

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

**Genetische Polymorphismen im Serotonintransportergen und  
Risikofaktoren für das SIDS (*Sudden Infant Death Syndrome*)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Dorothee Geisenberger**

aus

Landsberg am Lech

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Brockmüller

III. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 2011

---

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Der plötzliche Säuglingstod (SIDS)	1
1.2 Serotonin im zentralen Nervensystem	6
1.3 Der Serotonintransporter	10
1.4 Möglicher Pathomechanismus beim SIDS	16
1.5 Ziele der Arbeit	17
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Die Fälle von plötzlichem Kindstod	19
2.1.1 Probenmaterial	19
2.1.2 Klinische Daten	22
2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion zur Amplifikation der DNA-Sequenzen	23
2.3 Schneiden der DNA-Fragmente mit Enzymen	28
2.4 Fragmentlängenuntersuchung mittels Elektrophorese	30
2.4.1 Fluoreszenzmarkierter Primer zum Nachweis der Allele des VNTR im zweiten Intron	30
2.4.2 Unmarkierte Primer	31
2.5 Statistik	33
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1 Epidemiologie und Verteilung der Risikofaktoren	36
3.2 Häufigkeitsverteilung der Genotypen und Allele	38
3.2.1 Häufigkeit der <i>gain-of-function</i> -Mutation (Ile425Val)	38
3.2.2 Analyse der Genotypen- und Allelverteilung des Promotor-Polymorphismus	39
3.2.3 Analyse der Genotypen- und Allelverteilung des Polymorphismus im zweiten Intron	41
3.3 Kombination der Genvarianten des Promotor-Polymorphismus und des Polymorphismus im zweiten Intron	45
3.4 Genetische Polymorphismen des 5-HTT und Risikofaktoren für das SIDS	47

<b>4. Diskussion</b>	<b>50</b>
4.1 Diskussion der Ergebnisse	50
4.1.1 Polymorphismen im Serotonintransportergen und das SIDS	52
4.1.2 Verteilung der Genotypen im Bezug auf epidemiologische Risikofaktoren	61
4.2 Die Population der SIDS-Fälle	63
4.3 Methoden zur Genotypisierung	63
4.4 Ausblick	65
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6. Anhang: Abbildung 25 bis 27</b>	<b>68</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1	8
Abbildung 2	12
Abbildung 3	13
Abbildung 4	14
Abbildung 5	15
Abbildung 6	16
Abbildung 7	21
Abbildung 8	25
Abbildung 9	29
Abbildung 10	31
Abbildung 11	32
Abbildung 12	36
Abbildung 13	36
Abbildung 14	37
Abbildung 15	38
Abbildung 16	39
Abbildung 17	40
Abbildung 18	41
Abbildung 19	42
Abbildung 20	43
Abbildung 21	44
Abbildung 22	46
Abbildung 23	55
Abbildung 24	58
Abbildung 25	68
Abbildung 26	68
Abbildung 27	69

## Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1	23
Tabelle 2	39
Tabelle 3	42
Tabelle 4	45
Tabelle 5	47
Tabelle 6	48
Tabelle 7	49

# 1. Einleitung

## 1.1 Der plötzliche Säuglingstod (SIDS)

Aus „Salomons weises Urteil“: 1. Könige 3, 16-20

„Damals kamen zwei Hurenweiber zum König und stellten sich vor sein Antlitz.

Das eine Weib sprach:

Ach mein Herr!

ich und dieses Weib sind ansässig in einem Haus,

und ich habe in ihrem Beisein im Hause geboren,

und am dritten Tag wars nach meinem Gebären, daß auch dieses Weib gebar,

wir waren allein, kein Fremder mit uns im Haus,

nur wir zwei im Haus,

in der Nacht fand der Sohn dieses Weibes den Tod,

weil sie auf ihm gelegen hatte,

sie erhob sich mitten in der Nacht

und holte meinen Sohn von meiner Seite weg, während deine Magd schlief,

und legte ihn an ihren Busen,

ihren Sohn aber, den toten, legte sie an meinen Busen!“

(aus der Bibel ins Deutsche übersetzt von Buber und Rosenzweig 1929)

Dieser Auszug aus dem Urteil Salomons, das dem Alten Testament entstammt, steht beispielhaft für einen sehr früh beschriebenen Fall eines plötzlichen Säuglingstodes. Schon zu dieser Zeit suchten die Menschen begriffliche Erklärungen für das plötzliche und unerwartete Versterben eines scheinbar gesunden Säuglings.

Im Urteil Salomons wird davon ausgegangen, dass es sich bei diesem Todesfall um einen nichtnatürlichen Tod durch äußeres Ersticken handelte, was lange Zeit als Ursache für den plötzlichen Kindstod zugrundegelegt wurde. Hinzu kamen weitere Theorien wie das Asthma thymicum oder der Status thymicolymphaticus, wobei angenommen wurde, dass ein vergrößerter Thymus zur Einschränkung der Atmung führte.

Diese Hypothesen erwiesen sich als nicht haltbar und wurden im Laufe des letzten Jahrhunderts durch andere abgelöst (Kleemann und Bajanowski 2003). Schließlich zeigte Saternus 1985 als Erster, dass die Bauchlage in plötzlichen Säuglingstodesfällen eine wichtige Rolle spielt. Trotz der Verringerung der Inzidenz durch Aufklärungskampagnen, die vor der Bauchlage warnten, ist in den Industriestaaten der plötzliche Kindstod nach wie vor die häufigste Todesursache von Säuglingen. Ungeachtet aller neuen Erkenntnisse und Erklärungsmodelle, die in den letzten Jahren auch auf molekularer Ebene gewonnen wurden, bleibt die Ursache des plötzlichen Kindstodes bis heute ungeklärt (Poets et al. 2003).

Die Obduktion eines plötzlich verstorbenen Säuglings obliegt üblicherweise dem Aufgabenbereich der Rechtsmedizin, wobei in obigem Urteil des Salomon deutlich wird, welche differentialdiagnostischen Überlegungen zu Todesursache und Todesart seitens der Rechtsmedizin in Betracht kommen, nämlich natürlich oder nichtnatürlich. Im Salomonischen Urteil handelt es sich eher um einen natürlichen, unerwarteten, plötzlichen Tod des Säuglings, als um äußeres Ersticken durch Überliegen (so Riße 1998).

## **Definition**

Für den Begriff des plötzlichen und unerwarteten Kindstods hat sich seit 1970 die amerikanische Bezeichnung des *Sudden Infant Death Syndrome* (SIDS) weltweit verbreitet.

Das *Sudden Infant Death Syndrome* einheitlich zu definieren, stellte ein Problem dar, u.a. weil viele Fach- und Forschungseinrichtungen mit unterschiedlichen Betrachtungsweisen und Interessen daran beteiligt sind (Riße 1998).

Beckwith schlug 1969 die erste standardisierte Definition des plötzlichen Säuglingstodes als „*the sudden 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 zitiert nach Kinney und Thach 2009, S. 795) vor. Diese wurde auf der 2. internationalen Konferenz über die Ursachen des plötzlichen Säuglingstodes in Seattle verabschiedet.

Nach dieser Definition ist für die Diagnose eines SIDS sowohl eine unauffällige Anamnese, als auch das Fehlen einer adäquaten Todesursache nach gründlicher Obduktion nötig.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Definitionen vorgeschlagen, die die Definition von 1969 ergänzen sollten. So forderte 1989 ein Expertenforum in den USA, einberufen vom National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), eine Altersbegrenzung der Definition bis zum 1. Lebensjahr und die Beurteilung der Auffindesituation in die Definition mit aufzunehmen (Beckwith 2003; Krous et al. 2004). Eine Konferenz, die 2004 in San Diego (Kalifornien) abgehalten wurde, stimmte folgender, allgemeiner Definition zu: Das SIDS ist der plötzliche und unerwartete Tod eines Säuglings mit Beginn der fatalen Episode im Schlaf, der auch durch eine komplette Autopsie, Begutachtung der Umstände des Todes und die klinische Anamnese nicht zu erklären ist (Krous et al. 2004).

Bisher wurde jedoch keine dieser Änderungen und Definitionen allgemein anerkannt (Kleemann und Bajanowski 2003; Kinney und Thach 2009) und Widersprüche unter den SIDS-Studien gründen zum Teil im weltweiten Gebrauch mannigfaltiger Definitionen (Kinney und Thach 2009).

### **Epidemiologische Risikofaktoren**

Noch Ende der 80er Jahre ergaben Studien aus Ländern mit hohem Gesundheitsstandard im Mittel eine Inzidenz von einem bis drei SIDS-Fällen pro 1000 Lebendgeburten. Für Deutschland lag die Inzidenzrate bei 1,6‰. Mit dem Erkennen von Risikofaktoren, speziell der Bauchlage, und durchgeführten Aufklärungskampagnen kam es Anfang der 90er Jahre in vielen Ländern zu einem Absinken der Inzidenz, die in Deutschland am Ende der 90er Jahre noch 0,6 bis 0,7 pro 1000 Lebendgeburten betrug (Kleemann und Bajanowski 2003). Obwohl die Zahl der Fälle stark abgenommen hat, ist in den Industrienationen der plötzliche Kindstod immer noch die häufigste Todesursache von Kindern zwischen einem Monat und einem Jahr (Moon et al. 2007). Laut Todesursachenstatistik ereigneten sich im Jahr 2008 in Deutschland insgesamt 220 Fälle von plötzlichem Kindstod. Der Anteil des plötzlichen Kindstodes an der gesamten Säuglingssterblichkeit lag bei 10,3% und die Inzidenz bei 0,32‰ (Statistisches Bundesamt Wiesbaden 2010). Trotz des weltweiten Rückgangs des SIDS besteht ein großer Unterschied in der Inzidenz zwischen den einzelnen Nationen und Ethnien (Moon et al. 2007). Japan hat unter den Industrienationen die niedrigste SIDS-Rate mit 0,09 pro 1000 Säuglingen, in Neuseeland liegt die Rate mit derzeit 0,80 pro 1000 am höchsten und in den USA



liegt die SIDS-Rate bei 0,57 pro 1000 Säuglingen (Kinney und Thach 2009). afroamerikanische Säuglinge versterben jedoch zwei bis drei Mal häufiger im Vergleich zum Landesdurchschnitt (Moon et al. 2007).

Bei der Altersverteilung besteht ein Häufigkeitsgipfel des SIDS zwischen dem 2. und 4. Lebensmonat. Relativ wenige Todesfälle ereignen sich im ersten Lebensmonat. Bei diesen Angaben findet man in der Literatur weitgehende Übereinstimmung. Althoff (1986) sieht in dieser typischen Altersverteilung der plötzlichen Todesfälle keinen Zufall, sondern einen Zusammenhang mit den Entwicklungsbesonderheiten der Säuglinge in diesem Lebensalter. Das Sterbealter ist unabhängig von Risikofaktoren wie der Nationalität oder dem Geschlecht (Goldberg et al. 1986).

Es konnte bei der Geschlechtsverteilung weltweit eine Jungenübersterblichkeit festgestellt werden. Von den meisten Autoren wird ein Verhältnis von etwa 6:4 respektive 60:40% zugunsten der Jungen angegeben. Dies ist nicht mit der höheren Geburtenrate von Jungen in Zusammenhang zu bringen. Die höhere Sterblichkeit von Jungen ist allerdings kein spezifisches Phänomen des SIDS (Kleemann und Bajanowski 2003), auch die Daten des Statistischen Bundesamtes Wiesbaden zeigen einen erhöhten Anteil von Jungen bei der Sterberate aller Kinder innerhalb des ersten Lebensjahres.

Der plötzliche Kindstod tritt weltweit vermehrt in der kalten Jahreszeit auf. Diese Verteilung ist für das SIDS typisch und bei anderen Todesursachen nicht zu beobachten (Kleemann und Bajanowski 2003). Eine Häufung der Fälle tritt in der Periode zwischen Oktober/November bis März/April auf (Althoff 1986). Dieser Umstand lässt an einen Zusammenhang mit Atemwegsinfekten, aber auch mit äußeren Faktoren denken, wie eine Hyperthermie durch zu warme Kleidung, überhitzte Räume oder dicke Bettbedeckung (Kleemann und Bajanowski 2003).

## Exogene und endogene Risikofaktoren

Neben den epidemiologischen werden zahlreiche weitere Risikofaktoren für den plötzlichen Kindstod diskutiert. Von Saternus wurde 1985 die Bauchlage und die Inzidenz des SIDS in Zusammenhang gebracht und eine signifikante Zunahme der Fälle in der untersuchten Region nach Propagierung und Verbreitung der Bauchlage im Zeitraum von 1961 – 1981 festgestellt. Nachdem Ende der 80er Jahre vor der Bauchlage als Hauptrisikofaktor gewarnt wurde, sank die Inzidenz drastisch (s.o.; Kleemann und Bajanowski 2003). Dennoch bleibt diese Schlafposition ein wichtiger Risikofaktor, da immer noch Kinder in die Bauchlage gelegt werden. Es wurde gezeigt, dass die Überwärmung des Schlafzimmers und das enge Einwickeln während des Schlafs gekoppelt mit der Bauchlage das Risiko für das SIDS steigern. Diese Gegebenheiten verhindern, dass Wärme über die Oberfläche der Gesichtshaut abgegeben werden kann, sodass es zu einem Wärmestau kommt (Ponsonby et al. 1993). Weiche Schlafunterlagen sollten genauso wie Schlafen auf dem Sofa oder im Bett der Eltern vermieden werden (Moon et al. 2007). Allerdings sinkt das Risiko, wenn das Kind im Zimmer der Eltern im eigenen Bett schläft (Blair et al. 1999, Kleemann und Bajanowski 2003).

Zu den maternalen Risikofaktoren zählt mitunter junges Alter, womit eine niedrigere Schulbildung, Stillverzicht und unzureichende Schwangerschaftsvorsorge einher gehen können (Riße 1998, Schlaud 1998, Kleemann und Bajanowski 2003). Das Rauchen während der Schwangerschaft, aber auch die Nikotin-Exposition des Kindes durch die Atemluft und über die Muttermilch hat sich als einer der bedeutsamsten Risikofaktoren erwiesen (Riße 1998, Schlaud 1998, Kleemann und Bajanowski 2003, Horne et al. 2004, Saternus 2007, Moon et al. 2007, Kinney und Thach 2009). Auch bei mütterlichem Konsum illegaler Drogen oder Alkohol während der Schwangerschaft, konnte eine deutliche Risikoerhöhung für das SIDS nachgewiesen werden (Kleemann und Bajanowski 2003, Kinney und Thach 2009). Für Kinder, die zu früh geboren werden oder ein erniedrigtes Geburtsgewicht aufweisen, besteht ein bis zu 4fach erhöhtes Risiko, am plötzlichen Kindstod zu versterben (Moon et al. 2007). Eine familiäre Häufung des SIDS ist fraglich, der genaue Risikoanstieg für Geschwister betroffener Kinder ist bis heute nicht bekannt (Riße 1998, Moon et a. 2007).

Auf genetischer Ebene wurden bestimmte Polymorphismen mit dem SIDS in Zusammenhang gebracht. Dabei fokussierte sich die Forschung der letzten 20 Jahre auf Polymorphismen in Genen, die an autonomen Funktionen, der Neurotransmission, am Energiestoffwechsel und der Infektabwehr beteiligt sind (Kinney und Thach 2009). Mutationen, die unmittelbar zum Tod führen, müssen von Polymorphismen abgegrenzt werden, die Säuglinge unter besonderen Bedingungen für den plötzlichen Tod prädisponieren. Mögliche Kandidatengene für das SIDS wurden jüngst identifiziert (Opdal und Rognum 2004), sie codieren beispielsweise für den Komplementfaktor 4 (C4; Schneider et al. 1989), Interleukin-10 (IL-10; Opdal et al. 2003) oder für die Tyrosin-Hydroxylase (TH01; Klitschar et al. 2008). Ein weiteres Kandidatengene stellt der Serotonintransporter (SLC6A4) dar (Narita et al. 2001). Dabei konnten Assoziationen zwischen einem funktionellen Polymorphismus im Promotor sowie einem Polymorphismus im zweiten Intron mit einem erhöhten Risiko für das SIDS gezeigt werden (Weese-Mayer et al. 2003b).

## **1.2 Serotonin im zentralen Nervensystem**

Ein Großteil des Serotonins im Körper ist im Gastrointestinaltrakt und in den Thrombozyten gespeichert, lediglich 0,1% befinden sich im zentralen Nervensystem (Hüther und Rüther 2000).

Störungen des zentralen serotonergen Systems werden mit einer Vielzahl psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Die Serotoninstoffwechselwege sind auch von besonderem Interesse in der SIDS-Forschung, da Serotonin eine breite Spanne von physiologischen Systemen beeinflusst. In mehreren Studien konnten Anomalitäten in der Entwicklung und der Funktion des Serotonin-Systems bei SIDS-Fällen festgestellt werden (Haas et al. 2009).

### **Serotoninsynthese und -abbau**

Den Ausgangsstoff für die Serotoninsynthese bildet Tryptophan, eine essentielle Aminosäure, die durch die Tryptophan-Hydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert wird. Im nächsten Schritt wird das 5-Hydroxytryptophan zu dem

monoaminergen Neurotransmitter Serotonin, auch 5-Hydroxytryptamin (5-HT), decarboxyliert (Starke 2009). Das Schlüsselenzym für die Umwandlung, die Tryptophan-Hydroxylase, wird u.a. in den serotonergen Neuronen der Raphekerne exprimiert (Hüther und Rüter 2000).

Das Serotonin wird über das präsynaptische Neuronenende in den synaptischen Spalt freigesetzt und kann an die Serotonin-Rezeptoren der Postsynapse sowie an Autorezeptoren der Präsynapse binden. Das extrazelluläre Serotonin wird anschließend über den Serotonintransporter wieder in die Präsynapse aufgenommen und entweder über die Enzyme Monoaminoxidase (MAO) A und B abgebaut oder erneut vesikulär gespeichert. Das Hauptendprodukt des Serotoninstoffwechsels im Harn ist die 5-Hydroxyindolessigsäure (Starke 2009).

### **Einflüsse auf die Entwicklung des serotonergen Systems**

Schon bei der Geburt besitzt jedes Neugeborene ein gut ausgereiftes, voll funktionsfähiges serotonerges System, mit weitreichenden Projektionen und einer dichten Kollateralisierung (Hüther und Rüter 2000).

Sehr früh in der Entwicklung der menschlichen, embryonalen Medulla oblongata entstehen die 5-HT Neuronen, wodurch eine Störung des serotonergen Systems durch teratogene Noxen wie Nikotin oder Alkohol möglich ist. Tierexperimentelle Studien zeigten, dass eine Nikotin- und Alkoholexposition (beides Risikofaktoren für das SIDS) während der Schwangerschaft zu langanhaltenden Schäden in der 5-HT Neurotransmission führen können (Kinney 2005).

Nikotin hat neuroteratogene Effekte, was u.U. zu Veränderungen autonomer Funktionen, einschließlich einer verzögerten Weckreaktion (Arousal) bei Hypoxie oder anderen Stimuli, führt (Horne et al. 2004). Diese Effekte können das SIDS-Risiko direkt beeinflussen. Durch Unterlassen des Rauchens während der Schwangerschaft könnte möglicherweise ein Drittel der SIDS-Fälle verhindert werden (Moon et al. 2007).

Eine Beeinflussung des serotonergen Systems ist wahrscheinlich bis zur Ausreifung seiner Projektionen, also etwa bis zum Erreichen des adulten Hirnvolumens, möglich (Hüther und Rüter 2000). Als besonders kritische postnatale Phase in der Entwicklung des 5-HT Systems wird das Säuglingsalter angesehen, da im ersten Lebensjahr schnelle und tiefgreifende Veränderungen bei der Weiterentwicklung der

neuronalen Verknüpfungen als Reaktion auf extraterine Sinnesreize und Stimuli auftreten, die die physiologische Selbstregulation betreffen, an der das serotonerge System beteiligt ist (Kinney 2005, Duncan et al. 2010).

### Kerngebiete und Projektionen

Das serotonerge System der Medulla oblongata besteht aus 5-HT Neuronen, die in den median gelegenen Raphekernen (Nuclei raphes), in medialen respektive lateralen Kerngebieten und in der ventralen Oberfläche liegen (Paterson et al. 2006). Die weitaus meisten serotonergen Neurone des Zentralnervensystems befinden sich jedoch in den Raphekernen (Hüther und Rüter 2000).

Eingeteilt werden die serotonergen Nervenzellgruppen in einen rostralen und einen kaudalen Bereich (s. Abb. 1). Die rostrale Gruppe umfasst den Ncl. raphes medianus, den Nucleus linearis caudalis und den Ncl. raphes dorsalis sowie Zellen außerhalb der Raphekerne in rostral gelegenen Kernen. Der Ncl. raphes magnus, der Ncl. raphes obscurus, der Ncl. raphe pallidus und die 5-HT Neurone in benachbarten Kernen bilden die kaudale Gruppe (Baumgarten und Grozdanovic 1997).

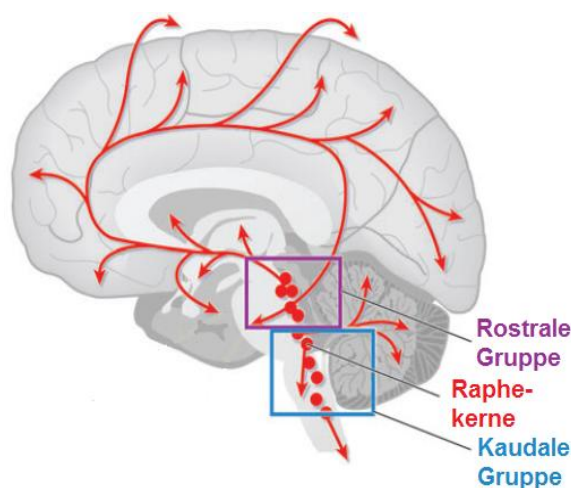


Abbildung 1 Sagittale Ansicht des menschlichen Gehirns, wobei die Raphekerne (Nuclei raphes; rote Kreise), die in eine rostrale und eine kaudale Gruppe eingeteilt werden können, sowie deren unterschiedliche Projektionen (rote Pfeile) hervorgehoben sind. Modifiziert nach Kinney et al., 2009, S. 523

Diese beiden Bereiche, die miteinander in Verbindung stehen, unterscheiden sich nicht nur in ihrer anatomischen Lage, sondern auch in ihrer Funktion und ihren Innervationsgebieten. Neurone aus dem rostralen Bereich liegen im Mittelhirn und

dem höheren Pons (Kinney 2005). Ascendierende Axonstränge ziehen in das laterale und mediale Vorderhirn, um Strukturen wie die Basalganglien, die Amygdala und den Hippokampus zu versorgen. Weitere Axonstränge innervieren unter anderem Anteile des Thalamus und des Hypothalamus sowie den Großhirnkortex (Hüther und Rüter 2000).

Afferenzen aus der kaudalen Gruppe der Raphekerne, in der Medulla oblongata und dem kaudalen Pons ziehen zu den Kleinhirnkernen, zu anderen Hirnstammarealen und zum Rückenmark (Baumgarten und Grozdanovic 1997, Kinney 2005).

Es wird heute davon ausgegangen, dass es im ZNS kaum Neuronen oder Astrozyten gibt, die nicht direkt (synaptisch) oder indirekt (parakrin) von den Raphekernen erreicht und beeinflusst werden können (Hüther und Rüter 2000).

### **Funktion des zentralen serotonergen Systems**

Die weitreichenden und diffusen Projektionen der serotonergen Perikarya des kaudalen und rostralen Bereichs in oben genannte und zahlreiche andere kortikale und subkortikale Strukturen ermöglichen die Modulation vieler zentralnervös gesteuerter Funktionen durch das serotonerge System (Hüther und Rüter 2000). Die rostrale Neuronengruppe ist beteiligt an der Vermittlung der Weckreaktion (Arousal), der Stimmung, der motorischen Aktivität und des cerebralen Blutflusses. Die kaudale Gruppe moduliert die Respiration, die Chemosensitivität (pH-Wert und CO<sub>2</sub>), die kardiovaskuläre Funktion, die Temperaturregulation, die Reflexe der oberen Luftwege, die motorische Aktivität, die Schmerzwahrnehmung und die Weckreaktion (Kinney 2005). Charakteristisch für die serotonergen Neurone der Raphekerne ist eine sehr regelmäßige, rhythmische Eigenaktivität. Wichtig ist jedoch weniger die Aktivität des serotonergen Systems an sich, sondern die Balance und die Homöostase, in der die einzelnen Teilbereiche des zentralen Nervensystems durch das serotonerge System gehalten werden (Hüther und Rüter 2000). Auf Gleichgewichtsstörungen des Stoffwechsels reagiert das serotonerge System modulierend über die Verbindungen zu benachbarten „Effektor“-Kernen. Zu diesen Effektor-Kernen gehören der Ncl. tractus solitarii (Integration der kardiorespiratorischen Wahrnehmung), der Ncl. hypoglossus (Kontrolle der oberen Atemwege, auch während des Schlafs), der prä-Bötzinger Komplex (wahrscheinlich der Generator des Atemrhythmus), der Ncl. phrenicus (Innervation des Zwerchfells),

Ncl. dorsalis nervi vagi (präganglionär parasymphatische Innervation) und der Ncl. ambiguus (Kontrolle des Pharynx und Larynx; Herzfrequenz und Ventrikelkontraktion; Kinney 2005). Opfer des SIDS weisen Störungen in diesen vom serotonergen System regulierten Funktionen auf. Ein Charakteristikum bei den SIDS-Fällen scheint eine fehlerhafte Weck- oder Arousalreaktion zu sein (Kato et al. 2003), ebenso zeigen sie feine Veränderungen der Atmung sowie der autonomen Kontrollmechanismen während des Schlafes (Schlechtman et al. 1996).

### **1.3 Der Serotonintransporter**

Der Effekt des ausgeschütteten Serotonins, inhibitorisch oder exhibitorisch, hängt von den jeweiligen Rezeptorsubtypen (mittlerweile sind 17 bekannt) an der Prä- oder Postsynapse ab (Kinney 2005).

Der Rücktransport des Serotonins in das präsynaptische Neuron durch ein einziges Protein, den Serotonintransporter (5-HTT, SERT) stellt eine funktionelle Schlüsselstelle dar. Der Transporter nimmt 5-HT aus dem synaptischen Spalt auf und reguliert somit die Stärke und Dauer der Wirkung auf postsynaptische Rezeptoren und spielt daher eine zentrale Rolle bei der Feinabstimmung der Neurotransmission (Lesch und Mössner 1998). Der Serotonintransporter gehört, wie auch die Transporter für Dopamin, Noradrenalin, Glycin und gamma-Aminobuttersäure, zu der großen Familie der Neurotransmitter-Natrium-Symporter (NSS). Ihnen gemeinsam sind zwölf hydrophobe Transmembrandomänen (Murphy et al. 2004).

#### **Lokalisation**

Der Serotonintransporter wird im Gehirn und einigen peripheren Organen und Geweben exprimiert (Lesch 1997). Er ist verantwortlich für den aktiven Rücktransport des Serotonins in Neuronen, Thrombozyten, enterochromaffinen und anderen Zellen. Im Gehirn befindet sich der 5-HTT sowohl in der präsynaptischen Membran der Nervenendigungen wie auch in benachbarten dendritischen Zellen (Murphy et al. 2004). Die höchste Dichte des 5-HTT zeigte sich auf den serotonergen Neuronen des Raphe-Komplexes im Mittelhirn (Lesch 1997). Die Konzentrationen von 5-HTT

mRNA ist im Ncl. raphes dorsalis am höchsten, niedriger in den restlichen Raphekernen und am niedrigsten in anderen Gebieten, wie dem Hypothalamus und dem Cortex (Hoffman et al. 1998).

### **Funktion und Wirkmechanismus**

Wie oben bereits erwähnt, terminiert der Serotonintransporter die Dauer und Stärke der Transmitterwirkung.

Wahrscheinlich besitzt der Serotonintransporter an der Zellaußenseite eine einzige Bindungsstelle (Murphy et al. 2004). Bei jedem Transportzyklus werden ein  $\text{Na}^+$  und ein  $\text{Cl}^-$  mit einem positiv geladenen 5-HT-Molekül, im Austausch mit einem  $\text{K}^+$ , gemeinsam transportiert (Lesch 1997). Wenn die Bindungsstelle voll besetzt ist, kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch die Bindungsstelle Zugang zur intrazellulären Oberfläche erhält. Nachdem  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und 5-HT abdissoziiert sind, bindet  $\text{K}^+$  an diese Stelle, um die erneute Konformationsänderung der Bindungsstelle in den Ausgangszustand zu erleichtern. Die Energie für den Transport der Substrate des 5-HTT wird durch eine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase generiert, die den Ionengradienten über der Zellmembran aufrecht erhält (Murphy et al. 2004).

### **Molekulare Struktur**

Das Protein des Serotonintransporters umfasst 630 Aminosäuren (Ramamoorthy et al. 1993, Lesch 1997, Murphy et al. 2004).

Auf struktureller Ebene ist die Funktion des membranständigen Transporterproteins noch nicht vollständig verstanden (Murphy et al. 2004). Als einziges Transportprotein aus der Familie der NSS konnte bislang der bakterielle Leucintransporter (LeuT), der dem menschlichen SERT homolog ist, für strukturelle Analysen herangezogen werden (Singh et al. 2007, Zhou et al. 2007). Die beste Näherung an die Struktur des 5-HTT-Proteins bietet ein Modell mit 12 transmembranären Domänen (Lesch et al. 1995, Lesch 1997, Kilic und Rudnick 2000, Murphy et al. 2004), intrazellulären Amino- und Carboxylenden und einer großen extrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 3 und 4 (s. Abb. 2), die für Stabilität sorgt und an der Proteinfaltung sowie am Einbau in die Membran beteiligt ist (Lesch 1997). Der SERT funktioniert in Form von Dimeren, wobei sich die interagierenden Untereinheiten zu



Komplexen höherer Ordnung verbinden, möglicherweise zu Tetrameren (Kilic und Rudnick 2000).

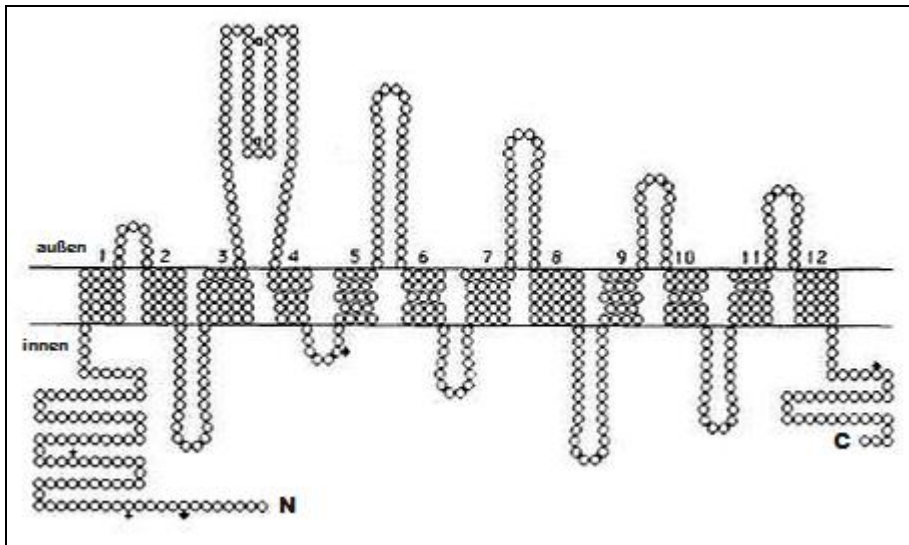


Abbildung 2 Strukturmodell des menschlichen Serotonintransporters, wobei die Kreise einzelne Aminosäuren darstellen. Modifiziert nach Lesch et al., 1995, S. 220

### Genetische Polymorphismen

Das humane Serotonintransportergen (SLC6A4) liegt auf Chromosom 17q11.2 (Ramamoorthy et al. 1993), erstreckt sich über 37,8 kb (Murphy et al. 2004) und enthält 14 Exons (Heils et al. 1996, Lesch 1997).

Die regulatorische 5'-Region (Promotorregion) des 5-HTT-Gens enthält ein TATA-Box-ähnliches Motiv (wichtig für die Transkriptions-Initiation) sowie einige Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, u.a. AP1, AP2, SP1 und CRE-ähnliche Motive (Lesch 1997).

Zusätzlich zu diesen regulatorischen Bindungsstellen wird die Transkriptionsaktivität des Promotors von einer repetitiven Sequenz variabler Länge, 5-HTT linked polymorphic region (5-HTTLPR) genannt, moduliert (Lesch 1997, Murphy et al. 2004). Diese repetitive Sequenz enthält GC-reiche, 20 bis 23 bp lange repetitive Elemente, die 14- respektiv 16-mal wiederholt werden, wobei der Polymorphismus auf der Insertion bzw. Deletion eines 43-bp-Fragmentes beruht, das zwischen den repetitiven Elementen 7 und 9 liegt (s. Abb. 3; Kraft et al. 2005). Die 5-HTTLPR bildet über Guanin eine tetramere Struktur, die positive regulatorische Elemente enthält, aber als Silencer in nicht-serotonergen Zellen wirkt (Lesch 1997).

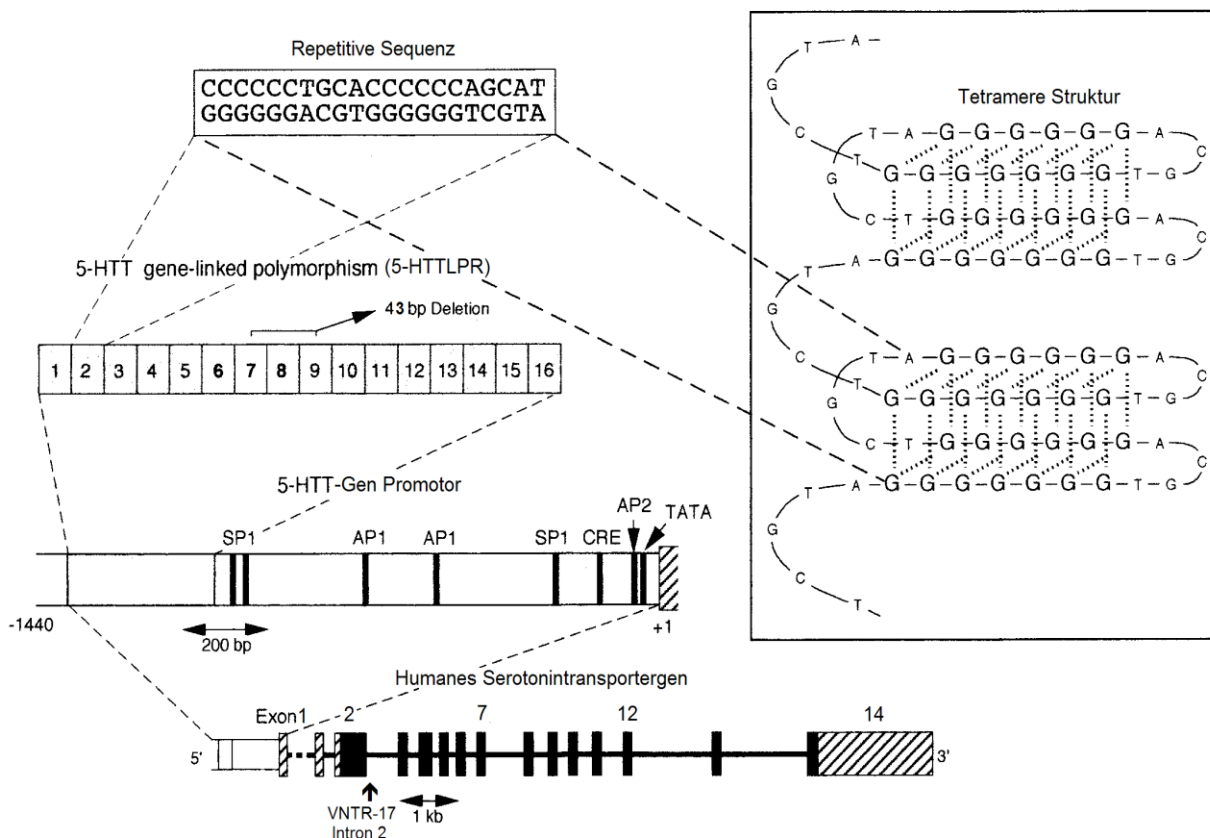


Abbildung 3 Dargestellt ist das humane Serotonintransportergen mit der Promotorregion, in der sich verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren befinden. Vergrößert ist die 5-HTT linked polymorphic region, in der die 44-bp-Deletion bzw. Insertion liegt. Gezeigt sind auch die repetitive Sequenz der 16 Elemente, sowie die tetramere Struktur, die diese bildet. Modifiziert nach Lesch, 1997, S. 683

Bei den 5-HTTLPR Allelen liegen gewöhnlich 14 oder 16 repetitive Elemente vor, Allele mit 18 bis 20 Wiederholungen wurden zwar nachgewiesen, treten aber nur sehr selten auf (Lesch und Mössner 1998). Die Allele mit 14 Wiederholungen werden mit S (short) und die Allele mit 16 Wiederholungen mit L (long) bezeichnet. Die längeren Allele mit bis zu 20 Wiederholungen werden entsprechend mit XL und XXL benannt (Murphy et al. 2004). Beim Vergleich der polymorphen Allele zeigt der Promotor eine höhere Aktivität, wenn das lange Allel L vorliegt (Heils et al. 1996), zudem produzieren Zellen, die homozygot für das L-Allel sind, höhere Konzentrationen an 5-HTT-mRNA (Lesch 1997). Eine Dysfunktion des 5-HTT wurde in vielen Studien mit psychiatrischen Erkrankungen assoziiert (Lesch 1997, Murphy et al. 2004). Den Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Anzahl repetitiver Elemente im Promotor des 5-HTT und dem erhöhten Risiko für das SIDS zeigten als

Erste Narita et al. (2001) in der japanischen Population, da die Allele L und XL häufiger bei den SIDS-Fällen als in der Kontrollgruppe gefunden wurden.

Das L-Allel und der L/L-Genotyp resultieren also in einem höheren mRNA-Spiegel, wodurch letztlich die Wiederaufnahme des Serotonins effektiver wird. Dadurch sinkt der Serotoninspiegel im synaptischen Spalt, was zu einer Dysregulation im serotonergen Nervensystem führen kann und wiederum eine Prädisposition für das SIDS darstellt (Opdal et al. 2008).

Das zweite Intron des Serotonintransportergens enthält einen *variable number of tandem repeat* (VNTR), mit 9, 10 oder 12 Kopien (Allel 9, 10, 12) einer 16 oder 17 bp langen Sequenz (VNTR-17 in Abb. 4). Das Allel mit 9 Sequenzwiederholungen tritt dabei sehr selten auf (Lesch 1997, Lesch und Mössner 1998).

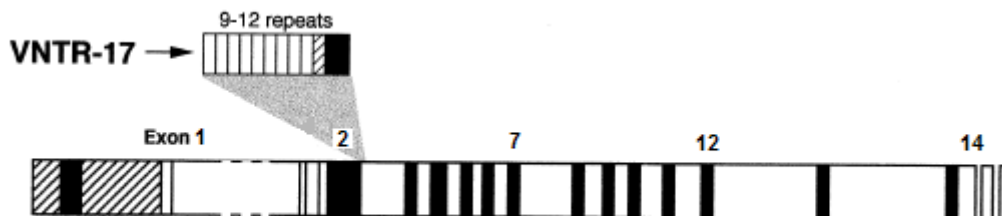


Abbildung 4 Dargestellt ist die Lokalisation des 17-bp-*variable number tandem repeat* im Intron 2 mit 9, 10 oder 12 Wiederholungen. Modifiziert nach Lesch und Mössner, 1998, S. 181

Der VNTR im zweiten Intron kann als Transkriptionsregulator die Expression des 5-HTT-Gens, auch zellspezifisch, beeinflussen. Das Allel 12 zeigte, im Vergleich mit dem Allel 10, eine gesteigerte Expressionsrate, insbesondere bei der Differenzierung von embryonalen Stammzellen trat das Allel 12 als stärkerer Enhancer auf (Fischerstrand et al. 1999).

Der VNTR beeinflusst die Genexpression des 5-HTT in ähnlicher Weise wie der Promotor-Polymorphismus, sodass möglicherweise eine Auswirkung dieses VNTR im zweiten Intron des Serotonintransportergens auf das SIDS-Risiko besteht (Weese-Mayer et al. 2003b). Auf den gesamten Promotor gesehen, kann der VNTR die Verteilung der Transkriptionsfaktoren und die Transkriptionsrate beeinflussen (Fischerstrand et al. 1999).

Ein weiterer Polymorphismus, bei dem an der Nucleotidposition 1273 der kodierenden Sequenz ein Adenin (A) gegen ein Guanidin (G) ausgetauscht wird (Ozaki et al. 2003), führt auf Proteinebene zur Auswechslung der Aminosäuren Isoleucin (Ile, I) zu Valin (Val, V) an der Position 425 (Ile425Val), die in der Transmembrandomäne 8 liegt (s. Abb. 5). Dieser *single nucleotide polymorphism* (SNP) tritt allerdings nur äußerst selten auf (Ozaki et al. 2003, Kilic et al. 2003, Torres und Caron 2003).

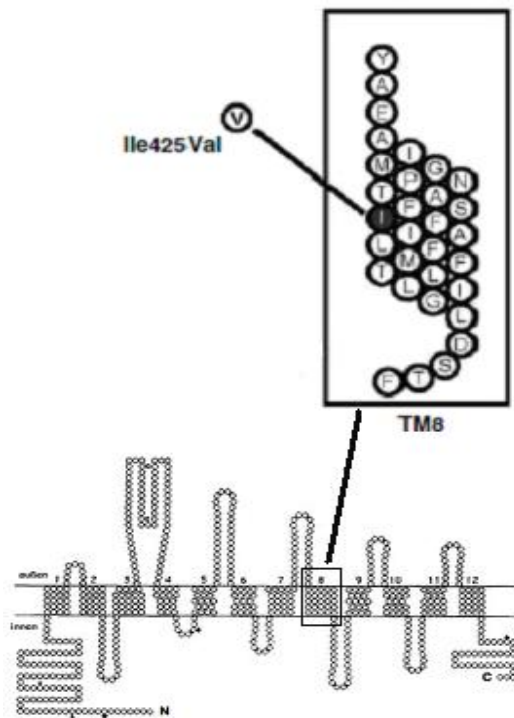


Abbildung 5 Lokalisation der Ile425Val Mutation in der Transmembrandomäne 8 des Serotonintransporters. Modifiziert nach Ozaki et al., 2003, S. 935

Die Untersuchung des mutierten Transporters zeigte eine gesteigerte Aufnahme von Serotonin, ungefähr um das Zweifache, was durch eine Zunahme der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit (höhere  $V_{max}$ ) und eine erhöhte Affinität des 5-HT zum Transporter (niedrigere  $K_m$ ) verursacht wird (Kilic et al. 2003). Der Genotyp Val425 ist also eine *gain-of-function*-Mutation (Ozaki et al. 2003).

Ein Zusammentreffen der oben genannten Polymorphismen, die alle eine Aktivitätssteigerung des Serotonintransporters hervorrufen, kann ein Anpassungsdefizit auf äußere Einflüsse während der frühen Entwicklung verursachen (Ozaki et al. 2003).

## 1.4 Möglicher Pathomechanismus beim SIDS

Bisher wurden verschiedene Theorien, wie beispielsweise eine vegetative Fehlsteuerung, eine Nebenniereninsuffizienz oder ein Mangel an Spurenelementen verdächtigt, ursächlich für das SIDS zu sein (Wilske 1993). Letztlich wurden alle Hypothesen wieder verworfen.

Nach dem „triple-risk Modell“ von Filiano und Kinney (1994) ist das SIDS die Folge des Zusammentreffens von drei verschiedenen Faktoren (s. Abb. 6). Eine vorbestehende Vulnerabilität prädisponiert die Opfer für das Sudden Infant Death Syndrom, zeitgleich befindet sich der Säugling in einem kritischen Entwicklungsstadium (2. bis 4. Lebensmonat) und schließlich wird das SIDS durch einen exogenen Risikofaktor bzw. Stressor ausgelöst. Nach diesem Modell ist es denkbar, dass ein exogenes Ereignis wie der Schlaf in der Bauchlage bei einem Säugling mit einer vorbestehenden Vulnerabilität, beispielsweise durch eine Mutation im Serotonintransportergen, einen plötzlichen Tod auslöst.

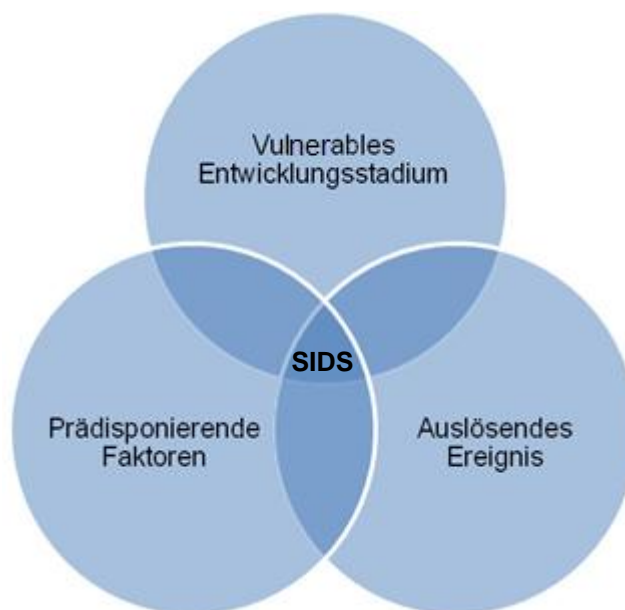


Abbildung 6 Venn-Diagramm zur Darstellung der Faktoren, die in Kombination das Sudden Infant Death Syndrom auslösen können. Modifiziert nach Poets et al., 2003, S. 508

Abweichungen bei der Anzahl und Differenzierung der serotonergen Neurone, bei den 5-HT-Rezeptoren und bei dem 5-HT-Transporter in der Medulla oblongata von SIDS-Fällen konnten im Vergleich mit Kontrollen in mehreren Studien festgestellt

werden (Kinney und Thach 2009). Diese Befunde lassen auf Abnormitäten bei der Synthese, der Freisetzung und der Wiederaufnahme des Serotonins schließen (Paterson et al. 2006). Durch die oben aufgeführten Mutationen im Serotonintransportergen kann der Rücktransport des Serotonins gesteigert werden, sodass die Dauer und die Intensität der Wirkung an den 5-HT-Rezeptoren abnimmt (Weese-Mayer et al. 2003a), was das Gleichgewicht im serotonergen System stört und eine adäquate Antwort auf Stressoren oder exogene Ereignisse behindern kann. Beispielsweise wurde ein Versagen der Weck- oder Arousalreaktion sowie der Schnappatmung mit dem SIDS in Verbindung gebracht. Diese sind wichtige Selbstwiederbelebungsmechanismen, die bei SIDS-Opfern gehemmt sein können (Poets et al. 2003). Zusätzlich können exogene Risikofaktoren wie die Bauchlage, eine Rauchexposition und Atemwegsinfekte die Reflexschwelle z. B. beim Arousal erhöhen (Kahn et al. 2000). Letztlich rufen diese fehlerhaften Schutzmechanismen beim SIDS eine Vulnerabilität hervor, welche, auf noch ungeklärte Weise, erst durch den Schlaf zum Tragen kommen (Kinney und Thach 2009).

Da Serotonin an der Regulation praktisch aller Aspekte beteiligt ist, die mit dem SIDS in Verbindung gebracht werden (Arousal, Schnappatmung, fehlerhafte Reflexe), kommt diesem Transmitter möglicherweise eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese zu (Poets et al. 2003).

## 1.5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit „**Genetische Polymorphismen im Serotonintransportergen und Risikofaktoren für das SIDS (*Sudden Infant Death Syndrome*)**“ soll versucht werden, einen möglichen Zusammenhang einer genetischen Prädisposition durch Mutationen im Serotonintransportergen mit den oben genannten bekannten epidemiologischen Risikofaktoren für einen Säugling, am SIDS zu versterben, aufzuzeigen.

Frühere Arbeiten hatten bereits versucht, einen Zusammenhang der Genotypenverteilung (Allele S, L der 5-HTTLPR; Allele 9, 10, 12 des VNTR) des Serotonintransportergens mit dem Risiko für das SIDS herzustellen. Sie konnten dabei eine Verknüpfung, insbesondere mit dem L-Allel der 5-HTTLPR, feststellen. Ein funktioneller SNP (Ile425Val), der zum Proteinaustausch führt, wurde bislang nur

im Rahmen psychiatrischer Erkrankungen erforscht. Für die vorliegende Arbeit wurden 129 SIDS-Fälle des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Göttingen genotypisiert. Es sollte geprüft werden, ob bei der Verteilung der Allele und der Genotypen ein signifikanter Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe besteht.

Betrachtet wurden:

1. Die Allel- und Genotypenverteilung des Polymorphismus im Promotor (5-HTTLPR)
2. Die Allel- und Genotypenverteilung des VNTR im zweiten Intron
3. Die *gain-of-function*-Mutation Ile425Val.

Weiterhin wurde die Allelverteilung im Bezug auf bekannte epidemiologische Risikofaktoren wie der Jahreszeit, dem Lebensalter und dem Geschlecht dargestellt, um auch hier einen möglichen Zusammenhang abzuleiten.

## **2. Material und Methoden**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand im Nachweis eines Zusammenhangs genetischer Variationen an drei verschiedenen Loci des Serotonintransportergens mit dem plötzlichen Säuglingstod. Weiterhin wurde versucht, eine mögliche Verknüpfung zwischen der Allel- und Genotypenverteilung und epidemiologischen Risikofaktoren herzustellen.

Für die Genotypisierung wurde die aus Blut oder Gewebe extrahierte DNA der 129 am SIDS verstorbenen Säuglinge an den oben genannten Genorten mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion und des Restriktionsendonukleasenverdau untersucht. Die Methoden wurden, falls nicht anders erwähnt, auf der Grundlage des Handbuchs Molecular Cloning (Sambrook et al. 1989) durchgeführt.

### **2.1 Die Fälle von plötzlichem Kindstod**

Das Probenmaterial für die DNA-Analyse stammt aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Göttingen. Es handelt sich um aus Blut oder Gewebe (Thymus, Milz) extrahierte DNA von 129 plötzlich verstorbenen Säuglingen aus den Jahren 1989 bis 2008. Entsprechend der Geschlechtsverteilung der SIDS-Fälle wurde eine Kontrollgruppe, bestehend aus 129 Erwachsenen, an den gleichen Genloci untersucht.

#### **2.1.1 Probenmaterial**

##### **DNA-Extraktion aus Blutproben**

Aus einem Teil der Blutproben war die DNA bereits extrahiert worden und konnte für die Genotypisierung verwendet werden. Aus einigen Blutproben musste die DNA mit Hilfe des DNA IQ™ Systems von Promega (Madison, USA) isoliert werden. Dazu wurden aus asserviertem (tiefgefrorenem) peripherem Blut oder Herzblut 25 µl entnommen.

Die Extraktion der DNA erfolgte nach der Standardarbeitsanweisung des DNA-Labors der Rechtsmedizin in Göttingen, basierend auf dem DNA IQ™ System –



Database Protocol von Promega (2006), unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien Lysepuffer, 2x Waschpuffer, Elutionspuffer und einer Resinsuspension. Dabei wurden zu 93  $\mu\text{l}$  Lysepuffer 7  $\mu\text{l}$  Resin in ein E-Cup (Eppendorf®-Cup) pipettiert, gemischt und die oben genannten 25  $\mu\text{l}$  Blut dazugegeben. Der gesamte Ansatz wurde durchmischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das E-Cup wurde in einen Magnet-Separationsständer eingebracht und der Flüssigkeitsüberstand abgenommen, ohne das Resin-Pellet zu zerstören. Es folgte ein Waschschriff mit je 100  $\mu\text{l}$  Lysepuffer und drei Waschschriffe mit 1x Waschpuffer. Zwischen jedem Schritt wurde die Probe mit dem Vortexer (Top-Mix, Fisher) gemischt. Danach trocknete das Pellet für 5 Minuten bei Raumtemperatur. 80  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer wurden zugegeben und der Ansatz für 5 Minuten bei 65°C inkubiert (Thermo Shaker, Kisker). Nach dem Vortexen wurde die Probe wieder in den Magnet-Separationsständer gestellt, die eluierte DNA in ein neues E-Cup überführt und das Resin-Pellet verworfen.

### **DNA-Extraktion aus Gewebe**

Aus den Gewebeproben wurde die DNA mit dem QIAamp DNA Investigator Kit von Qiagen® (Hilden) isoliert. Vorgegangen wurde dabei nach dem Protokoll für die Isolierung von DNA aus Gewebe aus dem QIAamp® DNA Investigator Handbook (2007) unter Verwendung der mitgelieferten MinElute Säulen, 2 ml Collection Tubes und der Puffer ATL, AL, AW1, AW2, ATE sowie Proteinase K.

Etwa 6 mg formalinfixiertes Gewebe wurde in ein E-Cup überführt und sofort mit 180  $\mu\text{l}$  ATL-Puffer überschichtet. Dazu wurden 20  $\mu\text{l}$  Proteinase K gegeben und durchmischt. Der gesamte Ansatz wurde über Nacht bei 56°C im Heizblock inkubiert, bis das Gewebe vollständig lysiert war. Nacheinander wurden 200  $\mu\text{l}$  AL-Puffer und 200  $\mu\text{l}$  96%iges Ethanol zugefügt, gemischt und dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde kurz zentrifugiert (EBA 21, Hettich), vorsichtig auf eine QIAamp MinElute Säule gebracht und bei 8000 rpm (rounds per minute) für 1 Minute zentrifugiert, um die DNA an das Säulenmaterial zu binden. Die DNA wurde nacheinander mit 500  $\mu\text{l}$  AW1-Puffer, 700  $\mu\text{l}$  AW2-Puffer und 700  $\mu\text{l}$  96%igem Ethanol gewaschen. Verbliebene Reste wurden durch erneute Zentrifugation entfernt und die DNA abschließend mit 50  $\mu\text{l}$  ATE-Puffer eluiert.

## Konzentrations- und Geschlechtsbestimmung der DNA-Proben

Das Plexor<sup>®</sup> HY System von Promega (Madison, USA) für Applied Biosystems Real-Time PCR Systeme machte es möglich, die Konzentration menschlich-autosomaler sowie Y-chromosomaler DNA in den einzelnen Proben zu bestimmen. So konnte auch das Geschlecht jedes SIDS-Falles überprüft werden. Bei einer männlichen Probe lag das Verhältnis von autosomaler zur Y-chromosomalen DNA [Auto]/[Y] in einem Bereich von 0,4 bis 2. Die Methode beruht auf der spezifischen Interaktion zwischen dem Primer, der ein iso-dC Nucleotid enthält und am 5' Ende farbmarkiert ist, und einem im Reaktionsmix enthaltenen iso-dGTP, das mit dem Quencher (Fluoreszenzlöscher) Dabcyl modifiziert ist.

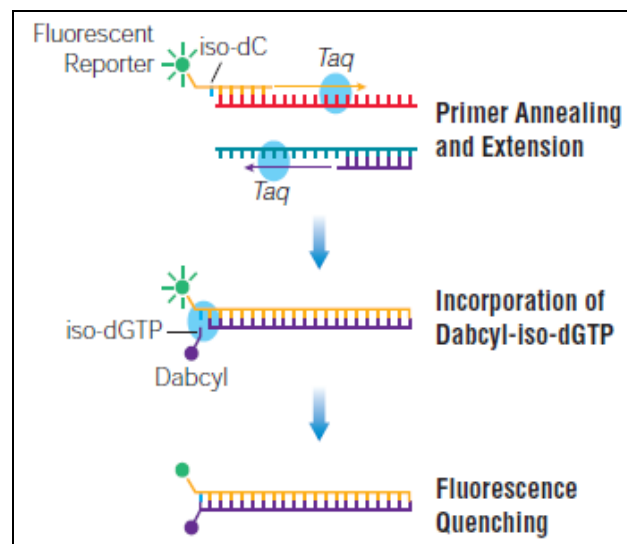


Abbildung 7 Schematische Darstellung des Plexor<sup>®</sup> real-time PCR Verlauf. Aus dem Technical Manual des Plexor<sup>®</sup> HY System for the Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR Systems, 2007, S. 2

Bei der Extension lagert sich das Dabcyl-iso-dGTP komplementär zum iso-dC des Primers an. An dieser Stelle eingebaut, bewirkt das Dabcyl eine Abnahme der Fluoreszenzintensität (s. Abb. 7), was die Konzentrationsbestimmung während der Amplifikation ermöglicht. Die Zunahme von PCR-Produkt geht mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität einher. Die Spezifität der entstandenen Produkte wird anhand ihrer Schmelztemperatur festgelegt, welche anhand einer Schmelzkurve bestimmt wird.

Bei der Durchführung der real-time PCR wurde nach dem Technical Manual für das Plexor<sup>®</sup> HY System for the Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time

RCR Systems von Promega (2007) unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien vorgegangen. Für jede Reaktion wurden 10 µl Plexor<sup>®</sup> HY Master Mix mit 7 µl DNase-freiem Wasser und 1 µl Plexor<sup>®</sup> HY 20x Primer/IPC Mix gemischt und in jede Vertiefung einer 96-well-PCR-Platte 18 µl des Reaktionsmix pipettiert. In die ersten beiden Reihen der Platte wurden je 2 µl einer Verdünnungsreihe als interne Normierung vom Plexor<sup>®</sup> HY Genomic DNA Standard und eine Negativkontrolle doppelt pipettiert, der Rest der Platte wurde mit je 2 µl der SIDS-Proben belegt. Die Amplifikation fand im 7500 Fast Real-Time PCR Gerät statt. Das PCR-Programm beginnt mit einem zweiminütigen Denaturierungsschritt bei 95°C, daran schließen sich 38 Zyklen mit Denaturierung für 5 Sekunden bei 95°C und Annealing und Extension bei 60°C für 35 Sekunden an. Bevor die Daten in die Plexor<sup>®</sup> Analysis Software exportiert werden konnten, mussten sie über die 7500 FAST sequence detection system Software analysiert werden.

### **2.1.2 Klinische Daten**

Vom SIDS sind mehr Jungen als Mädchen betroffen (Verhältnis 6:4). Es tritt vermehrt zwischen dem 2. und 4. Lebensmonat und vor allem während der kalten Jahreszeit auf. In der vorliegenden Arbeit sollte die Allelverteilung der Polymorphismen im Serotonintransportergen im Hinblick auf diese bekannten epidemiologischen Risikofaktoren ausgewertet werden, um einen möglichen Zusammenhang abzuleiten. Für alle der 129 SIDS-Fälle war das Geschlecht bekannt (s.o.). Das Sterbedatum sowie das Alter der Säuglinge waren jedoch nur in 114 der 129 Fälle, also zu 89% bekannt. Weitere Angaben zu Risikofaktoren, wie dem Rauchen der Mutter während und nach der Schwangerschaft oder der Schlafposition, fehlten bei dem überwiegenden Teil der Fälle. Alle 129 SIDS-Fälle waren ebenso wie die Kontrollgruppe Kaukasier.

Jeder der plötzlich verstorbenen Säuglinge wurde einer vollständigen Obduktion unterzogen, wobei nach Ausschluss anderer Ursachen und unter Betrachtung der Todesumstände das SIDS diagnostiziert wurde.

## 2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion zur Amplifikation der DNA-Sequenzen

Das schnelle und sensitive Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, *Polymerase-Chain-Reaction*), das 1984 von Karry Mullis entwickelt wurde, ist eine molekularbiologische Standardmethode zur exponentiellen Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten mit Hilfe von Oligonukleotiden.

### Primersequenzen

Die genutzten Primer wurden von der Firma Biometra (Göttingen) hergestellt. Sie wurden mit einer Konzentration von 0,1 nmol/μl geliefert und konnten in der gewünschten Menge unverdünnt in die PCR eingesetzt werden.

Für die Untersuchung des Polymorphismus im Intron 2 wurden die Primer (5HTT2) von Weese-Mayer et al. (2003b), für den Promotor-Polymorphismus sowie den SNP wurden die Primer (5HTTLPR und Ile425) von Wendland et al. (2006) übernommen:

Name	Primer-Sequenz	Allel-Länge
5HTT2 (VNTR)	Forward: 5´-TGG ATT TCC TTC TCT CAG TGA TTG G-3´ (am 5´-Ende modifiziert mit 6-Fam) Reverse: 5´TCA TGT TCC TAG TCT TAC GCC AGT G-3´	Allel 9: 339 bp Allel 10: 356 bp Allel 12: 390 bp
5HTTLPR (Promotor-region)	Forward: 5´-TCC TCC GCT TTG GCG CCT CTT CC-3´ Reverse: 5´-TGG GGG TTG CAG GGG AGA TCC TG-3´	Allel S: 469 bp Allel L: 512 bp
Ile425 (SNP)	Forward: 5´-TGG AAG CCC CAC CCT TCC TG-3´ Reverse: 5´-CAT CCT CCC ACA GCC CAT TTC C-3´	alle Allele (unverdaut) 365 bp

Tabelle 1 Sequenzen der Primer 5HTT2, 5HTTLPR und Ile425.

Die in Tabelle 1 angegebenen Primersequenzen wurden mit dem DNASTAR Lasergene® v8.1 Programm (GATC Biotech) auf Spezifität und mögliche Fehlhybridisierungen (z. B. hairpins oder Primerdimere) überprüft (Protokolle s. Anhang).

### PCR-Amplifikation

Vor Durchführung der PCR wurden 8-Tube Strips (0.2 ml), 8-Cap Strips (Applied Biosystems), E-Cups und hochreines Wasser (Merck, Darmstadt) unter der Flow-Box (Kojar, Finnland) 30 min mit UV-Licht bestrahlt. Zur Durchführung der PCR wurde für jeden Ansatz, einschließlich Pipettierverlust, ein Mastermix hergestellt:

- hochreines Wasser
- je nach Reaktionsansatz:
  - 10xPCR Puffer (mit 15 mM MgCl<sub>2</sub>) (Applied Biosystems) oder
  - 10xPCR Puffer (ohne MgCl<sub>2</sub>) plus 15 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems) oder
  - GoldStar 10xBuffer (Promega)
- 40 mM Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) (peqlab Biotechnologie, Erlangen)
- Primer je nach PCR (Biometra, Göttingen)
- Ampli Taq® Gold (Applied Biosystems).

Der Mastermix wurde gemischt und kurz abzentrifugiert (EBA 21, Hettich). In jedes Tube wurden 24 µl Mastermix vorgelegt und ca. 1 µl DNA-Probe dazu pipettiert. Vor der Amplifikation im FlexCycler (Twinblock analytikjena, Jena) oder im Gradient Cycler (Biometra, Göttingen) wurde der gesamte PCR-Ansatz mit einer Combispin Tischzentrifuge (peqlab Biotechnologie) für 1 min bei 2400 rpm zentrifugiert. Bei jeder Amplifikation wurde eine Negativkontrolle mitgeführt.

## Optimierung der PCR

Da die Reaktionsprotokolle aufgrund der unterschiedlichen Reagenzien und Geräte nicht direkt aus den Protokollen entsprechender Paper übernommen werden konnten, war es nötig, die PCR an die Gegebenheiten im DNA-Labor der Rechtsmedizin Göttingen anzupassen. Zudem war die Qualität mancher DNA-Proben aufgrund des Alters und der Lagerung mangelhaft, deshalb mussten möglichst optimale Bedingungen für die PCR geschaffen werden.

Mit Hilfe der Gradienten-PCR (Gradient Cycler, Biometra, Göttingen) war es möglich die optimale Annealing-Temperatur jedes Primerpaars zu ermitteln. Dazu wurden zehn PCR-Ansätze mit einer Template-DNA pipettiert und mit Annealing-Temperaturen zwischen 55°C und 65°C amplifiziert. Die einzelnen Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und so die effektivste Annealing-Temperatur ermittelt (s. Abb. 8).

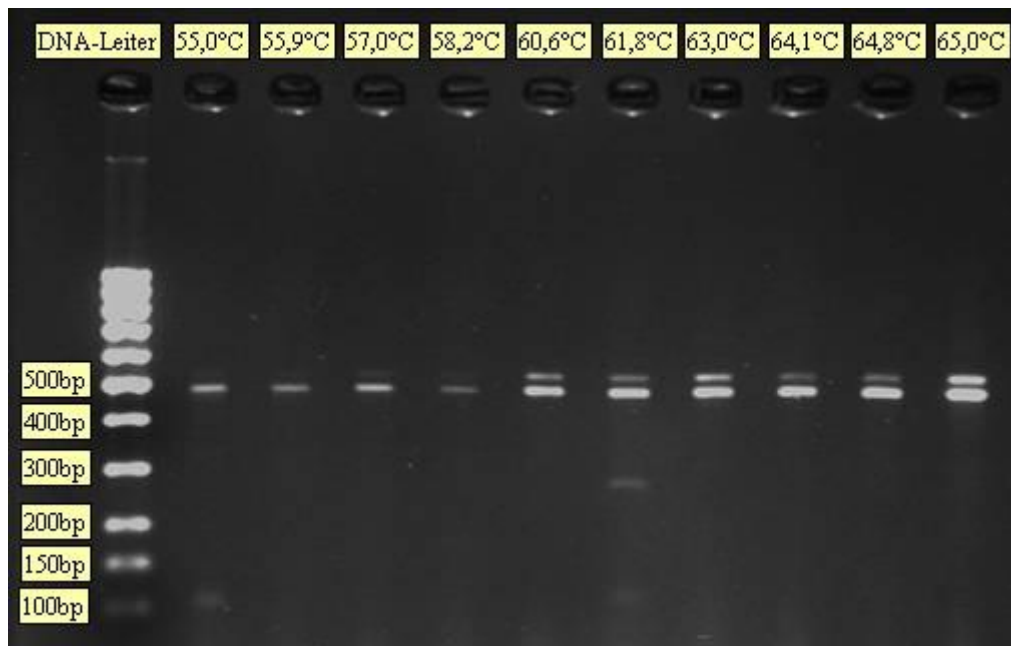


Abbildung 8 Agarosegel zur Darstellung und Auswertung der Gradienten-PCR am Beispiel einer heterozygoten Probe, die mit dem Primer 5HTTLPR (Promotor-Polymorphismus) amplifiziert wurde. Die optimale Annealing-Temperatur liegt bei 65°C, da bei dieser Temperatur die Banden am deutlichsten sind und am meisten Produkt entsteht.

Für jeden PCR-Ansatz der drei untersuchten Genorte wurde die  $MgCl_2$ -Konzentration ( $Mg^{2+}$  war teils schon im Puffer enthalten) sowie die Konzentration von dNTPs und Primern optimiert. Ebenso wurden die Zeiten für Denaturierung, Annealing und

Extension an die vom verwendeten PCR-Gerät abhängigen ramp Zeiten angepasst. Die Zyklenzahl wurde so gewählt, dass eine möglichst hohe Ausbeute erreicht, aber eine zu hohe Fehlhybridisierungsrate vermieden wurde.

Für die PCR mit dem Primer 5HTTLPR wurde der GoldStar 10xBuffer, der u.a. 1600 µg/ml BSA und 2 mM je dNTP enthält, eingesetzt. Bei Proben mit geringer Konzentration wurde 1 µl BSA (0,1 µg/µl; New England Biolabs) zugesetzt, um die Effizienz der PCR zu steigern (Appendix des Invitrogen Katalog 2003).

Es wurde nach folgenden Ansätzen und Programmen gearbeitet:

### PCR-Ansatz und Amplifizierungsprogramm für den Primer 5HTT2 zur Genotypisierung des VNTR im zweiten Intron

PCR-Ansatz:

H <sub>2</sub> O	20,2 µl
10xPCR Puffer (mit 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl
Nucleotide	0,5 µl
Primer 5HTT2 (forward)	0,3 µl
Primer 5HTT2 (reverse)	0,3 µl
Taq Gold	0,2 µl
<u>Template-DNA</u>	<u>ca. 5 – 10 ng</u>
Reaktionsvolumen	25 µl

PCR-Programm (FlexCycler):

Zyklus	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95°C	11 min	1
Amplifikation			37
<i>Denaturierung</i>	94°C	30 s	
<i>Annealing</i>	58°C	30 s	
<i>Elongation</i>	72°C	90 s	
Finale Extension	72°C	10 min	1
	4°C	∞	

## PCR-Ansatz und Cycler-Programm für den Primer 5HTTLPR zur Genotypisierung des Promotor-Polymorphismus (5-HTTLPR)

### PCR-Ansatz:

H <sub>2</sub> O	20,2 µl
GoldStar 10xBuffer	2,5 µl
Nucleotide	0,5 µl
Primer 5HTTLPR (forward)	0,3 µl
Primer 5HTTLPR (reverse)	0,3 µl
<u>Taq Gold</u>	<u>0,2 µl</u>
<u>Template-DNA</u>	<u>ca. 5 – 10 ng</u>
Reaktionsvolumen	25 µl

(Insgesamt sind im Ansatz 1mM dNTPs enthalten.)

### PCR-Programm (Gradient Cycler):

Zyklus	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95°C	15 min	1
Amplifikation			37
<i>Denaturierung</i>	94°C	30 s	
<i>Annealing</i>	65°C	1 min	
<i>Elongation</i>	72°C	1 min	
Finale Extension	72°C	10 min	1
	4°C	∞	



**PCR-Ansatz und Cyclyer-Programm für den Primer Ile425 zur Genotypisierung der *gain-of-function*-Mutation (Ile425Val) mit anschließendem Verdau mit Bccl**

PCR-Ansatz:

H <sub>2</sub> O	17,8 µl
10xPCR Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
Nucleotide	0,5 µl
Primer Ile425 (forward)	0,25 µl
Primer Ile425 (reverse)	0,25 µl
Taq Gold	0,2 µl
<u>BSA (0,1 µg/µl)</u>	<u>1,0 µl</u>
<u>Template-DNA</u>	<u>ca. 5 – 10 ng</u>
Reaktionsvolumen	25 µl

PCR-Programm (FlexCycler):

Zyklus	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95°C	11 min	1
Amplifikation			37
<i>Denaturierung</i>	94°C	30 s	
<i>Annealing</i>	58°C	30 s	
<i>Elongation</i>	72°C	90 s	
Finale Extension	72°C	10 min	1
	4°C	∞	

### 2.3 Schneiden der DNA-Fragmente mit Enzymen

Zur Genotypisierung des A→G SNP, der zum Austausch der Aminosäuren Isoleucin gegen Valin (I425V) führt, wurde das Amplifikat des Primers Ile425 mit dem Restriktionsenzym Bccl verdaut. In unmutierter Form (Ile425) wird das Amplifikat in

zwei Fragmente der Größe 288 und 77 bp geschnitten, bei Vorliegen der Mutation (Val425) bleibt das Fragment von 365 bp unverdaut (Wendland et al. 2006).

Für den Restriktionsverdau wurde das System von New England Biolabs (NEB), bestehend aus Enzym, Puffer und 100x BSA, verwendet. Die Enzymaktivität wird in Units (U) angegeben. Eine Unit ist definiert als die Menge an Restriktionsenzym die 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde bei 37°C vollständig verdaut.

Der PCR-Ansatz (10 µl) wurde in einem Gesamtvolumen von 15 µl mit dem Restriktionsenzym Bccl für zweieinhalb Stunden bei 37°C verdaut. Der Verdau wurde wie folgt angesetzt:

H <sub>2</sub> O	1,5 µl
Restriktionsenzym-puffer NEB 1 (10x)	1,5 µl
BSA (10x)	1,5 µl
Bccl (1:10 verdünnt, 1 µl = 1 U)	0,5 µl
PCR-Ansatz	10 µl

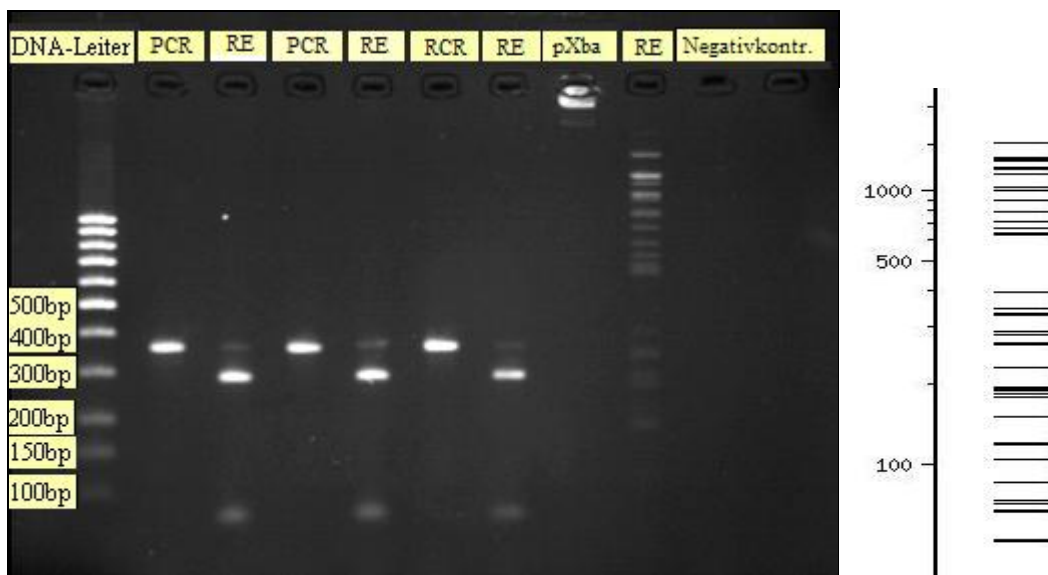


Abbildung 9 2%iges Agarosegel zur Auswertung des Restriktionsverdau mit Positiv- und Negativkontrolle. Links ist die Leiter aufgetragen, dann sind die PCR-Produkte (PCR) mit dem Restriktionsenzymverdau (RE) jeweils rechts daneben aufgetragen. Für die positive Kontrolle (pXba) ist das Schnittmuster nach Verdau (RE) neben dem Gelbild schematisch (die Auftrennung entspricht der eines 2 %igen Agarosegels) dargestellt. Bccl hat 41 Schnittstellen auf dem Kontrollplasmid pXba.

Als positive Kontrolle, zur Verifizierung der Aktivität von BclI, wurde das Kontrollplasmid pXba (NEB) als Substrat in den Restriktionsansatz eingesetzt. Bei jedem Versuchsansatz wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der das Substrat durch Wasser ersetzt wurde. Am Ende des Verdaus wurde das Enzym durch eine Inkubation bei 65°C für 20 Minuten inaktiviert.

## **2.4 Fragmentlängenuntersuchung mittels Elektrophorese**

### **2.4.1 Fluoreszenzmarkierter Primer zum Nachweis der Allele des VNTR im zweiten Intron**

Der Primer 5HTT2 (forward) wurde am 5'-OH-Ende mit dem Farbstoff 6-Fam (blau) fluoreszenzmarkiert. Dies machte es möglich, die bei der Amplifikation entstandenen DNA-Fragmente über die Fragmentanalyse (GeneScan) am ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) zu detektieren.

Der ABI 310 ist ein Fluoreszenz-Kapillargelelektrophoresesystem. Bei der Injektion des Probenmaterials wird für eine definierte Zeit Spannung angelegt und eine regulierte Menge negativ geladener DNA in die Kapillare gezogen. Kleinere Moleküle, wie beispielsweise übrige Primer, wandern dabei schneller in die Kapillaröffnung als die längeren PCR-Produkte (Butler et al. 2004). Eine Elektrode sorgt für die zur Elektrophorese benötigte Spannung (ca. 15 kV, 8 µA). Durch eine Heizplatte wird die Temperatur konstant bei 60°C gehalten. Die Produkte werden beim Durchwandern der mit Polymer gefüllten Kapillare nach ihrer Größe aufgetrennt und passieren einen Laser, der Lichtwellen bestimmter Wellenlänge (488, 514 nm) aussendet. Der vom Laser angeregte Fluoreszenzfarbstoff der DNA-Fragmente emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge, das über einen Spektrograph auf einer Kamera gesammelt wird, der das Licht in elektrische Signale umwandelt. Die Signale werden schließlich von der Collection Software gesammelt, aufgearbeitet und analysiert. Die Daten werden über die GeneScan Analysis Software interpretiert und können dann in Form eines Elektropherogramms ausgewertet werden (ABI Prism 310 Genetic Analyzer User`s Manual 1995). Anhand eines in jeder Probe mitgeführten Standards können die genauen Fragmentgrößen bestimmt werden. Der

interne Standard ist dabei mit einer anderen Farbe als die Probe markiert, typischerweise mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff (Butler et al. 2004).

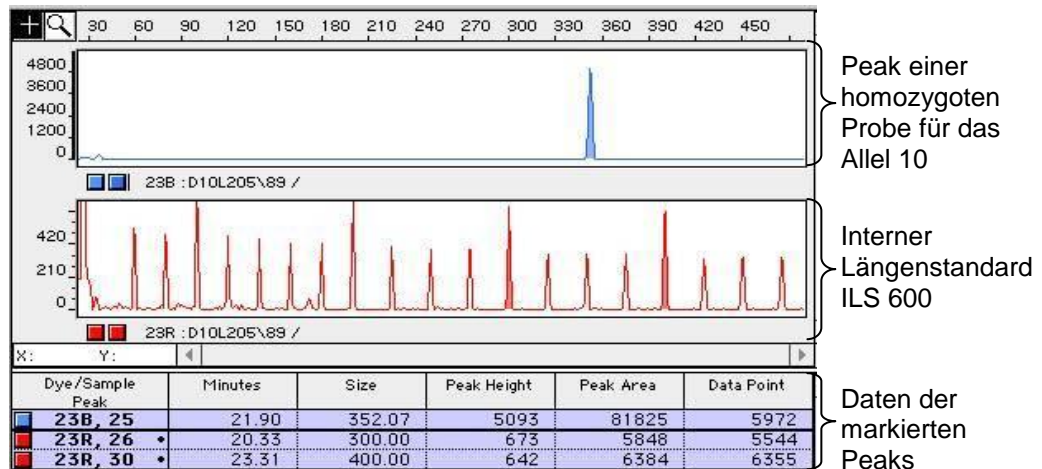


Abbildung 10 Elektropherogramm einer für das Allel 10 homozygoten Probe. Die Primer zur Amplifizierung waren mit dem blauen Farbstoff 6-Fam markiert. Die Peaks des Internen Standards (ILS 600) wurden rot markiert. Unten im Elektropherogramm sind u.a. die Fragmentgröße und die Peak-Höhe aufgeführt.

Das Amplifikat musste für die Analyse am ABI 310 wie folgt vorbereitet werden. Zu 12 µl HPLC Wasser wurden 0,5 µl des mit CXR (rot) markierten internen Längenstandards ILS 600 (Promega) gegeben. Nach Zugabe von 1 µl Probe wurde der Ansatz bei 95°C für 3 min im DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer, Waltham, USA) denaturiert, anschließend für 3 Minuten auf Eis gekühlt und konnte dann am ABI 310 analysiert werden.

## 2.4.2 Unmarkierte Primer

### Kapillargelelektrophorese mit dem QIAxcel System zur Detektion des RFLP des SNP Ile425Val

Mit dem QIAxcel System (Qiagen) und dem zugehörigen QIAxcel DNA Screening Kit (Qiagen) kann, mit Hilfe der Kapillargelelektrophorese, eine schnelle, größenabhängige Auftrennung von DNA erfolgen. Dabei befindet sich das Gel in einer vorgefertigten Kartusche mit zwölf Kapillaren, über die die Proben automatisch aufgenommen werden. Durch die angelegte Spannung wandert die negativ geladene DNA zum positiv geladenen Ende der Kapillare und nimmt dabei Ethidiumbormid auf, bis sie einen Detektor erreicht, der das Fluoreszenzsignal misst. Das Signal wird

durch die BioCalculator Software in elektronische Daten umgewandelt, diese werden dann als Elektropherogramm und als Gelbild (s. Abb. 11) dargestellt. Die Bio Calculator Software berechnet die DNA-Größen durch Vergleich mit dem QX DNA Size Marker, der als Referenzwert dient. Mit jeder Probe wird ein QX Alignment Marker mit in die Kapillare aufgenommen, der die erste und die letzte Bande auf dem Gel bildet (QIAxcel DNA Handbook 2008).

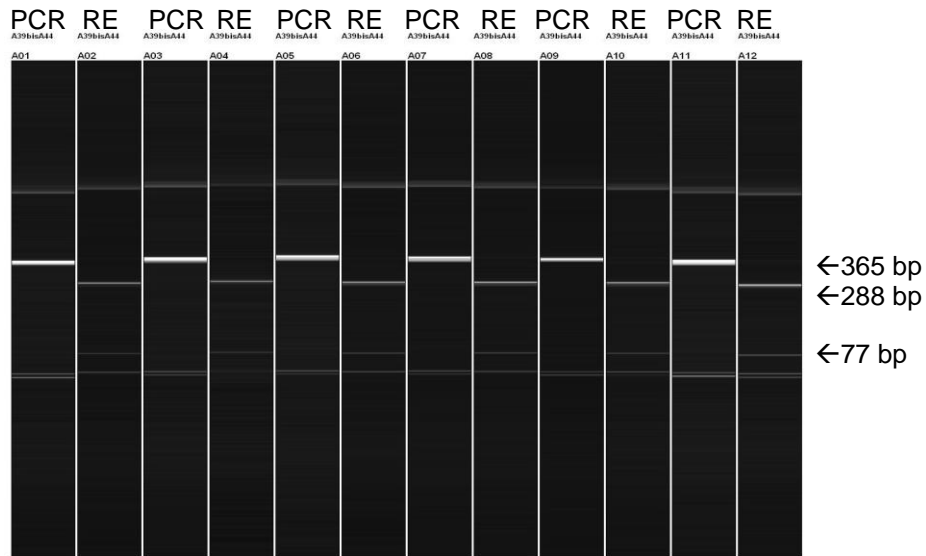


Abbildung 11 Gelbild des QIAxcel System mit Amplifikaten (PCR) des Primer Ile425 (365 bp) links und den Produkten des Restriktionsenzymverdau (RE; 288+77 bp) jeweils rechts von den Amplifikaten.

### Agarosegelelektrophorese zur Detektion der Allele der 5-HTTLPR (Promotor-Polymorphismus)

Die Detektion der Fragmente, die bei der Amplifikation mit dem Primer 5HTTLPR entstehen (469 und 512 bp), war mit dem QIAxcel System nicht möglich, weshalb das Amplifikat auf ein konventionelles Gel aufgetragen werden musste.

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

Tris	108 g
Borsäure	95 g
0,5 M EDTA, pH 8	40 ml
Entionisiertes Wasser	auffüllen auf 2 l Endvolumen

Die Agarosegelelektrophorese wurde sowohl zur Auswertung der PCR mit dem Primer 5HTTLPR, als auch zur Überprüfung von PCR-Optimierungsschritten und dem Restriktionsverdau genutzt.

Für eine minimale Größe der DNA-Fragmente von 77 bp und der maximalen Größe von 512 bp eignete sich eine Agarosekonzentration von 2%. Dazu wurde 1 g UltraPure™ Agarose (Invitrogen, Karlsruhe) mit 50 ml 1x TBE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen der Agaroselösung unter 60°C wurde Ethidiumbromid (Roth) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Das bei Raumtemperatur ausgehärtete Agarosegel konnte dann beladen werden. Dazu wurden zu 8 µl des DNA-Ansatzes 2 µl Bromphenol Blue Loading Solution (Promega) zugesetzt und in die Geltaschen eingebracht. An der ersten Position des Gels wurde eine 100 bp DNA-Leiter (Roth) aufgetragen. Die DNA wurde mit einer Spannung von 10 V/cm aufgetrennt (Elektrophoresesystem von Pharmacia) und das Ergebnis auf einem UV-Tisch (Biometra) sichtbar gemacht und ausgewertet.

## 2.5 Statistik

Der Chi-Quadrat-Test und der Fisher-Yates-Test (exakter Chi-Quadrat-Test) wurden genutzt, um die Häufigkeiten der verschiedenen Polymorphismen zwischen den SIDS-Fällen und den Kontrollen zu vergleichen. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit der statistischen Programmiersprache R (The R Foundation for Statistical Computing, Version 2.10.1). Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Die Tests für die Abweichung der Genotypen- und Allelhäufigkeit des Promotor-Polymorphismus und des VNTR im zweiten Intron vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden ebenfalls mit der Programmiersprache R durchgeführt. Dabei wurde als Signifikanzniveau  $p < 0,01$  verwendet.

Für die Schätzung der Haplotypenfrequenz der SIDS-Fälle und der Kontrollgruppe wurde die Software PHASE (Version 2.1.1; Stephens et al. 2001, Stephens und Donnelly 2003), eine statistische Methode zur Rekonstruktion von Haplotypen anhand der Genotypen (s. Tabelle 4), genutzt. Um die statistische Signifikanz der geschätzten Haplotypenfrequenzen beider Gruppen zu beurteilen, wurde ein Permutationstest (10 000 Simulationen) mit PHASE durchgeführt. Anhand der

geschätzten Haplotypenfrequenzen wurde das Linkage Disequilibrium (LD) zwischen dem Polymorphismus im Promotor und im zweiten Intron mit dem Programm 2LD (two-locus LD calculator; Zhao 2004) berechnet.

Die Diagramme wurden mit Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corp, Bothell, Washington) erstellt.

### 3. Ergebnisse

Der Neurotransmitter Serotonin ist an der Regulation autonomer Funktionen (Atmung, Arousal, Reflexe) beteiligt, deren Störung bei Opfern des SIDS beobachtet werden konnte. Abnormitäten verschiedener Komponenten des serotonergen Systems konnten bei SIDS-Fällen bereits nachgewiesen werden. Die Dauer und Stärke der Serotonin-Wirkung wird vom Serotonintransporter (5-HTT) reguliert, welcher an der präsynaptischen Membran den Neurotransmitter aufnimmt und dadurch dessen Wirkung an der Postsynapse beendet. Im Gen dieses Transporters liegen Polymorphismen in der Promotorregion (5-HTTLPR; Allele S und L) und im zweiten Intron (Allele 9, 10, 12), wobei die Allele L und 12 eine Aktivitätssteigerung des Serotonintransporters hervorrufen. Ein Zusammenhang, insbesondere des L-Allels mit dem SIDS konnte bereits in früheren Arbeiten (Narita et al. 2001, Weese-Mayer et al. 2003a, Marzano et al. 2008, Opdal et al. 2008) dargestellt werden, andere Studien fanden keinen Zusammenhang (Paterson et al. 2006, Haas et al. 2009).

Ein SNP (A→G), der zum Austausch der Aminosäuren Isoleucin gegen Valin an der Position 425 (Ile425Val) in der Transmembrandomäne 8 des 5-HTT führt, stellt eine *gain-of-function*-Mutation dar. Dieser Polymorphismus wurde bislang nur im Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen untersucht.

Nach der Genotypisierung der für diese Studie zur Verfügung stehenden 129 SIDS-Fälle der Göttinger Rechtsmedizin wurde geprüft, ob die Allele, die die Aktivität des 5-HTT steigern, bei den SIDS-Fällen signifikant häufiger als bei den Kontrollen zu finden sind.

Für die vorliegende Arbeit wurde die aus Blut- und Gewebeproben extrahierte DNA (Sektionsmaterial) von 129 SIDS-Fällen, ebenso wie die DNA der Kontrollgruppe (129 Erwachsene), mit Hilfe der PCR für drei Polymorphismen im Bereich des 5-HTT-Gens genotypisiert. Die beiden Längenpolymorphismen wurden direkt nach der PCR, das Amplifikat zur Genotypisierung des SNP nach dem Verdau mit dem Restriktionsenzym BclI mittels Elektrophorese typisiert.

Weiterhin erfolgte die Auswertung der Allelverteilung im Zusammenhang mit epidemiologischen Risikofaktoren für das SIDS.



### 3.1 Epidemiologie und Verteilung der Risikofaktoren

Bei den 129 untersuchten Fällen von plötzlichem Kindstod wurde ein prozentuales Verhältnis zwischen männlichem (m) und weiblichem (w) Geschlecht von 66% (n=85) zu 34% (n=44) festgestellt. Dieses Verhältnis von etwa 60:40% wird von den meisten Autoren für den plötzlichen Säuglingstod angegeben.

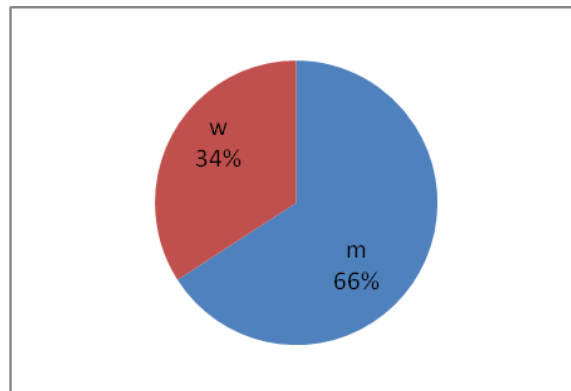


Abbildung 12 Das Verhältnis zwischen männlichem und weiblichem Geschlecht von 129 SIDS-Fällen der Göttinger Rechtsmedizin.

Das erreichte Lebensalter der SIDS-Fälle, für die das Alter bekannt ist (n=114), liegt tendenziell unter sechs Monaten. Während die Fallzahlen im 1. Lebensmonat noch moderat sind, zeigt sich im 2. Lebensmonat ein sprunghafter Anstieg der Fälle (s. Abb. 13), wobei die meisten Säuglinge im 2. bis 4. Lebensmonat versterben. Innerhalb der ersten sechs Lebensmonate verstarben 72,8%. Für diese Verteilung des Lebensalters bei Todeseintritt findet man in der Literatur weitgehende Übereinstimmung.

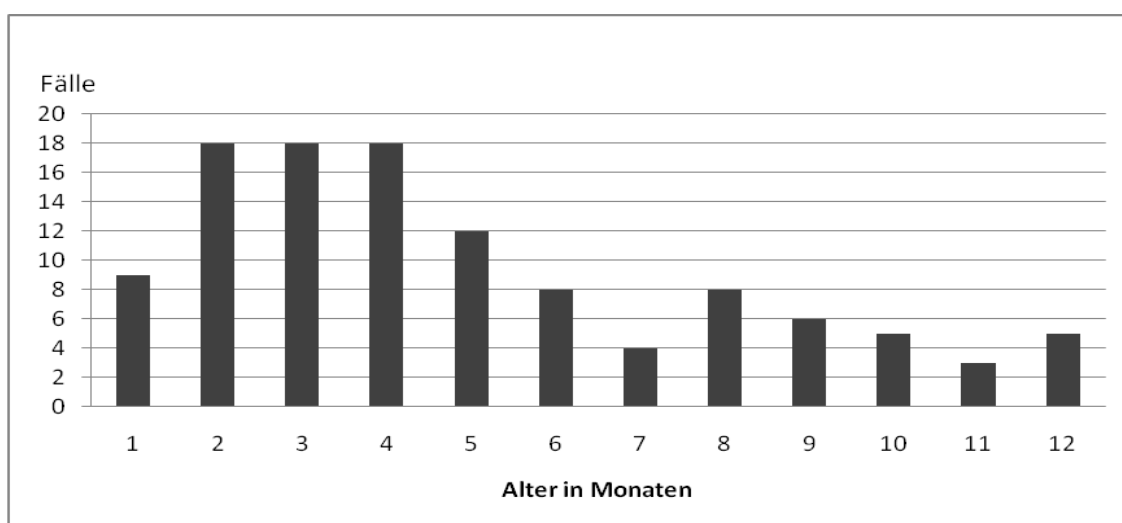


Abbildung 13 Die Altersverteilung von 114 SIDS-Fällen. Das Lebensalter wurde auf ganze Monate gerundet.

Die Jahreszeitliche Verteilung der SIDS-Fälle, für die das Sterbedatum bekannt ist (n=114), zeigt ein gehäuftes Auftreten des SIDS während der Monate Dezember bis April (s. Abb. 14), in denen sich 62,3% (n=71) der Fälle von plötzlichem Kindstod ereigneten. Diese Häufung der Sterbefälle innerhalb der kalten Monate ist typisch für das SIDS.

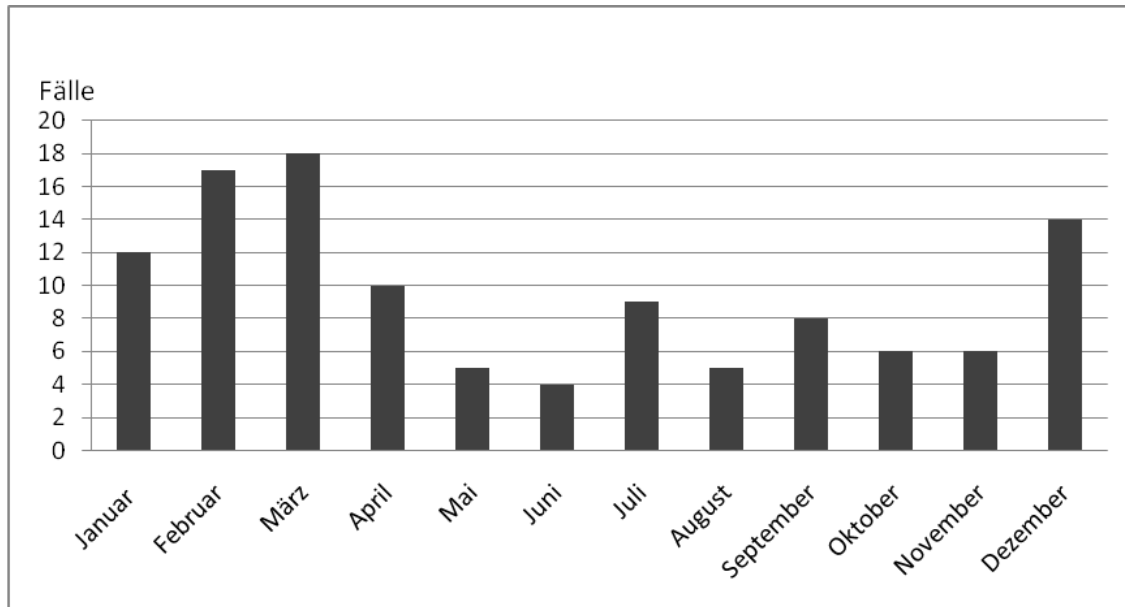


Abbildung 14 Die jahreszeitliche Verteilung von 114 der 129 untersuchten SIDS-Fälle der Göttinger Rechtsmedizin.

## 3.2 Häufigkeitsverteilung der Genotypen und Allele

### 3.2.1 Häufigkeit der *gain-of-function*-Mutation (Ile425Val)

Das Amplifikationsprodukt des A→G SNP, der zum Austausch der Aminosäuren Isoleucin gegen Valin (Ile425Val) führt, wurde mit dem Restriktionsenzym BclI verdaut um den Basenaustausch nachzuweisen. Ausgewertet wurden die Proben mit Hilfe des QIAxcel Systems (s. Abb. 15). Bei den untersuchten 129 SIDS-Fällen konnte der Austausch der Nucleotide Adenin (A) gegen Guanin (G) nicht nachgewiesen werden, bei allen Fällen und auch allen Kontrollen lag der Genotyp für Ile425 homozygot vor. Da die Mutation nicht nachgewiesen werden konnte, wird der SNP bei den weiteren Auswertungen nicht berücksichtigt.

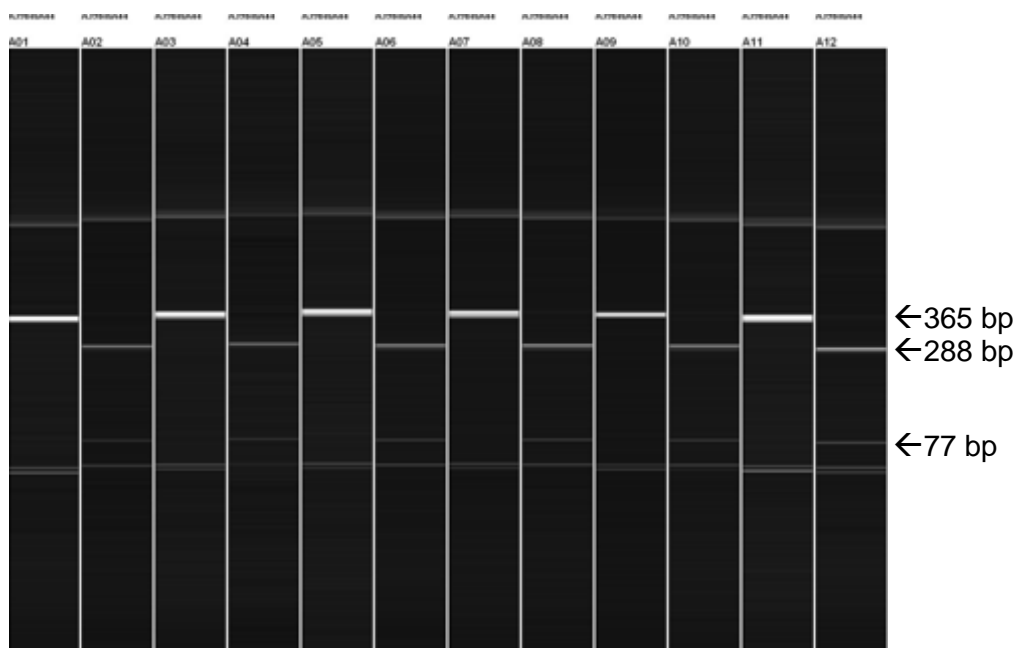


Abbildung 15 Darstellung eines Gelbildes des QIAxcel Systems zur Auswertung der Proben, die mit dem Primer Ile425 amplifiziert (365 bp) und mit BclI verdaut wurden (288+77 bp). Jeweils rechts von den Amplifikaten sind die zugehörigen verdauten Proben aufgetragen.

### 3.2.2 Analyse der Genotypen- und Allelverteilung des Promotor-Polymorphismus

Die Verteilung der Genotypen in der Promotorregion wurde anhand der Agarosegelelektrophorese ermittelt (s. Abb. 16). Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen S/S, L/L, S/L sowie der Allele S und L sind in Tabelle 2 dargestellt.

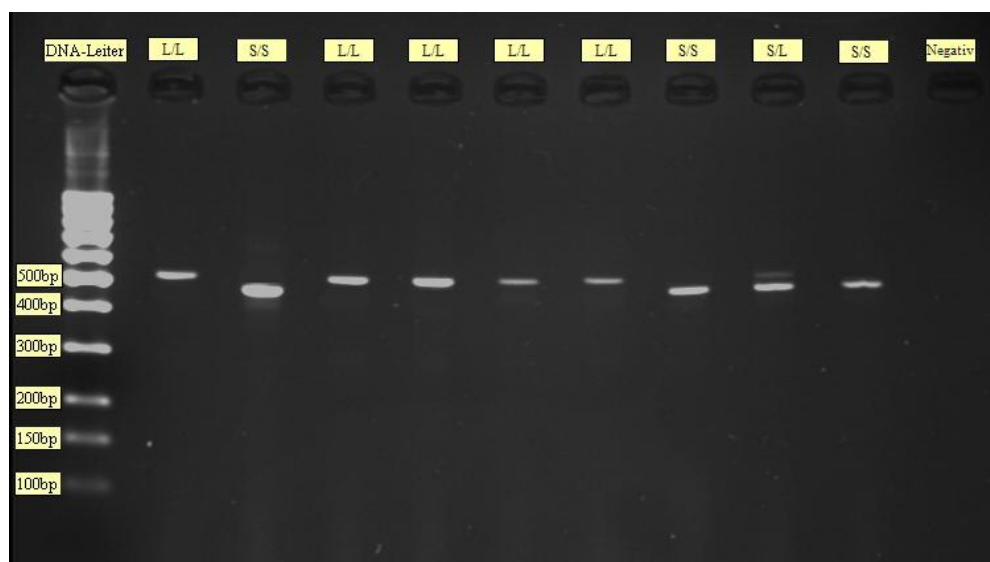


Abbildung 16 Darstellung eines Gelbildes mit den homozygoten Genotypen L/L und S/S sowie dem heterozygoten Genotyp S/L des Polymorphismus der Promotorregion.

Die Allele und Genotypen der Polymorphismen im Promotor verteilen sich wie folgt:

	<b><u>SIDS-Fälle (n=129)</u></b>		<b><u>Kontrollen (n=129)</u></b>	
	n	%	n	%
<b><u>Promotor (5-HTTLPR)</u></b>				
Genotyp				
S/S	24	18,6	37	28,7
S/L	61	47,3	52	40,3
L/L	44	34,1	40	31,0
Allele				
S	109	42,2	126	48,8
L	149	57,8	132	51,2

Tabelle 2 Verteilung der Genotypen und Allele des Polymorphismus in der Promotorregion des Serotonintransportergens von 129 SIDS-Fällen und 129 Kontrollen.

Bei der Berechnung des Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den erwarteten und beobachteten Genotypfrequenzen weder bei den Fällen ( $p=0,72$ ) noch bei den Kontrollen ( $p=0,03$ ) festgestellt werden.

Ausgewertet wurden die Daten von 129 SIDS-Fällen und 129 Kontrollen im Hinblick auf die Verteilung der Genotypen, der Häufigkeit der homozygoten Genotypen sowie der Allelhäufigkeiten des Promotor-Polymorphismus. Die erforderlichen Daten hierfür stammen aus Tabelle 2.

Bei der Verteilung der Genotypen des Polymorphismus im Promotor (L/L, S/L, S/S) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe ( $\chi^2$  2 FG,  $p=0,16$ ) festgestellt werden.

Das Verhältnis der SIDS-Fälle ohne dem langen Allel L (S/S gegen S/L+L/L) wurde mit der Kontrollgruppe verglichen. Der Anteil mit fehlendem langem Allel bei den SIDS-Fällen war nicht signifikant kleiner als bei der Kontrollgruppe, es zeigte sich jedoch ein Trend zu weniger S/S-Genotypen bei den Fällen ( $\chi^2$  1 FG,  $p=0,08$ ). Verglichen wurde auch das Verhältnis der SIDS-Fälle ohne dem kurzen Allel S (L/L gegen S/L+S/S) mit der Kontrollgruppe, wobei kein signifikant größerer Anteil ohne dem kurzen Allel bei den SIDS-Fällen festgestellt werden konnte ( $\chi^2$  1 FG,  $p=0,69$ ).

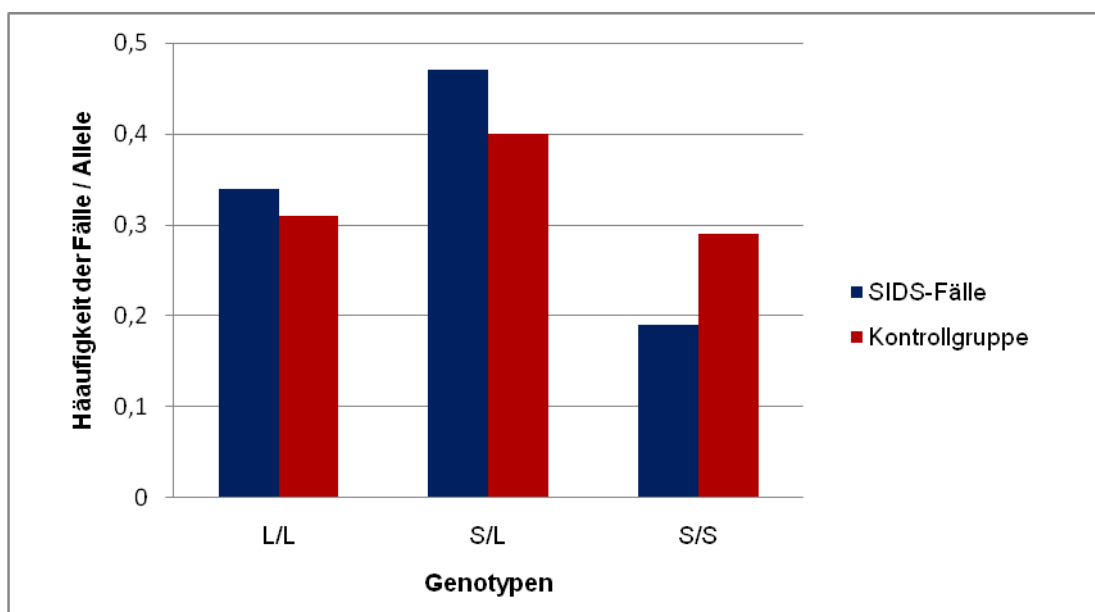


Abbildung 17 Verteilung der Genotypen des Polymorphismus in der Promotorregion des Serotonintransportergens bei den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe.

Zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe konnte bei der Verteilung der Allele des Promotor-Polymorphismus (S, L) kein signifikanter Unterschied erfasst werden ( $\chi^2$  1 FG,  $p=0,16$ ).

Ein Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe konnte zugunsten des langen Allel L nur als statistisch nicht signifikanter Trend (57,8% vs. 51,2% L; Abb. 18) festgestellt werden.

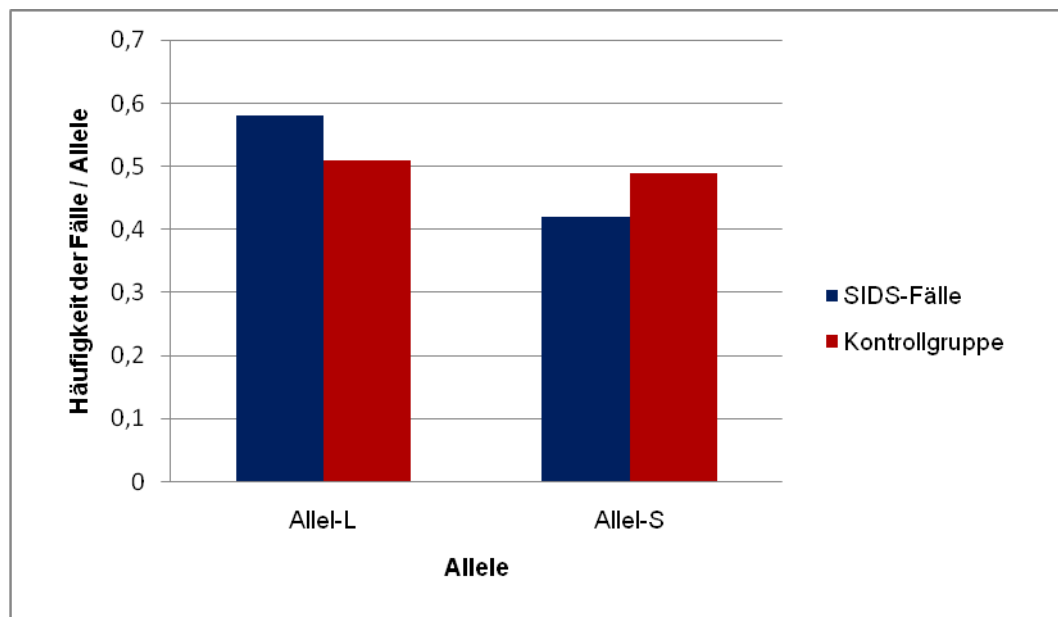


Abbildung 18 Verteilung der Allele des Polymorphismen in der Promotorregion des Serotonintransportergens bei den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe.

### 3.2.3 Analyse der Genotypen- und Allelverteilung des Polymorphismus im zweiten Intron

Die Genotypen, die durch den Polymorphismus im zweiten Intron entstehen, wurden mittels der Kapillarelektrophorese am ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ausgewertet (s. Abb. 19). Die Verteilung der verschiedenen Genotypen (9/9, 9/10, 9/12, 10/10, 10/12 und 12/12) sowie der Allele 9, 10 und 12 sind der Tabelle 3 zu entnehmen.



Abbildung 19 Darstellung eines Elektropherogramms des ABI Prism 310 Genetic Analyzer mit dem heterozygoten Genotyp 10/12 des Polymorphismus im zweiten Intron.

Die Allele und Genotypen der Polymorphismen im zweiten Intron verteilen sich wie folgt:

	<b><u>SIDS-Fälle (n=129)</u></b>		<b><u>Kontrollen (n=129)</u></b>	
	n	%	n	%
<b><u>Intron 2</u></b>				
<b>Genotyp</b>				
9/9	1	0,8	0	0
9/10	3	2,3	2	1,6
9/12	1	0,8	0	0
10/10	33	25,6	27	20,9
10/12	46	35,6	55	42,6
12/12	45	34,9	45	34,9
<b>Allele</b>				
9	6	2,3	2	0,8
10	115	44,6	111	43,0
12	137	53,1	145	56,2

Tabelle 3 Verteilung der Genotypen und Allele des VNTR im zweiten Intron des Serotonintransportergens von 129 SIDS-Fällen und 129 Kontrollen.

Ausgewertet wurden die Daten von 129 SIDS-Fällen und 129 Kontrollen im Hinblick auf die Verteilung der Genotypen, der Häufigkeit der homozygoten Genotypen sowie der Allelhäufigkeiten des VNTR im zweiten Intron. Die erforderlichen Daten hierfür stammen aus Tabelle 3.

Bei der Berechnung des Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den erwarteten und beobachteten Genotypfrequenzen des

Intron-2-Polymorphismus bei den Fällen ( $p=0,004$ ), jedoch nicht bei den Kontrollen ( $p=0,79$ ) festgestellt in werden.

Die Genotypen des VNTRs im zweiten Intron des Serotonintransportergens wurden in drei Gruppen, homozygot für den Genotyp 12/12, heterozygot mit einem Allel 12 und homozygot ohne das Allel 12, zusammengefasst. Bei der Verteilung der Genotypen (12/12, 10/12+9/12, 9/9+9/10+10/10) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe festgestellt werden ( $\chi^2$  2 FG,  $p=0,45$ ).

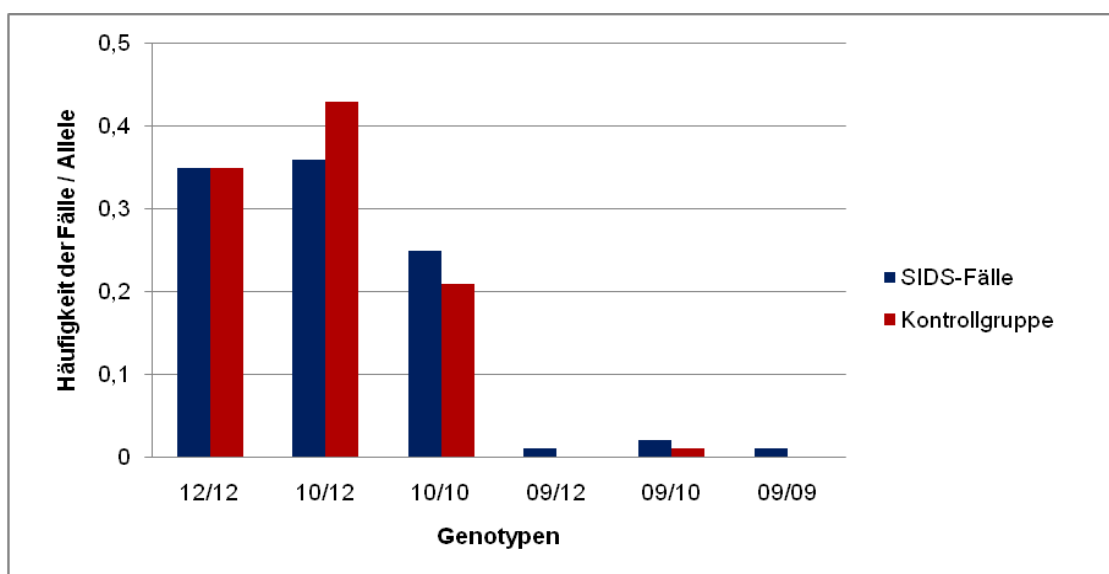


Abbildung 20 Verteilung der Genotypen des Polymorphismus im zweiten Intron des Serotonintransportergens bei den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe.

Verglichen wurde auch die Häufigkeit der SIDS-Fälle ohne das Allel 12 (9/9+9/10+10/10 vs. 9/12+10/12+12/12) mit den jeweiligen Daten der Kontrollgruppe. Der Anteil mit fehlendem Allel 12 bei den SIDS-Fällen war nicht signifikant kleiner als bei der Kontrollgruppe ( $\chi^2$  1 FG,  $p=0,32$ ). Das Verhältnis der SIDS-Fälle, bei denen die Allele 9 und 10 fehlen (12/12 gegen 9/9+9/10+9/12+10/10+10/12), wurde mit der Kontrollgruppe verglichen, wobei kein signifikant größerer Anteil ohne kurzem Allel bei den SIDS-Fällen festgestellt werden konnte ( $\chi^2$  1 FG,  $p=0,89$ ).

Bei der Häufigkeit der Allele 9, 10, 12 besteht statistisch kein Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe (Fisher-Test,  $p=0,34$ ). Das Allel 12 kommt bei der Kontrollgruppe mit 56,2% häufiger als bei den SIDS-Fällen mit 53,1% vor.



Das Allel 9, das generell nur selten vorliegt, ist bei den SIDS-Fällen mit 2,3% (n=6) häufiger als bei der Kontrollgruppe mit 0,8% (n=2).

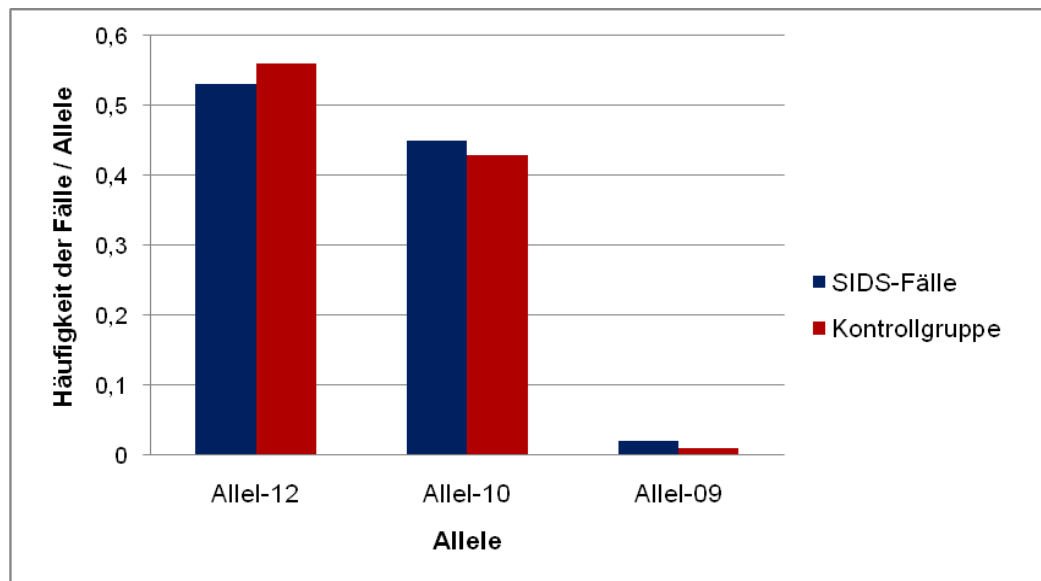


Abbildung 21 Verteilung der Allele des Polymorphismus im zweiten Intron des Serotonintransportergens bei den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe.

### 3.3 Kombination der Genvarianten des Promotor-Polymorphismus und des Polymorphismus im zweiten Intron

Die Kombinationen aus den Genotypen und Haplotypen der Polymorphismen im Promotor und im zweiten Intron verteilen sich wie folgt:

		<u>SIDS-Fälle (n=129)</u>		<u>Kontrollen (n=129)</u>	
		n	%	n	%
<u>Promotor</u>	<u>Intron 2</u>				
Genotyp					
S/S	10/10	2	1,5	6	4,6
S/S	10/12	8	6,2	16	12,4
S/S	12/12	14	10,8	15	11,6
S/L	9/10+10/10+9/9	18	14,0	9	7,0
S/L	9/12+10/12	26	20,1	19	14,7
S/L	12/12	17	13,2	24	18,6
L/L	9/10+10/10	17	13,2	14	10,9
L/L	9/12+10/12	13	10,1	21	16,3
L/L	12/12	14	10,9	5	3,9
Haplotyp					
S	9+10	30	11,6	37	14,3
S	12	79	30,6	89	34,5
L	9+10	91	35,3	76	29,5
L	12	58	22,5	56	21,7

Tabelle 4 Verteilung der Genotypen und Haplotypen der Polymorphismen in der Promotorregion und im zweiten Intron des Serotonintransportergens von 129 SIDS-Fällen und 129 Kontrollen.

Bei der Verteilung der kombinierten Genotypen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und den Kontrollen ( $\chi^2$  8 FG,  $p=0,04$ ).

Eine Assoziation zwischen den SIDS-Fällen und der Kombination aus den Genotypen L/L und 12/12 konnte im Vergleich zu den Kontrollen nicht gefunden werden (Fisher- Test,  $p=0,054$ ; L/L-12/12 gegen die restlichen Genotypen).

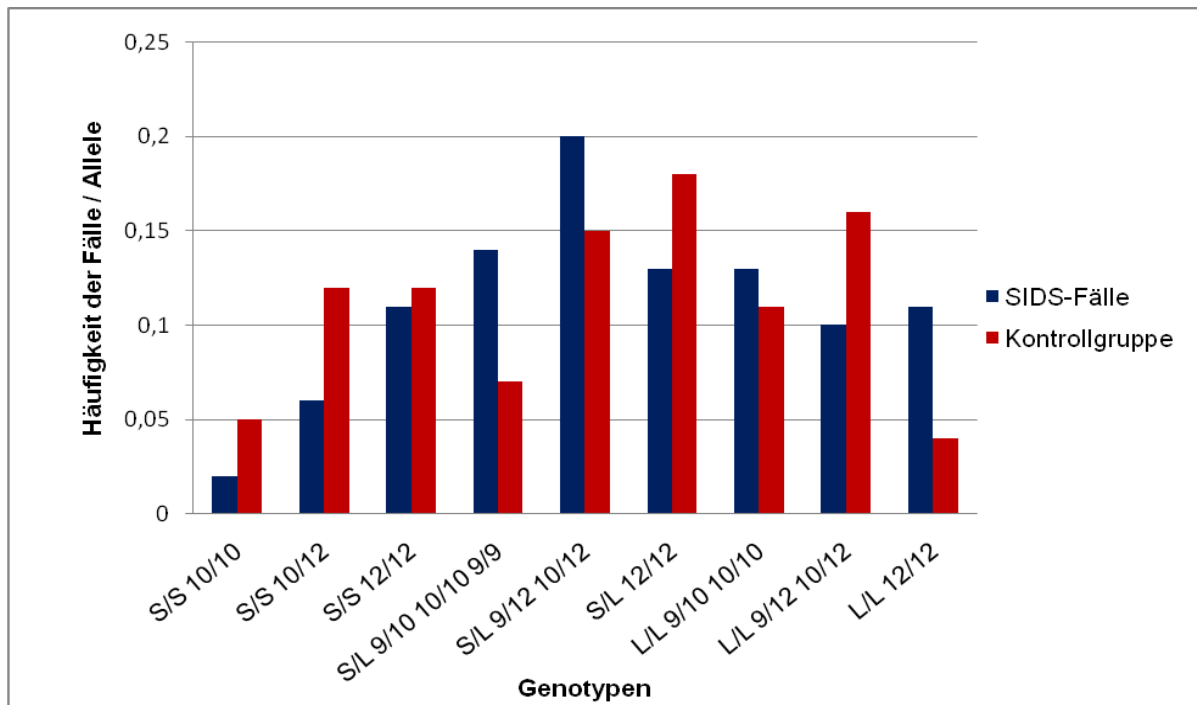


Abbildung 22 Kombination der verschiedenen Genotypen des Polymorphismus im Promotor und im zweiten Intron des Serotonintransportergens bei den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe.

Es konnte kein Unterschied bei den Haplotypenfrequenzen der SIDS-Fälle und der Kontrollgruppe anhand des Permutationstests (empirisches  $p=0,29$ ) festgestellt werden.

Der Haplotyp L-12 liegt bei den SIDS-Fällen nicht signifikant häufiger als bei den Kontrollen vor (22,5% vs. 21,7%).

Die geschätzten Haplotypfrequenzen wurden genutzt, um das Linkage Disequilibrium (LD) der hier vorliegenden Population zu berechnen. Das LD zwischen dem Promotor- und Intron-2-Polymorphismus war signifikant in der untersuchten Population ( $D'=0,22$ ,  $p=0,0001$ ).

### 3.4 Genetische Polymorphismen des 5-HTT und Risikofaktoren für das SIDS

Die Genotypen des Promotor-Polymorphismus und des VNTR im zweiten Intron der SIDS-Fälle, die von Dezember bis April und in den restlichen Monaten verstorben sind, verteilen sich wie folgt:

	<u>Dezember bis April (n=71)</u>		<u>Rest. Monate (n=43)</u>	
	n	%	n	%
Genotyp				
S/S	10	14,1	9	21,0
S/L	38	53,5	17	39,5
L/L	23	32,4	17	39,5
9/9	0	0	1	2,3
9/10	1	1,4	2	4,6
10/10	18	25,4	12	27,9
10/12	25	35,2	14	32,6
12/12	27	38,0	14	32,6

Tabelle 5 Verteilung der Genotypen der SIDS-Fälle die in den Monaten Dezember bis April oder in den restlichen Monaten verstorben sind.

Es konnte kein Unterschied bei der Genotypenverteilung der SIDS-Fälle, die in den kalten Monaten (Dezember bis April) verstorben waren und denen, die während der restlichen Monate verstarben, festgestellt werden, weder beim Promotor-Polymorphismus ( $\chi^2$  2 FG,  $p=0,33$ ) noch beim VNTR im zweiten Intron (Fisher-Test,  $p=0,57$ ).

Die Genotypen der Polymorphismen im Promotor und im zweiten Intron der SIDS-Fälle, die im Alter unter vier Wochen, von vier bis 16 und mehr als 16 Wochen verstorben sind, verteilen sich wie folgt:

Genotyp	<u>&lt; 4 Wochen (n=6)</u>		<u>&gt;4 bis 16 Wochen</u>		<u>&gt; 16 Wochen (n=49)</u>	
	n	%	n	%	n	%
S/S	2	33,3	10	17,0	8	16,3
S/L	2	33,3	27	45,7	26	53,1
L/L	2	33,3	22	37,3	15	30,6
9/9	0	0	0	0	1	2,0
9/10	0	0	2	3,4	1	2,0
10/10	0	0	13	22,0	16	32,7
10/12	3	50	25	42,4	12	24,5
12/12	3	50	19	32,2	19	38,8

Tabelle 6 Verteilung der Genotypen der SIDS-Fälle die unter vier Wochen, von vier bis 16 Wochen oder mehr als 16 Wochen verstorben sind.

Die SIDS-Fälle, die in einem Alter von weniger als vier Wochen verstorben waren, wurden mit den über 16 Wochen alten Fällen zusammengefasst. Hinsichtlich der Genotypenverteilung wurde diese Gruppe mit den Fällen, die im zweiten bis vierten Lebensmonat, also in der vulnerabelsten Phase verstarben, verglichen. Dabei konnten keine statistischen Unterschiede bei den beiden Polymorphismen im Promotor ( $\chi^2$  2 FG,  $p=0,89$ ) und im Intron 2 (Fisher-Test,  $p=0,37$ ) beobachtet werden.

Die Geschlechtsverteilung der Genotypen des Promotor-Polymorphismus und des VNTR im zweiten Intron ergibt sich wie folgt:

Genotyp	<u>männlich (n=85)</u>		<u>weiblich (n=44)</u>	
	n	%	n	%
S/S	15	17,6	9	20,4
S/L	38	44,7	23	52,3
L/L	32	37,7	12	27,3
9/9	1	1,2	0	0
9/10	4	4,7	0	0
10/10	20	23,5	13	29,5
10/12	33	38,8	13	29,5
12/12	27	31,8	18	41,0

Tabelle 7 Verteilung der kombinierten Genotypen der männlichen und weiblichen SIDS-Fälle.

Zwischen den männlichen und weiblichen SIDS-Fällen konnte weder hinsichtlich des Promotor-Polymorphismus ( $\chi^2$  2 FG,  $p=0,49$ ) noch des VNTR im zweiten Intron (Fisher-Test,  $p=0,41$ ) ein Unterschied festgestellt werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse

Noch immer ist die Ursache des Sudden Infant Death Syndrom (SIDS) ungeklärt. Für einige epidemiologische, exogene und endogene Risikofaktoren konnte eine Verbindung mit dem SIDS hergestellt werden, von denen aber keiner allein ursächlich für das plötzliche Versterben eines scheinbar gesunden Säuglings ist.

Die Grundlage vieler Studien zum SIDS bildet die Annahme, dass der plötzliche Säuglingstod das Resultat einer ex- oder intrinsischen Anpassungsstörung bei der Regulation der Atmung ist (Saternus 2004). Da der Neurotransmitter Serotonin an der Regulation der Atmung und vieler weiterer autonomer Funktionen, die ebenfalls mit dem SIDS in Verbindung gebracht werden, beteiligt ist (Poets et al. 2003), liegt ein Schwerpunkt der aktuellen SIDS-Forschung u.a. auf Fehlregulationen des serotonergen Systems bei Opfern des plötzlichen Säuglingstodes. Ein Aspekt ist hier die vermehrte Aktivität des Serotonintransporters mit dadurch bedingter, verminderter 5-HT-Rezeptoraktivierung. Auf genetischer Ebene wurden bereits in früheren Arbeiten zwei funktionelle Polymorphismen im Promotor (Allele S und L) und im zweiten Intron (Allele 9, 10, 12) des Serotonintransportergens im Hinblick auf ein gesteigertes Risiko für das SIDS untersucht. Besonders das L-Allel im Promotor-Polymorphismus konnte dabei mit einem erhöhten Risiko für das SIDS assoziiert werden. Hingegen wurde ein SNP, der auf Proteinebene zum Austausch der Aminosäuren Isoleucin zu Valin in der Transmembrandomäne 8 des 5-HT-Transporters führt und mit einer gesteigerten Transportaktivität verbunden ist (Ile425Val), bislang nur bei psychiatrischen Erkrankungen erforscht.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden 129 SIDS-Fälle und 129 Kontrollen für die drei oben genannten Polymorphismen genotypisiert. Die Verteilung der Allele und Genotypen zwischen den Fällen und Kontrollen wurde auf einen signifikanten Unterschied hin überprüft. Dabei können folgende Ergebnisse festgehalten werden:

1. Der L/L-Genotyp konnte bei den SIDS-Fällen nicht signifikant häufiger als bei den Kontrollen beobachtet werden.
2. Ein Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe konnte bezüglich des langen Allels L nur als statistisch nicht signifikanter Trend festgestellt werden.
3. Bei den SIDS-Fällen wurde der Genotyp 12/12 ebenso häufig wie bei den Kontrollen gefunden.
4. Ein Zusammenhang zwischen dem Allel 12 und dem SIDS konnte nicht festgestellt werden.
5. Es fanden sich keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem SNP (A→G) und dem SIDS.

Weiterhin wurden die Genotypen und Allele des Promotor-Polymorphismus und des Intron-2-Polymorphismus des Serotonintransporters in Kombination betrachtet. Hierbei zeigen sich folgende Resultate:

1. Bei der Verteilung der kombinierten Genotypen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und den Kontrollen.
2. Eine Assoziation zwischen den SIDS-Fällen und der Kombination aus den Genotypen L/L und 12/12 konnte im Vergleich zu den Kontrollen nicht gefunden werden.
3. Ein Unterschied bei den Haplotypenfrequenzen der SIDS-Fälle und der Kontrollgruppe konnte anhand des Permutationstests nicht festgestellt werden.
4. Der Haplotyp L-12 liegt bei den SIDS-Fällen nicht signifikant häufiger als bei den Kontrollen vor.

Ein Bezug zwischen der Verteilung der Genotypen und bekannten epidemiologischen Risikofaktoren wie dem Lebensalter und der Jahreszeit bei Todeseintritt sowie dem Geschlecht konnte nicht hergestellt werden.



### 4.1.1 Polymorphismen im Serotonintransportergen und das SIDS

#### Verteilung der Allele und Genotypen des Promotor-Polymorphismus

Narita et al. (2001) konnten als Erste den Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Anzahl repetitiver Elemente im Promotor des 5-HTT und dem Risiko für das SIDS in der japanischen Population zeigen, da die Allele L und XL häufiger bei den 27 SIDS-Fällen als in der Kontrollgruppe (n=230; 27,9% vs. 13,9% L+XL) gefunden wurden. Das S-Allel wurde dabei in 72,2% der japanischen SIDS-Fälle und in 86,1% der japanischen Kontrollen beobachtet.

Zwei Jahre später fanden Weese-Mayer et al. (2003a) das Allel L sowie den Genotyp L/L auch bei den von ihnen untersuchten afroamerikanischen und kaukasischen SIDS-Fällen (82,6% bzw. 63,6% Allel L und 67,4% bzw. 40,9% L/L) signifikant häufiger im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (70,9% bzw. 46,6% Allel L und 51,2% bzw. 27,3% L/L).

Die Verteilung der Allelfrequenzen des Promotor-Polymorphismus zeigt einen grundlegenden Unterschied zwischen den verschiedenen Populationen (Gelernter et al. 1999, Weese-Mayer et al. 2003a). Die Allelfrequenz des langen Allels L war mit 13,5% bei den japanischen Kontrollen außergewöhnlich niedrig (Narita et al. 2001), mit 73,9% jedoch sehr hoch in der afroamerikanischen Population (Weese-Mayer et al. 2003a). Dennoch konnten bislang in nahezu allen untersuchten Ethnien (u.a. japanisch, afroamerikanisch, kaukasisch) signifikante Unterschiede zwischen SIDS-Fällen und Kontrollen festgestellt werden und in allen Populationen scheint das L-Allel das SIDS-Risiko zu erhöhen. Parallel zu den Unterschieden der Inzidenzen für das SIDS variiert auch der 5-HTT-Promotor-Polymorphismus unter den verschiedenen Populationen (Weese-Mayer et al. 2003b), wobei Japan beispielsweise neben der niedrigsten Allelfrequenz für das L-Allel (Narita et al. 2001) mit 0,09‰ auch die geringste SIDS-Rate der Industrienationen aufweist (Kinney und Tach 2009).

Weiterhin konnte eine italienische Arbeitsgruppe um Marzano et al. (2008) anhand ihrer Fall-Kontroll-Studie mit 20 SIDS-Fällen (19 kaukasische, 1 afrikanischer) und 150 Kontrollen die Beobachtungen von Narita et al. (2001) und Weese-Mayer et al. (2003a) bestätigen. Auch bei ihrer Studie wurden der L/L-Genotyp und das L-Allel signifikant häufiger bei den Fällen von plötzlichem Säuglingstod, als in der

Kontrollgruppe gefunden. Bei der Genotypisierung der SIDS-Fälle konnte der S/S-Genotyp nicht nachgewiesen werden. Die Aussagekraft dieser Ergebnisse wird dabei durch die geringe Fallzahl von 20 Säuglingen eingeschränkt.

Allerdings existieren auch gegenteilige Ergebnisse, so fand eine norwegische Studie von Opdal et al. (2008) mit 163 Fällen und 243 Kontrollen, analog zur vorliegenden Arbeit mit 129 Fällen und 129 Kontrollen keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen bei der Verteilung der verschiedenen Genotypen (S/S, S/L, L/L) im Promotor des 5-HTT. Einen signifikanten Unterschied bei der Verteilung der Genotypen konnten auch Paterson et al. (2006) in ihrer Studie mit 31 SIDS-Fällen unterschiedlicher Ethnie und 10 Kontrollen nicht feststellen. Beim L/L-Genotyp konnten Opdal et al. (2008) nur einen nicht signifikanten Trend hin zu einer größeren Häufigkeit bei den SIDS-Fällen beobachten, während bei den Ergebnissen dieser Arbeit eine Tendenz zu weniger SIDS-Fällen mit dem S/S-Genotyp (ohne langes Allels L) festgestellt wurde (18,6% vs. 28,7% bei den Kontrollen). Der Genotyp L/L lag bei den hier untersuchten Fällen mit 34,1% nicht signifikant häufiger als bei den Kontrollen mit 31,0% vor.

Die norwegische Studie (Opdal et al. 2008) konnte das L-Allel tendenziell bei den SIDS-Fällen häufiger als bei den untersuchten Kontrollen finden (60,4% vs. 53,5%,  $p=0,05$ ). Eine Differenz zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe bezüglich des langen Allels L wurde in dieser Studie ebenso nur als statistisch nicht signifikanter Trend (57,8% vs. 51,2% L) festgestellt. Eine Schweizer Gruppe um Haas et al. (2009), die 145 SIDS-Fälle und 58 Kontrollen hinsichtlich der Allel- und Genotypenverteilung untersuchten fanden wie Opdal et al. (2008) und Paterson et al. (2006) keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. In ihrer Studie hatten nur 53,4% der SIDS-Fälle das lange Allel und 29,0% den L/L-Genotyp, verglichen mit 58,6% bzw. 36,2% bei den Kontrollen.

Die seltene Variante des XL-Allels, welches einen hohen Risikofaktor für das SIDS darstellt (Haas et al. 2009), wurde in der Population dieser Studie und auch in den früheren Studien, die kaukasische SIDS-Fälle untersuchten, nicht nachgewiesen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien, die teils kleine Populationen untersuchten, können jedoch nicht nur mit den geringen Fallzahlen erklärt werden (Haas et al. 2009), auch wenn die Anzahl der Proben ein Indikator für die Reliabilität (Zuverlässigkeit) ist (Hirschhorn et al. 2002). Bei allen oben genannten Studien, wie auch in dieser Arbeit, wurde auf die ethnische Herkunft der SIDS-Fälle und der

Kontrollen geachtet, bzw. hingewiesen. Jedoch wurde dabei nur das jeweilige Individuum betrachtet, nicht aber die näheren Familienmitglieder. Ein systematischer Unterschied in der Allelfrequenz aufgrund unterschiedlicher Herkunft (Stratifikation) kann jedoch auch in einer homogenen Population auftreten, wenn die untersuchte Person variierende Grade an genetischer Ausstattung von zwei oder mehr ethnischen Gruppen besitzt (Hirschhorn et al. 2002). Dies stellt eine mögliche Ursache für die teils uneinheitlichen Resultate der verschiedenen Studien, die alle kaukasische SIDS-Fälle untersuchten, dar.

Ein weiterer Grund für die abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu den Studien von Weese-Mayer et al. (2003a), Marzano et al. (2008) und Opdal et al. (2008), die kaukasische Fälle untersuchten, kann die uneinheitliche Definition und Klassifikation der SIDS-Fälle der verschiedenen Arbeitsgruppen sein. Noch immer gibt es für das SIDS keine allgemein gültige Definition (Kinney und Thach 2009). Weese-Mayer et al. (2003a, 2003b) geben als Grundlage für die Diagnose der SIDS-Fälle ihrer Studie die Definition von Willinger et al. (1991) an, wonach es sich beim SIDS um das plötzliche und unerwartete Versterben eines Säuglings im Alter bis zu einem Jahr handelt, wobei die Ursache weder durch die klinische Anamnese noch durch die Begutachtung der Umstände des Todes und der Obduktion zu erklären ist. Opdal et al. (2008) richteten sich nach den pathologischen Kriterien von Gregersen et al. (1995), die für einen SIDS-Fall voraussetzen, dass sich durch die Autopsie und auch durch klinische Informationen keine andere Todesursache ergibt. Die San-Diego-Definition (s. Kapitel 1.1; Krous et al. 2004) diente Haas et al. (2009) als Einschlusskriterium für die SIDS-Fälle ihrer Studie. Marzano et al. (2008) wählten die SIDS-Fälle in Anlehnung an die Kriterien von Matturri et al. (2005) aus, die das SIDS definieren als den plötzlichen Tod eines Säuglings innerhalb des ersten Lebensjahres, der nicht durch die Krankengeschichte zu erklären ist und eine vollständige Obduktion mit gründlicher Begutachtung des autonomen Nervensystems keinen möglichen Grund für das Versterben liefert. Bei den Fällen von plötzlichem Säuglingstod, die für diese Arbeit untersucht wurden, blieb die Todesursache trotz genauer Untersuchung anhand einer kompletten Autopsie, der Betrachtung der Todesumstände und der klinischen Anamnese ungeklärt. Obwohl sich die oben genannten Definitionen und Kriterien nur in Feinheiten und nicht grundlegend unterscheiden, bleibt auch die Frage, wie konsequent sie im Einzelnen durch die verschiedenen Obduzenten angewendet wurden.

Fasst man die Allelhäufigkeiten der Studien kaukasischer SIDS-Fälle von Weese-Mayer et al. (2003a), Opdal et al. (2008), Marzano et al. (2008), Haas et al. (2009) und die eigenen für die Allele L und S der 5-HTTLPR, ungeachtet etwaiger Differenzen beim Studiendesign, zusammen, findet man das Allel L signifikant häufiger ( $p < 0,01$ ) bei den SIDS-Fällen (s. Abb. 23). Die plötzlich verstorbenen Säuglinge ( $n=538$ ) weisen zu 58,4% das lange Allel auf, die Kontrollgruppe ( $n=624$ ) hingegen nur zu 50,5%.

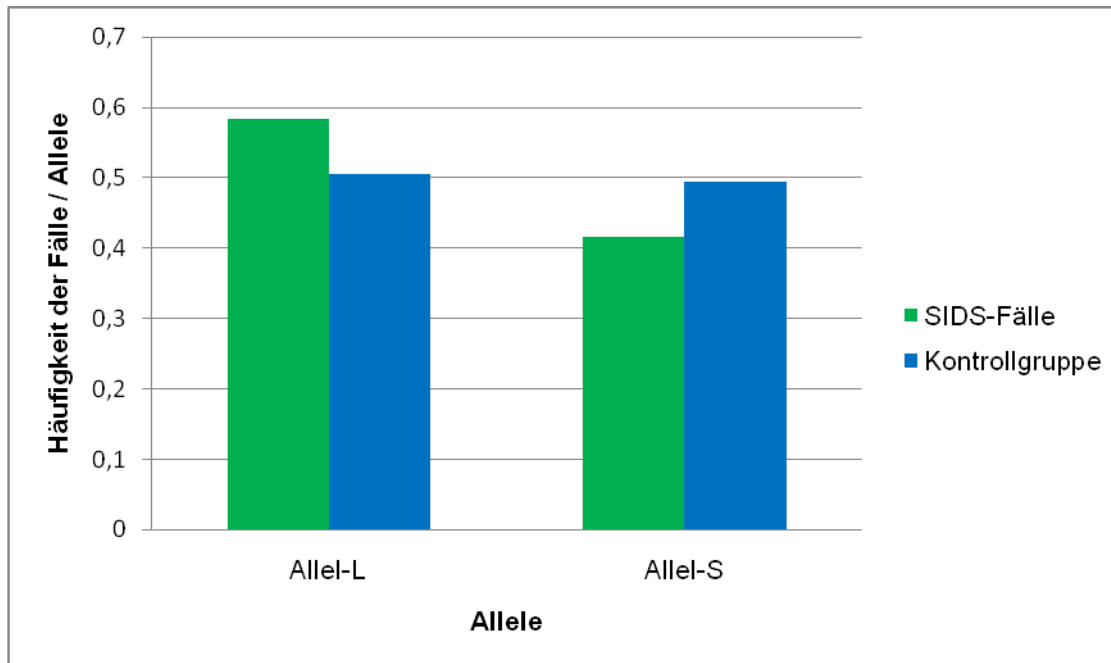


Abbildung 23 Zusammenfassung der Allelhäufigkeiten von 538 kaukasischen SIDS-Fällen und 624 Kontrollen des Polymorphismus im Promotor des Serotonintransportergens aus den Studien von Weese-Mayer et al. (2003a), Opdal et al. (2008), Marzano et al. (2008), Haas et al. (2009) und eigenen Daten ( $p < 0,01$ ).

Die Studien von Weese-Mayer et al. (2003a), Marzano et al. (2008) und tendenziell Opdal et al. (2008) scheinen eine Assoziation zwischen dem L-Allel und einem erhöhten Risiko für Säuglinge, am SIDS zu versterben, aufzuzeigen. Es soll jedoch beachtet werden, dass dies in der vorliegenden und wie auch in den Arbeiten von Haas et al. (2009) und Paterson et al. (2006) nicht bestätigt werden konnte. Dennoch scheint die Zusammenfassung aller bisher veröffentlichten und der hier vorgestellten Ergebnisse die These zu untermauern, dass das Allel L des 5-HTT-Promotor-Polymorphismus mit dem SIDS assoziiert ist.

Da das lange Allel L einen effektiveren Promotor des Serotonintransportergens bewirkt (Heils et al. 1996) und mit einem erhöhten Gehalt an von diesem Gen

transkribierter mRNA im Mittelhirn einhergeht (Little et al. 1998), wird angenommen, dass die synaptische Menge an Serotonin bei Vorliegen des L-Allels in dieser Gehirnregion niedriger ist (Weese-Mayer et al. 2003a). Allerdings können die Allele S und L durch einen SNP (A→G), der innerhalb der 5-HTTLPR liegt noch weiter unterteilt werden. Es wurde beobachtet, dass nur die A-Variante des L-Allels (L<sub>A</sub>) mit einem höheren Level an mRNA des 5-HTT einhergeht, während die Expressionsrate des L<sub>G</sub>-Allels genauso niedrig wie die des S-Allels ist (Wendland et al. 2006).

Weiterhin untersuchten Lim et al. (2006) die allelabhängige Expression von 5-HTT-mRNA an menschlichen, postmortalen Gewebeteilen des Pons, der serotonergen Neurone des Ncl. raphes dorsalis und des Ncl. raphes medianus enthält. Dabei erschien die Expressionsrate der mRNA des 5-HTT unabhängig vom Promotor-Polymorphismus. Dagegen könnten zusätzliche funktionelle, cis-wirkende Polymorphismen (für die Transkription benötigte Sequenzelemente), die in einem partiellen Linkage Disequilibrium (LD) mit dem L-Allel stehen, an der Regulation der mRNA-Expression des Serotonintransporters beteiligt sein.

Die bisher vorliegenden, kontroversen Ergebnisse sprechen dafür, dass die alleinige Untersuchung der SIDS-Fälle auf das Vorliegen der Allele S und L nicht unbedingt ausreicht, um einen möglichen Einfluss der 5-HTTLPR auf den Pathomechanismus des plötzlichen Säuglingstods zu erklären. Weitere Untersuchungen auf Polymorphismen, die im funktionellen Zusammenhang mit dem Promotor-Polymorphismus stehen, müssten angeschlossen werden.

### **Verteilung der Allele und Genotypen des Polymorphismus im zweiten Intron**

Wie das lange Allel L des Promotor-Polymorphismus bildet auch das Allel des VNTR im zweiten Intron mit zwölf Wiederholungen (Allel 12) die Grundlage für einen effektiveren Promotor des Serotonintransportergens (Heils et al. 1996, Fiskerstrand et al. 1999). Beide Polymorphismen werden assoziiert mit einer gesteigerten Expression des 5-HTT (Weese-Mayer et al. 2003b). Der VNTR im zweiten Intron des Serotonintransporters wurde für Kontrollstudien und Studien zu psychiatrischen Erkrankungen eingehend untersucht. Die Daten zeigen eine Allelfrequenz unter Kaukasiern für das Allel 12 von 52 – 68%, 32 – 46% für das Allel 10 und 0,8 – 2,9% für das Allel 9 (Weese-Mayer et al. 2003b). In Übereinstimmung mit diesen Daten beträgt in der Kontrollgruppe dieser Arbeit die Häufigkeit des Allels 12 56,2%, für das

Allel 10 43,0% und das Allel 9 0,8%. Im Gegensatz zu den ethnischen Unterschieden, die für die Allelfrequenz des Promotor-Polymorphismus berichtet wurden, scheinen diese für den Polymorphismus im zweiten Intron nicht zu bestehen (Weese-Mayer et al. 2003b).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen weitgehend mit den Resultaten aus anderen Studien, die kaukasische SIDS-Fälle untersuchten (Weese-Mayer et al. 2003b, Opdal et al. 2008, Marzano et al. 2008, Haas et al. 2009), überein. Während die SIDS-Fälle von Weese-Mayer et al. (2003b) das Allel 12 mit 59,78% etwas zahlreicher als die Kontrollen (57,61%) aufwiesen, zeigte sich bei den anderen Studien ein häufigeres Auftreten des Allels 12 bei den Kontrollen als bei den SIDS-Fällen. Auch bei den hier untersuchten Kontrollen wurde das Allel 12 mit 56,2%, bei den Fällen von plötzlichem Säuglingstod mit 53,1% gefunden. Das Allel 10, das im Vergleich zum Allel 12 eine geringere Expressionsrate des 5-HTT bedingt (Fiskerstrand et al. 1999), lag bei den Kontrollen geringfügig seltener als bei den SIDS-Fällen vor (43,0% vs. 44,6%).

Es konnte kein Unterschied bei der Verteilung der Genotypen in den hier untersuchten Fällen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Der Genotyp 12/12 wurde bei den SIDS-Fällen gleich häufig wie bei der Kontrollgruppe nachgewiesen (n=45; 34,9%). Ebenso fanden Opdal et al. (2008) den 12/12-Genotyp bei ihren Fällen in gleicher Anzahl wie bei den Kontrollen. Bei den Studien von Haas et al. (2009) und Marzano et al. (2008) war die Summe der Träger des 12/12-Genotyps bei den SIDS-Fällen gar geringer. Nur Weese-Mayer et al. (2003b) beobachteten den Genotyp 12/12 mit 36,96% bei den SIDS-Fällen häufiger als bei den Kontrollen (32,61%), jedoch nicht signifikant.

Eine Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse aus den obengenannten Studien von Weese-Mayer et al. (2003b), Opdal et al. (2008), Marzano et al. (2008), Haas et al. (2009) und der eigenen Daten (s. Abb. 24) zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) bei der Verteilung der verschiedenen Allele zwischen den Fällen (n=540) und den Kontrollen (n=626). Dieser signifikante Unterschied wird vor allem durch das Allel 9 bedingt. Die Zusammenschau aller bisherigen Ergebnisse zeigt, dass das Allel 12 bei der Kontrollgruppe häufiger vorliegt als bei den SIDS-Fällen (60,3% vs. 58,1%).

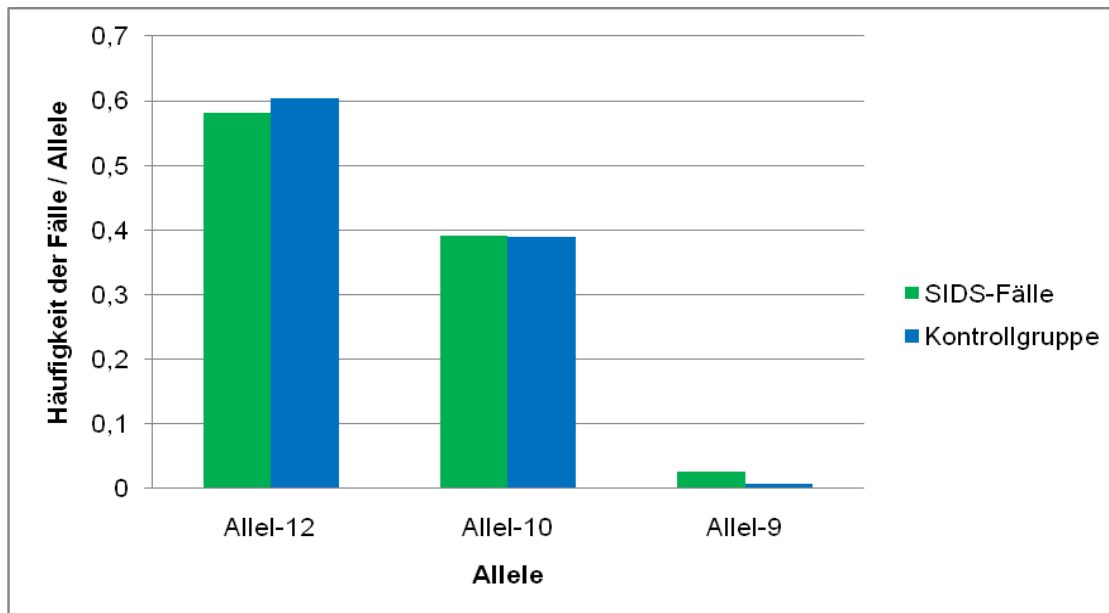


Abbildung 24 Zusammenfassung der Allelhäufigkeiten von 540 kaukasischen SIDS-Fällen und 626 Kontrollen des VNTR im zweiten Intron des Serotonintransportergens aus den Studien von Weese-Mayer et al. (2003b), Opdal et al. (2008), Marzano et al. (2008), Haas et al. (2009) und eigenen Daten.

Ein Zusammenhang mit einem erhöhten SIDS-Risiko bei Kaukasiern und dem Allel 12, das einen effektiveren Promotor des Serotonintransportergens darstellt (Fischerstrand et al. 1999), konnte von keiner der oben genannten Studien und auch nicht in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden.

Das seltene Allel mit neun Wiederholungssequenzen lag hingegen in dieser Arbeit und bei der Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse etwa dreimal häufiger bei den SIDS-Fällen als bei den Kontrollen vor. Lovejoy et al. (2003) fanden bei Untersuchungen der VNTR-Funktion in einer menschlichen Zelllinie, die das endogene 5-HTT-Gen exprimiert, eine sehr hohe Enhancer-Aktivität des Allels 9, sehr viel höher als bei den Allelen 10 und 12. Demnach würde das häufigere Vorliegen des Allels 9 bei den SIDS-Fällen, wie es in der gemeinsamen Betrachtung aller bislang publizierten Studien beobachtet wurde, gut zum inzwischen weitgehend anerkannten Konzept passen, dass eine erhöhte Aktivität des Serotonintransporters zur Entstehung des SIDS beiträgt. Allerdings ist das Allel 9 in beiden Gruppen, den Fällen und den Kontrollen, das weitaus seltenste Allel. Es könnte daher also nur in geringem Maße eine Rolle bei der Ätiologie des SIDS spielen.

## **Kombination der Polymorphismen im Promotor und im zweiten Intron des Serotonintransportergens**

Es scheint nicht unwahrscheinlich, dass der Effekt auf das SIDS nicht nur vom Promotor-Polymorphismus des Serotonintransportergens selbst, sondern auch von Polymorphismen, die mit diesem im Linkage Disequilibrium stehen, ausgehen (Opdal et al. 2008). Wie in der Studie von Weese-Mayer et al. (2003b) konnte in dieser Arbeit ein moderates LD zwischen dem Polymorphismus im Promotor und dem ebenfalls untersuchten VNTR im zweiten Intron festgestellt werden ( $D' = 0,234$ ).

Das lange Allel des Promotor-Polymorphismus und das Allel mit 12 Wiederholungen im zweiten Intron des 5-HTT stellen einen effektiveren Promotor des Gens dar (Heils et al. 1996, Fiskerstrand et al. 1999). Durch die gesteigerte Expression des 5-HTT wird erwartet, dass bei Vorliegen des Allel L oder des Allel 12 der Gehalt an synaptischem Serotonin sinkt. Entsprechend wäre die niedrigste Aktivität zu erwarten, wenn beide Varianten zugleich vorkommen (Weese-Mayer et al. 2003b).

Die serotonergen Neuronen entstehen sehr früh in der Entwicklung der menschlichen, embryonalen Medulla oblongata (Kinney 2005). Niedrigere Serotoninspiegel aufgrund höherer 5-HTT-Expression durch das Allel L, das Allel 12 oder die Kombination beider während der Entwicklung könnte die Anzahl serotonerger Neurone und synaptische Verbindungen verändern, was in einer niedrigeren Serotoninbindung in der Medulla oblongata und damit im SIDS resultieren könnte (Weese-Mayer et al. 2003b).

Bei der Auswertung der kombinierten Genotypen wurde von Weese-Mayer et al. (2003b), Opdal et al. (2008), Haas et al. (2009) und auch von der vorliegenden Arbeit der Genotyp L/L-12/12 nicht signifikant häufiger bei den SIDS-Fällen als bei den Kontrollen gefunden. Jedoch gibt es bei den SIDS-Fällen in dieser Arbeit eine Tendenz zur vermehrten Häufigkeit des Genotyps L/L-12/12 ( $p = 0,054$ ). Ein signifikanter Unterschied bei der Verteilung der kombinierten Genotypen zwischen den SIDS-Fällen und den Kontrollen ( $p = 0,04$ ) konnte hier festgestellt werden.

In ihrer Studie fanden Weese-Mayer et al. (2003b) den L-12-Haplotyp zahlenmäßig jedoch nicht signifikant häufiger bei den von ihnen untersuchten kaukasischen SIDS-Fällen im Vergleich zu den Kontrollen. In der vorliegenden Arbeit konnte bei ähnlicher Häufigkeitsverteilung des L-12-Haplotypen (22,5% SIDS-Fälle vs. 21,7% Kontrollen) wie bei der von Opdal et al. (2008) ebenfalls kein signifikanter



Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und den Kontrollen festgestellt werden. Haas et al. (2009) fanden in ihrer Studie den kombinierten Haplotyp L-12 häufiger bei den Kontrollen als bei den SIDS-Fällen (27,3% vs. 23,0%). Allein die Auswertung der Haplotypenhäufigkeiten in der Studie von Marzano et al. (2008) zeigte, dass der L-12-Haplotyp fast zweimal häufiger bei den SIDS-Fällen (44,5%) als bei den Kontrollen (23,4%) vorkam, allerdings bei einer kleinen Fallzahl von 20 SIDS-Fällen. Ein spezifisches SIDS-Risiko für kaukasische Säuglinge, ausgelöst durch diesen Haplotyp, konnte also von früheren Studien nicht durchgängig und auch in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Der L-12 Haplotyp hat scheinbar keinen direkten Einfluss auf die Expression des 5-HTT über die Kombination der Allele L und 12. Es ist jedoch möglich, dass ein noch unbestimmter funktioneller Polymorphismus, der im Linkage Disequilibrium mit dem L-12 Haplotyp steht, an der Regulation der 5-HTT-Expression beteiligt ist (Weese-Mayer et al. 2003b).

Die Kombination der Allele L und 9 konnte in dieser Arbeit bei 1,94% der SIDS-Fälle und 0,77% der Kontrollen gefunden werden. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Da das Allel 9 an sich und daher auch die Kombination der Allele L und 9 sehr selten vorliegen, könnte der Einfluss dieser Kombination auf das SIDS-Risiko ebenfalls nur sehr gering sein.

### **Die *gain-of-function*-Mutation Ile425Val**

Ein SNP (A→G), der auf Proteinebene zum Austausch der Aminosäuren Isoleucin (Ile) zu Valin (Val) an der Position 425 (Ile425Val) führt, die in der Transmembrandomäne 8 des 5-HTT liegt, wurde bisher nur im Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen und erstmalig in dieser Fragestellung untersucht. Das Vorliegen dieser Mutation steigert durch eine erhöhte Aufnahmegeschwindigkeit und Affinität des 5-HTT zum Serotonin dessen Aufnahme aus dem synaptischen Spalt (Kilic et al. 2003), und stellt somit eine *gain-of-function*-Mutation dar (Ozaki et al. 2003).

Der SNP konnte weder bei den SIDS-Fällen, noch bei den Kontrollen nachgewiesen werden. Die *gain-of-function*-Mutation tritt sehr selten auf (Ozaki et al. 2003, Kilic et al. 2003, Torres und Caron 2003), die Allelhäufigkeit für den Genotyp Val425 beträgt etwa 0,25%, das Wildtypallel besitzt eine Häufigkeit um 99,75% (Wendland et al. 2006). SIDS-Fälle zu finden, die die Mutation tragen, war bei der relativ kleinen

Population von 129 Fällen unwahrscheinlich. Ein Zusammenhang dieses SNPs mit dem SIDS kann ausgeschlossen werden.

#### **4.1.2 Verteilung der Genotypen im Bezug auf epidemiologische Risikofaktoren**

Sehr wahrscheinlich liegt bei den Säuglingen, die am SIDS versterben, eine genetische Prädisposition zu Grunde (Opdal et al. 2004). Die bisherigen Ergebnisse der SIDS-Forschung deuten darauf hin, dass die Gene, die in das serotonerge Netzwerk involviert sind, eine wichtige Rolle spielen könnten. Die meisten SIDS-Fälle tragen zumindest ein langes Allel (S/L und L/L) im Promotor des 5-HTT, dies gilt jedoch auch für die Kontrollen. Nur 34,1% der SIDS-Fälle dieser Arbeit und durchschnittlich 35 – 40% der kaukasischen SIDS-Fälle haben den L/L-Genotyp. Um das Risiko für das SIDS zu erhöhen, würde es folglich einer Kombination des L/L-Genotyps mit anderen Risikofaktoren bedürfen (Opdal et al. 2008). Ein solches Zusammentreffen postulierten auch Filiano und Kinney (1994) mit ihrem „triple-risk Modell“, wobei ein exogenes Ereignis den Auslöser für das SIDS bei einem Säugling mit entsprechenden prädisponierenden Faktoren darstellt, der sich in einem vulnerablen Entwicklungsstadium befindet (s. auch Kapitel 1.4). In der vorliegenden Arbeit wurde die Genotypenverteilung des Promotor-Polymorphismus und des Polymorphismus im zweiten Intron des Serotonintransportergens in Abhängigkeit von epidemiologischen Risikofaktoren wie der Jahreszeit, dem Lebensalter und dem Geschlecht der plötzlich verstorbenen Säuglinge untersucht.

Das Geschlechtsverhältnis für das SIDS beträgt etwa 60:40% zugunsten der Jungen. In dieser Studie betrug das Verhältnis von männlichen zu weiblichen SIDS-Fällen 66% zu 34%. Ein Unterschied in der Verteilung der Genotypen des Promotor-Polymorphismus und des VNTR im zweiten Intron zwischen männlichen und weiblichen SIDS-Fällen konnte in dieser Arbeit mit ihren 129 SIDS-Fällen nicht gefunden werden.

Das Sudden Infant Death Syndrom ereignet sich am häufigsten zwischen dem zweiten und vierten Monat nach der Geburt, was auch bei den hier untersuchten Fällen von plötzlichem Säuglingstod beobachtet werden konnte. In diesem spezifischen Lebensabschnitt ereignen sich wohl im Rahmen der normalen Entwicklung entscheidende Veränderungen (Okado et al. 2002). Zusätzliche

exogene Faktoren wie z. B. mütterliches Rauchen oder die Bauchlage, die das serotonerge System beeinflussen können, oder Defekte im serotonergen System an sich, stellen eine weitere Gefährdung für einen Säugling in dieser, ohnehin instabilen Lebensphase dar (Kinney 2005). Eine Häufung der mit dem SIDS assoziierten Polymorphismen im Promotor (Allel L) und im zweiten Intron (Allel 12) des Serotonintransportergens trat bei den hier untersuchten Säuglingen, die während dieser kritischen Entwicklungsphase verstarben, nicht auf.

Mehrere Studien wiesen darauf hin, dass Infektionen die Aktivität des Serotonins im Gehirn in hohem Maße verändern könnten (Okado et al. 2002). Erkältungen und Grippeerkrankungen, die sich vor allem im Winter ereignen, könnten also eine Erklärung für das besondere Merkmal des SIDS sein, gehäuft während der kalten Jahreszeit aufzutreten (Kleemann und Bajanowski 2003). Es konnte in dieser Arbeit jedoch kein Unterschied bei der Häufigkeit der Genotypen beim Vergleich der SIDS-Fälle, die in den Monaten Dezember bis April eintraten, und den Fällen, die in den anderen Monaten verstorben waren, festgestellt werden.

Opdal et al. (2008) konnten bei ihren Untersuchungen ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen den Genotypen und den hier aufgeführten Risikofaktoren feststellen. Sie fanden dagegen bei den Säuglingen, die nach ihrem plötzlichen Versterben in Bauchlage aufgefunden wurden, den S/S-Genotyp häufiger, was eine inverse Verknüpfung darstellt, da der Genotyp L/L mit einem erhöhten SIDS-Risiko assoziiert sein sollte. Mutmaßlich stellt diese Schlaflage an sich einen starken Risikofaktor für das SIDS dar, und hängt weniger von einer vorbestehenden genetischen Prädisposition ab (Opdal et al. 2008). Das mütterliche Rauchen, das als starker Risikofaktor für den plötzlichen Säuglingstod identifiziert wurde (Riße 1998, Schlaud 1998, Kleemann und Bajanowski 2003, Horne et al. 2004, Saturnus 2007, Moon et al. 2007, Kinney und Thach 2009) konnte von Opdal et al. (2008), die 163 SIDS-Fälle untersuchten, nicht mit einem bestimmten Genotyp der Polymorphismen im Promotor und im zweiten Intron des 5-HTT in Verbindung gebracht werden.

Für eine Auswertung der Genotypenverteilung im Zusammenhang mit den in Bauchlage verstorbenen Säuglingen und der Rauchexposition lagen von zu wenigen SIDS-Fällen dieser Studie die erforderlichen zusätzlichen Informationen vor.

## 4.2 Die Population der SIDS-Fälle

Ein SIDS-Fall wurde in die vorliegende Studie einbezogen, wenn die Todesursache trotz genauer Untersuchung anhand einer kompletten Autopsie, der Betrachtung der Todesumstände und der klinischen Anamnese ungeklärt blieb.

Um sicher zu gehen, dass Mitglieder einer möglichen Säuglingskontrollgruppe nicht zu einem späteren Zeitpunkt am SIDS verstorben wären, wurde für diese Arbeit eine Kontrollgruppe aus 129 gesunden Erwachsenen gebildet. Der 5-HTT-Genotyp wird vom Alter nicht beeinflusst (Weese-Mayer et al. 2003a). Auch Opdal et al. (2008) nahmen für ihre umfangreiche Studie Erwachsene in ihre Kontrollgruppe auf.

Alle SIDS-Fälle und die erwachsenen Kontrollen waren Kaukasier, jedoch war über die Familienangehörigen nichts bekannt. Die untersuchte Person könnte also variierende Grade an genetischer Ausstattung von anderen ethnischen Gruppen besitzen, was einen systematischen Unterschied in der Allelfrequenz bedingen würde. Gerade die Allelfrequenzen des Promotor-Polymorphismus unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Populationen deutlich (s. oben). Eine Lösung dieses Problems wären familienbasierte Studien, wobei bestimmt wird, wie häufig Eltern, die heterozygote Träger des entsprechenden Allels sind, dies auf den Betroffenen übertragen (Hischhorn et al. 2002).

Die SIDS-Fälle wurden nicht auf weitere genetische Mutationen wie dem MCAD-Enzymdefekt (Medium-Chain Acyl-Coenzym A Dehydrogenase Enzymdefekt) A985G, oder Mutationen, die im Rahmen des Long-QT-Syndrom auftreten, untersucht, die an sich zum Tod führen können (Opdal und Rognum 2004). Es ist also möglich, dass sich unter den untersuchten Fällen solche befanden, deren Gesundheit durch eine derartige genetische Störung zusätzlich beeinträchtigt war, was eine Aussage über den tatsächlichen Effekt von Polymorphismen im Serotonintransportergen erschwert.

## 4.3 Methoden zur Genotypisierung

Die aus Blut oder Gewebe isolierte DNA der 129 SIDS-Fälle und die DNA der Kontrollgruppe wurde an drei Genloci des Serotonintransportergens mit Hilfe der

Polymerase-Ketten-Reaktion und des Restriktionsendonukleasenverdau untersucht. Die Auswertung erfolgte über Gel- und Kapillargelelektrophorese.

Die Untersuchung der Proben auf die Polymorphismen im Promotor, im zweiten Intron und auf den SNP Ile425Val mittels PCR erfolgte für diese Arbeit in Einzelreaktionen. Eine Triplex-PCR zur gleichzeitigen Detektion aller drei Polymorphismen, wie sie beispielsweise von Wendland et al. (2006) durchgeführt wurde, hätte den Vorteil, den Verbrauch an Reagenzien und den Arbeitsaufwand zu minimieren. Die verschiedenen Amplifikate einer Triplex-PCR dienen zudem als interne Kontrolle für die jeweils anderen. Für die Entwicklung einer Triplex-PCR, bei der sich drei Primerpaare in einem Ansatz befinden, bedarf es jedoch eines abgestimmten Primerdesigns sowie der Optimierung der Annealing-Temperatur, um ausreichend sensitive und spezifische Ergebnisse zu erhalten. Die Etablierung und Optimierung einer Triplex-PCR ist kosten- und zeitaufwendig, der Nutzen muss vor allem bei einer überschaubaren Anzahl an Proben abgewogen werden. Die Menge der DNA der am SIDS verstorbenen Säuglinge, die für diese Studie untersucht wurde, war zum Teil sehr gering. Durch die sehr lange Lagerung mancher Proben war deren DNA in einem degradierten Zustand. Auch diese Umstände erschwerten die Durchführung einer Triplex-PCR, da für jede unterschiedliche Amplifikation optimale Bedingungen geschaffen werden mussten, und die ermittelte ideale Annealing-Temperatur jedes Primerpaars genau eingehalten werden musste um entsprechende Ergebnisse zu erzielen.

Das Amplifikat zur Genotypisierung des funktionellen SNP (A→G), der zum Austausch der Aminosäuren Isoleucin zu Valin führt, wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym BclI verdaut. Der Nachweis eines SNP ist durch verschiedene Methoden möglich, u.a. durch die Sequenzierung.

Die hier genutzten Methoden der PCR und des Restriktionsenzymverdau zur Genotypisierung der Proben stellten unter den möglichen Alternativen hinsichtlich der finanziellen und technischen Möglichkeiten die beste Wahl dar. Diese Methoden sind grundsätzlich für den Nachweis der verschiedenen Genotypen geeignet, sie beziehen sich jedoch nur auf die Ebene der DNA und lassen keine weiteren Aussagen, beispielsweise über das Protein bzw. posttranslationale Modifikationen des Serotonintransporters zu.

## 4.4 Ausblick

Einige Arbeiten konnten bisher eine Assoziation des SIDS mit dem Promotor-Polymorphismus des 5-HTT feststellen. Jedoch kann die Hypothese, dass dieser Polymorphismus an der Pathogenese des SIDS beteiligt ist nicht uneingeschränkt bestätigt werden. In anderen wie auch in dieser Studie wurden widersprechende Ergebnisse festgestellt. Weitere Kandidatengene die an autonomen Funktionen, der Neurotransmission, am Energiestoffwechsel und der Infektabwehr beteiligt sind, wurden auf eine Verbindung mit dem SIDS untersucht. Ein gemeinsamer, genetischer Defekt bei einem Großteil der SIDS Fälle konnte bisher allerdings noch nicht identifiziert werden. Die Forschung in diese Richtung könnte ein wichtiger Baustein sein, um die Ursachen des plötzlichen Säuglingstodes möglichst weitgehend aufzuklären.

Anhand der vorliegenden Befunde ist eine Prophylaxe, die zu einem völligen Verschwinden des SIDS führen könnte, in naher Zukunft nicht absehbar. Es gilt vor allem weiterhin vor den bis jetzt bekannten Risikofaktoren zu warnen, beziehungsweise darüber aufzuklären und mögliche Empfehlungen zur Vorsorge gegen das SIDS zu propagieren. Allein durch die Minimierung der Stressfaktoren von außen wie der Bauchlage, Schlafen im Bett der Eltern oder Rauchen der Mutter kann das SIDS-Risiko stark vermindert werden. Schon durch Unterlassen des Rauchens während der Schwangerschaft könnten möglicherweise ein Drittel der SIDS-Fälle verhindert werden (Moon et al. 2007). Dennoch gibt es leider Säuglinge, die ohne Vorliegen exogener Risikofaktoren am SIDS versterben. Dem *Sudden Infant Death Syndrome* müssen also noch weitere, bisher unbekannte Mechanismen zugrunde liegen, die es zu erforschen gilt.

## 5. Zusammenfassung

Das *Sudden Infant Death Syndrome* (SIDS) ist die häufigste Todesursache bei Säuglingen in den Industrieländern. Die Pathophysiologie und die Ursache sind bis heute ungeklärt. In den letzten Jahren wurden verschiedene genetische Polymorphismen mit dem SIDS in Zusammenhang gebracht. Ein Augenmerk liegt dabei auf dem Serotonintransportergen.

Serotonin hat im Hirnstamm Einfluss auf verschiedene Regulationsmechanismen, u.a. auf Atmung und Weckreaktion (Arousal), die auch mit dem SIDS in Verbindung gebracht werden. Die Dauer und Stärke der Serotonin-Wirkung wird vom Serotonintransporter (5-HTT) reguliert, welcher an der präsynaptischen Membran den Neurotransmitter aufnimmt und dadurch dessen Wirkung an den Serotoninrezeptoren der Postsynapse beendet.

Im Gen für diesen Transporter wurde ein Polymorphismus im Promotor (Allele short=S und long=L) und ein VNTR (*variable number tandem repeat*) im zweiten Intron (Allele 9, 10 und 12) beschrieben. Die Allele L und 12 steigern die Effektivität des Promotors, was zu einer Aktivitätssteigerung des Transporters führt, sodass Serotonin schneller zurücktransportiert werden kann, und die Wirkungsdauer an den postsynaptischen Rezeptoren abnimmt. Ein Zusammenhang, insbesondere des Allels L mit dem SIDS, wurde bereits in früheren Arbeiten dargestellt. Ein weiterer funktioneller SNP (*single nucleotide polymorphism*), der durch den Austausch der Aminosäuren Isoleucin gegen Valin (Ile425Val) in der Transmembrandomäne 8 des 5-HTT zu einer gesteigerten Aktivität führt, wurde bislang nur im Rahmen psychiatrischer Erkrankungen untersucht.

Für die vorliegende Studie wurde die aus Blut- und Gewebeproben extrahierte DNA (Sektionsmaterial) von 129 SIDS-Fällen, ebenso wie die DNA der Kontrollgruppe (129 Erwachsene), mit Hilfe der PCR genotypisiert. Das Amplifikat zur Genotypisierung des SNP wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym BclI verdaut. Die Auswertung erfolgte über Gel- und Kapillargelelektrophorese. Die Allelverteilung wurde weiterhin in Abhängigkeit von epidemiologischen Risikofaktoren wie der Jahreszeit, dem Lebensalter und dem Geschlecht dargestellt.

Die Ile425Val Mutation (A→G SNP) konnte von uns nicht in Verbindung mit dem SIDS gebracht werden.

Ein Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe zugunsten des langen Allels L konnte nur als statistisch nicht signifikanter Trend (58% vs. 52% L) festgestellt werden. Das Allel 12 trat bei den SIDS-Fällen nicht häufiger als bei der Kontrollgruppe auf. Ebenso bestand kein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit des L-Allels und dem Geschlecht der SIDS-Fälle sowie dem Lebensalter bzw. der Jahreszeit bei Todeseintritt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten die Hypothese eines Einflusses einer genetisch bedingten höheren 5-HTT-Aktivität auf die Häufigkeit des SIDS nicht weiter erhärten, doch die Zusammenfassung der bislang publizierten Daten und der Ergebnisse dieser Arbeit weist entschieden in diese Richtung.



## 6. Anhang: Abbildung 25 bis 27

Protokolle der Überprüfung der drei Primerpaare mit dem DNASTAR Lasergene® v8.1 Programm (GATC Biotech):

Upper Primer: rs25531 rv 23-mer 5' TGGGGGTTGCAGGGGATCCTG 3' Lower Primer: rs25531 fv 23-mer 5' TCCTCCGCTTTGGCGCCTCTTC 3'		
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	66.6 °C	67.8 °C
Primer Overall Stability	-49.5 kcal/m	-52.2 kcal/m
Primer Location	172..194	683..661
Product Tm - Primer Tm	17.8 °C	
Primers Tm Difference	1.2 °C	
Optimal Annealing Temperature	64.1 °C	
Product Length	512 bp	
Product Tm (%GC Method)	84.4 °C	
Product GC Content	62.9%	
Product Tm at 6xSSC	106.0 °C	

Salt			Formamide			
mM	xSSC	xSSPE	0%	10%	20%	50%
1	0.005	0.006	56.2	49.7	43.2	23.7
10	0.051	0.062	72.8	66.3	59.8	40.3
50	0.256	0.312	84.4	77.9	71.4	51.9
165	0.846	1.031	93.0	86.5	80.0	60.5
330	1.692	2.062	98.0	91.5	85.0	65.5
500	2.564	3.125	101.0	94.5	89.0	68.5
1000	5.128	6.250	106.0	99.5	93.0	73.5
195	1.000	1.219	+0.0	%formamide = Tm 94.2 °C		

Abbildung 25 Protokoll der Überprüfung des Primers 5HTTLPR mit dem DNASTAR Lasergene® v8.1 Programm (GATC Biotech).

Upper Primer: Ile 425 rv 22-mer 5' CATCCTCCACAGCCCATTTCC 3' Lower Primer: Ile 425 fv 20-mer 5' TGGAGCCCCACCCTTCCTG 3'		
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	61.2 °C	60.6 °C
Primer Overall Stability	-45.2 kcal/m	-43.4 kcal/m
Primer Location	3275285..3275300	3275649..3275633
Product Tm - Primer Tm	18.9 °C	
Primers Tm Difference	0.6 °C	
Optimal Annealing Temperature	58.9 °C	
Product Length	365 bp	
Product Tm (%GC Method)	79.5 °C	
Product GC Content	52.3%	
Product Tm at 6xSSC	101.1 °C	

Salt			Formamide			
mM	xSSC	xSSPE	0%	10%	20%	50%
1	0.005	0.006	51.3	44.8	38.3	18.8
10	0.051	0.062	67.9	61.4	54.9	35.4
50	0.256	0.312	79.5	73.0	66.5	47.0
165	0.846	1.031	88.1	81.6	75.1	55.6
330	1.692	2.062	93.1	86.6	80.1	60.6
500	2.564	3.125	96.1	89.6	83.1	63.6
1000	5.128	6.250	101.1	94.6	88.1	68.6
195	1.000	1.219	+0.0	%formamide = Tm 89.3 °C		

Abbildung 26 Protokoll der Überprüfung des Primers Ile425 mit dem DNASTAR Lasergene® v8.1 Programm (GATC Biotech).

Upper Primer: 5HTT2 rv 25-mer 5' TCATGTTCTAGTCTTACGCCAGTG 3' Lower Primer: 5HTT2 fw 25-mer 5' TGGATTTCCTTCTCAGTGATTGG 3'		
DNA 250 pM, Salt 50 mM	Upper Primer	Lower Primer
Primer Tm	52.6 °C	50.9 °C
Primer Overall Stability	-19.6 kcal/m	-21.0 kcal/m
Primer Location	8404242..8404268	8404789..8404765
Product Tm - Primer Tm	21.9 °C	
Primers Tm Difference	1.6 °C	
Optimal Annealing Temperature	51.4 °C	
Product Length	548 bp	
Product Tm (%GC Method)	72.9 °C	
Product GC Content	34.7%	
Product Tm at 6xSSC	94.5 °C	

Product Melting Temperature (%GC Method)

Salt			Formamide			
mM	xSSC	xSSPE	0%	10%	20%	50%
1	0.005	0.006	44.7	38.2	31.7	12.2
10	0.051	0.062	61.3	54.8	48.3	28.8
50	0.256	0.312	72.9	66.4	59.9	40.4
165	0.846	1.031	81.5	75.0	68.5	49.0
330	1.692	2.062	86.5	80.0	73.5	54.0
500	2.564	3.125	89.5	83.0	76.5	57.0
1000	5.128	6.250	94.5	88.0	81.5	62.0

%formamide = Tm 93.1 °C

Abbildung 27 Protokoll der Überprüfung des Primers 5HTT2 mit dem DNASTAR Lasergene® v8.1 Programm (GATC Biotech).

## 7. Literaturverzeichnis

- ABI Prism 310 Genetic Analyzer User`s Manual. Perkin-Elmer Corporation, 1995
- Althoff H: Der plötzliche Kindstod; in: Praxis der Rechtsmedizin für Mediziner und Juristen; hrsg. v. Forster B; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1986, 62-75
- Baumgarten HG, Grozdanovic Z: Anatomy of Central Serotonergic Projection Systems, in: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 129; hrsg. v. Baumgarten HG, Göthert M; Springer Verlag, Berlin 1997, 41-89
- Beckwith JB (2003): Defining the Sudden Infant Death Syndrome. Arch Pediatr Adolesc Med 157, 286-290
- Blair PS, Fleming PJ, Smith IJ, Platt MW, Young J, Nadin P, Berry PJ, Golding J (1999): Babies sleeping with parents: case-control study of factors influencing the risk of the sudden infant death syndrome. BMJ 319, 1457-1462
- Buber M, Rosenzweig F: Das Buch Könige; Schocken Verlag, Berlin 1929
- Butler JM, Buel E, Crivellente F, McCord BR (2004): Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. Electrophoresis 25, 1397-1412
- DNA IQ™ System – Database Protocol. Promega, Madison 2006
- Duncan JR, Paterson DS, Hoffman JM, Molker DJ, Borenstein NS, Belliveau RA, Krous HF, Haas EA, Stanley C, Nattie EE, Trachtenberg FL, Kinney HC (2010): Brainstem Serotonergic Deficiency in Sudden Infant Death Syndrome. JAMA 303, 430-437

- 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, 194-197
- Fiskerstrand CE, Lovejoy EA, Quinn JP (1999): An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity embryonic stem cells. *FEBS Lett* 458, 171-174
- Gelernter J, Cubells JF, Kidd JR, Pakstis AJ, Kidd KK (1999): Population Studies of Polymorphisms of the Serotonin Transporter Protein Gene. *Am J Med Genet* 88, 61-66
- Goldberg J, Hornung R, Yamashita T, Wehrmacher W (1986): Age at death and risk factors in sudden infant death syndrome. *Aust Paediatr J* 22, 21-28
- Gregersen M, Rajs J, Laursen H, Baandrup U, Frederiksen P, Gidlund E: Pathologic criteria for the Nordic Study of SIDS; in: Sudden infant death syndrome, new trends in the nineties; hrsg. v. Rognum TO; Scandinavian University Press 1995, 50-58
- Haas C, Braun J, Bär W, Bartsch C (2009): No association of serotonin transporter gene variation with sudden infant death syndrome (SIDS) in Caucasians. *Leg Med (Tokyo)* 11, 210-212
- Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP (1996): Allelic Variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression. *J Neurochem* 66, 2621-2624
- Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K (2002): A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 4, 45-61
- Hoffman BJ, Hansson SR, Mezey È, Palkovits M (1998): Localization and Dynamic Regulation of Biogenic Amine Transporters in the Mammalian Central Nervous System. *Front Neuroendocrinol* 19, 187-231

- Horne RSC, Franco P, Adamson TM, Groswasser J, Kahn A (2004): Influences of maternal cigarette smoking on infant arousability. *Early Hum Dev* 79, 49-58
- Hüther G, Rüter E: Das serotonerge System. 1. Auflage; UNI-MED Verlag AG, Bremen 2000
- Kahn A, Groswasser J, Franco P, Scaillet S, Sawaguchi T, Kelmanson I, de Broca A, Dan B, Servais L (2000): Factors influencing the determination of arousal thresholds in infants – a review. *Sleep Med* 1, 273-278
- Kato I, Franco P, Groswasser J, Scaillet s, Kelmanson I, Togari I, Kahn A (2003): Incomplete Arousal Processes in Infants Who Were Victims of Sudden Death. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 1298-1303
- Kilic F, Rudnick G (2000): Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3106-3111
- Kinney HC (2005): Abnormalities of the Brainstem Serotonergic System in the Sudden Infant Death Syndrome: A Review. *Pediatr Dev Pathol* 8, 507-524
- Kinney HC, Richerson GB, Dymecki SM, Darnall RA, Nattie EE (2009): The Brainstem and Serotonin in the Sudden Infant Death Syndrome. *Annu Rev Pathol* 4, 517-550
- Kinney HC, Thach BT (2009): The Sudden Infant Death Syndrome. *N Engl J Med* 361, 795-805
- Kleemann WJ, Bajanowski T: Plötzlicher Tod im Säuglings- und Kindesalter; in: *Handbuch gerichtliche Medizin*; hrsg. v. Madea B, Brinkmann B; Springer Verlag, Berlin 2003, 1071-1128
- 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, 190-193

- Kraft JB, Slager SL, McGrath PJ, Hamilton SP (2005): Sequence Analysis of the Serotonin Transporter and Associations with Antidepressant Response. *Biol Psychiatry* 58, 374-381
- Krous FK, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlick R, Kenns TG, Mitchell EA (2004): Sudden Infant Death Syndrome and Unclassified Sudden Infant Deaths: A Definitional and Diagnostic Approach. *Pediatrics* 114, 234-238
- Lesch KP: Molecular Biology, Pharmacology, and Genetics of the Serotonin Transporter: Psychobiological and Clinical Implications, in: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 129; hrsg. v. Baumgarten HG, Göthert M; Springer Verlag, Berlin 1997, 671-705
- Lesch KP, Mössner R (1998): Genetically Driven Variation in Serotonin Uptake: Is There a Link to Affective Spectrum, Neurodevelopmental, and Neurodegenerative Disorders? *Biol Psychiatry* 44, 179-192
- Lesch KP, Gross J, Franzek E, Wolozin BL, Riederer P, Murphy DL (1995): Primary Structure of the Serotonin Transporter in Unipolar Depression and Bipolar Disorder. *Biol Psychiatry* 37, 215-223
- Lim JE, Papp A, Pinsonneault J, Sadée W, Saffen D (2006): Allelic expression of serotonin transporter (SERT) mRNA in human pons: lack of correlation with the polymorphism SERTLPR. *Mol Psychiatry* 11, 649-662
- Lovejoy EA, Scott AC, Fiskerstrand CE, Bubb VJ, Quinn JP (2003): The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predisposition to affective disorders has distinct regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repeat unit. *Eur J Neurosci* 17, 417-420

- Little KY, McLaughlin DP, Zhang L, Livermore CS, Dalack GW, McFinton PR, DelProposto ZS, Hill E, Cassin BJ, Watson SJ, Cook EH (1998): Cocaine, Ethanol, and Genotype Effects on Human Midbrain Serotonin Transporter Binding Sites and mRNA Levels. *Am J Psychiatry* 155, 207–213
- Marzano FN, Maldini M, Filonzi L, Lavezzi AM, Parmigiani S, Magnani C, Bevilacqua G, Maturri L (2008): Genes regulating the serotonin metabolic pathway in the brain stem and their role in the etiopathogenesis of the sudden infant death syndrome. *Genomics* 91, 485-491
- Maturri L, Ottaviani G, Lavezzi AM (2005): Techniques and Criteria in Pathologic and Forensic-Medical Diagnostics in Sudden Unexpected Infant and Perinatal Death. *Am J Clin Pathol* 124, 259-268
- Moon RY, Horne RSC, Hauck FR (2007): Sudden infant death syndrome. *Lancet* 370, 1578-1587
- Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch KP (2004): Serotonin Transporter: Gene, Genetic Disorders, and Pharmacogenetics. *Mol Interv* 4, 109-123
- Narita N, Narita M, Takashima S, Nakayama M, Nagai T, Okado N (2001): Serotonin Transporter Gene Variation Is a Risk Factor for Sudden Infant Death Syndrome in the Japanese Population. *Pediatrics* 107, 690-692
- Okado N, Narita M, Narita N (2002): A serotonin malfunction hypothesis by finding clear mutual relationships between several risk factors and symptoms associated with sudden infant death syndrome. *Med Hypotheses* 58, 232-236
- Opdal SH, Rognum TO (2004): The Sudden Infant Death Syndrome Gene: Does It Exist? *Pediatrics* 114, 506-512
- Opdal SH, Opstad A, Wege A, Rognum TO (2003): IL-10 gene polymorphisms are associated with infectious cause of sudden infant death. *Hum Immunol* 64, 1183-1189

- Opdal SH, Vege Á, Rognum TO (2008): Serotonin transporter gene variation in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr* 97, 861-865
- Ozaki N, Goldman D, Kaye WH, Plotnicov K, Greenberg BD, Lappalainen J, Rudnick G, Murphy DL (2003): Serotonin transporter missense mutation associated with a complex neuropsychiatric phenotype. *Mol Psychiatry* 8, 933-936
- 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, 2124-2132
- Poets CF, Urschitz MS, von Bodman A (2003): Pathophysiologische Erklärungsmodelle zum plötzlichen Säuglingstod. *Monatsschr Kinderheilkd* 5, 504-509
- Ponsonby A-L, Dwyer T, Gibbons LE, Cochrane JA, Wang Y-G (1993): Factors Potentiating the Risk of Sudden Infant Death Syndrome Associated with the Prone Position. *N Engl J Med* 329, 377-382
- QIAamp® DNA Investigator Handbook. Qiagen, Hilden 2007
- QIAxcel DNA Handbook. Qiagen, Hilden 2008
- Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD (1993): Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: Molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2542-2546
- Riße M: Bedeutung und Wertigkeit morphologischer Befunde an Halsorganen unter forensisch-differentialdiagnostischen Aspekten. Eine rechtsmedizinische Studie zur Problematik des Plötzlichen Kindstodes (SIDS). Med. Habil.-Schr. Gießen 1998



- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989
- Saternus KS: Plötzlicher Kindstod – eine Folge der Bauchlage?; in: Festschrift für Horst Leithoff; hrsg. v. Walther G, Haffner H-T; Kriminalstatistikverlag, Heidelberg 1985, 67-88
- Saternus KS (2004): Sudden infant death–focus subject of medico-legal research. *Forensic Sci Int* 144, 247-253
- Saternus KS: Plötzlicher Kindstod; in: Praxis Rechtsmedizin. Befunderhebung. Rekonstruktion. Begutachtung; hrsg. v. Madea B; Springer Verlag, Berlin 2007, 252-256
- Schlaud M: Epidemiologie des Plötzlichen Kindstodes (SID); in: Säuglingssterblichkeit. Plötzlicher Kindstod (SID); hrsg. v. Saternus KS, Karimow S; Verlag Schmidt-Römhild, Lübeck 1998, 41-50
- Schneider PM, Wendler C, Riepert T, Braun L, Schacker U, Horn M, Althoff H, Mattern R, Rittner C (1989): Possible association of sudden infant death with partial complement C4 deficiency revealed by post-mortem DNA typing of HLA class II and III genes. *Eur J Pediatr* 149, 170-174
- Singh SK, Yamashita A, Gouaux E (2007): Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters. *Nature* 448, 925-956
- Starke K: Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems; in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; hrsg. v. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K; Urban & Fischer Verlag, München 2009, 105-136
- Statistisches Bundesamt: Todesursachenstatistik (Fachserie 12, Reihe 4); Wiesbaden 2010

- Stephens M, Donnelly P (2003): A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction. *Am J Hum Genet* 73, 1162-1169
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001): A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68, 978-989
- Technical Manual des Plexor® HY System for the Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR Systems. Promega, Madison 2007
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Maher BS, Silvestri JM, Curran ME, Marazita ML (2003a): Sudden Infant Death Syndrome: Association With a Promoter Polymorphism of the Serotonin Transporter Gene. *Am J Med Gen* 117A, 268-274
- Weese-Mayer DE, Zhou L, Berry-Kravis EM, Maher BS, Silvestri JM, Marazita ML (2003b): Association of the Serotonin Transporter Gene with Sudden Infant Death Syndrome: A Haplotype Analysis. *Am J Med Gen* 122A, 238-245
- Wendland JR, Martin BJ, Kruse MR, Lesch KP, Murphy DL (2006): Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Mol Psychiatry* 11, 224-226
- 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, 677-684
- Wilske J: Zur Definition und Pathophysiologie des plötzlichen Säuglingstodes; in: Plötzlicher Säuglingstod, Band 6; hrsg. v. Kruse K, Oehmichen M; Hansisches Verlagskontor Lübeck 1993, 7-18
- Zhao JH (2004): 2LD, GENECOUNTING and HAP: computer programs for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics* 20, 1325-1326

Zhou Z, Zhen J, Karpowich NK, Goetz RM, Law CJ, Reith MEA, Wang DN (2007):  
LeuT-Desipramine Structure Reveals How Antidepressants Block  
Neurotransmitter Reuptake. *Science* 317, 1390-1393

Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf der 19. Frühjahrstagung (Region Nord) der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) am 28. Mai 2010 in Gießen vorgestellt.

## Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Prof. Dr. M. Klintschar für die freundliche Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, die gute Betreuung und die Unterstützung bei allen aufgetreten Fragen und Problemen.

Mein Dank gilt auch Frau Lang und Frau Rink die mich während meiner Arbeit im Labor immer unterstützen. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Ormandy, vor allem für die Hilfe bei computertechnischen Fragen.

Für die vielen Ratschläge und seine große Hilfsbereitschaft danke ich Herrn Prof. Dr. Steinfeld.

Frau Putzer danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Gradienten-PCR, sowie Frau Klages aus der Abteilung für Pathologie für die Möglichkeit der Mitbenutzung des Gradient Cyclers.

Für die genetisch-epidemiologische Beratung und die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse möchte ich der Abteilung Genetische Epidemiologie der Universität Göttingen, insbesondere Frau Sohns danken.

Herrn Dr. Schönfeld und Frau Werner danke ich für die fachliche sowie die persönliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

## Lebenslauf

Am 21.05.1985 wurde ich als zweites Kind meiner Eltern Gertrud Elisabeth und Johannes Geisenberger in Landsberg am Lech geboren. Ich habe einen älteren Bruder, Martin, und eine jüngere Schwester, Carolin.

Von 1991 bis 1995 besuchte ich die Grundschule in Schwabsoien. Ab September 1995 war ich Schülerin an der Grund- und Teilhauptschule in Altenstadt. Im September 1997 wechselte ich an die Realschule in Schongau. Nach Abschluss der Realschule im Jahr 2001 begann ich meine zweijährige Ausbildung zur Laborantin für Biotechnologie am Agrarbildungszentrum in Landsberg am Lech, die ich im Juni 2003 abschloss. Innerhalb dieser Ausbildung absolvierte ich ein einjähriges Praktikum bei der Firma Roche Diagnostics in Penzberg.

Vom September 2003 bis zum Juni 2005 besuchte ich die Berufsoberschule in Landshut-Schönbrunn und erwarb dort die allgemeine Hochschulreife.

Im Oktober 2005 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen auf und absolvierte im Herbst 2007 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung nach neuer Approbationsordnung. Im August 2010 habe ich mein praktisches Jahr begonnen.