

Stefanie Schumann

**Sequenzanalyse des mitochondrialen
Genoms beim Syndrom des Plötzlichen
Säuglingstodes (SIDS)**

2013

Fachbereich Biologie

**Sequenzanalyse des mitochondrialen
Genoms beim Syndrom des Plötzlichen
Säuglingstodes (SIDS)**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**vorgelegt von
Stefanie Schumann
aus Schönebeck (Elbe)**

2013

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Dirk Prüfer
Erste Gutachterin:	Prof. Dr. med. Heidi Pfeiffer
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Christian Klämbt
Tag der mündlichen Prüfung:	07.08.2013
Tag der Promotion:	25.10.2013

**Für meine Familie
in Liebe und Dankbarkeit**

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	II
1. Einleitung	1
1.1 Der Plötzliche Säuglingstod (SIDS)	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	4
1.1.2 „Triple-Risk-Hypothesis“	5
1.1.3 German Study of Sudden Infant Death Syndrome	7
1.1.4 Genetische Grundlagen.....	9
1.2 Mitochondrien	11
1.2.1 Eigenschaften des mitochondrialen Genoms	11
1.2.2 Oxidative Phosphorylierung.....	13
1.2.3 Heteroplasmie	15
1.2.4 Mutationen und Polymorphismen der mitochondrialen DNA	15
1.2.5 Mitochondriopathien	17
1.3 Das mitochondriale Genom und der Plötzliche Säuglingstod	18
1.4 Zielsetzung.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Proben	21
2.1.2 Geräte	22
2.1.3 Chemikalien.....	22
2.1.4 Reagenziensysteme	24
2.1.5 Enzyme.....	25
2.1.6 Größenmarker, dNTPs	25
2.1.7 Oligonukleotide.....	26
2.1.8 Software, Datenbanken	26

2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Extraktion.....	27
2.2.2 Quantifizierung der DNA.....	34
2.2.2.1 Quantifizierung der Zellkern-DNA mittels <i>Real-Time</i> PCR	34
2.2.2.2 Quantifizierung der mitochondrialen DNA mittels <i>Real-Time</i> PCR	36
2.2.3 Aufreinigung der DNA-Extrakte	37
2.2.3.1 Aufreinigung „MICROCON® Centrifugal Filter Devices“	37
2.2.3.2 Aufreinigung „QIAquick PCR Purification Kit“	38
2.2.4 SNP-Analyse ausgewählter mitochondrialer Nukleotidpositionen	39
2.2.4.1 Primer-Design	40
2.2.4.2 Multiplex-PCR	43
2.2.4.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese	45
2.2.4.4 Aufreinigung der PCR-Produkte	46
2.2.4.5 SNaPshot-Multiplex-PCR	47
2.2.4.6 Aufreinigung der SNaPshot-Produkte	48
2.2.4.7 Kapillargelelektrophorese	49
2.2.5 Sequenzierung der mitochondrialen DNA	50
2.2.5.1 Primer Design.....	51
2.2.5.2 Singleplex-PCR	52
2.2.5.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	52
2.2.5.4 Aufreinigung der PCR-Produkte	53
2.2.5.5 Sequenzierreaktion	53
2.2.5.6 Aufreinigung der Sequenzierprodukte	54
2.2.5.7 Sequenzanalyse mittels ABI PRISM 310.....	55
2.2.6 Biostatistik	55

3. Ergebnisse	57
3.1 Probenbearbeitung	57
3.1.1 Auswahl einer Entparaffinierungsmethode	57
3.1.2 Auswahl einer Extraktionsmethode	59
3.2 Haplogruppen-Assay	63
3.2.1 Sensitivität des Haplogruppen-Assays	64
3.2.2 Qualität des Probenmaterials	65
3.2.3 Analyse der DNA-Proben nach Abschluss der Voruntersuchungen	67
3.3 Assay zur Analyse potentiell pathogener Mutationen	68
3.3.1 Primer-Optimierung	70
3.3.2 Sensitivität des Assays zur Analyse potentiell pathogener Mutationen ..	71
3.3.3 Qualität des Probenmaterials	71
3.3.4 Analyse der DNA-Proben nach Abschluss der Voruntersuchungen	73
3.4 Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte	77
3.4.1 Probenmaterial für die Sequenzierung mitochondrialer Abschnitte	77
3.4.2 Vergleich verschiedener PCR-Programme.....	79
3.4.3 Analyse der DNA-Proben nach Abschluss der Voruntersuchungen	80
3.5 Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms.....	84
3.5.1 Probenauswahl.....	84
3.5.2 Sensitivität	85
3.5.3 Analyse der DNA-Proben nach Abschluss der Voruntersuchungen	86
4. Diskussion	93
4.1 Probenbearbeitung	93
4.2 Qualität des Probenmaterials.....	95
4.3 Haplogruppen-Assay	96
4.4 Assay zur Analyse potentiell pathogener Mutationen	97

4.5 Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte	98
4.6 Sequenzierung des mitochondrialen Genoms	100
4.6.1 Probenauswahl.....	100
4.6.2 Lokalisation der Mutationen.....	102
4.6.3 Assoziation der Mutationen zu Krankheiten.....	106
4.6.4 Mutationen in drei SIDS-Fällen.....	107
4.6.5 Möglichkeiten und Grenzen dieser Arbeit.....	109
5. Ausblick	112
Literaturverzeichnis	114
Abbildungsverzeichnis	124
Tabellenverzeichnis	125
Danksagung.....	127
Eidesstattliche Erklärung	129
Lebenslauf	130
Anhang	

Zusammenfassung

Die Ursache für das Syndrom des Plötzlichen Säuglingstodes (SIDS; *Sudden Infant Death Syndrome*) wird in einem multifaktoriellen Geschehen gesehen. Sowohl äußere Risikofaktoren als auch eine genetische Prädisposition können ätiologisch eine Rolle spielen.

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob Sequenzveränderungen der mitochondrialen DNA (mtDNA) eine Ursache des SIDS sein können.

Das mitochondriale Genom kodiert Proteine, die an der Atmungskette der Zellen beteiligt sind. Sequenzveränderungen in diesen Abschnitten können sich somit negativ auf die Energieproduktion auswirken und über diesen Pathomechanismus hypothetisch mit dem SIDS in Zusammenhang stehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die mtDNA von 195 SIDS-Fällen der GeSID-Studie (GeSID; *German Study of Sudden Infant Death Syndrome*) und 151 lebenden, gesunden Kindern mittels *Multiplex-Minisequencing-Analyseverfahren* untersucht. Bei den SIDS-Fällen wurde die mtDNA aus gefrorenen bzw. aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben extrahiert. Von den gesunden Kindern wurde eine Speichelprobe untersucht.

Zunächst wurde die mitochondriale Haplogruppenzugehörigkeit bestimmt, gefolgt von der Untersuchung von *Loci* auf dem mitochondrialen Genom, die in der Literatur mit mtDNA-assoziierten Erkrankungen und dem SIDS in Zusammenhang gebracht werden.

Es konnten keine Risiko-Haplogruppe und keine potentiell pathogenen Mutationen ermittelt werden, die signifikant mit dem Plötzlichen Säuglingstod zusammenhängen.

Die Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms in drei ausgewählten SIDS-Fällen deckte insgesamt 36 homoplasmatische Mutationen sowohl im kodierenden als auch im nicht-kodierenden Bereich auf. Hier sind umfangreiche Studien auch unter Berücksichtigung der nukleären DNA und äußerer Risikofaktoren denkbar.

Abkürzungsverzeichnis

6-FAM	6-Carboxyfluorescein
A	Adenin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ALTE	scheinbar lebensbedrohliches Ereignis (<i>apparent life-threatening event</i>)
APD	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphatase
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMBF	Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CRS	Cambridge Referenz Sequenz (<i>Cambridge Reference Sequence</i>)
Cyt c	Cytochrom c
C4A/C4B	Komplementproteine des Immunsystems
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DEAF	maternal vererbte Taubheit (<i>maternally inherited DEAFness</i>)
d. h.	das heißt
D-loop	Kontrollregion der mtDNA (<i>displacement loop</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTR	<i>Dye Terminator Removal</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
EXO I	Exonuklease I
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form
FFPE	Formalin fixiert, Paraffin eingebettet

Fwd	vorwärts Primer (<i>forward primer</i>)
G	Guanin
GeSID	Deutsche Studie zum Plötzlichen Säuglingstod (<i>German Study of Sudden Infant Death Syndrome</i>)
HiDi	<i>highly deionized</i>
HPLC	Flüssigchromatografie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HV I, II, III	hypervariable Bereiche I, II, III
ICD 10, R95	Diagnose Plötzlicher Säuglingstod nach der ICD-Systematik
IPC	<i>internal PCR control</i>
LHON	Leberschen hereditären Optikusneuropathie (<i>Leber hereditary optic neuropathy</i>)
MELAS	mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktatazidose und schlaganfallähnlichen Episoden
MERF	Myoklonusepilepsie mit Ragged-red-Fasern
MM	Master Mix
mtDNA	mitochondriale DNA
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form
NARP	<i>neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa</i>
nDNA	nukleäre DNA
NICHD	<i>National Institute of Child Health and Human Development</i>
NUMTS	<i>nuclear mitochondrial insertions</i>
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
P	Orthophosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEO	progressive externe Ophthalmoplegie
POP	<i>Performance Optimized Polymer</i>
rCRS	revidierte Cambridge Referenz Sequenz (<i>revised Cambridge Reference Sequence</i>)
Rev	rückwärts Primer (<i>reverse primer</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	ribosomale RNA

SAP	Alkalische Phosphatase aus Garnelen (<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)
SBE	<i>single base extension</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SIDS	Plötzlicher Säuglingstod (<i>Sudden Infant Death Syndrome</i>)
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
T	Thymin
TER	Transkriptions Terminations Faktor (<i>transcription termination factor</i>)
T _m	Schmelztemperatur
tRNA	Transfer-RNA
u. a.	unter anderem
UCSC	University of California Santa Cruz
UQ	Ubichinol
vgl.	vergleiche
VIC	Fluoreszenzfarbstoff der Firma Applied Biosystems
z. B.	zum Beispiel

Mitochondriale Gene

<i>12S rRNA</i>	Gen der 12S ribosomalen RNA
<i>16S rRNA</i>	Gen der 16S ribosomalen RNA
<i>ATP6, -8</i>	Gen der ATP-Synthase Untereinheiten 6, -8
<i>CO1, -2, -3</i>	Gen der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten 1, -2, -3
<i>CYB</i>	Gen des Cytochrom b
<i>ND1, -2, -3, -4</i>	Gen der NADH-Dehydrogenase Untereinheiten 1, -2, -3, -4
<i>ND4L, -5, -6</i>	Gen der NADH-Dehydrogenase Untereinheiten 4L, -5, -6
<i>O_H</i>	Replikationsursprung des H-Stranges
<i>O_L</i>	Replikationsursprung des L-Stranges
<i>tRNA^x</i>	Gen der Transfer-RNA x

Nukleäre Gene

<i>5-HT</i>	Gen der Serotonin-Promotor-Region
<i>5-HTT</i>	Gen der Serotonin-Transporter-Promotor-Region
<i>ECE1</i>	<i>Endothelin-converting enzyme-1-gene</i>
<i>EN1</i>	<i>Engrailed-1-gene</i>
<i>Phox2a</i>	<i>Paired-like homeobox 2a-gene</i>
<i>RET</i>	<i>Rearranged during transfection-gene</i>
<i>TLX3</i>	<i>T-cell leukemia homeobox-gene</i>

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin

1. Einleitung

1.1 Der Plötzliche Säuglingstod (SIDS)

Der Begriff des Plötzlichen Säuglingstodes (SIDS; *Sudden Infant Death Syndrom*) wurde erstmals 1969 durch Beckwith geprägt (Seattle-Definition) [Byard *et al.* 2012; Krous 2010]. Unter Forderung weiterer Forschungsarbeiten und eines erweiterten Datensatzes, wurde er als plötzlicher Tod eines Säuglings oder eines Kleinkindes, welcher unerwartet auftritt und nach umfangreichen postmortalen Untersuchungen keine Todesursache hervorbringt, definiert [Beckwith 2003].

Diese international anerkannte Definition des SIDS wurde 1991, basierend auf der Konferenz des *National Institute of Child Health and Human Development* (NICHD; 1989), durch Willinger auf die Postneonatalperiode (8. bis 365. Lebensstag) präzisiert und um die vollständige Fall-Untersuchung ergänzt (NICHD-Definition) [Byard *et al.* 2012; Krous 2010; Willinger *et al.* 1991]. Somit sind zur Klärung der Todesursache eine vollständig durchgeführte Obduktion, eine genaue Überprüfung der Todesumstände und eine sorgsame Auswertung der klinischen Anamnese notwendig [Kinney *et al.* 2012; Bajanowski *et al.* 2004].

Die Definitionen verdeutlichen, dass es sich bei dem Syndrom des Plötzlichen Säuglingstodes um eine reine Ausschlussdiagnose handelt (Tabelle 1) [Bajanowski *et al.* 2004; Beckwith 2003; Byard *et al.* 2003].

Tabelle 1: SIDS-Differentialdiagnosen (nach Bajanowski *et al.* 2002)

Tod aus natürlicher Ursache	Tod aus nicht natürlicher Ursache
Infektionen	Ersticken
Stoffwechselerkrankungen	sonstige (verdeckte) Formen der (stumpfen) Gewalteinwirkung
Fehlbildungen	Münchhausen-Syndrom <i>by proxy</i> mit tödlichem Ausgang
Hyperthermie aus innerer Ursache	Hyperthermie aus äußerer Ursache
Pierre-Robin-Sequenz	Schütteltrauma
Reye-Syndrom	Intoxikation
Bronchopulmonale Dysplasie	Vernachlässigung

Weitere Definitionen schlossen sich an, eingeteilt in Untergruppen gemäß spezifischer epidemiologischer Merkmale und dem Umfang der Zusatzinformationen [Krous 2010]. Ein Beispiel dafür ist die San Diego-Definition nach Krous *et al.* 2004 [Byard *et al.* 2012; Krous *et al.* 2004]. Die allgemeinen Diagnosekriterien entsprechen der NICHD-Definition. Die Einteilung des SIDS in verschiedene Kategorien (Tabelle 2) dient einer standardisierten Diagnose und einer damit verbundenen internationalen Vergleichbarkeit. Die Differenzierung basiert auf festgelegten Altersabschnitten, definierten Kriterien hinsichtlich der klinischen Anamnese, den Todesumständen und dem klinischen Untersuchungsumfang. Es werden Vorschläge für die durchzuführenden Untersuchungen, die Befundbewertung und die Einteilung der Fälle gegeben [Bajanowski *et al.* 2004].

Die vorgestellten Definitionen (Seattle-, NICHD- und San Diego-Definition) sind international anerkannt und haben sich aus der Zusammenarbeit verschiedener Bereiche, unter anderem der Rechtsmedizin, Pädiatrie und Epidemiologie entwickelt. Es gibt keine Verbindlichkeit, eine dieser drei Standard-Definitionen zu verwenden, weshalb es zu subjektiven Herangehensweisen kommt. Literaturstudien von Byard *et al.* aus den Jahren 2006 und 2012 zeigen, dass die Zahl der in Publikationen falsch oder gar nicht zitierten SIDS-Definitionen in diesen Jahren von 58 % auf 32 % sank. Das bedeutet, dass noch heute circa ein Drittel der Veröffentlichungen zum Thema Plötzlicher Säuglingstod aus dieser Studie keine der Standard-Definitionen nutzt [Byard *et al.* 2007; Byard *et al.* 2012]. Veröffentlichungen zum Thema SIDS haben jedoch einen Einfluss auf darauf aufbauende Forschungsprojekte, Familien und deren Umkreis, sodass es von besonderer Wichtigkeit ist, SIDS-Fälle und einbezogene Kontrollen genau zu definieren [Byard *et al.* 2012].

Tabelle 2: Klassifizierung von SIDS-Fällen (nach Krous et al. 2004)

Kategorie 1A	erfüllt alle Anforderungen der allgemeinen Definition und folgende
	<p>Klinische Anforderungen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alter zwischen 21 Tagen und 9 Monaten - normale klinische Geschichte (inklusive Schwangerschaftsverlauf) - normales Wachstum und normale Entwicklung - keine ähnlichen Todesfälle bei Geschwistern oder nahen genetischen Verwandten
	<p>Todesumstände</p> <ul style="list-style-type: none"> - Todesumstände und Ereignisort geben keine Erklärung für den Tod - Säuglinge wurden in einer sicheren Umgebung gefunden - Unfall-Tod kann ausgeschlossen werden
	<p>Obduktion</p> <ul style="list-style-type: none"> - keine potentiell tödlichen pathologischen Befunde - keine Hinweise auf ein unerklärtes Trauma, Misshandlung, Vernachlässigung oder versehentliches Ersticken - negative toxikologische, mikrobiologische, radiologische und metabolische Befunde
Kategorie 1B	erfüllt alle Anforderungen der allgemeinen Definition, alle Kriterien der Kategorie 1A, mit Ausnahme: mindestens einer der in Kategorie 1A aufgeführten Untersuchungen wurde nicht durchgeführt
Kategorie 2	erfüllt alle Kriterien der Kategorie 1, mit Ausnahme mindestens einer der folgenden
	<p>Klinische Anforderungen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alter: jünger als 21 Tage oder älter als 270 Tage - ähnliche Fälle bei Geschwistern oder engen Verwandten (Ausschluss von Kindstötung oder genetischen Erkrankungen) - neonatale oder perinatale Beeinflussung (z. B. durch eine Frühgeburt)
	<p>Todesumstände</p> <ul style="list-style-type: none"> - nicht mit Sicherheit auszuschließende mechanische Asphyxie oder Ersticken durch Zudecken
	<p>Obduktion</p> <ul style="list-style-type: none"> - anormales Wachstum oder Entwicklung, die nicht zum Tod beitragen - deutliche Entzündungsercheinungen, die nicht zweifelsfrei für den Tod verantwortlich sind
nicht klassifiziert	- erfüllt weder die Kriterien der Kategorie 1 oder 2, noch die Bedingungen eines natürlichen oder nichtnatürlichen Todes
Reanimations-Fälle	- beinhaltet Fälle, für die keine Obduktion durchgeführt wurde
	- Fälle, bei denen die Säuglinge reanimiert wurden, allerdings später trotzdem verstorben sind (ALTE; <i>apparent life-threatening event</i>) [Kahn 2004]
	- mögliche Zuordnung zu einer oben aufgeführten Kategorie, je nach Erfüllung der Kriterien

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Beim Plötzlichen Säuglingstod tritt der Tod in der Regel in einer unbeobachteten Schlafphase ein. Eine typische Altersverteilung mit einem Sterblichkeitsgipfel zwischen zweitem und viertem Monat zeichnet sich ab. Alle sozialen Schichten sind betroffen, derweil eine Übersterblichkeit männlicher Säuglinge vorherrscht. Es lässt sich eine saisonale Abhängigkeit beobachten, wobei etwa zwei Drittel der Kindstodopfer während der infektblasteten Wintermonate sterben [Bajanowski *et al.* 2002; Jorch *et al.* 2009].

In den vergangenen Jahren haben epidemiologische Untersuchungen zur Aufstellung folgender Risikofaktoren für den Plötzlichen Säuglingstod geführt:

- Bauchlage als Schlafposition des Säuglings
- Rauchen während der Schwangerschaft und in Anwesenheit des Kindes
- Stillverzicht
- Schlafen des Säuglings im Elternbett („*Co-Sleeping*“)
- externe Wärme während des Schlafes
- Kopfbedeckung des Säuglings durch Kissen oder Decken
- Geburtsgewicht unter 2.500 g
- mehr als eine vorangegangene Geburt
- Mutter jünger als 20 Jahre
- Kind wächst nur bei einem Elternteil auf

[Bajanowski *et al.* 2004; Darai *et al.* 2012; Hunt 2005; McKenna *et al.* 2010].

Präventions-Kampagnen zu Beginn der 1990-er Jahre haben diese Risikofaktoren zum Anlass genommen, Empfehlungen an Eltern auszusprechen, um die Zahl der SIDS-Fälle zu senken. Der Säugling sollte in einer rauchfreien Umgebung aufwachsen und in Rückenlage, in einem Schlafsack im eigenen Bett und bei einer Raumtemperatur von circa 18°C schlafen. Durch diese Vorsorgeprogramme ist laut Statistischem Bundesamt die SIDS-Inzidenz (Diagnose Plötzlicher Kindstod; ICD 10, R95) in Deutschland in den letzten 20 Jahren stark gesunken (Tabelle 3): während sie 1991 bei 1,55 pro 1.000 Lebendgeborenen lag, reduzierte sie sich 2011 auf 0,21 SIDS-Fälle pro 1.000 Lebendgeborenen [Bajanowski *et al.* 2004; Statistisches Bundesamt].

Tabelle 3: Lebendgeburten, Säuglingssterblichkeit und SIDS-Fälle in Deutschland

	1991	1996	2002	2006	2011
Lebendgeborene	830.019	796.015	719.250	672.724	662.685
Verstorbene					
1. bis 365. Lebenstag*	5.711	3.962	3.036	2.579	2.408
8. bis 365. Lebenstag**			1.529	1.255	1.158
SIDS-Fälle					
1. bis 365. Lebenstag*	1.285	692	367	259	147
8. bis 365. Lebenstag**			334	234	141
SIDS-Rate (in %)					
1. bis 365. Lebenstag	22,50	17,47	12,09	10,04	6,11
8. bis 365. Lebenstag			21,84	18,65	12,18
SIDS-Inzidenz (pro 1.000 Lebendgeborenen)					
1. bis 365. Lebenstag	1,55	0,87	0,51	0,39	0,22
8. bis 365. Lebenstag			0,46	0,35	0,21

* <https://www.destatis.de/DE/Startseite.html>

(Vergleich nach der Umstellung der ICD-Systematik: 1980-1997 ICD9, ab 1998 ICD10)

** <https://www.destatis.de/DE/Startseite.html>

Statistisches Bundesamt, Gesundheit, Todesursachen in Deutschland, Fachserie 12, Reihe 4

Die Statistik basiert auf Totenscheinen, wobei die geringe Obduktionsrate von circa 50 % aller plötzlichen, unerwarteten Säuglingstodesfälle bei der Beurteilung berücksichtigt werden muss [Bajanowski *et al.* 2004].

Um die SIDS-Rate weiter zu senken, ist es notwendig, robustere Präventionskampagnen mit Fokus auf alle vermeidbaren Risiken zu entwickeln [Carpenter *et al.* 2004; Hauck *et al.* 2008].

1.1.2 „Triple-Risk-Hypothesis“

Bereits 1970 formulierte Bergman, dass beim Plötzlichen Säuglingstod Risikofaktoren mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten zusammenwirken. 1972 wurden diese bis dahin bekannten Risikofaktoren von Wedgwood *et al.* der ersten „Triple-Risk-Hypothesis“ zugeordnet, welche ein Zusammenspiel aus prädisponierenden Faktoren, externem Stress und einer zugrundeliegenden Anfälligkeit des Säuglings darstellt.

Die Arbeitsgruppe um Raring vertrat 1975 die Auffassung, dass es sich um einen zufälligen Prozess mit multifaktorieller Begründung handelt.

Filiano und Kinney lieferten 1994 die bis heute anerkannte Darstellungsform der „*Triple-Risk-Hypothesis*“ (Abbildung 1) [Filiano *et al.* 1994; Guntheroth *et al.* 2002]. Seitdem finden sich verschiedene pathophysiologische Erklärungsmodelle, z. B. Apnoe-Theorie, QT-Hypothese, Schlafhypothese, Arousal-Theorie, Hirnstamm-Dysfunktionstheorie [Moon *et al.* 2007; Poets *et al.* 2003; Sullivan *et al.* 2001]. Keine dieser Hypothesen hat das Verständnis bezüglich der Ursache des Plötzlichen Säuglingstodes signifikant verbessert, sodass die heutigen Konzepte wie bereits die von Bergman und Raring wenig spezifisch sind.

Der Plötzliche Säuglingstod stellt als multifaktorielles Ereignis den Endpunkt einer Vielzahl von Risikofaktoren mit verschiedenen Wahrscheinlichkeiten und pathophysiologischen Mechanismen dar [Poets *et al.* 2003]. Es wird vermutet, dass der Säugling intrinsische Faktoren selbst mitbringt, z. B. genetische Ursachen [Hunt *et al.* 2006; Kinney *et al.* 2009]. Befindet sich das Kind in einer kritischen Phase seiner Entwicklung, in der beispielsweise die Abwehrmechanismen noch nicht vollständig entwickelt sind, sollten exogene Stressoren vermieden werden [Kinney *et al.* 2009; Poets *et al.* 2003]. Zu diesen extrinsischen Faktoren gehören die bereits beschriebenen, vermeidbaren Risikofaktoren [Jorch *et al.* 2009].

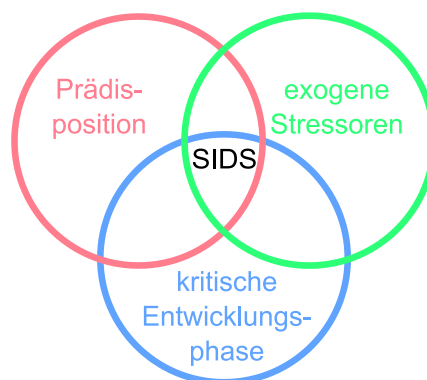


Abbildung 1: überarbeitete „*Triple-Risk-Hypothesis*“ (nach Filiano und Kinney 1994)

Das komplexe Zusammenspiel der Hypothesen-Komponenten ist bislang nicht ausreichend bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass noch nicht alle Faktoren und Umstände, die zum Tod führen, erforscht wurden [Bajanowski *et al.* 2004; Jorch *et al.* 2009]. Das Zusammenwirken lässt sich durch verschiedene, seltene und oft verborgene Störungen begründen, die unterschiedliche Auswirkungen auf

jeden einzelnen Säugling haben können und dadurch nicht zwangsläufig zu einem ätiologischen Faktor werden. Vermutlich geht der Plötzliche Säuglingstod mit einem individuellen Risiko einher. Bis eine präzise Definition, inklusive der Beziehungen zwischen intrinsischen und extrinsischen Risikofaktoren und der zugrundeliegenden Pathologie vorliegt, muss vor falschen „Einzel-Ursachen“ gewarnt werden [Byard *et al.* 2003].

1.1.3 German Study of Sudden Infant Death Syndrome

Die vorliegende Arbeit basiert auf Untersuchungsmaterial der zwischen November 1998 und Oktober 2001 durchgeführten deutschlandweiten Studie zum Plötzlichen Säuglingstod (GeSID; *German Study of Sudden Infant Death Syndrome*). Es handelt sich um eine durch das Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) geförderte retrospektive Fall-Kontroll-Studie, die unter der Leitung des Instituts für Rechtsmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchgeführt wurde. Die Studie umfasst sorgfältig durchgeführte Fall-Untersuchungen mit Eltern-Befragungen, Obduktionen und medizinischen Untersuchungsdaten aus Krankenakten und Mutterpässen. Es wurden 455 plötzliche, unerwartete Todesfälle von Säuglingen in einem Alter zwischen 8 und 365 Tagen untersucht. 18 rechtsmedizinische Institute nahmen nach positiven Voten der zuständigen Ethikkommissionen an den Untersuchungen teil [Findeisen *et al.* 2004]. Neben Rechtsmedizinern, Pädiatern und Epidemiologen arbeiteten Selbsthilfegruppen an diesem gemeinsamen Projekt. Ziel der Studie „Plötzlicher Säuglingstod“ war es, die Zahl der SIDS-Fälle zu minimieren, indem neue Präventionsfaktoren entdeckt werden sollten [Findeisen *et al.* 2004].

Die in diese Studie einbezogenen Todesfälle wurden nach der ersten Leichenschau als plötzlich und unerwartet eingestuft. Kinder, bei denen der Tod aufgrund bestimmter Erkrankungen zu erwarten war, nicht natürliche Todesfälle oder Fälle bei denen die Einwilligungserklärung der Eltern fehlte, wurden von der Studie ausgeschlossen [Bajanowski *et al.* 2006].

Das Gespräch mit den Eltern folgte einem standardisierten Fragebogen mit 106 Fragen.

Die Obduktion erfolgte nach Vorgaben eines international anerkannten Standardautopsieprotokolls inklusiv histologischer, mikrobiologischer, virologischer, toxikologischer und neuropathologischer Untersuchungen [Bajanowski *et al.* 2005]. Genetische Analysen wurden im Rahmen der Studie nicht durchgeführt.

Die pathologischen Kategorien und Diagnosekriterien basierten auf der San Diego-Definition nach Krous *et al.* 2004 (Tabelle 2) [Bajanowski *et al.* 2006]. Ein Team aus Rechtsmedizinern, Kinderärzten, Mikrobiologen und Epidemiologen führte die Klassifizierung der Fälle durch (Abbildung 2). Bei dem Großteil der untersuchten Fälle wurden vernachlässigbare pathologische Veränderungen registriert, die nicht todesursächlich schienen, wie unbedeutende Infektionen der Atemwege (SIDS+ Kategorie 2). Schwerwiegende pathologische Auffälligkeiten wie metabolische Erkrankungen, welche noch nicht mit der Todesursache gleichgestellt waren, fielen unter die SIDS+ Kategorie 3 (20,4 %). Der kleinste Anteil der untersuchten Fälle wurde aufgrund fehlender pathologischer Befunde dem Plötzlichen Säuglingstod (SIDS Kategorie 1) zugeordnet. Bei 11,2 % der Fälle wurde ein nicht natürlicher Tod festgestellt (kein SIDS Kategorie 4) [Findeisen *et al.* 2004].

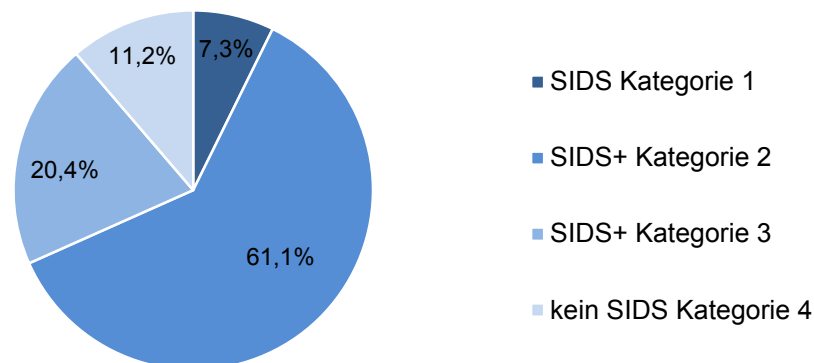


Abbildung 2: Fall-Klassifizierung der GeSID-Studie (nach Findeisen *et al.* 2004)

Die Ergebnisse der Studie bekräftigten die bereits beschriebenen epidemiologischen Erkenntnisse wie die charakteristische Alters- und Geschlechtsverteilung. Auch Risikofaktoren wie Bauchlage als Schlafposition, „Co-Sleeping“ und Stillverzicht wurden bestätigt. Die Untersuchungen brachten hervor, dass die Häufigkeit des Plötzlichen Säuglingstodes umgekehrt proportional

zum Alter der Mutter und abhängig vom sozioökonomischen Stand der Eltern ist. Sowohl das Rauchen der Mutter während der Schwangerschaft als auch ein geringes Geburtsgewicht wurden als Risikofaktoren bestätigt. Die Säuglinge, die sich aus der Seiten- oder Rückenlage auf den Bauch drehen, sind von einem erhöhten Risiko betroffen [Vennemann *et al.* 2005a, 2009].

1.1.4 Genetische Grundlagen

Die molekularen Grundlagen vieler humaner Krankheiten konnten durch Sequenzanalyse des menschlichen Genoms aufgedeckt werden.

Die einfachste Form der Genotyp-Phänotyp-Beziehungen sind Krankheiten, bei denen nur ein Gen verändert ist. Vom Genotyp kann allerdings nicht zwangsläufig auf einen Phänotyp geschlossen werden, da Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen weitere Phänotypen hervorbringen können. Bei den meisten humanen Erkrankungen handelt es sich um komplexe polygene Formen. Sie werden mit unterschiedlichen Phänotypen in Zusammenhang gebracht. Gemeinsam mit Umwelteinflüssen können multiple Gene das Krankheitsrisiko erhöhen oder verringern [Hunt 2004; Brugada *et al.* 2010, 7-21].

Bis vor wenigen Jahren wurden dem Plötzlichen Säuglingstod ausschließlich äußere Risikofaktoren zugeschrieben. Sie beeinflussen die Homöostase des Säuglings in einer Art und Weise, dass der plötzliche Tod die Folge sein kann. Individuelle Interaktionen zwischen den äußeren Faktoren und genetischen Veränderungen lassen sich nicht ausschließen [Hunt 2005; Kinney *et al.* 2012].

Einige Säuglinge sterben durch äußere Stressoren, während andere bei gleichen Bedingungen am Leben bleiben. Dies ist ein Hinweis dafür, dass SIDS mit einem individuellen Risiko einhergeht [Hunt 2004; Mage *et al.* 2012b].

Es wird vermutet, dass genetische und äußere Risikofaktoren interagieren und einen Phänotyp bilden, der anfällig ist für den Plötzlichen Säuglingstod. Welchen Einfluss diese Gen-Umwelt-Beziehungen auf die Pathophysiologie des Syndroms haben, ist bis heute noch nicht geklärt.

Genmutationen, mit lebensbedrohlichen Auswirkungen, können entweder als Ursache des Todes oder als prädisponierender Faktor angesehen werden [Opdal *et al.* 2004]. Mutationen in den Genen der Herz-Ionenkanäle, welche im Fall des

Long-QT-Syndroms das Potential für tödliche Arrhythmien erhöhen, werden bei fünf bis zehn Prozent der SIDS-Fälle vermutet [Mage 2012a]. Fälle, bei denen eine Mutation eine tödliche Störung zur Folge hat, sollten nicht dem Plötzlichen Säuglingstod zugeschrieben, sondern als erklärbarer Tod diagnostiziert werden [Mage 2012a; Opdal *et al.* 2004].

Diverse Studien haben Gene mit einem möglichen Effekt auf den Plötzlichen Säuglingstod untersucht. Einbezogen wurden u. a. jene, die beteiligt sind an der Regulation des Immunsystems, der Herzfunktion, dem Serotonin-Netzwerk und der Hirnfunktion und -entwicklung. Es wurden verschiedene Gendefekte mit dem Plötzlichen Säuglingstod in Zusammenhang gebracht (Tabelle 4) [Courts *et al.* 2010; Hunt 2005; Kinney *et al.* 2012; Opdal *et al.* 2004; Weese-Mayer *et al.* 2007]. Diese genetischen Erscheinungen sind assoziiert mit physiologischen Veränderungen im Respirationstrakt, der Immun- und der Arousal-Funktion und stützen somit die Vermutung, dass genetische Risikofaktoren prädisponierend für SIDS sein können [Hunt *et al.* 2006; Moon *et al.* 2007; Opdal *et al.* 2011].

Tabelle 4: Gene mit Mutationen in SIDS-Fällen (nach Hunt 2005)

Herz-Ionenkanäle - Natrium-Kanal - Kalium-Kanal
Promoter-Region des Serotonin (5-HT)-Transporter-Gens (<i>5-HTT</i>)
Entwicklung des autonomen Nervensystems - <i>Paired-like homeobox 2a (Phox2a)</i> - <i>Rearranged during transfection (RET)</i> - <i>Endothelin-converting enzyme-1 (ECE1)</i> - <i>T-cell leukemia homeobox (TLX3)</i> - <i>Engrailed-1 (EN1)</i>
Infektion und Entzündung - Komplement C4A und C4B - Interleukin-10

Die Identifizierung genetischer Marker, welche nicht die Todesursache darstellen, aber in vielen oder sogar allen SIDS-Fällen nachgewiesen werden können, ist ein erster Schritt, Präventionsstrategien zu entwickeln. Zukünftige genetische Studien sollten einer statistisch-ausreichend großen SIDS-Fallzahl eine geeignete Kontrollgruppe gegenüberstellen und möglichst viele verschiedene geographische Regionen einbeziehen, um zuverlässige und reproduzierbare Erkenntnisse zu erhalten. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass eine Mutation allein als

prädisponierendes Element in allen Fällen des Plötzlichen Säuglingstodes agiert. Polygene Faktoren könnten unter Einfluss äußerer, beeinflussbarer Risikofaktoren in verschiedenen Kombinationen und individuell prädisponierend wirken [Kinney *et al.* 2012; Hunt 2005; Opdal *et al.* 2011].

1.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen mit einer Doppelmembran und eigener Erbsubstanz. Sie enthalten sowohl die Komplexe der Atmungskette, als auch die Enzyme des Citratzyklus und der Fettsäureoxidation [Rolf *et al.* 2004]. Mitochondrien gelten als „Kraftwerke der Zellen“. Je nach Energiebedarf verfügen Zellen, z. B. Hautzellen, über wenige Mitochondrien und andere, beispielsweise Zellen des Gehirns und der Muskeln, über tausende dieser Organellen. Mitochondrien sind unter anderem am physiologischen Prozess der Zellalterung bzw. der Thermogenese beteiligt und regulieren die Apoptose [Mammucari *et al.* 2010; Passarino *et al.* 2010; Schönfeld 2002; Wallace 2012].

1.2.1 Eigenschaften des mitochondrialen Genoms

Mitochondrien besitzen ein eigenes doppelsträngiges Genom (mtDNA; mitochondriale DNA), welches geschlossen zirkulär vorliegt und in der Regel aus 16.568 Basenpaaren (bp) besteht [Parson 2009]. Die erste vollständige Nukleotid-Abfolge der humanen mitochondrialen Erbsubstanz wurde von Anderson *et al.* 1981 publiziert. Diese Sequenz wird als Anderson-Sequenz bzw. „*Cambridge Reference Sequence*“ (CRS) bezeichnet. Diese Basen-Abfolge bildet die Grundlage der heutigen Nomenklatur. Nach der Revision einiger mitochondrialer Nukleotid-Positionen findet die „*revised Cambridge Reference Sequence*“ (rCRS) als offiziell anerkannte mitochondriale Referenz-Sequenz Anwendung [Andrews *et al.* 1999].

Mitochondrien sind aufgrund ihres endosymbiontischen Ursprungs semiautonom [Wallace 2012]. Der Großteil der mitochondrialen Struktur- und Funktionsproteine

wird durch die nukleäre DNA (nDNA) kodiert. Das mitochondriale Genom kodiert wenige Proteinuntereinheiten der Atmungsketten-Komplexe (Abbildung 3).

Die Funktion bzw. Genprodukte aller Gene im mitochondrialem Erbgut sind bekannt. Die Erbsubstanz der Mitochondrien kodiert 22 mitochondriale tRNAs, zwei ribosomale RNAs und 13 essentielle Polypeptide. Die rRNA- und tRNA-Gene werden benötigt für die Expression der 13 von über 70 Proteinuntereinheiten der fünf Komplexe der mitochondrialen Atmungskette [Jaksch-Angerer *et al.* 1999; Rolf *et al.* 2004].

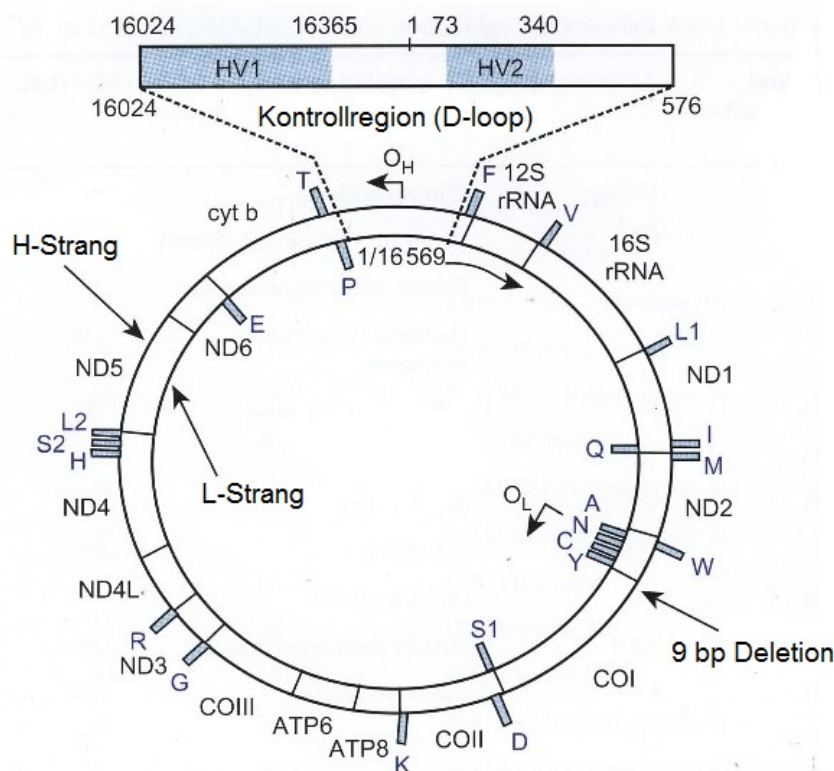


Abbildung 3: Das mitochondriale Genom (nach Butler 2012)

Der Doppelstrang besteht aus einem Guanin-reichen schweren Strang (H-Strang; *heavy strand*) und einem Cytosin-reichen leichten Strang (L-Strang; *light strand*). Im Gegensatz zur nDNA weist die mtDNA keine Introns auf. Die Kontrollregion der mtDNA erstreckt sich von Position 16.024 bis 576 und enthält den Abschnitt, der für die Replikation und Transkription der mtDNA von Bedeutung ist. Dieser sogenannte „*displacement loop*“ (D-loop) schließt zwei hypervariable Bereiche (HV I, HV II) ein, in denen gehäuft Mutationen auftreten. In diesen Regionen lassen sich deshalb häufig Unterschiede zwischen nicht verwandten Personen

nachweisen. Zum Beispiel unterscheiden sich nicht verwandte Europäer durchschnittlich in etwa acht Sequenzpositionen [Butler 2012, 405-456; Coble *et al.* 2004; Rolf *et al.* 2004; Wallace *et al.* 1995].

Die Vererbung der Mitochondrien erfolgt ausschließlich maternal. Die Zahl an mtDNA-Molekülen des Spermiums (50 - 100) ist im Vergleich zu der Anzahl an mtDNA-Kopien der Eizelle (100.000 - 200.000) verschwindend gering. Zusätzlich werden fremde Mitochondrien in der Eizelle durch Ubiquitinierung zerstört [Parson 2009]. Sofern keine Neumutationen stattfinden, weisen alle Angehörigen einer mütterlichen Linie dasselbe mitochondriale Erbgut auf [Rolf *et al.* 2004].

1.2.2 Oxidative Phosphorylierung

In den Mitochondrien wird die zelluläre Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) für anabole und katabole Prozesse durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) hergestellt. Die Oxidation der energiereichen Moleküle Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) ist über den Multi-Enzym-Komplex an die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP gekoppelt. Über verschiedene Elektronen-Carrier in den Proteinkomplexen der Elektronentransport- bzw. Atmungskette werden die durch Oxidation abgegebenen Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen. Diese stark exergonische Reaktion führt dazu, dass ein Teil der Energie zum Aufbau eines Protonengradienten genutzt wird, welches die ATP-Synthese ermöglicht. Über eine energieverbrauchende Reaktion wird ATP im Austausch gegen ADP mittels ADP-ATP-Translokase aus der mitochondrialen Matrix in das Zytosol befördert [Berg *et al.* 2007, 560-602; Saraste *et al.* 1982; Wallace 2010].

Das OXPHOS-System, dargestellt in Abbildung 4, besteht aus fünf Multi-Enzym-Komplexen (Komplex I bis IV), diese sind ebenso wie die beweglichen Überträgermoleküle Ubichinon (UQ) und Cytochrom c (Cyt c) in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert [Berg *et al.* 2007, 560-602].

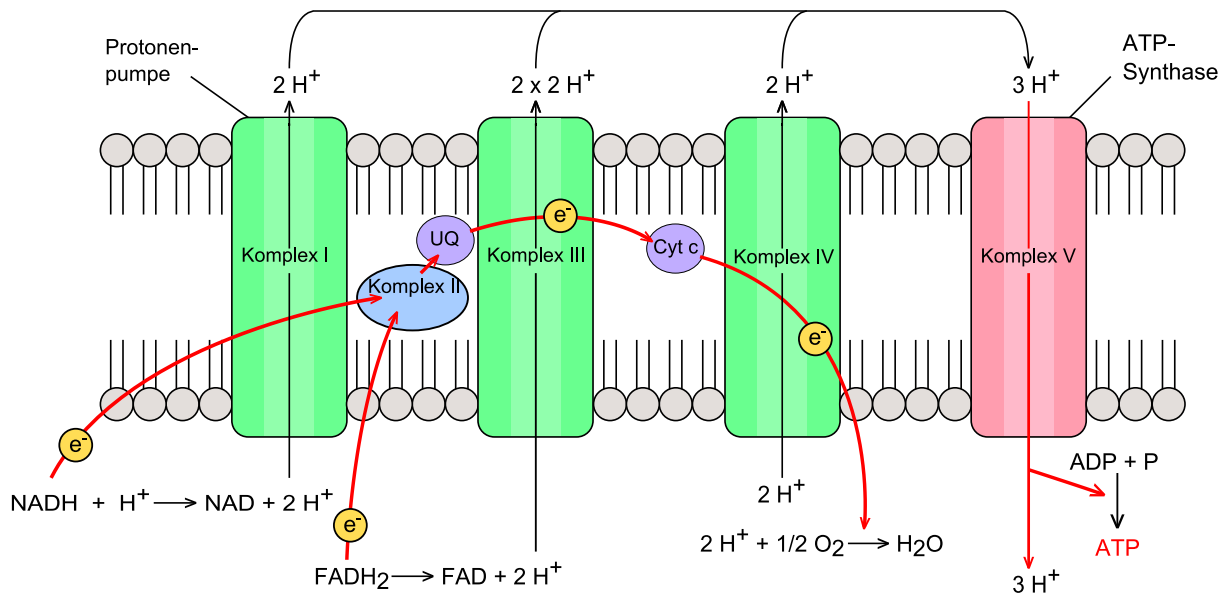


Abbildung 4: oxidative Phosphorylierung (nach Doc Kaiser's Microbiology Homepage)

13 funktionell wichtige Proteinuntereinheiten dieser Enzym-Komplexe werden im mitochondrialen Genom kodiert (Tabelle 5) [Wallace 2012].

Tabelle 5: Enzym-Komplexe der oxidativen Phosphorylierung

Enzym-Komplex	Enzym-Bezeichnung	Protein-Untereinheiten	mitochondrial kodierte Untereinheiten
Komplex I	NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase/ NADH-Dehydrogenase	45	7: <i>ND1</i> , -2, -3, -4, -4L, -5, -6
Komplex II	Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase	4	-
Komplex III	Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase/ Cytochrom-Reduktase	11	1: <i>CYB</i>
Komplex IV	Cytochrom-c-Oxidoreduktase	13	3: <i>CO1</i> , -2, -3
Komplex V	ATP-Synthase	17	2: <i>ATP6</i> , -8

1.2.3 Heteroplasmie

Tritt im Genom eines Mitochondriums eine Mutation auf, kommt es zu einer intrazellulären Mischung der Wildtyp- und der mutierten Form der mtDNA. Dieses versteht sich unter dem Begriff Heteroplasmie.

Heteroplasmie wird entweder über die mütterliche Linie vererbt oder entwickelt sich durch eine somatische Mutation während der Embryonalentwicklung bzw. im Laufe des Lebens [Parson 2009].

Teilt sich die Zelle, werden die Mitochondrien im Rahmen der maternalen Vererbung nach dem Zufallsprinzip auf die Tochterzellen übertragen (replikative Segregation). Die veränderte mitochondriale Erbsubstanz kann somit gewebespezifisch unterschiedlich quantitativ verteilt werden. Diese Verteilung wird durch den Heteroplasmiegrad prozentual charakterisiert. Die gewebespezifischen Unterschiede basieren darauf, dass die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle sowie die Anzahl der mtDNA-Moleküle in den Mitochondrien variabel ist. Im Laufe der Zeit können sich die Anteile der mtDNA-Typen ständig durch Zellteilung ändern und erneut das Stadium der Homoplasmie, in dem nur ein mtDNA-Typ in der Zelle vorliegt, erreichen. Dieses basiert auf der, den Gesetzen der Wahrscheinlichkeitsrechnung folgenden Verteilung der Mitochondrien auf die Tochterzellen [Wallace *et al.* 1999].

1.2.4 Mutationen und Polymorphismen der mitochondrialen DNA

Die mitochondriale Erbsubstanz weist eine hohe Mutationsrate auf, welche aus dem Fehlen schützender Histone, einem ineffizienten Fehlererkennungs- und DNA-Reparaturmechanismus und einer anhaltenden Belastung durch Sauerstoff-Radikale hervorgeht [Stuart *et al.* 2006; Wallace 1994].

Abhängig vom prozentualen Heteroplasmiegrad und von der Position im mitochondrialen Genom können Mutationen klinisch stumm sein oder einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der Zelle haben und damit zu klinischen Symptomen führen [Wallace 1994].

Eine Mutation kann abhängig vom Zeitpunkt ihres Auftretens im gesamten Embryo, in einzelnen Keimblättern, in einzelnen Organen oder in individuellen Stammzellen auftreten.

Es kommt zum Abbruch der Keimentwicklung, wenn das Ausmaß einer pränatalen Schädigung des mitochondrialen Genoms durch eine Mutation zu groß ist. Ist die Mutation mit dem Leben vereinbar, sind der Zeitpunkt und das Ausmaß klinischer Symptome davon abhängig, wie stark die Energieproduktion der Atmungskette von Geburt an beeinträchtigt ist und wie schnell relevante somatische Mutationen im Laufe des Lebens hinzukommen [Wallace 1992].

Zellen, bei denen die Anzahl veränderter Mitochondrien einen Schwellenwert erreichen, sind in ihren Funktionen beeinträchtigt. Der Organismus ist nicht mehr in der Lage, die durch Mutationen ausgelösten Störungen auszugleichen. Die Enzymkomplexe der Atmungskette werden beeinflusst und die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung nimmt ab [Wallace 1994]. Je nach Energiebedarf der Organe werden durch die verminderte energetische Kapazität der Mitochondrien Zahl und Schwere von Krankheitssymptomen erhöht. Gemeinsam mit der hohen mtDNA-Segregationsrate resultiert eine enorme Variabilität der klinischen Symptome [Wallace 2012].

Zusätzlich finden sich im mitochondrialen Genom Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs; *Single Nucleotide Polymorphisms*). SNPs basieren auf Punktmutationen, die während der menschlichen Evolution entstanden sind. Es handelt sich um über das gesamte mitochondriale Genom verteilte Sequenzvariationen, welche generationsübergreifend vererbt werden und bei denen das mutierte Allel mindestens bei einem Prozent der Population vorkommt [Brookes 1999]. Die Gesamtheit aller SNPs im mitochondrialen Genom wird als mtDNA-Haplotyp dargestellt. Dieser Haplotyp wird einer spezifischen Haplogruppe zugeordnet. Diese können für einzelne Krankheiten wie der Leber'schen hereditären Optikusneuropathie (LHON) prädisponierend sein [Hofmann *et al.* 1997; Kenney *et al.* 2013; Taylor *et al.* 2003; Wallace *et al.* 1999].

1.2.5 Mitochondriopathien

Der Begriff Mitochondriopathie beschreibt Funktionsbeeinträchtigungen der Mitochondrien, welche in erster Linie zu neuromuskulären Erkrankungen führen und mit Störungen der zellulären Energiebereitstellung in Form von ATP assoziiert sind [Zeviani *et al.* 2004]. Ein Großteil der Mitochondriopathien wird auf die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Mutationen zurückgeführt. Betroffen sind vor allem Zellen und Organe, die einen großen Energiebedarf haben, hier Muskelzellen. Da es sich häufig um Multisystemerkrankungen handelt, vorkommend in allen Altersstufen, können auch andere Organe, wie das Nervensystem, die Leber oder die Nieren betroffen sein. Neben einer belastungsabhängigen Muskelschwäche berichten Mitochondriopathie-Patienten über andauernde Schwächen der Augen- oder Herzmuskeln. Herzrhythmusstörungen können ausgelöst werden, wenn zusätzlich die Nervenleitung des Herzens beeinträchtigt ist. Epileptische Anfälle oder geistige Behinderungen resultieren aus Beeinflussungen des Gehirns [Chinnery 2010; Deschauer *et al.* 2009; Wong *et al.* 2010].

Mitochondriopathien können sowohl dominant als auch rezessiv vererbt werden. Nicht bei allen Patienten wird ein genetischer Defekt in der mitochondrialen DNA nachgewiesen, sodass auch Gene des nukleären Genoms einen Einfluss haben können. Die Vererbung kann demnach maternal und paternal sein [Deschauer *et al.* 2009].

In der mitochondrialen DNA betroffener Patienten lassen sich auch Heteroplasmien nachweisen, wobei der Anteil der veränderten DNA in Beziehung zum Schweregrad der Erkrankung steht. Es zeigt sich, dass Mitochondriopathien in sehr unterschiedlichen Geno- und Phänotypen vorkommen können [Schon *et al.* 1997].

Bekannte Mitochondriopathien sind: progressive externe Ophthalmoplegie (PEO) [Schon *et al.* 1997], mitochondriale Enzephalomyopathie mit Laktatazidose und Schlaganfällen (MELAS) [Pavakis *et al.* 1984], Myoklonusepilepsie mit „ragged red fibres“ (MERF) [Shoffner *et al.* 1990] und Leber'sche hereditäre Optikusneuropathie (LHON) [Wallace *et al.* 1988].

Die mitochondrialen Nukleotidvarianten des MELAS- (A3243C) und MERF-Syndroms (A8344G) sind Beispiele für den unterschiedlichen Schweregrad von

Krankheiten in Abhängigkeit vom Heteroplasmiegrad. Bei einer Rate unter 90 % verbleiben die Mutationen ohne jegliche Auswirkungen. Steigt der Heteroplasmiegrad über diesen Schwellenwert, kommt es zu einem schnellen Funktionsverlust der oxidativen Phosphorylierung. Bei einer Rate von mehr als 95 % wird die OXPHOS-Aktivität komplett eingestellt [Wallace 1994].

Die molekulare und biochemische Charakterisierung der aufgeführten Mitochondriopathien hat zu neuen Erkenntnissen bezüglich der Natur humaner degenerativer Erkrankungen beigetragen. Neben dem Schweregrad der Auswirkungen schädlicher mitochondrialer Mutationen auf den Organismus wird deutlich, dass diese häufiger vorkommen, als zunächst angenommen [Deschauer *et al.* 2009; DiMauro *et al.* 2001; Reeve *et al.* 2008; Wong *et al.* 2010].

1.3 Das mitochondriale Genom und der Plötzliche Säuglingstod

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich bereits mit möglichen Zusammenhängen zwischen dem mitochondrialen Genom und dem Plötzlichen Säuglingstod auseinandergesetzt und basierend auf den bis dahin bekannten Mitochondriopathien mehrere Hypothesen formuliert.

Die mitochondriale oxidative Phosphorylierung dient drei lebensnotwendigen Funktionen: der Reoxidation von NADH und FADH₂, der Bildung von Energie in Form von ATP und der Regulation der Temperatur durch Wärmeproduktion. Eine Mutation in einem Bereich der für diese Funktionen notwendigen Enzymkomplexe kann letale Auswirkungen auf den Organismus haben [Wallace 1994].

SIDS wird entsprechend international anerkannter Definitionen als ein plötzlich und unerwartet eintretender Tod bezeichnet. Die Säuglinge scheinen demnach vor dem Tod gesund zu sein, ohne vorhergehende Anzeichen oder Symptome [Vennemann *et al.* 2005b; Willinger *et al.* 1991]. Abweichend postulierten einige Studien eine auffällige Teilnahmslosigkeit, eine erhöhte Schläfrigkeit und einen geringen Aktivitätsstatus bei Säuglingen, die später am SIDS verstorben sind. [Opdal *et al.* 1998; Kelmanson 1996]. Herz- und Atemwegsinfektionen werden häufig bei der Obduktion nachgewiesen. Diese Krankheitsbilder könnten auf einen verzögerten ATP-Abbau zurückgeführt werden. Sowohl angeborene Risikofaktoren (z. B. Mitochondriopathien, Veränderungen des Interleukin-10-

Promotorgens) als auch äußere Risikofaktoren (z. B. Nahrungsmangel, Infektionen) können, besonders im Zusammenspiel, einen ATP-Mangel verursachen, indem der ATP-Katabolismus erhöht und/oder die ATP-Synthese verringert wird [Deixler 2009].

ATP ist der bedeutendste Energielieferant der Zelle. Es ist an fast allen Stoffwechselprozessen, an Membrantransporten und verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen (z. B. Muskelkontraktion, Immunabwehr) beteiligt. Um den eigenen Zellstoffwechsel zu bewahren, wird bei ATP-Mangel die spezifische Funktion der Zelle eingestellt. Kann der Zellstoffwechsel nicht aufrechterhalten werden, versagen membranständige Transportsysteme (Na^+/K^+ - und Ca^{2+} -ATPasen), wodurch Wasser, Natrium und Calcium in die Zellen gelangen, welche anschwellen und platzen. ATP-Mangel kann zum Funktionsverlust des Actin-Myosin-Mechanismus führen, worauf eine muskuläre Hypotonie mit Herz- und Ateminsuffizienz und eine reduzierte Kontraktilität der Gefäße folgen kann. Ein gesteigerter ATP-Verbrauch kann zum Ausbleiben der Hypoxieabwehrmechanismen (Arousal-Reaktion, Selbstreanimation) führen [Deixler 2009].

Die vorgestellten Auswirkungen eines durch mitochondriale Mutationen ausgelösten ATP-Mangels beruhen auf theoretischen Überlegungen, welche auf den Befunden des Plötzlichen Säuglingstodes und auf durch ATP-Mangel verursachtes Multiorganversagen basieren [Deixler 2009]. Einzelne mitochondriale Genmutationen können die Funktion der energieliefernden Prozesse stören. Mitochondriopathien, welche z. B. das Gehirn, das Herz oder das Nervensystem betreffen, können mit dem Plötzlichen Säuglingstod assoziiert sein [Courts *et al.* 2010].

Ein erhöhtes SIDS-Vorkommen innerhalb von Familien und entlang der maternalen Linie wurde mehrfach beobachtet [Hofmann *et al.* 1997; Opdal *et al.* 2002; Santorelli *et al.* 1996]. Zusätzlich konnte in unabhängigen Studien eine hohe Mutationsrate und ein modifiziertes Mutationsmuster in der D-loop-Region im Vergleich zu Kontrollgruppen aufgezeigt werden. Dieser Austausch von Nukleotiden ist nicht letal. Allerdings weist eine hohe Austauschrate im D-loop auf ein instabiles mitochondriales Genom hin und deutet damit auf weitere schädliche Mutationen in anderen mitochondrialen Sequenzbereichen [Hofmann *et al.* 1997; Opdal *et al.* 1999]. Bis heute konnten mindestens 60 Mutationen im gesamten

mitochondrialen Genom in vereinzelt Fällen mit dem Syndrom des Plötzlichen Säuglingstodes in Zusammenhang gebracht werden [Opdal *et al.* 2011]. Viele dieser Mutationen wurden in einem oder nur wenigen SIDS-Fällen gefunden. Derzeitig ist keine spezifische und wiederkehrende mitochondriale Mutation bekannt, die allein mit dem Plötzlichen Säuglingstod assoziiert ist. Daher wird von einigen Autoren der Zusammenhang von mtDNA-Mutationen und dem Plötzlichen Säuglingstod in Frage gestellt [Divne *et al.* 2003; Opdal *et al.* 2004].

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Studie war es, herauszufinden, ob bestimmte mtDNA-Haplogruppen sowie mit Krankheiten assoziierte mitochondriale Mutationen beim Syndrom des Plötzlichen Säuglingstodes gehäuft vorkommen.

Bisherige Studien haben nicht-kodierende Bereiche des mitochondrialen Genoms und die tRNA-kodierenden Sequenzabschnitte untersucht [Opdal *et al.* 1998, 2006]. Die mitochondriale Haplogruppe wurde bisher nur in einem geringen Umfang im Zusammenhang mit SIDS ermittelt [Divne *et al.* 2003].

Folgende Fragestellungen waren für die vorliegende Arbeit von wesentlicher Bedeutung:

1. Gibt es einen Zusammenhang zwischen einer bestimmten Haplogruppe und dem Plötzlichen Säuglingstod?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen bereits bekannten sogenannten pathogenen mitochondrialen Mutationen und dem Plötzlichen Säuglingstod?
3. Wird bei SIDS-Fällen verstärkt Heteroplasmie beobachtet?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden SIDS- und Kontrollfälle aus der GeSID-Studie untersucht. Im Vorfeld wurden DNA-Extraktionsmethoden optimiert. Ein forensisches Screening-Verfahren zur postmortalen Diagnose von mitochondrialen Haplogruppen-Polymorphismen kombiniert mit potentiell pathogenen mitochondrialen Mutationen wurde bisher nicht beschrieben. Es kann möglicherweise die Erkenntnisse über den Pathomechanismus beim Plötzlichen Säuglingstod bereichern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Proben

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben stammten aus der GeSID-Studie und wurden von den daran beteiligten Instituten (*GeSID-Group*) zur Verfügung gestellt [Vennemann *et al.* 2005a].

Von jedem SIDS-Fall wurden folgende Gewebeproben der drei Keimblätter analysiert:

Mesoderm: Herz und Diaphragma

Ektoderm: Medulla oblongata

Entoderm: Leber und Lunge

Die mtDNA wurde aus gefrorenen bzw. aus Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE-) Gewebeproben extrahiert. Bevorzugt wurden gefrorene Gewebeproben verwendet.

Bei 195 der insgesamt 333 SIDS-Fälle dieser Studie wurde aus mindestens einer Gewebeprobe jedes Keimblattes die DNA extrahiert und analysiert (Tabelle 6).

Tabelle 6: Untersuchungsmaterial

Gewebe	Leber	Lunge	Herz	Diaphragma	Medulla	
					oblongata	gesamt
gefroren (-80°C)	3	186	161	0	191	536
FFPE-Gewebe	154	7	24	128	4	317
nicht vorhanden	38	2	10	67	0	122
SIDS-Fälle gesamt	195	195	195	195	195	975

Die Kontrollgruppe bestand aus 151 Mundschleimhautabstrichen von nichtverwandten, gesunden Kleinkindern im Alter zwischen einem und fünf Jahren.

Für die Untersuchungen lagen sowohl die Einverständniserklärungen der Eltern als auch das positive Votum der Ethikkommission vor.

2.1.2 Geräte

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
ABI PRISM 7000	Applied Biosystems, Foster City, USA
Biocut 1130	Reichert LABTEC, München, Deutschland
Biofuge 13	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Biofuge primo	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Biometra T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Genetic Analyzer 3130xl	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ikamag [®] RCT	Janke & Kunkel GmbH & Co KG, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Kühlgerät	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Maxwell(R) 16 Instrument	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Multiphor II Elektrophoreseeinheit	Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland
Multidrive XL Stromversorger	Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland
Schüttelwasserbad	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH Burgwedel, Deutschland
Schwenker	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH Burgwedel, Deutschland
TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortex-Mixer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Waage Sartorius BP121S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage Mettler PJ3600	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Ammoniumperoxodisulfat (APD)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
AmpliTaq Gold Buffer (10 x)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Chloroform-Isoamylalkohol, 24:1	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Borsäure	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (20 mg/ml)	MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland
Bromphenolblau	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
BT Chelex [®] 100 Resin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Buffer (10 x) with EDTA	Applied Biosystems, Foster City, USA
EDTA-Na/Titriplex III (1mM)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure (100%)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (≥ 99,8 %)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Exonuclease I (20 U/μl)	New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Formaldehyd (37 %)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Hi-Di [™] Formamide	Applied Biosystems, Foster City, USA
HPLC-Wasser	J.T. Baker, Center Valley, USA
Magnesium chloride (50 mM)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Natriumacetat-Trihydrat	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumthiosulfat	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
PCR Gold Buffer (10 x)	Applied Biosystems, Foster City, USA

Performance Optimized Polymer 4	Applied Biosystems, Foster City, USA
Performance Optimized Polymer 7	Applied Biosystems, Foster City, USA
Phenol-Chloroform (70 %)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Rotiphorese® Gel 40, 29:1	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Salpetersäure (65 %)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure (100 %)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamine	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris (10 mM)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylol, reinst	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Reagenziensysteme

ABI PRISM® SNaPshot® Multiplex Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
BIOstic™ FFPE Tissue DNA Isolation Kit	MO BIO Laboratories, Carlsbad, USA
DNA IQ Casework Pro Kit für Maxwell 16	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

MICROCON® Centrifugal Filter Devices	Millipore Headquarters, Billerica, USA
NonaplexQS PCR Amplification Kit	Biotype Diagnostic GmbH, Dresden, Deutschland
Nucleo Spin® Tissue Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Performa® DTR Gel Filtration Cartridges	Edge Bio Systems, Gaithersburg, USA
qPCR Mastermix™	Eurogentec GmbH, Köln, Deutschland
Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
QIAGEN® Multiplex PCR Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAmp® DNA Mini	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick® PCR purification Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland

2.1.5 Enzyme

AmpliTaq Gold Polymerase (5 U/ml)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Proteinase K (20 mg/ml)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

2.1.6 Größenmarker, dNTPs

GeneScan™ LIZ120® Size Standard	Applied Biosystems, Foster City, USA
123 bp DNA Ladder (33,3 ng/µl)	Invitrogen™ Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
dNTPs (100 mM)	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.1.7 Oligonukleotide

Primer	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
Sonde	Eurogentec GmbH, Köln, Deutschland

2.1.8 Software, Datenbanken

AutoDimer-Software

BLAST-Software

ABI PRISM® 310 Data Collection Software Version 2.0

3130 Data Collection Software Version 3.0

GeneMapper ID Software Version 3.2.1

MITOMAP-Datenbank

Primer 3-Software

ABI PRISM 7000 SDS Software Version 1.2.3

Sequencing Analysis Software Version 3.0

Sequence Navigator Software Version 1.0.1

UCSC-Genome-Software

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion

Die Vorversuche zur DNA-Extraktion wurden anhand von vier FFPE-Gewebearten (je Gewebeprobe drei Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 0,3 µm) eines SIDS-Falles aus dem hiesigen Institut durchgeführt und basierten auf verschiedenen Methoden:

1. Bei der erste Methode, dem „Maxwell[®] 16 FFPE Plus DNA Purification Kit“ der Firma Promega, wird die DNA an paramagnetische Partikel gebunden und aus dem Zellextrakt präzipitiert. Durch Puffer-Zugabe werden die für die automatisierte Extraktion notwendigen Salzkonzentrationen und pH-Bedingungen eingestellt. Überschüssige Zellbestandteile und unerwünschte Verunreinigungen werden über mehrere Waschschrte mit entsprechenden Puffern entfernt. Über Änderungen des pH-Wertes wird die DNA in Lösung gebracht und von den paramagnetischen Partikeln abgetrennt [Promega. DNA IQ[™] Casework Pro Kit für Maxwell[®] 16. *Technical Manual*. 2010].

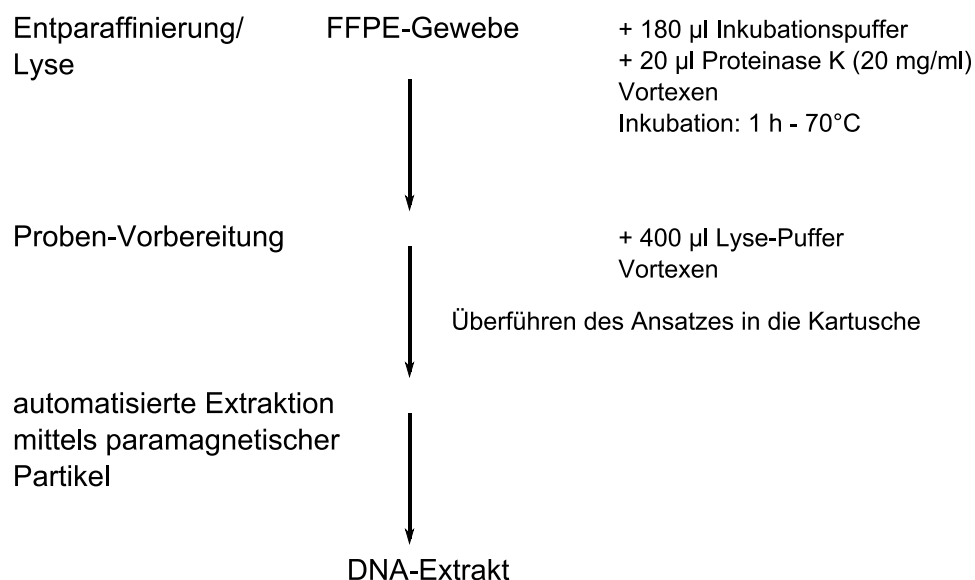


Abbildung 5: Extraktion „Maxwell[®] 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit“

2. Die zweite Extraktionsmethode, der „BIOstic™ FFPE Tissue DNA Isolation Kit“ der Firma Mo Bio Laboratories, verläuft unter Anwendung von Silikamembranbeschichteten Säulen. Silikagel, ein farbloses, poröses und amorphes Siliziumdioxid (SiO₂), ist stark hygroskopisch und eignet sich in diesem Fall als Adsorptionsmaterial. Eine spezifische Zusammensetzung gebrauchsfertiger Puffer ermöglicht die komplette Paraffinauflösung und eine gesteigerte Proteinase K-Aktivität. Die Zugabe chaotroper, salzbindender Puffer und absolutem Ethanol dient der Einstellung optimaler Bindungsbedingungen (pH-Wert, Salzkonzentration) der DNA an die Silikamembran im Filter. Waschschrte dienen dem Entfernen von Proteinen, anderen nicht wässrigen Verunreinigungen und unerwünschten Salzen. Der Prozess der DNA-Bindung ist reversibel und spezifisch für Nukleinsäuren [Mo Bio Laboratories. BIOstic™ FFPE Tissue DNA Isolation Kit. *Instruction Manual*. 2011].

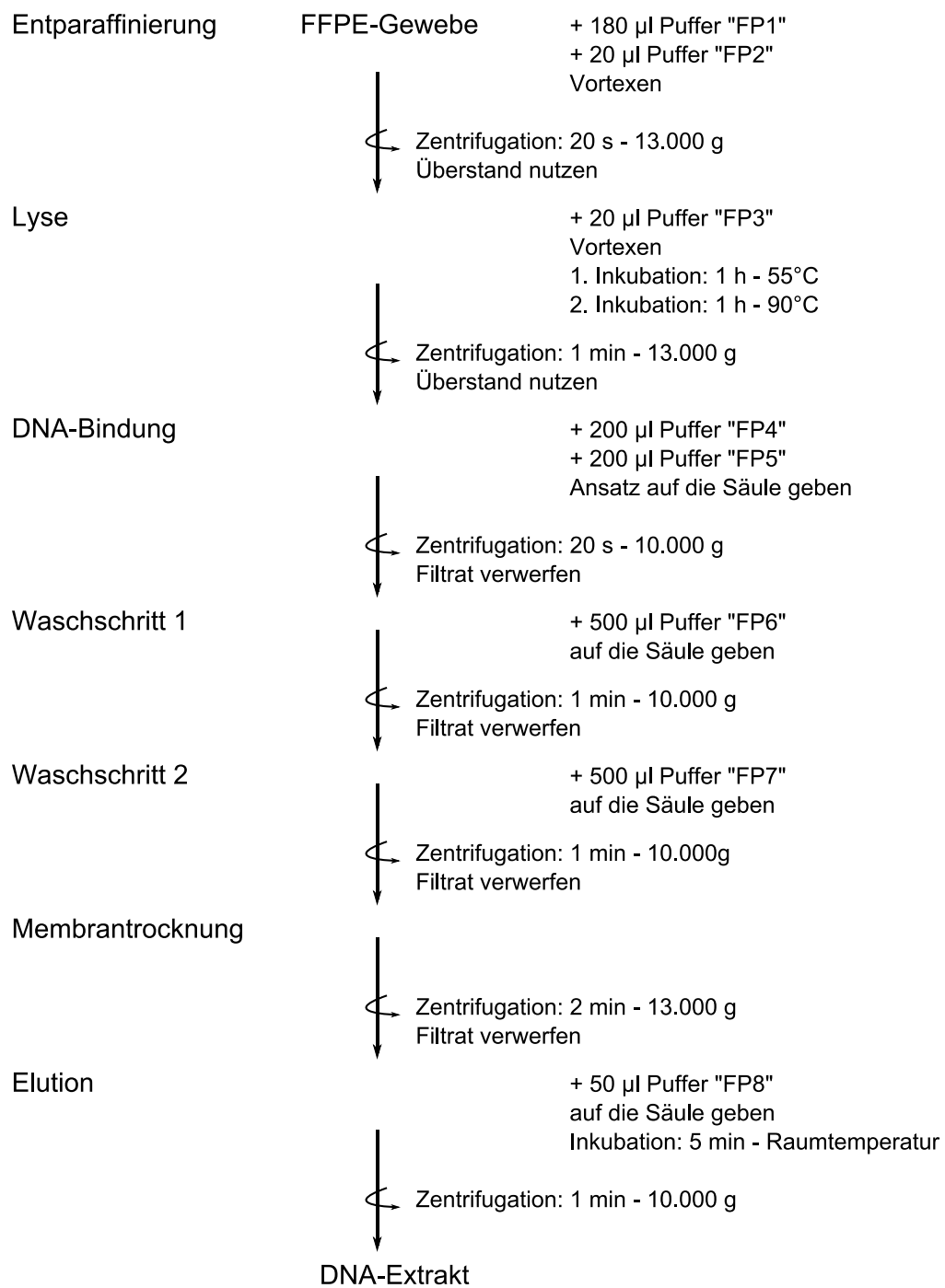


Abbildung 6: Extraktion „BIOstic™ FFPE Tissue DNA Isolation Kit“

Im Unterschied zu den beiden bisher beschriebenen Methoden wurden die FFPE-Gewebeproben für die folgenden vier Extraktionsverfahren zu Beginn mittels Xylol entparaffiniert.

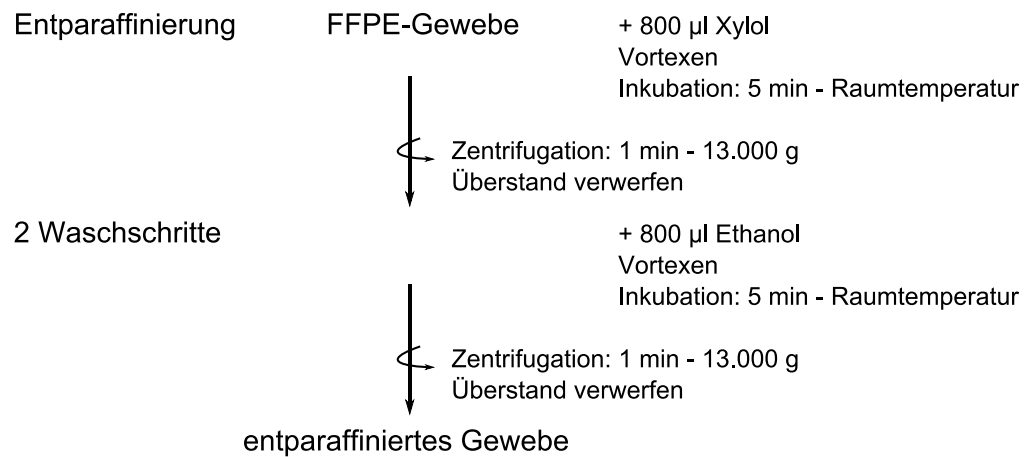


Abbildung 7: Entparaffinierung Xylol

3. Bei der dritten Methode werden Zellbestandteile mittels Chelex (5 %) aufgrund hoher Temperatureinflüsse aufgebrochen. Das Styroldivinylbenzolcopolymer bewirkt, dass hydrophobe Zellbestandteile gebunden werden. Das Enzym Proteinase K (20 mg/ml) ermöglicht u. a. die Hydrolyse der Membranproteine, wodurch die DNA freigesetzt wird [Walsch *et al.* 1991].

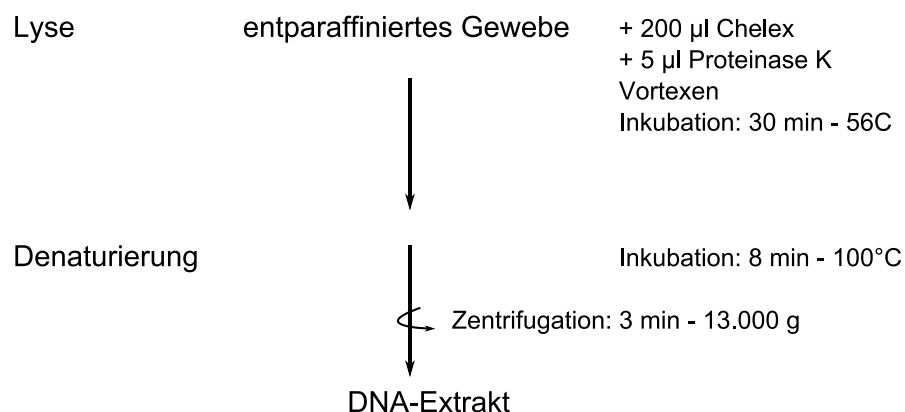


Abbildung 8: Extraktion Chelex

4. Die vierte Extraktionsmethode basiert auf unterschiedlichen Löslichkeiten von Stoffen und deren Trennung in eine wässrige Nukleinsäure-Phase und eine organische Phase. Über mehrere Schritte werden Proteine und andere Hemmstoffe aus der wässrigen Phase entfernt [Roth. Phenolische DNA Aufreinigung - Hintergrund und Protokoll. *Technische Daten*. 2009].

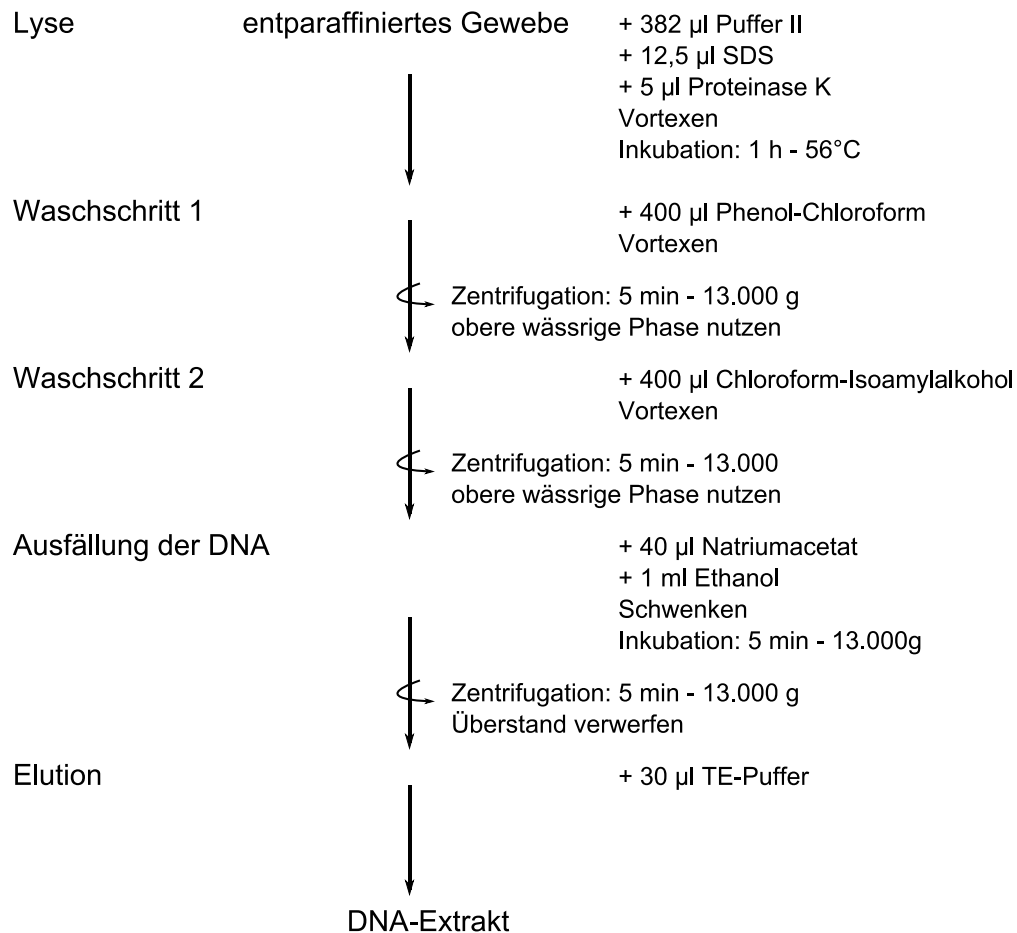


Abbildung 9: Extraktion Phenol-Chloroform

5. Das Prinzip der fünften Methode unter Anwendung des „Nucleo Spin[®] Tissue Kits“ der Firma Macherey-Nagel beruht auf dem gezielten Binden der DNA an eine Silikamembran, dem Auswaschen unerwünschter Substanzen und der abschließenden DNA-spezifischen Elution, ähnlich dem Prinzip des „BIOstic[™] FFPE Tissue DNA Isolation Kit“ (Methode eins). Allerdings entfällt die Entparaffinierung während der Lyse [Macherey-Nagel. Genomic DNA from Tissue. *User Manual NucleoSpin[®] Tissue*. 2010].

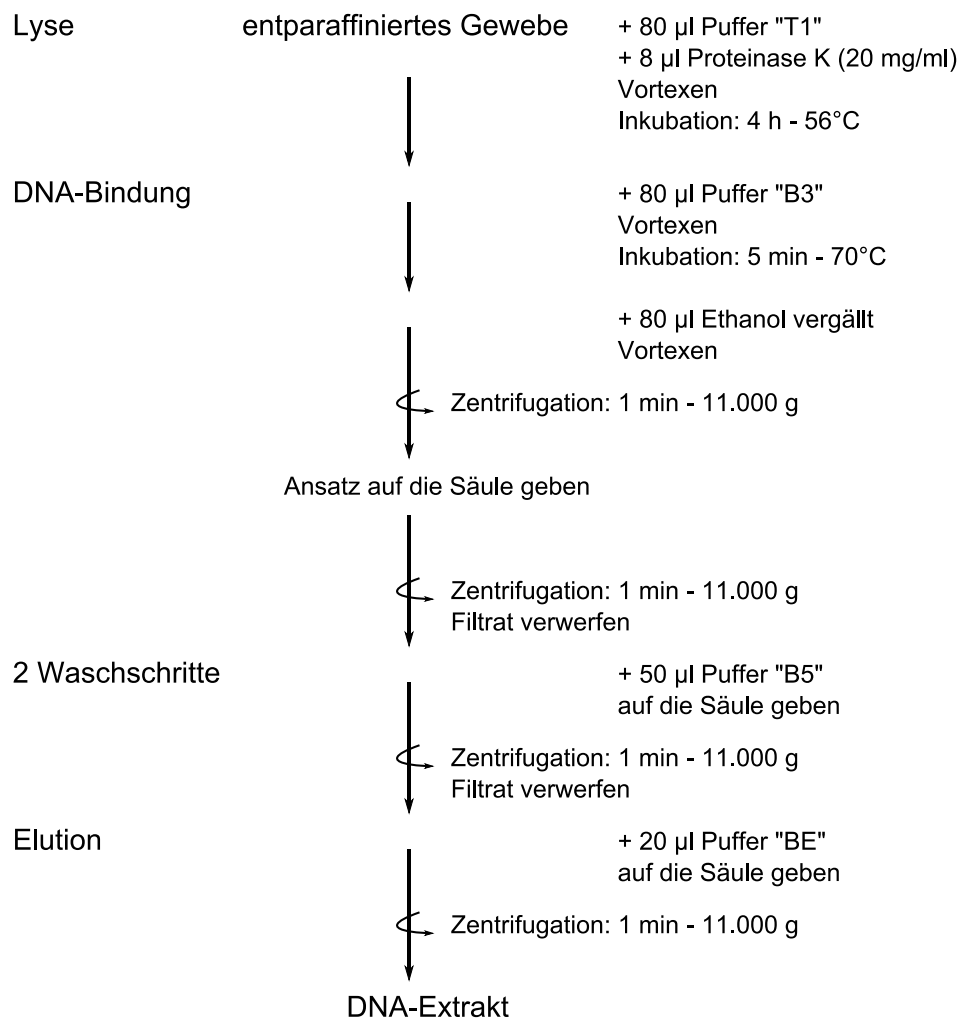


Abbildung 10: Extraktion „Nucleo Spin[®] Tissue Kit“

6. Grundlage der sechsten Extraktionsmethode, dem „QIAmp® DNA Mini Kit“ der Firma QIAGEN, ist erneut das Silikamembran-beschichtete Säulen-System [QIAGEN. QIAmp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. *User Manual*. 2010].

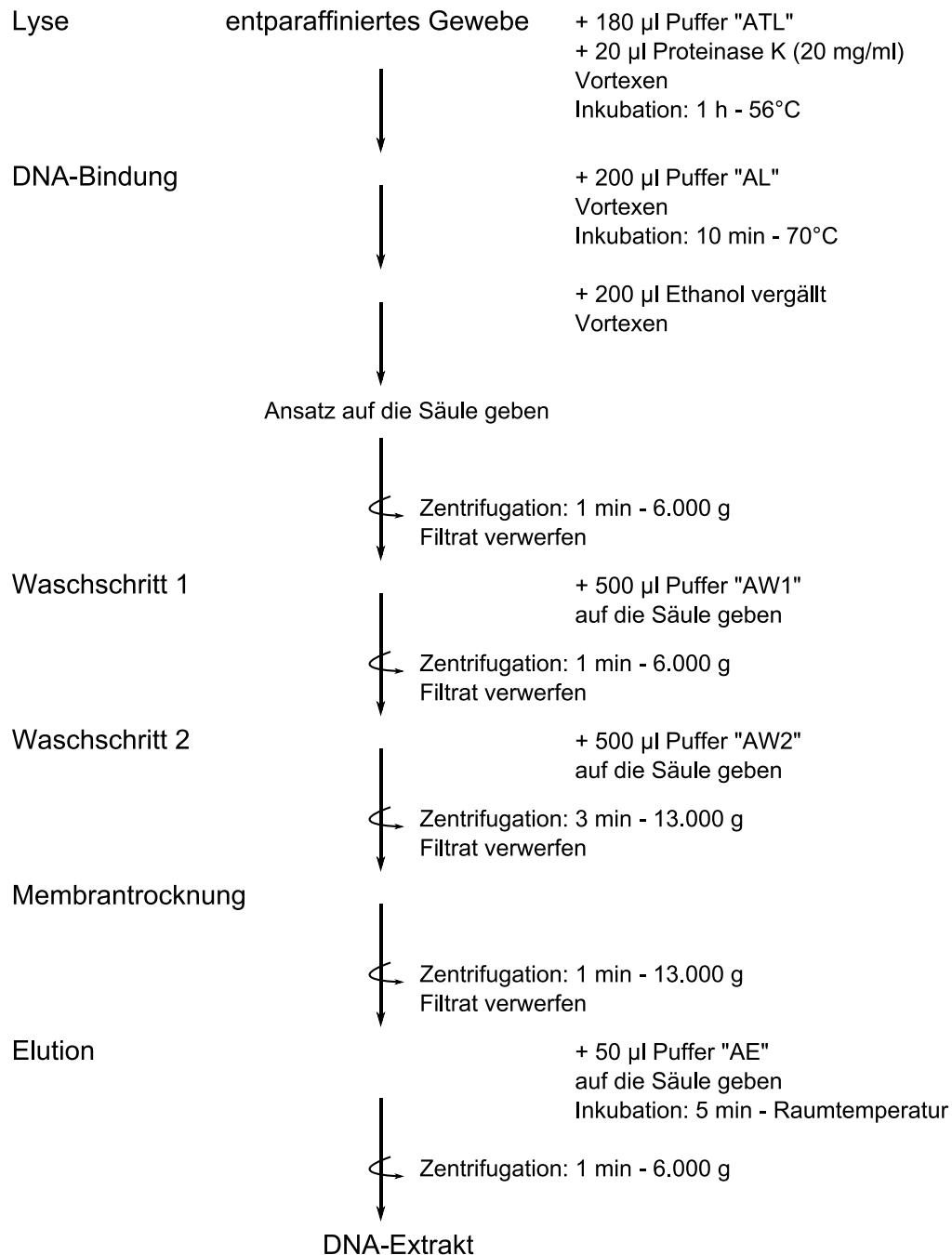


Abbildung 11: Extraktion „QIAmp® DNA Mini Kit“

2.2.2 Quantifizierung der DNA

Nachdem bei den Vorversuchen die vier Gewebearten eines SIDS-Falles mit sechs verschiedenen Methoden extrahiert wurden, wurde die Qualität und Quantität sowohl der nDNA als auch der mtDNA geprüft. Dies erfolgte unter Verwendung der *Real-Time PCR* (*Polymerase chain reaction*).

2.2.2.1 Quantifizierung der Zellkern-DNA mittels *Real-Time PCR*

Die Quantifizierung der DNA erfolgt mittels *Real-Time PCR* unter Einsatz des ABI Prism 7000 der Firma Applied Biosystems und unter Verwendung des „Quantifiler™ Human DNA Quantification Kits“. Hierbei wird die Konzentration der DNA bestimmt, indem sie einer Verdünnungsreihe (50 ng/μl - 23 pg/μl), hergestellt aus einer Standard-Probe mit bekannter Konzentration, gegenübergestellt wird.

Bei der *Real-Time PCR* unter Verwendung des „Quantifiler™ Human DNA Quantification Kits“ wird die Bildung von humanspezifischen Amplifikaten kontinuierlich gemessen. Bei dem 62 bp-langen Fragment handelt es sich um einen Bereich im humanen Telomerase-Gen (5p15.22). Die PCR läuft unter den in der folgenden Tabelle angegebenen Bedingungen ab:

Tabelle 7: Quantifizierung der nDNA - Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

Reagenzien	Menge (in μl)	<i>Real-Time PCR</i>	
Reaktions-Mix	6,25	Denaturierung	95°C - 10 min
Primer-Mix	5,25	Denaturierung	95°C - 15 s
Reaktionsansatz gesamt	11,5	Annealing	60°C - 1 min
DNA	2,0		} 40 x

Nach der Denaturierung des DNA-Doppelstranges in seine Einzelstränge lagern sich Telomerase-Gen-spezifische Primer komplementär an die Zielsequenz (Abbildung 12). Zusätzlich bindet eine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte TaqMan-Sonde spezifisch an die komplementäre Sequenz zwischen *forward*- und *reverse*-Primer. Die Sonde setzt sich zusammen aus einem Reporter-Fluorophor (FAM) am 5'-Ende und einem nichtfluoreszierenden Quencher am 3'-Ende. Aufgrund des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers zwischen den beiden wird

die Fluoreszenz-Emission des Reporters verhindert. Während der Elongation wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase abgebaut. Der Reporter wird vom Quencher getrennt, wodurch der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer unterbrochen wird. Das hat zur Folge, dass der Reporter Photonen emittiert, deren Intensität proportional der gebildeten DNA-Menge ist. Die Fluoreszenz wird mit einem entsprechenden Detektor im Thermocycler kontinuierlich nach jedem PCR-Zyklus gemessen.

Nach der Analyse werden die Ergebnisse mittels „ABI PRISM 7000 SDS Software Version 1.2.3“ ausgewertet [Butler 2012, 55-61].

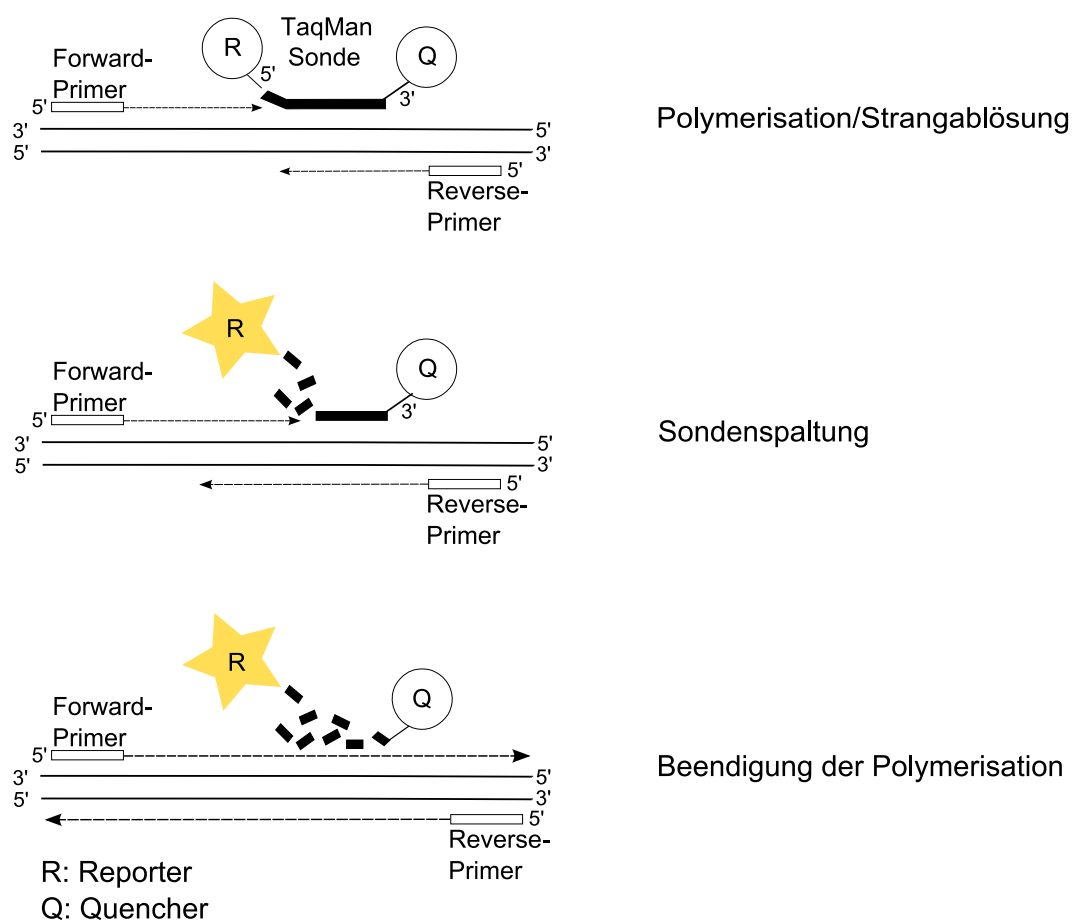


Abbildung 12: *Real-Time* PCR (nach Butler 2012)

Neben der Quantifizierung durch den humanspezifischen Assay erfolgt der IPC (*internal PCR control*) Assay. Dieser enthält neben einer IPC Template-DNA (eine synthetisierte Sequenz, die in der Natur nicht vorkommt), zwei Primer zur Amplifikation der IPC Template-DNA und eine TaqMan[®] Sonde, die mit dem

Farbstoff VIC[®] markiert ist. Neben der Quantifizierung der DNA-Extrakte kann demnach durch die parallele PCR der IPC Template-DNA eine Aussage über das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren im jeweiligen Extrakt gemacht werden. Befindet sich der Analyse-Wert der IPC Template-DNA oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes, ist das ein Hinweis darauf, dass die PCR durch unerwünschte Substanzen gehemmt wird [Applied Biosystems. Quantifiler[®] Kits - Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit and Quantifiler[®] Y Human Male DNA Quantification Kit. *User Manual*. 2012].

2.2.2.2 Quantifizierung der mitochondrialen DNA mittels *Real-Time* PCR

Das Prinzip der Quantifizierung mitochondrialer DNA mittels ABI Prism 7000 entspricht dem der Quantifizierung nukleärer DNA mittels *Real-Time* PCR. Zum Einsatz kommen mtDNA-spezifische Primer, eine Sonde und ein kloniertes PCR-Template mit bekannter mtDNA-Kopienzahl (10^8 - 10^3 Kopien/ μ l). Die Quantifizierung der mtDNA erfolgt in Anlehnung an Köhnemann *et al.* 2010 (Tabelle 8).

Tabelle 8: Quantifizierung der mtDNA - Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

Reagenzien	Menge (in μ l)	<i>Real-Time</i> PCR	
qPCR Master Mix	6,75	Inkubation	50°C - 2 min
Primerpaar (je 50 pmol)	0,2	Denaturierung	95°C - 10 min
Sonde (50 pmol)	0,1	Denaturierung	95°C - 15 s
BSA	1,25	Annealing	60°C - 1 min
HPLC-Wasser	2,0	} 50 x	
DNA	2,0		
Reaktionsansatz gesamt	12,3		

Zur Auswertung der Daten wird die „ABI PRISM 7000 SDS Software Version 1.2.3“ angewandt.

2.2.3 Aufreinigung der DNA-Extrakte

Zur Aufreinigung der Chelex-Extrakte aus den Vorversuchen (vier Gewebearten eines hiesigen SIDS-Falles) wurden zwei verschiedene Methoden angewandt.

2.2.3.1 Aufreinigung „MICROCON® Centrifugal Filter Devices“

Diese Methode dient dem Entfernen in Lösung befindlicher Salze und der Konzentrierung, sowohl von degradierten DNA-Extrakten als auch amplifizierten DNA-Fragmenten. Dabei beruht das Verfahren auf einer porenspezifischen Membran aus regenerierter Zellulose. Das verwendete Säulen-System Microcon 100 ermöglicht die Entsalzung und Konzentrierung doppelsträngiger DNA-Abschnitte ab einer Länge von 125 bp [Millipore. Microcon® Centrifugal Filter Devices. *User Guide*. 2005].

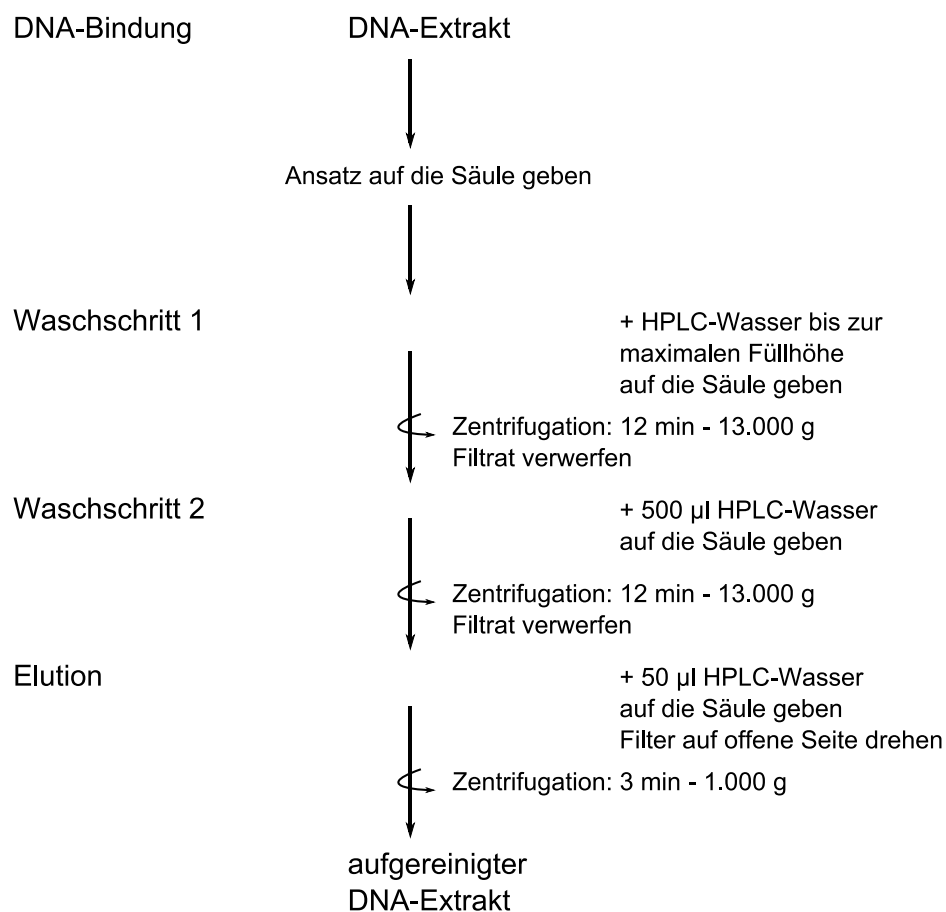


Abbildung 13: Aufreinigung „MICROCON® Centrifugal Filter Devices“

2.2.3.2 Aufreinigung „QIAquick PCR Purification Kit“

Die Aufreinigung von DNA-Extrakten bzw. PCR-Produkten mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma QIAGEN beruht auf einem Silikamembran-beschichteten Säulen-System. Das Prinzip entspricht den Reinigungs- und Elutionsschritten des „QIAamp[®] DNA Mini Kits“ und des „Nucleo Spin[®] Tissue Kits“ (Methode fünf und sechs der Extraktionsvorversuche). Produkte zwischen 100 und 10 kbp können aufgereinigt werden [Dugan *et al.* 2002; QIAGEN. QIAquick PCR Purification Kit. *QIAquick[®] Spin Handbook*. 2008].



Abbildung 14: Aufreinigung „QIAquick PCR Purification Kit“

2.2.4 SNP-Analyse ausgewählter mitochondrialer Nukleotidpositionen

Ein Teil der vorliegenden Arbeit umfasste die Bestimmung der mitochondrialen Haplogruppe und die Untersuchung von 37 mitochondrialen Mutationen, die bereits mit Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wurden. Zur Bestimmung der Haplogruppe wurden 32 spezifische Polymorphismen des mitochondrialen Genoms parallel untersucht. Die Analyse der 37 pathogenen Mutationen verlief in Analogie. Beide Verfahren unterschieden sich bezüglich der Lokalisation der zu überprüfenden Nukleotidpositionen und den umgebenden Sequenzabschnitten. Der folgende Abschnitt stellt den in Abbildung 15 dargestellten Arbeitsablauf beider Methoden vor. Das entsprechende Amplifikations-Protokoll (SIDS - *Multiplex-Minisequencing-Analyseverfahren*) findet sich in Abbildung A 1 im Anhang.

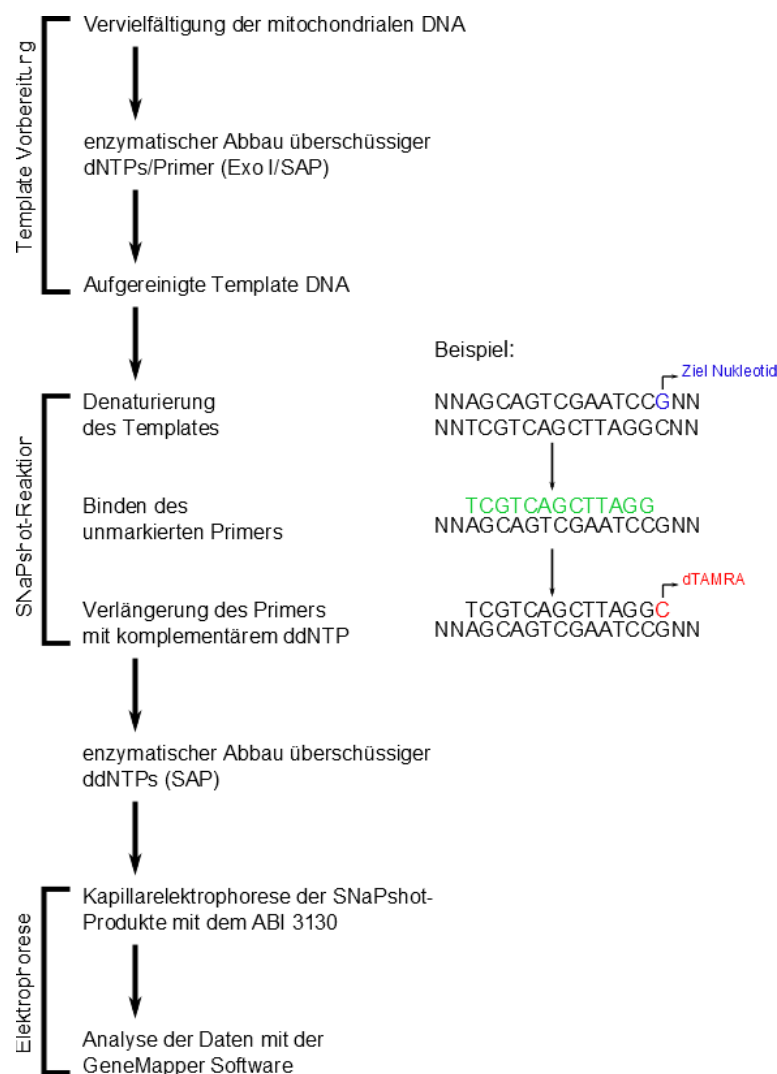


Abbildung 15: Überblick über das *Multiplex-Minisequencing-Analyseverfahren*

2.2.4.1 Primer-Design

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur Bestimmung der mitochondrialen Haplogruppe sind Teil eines von Köhnemann *et al.* 2009 im hiesigen Institut etablierten Sets aus 27 Primerpaaren und 32 *Single-Base-Extension-Primer* (SBE-Primer). Der SNP-Assay findet bereits Anwendung in der Routine-Arbeit, bei der Untersuchung von Spurenmaterial, bei dem eine geringe DNA-Konzentration (z. B. telogene Haare, Zähne) bzw. stark degradierte DNA, (z. B. alte Knochen, FFPE-Gewebeproben) zu erwarten ist.

Angaben zu der genauen Sequenz und Position der Primer finden sich in den Tabellen A 3, A 4 und A 5 im Anhang.

Der in dieser Arbeit entwickelte Assay zur Untersuchung potentiell pathogener Mutationen basiert auf bekannten mitochondrialen Mutationen, die nach Opdal *et al.* 2004 mit dem Plötzlichen Säuglingstod in Zusammenhang gebracht werden. Zusätzlich werden mit Mitochondriopathien assoziierte mitochondriale Mutationen einbezogen [Wong 2010, Gropman *et al.* 2004, Chinnery *et al.* 2000, 2010; Wallace *et al.* 1995]. In Tabelle neun sind die 37 pathogenen Mutationen zusammengefasst.

Bewusst sind die mitochondrialen Haplogruppen-Polymorphismen A2706G, C7028T, G12372A und C14766T, die von Opdal *et al.* 2004 als pathogene Mutationen für den Plötzlichen Säuglingstod aufgeführt werden, als interne Kontrolle in den Assay zur Bestimmung der potentiell pathogenen Mutationen aufgenommen.

Tabelle 9: mit Mitochondriopathien/SIDS assoziierte Mutationen

Mitochondriopathie	Nukleotid-varianten	Genregion	Aminosäure-Austausch
SIDS	A2706G	16S rRNA	nicht-kodierend
	T3197C	16S rRNA	nicht-kodierend
	T3250C	tRNA ^{Leu}	nicht-kodierend
	T3290C	tRNA ^{Leu}	nicht-kodierend
	T3308C	ND1	Met - Thr
	T3308G	ND1	Met-Terminator
	C7028T	CO1	synonym
	A9299G	CO3	synonym
	G9300A	CO3	Ala - Thr
	G9477A	CO3	Val - Ile
	T10034C	tRNA ^{Gly}	nicht-kodierend
	C10043T	tRNA ^{Gly}	nicht-kodierend
	A10044G	tRNA ^{Gly}	nicht-kodierend
	A11467G	ND4	synonym
	G11719A	ND4	synonym
	A12308G	tRNA ^{Leu}	nicht-kodierend
	G12372A	ND5	synonym
	T13617C	ND5	synonym
	C14766T	CYB	Thr - Ile
LHON	G3460A	ND1	Ala - Thr
	G11778A	ND4	Arg - His
	T14484C	ND6	Met - Val
NARP/ Leigh Syndrom	T8993G	ATP6	Leu - Arg
	T8993C	ATP6	Leu - Pro
	G14459A	ND6	Ala - Val
MELAS	A3243G	tRNA ^{Leu}	nicht-kodierend
	A3251G	tRNA ^{Leu}	nicht-kodierend
	T3271C	tRNA ^{Leu}	nicht-kodierend
MERF	A8344G	tRNA ^{Lys}	nicht-kodierend
	T8356C	tRNA ^{Lys}	nicht-kodierend
CPEO	A3243G	tRNA ^{Leu}	nicht-kodierend
	T4274C	tRNA ^{Ile}	nicht-kodierend
Myopathie	A12320G	tRNA ^{Leu}	nicht-kodierend
	T14709C	tRNA ^{Glu}	nicht-kodierend
Kardiomyopathie	A3243G	tRNA ^{Leu}	nicht-kodierend
	A4269G	tRNA ^{Ile}	nicht-kodierend
	A4300G	tRNA ^{Ile}	nicht-kodierend
Diabetes und Taubheit	A3243G	tRNA ^{Leu}	nicht-kodierend
	C12258A	tRNA ^{Ser}	nicht-kodierend
Enzephalomyopathie	G1606A	tRNA ^{Val}	nicht-kodierend
	T10010C	tRNA ^{Gly}	nicht-kodierend
Sensorineurale Taubheit	A7445G	CO1	synonym
Aminoglykosidisch induzierte Taubheit	A1555G	12S rRNA	nicht-kodierend

Aus der überarbeiteten Cambridge Referenz Sequenz der humanen mitochondrialen DNA (MITOMAP-Datenbank: NC_012920; gi:251831106) wurden mittels Primer 3-Software die Oligonukleotide entwickelt. Das Design der Primer erfolgte nach den in der folgenden Tabelle zusammengefassten allgemein gültigen Regeln:

Tabelle 10: Empfehlungen zum Primer-Design (nach Mühlhardt 2003)

Primer-Anforderungen	mögliche Folgen
Primer-Länge zwischen 18 - 30 bp	Stabilisierung der Bindung
G-/C-Anteil zwischen 40 - 60%	Stabilisierung der Bindung
maximal 4 gleiche Basen hintereinander	Fehlhybridisierungen, Leserasterverschiebung
Schmelztemperatur zwischen 55 - 80 °C	ausreichend hohe Annealing-Temperatur möglich
am 3'-Ende: 1 - 2 Guanin-/Cytosin-Basen	bessere Bindung und Elongation
am 3'-Ende: maximal 3 Guanin-/Cytosin-Basen	unspezifische Amplifikationsprodukte vermeiden
spezifische Sequenz	keine unspezifischen Amplifikationsprodukte
keine internen Sekundärstrukturen	Hybridisierung mit der Template-DNA
möglichst HPLC- oder PAGE-Reinigung	ungehemmte Amplifikation

Im Laufe der Evolution sind Kopien mitochondrialer Sequenzen in die nukleäre Erbsubstanz eingebaut wurden. Die nDNA enthält demnach Kopien mitochondrialer Bereiche (NUMTS, *nuclear mitochondrial insertions*). Das mitochondriale Genom findet sich zu Tausenden in einer Zelle, sodass die Kopienzahl der NUMTS die mitochondriale Sequenz nicht überschreiten und es demnach keinen Einfluss einer Co-Amplifikation geben sollte [Calvignac *et al.* 2010]. Um das Risiko einer Co-Amplifikation zusätzlich zu verringern, wurden die konstruierten Primer unter Verwendung der „UCSC-Genome-Software“ und mittels „BLAST-Software“ auf ihre mtDNA-spezifische Bindungsfähigkeit überprüft. Das Kriterium bei der Auswahl der Primer war, dass bei den Software-Analysen keine nukleären Entsprechungen gefunden wurden [Goios *et al.* 2008]. Abschließend wurden unter Anwendung des Programmes „AutoDimer“ die Oligonukleotide bezüglich unerwünschter Primer-Dimere bzw. Hairpin-Strukturen analysiert [Vallone *et al.* 2004a].

Die mittels Software entworfenen und auf unspezifische Bindungen überprüften SBE-Primer, dienten dem Nachweis des Wildtyp- oder Mutanten-Allels.

Um die Mutationen innerhalb eines Farbkanals differenzieren zu können, wurde die Länge der SBE-Primer spezifisch definiert. Hierzu wurden sie am 5'-Ende mit Polynukleotiden (dGACT) verlängert. Ein Abstand von vier Basenpaaren zwischen den Peaks sollte für jeden Farbkanal resultieren.

Genaue Angaben zu den Primern finden sich in den Tabellen A 6, A 7 und A 8 im Anhang.

2.2.4.2 Multiplex-PCR

Zu Beginn wurden mittels einer PCR-Reaktion, ausgewählte Sequenz-Bereiche des mitochondrialen Genoms spezifisch vervielfältigt. Diese Sequenz-Abschnitte konnten mehrere der zu untersuchenden Sequenzvariationen enthalten.

Bei der Haplogruppen-Bestimmung werden parallel 27 Fragmente zwischen 51 und 196 bp amplifiziert. 19 Fragmente, zwischen 89 und 292 bp lang, werden parallel unter der gleichen Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und identischen PCR-Bedingungen (Tabelle 11) zur Analyse der 37 potentiell pathogenen Mutationen amplifiziert.

Die „*touch-up*“ PCR wird eingesetzt, da die Analyse der mitochondrialen DNA häufig nur bei schwierig zu amplifizierenden Proben verwendet wird. Eine geringe Annealing-Temperatur zu Beginn ermöglicht eine einfache Primerbindung. Mit dem Anstieg der Temperatur nach jedem Zyklus um 0,2°C wird das Annealing spezifischer. Eine unspezifische Amplifikation nach einer gewissen Zyklenzahl wird verhindert [Butler 2012, 69-97; Rolf *et al.* 2004; Rowther *et al.* 2012].

Die Sequenzen der jeweiligen Primerpaare sind in Tabellen (A 3 bzw. A 6) im Anhang zusammengefasst.

Tabelle 11: Multiplex-PCR I - Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

Reagenzien	Menge (in μl)	Multiplex-PCR		
MgCl_2 (50 mM)	1,25		95°C - 10 min	
dNTP (25 mM)	1,25	Denaturierung	95°C - 30 s	} 3 x
AmpliTaq Gold Buffer (10 x)	1,25	Annealing	55°C - 45 s	
BSA (20 mg/ml)	0,2	Elongation	72°C - 30 s	
AmpliTaq Gold (5 U/ml)	0,2		95°C - 30 s	} 19 x
je Primer (je 4 pmol)	0,1		55°C - 45 s *	
DNA-Extrakt	2,0		72°C - 30 s	
Reaktionsansatz gesamt	7,0		95°C - 30 s	} 11 x
			60°C - 45 s	
			72°C - 30 s	
		Final Extension	72°C - 7 min	
			4°C - ∞	

* aufsteigend 0,2°C pro Zyklus

Alternativ zum selbsthergestellten Reaktionsansatz wurde der „QIAGEN® Multiplex PCR Kit“ getestet, welcher einen einsatzbereiten Multiplex-PCR Master Mix enthält. Der Master Mix besteht aus einer HotStarTaq® DNA-Polymerase, einem Multiplex-PCR-Puffer und dem Deoxynukleotid Triphosphat-Mix. [QIAGEN. QIAGEN® Multiplex PCR. *Handbook*. 2010].

Nachfolgende Tabelle zeigt den Reaktionsansatz und die PCR-Bedingungen:

Tabelle 12: Multiplex-PCR II - Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

Reagenzien	Menge (in μl)	Multiplex-PCR		
Multiplex-PCR Master Mix	6,25	Aktivierung	95°C - 15 min	
Primerpaar (je 4 pmol)	0,8	Denaturierung	94°C - 30 s	} 30 x
DNA-Extrakt	2,0	Annealing	64°C - 50 s	
Reaktionsansatz gesamt	ad 14,0	Elongation	72°C - 40 s	
		Final Extension	60°C - 20 min	
			4°C - ∞	

2.2.4.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Amplifikation wurden die PCR-Produkte in einem 9,3 %-igen Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend mittels Silbernitrat gefärbt. Durch das Mitführen eines Standards (123 bp DNA *Ladder*) mit bestimmten DNA-Fragmenten, konnten die Fragment-Längen der Amplifikate beurteilt werden. Zusätzlich diente der Standard als positive Kontrolle für die Silberfärbung. Die Konzentration der amplifizierten DNA konnte an der Bandenintensität abgeschätzt werden.

Bei der Elektrophorese wandern negativ geladene Moleküle (PCR-Produkte) unter Anlegen einer Spannung durch das Polyacrylamid-Gel von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld hängt dabei von der Feldstärke, der Ladungsgröße des Moleküls, der Größe und Form des Moleküls (Molmasse), dem Trägermedium (z. B. Papier, Agarose- oder Polyacrylamid-Gel) und dem pH-Wert des Trägermediums ab. Hinsichtlich gleicher Größe, aber unterschiedlicher Ladungen passieren hochgeladene Moleküle schneller das Trägermedium. Angesichts gleicher Ladung und unterschiedlicher Größe gelangen kleinere Teilchen schneller in Richtung Anode. Demnach wandern große, gering geladene Moleküle am langsamsten durch ein Gel [Allen *et al.* 1989]. Je nach Größe des PAA-Gels sind die Einstellungen der Stromwerte bei der Elektrophorese variabel (9,3 %-iges PAA-Gel: 1.000 V, 25 mA, 15 W, ca. 25 min). Im Anschluss an die Gelelektrophorese werden die PCR-Produkte mittels Silbernitrat angefärbt (Abbildung 16). Diese Färbung dient qualitativ der Visualisierung des Amplifikationserfolges, semiquantitativ der Amplikonmenge und der Fragment-Längen-Bestimmung [Blum *et al.* 1987].

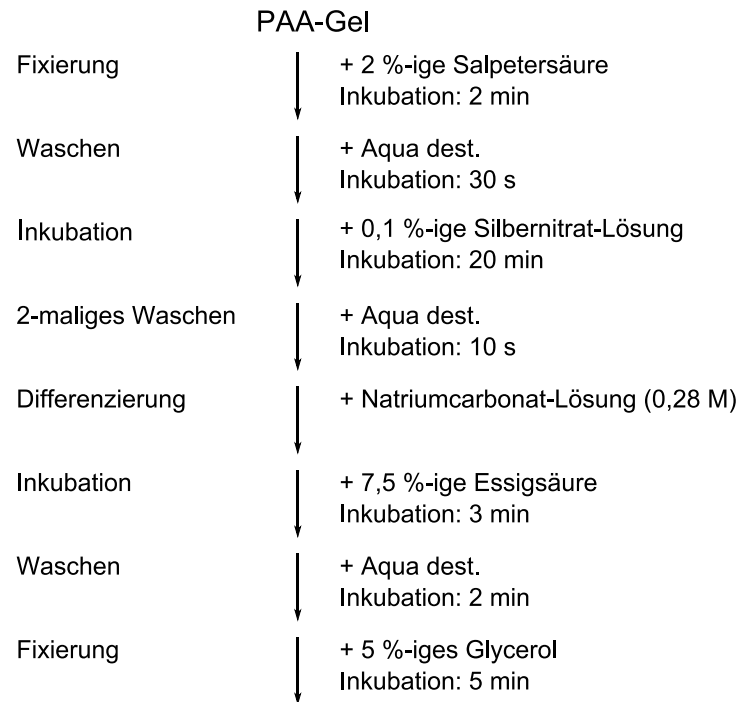


Abbildung 16: Silbernitrat-Färbung

2.2.4.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Nachdem die DNA-Fragmente erfolgreich mittels Gelelektrophorese nachgewiesen wurden, mussten ungebundene Nukleotide, restliche Primer, Salze und die DNA-Polymerase für die nachfolgende SNaPshot-Reaktion entfernt werden.

Neben den beiden unter 2.2.3 beschriebenen Methoden zur Aufreinigung/Konzentrierung von DNA-Extrakten bzw. PCR-Produkten können Amplifikate auch durch eine enzymatische Reaktion aufgereinigt werden. Jede Probe wird mit 1,25 µl *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP; 1 U/µl) und 0,04 µl Exonuklease I (EXO; 20 U/µl) versetzt. Exonuklease I baut die Einzelstrang-DNA ab, indem vom Ende des Primers Nukleinsäuremonomere abgespalten werden. SAP ist in der Lage, die 5'-Enden überschüssiger Deoxynukleotid Triphosphate (dNTPs) zu dephosphorylieren. Die Aktivität beider Enzyme wird nach einer Inkubationszeit von 95 min bei 37°C durch Erhitzen auf 78°C für 15 min deaktiviert, wodurch die enzymatische Reaktion kontrollierbar ist [Butler 2012, 347-369].

2.2.4.5 SNaPshot-Multiplex-PCR

Nach der Multiplex-PCR und Aufreinigung schloss sich die SNaPshot-Multiplex-PCR an. Mit dieser Methode war es möglich, die 32 mitochondrialen Haplogruppen-Polymorphismen bzw. die 37 mitochondrialen, pathogenen Mutationen in je einem Multiplex-Ansatz (Tabelle 13) unter den gleichen PCR-Bedingungen zu analysieren.

Tabelle 13: SNaPshot-Reaktion - Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

Reagenzien	Menge (in µl)	SNaPshot-Reaktion	
SNaPshot Mix	1,25	Denaturierung	96°C - 10 s
SNaPshot Primer je	0,1	Annealing	55°C - 5 s
PCR-Produkt	2,0	Elongation	60°C - 30 s
Reaktionsansatz gesamt	ad 7,0	Final Extension	60°C - 10 min
			4°C - ∞

Das *Multiplex-Minisequencing*-Analyseverfahren mittels SNaPshot-Multiplex-PCR geht zurück auf die Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (1977). Der so genannte *Single-Base-Extension-Primer* (SBE-Primer)/*SNaPshot Primer* bindet komplementär genau eine Base vor der Lokalisation des Polymorphismus (Annealing) an die durch Denaturierung gebildete einzelsträngige DNA. Diese Primer unterscheiden sich, wie im Abschnitt „Primer-Design“ beschrieben, spezifisch in ihrer Länge (Tabelle A 4/A 5 bzw. A 7/A 8). Komplementär zum Nukleotid der Mutation wird der Primer, vermittelt durch eine DNA-Polymerase, um ein fluoreszenzmarkiertes Dideoxynukleotid-Triphosphat (ddNTP) am 3'-Ende erweitert (Elongation). Diese Kettenabbruch-ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxygruppe, sodass die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids und damit eine Verlängerung des Primers am 3'-Ende durch die DNA-Polymerase nicht mehr möglich ist. Der Vorteil der SNaPshot-Multiplex-PCR ist, dass in einem Reaktionsansatz zeitgleich mehrere SBE-Primer unterschiedlicher Größe binden können. Folglich entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, bestehend aus dem Primer und einem entsprechenden fluoreszenzmarkierten ddNTP [Applied Biosystems. ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit. *Protocol*. 2010; Köhnemann *et al.* 2009; Paneto *et al.* 2010; Vallone *et al.* 2004b].

In der nachstehenden Abbildung sind die einzelnen Schritte der SNaPshot-Multiplex-PCR bildhaft dargestellt:

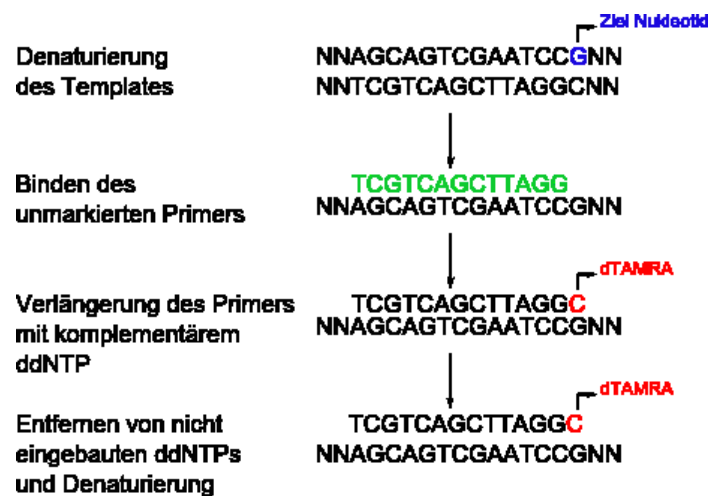


Abbildung 17: SNaPshot-Multiplex-PCR

Der „SNaPshot Multiplex Kit“ der Firma Applied Biosystems basiert auf dem Prinzip des SNaPshot-Verfahrens. Jedes im SNaPshot-Reaktions-Mix enthaltene ddNTP ist mit einem der folgenden Fluoreszenzfarbstoffe markiert:

Tabelle 14: Fluoreszenzmarkierungen der ddNTPs

ddNTP	Fluoreszenzfarbstoff	Signalfarbe
Adenin	dR6G	grün
Cytosin	dTAMRA TM	schwarz
Guanin	dR110	blau
Thymin	dROX TM	rot

2.2.4.6 Aufreinigung der SNaPshot-Produkte

Überschüssige, fluoreszenzmarkierte ddNTPs wurden für die abschließende Kapillargelelektrophorese aus den SNaPshot-Produkten entfernt.

Jeder Ansatz der SNaPshot-Reaktion wird mit 1,25 µl SAP (1 U/µl) versetzt, sodass die 5'-Enden ungebundener ddNTPs dephosphoryliert und damit in ihrer Bindungsfähigkeit gestört werden. Die Enzymaktivität wird nach einer 95 minütigen Inkubation bei 37°C durch das Erwärmen auf 78°C für 15 Minuten inaktiviert.

2.2.4.7 Kapillargelelektrophorese

Nach der Aufreinigung des SNaPshot-Ansatzes wurden die fluoreszenzmarkierten Fragmente entsprechend ihrer Länge und dem gebundenen Fluoreszenzfarbstoff kapillargelelektrophoretisch aufgetrennt.

Für die Amplikon-Längenbestimmung werden zu 10 µl Hi-Di-Formamide (inklusive Längenstandard LIZ 120) jeweils 1 µl des SNaPshot-Produktes hinzugefügt. Durch Hitzedenaturierung (3 min, 95°C) werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Strängen der markierten DNA-Fragmente aufgebrochen. Hi-Di-Formamide bewirkt, dass die Wasserstoffbrückenbindungen getrennt bleiben und zusätzlich die Salzkonzentration vermindert wird.

Es wird das Modul „SNP36-POP4_1“ (Injektions-Zeit: 15 s; Injektions-Spannung: 2.0 kV; Lauf-Spannung: 15.0 kV; Lauf-Temperatur: 60°C, Lauf-Zeit: 17 min) ausgewählt.

Die Kapillargelelektrophorese dient der Auftrennung und der Detektion der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte. Die geladenen DNA-Fragmente wandern entlang einer Spannung durch ein Medium. Es werden simultan vier Kapillaren mit einer Gelmatrix (Polymer) gefüllt und das Probenmaterial in die Kapillare injiziert. Die DNA-Amplifikate werden ihrer Länge nach aufgetrennt und passieren beim Durchqueren der Gelmatrix in Richtung Anode einen Argon-Ionen-Laser. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch diesen angeregt, Licht zu emittieren. Dieses wird mit einem Prisma der Wellenlänge nach aufgespalten und von einer Detektionseinheit (CCD-Kamera) erfasst. Sie wandelt die Fluoreszenzintensität und -art in Daten um, welche an die Datenerfassungssoftware („Data Collection Software“) übermittelt werden. Die Allel-Zuordnung erfolgt automatisch unter Anwendung der „GeneMapper-Software“.

Das Ergebnis ist ein Elektropherogramm, wie es in der Abbildung 23 im Abschnitt 3.2 dargestellt ist. Bei der Befund-Auswertung ist zu beachten, ob der SBE-Primer am vorwärtigen oder rückwärtigen Strang der DNA bindet. Bei einem vorwärtigen (*forward*) SBE-Primer entspricht das inkorporierte ddNTP dem nachzuweisenden Polymorphismus. Bei einem rückwärtigen (*reverse*) Primer ist der nachzuweisende Polymorphismus die komplementäre Base des inkorporierten ddNTP.

2.2.5 Sequenzierung der mitochondrialen DNA

Nachdem von allen im Untersuchungsumfang enthaltenen DNA-Proben die mitochondriale Haplogruppe bestimmt und die 37 potentiell pathogenen Mutationen analysiert wurden, wurde die gesamte Sequenz des mitochondrialen Genoms von drei ausgewählten SIDS-Proben bestimmt. Dafür wurden die Gewebeproben der Medulla oblongata mit dem „Maxwell® 16 FFPE Plus DNA Purification Kit“ extrahiert.

Der folgende Abschnitt stellt den in Abbildung 18 dargestellten Arbeitsablauf der Methode vor. Das entsprechende Amplifikations-Protokoll (SIDS-Sequenzierung) findet sich im Anhang.

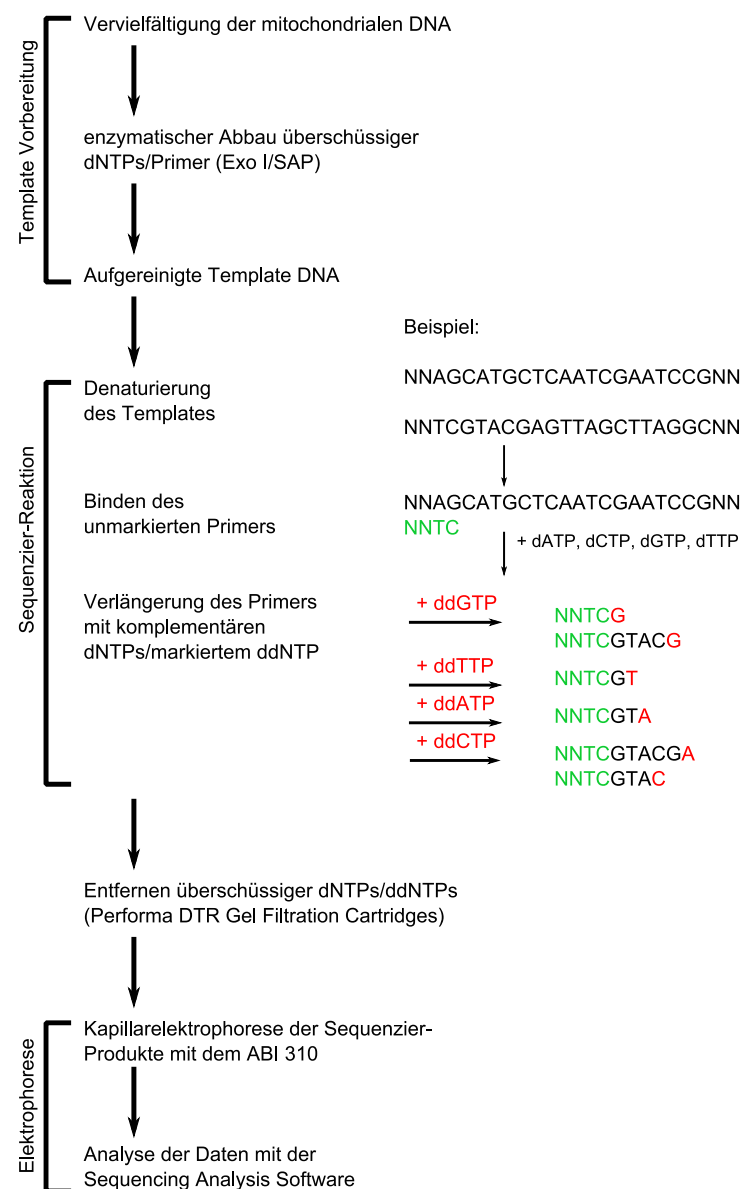


Abbildung 18: Überblick über die Sequenzierung

2.2.5.1 Primer Design

Die Oligonukleotide zur Sequenzierung der humanen mtDNA basieren auf dem ehemals kommerziell erhältlichen „mitoSEQr™-System“ der Firma Applied Biosystems. Die Sequenzen der 46 Primerpaare wurden auf Nachfrage von der Firma zur Verfügung gestellt. Durch den manuellen Abgleich mit der revidierten Cambridge Referenz Sequenz wurden fehlende oder abweichende Nukleotide in 15 der insgesamt 92 Primer-Sequenzen aufgedeckt (Tabelle 15). Die korrigierten Primerpaare wurden unter Verwendung der „UCSC-Genome-Software“ und mittels „BLAST-Software“ auf ihre mtDNA-spezifische Bindungsfähigkeit überprüft. Abschließend wurden unter Anwendung des Programmes „AutoDimer“ die Oligonukleotide bezüglich unerwünschter Primer-Dimere bzw. Hairpin-Strukturen analysiert [Vallone *et al.* 2004a].

Das *M13-Tailing* innerhalb der Primer-Sequenzen des „mitoSEQr™-System“, für eine vereinfachte Sequenzierreaktion durch M13-Primer, wurde nicht benötigt.

Tabelle 15: Vergleich der „mitoSEQr™-System“ Primer-Sequenzen mit der rCRS

Sequenzier-Fragment	Nukleotid-position	Primer-Ausrichtung	„mitoSEQr™ System“	rCRS
Fragment 22	9043	<i>reverse</i>	-	C
Fragment 25	9992	<i>reverse</i>	-	C
Fragment 26	10259	<i>reverse</i>	-	A
Fragment 27	10714	<i>reverse</i>	-	C
Fragment 29	11017	<i>forward</i>	C	T
Fragment 30	11916	<i>reverse</i>	-	T
Fragment 31	12175	<i>reverse</i>	-	T
Fragment 33	12976	<i>reverse</i>	-	C
Fragment 34	13329	<i>reverse</i>	-	C
Fragment 36	14102	<i>reverse</i>	-	T
Fragment 39	15034	<i>reverse</i>	-	A
Fragment 43	16534	<i>reverse</i>	-	A
Fragment 44	16189	<i>forward</i>	C	T
	263	<i>reverse</i>	C	T
Fragment 45	481	<i>reverse</i>	-	C
Fragment 46	908	<i>reverse</i>	-	C

2.2.5.2 Singleplex-PCR

Die korrigierten Oligonukleotide des ehemals kommerziell erhältlichen „mitoSEQr™-System“ der Firma Applied Biosystems ermöglichen die separate Amplifikation von 46 Fragmenten, welche eine Länge zwischen 369 bp (Fragment 1) und 679 bp (Fragment 13) haben. Die Oligonukleotide sind so konstruiert, dass die mitochondriale Sequenz jeweils durch zwei Fragmente bestimmt wird. Die Fragmente weisen demnach überlappende Sequenzen von ca. 200 bp an jedem Ende auf. Der Reaktionsansatz und die PCR-Bedingungen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst [Applied Biosystems. VariantSEQr™ and mitoSEQr™ Resequencing Systems. *Protocol*. 2006]:

Tabelle 16: Singleplex-PCR - Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen

Reagenzien	Menge (in µl)	Singleplex-PCR	
MgCl ₂ (50 mM)	1,25	96°C - 5 min	
dNTP (25 mM)	1,25	Denaturierung	94°C - 30 s
AmpliTaq Gold Buffer (10 x)	1,25	Annealing	60°C - 45 s
BSA (20 mg/ml)	0,2	Elongation	72°C - 45 s
AmpliTaq Gold (5 U/ml)	0,2	} 40 x	
Primerpaar (je 0,4 pmol)	0,2		
HPLC-Wasser	0,65	Final Extension	72°C - 10 min
DNA-Extrakt	2,0	4°C - ∞	
Reaktionsansatz gesamt	7,0		

2.2.5.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese

Der Ablauf der Polyacrylamid Gelelektrophorese entsprach dem in Abschnitt 2.2.4.3.

Es wird die Amplifikation der einzelnen Fragmente überprüft. Für eine erfolgreiche Sequenzierung ist lediglich eine Bande entsprechend der erwarteten Fragmentlänge im 9,3 %-igen PAA-Gel sichtbar. PCR-Produkte mit unspezifischen Banden im Gel sind für die nachfolgende Sequenzierreaktion nicht geeignet.

2.2.5.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Sequenzierreaktion ist eine sorgfältige Aufreinigung der PCR-Produkte notwendig. Ungebundene Nukleotide und Primerreste können die Sequenzierung beeinträchtigen. Des Weiteren kann die Aktivität der DNA-Polymerase die Qualität der Amplifikate, welche Ausgangsprodukte für die Sequenzierung sind, beeinflussen.

Analog zu der Aufreinigung der Multiplex-Amplifikate zur Bestimmung der 32 Haplogruppen-Polymorphismen bzw. 37 potentiell pathogenen Mutationen (Abschnitt 2.2.4.4) wurden SAP und EXO I verwendet.

2.2.5.5 Sequenzierreaktion

Die Analyse der Basenabfolge der mitochondrialen DNA-Abschnitte erfolgte nach der Kettenabbruch-Reaktion nach Sanger *et al.* 1977. Die Bedingungen unter denen die Sequenzierreaktion abläuft und die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 17: Reaktionsansatz und Sequenzierbedingungen

Reagenzien	Menge (in μ l)	Sequenzierreaktion	
BigDye	1,25	96°C - 1 min	
Sequenzier-Primer (0,4 pmol)	0,5	Denaturierung	96°C - 10 s
HPLC-Wasser	6,5	Annealing	50°C - 5 s
PCR-Produkt	1,0	Elongation	60°C - 4 min
Reaktionsansatz gesamt	9,25	4°C - ∞	

Mit den Primern der Singleplex-PCR werden die mittels Denaturierung gespaltenen DNA-Abschnitte durch die Polymerase gezielt neusynthetisiert (Abbildung 19). Die Wahl des Primers (*forward*- oder *reverse*-Primer) bestimmt den Startpunkt der Neusynthese. Es handelt sich hier um eine lineare Amplifikation, da lediglich ein Primer verwendet wird. Der Sequenzieransatz enthält neben den vier erforderlichen dNTPs zusätzlich ddNTPs, welche mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Wie bei der SNaPshot-

Technik können diese ddNTPs aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppen keine Bindung mit der 5'-Phosphatgruppe eines zweiten Nukleotids eingehen. Die Verlängerung des neusynthetisierten Stranges durch die DNA-Polymerase wird an dieser Stelle abgebrochen. Es resultieren unterschiedlich lange DNA-Amplikone, welche sich aufgrund des Fluoreszenzfarbstoffes des komplementär angelagerten ddNTPs unterscheiden. [Applied Biosystems. VariantSeqr™ and mitoSeqr™ Resequencing Systems. *Protocol*. 2006; Applied Biosystems. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. *Protocol*. 2010; Butler 2012, 405-456].

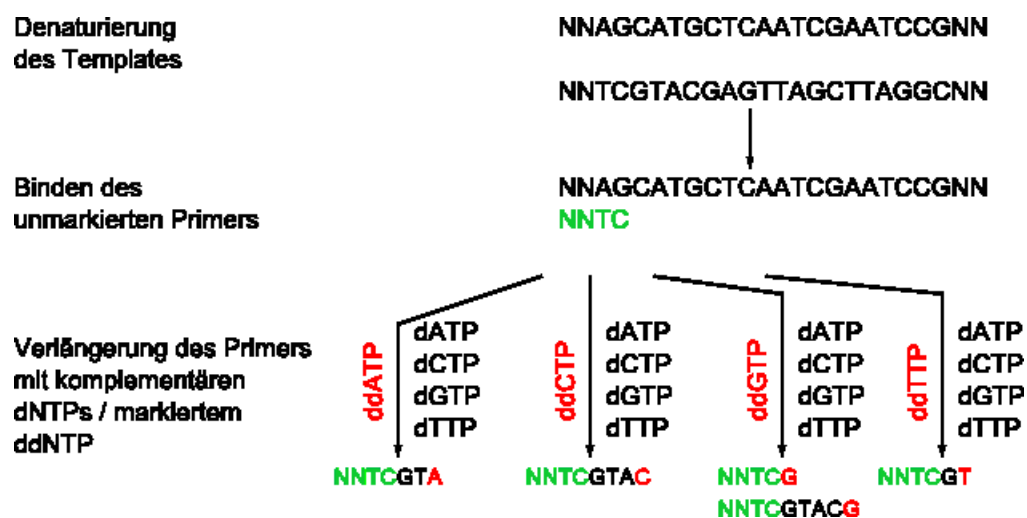


Abbildung 19: Sequenzierreaktion

2.2.5.6 Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Überschüssige Dye Terminatoren, ungebundene dNTPs/fluoreszenzmarkierte ddNTPs, Puffer und ungebundene Primer wurden mittels DTR-Gelfiltrationssäulen (*Dye Terminator Removal*) des Reinigungs-Kits „Performa® DTR Gel Filtration Cartridges“ der Firma EdgeBio entfernt.

Die Säulen werden direkt vor dem Gebrauch zwei Minuten bei 750 g zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Sequenzierprodukt wird auf die Mitte der Säule pipettiert und erneut zentrifugiert (2 min, 750 g). Unerwünschte Substanzen gelangen nicht durch die Gelmatrix, während die Sequenzierprodukte das Gel passieren und im Filtrat vorliegen [EdgeBio. Performa® DTR Gel Filtration Cartridges. *User Manual*. 2012; Stewart *et al* 2003].

2.2.5.7 Sequenzanalyse mittels ABI PRISM 310

Die Auftrennung und Detektion der fluoreszenzmarkierten Sequenzierprodukte erfolgte mittels Kapillargelelektrophorese.

Es wird das Modul „P4 Rapid Seq (1ml) E“ (Injektions-Zeit: 30 s; Injektions-Spannung: 1.0 kV; Lauf-Spannung: 15.0 kV; Lauf-Temperatur: 50°C, Lauf-Zeit: 20 min) ausgewählt. Die Sequenzierprodukte werden entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und die jeweilige Fluoreszenz detektiert. Die Auswertung der Rohdaten und die Darstellung der Ergebnisse erfolgt mittels „Sequencing Analysis Software“. Die Basen-Abfolge der Sequenzierprodukte wird bestimmt und die Ergebnisse als Elektropherogramm dargestellt. Unter Verwendung der „Sequence Navigator Software“ werden die Daten mit einer bekannten Referenzsequenz abgeglichen, und die festgestellten Abweichungen angezeigt [Applied Biosystems. ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer. *User Guide*. 2010].

2.2.6 Biostatistik

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse der beiden *Multiplex-Minisequencing*-Analyseverfahren wurde der Chi²-Test verwendet.

In einem Stichprobenumfang n wird geprüft, ob zwei Merkmale unabhängig voneinander auftreten (Nullhypothese) oder ob diese in Beziehung zueinander stehen bzw. voneinander abhängig sind.

In einer Vierfeldertafel werden die Häufigkeiten, d. h. die Probenanzahl, für die die Merkmale zutreffen, zusammengestellt:

Tabelle 18. Vierfeldertafel Chi²-Test

	Merkmal A	Merkmal A*	Summe
Merkmal B	a	b	a + b
Merkmal B*	c	d	c + d
Summe	a + c	b + d	a + b + c + d

Unter Verwendung der folgenden Formel wird aus den Häufigkeiten der Chi²-Wert (χ^2) berechnet:

$$\chi^2 = \frac{n \times (ad - bc)^2}{(a + b)(a + c)(c + d)(b + d)}$$

Bei Annahme der Nullhypothese (die Merkmale treten unabhängig voneinander auf) wäre $\chi^2 = 0$ bzw. χ^2 befindet sich in einem Intervall, welches durch das Signifikanzniveau bestimmt wird. Für das in dieser Arbeit verwendete Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ liegt das Intervall zwischen 0 und 3,841.

Die beiden Merkmale sind voneinander abhängig (statistisch signifikant), wenn $\chi^2 > 3,841$ ist [criticalcare.at].

3. Ergebnisse

3.1 Probenbearbeitung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten zunächst Untersuchungen bezüglich der DNA-Menge und -Qualität des vorliegenden Probenmaterials.

Bei allen Vorversuchen wurden die vier FFPE-Gewebearten Lunge, Herz, Diaphragma und Leber parallel untersucht (je Gewebeprobe drei Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 0,3 µm).

Die verschiedenen Entparaffinierungs-, Extraktions- und Aufreinigungsmethoden wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder *Real-Time* PCR verglichen. Hinsichtlich der *Multiplex-Minisequencing*-Reaktion wurden die Proben mit dem im hiesigen Institut etablierten und in der Routine-Arbeit eingesetzten Verfahren zur Bestimmung 32 mitochondrialer Haplogruppen-Polymorphismen kapillargel-elektrophoretisch analysiert [Köhnemann *et al.* 2009].

3.1.1 Auswahl einer Entparaffinierungsmethode

Es wurden die vier FFPE-Gewebearten eines SIDS-Falles aus dem hiesigen Institut unter Verwendung von drei vorgestellten Methoden entparaffiniert und extrahiert.

An die Xylol-Entparaffinierung schloss sich die Extraktion mittels Chelex an. Der „BIOstic™ FFPE Tissue DNA Isolation Kit“ und der „Maxwell® 16 FFPE Plus DNA Purification Kit“ verbinden die Entparaffinierung und die DNA-Extraktion.

Kriterien für die Auswahl der Entparaffinierungsmethode waren das Vorhandensein typischer Bandenmuster im Polyacrylamid-Gel und das Erstellen eines Vollprofils bei der *Multiplex-Minisequencing*-Analyse zur Bestimmung der mitochondrialen Haplogruppe.

Konnten mittels *Multiplex-Minisequencing*-Verfahren unter Verwendung des Assays zur Bestimmung der mitochondrialen Haplogruppe mindestens 30 Signale im Elektropherogramm dargestellt werden, wurde dies als Vollprofil definiert. Wurden weniger als 30 Signale detektiert und die Haplogruppe konnte dargestellt werden, wurde dies als Teilprofil benannt. Konnte, aufgrund fehlender Signale im

Elektropherogramm, keine mitochondriale Haplogruppe dargestellt werden, wurde dies im Folgenden als „nicht auswertbar“ bezeichnet [Köhnemann *et al.* 2011].

Die Ergebnisse der Polyacrylamid-Gelelektrophorese sind in der folgenden Abbildung dargestellt:

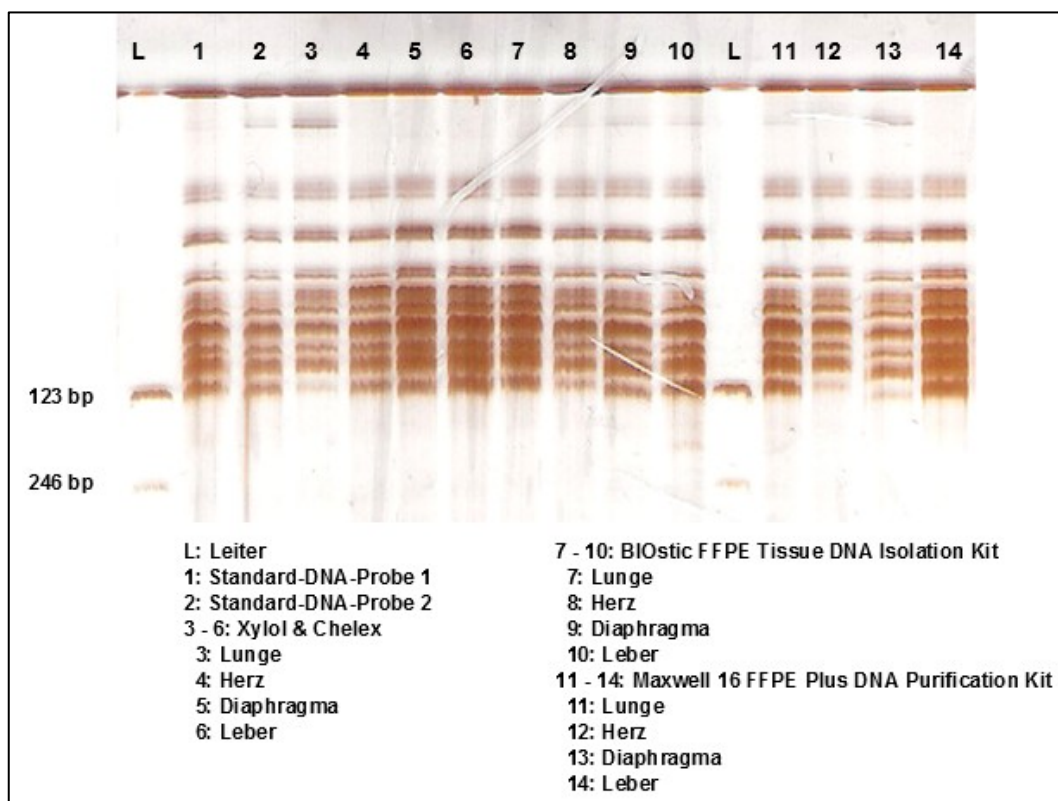


Abbildung 20: Polyacrylamid-Gel - Auswahl einer Entparaffinierungsmethode

Im Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) stellten sich die verschiedenen Gewebeproben der drei Entparaffinierungsmethoden vergleichbar zu zwei Standard-DNA-Proben dar. Die Amplifikate mit den Längen 157 bp (A2706G, C2772T) und 196 bp (G1719A, A1811G) ließen sich im Gel nicht nachweisen.

Nach der SNaPshot-Reaktion durch die Kapillargelelektrophorese ließen sich im Elektropherogramm jeder Gewebeprobe alle Merkmale der Haplogruppe H* in einem Vollprofil darstellen, wobei die Peakhöhen der genannten Polymorphismen der im Polyacrylamid-Gel fehlenden langen Fragmente deutlich geringer waren.

Da die Ergebnisse der Kapillargelelektrophorese nach der *Multiplex-Minisequencing*-Reaktion bei allen drei Verfahren identisch waren, war jede dieser Entparaffinierungsverfahren für weitere Analysen denkbar. Für die Wahl der

zukünftig anzuwendenden Entparaffinierungsmethode wurde demnach die kostengünstige Entparaffinierung mittels Xylol gewählt.

3.1.2 Auswahl einer Extraktionsmethode

Für die Extraktion der vier mittels Xylol entparaffinierten Gewebearten eines SIDS-Falles aus dem hiesigen Institut wurden vier der vorgestellten Extraktionsmethoden getestet.

Die Extraktion mittels Phenol-Chloroform, „Nucleo Spin[®] Tissue Kit“ und „QIAmp[®] DNA Mini Kit“ wurde in die Untersuchungen einbezogen. Da bei der Extraktion mittels Chelex PCR-Inhibitoren im Extrakt verbleiben, wurden die Gewebeproben in einem Doppelansatz mit Chelex extrahiert. Im Anschluss wurden die Gewebeproben eines Ansatzes mit den „MICROCON[®] Centrifugal Filter Devices“ und dem „QIAquick PCR Purification Kit“ aufgereinigt. Unter Berücksichtigung beider Chelex-Ansätze werden im Folgenden die Ergebnisse von fünf Verfahren vorgestellt.

Kriterien für die Auswahl der Extraktionsmethode waren die DNA-Ausbeute und das Erstellen eines Vollprofils bei der *Multiplex-Minisequencing*-Analyse.

Die Ergebnisse der nDNA-Quantifizierung sind in der folgenden Tabelle und dem dazugehörigen Diagramm (Abbildung 21) dargestellt:

Tabelle 19: Vorversuche Extraktion - nDNA-Ausbeute (ng)

	Chelex	Chelex, Microcon, Qiagen	Phenol- Chloroform	Macherey & Nagel	QIAmp® DNA Mini Kit
Elutionsvolumen	300 µl	30 µl	30 µl	20 µl	50 µl
Lunge	2.307 *	5.848 *	19	244 *	2.401 *
Herz	345 *	3.786 *	2	141 *	1.437 *
Diaphragma	114 *	670 *	2	10	376 *
Leber	771 *	8.738 *	22	534 *	1.881 *

*: IPC > 30

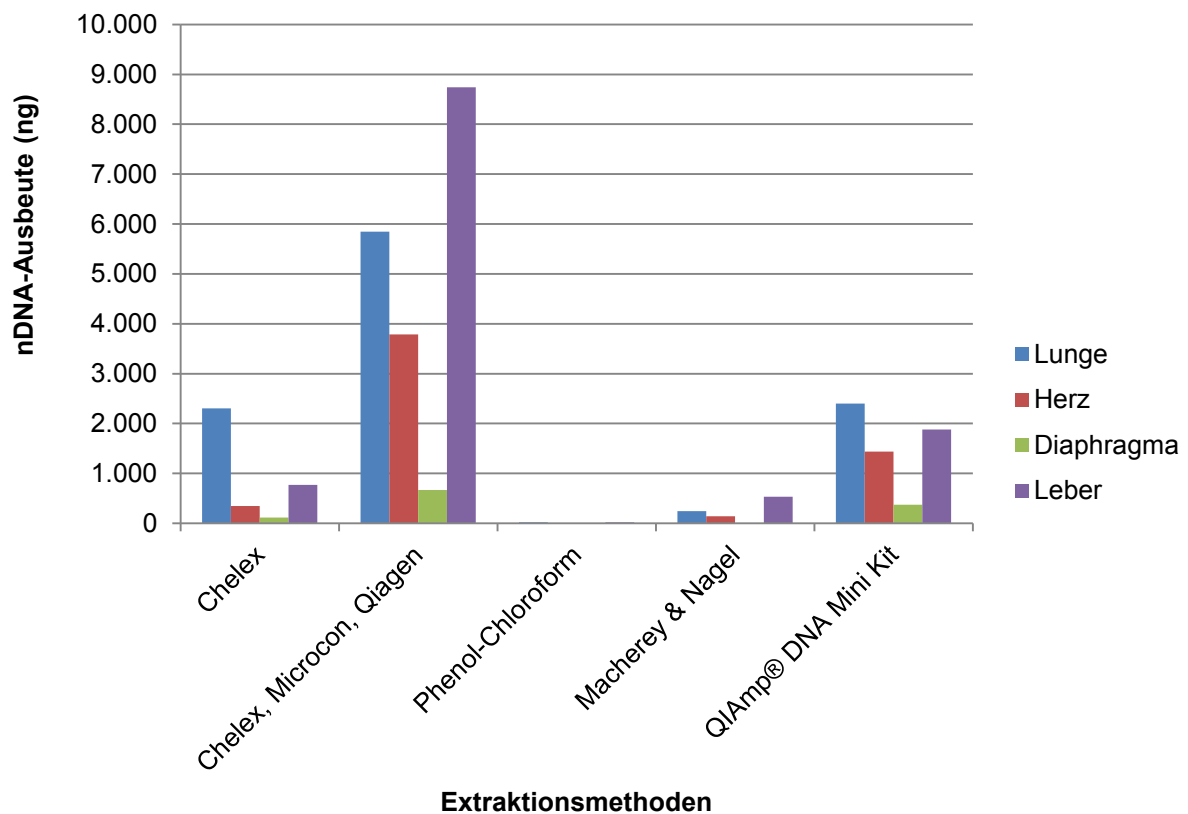


Abbildung 21: Vorversuche Extraktion - nDNA-Ausbeute (ng)

In der nachfolgenden Tabelle und dem dazugehörigen Diagramm (Abbildung 22) werden die Ergebnisse der mtDNA-Quantifizierung und die der *Multiplex-Minisequencing*-Analyse zusammengefasst:

Tabelle 20: Vorversuche Extraktion - mtDNA-Ausbeute (mtDNA-Kopienzahl)

	Chelex	Chelex, Microcon, Qiagen	Phenol- Chloroform	Macherey & Nagel	QIAmp® DNA Mini Kit
Elutionsvolumen	300 µl	30 µl	30 µl	20 µl	50 µl
Lunge	8,5x10 ⁸ VP	1x10 ⁸ VP	2,8x10 ⁷ VP	1,8x10 ⁸ VP	5,3x10 ⁸ VP
Herz	8,9x10 ⁸ VP	3,8x10 ⁸ VP	3,6x10 ⁶ VP	1x10 ⁹ VP	9,1x10 ⁸ VP
Diaphragma	9,3x10 ⁵ TP	n. d. n.a.	2,5x10 ⁴ TP	3,1x10 ⁷ TP	1,4x10 ⁶ TP
Leber	6,0x10 ⁴ VP	4,4x10 ³ n.a.	1,2x10 ⁴ VP	4,4x10 ⁸ VP	1x10 ⁹ VP

VP: Vollprofil; TP: Teilprofil; n.a.: nicht auswertbar; n. d.: nicht detektierbar

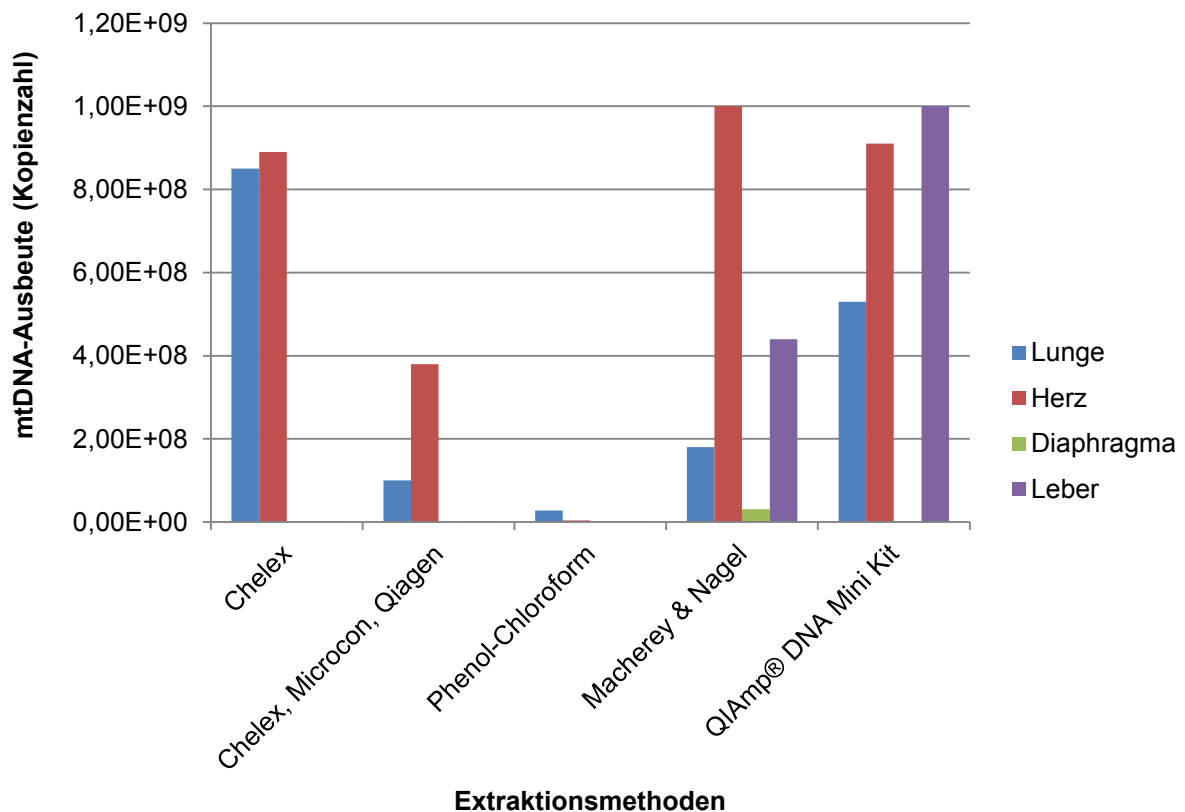


Abbildung 22: Vorversuche Extraktion - mtDNA-Ausbeute (mtDNA-Kopienzahl)

Die nDNA-Ausbeute bei allen Gewebeproben der Phenol-Chloroform-Extraktion war am niedrigsten. Die Gewebeproben der Chelex-Extraktion mit anschließenden Aufreinigungsschritten wiesen die höchste nDNA-Ausbeute auf. Eine Korrelation zwischen den nDNA- und mtDNA-Ausbeuten wurde nicht festgestellt. Die mtDNA-Ausbeute war hundertfach bis millionenfach höher als die der nDNA, mit Ausnahme der Gewebeprobe des Diaphragmas bei der Chelex-Extraktion mit Aufreinigung. Hier war die mtDNA-Ausbeute nicht messbar, während die nDNA-Ausbeute dieser Probe im Vergleich zu den anderen Extraktions-Verfahren am höchsten war.

Eine gewebespezifische Konzentrationsverteilung konnte nicht festgestellt werden. Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion wurden in keiner der vier Gewebeproben PCR-Inhibitoren nachgewiesen (IPC < 30; Tabelle 19). Trotz PCR-Inhibitoren in den übrigen Extrakten waren die Ergebnisse der *Multiplex-Minisequencing*-Analysen bis auf das Verfahren der aufgereinigten Chelex-Extrakte identisch (Tabelle 20). Die Diaphragma-Proben wiesen lediglich ein Teilprofil auf. Aus der mtDNA der übrigen drei Gewebearten wurde jeweils die Haplogruppe H* als Vollprofil dargestellt. PCR-Inhibitoren scheinen keinen Einfluss auf den SNP-Assay zur Bestimmung der mitochondrialen Haplogruppe (Haplogruppen-Assay) zu haben.

Untersuchungen zu der Frage, ob die Gewebearten unter Verwendung verschiedener Extraktionsverfahren eine ähnliche Verteilung der DNA-Ausbeuten zeigen, ergaben den geringsten nDNA-Gehalt bei der Phenol-Chloroform-Extraktion. Die Ergebnisse der *Multiplex-Minisequencing*-Analyse waren identisch zu denen der anderen vier Extraktionsmethoden. Bei den Gewebeproben Lunge, Herz und Leber ließ sich die Haplogruppe als Vollprofil darstellen. Die Gewebeprobe des Diaphragmas wies bei allen vier Extraktionsmethoden ein Teilprofil auf, die Signale der Polymorphismen der über 150 bp langen Fragmente fehlten im Elektropherogramm. Die *Multiplex-Minisequencing*-Ergebnisse der aufgereinigten Chelex-Extrakte fielen aufgrund der zu geringen mtDNA-Konzentrationen in den Gewebeproben Diaphragma und Leber negativ aus. Aus diesem Grund kam dieses Verfahren für nachfolgende Analysen nicht in Frage.

Unter Berücksichtigung der vorgestellten Ergebnisse wurden alle Analysen der FFPE-Gewebeproben mit Xylol entparaffinierten und Chelex extrahierten DNA-Proben durchgeführt.

Unter Berücksichtigung der DNA-Qualität wurden die DNA-Proben für die Sequenzierung zur Überprüfung ausgewählter *Multiplex-Minisequencing*-Ergebnisse mittels Phenol-Chloroform und die DNA-Proben für die Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms mit dem Maxwell 16 Instrument („Maxwell® 16 FFPE Plus DNA Purification Kit“) extrahiert.

3.2 Haplogruppen-Assay

Nach Abschluss der Vorversuche zur Auswahl geeigneter Extraktionsmethoden für die jeweiligen Folgeanalysen wurde von den 195 SIDS-Fällen aus der GeSID-Studie und den 151 Proben der Kontrollgruppe jeweils die mitochondriale Haplogruppe bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle A 13 zusammengefasst.

Der im hiesigen Institut etablierte und in der Routine-Arbeit angewandte Haplogruppen-Assay nach Köhnemann *et al.* 2009 wurde eingesetzt. Es wurden 27 Sequenzabschnitte, welche die 32 Haplogruppen-Polymorphismen enthalten und zwischen 51 und 196 bp lang sind, parallel amplifiziert und die Polymorphismen mittels SNaPshot-Reaktion analysiert.

In Abbildung 23 ist ein Elektropherogramm der 32 mitochondrialen Haplogruppen-Polymorphismen (Vollprofil) dargestellt. Zur fehlerfreien Übertragung der Befunde diente ein neu entwickeltes Excel-basiertes Auswerte-Tool.

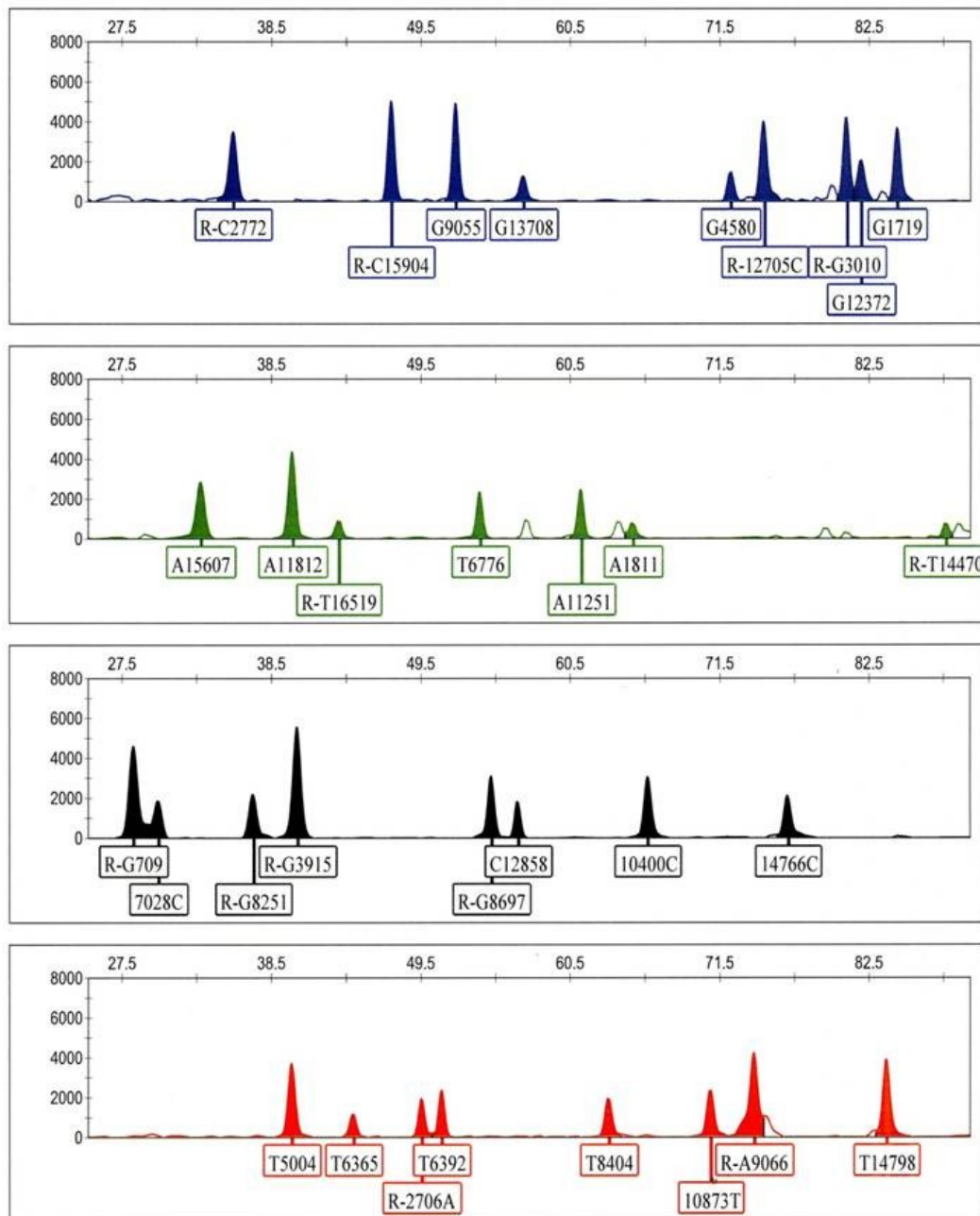


Abbildung 23: Elektropherogramm - 32 mt-Haplogruppen-Polymorphismen

3.2.1 Sensitivität des Haplogruppen-Assays

Um die Sensitivität des SNP-Assays zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe von ca. 1×10^8 bis 775 mtDNA-Kopien/ μ l in zehn Stufen aus einer Standard-Probe des „Human Quantifier Kits“ der Firma Applied Biosystems erstellt. Die Verdünnungen wurden mit zwei Mikroliter in zwei PCR-Ansätzen amplifiziert. Bereits im PAA-Gel war erkennbar, dass bei weniger als ca. 10^4 mtDNA-Kopien/ μ l

die Fragmente größer 150 bp ausfallen. Die Ergebnisse wurden nach der SNaPshot-Reaktion durch die Kapillargelelektrophorese bestätigt. Die Signale der Polymorphismen der über 150 bp langen Fragmente fehlten im Elektropherogramm.

Die anhand der Verdünnungsreihe erhaltenen Erkenntnisse konnten die *Multiplex-Minisequencing*-Ergebnisse der Vorversuche zu den Extraktionsverfahren (Tabelle 20) nur teilweise bestätigen. Die mittels Chelex extrahierte Leber-Probe mit geringer mtDNA-Ausbeute (6×10^4 mtDNA-Kopien/ μ l) zeigte im Elektropherogramm ein Vollprofil, während die höher konzentrierte Diaphragma-Probe ($9,3 \times 10^5$ mtDNA-Kopien/ μ l) lediglich ein Teilprofil mit Fehlen der langen Fragmente aufwies. Demnach ist neben der Konzentration an mitochondrialer DNA, der Grad an Degradierung der Gewebeprobe ein limitierender Faktor bei der DNA-Analyse.

3.2.2 Qualität des Probenmaterials

Zur Überprüfung der DNA-Qualität wurden die vier Gewebeproben von zwei GeSID-Fällen (MS001S und MS009S) mit dem Haplogruppen-Assay analysiert. Für MS001S konnte bei allen Gewebeproben ein volles Haplogruppen-Profil dargestellt werden. Unter den gleichen Voraussetzungen (ähnliche DNA-Konzentrationen, parallele Entparaffinierung und Extraktion, gleicher PCR Master Mix) wies MS009S in den vier Gewebeproben lediglich ein Teilprofil auf, es fehlten zwei Fragmente mit einer Länge von 157 bzw. 196 bp. Diese wurden im Anschluss in einer Duplex-PCR amplifiziert. In allen vier Gewebeproben des Falles MS009S konnten sie nicht dargestellt werden. In der Wiederholung wurden die Primermengen erhöht (10 pmol/ μ l). Alle Polymorphismen waren darstellbar. Es folgte eine Multiplex-PCR, die alle Fragment-Primer je 0,4 pmol enthielt, wobei die Primermengen für die langen Fragmente auf 10 pmol erhöht wurden. Es war erneut nur ein Teilprofil darstellbar. Das Vereinigen der Amplifikate der Duplex-PCR und einer 25-Fragment-Multiplex-PCR nach getrennten Reaktionen lieferte ebenfalls ein Teilprofil, sodass das Fehlen der Peaks durch eine gestörte SNaPshot-Reaktion begründet wird.

Um einen Einfluss möglicher PCR-Inhibitoren zu untersuchen, wurde die DNA aus den Gewebeproben beider Fälle mit den Verfahren der Vorversuche extrahiert.

Die Ergebnisse der Quantifizierungen und des Haplogruppen-Assays sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 21: Haplogruppen-Assay - Qualität des Probenmaterials

Extraktion	DNA-Probe	FFPE-Gewebe-proben	nDNA-Ausbeute (ng)	IPC	mtDNA-Ausbeute (Kopienzahl)	Mini-sequencing
Chelex	MS001S	Lunge	786	32,28	n. d.	VP
		Herz	24	n. d.	n. d.	VP
		Diaphragma	267	n. d.	n. d.	VP
		Leber	2.232	35,41	n. d.	VP
	MS009S	Lunge	426	n. d.	n. d.	TP
		Herz	6	n. d.	n. d.	TP
		Diaphragma	192	n. d.	n. d.	TP
		Leber	762	31,98	n. d.	TP
Chelex, Microcon, Qiagen	MS001S	Lunge	141	37,23	n. d.	VP
		Herz	347	38,68	n. d.	VP
		Diaphragma	146	33,36	n. d.	VP
		Leber	177	33,32	n. d.	VP
	MS009S	Lunge	90	n. d.	n. d.	TP
		Herz	93	n. d.	n. d.	TP
		Diaphragma	45	n. d.	n. d.	TP
		Leber	60	35,73	n. d.	TP
QIAmp® DNA Mini Kit	MS001S	Lunge	354	39,17	n. d.	VP
		Herz	1.339	n. d.	n. d.	VP
		Diaphragma	515	n. d.	n. d.	VP
		Leber	750	n. d.	n. d.	VP
	MS009S	Lunge	126	n. d.	n. d.	TP
		Herz	241	n. d.	n. d.	TP
		Diaphragma	86	n. d.	n. d.	TP
		Leber	187	n. d.	n. d.	TP
Phenol-Chloroform	MS001S	Lunge	2	27,50	$2,2 \times 10^6$	VP
		Herz	3	27,60	$1,2 \times 10^8$	VP
		Diaphragma	4	28,09	$1,0 \times 10^8$	VP
		Leber	3	27,63	$5,8 \times 10^6$	VP
	MS009S	Lunge	14	28,87	$9,6 \times 10^2$	TP
		Herz	7	27,83	$9,3 \times 10^5$	TP
		Diaphragma	4	27,96	$1,4 \times 10^5$	TP
		Leber	8	28,23	$4,9 \times 10^4$	TP

VP: Vollprofil; TP: Teilprofil; n. d.: nicht detektierbar (starke Inhibition)

Die Ergebnisse der Extraktions-Vorversuche bestätigten sich. Bis auf die Extraktion mittels Phenol-Chloroform wiesen alle Verfahren starke Inhibition (IPC > 30, bzw. nicht detektierbar) und deutlich höhere Ausbeuten an nukleärer DNA auf. Die mtDNA-Ausbeute konnte nur für die Phenol-Chloroform-Extraktion ermittelt werden, da bei den übrigen Verfahren entweder die mtDNA-

Konzentration zu hoch oder die Inhibition zu stark waren. Die Ergebnisse der *Multiplex-Minisequencing*-Reaktion waren bei diesen Extraktionsverfahren und den Vorversuchen identisch. Die Proben des Falles MS001S zeigten bei allen Extraktions-Verfahren ein Vollprofil und die des Falles MS009S ein Teilprofil.

Um die Ergebnisqualität zu verbessern, wurden die Phenol-Chloroform-Extrakte des Falles MS009S mit der vierfachen DNA-Menge amplifiziert. Die langen Fragmente konnten auch dann nicht nachgewiesen werden, es traten Artefakte auf.

3.2.3 Analyse der DNA-Proben nach Abschluss der Voruntersuchungen

Die Degradierung der DNA in Gewebeproben wird durch die Fixierungszeit verstärkt. Die Vorversuche zeigten, dass die Qualität und die Konzentration der DNA aus FFPE-Gewebeproben sehr unterschiedlich waren. Aus diesem Grund wurden die Analysen, soweit wie möglich, mit gefrorenem Material von Lunge, Herz und Medulla oblongata durchgeführt. Leber und Diaphragma lagen in Form von FFPE-Blöcken vor. Hier wurden häufig Teilprofile erstellt. Die Anzahl der bei den Teilprofilen fehlenden Fragmente war sehr unterschiedlich. Bei wenigen FFPE-Proben des Diaphragmas konnte ein Vollprofil dargestellt werden.

Aus den gefrorenen Gewebeproben konnte immer ein Vollprofil abgeleitet werden, sodass die Haplogruppe zu jedem SIDS-Fall aus mindestens einer Gewebeprobe jedes Keimblattes bestätigt wurde.

Aus den 151 Proben der Kontrollgruppe wurden Vollprofile bestimmt.

In dem nachfolgenden Diagramm (dazugehörige Tabelle A 11) wird die Verteilung der Haplogruppen zusammengefasst:

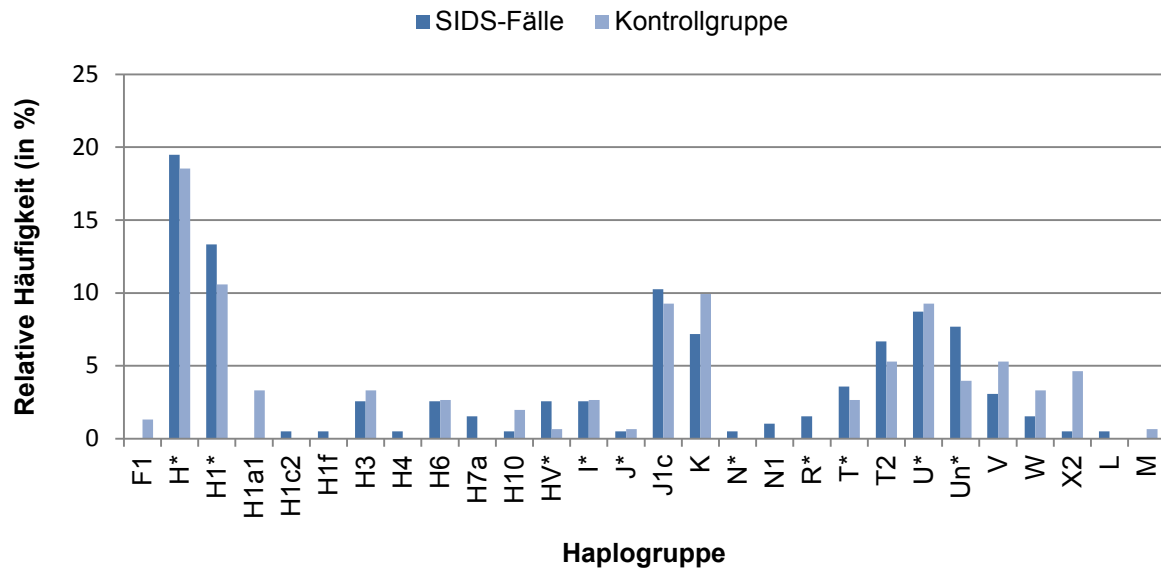


Abbildung 24: mitochondriale Haplogruppen-Verteilung

Die Haplogruppen H* (ca. 40 %) und U* (ca. 20 %) wurden mit ihren Untergruppen am häufigsten bestimmt. Die charakteristische Haplogruppen-Verteilung der europäischen Population wurde damit wiedergespiegelt [European Prehistory, Anthropology & Genetics].

Die Haplogruppen-Verteilung der SIDS-Fälle wurde mit der Haplogruppen-Verteilung der Kontrollgruppe verglichen. Unter Verwendung des Chi²-Tests ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Haplogruppen-Verteilung der SIDS-Fälle (dunkelblau) und der Kontrollgruppe (hellblau) feststellen ($\alpha = 5\%$, $\chi^2 > 3,841$). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer speziellen Haplogruppe (Risiko-Haplogruppe) und dem Plötzlichen Säuglingstod konnte nicht festgestellt werden.

3.3 Assay zur Analyse potentiell pathogener Mutationen

DNA-Proben von 195 SIDS-Fällen und 151 Proben der Kontrollgruppe wurden auf 37 Mutationen untersucht, welche mit Mitochondriopathien bzw. dem Plötzlichen Säuglingstod assoziiert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle A 13 zusammengefasst. Mutationen sind rot markiert. Blau hervorgehoben sind im Elektropherogramm fehlende Signale.

Es ist gelungen, ein schnelles, kostengünstiges *Multiplex-Minisequencing*-Verfahren zu entwickeln, mit dem potentiell pathogene Mutationen untersucht werden können. Es wurden 19 Sequenzabschnitte, welche die potentiell pathogenen Mutationen enthalten, parallel amplifiziert und die Mutationen mittels SNaPshot-Reaktion analysiert.

In Abbildung 25 ist ein Elektropherogramm des Assays zur Analyse 37 potentiell pathogener mitochondrialer Mutationen dargestellt. Zur fehlerfreien Übertragung der Befunde diente ein neu entwickeltes Excel-basiertes Auswerte-Tool.

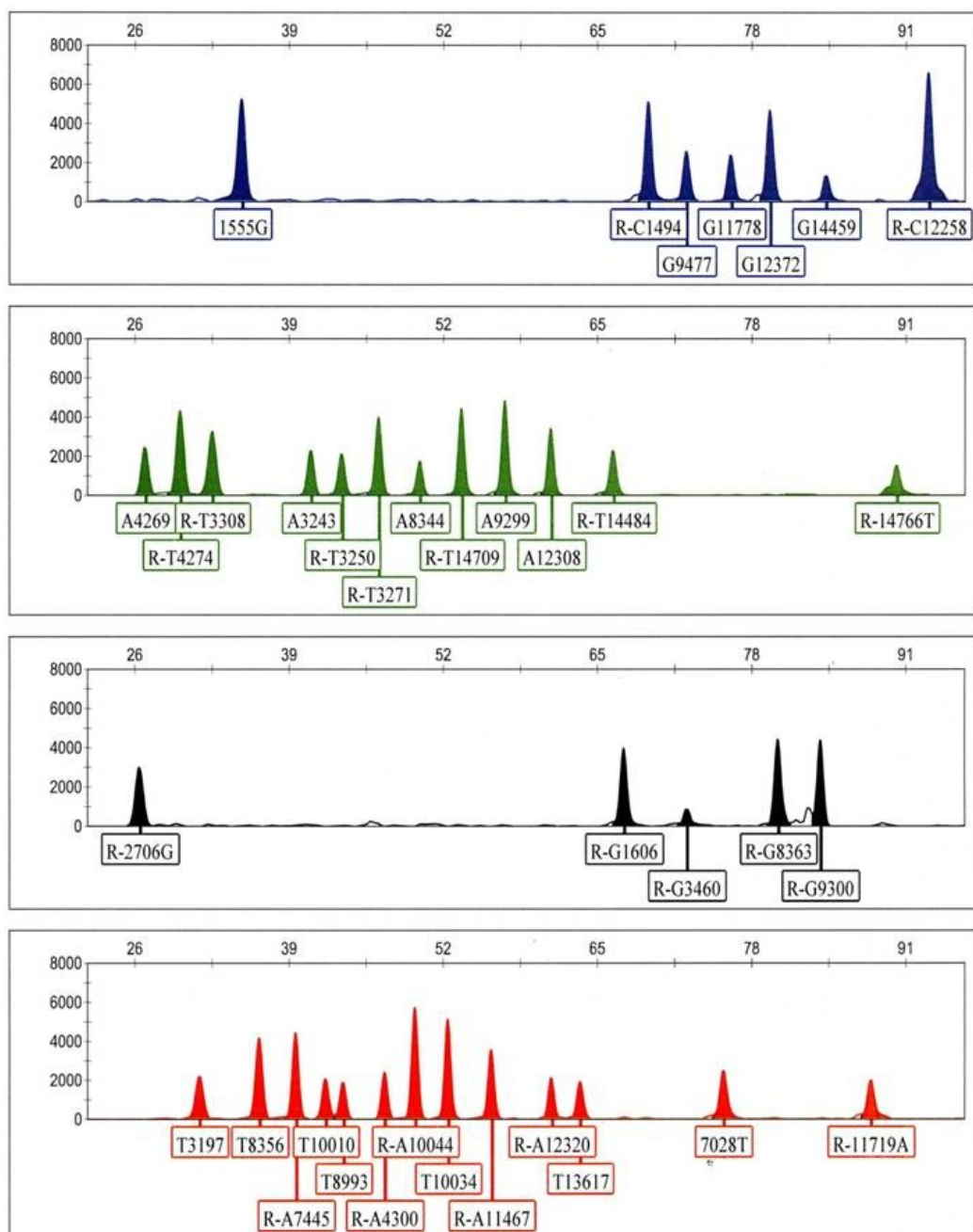


Abbildung 25: Elektropherogramm - Analyse 37 potentiell pathogener Mutationen

3.3.1 Primer-Optimierung

Die mittels Software entworfenen und auf unspezifische Bindungen überprüften Multiplex-Primer dienen der Amplifikation von 19 zwischen 89 und 292 bp langen Sequenzabschnitten. Die Primer sind zwischen 17 und 30 bp lang.

Zu Beginn wurde unter Verwendung einer Standard-Probe der Firma Applied Biosystems (200 pg/ μ l) jedes Fragment mit einer Primer-Konzentration von 4 pmol/ μ l in einer Singleplex-PCR amplifiziert und die Länge mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft.

Die SBE-Primer sind zwischen 17 und 88 bp lang. Sie wurden vorerst unter Verwendung kommerzieller DNA-Proben separat (je 0,06 pmol) mittels SNaPshot-Reaktion und Kapillargelelektrophorese auf ihre Länge und den gebundenen Fluoreszenzfarbstoff getestet. Durch die ausreichenden Fragmentgrößenunterschiede und den vier verschiedenen emittierten Signalfarben wurde eine eindeutige Zuordnung möglich. In den Elektropherogrammen der 37 Einzelanalysen ließen sich die erwarteten, entsprechend korrigierten Fragmente erkennen. Artefakte, die sich unspezifisch als Peaks in verschiedenen Fragmentlängen darstellten, wurden durch Modifikationen des entsprechenden SBE-Primers entfernt. Hierzu wurde entweder die Länge des SBE-Primers neu definiert oder der SBE-Primer für den Komplementärstrang neu entwickelt. Betroffen waren sechs SBE-Primer, darunter u. a. die Nukleotidvarianten A4300T und C12258T.

Zur Etablierung des Assays zur Analyse potentiell pathogener Mutationen wurden neben einer Leerkontrolle erneut zwei unterschiedliche Standard-DNA-Proben eingesetzt. Zu Beginn wurden die SBE-Primer eines Farbkanals gemeinsam analysiert. Bei der Leerkontrolle wurden keine Signale im Elektropherogramm sichtbar, bei den beiden Standard-Proben die erwarteten. Die SNaPshot-Reaktion mit allen 37 SBE-Primern wurde erstellt. Erneut wurden keine Signale in der Leerkontrolle nachgewiesen, Kontaminationen und Artefakte konnten somit ausgeschlossen werden. Die Peaks waren bei den Standardproben für die verschiedenen Wildtyp-Allele sehr unterschiedlich hoch (*Imbalance*); gewünscht war eine Höhe zwischen 1.000 und 3.000 RFU. Hierzu wurden die SBE-Primerkonzentrationen entsprechend erhöht bzw. verringert. Artefakte wurden nicht nachgewiesen.

Alternativ zum selbst hergestellten Reaktionsansatz wurde für die Multiplex-PCR der „QIAGEN® Multiplex PCR Kit“ nach Hersteller-Angaben getestet. Die Anwendung des QIAGEN Kits zeigte keine Vorteile gegenüber dem selbst hergestellten Reaktionsansatz. Aus Kostengründen wurde der selbst hergestellte Reaktionsansatz verwendet.

3.3.2 Sensitivität des Assays zur Analyse potentiell pathogener Mutationen

Um die Sensitivität des Assays zu ermitteln, wurde die Verdünnungsreihe des Haplogruppen-Assays verwendet (ca. 1×10^8 bis ca. 775 mtDNA-Kopien/ μ l). Die 19 Sequenzabschnitte wurden mit zwei Mikroliter der Verdünnungen in zwei PCR-Ansätzen amplifiziert. Bereits im PAA-Gel war erkennbar, dass bei den Konzentrationen unter ca. 1×10^3 mtDNA-Kopien/ μ l die mehr als 150 bp langen Fragmente ausfielen, es zeigte sich ein Teilprofil.

Im Unterschied zum Haplogruppen-Assay wurde ein Teilprofil bei diesem Assay zur Analyse potentiell pathogener Mutationen definiert, wenn bereits ein Signal im Elektropherogramm fehlte. Als Vollprofil wurden die Ergebnisse des *Multiplex-Minisequencing*-Verfahrens bezeichnet, bei denen alle 37 Signale im Elektropherogramm dargestellt wurden.

3.3.3 Qualität des Probenmaterials

Analog zur Etablierung des Haplogruppen-Assays wurden zwei GeSID-Fälle verwendet (HH0130S, HH0248S). Die vier verschiedenen FFPE-Gewebearten wurden mit Xylol entparaffiniert und sowohl mit Chelex als auch mit Phenol-Chloroform extrahiert. Die Ergebnisse der Quantifizierungen und des *Multiplex-Minisequencing*-Verfahrens sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 22: Analyse potentiell pathogener Mutationen - Qualität Probenmaterial

Extraktion	DNA-Probe	FFPE-Gewebe-probe	nDNA-Ausbeute (ng)	IPC	mtDNA-Ausbeute (Kopienzahl)	Mini-sequencing
Chelex	HH0130S	Lunge	4.044	34,90	n. d.	VP
		Herz	2.205	30,23	n. d.	VP
		Diaphragma	612	31,27	$5,2 \times 10^7$	VP
		Leber	1.914	32,41	n. d.	VP
	HH0248S	Lunge	1.527	32,51	n. d.	TP
		Herz	513	32,24	n. d.	TP
		Diaphragma	172	31,51	n. d.	TP
		Leber	1.617	31,77	n. d.	TP
Phenol-Chloroform	HH0130S	Lunge	6,5	27,24	$3,7 \times 10^6$	VP
		Herz	1,7	27,37	$2,5 \times 10^7$	VP
		Diaphragma	0,5	27,09	$9,0 \times 10^6$	VP
		Leber	5,3	27,63	$1,6 \times 10^7$	VP
	HH0248S	Lunge	6,5	27,06	$6,5 \times 10^6$	TP
		Herz	0,4	26,81	$1,4 \times 10^7$	TP
		Diaphragma	0,2	27,22	$8,5 \times 10^5$	TP
		Leber	8,8	27,24	$4,8 \times 10^6$	TP

VP: Vollprofil; TP: Teilprofil; n. d.: nicht detektierbar (starke Inhibition)

Die mit Chelex extrahierten Gewebeproben wiesen starke Inhibition auf (IPC > 30). Die Konzentrationen an nukleärer DNA waren etwa tausendfach höher als die der Phenol-Chloroform-Extrakte. Diese enthielten keine PCR-Inhibitoren. Von den Chelex-Extrakten konnte bis auf eine Gewebeprobe die Konzentration an mitochondrialer DNA nicht bestimmt werden. Grund dafür könnten eine gestörte *Real-Time* PCR durch die Inhibitoren der Chelex-Extrakte, oder zu hohe mtDNA-Konzentrationen gewesen sein.

Bei dem Fall HH0130S wurde bei allen Gewebeproben sowohl bei den Chelex- als auch bei den Phenol-Chloroform-Extrakten ein Vollprofil dargestellt. Unter den gleichen Voraussetzungen (ähnliche DNA-Konzentrationen, parallele Entparaffinierung und Extraktion, gleicher PCR Master Mix) wiesen die Gewebeproben des Falles HH0248S lediglich ein Teilprofil auf, die Signale der mehr als 150 bp langen Fragmente fielen aus.

3.3.4 Analyse der DNA-Proben nach Abschluss der Voruntersuchungen

Da bereits die Vorversuche zur Extraktion und zum Haplogruppen-Assay zeigten, dass die Qualität und die Konzentration der DNA aus FFPE-Gewebeproben sehr unterschiedlich waren, wurden die Analysen der potentiell pathogenen Mutationen soweit wie möglich mit gefrorenem Material von Lunge, Herz und Medulla oblongata durchgeführt. Leber und Diaphragma lagen in Form von FFPE-Blöcken vor. Sie wiesen Teilprofile auf, die zum Abgleich genutzt werden konnten. Bei den FFPE-Proben des Diaphragmas eines rechtsmedizinischen Institutes konnten neben allen Haplogruppen-Polymorphismen auch alle potentiell pathogenen Mutationen analysiert und entweder das Wildtyp- oder das mutierte Allel nachgewiesen werden. Der Umfang der bei den Teilprofilen fehlenden Fragmenten war sehr unterschiedlich.

Aus den gefrorenen Gewebeproben konnte immer ein Vollprofil abgeleitet werden, sodass die potentiell pathogenen Mutationen der meisten SIDS-Fälle aus mindestens einer Gewebeprobe jedes Keimblattes ermittelt wurden.

Bei den 151 DNA-Proben der Kontrollgruppe konnten alle 37 potentiell pathogenen mitochondrialen Mutationen unter Verwendung des *Multiplex-Minisequencing*-Verfahrens analysiert werden.

In dem nachfolgenden Diagramm (dazugehörige Tabelle A 12) werden die nachgewiesenen potentiell pathogenen Mutationen der SIDS-Fälle denen der Kontrollgruppe gegenübergestellt:

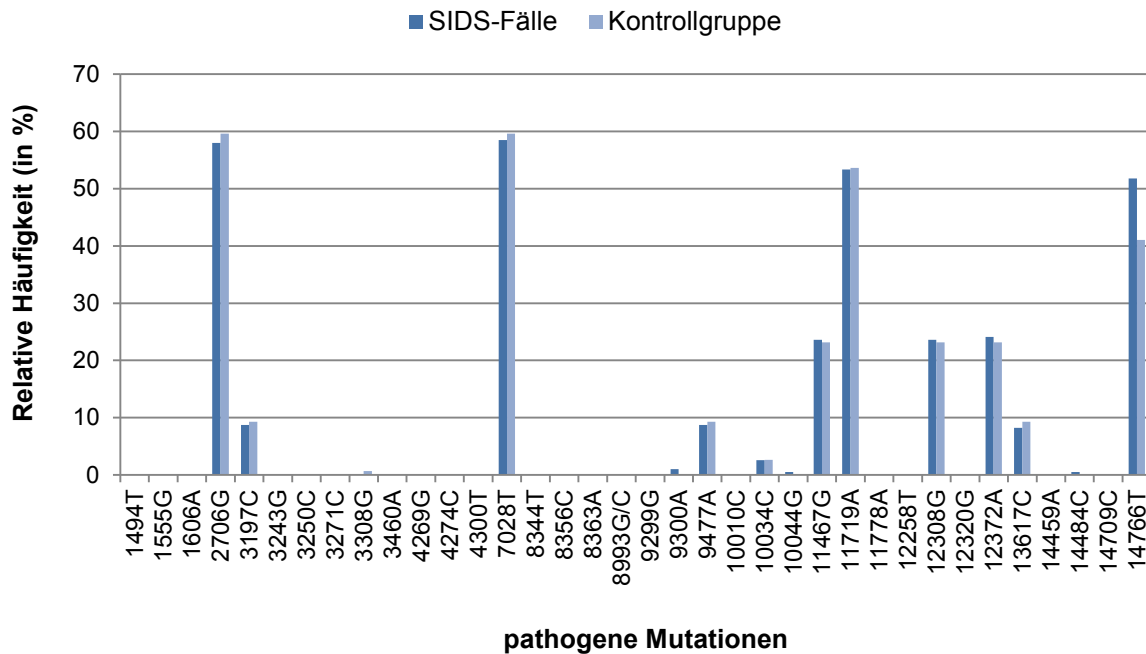


Abbildung 26: Verteilung potentiell pathogener mitochondrialer Mutationen

Die Verteilung der detektierten potentiell pathogenen Mutationen zwischen den SIDS-Fällen wurde mit der Verteilung der Kontrollgruppe verglichen. Unter Verwendung des χ^2 -Tests ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den SIDS-Fällen (dunkelblau) und der Kontrollgruppe (hellblau) feststellen ($\alpha = 5\%$, $\chi^2 > 3,841$).

Die 11 in Tabelle 23 aufgelisteten mutierten Allele wurden bei den SIDS- und Kontroll-Fällen gleichermaßen nachgewiesen. Es wurden spezifische Kombinationen an mutierten Allelen aufgedeckt, die in gleicher Art in mehreren Haplogruppen vorkamen, z. B. 2706G, 7028T, 11719A und 14766T in den Haplogruppen L, M*, N*, X2, W, N1, R*, J*, J1c, T*, T2, F1. Somit handelte es sich dabei um haplogruppenassoziierte Polymorphismen. Eine spezifische Kombination, der vier genannten mutierten Allele mit dem Allel 10034C, trat nur in der Haplogruppe I* auf. In der Haplogruppe H* mit ihren Untergruppen wurde keines der mutierten Allele nachgewiesen. Die in Tabelle 23 aufgeführten mutierten Allele können demnach mit den entsprechenden Haplogruppen assoziiert werden.

Tabelle 23: haplogruppenassoziierte Polymorphismen

Haplogruppen	haplogruppenassoziierte Polymorphismen										
	2706G	3197C	7028T	9477A	10034C	11467G	11719A	12308G	12372A	13617C	14766T
H*, H1a1, H1c2, H1f, H1*, H3, H4, H6, H7a, H10											
HV*, V	x		x								
L, M*, N*, X2, W, N1,R*,J*,J1c, T*, T2, F1	x		x				x				x
I*	x		x		x		x				x
Un*, K	x		x			x	x	x	x		x
U*	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x

Zusätzlich zu den SNPs, die mit den Haplogruppen korrelieren, wurde in fünf Fällen (vier SIDS-, ein Kontroll-Fall) eine Mutation des Assays zur Analyse potentiell pathogener Mutationen aufgedeckt (Tabelle 24). Alle mutierten Allele außer 9300A wurden in einem Fall gefunden. Die einzige Ausnahme fand sich in zwei SIDS-Proben. Eine Kontrollprobe wies das mutierte Allel 3308C auf.

Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen einer der detektierten Mutationen des Assays und dem Plötzlichen Säuglingstod feststellen, da die mutierten Allele jeweils bei einem oder zwei SIDS-Fällen gefunden wurden.

Tabelle 24: seltene potentiell pathogene Mutationen

Probe	Haplogruppe	mutiertes Allel
K53	K	3308C
KI0458S	T2	9300A
MC0160S	H*	9300A
HE0357S	H4	10044G
HH0136S	K	14484C

Neben haplogruppenassoziierten Polymorphismen und vier isoliert auftretenden potentiell pathogenen Mutationen, konnten bei 44 Fällen bestimmte Wildtyp- bzw. mutierte Allele nicht nachgewiesen werden, mindestens ein Signal fehlte im Vollprofil (Tabelle 25). Mit Ausnahme der Nukleotidvarianten C14766T, fehlte mindestens ein einzelnes Wildtyp- bzw. Mutanten-Allel maximal in sechs Fällen. Kontroll- und SIDS-Proben waren dabei gleich betroffen.

C14766T fehlte in zwei SIDS-Fällen und 19 Proben der Kontrollgruppe. Eine Kontrollprobe wurde exemplarisch neben den beiden SIDS-Proben durch die Sequenzierung des Fragments analysiert. Die Fragmente der übrigen 23 Fälle wurden sequenziert, um Mutationen in den Primer-Bindungsstellen zu detektieren oder andere Ursachen für die fehlende Darstellung zu finden.

Tabelle 25: potentielle Deletionen

Nukleotidposition	Proben
2706	ER0432S
3243	MS0169C
8344	ER0431S, ES020S, MC0301S, MS0388S, K45, K74
8356	ER0431S, FA0417S, MC0301S, MS0351S, K25, K45
8363	K85
9477	MS0480S, K14
10010	HE0357S, JN0243S
10034	HE0158S, HE0357S
11467	K29
11719	AA0303S
12372	MC0151S
13617	HE0255S, JN0376S
14484	ER0519S
14766	ER0472S, KI0345S, 19 Kontroll-Fälle

3.4 Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte

Von 23 SIDS-Fällen und acht Proben aus der Kontrollgruppe wurde jeweils ein Fragment des Assays zur Analyse potentiell pathogener Mutationen sequenziert. Es konnten isoliert auftretende Mutationen bestätigt bzw. das Fehlen einiger Peaks im Elektropherogramm durch neue Mutationen in den Bindungsstellen der SBE-Primer erklärt werden.

Jedes Fragment wurde sowohl vom 5'- zum 3'-Ende des H-Stranges (*forward*) als auch vom 5'- zum 3'-Ende des L-Stranges (*reverse*) sequenziert. Zum Abgleich diente die revidierte Cambridge Referenz Sequenz (MITOMAP-Datenbank: NC_012920; gi:251831106).

In die Auswertung wurden Sequenzabweichungen einbezogen, die in beiden Sequenzierrichtungen nachgewiesen werden konnten. Sie wurden unter Anwendung der MITOMAP-Datenbank überprüft.

3.4.1 Probenmaterial für die Sequenzierung mitochondrialer Abschnitte

Für die Sequenzierung der zwischen 89 und 292 bp langen mitochondrialen Fragmente wurde bei den SIDS-Fällen die aus gefrorenem Material der Medulla oblongata extrahierte DNA verwendet. Für die Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte der Kontroll-Fälle standen die DNA-Proben der Mundschleimhautabstriche zur Verfügung.

Die für die Sequenzierung mitochondrialer Abschnitte ausgewählten 23 SIDS- und acht Kontroll-Fälle und deren Quantifizierungsergebnisse sind in Tabelle 26 dargestellt. Der DNA-Gehalt (nDNA und mtDNA) der Mundschleimhautabstriche war geringer als der der Gewebeproben. Die Standard-DNA (Applied Biosystems), die als Positivkontrolle bei der Sequenzierung mitochondrialer Abschnitte diente, enthielt $4,3 \times 10^5$ mtDNA-Kopien/ μl . PCR-Inhibitoren konnten bei allen 31 DNA-Proben ausgeschlossen werden ($\text{IPC} < 30$). Für eine Sequenzierung lagen die zu analysierenden DNA-Proben demnach in ausreichender Qualität und Quantität vor.

Tabelle 26: Sequenzierung mitochondrialer Abschnitte - Ergebnisse Quantifizierung

Fragment	DNA-Probe	nDNA-Ausbeute (ng)	mtDNA-Ausbeute (Kopien)	IPC
R-A2706G	ER0432S	58	$3,6 \times 10^9$	27,3
T3197C/ A3243G/ T3250C/ T3271C/ T3308C/G	MS0169S K53	122 66	$2,2 \times 10^9$ $3,9 \times 10^8$	27,0 27,0
A8344G/ T8356C/ R-G8363A	ER0431S ES0020S FA0417S MC0301S MS0351S MS0388S K25 K45 K74 K85	149 984 4.836 3.708 8.490 103 57 84 27 54	$8,1 \times 10^9$ $1,9 \times 10^9$ $1,1 \times 10^{10}$ $3,3 \times 10^9$ $6,0 \times 10^9$ $1,0 \times 10^9$ $3,9 \times 10^7$ $1,1 \times 10^8$ $4,8 \times 10^8$ $3,6 \times 10^8$	27,2 26,8 25,9 25,7 25,7 27,0 27,1 27,2 27,2 27,3
R-G9300A	KI0458S MC0160S	367 15.732	$1,1 \times 10^{10}$ $2,3 \times 10^{10}$	27,1 25,5
G9477A	MS0480S K14	144 105	$8,7 \times 10^9$ $2,9 \times 10^9$	27,0 27,2
T10010C/ T10034C/ R-A10044G	HE0158S HE0357S JN0243S	594 14.652 289	$6,0 \times 10^9$ $3,3 \times 10^9$ $1,8 \times 10^9$	26,9 25,5 27,0
R-A11467G	K 29	291	$6,9 \times 10^6$	27,2
R-G11719A	AA0303S HN0245S	226 4.092	$1,0 \times 10^8$ $5,4 \times 10^8$	27,2 25,9
C12258T/ A12308G/ R-A12320G/ G12372A	MC0151S	1.596	$1,8 \times 10^{10}$	26,6
T13617C	HE0255S JN0376S	182 557	$9,0 \times 10^9$ $5,4 \times 10^9$	27,1 26,7
R-T14484C	ER0519S HH0136S	391 21	$2,5 \times 10^9$ $6,9 \times 10^9$	26,9 27,5
R-T14709C/ R-C14766T	ER0472S KI0345S K12	12.732 250 123	$1,0 \times 10^{10}$ $5,4 \times 10^9$ $1,1 \times 10^8$	26,2 27,0 27,3

3.4.2 Vergleich verschiedener PCR-Programme

Zu Beginn wurden von einer zufällig ausgewählten Gewebeprobe die Sequenzen der HV I- und HV II-Region bestimmt. Dieses Verfahren wird im hiesigen Institut zur Analyse von DNA-Spuren, welche für die Untersuchung von *short tandem repeats* (STRs) in der nDNA ungeeignet sind, angewandt. Es wurde das PCR-Programm der Standard-Methode mit dem des „mitoSEQr™ Systems“ der Firma Applied Biosystems verglichen (Tabelle 27).

Tabelle 27: PCR-Programme für die Sequenzierung mitochondrialer Abschnitte

Singleplex-PCR			
	Standard-Verfahren		„mitoSEQr™ Systems“
Aktivierung	95°C - 10 min		96°C - 5 min
Denaturierung	95°C - 30 s	} 3 x	94°C - 30 s
Annealing	55°C - 45 s		60°C - 45 s
Elongation	72°C - 30 s		72°C - 45 s
	95°C - 30 s	} 19 x	
	55°C - 45 s *		
	72°C - 30 s		
	95°C - 30 s	} 11 x	
	60°C - 45 s		
	72°C - 30 s		
Final Extension	72°C - 7 min		72°C - 10 min
	4°C - ∞		4°C - ∞
Sequenzierreaktion			
Aktivierung			96°C - 1 min
Denaturierung	96°C - 15 s	} 25 x	96°C - 10 s
Annealing	58°C - 30 s		50°C - 5s
Elongation	58°C - 2 min		60°C - 4 min
	4°C - ∞		4°C - ∞

* aufsteigend 0,2°C pro Zyklus

Bei gleichen Reaktionsansätzen und DNA-Mengen wiesen beide PCR-Verfahren identische Ergebnisse auf. Es konnte kein Unterschied zwischen den Signalintensitäten und -qualitäten im Elektropherogramm festgestellt werden. Obwohl die PCR-Bedingungen des „mitoSEQr™ Systems“ zeitintensiver waren, wurden im Hinblick auf die Kompletsequenzierung der mtDNA die PCR-Bedingungen des Kits für Folge-Analysen angewandt. Die Amplifikate für die Sequenzierung des mitochondrialen Genoms waren zwischen 369 und 679 bp lang, sodass sowohl bei der Singleplex-PCR als auch bei der Sequenzierreaktion

lange Elongationszeiten notwendig waren. Die 40 Zyklen der Singleplex-PCR waren erforderlich, um ausreichend Material für die Sequenzierreaktion der langen Fragmente zu erhalten.

3.4.3 Analyse der DNA-Proben nach Abschluss der Voruntersuchungen

Die Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte, welche zur Überprüfung der Ergebnisse des Assays zur Analyse potentiell pathogener Mutationen dienten, wurde am ABI Prism 310 durchgeführt. Durch die Sequenzierung beider Strang-Richtungen konnten die Sequenzen aller 31 Fragmente ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 28 und 29 aufgeführt.

Die potentiell pathogenen Mutationen 2706G, 3308C, 9300A, 10034C, 10044G, 11467G, 11719A, 12372A, 13617C, 14484C und 14766T konnten mittels Sequenzierung bestätigt werden. Diese mutierten Allele befanden sich sowohl in RNA-kodierenden als auch in Protein-kodierenden Regionen des mitochondrialen Genoms. Einige Mutationen waren still (synonym), d.h. sie bewirkten keine Veränderung der Genexpression im betroffenen Abschnitt. Andere Mutationen führten zu einem Aminosäure-Austausch (*missense*).

Das Fehlen der Peaks im Elektropherogramm des Assays zur Analyse potentiell pathogener Mutationen bei den SIDS-Proben ES0020S und MS0388S und bei den Kontroll-Fällen K14 und K74 konnte durch die Sequenzierung der Fragmente nicht geklärt werden. Es wurde jeweils das Wildtyp-Allel nachgewiesen und es fanden sich keine Abweichungen zur rCRS.

Bei der Sequenzierung der Proben wurden 16 neue Mutationen und eine Insertion aufgedeckt. Die Insertion wurde bisher in der MITOMAP-Datenbank nicht beschrieben.

Die übrigen 16 Mutationen wurden in der Datenbank gefunden. Eine Mutation lag in der rRNA-Genregion, sechs in tRNA-kodierenden Bereichen. Fünf Mutationen führten zu einem Aminosäure-Austausch (*missense*-Mutationen): 9468G in der Untereinheit 3 der Cytochrome c Oxidase, 12358G in der Untereinheit 5 und

14502C in der Untereinheit 6 der NADH Dehydrogenase, 14793G und 14798C im Cytochrom b. Die übrigen synonymen Mutationen befanden sich ebenfalls in unterschiedlichen Protein-kodierenden Bereichen und kodierten für die gleiche Aminosäure.

Bei der Sequenzierung aller 31 Fragmente konnte keine Heteroplasmie nachgewiesen werden, die 35 identifizierten Mutationen waren alle homoplasmatisch.

Tabelle 28: Ergebnisse der Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte I

Fragment	DNA-Probe	Ergebnis		Sequenzierung	MITOMAP	Lokalisation im Amplifikat	Aminosäure-		Genregion
		Minisequencing	Ergebnis				Austausch	Genregion	
A2706G	ER0432S	Deletion	2706G/ 2707G	ja	Mutation	nicht-kodierend	16S rRNA		
T3197C/ T3308C/G	MS0169S	Deletion	3229.1A	nein	SBE-Primer A2706G SBE-Primer A3243G	nicht-kodierend	16S rRNA		
	K53	3308C	3308C	ja	Mutation	Leseraster- verschiebung	TER		
A8344G/ G8363A	ER0431S	Deletion	8337C	ja	SBE-Primer A8344G/T8356C	Met - Thr	ND1		
	ES0020S	Deletion	Wildtyp	-	-	nicht-kodierend	tRNA ^{Lys}		
	FA0417S	Deletion	8348G	ja	SBE-Primer T8356C	nicht-kodierend	tRNA ^{Lys}		
	MC0301S	Deletion	8343G	ja	SBE-Primer A8344G/T8356C	nicht-kodierend	tRNA ^{Lys}		
	MS0351S	Deletion	8348G	ja	SBE-Primer T8356C	nicht-kodierend	tRNA ^{Lys}		
	MS0388S	Deletion	Wildtyp	-	-	-	-		
	K25	Deletion	8348G	ja	SBE-Primer T8356C	nicht-kodierend	tRNA ^{Lys}		
	K45	Deletion	8343G	ja	SBE-Primer A8344G/T8356C	nicht-kodierend	tRNA ^{Lys}		
	K74	Deletion	Wildtyp	-	-	-	-		
	K85	Deletion	8380C	ja	SBE-Primer G8363A	synonym	ATP8		
A9299G/ G9300A	K10458S	9300A	9300A	ja	Mutation	Ala - Thr	CO3		
	MC0160S	9300A	9300A	ja	Mutation	Ala - Thr	CO3		
G9477A	MS0480S	Deletion	9468G	ja	SBE-Primer G9477A	Thr - Ala	CO3		
	K14	Deletion	Wildtyp	-	-	-	-		
T10010C/ A10044G	HE0158S	Deletion	10018G	ja	SBE-Primer T10034C	nicht-kodierend	tRNA ^{Gly}		
	HE0357S	Deletion	10007C/ 10034C/ 10044G	ja	SBE-Primer T10010C Mutation	nicht-kodierend	tRNA ^{Gly}		
	JN0243S	Deletion	10003C	ja	SBE-Primer T10010C	nicht-kodierend	tRNA ^{Gly}		

Tabelle 29: Ergebnisse der Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte II

Fragment	Ergebnis		Sequenzierung	MITOMAP	Lokalisation im Amplifikat	Aminosäure-		Genregion
	DNA-Probe	Minisequencing				Austausch	Austausch	
A11467G	K 29	Deletion	11467G/ 11470G	ja ja	Mutation SBE-Primer A11467G	synonym	synonym	ND4 ND4
G11719A/ G11778A	AA0303S HN0245S	Deletion 11719A	11719A/ 11732C 11719A	ja ja ja	Mutation SBE-Primer G11719A Mutation	synonym	synonym	ND4 ND4 ND4
C12258T/ G12372A	MC0151S	Deletion	12358G/ 12372A	ja ja	SBE-Primer G12372A Mutation	Thr - Ala	synonym	ND5 ND5
T13617C	HE0255S	Deletion	13617C	ja	Mutation	synonym	synonym	ND5
G14459A/ T14484C	JN0376S ER0519S	Deletion Deletion	13611G 14502C	ja ja	SBE-Primer T13617C SBE-Primer T14484C	synonym	lle - Val	ND5 ND6
T14709C/ C14766T	HH0136S ER0472S	Deletion Deletion	14484C 14766T/ 14798C	ja ja ja	Mutation Mutation im Fragment	Met - Val	Thr - lle Phe - Leu	ND6 CYB CYB
	KI0345S	Deletion	14766T/ 14793G	ja ja	Mutation SBE-Primer C14766T	Thr - lle	His - Arg	CYB CYB
	K12	Deletion	14766T	ja	Mutation	Thr - lle	Thr - lle	CYB

3.5 Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms

Von drei ausgewählten SIDS-Fällen wurde das gesamte mitochondriale Genom in 46 Fragmenten sequenziert. Jedes Fragment wurde sowohl vom 5'- zum 3'-Ende des H-Stranges (*forward*) als auch vom 5'- zum 3'-Ende des L-Stranges (*reverse*) sequenziert und mit der rCRS abgeglichen.

In die Auswertung wurden Sequenzabweichungen einbezogen, die in beiden Sequenzrichtungen reproduzierbar in den überlappenden Bereichen angrenzender Fragmente nachgewiesen werden konnten.

Sequenzveränderungen, welche nicht dem mitochondrialen Haplogruppen-Assay entsprachen, wurden in der MITOMAP-Datenbank überprüft.

3.5.1 Probenauswahl

Für die Sequenzierung der zwischen 369 und 679 bp langen mitochondrialen Fragmente wurde bei den SIDS-Fällen die aus gefrorenem Material der Medulla oblongata extrahierte DNA verwendet.

Durch die Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte zur Überprüfung einiger Ergebnisse der SNP-Analysen wurden fünf Mutationen aufgedeckt, die für anschließende mtDNA-Sequenzierungen von besonderem Interesse sein könnten (Tabelle 30).

Tabelle 30: Mutationen und deren Aminosäure-Einfluss

DNA-Probe	Wildtyp-/ Mutanten-Allel	Gen-region	Aminosäure-Austausch
MS0480S	A9468G	CO 3	Thr (polar, neutral) → Ala (unpolar, neutral)
MC0151S	A12358G	ND 5	Thr (polar, neutral) → Ala (unpolar, neutral)
ER0519S	T14502C	ND 6	Ile (unpolar, neutral) → Val (unpolar, neutral)
KI0345S	A14793G	CYB	His (polar, basisch) → Arg (polar, basisch)
nicht in MITOMAP			
MS0169S	3229.1A	TER	Leserasterverschiebung

In der MITOMAP-Datenbank war die Adenin-Insertion an Position 3229 nicht zu finden. Durch die Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte sind vier weitere Mutationen in Protein-kodierenden Genen aufgedeckt worden, die in der MITOMAP-Datenbank zu finden sind. Sie kommen in unterschiedlichen Genen

der Atmungskette-Untereinheiten vor, bewirken einen Aminosäure-Austausch und könnten damit mögliche fatale Proteinveränderungen verursachen. Durch die Sequenzierung wurden auch Mutationen in tRNA-Genen lokalisiert. Konformationsänderungen innerhalb der tRNA können die Folge sein.

Nach diesen Überlegungen wurden die in der folgenden Tabelle dargestellten SIDS-Fälle stellvertretend für die Sequenzierung des mitochondrialen Erbguts ausgewählt:

Tabelle 31: SIDS-Fälle für die Sequenzierung des mitochondrialen Genoms

DNA-Probe	c (nDNA) (ng/μl)	c (mtDNA) (Kopienzahl/μl)	IPC
HE0158S	343,6 ng/μl	$9,1 \times 10^8$	25,4
MC0151S	53,0 ng/μl	$3,6 \times 10^8$	26,4
MS0169S	84,4 ng/μl	$3,5 \times 10^7$	26,1

3.5.2 Sensitivität

Die Fragmente zur Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms variieren zwischen 369 und 679 bp. Aus diesem Grund wurde das *Performance Optimized Polymer 7* (POP 7) im Vergleich zum *Performance Optimized Polymer 4* (POP 4) unter Verwendung des längsten Fragments (Fragment 13 - 679 bp) am ABI PRISM 310 getestet. Das Polymer wird für die Sequenzierung langer Fragmente bis ca. 500 bp empfohlen.

Die Vorüberlegungen bestätigten sich. Die Sequenz des 679 bp langen Fragments konnte mit dem POP 4 bis ca. 250 bp eindeutig nachgewiesen werden. Längere Bereiche flachten rapide ab und ließen sich schwer im Elektropherogramm erkennen. Im Gegensatz dazu ließ sich die Sequenz mit dem POP 7 ab 50 bp bis zum Fragment-Ende deutlich ablesen. Die ersten 50 Peaks waren ineinander verschoben. Für die Untersuchungen der SIDS-Fälle sollten die Fragmente in beide Strang-Richtungen sequenziert werden. Die ersten 50 bp bei der Analyse mittels POP 7 sollten daher durch die jeweilige entgegengesetzte Reaktion und durch überlappende Sequenzbereiche der angrenzenden Fragmente zu bestimmen sein.

Vor den Analysen wurde der Einfluss verschiedener mtDNA-Konzentrationen auf die unterschiedlich langen Fragmente untersucht. Es wurde die bereits beschriebene Verdünnungsreihe (ca. 1×10^8 bis 775 mtDNA-Kopien/ μ l) verwendet und jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden das kürzeste Fragment (369 bp) und das längste Fragment (679 bp) des Analyseverfahrens eingesetzt. Das kurze Fragment war ab ca. 5×10^4 mtDNA-Kopien/ μ l schwach im PAA-Gel zu erkennen. Das lange Fragment war lediglich bei der höchsten Konzentration (ca. 1×10^8 mtDNA-Kopien/ μ l) im Gel sichtbar. Kurze Fragmente ließen sich demnach mit niedrigeren mtDNA-Konzentrationen als lange Fragmente amplifizieren. Für die Sequenzierung langer Fragmente (in diesem Fall 679 bp) wurde mehr Ausgangsmaterial benötigt. Somit konnte das Verfahren unter den optimierten Bedingungen für die SIDS-Proben eingesetzt werden.

3.5.3 Analyse der DNA-Proben nach Abschluss der Voruntersuchungen

Die Sequenzierung des mitochondrialen Genoms wurde am ABI Prism 310 unter Verwendung des POP 7 durchgeführt. Durch die Sequenzierung beider Strang-Richtungen konnte die komplette mtDNA-Sequenz von drei SIDS-Fällen detektiert werden. Mutationen, die nicht durch die überlappenden Bereiche zweier benachbarter Fragmente nachgewiesen werden konnten, wurden durch die *forward*- und *reverse*-Sequenzierung bestätigt. Jeder Fall wurde demnach einer Doppelbestimmung unterzogen.

In den drei Fällen konnten insgesamt 55 homoplasmatische Mutationen ermittelt werden.

Sechs Transitionen (A263G, A750G, A1438G, A4769G, A8860G, A15326G) wurden in allen drei Fällen detektiert. Sie werden in der original Cambridge Referenz Sequenz als seltene Polymorphismen bezeichnet.

Die mittels Haplogruppen-Assay bestimmten Polymorphismen wurden bestätigt:

Tabelle 32: haplogruppenassoziierte-Polymorphismen

DNA-Probe	Haplogruppe	haplogruppenassoziierte Polymorphismen						
HE0158S	U*	G2706	T7028	10400C	10873T	12372A	12705C	T14766
MC0151S	N*	G2706	T7028	10400C	10873T	12372A	T12705	T14766
MS0169S	H*	2706A	7028C	10400C	10873T	G12372	12705C	14766C

Die haplogruppenassoziierten Polymorphismen, welche mit dem Assay zur Untersuchung der potentiell pathogenen Mutationen identifiziert wurden, konnten ebenfalls bestätigt werden:

Tabelle 33: haplogruppenassoziierte Mutationen

DNA-Probe	Haplogruppe	haplogruppenassoziierte Polymorphismen					
HE0158S	U*	3197C	9477A	11467G	11719A	12308G	13617C
MC0151S	N*	T3197	G9477	A11467	11719A	A12308	T13617
MS0169S	H*	T3197	G9477	A11467	G11719	A12308	T13617

39 % der übrigen 36 homoplasmatischen Mutationen finden sich in den Proteinkodierenden Bereichen des mitochondrialen Genoms, 44 % in der nicht-kodierenden D-loop-Region. Eine Substitution (3 %) wurde im Gen der 12S rRNA nachgewiesen und drei (8 %) in den tRNA-kodierenden Abschnitten. Das folgende Diagramm stellt die Verteilung der durch die Sequenzierung detektierten Mutationen im mitochondrialen Genom dar:

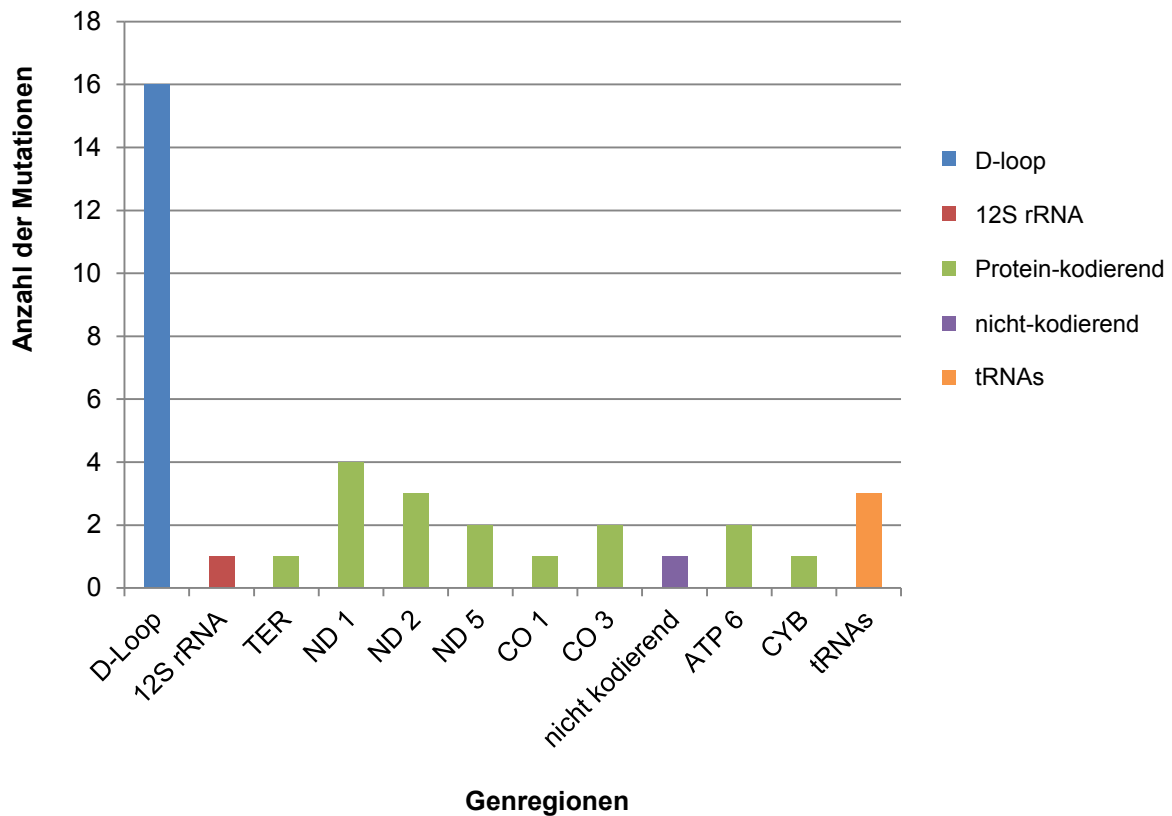


Abbildung 27: Verteilung nachgewiesener Mutationen

Mutationen in der D-loop-Region

16 Mutationen wurden in der nicht-kodierenden Region des mitochondrialen Genoms, dem D-loop, detektiert. Diese homoplasmatischen Mutationen sind in der MITOMAP-Datenbank beschrieben (Tabelle 34).

Bei den mit einem Stern versehenen Mutationen handelt es sich laut Datenbank um somatische Mutationen, die mit verschiedenen Tumor-Arten in Zusammenhang gebracht werden [Stafford *et al.* 2010; Brandon *et al.* 2006; Tseng *et al.* 2006; Coskun *et al.* 2004; Kumimoto *et al.* 2004; Del Bo *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003; Attardi 2002; Chen *et al.* 2002; Maximo *et al.* 2002]. Mindestens eines dieser mutierten Allele findet sich in einem der drei SIDS-Fälle.

Die anderen Mutationen werden als stille Mutationen betrachtet, da sie sich in den nicht-kodierenden Bereichen des mitochondrialen Erbguts und bis auf die Insertionen in der Poly-C-Region (303-315) nicht in dem Bereich des Replikationsursprunges (O_H : Replikationsursprung des H-Stranges, O_L : Replikationsursprung des L-Stranges) befinden.

Eine Cytosin-Insertion an Position 315 wurde in allen drei SIDS-Fällen detektiert.

Tabelle 34: Mutationen der D-loop-Region

SIDS-Fall	mutiertes Allel	Genregion	Aminosäure-Austausch	MITOMAP
1, 2	73G*	<i>HV II</i>	nicht-kodierend	ja
2	150T*	<i>O_H</i>	nicht-kodierend	ja
3	152C*	<i>O_H</i>	nicht-kodierend	ja
2	309.1C	<i>O_H</i>	nicht-kodierend	ja
1, 2, 3	315.1C	<i>O_H</i>	nicht-kodierend	ja
3	340T	<i>HV II</i>	nicht-kodierend	ja
3	456T*	<i>HV III</i>	nicht-kodierend	ja
1	16192T	<i>HVI</i>	nicht-kodierend	ja
2	16223T*	<i>HVI</i>	nicht-kodierend	ja
1	16256T	<i>HVI</i>	nicht-kodierend	ja
2	16257A	<i>HVI</i>	nicht-kodierend	ja
2	16261T	<i>HVI</i>	nicht-kodierend	ja
1, 3	16270T	<i>HVI</i>	nicht-kodierend	ja
3	16304C*	<i>HVI</i>	nicht-kodierend	ja
2	16311C*	<i>HVI</i>	nicht-kodierend	ja
1	16526A	<i>7S DNA</i>	nicht-kodierend	ja

1: HE0158S; 2: MC0159S; 3: MS0169S; *somatische Mutation

Mutationen im Gen der 12S rRNA

Die Cytosin-Insertion in der Genregion der 12S rRNA an Position 960 ist in der MITOMAP-Datenbank beschrieben und wurde im SIDS-Fall HE0158S detektiert (Tabelle 35). Sie wird als stille Mutation betrachtet, da sie keine genetische Information besitzt, die in Proteine umgeschrieben wird.

Tabelle 35: Mutationen im Gen der 12S rRNA

SIDS-Fall	mutiertes Allel	Genregion	Aminosäure-Austausch	MITOMAP
1	960.1C	<i>12S rRNA</i>	nicht-kodierend	ja

1: HE0158S; 2: MC0159S; 3: MS0169S

Mutationen im Gen des Transkriptions-Terminators

Die bereits beschriebene Adenin-Insertion im Gen des Transkriptions Terminations Faktors (TER) an Position 3229 konnte durch die Sequenzierung des mitochondrialen Genoms im SIDS-Fall MS0169S bestätigt werden:

Tabelle 36: Mutationen im Gen des Transkriptions-Terminators

SIDS-Fall	mutiertes Allel	Genregion	Aminosäure-Austausch	MITOMAP
3	3229.1A	<i>TER</i>	Leserasterverschiebung	nein

1: HE0158S; 2: MC0159S; 3: MS0169S

Mutationen in den Genen der NADH Dehydrogenase-Untereinheiten

Acht Mutationen konnten in Genen der drei NADH-Dehydrogenase-Untereinheiten detektiert werden (Tabelle 37).

In der SIDS-Probe MS0169S wurden zwei Mutationen in der Untereinheit 1 aufgedeckt, welche in der Datenbank nicht zu finden sind und zu einem Austausch der Aminosäuren führen.

Durch die Transition an Position 3571 wird die hydrophobe, unpolare Aminosäure Leucin gegen die hydrophobe, unpolare Aminosäure Isoleucin ausgetauscht. Das mutierte Allel 3580G bewirkt den Aminosäure-Austausch der ebenfalls hydrophoben, unpolaren Aminosäuren Prolin gegen Alanin.

Die übrigen sechs mutierten Allele sind in der MITOMAP-Datenbank beschrieben. Eine der drei Mutationen im Gen der Untereinheit 2 (Transition an Position 5319) löst den Austausch der ungeladenen, polaren Aminosäuren Threonin gegen Serin aus. Die beiden restlichen Mutationen sind synonym.

Eine weitere Mutation in der Genregion der Untereinheit 5 ist ebenfalls synonym, wohingegen die Mutation an Position 12358 den Aminosäure-Austausch des ungeladenen polaren Threonins zum hydrophoben unpolaren Alanin bewirkt.

Tabelle 37: Mutationen in den Genen der NADH-Dehydrogenase-Untereinheiten

SIDS-Fall	mutiertes Allel	Genregion	Aminosäure-Austausch	MITOMAP
3	3571A	ND1	Leu - Ile	nein
3	3580G	ND1	Pro - Ala	nein
3	3606G	ND1	synonym	ja
2	5231A	ND2	synonym	ja
3	5319G	ND2	Thr - Ser	ja
2	5417A	ND2	synonym	ja
2	12358G	ND5	Thr - Ala	ja
2	12771A	ND5	synonym	ja

1: HE0158S; 2: MC0159S; 3: MS0169S

Mutationen in den Genen der Cytochrom-c-Oxidase- Untereinheiten

Die einzige in der Genregion der Untereinheit 1 nachgewiesene synonyme Mutation findet sich in der MITOMAP-Datenbank (Tabelle 38).

Die beiden mutierten Allele im Gen der Untereinheit 3 sind ebenfalls in der Datenbank aufgeführt. Die Transition an Position 9738 verursacht den Austausch der hydrophoben unpolaren Aminosäure Alanin gegen das hydrophile polare Threonin. Im SIDS-Fall HE0158S wurde eine synonyme Mutation im Gen der Untereinheit 3 detektiert.

Tabelle 38: Mutationen in den Genen der Cytochrom-c-Oxidoreduktase-Untereinheiten

SIDS-Fall	mutiertes Allel	Genregion	Aminosäure-Austausch	MITOMAP
1	7211A	CO1	synonym	ja
1	9548A	CO3	synonym	ja
2	9738A	CO3	Ala - Thr	ja

1: HE0158S; 2: MC0159S; 3: MS0169S

Mutationen im nicht-kodierenden Bereich

Die SIDS-Probe MC0151S weist in der 24 bp langen nicht-kodierenden Region (8270 - 8294), zwischen den Genen der Cytochrom-c-Untereinheit 2 und dem der tRNA^{Lys}, eine Neun-Basen-Insertion (CCCCCTCTA) auf. Diese Insertion ist in der MITOMAP-Datenbank beschrieben (Tabelle 39).

Tabelle 39: Mutationen im nicht-kodierenden Bereich

SIDS-Fall	mutiertes Allel	Genregion	Aminosäure-Austausch	MITOMAP
2	8289.9	nicht-kodierend	Leserasterverschiebung	ja

1: HE0158S; 2: MC0159S; 3: MS0169S

Mutationen in den Genen der ATP-Synthase-Untereinheiten

Lediglich in der Untereinheit 6 der ATP-Synthase konnten in zwei SIDS-Fällen zwei unterschiedliche Mutationen detektiert werden, welche in der Datenbank vorliegen (Tabelle 40). Die Transition an Position 8618 verursacht den Austausch zweier ungeladener polarer Aminosäuren, wohingegen die Mutation an Position 8563 synonym ist.

Tabelle 40: Mutationen in den Genen der ATP-Synthase-Untereinheiten

SIDS-Fall	mutiertes Allel	Genregion	Aminosäure-Austausch	MITOMAP
3	8563G	<i>ATP6</i>	synonym	ja
2	8618C	<i>ATP6</i>	Ile - Thr	ja

1: HE0158S; 2: MC0159S; 3: MS0169S

Mutationen im Cytochrom-b-Gen

Die SIDS-Probe HE0158S weist die einzige homoplasmatische Mutation in der Genregion des Cytochrom b auf. Sie ist bereits in der MITOMAP-Datenbank zu finden und veranlasst den Austausch der basischen Aminosäure Histidin gegen das ebenso basische Arginin:

Tabelle 41: Mutationen im Cytochrom-b-Gen

SIDS-Fall	mutiertes Allel	Genregion	Aminosäure-Austausch	MITOMAP
1	14793G	<i>CYB</i>	His - Arg	ja

1: HE0158S; 2: MC0159S; 3: MS0169S

Mutationen in tRNA-Genen

Die drei Mutationen, die in zwei SIDS-Fällen nachgewiesen wurden, befinden sich in drei verschiedenen tRNA-Genen (Tabelle 41).

Die drei detektierten Transitionen sind in der MITOMAP-Datenbank zu finden.

Tabelle 42: Mutationen in tRNA-Genen

SIDS-Fall	mutiertes Allel	Genregion	Aminosäure-Austausch	MITOMAP
3	595T	<i>tRNA^{Phe}</i>	nicht-kodierend	ja
3	4336C	<i>tRNA^{Gln}</i>	nicht-kodierend	ja
1	10018G	<i>tRNA^{Gly}</i>	nicht-kodierend	ja

1: HE0158S; 2: MC0159S; 3: MS0169S

4. Diskussion

4.1 Probenbearbeitung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten zunächst Untersuchungen bezüglich der DNA-Menge und -Qualität des vorliegenden Probenmaterials.

Die Ergebnisse der Vorversuche zur Auswahl einer geeigneten Entparaffinierungsmethode waren bei den drei vorgestellten Verfahren identisch, aus diesem Grund war sowohl der „BIOstic™ FFPE Tissue DNA Isolation Kit“, als auch der „Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit“ oder die Entparaffinierung mittels Xylol für weitere Analysen denkbar. Für die Wahl der zukünftig anzuwendenden Entparaffinierungsmethode war demnach der Kostenfaktor ausschlaggebend.

Obwohl die Entparaffinierung mittels Xylol im Vergleich zu den auf Kits basierenden Entparaffinierungsverfahren mehr Nachteile aufweist (zeit- und arbeitsaufwändig, gesundheitsschädlich und kontaminationsanfällig; Tabelle 43), wurde diese kostengünstige Methode zur Entparaffinierung der FFPE-Gewebeproben aus 195 SIDS-Fällen eingesetzt. Die Arbeiten wurden unter einem Abzug durchgeführt, um das gesundheitsschädliche Einatmen des Xylols zu vermeiden. Präventiv wurden beständige Schutzhandschuhe und ein Kittel getragen. Um die Kontaminationsanfälligkeit und einen erhöhten Probenverlust aufgrund vieler Arbeitsschritte zu verringern, wurden die Waschschriffe mittels absteigender Ethanol-Reihe (Isopropanol → 96 % Ethanol → 80 % Ethanol → 70 % Ethanol → Wasser) durch zweimaliges Waschen mit absolutem Ethanol und anschließender Lufttrocknung ersetzt.

Tabelle 43: Vergleich verschiedener Entparaffinierungsmethoden

	Xylol	BIOstic™ FFPE Tissue DNA Isolation Kit	Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit
Zeitaufwand pro Probe	ca. 2 h	innerhalb der Extraktion	innerhalb der Extraktion
Kosten pro Probe	< 1 Euro	ca. 3 Euro	ca. 5 Euro
Gesundheitsrisiken	ja	nein	nein
Kontaminationsanfälligkeit	hoch	hoch	hoch

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Vorversuche zur Auswahl einer geeigneten Extraktionsmethode und des in Tabelle 44 dargestellten Vergleichs der fünf beschriebenen Extraktions-/Aufreinigungsverfahren wurden alle Analysen der FFPE-Gewebeproben mit Xylol entparaffinierten und mit Chelex extrahierten DNA-Proben durchgeführt. Die Extraktion mittels Chelex ist eine schnelle, einfache und kostengünstige Methode. Wenige Arbeitsschritte minimieren das Risiko von Kontaminationen bzw. des Vertauschens der Proben.

Tabelle 44: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden

	Chelex	Chelex, Microcon, Qiagen	Phenol- Chloroform	Macherey & Nagel	QIAmp® DNA Mini Kit
Zeitaufwand pro Probe	ca. 1 h	ca. 2,5 h	ca. 24 h	ca. 5 h	ca. 2 h
Kosten pro Probe	< 1 Euro	ca. 5 Euro	< 1 Euro	ca. 3 Euro	ca. 3 Euro
Gesundheitsrisiken	nein	nein	ja	nein	nein
Kontaminationsanfälligkeit	gering	hoch	hoch	hoch	hoch

Unter Berücksichtigung der DNA-Qualität wurden für die Sequenzieranalysen folgende Extraktionsmethoden gewählt:

Die DNA-Proben für die Sequenzierung zur Überprüfung ausgewählter *Multiplex-Minisequencing*-Ergebnisse wurden mittels Phenol-Chloroform extrahiert. Es handelt sich um eine kostengünstige Alternative zur Chelex-Extraktion, bei der PCR-Inhibitoren in mehreren Schritten entfernt werden.

Für die Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms wurden die DNA-Proben mit dem Maxwell 16 Instrument extrahiert. Der „Maxwell 16® DNA IQ Casework Pro Kit“ wurde bei den Voruntersuchungen nicht berücksichtigt. Das Prinzip und der Arbeitsablauf entsprechen dem des „Maxwell® 16 FFPE Plus DNA Purification Kit“, wobei während der Lyse keine Entparaffinierung stattfindet. Es handelt sich um eine zeitsparende, allerdings kostenintensive Extraktionsmethode. Die DNA ist aufgereinigt und höher konzentriert als bei der Phenol-Chloroform-Extraktion.

4.2 Qualität des Probenmaterials

Die gewonnene DNA-Menge und -Qualität aus FFPE-Gewebeproben ist abhängig von der Gewebeart, dem Alter der Probe, der Schnittdicke, der Fixierungszeit und dem Verhältnis zwischen Wachs und Gewebe in jedem FFPE-Gewebe-Schnitt [Wiegand *et al.* 1996].

Zur Überprüfung der Qualität des Probenmaterials wurden mit beiden *Multiplex-Minisequencing*-Analyseverfahren die vier FFPE-Gewebearten Lunge, Herz, Diaphragma und Leber, von jeweils zwei verschiedenen GeSID-Fällen sowohl mit Chelex als auch mit Phenol-Chloroform extrahiert (Tabelle 21 und 22).

Die mit Chelex extrahierten Gewebeproben wiesen eine starke Inhibition auf (IPC > 30). Die Konzentrationen an nukleärer DNA waren zum Teil etwa tausendfach höher als die der Phenol-Chloroform-Extrakte. Diese enthielten keine PCR-Inhibitoren. Von den Chelex-Extrakten konnte die Konzentration an mitochondrialer DNA meist nicht bestimmt werden. Grund dafür könnten zu hohe mtDNA-Konzentrationen oder eine gestörte *Real-Time* PCR durch Inhibitoren der Chelex-Extrakte gewesen sein.

Bei jeweils einem Fall der beiden *Multiplex-Minisequencing*-Verfahren wurde bei allen Gewebeproben sowohl bei den Chelex- als auch bei den Phenol-Chloroform-Extrakten ein Vollprofil dargestellt. Unter den gleichen Voraussetzungen (ähnliche DNA-Konzentrationen, parallele Entparaffinierung und Extraktion, gleicher PCR Master Mix) wiesen die Gewebeproben des zweiten Falles lediglich ein Teilprofil auf.

Inhibition kann nicht ausschließlich die Begründung für das Ausfallen der langen Fragmente sein, da auch die Phenol-Chloroform-Extrakte ohne Inhibition im zweiten Fall nur ein Teilprofil lieferten.

Bei ähnlichen nDNA-Konzentrationen gleicher Gewebearten, in zwei verschiedenen Fällen und ohne PCR-Inhibitoren kann lediglich ein unterschiedlicher Grad an Degradierung die Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse des *Multiplex-Minisequencing*-Verfahrens sein.

Die Qualität und die Konzentration der DNA aus den etwa zehn Jahre alten FFPE-Gewebeproben stellten sich in den Elektropherogrammen beider *Multiplex-Minisequencing*-Verfahren sehr unterschiedlich dar. Die Erkenntnis, dass FFPE-Proben aus manchen Instituten bessere Ergebnisse lieferten als aus anderen, ließ

vermuten, dass der unterschiedliche Grad der DNA-Degradierung auf verschiedene Fixierungszeiten der Institute zurückzuführen ist. Die Untersuchungsergebnisse der FFPE-Proben (Leber, Diaphragma) lieferten häufig ein Teilprofil, mit dem die Ergebnisse der gefrorenen Gewebeproben abgeglichen wurden. Die vorliegenden Ergebnisse beider *Multiplex-Minisequencing*-Analysen basieren in den meisten Fällen auf den Befunden der gefrorenen Gewebeproben (Lunge, Herz, Medulla oblongata), mindestens eine Gewebeprobe jedes Keimblattes.

Für die Sequenzieranalysen wurde bei den SIDS-Fällen die aus gefrorenem Material der Medulla oblongata extrahierte DNA verwendet. FFPE-Gewebeproben kamen für die Sequenzierung nicht in Frage. Bereits durch die höchst sensitive Analyse zur Bestimmung der Haplogruppen-Polymorphismen und den potentiell pathogenen Mutationen wurde gezeigt, dass die FFPE-Gewebeproben stark degradiert waren und dadurch Fragmente länger als 150 bp nicht amplifiziert werden konnten. Gefrorene Gewebeproben der Medulla oblongata wurden für die Sequenzieranalysen ausgewählt, da sie reich an Mitochondrien sind und für alle SIDS-Fälle vorlagen.

4.3 Haplogruppen-Assay

In allen 195 SIDS- und 151 Kontroll-Fällen konnte mittels 32 SNP-Assay die mitochondriale Haplogruppe bestimmt werden (Tabelle A 13). Alle Gewebeproben eines Falles lieferten identische Ergebnisse. Detektierte Polymorphismen wurden durch die Analysen von mindestens einer Gewebeart der drei Keimblätter bestätigt. In keiner der analysierten Proben wurde Heteroplasmie nachgewiesen. Die Haplogruppen H* (ca. 40 %) und U* (ca. 20 %) wurden mit ihren Untergruppen am häufigsten dargestellt. Die charakteristische Haplogruppen-Verteilung der europäischen Population wurde damit wiedergespiegelt [European Prehistory, Anthropology & Genetics]. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den SIDS-Fällen und der Kontrollgruppe. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Risiko-Haplogruppe und dem Plötzlichen Säuglingstod konnte nicht festgestellt werden.

4.4 Assay zur Analyse potentiell pathogener Mutationen

Es ist gelungen, eine schnelle und einfache Methode zur Detektion 37 mitochondrialer potentiell pathogener Mutationen zu entwickeln. Die Mutationen wurden bereits mit Mitochondriopathien nach Wong 2010, Gropman *et al.* 2004, Chinnery *et al.* 2000, 2010 und Wallace *et al.* 1995 und dem Plötzlichen Säuglingstod nach Opdal *et al.* 2004 in Zusammenhang gebracht. Die beschriebenen SIDS- und Kontrollfälle wurden mit dem etablierten *Multiplex-Minisequencing*-Verfahren erfolgreich analysiert (Tabelle A 13).

Im Elektropherogramm wichen die gemessenen Fragmentlängen der einzelnen Signale um zwei bis vier Basenpaare von den erwarteten Werten ab. Dieses kann zum einen durch das unterschiedliche Molekulargewicht der Nukleotide und somit der Fragmente erklärt werden. Zum anderen werden Migrationsunterschiede durch Größe und Molekulargewicht der ddNTPs mit unterschiedlichen Fluorophoren verursacht.

Unter Berücksichtigung dieser mittels Singleplex ermittelten Fragmentlängen lieferten alle Gewebeproben eines Falles identische Ergebnisse. Detektierte, potentiell pathogene Mutationen wurden durch die Analyse von mindestens einer Gewebeprobe jedes Keimblattes bestätigt. In keiner der analysierten Proben wurde Heteroplasmie nachgewiesen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der SIDS-Fälle und denen der Kontrollgruppe konnte nicht festgestellt werden.

Vier der mit dem Plötzlichen Säuglingstod assoziierten Mutationen wurden auch spezifischen Haplogruppen zugeschrieben. Diese vier haplogruppenassoziierten Polymorphismen waren bereits in dem Haplogruppen-Assay vorhanden und wurden zur internen Kontrolle in den Assay zur Analyse potentiell pathogener Mutationen integriert. Durch das Gegenüberstellen der Ergebnisse beider Verfahren wurden weitere sieben Polymorphismen aufgedeckt, die jeweils mit bestimmten Haplogruppen zusammenhingen (Tabelle 23). Von den 17 durch Opdal *et al.* mit SIDS-assoziierten Mutationen wurden demnach elf auch als haplogruppenassoziierte Polymorphismen identifiziert.

Zusätzlich zu diesen haplogruppenassoziierten Polymorphismen wurden in vier SIDS-Fällen und einem Kontroll-Fall vier isoliert auftretende potentiell pathogene Mutationen detektiert, welche durch Sequenzierung bestätigt wurden (Tabelle 24). Diese potentiell pathogenen Mutationen waren in der MITOMAP-Datenbank veröffentlicht: eine in der Genregion der tRNA^{Gly} und drei in der Proteinkodierenden Region (Tabelle 28 und 29). Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen einer dieser potentiell pathogenen Mutationen und dem Plötzlichen Säuglingstod ermitteln, da diese Mutationen jeweils lediglich bei einem oder zwei der 195 SIDS-Fälle vorhanden waren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass vier der potentiell pathogenen Mutationen in einem oder zwei SIDS-Fällen nachgewiesen werden konnten und elf Mutationen des Assays zur Analyse potentiell pathogener Mutationen wurden auch mit Haplogruppen assoziiert.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer der nach Literaturangaben [Chinnery *et al.* 2000, Gropman *et al.* 2004, Opdal *et al.* 2004, 2010; Wallace *et al.* 1995, Wong 2010] potentiell pathogenen mitochondrialen Mutationen und dem Plötzlichen Säuglingstod konnte nicht festgestellt werden.

4.5 Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Mutationen konnten in 44 Fällen mittels Assay zur Analyse ausgewählter potentiell pathogener Mutationen einzelne Nukleotidvarianten nicht bestimmt werden (Tabelle 25), da die entsprechende Nukleotidvariante in der SNaPshot-Reaktion nicht dargestellt werden konnte.

Durch die Sequenzierung der entsprechenden Fragmente bei 31 Fällen wurden 35 Mutationen detektiert. In zwei SIDS-Fällen und zwei Kontroll-Proben wurde durch Sequenzierung das Wildtyp-Allel dargestellt.

Die 35 detektierten Mutationen teilten sich wie folgt auf:

Die Nukleotidvarianten C14766T waren in zwei SIDS-Fällen und 19 Proben der Kontrollgruppe nicht darstellbar. Die Sequenzierung bestätigte in den SIDS-Fällen zwei verschiedene Mutationen in der Bindungsregion des SBE-Primers. In dem Fragment der für die Kontroll-Fälle exemplarisch sequenzierten Probe wurde das mutierte Allel detektiert. Das Fragment, in dem sich diese Nukleotidvarianten befinden, ist mit 292 bp das längste (T14709C/C14766T) des Assays zur Analyse potentiell pathogener Mutationen. Eine nicht ausreichende DNA-Qualität der Chelex-Proben könnte für das Fehlen des Peaks in den Kontroll-Fällen die Ursache sein. Die Signalstärke der mutierten Allele ist häufig geringer (< 800 RFU) als die des Wildtyps (1.000 - 3.000 RFU).

Bei der Sequenzierung der übrigen Proben wurden neben 15 bestätigten potentiell pathogenen Mutationen, 16 neue Mutationen und eine Insertion detektiert (Tabellen 28 und 29). Die 16 Mutationen waren bereits in der Datenbank vorhanden und in den Ribosomen betreffenden und tRNA-kodierenden DNA-Abschnitten lokalisiert, führten zu Aminosäure-Austauschen oder waren synonym in unterschiedlichen Protein-kodierenden Bereichen. Die Insertion eines Adenins an Position 3229 wurde bisher in der MITOMAP-Datenbank nicht beschrieben.

Drei SIDS-Fälle wiesen zusätzlich zu einer potentiell pathogenen Mutation haplogruppenassoziierte Polymorphismen auf (HE0357S: U*, 10034C; HN0245S: H*, 11719A; MC0151S: N*, 12372A), welche nicht der eigentlichen Haplogruppe dieser Probe entsprachen, sondern mit einer anderen Haplogruppe assoziiert waren. Demnach stellt sich die Frage, ob haplogruppenassoziierte Polymorphismen einen Einfluss auf den Plötzlichen Säuglingstod haben. Da es sich bei diesem Syndrom um ein multifaktorielles Geschehen handelt, ist nicht auszuschließen, dass im Zusammenspiel mit Mutationen der Zellkern-DNA oder unter Einfluss anderer äußerer Risikofaktoren haplogruppenassoziierte Polymorphismen zum Tod beitragen.

4.6 Sequenzierung des mitochondrialen Genoms

Mittels *Multiplex-Minisequencing*-Verfahren konnte keine Risiko-Haplogruppe und keine potentiell pathogene Mutation identifiziert werden, die signifikant mit dem Plötzlichen Säuglingstod in Zusammenhang steht.

Durch die Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte wurden Mutationen aufgedeckt, die für umfassende mtDNA-Sequenzierungen von besonderem Interesse sein könnten.

4.6.1 Probenauswahl

Der SIDS-Fall mit dem mutierten tRNA^{Gly}-Gen (HE0158S) wurde für die Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms ausgewählt, da Mutationen in den tRNA-Genen die Sekundärstruktur des RNA-Moleküls verändern und damit einen Einfluss auf den gesamten Organismus haben können. Es wurden bereits einige Mutationen in den Genregionen der tRNAs mit dem Plötzlichen Säuglingstod assoziiert [Opdal *et al.* 2004].

Der SIDS-Fall mit der Insertion eines Adenins an Position 3229 (MS0169S) wurde ausgewählt, da diese Insertion noch nicht in der MITOMAP-Datenbank vorliegt, allerdings in der Studie von Raghupathi (Dissertation 2011) an einem Patienten mit einer mitochondrialen Myopathie beschrieben wurde.

Die Arbeitsgruppe um Raghupathi wies eine signifikante Störung der Transkriptions-Termination nach, welche dazu führt, dass das längere polyzistronische Transkript der mtDNA vermehrt hergestellt wird. Die Anzahl an mRNAs, welche die Untereinheiten der Atmungskette kodieren, ist entsprechend höher. Die Insertion in diesem Bereich bewirkt eine Leserasterverschiebung der gesamten Transkriptions-Terminations-Sequenz (3229 - 3256). Eine Erklärung für die verminderte Transkriptions-Termination ist eine gestörte Bindung des mitochondrialen TER. Eine zweite Möglichkeit ist, dass der mitochondriale Transkriptions-Terminations-Faktor weiterhin normal an die Erkennungssequenz bindet, seine Funktion aufgrund der Konformationsveränderung innerhalb der mtDNA durch die Insertion gestört wird.

Ein weiterer zu sequenzierender SIDS-Fall (MC0151S) wurde stellvertretend für die im Protein-kodierenden Bereich der mtDNA lokalisierten und in MITOMAP beschriebenen Mutationen, welche den Austausch einer polaren gegen eine unpolare Aminosäure bewirken, ausgewählt. Die dreidimensionale Struktur der Proteine wird durch die Abfolge der Aminosäuren und deren Seitenketten bestimmt. Bereits die Größe und die Form der Rest-Gruppen haben einen Einfluss auf die Proteinstruktur, die durch zusätzliche Bindungen zwischen den Seitenketten stabilisiert wird. Aus dieser hoch komplexen Struktur resultiert die biologische Proteinfunktion.

4.6.2 Lokalisation der Mutationen

Bei der Sequenzierung des mitochondrialen Erbguts der drei ausgewählten SIDS-Fälle wurden 36 homoplasmatische Mutationen detektiert (Tabelle 45).

Tabelle 45: Ergebnisse Sequenzierung des mitochondrialen Genoms

SIDS-Fall	Nukleotid-variante	Genregion	Aminosäure-Austausch	vorbeschrieben (MITOMAP)
1, 2	73G*	<i>HV II</i>	nicht-kodierend	u. a. Schilddrüsen- & Prostata-Tumor
2	150T*	<i>O_H</i>	nicht-kodierend	u. a. Schilddrüsen- & Prostata-Tumor
3	152C*	<i>O_H</i>	nicht-kodierend	u. a. Ovarial- & Brust-Tumor
2	309.1C	<i>O_H</i>	nicht-kodierend	Polymorphismus
1, 2, 3	315.1C	<i>O_H</i>	nicht-kodierend	Polymorphismus
3	340T	<i>HV II</i>	nicht-kodierend	Polymorphismus
3	456T*	<i>HV III</i>	nicht-kodierend	Schilddrüsen-Tumor
3	595T	<i>tRNA^{Phe}</i>	nicht-kodierend	Polymorphismus
1	960.1C	<i>12S rRNA</i>	nicht-kodierend	DEAF
3	3229.1A	<i>TER</i>	Leseraster-verschiebung	nicht vorbeschrieben
3	3571A	<i>ND1</i>	Leu - Ile	nicht vorbeschrieben
3	3580G	<i>ND1</i>	Pro - Ala	nicht vorbeschrieben
3	3606G	<i>ND1</i>	synonym	Polymorphismus
3	4336C	<i>tRNA^{Gln}</i>	nicht-kodierend	ADPD, Schwerhörigkeit, Migräne
2	5231A	<i>ND2</i>	synonym	Polymorphismus
3	5319G	<i>ND2</i>	Thr - Ser	Polymorphismus
2	5417A	<i>ND2</i>	synonym	Polymorphismus
1	7211A	<i>CO1</i>	synonym	Polymorphismus
2	8289.9	<i>nicht-kodierend</i>	Leseraster-verschiebung	Längenpolymorphismus
3	8563G	<i>ATP6</i>	synonym	Polymorphismus
2	8618C	<i>ATP6</i>	Ile - Thr	Polymorphismus
1	9548A	<i>CO3</i>	synonym	Polymorphismus
2	9738A	<i>CO3</i>	Ala - Thr	Polymorphismus
1	10018G	<i>tRNA^{Gly}</i>	nicht-kodierend	Polymorphismus
2	12358G	<i>ND5</i>	Thr - Ala	Polymorphismus
2	12771A	<i>ND5</i>	synonym	Polymorphismus
1	14793G	<i>CYB</i>	His - Arg	Polymorphismus
1	16192T	<i>HV I</i>	nicht-kodierend	Polymorphismus
2	16223T*	<i>HV I</i>	nicht-kodierend	Tumor
1	16256T	<i>HV I</i>	nicht-kodierend	Polymorphismus
2	16257A	<i>HV I</i>	nicht-kodierend	Polymorphismus
2	16261T	<i>HV I</i>	nicht-kodierend	Polymorphismus
1, 3	16270T	<i>HV I</i>	nicht-kodierend	Polymorphismus
3	16304C*	<i>HV I</i>	nicht-kodierend	u. a. Brust- & Prostata-Tumor
2	16311C*	<i>HV I</i>	nicht-kodierend	Prostata-Tumor
1	16526A	<i>7S DNA</i>	nicht-kodierend	Polymorphismus

1: HE0158S; 2: MC0151S; 3: MS0169S; somatische Mutationen

14 Mutationen (39 %) fanden sich in den Protein-kodierenden Bereichen des mitochondrialen Genoms. Diese Mutationen waren gleichmäßig im mitochondrialen Genom verteilt. Das gehäufte Auftreten von Mutationen in einem bestimmten Genlocus wurde nicht festgestellt.

Proteine sind lineare Polymere, bestehend aus Aminosäuren, welche in einer Kette miteinander verbunden sind. Die Aminosäuren unterscheiden sich voneinander durch ihre Seitenketten (Rest-Gruppe), welche in Größe, Gestalt, Ladung, sowie Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophober Disposition und ihrer chemischen Reaktivität variieren. Die dreidimensionale Struktur der Proteine wird durch die Abfolge der Aminosäuren und deren Seitenketten bestimmt. Bereits die Größe und die Form der Rest-Gruppen haben einen Einfluss auf die Proteinstruktur, die durch zusätzliche Bindungen zwischen den Seitenketten stabilisiert wird. Aus dieser hoch komplexen Struktur resultiert die biologische Proteinfunktion. Veränderungen in der Aminosäure-Sequenz und der damit verbundenen Seitenketten-Variation bewirken Änderungen zwischen den intramolekularen Reaktionen der Restgruppen, eine Formveränderung des Proteins und einen möglichen Funktionsverlust. Die Aminosäuresequenz legt die Sekundärstruktur der Proteine lediglich zu 60 bis 70 % fest. Der Rest wird durch Wechselbeziehungen über größere Distanzen, wie bei der Tertiärstruktur bestimmt. Aus diesem Grund kann die dreidimensionale Proteinstruktur nur schwer über die Abfolge der Aminosäuren vorhergesagt werden [Berg *et al.* 2007, 27-70].

Die Insertion eines Adenins an Position 3229, aufgrund derer die Probe MC0159S sequenziert wurde, ist nicht in der MITOMAP-Datenbank aufgeführt, bei den übrigen Mutationen handelte es sich um Substitutionen (Tabelle 45).

12 Mutationen waren in der MITOMAP-Datenbank beschrieben, führten zu einem Aminosäure-Austausch oder waren synonym.

Die beiden in der Datenbank nicht aufgeführten Transitionen an den Positionen 3571 und 3580 führten zu einer Änderung des jeweiligen Aminosäurecodes. Die Auswirkungen der Mutationen auf die Funktionen der entsprechenden Proteine sind bisher nicht bekannt. Allerdings werden auch synonyme Mutationen mit Mitochondriopathien assoziiert [Wong 2010, Gropman *et al.* 2004, Chinnery *et al.* 2000, 2010; Wallace *et al.* 1995].

Die Ergebnisse dieses Projekts stimmen mit vorangegangenen Studien überein, welche in der D-loop Region von SIDS-Fällen eine erhöhte Mutationsrate aufdeckten [Divne *et al.* 2003]. 15 der hier durch Sequenzierung ermittelten Mutationen (42 %) wurden in der nicht-kodierenden D-loop-Region detektiert (Tabelle 45). Dieser Bereich erstreckt sich zwischen den Nukleotidpositionen 16024 und 576. Dem Sequenzabschnitt unterliegt die Kontrolle der Replikation und Transkription der mtDNA. Mutationen in diesem Bereich könnten demnach eine verminderte Anzahl an Mitochondrien oder eine veränderte Expression mitochondrialer Gene verursachen, welche den mitochondrialen Metabolismus und die oxidative Phosphorylierung beeinflussen. Die pathogenen Auswirkungen der Mutationen wurden bisher nicht detailliert beschrieben.

Die 15 homoplasmatischen Mutationen im D-loop sind in der MITOMAP-Datenbank beschrieben.

Bei sieben Mutationen handelt es sich laut Datenbank um somatische Mutationen, die mit verschiedenen Tumor-Arten in Zusammenhang gebracht werden [Stafford *et al.* 2010; Brandon *et al.* 2006; Tseng *et al.* 2006; Coskun *et al.* 2004; Kumimoto *et al.* 2004; Del Bo *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003; Attardi 2002; Chen *et al.* 2002; Maximo *et al.* 2002; Nekhaeva *et al.* 2002; Liu *et al.* 2001; Calloway *et al.* 2000; Fliss *et al.* 2000; Michikawa *et al.* 1999]. Mindestens eine dieser Mutationen findet sich in einem SIDS-Fall.

Die übrigen acht Mutationen werden als synonyme Mutationen betrachtet, da sie sich in den nicht-kodierenden Bereichen des mitochondrialen Erbguts und bis auf die Insertionen in der Poly-C-Region (303-315) nicht in dem Bereich des Replikationsursprunges befinden. Eine Cytosin-Insertion an Position 315 wurde in allen drei SIDS-Fällen detektiert.

Eine Mutation wurde im Gen der 12S rRNA nachgewiesen (3 %) und drei (8 %) in den tRNA-kodierenden Abschnitten. Mutationen in den rRNA- und tRNA-Genen können die Sekundärstruktur des RNA-Moleküls verändern, wodurch sie einen Einfluss auf den gesamten Organismus haben können. Die Cytosin-Insertion an Position 960 ist in der MITOMAP-Datenbank beschrieben und wurde mit maternal vererbter Taubheit (DEAF; *maternally inherited DEAFness*) in Zusammenhang gebracht [Elstner *et al.* 2008]. Sie bewirkt eine Leserasterverschiebung, welche einen Einfluss auf die Sekundärstruktur der 12S rRNA haben könnte.

Veränderungen der rRNA-Sekundärstrukturen können zu instabilen Untereinheiten der Ribosomen führen, sodass dessen Funktion beeinflusst wird.

Acht Prozent der Substitutionen, die in zwei SIDS-Fällen nachgewiesen wurden, befinden sich in drei verschiedenen tRNA-Genen. Die tRNA-Moleküle sind aus 74 - 94 Ribonukleotiden aufgebaut, aus denen sich die charakteristische Sekundärstruktur (Kleeblatt-Form; Abbildung 28) bildet. Die tRNA-Moleküle transportieren Aminosäuren zu den Ribosomen, wo sie die Sequenz der mRNA in Polypeptide übersetzen. Jedes der drei tRNA-Gene weist eine Mutation auf, die in der MITOMAP-Datenbank hinterlegt ist. Das mutierte Allel 4336C wird u. a. mit der Alzheimer Krankheit und Parkinson (ADPD, *Alzheimer's Disease & Parkinson's Disease*) in Verbindung gebracht [Hutchin *et al.* 1995; Wallace *et al.* 1992]. Mutationen in diesen nicht-Protein-kodierenden Bereichen können demnach eine pathogene Wirkung haben, wie in der folgenden Abbildung dargestellt:

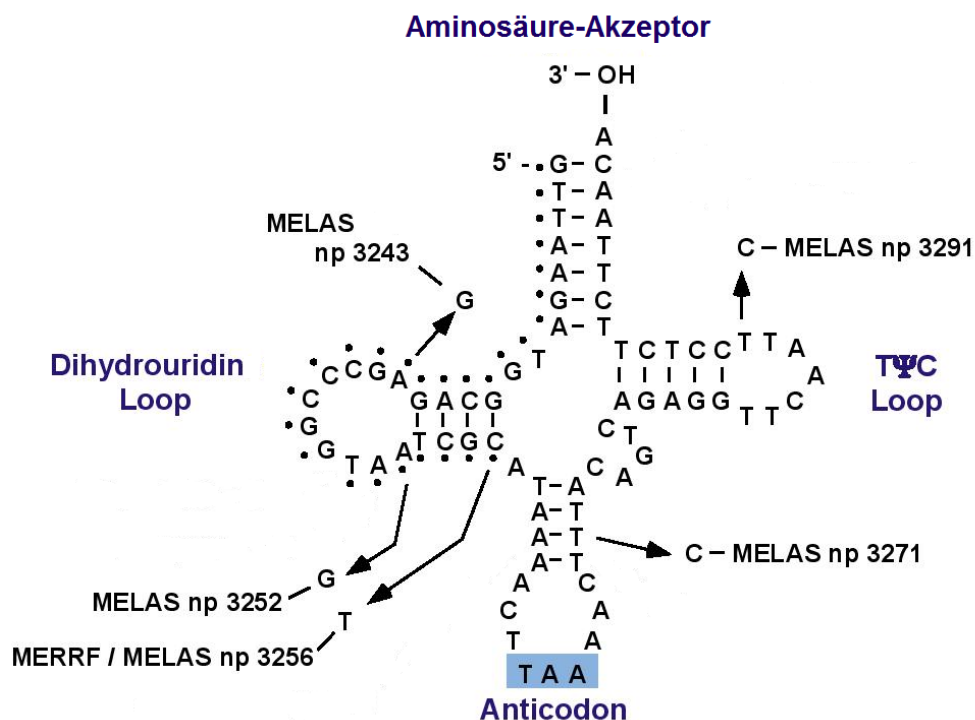


Abbildung 28: pathogene Mutationen in der tRNA^{Leu1} (nach MITOMAP)

Die mitochondrialen Gene kodieren für 13 Untereinheiten der an der Atmungskette beteiligten Proteinkomplexe. Die mitochondrial-kodierten tRNA- und rRNA-Gene sind an der Expression dieser Gene beteiligt. Mutationen im mitochondrialen Erbgut haben somit einen Einfluss auf die Funktion der Atmungskette und können im gesamten mitochondrialen Genom vorliegen. Anhand der Lokalisation der Mutationen, die zum Beispiel mit den vorgestellten Mitochondriopathien assoziiert sind, lässt sich die Ausprägung des Phänotyp häufig nicht erklären. Dieser steht vielmehr in Wechselbeziehung mit der Anzahl mutierter Mitochondrien (Heteroplasmiegrad, Schwellenwerteffekt).

4.6.3 Assoziation der Mutationen zu Krankheiten

33 der 36 detektierten Mutationen sind in der MITOMAP-Datenbank hinterlegt (Tabelle 45).

Sieben dieser mitochondrialen Mutationen werden als somatische Mutationen mit verschiedenen Tumorarten beschrieben [Stafford *et al.* 2010; Brandon *et al.* 2006; Tseng *et al.* 2006; Coskun *et al.* 2004; Kumimoto *et al.* 2004; Del Bo *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003; Attardi 2002; Chen *et al.* 2002; Maximo *et al.* 2002; Nekhaeva *et al.* 2002; Liu *et al.* 2001; Calloway *et al.* 2000; Fliss *et al.* 2000; Michikawa *et al.* 1999]. Sie befinden sich in den drei SIDS-Fällen in der nicht-kodierenden Region und könnten einen Einfluss auf den mitochondrialen Metabolismus und damit der oxidativen Phosphorylierung haben.

Eine Mutation im tRNA^{Gly}-Gen wird u. a. mit ADPD [Hutchin *et al.* 1995; Wallace *et al.* 1992] und eine weitere im 12S rRNA-Gen mit DEAF [Elstner *et al.* 2008] in Zusammenhang gebracht. Da diese Mutationen mit Krankheiten assoziiert sein sollen, könnten auch die beiden übrigen Mutation in den tRNA-Genen entsprechend assoziiert sein. Möglicherweise besteht auch ein Zusammenhang mit dem Plötzlichen Säuglingstod. Die Sequenzierung weiterer Fälle könnte zur Klärung dieser Frage beitragen.

Im Gegensatz dazu kann ein pathogener Einfluss der Neun-Basen-Insertion (CCCCCTCTA) in einer nicht Protein-kodierenden Region zwischen den Genen der Cytochrom-c-Untereinheit 2 und dem der tRNA^{Lys} ausgeschlossen werden, da

sich die Insertion in einem Sequenzbereich befindet, der weder für Proteine noch für RNA-Moleküle kodiert.

4.6.4 Mutationen in drei SIDS-Fällen

In dem folgenden Diagramm ist die Verteilung der detektierten Mutationen der drei SIDS-Fälle zusammengefasst:

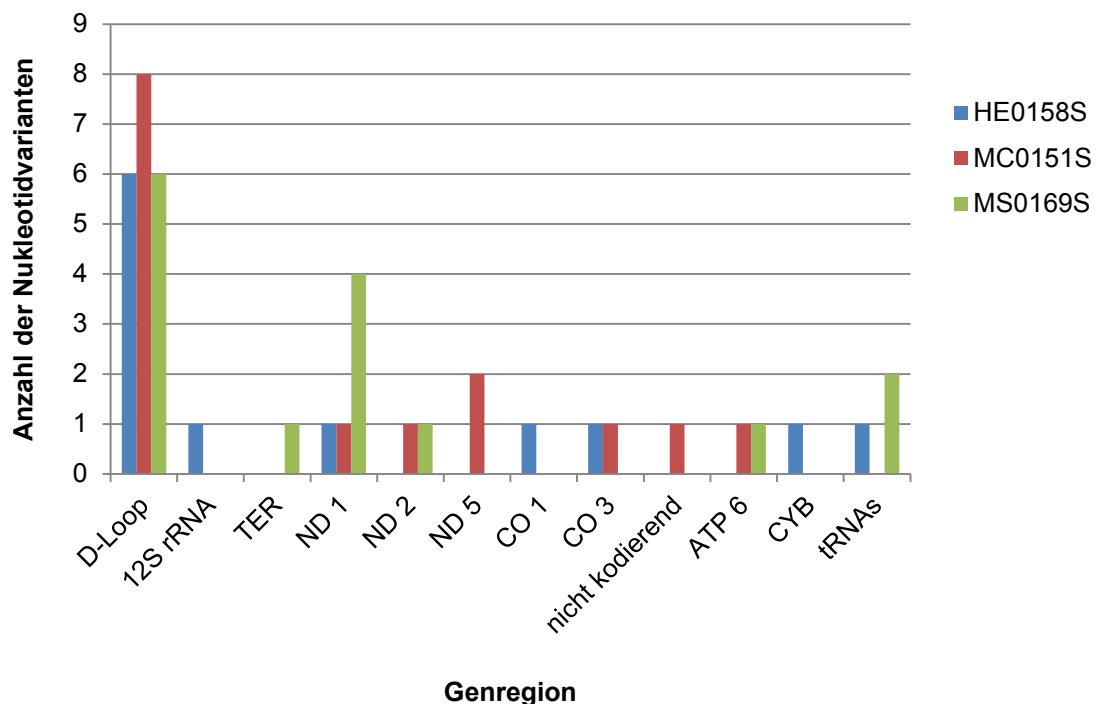


Abbildung 29: Mutationen in drei SIDS-Fällen

In dem SIDS-Fall HE0158S wurden 11 Mutationen detektiert. Von diesen 11 befinden sich sechs in der nicht-kodierenden Kontrollregion. Zwei Mutationen wurden in RNA-kodierenden Genen detektiert, die Mutation im Gen der 12S rRNA ist mit Taubheit assoziiert [Elstner *et al.* 2008]. Beide Mutationen könnten die entsprechende RNA-Sekundärstruktur beeinflussen und mit Krankheiten assoziiert sein. Zwei synonyme Mutationen sind in den Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidoreduktase lokalisiert. Zwei weitere Mutationen im Cytochrom b-Gen bewirken einen Austausch biochemisch identischer Aminosäuren.

Der SIDS-Fall MC0151S weist 15 Mutationen auf, davon über die Hälfte in der nicht-kodierenden Region. Eine Insertion und eine Substitution konnten allerdings in der Promoter-Region des H-Stranges detektiert werden. Ein Einfluss auf die Replikation des mitochondrialen Genoms kann demnach nicht ausgeschlossen werden. Die in der Untereinheit 5 der NADH-Dehydrogenase detektierten Mutationen wurden nur in dieser Probe lokalisiert. Eine der beiden Mutationen ist synonym, hat demnach keine biochemischen Auswirkungen. Die zweite Mutation bewirkt den Austausch einer polaren gegen eine unpolare Aminosäure. Durch diesen Tausch zweier biochemisch verschiedener Aminosäuren wird die Sekundärstruktur der jeweiligen Proteine beeinflusst.

Beim SIDS-Fall MS0169S konnten 14 Mutationen detektiert werden. Einige wurden in der nicht-kodierenden D-loop-Region nachgewiesen, eine davon im Replikationsursprung des H-Stranges. Die Wahrscheinlichkeit einer veränderten Replikation des mitochondrialen Genoms wird zusätzlich durch die Mutation im Transkriptions-Terminator-Gen erhöht. Eine Mutation in den tRNA-Genen ist u. a. mit der Alzheimer und der Parkinson Krankheit assoziiert [Hutchin *et al.* 1995; Wallace *et al.* 1992], die zweite wurde bisher nicht beschrieben. Beiden könnte demnach ein pathogener Einfluss zugeschrieben werden.

Alle drei SIDS-Fälle weisen zusätzlich zu ihren individuellen Mutationen eine gemeinsame auf. Die Insertion des Cytosins an Position 315 gehört der Poly-C-Region in der HV II-Region an.

Mutationen, die die Aminosäure-Sequenz der Proteine oder die Sekundärstruktur der t- oder rRNAs verändern, können von medizinischem und physiologischem Interesse sein [Coble *et al.* 2004]. Eine direkte pathogene Auswirkung lässt sich allerdings nicht ableiten, da die Auswirkungen einzelner Mutationen im mitochondrialen Genom bisher nicht dargestellt werden konnten. Diverse Krankheiten werden bereits mit mitochondrialen Mutationen, welche einen Einfluss auf Proteine, die Proteinsynthese und damit die ATP-Bildung haben, in Zusammenhang gebracht.

Eine mitochondriale Dysfunktion kann als Ursache für den Plötzlichen Säuglingstod nicht ausgeschlossen werden. Die Erkenntnisse dieser Arbeit zusammen mit denen weiterer Studien zeigen, dass eine potentielle

mitochondriale Dysfunktion in den meisten Fällen nicht auf nur eine spezielle Mutation im mitochondrialen Genom zurückgeführt werden kann. Mutationen können allerdings als prädisponierender Faktor unter bestimmten äußeren Einflüssen zu einem erhöhten SIDS-Risiko führen. An der Hauptfunktion der Mitochondrien sind Gene beteiligt, die in der nukleären DNA kodiert sind. Demnach könnten Mutationen sowohl in nukleären als auch in den mitochondrialen Genen gemeinsam mit äußeren Faktoren in Zusammenhang mit dem Plötzlichen Säuglingstod stehen. Unter der Annahme, dass es sich bei dem Plötzlichen Säuglingstod um ein multifaktorielles Ereignis handelt und bisher wenige Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen mitochondrialen Mutationen und dem Syndrom gefunden wurden, sind weitere Untersuchungen unter Einbezug des nukleären Genoms und äußeren Risikofaktoren zur Klärung notwendig.

4.6.5 Möglichkeiten und Grenzen dieser Arbeit

Bei dem *Multiplex-Minisequencing*-Analyseverfahren handelt es sich um eine schnelle, einfache und kostengünstige Methode bestimmte Nukleotidvarianten zu untersuchen. Die Auswahl der für den pathogenen Assay gewählten Mutationen basiert auf Publikationen, die Mutationen im mitochondrialen Genom mit Krankheiten bzw. dem Plötzlichen Säuglingstod in Zusammenhang gebracht haben. Sieben der 17 mit SIDS-assoziierten Mutationen konnten zusätzlich zu den vier bereits bekannten Polymorphismen des Haplogruppen-Assays als haplogruppenassoziierte Polymorphismen identifiziert werden. Bei Mutationen, welche mit Krankheiten assoziiert wurden, sollten haplogruppenassoziierte Polymorphismen bedacht werden.

Ursprünglich sollten degradierte FFPE-Proben für die *Multiplex-Minisequencing*-Analysen verwendet werden. Aus diesem Grund wurde der Assay so konstruiert, dass die maximale Fragmentlänge der Amplikone weniger als 200 bp betrug. Auch wenn es nach Calvignac *et al.* 2011 keinen Einfluss einer Co-Amplifikation von NUMTs gibt, sollte das Risiko zusätzlich durch Multiplex-Primer mit einer mtDNA-spezifischen Bindungsfähigkeit verringert werden. Diese mtDNA-spezifische

Bindungsfähigkeit ließ sich mittels „BLAST-Software“ nicht für alle Fragmente zu 100% erfüllen. Bei den verwendeten gefrorenen Gewebeproben hätte eine PCR zur Amplifikation langer spezifischer Fragmente („*long-range*“ PCR) die mt-Spezifität zusätzlich erhöht [Calvignac *et al.* 2010]. Die Primer-Bindung könnte bei mitochondriendepletierten Zellen (rho-Null-Zellen) auf ihre Spezifität getestet werden.

Während des Screenings traten bei beiden *Multiplex-Minisequencing*-Analyseverfahren in einigen Elektropherogrammen drei identische unspezifische Peaks bis ca. 35 bp im Farbkanal für Guanin und Adenin auf. Sie wurden nach der kapillargelelektrophoretischen Untersuchung von STRs detektiert und verloren während der Analyse mehrerer SNP-Proben an Intensität. Es handelte sich demnach um Artefakte, die durch die Kapillargelelektrophorese von STR-Profilen verursacht wurden. Um diesen Artefakten vorzubeugen, sollten STR- und SNP-Analysen wenn möglich auf getrennten Sequenziergeräten untersucht werden bzw. SNP- den STR-Analysen vorangehen.

Die mittels *Multiplex-Minisequencing*-Analyseverfahren und Sequenzierung detektierten Nukleotidvarianten waren ausnahmslos homoplasmatisch. Mit der Methode der Sequenzierung sind geringgradige Heteroplasmien aufgrund der Heteroplasmie-Nachweisgrenze (20 %) nicht immer sicher detektierbar.

Die Qualität aller in diesem Projekt angewandten Untersuchungsverfahren wurde durch umfassende Kontrollen gesichert. Das Mitführen einer Leerkontrolle diente dem Überprüfen von Kontaminationen. Durch die Amplifikations-Positivkontrolle wurde die Reaktion kontrolliert. Die Ergebnisse der *Multiplex-Minisequencing*-Verfahren wurden durch die Analyse mindestens zwei verschiedener Gewebearten eines SIDS-Falles abgesichert. Die vier haplogruppenspezifischen Polymorphismen in beiden Verfahren dienten der internen Kontrolle. In die Auswertung der Sequenzierungen wurden alle Mutationen einbezogen, die durch die Sequenzierung der Fragmente in 5'-3'-Richtung des H-Stranges und 5'-3'-Richtung des L-Stranges oder den überlappenden Bereichen benachbarter Fragmente detektiert wurden und somit doppelt bestimmt waren.

Im Vergleich zu vorherigen Studien konnte mit dem effektiven *Multiplex-Minisequencing*-Analyseverfahren ein großer Proben-Umfang aus SIDS- und Kontrollfällen untersucht werden. Die Proben der GeSID-Studie waren genauen Fall-Analysen unterzogen worden, sodass die Qualität der zur Verfügung gestellten SIDS-Fälle gesichert war.

Die Sequenzierungen des gesamten mitochondrialen Genoms lieferten Hinweise auf mögliche pathogene Effekte. Unter der Annahme, dass es sich bei dem Plötzlichen Säuglingstod um ein multifaktorielles Ereignis handelt und bisher keine Verbindungen zu mitochondrialen Mutationen gefunden wurden, scheint für die Analyse des genetischen Aspekts des Plötzlichen Säuglingstods die Sequenzierung des mitochondrialen Genoms ohne die Analyse nukleärer DNA nicht auszureichen. Das entwickelte Verfahren zur Sequenzierung des mitochondrialen Genoms ist an die Labor-Ausstattung eines forensisch arbeitenden DNA-Labors angepasst. Es sind keine zusätzlichen kostenintensiven Analysegeräte notwendig und die Kenntnisse der forensischen Routine-Arbeit können angewandt werden.

Die Sequenzierung basierend auf der Kettenabbruch-Reaktion nach Sanger eignet sich zur Überprüfung anderer Untersuchungsverfahren. Wie bereits die Kontrolle der mittels pathogenem Assay detektierten Nukleotidvarianten durch die Sequenzierung der entsprechenden Fragmente verdeutlichte, ist eine zweite Methode zur Bestätigung von Befunden häufig erforderlich.

5. Ausblick

Die FSID (*Foundation for the Study of Infant Deaths*), eine in England ansässige Nicht-Regierungs-Organisation, verfolgt das Ziel, plötzliche Säuglingstodesfälle zu verhindern und die Gesundheit von Säuglingen zu unterstützen. Sie fördert derzeit u. a. eine „Whole Genome“ Assoziationsstudie zum Plötzlichen Säuglingstod. Diese wird unter Zusammenarbeit führender Spezialisten durchgeführt. 333 SIDS-Fälle aus der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten GeSID-Studie und 100 zusätzliche Fälle des Sheffield Children's Krankenhauses werden einer Kontrollgruppe bestehend aus 1.500 lebenden Säuglingen des in Deutschland durchgeführten „National Genome Research Project“ gegenübergestellt.

Bei dieser Assoziationsstudie wird systematisch das gesamte Genom (nDNA und mtDNA) der beiden Gruppen analysiert und verglichen. Es sollen erste Hinweise auf eine genetische Ursache des Plötzlichen Säuglingstodes geliefert werden.

Die Ergebnisse der Genom-Analysen werden in Datenbanken gespeichert, verglichen und nach Genvarianten durchsucht. Spezielle Computerprogramme unterscheiden Genvarianten von Sequenzierfehlern. Datenbanken und spezielle Programme bringen Variationen mit Genen in Verbindung.

Das Ziel ist es, neue bedeutende Gene ebenso wie häufige modifizierte Genvarianten zu identifizieren. Auffällige Ergebnisse sollten durch eine zweite Sequenziermethode, wie z. B. die in dem vorliegenden Projekt verwendete Kettenabbruch-Reaktion nach Sanger, bestätigt werden. Die Identifizierung neuer bedeutender Gene und Genvarianten wird der SIDS-Forschung neue wichtige pathophysiologische Krankheitsverläufe aufzeigen und zu neuen Herangehensweisen an molekulare Abläufe einer Krankheit führen.

Viele humane Krankheiten basieren auf einem komplexen Zusammenspiel von Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen. Beim Plötzlichen Säuglingstod können äußere Risikofaktoren den Auslöser darstellen. Diese könnten die Homöostase des Säuglings negativ beeinflussen. Die individuelle Säuglings-Anfälligkeit wird dabei nicht durch den Auslöser bestimmt, sondern durch Wechselbeziehungen mit verschiedenen Genen und den kodierten Proteinen.

Eine weitere wichtige Methode in diesem Zusammenhang sind In-vitro-Assays, mit denen die Eigenschaften von Proteinen studiert werden. Es lässt sich erkennen,

ob eine Mutation in einem Gen zu einer veränderten Funktion des Genproduktes führt.

Liegt ein genetischer Risiko-Faktor vor und kann dieser restlos aufgeklärt werden, könnte nach der Geburt eines Kindes im Rahmen einer weiteren Routineuntersuchung gezielt nach potentiell pathogenen SIDS-Mutationen gesucht werden. Dafür wäre das schnelle, einfache und kostengünstige *Multiplex-Minisequencing*-Analyseverfahren geeignet. Die pathogenen Auswirkungen detektierter Mutationen könnten medikamentös und/oder durch besondere Pflege- und Sicherheitsmaßnahmen neutralisiert und damit der Plötzliche Säuglingstod verhindert werden [Courts *et al.* 2010; SNPs: Die große Bedeutung der kleinen Unterschiede“; 86 - 97].

Literaturverzeichnis

- Allen RC**, Graves G, Budowle B. Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *Biotechniques*. 1989;7(7):736-744.
- Anderson S**, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin AR, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457-465.
- Andrews RM**, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999;23(2):147.
- Arnestad M**, Opdal SH, Musse MA, Vega A, Rognum TO. Are substitutions in the first hypervariable region of the mitochondrial DNA displacement-loop in sudden infant death syndrome due to maternal inheritance?. *Acta Paediatr*. 2002;91(10):1060-1064.
- Attardi G**. Role of mitochondrial DNA in human aging. *Mitochondrion*. 2002;2(40545):27-37.
- Bajanowski T**, Brinkmann B, Vennemann M. The San Diego definition of SIDS: practical application and comparison with the GeSID classification. *Int J Legal Med*. 2006;120(6):331-336.
- Bajanowski T**, Vennemann M, Bohnert M, Rauch E, Brinkmann B, Mitchell EA, GeSID Group. Unnatural causes of sudden unexpected deaths initially thought to be sudden infant death syndrome. *Int J Legal Med*. 2005;119(4):213-216.
- Bajanowski T**, Poets C. Der Plötzliche Säuglingstod – Epidemiologie, Ätiologie, Pathophysiologie und Differenzialdiagnostik. *Dtsch Arztebl*. 2004;101(47):3185-3190.
- Bajanowski T**, Kleemann WJ. Der plötzliche Kindstod. *Rechtsmedizin*. 2002;12:233-248.
- Beckwith JB**. Defining the Sudden Infant Death Syndrome. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2003;157(3):286-290.
- Berg JM**, Tymoczko JL, Stryer L. Stryer Biochemie. *Spektrum*. 2007;6.Auflage;S. 22-70, S. 560-602.
- Blakely EL**, Mitchell AL, Fisher N, Meunier B, Nijtmans LG, Schaefer AM, Jackson MJ, Turnbull DM, Taylor RW. A mitochondrial cytochrome b mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in humans and yeast. *FEBS J*. 2005;272(14):3583-3592.

- Blum H**, Beier H, Gross HS. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 1987;8:93-99.
- Brandon M**, Baldi, P, Wallace DC. Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*. 2006;25(34):4647-4662.
- Brookes AJ**. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234(2):177-186.
- Brugada R**, Brugada J, Brugada P. Clinical approach to sudden cardiac death syndromes. *Springer*. 2010.1.Auflage;S. 7-21.
- Butler JM**. Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology. *Elsevier*. 2012;1.Auflage;S. 49-68, S. 69-98, S. 347-369, S. 405-456.
- Byard RW**, Lee V. A re-audit of the use of definitions of sudden infant death syndrome (SIDS) in peer-reviewed literature. *J Forensic Leg Med*. 2012;19(8):455-456.
- Byard RW**, Marshall D. An audit of the use of definitions of sudden infant death syndrome (SIDS). *J Forensic Leg Med*. 2007;14(8):453-455.
- Byard RW**, Krous HF. Sudden Infant Death Syndrome: Overview and Update. *Pediatr Dev Pathol*. 2003;6(2):112-127.
- Calloway CD**, Reynolds RL, Herrin GL, Anderson WW. The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. *Am J Hum Genet*. 2000;66(4):1384-1397.
- Calvignac S**, Konecny L, Malard F, Douady CJ. Preventing the pollution of mitochondrial datasets with nuclear mitochondrial paralogs (numts). *Mitochondrion*. 2011;11(2):246-254.
- Carpenter RG**, Irgens LM, Blair PS, England PD, Fleming P, Huber J, Jorch G, Schreuder P. Sudden unexplained infant death in 20 regions in Europe: case control study. *Lancet*. 2004;363(9404):185-191.
- Chen JZ**, Gokden N, Greene GF, Mukunyadzi P, Kadlubar FF. Extensive somatic mitochondrial mutations in primary prostate cancer using laser capture microdissection. *Cancer Res*. 2002;62(22):6470-6474.
- Chinnery PF**. Mitochondrial Disorders Overview. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2000 Jun 08 [updated 2010 Sep 16].
- Chinnery PF**, Douglas MT. Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis of human disease. *Mol Med Today*. 2000;6(11):425-432.
- Coble MD**, Just RS, O'Callaghan JE, Letmanyi IH, Peterson CT, Irwin JA, Parsons TJ. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int J Legal Med*. 2004;118(3):137-146.

- Coskun PE**, Beal MF, Wallace DC. Somatic mitochondrial DNA control region mutations are prevalent in Alzheimer Disease brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(29):10726-10731.
- Courts C**, Madea B. Genetics of the sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int*. 2010;203(1-3):25-33.
- Darai G**, Handermann M, Sonntag HG, Zöller L. Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 2012;4. Auflage:931.
- Deixler E**. ATP-Depletion durch Hyperventilation, Gewebhypoxie und Hypermetabolismus als Ursache für Plötzlichen Kindstod – eine Hypothese. *Z Geburtshilfe Neonatol*. 2009;213(4):122-134.
- Del Bo R**, Bordoni A, Sciacco M, Di Fonzo A, Galbiati S, Crimi M, Bresolin N, Comi GP. Remarkable infidelity of polymerase gammaA associated with mutations in POLG1 exonuclease domain. *Neurology*. 2003;61(7):903-908.
- DiMauro S**, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet*. 2001;106(1):18-26.
- Divne A-M**, Rasten-Almqvist P; Rajs J, Gyllensten U, Allen M. Analysis of the mitochondrial genome in the sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr*. 2003;92(3):386-388.
- Dugan KA**, Lawrence HS, Hares DR, Fisher CL, Budowle B. An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. *J Forensic Sci*. 2002; 47(4):811 – 818.
- Elstner M**, Schmidt C, Zingler VC, Prokisch H, Bettecken T, Elson JL, Rudolph G, Bender A, Halmagyi GM, Brandt T, Strupp M, Klopstock T. Mitochondrial 12S rRNA susceptibility mutations in aminoglycoside-associated and idiopathic bilateral vestibulopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377(2):379-383.
- Filiano J**, Kinney HC. A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Biol Neonate*. 1994;65(3-4):194-197.
- Findeisen M**, Vennemann M, Brinkmann B, Ortmann C, Röse I, Köpcke W, Jorch G, Bajanowski T. German study on sudden infant death (GeSID): design, epidemiological and pathological profile. *Int J Legal Med*. 2004;118(3):163-169.
- Fliss MS**, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, Jen J, Sidransky D. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science*. 2000;287(5460):2017-2019.
- Goios A**, Prieto L, Amorim A, Pereira L. Specificity of mtDNA-directed PCR-influence of Nuclear MTDNA insertion (NUMT) contamination in routine samples and techniques. *Int J Legal Med*. 2008;122(4):341-345.

- Gropman A**, Chen T-J, Perng C-L, Krasnewich D, Chernoff E, Tiffit C, Wong L-JC. Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation. *Am J Med Genet A*. 2004;124A(4):377-382.
- Guntheroth WG**, Spiers PS. The Triple Risk Hypotheses in Sudden Infant Death Syndrome. *Pediatrics*. 2002;110(5):1-6.
- Hauck FR**, Tanabe KO. International Trends in Sudden Infant Death Syndrome: Stabilization of Rates Requires Further Action. *Pediatrics*. 2008;122(3):660-666.
- Hofmann S**, Jaksch M, Bezold R, Mertens S, Aholt S, Paprotta A, Gerbitz KD. Population genetics and disease susceptibility: characterization of central European haplogroups by mtDNA gene mutations, correlation with D loop variants and association with disease. *Hum Mol Genet*. 1997;6(11):1835-1846.
- Hunt CE**, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *CMAJ*. 2006;174(13):1861-1869.
- Hunt CE**. Gene-environment interactions: implications for sudden unexpected deaths in infancy. *Arch Dis Child*. 2005;90(1):48-53.
- Hunt CE**. Genes and Sudden Infant Death Syndrome. *Pediatr Res*. 2004;56(3):321-322.
- Hutchin T**, Cortopassi G. A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1995;92(15):6892-6895.
- Jaksch-Angerer M**, Hofmann S, Bauer MF, Gempel K, Obermaier-Kusser B, Paetzke I, Gerbitz KD. Mitochondriale Erkrankungen Biochemisch-molekularbiologische Diagnostik von Defekten der Atmungskette. *Deutsches Ärzteblatt*. 199;96:2972-2981.
- Kahn A**. Recommended clinical evaluation of infants with an apparent life-threatening event. Consensus document of the European Society for the Study and Prevention of Infant Death, 2003. *Eur J Pediatr*. 2004;163(2):108-115.
- Kelmanson IA**. An assessment of behavioural characteristics in infants who died of sudden infant death syndrome using the early infancy temperament questionnaire. *Acta Paediatr*. 1996;85(8):977-980.
- Kenney MC**, Chwa M, Atilano SR, Pavlis JM, Falatoonzadeh P, Ramirez C, Malik D, Hsu T, Woo G, Soe K, Nesburn AB, Boyer DS, Kuppermann BD, Jazwinski SM, Miceli MV, Wallace DC, Udar N. Mitochondrial DNA variants mediate energy production and expression levels for CFH, C3 and EFEMP1 genes: implications for age-related macular degeneration. *PLoS One*. 2013;8(1).
- Kinney HC**, Rognum TO, Nattie EE, Haddad GG, Hyma B, McEntire B, Paterson DS, Crandall L, Byard RW. Sudden and unexpected death in early life: proceedings of a symposium in honor of Dr. Henry F. Krous. *Forensic Sci Med Pathol*. 2012;8(4):414-425.

- Kinney HC**, Thach BT. The sudden infant death syndrome. *N Engl J Med.* 2009;361(8):795-805.
- Köhnemann S**, Pfeiffer H. Application of mtDNA SNP analysis in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet.* 2011;5(3):216-21.
- Köhnemann S**, Pennekamp P, Schmidt PF, Pfeiffer H. qPCR and mtDNA SNP analysis of experimentally degraded hair samples and its application in forensic casework. *Int J Legal Med.* 2010;124(4):337-342.
- Köhnemann S**, Hohoff C, Pfeiffer H. An economical mtDNA SNP assay detecting different mitochondrial haplogroups in identical HVR 1 samples of Caucasian ancestry. *Mitochondrion.* 2009;9(5):370-375.
- Krous HF**. Sudden Unexpected Death in Infancy and the Dilemma of Defining the Sudden Infant Death Syndrome. *Current Pediatric Reviews.* 2010;6:5-12.
- Krous HF**, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlick R, Keens TG, Mitchell EA. Sudden Infant Death Syndrome and Unclassified Sudden Infant Deaths: A Definitional and Diagnostic Approach. *Pediatrics.* 2004;114(1):234-238.
- Kuiken C**, Yusim K, Boykin L, Richardson R. The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics.* 2005;21(3):379-384.
- Kumimoto H**, Yamane Y, Nishimoto Y, Fukami H, Shinoda M, Hatooka S, Ishizaki K. Frequent somatic mutations of mitochondrial DNA in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2004;108(2):228-231.
- Liu VW**, Shi HH, Cheung AN, Chiu PM, Leung TW, Nagley P, Wong LC, Ngan HY. High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 2001;61(16):5998-6001.
- Mage DT**. Do infants die of sudden infant death syndrome (SIDS) with long QT syndrome (LQTS) or from LQTS?. *Pediatr Cardiol.* 2012a;33(8):1472.
- Mage DT**, Donner EM, Vennemann M, Fleming P, Sol-Church K, Drake R, Gulino SP. All sudden unexplained infant respiratory deaths may result from the same underlying mechanism. *Scandinavian Journal of Forensic Science.* 2012b;18(1):1-9.
- Mammucari C**, Rizzuto R. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(7-8):536-543.
- Maximo V**, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hurthle cell tumors. *Am J Pathol.* 2002;160(5):1857-1865.
- McKenna JJ**, Gettler LT. Co-sleeping, breastfeeding and Sudden Infant Death Syndrome. *Encyclopedia on Early Childhood Development.* 2010:1-10.

- Michikawa Y**, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science*. 1999;286(5440):774-779.
- Moon RY**, Horne RSC, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *Lancet*. 2007;370(9598):1578-1587.
- Mühlhardt C**. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. *Spektrum Akademischer Verlag*. 2003;4. Auflage:79-83.
- Nekhaeva E**, Bodyak ND, Kravtsov Y, McGrath SB, Van Orsouw NJ, Pluzhnikov A, Wei JY, Vijg J, Khrapko K. Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(8):5521-5526.
- Opdal SH**, Rognum TO. Gene variants predisposing to SIDS: current knowledge. *Forensic Sci Med Pathol*. 2011;7(1):26-36.
- Opdal SH**, Vege A, Arnestad M, Musse MA, Rognum TO. Mitochondrial tRNA genes and flanking regions in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr*. 2007;96(2):211-214.
- Opdal SH**, Rognum TO. The Sudden Infant Death Syndrome Gene: Does It Exist?. *Pediatrics*. 2004;114(4):506-512.
- Opdal SH**, Vege A, Egeland T, Musse MA, Rognum TO. Possible role of mtDNA mutations in sudden infant death. *Pediatr Neurol*. 2002;27(1):23-29.
- Opdal SH**, Rognum TO, Torgersen H, Vege A. Mitochondrial DNA point mutations detected in four cases of sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr*. 1999;88(9):957-960.
- Opdal SH**, Rognum TO, Vege A, Stave AK, Dupuy BM, Egeland T. Increased number of substitutions in the D-loop of mitochondrial DNA in the sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr*. 1998;87(10):1039-1044.
- Paneto GG**, Köhnemann S, Martins JA, Cicarelli RMB, Pfeiffer H. A single multiplex PCR and SNaPshot minisequencing reaction of 42 SNPs to classify admixture populations into mitochondrial DNA haplogroups. *Mitochondrion*. 2011;11(2):296-302.
- Parson W**. Bedeutung der mtDNA-Analyse für forensische Fragestellungen. *Rechtsmedizin*. 2009;19:183-194.
- Poets CF**, Urschitz MS, von Bodman A. Pathophysiologische Erklärungsmodelle zum plötzlichen Säuglingstod. *Monatsschrift Kinderheilkunde*. 2003;151:504-509.
- Raghupathi R**. A novel mitochondrial DNA (mtDNA) mutation significantly attenuates transcription termination in a patient with a mitochondrial myopathy. Dissertation, Flinders University, School of Medicine, Dept. of Human Physiology, Centre for Neuroscience. 2011.

- Reeve AK**, Krishnan KJ, Turnbull D. Mitochondrial DNA mutations in disease, aging, and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147:21-29.
- Rolf B**, Wiegand P. Analyse biologischer Spuren, Teil III: Mitochondriale DNA und Y-chromosomale STR, *Rechtsmedizin.* 2004;14:473-484.
- Rowther FB**, Kardooni H, Warr T. Touch-up gradient amplification method. *J Biomol Tech.* 2012;23(1):1-3.
- Santorelli FM**, Schlessel JS, Slonim AE, DiMauro S. Novel mutation in the mitochondrial DNA tRNA glycine gene associated with sudden unexpected death. *Pediatr Neurol.* 1996;15(2):145-149.
- Saraste M**, Walker JE. Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett.* 1982;144(2):250-254.
- Schon EA**, Bonilla E, DiMauro SJ. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *Bioenerg Biomembr.* 1997;29(2):131-49.
- Schönfeld P**. Die zitterfreie Thermogenese. *Chemie in unserer Zeit.* 2002;1:54-60.
- Stafford P**, Chen-Quin EB. The pattern of natural selection in somatic cancer mutations of human mtDNA. *J Hum Genet.* 2010;55(9):605-612.
- Stewart JE**, Aagaard PJ, Pokorak EG, Polansky D, Budowle B. Evaluation of a multicapillary electrophoresis instrument for mitochondrial DNA typing. *J Forensic Sci.* 2003;48(3):571-580.
- Stuart JA**, Brown MF. Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757(2):79-89.
- Sullivan FM**, Barlow SM. Review of risk factors for sudden infant death syndrome. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2001;15(2):144-200.
- Taylor RW**, Jobling MS, Turnbull DM, Chinnery PF. Frequency of rare mitochondrial DNA mutations in patients with suspected Leber's hereditary optic neuropathy. *J Med Genet.* 2003;40(7):e85.
- Tseng LM**, Yin PH, Chi CW, Hsu CY, Wu CW, Lee LM, Wei YH, Lee HC. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006;45(7):629-638.
- Vallone PM**, Butler JM. Auto Dimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques.* 2004a;37(2):226-231.
- Vallone PM**, Just RS, Coble MD, Butler JM, Parsons TJ. A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int J Legal Med.* 2004b;118(3):147-157.
- Vennemann MM**, Bajanowski T, Brinkmann B, Jorch G, Sauerland C, Mitchell EA, GeSID Study Group. Sleep environment risk factors for sudden infant death syndrome: the German Sudden Infant Death Syndrome Study. *Pediatrics.* 2009;123(4):1162-1170.

- Vennemann MMT**, Findeisen M, Butterfaß-Bahloul T, Jorch G, Brinkmann B, Köpcke W, Bajanowski T, Mitchell EA, The GeSID Group. Modifiable risk factors for SIDS in Germany: Results of GeSID. *Acta Paediatr.* 2005a;94(6):655-660.
- Vennemann M**, Findeisen M, Butterfaß-Bahloul T, Jorch G, Brinkmann B, Köpcke W, Bajanowski T, Richter A, Mitchell EA, The GeSID Group. Infection, health problems, and health care utilisation, and the risk of sudden infant death syndrome. *Arch Dis Child.* 2005b;90(5):520-522.
- Wallace DC**. The epigenome and the mitochondrion: bioenergetics and the environment. *Genes Dev.* 2010;24(15):1571-1573.
- Wallace DC**. Mitochondria, bioenergetics, and the epigenome in eukaryotic and human evolution. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2009;74:383-393.
- Wallace DC**. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(19):8739-8746.
- Wallace DC**. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:1175-1212.
- Walsch PS**, Metzger DA, Higushi R. Chelex[®] 100 as a medium für simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques.* 1991;10(4):506-513.
- Weese-Mayer DE**, Ackerman MJ, Marazita ML, Berry-Kravis EM. Sudden Infant Death Syndrome: Review of implicated genetic factors. *Am J Med Genet A.* 2007;143A(8):771-788.
- Wiegand P**, Domhöver J, Brinkmann B. DNA-Degradation in formalinfixierten Geweben. *Pathologe.* 1996;17:451-454.
- Willinger M**, James LS, Catz C. Defining the sudden infant death syndrome (SIDS): Deliberations of an expert panel convened by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatr Pathol.* 1991;11(5):677-684.
- Wong L-JC**. Molecular genetics of mitochondrial disorders. *Dev Disabil Res Rev.* 2010;16(2):154-162.
- Zeviani M**, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain.* 2004;127(10):2153-2172.
- Zhang J**, Asin-Cayuela J, Fish J, Michikawa Y, Bonafe M, Olivieri F, Passarino G, De Benedictis G, Franceschi C, Attardi G. Strikingly higher frequency in centenarians and twins of mtDNA mutation causing remodeling of replication origin in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(3):1116-1121.

Herstellerprotokolle

1. Applied Biosystems. ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer. *User Guide*. 2010
2. Applied Biosystems. ABI PRISM® SNaPshot™ Multiplex Kit. *Protocol*. 2010
3. Applied Biosystems. VariantSEQR™ and mitoSEQR™ Resequencing Systems. *Protocol*. 2006
4. Applied Biosystems. Quantifiler® Kits - Quantifiler® Human DNA Quantification Kit and Quantifiler® Y Human Male DNA Quantification Kit. *User Manual*. 2012
5. Macherey-Nagel. Genomic DNA from Tissue. *User Manual NucleoSpin® Tissue*. 2010
6. Millipore. Microcon® Centrifugal Filter Devices. *User Guide*. 2005
7. Mo Bio Laboratories. BIOstic™ FFPE Tissue DNA Isolation Kit. *Instruction Manual*. 2011
8. Promega. DNA IQ™ Casework Pro Kit für Maxwell® 16. *Technical Manual*. 2010
9. QIAGEN. QIAGEN® Multiplex PCR. *Handbook*. 2010
10. QIAGEN. QIAmp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. *User Manual*. 2010
11. QIAGEN. QIAquick PCR Purification Kit. *QIAquick® Spin Handbook*. 2008
12. Roth. Phenolische DNA Aufreinigung - Hintergrund und Protokoll. *Technische Daten*. 2009; nach Sambrook, Russell. *Molecular Cloning*, 3. Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York, 2001).

Internetquellen

- <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>
→ BLAST-Software; zuletzt geprüft am 16.05.2013.
- <http://www.criticalcare.at/Statistik/Chi-Quadrat-Test.htm>
→ criticalcare.at; zuletzt geprüft am 17.05.2013.
- <http://www.cstl.nist.gov/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>
→ AutoDimer-Software; zuletzt geprüft am 11.05.2013.
- <https://www.destatis.de/DE/Startseite.html>
→ Statistisches Bundesamt, Gesundheit, Todesursachen in Deutschland, Fachserie 12, Reihe 4; zuletzt geprüft am 29.04.2013.
- <http://www.dgm.org/files/mitochon.pdf>
→ Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V.; Broschüre „Mitochondriopathien“ Juli 2009; zuletzt geprüft am 03.05.2010.
- <http://www.eupedia.com/genetics/>
→ European Prehistory, Anthropology & Genetics; zuletzt geprüft am 17.12.2012.
- <http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/fg5.html>
→ Doc Kaiser's Microbiology Homepage; zuletzt geprüft am 13.06.2013.
- <http://frodo.wi.mit.edu/>
→ Primer3-Software; zuletzt geprüft am 11.05.2013.
- <http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>
→ UCSC-Genome-Software; zuletzt geprüft am 11.05.2013.
- http://www.sids.de/cms/dokumente/Gesundheit_von_Mutter_und_Kind_Broschuere_2_Aufl.pdf
→ Landesinitiative NRW 2006, Broschüre „Gesundheit von Mutter und Kind“; zuletzt geprüft am 17.05.2013.
- <http://www.MITOMAP.org/MITOMAP>
→ MITOMAP-Datenbank; zuletzt geprüft am 12.05.2013.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: überarbeitete „ <i>Triple-Risk-Hypothesis</i> “ (nach Filiano und Kinney 1994)	6
Abbildung 2: Fall-Klassifizierung der GeSID-Studie (nach Findeisen <i>et al.</i> 2004).....	8
Abbildung 3: Das mitochondriale Genom (nach Butler 2012).....	12
Abbildung 4: oxidative Phosphorylierung (nach Doc Kaiser's Microbiology Home Page) .	14
Abbildung 5: Extraktion „Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit“	27
Abbildung 6: Extraktion „BIOstic™ FFPE Tissue DNA Isolation Kit“	29
Abbildung 7: Entparaffinierung Xylol	30
Abbildung 8: Extraktion Chelex	30
Abbildung 9: Extraktion Phenol-Chloroform	31
Abbildung 10: Extraktion „Nucleo Spin® Tissue Kit“	32
Abbildung 11: Extraktion „QIAmp® DNA Mini Kit“	33
Abbildung 12: <i>Real-Time</i> PCR (nach Butler 2012).....	35
Abbildung 13: Aufreinigung „MICROCON® Centrifugal Filter Devices“	37
Abbildung 14: Aufreinigung „QIAquick PCR Purification Kit“	38
Abbildung 15: Überblick über das <i>Multiplex-Minisequencing</i> -Analyseverfahren	39
Abbildung 16: Silbernitrat-Färbung.....	46
Abbildung 17: SNaPshot-Multiplex-PCR	48
Abbildung 18: Überblick über die Sequenzierung.....	50
Abbildung 19: Sequenzierreaktion	54
Abbildung 20: Polyacrylamid-Gel - Auswahl einer Entparaffinierungsmethode	58
Abbildung 21: Vorversuche Extraktion - nDNA-Ausbeute (ng)	60
Abbildung 22: Vorversuche Extraktion - mtDNA-Ausbeute (mtDNA-Kopienzahl)	61
Abbildung 23: Elektropherogramm - 32 mt-Haplogruppen-Polymorphismen	64
Abbildung 24: mitochondriale Haplogruppen-Verteilung.....	68
Abbildung 25: Elektropherogramm - Analyse 37 potentiell pathogener Mutationen.....	69
Abbildung 26: Verteilung potentiell pathogener mitochondrialer Mutationen	74
Abbildung 27: Verteilung nachgewiesener Mutationen.....	88
Abbildung 28: pathogene Mutationen in der tRNA ^{Leu1} (nach MITOMAP).....	105
Abbildung 29: Mutationen in drei SIDS-Fällen.....	107
Abbildung A 1: Protokoll <i>Multiplex-Minisequencing</i> -Analyseverfahren	
Abbildung A 2: Protokoll Sequenzierung	

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SIDS-Differentialdiagnosen (nach Bajanowski <i>et al.</i> 2002).....	1
Tabelle 2: Klassifizierung von SIDS-Fällen (nach Krous <i>et al.</i> 2004).....	3
Tabelle 3: Lebendgeburten, Säuglingssterblichkeit und SIDS-Fälle in Deutschland.....	5
Tabelle 4: Gene mit Mutationen in SIDS-Fällen (nach Hunt 2005).....	10
Tabelle 5: Enzym-Komplexe der oxidativen Phosphorylierung.....	14
Tabelle 6: Untersuchungsmaterial.....	21
Tabelle 7: Quantifizierung der nDNA - Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen.....	34
Tabelle 8: Quantifizierung der mtDNA - Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen.....	36
Tabelle 9: mit Mitochondriopathien/SIDS assoziierte Mutationen.....	41
Tabelle 10: Empfehlungen zum Primer-Design (nach Mühlhardt 2003).....	42
Tabelle 11: Multiplex-PCR I - Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen.....	44
Tabelle 12: Multiplex-PCR II - Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen.....	44
Tabelle 13: SNaPshot-Reaktion - Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen.....	47
Tabelle 14: Fluoreszenzmarkierungen der ddNTPs.....	48
Tabelle 15: Vergleich der „mitoSEQr TM -System“ Primer-Sequenzen mit der rCRS.....	51
Tabelle 16: Singleplex-PCR - Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen.....	52
Tabelle 17: Reaktionsansatz und Sequenzierbedingungen.....	53
Tabelle 18. Vierfeldertafel Chi ² -Test.....	55
Tabelle 19: Vorversuche Extraktion - nDNA-Ausbeute (ng).....	60
Tabelle 20: Vorversuche Extraktion - mtDNA-Ausbeute (mtDNA-Kopienzahl).....	61
Tabelle 21: Haplogruppen-Assay - Qualität des Probenmaterials.....	66
Tabelle 22: Analyse potentiell pathogener Mutationen - Qualität Probenmaterial.....	72
Tabelle 23: haplogruppenassoziierte Polymorphismen.....	75
Tabelle 24: seltene potentiell pathogene Mutationen.....	75
Tabelle 25: potentielle Deletionen.....	76
Tabelle 26: Sequenzierung mitochondrialer Abschnitte - Ergebnisse Quantifizierung.....	78
Tabelle 27: PCR-Programme für die Sequenzierung mitochondrialer Abschnitte.....	79
Tabelle 28: Ergebnisse der Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte I...82	82
Tabelle 29: Ergebnisse der Sequenzierung ausgewählter mitochondrialer Abschnitte II..83	83
Tabelle 30: Mutationen und deren Aminosäure-Einfluss.....	84
Tabelle 31: SIDS-Fälle für die Sequenzierung des mitochondrialen Genoms.....	85
Tabelle 32: haplogruppenassoziierte-Polymorphismen.....	87
Tabelle 33: haplogruppenassoziierte Mutationen.....	87
Tabelle 34: Mutationen der D-loop-Region.....	89
Tabelle 35: Mutationen im Gen der 12S rRNA.....	89

Tabelle 36: Mutationen im Gen des Transkriptions-Terminators	89
Tabelle 37: Mutationen in den Genen der NADH-Dehydrogenase-Untereinheiten	90
Tabelle 38: Mutationen in den Genen der Cytochrom-c-Oxidoreduktase-Untereinheiten	91
Tabelle 39: Mutationen im nicht-kodierenden Bereich	91
Tabelle 40: Mutationen in den Genen der ATP-Synthase-Untereinheiten	92
Tabelle 41: Mutationen im Cytochrom-b-Gen	92
Tabelle 42: Mutationen in tRNA-Genen	92
Tabelle 43: Vergleich verschiedener Entparaffinierungsmethoden	93
Tabelle 44: Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden	94
Tabelle 45: Ergebnisse Sequenzierung des mitochondrialen Genoms	102

Tabelle A 1: Lösungen

Tabelle A 2: Gelpräparation für drei PAA-Gele (9,3%)

Tabelle A 3: Haplogruppen-Analyse - Multiplex-Primer

Tabelle A 4: Haplogruppen-Analyse - SNaPshot-Primer - G/A-Farbkanäle

Tabelle A 5: Haplogruppen-Analyse - SNaPshot-Primer - C/T-Farbkanäle

Tabelle A 6: pathogene SNP-Analyse - Multiplex-Primer

Tabelle A 7: pathogene SNP-Analyse - SNaPshot-Primer - G/A-Farbkanäle

Tabelle A 8: pathogene SNP-Analyse - SNaPshot-Primer - C/T-Farbkanäle

Tabelle A 9: Sequenzier-Primer - Fragment 1 bis 23

Tabelle A 10: Sequenzier-Primer - Fragment 24 bis 46

Tabelle A 11: mitochondriale Haplogruppen-Verteilung

Tabelle A 12: Verteilung pathogener mitochondrialer Mutationen

Tabelle A 13: Ergebnisse des Haplogruppen- und pathogenen Assays

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen meinen Dank aussprechen, die mich direkt und indirekt bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. med. Heidi Pfeiffer, danke ich sehr für die Überlassung des interessanten Themas und der engagierten Unterstützung. Besonders gilt mein Dank Ihrem freundlichen, verständnisvollen Umgang und dem mir entgegengebrachten Vertrauen bezüglich der verantwortungsvollen Tätigkeiten.

Ich bedanke mich weiterhin bei Frau Prof. Dr. rer. nat Eva Liebau, Herrn Prof. Dr. rer. nat Christian Klämbt und Herrn Prof. Dr. rer. nat Bernd Dworniczak, die mir als Gutachter diese Dissertation ermöglicht haben.

Großen Dank schulde ich der GeSID-Group für die Bereitstellung des Probenmaterials und besonders Frau Prof. Dr. med. Mechtild Vennemann für Ihre tatkräftige und geduldige Unterstützung bei der Proben-Beschaffung.

Ich möchte mich bei Frau Anette Tippelt, einer hilfsbereiten Mitarbeiterin der Firma Life Technologies GmbH, für die Bereitstellung der Primersequenzen des „mitoSEQrTM-System“ bedanken.

Zusätzlich gilt mein großer Dank dem Förderverein des hiesigen Instituts, durch den ich an zahlreichen Weiterbildungen teilnehmen und somit meine fachlichen Kenntnisse im wissenschaftlichen und forensischen Bereich der Molekulargenetik erweitern konnte.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Stephan Köhnemann, der immer auf meine Ideen vertraut und sie mich selbstständig hat durchführen lassen. Gemeinsam mit Marianne Schürenkamp und Ulla Sibbing stand er mir während der gesamten Zeit engagiert zur Seite und hat mich bei anderen wissenschaftlichen Tätigkeiten sehr gefördert und gefordert. Ohne ihre beständige Hilfsbereitschaft, Unterstützung, Geduld und konstruktive Kritik wäre die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen. Für ihre enorme Hilfsbereitschaft, den unzähligen

fachlichen Diskussionen, den vielen Tipps und Tricks im Labor und für die Schaffung einer freundlichen Arbeitsatmosphäre bin ich dem Team überaus dankbar. Janosch Kretzschmann danke ich für die Umsetzung der computergestützten Auswerte-Tools. Für harmonische Laborabläufe möchte ich mich bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken.

Für die Einarbeitung in die histologische Technik danke ich den Mitarbeiterinnen der histologischen Abteilung.

Meine Familie und Freunde haben es mir ermöglicht, so weit in meinem Leben zu kommen. Ihnen danke ich von Herzen für ihre großzügige und liebevolle Unterstützung, ihr Verständnis, ihre Ausdauer und für die vielen aufmunternden und ermutigenden Worte.

Eidesstattliche Erklärung

Name: Stefanie Schumann
Matrikelnummer: 370711
Fachhochschule: Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Fachbereich: Institut für Biowissenschaften

Hiermit erkläre ich, Stefanie Schumann, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Sequenzanalyse des mitochondrialen Genoms beim
Syndrom des Plötzlichen Säuglingstodes (SIDS)“

selbstständig verfasst, nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Datum

Unterschrift

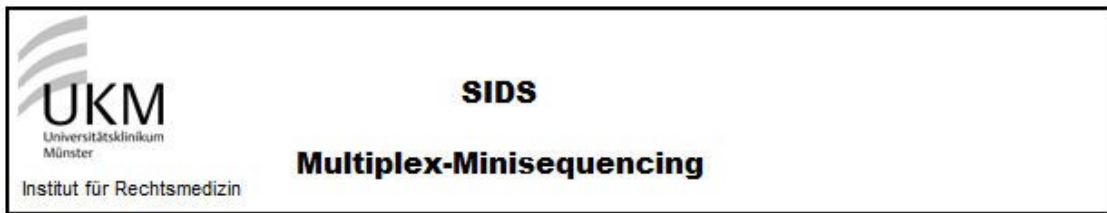
Anhang

Tabelle A 1: Lösungen

APD-Lösung (10%)	Ammoniumperoxodisulfat (APD)	5 g
	Aqua dest.	ad 50 ml
Essigsäure (7,5 %)	Essigsäure (100 %)	75 ml
	Aqua dest.	925 ml
Glycerol-Lösung (5 %)	Glycerol	25 ml
	Aqua dest.	475 ml
Natriumacetat (3 M)	Natriumacetat-Trihydrat	40,82 g
	Aqua dest.	ad 100 ml
Natriumcarbonat-Lösung	Natriumcarbonat	30 g
	Formaldehyd (37 %)	2,4 ml
	Natriumthiosulfatlösung	0,4 ml
	Aqua dest.	ad 1 l
Natriumthiosulfat-Lösung	Natriumthiosulfat	200 mg
	Aqua dest.	ad 50 ml
Puffer II	Tris (10 mM)	1,21 g
	EDTA-Na/Titriplex III (1mM)	1,74 g
	Natriumchlorid	23,38 g
	HPLC-Wasser	ad 1 l
Salpetersäure (2 %)	Salpetersäure (65 %)	30 ml
	Aqua dest.	970 ml
Silbernitrat-Lösung (0,1 %)	Silbernitrat	1 g
	Formaldehyd (37 %)	1,5 ml
	Aqua dest.	ad 1 l
TE-Puffer	Tris (10 mM)	1,21 g
	EDTA-Na/Titriplex III (1mM)	0,38 g
	Aqua dest.	ad 1 l
1x Tris-Borat-Puffer	Tris (10mM)	314,4 g
	Borsäure	43,8 g
	Aqua dest.	ad 5 l
Tris-Sulfat-Puffer (40 mM)	Schwefelsäure (100 %)	2,15 ml
	Tris (10 mM)	45 g
	Aqua dest.	ad 1 ml

Tabelle A 2: Gelpräparation für drei PAA-Gele (9,3%)

Rotiphorese® Gel 40, 29:1	10,5 ml
HPLC-Wasser	25,5 ml
Tris-Sulfat-Puffer (40 mM)	9 ml
APD-Lösung (10%)	315 µl
Tetramethylethyldiamine	15,9 µl



Multiplex-PCR	MgCl ₂	dNTP	Puffer	BSA	Ampli Taq Gold	Primer
1-fach	1,25	1,25	1,25	0,2	0,2	0,2
0	0	0	0	0	0	0

→ 5 µl MM + 1 µl DNA

SNaPshot-PCR	SNaPshot Mix	SNaPshot Primer
1-fach	1,25	0,1
0	0	0

→ 5 µl MM + 1 µl PCR-Produkt

Proben:

siehe Extraktionsprotokoll vom:

Multiplex-PCR: → 5 µl MM + 1 µl DNA Datum / Hz:

Programm (DN_GN_154): vallone ix

EXO-SAP-Verdau: + 1,25 µl MM (1 µl SAP + 0,04 µl EXO I) / Probe Datum / Hz:

Programm (DN_GN_154): verdau lang

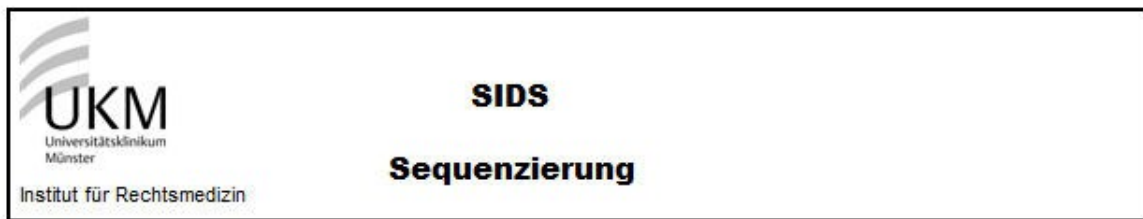
SNaPshot-PCR: → 5 µl MM + 1 µl PCR-Produkt Datum / Hz:

Programm (DN_GN_154): minisequ.

SAP-Verdau: + 1,25 µl SAP / Probe Datum / Hz:

Programm (DN_GN_154): verdau lang

Abbildung A 1: Protokoll *Multiplex-Minisequencing*-Analyseverfahren



Multiplex-PCR		MgCl ₂	dNTP	Puffer	BSA	Ampli Taq Gold	Primer	HPLC
	1-fach	1,25	1,25	1,25	0,2	0,2	0,2	0,65
	0	0	0	0	0	0	0	0

› 5 µl MM + 2 µl DNA

Sequenzier-Reaktion		HPLC	BigDye	Primer
	1-fach	6,5	2	0,5
Fwd	0	0	0	0
Rev	0	0	0	0

› 9 µl MM + 1 µl PCR-Produkt

Proben:

Multiplex-PCR: → 5 µl MM + 2 µl DNA Datum / Hz:

Programm (DN_GN_154): SIDS-PCR

EXO-SAP-Verdau: + 1,25 µl MM (1 µl SAP + 0,04 µl EXO I) / Probe Datum / Hz:

Programm (DN_GN_154): Verdau lang

Sequenzier-Reakt: → 9 µl MM + 1 µl PCR-Produkt Datum / Hz:

Programm (DN_GN_154): SIDS-SEQ

Edge Bio PERFORMA DTR Gel Filtration Cartridges Datum / Hz:

Abbildung A 2: Protokoll Sequenzierung

Tabelle A 3: Haplogruppen-Analyse - Multiplex-Primer

SNP-Position	Fragment- länge (bp)	Fwd/Rev	Basenbereich	Primersequenz (5'-3')	Tm (°C)
G709A	112	Fwd Rev	685 - 706 775 - 796	AAGATTACACATGCAAGCATCC CTAGGCTAAGCGTTTTGAGCTG	59,1 60,7
G1719A; A1811G	196	Fwd Rev	1657 - 1676 1830 - 1852	CTTGACCGCTCTGAGCTAAA GCAGAAGGTATAGGGTTAGTCC	58,4 59,4
A2706G; C2772T	157	Fwd Rev	2662 - 2685 2800 - 2818	ACTTTTAACCAAGTGAATGACCT GCCCAACCGAAATTTTAA	57,4 59,8
G3010A	53	Fwd Rev	2984 - 3005 3011 - 3036	ACCTCGATGTTGGATCAGGACA CGAACCTTAATAGCGGCTGCACCAT	64,1 70,3
G3915A	80	Fwd Rev	3875 - 3894 3935 - 3954	TAGCAGAGACCAACCGAACCC GGCGTATTCGATGTTGAAGC	60,3 60,6
G4580A	78	Fwd Rev	4531 - 4550 4584 - 4608	CGCTAAGCTCGCACTGATT TTTTGGTTAGAAGTGAATAAAAGC	60,7 59,2
T5004C	124	Fwd Rev	4950 - 4969 5052 - 5073	TCCATCATAGCAGGCAGTTG TGGTTATGTTAGGGTTGTACGG	59,8 58,8
T6365C; T6392C	110	Fwd Rev	6320 - 6339 6410 - 6429	TGGAGCCTCCGTAGACCTAA TGGCAGGGGGTTTTATATTG	59,8 59,7
T6776C	83	Fwd Rev	6743 - 6762 6806 - 6825	TGGCTTCCTAGGGTTTATCG CGGAGGTGAAATATGCTCGT	59,2 60,1
C7028T	94	Fwd Rev	6977 - 6999 7047 - 7070	AGCAAACCTCACTAGACATCG GATGGCAAATACAGCTCCTATTGA	58,5 61,6
A8251G	113	Fwd Rev	8203 - 8222 8294 - 8315	CATGCCCATCGTCTAGAAT TGCTAAGTTAGCTTACAGTGG	59,9 54,4
T8404C	126	Fwd Rev	8359 - 8379 8465 - 8484	CAGTGAAATGCCCAACTAAA TTTTGGTGAGGGAGGTAGGTG	60 60
G8697A	80	Fwd Rev	8661 - 8685 8716 - 8740	CCAACAATGACTAATCAAATAACC GTATAAGAGATCAGGTTCTCCTTT	58,2 58,4
G9055A; A9066G	100	Fwd Rev	9001 - 9021 9075 - 9100	CGCCTAACCGCTAACATTACT TGATAAGTGATAGAGGGAAGGTTAATG	58,5 59,1
C10400T	90	Fwd Rev	10353 - 10372 10421 - 10442	GCCCTAAGTCTGGCCTATGA TGAGTCGAAATCATTGTTTTG	59,3 60,1
T10873C	90	Fwd Rev	10831 - 10850 10900 - 10920	AATCAACACAACCACCCACA GGGGAACAGCTAAATAGGTTG	59,7 57,8
A11251G	90	Fwd Rev	11191 - 11212 11259 - 11280	CGCAGGCACATACTTCTTATTC AGTGAGCCTAGGGTGTGTGAG	61 60,7
A11812G	63	Fwd Rev	11787 - 11809 11827 - 11849	TCCTCTCAAGGACTTCAAACCT GGCTTGCTAGAAGTCATCAAAAA	58,7 59,9
G12372A	103	Fwd Rev	12306 - 12326 12389 - 12408	AAAAATTTTGGTGCAACTCCA AACAGGGGTGGTAAGGATGG	59,5 61,1
C12705T	91	Fwd Rev	12669 - 12692 12736 - 12759	CCCAAACATTAATCAGTTCCTCAA GAACAGTTGGAATAGGTTGTTAGC	59,4 58,3
C12858T	126	Fwd Rev	12807 - 12824 12913 - 12932	ATGATACGCCGAGCAGA TGTGGTCTCATGAGTTGGA	60,3 60,1
G13708A	119	Fwd Rev	13642 - 13660 13742 - 13760	CGCTTCCCCACCCTTACTA GCGGGGGAAATGTTGTTAG	60,1 60,3
T14470A	72	Fwd Rev	14426 - 14445 14478 - 14497	CCCATGCCTCAGGATACTC TTTAGGGGGAATGATGGTTG	61,8 59,6
C14766T; T14798C	108	Fwd Rev	14730 - 14749 14818 - 14837	CAACTACAAGAACACCAATG ATCATGCGGAGATGTTGGAT	51,5 60,3
A15607G	51	Fwd Rev	15586 - 15604 15617 - 15636	TCTCCGATCCGTCCTAAC GATAGTAATAGGGCAAGGAC	60 50,7
C15904T	86	Fwd Rev	15873 - 15892 15937 - 15958	TACTCAAATGGGCCTGTCCT TGATTTGTCCTTGAAAAAGGT	59,6 59,9
T16519C	99	Fwd Rev	16459 - 16478 16537 - 16557	CCATAACACTTGGGGGTAGC TTATTTAAGGGGAACGTGTGG	59,3 58,9

Tabelle A 4: Haplogruppen-Analyse - SNaPshot-Primer - G/A-Farbkanäle

SNP-Position	Primer	Fwd/Rev	Primerlänge (bp)	Primersequenz (5'-3')	T _m (°C)
C2727T	R-C2727T	Rev	31 (22)	GTCTGACAA GGTITGGTAGTTTAGGACCTGT	56,4
C15904T	R-C15904T	Rev	44 (24)	ACGTCGTGAAAAGTCTGACAA CCGGTTTACAAGACTGGTGTATT	59,4
G8251A	R-A8251G	Rev	47 (25)	CCACGTCGTGAAAAGTCTGACAA GGGTGTATAGGGTAAATACGGG	61,8
G9055A	G9055A	Fwd	50 (22)	TAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAA ACTCATGCACCTAAATTGGAAGC	60,5
G13708A	G13708A	Fwd	56 (20)	GACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAA TAAACCCCATTTAAACGCCCTG	59,8
G4580A	G4580A	Fwd	72 (28)	ACAAAACCTGACTAAAACCTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAA TTACCTGAGTAGGCCCTAGAAAATAAACAT	60,2
C12705T	R-C12705T	Rev	73 (30)	CAAACTGACTAAAACCTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAA GGTAACCTAAGATTAGTATGGTAATTAGGAA	56,7
G3010A	G3010A	Fwd	80 (24)	CGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAAACCTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAA CTCGATGTTGGATCAGGACATCCC	68,1
G12372A	G12372A	Fwd	82 (23)	CGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAAACCTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAA ACTACTATAACCCCTAACCCCT	54,4
G1719A	G1719A	Fwd	84 (24)	AACTGACTAAAACCTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAAAACCTGCGTAAAAGTCTGACAA CCACCTTACTACCAGACAAACCTTA	58,7
A15607G	A15607G	Fwd	30 (20)	AGTCTGACAA CTCGGATCCCGTCCCTAACAA	62,2
A11812G	A11812G	Fwd	37 (23)	TGAAAAGTCTGACAA CTCTCTCAAAGGACTTCAAACTCT	56,1
T16519C	R-T16519C	Rev	38 (22)	CGTGAAAAGTCTGACAA TGTGGGCTATTAGGGCTTTATG	58,4
T6776C	R-T6776C	Rev	51 (27)	TGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAA GTCTACGTCTATTCTACTGTAATAAT	53,2
A11251G	A11251G	Fwd	60 (20)	AACTGACTAAAACCTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAA CTCCCCCTACTCATCGCACT	59,3
A1811G	A1811G	Fwd	64 (24)	AACTGACTAAAACCTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAA GCAAGGGAAAAGATGAAAAATTATA	57,9
T14470A	R-T14470A	Rev	81 (33)	TCTGACAAAACCTGACTAAAACCTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGTCTGACAA AATTATTTAGGGGGAATGATGGTGTCTTTGG	70,3

Tabelle A 5: Haplogruppen-Analyse - SNaPshot-Primer - C/T-Farbkanäle

SNP-Position	Primer	Fwd/Rev	Primerlänge (bp)	Primersequenz (5'-3')	T _m (°C)
G709A	R-G709A	Rev	23	TTTAGAGGGTGAACCTCACTGGAA	60,2
C7028T	C7028T	Fwd	27	ACTACACGACACGTAAGCTACGTTGTAGC	62
G3915A	R-G3915A	Rev	36	GTATTGATGTTGAAGCCTGAGACTAGTTCCGGACTC	72,9
G8697A	R-G8697A	Rev	51 (26)	GTGCCACGTCGTGAAAAGCTGACAA CGTCCTTTAGTGTGTATGGTTAT	58,4
C12858T	C12858T	Fwd	55 (23)	AAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGCTGACAA GCAGCCATTCAAAGCAATCCTATA	62,5
C10400T	C10400T	Fwd	65 (26)	ACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGCTGACAA TGACTACAAAAAGGATTAGACTGAAC	57,3
C14766T	C14766T	Fwd	76 (23)	GAAAAGCTGACAAAAACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGCTGACAA ACCAATGACCCCAATACGCAAAA	66,3
T5004C	T5004C	Fwd	38 (22)	CGTGAAAAGCTGACAA CCAAAACCCAGCTACGCCAAAATC	64,9
A2706G	R-A2706G	Rev	44 (21)	GCCACGTCGTGAAAAGCTGACAA GGTCCTCTCGTCTTGTGTGT	59,5
T6365C	T6365C	Fwd	44 (24)	ACGTCGTGAAAAGCTGACAA CATCTTCTCCTTACACCTAGCAGG	60,6
T6392C	T6392C	Fwd	47 (22)	GTGCCACGTCGTGAAAAGCTGACAA CCTCTATCTTAGGGGCCATCAA	61,6
T8404C	T8404C	Fwd	61 (22)	ACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGCTGACAA CTACCGTATGGCCCACTAAT	62
T10873C	T10873C	Fwd	69 (24)	GACAAAACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGCTGACAA CAGCCTAATTAATTAGCATCATCCC	60,2
A9066G	R-A9066G	Rev	70 (25)	GACAAAACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGCTGACAA TAGAGGGAAAGGTTAATGGTTGATAT	58,5
T14798C	T14798C	Fwd	83 (27)	CGTGAAAAGCTGACAAAACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAAGCTGACAA CCCCTAATAAAAAATTAATTAACCACTCA	59,2

Tabelle A 6: pathogene SNP-Analyse - Multiplex-Primer

SNP-Position	Fragment-länge (bp)	Fwd/Rev	Basenbereich	Primersequenz (5'-3')	Tm (°C)
C1494T; A1555G	207	Fwd Rev	1376 - 1396 1557 - 1582	CCCAGAAAACACTACGATAGCCC CCAGTACACTTACCATGTTACGACTT	60 59,8
G1606A	187	Fwd Rev	1586 - 1604 1755 - 1772	GTGCACCTTGACGAACCAG TGCGCCAGGTTTCAATTT	60,3 60,2
A2706G	109	Fwd Rev	2662 - 2686 2739 - 2770	ACTTTTAACCAGTAAAATTGACCTG GTTTGTAGTACTGTTTGCATTAATAAATT	59,9 60,5
T3197C; T3308C/G	175	Fwd Rev	3163 - 3182 3317 - 3337	GCCTTCCCCGTAATGATA CAATGAGGAGTAGGAGGTTGG	61 58,7
G3460A	116	Fwd Rev	3374 - 3393 3470 - 3489	CCGAACGAAAAATTCTAGGC TAGGGGCTCTTTGGTGAAGA	58,8 59,8
A4269G; A4300T	91	Fwd Rev	4243 - 4262 4309 - 4333	AGCATTCCCCCTCAAACCTA CCTAGAAAATAAGGGGGTTAAGCTC	60,8 60,9
C7028T	247	Fwd Rev	6919 - 6941 7143 - 7165	TCTGAGCCCTAGGATTCATCTTT ACGCCGATGAATATGATAGTGAA	60,6 60,7
A7445G	262	Fwd Rev	7286 - 7319 7518 - 7547	TCTAACAGCAGTAATATTAATAATTTTCATGATT AAAGTTATGAAATGGTTTTTCTAATACCTT	60,4 59,6
A8344G; G8363A	222	Fwd Rev	8187 - 8207 8389 - 8408	GAGCAAACCACAGTTTCATGC GGGTAATTATGGTGGGCCAT	60,7 60,6
T8993C/G	98	Fwd Rev	8926 - 8946 9002 - 9023	CCTACACCCCTTATCCCCATA GCAGTAATGTTAGCGGTTAGGC	59,9 60,2
A9299G; G9300A	89	Fwd Rev	9244 - 9260 9312 - 9332	CCAGCCCATGACCCCTA GAGCGTTATGGAGTGGAAGTG	60,4 59,7
G9477A	137	Fwd Rev	9421 - 9439 9541 - 9557	CACCACCTGTCCAAAAAGG GGGCCAGTGCCCTCCTA	59 62,2
T10010C; A10044G	178	Fwd Rev	9922 - 9946 10071 - 10099	CCTGATACTGGCATTITGTAGATGT GCTAGGAGGGTGTGATTATTAATAAATTAA	60,6 61,2
A11467G	244	Fwd Rev	11273 - 11302 11497 - 11516	GGCTCACTAAACATTCTACTACTACTCTC GGGGGTTGAGAATGAGTGTG	61,6 60,4
G11719A; G11778A	125	Fwd Rev	11689 - 11708 11788 - 11813	CGGCGCAGTCATTTCATAA GTAGAGTTTGAAGTCCTTGAGAGAGG	62,2 60,3
C12258T; G12372A	180	Fwd Rev	12214 - 12237 12375 - 12393	CTCACAGAAGTCTAACTCATGC GATGGGGGGAATTAGGGAA	60,5 60,8
T13617C	97	Fwd Rev	13557 - 13581 13637 - 13653	AGCCCTATCTATTACTCTCATCGCT GGTGGGGAAGCGAGGTT	60,2 61
G14459A; T14484C	196	Fwd Rev	14365 - 14384 14536 - 14560	CACCAATCCTACCTCCATCG CGGGGTGTGTTATTCTGAATTTT	60,3 59,6
T14709C; C14766T	292	Fwd Rev	14659 - 14682 14932 - 14950	CAAAGCATACATCATTATTCTCGC GTGGGCGATTGATGAAAAG	60 59,1

Tabelle A 7: pathogene SNP-Analyse - SNaPshot-Primer - G/A-Farbkanäle

SNP-Position	Primer	Fwd/Rev	Primerlänge (bp)	Primersequenz (5'-3')	T _m (°C)
T308C/G	R-T3308C/G	Rev	17	GGAGGTTGGCCATGGGT	61,8
A4269G	A4269G	Fwd	22	TTCCCCCTCAAACCTAAGAAAT	60,2
T4274C	R-T4274C	Rev	26 (25)	G ACTCTATCAAAGTAAACTCTTTTATC	49,8
A1555G	A1555G	Fwd	30 (25)	GGACT ACCCTACGCCATTTATAGAGGAG	60,1
A3243G	A3243G	Fwd	34 (22)	GACTGACTGACT ACAGGGTTTGAAGATGGCAG	60,4
T3250C	R-T3250C	Rev	38 (20)	GAGACTGACTGACTGACT GTTTTAAAGTTTTATGCGAAT	49,3
T3271C	R-T3271C	Rev	42 (24)	GAGACTGACTGACTGACT GAGGAATTGAACCTCTGACTGTAA	58,8
A8344G	A8344G	Fwd	46 (24)	GAGACTGACTGACTGACT CCTTTAAGTTAAAGATTAAAGAGA	50,9
T14709C	R-T14709C	Rev	50 (27)	GACGACTGACTGACTGACTGTAGTTGAAATACAAACGATGGTTTTTC	60,4
A9299G	A9299G	Fwd	54 (20)	GAGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT CTCCTAATGACCTCCGGGCT	62,7
A12308G	A12308G	Fwd	58 (20)	GAGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT CCATTGGTCTTAGGGCCCAA	64,2
T14484C	R-T14484C	Rev	62 (27)	GACGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT GTTTTTTAAATTTTAGGGGGAATG	59,7
C1494T	R-C1494T	Rev	66 (28)	GAGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT AAATGTCTTTGAAAGTATGCTGAGGAG	60,6
G9477A	G9477A	Fwd	70 (29)	GGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT ACGGGATAATCCTATTATTACCTCAGAA	62,4
G11778A	G11778A	Fwd	74 (21)	GGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT ACTACGAAACGCACTCACAGTC	58
G12372A	G12372A	Fwd	78 (24)	GAGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT CACTACTATAACCACCCCTAACCCCT	56,9
G14459A	G14459A	Fwd	82 (23)	GACGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT CAGGATACCTCAATAGCCATC	59,1
C14766T	R-C14766T	Rev	86 (29)	GGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACT AGTGGTTAATTTATTAGGGGGTTA	60

Tabelle A 9: Sequenzier-Primer - Fragment 1 bis 23

Fragment	Fragment-länge (bp)	Fwd/Rev	Basenbereich	Primersequenz (5'-3')	Tm (°C)
1	369	Fwd	706 - 726	CCCGTTCAGTGAGTTCACCC	66.2
		Rev	1048 - 1074	CCCAGTTTGGGTCTTAGCTATTGTGTG	66.7
2	559	Fwd	873 - 893	GGTTGGCAATTTTCGTGCCAG	64.8
		Rev	1405 - 1431	CTGCTAAATCCACCTTCGACCCCTAAG	66.8
3	597	Fwd	1174 - 1194	TGGCGGTGCTTCATATCCCTC	66.6
		Rev	1748 - 1770	CGCCAGGTTTCAATTTCTATCGC	65.9
4	594	Fwd	1485 - 1504	GCCCGTCACCCCTCCTCAAGT	66.0
		Rev	2056 - 2078	GGGATTTAGAGGGTTCTGTGGGC	66.1
5	570	Fwd	1873 - 1895	AACCTTGCAAGGAGAGCCAAAGC	65.1
		Rev	2422 - 2442	GCATGCCTGTGTTGGTTGA	65.4
6	597	Fwd	2201 - 2220	GCGTTCAAGCTCAACACCCA	64.6
		Rev	2772 - 2797	GCAGGTTTGGTAGTTTAGGACCTGTG	65.1
7	600	Fwd	2571 - 2590	GCGGTACCTAACCGTGCAA	65.3
		Rev	3148 - 3170	GGGAAGGCGCTTTGTGAAGTAGG	67.2
8	601	Fwd	2927 - 2950	CCCTAGGGATAACAGCGCAATCCT	67.3
		Rev	3507 - 3527	GCGGTGATGTAGAGGGTGATG	62.8
9	585	Fwd	3306 - 3326	CATACCCATGGCCAACCTCCT	65.3
		Rev	3868 - 3890	CGGTTGGTCTCTGCTAGTGTTGA	65.9
10	539	Fwd	3629 - 3655	CCTCTAGCCTAGCCGTTTACTCAATCC	66.2
		Rev	4142 - 4167	GTGTATGAGTTGGTCGTAGCGGAATC	65.9
11	637	Fwd	3897 - 3915	CTTCGACCTTGCCGAAGGG	65.3
		Rev	4514 - 4533	GCGCTGTGATGAGTGTGCCT	65.0
12	599	Fwd	4389 - 4413	CACCCCATCCTAAAGTAAGGTGAGC	65.1
		Rev	4962 - 4987	GTTTGGTTTAAATCCACCTCAACTGCC	66.6
13	679	Fwd	4805 - 4828	CTTCTGAGTCCCAGAGGTTACCCA	65.0
		Rev	5460 - 5483	AGGTAGGAGTAGCGTGGTAAGGGC	64.9
14	672	Fwd	5259 - 5282	TGGGCCATTATCGAAGAATTCACA	66.5
		Rev	5909 - 5930	AGAGAATAGTCAACGGTCGGCG	64.9
15	568	Fwd	5696 - 5720	CAGCTAAGCACCCCTAATCAACTGGC	66.2
		Rev	6242 - 6263	GGCCTCCACTATAGCAGATGCG	65.3
16	543	Fwd	5995 - 6019	CAGCTCTAAGCCTCCTTATTCGAGC	64.9
		Rev	6506 - 6537	CTGTTAGTAGTATAGTGATGCCAGCAGCTAGG	66.1
17	468	Fwd	6425 - 6447	TGCCATAACCCAATACCAAACGC	66.7
		Rev	6873 - 6892	CTTCCGTGGAGTGTGGCGAG	66.5
18	661	Fwd	6739 - 6764	CAATTGGCTTCTAGGGTTTATCGTG	66.5
		Rev	7376 - 7399	GGGCATCCATATAGTCACTCCAGG	64.9
19	573	Fwd	7233 - 7254	CCCGATGCATACACCACATGAA	66.0
		Rev	7786 - 7805	CTAGGATGATGGCGGGCAGG	67.2
20	675	Fwd	7640 - 7665	GAGCTTATCACCTTTTCATGATCACGC	66.1
		Rev	8287 - 8314	GCTAAGTTAGCTTTACAGTGGGCTCTAG	62.4
21	511	Fwd	8161 - 8186	CTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTG	65.2
		Rev	8647 - 8671	GTCATTGTTGGGTGGTGATTAGTCG	65.7
22	528	Fwd	8533 - 8559	GAAAATCTGTTCGCTTCATTCATTGCC	68.4
		Rev	9040 - 9060	GGTGGCGCTTCCAATTAGGTG	65.9
23	562	Fwd	8775 - 8794	CCTCCTCGGACTCCTGCCTC	65.9
		Rev	9314 - 9336	TGAGGAGCGTTATGGAGTGGAAG	64.8

Tabelle A 10: Sequenzier-Primer - Fragment 24 bis 46

Fragment	Fragment- länge (bp)	Fwd/Rev	Basenbereich	Primersequenz	Tm (°C)
24	598	Fwd	9046 - 9065	ATTGGAAGCGCCACCCTAGC	65.8
		Rev	9620 - 9643	CAGGTGATTGATACTCCTGATGCC	65.1
25	562	Fwd	9444 - 9474	CGATACGGGATAATCCTATTTATTACCTCAG	64.6
		Rev	9970 - 10005	TTATACTAAAAGAGTAAGACCCTCATCAATAGATGG	64.6
26	529	Fwd	9752 - 9774	CGAGTCTCCCTTCACCATTTCCG	68.2
		Rev	10254 - 10280	GGGTAAAAGGAGGGCAATTTCTAGATC	65.1
27	610	Fwd	10120 - 10148	CATTTTGACTACCACAACCTCAACGGCTAC	67.4
		Rev	10705 - 10729	AGGCCATATGTGTTGAGATTGAGA	65.1
28	578	Fwd	10659 - 10678	CTAGTCTTTGCCCTCGGA	66.0
		Rev	11214 - 11236	GGGAAGGGAGCCTACTAGGGTGT	65.0
29	597	Fwd	10999 - 11018	CCAACGCCACTTATCCAGCG	66.0
		Rev	11574 - 11595	TGTCGTAGGCAGATGGAGCTTG	64.9
30	537	Fwd	11398 - 11423	CTTATGACTCCCTAAAGCCCATGTCG	66.8
		Rev	11906 - 11934	GTGATATTTGATCAGGAGAACGTGGTTAC	64.9
31	441	Fwd	11754 - 11778	CAAACACGAACGCACTCACAGTCG	67.2
		Rev	12168 - 12194	GTCGTAAGCCTCTGTTGTCAGATTCAC	65.5
32	554	Fwd	12007 - 12027	GGGCTCACTCACCCACCACAT	66.8
		Rev	12540 - 12560	TGGGTTGTTTGGGTTGTGGCT	66.8
33	600	Fwd	12395 - 12420	TTACCACCCTCGTTAACCCCTAACAAA	64.6
		Rev	12970 - 12994	CTGCTAGGAGGAGCCTAGTAGTGG	64.8
34	559	Fwd	12788 - 12814	CCTTCTTGCTCATCAGTTGATGATACG	66.1
		Rev	13323 - 13346	GCTTTGAAGAAGGCGTGGGTACAG	67.2
35	515	Fwd	13198 - 13217	GCAGCAGTCTGCGCCCTTAC	65.6
		Rev	13693 - 13712	GCTGCCAGGCGTTTAAATGGG	67.0
36	610	Fwd	13515 - 13536	CCACATCATCGAAACCGCAAAC	66.8
		Rev	14097 - 14124	GATGAGTGGGAAGAAGAAAGAGAGGAAG	65.9
37	572	Fwd	13802 - 13822	CAGCCCTCGCTGTCACTTTCC	66.7
		Rev	14353 - 14373	GGATTGGTGCTGTGGGTGAAA	65.4
38	588	Fwd	14224 - 14246	ACGCCATAATCATACAAAGCCC	65.1
		Rev	14791 - 14811	GGGAGGTCGATGAATGAGTGG	64.0
39	599	Fwd	14453 - 14479	GCCATCGCTGTAGTATATCCAAAGACA	65.4
		Rev	15032 - 15051	AGCCTCGCCGATGTGTAG	66.9
40	596	Fwd	14860 - 14878	CGCCTGCCTGATCCTCAA	67.0
		Rev	15432 - 15455	GAAGGAAGAGAAGTAAGCCGAGGG	64.8
41	556	Fwd	15257 - 15277	GACAGTCCCACCCTCACACGA	65.9
		Rev	15790 - 15812	CGGATGCTACTTGTCCAATGATG	63.8
42	579	Fwd	15608 - 15627	CTAGGAGGCGCTCTTGCCCT	65.1
		Rev	16165 - 16186	GGGTTTGATGTGGGTTGGGTT	65.1
43	588	Fwd	15961 - 15990	GAAAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGCACC	65.9
		Rev	16525 - 16548	GGGAACGTGTGGGCTATTTAGGCT	67.3
44	657	Fwd	16188 - 16209	CCCCCATGCTTACAAGCAAGT	62.7
		Rev	256 - 275	CTGTGTGAAAGCGGCTGTG	65.3
45	491	Fwd	6 - 34	CAGGTCTATCACCTATTAACCACTCAG	66.6
		Rev	465 - 496	GGGTTGTATTGATGAGATTAGTAGTATGGGAG	64.8
46	607	Fwd	321 - 345	TGGCCACAGCACTTAAACACATCTC	66.5
		Rev	901 - 927	CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGACC	64.8

Tabelle A 11: mitochondriale Haplogruppen-Verteilung

Haplo- gruppe	SIDS		Kontrollgruppe	
	absolute Häufigkeit	relative (%)	absolute Häufigkeit	relative (%)
F1	0	0	2	1,33
H*	38	19,49	28	18,54
H1*	26	13,33	16	10,6
H1a1	0	0	5	3,31
H1c2	1	0,51	0	0
H1f	1	0,51	0	0
H3	5	2,56	5	3,31
H4	1	0,51	0	0
H6	5	2,56	4	2,65
H7a	3	1,54	0	0
H10	1	0,51	3	1,99
HV*	5	2,56	1	0,66
I*	5	2,56	4	2,65
J*	1	0,51	1	0,66
J1c	20	10,26	14	9,27
K	14	7,18	15	9,93
N*	1	0,51	0	0
N1	2	1,03	0	0
R*	3	1,54	0	0
T*	7	3,59	4	2,65
T2	13	6,67	8	5,3
U*	17	8,72	14	9,27
Un*	15	7,69	6	3,97
V	6	3,08	8	5,3
W	3	1,54	5	3,31
X2	1	0,51	7	4,64
L	1	0,51	0	0
M	0	0	1	0,66

Tabelle A 12: Verteilung pathogener mitochondrialer Mutationen

mutiertes Allel	SIDS		Kontrollgruppe	
	absolute Häufigkeit	relative (%)	absolute Häufigkeit	relative (%)
1494T	0	0	0	0
1555G	0	7,95	0	0
1606A	0	8,72	0	0
2706G	113	0	90	59,6
3197C	17	0	14	9,27
3243G	0	0	0	0
3250C	0	0	0	0
3271C	0	0	0	0
3308G	0	0	1	0,66
3460A	0	0	0	0
4269G	0	0	0	0
4274C	0	0	0	0
4300T	0	0	0	0
7028T	114	58,46	90	59,6
7445G	0	0	0	0
8344T	0	0	0	0
8356C	0	0	0	0
8363A	0	0	0	0
8993G/C	0	0	0	0
9299G	0	0	0	0
9300A	2	1,03	0	0
9477A	17	8,72	14	9,27
10010C	0	0	0	0
10034C	5	2,56	4	2,65
10044G	1	0,51	0	0
11467G	46	23,59	35	23,18
11719A	104	53,33	81	53,64
11778A	0	0	0	0
12258T	0	0	0	0
12308G	46	23,59	35	23,18
12320G	0	0	0	0
12372A	47	24,1	35	23,18
13617C	16	8,21	14	9,27
14459A	0	0	0	0
14484C	1	0,51	0	0
14709C	0	0	0	0
14766T	101	51,8	62	41,06

Tabelle A 13: Ergebnisse des Haplogruppen- und pathogenen Assays

DNA-Probe	Haplogruppe	R-C1494T	A1555G	R-G1606A	R-A2706G	T3197C	A3243G	R-T3250C	R-13271C	R-13308C/G	R-G3460A	A4289G	R-14274C	R-A4300T	C7028T	R-A7445G	A8344G	T8356C	R-G8363A	T8993G/C	A9299C	R-G9300A	G9477A	T10010C	T10034C	R-A10044G	R-A1467G	R-G11719A	G11778A	C1228T	A12308G	R-A12320G	G12372A	T13617C	G14459A	R-T14484C	R-T14709C	R-C14766T				
HE0494S	L	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	C	
K 89	M*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T	
MC0151S	N*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
MS0096S	X2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 5	X2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 33	X2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 73	X2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 201	X2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 224	X2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 416	X2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 417	X2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
MC0204S	W	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
MD0371S	W	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
MS0210S	W	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 28	W	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 40	W	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 56	W	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 82	W	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 83	W	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
AA0312S	N1	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
HN0378S	N1	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
FR0127S	I*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
KI0120S	I*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
KI0331S	I*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
MS0010S	I*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
MS0405S	I*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 30	I*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 41	I*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 92	I*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
K 93	I*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
ER0319S	R*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
ER0431S	R*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T
MC0295S	R*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	G	C	A	A	A	T	G	T	T	T	T	T

DNA-Probe	Haplogruppe	R-C1494T	A1555G	R-G1606A	R-A2706G	T3197C	A3243G	R-13250C	R-13271C	R-13308C/G	R-G3460A	A4269G	R-14274C	R-A4300T	C7028T	R-A7445G	A8344G	T8356C	R-G8363A	T8993G/C	A9299G	R-G9300A	G9477A	T10010C	T10034C	R-A10044G	R-A11467G	R-G11719A	C11778A	C12258T	A12308G	R-A12320G	G12372A	T13617C	G14459A	R-114484C	R-114709C	R-C14766T	
K 404	J1c	C	A	G	G	G	A	T	G	A	T	A	A	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 500	J1c	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
ER0347S	T*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
HE0339S	T*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
HN0135S	T*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
JN0243S	*L	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K10059S	*L	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
MS0019S	*L	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
MS0334S	T*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 10	T*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 61	T*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 88	T*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 401	T*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
AA0294S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
ER0310S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
FR0073S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
HE0213S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
HE0304S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
HN0198S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
HN0242S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
JN0131S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K10458S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
MC0308S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
MC0332S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
MD0444S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
MS0407S	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 17	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 39	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 54	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 77	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 91	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 411	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 412	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T
K 413	T2	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	A	-	T	T	A	A	A	G	C	A	A	A	G	T	T	T	T

DNA-Probe	Haplogruppe
AA0237S	U*
HA0086S	U*
HA0088S	U*
HA0192S	U*
HE0158S	U*
HE0255S	U*
HE0344S	U*
HH0375S	U*
HN0190S	U*
HN0286S	U*
HN0445S	U*
KI0345S	U*
MC0337S	U*
MS0214S	U*
MS0228S	U*
MS0406S	U*
PO0454S	U*
K 12	U*
K 22	U*
K 23	U*
K 35	U*
K 46	U*
K 47	U*
K 72	U*
K 74	U*
K 80	U*
K 94	U*
K 228	U*
K 229	U*
K 400	U*
K 418	U*
R-C1494T	C
A155G	A
R-G1806A	G
R-A2706G	G
T3197C	C
A3243G	A
R-13250C	T
R-13271C	T
R-13308C/G	T
R-G3460A	G
A4269G	A
R-14274C	T
R-A4300T	A
C7028T	T
R-A7445G	A
A8344G	A
T8356C	T
R-G8363A	G
T893G/C	T
A9299G	A
R-G9300A	G
G9477A	A
T10010C	T
T10034C	T
R-A10044G	A
R-G11719A	A
G11778A	G
C12258T	C
A12308G	G
R-A12320G	A
G12372A	A
T13617C	C
G14459A	G
R-114484C	T
R-114709C	T
R-C14766T	T

DNA-Probe	Haplogruppe
AA0303S	Un*
ER0432S	Un*
FR0064S	Un*
FR0092S	Un*
HA0197S	Un*
HA0442S	Un*
HA0447S	Un*
HE0341S	Un*
JN0053S	Un*
K10420S	Un*
MC0098S	Un*
MC0302S	Un*
MS0340S	Un*
PO0342S	Un*
PO0383S	Un*
K 21	Un*
K 27	Un*
K 52	Un*
K 204	Un*
K 214	Un*
K 407	Un*
R-C1494T	C
A1555G	A
R-G1606A	G
R-A2706G	G
T3197C	T
A3243G	A
R-T3250C	T
R-13271C	T
R-T3308C/G	T
R-G3460A	G
A4269G	A
R-14274C	T
R-A1300T	A
C7028T	T
R-A7445G	A
A8344G	A
T8356C	T
R-G8363A	G
T8993G/C	T
A9299G	A
R-G9300A	G
G9477A	G
T10010C	T
T10034C	T
R-A10044G	A
R-A11467G	G
R-G11719A	A
G11778A	G
C12258T	C
A12308G	G
R-A12320G	A
G12372A	A
T13617C	T
G14459A	G
R-T14484C	T
R-T14709C	T
R-C14766T	T

DNA-Probe	Haplogruppe	R-C1494T	A1555G	R-G1606A	R-A2706G	T3197C	A3243G	R-T3250C	R-T3271C	R-T3308C/G	R-G3460A	A4269G	R-T4274C	R-A4300T	C7028T	R-A7445G	A8344G	T8356C	R-G8363A	T8993G/C	A9299G	R-G9300A	G9477A	T10010C	T10034C	R-A10044G	R-A11467G	R-G11719A	G11778A	C12258T	A12308G	R-A12320G	G12372A	T13617C	G14459A	R-T14484C	R-T14709C	R-C14766T		
AA0265S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
FR0114S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
FR0395S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
FR0490S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
HA0289S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
HH0136S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
HN0117S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
HN0290S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
MC0067S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
MC0068S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
MC0336S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
MC0409S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
MS0013S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
PO0475S	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 29	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 34	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 38	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 42	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 43	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 44	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 50	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 53	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 62	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 81	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 87	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 95	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 419	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 420	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T
K 421	K	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	G	T	A	A	G	A	A	G	C	G	A	A	T	G	T	T	T

DNA-Probe	Haplogruppe	R-C1494T	A1555G	R-G1606A	R-A2706G	T3197C	A3243G	R-T3250C	R-13271C	R-T3308C/G	R-G3460A	A4289G	R-T4274C	R-A4300T	C7028T	R-A7445G	A8344G	T8356C	R-G8363A	T8993G/C	A9299G	R-G9300A	G9477A	T10010C	T10034C	R-A10044G	R-A11467G	R-G11719A	G11778A	C12258T	A12308G	R-A12320G	G12372A	T13617C	G14459A	R-T14484C	R-T14709C	R-C14766T		
K 96	F1	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
K 97	F1	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	A	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
ES0020S	HV*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
HA0500S	HV*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
HE0260S	HV*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
JN0047S	HV*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
MS0388S	HV*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
K 36	HV*	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
AA0163S	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
HA0138S	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
MS0222S	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
MS0238S	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
MS0470S	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
PO0362S	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
K 13	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
K 15	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
K 26	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
K 71	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
K 211	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
K 212	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
K 217	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T
K 231	V	C	A	G	G	T	A	T	T	T	G	A	T	A	T	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	G	C	A	A	G	T	G	T	T	T	T

DNA-Probe	Haplogruppe
AA0168S	H*
AA0188S	H*
AA0209S	H*
AA0229S	H*
ER0306S	H*
ER0430S	H*
ER0519S	H*
ES0100S	H*
ES0113S	H*
FR0034S	H*
HA0087S	H*
HE0272S	H*
HN0153S	H*
HN0245S	H*
HN0280S	H*
HN0291S	H*
HN0350S	H*
HN0374S	H*
HN0457S	H*
JN0051S	H*
JN0196S	H*
KI0159S	H*
MC0111S	H*
MC0160S	H*
MC0166S	H*
MC0167S	H*
MC0215S	H*
MC0226S	H*
MC0301S	H*
MC0322S	H*
MC0367S	H*
MD0137S	H*
MS0169S	H*
MS0176S	H*
R-C1494T	C
A1555G	C
R-G1606A	G
R-A2706G	A
T3197C	T
A3243G	A
R-T3250C	T
R-T3271C	T
R-T3308C/G	T
R-G3460A	G
A4269G	A
R-T4274C	T
R-A4300T	A
C7028T	C
R-A7445G	A
A8344G	A
T8356C	T
R-G8363A	G
T8993G/C	T
A9299G	A
R-G9300A	G
G9477A	G
T10010C	T
T10034C	T
R-A10044G	A
R-A11467G	A
R-G11719A	G
G11778A	G
C12258T	C
A12308G	A
R-A12320G	A
G12372A	G
T13617C	T
G14459A	G
R-T14484C	T
R-T14709C	T
R-C14766T	C

DNA-Probe	Haplogruppe
MS0358S	H*
MS0396S	H*
MS0460S	H*
MS0480S	H*
K 2	H*
K 6	H*
K 8	H*
K 16	H*
K 45	H*
K 48	H*
K 51	H*
K 60	H*
K 63	H*
K 65	H*
K 66	H*
K 75	H*
K 79	H*
K 85	H*
K 86	H*
K 90	H*
K 203	H*
K 210	H*
K 213	H*
K 218	H*
K 219	H*
K 220	H*
K 223	H*
K 225	H*
K 403	H*
K 409	H*
K 410	H*
K 415	H*
R-C1494T	C
A1555G	C
R-G1606A	G
R-A2706C	A
T3197C	T
A3243G	A
R-13250C	T
R-13271C	T
R-13308C/G	T
R-G3460A	G
A4269G	A
R-14274C	T
R-A4300T	A
C7028T	C
R-A7445G	A
A8344G	A
T8356C	T
R-G8363A	G
T8993G/C	T
A9299G	A
R-G9300A	G
G9477A	G
T10010C	T
T10034C	T
R-A10044G	A
R-A11467G	A
R-G11719A	G
G11778A	G
C12258T	C
A12308G	A
R-A12320C	A
G12372A	G
T13617C	T
G14459A	G
R-T14484C	T
R-T14709C	T
R-C14766T	C

DNA-Probe	Haplogruppe	R-C1494T	A1555G	R-G1606A	R-A2706G	T3197C	A3243G	R-T3250C	R-13271C	R-T3308C/G	R-G3460A	A4269G	R-T4274C	R-A4300T	C7028T	R-A7445G	A8344G	T8356C	R-G8363A	T8993C/C	A9299G	R-G9300A	G9477A	T10010C	T10034C	R-A10044G	R-A11467G	R-G11719A	G11778A	C12258T	A12308G	R-A12320G	G12372A	T13617C	G14459A	R-T14484C	R-T14709C	R-C14766T			
MS0015S	H10	C	C	C	C	A	A	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
K 226	H10	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
K 227	H10	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
K 402	H10	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
FR0520S	H7a	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
HN0434S	H7a	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
MS0186S	H7a	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
ER0429S	H6	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
ES0489S	H6	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
HN0324S	H6	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
K10261S	H6	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
MS0299S	H6	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
K 215	H6	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
K 216	H6	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
K 234	H6	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
K 235	H6	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	G	T	G	T	T	C	
HE0357S	H4	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	A	G	T	G	T	T	C
ER0328S	H3	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	A	G	T	G	T	T	C
HE0488S	H3	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	A	G	T	G	T	T	C
HN0297S	H3	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	A	G	T	G	T	T	C
JN0376S	H3	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	A	G	T	G	T	T	C
MS0349S	H3	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	A	G	T	G	T	T	C
K 1	H3	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	A	G	T	G	T	T	C
K 3	H3	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	A	G	T	G	T	T	C
K 4	H3	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	A	G	T	G	T	T	C
K 18	H3	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	A	G	T	G	T	T	C
K 76	H3	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	A	A	G	T	G	T	T	C

DNA-Probe	Haplogruppe
AA0315S	H1*
DO0293S	H1*
ER0517S	H1*
ES0330S	H1*
FA0417S	H1*
FR0060S	H1*
FR0254S	H1*
HE0225S	H1*
HH0284S	H1*
HN0115S	H1*
HN0139S	H1*
HN0191S	H1*
HN0219S	H1*
HN0275S	H1*
HN0343S	H1*
KI0352S	H1*
KI0387S	H1*
MC0078S	H1*
MC0385S	H1*
MS0216S	H1*
MS0223S	H1*
MS0233S	H1*
MS0321S	H1*
MS0351S	H1*
MS0384S	H1*
MS0498S	H1*
K 14	H1*
K 25	H1*
K 32	H1*
K 37	H1*
K 57	H1*
K 84	H1*
K 206	H1*
K 207	H1*
R-C1494T	C
A1555G	C
R-G1606A	G
R-A2706G	A
T3197C	T
A3243G	A
R-T3250C	T
R-T3271C	T
R-T3308C/G	T
R-G3460A	G
A4269G	A
R-T4274C	T
R-A4300T	A
C7028T	C
R-A7445G	A
A8344G	A
T8356C	T
R-G8363A	G
T8993G/C	T
A9299G	A
R-G9300A	G
G9477A	G
T10010C	T
T10034C	T
R-A10044G	A
R-A11467G	A
R-G11719A	G
G11778A	G
C12258T	C
A12308G	A
R-A12320G	A
G12372A	G
T13617C	T
G14459A	G
R-T14484C	T
R-T14709C	T
R-C14766T	C

DNA-Probe	Haplogruppe	R-C1494T	A1555G	R-G1606A	R-A2706G	T3197C	A3243G	R-T3250C	R-T3271C	R-T3308C/G	R-G3460A	A4269G	R-T4274C	R-A4300T	C7028T	R-A7445G	A8344G	T8356C	R-G8363A	T8993G/C	A9299G	R-G9300A	G9477A	T10010C	T10034C	R-A10044G	R-A11467G	R-G11719A	G11778A	C12258T	A12308G	R-A12320G	G12372A	T13617C	G14459A	R-T14484C	R-T14709C	R-C14766T	
K 208	H1*	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
K 209	H1*	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
K 232	H1*	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
K 233	H1*	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
K 405	H1*	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
K 406	H1*	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
K 414	H1*	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
K 501	H1*	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
K 20	H1a1	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
K 58	H1a1	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
K 59	H1a1	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
K 230	H1a1	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
K 408	H1a1	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
PO0436S	H1c2	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C
IMC0256S	H1f	C	A	G	A	T	A	T	T	T	G	A	T	A	C	A	A	T	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	G	G	C	A	A	G	T	G	T	T	C