt haben. Selektiert wurde diese Gruppe aus vorliegenden anonymisierten Vaterschaftstests.

Von einem großen Teil der gesamten Proben lag die DNA bereits extrahiert und quantifiziert vor und konnte direkt für die Amplifikation verwendet werden. Aus einigen Blutproben wurde die DNA mit Hilfe des DNA-IQ-Systems von der Promega GmbH, Mannheim, Deutschland isoliert. Die Extraktion der DNA erfolgte nach einem Standardprotokoll des DNA-Labors des Instituts für Rechtsmedizin in Göttingen. Die Proben der Rechtsmedizin Hannover lagen bereits in einem extrahierten Zustand vor.

Klinische Daten

Bei Betrachtung der schon beschriebenen epidemiologischen Risikofaktoren lassen sich einige klassische Faktoren aufzeigen, die den plötzlichen Kindstod charakterisieren. Es wird davon ausgegangen, dass mehr Jungen als Mädchen, mit einem Verhältnis von 60:40, betroffen sind (Kleemann und Bajanowski 2004). Auch zum Todeszeitpunkt und Todesalter gibt es auffällige Daten zu nennen. So tritt das Phänomen des SIDS zumeist in den kalten Monaten von November-April auf. Eine hohe Todesrate gibt es bei Säuglingen im Alter von 2 - 4 Monaten und im 6. Lebensmonat (Mitchell et al. 1997). Diese epidemiologischen Risikofaktoren sollen in der zu Grunde liegenden Untersuchung berücksichtigt werden.

2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion zur Amplifikation der mtDNA-Sequenzen

Eine Grundlage der medizinischen und biologischen Forschung ist der Nachweis von kleinsten Mengen genetischen Materials (Linz und Degenhardt 1990). 1985 entwickelte Kary Mullis die PCR, um definierte DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Inzwischen ist die PCR eine molekularbiologische Standardmethode, ohne die die forensische Medizin nicht auf dem heutigen Stand wäre.

Als Ausgangslage dient der PCR ein Stück doppelsträngige DNA, welches die gesuchte Sequenz enthält. Der vorliegende Doppelstrang wird durch thermische Denaturierung in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Zwei Oligonukleotide, die als Primer der DNA-Synthese dienen, liegen in einem komplementären Zustand zu jeweils einem der beiden Einzelstränge vor. Es handelt bei den Primern um 20-30bp große einzelsträngige DNA-Moleküle, die die zu amplifizierende DNA einrahmen und mit ihr hybridisieren. Ausgehend von jedem der beiden Primer wird durch die DNA-Polymerase ein DNA-Strang in 5'-3'-Richtung neusynthetisiert. Das Vorhandensein von Desoxyribonucleotid-Triphosphaten (dNTPs) der vier Basen (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) ist für die Neusynthese der DNA-Stränge unerlässlich. Durch das mehrfache Wiederholen der Denaturierung, Hybridisierung und der DNA-Synthese ist eine Vermehrung der DNA-Sequenz möglich. Mit jedem durchlaufenden Zyklus wird eine Verdopplung der DNA-Moleküle ermöglicht.

Die einzelnen Schritte und die grobe Ablaufschematik der PCR sind in den Tabellen auf den nachfolgenden Seiten aufgeführt. Charakteristisch ist die unterschiedliche Temperatur der einzelnen Reaktionen. Die Trennung des Doppelstranges erfolgt unter der Erhitzung des Stranges auf 90 Grad. Durch die nachfolgende Abkühlung auf 50 Grad wird die Hybridisierung der Primer mit den komplementären DNA-Sequenzen gewährleistet. Für die Verlängerung der DNA wird seit 1988 die hitzestabile Taq-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wird, verwendet (Linz und Degenhardt 1990).

Primersequenzen

Für die Untersuchung der mtDNA-Variationen wurden die Primer von Camilleri et al. (2009) übernommen. Die Konzentration der Primer betrug 0,1 nmol/ μ l und wurde nach einer 1:10 Verdünnung für die PCR-Reaktion verwendet.

Primersequenzen			
Name	Primer-Sequenz	Genomposition	Fragmentlänge
G3010A	Forward: 5'CATGCTAAGACTTCACCA3' Reverse: 5'TCGTTGAACAAACGAACC3'	2852 bis 3048	196bp
T16519C	Forward: 5'GGATGACCCCCTCAGATA3' Reverse: 5'CTTATTTAAGGGGAACGTG3'	16369 bis 16558	189bp
C7028T	Forward: 5'TTTCGGTCACCCTGAAGTTTA3' Reverse: 5'AGCGAAGGCTTCTCAAATCAT3'	6613 bis 7734	720bp

Tabelle 4: Primersequenzen der SNPs G3010A, T16519C und C7028T

PCR-Amplifikation

Als Vorbereitung der PCR-Durchführung wurden die verwendeten Materialien 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Im akkreditierten Labor der Medizinischen Hochschule Hannover wurde die Amplifikation im eigens dafür vorgesehenen PCR-Labor durchgeführt.

Für jeden Ansatz der PCR wurde ein Mastermix erstellt. In dem jeweiligen *Tube* wurden 11,5 μ l Mastermix und 1 μ l mtDNA pipettiert. Bei allen Reaktionsansätzen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die anstelle der DNA-Template reines Wasser enthielt. Kontaminationen konnten auf diese Weise erkannt werden.

PCR-Parameter

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Singleplex-PCR mit optimierten PCR-Parametern nach Linz und Degenhardt (1990) durchgeführt.

Aufgrund der experimentellen Arbeit in den Laboren der Universität Göttingen und der Medizinischen Hochschule Hannover, sowie der darauf resultierenden Verwendung anderer Geräte und Reagenzien, mussten die verwendeten Reaktionsparameter modifiziert werden. Für jeden Reaktionsansatz wurde die Konzentration von $MgCl_2$, den dNTPs und den verwendeten Primern optimiert. Die Zyklenzahl wurde so gewählt, dass eine hohe Ausbeute erzielt, aber zugleich eine geringe Fehlhybridisierungsrate erreicht wurde. Nach einigen Modifikationen stellten sich die folgenden aufgeführten Parameter als optimal dar.

PCR-Ansatz für den Primer G3010A	
H ₂ O	7,65 µl
10xPCR Puffer II	1,25 µl
MgCl ₂	1 µl
dNTPs	0,5 µl
Primer G3010A_f	0,5 µl
Primer G3010A_r	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
Template	1 µl
Gesamtvolumen	12,5 µl

Tabelle 5: PCR-Ansatz für den Primer G3010A

PCR-Programm Primer G3010A			
Zyklus	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initial	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	1 min	35
Annealing	52°C	1 min	
Elongation	70°C	2 min	
Finale Elongation	70°C	10 min	1
Cooling	4°C	∞	∞

Tabelle 6: Amplifizierungsprogramm für den Primer G3010A

PCR-Ansatz für den Primer T16519C	
H ₂ O	7,65µl
10xPCR Puffer II	1,25µl
MgCl ₂	1µl
dNTPs	0,5µl
Primer G3010A_f	0,5µl
Primer G3010A_r	0,5µl
Taq Polymerase	0,1µl
Template	1µl
Gesamtvolumen	12,5µl

Tabelle 7: PCR-Ansatz für den Primer T16519C

PCR-Programm für den Primer T16519C			
Zyklus	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initial	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	1 min	35
Annealing	56°C	1 min	
Elongation	70°C	2 min	
Finale Elongation	70°C	10 min	1
Cooling	4°C	∞	∞

Tabelle 8: Amplifizierungsprogramm für den Primer T16519C

Der PCR-Ansatz mit der bei den übrigen Primern verwendeten Taq-Polymerase brachte bei dem Primer C7028T keinen Amplifikationserfolg. Nach mehreren Polymerase-Ansätzen erwies sich der Multiplex-Mix am effektivsten.

PCR-Multiplex-Ansatz für den Primer C7028T	
H ₂ O	2,95 µl
Primer 7028_f	0,04 µl
Primer 7028_r	0,04 µl
Multiplex-Mix	4,18 µl
Template	1 µl
Gesamtvolumen	8,17 µl

Tabelle 9: PCR-Ansatz für den Primer C7028T

PCR-Programm für den Primer C7028T			
Zyklus	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initial	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	1 min	38
Annealing	57°C	1 min	
Elongation	70°C	1,5 min	
Finale Elongation	70°C	10 min	1
Cooling	4°C	∞	∞

Tabelle 10: Amplifizierungsprogramm für den Primer *C7028T*

2.3 RFLP-Analyse zum Schneiden der mtDNA-Fragmente mit Restriktionsenzymen

Zur Genotypisierung der vorliegenden genetischen Polymorphismen wurden die Amplifikate mit Restriktionsenzymen verdaut. In der molekularbiologischen Forschung wird dieses Verfahren RFLP-Analyse (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) genannt. Bei den verwendeten Restriktionsenzymen handelt es sich um Endonukleasen, die die Eigenschaft besitzen, hinter spezifischen Basensequenzen die DNA-Stränge zu schneiden. Kommt es zu einem Basenaustausch in der vorliegenden Sequenz, ist auch das Schnittmuster der Enzyme verändert. Durch eine Mutation kann beispielsweise eine zusätzliche Schnittstelle entstehen oder eine vorhandene Schnittstelle entfallen. Auf diese Weise ist eine Typisierung der SNPs durchführbar.

G3010A

Das 196bp (Position 2852 bis Position 3048) große Amplifikat des Primers G3010A wird mit Hilfe des Enzyms BCC I verdaut. Diese Endonuklease aus dem Bakterium *Bacillus fusiformis* schneidet den Doppelstrang an Position 3005, wenn der Wildtyp ausgeprägt ist. Auf diese Weise entstehen zwei unterschiedliche Fragmente mit einer Größe von 153bp und 43bp. Befindet sich an Position 3010 der mtDNA anstelle von Guanin die Base Adenin, findet kein Restriktionsverdau statt. In der Gelelektrophorese wird, auch nach durchgeführtem Restriktionsverdau, nur eine Bande von 196bp sichtbar und entspricht dem Fragment des PCR-Amplifikats.

```

2821 cctcggagca gaaccaacc tccgagcagt acatgctaag acttcaccag tcaaagcgaa
2881 ctactatact caattgatcc aataacttga ccaacggaac aagttaccct aggataaca
2941 gcgcaatcct attctagagt ccatatcaac aatagggttt acgacctcga tgttgatca
3001 ggacatcccgatggtgcagc cgctattaa ggttcgtttg ttcaacgatt aaagtcctac

```

Abbildung 4: Darstellung des SNPs G3010A in der mtDNA

Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des Primers G3010A	
H ₂ O	1,5µl
NEBuffer I	1,5 µl
BSA	1,5 µl
BCC I	0,5 µl
PCR-Amplifikat	10 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Tabelle 11: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des Primers G3010A

Das Gesamtvolumen von 15µl wurde mit dem Restriktionsenzym BCCI für 160 Minuten bei 37°C und 20 Minuten bei 65°C verdaut.

T16519C

Zur Genotypisierung des T→C-SNP des Primers 16519 wird das Amplifikat mit dem Restriktionsenzym HAE III verdaut. Das Enzym aus dem Bakterium *Haemophilus aegypticus* schneidet das 189bp (Position 16369 bis Position 16558) große Amplifikat bei vorliegender Base T an Position 16457. Durch diese Schnittstelle entstehen 2 Fragmente mit einer Größe von 88bp und 101bp. Liegt eine Genvariation an Position 16519 vor, die die Base Thymin in Cytosin tauscht, entsteht eine zusätzliche Schnittstelle. Folglich entstehen drei Fragmente mit einer Größe von 88bp, 61bp und 40bp.

```

16321 catttaccgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtcccatgg atgaccccc
16381 tcagataggg gtccttgac caccatcctc cgtgaaatca atatcccgca caagagtgct
16441 actctcctcg ctccgggcc ataacacttg gggtagcta aagtgaactg tatccgacat
16501 ctggttctta cttcagggtc ataaagccta aatagccca acgttcccct taaataagac

```

Abbildung 5: Darstellung des SNPs T16519C in der mtDNA

Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des Primers T16519C	
H ₂ O	2,9 µl
NEBuffer IV	2 µl
HAE III	0,1 µl I
PCR-Amplifikat	15 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 12: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des Primers T16519C

Das Gesamtvolumen von 20µl wurde mit dem Restriktionsenzym HAE III für 120 Minuten bei 37°C und 20min bei 80°C verdaut.

C7028T

Das 720bp (Position 6613 - Position 7734) große, unmutierte Amplifikat des Primers C7028T weist durch den Verdau mit Restriktionsenzym ALU I, aus dem Bakterium *Artrobacter luteus*, drei Schnittstellen auf. Das Enzym schneidet an Position 6729, 6868 und 7056. In der Elektrophorese sind schließlich vier Fragmente mit einer Größe von 116bp, 139bp, 188bp und 278bp vorhanden. Bei vorliegender Mutation an Position 7028 in der Cytosin gegen Tyrosin getauscht wird, entsteht eine weitere Schnittstelle. Nachweisen lassen sich fünf verschieden große Fragmente mit einer Größe von 30bp, 116bp, 139bp, 158bp und 278bp.

```

6601 acctattctg atttttcggt caccctgaag ttatattct taccctacca ggcttcggaa
6661 taatctcca tattgtaact tactactccg gaaaaaaga accatttga tacatagga
6721 tggctcagc tatgatata attggcttcc tagggtttat cgtgtgagca caccatatat
6781 ttacagtagg aatagacgta gacacacgag catatttcac ctccgctacc ataatcatcg
6841 ctatccccac cggcgtcaaa gtatttagct gactcgccac actccacgga agcaatatga
6901 aatgatctgc tgcagtctc tgagccctag gattcatctt tctttcacc gtaggtggcc
6961 tgactggcat tgtattagca aactcatcac tagacatcgt actacacgac acgtactacg
7021 tttagccca cttcactat gtctatcaa taggagctgt attgcatc ataggaggct
7081 tcattcactg attccccta ttctcaggct acaccctaga ccaaactac gccaaaatcc
7141 atttcactat catattcatc ggcgtaaadc taactttctt ccacaacac tttctcggcc
7201 tatccggaat gccccgacgt tactcggact accccgatgc atacaccaca tgaaacatcc
7261 tatcatctgt aggctcattc atttctctaa cagcagtaat attaataatt ttcatgattt
7321 gagaagcctt cgcttcgaag cgaaaagtcc taatagtaga agaaccctcc ataaactgg

```

Abbildung 6: Darstellung des SNPs C7028T in der mtDNA

Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des Primers C7028T	
H ₂ O	3,5 µl
NEBuffer IV	1 µl
Alu I	0,5 µl
PCR-Amplifikat	5 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Tabelle 13: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau des Primers C7028T

Das Gesamtvolumen von 10µl wurde mit dem Restriktionsenzym ALU I für 120 Minuten bei 37°C und 20 Minuten bei 65°C verdaut.

2.4 Fragmentlängenuntersuchung mittels Elektrophorese

Durch die Anwendung einer Gelelektrophorese ist die Auftrennung von DNA-Fragmenten hinsichtlich ihrer Größe möglich. Das Prinzip dieser Methode besteht aus der Negativität der Nukleinsäure. Die Erzeugung eines elektrischen Feldes lässt die negativ geladenen Fragmente durch die Gelmatrix zu der positiv geladenen Anode wandern. Die kleineren Moleküle legen in gleicher Zeit im Verhältnis zu größeren Molekülen eine weitere Strecke zurück, da weniger Kollisionen mit der Matrix entstehen (Martin 1996).

Die Fragmentlängenuntersuchung des PCR-Produktes und der Restriktionsverdau der zu untersuchenden Proben wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese und der Kapillargelelektrophorese der Firma QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland durchgeführt.

Kapillargelelektrophorese

Die Kapillargelelektrophorese wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl für die Analyse der PCR-Fragmente als auch für den Restriktionsverdau angewendet.

Das QIAxcel-System, mit dem zugehörigen *QIAxcel DNA Screening Kit* der Firma QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland, bietet eine schnelle Fragmentlängenanalyse mittels einer Kapillargelelektrophorese. Die Auftrennung erfolgt in einer ethidiumbromidhaltigen Gelkartusche. Das QIAxcel-System ist in der Lage, ein Fluoreszenzsignal der wandernden DNA-Moleküle zu messen, an die integrierte *BioCalculator-Software* weiterzugeben und diese in elektronische Daten umzuwandeln. Diese Daten werden als Elektropherogramme sowie als Gelbild gespeichert. Durch die einmalige Anwendung eines *QX DNA Size Marker*, der den Referenzwert darstellt, ist es dem *BioCalculator* möglich, die gemessenen DNA-Größen mit diesem zu vergleichen und zu analysieren. Die Kapillargelelektrophorese macht eine Analyse von 96 Proben in 120 Minuten möglich.

Agarosegelelektrophorese

Zur Durchführung der Agarosegelelektrophorese wurde ein 5x-TBE-Puffer hergestellt:

5x-TBE-Puffer Herstellung	
Tris	108 g
Borsäure	95 g
0,5M EDTA, pH 8	40 ml
Entionisiertes Wasser	aufgefüllt auf 2000 ml Endvolumen

Tabelle 14: Anleitung der 5x-TBE-Puffer Herstellung

Die Agarosegelelektrophorese wurde sowohl zur PCR-Fragment-Analyse, als auch zur Analyse des Restriktionsverdau eingesetzt. Durch die Größenvariationen der DNA-Fragmente eignet sich ein Gel mit einer 2%-Agarosekonzentration. Zur Herstellung wurden 1,2g Agarose in 60ml TBE-Puffer gelöst und auf einer Heizplatte zum Sieden gebracht. Nach Abkühlung der Agaroselösung wurden 3µl Gelstain hinzugegeben. Gelstain entspricht bezüglich der Funktion dem Farbstoff Ethidiumbromid. Im interkalierten Zustand kann der Farbstoff UV-Licht absorbieren und diese Energie wieder abgeben (Martin 1996). Das Agarosegel wird in eine Gelkammer gegossen und 30 Minuten bei Raumtemperatur ausgehärtet. Die entstandenen Geltaschen werden mit 10µl des DNA-Ansatzes bzw. mit dem Restriktionsverdau und 2µl Bromophenol Blue Loading Solution beladen. In die erste Geltasche wurde ein 100bp Marker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland, Gene Ruler BMA 100bp) als Größenstandard aufgetragen. Die DNA-Moleküle wurden für 60 Minuten bei 120V aufgetrennt und abschließend unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht.

2.5 Statistik

Für die statistische Auswertung der vorliegenden Proben wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt. Diese statistische Methode macht es möglich, die Häufigkeiten der verschiedenen Gen-Variationen zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe zu berechnen. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit der Software Microsoft Office Excel 2007.

3 Betrachtung der Ergebnisse

3.1 Epidemiologie und Verteilung der Risikofaktoren

Die 176 untersuchten SIDS-Fälle wiesen ein prozentuales Verhältnis von 59% (n=104) zu 41% (n=72) zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht auf.

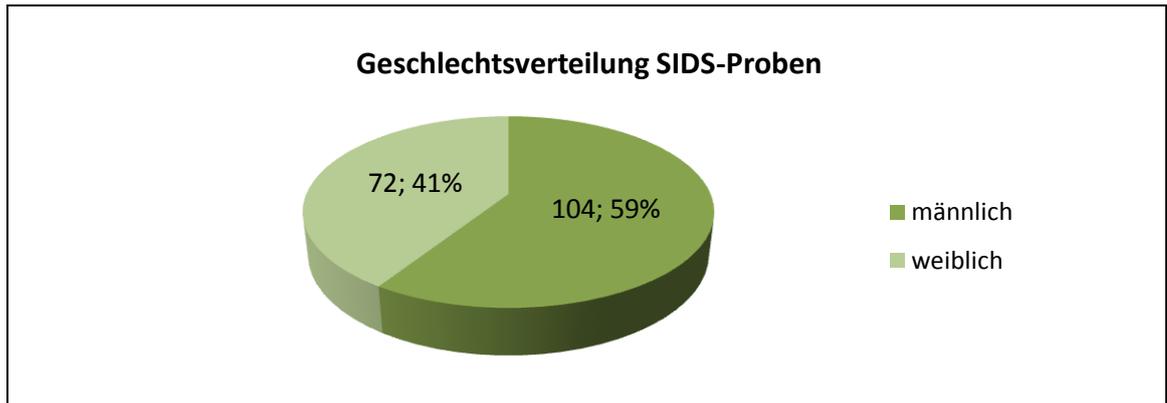


Abbildung 7: Geschlechtsverteilung der untersuchten SIDS-Proben (n=176)

Die Betrachtung der Sterbemonate und des Sterbealters war aufgrund der Datenlage nur für eine geringe Anzahl von SIDS-Fällen (n=42) möglich. 18 der 42 SIDS-Fälle verstarben während der Monate Februar-April. Die übrigen Säuglinge starben gleichmäßig verteilt in den Monaten Mai-Januar.

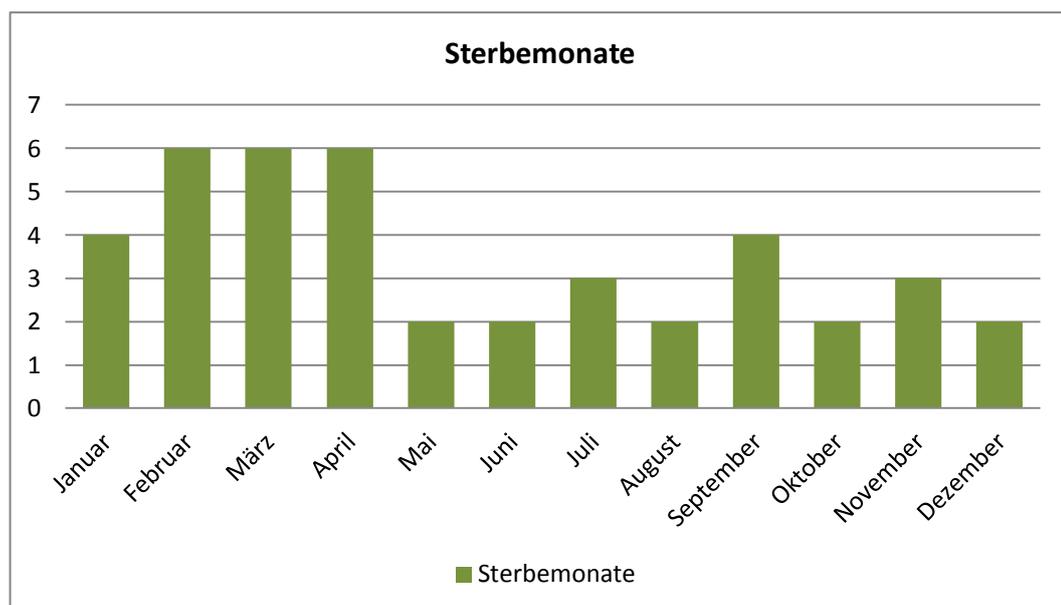


Abbildung 8: Jahreszeitliche Verteilung der Göttinger SIDS-Fälle (n=42)

Der Eintritt des SIDS lässt sich gehäuft innerhalb der ersten 6 Lebensmonate nachweisen. Während die Todesfälle innerhalb des ersten Monats relativ gering sind, kommt es zu einem großen Anstieg im zweiten Lebensmonat. Die meisten Todesfälle treten zwischen dem 2. und 4. Monat ein. Diese Verteilung lässt sich durch Angaben in der Literatur bestätigen (Mitchell et al. 1997).

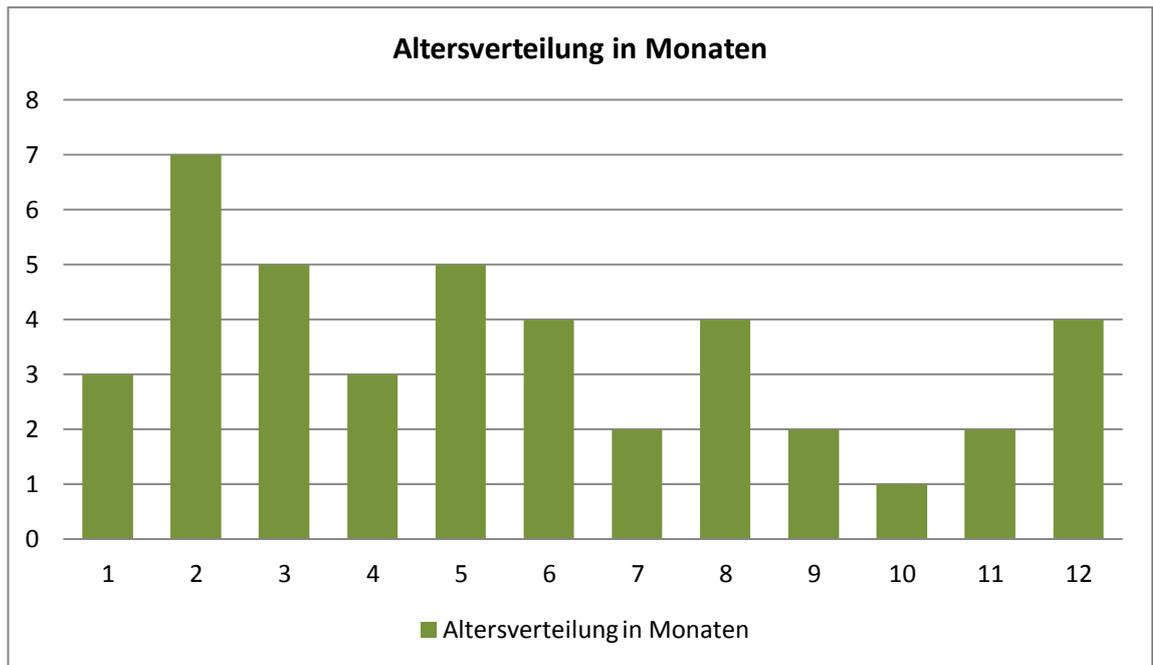


Abbildung 9: Altersverteilung der Göttinger SIDS-Fälle (n=42)

3.2 Analyse der Genotypenverteilung der mitochondrialen Polymorphismen

176 SIDS-Fälle und 113 Kontrollen wurden bezüglich der Genotypisierung der mitochondrialen SNPs G3010A, T16519C und C7028T untersucht. Das jeweilige Amplifikationsprodukt wurde durch die Restriktionsendonukleasen BCC I, HAE III oder ALU I verdaut, um den möglichen Basenaustausch nachzuweisen. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die Ergebnisse der Amplifikation und des Restriktionsverdaus für die SNPs T16519C und G3010A.

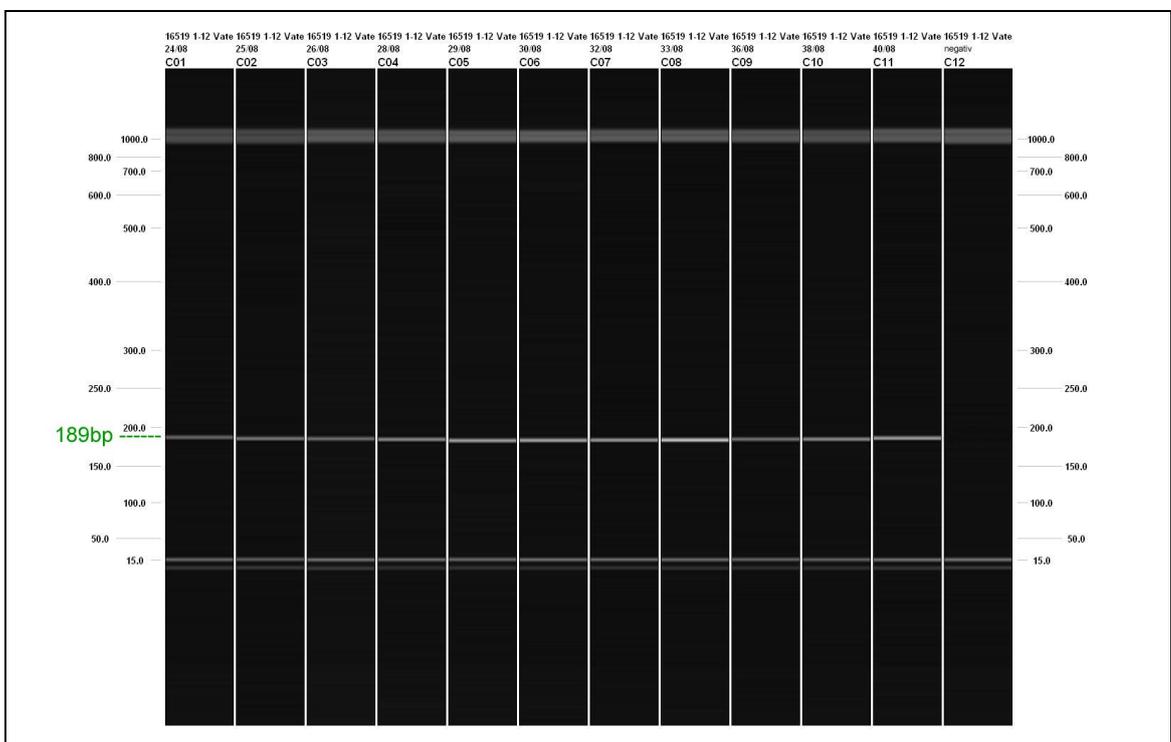


Abbildung 10: Amplifikationserfolg des SNPs T16519C

Es entstehen Fragmente mit einer Größe von 189bp. Ausgewertet wurden die Daten mit dem QIAxcel-System der Firma Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

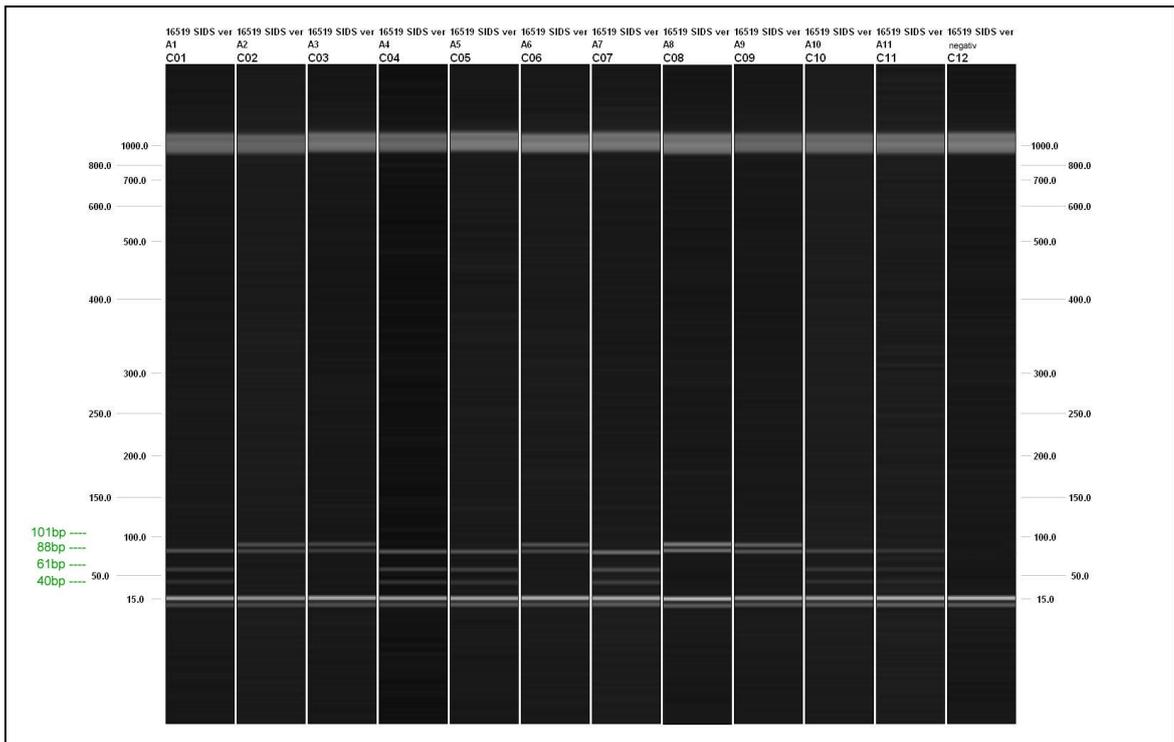


Abbildung 11: RFLP-Ergebnisse des SNPs T16519C

Deutlich zu unterscheiden sind die verschiedenen entstandenen Fragmente. Bei Vorliegen von T16519 sind 2 Fragmente mit einer Größe von 101bp und 88bp zu erkennen. Beim Vorliegen eines Basenaustausches zu 16519C sind drei Fragmente mit einer Größe von 88bp, 61bp und 40bp nachzuweisen

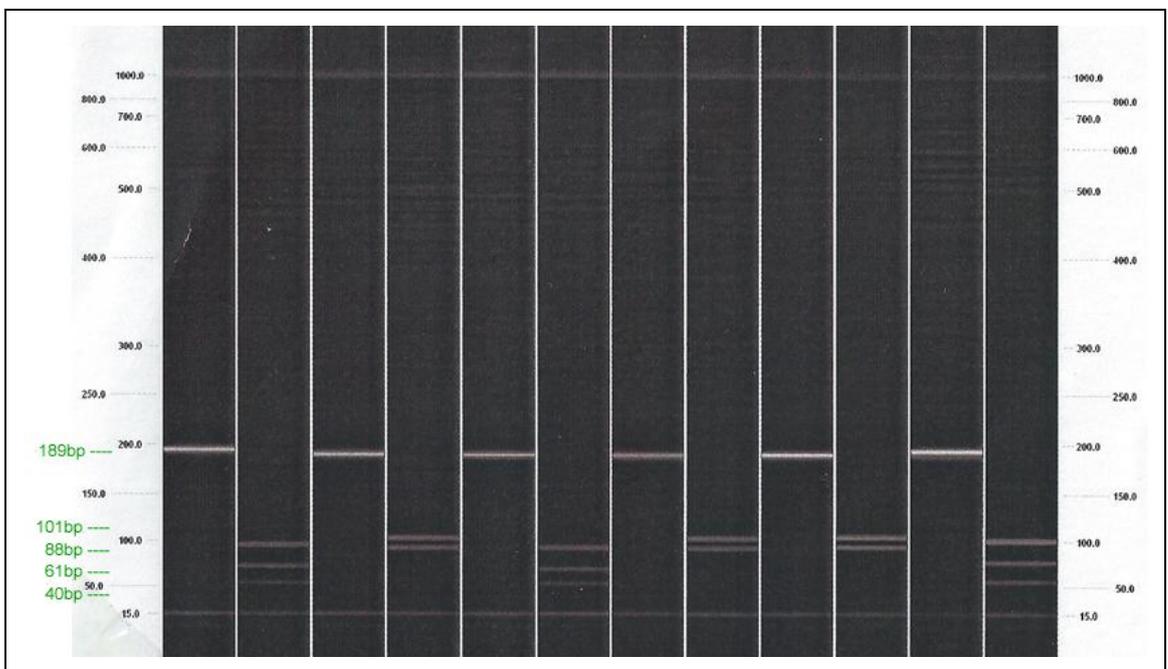


Abbildung 12: PCR- und RFLP-Ergebnisse des T16519C-Polymorphismus

Die 2. Spalte zeigt das Vorkommen eines Basenaustausches zu 16519C. Die 4. Spalte zeigt die nach der Cambridge-Referenz-Sequenz angegebene T16519-Verteilung.

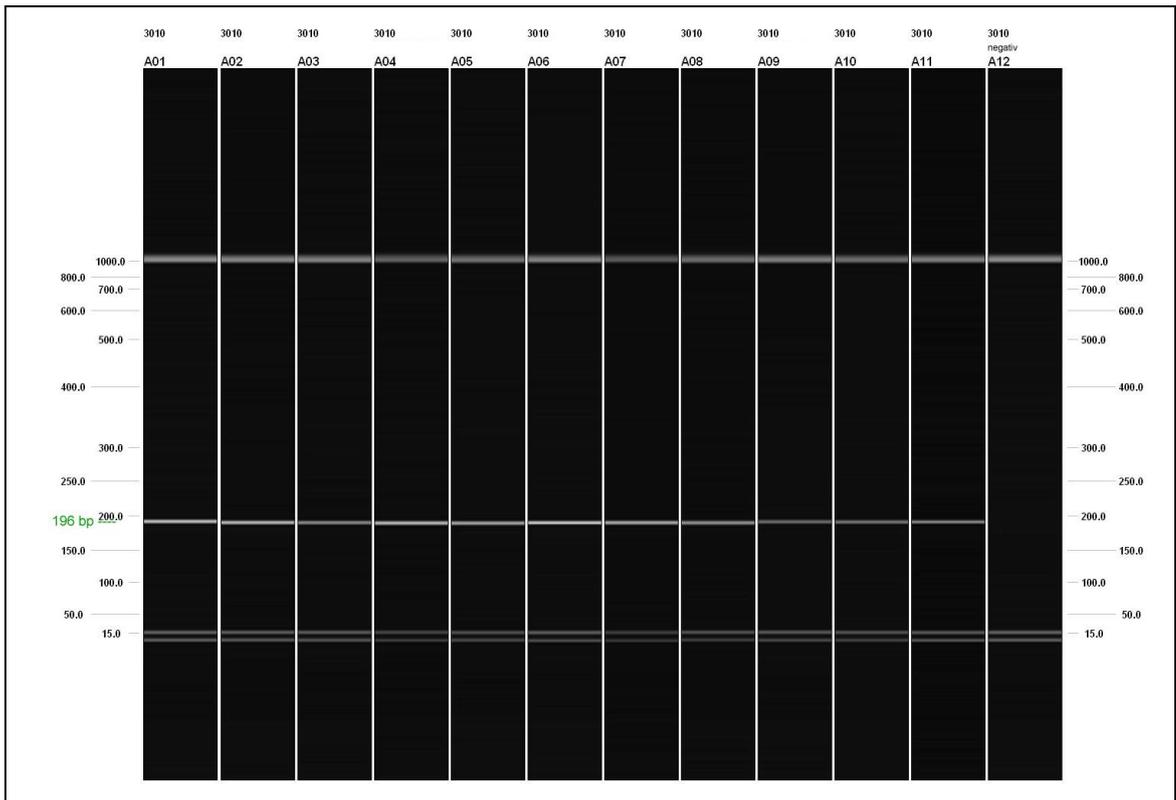


Abbildung 13: Amplifikationserfolge G3010A

Das Amplifikat des SNPs G3010A liegt mit einer Größe von 196bp vor.

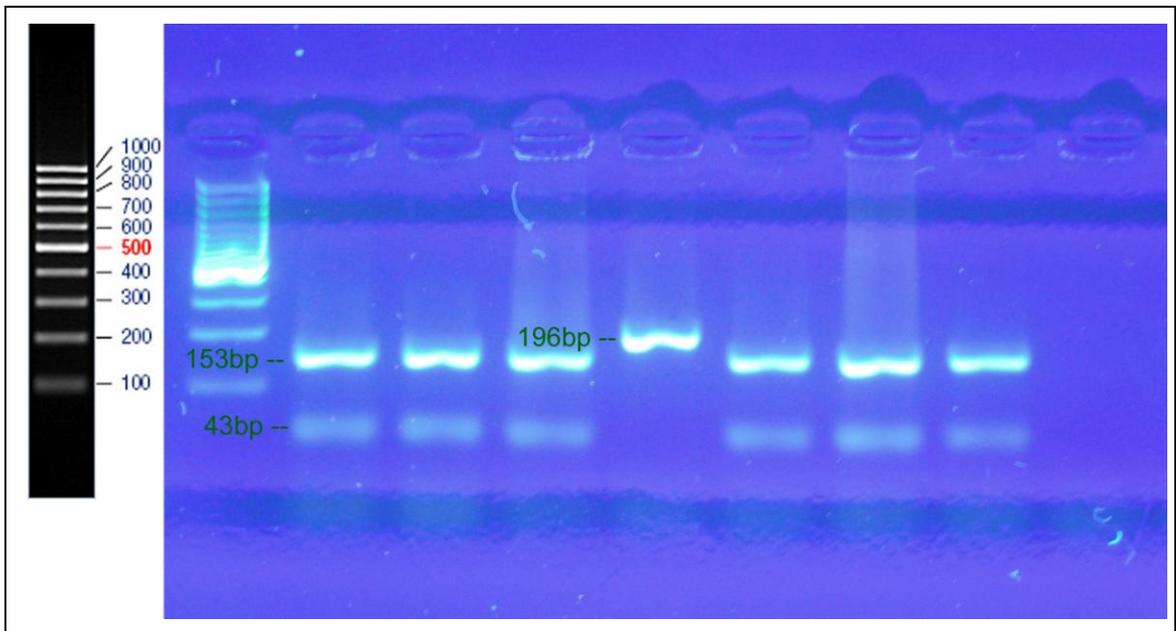


Abbildung 14: RFLP-Ergebnisse G3010A (Gelelektrophorese)

Deutlich zu unterscheiden sind die verschiedenen entstandenen Fragmente. Bei Vorliegen von G3010A sind 2 Fragmente mit einer Größe von 153bp und 43bp zu erkennen. Beim Vorliegen eines Basenaustausches zu 3010A bleibt das Amplifikat ungeschnitten mit einer Größe von 196bp.

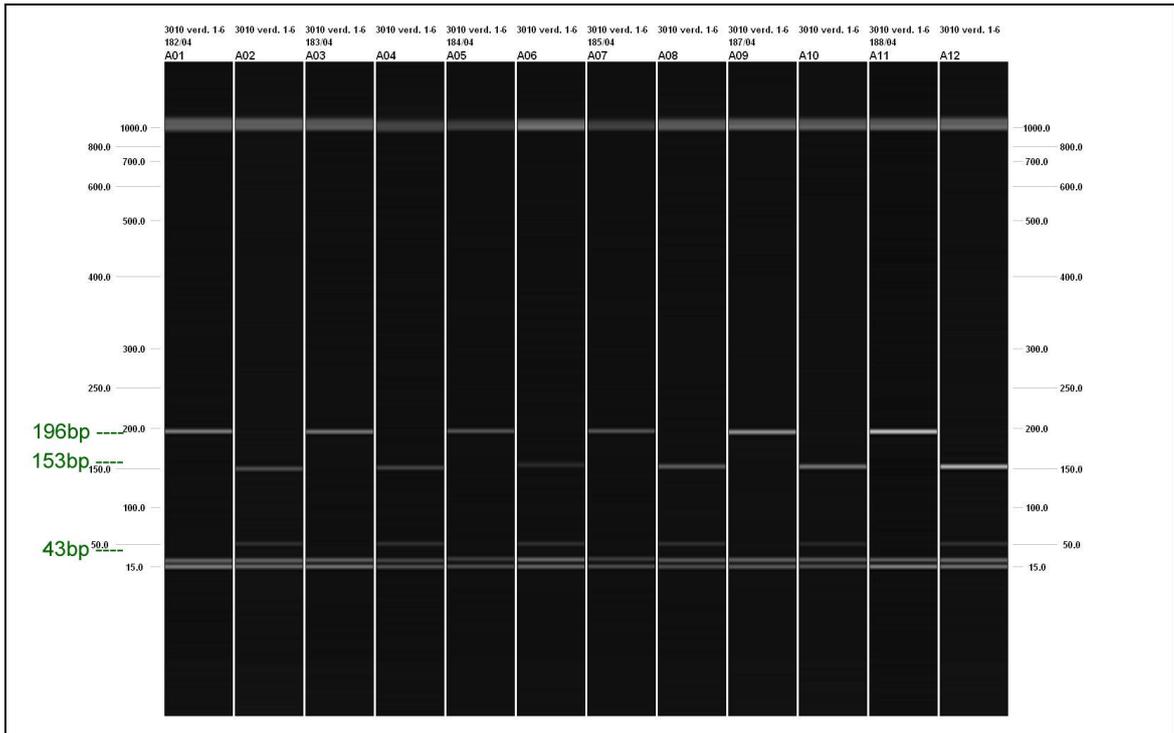


Abbildung 15: RFLP- und PCR-Ergebnisse G3010A

Gegenüberstellung der Amplifikate und ihrer passenden RFLP-Ergebnissen. Alle Proben weisen einen G3010-Polymorphismus auf.

Ausgewertet wurden die 176 SIDS-Fälle und die 113 Kontrollen in Bezug auf die Genotypverteilung und die Frage, ob eine gehäufte Anzahl von Mutationen bei SIDS-Fällen nachgewiesen werden kann. Die mitochondrialen Sequenzen wurden mit der Cambridge-Referenz-Sequenz verglichen (Anderson et al. 1981). Abweichungen wurden als Mutation betrachtet. Folgende Genotypverteilung konnte festgehalten werden:

Genotyp	SIDS (n=176)		Kontrolle (n=113)	
G3010A				
G	110	62,50%	82	72,57%
A	66	37,50%	31	27,43%
C7028T				
C	62	35,23%	57	50,44%
T	114	64,77%	56	49,56%
T16519C				
T	48	27,27%	24	21,24%
C	128	72,73%	89	78,76%

Tabelle 15: Genotypverteilung der mitochondrialen Polymorphismen bei SIDS-Fällen und Kontrollen

In der folgenden Abbildung sind die prozentualen Daten noch einmal graphisch dargestellt.

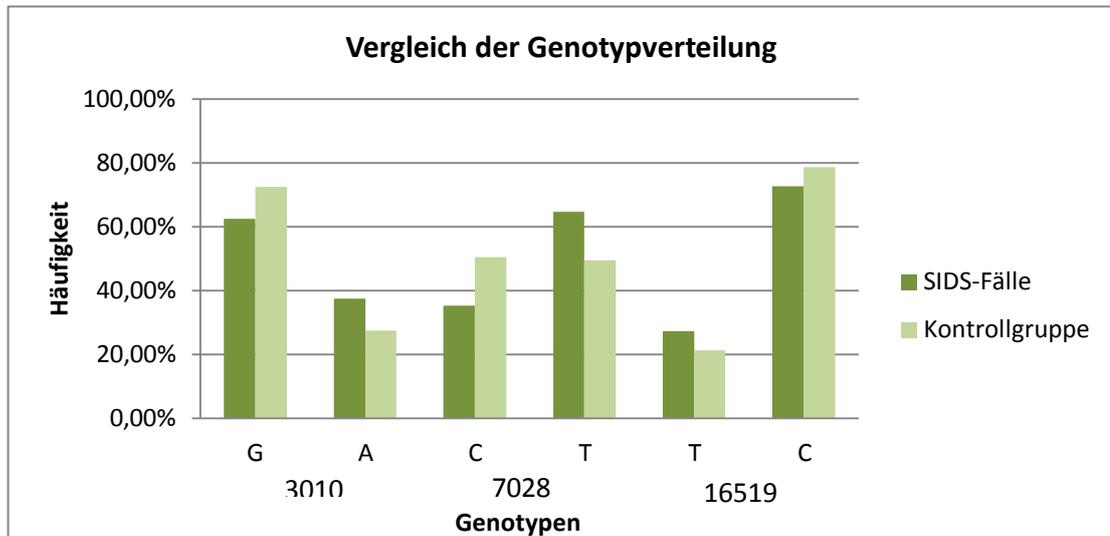


Abbildung 16: Mitochondriale Polymorphismen der SIDS-Fälle und der Kontrollgruppe hinsichtlich der Genotypverteilung

Bei Betrachtung des SNP G3010A zeigen 66 der 176 untersuchten SIDS-Fälle einen Basenaustausch von G>A, was einem Prozentsatz von 37,5% entspricht. Innerhalb der Kontrollgruppe lässt sich bei 27,43% (n=31) ein Basenaustausch von G>A nachweisen. Sowohl die SIDS-Fälle mit 63,5%, als auch die Kontrollen mit 72,57% zeigen keine Diskrepanz bezüglich der Mutationsrate auf. Die Mutation im SNP T16519C lässt sich bei 128 der 176 SIDS-Fälle nachweisen (72,73%). Innerhalb der Kontrollgruppe konnten bei 78,76% ein G>A Basenaustausch aufgezeigt werden. Die Ursprungssequenz konnte bei 27,72% (n=48) im Vergleich zu 21,24% (n=24) der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Im SNP C7028T ließ sich bei den untersuchten SIDS-Fällen eine höhere Mutationsrate von 64,77% im Vergleich zu 49,56% bei der Kontrollgruppe nachweisen. Dieses Ergebnis konnte in der Verifizierung mit der SNaPshot-Methode nicht bestätigt werden und wird, in über die Dissertation hinausgehende weitere experimentelle Untersuchungen, erneut überprüft.

Bei Betrachtung der einzelnen SNPs konnte kein erhöhtes Mutationsvorkommen bei SIDS-Fällen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

3.3 Kombination der mitochondrialen Polymorphismen

Auf methodischer Grundlage der Studie von Camilleri et al. (2009) wurden die Genotypen der mitochondrialen Polymorphismen in Kombination betrachtet, um das mögliche Vorkommen mehrerer Mutationen in einem Individuum nachzuweisen. Die Haplogruppe H (7028C) und die Non-Haplogruppe H (7028T) wurden mit allen möglichen Basenvariationen kombiniert. Folgende Ergebnisse können festgehalten werden:

7028	n / %		SIDS-Fälle		Kontrollgruppe	
non-Haplo H (T) Ko	114	CG	48	42,11%	42	75,00%
	64,77%	CA	32	28,07%	4	7,14%
	56	TA	14	12,28%	10	17,86%
	49,56%	TG	20	17,54%	0	0,00%
Haplo H (C) Ko	62	CG	30	48,39%	39	68,42%
	35,23%	CA	18	29,03%	4	7,02%
	57	TA	2	3,23%	13	22,81%
	50,44%	TG	12	19,35%	1	1,75%
Zusammen	176	CG	78	44,32%	81	71,68%
		CA	50	28,41%	8	7,08%
		TA	16	9,09%	23	20,35%
		TG	32	18,18%	1	0,88%

Tabelle 16: Kombination der mitochondrialen Polymorphismen der SIDS-Fälle und Kontrollen

Betrachtet man die Kombination von 7028T, 16519C und 3010A, lässt sich ein prozentuales Vorkommen von 28,07% bei den SIDS-Fällen im Vergleich zu 7,14% in der Kontrollgruppe nachweisen. Die Kombination von 7028C, 16519C und 3010A zeigt ebenfalls ein gehäuftes Vorkommen von 29,03% im Vergleich zu 7,02% in der Kontrollgruppe. Dies lässt darauf schließen, dass Abweichungen von der Cambridge-Referenzsequenz im SNP G3010A und T16519C bei SIDS-Fällen statistisch häufiger vorkommen als in der Kontrollgruppe. Ob eine Mutation im SNP C7028T vorliegt, ist für das Ergebnis nicht entscheidend und zeigt keine ausschlaggebende Relevanz.

Die Kombination der SNPs G3010A und T16519C wird in der folgenden Tabelle näher betrachtet:

Zusammenhang T16519C / G3010A					
16519	3010	SIDS		Kontrollen	
T	G	32	66,67%	4,17%	1
	A	16	33,33%	95,83%	23
C	G	78	60,94%	91,01%	81
	A	50	39,06%	8,99%	8

Tabelle 17: Kombination der mitochondrialen Polymorphismen T16519C und G3010A

	G	A	gesamt	Freq
SIDS	78	50	128	0,609375
Kontrolle	81	8	89	0,91011236
gesamt	159	58	217	
$\chi^2=$		24,2442837 signifikant		
$\alpha=$		0,01		

Tabelle 18: Chi-Quadrat-Test der Polymorphismus-Kombination der SNPs T16519C und G3010A

Es konnte ein signifikanter Unterschied ($\chi^2 = 24,24$; $\alpha = 0,01$) in der Kombination einer Mutation der D-Loop-Region 16519C und einer des kodierenden Bereiches 3010A festgestellt werden, wie es schon in vorherigen Studien nachgewiesen werden konnte (Opdal et al. 1998; Opdal et al. 1999; Opdal et al. 2002). 39,06% (n=50) tragen die Mutationen 3010A und 16519C im Vergleich zu 8,99% (n=8) in der Kontrollgruppe. Eine weitere Assoziation zwischen den Kombinationen der mitochondrialen Polymorphismen und dem SIDS konnte nicht nachgewiesen werden.

3.4 Mitochondriale Polymorphismen und epidemiologische Risikofaktoren für das SIDS

Die Kombination der Polymorphismen 3010A und 16519C wurde hinsichtlich ihrer epidemiologischen Risikofaktoren betrachtet. 39,06% (n=50) der SIDS-Fälle weisen die genotypische Kombination aus 3010A und 16519C auf und wurden hinsichtlich ihrer Geschlechtsverteilung betrachtet. 32 der 50 SIDS-Fälle als Träger der beiden Mutationen sind männlichen Geschlechts (64%). 18 der 50 SIDS-Fälle und Träger der beiden Mutationen sind weiblich (36%). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen dem erhöhten Vorkommen der Mutationen im männlichen Geschlecht und der Tatsache, dass Jungen häufiger am SIDS versterben als Mädchen.

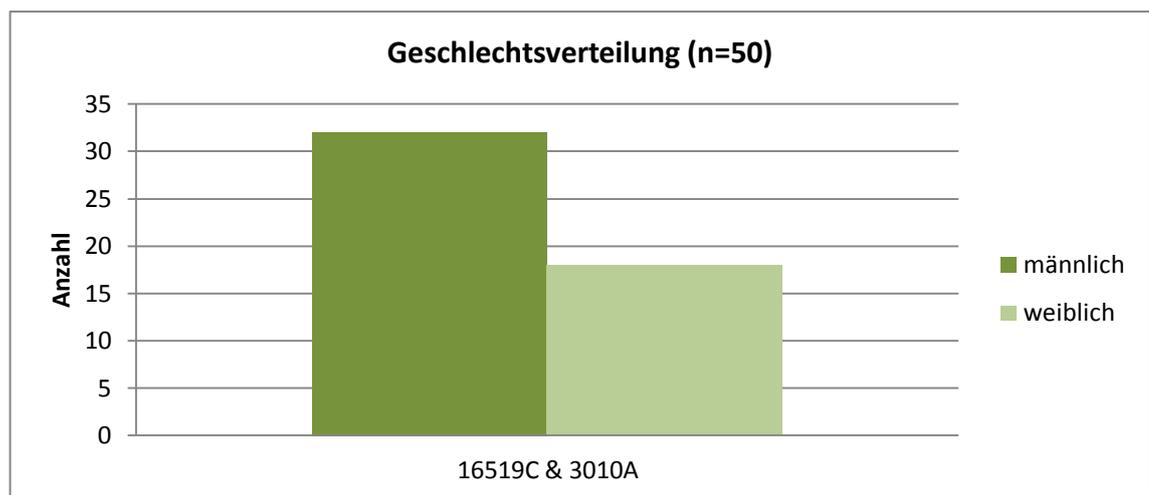


Abbildung 17: Geschlechtsverteilung der SIDS-Fälle in der vorliegenden SNP-Kombination aus 3010A und 16519C

Die Kombination der Genotypen 3010A und 16510C im Zusammenhang mit den SIDS-Fällen, die in den Monaten von November bis April verstorben sind, zeigt sich wie folgt:

SIDS-Fälle (n=42)		
	November bis April	Restliche Monate
Gesamt	27 (64,3%)	15 (35,7%)
16519C & 3010A	8 (29,6%)	5 (33,3%)

Tabelle 19: Die jahreszeitliche Sterbeverteilung. Erhoben an 42 SIDS-Fällen und in Abhängigkeit der SNPs 3010A und 16519C

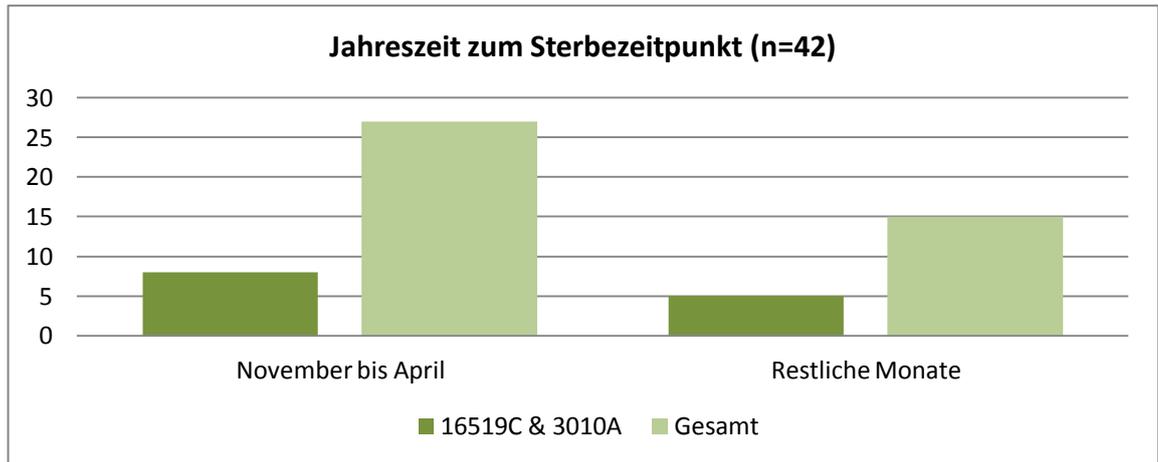


Abbildung 18: Jahreszeit zum Sterbezeitpunkt der SIDS-Fälle

Von 42 SIDS-Fällen, bei denen Angaben zum Todeszeitpunkt vorlagen, sind 27 Säuglinge in den Monaten November bis April verstorben. 8 davon (29,6%) waren Träger der Mutationen 3010A und 16519C. 15 SIDS-Fälle, die in den übrigen Monaten verstorben sind, trugen mit einem Anteil von 33,3% die vorliegenden Mutationen. Es konnte keine signifikante Assoziation hinsichtlich der Mutationen und des Todeszeitpunktes festgestellt werden.

Die Kombination der Genotypen 3010A und 16510C zeigt folgende Assoziation mit den SIDS-Fällen, die im Alter von 2-4 und im Alter von 6 Monaten verstorben sind:

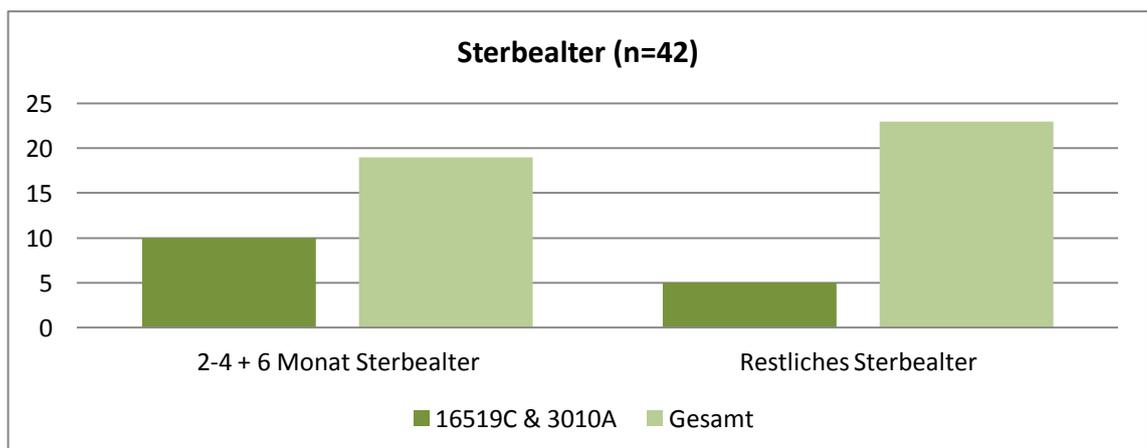


Abbildung 19: Sterbealter der SIDS-Fälle

Von 42 SIDS-Fällen, bei denen die Angaben zum Sterbealter vorlagen, sind 19 während des 2. bis 4. Monat und des 6. Monat verstorben. 10 davon weisen die Mutationen in

den SNPs 3010A und 16519C auf (52,6%). 23 der SIDS-Fälle sind in den restlichen Monaten verstorben, wovon 21,7% die Mutationen 3010A und 16519C aufweisen. Aufzuzeigen ist, dass SIDS-Fälle, die laut Literaturangaben häufig zwischen dem 2. und 4. Monat und innerhalb des 6. Monats versterben, auch eine signifikant erhöhte kombinierte Mutationsrate in den SNPs 3010A und 16519C aufweisen (Kleemann und Bajanowski 2004).

3.5 Verifizierung der Datenerhebung

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse wurden mit Forschungsrohdaten aus der Rechtsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover verifiziert. Die Forschungsdaten wurden mittels der SNaPshot-Analyse gewonnen. Folgende Ergebnisse lassen sich aus den erhobenen Daten ableiten:

		SIDS (n=176)		Kontrolle (n=113)	
G3010A					
G		130	73,86%	83	73,45%
A		46	26,14%	27	23,89%
C7028T					
C		79	44,89%	51	45,13%
T		97	55,11%	59	52,21%
T16519C					
T		49	27,84%	24	21,24%
C		127	72,16%	89	78,76%

Zusammenhang 16519 / 3010					
16519	3010	SIDS		Kontrollen	
T	A	9	18,37%	87,50%	21
	G	40	81,63%	12,50%	3
C	A	37	29,13%	6,74%	6
	G	90	70,87%	89,89%	80

	G	A	gesamt	Freq
SIDS	90	37	127	0,70866142
Kontrolle	80	6	86	0,93023256
gesamt	170	43	213	
	$\chi^2 = 15,623948$		signifikant	
	$\alpha = 0,01$			

Tabelle 20: Ergebnisse der Verifizierung durch die SNaPShot-Analyse

Es zeigt sich weitgehend eine Übereinstimmung der erhobenen Daten. Wie in der zum Vergleich vorliegenden Arbeit lassen sich bei Betrachtung der einzelnen Polymorphismen keine Unterschiede zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe aufzeigen. Die nachgewiesene erhöhte Häufigkeit im SNP C7028T konnte in der Verifizierung, wie im Kap. 3.2, (S.44) aufgeführt, nicht bestätigt werden und wird in weiteren, noch durchzuführenden, Untersuchungen geklärt werden müssen und wird nicht in die weitere Untersuchung mit aufgenommen.

Auch hier zeigt die Kombination der Polymorphismen 3010A und 16519C ein signifikant erhöhtes Vorkommen bei den SIDS-Fällen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($\chi^2=15,62$, $\alpha=0,01$, $df=1$).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Genetische Polymorphismen stellen einen der drei Einflussfaktoren dar, die als mögliche Ursache des plötzlichen Kindstodes in Betracht kommen. Das Zusammenspiel aus epidemiologischen und endogenen Faktoren, sowie genetischen Prädispositionen konnte als mögliche Ursache in der von Filiano und Kinney (1994) entwickelten „Triple-Risk-Hypothese“ mit SIDS-Fällen in Verbindung gebracht werden. Liegt eine genetische Prädisposition vor und unterliegt der Säugling einem epidemiologischen Risikofaktor, so reicht ein einziger Trigger aus, um die „Triple-Risk-Hypothese“ zu komplettieren und den plötzlichen Kindstod auszulösen (Opdal und Rognum 2010).

Viele genetische Erklärungsansätze wurden in den letzten Jahren verfolgt, die genaue Ursache des SIDS ist jedoch bis dato ungeklärt (Opdal und Rognum 2010).

Auf Grundlage der „Triple-Risk-Hypothese“ nehmen viele Studien an, dass Polymorphismen der mtDNA eine mögliche genetische Prädisposition bei SIDS-Fällen sein können (Opdal et al. 1999). Die mtDNA kodiert die Untereinheiten der OXPHOS, die für die ATP-Produktion des Körpers zuständig ist. Durch eine hohe Anzahl an Kopien der mtDNA entsteht durch eine Mutation eine Vielfalt aus mutierter und Wildtyp-DNA, das Vorliegen einer Heteroplasmie. Infolgedessen können aus Polymorphismen der mtDNA Defekte in der OXPHOS resultieren, die einen Mangel an dem lebenswichtigen ATP als Konsequenz haben. Stark energieverbrauchende Organe wie das Herz, das Gehirn oder die Skelettmuskulatur sind dann nicht mehr ausreichend mit ATP versorgt und unterliegen einem Mangel (Bélanger et al. 2011). Als Konsequenz für den Säugling kann es möglicherweise zu einer erschwerten Atemtätigkeit kommen. Er ist nicht in der Lage, zu schreien und seinen Kopf, in Bauchlage liegend, zur Seite zu drehen und sich so aus vermeintlich lebensbedrohlichen Situationen zu befreien (Opdal et al. 1999).

Da die mtDNA an diesem wichtigen biochemischen Kreislauf beteiligt ist, liegt ein Fokus der aktuellen SIDS-Forschung auf dem Einfluss genetischer Polymorphismen der mtDNA und beispielsweise der daraus resultierenden Fehlfunktion der OXPHOS. Vorgegangene Arbeiten konnten auf dem genetischen Gebiet erhöhte Mutations-

raten der mtDNA bei SIDS-Fällen nachweisen (Boles et al. 2010; Opdal et al. 1998; Opdal et al. 1999; Opdal et al. 2002; Opdal und Rognum 2004). Auch die D-Loop-Region der mtDNA steht im Fokus der Untersuchung, um hier eine eventuell erhöhte Mutationsrate bei SIDS-Fällen nachweisen zu können (Opdal et al. 1998). Polymorphismen in dieser Region können die Replikationsrate der mtDNA ändern und somit die Zellteilung beeinflussen (Aikhionbare et al. 2007). Eine dominante mitochondriale Mutation, die direkt mit SIDS-Fällen in Verbindung gebracht werden kann, liegt derzeit noch nicht vor (Opdal und Rognum 2010).

Die vorliegende Arbeit hat auf Grundlage bisher durchgeführter Studien die mitochondrialen SNPs G3010A, T16519C und C7028T bei 176 SIDS-Fällen und 113 Kontrollfällen genotypisiert. Überprüft wurde ein möglicher signifikanter Unterschied der Genotypen zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe. Die SNPs wurden einzeln und in Kombination betrachtet, um zu prüfen, ob beim gleichzeitigen Vorhandensein mehrerer Mutationen in einem Individuum ein vermehrtes Vorkommen des plötzlichen Kindstodes nachweisbar ist. Um der „Triple-Risk-Hypothese“ weitgehend gerecht zu werden wurden die vorliegenden Daten auf den Einfluss von epidemiologischen Faktoren hin untersucht. Die SIDS-Fälle wurden anhand ihrer Genotypisierung, soweit es die Datenlage möglich machte, mit ihrem Geschlecht, dem Sterbealter, sowie der Jahreszeit des Todeszeitpunktes in einen Zusammenhang gebracht, um mögliche Auffälligkeiten darzulegen.

4.1.1 Genetische Polymorphismen der mtDNA im Zusammenhang mit SIDS

Um die genetischen Polymorphismen der mtDNA im Zusammenhang mit SIDS zu betrachten, wird die Genotypverteilung für die einzelnen SNPs G3010A, T16519C und C7028T dargestellt. Auf Grundlage vorangegangener Studien werden die SNPs in Kombination betrachtet. Das Vorliegen mehrerer Mutationen in einem Individuum konnte häufiger bei SIDS-Fällen, als in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Hofmann et al. 1997; Opdal et al. 1998; Opdal et al. 1999; Opdal et al. 2002).

Verteilung der Genotypen der einzelnen mitochondrialen Polymorphismen

Es gibt mehrere Gründe die Annahme zu verfolgen, dass Polymorphismen der mtDNA eine Ursache des plötzlichen Kindstodes sein können. Studien zeigen, dass Säuglinge, die relativ spät am SIDS verstorben sind unter Apathie litten, schläfriger waren, ein niedrigeres Aktivitätslevel aufwiesen und eine erhöhte Blutkonzentration von Hypoxanthin nachzuweisen war als bei Kontrollgruppen (Kahn et al. 1992; Kelmanson et al. 1996; Opdal et al. 1998). Dieses kann die Folge von ATP-Mangel als Resultat einer mitochondrialen Mutation sein (Wallace 1992).

Die Vermutung, dass möglicherweise Mutationen der mtDNA bei SIDS-Fällen häufiger auftreten als bei Kontrollgruppen und eine mögliche Assoziation zwischen dem Polymorphismus und dem Eintreten des plötzlichen Kindstodes besteht, wurde in mehreren Studien untersucht (Divne et al. 2003; Opdal et al. 1998; Opdal et al. 1999; Opdal et al. 2002). Bislang konnten 60 Mutationen der mtDNA bei SIDS-Fällen nachgewiesen werden (Opdal und Rognum 2004). Einige dieser sollen im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

1998 untersuchte die norwegische Arbeitsgruppe um Opdal et al. erstmalig das Auftreten von Polymorphismen der mtDNA bei SIDS-Fällen. Die veröffentlichte Studie schloss 82 SIDS-Fälle und 133 Kontrollen (94 Kinder und 39 Erwachsene) ein. Ein Augenmerk der Untersuchung lag auf dem Sequenzabschnitt 16055nt - 16500nt, die sogenannte D-Loop-Region. Die Polymorphismen der D-Loop-Region wurden einzeln betrachtet und im Hinblick auf das Vorliegen mehrerer Mutationen in einem Individuum analysiert. Es zeigte sich, dass 42,6% der SIDS-Fälle zwei oder weniger Mutationen trugen, in der Kontrollgruppe hingegen lediglich 34,4%. Damit wiesen die SIDS-Fälle insgesamt eine höhere Mutationsrate auf als die Kontrollgruppe ($p=0.088$). Im Hinblick auf die einzelnen Polymorphismen konnten 77 Mutationen bei den SIDS-Fällen gegenüber 71 Mutationen in der Kontrollgruppe aufgezeigt werden. Die Substitutionen der SIDS-Fälle kamen dabei in allen D-Loop-Bereichen vor, sodass keine Sequenz als nicht betroffen betrachtet werden konnte. Keine Mutation lag bei 15,9% der SIDS-Fälle und bei 24,1% der Kontrollen vor. Demnach haben die SIDS-Fälle nachweislich eine erhöhte Mutationsrate, ein erhöhtes Vorkommen mehrerer Mutationen im gleichen Individuum im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Da die Studiengruppe um Opdal die Relevanz der mitochondrialen Mutationen im Hinblick auf das SIDS erkannte, führte sie weitere Studien in den Jahren 1999, 2002 und 2004 durch. In der Publikation aus dem Jahre 1999 wurden 158 SIDS-Fälle und 97 Kontrollen (Kinder) erfasst. Dieses Mal handelte es sich um eine kodierende Region, 3230nt - 3330nt. Um die Assoziation der mitochondrialen Mutationen mit SIDS-Fällen weiter zu verfolgen, wurde nach Mutationen geforscht, die ausschließlich bei SIDS-Fällen und nicht in der Kontrolle nachzuweisen waren. Bei 4 der 158 SIDS-Fälle konnte am SNP T3290C, T3308C und T3308G eine Mutation festgestellt werden, die nicht in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnte. Insgesamt wiesen diese 4 SIDS-Fälle Mutationen sowohl im kodierenden Bereich, als auch in der D-Loop-Region, mit einer Mutationsrate von 85% auf. Die Aussagekraft in dieser Studie ist durch die geringe Fallzahl von 4 Säuglingen eingeschränkt.

In der im Jahre 2002 durchgeführten Studie wurde ein exogener Risikofaktor in die Untersuchung aufgenommen. Wie im Abschnitt der epidemiologischen Risikofaktoren aufgeführt, konnte bei einer Vielzahl der SIDS-Kinder ein grippaler Infekt nachgewiesen werden, an dem sie letztlich auch verstorben sind. Opdal et al. (2002) untersuchten 257 SIDS-Fälle, 36 davon litten zum Todeszeitpunkt nachweislich an einem Infekt. Als Kontrollgruppe dienten hier 102 Kinder. Insgesamt wurden 9 verschiedene SNPs untersucht. Die SIDS-Fälle zeigten eine signifikant erhöhte Mutationsrate ($p=0,024$) im Gegensatz zu der untersuchenden Kontrollgruppe. Die prämortal unter einem Infekt leidenden Säuglinge wiesen eine Mutationsrate von 11,1%, die SIDS-Säuglinge (ohne Infekt) 5,6% und die Kontrollen von 2,9% auf. Wie in den vorangegangenen Studien der norwegischen Arbeitsgruppe wurden SIDS-Fälle mit nachgewiesenen Mutationen auf Mutationen der D-Loop-Region untersucht und es konnten die schon erhobenen Ergebnisse unterstrichen werden.

Eine schwedische Studie von Divne et al. (2003) untersuchte 16 mitochondriale Polymorphismen in einer Fall-Kontroll-Studie von 6 SIDS-Kindern und 14 Kontrollen. Unter den zu untersuchenden Polymorphismen waren auch die in dieser Arbeit betrachteten SNPs T16519C und C7028T integriert. Der Basenaustausch T>C konnte bei dem SNP T16519C bei 4 von 6 SIDS-Fällen und bei 8 von 14 Kontrollen festgestellt werden. Das Vorliegen von C>T beim SNP C7028T konnte bei 4 von 6 SIDS-Kindern und bei 12 von 14 Kontrollen nachgewiesen werden. Beide Mutationen konnten bei SIDS-

Kindern nachgewiesen werden, zeigen jedoch keine Signifikanz. Drei in der Studie untersuchte Polymorphismen (A11467G, A12308G und G12372A) zeigten ein erhöhtes Vorkommen und wurden in einer weiteren Studie von 10 SIDS-Fällen und 138 Erwachsenen weitergehend untersucht. Es konnte ein Mutationsvorkommen von 25% bei SIDS-Fällen nachgewiesen werden und somit die Ansätze von Opdal et al. unterstrichen werden.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten können den Trend einer erhöhten Mutationsrate bei SIDS-Fällen im Vergleich zur Kontrollgruppe bestätigen. Die SNPs C16519T und C7028T wurden in einer kleinen Population von Divne et al. 2003 untersucht. Es wurde aber kein signifikanter Unterschied zwischen den SIDS- und den Kontrollfällen nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit kann eine Mutationsrate von 72,73% gegenüber 78,76% bei SIDS-Fällen im SNP T16519C und bei Untersuchung des SNPs C7028T eine Mutationsrate von 64,77% zu 49,56% aufgezeigt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der Studien von Opdal et al. (1998), Opdal et al. (1999), Opdal et al. (2002) und Divne et al. (2003).

Abweichende Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu den Studien der Arbeitsgruppe Opdal et al. (1998), Opdal et al. (1999) und Opdal et al. (2002) können begründet sein, in der nicht einheitlichen Verwendung der Definition des SIDS. Die Definition von Willinger et al. (1991) besagt, dass es sich beim SIDS um den plötzlichen und unerwarteten Tod eines Säuglings im Alter von bis zu einem Jahr handelt, dessen Todesursache nach durchgeführter Autopsie und klinischer Anamnese nicht nachweisbar ist. Opdal et al. richteten sich in ihren Studien aus den Jahren 1998, 1999 und 2002 nach Klassifikationskriterien von Gregersen et al. (1995). Diese besagen, dass ein SIDS vorliegt, wenn sich nach Durchführung einer Autopsie und einer klinischen Anamnese keine andere Todesursache nachweisen lässt. In der Arbeit von Divne et al. (2003) wird keine Definitionsgrundlage erwähnt.

In der 1998 durchgeführten Studie beinhaltet die Populationen der SIDS-Fälle Säuglinge mit einem Alter von 0,5 - 14 Monaten und in der 1999 durchgeführten Studie, Säuglinge in einem Alter von 0,5 - 36 Monaten. Per definitionem betrifft der plötzliche Kindstod Säuglinge bis zu einem Alter von 12 Monaten. Diese Einteilung wurde in den erwähnten Studien weit überschritten. Die Anzahl der in diesem Alter untersuchten Fälle kann nicht nachvollzogen werden. Divne et al. 2003 haben aus-

schließlich Säuglinge mit einem Alter von bis zu einem Jahr in die Studie eingeschlossen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SIDS-Fälle wurden hinsichtlich ihres Sterbealters geprüft und bei einem Überschreiten der 1-Jahres-Grenze aus der Fall-Kontroll-Studie ausgeschlossen. Zur Einhaltung der Definition darf kein klinisch nachweisbarer Grund für das Versterben des Säuglings vorliegen. In der Studie von Opdal et al. (2002) wurden Säuglinge, die zum Todeseintritt unter einem Infekt litten, als SIDS klassifiziert. Auch die von Opdal et al. (2002) verwendete Definition von Gregersen et al. (1995) schließt das Vorliegen einer anderen Todesursache aus. Es liegt die Frage nahe, wie konsequent die Definitionen während der Obduktion und der gesamten Klassifizierung eingehalten wurden. Schon kleinste Unterschiede in der Interpretation oder Einhaltung der Definition können das Ergebnis einer Arbeit grundlegend ändern.

Das Vorliegen eines Infektes spielt als epidemiologischer Faktor bei SIDS eine Rolle. Auffällig war, wie im Kapitel Epidemiologische Faktoren (Kap. 1.1.3, S. 7) erörtert, das Vorliegen eines grippalen Infektes während des Todeszeitpunktes, welcher aber nicht als Todesursache festgemacht werden konnte. Ein interessanter Ansatz wäre gewesen bei dem Vorliegen eines Infektes bei korrekt klassifizierten SIDS-Fällen auf erhöhte Mutationsraten zu achten, um den möglichen Einfluss epidemiologischer Faktoren zu belegen. Dies war in der hiesigen Arbeit aufgrund teilweise nicht vorliegender Anamnesedaten nicht möglich. Für zukünftige Untersuchungen stellt es einen wichtigen Ansatz dar, um die exogenen und epidemiologischen Faktoren in die Forschung einzubeziehen, wie noch im Diskussionsteil 4.1.2 (S. 63) erläutert werden soll.

Die durchgeführten Studien zeigen, dass keine Punktmutation alleine für den Eintritt des plötzlichen Kindstodes verantwortlich ist, allerdings die Vermutung nahe liegt, dass es sich um einen prädisponierenden Faktor handelt. Um diese Vermutung weiter zu verfolgen, müssten weitere Untersuchungen der mitochondrialen Mutationen durchgeführt werden.

Kombination der mitochondrialen Polymorphismen

Sehr wahrscheinlich ist die prädisponierende Wirkung mitochondrialer Mutationen nicht nur von einer, sondern vom Vorliegen mehrerer Mutationen ausgehend. Im Jahre

1997 untersuchten Hofmann et al. einerseits die mitochondriale D-Loop-Region, andererseits einzelne Punktmutationen der kodierenden Regionen. Die Assoziation einer erhöhten Mutationsrate in der D-Loop-Region und zusätzlichen Mutationen in kodierenden Sequenzen der mtDNA konnten festgestellt werden. Auch die schon beschriebenen Studien von Opdal et al. aus den Jahren 1998, 1999 und 2002 belegten das Vorliegen einer Mutation in der D-Loop-Region bei nachgewiesenen anderen Polymorphismen. Arnestad et al. (2002) hielten fest, dass eine Mutation der D-Loop-Region nicht alleine die Ursache für das Auftreten einer Mitochondriopathie sein kann. Vielmehr mag diese Mutation ein Indiz dafür sein, dass weitere Mutationen im Genom zu finden sind (Opdal und Rognum 2004). Die hohen Mutationsraten der D-Loop-Region, die auch Opdal et al. (2007) nachweisen konnten, ließen den Schluss zu, dass diese Mutationen einen Einfluss auf weitere Mutationen der mtDNA haben. Es entstand die Annahme, dass eine Mutation der D-Loop-Region ein Marker für die Instabilität des mitochondrialen Genoms darstellt und das Risiko für eine weitere Punktmutation im kodieren Bereich um 30% erhöht (Hofmann et al. 1997; Opdal et al. 1998; Arnestad 2002).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde auf Grundlage der oben erwähnten Studien das gleichzeitige Vorliegen von Mutationen in der D-Loop-Region (T16519C) und Mutationen der kodierenden Sequenzen (G3010A und C7028T) verglichen. Bei Betrachtung der SNPs C16519T und G3010A konnte diese Aussage statistisch signifikant bestätigt werden. Bei Vorliegen einer Mutation im SNP T16519C konnte eine statistisch signifikante Erhöhung ($\chi^2=24,24$, $\alpha=0,01$, $df=1$) von zusätzlichen Mutationen im kodieren Bereich G3010A im Vergleich zu der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. So ließ sich bei 39,06% der SIDS-Fälle eine Mutation im SNP T16519C und gleichzeitig eine Mutation im SNP G3010A, im Vergleich zu 8,99% in der Kontrollgruppe, feststellen. Ein Zusammenhang zwischen den SNPs T16519C und C7028T konnte nicht festgestellt werden. Hervorzuheben ist, dass von den 176 untersuchten SIDS-Fällen 108 von Ihnen, bei Vorliegen einer Mutation in der D-Loop-Region (T16519C), eine weitere Punktmutation in den kodierenden Sequenzen nachgewiesen werden konnte (C7028T und G3010A). Durch eine Mutation der D-Loop-Region kann die Replikation und somit die nachfolgende mitochondriale Kodierung beeinflusst werden.

Eine signifikanter Unterschied ($X^2=24,24$, $\alpha=0,01$, $df=1$) bei Vorliegen einer Mutation in der D-Loop-Region und im kodierenden Bereich konnte in dieser Arbeit zwischen SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe aufgezeigt werden. Dieses Ergebnis für ein mögliches erhöhtes Risiko für den Eintritt des SIDS konnten die Studien von Arnestad et al. (2002), Hofmann et al. (1997), Opdal et al. (1998), Opdal et al. (1999), Opdal et al. (2002) und Opdal et al. (2007) bestätigen.

4.1.2 Genetische Polymorphismen der mtDNA in Bezug auf epidemiologische Risikofaktoren für SIDS-Fälle

Viele Studien gehen davon aus, dass es sich bei dem Phänomen des SIDS um ein multifaktorielles Syndrom handelt (Horne et al. 2010; Moon et al. 2007). Mit großer Wahrscheinlichkeit liegt bei Säuglingen, die später an SIDS versterben werden, eine genetische Prädisposition vor. Eine wichtige Rolle in der aktuellen SIDS-Forschung spielen die mitochondrialen Polymorphismen. Bei einer Vielzahl von SIDS-Fällen konnten einzelne oder mehrere Mutationen nachgewiesen werden. 108 der 176 untersuchten SIDS-Fälle waren Träger einer Mutation. 39,06% der SIDS-Fälle wiesen sowohl eine Mutation der D-Loop-Region (T16519C), als auch im kodierenden Bereich auf (G3010A), im Vergleich zu 8,99% in der Kontrollgruppe.

Die Kombination der vorliegenden genetischen Prädisposition mit einem exogenen Einflussfaktor erhöhte das Risiko eines SIDS um ein Vielfaches. Das Zusammentreffen dreier Einflussfaktoren wie der genetischen Prädisposition, dem exogenen Risikofaktor, sowie der vulnerablen Entwicklungsphase lassen sich in der „Triple-Risk-Hypothese“ zusammenfassen (Filiano und Kinney 1994). Säuglinge, die der Gefahr des SIDS ausgesetzt sind, befinden sich ausnahmslos in einer vulnerablen Entwicklungsphase, liegt unter diesen Voraussetzungen gleichzeitig eine genetische Prädisposition vor, reicht ein einziger exogener Trigger aus, um das SIDS auszulösen (Kap. 1.1.4, S. 10).

In der durchgeführten Arbeit wurden die genetischen Polymorphismen der mtDNA (G3010A, C16519T und C7028T) im Zusammenhang mit epidemiologischen Faktoren wie dem Geschlecht, der Jahreszeit zum Todeszeitpunkt und dem Sterbealter untersucht. Von 176 untersuchten SIDS-Fällen waren 59% männlich und 41% weiblich.

Dieses Verhältnis von etwa 60% zu 40% zugunsten des männlichen Geschlechts deckt sich mit den Literaturangaben (Kleemann und Bajanowski 2004).

Das Vorkommen von SIDS-Fällen ist häufig während der Wintermonate November bis April zu beobachten (Kleemann und Bajanowski 2004). Das Sterbealter liegt zwischen dem 2. und 4. Monat, als auch im 6. Monat (Mitchell et al. 1997). Sowohl die jahreszeitliche als auch die Altersverteilung konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. 27 der 42 Fälle, von denen der Sterbezeitpunkt bekannt war, starben in den Monaten November-April und 10 der 42 Fälle in einem Alter von 2 - 4 oder 6 Monaten.

Weitere epidemiologische Einflussfaktoren wurden von Opdal et al. (1999) und Divne et al. (2003) betrachtet. Opdal et al. (1999) berücksichtigten zusätzlich zum Geschlecht und dem Sterbalter, die Auffindeposition des Säuglings, sowie das Vorliegen möglicher grippaler Infekte. Divne et al. (2003) untersuchten desweiteren die Nikotinkonzentration im Blut. Diese Einflussfaktoren wurden schon mehrfach in der Literatur mit SIDS in Verbindung gebracht. So berichteten Saturnus et al. (1985) erstmals von dem Vorliegen der Bauchlage als Risikofaktor. Säuglinge, die in der Rückenlage schlafen, weisen ein geringeres Risiko an SIDS zu versterben als die Bauch- oder Seitenlage (Galland et al. 2002). Die winterliche Jahreszeit die häufig bei SIDS-Fällen beobachtet werden kann, wird auch häufig mit einem vermehrten Auftreten von grippalen Infekten beobachtet. Der grippale Infekt könnte somit eine Erklärung für das gehäufte Auftreten von SIDS-Fällen während der Wintermonate sein. Auch der Nikotinabusus der Eltern kann als starker Risikofaktor mit dem Auftreten des SIDS in einen Zusammenhang gebracht werden (Mc Donnel-Naughton et al. 2012).

Zu den von Opdal et al. (1999) und Divne et al. (2003) berücksichtigten Risikofaktoren lagen bei den in dieser Studie untersuchten SIDS-Fällen keine statistischen Angaben vor und konnten somit nicht in die Auswertung einbezogen werden. Weitere Untersuchungen sollten diese epidemiologische Einflussfaktoren aufgreifen und in zukünftigen Studien berücksichtigen.

4.2 Diskussion des angewandten Probenmaterials

Im folgenden Abschnitt sollen die angewandten Proben der vorliegenden Arbeit betrachtet werden. Ein Augenmerk soll dabei auf den Auswahlkriterien der SIDS-Fälle und der Kontrollgruppe liegen.

Die Population der SIDS-Fälle

Die untersuchten Säuglinge der vorliegenden Arbeit wurden als SIDS-Fälle klassifiziert, wenn nach einer durchgeführten Obduktion und einer klinischen Anamnese keine Todesursache feststellbar war. Die Säuglinge waren in einem Alter von 1 bis zu 12 Monaten und entsprechen somit den Kriterien der verbreiteten Definition von Willinger et al. (1991). Epidemiologische Daten, wie das Geschlecht, lagen zu der gesamten Untersuchungspopulation vor. Die Angaben zum Sterbezeitpunkt waren bei 42 von 176 untersuchten Proben vorhanden. Die Studien von Opdal et al. (1999) und Divne et al. (2003) bezogen die Auffindeposition zum Todeszeitpunkt, vorliegende Infekterkrankungen und einen möglichen Nikotingehalt im Blut des Säuglings mit in ihre Untersuchung ein. Opdal et al. (1999) ergänzte dies durch die Ergebnisse der Obduktion und der Mikropathologie. So konnte die norwegische Arbeitsgruppe bei ihren untersuchten Säuglingen, Petechien an Perikard und Thymus nachweisen, die sich typischerweise bei SIDS-Fällen finden lassen (Hunt und Hauck 2006).

Nachweislich nehmen die epidemiologischen Einflussfaktoren eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit SIDS ein und sollten in die aktuelle SIDS-Forschung eingegliedert werden. In nachfolgenden Studien sollte eine ausführliche klinische Anamnese erhoben werden, um Symptome wie eine erhöhte Schläfrigkeit bzw. Weckfunktion frühzeitig abzuklären und mögliche Begleitumstände die das Umfeld des Säuglings betreffen zu berücksichtigen (Kahn et al. 1992). Durch die Integrierung dieser Informationen können beispielweise Schlüsse auf die Schlafposition des Kindes, das familiäre Umfeld, eine mögliche Rauchexposition oder das Vorliegen eines grippalen Infektes gezogen werden, dem der Säugling zum Todeszeitpunkt ausgesetzt war. Unter Einbeziehung der exogenen Faktoren kann geprüft werden, ob drei Einflussfaktoren vorliegen und die „Triple-Risk-Hypothese“ von Filiano und Kinney (1994) grundlegend abgedeckt und bestätigt werden kann (Opdal und Rognum 2010).

Ebenfalls von Relevanz ist die mütterliche Vererbung der mtDNA. Aufgrund der schon im Kapitel der Mitochondriopathien (Kap. 1.2.4, S. 23) beschriebenen Heteroplasmie ist es möglich, dass die mitochondrialen Sequenzen der Mutter und des Kindes nicht übereinstimmen. Eine gesunde Mutter mit wenigen Mutationen kann ein krankes Kind auf die Welt bringen, deren mtDNA eine Vielzahl von Mutationen aufweist (Opdal et al. 1998). Es wäre sinnvoll sowohl die mütterliche Linie, als auch die Geschwister auf ihre mitochondrialen Mutationen zu untersuchen, um abzuklären, ob die Mutationen vererbt wurden oder im Individuum somatisch entstanden sind. Möglicherweise kann durch diese zusätzliche Untersuchung ein Rückschluss auf das Vorkommen einer erhöhten Todesfallrate bei Geschwistern von SIDS-Fällen gezogen werden. Es stellt sich derzeit die Frage, ob diese genetisch oder durch das Vorkommen der gleichen exogenen Einflussfaktoren bedingt ist (Guntheroth et al. 1990; Beal 1992).

Die Population der Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe dienten in dieser Arbeit DNA-Extrakte von 113 kaukasischen Erwachsenen. In der von Opdal et al. (1998) durchgeführten Studie wurde eine Kontrollgruppe sowohl aus Kindern, als auch aus Erwachsenen gebildet. Die Problematik der aufgeführten Kontrollgruppenzusammensetzung ist die Tatsache, dass im Laufe des Alters eine Ansammlung von Mutationen möglich ist. Als Konsequenz daraus sollte das Alter der Kontrollen annähernd gleich zu den SIDS-Fällen sein (Wallace 1992). Es ist generell schwierig, eine Kontrollgruppe zusammenzustellen, deren Altersverteilung vergleichbar mit der SIDS-Gruppe ist. Bei der Verwendung einer möglichen Säuglingskontrollgruppe bestünde das Risiko, dass in dieser Gruppe zu einem späteren Zeitpunkt ein SIDS auftritt. Erst bei Kindern, die das erste Lebensjahr erreicht haben, ist diese Gefahr ausgeschlossen. Auch Opdal et al. (1998) diskutierten die optimale Zusammensetzung einer Kontrollgruppe. In deren Studie mit Kindern und Erwachsenen in der Kontrollgruppe wurden zum Ausschluss etwaiger Fehler die Proben der Erwachsenen aus der Ergebniserhebung ausgeschlossen. Es zeigte sich, dass die Kontrollgruppenzusammensetzung keinen Einfluss auf das untersuchte Ergebnis nahm. Es muss daher versucht werden Kontrollgruppen aus Kindern aufzustellen, die die Untersuchungen nicht durch abweichende Alterstrukturen zu den SIDS-Fällen beeinflussen.

4.3 Betrachtung der angewandten Methoden zur Genotypisierung

Drei Polymorphismen der mtDNA wurden an 176 SIDS-Fällen und 113 Kontrollen mit Hilfe der PCR und des Restriktionsendonukleasenverdau genotypisiert. Die Amplifikation der mitochondrialen Sequenzen erfolgte im Rahmen einer Singleplex-PCR. Eine Verifizierung der Datensätze erfolgte an der Medizinischen Hochschule Hannover anhand der Durchführung einer SNaPshot-Analyse. Diese Multiplex-Variante zur gleichzeitigen Amplifizierung aller Polymorphismen hat den Vorteil, dass die Arbeitszeit und die finanziellen Ausgaben minimiert werden können (Köhnemann et al. 2008). Ein weiterer Vorteil der Snapshot-Analyse ist die Begrenzung der Fragmentgröße der zu amplifizierenden Genloci. Durchschnittlich liegt diese Größe bei 200bp und zeigt qualitativ genauere Ergebnisse. Die Amplifikatsgröße von 720bp des SNPs C7028T erwies sich in der genauen Auswertung, auch nach der durchgeführten RFLP-Analyse, als problematisch. So ließen sich bei Betrachtung des SNPs C7028T zwischen der Singleplex- und der Multiplex-PCR einige Diskrepanzen nachweisen. Zur Durchführung einer SNaPshot-Analyse bedarf es einem aufwendigeren Primerdesign, um für alle verwendeten Primerpaare optimale Bedingungen zu gewährleisten, die ein sensitives Ergebnis erzielen. Dieser Arbeitsvorgang bedarf viel Zeit und sollte im Kosten-Nutzen-Verhältnis anhand der Studiengröße abgeglichen werden.

Die in der PCR entstandenen Amplifikate der SNPs G3010A, T16519C und C7028T wurden im Rahmen der Genotypisierung mit ihrem jeweiligen Restriktionsenzym verdaut. Dieser Versuchsablauf stellt eine Methodik dar, wie sie beispielweise auch in der SNP-Analyse von Camilleri et al. (2009) angewandt wurde. Ein weiteres Verfahren für den Nachweis eines SNPs stellt die Sequenzierung dar, die unter anderem in den Studien von Opdal et al. (1998) durchgeführt wurde.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch das QIAxcel System der Firma QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland, bzw. durch die Gelelektrophorese. Die Verwendung des QIAxcel Systems stellt im Vergleich zur herkömmlichen Gelelektrophorese eine immense Zeitersparnis dar und erstellt Gelbilder, die sich bezüglich der Kontraste der unterschiedlichen Bandenstärken automatisch anpassen. Es resultierten genaue Analysen, die sich sehr gut interpretieren ließen. Die Auswertung eines herkömmlichen

Gels stellte sich, vor allem bei der SNP-Analyse C7028T, aufgrund der Bandenlage als schwierig dar.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden stellten im Bezug auf die Probengröße und die technischen Möglichkeiten die beste Wahl dar und werden in aktuellen Publikationen zur SNP-Analyse eingesetzt.

4.4 Ausblick

Viele Studien konnten bis dato einen Zusammenhang zwischen mitochondrialen Polymorphismen und dem SIDS herstellen. Es konnte bislang jedoch keine Mutation nachgewiesen werden, die den Eintritt des SIDS zur Folge hat. In dieser Arbeit, wie auch in anderen Studien, konnte ein signifikantes Auftreten einer Mutation in der mitochondrialen D-Loop-Region und einer gleichzeitigen Mutation in einem weiteren kodierenden Abschnitt festgestellt werden. Es gilt herauszufinden, ob es sich um letale Mutationen handelt, die den Todesfall auslösen, oder um normale Genvarianten, die für das SIDS prädisponieren (Opdal und Rognum 2004). Die Bestätigung dieser Assoziation und die Untersuchung weiterer mitochondrialer Mutationen stellt einen wichtigen Baustein in der zukünftigen SIDS-Forschung dar, um die Ursachen des SIDS aufzuklären.

Ein Fokus der weiteren Forschung sollte auf der Betrachtung der klinischen Anamnese liegen. Die Einbeziehung von epidemiologischen Risikofaktoren oder beispielweise der Auffindesituation des Säuglings stellt eine Möglichkeit dar, bisher bekannte Risiken in die Forschung zu integrieren. Vor nachgewiesenen Risikofaktoren sollte durch Prophylaxemaßnahmen gewarnt und die Risikofaktoren minimiert werden. Durchgeführte Kampagnen zur Vermeidung der Bauchlage haben gezeigt, dass die SIDS-Inzidenz stark gesenkt werden konnte (Mitchell und Blair 2012).

Es bedarf einer Zusammenarbeit aus Klinik und Forschung, um die Ursache des SIDS zu erforschen.

5 Zusammenfassung

Der plötzliche Kindstod (engl. *Sudden Infant Death Syndrome*-SIDS) ist die häufigste Todesursache bei Säuglingen innerhalb des ersten Lebensjahres. Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Veränderungen sowie die genaue Todesursache sind bis dato ungeklärt. Viele Forschungsbereiche setzen sich intensiv mit der Klärung dieses „Phänomens“ auseinander. Ein Schwerpunkt liegt auf dem genetischen Gebiet und der Betrachtung verschiedener Polymorphismen. Ein Fokus wird hierbei auf die genetischen Polymorphismen der mitochondrialen DNA (mtDNA) gesetzt.

Die mtDNA kodiert die Untereinheiten der OXPHOS, die für die ATP-Produktion des Körpers zuständig ist. Polymorphismen der mtDNA können Defekte in der OXPHOS auslösen, die einen ATP-Mangel und letztlich einen Energiegewinnungsdefizit als Konsequenz haben. Stark energieverbrauchende Organe wie das Herz, das Gehirn oder die Skelettmuskulatur sind dann nicht mehr ausreichend mit ATP versorgt und unterliegen einem Mangel (Bélanger et al. 2011). Die Auswertung vorliegender Säuglings-Anamnesen, die später am SIDS verstorben sind, konnten zeigen, dass die verstorbenen Säuglinge schläfriger waren und eine geringere Aktivität besaßen, als andere Säuglinge, die nicht dem SIDS erlegen sind. Die Ursache könnte ein schleicher ATP-Mangel sein (Kahn et al. 1992; Kelmanson 1996).

Vor allem Opdal et al. konnten mit ihren Studien aus den Jahren 1998, 1999, 2002 sowie Opdal und Rognum (2004) einen Zusammenhang mitochondrialer Polymorphismen mit SIDS herstellen. Die von Opdal untersuchten SNPs ließen sich bei SIDS-Fällen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe vermehrt nachweisen. Auch die Kombination aus dem Vorliegen mehrerer Polymorphismen in einem Individuum konnte durch Studien gesichert werden. Zu erwähnen sei hierbei die D-Loop-Region der mtDNA. Liegt in diesem Abschnitt eine Mutation vor, ist auch eine Mutation im kodierenden Bereich der mtDNA zu erwarten und konzentriert bei SIDS-Fällen nachzuweisen (Opdal et al. 1999; Opdal et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden die SNPs G3010A, T16519C und C7028T der mtDNA in Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang mit dem SIDS untersucht. Schon 2003 untersuchten Divne et al. (2003) einen möglichen Zusammenhang der SNPs G3010A und C7028T im Zusammenhang mit SIDS, jedoch ohne signifikantes Ergebnis. Boles et

al. (2010) konnten eine Assoziation zwischen den Polymorphismen G3010A und T16519C mit dem plötzlichen Kindstod herstellen. Da bislang jedoch keine ausführliche Publikation zu dieser Frage vorliegt, wurde mit der vorliegenden Arbeit die Rolle der Polymorphismen G3010A und T16519C in Bezug auf den plötzlichen Kindstod gemeinsam mit der (bei Europäern) häufigsten Variation C7028T untersucht.

Die DNA von 176 SIDS-Fällen und einer Kontrollgruppe von 113 Erwachsenen wurde mittels Singleplex-PCR und RFLP-Analyse genotypisiert. Anhand der Genotypisierung konnten die SNPs quantifiziert und im Hinblick auf einen möglichen Unterschied zwischen SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe untersucht werden.

Bei Betrachtung der einzelnen SNPs G3010A, T16519C und C7028T lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe feststellen. Das gehäufte Vorliegen einer erhöhten Mutationsrate in einem Individuum bei SIDS-Fällen im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte durch diese Arbeit bestätigt werden. Beim gleichzeitigen Vorkommen der Mutationen im SNP 3010A und 16519C lässt sich ein signifikant höheres Vorkommen bei SIDS-Fällen mit 39,06% (n=50) gegenüber 8,99% (n=8) in der Kontrollgruppe aufzeigen ($\chi^2=24,24$, $\alpha=0,01$, $df=1$). Auch die von Opdal et al. (1999) geäußerte Annahme, dass beim Vorliegen einer Mutation in der D-Loop-Region weitere Mutationen im kodierenden Bereich vorkommen, konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden.

6 Anhang

Geräte, Reagenzien und Material

Rechtsmedizin der Universität Göttingen

Geräte:

- Elektrophoresekammer , Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100, Pharmacia
- Elektrophoresekammer QIAaxcel System, inkl. Bio Calculator Software 1.0, Qiagen Hilden
- Gefrierschrank, Economic-no-frost, Bosch
- Heizplatte, Ikamag RH, Janke und Kunkel, Ika-Werk
- Kühlschrank, Beko A class
- Pipetten: 0,1-2,5µl ; 0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl, Eppendorf Reference
- Präzisionswaage, Sartorius analytic
- Sterilbank, Kojair; Reinraum-, Klima-und Labortechnik Trendelburg
- Thermocycler, Flex Cyclor, Analytik Jena
- Thermoshaker, Ts-100, Kisker Biotech, Steinfurt
- Vortexer, Top Mix 11118, Fischer Bio Block Scientific
- Zentrifuge, Centrifuge Combi-spin FVL-2400, peq-Lab biotechnology GmbH

Reagenzien und Kits:

- Amp Taq Gold Polymerase 250u, 5U/ml, Roche applied Biosystems
- Borsäure, M 61, 83g/mol, Merck Darmstadt
- DNA-Extraktions Kit QIAamp R DNA Investigator, Qiagen Hilden
- DNTP-Mix, 1ml, je 10mM, peq lab
- Loadingbuffer, 6xGel loading buffer Typ II
- MgCl₂-Solution, 25mM, 1,5ml, Roche applied Biosystems
- PCR-Puffer, 10xBuffer II (no MgCl₂), 1,5ml, Roche applied Biosystems
- Primer 3010G-f, 1nmol/µl, # 42793, Biometra PCR Grade DNS Göttingen
- Primer 3010G-r, 1nmol/µl, # 42794, Biometra PCR Grade DNS Göttingen
- Primer 16519T-f, 1nmol/µl, # 43791, Biometra PCR Grade DNS Göttingen

- Primer 16519T-r, 1nmol/μl, # 43792, Biometra PCR Grade DNS Göttingen
- Primer 7028 C-f, 1nmol/μl, # 42789, Biometra PCR Grade DNS Göttingen
- Primer 7028 C-r, 1 nmol/μl # 42790, Biometra PCR Grade DNS Göttingen
- Puffer 2, 10xNEBuffer 2, # B70015, New England Biolabs
- Puffer 4, 10xNEBuffer 4, # B70045, New England Biolabs
- QIAGEN DNA Screening Kit (2400), Qiagen Hilden
- Restriktionsenzym ALU I, 1000u, 10000U/ml, New England Biolabs
- Restriktionsenzym BCC I, 1000u, 10000U/ml, #R07045, New England Biolabs
- Restriktionsenzym HAE III, 1000u, 10000U/ml, #R01085, New England Biolabs
- Wasser, Lichrosolv, Merck KGaA Darmstadt

Material:

- Handschuhe: peha soft powderfree, Paul Hartmann AG, Heidenheim
- Pipettenspitzen: ep T.I.P.S dualfilter, 10μl, Eppendorf
- Pipettenspitzen: safe seal -Tips Premium, 10μl, Biozym Scientific GmbH
- Pipettenspitzen: safe seal- Tips Premium, 100μl, Biozym Scientific GmbH
- Pipettenspitzen: safe seal-Tips Premium, 1000μl, Biozym Scientific GmbH
- Reaktionsgefäße: Eppendorf Tubes 1,5ml
- Reaktionsgefäße: PCR Tubes, 0,2ml, farbl. Gemischt, Biozym Scientific GmbH
- Reaktionsgefäße: 8-Tube Strip 0,2ml, Micro Amp, Applied Biosystems

Rechtsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover

Geräte:

- Elektrophoresekammer: Electrophoresis Power Supply-EPs 3500XL, Pharmacia
- Elektrophoresekammer: Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100, Pharmacia
- Elektrophoresekammer: Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200, Pharmacia
- Gefrierschrank: Frost, Liebherr
- Heizplatte: Temp-Heizplatte , IKAMAG^R RET
- Pipetten Research 0,1-2,5μl, 0,5-10μl und 10-100μl, Eppendorf
- Präzisionswaage, Sartorius research
- Thermocycler: MinicyclerTM, MJ Research
- Thermocycler: PTC-200 Peltier Thermal Cycler DNA Engine, MJ Research

- Vortexer: Vortex-Genie 2 , Scientific Industries
- Zentrifuge: Centrifuge Sprout

Reagenzien und Kits:

- Agarose LE, Biozym
- AmlI Taq Gold™, 250u, 5u/μl, Applied Biosystems
- Borsäure, H₃BO₃, M= 61,83g/ml, MERCK
- Bromophenolblau, C₁₉H₁₀Br₄O₅S, MERCK
- BSA, 100x, #B90015, 10mg/ml, New England Biolabs
- DNTP Mix 10mM, PE Applied Biosystems
- EDTA, Disodium Salt, Dihydrate, Molecular Biology Grade 100g, Calbiochemie
- Gel Stain, DNA Stain Clear G, SERVA
- Größenstandard, Gene Ruler™, 100bp DNA Ladder, 0,1 vg, 50vg, Fermentas
- MgCl₂-Solution, 15mM, 1,5ml, Perkin Elmer
- Multiplex PCR Kit-Mastermix, 0,85μl, Qiagen
- PCR-Puffer, 10x(MgCl₂), 1,5 ml , Perkin Elmer
- PCR-Wasser, RT-PCR Grade Water 1,5ml, Ambion by life technologies
- Primer 3010G-f, 1nmol/μl, # 42793, Biometra PCR Grade DNS Göttingen
- Primer 3010G-r, 1nmol/μl, # 42794, Biometra PCR Grade DNS Göttingen
- Primer 16519T-f, 1nmol/μl, # 43791, Biometra PCR Grade DNS Göttingen
- Primer 16519T-r, 1nmol/μl, # 43792, Biometra PCR Grade DNS Göttingen
- Primer 7028 C-f, 1nmol/μl, # 42789, Biometra PCR Grade DNS Göttingen
- Primer 7028 C-r, 1 nmol/μl, # 42790, Biometra PCR Grade DNS Göttingen
- Puffer 2, 10xNEBuffer 2, # B70015
- Puffer 4, 10xNEBuffer 4, # B70045, New Englang Biolabs
- Restriktionsenzym ALU I, 1000u, 10000U/ml, New England Biolabs
- Restriktionsenzym BCC I, 1000u, 10000U/ml, #R07045, New England Biolabs
- Restriktionsenzym HAE III, 1000u, 10000U/ml, #R01085, New England Biolabs
- Wasser, 10ml, Braun

Material:

- Handschuhe Sterling Nitrile, Powder free, Kimberly-Clark
- Multiply^R-vStrip pro 8er Kette, Sarstedt AG
- Pipettenspitzen, Biosphere[®], Filter Tips, 100µl type Eppendorf Gilson
- Pipettenspitzen, Biosphere[®], Filter Tips, 0,5-20µl type Eppendorf Gilson
- Pipettenspitzen: ep T.I.P.S dualfilter, 10µl, Eppendorf
- Reaktionsgefäße: Microtube 1,5ml, Sarstedt AG
- Reaktionsgefäße: PCR Softstrips 0,2ml, farblos, Biozym

Abbildung 20: Übersicht Geräte, Reagenzien und Material

SIDS- Fälle					G3010A C7028T T16519C				
A 1	w	A	T	C	A 52	w	G	T	C
A 3	m	G	T	T	A 53	m	A	T	C
A 4	w	G	C	C	A 54	m	A	T	C
A 5	m	A	T	C	D 88/11				
A 6	w	A	T	T	S1	m	G	C	T
A 7	m	A	T	C	S 2	w	G	T	C
A 8	m	A	T	T	S 3	w	G	T	T
A 10	w	A	T	C	S 4	m	G	T	T
A 11	m	A	T	C	S 5	w	G	C	C
A 12	m	G	C	T	S 6	m	G	T	C
A 13	w	G	T	T	S 7	w	G	T	C
A 14	w	G	C	C	S 8	m	G	C	T
A 15	m	A	T	C	S 9	m	A	T	C
A 16	w	A	C	C	S 10	m	A	T	C
A 17	w	G	T	C	S 11	w	G	T	C
A 19	w	G	C	C	S 12	m	A	C	C
A 22	w	G	T	C	S 13	w	G	T	C
A 23	m	A	T	C	S 14	m	G	C	T
A 24	m	A	T	T	S 15	w	A	C	C
A 25	m	A	C	T	S 16	m	G	C	C
A 26	m	G	C	C	S 17	m	G	T	C
A 27	m	G	T	C	S 18	m	A	T	C
A 29	m	G	T	C	S 19	m	G	C	C
A 32	w	G	C	C	S 20	w	G	C	T
A 33	w	G	T	T	S 21	m	G	T	C
A 34	m	G	T	C	S 22	m	A	T	C
A 35	w	G	C	C	S 23	m	A	C	C
A 36	m	G	T	C	S 24	m	G	C	C
A 37	m	A	T	C	S 26	w	A	T	C
A 39	w	G	T	T	S 27	m	G	T	C
A 41	w	G	T	C	S 28	m	A	C	C
A 42	w	G	T	C	S 30	w	A	T	C
A 44	m	A	T	T	S 31	m	G	T	C
A 46	m	G	T	C	S 32	w	A	T	C
A 47	m	G	C	C	S 34	w	G	C	T
A 48	m	G	T	C	S 35	m	A	T	T
A 49	m	A	T	C	S 38	m	G	C	T
A 50	m	G	T	C	S 39	m	G	T	C
A 51	m	A	T	C	D 89/11				
					S1a	m	A	T	T
					S 4	m	G	T	C
					S 5	m	A	C	C

S 6	w	A	T	C	S 48	w	A	T	C
S 7	m	A	C	C	S 49	w	G	T	C
S 8	m	A	C	C	S 50	m	A	T	T
S 9	m	G	C	C	S 51	w	A	C	C
S 10	m	G	C	C	S 52	m	G	T	C
S 11	w	G	T	T	S 53	w	A	T	T
S 12	w	G	C	C	S 55	m	A	C	C
S 13	w	G	T	T	S 56	m	G	T	C
S 14	m	G	T	T	S 57	w	G	T	C
S 15	m	G	T	C	S 58	m	G	C	C
S 16	w	G	T	C	S 59	m	G	C	C
S 17	m	G	T	T	S 60	m	G	C	T
S 18	m	G	T	T	S 61	w	G	T	C
S 19	w	G	T	C	S 62	w	G	C	C
S 20	w	G	C	T	S 63	w	G	T	C
S 21	m	G	T	T	S 64	m	G	T	C
S 22	m	A	T	C	S 65	m	A	T	C
S 23	m	G	T	T	S 66	w	A	T	C
S 24	m	G	C	C	S 67	w	A	C	C
S 25	w	G	T	T	S 68	m	G	T	C
S 26	m	A	T	T	S 69	m	G	T	C
S 27	m	G	T	T	S 70	m	G	T	C
S 28	m	G	T	T	S 71	w	A	T	C
S 29	m	A	T	C	S 72	m	A	C	C
S 30	m	G	C	C	S 73	m	A	C	C
S 31	m	G	T	C	S 74	w	G	C	C
S 32	w	G	C	C	S 75	m	G	C	C
S 33	w	G	T	C	S 76	w	A	T	C
S 34	w	G	C	T	S 77	w	A	C	C
S 35	w	G	T	T	S 78	m	G	C	C
S 36	w	G	T	C	S 79	m	A	T	T
S 37	m	G	T	T	S 80	w	G	C	C
S 38	m	G	T	C	S 81	m	G	C	T
S 39	m	G	T	C	S 82	w	A	T	T
S 40	m	A	T	C	S 83	w	A	T	C
S 41	w	G	C	C	S 84	m	G	T	C
S 42	m	G	T	C	S 85	w	G	C	C
S 43	w	G	T	T	S 86	m	G	T	C
S 44	m	G	C	C	S 87	w	A	T	C
S 45	w	G	C	C	S 88	w	G	T	C
S 46	m	A	T	T	S 89	m	G	C	C
S 47	w	G	T	T	S 90	m	A	T	C

S 91	m	A	C	C
S 92	m	G	T	C
S 93	m	A	C	C
S 94	m	A	C	T
S 95	m	G	C	C
S 96	m	A	C	C
S 97	m	A	T	C
S 98	w	G	T	C
S 99	w	G	T	C
S 100	w	A	T	T
S 101	w	G	C	T
S 102	w	A	T	T
S 103	w	A	C	C

Kontrolle	G3010A	C7028T	T16519C
------------------	---------------	---------------	----------------

221/08	w	A	T	C
223/08	w	G	C	C
225/08	w	A	C	C
227/08	w	G	C	C
228/08	m	A	C	C
235/08	m	A	T	C
242/08	w	A	T	C
243/08	m	A	T	C
327/08	w	A	C	T
329/08	w	A	C	C
332/08	m	G	C	T
K 34	w	A	C	C
K 35	w	G	T	C
K 36	m	G	C	C
K 37	m	G	C	C
K 38	w	G	C	C
K 39	w	G	C	C
K 40	w	G	C	C
K 41	w	G	C	C
K 42	w	G	C	C
K 43	w	A	T	T
K 44	m	A	C	T
K 45	m	A	T	T
K 46	w	G	T	C
K 47	w	G	C	C

K 49	w	A	C	T
K 50	m	A	C	T
K 51	w	G	T	C
K 52	m	G	C	C
K 53	m	G	C	C
K 54	m	G	C	C
K 55	w	G	C	C
K 56	m	G	T	C
K 57	m	A	C	T
K 58	w	G	T	C
K 59	w	A	T	T
K 60	m	A	C	T
K 61	w	G	T	C
K 62	m	G	T	C
K 63	m	G	T	C
K 64	w	A	C	T
K 66	m	A	T	T
K 67	m	A	T	T
K 68	w	G	C	C
K 69	m	G	C	C
K 70	w	G	T	C
K 71	w	G	T	C
K 72	w	A	C	T
K 73	m	G	T	C
K 75	m	G	C	C
K 76	w	G	T	C
K 77	m	G	T	C
K 79	m	G	T	C
K 80	m	G	C	C
K 81	m	G	C	C
K 82	w	G	C	C
K 83	m	G	T	C
K 84	m	A	C	T
K 85	w	G	T	C
K 86	w	G	C	C
K 87	m	G	C	C
K 88	m	A	C	T
K 89	w	G	T	C
K 90	m	G	T	C
K 91	m	A	T	T
K 92	m	G	T	C
K 93	m	G	C	C

K 94	w	G	C	C	K 143	m	G	C	C
K 95	w	A	T	T	K 150	m	G	C	C
K 96	m	G	T	C	K 152	m	G	T	C
K 97	w	G	C	C	K 156	m	G	T	C
K 98	w	G	C	C					
K 99	m	G	T	C					
K 100	m	G	C	C					
K 101	m	G	T	C					
K 102	m	G	T	C					
K 103	w	G	C	C					
K 104	m	G	C	C					
K 105	m	G	T	C					
K 106	w	G	T	C					
K 107	w	G	T	C					
K 108	w	G	T	C					
K 109	m	G	T	C					
K 110	m	A	T	T					
K 111	m	G	T	C					
K 112	w	G	T	C					
K 113	w	G	C	C					
K 114	m	G	T	C					
K 115	w	G	C	C					
K 116	w	A	C	T					
K 117	m	G	C	C					
K 118	w	G	T	C					
K 119	m	G	C	C					
K 120	w	A	C	T					
K 121	w	G	T	C					
K 122	m	G	T	C					
K 123	w	G	C	C					
K 124	w	G	C	C					
K 127	m	G	C	C					
K 128	m	G	T	C					
K 129	m	A	T	T					
K 130	m	G	T	C					
K 134	m	G	C	C					
K 135	m	G	T	C					
K 136	m	A	T	T					
K 137	m	G	T	C					
K 138	m	G	T	C					
K 140	m	A	C	T					
K 141	m	G	T	C					

Tabelle 21: Übersicht der Rohdaten

7 Literaturverzeichnis

- Aikhionbare FO, Mehrabi S, Kumaresan K, Zavareh M, Oatinwo M, Odunsi K, Patridge E (2007): Mitochondrial DNA sequence variants in epithel ovarian tumor subtypes and stages. *J Carcinog* 6(1): 1-7
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of the Cell*. 5 edition; Garland Science, New York 2007
- Althoff H: Der plötzliche Kindstod; in: *Praxis der Rechtsmedizin für Mediziner und Juristen*; hrsg. v. Forster B; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1986, 62-75
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Buijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F et al. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465
- Arnestad M, Opdal Sh, Musse Ma, Vege A, Rognum To (2002): Are substitutions in the first hypervariable region of the mitochondroial DNA displacement-loop in sudden infant death syndrome due to maternal inheritance. *Acta Paediatr* 91(10): 1060-1064
- Bajanowski T, Poets C (2004): Der plötzliche Säuglingstod. *Dtsch Arztebl* 101(47): 3185
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005): Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120: 483-495
- Bar-Yishay E, Gaides M, Goren A, Szeinberg A (2011): Aeration properties of a new sleeping surface for infants. *Pediatr Pulmonol* 46(2): 193- 198
- Beal SM (1992): Siblings of sudden infant death syndrome victims. *Clin Perinatol* 19: 839-848
- Beal SM, Blundell HK (1988): Recurrence incidence of sudden infant death syndrome. *Arch Dis Child* 63(8): 924-930

- Beckwith JB: Discussion of the terminology and definition on the sudden infant death syndrome. In: Bergmann AB, Beckwith JB, Ray CC (hrsg.): Sudden infant death syndrome. Proceedings of the second International conference on the causes of sudden infant death in infants, University of Washington Press, Seattle London 1970. 83-139
- Beckwith JB (2003): Defining the sudden infant death syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med* 157: 286-290
- Bélangier M, Allaman I, Magistretti PJ (2011): Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14: 724-738
- Boles RG, Das K, Zaki EA (2010): Two common mtDNA polymorphisms are associated with sudden infant death syndrome (SIDS). *Mitochondrion* 10: 219-220
- Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, Wallace DC (2005): MITOMAP: a human mitochondrial genome database-2004 update. *Nucleic Acids Res* 33: 611-613
- Byard RW (2010): Sudden unexpected death in infancy (SUDI)—the role of the pathologist. *Curr Pediatr Rev* 6(1): 21-26
- Byard RW, Krous HF (2003): SIDS: overview and update. *Pediatr Dev Pathol* 6(2): 112-127
- Camilleri M, Carlson P, Zinsmeister AR, McKinzie S, Busciglio I, Burton D, Zaki EA, Boles RG (2009): Mitochondrial DNA, gastrointestinal motor and sensory functions in health and functional gastrointestinal disorders. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296(3) 510-516
- Carvajal A, Cora-Patón T, Martín de Diego I, Martín Arias LH, Álvarez-Requejo A, Lobato A (1996): DTP vaccine and infant sudden death syndrome. Meta-analysis. *Med Clin* 106(17): 649-652
- Chen XJ, Butow RA (2005): The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet* 6(11): 815-825

- Courts C, Madea B (2010): Genetics of the sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int* 203(1-3): 25-33
- Deixler E (2009): Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) caused by ATP-depletion following hyperventilation, tissue-hypoxia and hypermetabolism-a hypothesis. *Z Geburtshilfe Neonatol* 213(4): 122-134
- Divne AM, Råsten-Almqvist P, Rajs J, Gyllensten U, Allen M (2003): Analysis of the mitochondrial genome in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr* 92: 386-388
- Filiano JJ, Kinney HC (1994): A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple risk model. *Biol Neonate* 65(3): 194-197
- Gaarder J: *Durch einen Spiegel, in einem dunklen Wort*. 1. Auflage; Carl Hanser Verlag, München 1996
- Galland BC, Taylor BJ, Bolton D (2002): Prone versus supine sleep position: A review of the physiological studies in SIDS research. *J Paediatr Child Health* 38(4), 332-338
- Ganten D, Ruckpaul K: *Grundlagen der Molekularen Medizin*. 3.Auflage; Springer Verlag ,Heidelberg 2007
- Goldberg J, Hornung R, Yamashita T, Wehrmacher W (1986): Age at death and risk factors in sudden infant death syndrome. *Aust Paediatr J* 22(1): 21-28
- Gregersen M, Rajs J, Laursen H, Baandrup U, Frederiksen P, Gidlund E: Pathology criteria for the Nordic Study of SIDS. In: *Sudden infant death syndrome: new trends in the Nineties*. hrsg. v. Rognum TO; Scandinavian University Press, Oslo Kopenhagen Stockholm 1995, 50-58
- Guntheroth WG, Lohmann R, Spiers PS (1990): Risk of SIDS in subsequent siblings. *J Pediatr* 116: 520-4

- Hentze MW, Kulozik AE, Hagemeyer C, Bartram CR: Molekulare Medizin: Grundlagen, Pathomechanismen, Klinik. 1.Auflage; Gruyter Verlag, Berlin 2000
- Hofmann S, Jaksch M, Bezold R, Mertens S, Aholt S, Paprotta A (1997): Population genetics and disease susceptibility: characterizations of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D-Loop variants and association with disease. *Hum Mol Genet.* 6: 1835-46
- Horne RSC, Witcombe N, Yiallourou S, Scaillet S, Thiriez G, Franco P (2010): Cardiovascular control during sleep in infants: implications for sudden infant death syndrome. *Sleep Med* 7:615-621
- Hunt CE, Hauck FR (2006): Sudden infant death syndrome. *CMAJ* 174(13): 1861-1869
- Jensen LL, Rohde MC, Banner J, Byard RW (2012): Reclassification of SIDS cases-a need for adjustment of the San Diego classification. *Int J Legal Med* 126(2): 271-277
- Kahn A, Groswasser J, Rebuffat E, Sottiaux M, Blum D, Foerster M (1992): Sleep and cardiorespiratory characteristics of infant victims of sudden death: a prospective case-control study. *Sleep* 15: 287-292
- Kelmanson A (1996): An assessment of behavioural characteristics in infants who died of sudden infant death syndrome using the early infancy temperament questionnaire. *Acta Paediatr* 85(8): 977-980
- Kinney HC, Thach BT (2009): The sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 361(8): 795-805
- Kinney HC, Richerson GB, Dymecki SM, Darnall, Nattie EE (2009): The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. *Annu Rev Pathol* 4: 517-550

- Kinney HC, Rognum TO, Nattie EE, Haddad GG, Hyma B, Mc Entire B, Paterson DS, Crandall J, Byard RW (2012): Sudden and unexpected death in early life: proceedings of a symposium in honor of Dr. Henry F. Krous. *Forensic Sci Med Pathol* 8(4): 414-425
- Kleemann WJ, Bajanowski T: Plötzlicher Tod im Säuglings- und Kindesalter. In: *Handbuch gerichtliche Medizin*; hrsg v. Madea B, Brinkmann B; Springer Verlag, Berlin 2004, 1071-1128
- Kleemann WJ, Schlaud M, Poets CF, Rothämel T, Tröger HD (1996): Hyperthermia in sudden infant death. *Int J Legal Med* 109(3): 139-42
- Klitschar M, Reichenpfader B, Saternus KS (2008): A functional polymorphism in the tyrosine hydroxylase gene indicates a role of noradrenalinergic signaling in sudden infant death syndrome. *J Pediatr* 153(2): 190-193
- Köhnemann S, Sibbing U, Pfeiffer H, Hohoff C (2008): A rapid mtDNA assay of 22 SNPs in one multiplex reaction increases the power of forensic testing in European Caucasians. *Int J Legal Med* 122(6): 517-523
- Koopman WJH, Distelmair F, Smeitink JAM, Willems PHGM (2012): OXPHOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J* 10: 1-21
- Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlick R, Keens TG, Mitchell EA (2004): Sudden infant death syndrome and unclassified sudden Infant deaths: a definitional and diagnostik approach. *Pediatrics* 114(1): 234-238
- L'Hoir MP, Engelberts AC, Van Well GT, McClelland S, Westers P, Dandachli T, Mellenbergh GJ, Wolters WH, Huber J (1998): Risk and preventive factors for cot death in The Netherlands, a low-incidence country. *Eur J Pediatr*, 157(8): 681-688
- Linz U, Degenhardt H (1990): Polymerase chain reaction, an overview. *Naturwissenschaften*. 77(11): 515-530

- Martin R: Elektrophorese von Nukleinsäuren. 1.Auflage; Springer Spektrum Verlag, Heidelberg 1996
- Mc Donnell-Naughton M, Mc Garvey C, O'Regan MO, Matthews T (2012): Maternal smoking and alcohol consumption during pregnancy as risk factor for sudden infant death. *Ir Med J* 105(4): 105-8
- Meissner C (2007): Mutations of mitochondrial DNA- cause or consequence of the ageing process. *Z Gerontol Geriatr* 40: 325-333
- Millat G, Kugener B, Chevalier P, Chahine M, Huang H, Malicier D, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R (2009): Contribution of long-QT syndrome genetic variants in sudden infant death syndrome. *Pediatr Cardiol* 30(4): 502-509
- Mitchell EA (1991): Cot death: should the prone sleeping position be discouraged. *J Paediatr Child Health* 27(6): 319-321
- Mitchell EA, Milerad J (2006): Smoking and the sudden infant death syndrome. *Rev Environ Health* 21(2): 81-103
- Mitchell EA, Blair PS (2012): SIDS Prevention: 3000 lives saved but we can do better. *N Z Med J* 125(1359): 50-57
- Mitchell EA, Brunt JM, Everard C (1994): Reduction in mortality from sudden infant death syndrome in New Zealand: 1986-92. *Arch Dis Child* 70: 291-294
- Mitchell EA, Tuohy PG, Brunt JM, Thompson JM, Clements MS, Stewart AW, Ford RP, Taylor BJ (1997): Risk factors for sudden infant death syndrome following the prevention campaign in New Zealand: a prospective study. *Pediatrics*. 100(5): 835-840
- Mitchell EA, Krous HF, Donald T, Byard RW (2000): An analysis of the usefulness of specific stages in the pathologic investigation of sudden infant death. *Am J Forensic Med Pathol* 21(4): 395-400

- Mitchell EA, Bajanowski T, Brinkmann B, Jorch G, Stewart AW, Vennemann MM (2008): Prone sleeping position increases the risk of SIDS in the day more than at night. *Acta Paediatr* 97(5): 584-589
- MITOMAP (2012), Mitochondrial DNA Map; www.mitomap.org [abgerufen am 23.12.2012]
- Moon RY, Horne RSC, Hauck FR (2007): Sudden infant death syndrome. *Lancet* 370(9598): 1578-1587
- Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornalley PJ, Partidge L, Gems D (2011): Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab* 13(4): 361-366
- Nass S, Nass MM (1963): Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J Cell Biol* 19: 613-629
- Neckelmann N, Li K, Wade RP, Shuster R, Wallace DC (1987): cDNA sequence of a human skeletal muscle ADT/ATP translocator: lack of a leader peptide, divergence from a fibroblast translocator cDNA, and coevolution with mitochondrial DNA genes. *Proc Natl Acad Sci* 84(21): 7580-7584
- Opdal SH, Rognum TO (2004): The sudden infant death syndrome gene: does it exist?. *Pediatrics* 114(4): 506-512
- Opdal SH, Rognum TO (2010): Gene variants predisposing to SIDS: current knowledge. *Forensic Sci Med Pathol* 7(1): 26-36
- Opdal SH, Rognum TO, Vege A, Atave Ak, Dupuy BM, Egeland T (1998): Increased number of substitution in the D-Loop of mitochondrial DNA in the sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr* 87(10): 1039-1044
- Opdal SH, Rognum TO, Tøgersen H, Vege A (1999): Mitochondrial DNA point mutations detected in four cases of sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr* 88(9): 957-960

- Opdal SH, Vege A, Egeland T, Musse A, Rognum TO (2002): Possible role of mtDNA mutations in sudden infant death. *Pediatr Neurol* 27(1): 23-29
- Opdal SH, Vege A, Arnestad M, Musse MA, Rognum TO (2007): Mitochondrial tRNA genes and flanking regions in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr* 96(2): 211-214.
- Paterson DS, Trachtenberg FL, Thompson EG, Belliveau RA, Beggs AH, Darnall R, Chadwick AE, Krous HF, Kinney HC (2006): Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome. *JAMA* 296(17): 2124-2132
- Plattner H, Hentschel J: *Zellbiologie*. 4.Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2011
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: *Duale Reihe: Biochemie*. 2. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2008
- Riße M: *Bedeutung und Wertigkeit morphologischer Befunde an Halsorganen unter forensisch-differentialdiagnostischen Aspekten. Eine rechtsmedizinische Studie zur Problematik des Plötzlichen Kindstodes (SIDS)*. Tectum Verlag, Marburg 2001
- Rognum TO, Willinger M: The story of the „Stavanger Definition“; in: *Sudden infant death syndrome: new trends in the Nineties*; hrsg. v. Rognum TO; Scandinavian University Press, Oslo Kopenhagen Stockholm 1995, 21-25
- Rugarli E, Langer T (2012): Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J* 31(6): 1336-1349
- Saraste A (1999): Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* 24(3): 189-195
- Saturnus KS: Plötzlicher Kindstod- eine Folge der Bauchlage?; in : *Festschrift für Horst Leithoff*; hrsg. V. Walther G, Haffner H-T; Kriminalstatistikverlag, Heidelberg 1985, 67-88

- Scarpulla RC (2006): Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 97(4): 673-683
- Schlaud M, Dreier M, Debertin AS, Jachau K, Heide S, Giebe B, Sperhake JP, Poets CF, Kleemann WJ (2010): The German case-control scene investigation study on SIDS: epidemiological approach and main results. *Int J Legal Med* 124(1): 19-26
- Scholle S, Glaser S, Zwacka G, Scheidt B (1990): The diagnosis of sleep apnea-possibility for the prevention of SIDS. *Klin Padiatr* 202(6): 391-395
- Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn, destatis (2012), Todesursachenstatistik; www.destatis.de [abgerufen am 21.09.2012]
- Tursz A, Crost M, Gerbouin-Rérolle P, Cook JM (2010): Underascertainment of child abuse fatalities in France: retrospective analysis of judicial data to assess underreporting of infant homicides in mortality statistics. *Child Abuse Negl* 34: 534-544
- Vennemann MM, Hense HW, Bajanowski T, Blair PS, Complojer C, Moon RY, Kiechl-Kohlendorfer V (2012): Bed sharing and the risk of sudden infant death syndrome: can we resolve the debate. *J Pediatr* 160(1): 44-48
- Wallace DC (1992): Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases. *Science* 256(5057): 628-632
- Wallace DC (2005): A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39: 359-407
- WHO, World Health Organization (2012), Klassifikation SIDS (ICD 10-R95); www.who.int [abgerufen am 01.07.2012]
- Willinger M, James LS, Catz C (1991): 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(5): 677-684

Zinka B, Rauch E, Penning R, Graw M. 2004: Sudden infant death (SID). Gibt es den plötzlichen Säuglingstod. Pädiatrie hautnah 1: 41-45

