

Institut für Humangenetik
der Fakultät für Humanmedizin der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger)

**Identifikation eines neuen Gens (*OLFML2B*) und Charakterisierung seiner genetischen
Varianten in Patienten mit Repolarisationsstörungen und plötzlichem Kindstod (SIDS)**

Michaela Hanna Dominica Prucha

Vollständiger Abdruck der von der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation:
1. Priv.-Doz. Dr. A. Pfeufer
2. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 13.02.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 16.10.2013 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

1 INHALTSVERZEICHNIS

1 INHALTSVERZEICHNIS 3

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 6

3 EINLEITUNG 11

3.1 Das Aktionspotential des Herzmuskels 11

 3.1.1 *Phasen des kardialen Aktionspotentials* 11

 3.1.2 *Molekulare Grundlagen der Repolarisation* 13

 3.1.3 *Das QT-Intervall* 14

 3.1.4 *Repolarisationsstörungen* 14

3.2 Das monogene Long-QT Syndrom 15

 3.2.1 *Definition* 15

 3.2.2 *Historie* 17

 3.2.3 *Genetische Ursachen* 17

 3.2.4 *Diagnostik* 19

 3.2.5 *Therapie* 21

 3.2.6 *Komplexe Prädispositionen zu Repolarisationsstörungen* 21

 3.2.7 *Das medikamenteninduzierte LQT-Syndrom* 22

 3.2.8 *Komplexe genetische Ursachen von Repolarisationsstörungen* 22

3.3 Plötzliche Herztodsyndrome 23

 3.3.1 *Sudden Cardiac Death (SCD)* 23

 3.3.2 *Sudden Infant Death Syndrome (SIDS)* 23

 3.3.2.1 *Definition* 23

 3.3.2.2 *Historie* 24

 3.3.2.3 *Ursachen von SIDS* 25

 3.3.2.4 *Genetische Ursachen von SIDS* 25

 3.3.2.5 *Kardiale Repolarisationsstörungen als Ursache von SIDS* 26

3.4 Genomweite Assoziationsstudien 26

 3.4.1 *GWAS von kardialen Repolarisationsstörungen* 27

 3.4.2 *Komplexe genetische Modulation des plötzlichen Herztodes* 30

3.5 Die Proteine NOS1AP und OLFML2B 30

 3.5.1 *Das NOS1AP-Protein* 30

 3.5.2 *Die Familie der Olfactomedine* 30

 3.5.2.1 *Myocilin und das primäre Offenwinkelglaukom* 31

 3.5.3 *Das OLFML2B-Protein* 33

 3.5.4 *Vorarbeiten zur Pathogenität von OLFML2B und NOS1AP im Tiermodell* 34

3.6 Ziel dieser Arbeit 35

4 METHODEN 36

4.1	Patienten und Kontrollkollektiv	36
4.1.1	<i>LQTS-Patienten</i>	36
4.1.2	<i>Medikamenteninduzierte LQTS-Patienten (diLQTS)</i>	37
4.1.3	<i>SIDS-Patienten</i>	37
4.1.4	<i>SCD-Patienten</i>	37
4.1.5	<i>Kontrollprobanden aus der KORA-Studie</i>	37
4.1.6	<i>Kontrollprobanden aus dem „Exome sequencing“-Projekt (ESP)</i>	38
4.1.7	<i>Übersicht über die Fälle und Kontrollen</i>	38
4.2	DNA-Extraktion aus Leukozyten des peripheren Blutes	39
4.2.1	<i>Allgemeines und Ablauf</i>	39
4.2.2	<i>Verwendetes Protokoll zur DNA-Extraktion aus Leukozyten</i>	41
4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
4.3.1	<i>Allgemeines und Historie</i>	42
4.3.2	<i>Primerdesign</i>	43
4.3.3	<i>Ablauf und Schrittfolge</i>	44
4.3.4	<i>Verwendetes PCR-Protokoll</i>	46
4.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	47
4.4.1	<i>Protokoll für die DNA-Agarose-Gelelektrophorese</i>	48
4.5	Schmelzkurvenanalyse	49
4.5.1	<i>Historie</i>	49
4.5.2	<i>Allgemeines</i>	49
4.5.3	<i>Farbstoffe im Vergleich</i>	50
4.5.4	<i>Ablauf</i>	51
4.5.5	<i>Auswertung mit der MeltingWizard Software</i>	52
4.5.6	<i>Genauigkeit</i>	53
4.6	DNA-Sequenzierung nach Sanger	54
4.6.1	<i>Historie</i>	54
4.6.2	<i>Allgemeines</i>	55
4.6.3	<i>Ablauf und Schrittfolge der ursprünglichen Methode</i>	56
4.6.4	<i>Aufreinigung des PCR-Amplifikats</i>	59
4.6.5	<i>Verwendetes Cycle-Sequenzierungsprotokoll</i>	60
4.6.6	<i>Softwaregestützte Mutationsdetektion</i>	60
4.7	MALDI-TOF MS	62
4.7.1	<i>Historie</i>	62
4.7.2	<i>Prinzip und Ablauf</i>	62
4.7.3	<i>PCR für Maldi-TOF MS</i>	65
4.7.4	<i>SAP-Reaktion</i>	67

4.7.5	<i>Durchführung der hME-Reaktion</i>	68
4.7.6	<i>Reinigung der hME-Reaktionsprodukte</i>	70
4.8	Datenauswertung und Statistik	70
4.8.1	<i>Gen-basierte Burden-Tests für seltene Varianten</i>	70
4.8.2	<i>Prädiktion der Pathogenität von Proteinvarianten</i>	71
5	ERGEBNISSE	72
5.1	Aufgefundene Varianten im <i>OLFML2B</i> -Gen	72
5.2	Häufigkeitsanalyse aller Varianten zwischen KORA- und ESP- Kontrollen	77
5.3	Häufigkeitsanalyse der aufgefundenen Varianten bezogen auf die Patienten	79
5.4	Differenzierte Häufigkeitsanalyse in Patienten nach Art der Erkrankung	81
5.5	Identifikation einzelner kausaler Mutationen im <i>OLFML2B</i> -Gen	83
5.6	Charakterisierung einzelner kausaler Mutationen bei SIDS	86
6	DISKUSSION	89
6.1	Prävalenz von <i>OLFML2B</i> -Varianten	89
6.2	<i>OLFML2B</i> -Varianten und Evolution	89
6.3	Sensitivität der verwendeten Mutationsscreeningmethode	90
6.4	Assoziation der <i>OLFML2B</i> -Varianten mit arrhythmogenen Erkrankungen	90
6.5	Assoziation der <i>OLFML2B</i> -Varianten mit einzelnen arrhythmogenen Erkrankungen	91
6.6	Auswahl von 14 <i>OLFML2B</i> -Varianten mit statistischen Merkmalen	92
6.7	Weiterführende funktionelle Untersuchungen von drei <i>OLFML2B</i> -Varianten	93
6.7.1	<i>Zellbiologische Versuche zur Sekretion des OLFML2B-Proteins</i>	94
6.7.2	<i>Zellulär-elektrophysiologische Untersuchungen des OLFML2B-Proteins</i>	96
6.8	Implikation für die Familie der Olfactomedine und ihrer Proteine	97
6.9	Implikationen für SIDS	98
6.10	Implikationen für zukünftige genomweite Untersuchungen	99
6.11	Schlussfolgerung	100
7	ZUSAMMENFASSUNG	101
8	SUMMARY	102
9	LITERATURVERZEICHNIS	103
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	120
11	TABELLENVERZEICHNIS	122
12	DANKSAGUNG	123
13	CURRICULUM VITAE	124

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1q23.3	Chromosom 1, Arm q, Stelle 23.2
24h-EKG	24-Stunden-Elektrokardiographie
32P-	Phosphor-32 zur radioaktiven Markierung
U/ μ l	Units/Mikroliter (Maß der Enzymkonzentration)
A	Adenin bzw. Adenosin
Abb.	Abbildung
<i>AKAP9</i>	Name eines Gens
et al.	et alii/aliae/alia (und andere)
<i>ANKB</i>	Name eines Gens
AP	Alkalische Phosphatase
ARIC	Studienkohorte
AS	Aminosäure
AV-	atrioventrikulär-
BMP-Pathway	„bone morphogenetic protein“-Signalweg
bp	Basenpaare (Nukleinsäuresequenzmaß)
BrS	Brugada-Syndrom
C	Cytidin
Ca	Calcium
Ca(2+)	Calcium(2+)-Ion
<i>CACNA1C</i>	Name eines Gens
<i>CAPON</i>	alternativer Name des Gens <i>NOS1AP</i>
<i>CAV3</i>	Name eines Gens
cDNA	kodierende (<i>engl.</i> : coding) DNA
CEU	Central European(s) (weitgehend synonym verwendet mit dem Begriff „Kaukasier“ im humangenetischen Sinne)
<i>CFTR</i>	Name eines Gens
Chr.	Chromosom
CI	Konfidenzintervall
CPVT	katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie
CS-E	Chondroitinsulfat E
CXC-Motiv	Motiv, das für ein spezielles Chemokin/Protein kodiert
Da	Dalton (Maßeinheit der Molekularmasse)
ddGTP	Didesoxyguanintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxynukleotidtriphosphat
DHPLC	„denaturing high performance liquid chromatography“

diLQT	„drug-induced LQT“, medikamenteninduziertes LQT
DNA	„desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	DNA spaltendes Enzym
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESP	Exome Sequencing Project
EVS	Exome Variant Server (Datenbankressource des ESP)
EXO	Exonuklease
F-Primer	„Forward“-Primer
FGF	„fibroblast growth factors“, Fibroblasten-Wachstumsfaktoren
G	Guanosin
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
GeNOVA	Studiename
GeSID-Studie	„German sudden infant death“-Studie
<i>GJB1</i>	Name eines Gens
GSF Neuherberg	Gesellschaft für Strahlenschutz, heute Helmholtz Zentrum München
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
HEK-Zellen	„Human Embryonic Kidney“-Zellen
<i>HERG</i>	veralteter Name des <i>KCNH2</i> -Gens
het	heterozygot
HF	Herzfrequenz
HGNC	„HUGO Gene Nomenclature Committee“
hME	„homogenous mass extend“ (kommerzielles massenspektrometrisches Verfahren der Fa. Sequenom zur Genotypisierung von SNPs)
hom	homozygot
Hpf	„high pressure freezing“
HRM	High resolution melting (kommerzielles Verfahren der Fa. Idaho Technologies zur Detektion von Mutationen in PCR-Produkten)
HUGO	Human Genome Organisation
dH ₂ O	chemische Formel für destilliertes Wasser
I _{Ca}	Calciumstrom
I _{Kr}	repolarisierender Kaliumstrom (durch <i>KCNH2</i>)
I _{Ks}	repolarisierender Kaliumstrom (durch <i>KCNQ1</i>)
I _{Na}	depolarisierender Natriumstrom (durch <i>SCN5A</i>)
JLNS	Jervell und Lange-Nielson Syndrom (autosomal-rezessives LQTS)

K(+)	Kaliumion
kb	Kilobase(n) (Nukleinsäuresequenzmaß)
<i>KCNH2</i>	Name eines Gens
<i>KCNQ1</i>	Name eines Gens
kg	Kilogramm
<i>Kir2.1</i>	veralteter Name des Gens <i>KCNJ2</i>
KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
<i>KvLQT1</i>	veralteter Name des Gens <i>KCNQ1</i>
LD	Linkage Disequilibrium
LQTS	Long-QT Syndrom
LQT1 - LQT13	Genorte der LQTS-Krankheitsgene
LV	linker Ventrikel
Lys	Lysin
mA	Milliampere (Maßeinheit des elektrischen Stroms)
MAF	Minor-Allelfrequenz
Maldi-TOF-MS	„Matrix-asisted-laser-desorption/ionisation-Time-of-flight-massspectrometry“
Mb	Megabase(n) (Nukleinsäuresequenzmaß)
mg	Milligramm
Mg(2+)	Magnesium(2+)-Ion
min.	Minute(n)
<i>MinK</i>	alternativer Name des Gens <i>KCNE1</i>
MiRP1	alternativer Name des Gens <i>KCNE2</i>
mM	Millimol
MONICA	Studie der WHO über Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Multinational Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease)
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde
Mut	Mutation
mV	Millivolt (Maßeinheit der elektrischen Spannung)
<i>MYOC</i>	Name eines Gens
N-Terminus	Amino-Terminus
Na(+)	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
nm	Nanometer
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (kodiert durch das <i>NOS1</i> -Gen)

<i>NOS1</i>	Name eines Gens
<i>NOS1AP</i>	Name eines Gens, auch <i>CAPON</i> genannt
Ns	nicht synonym
OD	„optical density“, 1 OD entspricht einer Konzentration von 50ng/μl doppelsträngiger DNA
OH-Gruppe	Hydroxidgruppe
OLF-Domäne	Olfactomedin-Domäne
<i>OLFM2</i>	Name eines Gens
<i>OLFML2B</i>	Name eines Gens, <i>Photomedin 2</i>
OR	Odds Ratio
p-Wert	Signifikanzwert
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDI	Protein-disulfid-Isomerase
PDZ-binding domain	Teil eines Proteins, welcher mit anderen PDZ-Domänen interagiert
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
POAG	primäres Offenwinkelglaukom
QT-Intervall	Zeitdauer zwischen dem Beginn der Q-Zacke und dem Ende der T-Welle im EKG (üblicherweise gemessen in ms)
QTc	korrigierte QT-Zeit
QTL	„quantitative trait locus“
R-Primer	„reverse primer“
RCLB	„red cell lysis buffer“
rpm	Umdrehungen pro Minute
RR-Intervall	Zeitdauer zwischen zwei R-Zacken im EKG (üblicherweise gemessen in ms)
rs-Nummer	Identifikationsnummer von SNPs
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„real-time“-PCR
RV	rechter Ventrikel
RWS	Romano-Ward Syndrom (autosomal dominantes LQTS)
s	Sekunde
SAP	„Shrimp Alkaline Phosphatase“
SarDiNIA	Projektname einer epidemiologischen Studie
SCD	Plötzlicher Herztod („sudden cardiac death“)
<i>SCN4B</i>	Name eines Gens
<i>SCN5A</i>	Name eines Gens
SD	Standardabweichung („standard deviation“)
SDS-Puffer	Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese-Puffer
sec	Sekunde

SE-Puffer	Saline-EDTA-Puffer
SIDS	„sudden infant death“
SNP	„single nucleotide polymorphism“
<i>SNTAI</i>	Name eines Gens
T	Thymidin
TAQ	<i>Thermus aquaticus</i>
TdP	ventrikuläre Tachykardie vom Torsade de pointes-Typ
TE-Puffer	Puffer, der TRIS und EDTA enthält
TIGR	veralteter Name für das MYOC-Protein („trabecular meshwork inducible glucocorticoid response protein“)
TOF	„time of flight“
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Puffersubstanz)
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoff)
Tyr	Tyrosin
U	Unit
μmol	Mikromol (Stoffmengenmaß)
μM	Mikromolar (Konzentrationsmaß; μmol/l)
UV	ultraviolett
VF	Kammerflimmern („ventricular fibrillation“)
VT	ventrikuläre Tachykardie
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
WNT-Pathway	Signalweg, der nach dem Liganden „Wnt“ benannt wurde
wt	Wildtyp

3 EINLEITUNG

3.1 Das Aktionspotential des Herzmuskels

Für die Kontraktion des Herzens ist eine koordinierte Erregung der Kardiomyozyten der Vorhöfe, des AV-Knotens, des ventrikulären Reizleitungssystems sowie der Kammern notwendig. Durch ein komplexes Zusammenspiel von Ionenströmen entstehen dabei elektrische Aktionspotentiale in den verschiedenen anatomisch und physiologisch unterschiedlichen Arealen des Herzens.

Die zyklische Aktivität im Sinusknoten steht am Anfang des physiologischen Sinusrhythmus. Diese Erregung breitet sich in der Folge zunächst über die Vorhöfe, dann weiter über den Atrioventrikularknoten auf die Ventrikelebene und über das His-Bündel auf die Tawara-Schenkel aus. Von dort aus wird dann die Erregung der Arbeitsmuskulatur der Herzventrikel getriggert.

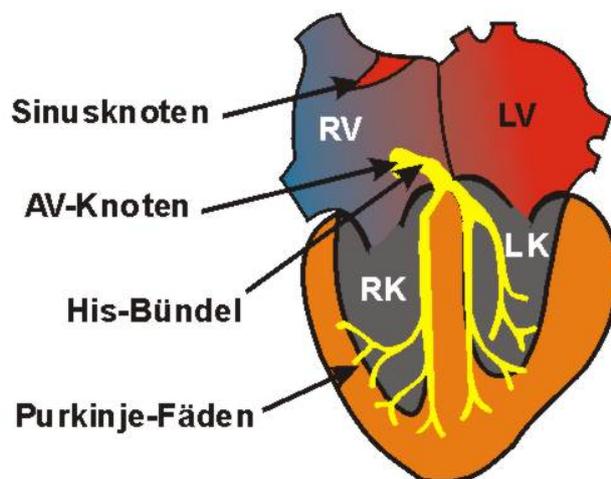


Abbildung 1: Die Abbildung zeigt die räumliche Aufteilung der kardialen Erregungsleitung ausgehend vom Sinusknoten bis zum Ventrikel.

Die kardiale Erregungsleitung breitet sich zunächst über die Vorhöfe, dann weiter über den Atrioventrikularknoten auf die Ventrikelebene und über das His-Bündel auf die Tawara-Schenkel aus [Eichmann, 1998].

Die molekularen Träger dieser Ionenströmungen sind Ionenkanäle, die aus einer oder mehreren Protein-Untereinheiten bestehen, welche von den entsprechenden Ionenkanalgenen im Genom kodiert werden.

3.1.1 Phasen des kardialen Aktionspotentials

Man unterscheidet zwischen verschiedenen Arbeitsphasen (Phase 0-Phase 4) des Myokards bei der kardialen Erregungsleitung. Diese werden durch Ionenströme in der kardiomyozytären Zellmembran (Sarkolemma) ausgelöst, die die Arbeitsphasen zeitlich und räumlich steuern.

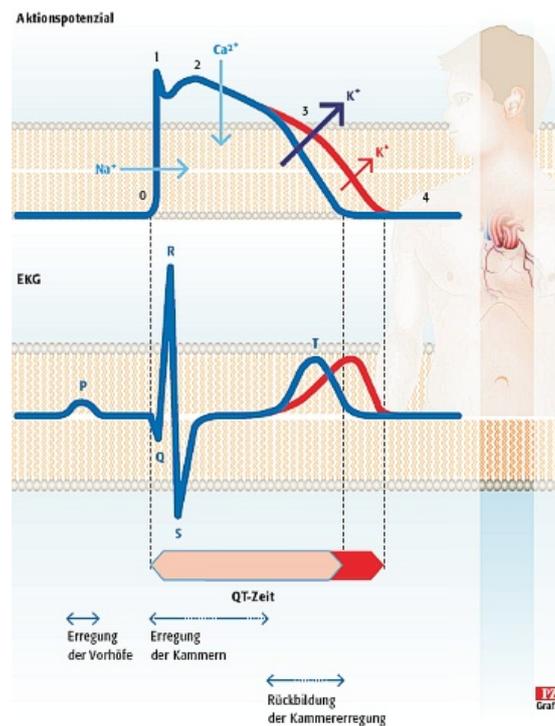


Abbildung 2: Aktionspotential des Herzmuskels und Charakterisierung der einzelnen Erregungsphasen.

Es sind eine normale (blau) und eine pathologische (rot) Repolarisation dargestellt mit ihren jeweiligen Auswirkungen auf das Aktionspotential (schematisch) und das QT-Intervall im Oberflächen-EKG [Hein, 2009].

Phase 0 - Ruhezustand:

Die Herzmuskelzelle befindet sich im depolarisierten Zustand und das Membranpotential ist nahe dem Kaliumruhepotential. Natrium- (I_{Na}) und Calciumkanäle (I_{Ca}) sind geschlossen.

Phase 1 - Depolarisation:

Hier kommt es zur Depolarisation der Herzmuskelzelle durch einen schnellen Einstrom von Natriumionen (I_{Na}) in die Herzmuskelzelle.

Phase 2 - Plateau-Phase:

Es strömen langanhaltend Calciumionen (I_{Ca}) in die Herzmuskelzelle ein und triggern eine weitere Freisetzung von Calciumionen aus den intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums. Die Calciumkanäle schließen nach 100ms und Calcium wird wieder zurück in die Speicher beziehungsweise aus der Zelle heraus befördert, und die Herzmuskelzelle relaxiert.

Phase 3 - Repolarisation:

Durch die Öffnung von repolarisierenden Kaliumkanälen (I_{Ks} , I_{Kr}) kehrt das Membranpotential wieder zum Ausgangspunkt zurück. Eine Verlängerung der Phase 3 führt zu einer Verzögerung der Repolarisation und verlängert die Repolarisation und somit das QT-Intervall.

Phase 4 - Ruhezustand:

In Phase 4 befindet sich die Zelle im Ruhezustand. Eine langsame Depolarisation über I_f -Ströme durch zyklonukleotid-regulierte Kationenkanäle (v.a. HCN2 und HCN4) führt beim Überschreiten des Schwellenpotentials für den spannungsabhängigen Natriumkanal (SCN5A) zum nächsten Aktionspotential (I_{Na}).

3.1.2 Molekulare Grundlagen der Repolarisation

Das Aktionspotential im Ventrikel ist bei einem verlängerten QT-Intervall ebenfalls verzögert.

Durch eine Veränderung in den Kaliumkanälen, zum Beispiel durch eine Mutation, die zu einer Kaliumstromreduktion führt, kann es zu einer solchen Verlängerung des Aktionspotentials kommen. Aber auch durch aktivierende andere Mutationen, zum Beispiel in den depolarisierenden Na- oder Ca-Kanälen, kann das Aktionspotential verlängert werden. Letztere sind jedoch aufgrund der statistisch kleineren Wahrscheinlichkeit von aktivierenden gegenüber inaktivierenden Mutationen um mehr als eine Größenordnung seltener.

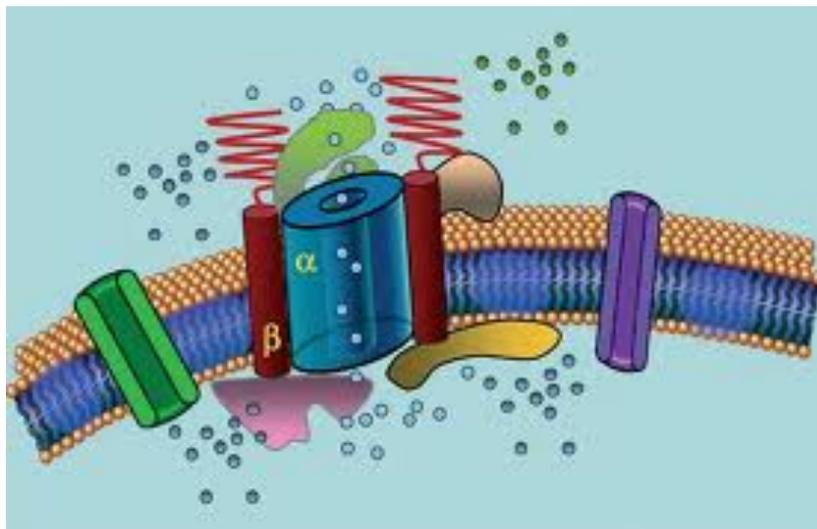


Abbildung 3: Bildliche Darstellung eines Ionenkanals, der aus alpha- und beta-Untereinheiten aufgebaut ist.

[Medeiros-Domingo et al., 2007].

3.1.3 Das QT-Intervall

Das QT-Intervall beschreibt die Dauer zwischen der Q- und der T-Zacke im EKG und ist in der Normalbevölkerung nahezu normalverteilt mit einem Mittelwert bei 400ms. Diese Zeitdauer ist stark abhängig von der Herzfrequenz. Der Korrelationskoeffizient zwischen dem QT- und dem RR-Intervall beträgt ca. $0,5 \leq r^2 \leq 0,6$ in Abhängigkeit von der untersuchten Bevölkerungsstichprobe. Der Begriff QTc steht für das korrigierte QT-Intervall. Üblicherweise ist QTc für die Herzfrequenz korrigiert, manchmal auch für das Alter und das Geschlecht. Typische Standardabweichungen aus Bevölkerungsstudien sind für das QT-Intervall ca. $\pm 28\text{ms}$ und für das QTc-Intervall ca. $\pm 17\text{ms}$. Die QT-Zeit ist bei Frauen üblicherweise um ca. 5-10ms länger als bei Männern.

Die Herzfrequenzkorrektur des QT-Intervalls nach Bazett:

$$\text{QTc}[\text{ms}] = \text{QT}[\text{ms}] / \sqrt{\text{RR}[\text{ms}]}$$

Die Herzfrequenzkorrektur des QT-Intervalls mit linearer Regression (z.B. 0,150):

$$\text{QTc}[\text{ms}] = \text{QT}[\text{ms}] - 0,150 * \text{RR}[\text{ms}]$$

Die Korrektur mit linearer Regression ist der Korrektur nach Bazett vorzuziehen, da sie zu einer stärkeren Reduktion der Varianz führt [Pfeufer et al., 2005].

Eine Verlängerung des QTc von über 450ms bei Männern bzw. 460ms bei Frauen wird im klinischen Gebrauch als ein signifikant verlängertes QTc-Intervall bezeichnet und kann auf das Vorliegen eines monogenen Long-QT Syndroms (LQTS) hinweisen. Andere EKG-Hinweise auf das Vorliegen von Repolarisationsstörungen sind alternierende T-Wellen („T-wave alternans“) und gekerbte T-Wellen („T-wave notches“), (s. Abbildung 6). Eine erhöhte Mortalität bei Personen mit einem verlängerten QT-Intervall wurde erstmals im Jahr 1991 beschrieben [Shouten, 1991].

3.1.4 Repolarisationsstörungen

Eine Störung der Repolarisation im Herzen tritt oft als Verlängerung des QT-Intervalls in Erscheinung. Sie kann zu einer ventrikulären Tachykardie (VT) führen, die dann typischerweise vom Torsade de pointes-Typ (TdP) ist. Eine TdP-Tachykardie kann in Kammerflimmern (VF) degenerieren und schließlich zum plötzlichen Herztod führen (SCD). Sowohl VT, TdP und VF können als Synkopen symptomatisch werden [Elming et al., 1998].

Eine Repolarisationsstörung vom TdP-Typ ist in der folgenden EKG-Aufzeichnung wiedergeben:



Abbildung 4: 12-Kanal EKG, das eine ventrikuläre Tachykardie vom Torsade de pointes-Typ (TdP) zeigt.

Dargestellt sind in drei Kanälen jeweils sechs Ableitungen im Wechsel (Zeile 1-3), sowie darunter durchgehend die Ableitung II (Zeile 4). Eine ventrikuläre Extrasystole (VES) wird von einer Pause und einem anschließenden supraventrikulär ausgelösten Schlag gefolgt. Der anschließende vorzeitige Kammer Schlag wird gefolgt von einer Episode polymorpher ventrikulärer Tachykardie. Diese weist die typischen schraubenförmig oszillierenden Kammerkomplexe einer TdP-Tachykardie auf, die durch eine kontinuierliche Verdrehung der QRS-Achse um eine gedachte Grundlinie charakterisiert sind [Karls-Universität-Prag, 2013].

3.2 Das monogene Long-QT Syndrom

3.2.1 Definition

Das monogene Long-QT Syndrom (LQTS) ist durch eine signifikante Verlängerung des QT-Intervalls über die oben beschriebenen Schwellenwerte charakterisiert. LQTS ist eine relativ seltene Erkrankung mit einer Häufigkeit zwischen 1:2.000 und 1:5.000 in der Normalbevölkerung [Hedley et al., 2009].

LQTS wird durch Mutationen in Genen für einige der oben erwähnten Ionenkanäle sowie in Genen für mit diesen interagierende Proteine hervorgerufen. Die Erkrankung ist funktionell charakterisiert durch einen abnormen Ablauf der kardialen Repolarisation in den ventrikulären Herzmuskelzellen. Während geringfügige Änderungen und Störungen der kardialen Repolarisation sich in der Normalbevölkerung

als Variation des QT-Intervalls manifestieren, ist das Long-QT Syndrom die monogene Modellerkrankung einer stärker gestörten kardialen Repolarisation.

Die QT-Verlängerung muß in den Betroffenen, jedoch nicht zu jedem Zeitpunkt, über den Schwellenwerten liegen, so daß ein EKG mit einem normalen QT-Intervall nicht zwingend zum definitiven Ausschluß der Diagnose verwendet werden kann.

Hier folgt die Abbildung eines Elektrokardiogramms bei einem Patienten mit LQTS:

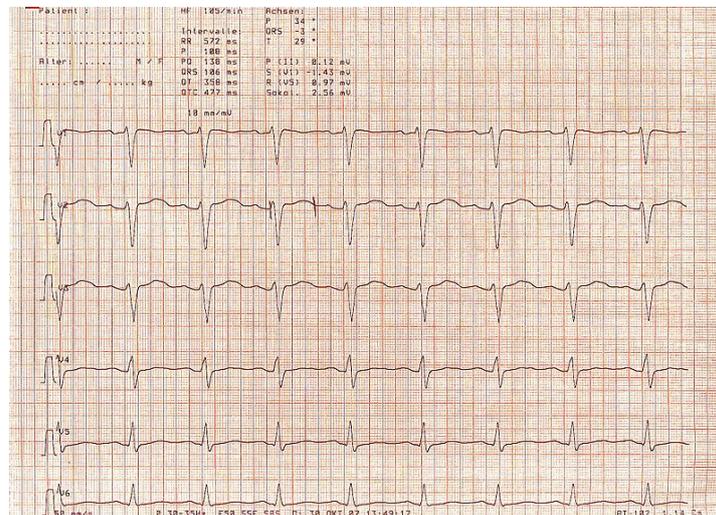


Abbildung 5: EKG bei Long-QT Syndrom mit Tachykardie.

Trotz der primär nicht als verlängert erscheinenden QT-Zeit von 358ms ergibt sich nach Frequenzkorrektur aufgrund der vorliegenden Sinustachykardie (HF=125/min; RR=572ms) ein deutlich verlängertes QTc-Intervall von 477ms [Wikipedia, 2013].

Typischerweise sind auch diagnostisch wegweisend T-Wellen-Einkerbungen („notches“) sowie alternierende T-Wellen („alternans“), die selbst im Falle eines nicht signifikant verlängerten QT-Intervalls auf Repolarisationsstörungen hinweisen können (siehe Abbildung 6).

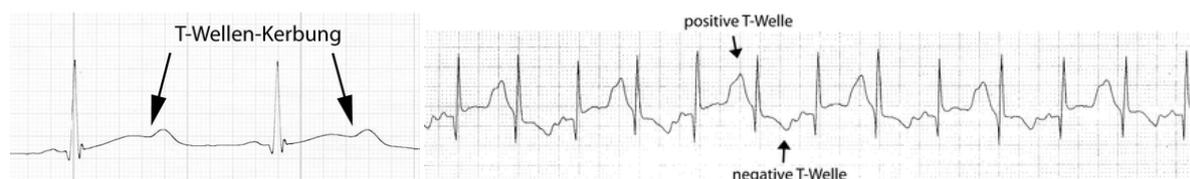


Abbildung 6: EKG bei Long-QT Syndrom mit T-Wellen-Einkerbungen (links) sowie alternierende T-Wellen (rechts).

Bei alternierenden T-Wellen wechseln sich solche mit positiver und negativer Amplitude ab [Universitätsklinikum-Heidelberg, 2013].

3.2.2 Historie

Das Long-QT Syndrom wurde erstmals im Jahr 1957 von Anton Jervell und Fred Lange-Nielsen beschrieben [Jervell et al., 1957]. Sie berichteten über ein nicht blutsverwandtes Ehepaar mit sechs Kindern, vier ihrer Kinder waren taub und litten an rezidivierenden Synkopen unklarer Genese. Drei dieser Kinder verstarben an einem plötzlichen Herztod. Bei den Eltern waren keine kardiologischen oder neurologischen Erkrankungen bekannt. Die einzige Auffälligkeit bei den Kindern war eine bekannte Verlängerung der QT-Zeit im EKG.

Eine weitere Studie wurde zu diesem Thema sechs Jahre später von Romano und Ward, beides Kinderärzte, veröffentlicht [Romano et al., 1963]. Ein Syndrom mit rezidivierenden Synkopen, plötzlichem Herztod in der Familienanamnese und einer QT-Zeit-Verlängerung im EKG jedoch ohne Gehörlosigkeit wurde von ihnen beobachtet.

Durch weitere Studien konnte gezeigt werden, dass homozygote Mutationen mit autosomal-rezessivem Vererbungsmuster der von Jervell und Lange-Nielsen beschriebenen Erkrankung zugrunde lagen, während Romano und Ward die heterozygote Variante ohne Gehörlosigkeit entdeckt hatten, die autosomal-dominant vererbt wird.

Das Long-QT Syndrom wurde schließlich im Jahr 1995 als Ionenkanalerkrankung erkannt [Wang et al., 1995a].

3.2.3 Genetische Ursachen

Die ersten drei Krankheitsgene des monogenen Long-QT Syndroms wurden in den Jahren 1995 und 1996 entdeckt [Curran et al., 1995], [Wang et al., 1995b], [Wang et al., 1996], [Bennett et al., 1995]. Mittlerweise sind 13 Krankheitsgene bekannt. In ca. 75% aller klinisch mit LQTS diagnostizierten Patienten kann in einem dieser Gene eine monogene Mutation identifiziert werden.

Tabelle 1: Darstellung der verschiedenen Gene, in denen monogene Mutationen zu LQTS führen

Syndrom	Genort	Gen (HGNC)	Gen (veraltet)	Vererbung	Häufigkeit*
LQT1	11p15.5	<i>KCNQ1</i>	<i>KvLQT1</i>	dominant	40-55%
LQT2	7q35-36	<i>KCNH2</i>	<i>HERG</i>	dominant	15-20%
LQT3	3p21-24	<i>SCN5A</i>	<i>SCN5a</i>	dominant	5%
LQT4	4q25-27	<i>ANK2</i>	<i>ANKB</i>	dominant	1-2%
LQT5	21q22.1-22.2	<i>KCNE1</i>	<i>MinK</i>	dominant	1%
LQT6	21q22.1-22.2	<i>KCNE2</i>	<i>MiRP1</i>	dominant	selten
LQT7	17q23	<i>KCNJ2</i>	<i>Kir2.1</i>	dominant	selten
LQT8	12p13.3	<i>CACNA1C</i>	<i>CACNA1c</i>	dominant	selten
LQT9	3p25	<i>CAV3</i>	<i>CAV3</i>	dominant	selten
LQT10	11q23.3	<i>SCN4B</i>	<i>SCN4β</i>	dominant	bisher 1 Familie
LQT11	7q21-q22	<i>AKAP9</i>	<i>AKAP9</i>	dominant	selten
LQT12	20q11.2	<i>SNTA1</i>	<i>SNTA1</i>	dominant	selten
LQT13	11q23.3-24.3	<i>KCNJ5</i>	<i>Kir3.4</i>	dominant	selten
JLN1	11p15.5	<i>KCNQ1</i>	<i>KvLQT1</i>	rezessiv	6,3%
JLN2	21q22.1-22.2	<i>KCNE1</i>	<i>MinK</i>	rezessiv	0,7%

*RWS = Long-QT Syndrom (vom Romano-Ward-Typ), JLN = Long-QT Syndrom (vom Jervell und Lange Nielsen-Typ) [Medeiros-Domingo et al., 2007], [GHDP, 2010]. *Die Häufigkeit bezieht sich auf die Gesamtheit aller bisher untersuchten Long-QT Patienten.*

Beim autosomal-dominanten Long-QT Syndrom sind in der Literatur mittlerweile über 500 Mutationen in 13 Genen beschrieben. Beim autosomal-rezessiven Jervell und Lange-Nielsen Syndrom kommen Mutationen nur in zwei dieser 13 Gene vor (*KCNQ1* und *KCNE1*).

Mutationen in Kaliumkanälen und in mit ihnen interagierenden Proteinen (z.B. *KCNE1* und *KCNE2*) führen dabei zu einem reduzierten Kaliumauswärtsstrom, vor allem in Phase 3 des Aktionspotentials (verminderte Repolarisation). Mutationen in Natriumkanälen und in mit ihnen interagierenden Proteinen (z.B. *ANK2*, *CAV3* und *SCN4B*) führen typischerweise zu einem vermehrten Natriumeinwärtsstrom, vor allem in Phase 0, 1 und 4 des Aktionspotentials (vermehrte Depolarisation). Beide Mechanismen führen zu einer Verlängerung des kardialen Aktionspotentials und damit auch der QT-Zeit. Um die vorliegende Pathophysiologie jedes Patienten besser verstehen zu können und dementsprechend die Therapie anzupassen, ist es wichtig, in jedem Betroffenen das mutierte Krankheitsgen sowie die verursachende Mutation zu identifizieren.

Den betroffenen Krankheitsgenen beim autosomal-dominanten LQTS (RWS) lassen sich klinisch relevante unterschiedliche Subphänotypen zuordnen. Das wird hier am Beispiel der drei am häufigsten betroffenen Krankheitsgene erläutert:

LQT1:

Im Gen *KCNQ1* (Chr. 11p15.5) liegt in ca. 40-55% aller LQTS-Patienten eine Mutation vor. Die Expression des Gens findet vor allem in Innenohr, Pankreas, Darm und in der Niere statt. Krankheitsmutationen führen zu einem verringerten I_{Ks} -Repolarisationsstrom bedingt durch die mutationsbedingt geringere Leitfähigkeit der alpha-Untereinheit des spannungsabhängigen KCNQ1-Kaliumkanals. Bei LQT1 ist die T-Welle im EKG oft verbreitert. Bei LQT1-Mutationen kommt es häufig zur Triggerung ventrikulärer Arrhythmien bei Stimulation des sympathischen Nervensystems (68%) [Schwartz et al., 2001b] oder bei körperlicher Anstrengung, z.B. beim Schwimmen [Ackerman et al., 1999]. LQT1-Mutationen haben ein minimal geringeres Risiko als LQT2-Mutationen für den plötzlichen Herztod.

LQT2:

In ca. 15-20% liegt bei LQTS-Patienten eine Mutation im Gen *KCNH2* (Chr. 7q36) vor. Dieses Gen kodiert für die alpha-Untereinheit der kardialen Kaliumkanäle. Krankheitsmutationen führen zu einem verringerten I_{Kr} -Repolarisationsstrom bedingt durch die mutationsbedingt geringere Leitfähigkeit der alpha-Untereinheit des spannungsabhängigen KCNH2-Kaliumkanals. Bei LQT2 ist meist eine niedrige Amplitude der T-Welle mit einer kleinen Einkerbung („T-wave notch“) erkennbar.

Patienten mit *KCNH2*-Mutationen erleiden ventrikuläre Arrhythmien besonders häufig im Schlaf (22%), im Zusammenhang mit emotionalen Stresssituationen (49%) oder mit plötzlichen auditorischen Stimuli, wie zum Beispiel dem Klingeln eines Weckers [Schwartz et al., 2001b].

LQT3:

In ca. 5% aller LQT-Patienten liegt eine Mutation im Gen *SCN5A* (Chr. 3p21) vor.

Krankheitsmutationen führen zu einem vermehrten I_{Na} -Depolarisationsstrom (bedingt durch die mutationsbedingt erhöhte Offenwahrscheinlichkeit und damit gesteigerte Leitfähigkeit der alpha-Untereinheit des spannungsabhängigen SCN5A-Natriumkanals. Die T-Welle setzt bei LQT3 meist verspätet ein. Bei LQT3 ist das Risiko ventrikulärer Arrhythmien vor allem bei Bradykardie, z.B. in Ruhe und im Schlaf, erhöht [Beaufort-Krol et al., 2005].

3.2.4 Diagnostik

Bei einem klassischen Phänotyp mit deutlicher QT-Verlängerung und rezidivierenden Synkopen ist die Diagnosestellung des Long-QT Syndroms relativ klar. Es gibt aber Fälle, wo die klinischen Befunde und die Symptome nicht so eindeutig sind. Hier ist die Evaluation weiterer Faktoren

notwendig, die sich aus der individuellen Anamnese, einschließlich der Symptome, sowie aus dem klinischen Befund, einschließlich des Oberflächen-EKG, ergeben. Es sind mehrere Scores publiziert worden, die diese diagnostischen Kriterien miteinbeziehen, unter Anderem der häufig verwendete Schwartz-Score [Schwartz, 1985], [Schwartz et al., 1993], [Medeiros-Domingo et al., 2007], [Schwartz, 2006].

Der Algorithmus zur Berechnung des Schwartz-Scores ist in der folgenden Tabelle 2 zusammengefasst. Der errechnete Score reicht von 0 bis 9 möglichen Punkten. Bei über 3,5 Punkten spricht man von einer hohen Wahrscheinlichkeit des LQTS.

Zu beachten ist allerdings, dass alle bisher entwickelten Scores lediglich Aussagen zur Diagnosewahrscheinlichkeit des LQTS machen. Sie sind nicht zur Beurteilung der Prognose des zukünftigen Krankheitsverlaufes gedacht, entwickelt oder validiert worden.

Tabelle 2: Gewichtung der Punkte im Schwartz-Score

Variablen	Variablen im Detail	Punkte
EKG	QTc \geq 480	3
	QTc \geq 460-479	2
	QTc \geq 480 (4 min nach Belastung)	1
	QTc \geq 450-459 (nur für Männer)	1
	Torsade de pointes	2
	Alternierende T-Wellen („alternans“)	1
	T-Wellen-Kerbungen („notches“) in mindestens 3 Ableitungen	1
	Bradykardie	0,5
Anamnese	Synkope	
	mit Stress	2
	ohne Stress	1
	Kongenitale Innenohrschwerhörigkeit	0,5
Familienanamnese	Familienangehörige mit diagnostiziertem LQTS	1
	unklarer plötzlicher Herztod unter 30 Jahren	0,5

QTc wurde mit der Bazett-Formel berechnet ($QTc=QT/\sqrt{RR}$). Zur Berechnung des Schwartz-Scores werden folgende Strata gebildet:

≤ 1 Punkt: geringe Wahrscheinlichkeit für LQTS

1,5-3 Punkte: mittlere Wahrscheinlichkeit für LQTS

$\geq 3,5$ Punkte: hohe Wahrscheinlichkeit für LQTS

Da Mutationsträger durchaus klinisch unauffällig sein können, also z.B. auch keine auffällige Verlängerung des QT-Intervalls aufweisen müssen, ist in betroffenen Familien mit bekannter Mutation auf jeden Fall eine molekulargenetische Untersuchung in den weiteren Familienmitgliedern ratsam, auch wenn diese keinen hohen Schwartz-Score zu einem bestimmten Zeitpunkt erreichen.

3.2.5 Therapie

Der primäre Ansatz ist zunächst eine Therapie mit Betablockern, wenn keine Kontraindikationen vorliegen. Hierzu geeignet ist zum Beispiel Propranolol in der täglichen Dosierung von 2-3mg/kg/Tag, ggf. auch 4mg/kg/Tag, da dieser Betablocker auch die Blut-Hirnschranke problemlos passieren kann. Nadolol in der Dosierung 1mg/kg/Tag kann als Ausweichpräparat gegeben werden. Betablocker mit einer intrinsischen sympathomimethischen Aktivität dürfen nicht gegeben werden. Unter dieser antiadrenergen Therapie zeigte sich eine Letalität bei Patienten mit unbekanntem Genotyp von 2% im Untersuchungszeitraum [Moss et al., 2000].

Die Wirkung liegt möglicherweise in der Sensibilisierung für Katecholamine bei reduziertem Kaliumstrom und in der Sensibilität für eine Betablockade. Daher ist das Meiden von Trigger-Aktivitäten wie zum Beispiel Wettkampfsport, Vagusmanöver und Tauchen prophylaktisch wichtig [Roden, 2008]. Aber eine regelmäßige Bewegung ist ratsam. Auch QT-Zeit verlängernde Medikamente sind nicht erlaubt. Eine Therapie mit Betablockern beim medikamenteninduzierten LQTS ist allerdings kontraindiziert. Wichtig ist zudem der Ausgleich einer Hypokaliämie sowie die Gabe von Magnesium oder eine Therapie mit Orciprenalin bei zu niedriger Herzfrequenz.

Eine weitere Möglichkeit bei Hochrisikopatienten ist die linksventrikuläre sympathische Denervierung mittels Thorakotomie [Schwartz et al., 2004], die in einer Studie bei 91% der Patienten zu einer Reduktion der kardialen Ereignisse und zu einer Verkürzung der QT-Zeit im EKG im Durchschnitt um 39ms geführt hatte. Leider besteht bei diesem operativen Eingriff als Nebenwirkung die Gefahr eines iatrogenen Horner-Syndroms.

Nur bei wenigen Patienten ist schließlich die Implantation eines Herzschrittmachers indiziert.

Heutzutage werden aber immer öfters Defibrillatoren mit Schrittmacherfunktion implantiert, insbesondere nach einem bereits durchgemachten Herzstillstand. Der Einsatz bei Patienten ohne bisherigen Herzstillstand ist umstritten [Viskin et al., 2009].

3.2.6 Komplexe Prädispositionen zu Repolarisationsstörungen

Neben den beschriebenen monogenen existieren auch polygene Dispositionen, die zu Repolarisationsstörungen führen können. Diese werden durch das Zusammenwirken von mehreren üblicherweise häufigen genomischen Varianten („Polymorphismen“) verursacht, die für sich genommen nur jeweils eine geringe Risikoerhöhung bewirken. Diese schwachen Varianten können aber additiv oder auch nicht-additiv zusammenwirken, im letzteren Fall spricht man von statistischer Interaktion oder epistatischen Effekten. Polygene Erkrankungen werden alternativ oftmals auch als komplexe Erkrankungen bezeichnet, da neben genetischen Varianten üblicherweise auch exogene und umweltbedingte Faktoren an der Erkrankungsätiologie beteiligt sind.

3.2.7 Das medikamenteninduzierte LQT-Syndrom

Viele Medikamente können über eine Verlängerung der QT-Zeit zum LQTS führen, zum Beispiel durch eine Wirkung auf den Kaliumstrom in der Herzmuskelzelle. Jedoch der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt [Haverkamp W, 2002].

Tabelle 3: Medikamente, die ein LQTS auslösen können

Indikationsgruppe	Wirkstoffe (Beispiele)
Herz-Kreislauf-Medikamente	Adrenalin, Dobutamin, Dopamin, Ephedrin, Indapamid, Isradipin, Midodrin, Noradrenalin
Antiarrhythmika	Amiodaron, Chinidin, Disopyramid, Flecainid, Sotalol
Neuro- und Psychopharmaka	Amitriptylin, Chloralhydrat, Citalopram, Chlorpromazin, Clomipramin, Doxepin, Felbamat, Fluoxetin, Flupentixol, Galantamin, Haloperidol, Imipramin, Levomepromazin, Lithium, Methadon, Methylphenidat, Nortriptylin, Olanzapin, Paroxetin, Quetiapin, Risperidon, Sertindol, Sertralin, Thioridazin, Tizanidin, Trimipramin, Venlafaxin
Magen-Darm-Mittel	Cisaprid, Dolasetron, Domperidon, Granisetron, Octreotid, Ondansetron, Sibutramin
Asthmamittel	Salbutamol, Salmeterol, Terbutalin
Antibiotika	Azithromycin, Ciprofloxacin, Clarithromycin, Erythromycin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Ofloxacin, Trimethoprim-Sulfamethoxazol
Virustatika	Amantadin, Foscarnet
antiparasitäre Mittel	Chinidin, Chloroquin, Mefloquin, Pentamidin
Antimykotika	Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol, Voriconazol
andere Wirkstoffe	Alfuzosin, Phenylephrin, Pseudoephedrin, Tacrolimus, Tamoxifen, Vardenafil

Dargestellt werden einige Medikamente, die zur einer Verlängerung der QT-Zeit führen können und ihre Indikationsgruppen [Hein, 2009]. Diese Tabelle ist lediglich eine Übersicht und entspricht nicht der Vollständigkeit.

3.2.8 Komplexe genetische Ursachen von Repolarisationsstörungen

Es wurde gezeigt, dass das verlängerte QT-Intervall das Risiko für ventrikuläre Arrhythmien erhöht, die wiederum zu einem SCD (sudden cardiac death) führen können [Straus et al., 2006]. In mehreren genomweiten Assoziationsstudien wurde mittlerweile die Assoziation zwischen SNPs in der Nähe der Gene *NOS1AP* und *OLFML2B* (z.B. rs10494366) sowie der Länge des QT-Intervalls in der Normalbevölkerung beschrieben [Arking et al., 2006]. Durch Aarnoudse et al. konnte dieser Zusammenhang auch in einem weiteren Patientenkollektiv von 228 Teilnehmern bestätigt werden [Aarnoudse et al., 2007]. Die komplexe genetische Modulation des QT-Intervalls durch häufige genetische Varianten wird im Detail im Kapitel 3.4 - genomweite Assoziationsstudien - beschrieben.

3.3 Plötzliche Herztods syndrome

3.3.1 Sudden Cardiac Death (SCD)

"Sudden cardiac death" (SCD) ist eine der häufigsten tödlichen kardialen Ursachen. In Deutschland sterben 100.000-200.000 Menschen pro Jahr mit dieser Diagnose. SCD beinhaltet den kardialen Tod innerhalb einer Stunde nach Beginn der ersten Symptome. Die Definition bezieht sich nicht auf eine spezielle kardiale Ursache im Konkreten, denn es können viele verschiedene Gründe zu einem plötzlichen unerwarteten kardialen Tod führen [Virmani et al., 2001].

Die häufigste Ursache ist eine durch einen Herzinfarkt ausgelöste akute ventrikuläre Tachykardie, die in Kammerflimmern degeneriert (VT/VF). Am zweithäufigsten kommt es zu einem SCD bei erwachsenen Patienten durch eine linksventrikuläre Hypertrophie, die wiederum zu VT/VF führen kann.

Auch bei jungen Athleten wurde ein SCD unklarer Genese beobachtet. Ein Ungleichgewicht der autonomen Aktivierung des Herzmuskels wurde beschrieben, aber insbesondere auch bei Herzinsuffizienzpatienten [Pokorny et al., 2011]. Typisch für diese Erkrankung ist, dass bei einer Obduktion keine klare Ursache für den plötzlichen Tod gefunden werden kann [Tester et al., 2005a].

3.3.2 Sudden Infant Death Syndrome (SIDS)

3.3.2.1 Definition

Der plötzliche Kindstod bzw. das „sudden infant death syndrome“ (SIDS) beschreibt den plötzlichen Tod eines Kindes mit unklarer Todesursache im Alter bis zu 1 Jahr. Die Diagnose eines plötzlichen Kindstods wird durch den Pathologen bzw. Rechtsmediziner gestellt, der keine erklärbare Ursache für den plötzlichen Tod finden konnte. SIDS ist damit eine Ausschlussdiagnose.

Die Inzidenz von SIDS hat in den letzten zwei Dekaden in den westlichen Ländern durch Präventionsmaßnahmen wie Vermeidung von Bauchlage, Hitzestau und Rauchexposition deutlich abgenommen, in Deutschland sogar um 66%: Von 1,4 auf 1000 Lebendgeborenen in 1990 auf 0,47 von 1000 Lebendgeborenen in 2006, siehe Tabelle 4. Der plötzliche Kindstod betrifft aber in Deutschland immer noch viele hundert Kinder jährlich. In Deutschland starben im Jahr 2008 321 Babys am plötzlichen Kindstod [Statistisches-Bundesamt, 2008].

Tabelle 4: SIDS-Fälle zwischen 1990 bis 2008 in Deutschland

Jahr	1990	2006	2008
Lebendgeborene	905675	672724	682514
gestorbene Säuglinge im 1 Jahr	6385 (7,0%)	2579 (3,8%)	2414 (3,5%)
an SIDS	1425 (1,4%)	319 (0,47%)	321 (0,47%)

Lebendgeborene, Säuglingssterblichkeit und SIDS-Fälle zwischen 1990 und 2008.

Daten vom statistischen Bundesamt 2008 [Statistisches-Bundesamt, 2008].

Die Säuglingssterblichkeit liegt in Bayern seit mehreren Jahren unter dem Durchschnitt anderer Bundesländer. Die wichtigsten Ursachen sind Frühgeburten, angeborene Fehlbildungen und der plötzliche Kindstod (SIDS). Bei ungefähr jedem zehnten dieser Kinder wurde ein SIDS diagnostiziert: 29 Babys starben 2006 am plötzlichen Kindstod in Bayern (s. folgende Abbildung mit Daten des statistischen Bundesamtes von 2006).

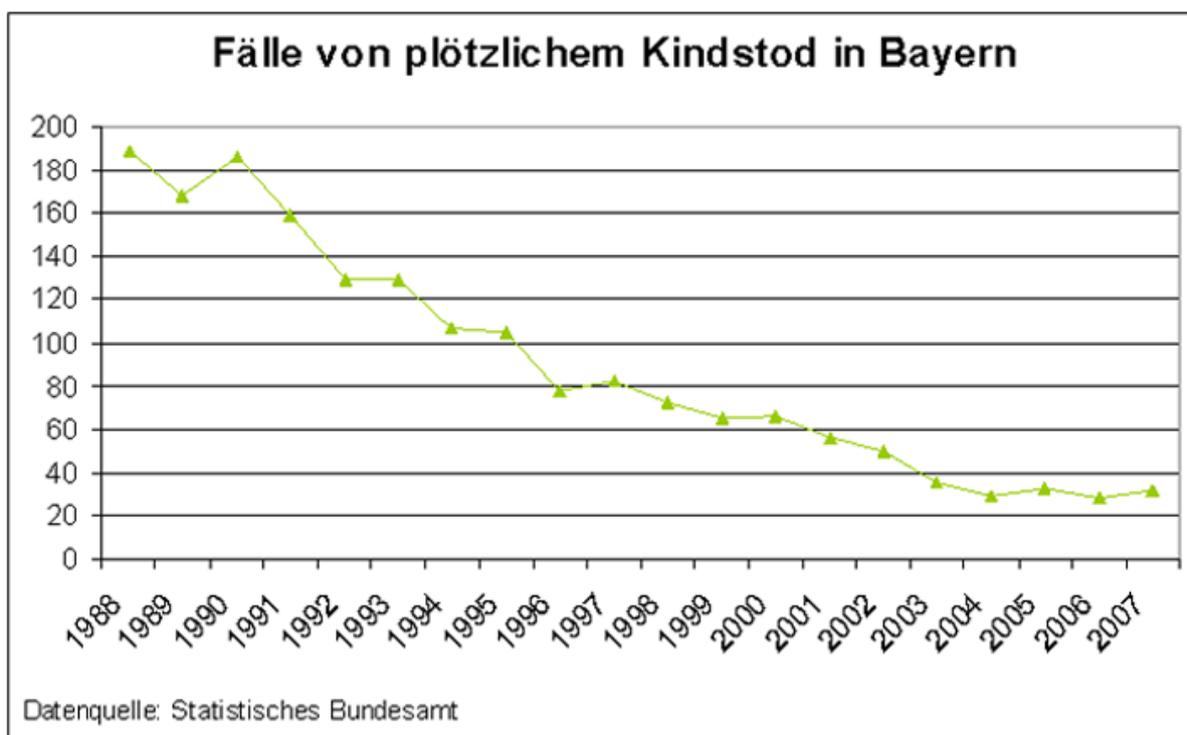


Abbildung 7: Daten des statistischen Bundesamtes über die Fälle von plötzlichem Kindstod in Bayern.

Diese Abbildung zeigt Daten des statistischen Bundesamtes über die Verteilung der Fälle an plötzlichem Kindstod in Bayern zwischen 1988 und 2007 [Statistisches-Bundesamt, 2006].

3.3.2.2 Historie

Seit der Antike wird berichtet, dass auch schon damals wie auch heute augenscheinlich „gesunde“ Kinder ganz plötzlich ohne ersichtlichen Grund während des Schlafes sterben können. Eine der ersten

Autopsien eines solchen plötzlichen unerwarteten Kindstods wurde durch Samuel Fearn veranlasst und im Jahre 1834 in Lancet publiziert [Fearn, 1834].

Auch heute, viele Jahre später, obwohl es relativ viele Veröffentlichungen zu diesem Thema bereits gibt, bleibt die Thematik weiterhin mysteriös und ungeklärt mit vielen offenen Fragen [Kinney et al., 2009].

3.3.2.3 Ursachen von SIDS

Mittlerweile haben Forscher bereits mehr als 50 mögliche Risikofaktoren für den plötzlichen Kindstod diskutiert [Sullivan et al., 2001], was die konkrete Ursachensuche nicht gerade einfacher gestaltet. 10% der Fälle, die zum SIDS hinzugezählt werden, sterben an monogenen, d.h. mendelsch-vererbten Erkrankungen. Dazu gehören vorwiegend das monogene Long-QT Syndrom (LQT), das Brugada-Syndrom (BrS) und die catecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie (CPVT) [Fuse, 2010]. Eine genetische Prädisposition zum plötzlichen Kindstod (SIDS) kann aber sowohl durch monogene als auch durch komplexe Krankheitsmodelle erklärt werden.

Zwischen dem 2. und 4. Lebensmonat wurde eine Häufung der plötzlichen Todesfälle beobachtet. Als mögliches Risiko wird der nächtliche Schlaf sowie ein geringes Geburtsgewicht, das männliche Geschlecht, niedriger sozialer Status und durchgemachte Infektionen [Guntheroth et al., 2002], [Mitchell, 2009], [Moon et al., 2007], [Stockwell et al., 1988] angesehen. Auch eine respiratorische Ursache wurde in Studien vermutet [Kinney et al., 2009], konnte aber nicht abschließend bestätigt werden [Waggener et al., 1990], [Schechtman et al., 1991].

Bei den genetische Risikofaktoren können die ethnische Herkunft und die genetische Kontrolle von Körperfunktionen eine Rolle spielen [Blackwell et al., 2004], [Opdal et al., 2011].

Die epidemiologischen Risikofaktoren für SIDS können unterteilt werden in

1. genetische Prädisposition,
2. pränatale und
3. postnatale Risikofaktoren.

3.3.2.4 Genetische Ursachen von SIDS

Genetische Prädispositionen zu SIDS werden bereits auf der ganzen Welt viel erforscht. Schwartz et al. sowie Ackerman et al. fanden assoziierte Mutationen u.a. im *SCN5A*-Gen und *KCNQ1*-Gen, die auch für die QT-Zeit-Verlängerung eine Rolle spielen beim Long-QT Syndrom, siehe Tabelle 1 [Schwartz et al., 2001a], [Schwartz et al., 2000], [Schwartz et al., 1998], [Ackerman et al., 2001]. Der Phänotyp kann sowohl monogener als auch komplex polygener Natur sein. In manchen ethnischen Gruppen, insbesondere in afrikanischen Ländern und bei den neuseeländischen Maori, ist das Risiko für SIDS deutlich erhöht [Rasinski et al., 2003].

Einige spezifische genetische Veränderungen z.B. im Serotonin-Transporter, die zu einer Prolongation der respiratorischen Reflexe führen können, wurden zusammen mit einem SIDS beobachtet und

entsprechende Polymorphismen beschrieben [Weese-Mayer et al., 2003], [Rand et al., 2007]. Auch Veränderungen an den Nikotinrezeptoren sowie in Genen, die am Inflammationsprozess beteiligt sind, wurden in Zusammenhang mit SIDS beobachtet [Machaalani et al., 2011].

3.3.2.5 Kardiale Repolarisationsstörungen als Ursache von SIDS

Seit der Erstbeschreibung des Long-QT Syndroms ist der Zusammenhang zwischen einer gestörten Repolarisation und dem erhöhten Risiko für einen plötzlichen Herztod bekannt. In vielen Studien wurde seitdem gezeigt, dass auch ein geringfügig verlängertes QT-Intervall in Personen aus der Normalbevölkerung das Risiko für ventrikuläre Arrhythmien erhöht, die wiederum zu einem SCD führen können [Straus et al., 2006].

Durch Schwartz wurde im Jahr 1976 erstmals auch der Zusammenhang zwischen einer gestörten Repolarisation und SIDS berichtet. Anschließend wurden zur Bestätigung über einen Zeitraum von 19 Jahren 34.442 Neugeborene mittels 24h-EKG-Untersuchungen gescreent. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein verlängertes QT-Intervall ein starker Risikofaktor für SIDS mit einem Faktor (relatives Risiko) von 41 ist [Schwartz et al., 1998], viel stärker als alle bisher sonst diskutierten möglichen Faktoren.

3.4 Genomweite Assoziationsstudien

Die Identifikation von Krankheitsgenen bei monogenen Erkrankungen, wie zum Beispiel der zystischen Fibrose (CFTR-Gen) oder dem Long-QT Syndrom, ist aufgrund der stärkeren Effekte der entsprechenden Mutationen schon ab Ende der 1980er Jahre durch die Kopplungsanalyse in betroffenen Familien möglich geworden. Schwieriger ist die Identifikation prädisponierender Varianten bei den komplexen Erkrankungen wie zum Beispiel bei den kardiovaskulären Erkrankungen. Hier scheinen nämlich viele verschiedene Faktoren verantwortlich für den Krankheitsausbruch zu sein, unter anderem auch Umweltfaktoren neben vielen Genvarianten, die zu kleinen Veränderungen im Phänotyp führen können.

In den letzten Jahren ist es durch die genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) zu einem bedeutenden Fortschritt im Bereich der Identifizierung polygener genetischer Prädispositionen für komplexe Erkrankungen gekommen. Bei GWAS untersucht man Unterschiede in der Frequenz genetischer Varianten bei Betroffenen und Unbetroffenen im gesamten Genom und findet somit die Assoziation zwischen bestimmten Varianten und der entsprechenden Krankheit heraus. Meistens sind hierzu große Kollektive an Patienten und Kontrollen, meistens mehrere hundert bis weit über 1.000 Personen, notwendig. Im Jahr 2010 sind bereits über 2.908 Assoziationssignale in über 779 GWAS für 148 Regionen beim US National Human Genome Research Institute registriert worden.

Um solche große Assoziationsstudien zu ermöglichen, war das 2005 und 2007 in Nature publizierte HapMap Project von über 200 weltweit kooperierenden Forschern grundlegend

[TheInternationalHapMapConsortium, 2005]. Es ermöglichte die Identifizierung von 6,4 Millionen SNPs (single nucleotide polymorphisms) in 270 Individuen (aus Amerika, Japan, China, Westafrika), von denen 2,6 Millionen eine Allelfrequenz von 5% (MAF) aufweisen, so dass sie gut als Marker für Assoziationsstudien angewendet werden können [Frazer et al., 2007].

Der Name HapMap stammt von dem Namen Haplotyp ab, das Allele beschreibt, die zusammen gehören und auch zusammen vererbt werden aufgrund einer nahen chromosomalen Anordnung.

Somit lässt sich das Linkage disequilibrium (LD) zwischen benachbarten SNPs in verschiedenen Bevölkerungsgruppen bestimmen, d.h. die Assoziation bestimmter Varianten benachbarter Genorte oder genetischer Marker auf einem einzelnen Chromosom. Für alle Studien, die SNPs untersuchen, ist das LD wichtig, da hiermit eine kausale Variante für die zu untersuchende Erkrankung mit einem nahen SNP in Assoziation stehen und somit entdeckt werden kann, obwohl die Variante selber nicht genotypisiert wurde [Cordell et al., 2005]. Folglich empfiehlt es sich generell jedes zunächst gefundene Assoziationssignal und jede gefundene assoziierte genetische Variante einer Replikationsanalyse zu unterziehen.

Bei der Interpretation der Assoziationssignale ist es wichtig zu verstehen, dass sie lediglich Regionen identifizieren, in denen sich die kausalen Gene und Varianten befinden. Die ursächlichen Varianten und die für die zu untersuchende Erkrankung kausalen Gene können auf diese Art und Weise nicht identifiziert werden. Daher sind im Anschluß an eine GWAS noch weiterführende kausale funktionelle Untersuchungen erforderlich [Altshuler et al., 2008]. Insgesamt ist somit ein weiter Weg zu beschreiten bis zum abschließenden Kausalitätsnachweis für die Krankheitsrelevanz einer Genvariante und eines Krankheitsgens.

3.4.1 GWAS von kardialen Repolarisationsstörungen

Wie bereits weiter oben in dieser Arbeit beschrieben, zählen die meisten Herzrhythmusstörungen, wie auch die überwiegende Zahl der Fälle von plötzlichem Herztod, zu den komplexen Erkrankungen. Bei diesen Erkrankungen vermutet man, dass wahrscheinlich viele verschiedene Gene einen minimalen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko zusammen mit Umweltfaktoren haben [Arking et al., 2009].

Für die Untersuchung komplexer Dispositionen zu kardialen Repolarisationsstörungen ist insbesondere das in der Normalbevölkerung annähernd normal verteilte QT-Intervall sehr geeignet, da es im EKG einfach messbar ist. Durch Arking et al. wurde im Jahre 2006 erstmals eine genomweite Assoziationsstudie für das QT-Intervall durchgeführt [Arking et al., 2006]. Diese Studie identifizierte einen SNP (rs10494366) zwischen dem *NOS1AP*- und dem *OLFML2B*-Gen, der in der Normalbevölkerung die genomweit stärkste Assoziation zum QT-Intervall aufwies. Er erklärt ca. 1,5% der Variation des frequenzkorrigierten QT-Intervalls (siehe Abbildung 8).

Im nächsten Jahr wurde dieses Ergebnis durch Post et al. belegt [Post et al., 2007]. Auch durch Aarnoudse et al. konnte dieser Zusammenhang bei der Untersuchung von 5374 Teilnehmern im Rahmen der Rotterdam-Studie bestätigt werden [Aarnoudse et al., 2007].

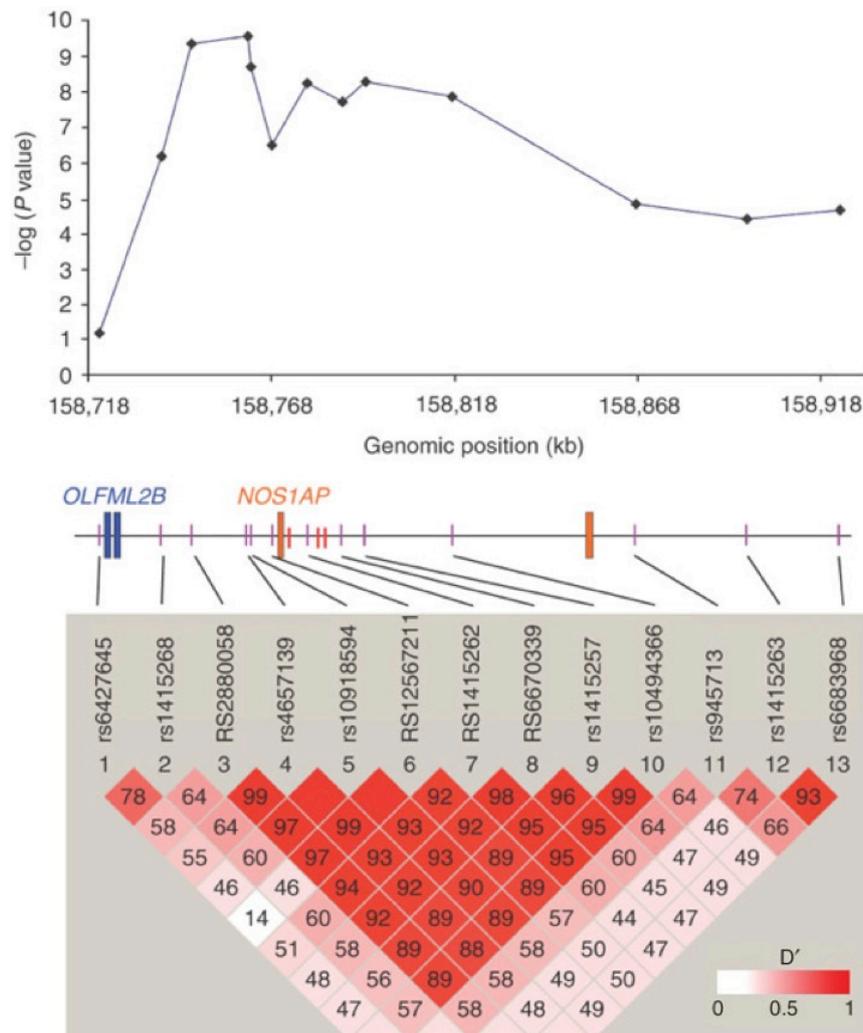


Abbildung 8: Fine-mapping der Assoziation mit dem QTc-Intervall von SNPs aus der NOS1AP-Genregion (Locusplot) und Darstellung ihres Linkage disequilibrium (LD).

Der obere Teil der Abbildung zeigt für jeden genotypisierten SNP die Signifikanz der Assoziation mit dem QTc-Intervall als negativen Logarithmus des p-Wertes an (y-Achse). Die x-Achse entspricht der genomischen Position des jeweiligen SNPs. Die am signifikantesten assoziierte Region befindet sich in der 5'-Gegend des NOS1AP-Gens. Die untere Übersicht zeigt das paarweise LD zwischen den SNPs (Angabe von D' multipliziert $\times 100$). In rot dargestellt sieht man die Intensivität des LDs: je dunkler die Farbe, umso stärker ist das D' zwischen zwei SNPs auf der Skala von 0-1 bzw. 0-100 [Arking et. al., 2006].

2009 wurde auch eine Metaanalyse mit 15.842 Individuen zu diesem Thema durch Pfeufer et al. durchgeführt, die fünf verschiedene Kohorten vereinigte (ARIC, KORA, GeNOVA, SarDiNIA und Heinz Nixdorf Recall) im Rahmen der QTSCD-Studie [Pfeufer et al., 2009] (siehe Abbildung 9). Es wurden zehn verschiedene Assoziationssignale entdeckt, die das QT-Intervall beeinflussen. Aber auch hier war das stärkste Assoziationssignal im *NOS1AP*-Gen.

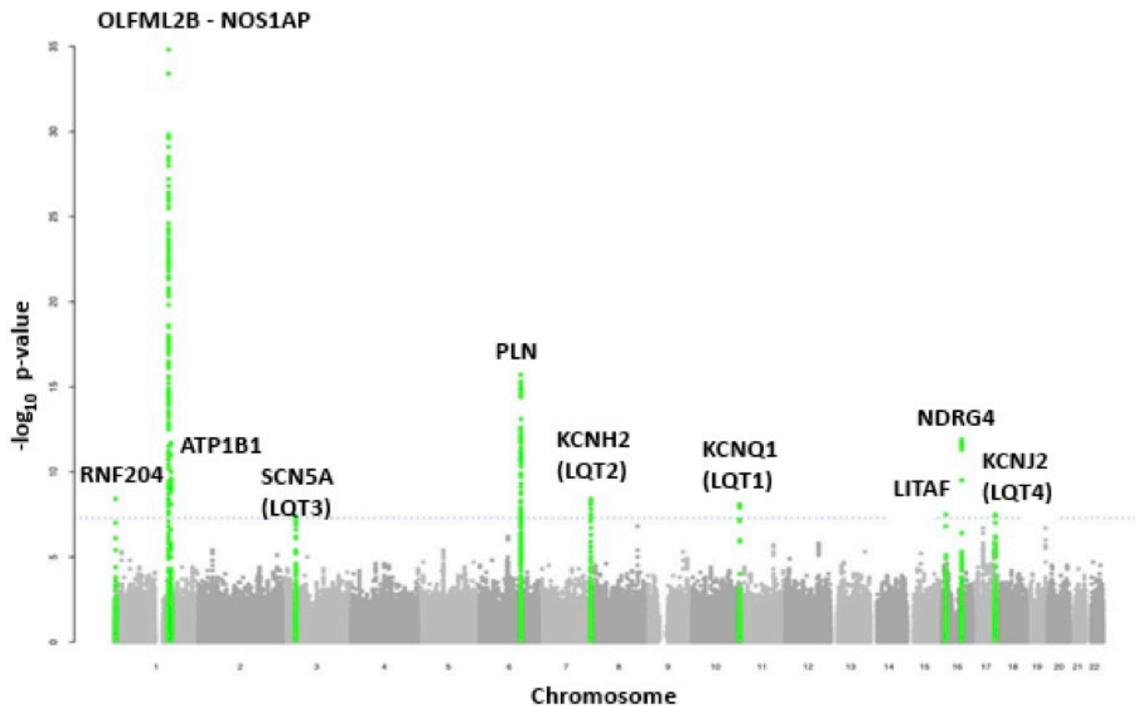


Abbildung 9: Darstellung der genomweiten Assoziation des QTc-Intervalls aus einer GWAS.

Diese Analyse untersuchte 15.852 Personen aus 5 populationsbezogenen Studien. Die x-Achse gibt die genomische Position an. Die y-Achse zeigt die Signifikanz der Assoziation als negativen Logarithmus des p-Wertes an [Pfeufer et al., 2009].

Durch eine Kombination der Auswertungen mit den Daten der SNPs aus dem HapMap-Projekt wurde die stärkste Assoziation mit dem SNP rs4657178 gesehen. Dieser SNP stand in einem Linkage disequilibrium zum ursprünglich identifizierten Signal rs12143842), und der in früheren Studien gefundene SNP rs10494360 zeigte ein moderates LD mit den anderen beiden. Parallel folgte eine weitere Publikation, die unabhängig davon das stärkste regionale Assoziationssignal mit dem SNP rs12143842 fand [Eijgelsheim et al., 2009]. Dies ist ein SNP, wie bereits erwähnt, im signifikanten LD ($D' = 0.584$, $r^2 = 0.111$) mit dem bereits kurze Zeit vorher beschriebenen SNP (rs10494366) in der Region 1q23.3.

Die meisten identifizierten SNPs befinden sich in der 1q23.3-Region [Arking et al., 2009], [Pfeufer et al., 2009]. Diese SNPs sind teilweise innerhalb des *NOS1AP*-Gens, zum Teil aber auch im *OLFML2B*-Gen lokalisiert. Eine weitere Metaanalyse mit 13.685 Individuen durch Newton-Cheh et al. bestätigte diese Ergebnisse [Newton-Cheh et al., 2009].

Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Gene *NOS1AP* und *OLFML2B* einen Einfluss auf das QT-Intervall haben.

3.4.2 Komplexe genetische Modulation des plötzlichen Herztodes

Später wurde auch ein Zusammenhang von Varianten im *NOS1AP*-Gen und SCD hergestellt [Kao et al., 2009].

3.5 Die Proteine NOS1AP und OLFML2B

3.5.1 Das NOS1AP-Protein

NOS1AP, früher auch als *CAPON* bezeichnet, kodiert den "Carboxy-terminalen PDZ-binding domain ligand-Aktivator" des neuronalen „nitric oxide“ Proteines.

NOS1AP ist gleichzeitig ein cytosolisches Protein, das durch seine PDZ-Domäne an das Signalmolekül, die neuronale „nitric oxide Synthase“ (nNOS), bindet. nNOS wird durch das *NOS1*-Gen kodiert [Jaffrey et al., 2002]. Die PDZ-Domäne verankert die Transmembranproteine mit dem Zytoskelett und stabilisiert somit die Signalkomplexe.

Der Einfluss von *NOS1AP* auf die Repolarisation im Herzen wird durch eine Überexpression seines Gens und seiner Interaktion mit *NOS1* erklärt [Jaffrey et al., 1998]. Dies führt zu einer Beeinflussung der Repolarisation durch Inhibition der L-Typ Calcium-Kanäle (u.a. kodiert durch *CACNA1C*) im Myokard [Gotthardt et al., 2000], [Chang et al., 2008].

3.5.2 Die Familie der Olfactomedine

OLFML2B kodiert für das *OLFML2B*-Protein, ein Mitglied aus der Familie der Olfactomedine. Alle 10 humanen Proteine aus der Olfactomedinfamilie sind Glykoproteine, die eine charakteristische OLF-Domäne an ihrem C-Terminus tragen. Diese Domäne besteht aus einer Sequenz von circa 260 Aminosäuren mit Homologie zum C-Terminus des OLF, einer Hauptkomponente der extrazellulären Schleimmatrix des olfaktorischen Neuroepitheliums des Menschen [Bal et al., 1993]. Die Proteine dieser Familie werden im Gehirn und Kleinhirn, Pankreas, der Prostata, im Dick- und Dünndarm, Herz- und Skelettmuskel exprimiert [Bal et al., 1993]. Ihre Funktion erstreckt sich von Neurogenese über die neuromuskuläre Signalübertragung, Exozytose von synaptischen Vesikeln bis zur Glaukomgenese als Beispielkrankung [Alward et al., 1998], [Fingert et al., 1999], (Stone, Fingert et al. 1997). Die genaue Funktion und Bedeutung dieser Proteine für die Zellbiologie ist noch unbekannt.

Am N-Terminus der Proteine der OLF-Familie befinden sich Sequenzen, die das Signal zur Exozytose geben, gefolgt vom CXC-Motiven, die zur Disulfidbrückenbildung beitragen und Homodimere sowie

Oligomere entstehen lassen [Bal et al., 1993]. Auch der C-Terminus trägt zur Dimer- und Oligomerbildung bei [Yokoe et al., 1993].

Die homologen OLF-Domänen bestehen aus Beta-Kettenmotiven, die evolutionär deutlich stärker konserviert sind als die N-terminalen Bereiche der Proteine [Zeng et al., 2005]. OLF-Domänen nehmen über die Ausbildung multipler beta-Faltblattstrukturen die Konfiguration eines beta-Propellers ein.

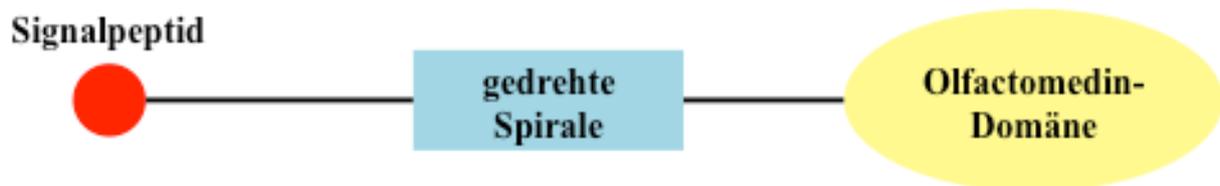


Abbildung 10: Einheitliche gemeinsame Struktur der Proteine der Olfactomedinfamilie.

Diese einheitliche Struktur aller Proteine der Olfactomedinfamilie besteht aus einer Olfactomedindomäne, einer gedrehten Spirale und einem Signalpeptid.

Durch die Sequenzierung des humanen Genoms ließen sich alle zehn paralogen Proteine im menschlichen Genom identifizieren, z.B. konnte Kulkarni et al. durch eine gezielte Gendatenbanksuche fünf neue OLF-Familienmitglieder identifizieren [Kulkarni et al., 2000]. Im Jahr 2005 wurden OLFML2A (Photomedin 1) und OLFML2B (Photomedin 2) im Rahmen eines cDNA-Screenings auf neue Sekretionsproteine mittels Fluoreszenzmarkierung in der Maus identifiziert und charakterisiert (Furutani et al. 2005).

Mittlerweile sind in verschiedenen Spezies bis zu 100 verschiedene Proteine der OLF-Familie bekannt, die sogar in verschiedenen Spezies, wie zum Beispiel *Caenorhabditis elegans* bis zum *Homo sapiens* gefunden wurden.

Phylogenetisch werden die Olfactomedine in sieben evolutionär und funktionell verschiedene Subgruppen unterteilt [Zeng et al., 2005]. Zum Beispiel das Olfactomedin 1 (Noelin) ist ein sezerniertes Glykoprotein im olfaktorischen Neuroepithel des Ochsenfrosches und ist bereits seit über 20 Jahren bekannt [Snyder et al., 1991], [Yokoe et al., 1993]. Es wird auch in der Ratte, bei der Maus, beim Huhn oder im *Xenopus* immer bevorzugt im neuronalen Gewebe exprimiert.

3.5.2.1 Myocilin und das primäre Offenwinkelglaukom

Das Offenwinkelglaukom (=Weitwinkelglaukom, POAG) ist eine in der Mehrzahl der Fälle komplexe Erkrankung des späteren Erwachsenenalters in Assoziation mit erhöhtem Augeninnendruck. Es kommt hier zu einer axonalen Degeneration und einem Gesichtsfeldverlust. Der erhöhte Augeninnendruck führt zu einem Funktionsverlust des trabekulären Netzwerkes, was wiederum den Fluß der Tränenflüssigkeit behindert. Eine monogene Sonderform, das autosomal-dominant vererbte primäre Offenwinkelglaukom macht etwa 2% aller Fälle aus mit inkompletter Penetranz, teils

multifaktoriell bedingt durch die Interaktion mehrerer Gene und Umweltfaktoren [Sarfarazi, 1997]. Myocilin ist aktuell eines der drei bekannten Gene, die in Zusammenhang mit dieser Erkrankung stehen und gehört ebenfalls zur Familie der Olfactomedine.

Erstmals aufgefallen ist dieser Effekt bei der Gabe von Glukokortikoiden an Patienten mit einem Weitwinkelglaukom, daher auch der alternative Name des Myocilins als „Trabecular meshwork inducible glucocorticoid response protein“ (TIGR). Es kam hierbei zu einer gesteigerten Produktion dieses Proteins ähnlich wie bei anderen Formen des trabekulären Stresses [Polansky et al., 1997]. Folglich könnte Myocilin eine protektive Rolle im Auge spielen [Karavanich et al., 1998].

Schließlich konnten bei Patienten mit POAG verschiedener ethnischer Gruppen weltweit im Jahr 1997 über 70 verschiedene Punktmutationen in diesem Gen nachgewiesen werden. Vor allem Mutationen in den kodierenden Regionen des Myocilins sind mit 5% der primären Weitwinkelglaukomerkrankungen assoziiert worden [Kennan et al., 1998], [Fingert et al., 1999], [Mabuchi et al., 2001b], [Mabuchi et al., 2001a], [Mansergh et al., 1998], [Suzuki et al., 2000], [Taniguchi et al., 2000], [Vasconcellos et al., 2000], [Suzuki et al., 1997], [Challa et al., 2002], [Alward et al., 2002], [Shimizu et al., 2000]. Bei Patienten, die bereits mit jüngeren Jahren an einem Glaukom litten (juvenile Form, meist autosomal-dominant), fand man diese Mutationen sogar mit einer Häufigkeit von bis zu 36% [Shimizu et al., 2000], [Alward et al., 2002]. Parallel wurde bei Mäusen, die keine Mutation in ihrem Myocilingen aufwiesen beobachtet, dass sie weder an einem Glaukom oder anderen Erkrankungen litten (Kim, Savinova et al. 2001).

Myocilin wird in verschiedenen Geweben exprimiert, bevorzugt im Auge, bestehend aus 504 Aminosäuren [Kubota et al., 1998]. Die meisten beschriebenen Mutationen finden sich im Exon 3, das an den C-Terminus des Proteins grenzt.

Das Protein hat 2 Hauptkomponenten: Am N-Terminus eine myosinähnliche Komponente (Homologie von bis zu 30%) [Ortego et al., 1997] und am C-Terminus eine Olfactomedin-like-Domäne (Homologie von bis zu 50%) [Adam et al., 1997].

Man geht davon aus, dass das Myocilin eine große Rolle in neuronalen Strukturen und ihrer Funktion spielt, da es zum Beispiel in den Myelinscheiden des Nervus opticus [Karali et al., 2000], [Ricard et al., 2001] und den peripheren Nerven [Ohlmann et al., 2003] gefunden wurde.

Gewebe, in dem Myocilin bisher überall gefunden wurde:

- Strukturen des Auges, vor allem in der Iris, Sklera und Trabekularnetzwerk.

Man hat bei weiteren Untersuchungen gesehen, dass die mutierte Myocilinform weniger aus den Zellen sezerniert werden kann und die normale Myocilinsekretion unterdrückt, was zu einer Myocilinakkumulation im endoplasmatischen Retikulum der Zelle führt [Caballero et al., 2000]. So

könnte es durch eine Proteosomendegradation zu einer zellulären Dysfunktion und einem Zelluntergang kommen.

Viele verschiedene Mutationen zusammen können schließlich zu einem heterogenen Phänotyp führen [Fingert et al., 1999], [Alward et al., 2002] [Donegan et al., 2012], [Sultana et al., 2011].

Aktuell geht man von einem dominant-negativen Effekt der Myocilinmutationen aus, da Studien gezeigt haben, dass ein Funktionsverlust oder eine Haploinsuffizienz nicht zu einer Glaukomentstehung führe, da es viele Patienten gibt, denen zwar eine große Genportion oder eine vollständige Genkopie fehlt, sie aber keine klinischen Merkmale aufweisen. Gleichzeitig zeigen Patienten mit einer homozygoten Mutation im Myocilingen keine Anzeichen eines Glaukoms [Lam et al., 2000], [Morissette et al., 1998].

3.5.3 Das OLFML2B-Protein

Die cDNAs der Proteine OLFML2A (Photomedin 1) und OLFML2B (Photomedin 2) haben ein offenes Leseraster und kodieren für 681 beziehungsweise 746 Aminosäuren. Sie bestehen aus genau der gleichen Domänenstruktur wie auch andere Mitglieder der OLF-Familie wie zum Beispiel das Myelin und Noelin. Diese Homologie reicht von 69% bis 29%. Die beschriebene Serin-Threonin-reiche Region lässt sich aber bisher nur bei den Photomedinen nachweisen, in welchen sie auch glykolysiert wird.

Charakteristisch für Photomedine ist der Nachweis repetitiver CXCXCX9C-Motive am N-Terminus, eine coiled-coil Domäne (gedrehte Spirale), eine Serin-Threonin-reiche Region (im Gegensatz zu den restlichen Mitgliedern der Olfactomedinfamilie) sowie eine OLF-Domäne am C-Terminus. Das CXCXCX9C-Motiv ist eine Variation des CXC-Motivs, das in allen Familienmitgliedern gefunden wurde. Dieses Motiv könnte somit zur Dimerbildung bzw. Oligomerisation auch der Photomedine beitragen, wodurch die biologische Funktion dieser Proteine gesteuert wird.

Photomedin 1 wird als Dimer, gebunden über seine Disulfidbrücken, synthetisiert und proteolytisch zwischen Tyr300 und Lys301 gespalten nach der Sekretion aus der Zelle. Für das Photomedin 2 gibt es noch weniger genaue Angaben.

Bezüglich der Unterschiede der Expressionslokalisation ergibt sich bei der Untersuchung des Auges, dass Photomedin 1 lediglich nur im äußeren Segment der Photorezeptorzellen der Retina exprimiert wird, dagegen Photomedin 2 in allen Neuronen der Retina. Beide Proteine sind sezernierte Proteine [Furutani et al., 2005].

In der extrazellulären Matrix (ECM), die sehr viele Glykosaminoglykane enthält, binden Photomedine bevorzugt an Chondroitinsulfat E (CS-E) und Heparin [Furutani et al., 2005], aber kaum an andere Komponenten der ECM, wie die Kollagene I-VI, Laminin 1, 2 und 10, Dekorin und andere Glykosaminoglykane und Hyaluronsäure. Die spezielle Bindung an CS-E entsteht wahrscheinlich

durch das 4,6-disulfatierte N-Acetylgalaktosamin. Es zeigt sich, dass CS-E an verschiedene Wachstumsfaktoren (FGF= growth factors) wiederum bindet. Man vermutet, dass Photomedine diese Bindung negativ beeinflussen durch eine Kompetition um das CS-E beziehungsweise durch eine Reservoirfunktion der Photomedindimere, die zur CSE-Akkumulation führt und die Interaktion mit den Wachstumsfaktoren somit positiv steuert.

Photomedin 1 ist bisher in folgenden Geweben gefunden worden:

- Lunge, Auge, Hoden, Uterus, Ovar;
- etwas weniger im Herzen, Skelettmuskel, Brustdrüse, Haut, Prostata;
- nicht im Gehirn, Thymus, Leber, Milz, Nieren, Pankreas und Darm.

Photomedin 2 (*OLFML2B*) zeigt ein breiteres Spektrum der Gewebeverteilung:

- Herz, Lunge, Skelettmuskel, Brustdrüse, Haut, Magen, Auge, Dickdarm, Hoden, Nebenhoden, Uterus, Ovar;
- weniger im Gehirn, Nieren, Dünndarm, Plazenta, Prostata;
- nicht in der Leber, Milz, Pankreas und Thymus.

Das *OLFML2B*-Gen besteht aus 40.663 Basenpaaren, die auf acht Exons und sieben Introns aufgeteilt sind.

Es ist ein Mitglied der Olfactomedin-Familie, die auch als potentieller Modulator des WNT- und BMP-Pathways gilt. Aber die genaue biochemische Wirkung dieser Proteine ist noch weitgehend unbekannt.

3.5.4 Vorarbeiten zur Pathogenität von *OLFML2B* und *NOS1AP* im Tiermodell

Im Rahmen von Vorarbeiten konnte in unserer Arbeitsgruppe und in Kooperationen (i.e. W. Rottbauer, Uni Heidelberg) mit Hilfe von Tiermodellen gezeigt werden, dass die Coexpression von *OLFML2B* mit spannungsgesteuerten Kaliumkanälen im Frosch zu einer spezifischen Stromminderung führt, die nur den Kalium-Kanal *KCNH2* betrifft.

Zebrafisch-Embryonen, die mit *NOS1AP*- und *OLFML2B*-orthologen Morpholinos injiziert wurden, zeigten pathologische kardiale Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen, die symptomlos blieben.

Durch ein Knockdown des *OLFML2B*-Gens auf Chromosom 2 des Zebrafisches kam es zu einer gestörten kardialen Elektrophysiologie mit Bradykardien und einer gestörten Morphologie und Physiologie mit einer Vergrößerung der Vorhöfe und Ventrikel des Herzens. Embryos, die mit einer Standardkontrolle injiziert wurden, blieben symptomlos.

Das Knockdowns des *OLFML2B*-Gens auf Chromosom 20 des Zebrafisches führte zu schweren Entwicklungsstörungen mit Körperformveränderungen, einem perikardialen Ödem und einer reduzierten Blutzirkulation. Diese Charakteristika waren bereits bei 48hpf zu sehen.

Durch das Knockdown von *NOS1AP* im Zebrafisch zeigte der Phänotyp eine Bradykardie und ein massives perikardiales Ödem 72 Stunden nach der Fertilisation, und eine kardiale Dysfunktion führte zu einer signifikant erniedrigten Blutzirkulation.

3.6 Ziel dieser Arbeit

Die Assoziation zwischen dem QT-Intervall in der Normalbevölkerung und dem *OLFML2B-NOS1AP*-Lokus wirft die Frage auf, welches Gen in diesem Genort kausal für diese Assoziation ist. Eine Möglichkeit diese Frage mit den Methoden der Humangenetik zu untersuchen, ist die Suche nach Mutationen mit starken phänotypischen Effekten in der kodierenden Sequenz der potentiell in Frage kommenden Gene in solchen Personen, die phänotypische Repolarisationsstörungen aufweisen.

Nach der Eingangshypothese sollten entsprechende kausale Varianten selten sein und – im Gegensatz zu den häufigen Varianten mit geringeren Effekt auf den Phänotyp – nur bei den Patienten auftreten, jedoch nicht im Kontrollkollektiv. Bei ihnen kann es sich z.B. um Missense-, Nonsense-, Frameshift- und andere Mutationen handeln, die einen Funktionsverlust des Proteins zur Folge haben. Für diese Untersuchungen ist ein Screening möglichst vieler Patienten und Kontrollprobanden erforderlich.

Aus diesem Grund war es das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob neben häufigen Genvarianten mit schwachen QT-Intervall-Effekten auch seltene Mutationen mit starken Effekten auf die kardiale Repolarisation im *OLFML2B*-Gen existieren. Aufgefundene Mutationen sollten dann auf ihr Vorkommen in der Normalbevölkerung sowie mit in-silico Vorhersagemethoden auf ihr Potential krankheitsverursachende Veränderungen im *OLFML2B*-Protein hervorzurufen untersucht werden. Seltene Mutationen, die Repolarisationsstörungen nach einem monogenen Krankheitsmodell (autosomal-dominant oder rezessiv) verursachen, eignen sich aufgrund ihres starken phänotypischen Effektes auch besonders, funktionelle Untersuchungen auf Proteinebene und auf zellulär-elektrophysiologischer Ebene durchzuführen.

4 METHODEN

4.1 Patienten und Kontrollkollektiv

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit Repolarisationsstörungen waren zum einen Patienten mit Long-QT Syndrom (LQTS), da dieses die modellhafte monogene Erkrankung der gestörten kardialen Repolarisation darstellt. Zum anderen untersuchten wir erwachsene Patienten, die einen plötzlichen Herztod (sudden cardiac death, SCD) erlitten hatten bzw. Kinder mit einem plötzlichen Kindstod (sudden infant death syndrome, SIDS). Der Grund für diese Wahl war, dass diese Erkrankungen zumindest zum Teil durch Repolarisationsstörungen mitverursacht werden. Außerdem wollten wir insgesamt möglichst viele und große Kollektive untersuchen, um die Wahrscheinlichkeit der Detektion von Mutationen zu erhöhen. Alle eingeschlossenen Individuen, Patienten wie auch Kontrollen, waren ethnische Kaukasier.

Alle teilnehmenden Patienten und Probanden waren mit der Teilnahme an einer Studie einverstanden bevor Daten erhoben und die DNA untersucht wurde. Im Falle von bereits verstorbenen Probanden gaben die Familienangehörigen ihr Einverständnis zur genetischen Untersuchung sowie zur Identifikation der möglichen Ursachen, die an dem Tod hätten beteiligt sein können.

Die Patienten- und Probandenstudien fanden unter Berücksichtigung der Deklarationen von Nürnberg, Helsinki und Somerset-West statt, alle Patientenstudien hatten ein positives Votum der Ethikkommissionen der jeweiligen Universitätskliniken, die MONICA- und KORA-Surveys sowie ihre Follow-ups hatten ein positives Votum der Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer.

4.1.1 LQTS-Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 125 Patienten mit der klinisch gesicherten Diagnose eines Long-QT Syndroms (LQTS) untersucht. Bei allen waren in der molekulargenetischen Diagnostik keine kausalen Mutationen in den LQT-Krankheitsgenen *KCNQ1* (LQT1), *KCNH2* (LQT2) und *SCN5A* (LQT3) festgestellt worden. Alle LQT-Patienten wurden ausführlich anamnestiziert und körperlich untersucht. In der EKG-Untersuchung zeigte sich ein verlängertes QT-Intervall und die Patienten wiesen einen diagnostischen Schwartz-Score von mindestens 2,5 auf. Bei diesen Patienten besteht somit mutmaßlich eine Mutation in einem anderen Krankheitsgen. Die Patienten stammen aus der Kardiologischen Klinik des Universitätsklinikums Großhadern der LMU München (1. Medizinische Klinik), dem Universitätsklinikum der Universität Nantes sowie dem University Medical Center Amsterdam.

4.1.2 Medikamenteninduzierte LQTS-Patienten (diLQTS)

Zusätzlich wurden 329 Patienten untersucht, die ein medikamenteninduziertes Long-QT Syndrom aufwiesen. Bei allen diesen Patienten waren ebenfalls in der molekulargenetischen Diagnostik keine kausalen Mutationen in den LQT-Krankheitsgenen *KCNQ1* (LQT1), *KCNH2* (LQT2) und *SCN5A* (LQT3) festgestellt worden. Auch diese wurden ausführlich anamnestiziert und körperlich untersucht. Das QT-Intervall war verlängert und die Patienten wiesen einen diagnostischen Schwartz-Score von mindestens 2,5 auf. Die Patienten stammen aus den gleichen Kollektiven wie die Patienten mit nicht medikamenteninduziertem LQTS.

4.1.3 SIDS-Patienten

Die in dieser Arbeit untersuchten 93 Fälle mit plötzlichem Kindstod (sudden infant death syndrome, SIDS) stammen aus drei Studien: Der deutschen SIDS-Studie (GeSID) sowie den SIDS-Studien der rechtsmedizinischen Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) und der Universität Sheffield, UK (SHF). Alle untersuchten SIDS-Patienten waren entsprechend der Definition von SIDS zum Zeitpunkt ihres Todes unter einem Jahr alt. In einer makroskopischen rechtsmedizinischen und histopathologischen Untersuchung waren andere Todesursachen ausgeschlossen worden.

4.1.4 SCD-Patienten

Die untersuchten 94 Fälle mit plötzlichem Herztod (sudden cardiac death, SCD; bzw. sudden unexplained death syndrome) stammen aus den Studien der rechtsmedizinischen Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) und der Universität von Miami, USA (MIA). Alle Patienten erfüllten die Definition eines plötzlichen Herztodes, sie waren innerhalb von 24 Stunden nach dem ersten Auftreten von Symptomen ohne eine bekannte erklärende Grunderkrankung heraus verstorben und wiesen bei der anschließenden pathologischen Untersuchung keine Anzeichen für eine makroskopisch oder mikroskopisch feststellbare Ursache auf.

4.1.5 Kontrollprobanden aus der KORA-Studie

Als Kontrollprobanden wurden 702 Individuen aus der KORA-Studie (Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg) verwendet. KORA ist die Fortsetzung und Erweiterung der Beteiligung des Helmholtz Zentrums München (ehemals GSF Neuherberg) am ehemaligen MONICA-Projekt der WHO, das seit 1984/1985 bevölkerungsrepräsentative Querschnittsstudien durchführt mit dem Ziel zeitliche Trends der klassischen Risikofaktoren von Herz- und Kreislauferkrankungen wiederzugeben [Lowel et al., 2005]. Insgesamt wurden bei MONICA und KORA 430.000 Einwohner im Raum Augsburg zwischen 25 und 74 Jahren untersucht, davon 18.000 rekrutiert und 4 bis 20 Jahre lang medizinisch und statistisch nachbeobachtet.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Probanden entstammen dem Survey KORA S4 (KS4), der zwischen 1999 und 2001 erhoben wurde. Mit der ersten Nachuntersuchung, die in den Jahren 2002 und 2003 im Rahmen einer speziellen Untersuchung in Hinblick auf Herz-Kreislaufkrankungen durchgeführt worden war, wurden diese in KORA Magic Controls (KMC) umbenannt. Bei den Probanden des Surveys KS4 handelt es sich um zufällig aus den Daten der Einwohnermeldeämter ausgewählte Personen, die einen repräsentativen Querschnitt der deutschen Normalbevölkerung darstellen. Bei den Teilnehmern des KMC-Follow-ups waren lediglich die höheren Altersstrata (55-75 Jahre) im Verhältnis 4:1 überrepräsentiert, ansonsten lagen keine signifikanten Abweichungen vom repräsentativen Querschnitt des Surveys KS4 vor.

4.1.6 Kontrollprobanden aus dem „Exome sequencing“-Projekt (ESP)

Als zusätzliche Kontrollprobanden wurden 4.300 Kaukasier von den insgesamt 6.503 Personen aus der öffentlich zugänglichen Datenbank des US-Amerikanischen Exome sequencing Projekts verwendet und in-silico analysiert [ExomeVariantServer, 2013], [Tennessee et al., 2012]. Obwohl das ESP-Kollektiv für einige monogene Erkrankungen angereichert ist, es enthält 49 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und 431 Patienten mit Mukoviszidose (CF), entspricht es überwiegend einem Normalbevölkerungskollektiv mit Probanden aus der Framingham Heart Study (FHS), der Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC), der Cardiovascular Health Study (CHS) und weiteren populationsbasierten epidemiologischen US-amerikanischen Studien. Trotz der geringgradigen Anreicherung für Personen mit monogenen Erkrankungen können diese nur eine geringe Verschiebung des Spektrums von kausalen Varianten erklären und können nicht die alleinige Ursache für alle aufgefundenen seltenen Varianten sein. Zudem würde ein etwaiger Bias durch Erkrankte unter den Kontrollen nicht zu falsch positiven Ergebnissen führen (Inflation des α -Fehlers), sondern zu einer Abnahme der statistischen Power und einer Unterschätzung der tatsächlichen Effekte (Inflation des β -Fehlers). Das ESP-Kollektiv spiegelt insgesamt gut das Vorkommen seltener Allele in der kaukasischen Normalbevölkerung wieder und eignet sich daher als zusätzliche Kontrollpopulation für das in dieser Dissertation durchgeführte Projekt.

4.1.7 Übersicht über die Fälle und Kontrollen

Die folgende Übersicht zeigt die wesentlichen Charakteristika der untersuchten Patienten mit LQTS, SIDS und SCD sowie der populationsbasierten Kontrollen:

Tabelle 5: Charakteristika der untersuchten Patienten und Kontrollen

	LQT	diLQT	SIDS	SCD	KORA-Kontrollen	EVS-Kontrollen
n	125	329	93	94	702	4300
männlich, n (%)	59 (47,2%)	191 (58,1%)	64 (68,8%)	57 (60,6%)	350 (49,7%)	nicht bekannt
Alter (\pm SD)*	44.2 \pm 10.8 Jahre	51,8 \pm 13.1 Jahre	140.8 \pm 85.1 Tage	29.2 \pm 14.6 Jahre	57.7 \pm 12.4 Jahre	nicht bekannt

Aufgezeigt sind die Anzahl, das Geschlecht und Alter der untersuchten Patienten in den unterschiedlichen Kollektiven.

Beim Matching wurde hoher Wert auf das Geschlechtmatching gelegt. Dieses erfolgte aus dem Grund, dass Arrhythmien und plötzliche Todesfälle geschlechtsspezifische Inzidenzen zeigen.

Bei allen Patienten wie auch Kontrollen handelt es sich um ethnische Mitteleuropäer („Kaukasier“ bzw. CEU). Ein Altersmatching wurde nicht vorgenommen. Dieses geschah zum einen, weil es insbesondere für SIDS-Fälle im ersten Lebensjahr keine geeignete Geburtskohorte gab, die uns zur Verfügung gestanden hätte. Zum anderen war ein Altersmatching nicht nötig, da wir keine altersabhängigen Risikofaktoren untersucht oder als Kovariablen verwendet haben.

Die KORA-Population sowie die europäischen Probanden des US-amerikanischen Exome sequencing Projekts spiegeln sehr gut die Genotypfrequenzen häufiger Genvarianten der mitteleuropäischen Population wieder, und diese sind zwischen der Geburt und dem hohen Lebensalter nicht signifikant altersabhängig. Das zeigt sich u.a. daran, dass bis zum heutigen Tag keine signifikanten Assoziationen zwischen häufigen Genvarianten (SNPs) und dem Erreichen eines hohen Lebensalters gefunden worden sind.

4.2 DNA-Extraktion aus Leukozyten des peripheren Blutes

4.2.1 Allgemeines und Ablauf

Die DNA-Extraktion wurde durchgeführt nach dem mehrstufigen Protokoll von Miller, Dykes und Polesky [Miller et al., 1988]. Beim ersten Schritt der DNA-Extraktion aus Vollblut wurden die Erythrozyten lysiert, während Leukozyten und DNA erhalten blieben. Dazu verwendet man einen Lysepuffer, einen Red-Cell-Lyse-Puffer (RCLB). Er enthält Ammoniumchlorid, das vor allem Erythrozyten, aber nicht Lymphozyten angreift. RCLB ist eine hypotone Lösung und weist folglich eine hämolysierende Wirkung auf. Im hypotonen Medium strömt Flüssigkeit in die Erythrozyten ein und ihre Membran platzt. Dann wird zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wird erneut mit RCLB versetzt und anschließend wieder dekantiert. Es sollte kein RBC-Lyse-Puffer im Röhrchen bleiben.

Im zweiten Schritt wird das die kernhaltigen Zellen enthaltende Pellet mit einem SE-Puffer, das NaCl, Na₂EDTA und NaOH enthält, vollständig suspendiert. EDTA inhibiert Nukleasen, die Mg²⁺ als Kofaktor benutzen. Dieses wird von EDTA im Chelatkomplex gebunden, und eine Zerstörung der DNA wird verhindert. Hinzugegeben wird ebenfalls Proteinase K, eine Protease mit endo- und exolytischer Wirkung in einem SDS-haltigen Puffer. Die Protease wird für den Abbau von Proteinen in Zelllysaten und zur Freisetzung von Nukleinsäure eingesetzt. Sie zerstört DNAsen und Histone, um die die DNA gewickelt ist. Das SDS-Puffer wirkt als Detergenz. Da der Zellkern, wie auch die Zelle selbst, von einer Zellmembran umgeben ist, wird diese aufgelöst. Alle Biomembranen bestehen hauptsächlich aus Lipiden und Proteinen. Die Lipide haben einen hydrophilen Kopf und einen lipophilen Schwanz. In einer wässrigen Lösung bilden diese eine Lipiddoppelschicht. Die lipophilen Schwänze zeigen zueinander, die Köpfe ragen in die wässrige Umgebung.

Nach der Proteolyse wird wieder der SE-Puffer und jetzt auch saturiertes NaCl hinzugegeben. Dies bringt weitere störende Proteine zum Ausfallen (Aussalzeffekt), die durch Zentrifugation abgetrennt werden können. Die im Überstand gelöste DNA wird abgehoben, in ein neues Röhrchen umgefüllt und mit Alkohol ausgefällt. Da Alkohol eine geringere Dichte als Wasser hat, bildet er die obere der Zweiphasenschicht im Röhrchen. Durch Alkohol wird die Hydrathülle um die DNA verdrängt, das Molekül wird destabilisiert und fällt aus (Präzipitation). Schließlich wandert die DNA aus der Wasserphase in die Alkoholphase. Nun kann man ein Knäuel DNA in der oberen Phase sehen. Dieses wird herausgefischt und mit Ethanol gewaschen. Dieses lässt man verdampfen und anschließend füllt man das Gefäß mit der DNA mit TE-Puffer auf. Nachdem man es über Nacht bei Raumtemperatur gut gemischt hat, kann man am nächsten Tag die OD₂₆₀ und OD₂₈₀ bestimmen oder mit SYBR-Green ausmessen. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte bei einer guten Präzipitation reproduzierbar im Bereich 1,7 bis 1,9 liegen.

4.2.2 Verwendetes Protokoll zur DNA-Extraktion aus Leukozyten

1. 10 ml EDTA-Blut in ein 50 ml Röhrchen gießen und auf Eis stellen. 30 ml eiskalten RBC-Lyse-Puffer zugeben (enthält Ammoniumchlorid). Lyse der Erythrozyten auf Eis, 15 min.
2. Zentrifugation bei 2500 rpm, 10 min, 4°C. Überstand vorsichtig abkippen
3. 10 ml eiskalten RBC-Lyse-Puffer zugeben, das Zellpellet vollständig suspendieren. Sofort nochmals zentrifugieren (10 min, 4°C, 2500 rpm)
4. Das die kernhaltigen Zellen enthaltende Pellet vollständig suspendieren in 5 ml SE-Puffer (Raumtemperatur), dann 25 µl Proteinase K (Merck), gelagert in -20°C, zugeben
5. 250 µl SDS (20 %) zugeben und im Wärmeschrank bei 55°C über Nacht inkubieren
6. 5 ml SE-Puffer und 3 ml saturiertes NaCl (ca. 6 M, autoklaviert) zugeben, mischen und das Röhrchen mindestens 10 min in 55°C Wärmeschrank legen
7. Zentrifugation bei 3500 rpm, 15 min, bei 40°C, den Überstand vorsichtig in ein neues Röhrchen abgießen
8. DNA durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol und durch langsames Invertieren des Röhrchens ausfällen
9. Das Knäuel mit einer sterilen Pipettenspitze herausfischen, 1 x in ca. 0.2 ml 70% Ethanol waschen, Ethanol ca. 30-40 min abdampfen lassen
10. DNA in 1000-1800 µl TE (steril), je nach Größe der Flocke, lösen
11. Über Nacht bei Raumtemperatur mischen, dann mit einem 5 µl-Aliquot (in 100 µl TE, d.h. Verdünnung 1:20) die OD260 und OD280 bestimmen oder mit SYBR-Green ausmessen

Aus 10 ml Blut eines Gesunden lassen sich nach diesem Protokoll, je nach Leukozytenzahl, 300 – 700µg DNA isolieren.

Tabelle 6: Protokoll: RBC-Lyse-Puffer-Herstellung

RBC-Lyse-Puffer-Herstellung		
(autoklaviert, pH muss nach dem Autoklavieren kontrolliert und ggf. neu eingestellt werden):		
Substanz	Konzentration	Menge
NH ₄ Cl	155mM	8,29g
KHCO ₃	10mM	1,0g
Mg ₂ EDTA	0,1mM	0,034g

Herstellung des RBC-Lyse-Puffers. Der Puffer wird anschließend mit HCl oder NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Tabelle 7: Protokoll: SE-Puffer-Herstellung

SE-Puffer-Herstellung (nach Maniatis, autoklaviert):		
Substanz	Konzentration	Menge
NaCl	75mM	4,39g
Na-EDTA	25mM	8,41g

Herstellung des SE-Puffers. Der Puffer wird anschließend mit NaOH auf pH 8.0 eingestellt und auf 1 Liter aufgefüllt.

Tabelle 8: Protokoll: TE-Puffer-Herstellung

TE-Puffer-Herstellung (nach Maniatis, autoklaviert):		
Substanz	Konzentration	Menge
Tris/Hcl (ph8)	10mM	5ml
EDTA	1mM	1ml
ddH ₂ O		auf 500ml

Herstellung des TE-Puffers.

4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.3.1 Allgemeines und Historie

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine der wichtigsten Methoden für die Molekularbiologie geworden. Mit dieser Methode kann ein kurzer genau definierter Teil der Erbsubstanz (DNA oder RNA) in-vitro vervielfältigt werden. Dabei kann es sich um ein Gen oder einen Teil eines Gens oder auch um nicht-kodierende Sequenzen handeln.

Der Name Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird von der wichtigsten Substanz für diese Methode, einer DNA-Polymerase, abgeleitet. Dieses Enzym kann DNA in vitro amplifizieren. Während der PCR dienen die DNA-Produkte vorheriger Zyklen als Vorlage für die erneute Replikation im nächsten Zyklus. Es kommt schließlich zu einer Kettenreaktion und die DNA wird exponentiell amplifiziert, so dass man 10^6 Kopien eines spezifischen DNA-Fragments innerhalb sehr kurze Zeit erhalten kann [Saiki et al., 1988], [Saiki et al., 1985].

Im Jahr 1988 wurde von Saiki et al. die thermostabile DNA-Polymerase eingeführt [Saiki et al., 1988]. Diese wird aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermophilus aquaticus* gewonnen und Taq-Polymerase genannt. Der Vorteil dieser Polymerase ist, dass sie auch bei einer Temperatur von 100°C noch aktiv ist [Holland et al., 1991] mit einem Temperaturoptimum bei 75-80°C. [Arnheim et al., 1992].

Die Extensionsrate beträgt über 70 Nukleotide pro Sekunde bei 70°C [Innis et al., 1988]. Somit ist das Verfahren sehr schnell. Es besteht die Möglichkeit Fragmente bis zu 40kb zu amplifizieren [Saiki et al., 1988], was aber immer noch sehr viel kürzer als die chromosomale DNA einer eukaryotischen Zelle ist. Die höhere Spezifität der Taq-DNA-Polymerase ermöglicht es 4×10^6 Kopien zu produzieren bevor ihre Aktivität nachlässt.

Ein Primer besteht aus einer Sequenz einzelsträngiger DNA, die durch eine spezifische Basenpaarung komplementär an ihre Template-DNA bindet. Bei einer PCR sind die Primer besonders kurz, maximal 16-20 Basenpaare lang. Durch ein optimales Primerdesign der Primersequenz wird die hohe Spezifität der Polymerase-Kettenreaktion bestimmt. Damit der Primer exakt an die gewünschte Stelle der Template-DNA binden kann, muss seine Sequenz zu dieser genau komplementär sein, aber auch lang genug, so dass er spezifisch für diese eine Stelle der DNA ist und nicht woanders binden kann.

Da eine konkrete Stelle der DNA jeweils von einem A, T, C oder G besetzt sein kann, ist die Chance z.B. auf ein C annähernd 1 von 4. Aber nicht berücksichtigt wird, dass alle 4 Basen nicht mit der gleichen Häufigkeit im Genom vorkommen. Wenn man nun eine 20 Basen lange Primersequenz wählt, ist die Wahrscheinlichkeit diese ein zweites Mal im Genom zu finden 10^{-12} . Da das menschliche Genom aber nur 3×10^9 Basenpaare hat, sollte eine 20 Basen lange Sequenz nur einmal vorkommen.

Es werden zwei Primer für die PCR designed, die jeweils an beiden Strängen der Template-DNA-Sequenz binden können, damit die Region zwischen ihnen vorwärts und rückwärts amplifiziert werden kann. Ihr 3'-Ende sollte nahe der Target-DNA liegen, ihr 5'-Ende weiter weg. Dann kann die DNA-Polymerase mit der DNA-Synthese in der 5'-3'-Richtung beginnen. Der GC-Anteil sollte nicht zu hoch liegen, da diese Basen besonders häufig im menschlichen Genom vorkommen, optimal ist der Anteil von 30% für ein Target unter 530bp [Arnheim et al., 1992]. Wichtig ist auch darauf zu achten, dass die jeweiligen Sense- und Antisense-Primer nicht komplementär zueinander sind, damit man keine Primerdimere erhält.

4.3.2 Primerdesign

OLFML2B wurde amplifiziert aus genomischer DNA, indem spezifische Primer verwendet wurden. Die PCR-Primer wurden designed mit der Software „Primer 3“ (National Human Genome Research Institute) und „human genome NCBI build 36“ (UCSD Genome Group), siehe Tabelle 9. Es wurden alle 8 Exons des *OLFML2B*-Gens auf Mutationen untersucht, einschließlich auch der Exon-Intron-Umgebung.

Tabelle 9: PCR-Primer zur Amplifikation der Exons des *OLFML2B*-Gens

Gen	Exon	Primer – F	Primer – R
<i>OLFML2B</i>	1	CATTCTCTGAAGGGGCTGAG	CCATCCAGGGCAAGAAGG
<i>OLFML2B</i>	2	ATGCCCTAACCCGTTTTTC	CAAGGCATTGCCCCATAC
<i>OLFML2B</i>	3	ATTCCTGGCTAGTGGCTTTC	GCTGAAAATTTACTGTGGGACG
<i>OLFML2B</i>	4	TCCTGCTTGTCTTCAGGG	GCTTGTGATCAGAGGCC
<i>OLFML2B</i>	5	AGTGACCTGACCTCCCTTG	ACTTCCTCCCTACCCTGCC
<i>OLFML2B</i>	6.1	GTTGTTTCTTTCCCGTGCC	AGTGGTGGCTGGTACCTGAG
<i>OLFML2B</i>	6.2	TCAGTGGGACCAACACTCC	CAGGAGACCAAGGCCAGG
<i>OLFML2B</i>	7	AGGCATCACTAGATCAGCCC	AAGGAGCAGTCTGGGTGG
<i>OLFML2B</i>	8.1	TGAAGCCTCCTGTTTTCTCC	CCGGGTAGATGAGCCATAGG
<i>OLFML2B</i>	8.2	ACGTGGCCTACGAGGAG	AAAGCGTAGGAGATGTTGGC
<i>OLFML2B</i>	8.3	GAGGAATTTCTACGGCAACTG	TGTGCTTCTGCTTGTGGG

Die Primer wurden durch die ExonPrimer Software basierend auf Primer 3 entsprechend dem humanen Genom nach NCBI hergestellt.

4.3.3 Ablauf und Schrittfolge

Eine klassische PCR benötigt folgende grundlegende Komponenten und Reagenzien:

1. **DNA-Template** (genomische Patienten-DNA);
2. **Zwei Primer**, Vorwärts- und Rückwärts-Primer (F- und R-Primer), die auf beiden Strängen zur DNA komplementär sind, um jeweils den Startpunkt festzulegen;
3. **DNA-Polymerase** mit einem Temperaturoptimum bei 70°C, wie zum Beispiel die Taq-Polymerase I;
4. **Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)**, Bausteine für den neu synthetisierten DNA-Strang: dATP, dTTP, dGTP und dCTP;
5. **Pufferlösung**, schafft die geeignete chemische Umgebung für die DNA-Polymerase;
6. **Magnesiumionen (Mg²⁺)** zur optimalen Aktivität der DNA-Polymerase.

Gewöhnlich besteht eine PCR aus einer Serie von 20 bis 40 Zyklen unterschiedlicher Temperaturen, wobei jeder Zyklus drei klassische Schritte bestimmter Temperaturphasen enthält; Denaturierung, Annealing und Elongation.

Diese angewendeten Temperaturen und ihre Zeitdauer sind von verschiedenen Parametern abhängig; der Konzentration der Ionen in der Lösung und der Menge der dNTPs wie auch der Schmelztemperatur (T_m) der Primer [Rychlik et al., 1990].

A. Initial:

Manche DNA-Polymerasen benötigen diesen Schritt zur Aktivierung, also eine Hot-Start-PCR, um eine hohe Spezifität zu erreichen. Hierbei wird die Reaktion auf 94-96°C erhitzt und für 1-9 Minuten bei dieser Temperatur gehalten.

1. Denaturierung:

Dies ist der erste richtige Temperaturschritt, der bei jeder PCR benötigt wird. Die DNA wird bei einer Temperatur von 94-98°C für 20-30 Sekunden denaturiert. Die Wasserstoffbrückenbindungen der Doppelhelix werden aufgesprengt mit dem Ziel den komplementären Doppelstrang der DNA in zwei Einzelstränge aufzuspalten. Auch die Primer beginnen zu schmelzen.

2. Annealing:

Die Temperatur wird auf 50-65°C für 20-40 Sekunden gesenkt, damit sich die DNA rehybridisieren kann. Die Primer lagern sich bei dieser spezifischen Temperatur an die DNA-Einzelstränge an. Die genaue Temperatur wird durch die Art und Länge der Primer bestimmt. Wenn die Temperatur zu hoch gewählt wird, können die Primer nicht fest genug binden, und die Produktbildung ist ineffizient. Bei zu niedriger Temperatur wiederum können die Primer auch an nicht komplementäre Sequenzen binden und zu unspezifischen Produkten führen.

Auch die Polymerase bindet nun an das DNA-Primer-Hybrid.

3. Elongation:

Dieser Temperaturschritt ist von der jeweiligen DNA-Polymerase abhängig. Das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase liegt bei 75-80°C [Chien et al., 1976], [Lawyer et al., 1993]. Meist wird eine Temperatur von 72°C angewendet, dann synthetisiert das Enzym einen neuen DNA-Strang aus dNTPs, die komplementär zum DNA-Template in 5'-3'-Richtung sind. Die Dauer für diese Elongation ist von der DNA-Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden Segments abhängig.

B. Final:

Um sicher zu gehen, dass auch jeder Einzelstrang amplifiziert wurde, hält man die Temperatur für weitere 5-15 Minuten bei der Elongationstemperatur.

C. Schluss:

Schließlich wird die Temperatur auf 5-15°C abgekühlt um die Produkte kurzzeitig lagern zu können.

Diese drei Vorgänge werden je nach Protokoll in Form von 30 Zyklen wiederholt mit dem Ziel jedes Mal die DNA zu verdoppeln, so dass man die vierfache, achtfache usw. Menge der DNA enthält. Es kommt zur exponentiellen Vermehrung der DNA.

Im ersten Zyklus entstehen zunächst DNA-Einzelstränge, die in 5'-Richtung länger sind als ihr Template, da nur der Startpunkt, aber nicht der Endpunkt festgelegt ist. Aber bei der nächsten Denaturation kommt es zum Abbruch des Stranges an der richtigen Stelle. Ab der darauffolgenden Elongation kommt es dann also ab dem zweiten Zyklus zur Bildung von DNA-Strängen der richtigen Länge. Denn an diese heften sich in 3'-Position die 5'-Primer. Es kommt zu keinem 5'-Überhang, da die Polymerase auf dem Template in Richtung des 3'-Endes liest.

Die Zahl von 30 Zyklen sollte nicht überschritten werden, da sich sonst auch kürzere Fragmente anhäufen.

Nach vielen Zyklen wird ein Plateau erreicht und die Menge an Produkten nimmt dann wieder ab. Es gibt zwei Erklärungen für diesen Effekt; wenn immer mehr Produkt entsteht, kommt es zur Konkurrenz bezüglich der Bindung von Template-DNA und Primer im Vergleich zum Reannealing der komplementären Template-Stränge. Zweitens nimmt die Konzentration der DNA-Polymerase im Verlauf der Reaktionen ab, aber auch die Menge der Target-DNA. Demzufolge kann ein kürzerer Abschnitt effizienter amplifiziert werden als ein zu langer.

Zum Nachweis der Funktion der Primer wurden die PCR-Produkte schließlich mittels Gelelektrophorese kontrolliert.

4.3.4 Verwendetes PCR-Protokoll

Die PCR wurde in 96er Lochplatten (Abgene) durchgeführt. In diese wurden 5µl einer DNA Lösung von 5µg/µl der zu untersuchenden Patienten eingebracht und eintrocknen gelassen, so dass in jedem Loch 5ng trockener DNA enthalten sind.

Der Mastermix wurde separat hergestellt und 6µl pro Loch gegeben. Dann wurde das sog. Touchdown-Protokoll angewendet, bei dem die Annealing-Temperatur im Verlauf der PCR abgesenkt wird um sowohl die Spezifität als auch die Ausbeute an Produkt möglichst zu erhöhen. Die genauen Schritte sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 10: PCR-Protokoll

Substanzen	1 Well	1 Platte: 480x	8 Platten	Konzentration
10*Qiagen PCR-Puffer	0,6ul	298ul	2304ul	1*
2mM dNTPs	0,6	298ul	2304ul	200uM
F-Primer (100uM)	0,03	14,4ul	115,2ul	500nM
R-Primer (100uM)	0,03ul	14,4ul	115,2ul	500nM
LCGreen Dye	3,16ul	86,4ul	691,2ul	0,3*
Qiagen Taq-Polymerase	0,1ul	48ul	384ul	0,5U
dH2O	4,46ul	2140,8ul	17126,4ul	
Gesamtvolumen	6ul	2880ul	23040ul	

Dazu wurde in jedes Well 8µl mineralisches Öl hinzugefügt.

Tabelle 11: Touch-down-Protokoll/PCR

Temperatur	Zeit	Zykluszahl
95°C	15 Minuten	1 Zyklus
95°C	20 Sekunden	20 Zyklen
70°C -> 60°C (-0,5°C/Zyklus)	30 Sekunden	
72°C	1 Minute	
95°C	20 Sekunden	20 Zyklen
62°C	30 Sekunden	
72°C	1 Minute	
72°C	10 Minuten	1 Zyklus
4°C	1 Minute	Ende

Ablauf des Touch-down-Protokolls bei der PCR. Mit Hilfe dieses Protokolls konnte eine maximale Menge des korrekten PCR-Produktes erzielt werden.

4.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Das PCR-Produkt wurde anhand eines 1%igen Agarosegels beurteilt. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wurde dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt, das als sequenzunspezifische Substanz zwischen den Basenpaaren der DNA interkaliert. Bei Bestrahlung des Gels mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 oder 300nm kommt es zu einer Fluoreszenz der DNA [Ibelgauf, 1993].

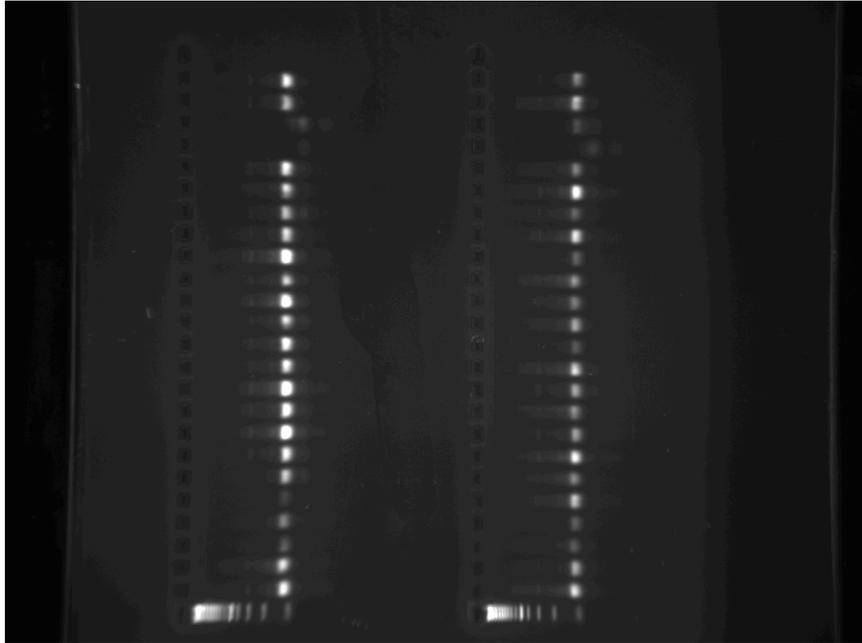


Abbildung 11: Darstellung des PCR-Produktes mittels Gelelektrophorese.

Anschließend wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt, aufgezeigt ist die Fluoreszenz der DNA.

4.4.1 Protokoll für die DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Hier folgt eine Tabelle mit den Angaben zur Herstellung des Agarosegels.

Tabelle 12: Protokoll für Gelelektrophorese

Substanzen	Konzentration	Menge
Agarose	2%	150ml
Ethidiumbromid	0,1%	23ul
PCR-Produkt		1,5ul
Ficoll Orange	15%	7ul

Herstellung des Agarosegels zur Überprüfung des PCR-Produktes auf Sauberkeit und Menge. Es wurde eine Spannung von 95V für 45 Minuten angelegt.

Zum Testen der PCR-Produkte wurde ein Aliquot aus 5 μ l, eine Wasserkontrolle und ein Längenstandard (100bp) zur Bestimmung der Produktgröße mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 95V für etwa 40-45min und wurde im Anschluss unter UV-Licht ausgewertet.

4.5 Schmelzkurvenanalyse



Abbildung 12: Idaho LightScanner (Idaho Technology).

Der Idaho LightScanner wurde zur Schmelzkurvenanalyse (High-Resolution-Melting) verwendet.

4.5.1 Historie

Mehr als 20 Jahre nach der ersten In-vitro-Amplifikation von DNA mittels PCR ist das High-Resolution-Melting (HRM) in vielen Forschungslaboren eine etablierte Methode zum schnellen Screening von PCR-Produkten auf das Vorliegen von Mutationen geworden.

Im Jahr 2002 wurde HRM durch eine Kollaboration von Wissenschaftlern der Universität Utah (USA) zusammen mit der Industrie (Idaho Technology, USA) entwickelt. Obwohl bereits vor vielen Jahren Schmelzkurven während der PCR beobachtet wurden, ist die Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die PCR mit der Zeit immer beliebter geworden. Diese beschriebene einfache Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die PCR wird nun seit 1997 standardmäßig angewendet [Lay et al., 1997].

Nicht nur durch bessere Farbstoffe [Wittwer et al., 2003], sondern auch durch neue Technologien wurde das HRM in den letzten Jahren deutlich optimiert. Das erste Instrument, HR-1 von Idaho Technology, wurde von Carl Wittwer [Wittwer et al., 2003] mit dem Ziel entwickelt, die DNA-Schmelzkurvenanalyse so präzise wie möglich zu gestalten. Alle Analysen wie das Genotypisieren, Mutationsscreenen und das Abgleichen von Sequenzen wurden erstmalig an diesem Instrument durchgeführt und etabliert. Amplifiziert wurde früher z.B. an einem RapidCycler II von IdahoTechnology; aber viele HRM-Instrumente haben diese Funktion heute bereits integriert.

4.5.2 Allgemeines

Mit diesem Verfahren der HRM können Variationen innerhalb einer Sequenz eines bestimmten Fragments, der aus amplifizierter DNA besteht, aufgedeckt werden. Aber nicht nur durch Produkte,

sondern auch durch nicht amplifizierte DNA können Schmelzkurven bei einer bestimmten Temperaturskala erhalten werden. Die DNA-Fragmente werden komplett auf passende Hybride, genannt Homoduplexe und unpassende Heteroduplexe, analysiert. Wildtyp und Mutante werden anhand einer unterschiedlichen Schmelzkurve bzw. eines anderen Schmelzpunktes differenziert.

HRM ist somit eine einfache Methode zum Genotypisieren, Abgleichen von Sequenzen und Screenen von unbekannt Mutationen. Das Schmelzverhalten der DNA-Doppelhelix und das somit folgende Aufspalten in zufällige Abschnitte ist eine fundamentale Eigenschaft der DNA.

Das Prinzip der HRM ist, dass nach der PCR-Amplifikation beim kontrollierten Erhitzen der Produkte entstehende Schmelzkurven durch die Fluoreszenzänderung eines beigemischten Farbstoffs beim Schmelzen der Doppelhelix aufgezeichnet werden. Konventionell wird das Schmelzverhalten der DNA ohne Fluoreszenzfarbstoff durch UV-Absorption gemessen (Hyperchromizität), was allerdings Stunden in Anspruch nimmt und große Mengen an DNA (Mikrogramm) benötigt. Die Fluoreszenzanalyse ist viel genauer, und es werden nur einige Nanogramm an DNA benötigt.

4.5.3 Farbstoffe im Vergleich

Viele Farbstoffe fluoreszieren stark in der Gegenwart von doppelsträngiger DNA, v.a. Ethidiumbromid, aber SYBR Green I und LCGreen I sind heller und Standard bei der Anwendung von Schmelzkurvenanalysen und RT-PCR [Reed et al., 2007].

Allerdings entstehen die besten Resultate durch die Anwendung vom Farbstoff LCGreen I und Plus, die speziell für das HRM entwickelt wurden. Für diese Arbeit wurde LCGreen Plus angewendet. Der Unterschied zwischen diesen beiden Farbstoffen ist, dass LCGreen Plus noch heller ist als LCGreen I und an mehreren verschiedenen Instrumenten angewendet werden kann [Graham et al., 2005]. Beide beeinträchtigen die PCR-Reaktion nicht und fluoreszieren sehr hell bei der Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Somit ist eine teure und zeitaufwendige Markierung der Proben mit einem Farbstoff nicht notwendig. LCGreen Plus wurde bereits vor der Amplifikation im Verhältnis 1:10 hinzugegeben, d.h. in der Konzentration zwischen 1 und 10µM [IdahoTechnology, 2008]. LCGreen Plus hat eine gute Zuverlässigkeit bei der Darstellung der Heteroduplexe, der Grund ist noch nicht vollständig geklärt [IdahoTechnology, 2008], vermutlich durch die gleichmäßige Verteilung zwischen den beiden DNA-Strängen während des Schmelzprozesses [Wittwer et al., 2003], [Gundry et al., 2003]. LCGreen Plus kann aber sogar auch in höheren Konzentrationen angewendet werden ohne die Reaktion zu beeinflussen. Lediglich bei der Verwendung dieses Farbstoffes, kann die Mg-Konzentration die Farbstoffverteilung beim Schmelzen beeinflussen [IdahoTechnology, 2008]. Andere Farbstoffe sind am Aufkommen, jedoch bisher noch nicht durch Vergleichsstudien untersucht.

4.5.4 Ablauf

Nach der PCR werden die Kapillaren noch einmal schrittweise auf 90°C erhitzt [Vandersteen et al., 2007]. Die Temperaturen werden jeweils an 65 Punkten/°C kontrolliert. Die Schmelztemperaturen sollten in diesem Bereich liegen. Die Kapillaren werden durch einen großen anliegenden Aluminiumzylinder erhitzt, der wiederum durch eine heiße Spirale erwärmt wird. Der LightScanner, der hier bei dieser Arbeit verwendet wurde, ist als Hochdurchsatztechnik entwickelt worden, als die Nachfrage nach einem größeren Format wie 96er oder 384er Platten gestiegen ist. Hier werden Temperaturveränderungen von jeweils 0,1°C empfohlen mit einem Halten der Temperatur mit der Dauer von 2sec bei jedem 0,1°C Schritt. Die resultierende Temperaturveränderung beträgt 0,017°C/s.

Messen der Fluoreszenz:

Das Schmelzprofil einer Doppelhelix ist stets abhängig vom umgebenden Puffer, v.a. der Salzkonzentration, die in diesem enthalten ist, dem GC-Gehalt, der Länge und der Heterozygotie. Um ein zuverlässiges Ergebnis zu erhalten, sollte jede DNA auf die gleiche Art und Weise isoliert worden sein und die gleiche Konzentration betragen [Reed et al., 2007], [Gundry et al., 2003].

Vorhandene doppelsträngige DNA fluoresziert in Anwesenheit des interkalierenden Farbstoffes sehr stark bei niedrigen Temperaturen. Wenn die Temperatur steigt, nimmt die Fluoreszenz ab, zuerst langsam und fällt dann ab bei einem charakteristischen Temperaturwert, wenn die DNA in Einzelstränge zerfällt. Die Fluoreszenz beinhaltet zu diesem Zeitpunkt noch 50%. Der Schmelzpunkt wird offiziell definiert als eine bestimmte Temperatur, wo die Hälfte der Duplexe schon geschmolzen ist. Das entspricht dem Wendepunkt der Steigungskurve.

Die meiste Information erhält man daher nicht durch das Ablesen der Schmelztemperatur, sondern durch das Betrachten der Form der Schmelzkurve. Das Vergleichen der Schmelzkurven miteinander wird hauptsächlich im Verfahren des Matchens von Sequenzen, aber auch beim Mutationsscreening als ein Indikator für Heteroduplexe, geformt durch heterozygote DNA, angewendet. Die Detektion von Heteroduplexen in kleinen Amplikons bevorzugt ein schnelles Kühlen vor dem Schmelzen, schnelles Heizen während dem Schmelzen und eine niedrige Mg²⁺-Konzentration [Gundry et al., 2003].

Es zeigt sich eine Fluoreszenzabnahme korrespondierend zum Schmelzpunkt der am wenigsten stabilen Probe. Daraus wird geschlußfolgert [Gingeras et al., 2005], dass Sequenzvarianten weniger stabil sind und somit eine abgewandelte Schmelzkurve zeigen. Homozygote werden ebenfalls anhand von Schmelzpunktveränderungen auseinandergelassen [Wittwer et al., 2003]. Die HRM-Analyse kann somit als konventionelle Methode zum Screening von Homozygoten und Heterozygoten angewendet werden. Im Gegensatz zur HPLC, wo nur Heterozygote aufgezeigt werden können, ist die angegebene Sensitivität und Spezifität hierbei viel genauer; sie betragen 97% und 99% [Chou et al., 2005], auch in Produkten bis 1.000bp [Reed et al., 2004], und man benötigt keine Elektrophorese [Graham et al., 2005]. Frühere Methoden zeigten oft falsch-positive Polymorphismen als Mutationen

an oder führten auch zu falsch-negativen Ergebnissen, da sie sich auf Mutationshotspots konzentrieren und somit seltene Mutationen übersehen können [Reed et al., 2004]. Als Beispiel die Restriktionsenzymmethode, ein sehr lokalisiertes Verfahren, das nur bis zu 30 Nukleotide untersuchen kann.

Um die Unterschiede der Schmelzpunkte möglichst groß zu halten, sollten die Amplikonlängen möglichst kurz gehalten werden, möglichst unter 500bp. Denn je kürzer eine Probe ist, desto höher ist ihre Destabilisierung durch einen „Mismatch“ [von Ahsen, 2005].

4.5.5 Auswertung mit der MeltingWizard Software

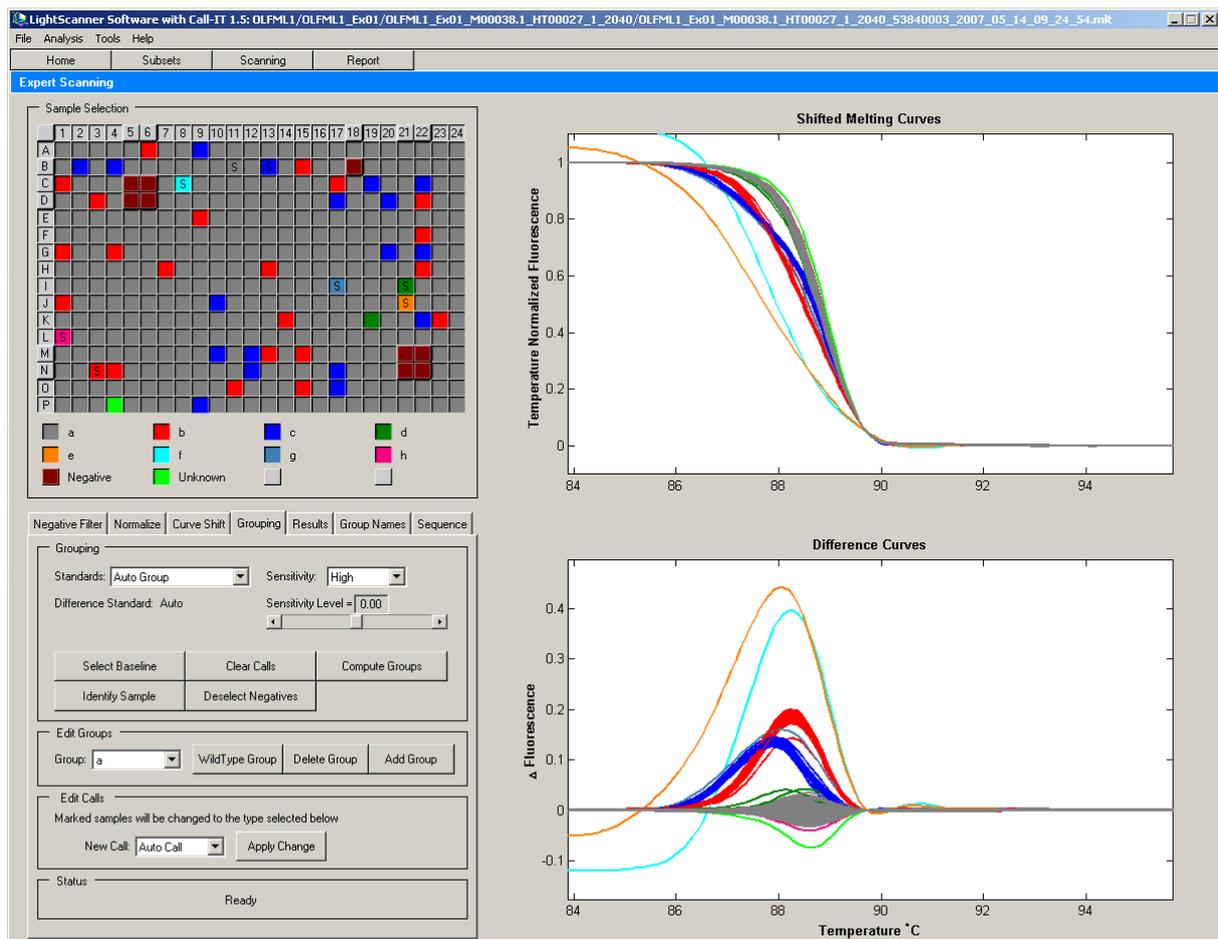


Abbildung 13: Melting Wizard Software.

Mithilfe der Melting Wizard Software wurden die Schmelzkurven ausgewertet.

Nach dem Scannen wurden die Daten durch die mitgelieferte Software „Melting Wizard“ normalisiert, der Temperatur angepasst und anschließend in einer graphischen Darstellung der Differenz der Fluoreszenz auf einem Display angezeigt. Die Fluoreszenzintensitätswerte werden zwischen 0-100% normalisiert indem eine lineare Grundlinie vor und nach jedem Schmelzen definiert wird [Technology, 2008]. Eine Schmelzkurve wird als Referenz gewählt und die Differenz zwischen den Kurven und dem Standard wird gegen die Temperatur aufgetragen um die Fluoreszenzdifferenz darzustellen [IdahoTechnology, 2008]. Die Referenz wird meist durch den Mittelwert verschiedener

Wildtypkurven gebildet [Graham et al., 2005]. Die ursprüngliche Referenzkurve stellt eine horizontale Linie bei 0 dar, und die verschiedenen Genotypen sammeln sich dann ober- und unterhalb dieser Linie, so dass die verschiedenen Genotypen einfach visuell auseinandergehalten werden können [IdahoTechnology, 2008].

Folglich müssen die Proben mit einem ausgefallenen Schmelzprofil seltene Varianten sein [Vandersteen et al., 2007]. Diese Schmelzkurven sollten nicht mit abgeleiteten Kurven ($-dF/dT$) verwechselt werden [Wittwer CT, 2003], die oft zur Darstellung von Daten mit schlechter Auflösung benutzt werden [Wittwer et al., 2003], [Graham et al., 2005]. Bei der Darstellung der Differenz der Fluoreszenz werden nur die minimalen Schmelztemperaturunterschiede der DNA durch die Form der Schmelzkurve hervorgehoben [Graham et al., 2005]. Somit wird das Verhalten der gesamten Kurve im hohen Temperaturbereich mit einbezogen und nicht nur der Schmelzpunkt berücksichtigt [Zhou et al., 2005]. Denn die Gefahr ist, dass durch die konventionellen ableitenden Verfahren die Darstellung der hoch auflösenden Daten so vereinfacht wird, dass ein nur minimaler Effekt, der durch Heteroduplexe erzeugt wurde, verdeckt werden könnte [IdahoTechnology, 2008].

Obwohl man auch automatische Zusammengehörigkeitsalgorithmen verwenden könnte, ist dennoch das Herausfinden der Zusammengehörigkeit durch den visuellen Vergleich korrekt und zuverlässig [IdahoTechnology, 2008].

Obwohl bei manchen Heteroduplexen die Paarungen gleich sind, hängt die Stabilität der benachbarten Regionen von den angrenzenden Basen ab, was oft zu einer unterschiedlichen Stabilität führt [Graham et al., 2005] und bei der thermodynamischen Auswertung automatisch berechnet wird. Gewöhnlich betragen DNA-Schmelzbereiche zwischen 50-300bp und längere Amplikons können mehrere Schmelzdomänen aufzeigen. Wenn zwei Peaks innerhalb einer Schmelzkurve ersichtlich werden, d.h. ein Amplikon zwei Schmelzdomänen enthält, dann befindet sich die Mutation häufiger in der unteren Domäne während die höhere Domäne für alle Proben meistens identisch ist [Wittwer CT, 2003].

Obwohl bis dato PCR-Produkte nur bis zu einer Größe von 1000bp dieser Methode zugänglich waren [von Ahsen, 2005], ist nun kein oberes Limit für die Größe des Amplikons zum Genotypisieren und Mutationsscreening bei dieser Methode gegeben [IdahoTechnology, 2008]. Andere Scanningmethoden wie z.B. das Sequenzieren erlauben nur das Prozessieren von Produkten von 300-700bp. Daher ist das High-Resolution-Melting eine gute Methode, niedrige Kosten mit einem hohen Datensatz zu kombinieren.

4.5.6 Genauigkeit

Da die meisten Produkte eine wirklich sehr ähnliche Schmelztemperatur besitzen, ist die Genauigkeit der DNA-Schmelzkurvenanalyse direkt von der Auflösung des jeweiligen Schmelzinstrumentes abhängig.

Das Scannen von Heteroduplexen zeigt nur Sequenzvarianten an, kann diese aber nicht identifizieren oder genotypisieren. Sequenzen, die nicht krankheitsverursachend sind, kommen viel häufiger vor als jene, die für gewisse Krankheiten prädisponieren [von Ahsen, 2005]. Wenn Proben an HRS-Systemen mit einer geringen Auflösung untersucht werden, können 19-52% der möglichen heterozygoten SNPs mit der erwarteten heterozygoten Variante verwechselt werden [Graham et al., 2005]. High-resolution Methoden benötigen einen analogen oder digitalen 16-bit Konverter mit einer sehr hohen Auflösung, idealerweise 0,002°C und 0,002% der Fluoreszenz [IdahoTechnology, 2008]. Es werden circa 50 Datenpunkte für 1°C benötigt.

Die ggf. nicht so exakte Differenzierung von hetero- und homozygoten Varianten in diesem Verfahren stellt aber in unserem Fall kein Problem dar, da HRM nur als Screeningmethode angewendet wurde und alle aufgefundenen Varianten noch mit Hilfe der Sanger-DNA-Sequenzierung überprüft wurden, um zwischen hetero- und homozygote Varianten zuverlässig unterschieden zu können, wie es auch empfohlen wird [Vandersteen et al., 2007].

4.6 DNA-Sequenzierung nach Sanger



Abbildung 14: Sanger-Sequencing mit einem Kapillarsequencer (ABI-Life Technologies).

Die Sequenzierung erfolgte nach Sanger.

4.6.1 Historie

1975 wurde die „Plus und Minus“-Methode zum Sequenzieren von DNA durch Frederick Sanger eingeführt [Sanger et al., 1975]. Diese Methode stellte die Basis für alle weiteren Sequenziermethoden dar, die viele Jahre später entwickelt wurden. Insbesondere die Einführung der Auftrennung von DNA-Fragmenten bei der Polyacrylamidgelelektrophorese der Größe nach stellte eine wichtige Neuerung dar. Bei der „Plus und Minus“-Methode entstanden unterschiedlich lange Fragmente der DNA. Die eingebauten dNTPs wurden mit ^{32}P radioaktiv markiert, so dass durch eine nächtliche

Bestrahlung mit Röntgenstrahlen unterschiedliche Banden auf dem Gel sichtbar wurden, die sich nur in einer Basenlänge voneinander unterschieden.

1977 wurden zwei weitere Methoden zum Sequenzieren von DNA entdeckt. Maxam und Gilbert beschrieben ein Verfahren, bei dem es durch eine basenspezifische chemische Spaltung der DNA und eine anschließende Auftrennung der Fragmente durch Gelelektrophorese [Maxam et al., 1977] zur Aufschlüsselung der Sequenz kam. Diese Methode wird heute aber nicht mehr angewendet, da sie gefährliche Reagenzien wie Hydrazin benötigte und eine Automatisierung nicht möglich war. Sanger entwarf zur gleichen Zeit die Kettenabbruch-Synthese, und mit ihr wurde bereits 1977 die erste vollständige Sequenzierung eines Bakteriophagen-Genoms vorgestellt [Sanger et al., 1992].

Schließlich erhielten beide Teams 1980 den Nobelpreis, aber Sangers Methode wurde als Standard eingeführt.

In den 90er Jahren wurde diese Methode weiter verbessert. Anfangs benötigte man noch 4 einzelne Reaktionen per Template (eine Reaktion für jede Base: G, A, T und C) jeweils mit dementsprechenden Didesoxynukleotiden. Es wurden auch neue Markerfarbstoffe in verschiedenen Farben eingeführt [Prober et al., 1987], [Smith et al., 1986], so dass heute nur noch eine einzelne Reaktion mit allen vier dNTPs und ddNTPs durchgeführt werden muss. Fluoreszenzfarbstoffe ersetzen die radioaktiven Marker, die Autoradiographie und das manuelle Auszählen der Basen. Dieses neue Verfahren wurde durch das Labor von Leroy Hood zusammen mit der Firma Applied Biosystems (ABI, Foster City, CA, USA) veröffentlicht [Smith et al., 1986] und 1987 erfolgte die Vermarktung durch Applied Biosciences.

Später wurde das Gel durch Kapillaren ersetzt, so dass der Separationsschritt deutlich vereinfacht wurde, und die Länge des Sequenzierstranges variabler wurde [Madabhushi, 1998]. In den letzten 10 Jahren wurde sogar die Länge von einem Strang von 450bp bis auf mögliche 850bp erhöht, ohne dass es Probleme beim Sequenzieren gab.

Dovichi und Zhang publizierten 2000 eine elegante Vereinfachung bezüglich dieser Methode, indem sie anstatt der Primer die ddNTPs mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten [Dovichi NJ, 2000].

Bereits 1994 wurde schließlich basierend auf der Sequenzierung eine detaillierte Karte des menschlichen Genoms publiziert [Murray et al., 1994], und Februar 2001 wurden die Sequenzen des humanen Genoms in der gleichen Woche in Science und Nature veröffentlicht [Venter et al., 2001].

4.6.2 Allgemeines

Das Sequenzieren nach Sanger, auch Kettenabbruch-Synthese genannt, ist eine enzymvermittelte Methode zur Darstellung der Nukleotidsequenz eines DNA-Moleküls. Mit dieser Methode können Regulatorgene und Gensequenzen aufgedeckt werden, aber auch Vergleiche von homologen Genen gezogen und Mutationen entschlüsselt werden.

Das Prinzip besteht aus der Synthese einer komplementären Template-DNA, die durch den enzymatischen Einbau von 2'-Desoxynukleotiden (dNTPs), katalysiert durch das Enzym DNA-

Polymerase, zusammengesetzt wird. Durch die Zugabe von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) und deren Bindung an stochastisch ausgewählten unterschiedlichen Positionen der DNA wird die Synthese abgebrochen [Sanger et al., 1992]. Es entstehen somit Fragmente unterschiedlicher Längen. Aufgrund der negativen Ladung der DNA kann man diese Fragmente auf einem Polyacrylamidgel der Größe nach auftrennen. Die DNA wandert zur positiven Elektrode, wenn eine elektrische Spannung angelegt wird. Größere Fragmente wandern langsamer als kleinere. Schließlich kann diese Methode mit der Genauigkeit des Längenunterschieds nur einer einzelnen Base zwischen den Abschnitten unterscheiden, das heißt, ein Strang mit 300 Basen unterscheidet sich von einem Strang, der nur aus 299 Basen besteht.

Wenn sich also diese Fragmente auf dem Gel ihrer Länge nach aufspalten, können die verschiedenen Fluoreszenzmarker durch einen Argonlaser angeregt und die davon ausgehenden Signale auf einem Detektor registriert werden. Es ergibt sich eine Sequenz aus unterschiedlich hohen Peaks, bestehend aus vier verschiedenen Farben der jeweiligen Marker, die vom Detektor gelesen werden.

4.6.3 Ablauf und Schrittfolge der ursprünglichen Methode

Das Sequenzieren nach Sanger benötigt folgende klassische Komponenten:

- **DNA-Einzelstrang**, der sequenziert wird;
- **DNA-Primer nur in 5'-3'-Richtung**, kurze DNA-Stücke, die komplementär zum zu sequenzierenden DNA-Strang sind, mit Fluoreszenzfarbstoffmarkierung am 5'-Ende;
- **DNA-Polymerase**, bindet an den Primer und synthetisiert die DNA in 3'-5'-Richtung;
- **dNTPs (Deoxynukleotide)**, werden durch die DNA-Polymerase eingebaut;
- **ddNTPs (Didesoxynukleotide)**, führen beim Einbau zur Kettenabbruchreaktion.

Zunächst muss die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95°C denaturiert werden, damit man Einzelstränge erhält.

Durch die DNA-Polymerase wird der DNA-Strang durch den Einbau von dNTPs verlängert. Hierzu bindet der Primer an die OH-Gruppe des 3'-Endes der Template-DNA. Die DNA-Polymerase bindet wiederum an die OH-Gruppe des Primers.

Bei der DNA-Synthese verbindet die Polymerase die 3'-OH-Gruppe eines Nukleotids mit der 5'-Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids.

Das Prinzip des Sequenzierens nach Sanger beruht auf dem Prinzip, dass ohne diese OH-Gruppe am 3'-Ende der Nukleotide der DNA-Strang nicht weiter verlängert werden kann, da das nächste Nukleotid nicht gebunden werden kann.

Diese zum Kettenabbruch führende Form der Nukleotide stellen, wie bereits erwähnt, Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) dar.

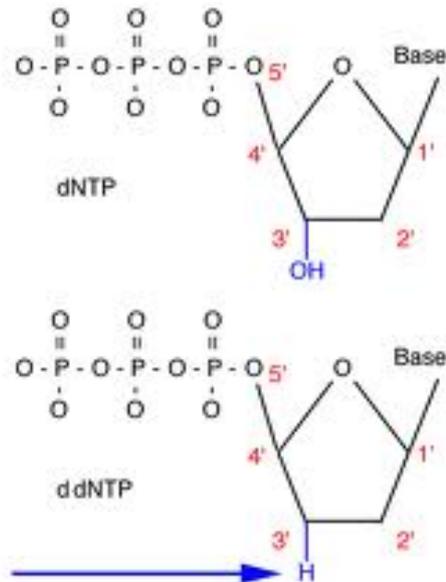


Abbildung 15: Molekulare Darstellung eines dNTPs (oben) und ddNTPs (unten).

Die zum Kettenabbruch führende Form der Nucleotide sind die Dideoxynucleotide (ddNTPs).

Die Konzentration der ddNTPs sollte ungefähr 1% der Konzentration der dNTPs betragen. Denn nach der Hinzugabe der DNA-Polymerase kommt es zur Polymerisation, und die Reaktion wird in ca. 1/100 der Fälle abgebrochen, wenn ein ddNTP eingebaut wurde. Wenn also die Konzentration nicht zu hoch ist, entsteht eine Serie unterschiedlicher Fragmentlängen.

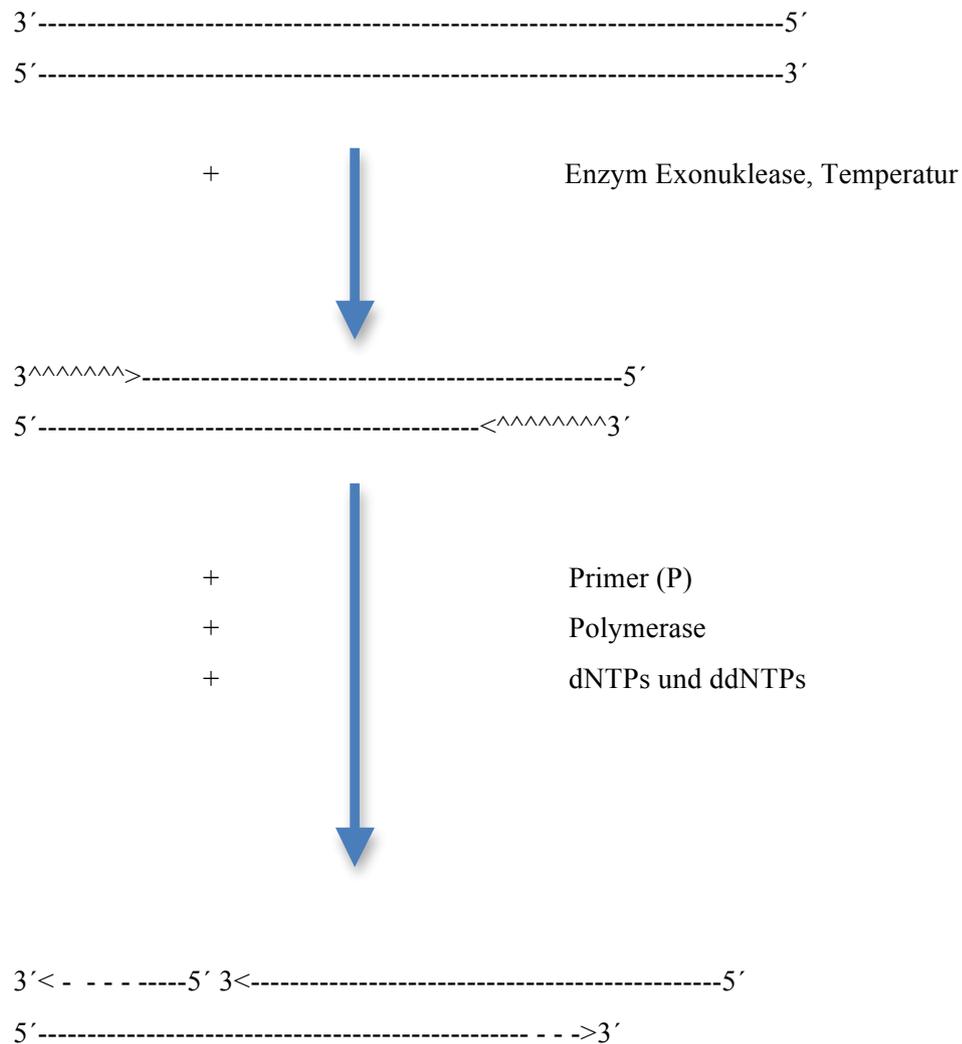


Abbildung 16: Zerstörung der Duplexe mit Exonuklease III (EXO III) und Basenextensionsreaktion.

Dieses vereinfachte Diagramm zeigt die Zerstörung der Duplexe mit Exonuklease III (EXO III) und die Richtung der Basenextension (- - -) beginnend vom Primer (P).

Der Trick dieses Verfahrens ist, dass alle Sequenzen mit den gleichen Nukleotiden starten, aber mit einer spezifischen Base enden. Wenn ein Strang in einer Lösung immer wieder erneut hergestellt wird, endet der neu synthetisierte Strang an allen Positionen, wo die entsprechenden ddNTPs gebunden werden können.

Nach diesen beschriebenen Reaktionen wird die DNA wieder denaturiert, damit sich die unterschiedlichen Einzelstränge auf dem Polyacrylamidgel auftrennen. Die Inhalte der damaligen vier Reaktionen werden in vier separaten Reihen auf dem Gel aufgetragen, um sie voneinander unterscheiden zu können. Nach der Gelelektrophorese werden die Banden mit UV- oder auch Röntgenstrahlen bestrahlt, je nachdem wie die Primer markiert waren.

Wenn also alle 4 Reaktionen auf dem Gel zusammengefasst werden, kann die aktuelle DNA-Sequenz in 5'- zu 3'-Richtung von unten nach oben auf dem Gel gelesen werden.

Die unterschiedlichen Fluoreszenzen werden von einem Laser erfasst und in der Form eines Chromatogramms aufgezeichnet. Das ist ein Diagramm aus verschiedenfarbigen Peaks, die mit den jeweiligen Nukleotiden korrespondieren in der jeweiligen Position der Sequenz.

4.6.4 Aufreinigung des PCR-Amplifikats

Zur Aufreinigung des PCR-Amplifikats nach der PCR wurden die überschüssigen Primer sowie nicht gebundene Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) entfernt. Hierzu wurde ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, USA) verwendet. Dies ist ein Mix, der die hydrolytischen Enzyme Exonuklease-I (EXO I) und Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP) enthält, die überschüssige Primer und dNTPs abbauen können.

ExoSAP-IT wurde zum PCR-Produkt in einer 96er Multiwellplatte hinzupipettiert und die Platte danach mit einem Foliendeckel verschlossen. Danach wurde die Platte anzentrifugiert und schließlich in den vorgeheizten Mastercycler gestellt.

Tabelle 13: Herstellung ExoSAP-Mix

Substanzen	Menge
10x Exonuklease I Puffer	0,5ul
EXO I (20U/ul)	0,025ul
SAP (IU/ul)	0,5ul
dH ₂ O	3,975ul
PCR-Produkt	5ul

Herstellung des ExoSAP-Mix für die Aufreinigung des PCR-Produktes vor der Sequenzierung. Die Exonuklease zerstört die nicht verbrauchten Primer, so dass die nicht gebundenen Primer die nachfolgende Sequenzierung nicht beeinträchtigen.

Folgendes Programm wurde für die ExoSAP-Behandlung angewendet.

Tabelle 14: Protokoll: ExoSAP-Mix-Programm

Temperatur	Zeit
37°C	65 Minuten
72°C	15 Minuten
4°C	Ende

Bei 37°C erfolgt die enzymatische Reaktion der Exonuklease und der SAP. Bei 72°C werden beide Enzyme thermisch deaktiviert, so dass sie die nachfolgende Sequenzierung nicht beeinträchtigen.

4.6.5 Verwendetes Cycle-Sequenzierungsprotokoll

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte nach einem Cycle-Sequencing-Protokoll. Dabei wird durch wiederholte Schritte des Primer-Annealings und der Primerextension mehr Sequenzierungsprodukt erhalten im Vergleich zu einer klassischen Sanger-Sequenzierungsreaktion.

Tabelle 15: Herstellung eines Sequenziergemisches

Substanz	Menge
PCR-Produkt nach ExoSAP-Aufreinigung	2,0 µl
Big Dye Terminator Version 3.1	0,25 µl
5x Big Dye Terminator Puffer	1,0 µl
Seq-Primer	0,5 µl
dH ₂ O	1,25 µl
Gesamt	5,0 µl

Herstellung eines Sequenzierungsgemisches für Cycle-Sequencing. Es werden in jedem Well 2µl aufgereinigtes PCR-Produkt und 3µl Sequenziermix zusammengefügt. Der Gesamtansatz ergibt 5 µl.

Im Anschluß wird das Cycle-Sequencing des Sequenziergemisches mit Hilfe des folgenden Programmes durchgeführt:

Tabelle 16: DNA-Sequenzierungsprogramm

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	1 Min.	40 Zyklen
72°C	1 Min.	
4°C	5 Min.	Ende

Beim Cycle Sequencing wird zunächst das PCR-Produkt bei 95°C denaturiert, anschließend erfolgt des Annealing der Sequenzierprimer und die Primerextension bei 72°C. Der Prozeß aus Denaturierung, Annealing und Primerextension wird für 40 Zyklen wiederholt.

Danach erfolgte eine Aufreinigung der Sequenzierproduktes mit dem Qiagen-Kit Cycle Seq Kit.

4.6.6 Softwaregestützte Mutationsdetektion

Mit Hilfe der kommerziellen Software *Mutation Surveyor* (Softgenetics, State College, PA, USA) wurden die erzeugten Sequenzen im Hinblick auf das Vorliegen von Mutationen analysiert. Dieses Programm kann mit einer hohen Sensitivität und Spezifität die Wildtyp-Sequenzen von mutierten Sequenzen differenzieren. Innerhalb von 2 Minuten können bis zu 400 Reihen, die bei Mutation Surveyor als ein durchlaufendes Fenster dargestellt werden, untersucht werden.

Dieses Programm kann mit unidirektionalen und bidirektionalen Daten genutzt werden. Die Genauigkeit bei der bidirektionalen Analyse liegt über 99%, bei der unidirektionalen Methode beträgt sie 95%. Jede einzelne Base, die als Peak in einer anderen Farbe dargestellt wird, wird automatisch mit einer Referenzsequenz verglichen. Diese Referenzsequenzen können direkt bei GenBank (von Softgenetics) heruntergeladen werden, wo alle humanen Sequenzen gespeichert sind. Gefundene Differenzen zwischen den beiden Sequenzen werden als ein scharfer „Peak“ im Elektropherogramm, einer weiteren Reihe auf dem Bildschirm dargestellt. Folglich muss man nicht selber mit dem Auge verschiedene Sequenzen abgleichen, was viel Zeit kosten würde. Automatisch führt die Software auch eine Gruppenzugehörigkeit der Sequenzen durch. Sie verbindet den Vorwärts- und Rückwärtsstrang der jeweiligen Patienten, vergleicht diese mit der Referenz und sortiert sie nach den jeweiligen Exons.



Abbildung 17: Darstellung der Sequenzen von *OLFML2B*.

Durch die mitgelieferte Software Mutation Surveyor können die zu analysierenden Sequenzen eines Gens schließlich am Computerbildschirm dargestellt werden.

Schließlich wurden die PCR-Produkte resequenziert wie es vom Hersteller auch empfohlen wird (ABI 3730, Applied Biosystems, Foster City, USA).

4.7 MALDI-TOF MS

Die Genotypen der aufgefundenen seltenen (Mutationen) und häufigen (SNP) Varianten wurden mit Maldi-TOF MS (Sequenom, San Diego, USA) in allen Patienten bestätigt.



Abbildung 18: Maldi-TOF MS (Sequenom).

Maldi-TOF MS =Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry.

4.7.1 Historie

Der Begriff „Maldi-TOF MS = Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry“ wurde im Jahre 1985 durch Franz Hillenkamp, Michael Karas und deren Kollegen eingeführt, als sie herausfanden, dass die Aminosäure Alanin unzerstört ionisieren kann, wenn man sie in eine Matrix aus einer organischen Substanz einbettet und sie dann mit einem 266nm Laser beschießt.

4.7.2 Prinzip und Ablauf

Das Prinzip der SNP-Genotypisierung durch Maldi-TOF MS basiert auf (1) einer PCR der Region des zu genotypisierenden SNPs, (2) einer Primerextensions-Reaktion für eine einzige Base an der Position des zu genotypisierenden SNPs, gefolgt von einer (3) Aufreinigung der Produkte und (4) einer massenspektrometrischen Analyse der Einzelbasen-Primerextentionsprodukte für den Genotyp des SNP.

Primer für die PCR und die Einzelbasen-Primerextentions-Reaktion werden mit Hilfe der Software MassARRAY Assay Designer 3.0 (Sequenom, San Diego, USA) hergestellt. Das Ziel ist möglichst

spezifische Primer auszuwählen, die möglichst genau nur an die zu untersuchende Region binden. Diese Methode ist ein Multiplex-Verfahren, mehrere SNPs können in einer Reaktion parallel untersucht werden. An jeden PCR-Primer wurde eine Endung aus zehn bekannten Basenpaaren als „tag“ angehängt, um die Masse der PCR-Primer deutlich größer zu machen als die der Extensions-Primer, damit sie die MALDI-Analyse nicht stören.

Nach der Aufreinigung (SAP-Verdau nicht eingebauter dNTPs) wird der PCR-Erfolg auf einem 3% Agarose-Gel kontrolliert. Dort wird auch eine Negativkontrolle zur Sicherheit aufgetragen, um Verunreinigungen des Mastermixes auszuschließen. Anschließend folgt die Primer-Extensionsreaktion bei der die Primer an der Position des SNP um genau eine einzelne Base verlängert werden. Die Art der eingebauten Base (A, G, T oder C) korrespondiert mit dem Genotypen des jeweiligen SNP.

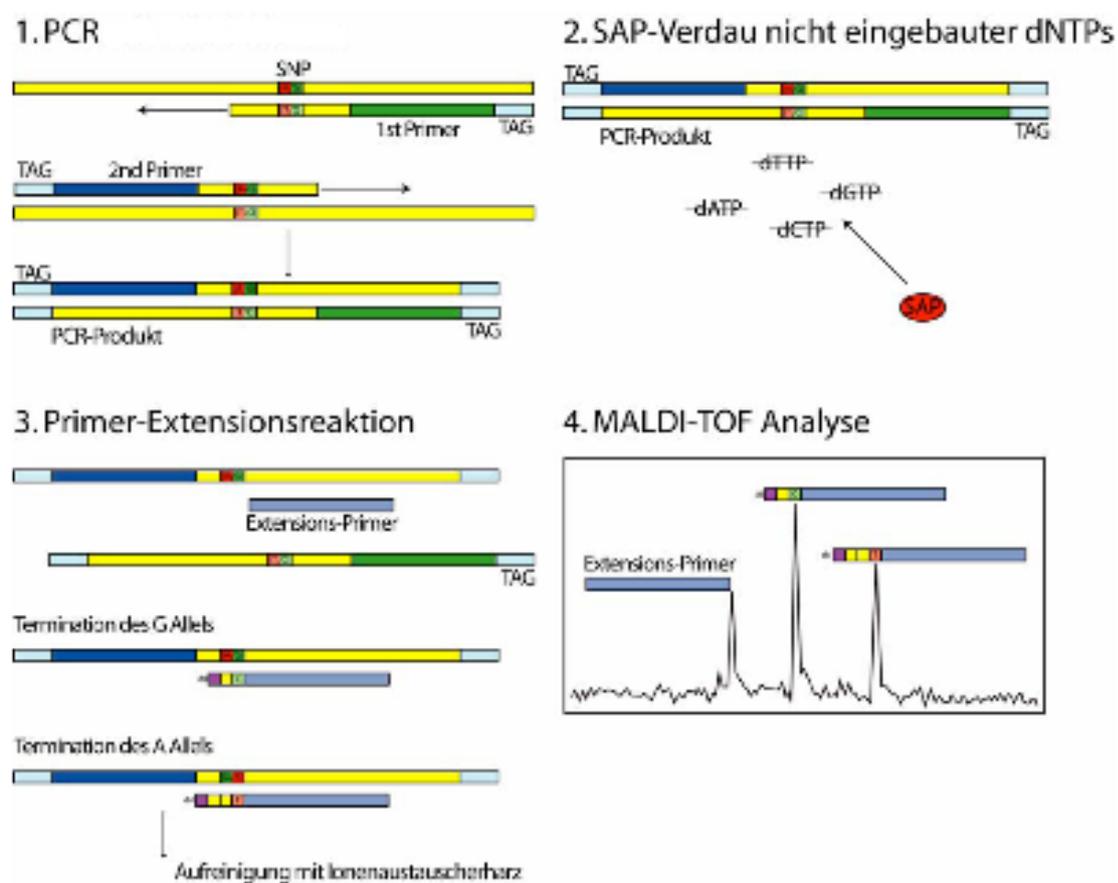


Abbildung 19: Homogenous Mass Extend-Reaktion (hME).

Maldi-TOF MS führt zunächst (1) eine PCR der Region des zu genotypisierenden SNPs durch, gefolgt von (2) einer Primerextensions-Reaktion für eine einzige Base an der Position des zu genotypisierenden SNP und schließlich zu einer (3) Aufreinigung der Produkte. Eine massenspektrometrische Analyse der Einzelbasen-Primerextensionsprodukte führt dann zur erfolgreichen Genotypisierung. Dieses Schema wurde freundlicherweise durch Dr. H. Gohlke, Helmholtz Zentrum München, zur Verfügung gestellt.

Das Prinzip der massenspektrometrischen Analyse im Rahmen der Maldi-TOF MS, basiert auf einem Laserimpuls, der eine Desorption der in eine kristalline Matrix eingebetteten Einzelbasen-Primerextensionsprodukte induziert und somit diese Moleküle unzerstört ionisiert, so dass ihre Masse anhand der Flugzeit bestimmt werden und so auf die Art der eingebauten Base (A, G, T oder C) geschlossen werden kann. Die Matrix ist notwendig, um die Evaporation zu ermöglichen. Diese nimmt die Laserenergie auf und verhindert dadurch einen photolytischen Schaden der Fragmente und ihre weitere Interaktion. In den letzten Jahren wurde dieses Verfahren so weit entwickelt, so dass DNA-Fragmente zwischen 1000 und 9000 Da mit einer Genauigkeit von 0,1-0,001% gemessen werden können. Zudem wurde durch diese Methode auch ein hoher Datendurchlauf ermöglicht, der eine Analyse von SNPs in großen Populationsstudien [Griffin et al., 2000] erlaubt.

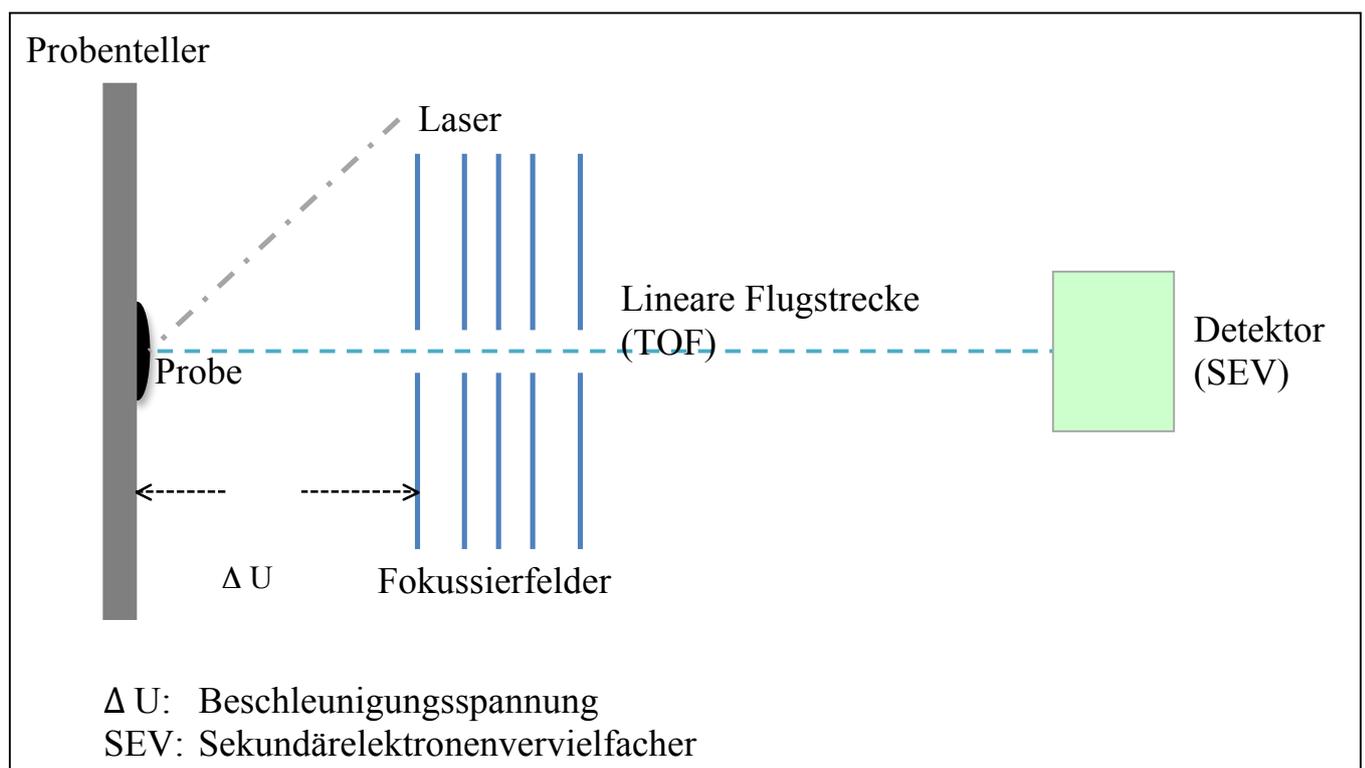


Abbildung 20: Schematischer Aufbau des Maldi-TOF MS.

Die ionisierten DNA-Fragmente werden durch den Laserimpuls aus der Matrix freigesetzt und in einem Feld mit konstant bleibender Energie beschleunigt bis diese Moleküle schließlich auf einen Detektor am Ende einer langen Röhre auftreffen. Die gemessene Zeit zwischen der Freisetzung dieser Moleküle und dem Auftreffen auf dem Detektor wird als „TOF=Time of flight“ bezeichnet. Da alle Teilchen identisch beschleunigt werden, entspricht diese Zeit ihrer molekularen Masse. Alle Teilchen haben somit ein nur gering unterschiedliches Molekulargewicht und unterscheiden sich nur in ihrer terminalen Base am 3'-Ende abhängig vom Genotyp.

4.7.3 PCR für Maldi-TOF MS

Die 14 nichtsynonymen Varianten, die in Patienten gefunden wurden und in beiden Kontrollkollektiven eine MAF $\leq 0.1\%$ hatten, wurden mit MALDI-TOF MS zur Bestätigung in den Patienten und im KORA-Kollektiv reagentypisiert. Dazu wurden zunächst 96er Platten mit 1ng/ml DNA der zu genotypisierenden Personen belegt (Qiagen, Hilden, Deutschland). Vier dieser 96er Platten wurden danach auf eine 384er Platte transferiert (Abgene, Surrey, UK). Im ersten Schritt wurde eine PCR durchgeführt (s. Kapitel 4.3) um etwa 100 Basenpaare der zu untersuchenden Region zu amplifizieren. Dabei wurden die folgenden PCR-Primer verwendet:

Tabelle 17: PCR-Primer für Genotypisierung der 14 nichtsynonymen Varianten

Gen	Variante	PCR-Primer – F	PCR-Primer – R
<i>OLFML2B</i>	A12S	ACGTTGGATGTTGTCCTGTGAGG ACAATG	ACGTTGGATGAAGCCTCGGCTGCT AGTTC
<i>OLFML2B</i>	S113L	ACGTTGGATGATACCGTGGAACC ATCACC	ACGTTGGATGAGCTTCTGGAGCCT GAAGTC
<i>OLFML2B</i>	T149A	ACGTTGGATGTGTAGCTTCAGGAG ATCCAG	ACGTTGGATGCCCTTGCCTTGTTT CATAG
<i>OLFML2B</i>	N339M	ACGTTGGATGATCAGCTCCTGAGA CACAAC	ACGTTGGATGCTTGGATTGTAATC CACTGC
<i>OLFML2B</i>	R347W	ACGTTGGATGATCAGCTCCTGAGA CACAAC	ACGTTGGATGTTGTTTGGAGTGTT GGTCCC
<i>OLFML2B</i>	R353H	ACGTTGGATGTTTCAGGTCGCTTGT CACAG	ACGTTGGATGAGACACAACGGCCT GATGAC
<i>OLFML2B</i>	A436S	ACGTTGGATGAACACTCCAAACAA CCTCGG	ACGTTGGATGTTCTCCTCAGGTAC CAGCCA
<i>OLFML2B</i>	P504L	ACGTTGGATGTTCCGCCCATATGT GTTCTG	ACGTTGGATGAAACCTCCATCCAC CTCTTC
<i>OLFML2B</i>	G515E	ACGTTGGATGGACACTCTCTCCAC AATCAC	ACGTTGGATGCGTAAATCCGCTCA TCCTTG
<i>OLFML2B</i>	R527Q	ACGTTGGATGACATATGGGCGGAA TGAAGG	ACGTTGGATGGGGTGTTGCCGTAG TAATAG
<i>OLFML2B</i>	Y557H	ACGTTGGATGTGAAGCCTCCTGTT TTCTCC	ACGTTGGATGATTGTATAACCACGT GGCCTG
<i>OLFML2B</i>	T610I	ACGTTGGATGATGCTGCATGACGT GGCCTA	ACGTTGGATGTTCTCGTCCACAGC AAAGTC
<i>OLFML2B</i>	A623T	ACGTTGGATGATGCTGCATGACGT GGCCTA	ACGTTGGATGTTGCTCAGGACAAT GACCTC
<i>OLFML2B</i>	G674D	ACGTTGGATGACAGAAGGAGACC ACATGGC	ACGTTGGATGCGAAAGCGTAGGAG ATGTTG

Diese Primer wurden für die Genotypisierung der 14 mit MALDI bestätigten nichtsynonymen *OLFML2B*-Varianten verwendet, die in Patienten aufgefunden wurden und die eine MAF $\leq 0.1\%$ aufwiesen. Wiedergegeben sind die F- und R-Primer der PCR-Reaktion.

Die Genotypisierung wurde in einem Volumen von 5 μ l in jedem einzelnen Well durchgeführt. Bei der Plattenbelegung wurden Positiv- und Negativkontrollen in die 96er und 384er Platten eingebaut, um eine Probenvertauschung durch Drehung der Platten auszuschließen.

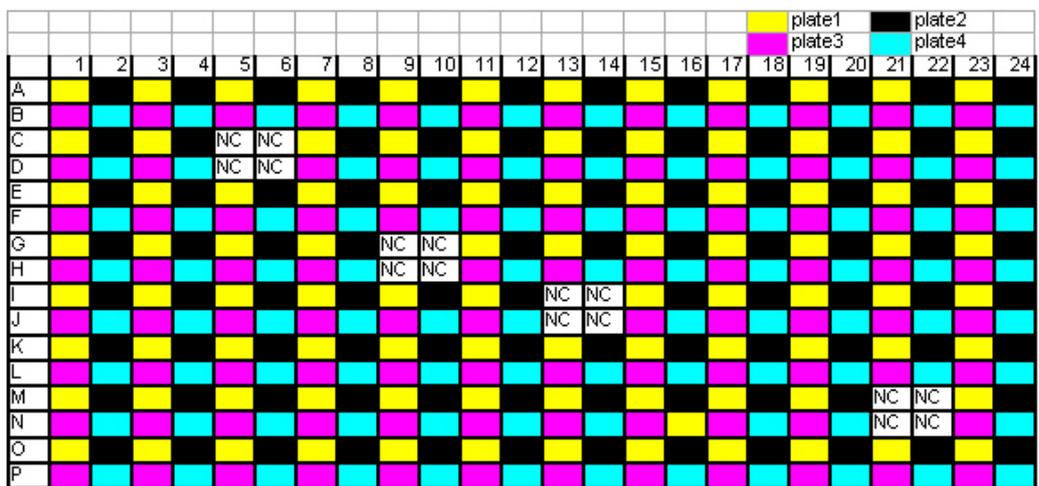


Abbildung 21: Plattenbelegung der 384er Platten mit eingebauten Kontrollen.

Die Kontrollen dienen der Verhinderung einer Probenvertauschung durch 180°-Drehung der Platten. „NC“ steht für: negative Kontrolle (negative control). Dieses Schema wurde freundlicherweise durch Dr. Henning Gohlke, Helmholtz Zentrum München, zur Verfügung gestellt.

4.7.4 SAP-Reaktion

Um die überschüssigen dNTPs, die nicht eingebaut werden konnten, wieder zu entfernen, ist ihre Entfernung durch Dephosphorylierung mit dem katalytischen Enzym Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Amersham, Piscataway, USA) notwendig. Im Gegensatz zu der ExoSAP-Aufreinigung von PCR-Produkten vor der Cycle-Sequenzierung ist bei der hME-Reaktion keine Entfernung der unverbrauchten PCR-Primer mit Exonuklease notwendig, da diese durch die Massenerhöhung mit Hilfe des 10bp langen „tag“ nicht im Massenspektrum stören.

Tabelle 18: Standard Master-Mix zur Aufreinigung mit SAP

Komponenten	1 Reaktion	384er Platte	Konzentration
hME-Puffer	0,17ul	81,6ul	10x
SAP	0,3ul	144ul	1U7ul
dH ₂ O	1,5ul	734,4ul	
Gesamtvolumen	2ul	960ul	

Der folgende Reaktionsmix wurde für die SAP („Shrimp Alkaline Phosphatase“) Reaktion hergestellt.

Die Entfernung der dNTPs erfolgt durch Inkubation bei 37°C gefolgt von einer Inaktivierung der SAP bei 85°C. Folgendes Programm wurde für die ExoSAP-Behandlung angewendet.

Tabelle 19: Protokoll: SAP Mix-Programm

Temperatur	Zeit
37°C	20 Minuten
85°C	10 Minuten
4°C	Ende

Bei 37°C erfolgt die enzymatische Reaktion der SAP. Bei 85°C wird die SAP thermisch inaktiviert, so dass sie die nachfolgende hME-Reaktion nicht beeinträchtigt.

4.7.5 Durchführung der hME-Reaktion

Im Folgenden wird der Ansatz für die Einzelbasen-Extension nach dem proprietären Homogenous Mass Extend-Protokoll (hME) wiedergegeben. Dieses bewirkt eine Extensionsreaktion spezifisch für jeden SNP. Auch dieses Verfahren wurde auf 384er Platten durchgeführt. Für eine 384er-Mikrotiterplatte wird ein Ansatz von 480 Reaktionen hergestellt um trotz Pipettierverlusten eine ausreichende Reaktionsmenge zur Verfügung zu haben. Die Basenextensionsreaktion wurde mittels des Enzyms Thermosequenase (Amersham, Piscataway, USA) durchgeführt.

Tabelle 20: Mastermix für die Basenextensionsreaktion bei hME

Komponenten	1 Reaktion	384er Platte
hME-Mix	0,2ul	96ul
hME-Primer	0,054ul	25,92ul
Thermosequenase	0,018	8,64ul
dH ₂ O	1,728	829,4ul
Gesamtvolumen	2ul	960ul

Ansatz für Mastermix der Multiplex-SNP-Genotypisierung mit Hilfe des proprietären „Homogenous Mass Extend-Protokolls“ (hME).

Anschließend wird die „Homogenous Mass Extend-Reaktion“ (hME) mit dem folgenden Temperaturprotokoll durchgeführt.

Tabelle 21: Temperaturprofil für die hME-Reaktion

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierungsschritt	95°C	15 Minuten	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	55 Zyklen
Annealing	52°C	30 Sekunden	
Extension	72°C	1 Minuten	
Finale Extension	72°C	10 Minuten	1 Zyklus

Protokoll für die hME-Methode. Die Schritte Denaturierung, Annealing sowie die Extension werden 55x wiederholt.

Die für die Genotypisierung der 14 Varianten im *OLFML2B*-Gen verwendeten Extensions-Primer sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben (siehe Erklärung im Ergebnisteil dieser Arbeit).

Tabelle 22: Extensions-Primer für die hME-Genotypisierung

Gen	Variante	Extension - Primer
<i>OLFML2B</i>	A12S	CCGGAACCACAATCAGAG
<i>OLFML2B</i>	S113L	TCACCTCAGGCTCGT
<i>OLFML2B</i>	T149A	aTTGCCTTGTTTCATAGCTCTCC
<i>OLFML2B</i>	N339M	CCTGATGACCAGTGTCCACC
<i>OLFML2B</i>	R347W	CCTGATGACCAGTGTCCACC
<i>OLFML2B</i>	R353H	GTGCTGTGTCCCTGA
<i>OLFML2B</i>	A436S	aatccATGCCTCCCTGGGAGACACTG
<i>OLFML2B</i>	P504L	cGTGTTCTGGGTGGTC
<i>OLFML2B</i>	G515E	ATGGGCGGAATGAAG
<i>OLFML2B</i>	R527Q	GACCCCCTGGCCAAGGATGAGC
<i>OLFML2B</i>	Y557H	CGCTGGAGCAATTCC
<i>OLFML2B</i>	T610I	gcgGCATGACGTGGCCTACGAGGAGCCA
<i>OLFML2B</i>	A623T	CCATTCTCGTCCACAG
<i>OLFML2B</i>	G674D	CAGATGACGAAGCAGTTG

Diese Primer wurden für die Genotypisierung der 14 mit MALDI bestätigten nichtsynonymen *OLFML2B*-Varianten mit MAF $\leq 0.1\%$ verwendet, die in Patienten aufgefunden wurden. Wiedergegeben sind die Extensionsprimer für die hME-Reaktion.

4.7.6 Reinigung der hME-Reaktionsprodukte

Zur Reinigung der erhaltenen Basenextensionsprodukte wurde SpectroCLEAN resin von Sequenom, San Diego, USA, angewendet. Somit können Salzreste (Mg^{2+}) der vorherigen Reaktion entfernt werden. Zunächst wurde 19 μ l dH₂O zu den Basenextensionsprodukten hinzugegeben und anschließend für 3 Minuten zentrifugiert.

Nach der Reinigung wurden die Produkte zusammen mit einer 3-Hydroxypicolinsäure auf eine 384er Platte pipettiert. Hinzugefügt wurde ein Kalibrator aus mehreren bekannten Oligonukleotiden.

Die Daten wurden schließlich durch die Software MASSARRAY-RT (Sequenom, San Diego, USA) ausgewertet.

4.8 Datenauswertung und Statistik

Statistische Auswertungen wurden durchgeführt, um das Spektrum der aufgefundenen Varianten zu charakterisieren und insbesondere um die Assoziation zwischen einzelnen Varianten und arrhythmogenen Erkrankungen zu detektieren.

4.8.1 Gen-basierte Burden-Tests für seltene Varianten

Der Burden-Test als genbasierter Test für die Untersuchung der Assoziation seltener Varianten zwischen dem Fall- und Kontrollkollektiv vergleicht die Anzahl (Last, „Burden“) der von der Referenzsequenz abweichenden Genotypen in den Fällen im Vergleich zu den Kontrollen innerhalb der proteinkodierenden CDS (code determining Sequence) vom Start- bis zum Stoppcodon eines Gens.

Der Burden-Test für seltene und sehr seltene Varianten analysiert unter der Annahme eines dominanten Modells die Anzahl von Personen, die ein seltenes Allel einer seltenen Variante tragen im Fallkollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Er ist ein einseitiger Test und untersucht die Annahme, dass im Fallkollektiv eine höhere Häufigkeit seltener Varianten besteht. Er prüft dabei lediglich den Mittelwert der Häufigkeitsverteilung der Varianten im Vergleich von Fall- zu Kontrollkollektiv, jedoch nicht deren Varianz. Die Signifikanz des Burden-Testes kann entweder numerisch oder durch Permutation ermittelt werden. In unserem Falle wurde die Auswertung mit Hilfe des χ^2 -Testes mit Bestimmung der Odds Ratio vorgenommen. Diese wurden aus den entsprechenden Vierfeldertafeln bestimmt. Alle Konfidenz-Intervalle (CI) sind als 95% Konfidenz-Intervalle angegeben. Sie geben die Reliabilität der Daten an, ein CI von 95% (CI95%) besagt, dass der tatsächliche Wert des Effektschätzers (in diesem Fall des OR) mit 95% Wahrscheinlichkeit innerhalb der Grenzen des Konfidenz-Intervalles liegt. Alle OR wurden auf das seltene Allel bezogen. Bei einer OR von 1 ist der Effekt in beiden Kollektiven gleich groß, ist die OR größer 1, ist das Risiko in der Gruppe mit dem selteneren Allel erhöht, ist die OR kleiner als 1, besteht ein protektiver Effekt, wenn das seltene Allel vorhanden ist.

Zusätzlich zur Analyse aller seltener Varianten in einem Test haben wir die Varianten gemäß ihren Allelfrequenzen in Strata, d.h. in die Gruppen der seltenen ($MAF \leq 1\%$) und der sehr seltenen Varianten ($MAF \leq 0,1\%$) zusammengefasst. Innerhalb jedes Stratums wurde wiederum ein Burden-Test durchgeführt.

4.8.2 Prädiktion der Pathogenität von Proteinvarianten

Zur Prädiktion von aminosäureaustauschenden Missense-Mutationen in Proteinen wurden zwei weit verbreitete in-silico Prädiktionstools für kodierende nicht synonyme SNPs verwendet. SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) und PolyPhen 2 sind Softwares, die eine Vorhersage bezüglich eines Aminosäureaustausches und der Proteinfunktion treffen. Beide basieren auf einem „aligning“ von allen analogen Proteinsequenzen (orthologe wie paraloge) und der Observation der im entsprechenden Kodon vorkommenden bzw. nicht vorkommenden Aminosäuren, gepaart mit einer Vorhersage, ob die nicht vorkommenden toleriert bzw. nicht toleriert werden.

SIFT und PolyPhen 2 unterscheiden zwischen funktionell neutralen und deletierenden Aminosäureaustauschen in verschiedenen Mutationsstudien und den humanen Polymorphismen. Beide Verfahren können zur Hilfe bei Assoziationsstudien herangezogen werden wie auch zur Prioritätensetzung für weitere Studien. PolyPhen 2 ermittelt einen probabilistischen „classifier“ basierend auf einem Algorithmus [Adzhubei et al., 2010]. SIFT sagt nach einem ähnlichen Verfahren für jeden Aminosäureaustausch vorher, ob eine Variante beobachtet oder nicht beobachtet sowie ob sie toleriert oder nicht toleriert wird [NG, 2003].

5 ERGEBNISSE

Um einen pathophysiologischen Einfluss des *OLFML2B*-Gens zu charakterisieren, war es wichtig, Patienten mit potentiell autosomal-dominanten oder -rezessiven Repolarisationsstörungen auf seltene Varianten (Mutationen) im Gen *OLFML2B* zu untersuchen.

Insgesamt wurden 641 Patienten auf Varianten in *OLFML2B* analysiert. Darunter waren 125 Patienten mit Long-QT Syndrom, 329 Patienten mit medikamenteninduziertem LQTS, 93 Fälle mit plötzlichem Kindstod (SIDS) und 94 Fälle mit plötzlichem Herztod (SCD).

Als Kontrollen wurden zum einen 702 Probanden aus dem KORA S4 Kollektiv mit methodisch identischen Verfahren auf dieselbe Weise untersucht. Zusätzlich wurden die in der öffentlich zugänglichen Datenbank (Exome Variant Server, EVS) veröffentlichten Varianten von 4300 Personen aus der Normalbevölkerung des US-amerikanischen Exome-Sequencing-Projects (ESP) in-silico analysiert. Diese sind mit Hilfe von Next-Generation-Sequencing aller Exone („whole-Exome-Sequencing“, WES), also mit einer anderen Methode, die eine höhere Sensitivität als die von uns verwendete aufweist, gefunden worden.

Bei diesen Personen handelt es sich nicht nur um gesunde, sondern auch um betroffene Personen, die jedoch überwiegend komplexe Erkrankungen aufweisen (z.B. Myokardinfarkt, Diabetes mellitus Typ II). Da in dieser Arbeit nur nach monogenen Mutationen im *OLFML2B*-Gen gesucht wird, kann das ESP-Kollektiv als Kontrolle verwendet werden.

5.1 Aufgefundene Varianten im *OLFML2B*-Gen

In den acht Exons des *OLFML2B*-Gens wurden in den untersuchten Kaukasiern insgesamt 86 Nukleinsäure-Varianten aufgefunden, die jeweils mindestens einmal in den Patienten mit Long-QT Syndrom, mit medikamenteninduziertem LQTS (diLQT), mit plötzlichem Kindstod (SIDS) oder mit plötzlichem Herztod (SCD) gesehen wurden oder im KORA S4 Kollektiv bzw. den kaukasischen Personen aus der Normalbevölkerung aus der öffentlich zugänglichen Datenbank des US-amerikanischen Exome-Sequencing-Projects vorkamen.

Die Art der Varianten (Mutationstyp in Bezug auf des Protein) in Abhängigkeit von ihrer minoren Allelfrequenz (MAF) gibt Tabelle 23 an.

Tabelle 23: Aufgefundene Varianten im *OLFML2B*-Gen

Typ der Variante	Alle Varianten	Nur häufige Varianten	Seltene und sehr seltene Varianten	Nur seltene Varianten	Nur sehr seltene Varianten
<i>MAF</i>	alle	>1%	≤1%	>0.1%, ≤1%	≤0.1%
Anzahl	86 (100%)	3 (100%)	83 (100%)	5 (100%)	78 (100%)
missense	58 (67,4%)	3 (100%)	55 (66,3%)	5 (100%)	50 (64,1%)
synonym	27 (31,4%)	0 (0%)	27 (32,5%)	0 (0%)	27 (34,6%)
stop-gained	1 (1,2%)	0 (0%)	1 (1,2%)	0 (0%)	1 (1,3%)
stop-lost	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Die Tabelle gibt eine Übersicht über alle 86 insgesamt im *OLFML2B*-Gen gefundenen Varianten und ihren Mutationstyp (Missense-, synonym, stop-gained, stop-lost) in Abhängigkeit von der minoren Allelfrequenz (*MAF*) an.

Zu Stratifizierung der Varianten nach ihrer minoren Allelfrequenz (*MAF*) wurden zwei Grenzwerte gewählt: seltene Varianten ($MAF \leq 1\%$) sowie sehr seltene Varianten ($MAF \leq 0,1\%$). Dieses wurde immer in Bezug auf ihre Häufigkeit in den beiden Kontrollkollektiven bewertet, d.h. eine Variante musste in beiden Kontrollkollektiven diese Schwelle nicht überschreiten, um entsprechend klassifiziert zu werden. Die Allelfrequenz in den Patientenkollektiven spielte für diese Einteilung keine Rolle.

Da der in dieser Arbeit gewählte Ansatz nur auf solche Varianten ausgerichtet ist, die unter einem monogenen Krankheitsmodell für die Erkrankung der jeweiligen Patienten kausal sind und die üblicherweise als „Mutationen“ bezeichnet werden, ist die Auswertung in dieser Arbeit auf seltene und sehr seltene Varianten beschränkt. Daher sind im Folgenden alle Auswertungen nur im Bezug auf Varianten mit einer $MAF \leq 1\%$ (siehe z.B. Tabelle 27) bzw. $MAF \leq 0,1\%$ (siehe z.B. Tabelle 28) wiedergegeben. Diese Ausschlußgrenzen wurden gewählt, da häufige Varianten mit Allelfrequenzen >1% als populationsgenetisch fixierte Polymorphismen angesehen werden, das heißt, diese gehen durch den genetischen Populationsdrift üblicherweise aus der Population nicht verloren und verursachen auch keine monogenen Erkrankungen.

Tabelle 24: Aufgefundene Varianten im *OLFML2B*-Gen

Sämtliche Varianten in Exons	Gesamt (n=5643)	Patienten (n=641)	KORA (n=702)	ESP (n=4300)
Sämtliche Varianten	86 (100%)	32 (100%)	12 (100%)	66 (100%)
<i>Sämtliche Varianten mit MAF ≤1%</i>	<i>83 (100%)</i>	<i>29 (100%)</i>	<i>9 (100%)</i>	<i>63 (100%)</i>
<i>Sämtliche Varianten mit MAF ≤0,1%</i>	<i>78 (100%)</i>	<i>25 (100%)</i>	<i>7 (100%)</i>	<i>58 (100%)</i>
Missense-Varianten	58 (67,2%)	26 (81,3%)	9 (75,0%)	42 (63,6%)
<i>Missense-Varianten mit MAF ≤1%</i>	<i>55 (66,3%)</i>	<i>23 (79,3%)</i>	<i>6 (66,7%)</i>	<i>39 (61,9%)</i>
<i>Missense-Varianten mit MAF ≤0,1%</i>	<i>50 (64,1%)</i>	<i>19 (76,0%)</i>	<i>4 (57,1%)</i>	<i>34 (58,6%)</i>
Synonyme Varianten	27 (31,4%)	6 (18,9%)	3 (25,0%)	23 (34,8%)
<i>Synonyme Varianten mit MAF ≤1%</i>	<i>27 (32,5%)</i>	<i>6 (20,7%)</i>	<i>3 (33,3%)</i>	<i>23 (36,5%)</i>
<i>Synonyme Varianten mit MAF ≤0,1%</i>	<i>27 (34,6%)</i>	<i>6 (24,0%)</i>	<i>3 (42,9%)</i>	<i>23 (39,7%)</i>
Nonsense-Varianten	1 (1,2%)	0	0	1 (1,5%)
<i>Nonsense-Varianten mit MAF ≤1%</i>	<i>1 (1,2%)</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>1 (1,6%)</i>
<i>Nonsense-Varianten mit MAF ≤0,1%</i>	<i>1 (1,3%)</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>1 (1,7%)</i>
Verlust des Stoppcodons	0	0	0	0
<i>Verlust des Stoppcodons mit MAF ≤1%</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Verlust des Stoppcodons mit MAF ≤0,1%</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die verschiedenen im *OLFML2B*-Gen gefundenen Varianten und ihren Mutationstyp (Missense-, synonym, stop-gained, stop-lost) in Abhängigkeit von der minoren Allelfrequenz (MAF) und dem untersuchten Kollektiv an. Die Prozentzahlen beziehen sich immer auf alle Varianten der jeweiligen MAF-Kategorie.

Die folgende Tabelle gibt eine nach der Position im *OLFML2B* Protein geordnete Übersicht über alle 86 untersuchten häufigen, seltenen und sehr seltenen Varianten an:

Tabelle 25: Liste aller 86 untersuchten Varianten in diesem Projekt

Mutation	rs	cDNA Position	cDNA Allel	Mutationstyp	MAF (%) in Patienten	MAF (%) in KORA	MAF (%) in EVS	Conservation Score PhastCons	Conservation Score GERP	Polyphen
L7L	-	21	C/T	synonym	0	0	0.012	0.001	-6.3	unknown
Y10C	rs12130792	29	T/C	Missense-	7.176	7.692	7.535	0.02	-0.65	benign
A12S	rs146578225	34	A/C	Missense-	0.078	0	0	0.02	-0.65	benign
A18A	-	54	A/G	synonym	0	0	0.012	0.219	1.75	unknown
S22R	-	64	G/T	Missense-	0	0	0.012	0	1.2	possibly-damaging
T26R	-	77	C/G	Missense-	0	0	0.012	0.004	4.04	possibly-damaging
A34A	-	102	T/C	synonym	0	0	0.012	0.783	4.05	unknown
R86W	rs149753373	256	A/G	Missense-	0.312	0	0.163	1	3.51	probably-damaging
T109T	rs41271961	327	A/G	synonym	0	0	0.081	0.972	1.66	unknown
S112S	rs149440032	336	T/C	synonym	0	0	0.058	0.003	-9.28	unknown
S113L	rs142774017	338	A/G	Missense-	0.078	0	0.012	0.924	4.64	possibly-damaging
S123L	-	368	A/G	Missense-	0	0	0.012	0.021	4.64	probably-damaging
E129K	rs140595006	385	T/C	Missense-	0	0	0.012	0.988	4.64	probably-damaging
T149A	rs145092080	445	C/T	Missense-	0.156	0	0.105	1	5.38	possibly-damaging
A157A	rs139471213	471	T/C	synonym	0	0	0.012	0.797	-8.16	unknown
K165R	-	494	C/T	Missense-	0	0	0.012	1	5.38	probably-damaging
V184V	rs148759747	552	T/C	synonym	0	0	0.012	0.976	-5.04	unknown
E193E	-	579	C/T	synonym	0	0	0.012	0.241	-2.23	unknown
R203X	-	607	A/G	stop-gained	0	0	0.012	0.886	4.74	unknown
T204T	rs140833279	612	A/G	synonym	0	0	0.023	0.018	-9.48	unknown
N213S	rs34095099	638	C/T	Missense-	0	0	0.558	0.974	4.74	possibly-damaging
R226C	rs144952465	676	A/G	Missense-	0	0	0.070	0.99	3.81	probably-damaging
A234A	rs139906358	702	A/T	synonym	0	0	0.012	0	-9.29	unknown
A236insA	Patscreening	708	C/A	Missense-	0.156	0	0	.	.	.
E244Q	-	730	G/C	Missense-	0	0	0.012	0.995	5.09	probably-damaging
R245W	-	733	A/G	Missense-	0	0	0.012	0.9	2.06	probably-damaging
R245Q	rs144547147	734	T/C	Missense-	0	0	0.012	0.883	3.22	probably-damaging
E251E	-	753	A/G	synonym	0	0	0.012	0.995	-4.11	unknown
L269P	rs36108216	806	G/A	Missense-	0.624	0.4986	0.721	0.077	5.22	benign
R288W	rs141480556	862	A/G	Missense-	0	0	0.023	0.774	4.28	probably-damaging
P289L	rs4656343	866	G/A	Missense-	4.836	4.558	5.744	1	4.28	probably-damaging
R297G	-	889	C/G	Missense-	0	0	0.023	1	4.28	probably-damaging
L335L	rs144399009	1005	A/G	synonym	0	0	0.047	0.985	-1.52	unknown
N339M	Patscreening	1017	.	Missense-	0.078	0	0	.	.	.
R347Q	rs76125299	1040	C/T	Missense-	1.092	0.997	0.023	.	.	.
R347W	Patscreening	1041	.	Missense-	0.156	0	0	.	.	.
R353L	rs142806829	1058	A/C	Missense-	0	0	0.012	0	-7.83	benign
R353H	Patscreening	1059	.	Missense-	0.078	0	0	.	.	.
D363N	-	1087	T/C	Missense-	0	0	0.012	0	2.45	benign
N365N	rs34123330	1095	A/G	synonym	0.234	0	0	0	-2.03	unknown
R367W	rs77628593	1099	A/G	Missense-	0.078	0	0	0	2.53	benign
S372Y	rs36123211	1115	T/G	Missense-	0	0	0.012	0.001	2.22	benign
S379L	rs145215702	1136	A/G	Missense-	0	0.0712	0.047	0.013	4.39	benign
S384R	rs35444039	1152	C/G	Missense-	0.078	0	0.035	0	-1.17	benign
I385I	rs143079784	1155	A/G	synonym	0	0	0.012	0	1.39	unknown
S399L	rs140535952	1196	A/G	Missense-	0	0	0.012	0.005	2.71	benign
D403V	rs146002791	1208	A/T	Missense-	0	0	0.012	0	2.21	benign
Q411H	rs116670170	1233	A/C	Missense-	0.468	0.214	0.244	0.025	1.14	benign

Mutation	rs	cDNA Position	cDNA Allel	Mutationstyp	MAF (%) in Patienten	MAF (%) in KORA	MAF (%) in EVS	Conservation Score PhastCons	Conservation Score GERP	Polyphen
A436S	Patscreening	1308	.	Missense-	0.078	0	0	.	.	.
T456I	rs142619447	1367	A/G	Missense-	0.078	0	0	0.002	2.25	possibly-damaging
D460H	rs141122488	1378	G/C	Missense-	0	0	0.012	0.648	3.59	possibly-damaging
S461S	-	1383	T/C	synonym	0	0	0.023	0	-5.38	unknown
W470R	rs2499836	1408	A/G	Missense-	32.917	30.627	31.919	0.011	3.99	benign
I487N	-	1460	T/A	Missense-	0	0	0.012	1	4.52	probably-damaging
R493R	-	1479	T/C	synonym	0	0	0.012	1	4.31	unknown
L498V	-	1492	C/G	Missense-	0	0	0.012	1	4.31	probably-damaging
P504L	Patscreening	1512	.	Missense-	0.0780	0	0	.	.	unknown
P504P	rs145934709	1512	A/C	synonym	0	0	0.012	0.148	-8.63	unknown
T506T	Patscreening	1518	.	Missense-	0	0.0712	0.000	.	.	Unknown
R512W	-	1534	A/G	Missense-	0	0	0.012	0.995	2.18	probably-damaging
R512Q	rs141945594	1535	T/C	Missense-	0	0	0.012	0.998	3.4	probably-damaging
G515E	Patscreening	1544	.	Missense-	0.078	0	0.000	.	.	.
R527Q	Patscreening	1581	.	Missense-	0.078	0	0.000	.	.	.
Y529Y	rs138789156	1587	A/G	synonym	0.390	0.0712	0.023	0.641	-5.69	unknown
G536S	Patscreening	1608	.	Missense-	0.234	0	0.000	.	.	.
N544N	-	1632	A/G	synonym	0.078	0.0712	0.070	1	2.27	unknown
Y557H	-	1669	G/A	Missense-	0.078	0.0712	0.023	1	5.17	probably-damaging
P560P	-	1680	T/C	synonym	0	0	0.012	0.908	-7.9	unknown
G565R	rs147887951	1693	G/C	Missense-	0	0	0.012	0.968	4.26	probably-damaging
H568Y	rs144617718	1702	A/G	Missense-	0	0	0.023	0.921	5.17	probably-damaging
R579R	rs142854687	1737	A/G	synonym	0	0	0.012	0.968	-5.61	unknown
E608V	Patscreening	1824	.	Missense-	0	0.0712	0	.	.	.
T610I	Patscreening	1830	.	Missense-	0.156	0	0	.	.	.
A623T	Patscreening	1869	.	Missense-	0.078	0	0	.	.	.
A635V	rs150749230	1904	A/G	Missense-	0	0	0.012	1	5.36	probably-damaging
N652S	rs141191222	1955	C/T	Missense-	0	0	0.035	0.977	5.36	probably-damaging
R665H	-	1994	T/C	Missense-	0	0	0.023	1	5.36	possibly-damaging
R669W	-	2005	A/G	Missense-	0	0	0.012	0.846	3.39	probably-damaging
Y673Y	Patscreening	2019	.	synonym	0.156	0	0	.	.	.
G674D	Patscreening	2022	.	Missense-	0.078	0	0	.	.	.
G674G	Patscreening	2022	.	synonym	0.156	0	0	.	.	.
C676Y	-	2027	T/C	Missense-	0	0	0.023	1	5.36	probably-damaging
I679I	rs146890055	2037	A/G	synonym	0	0	0.012	1	3.49	unknown
Y698C	-	2093	C/T	Missense-	0	0	0.012	0.999	5.36	probably-damaging
Y698Y	rs150437510	2094	A/G	synonym	0.078	0	0.023	0.992	-2.37	unknown
F714F	-	2142	A/G	synonym	0	0	0.023	0.997	-0.59	unknown

Die Liste gibt alle 86 häufigen, seltenen und sehr seltenen Varianten wieder, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Die Varianten stammen sowohl aus Patienten als auch aus den Kontrollkollektiven KORA und ESP. Varianten, die nur in Patienten gefunden wurden und im ESP-Projekt nicht vorkamen, sind mit „Patscreening“ an Stelle der rs-Nummer gekennzeichnet. Die Nummerierung der cDNA-Position erfolgte anhand der humanen cDNA-Referenz-Sequenz NM015441 und der Proteinreferenz-Sequenz NP056256.

Die aufgefundenen Varianten wurden mit statistischen Verfahren der Populationsgenetik (Häufigkeitsanalyse) ausgewertet. Dabei wird eine Häufigkeitsanalyse bezogen auf die Anzahl der

Patienten, die diese Mutationen tragen, durchgeführt (Kapitel 5.3). Diese Auswertung ist statistisch aussagekräftig und genetisch epidemiologisch für die Krankheitsverursachung akzeptiert.

5.2 Häufigkeitsanalyse aller Varianten zwischen KORA- und ESP- Kontrollen

Der Vergleich der Häufigkeit aufgefundener seltener und sehr seltener Varianten zwischen den beiden Kontrollkollektiven ist nötig, da beide nicht mit derselben Technologie auf Mutationsträger gescreent wurden. Daher ergeben sich Unterschiede in der Detektionswahrscheinlichkeit und –häufigkeit von Mutationen zwischen den beiden Kontrollkollektiven (s. Tabelle 26). Während das KORA-Kollektiv mit derselben Kombination aus Schmelzkurvenanalyse, Sequenzierung und MALDI-TOF auf Mutationen analysiert wurde, wie die Patienten, kam im ESP-Projekt (Datenbankanalyse) Next-Generation Sequencing Technologie zum Einsatz, im Genauen Whole-Exome-Sequencing.

Tabelle 26: Detektionswahrscheinlichkeit sämtlicher seltener und sehr seltener Varianten, die im *OLFML2B*-Gen identifiziert wurden

Anzahl der Kontrollen mit seltenen und sehr seltenen exonischen Varianten	KORA (n=702)	EVS (n=4300)
Träger sämtlicher Varianten (MAF ≤1%)	16 (2,3%)	254 (5,9%)
• KORA vs. ESP	OR = 0,37 (95%CI 0,22-0,62) p=8,0x10⁻⁵	
Träger sämtlicher Varianten (MAF ≤0,1%)	6 (0,9%)	100 (2,3%)
• KORA vs. ESP	OR = 0,36 (95%CI 0,16-0,83) p=1,2x10⁻²	
Träger von Missense-Varianten (MAF ≤1%)	13 (1,9%)	207 (4,8%)
• KORA vs. ESP	OR = 0,37 (95%CI 0,21-0,66) p=3,9x10⁻⁴	
Träger von Missense-Varianten (MAF ≤0,1%)	3 (0,4%)	53 (1,2%)
• KORA vs. ESP	OR = 0,34 (95%CI 0,11-1,10) p=6,0x10⁻²	
Träger von Synonymen Varianten (MAF ≤1%)	3 (0,4%)	46 (1,1%)
• KORA vs. ESP	OR = 0,40 (95%CI 0,12-1,28) p=1,1x10⁻¹	
Träger von Synonymen Varianten (MAF ≤0,1%)	3 (0,4%)	46 (1,1%)
• KORA vs. ESP	OR = 0,40 (95%CI 0,12-1,28) p=1,1x10⁻¹	
Träger von Nonsense-Varianten	0	1 (0,02%)
Träger mit Verlust des Stoppcodons	0	0 (0%)

*Häufigkeitsanalyse sämtlicher seltener und sehr seltene Varianten, die im *OLFML2B*-Gen identifiziert wurden.*

Ebenso führten wir diese Analyse ausschließlich für die sehr seltenen Varianten (MAF ≤0,1%) durch, um für alle Variantentypen und Allelfrequenzbereiche die Detektionswahrscheinlichkeit unserer Screeningmethode im Vergleich zur Whole-Exome-Sequenzierung (WES) beim ESP-Projekt abschätzen zu können. Die Analyse zeigt, daß methodenbedingt die Detektionswahrscheinlichkeit von Varianten allgemein im ESP-Projekt höher war. Unter der Annahme, daß das beim ESP-Projekt verwendete WES als Goldstandard anzunehmen ist, ergeben sich für die von uns verwendete Methodik aus Schmelzkurvenanalyse, Sequenzierung und MALDI-TOF sehr einheitliche Detektionswahrscheinlichkeiten, die für alle Variantentypen und Allelfrequenzbereiche zwischen 34% und 40% liegen.

Unsere Ergebnisse bezüglich der Mutationshäufigkeit im *OLFML2B*-Gen im Vergleich zwischen den Patienten und dem ESP-Kollektiv, müssen demzufolge für diese Unterschiede in den Detektionsraten adjustiert werden, da in dem Patientenkollektiv wie beim KORA-Kollektiv von einer um den Faktor 0,34- bis 0,40-fach verminderten Detektionswahrscheinlichkeit für seltene und sehr seltene Genvarianten auszugehen ist.

5.3 Häufigkeitsanalyse der aufgefundenen Varianten bezogen auf die Patienten

Ein statistischer Krankheitszusammenhang zwischen Genvarianten und bestimmten Erkrankungen wird dadurch hergestellt, dass sich die Häufigkeit ätiologisch relevanter Varianten in Patienten- und Kontrollkollektiven signifikant unterscheidet. Aus diesem Grunde führten wir eine solche Assoziationsanalyse für die aufgefundenen Varianten durch.

In den folgenden Tabellen ist die Anzahl und die relative Häufigkeit von Trägern entsprechender Mutationen wiedergegeben. Da bei den seltenen und sehr seltenen Varianten homozygote Träger nahezu nicht beobachtet wurden, werden die homozygoten und die heterozygoten Träger gemeinsam dargestellt und analysiert. Das entspricht in der humangenetischen Terminologie einem dominanten Krankheitsmodell.

Tabelle 27: Darstellung der Anzahl der Träger sämtlicher seltener Varianten (MAF ≤1%), die im OLFML2B-Gen identifiziert wurden

Anzahl der Patienten mit exonischen Varianten mit MAF ≤1%	Patienten (n=641)	KORA (n=702)	ESP (n=4300)
Träger sämtlicher Varianten	57 (8,9%)	16 (2,3%)	254 (5,9%)
• Pat. vs. KORA	OR = 4,18 (95%CI 2,38-7,37) p=9,3x10⁻⁸		
• Pat. vs. ESP	OR = 1,55 (95%CI 1,15-2,10) p=3,7x10⁻³		
Träger von Missense-Varianten	43 (6,7%)	13 (1,6%)	207 (4,8%)
• Pat. vs. KORA	OR = 3.81 (95%CI 2,03-7,16) p=8,7x10⁻⁶		
• Pat. vs. ESP	OR = 1,42 (95%CI 1,01-2,00) p=4,1x10⁻²		
Träger von Synonymen Varianten	14 (2,2%)	3 (0,4%)	46 (1,1%)
• Pat. vs. KORA	OR = 5,20 (95%CI 1,49-18,19) p=4,0x10⁻³		
• Pat. vs. ESP	OR = 2,06 (95%CI 1,13-3,78) p=1,6x10⁻²		
Träger von Nonsense-Varianten	0	0	1 (0,02%)
Träger mit Verlust des Stoppcodons	0	0	0

In dieser Tabelle sind die Träger sämtlicher seltener Varianten (MAF ≤1%) aufgezeigt, die im OLFML2B-Gen gefunden wurden.

Da wir nur 5 seltene Varianten mit einer MAF zwischen 1% und 0.1% aufgefunden haben, werden diese aufgrund ihrer geringen Anzahl nicht alleine analysiert, sondern nur als Gesamtheit aller Varianten mit MAF ≤1%, d.h. die seltenen und sehr seltenen Varianten gemeinsam.

Tabelle 28: Darstellung der Anzahl der Träger sämtlicher sehr seltener Varianten (MAF ≤0.1%), die im OLFML2B-Gen identifiziert wurden

Anzahl der Patienten mit exonischen Varianten mit MAF ≤0,1%	Patienten (n=641)	KORA (n=702)	ESP (n=4300)
Träger sämtlicher Varianten	37 (5,8%)	6 (0,9%)	100 (2,3%)
• Pat. vs. KORA	OR = 7,11 (95%CI 2,98-16,95) p=3,2x10⁻⁷		
• Pat. vs. ESP	OR = 2,57 (95%CI 1,75-3,79) p=7,1x10⁻⁷		
Träger von Missense-Varianten	23 (3,6%)	3 (0,4%)	53 (1,2%)
• Pat. vs. KORA	OR = 8,67 (95%CI 2,59-29,02) p=2,7x10⁻⁵		
• Pat. vs. ESP	OR = 2,98 (95%CI 1,81-4,90) p=6,2x10⁻⁶		
Träger von Synonymen Varianten	14 (2,2%)	3 (0,4%)	46 (1,1%)
• Pat. vs. KORA	OR = 5,20 (95%CI 1,49-18,19) p=4,0x10⁻³		
• Pat. vs. ESP	OR = 2,06 (95%CI 1,13-3,78) p=1,6x10⁻²		
Träger von Nonsense-Varianten	0	0	1 (0,02%)
Träger mit Verlust des Stoppcodons	0	0	0

In dieser Tabelle sind die Träger sämtlicher sehr seltener Varianten (MAF ≤0.1%) aufgezeigt, die im OLFML2B-Gen gefunden wurden.

5.4 Differenzierte Häufigkeitsanalyse in Patienten nach Art der Erkrankung

Zur Auswertung der Assoziation mit den jeweiligen Erkrankungen werden die Patienten nach den vier untersuchten Patientenkollektiven stratifiziert dargestellt. Die Auswertung wird auf die nichtsynonymen und synonymen Varianten beschränkt, da nur diese in den Patienten aufgefunden wurden.

Bei der differenzierten Häufigkeitsanalyse stratifiziert nach der Art der vier untersuchten Erkrankungen ergibt sich das folgende Bild:

Tabelle 29: Assoziation seltener Varianten im *OLFML2B*-Gen mit dem Erkrankungsstatus

MAF ≤1%	alle Patienten (n=641)	LQT (n=125)	diLQT (n=329)	SIDS (n=93)	SCD (n=94)	KORA (n=702)	ESP (n=4300)
Träger sämtlicher Varianten	57	11	38	6	2	16	254
• Pat. vs. KORA	OR = 4,18 (2,38-7,37) p=9,3x10 ⁻⁸	OR = 4,14 (1,87-9,14) p=1,6x10 ⁻⁴	OR = 5,60 (3,07-10,20) p=4,7x10 ⁻¹⁰	OR = 2,96 (1,13-7,76) p=2,1x10 ⁻²	OR = 0,93 (0,21-4,12) p=9,3x10 ⁻¹	-	-
• Pat. vs. ESP	OR = 1,55 (1,15-2,10) p=3,7x10 ⁻³	OR = 1,54 (0,82-2,98) p=1,8x10 ⁻¹	OR = 2,08 (1,45-2,98) p=4,9x10 ⁻⁵	OR = 1,10 (0,48-2,54) p=8,3x10 ⁻¹	OR = 0,35 (0,08-1,41) p=1,2x10 ⁻¹	-	-
Träger von Missense-Varianten	43	8	29	5	1	13	207
• Pat. vs. KORA	OR = 3,81 (2,03-7,16) p=8,7x10 ⁻⁶	OR = 3,62 (1,46-8,93) p=2,9x10 ⁻³	OR = 5,12 (2,63-9,99) p=1,4x10 ⁻⁷	OR = 3,01 (1,05-8,65) p=3,2x10 ⁻²	OR = 0,57 (0,07-4,41) p=5,9x10 ⁻¹	-	-
• Pat. vs. ESP	OR = 1,42 (1,01-2,00) p=4,1x10 ⁻²	OR = 1,35 (0,65-2,80) p=4,2x10 ⁻¹	OR = 1,91 (1,27-2,87) p=1,5x10 ⁻³	OR = 1,12 (0,45-2,80) p=8,0x10 ⁻¹	OR = 0,21 (0,03-1,53) p=9,0x10 ⁻²	-	-
Träger von synonymen Varianten	14	3	9	1	1	3	46
• Pat. vs. KORA	OR = 5,20 (1,49-18,19) p=4,0x10 ⁻³	OR = 5,73 (1,14-28,72) p=1,7x10 ⁻²	OR = 6,55 (1,76-24,37) p=1,3x10 ⁻³	OR = 2,53 (0,26-24,60) p=4,1x10 ⁻¹	OR = 2,51 (0,26-24,34) p=4,1x10 ⁻¹	-	-
• Pat. vs. ESP	OR = 2,06 (1,13-3,78) p=1,6x10 ⁻²	OR = 2,27 (0,70-7,41) p=1,6x10 ⁻¹	OR = 2,60 (1,26-5,36) p=7,2x10 ⁻³	OR = 1,01 (0,14-7,37) p=9,9x10 ⁻¹	OR = 0,99 (0,14-7,29) p=9,9x10 ⁻¹	-	-

Assoziation seltener Varianten (MAF ≤1%), die im *OLFML2B*-Gen identifiziert wurden mit dem Erkrankungsstatus in der Gesamtzahl der Patienten sowie stratifiziert in den vier Krankheitskollektiven

Bei der Limitierung der Auswertung auf die sehr seltenen Varianten wird folgende Assoziationsanalyse erhalten.

Tabelle 30: Assoziation sehr seltener Varianten im *OLFML2B*-Gen mit dem Erkrankungsstatus

MAF ≤0,1%	alle Patienten (n=641)	LQT (n=125)	diLQT (n=329)	SIDS (n=93)	SCD (n=94)	KORA (n=702)	ESP (n=4300)
Träger sämtlicher Varianten	37	9	22	5	1	6	100
• Pat. vs. KORA	OR = 7,11 (2,98-16,95) p=3,2x10 ⁻⁷	OR = 9,00 (3,14-25,76) p=9,7x10 ⁻⁷	OR = 8,31 (3,34-20,71) p=7,9x10 ⁻⁸	OR = 6,59 (1,97-22,04) p=4,5x10 ⁻⁴	OR = 1,25 (0,15-10,48) p=8,4x10 ⁻¹	-	-
• Pat. vs. ESP	OR = 2,57 (1,75-3,79) p=7,1x10 ⁻⁷	OR = 3,26 (1,61-6,61) p=5,3x10 ⁻⁴	OR = 3,01 (1,87-4,84) p=1,9x10 ⁻⁶	OR = 2,39 (0,95-6,00) p=5,7x10 ⁻²	OR = 0,45 (0,06-3,27) p=4,2x10 ⁻¹	-	-
Träger von Missense-Varianten	23	6	13	4	0	3	53
• Pat. vs. KORA	OR = 8,67 (2,59-29,02) p=2,7x10 ⁻⁵	OR = 11,75 (2,90-47,62) p=1,4x10 ⁻⁵	OR = 9,59 (2,71-33,87) p=2,0x10 ⁻⁵	OR = 10,47 (2,31-47,55) p=1,6x10 ⁻⁴	OR = 0,08 (0,01-88,38) p=5,4x10 ⁻¹	-	-
• Pat. vs. ESP	OR = 2,98 (1,81-4,90) p=6,2x10 ⁻⁶	OR = 4,04 (1,70-9,59) p=6,1x10 ⁻⁴	OR = 3,30 (1,78-6,11) p=6,1x10 ⁻⁵	OR = 3,60 (1,28-10,17) p=9,7x10 ⁻³	OR = 0,02 (0,01-97,40) p=2,8x10 ⁻¹	-	-
Träger von synonymen Varianten	14	3	9	1	1	3	46
• Pat. vs. KORA	OR = 5,20 (1,49-18,19) p=4,0x10 ⁻³	OR = 5,73 (1,14-28,72) p=1,7x10 ⁻²	OR = 6,55 (1,76-24,37) p=1,3x10 ⁻³	OR = 2,53 (0,26-24,60) p=4,1x10 ⁻¹	OR = 2,51 (0,26-24,34) p=4,1x10 ⁻¹	-	-
• Pat. vs. ESP	OR = 2,06 (1,13-3,78) p=1,6x10 ⁻²	OR = 2,27 (0,70-7,41) p=1,6x10 ⁻¹	OR = 2,60 (1,26-5,36) p=7,2x10 ⁻³	OR = 1,01 (0,14-7,37) p=9,9x10 ⁻¹	OR = 0,99 (0,14-7,29) p=9,9x10 ⁻¹	-	-

Assoziation sehr seltener Varianten (MAF ≤0,1%), die im *OLFML2B*-Gen identifiziert wurden mit dem Erkrankungsstatus in der Gesamtzahl der Patienten sowie stratifiziert in den vier Krankheitskollektiven

5.5 Identifikation einzelner kausaler Mutationen im *OLFML2B*-Gen

Anschließend fokussierten wir uns auf solche Varianten, die eine hohe Wahrscheinlichkeit aufwiesen für die Krankheit des mutationstragenden Patienten kausal zu sein. Diese identifizierten wir aus den insgesamt 86 Varianten nach den folgenden Kriterien:

- Sehr seltene Variante (MAF $\leq 0,1\%$ in beiden Kontrollkollektiven KORA und ESP)
- Nichtsynonyme Variante
- Vorkommen in mindestens einem Patienten.

Diesen Kriterien entsprachen insgesamt 14 Varianten.

Diese 14 Varianten wurden mit Hilfe der MALDI-TOF MS in allen Patienten und allen Kontrollen zur Bestätigung der Sequenzierbefunde und zur Detektion von in der Schmelzkurvenanalyse und Sequenzierung eventuell noch nicht entdeckter Mutationsträger reagentypisiert. Die sich dabei ergebenden Allelfrequenzen sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 31: Liste der 14 Missense-Mutationen mit hoher Wahrscheinlichkeit für Krankheitskausalität

MUT	cDNA Pos	Allel	Exon	Diagnose	MAF in Patienten (%)	MAF in KORA (%)	MAF in EVS (%)	Polyphen 2 Prediction	Polyphen2 Prediction Score	SIFT Prediction	SIFT Prediction Grade
A12S	34	A/C	Ex01	diLQT	0.0780	0	0.0538	benign	0	tolerated - not observed	0.1
S113L	338	A/G	Ex02	diLQT	0.0780	0	0.0154	possibly-damaging	0.867	not tolerated	1
T149A	445	C/T	Ex03	diLQT	0.1560	0	0.0692	possibly-damaging	0.934	tolerated - observed	0
N339M	1017	C/T	Ex06	diLQT	0.0780	0	0	possibly-damaging	0.465	not tolerated	1
R347W	1041	T/A	Ex06	diLQT	0.1560	0	0	probably-damaging	0.968	not tolerated	1
R353H	1058	G/A	Ex06	LQT	0.0780	0	0	benign	0.004	tolerated - not observed	0.1
A436S	1336	T/G	Ex06	LQT	0.0780	0	0	benign	0	tolerated - observed	0
P504L	1511	C/T	Ex07	SIDS	0.0780	0	0	probably-damaging	1	not tolerated	1
G515E	1544	A/G	Ex07	SIDS	0.0780	0	0	probably-damaging	1	not tolerated	1
R527Q	1580	A/G	Ex07	LQT	0.0780	0	0	possibly-damaging	0.593	not tolerated	1
Y557H	1669	G/A	Ex07	SIDS	0.0780	0.0712	0.0154	possibly-damaging	0.835	not tolerated	1
T610I	1829	C/T	Ex08	diLQT	0.1560	0	0	probably-damaging	0.999	not tolerated	1
A623T	1869	G/A	Ex08	diLQT	0.0780	0	0	probably-damaging	1	not tolerated	1
G674D	2022	G/A	Ex08	LQT	0.0780	0	0	probably-damaging	1	not tolerated	1

Diese 14 Mutationen haben eine hohe Wahrscheinlichkeit für Krankheitskausalität, da sie nichtsynonym sind und in beiden Kontrollkollektiven nur sehr selten (MAF ≤0,1%) oder gar nicht vorkommen.

Bis auf drei der 14 Mutationen - T149A, R347W, T610I - , die jeweils zweimal beobachtet wurden, wurden alle übrigen 11 Varianten nur einmal in jeweils einem Patienten im heterozygoten Zustand

beobachtet entsprechend einer MAF von 0,0780% über alle Patienten. Nur vier der 14 Varianten wurden auch in Personen aus der Normalbevölkerung gesehen, zehn der 14 Varianten kamen in keinem der beiden Kontrollkollektive vor. Alle der 14 Varianten waren im Patientenkollektiven häufiger anzutreffen als in den Kontrollkollektiven.

Von diesen 14 sehr seltenen heterozygoten nichtsynonymen Missense-Mutationen wurden folgende Anzahlen in den verschiedenen Krankheitskollektiven beobachtet:

- 4 in Patienten mit LQT
- 7 in Patienten mit diLQT
- 3 in Patienten mit SIDS

In den Patienten mit SCD wurde keine einzige entsprechende Mutation gefunden.

5.6 Charakterisierung einzelner kausaler Mutationen bei SIDS

Im Folgenden wurde der Schwerpunkt auf die Varianten bei SIDS-Patienten gelegt, da die parallel in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte proteinbiochemische Untersuchung dieser Varianten einen starken Einfluss auf die Unterdrückung ihrer extrazellulären Sekretion ergab. Dieser Einfluss war bei drei mutanten OLFML2B-Proteinen dominant-negativ gegenüber dem Wildtyp. Daher könnte die Nichtsekretion des OLFML2B-Proteins potentiell einen SIDS-Phänotyp in einem heterozygoten Mutationsträger nach einem autosomal-dominanten Krankheitsmodell erklären.

Die drei sehr seltenen heterozygoten nichtsynonymen Missense-Mutationen, die in SIDS-Patienten identifiziert wurden, sind hier wiedergegeben:

1. P504L (c.1511 C>T) – nicht in Kontrollen
2. G515E (c.1544 G>A) – nicht in Kontrollen
3. Y557H (c.1669 T>C) – MAF=0.071% in KORA; MAF=0.015% in ESP

Zwei von diesen wurden gar nicht in der Normalbevölkerung gesehen, die Variante Y557H kam mit einer geringen MAF auch in den Kontrollkollektiven vor.

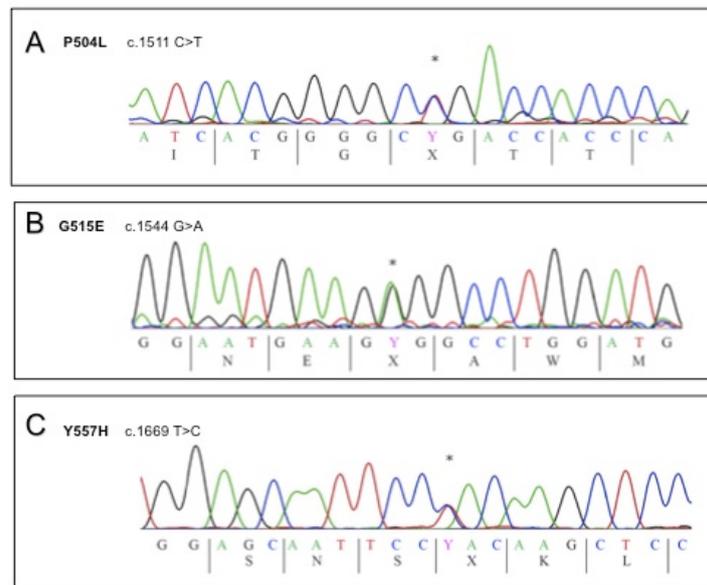


Abbildung 22: Nachweis der Mutationen: P504L, G515E und Y557H.

Gezeigt sind die Sequenzelektropherogramme, die an den markierten Stellen () Heterozygotien aufweisen.*

Retrospektiv wurden die vorhandenen Untersuchungsbefunde der drei Kinder mit den gefundenen Mutationen ausgewertet.

Das kardiale Gewicht war in allen drei Fällen normwertig. Es zeigten sich keine Zeichen von Perikarditis oder Myokarditis. Alle verstarben innerhalb des ersten Lebensjahres. Zwei Kinder wurden morgens tot im Bett liegend aufgefunden, das dritte Kind verstarb am Abend.

Bei allen drei Kindern waren keine kardialen oder auch andere Vorerkrankungen bekannt, die Entwicklung war regelrecht.

Während der Autopsie wurde bei allen drei Kindern eine perikardiale Flüssigkeitsansammlung gesehen und bei zwei Kindern epikardiale petechiale Blutungen festgestellt. Alle drei Kinder hatten zusätzlich inflammatorische Erscheinungen.

Tabelle 32: Klinische Daten zu den 3 gefundenen Mutationen im *OLFML2B*-Gen

Kerndaten	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Mutation	P504L	G515E	Y557H
Geschlecht	männlich	weiblich	weiblich
Todesalter	37 Tage	10 Monate	8 Monate
Auffinden	im Schlaf am Morgen im eigenen Bett in Bauchlage gestorben	starb am Abend in Bauchlage	starb in der Nacht, in Bauchlage aufgefunden am Morgen
Grösse	54 cm	75 cm	71 cm
Gewicht	4140 g	8100 g	7300 g
Herzgewicht	24 g	38 g	34 g
Zeichen einer Perikarditis/Myokarditis	keine	keine	keine
andere kardiale Auffälligkeiten	1-2 ml perkardiale Flüssigkeit, epikardiale petechiale Einblutungen	2 ml perkardiale Flüssigkeit	1 ml perkardiale Flüssigkeit, epikardiale petechiale Einblutungen
weitere Diagnosen	Pyelonephritis, Sialadenitis	Tracheitis	beginnende Zeichen einer Pneumonie

*Dargestellt ist die retrospektive Analyse der klinische Daten der SIDS-Patienten mit den drei gefundenen sehr seltenen nichtsynonymen Mutationen im *OLFML2B*-Gen.*

6 DISKUSSION

Nach dem Auffinden der Assoziation vom QT-Intervall mit dem *OLFML2B-NOS1AP*-Genort, war es das Ziel dieser Arbeit, durch Mutationsanalyse Patienten mit starken Repolarisationsstörungen für seltene Mutationen im *OLFML2B*-Gen zu untersuchen ($MAF \leq 1\%$). Dadurch sollte ein humangenetisch-frequentistischer Beweis für die pathophysiologische Relevanz des *OLFML2B*-Gens geführt werden und gleichzeitig die funktionelle Charakterisierung der aufgefundenen Varianten vorbereitet werden.

6.1 Prävalenz von *OLFML2B*-Varianten

Insgesamt fanden wir im 750 Aminosäure langen *OLFML2B*-Gen in 5.343 Personen 86 exonische Varianten. Das bedeutet, dass 11,5% der Codons von einer Mutation betroffen sind. Darunter waren 58 Missense-Mutationen und eine Nonsense-Mutation. Das entspricht insgesamt einer Rate von 7,9% aller Aminosäurereste, die von Proteinsequenz-verändernden Varianten betroffen waren. Das ist für ein humanes Protein ein überdurchschnittlicher Wert, der zeigt, dass im Vergleich zu anderen Genen das *OLFML2B*-Gen ein schwach konserviertes Gen ist. Das erkennt man ebenfalls daran, dass 66 von allen 86 aufgefundenen Varianten auch im ESP-Kollektiv vorkamen, das überwiegend aus Personen der Normalbevölkerung besteht.

6.2 *OLFML2B*-Varianten und Evolution

Die Ka/Ks-Ratio beschreibt in einer Gensequenz das Verhältnis von nichtsynonymen (Ka) zu synonymen (Ks) Varianten bzw. Mutationen. Es ermöglicht für dieses Gen eine Unterscheidung zwischen positiver oder Darwinscher Selektion ($Ka/Ks > 1$), stabilisierender („purifying“) Selektion ($Ka/Ks < 1$) bzw. neutraler oder balancierender Selektion ($Ka/Ks = 1$). Aus unseren Daten ergibt sich für *OLFML2B* ein signifikant erhöhtes Ka/Ks-Ratio: $Ka/Ks = 59/27 = 2,19$ ($p = 0,013$). Auch bei Beschränkung auf seltene ($MAF \leq 1\%$) Varianten bleibt das Ka/Ks-Ratio signifikant erhöht: $Ka/Ks(\leq 1\%) = 56/27 = 2,07$ ($p = 0,022$). Bezogen auf die sehr seltenen Varianten liegt es bei $Ka/Ks(\leq 0,1\%) = 51/27 = 1,89$ ($p = 0,052$).

Auch bei der ausschließlichen Analyse einzelner Kollektive ergeben sich deutlich positive Werte für das Ka/Ks-Ratio in allen Kollektiven. Für Patienten resultiert ein $Ka/Ks = 26/6 = 4,33$ ($p = 0,0085$), für das KORA-Kontrollkollektiv $Ka/Ks = 9/3 = 3,00$ ($p = 0,21$) und für das ESP-Kontrollkollektiv ein $Ka/Ks = 43/23 = 1,87$ ($p = 0,044$). Alle diese Daten sind ein deutlicher Hinweis, dass das *OLFML2B*-Gen nicht nur sehr variantenreich ist, sondern dass dies in der Evolution auch einer positiven Darwinschen Selektion unterliegt.

6.3 Sensitivität der verwendeten Mutationsscreeningmethode

Die in dieser Arbeit verwendete Schmelzkurvenanalyse war vor der Einführung der Next Generation Sequencing Technologien (NGS) ein verbreitetes kostengünstiges Verfahren zur Hochdurchsatzdetektion unbekannter Varianten und Mutationen in Individuen. Sie ist mittlerweile nahezu vollständig durch NGS-Verfahren wie Whole Genome Sequencing (WGS), Whole Exome Sequencing (WES) oder Gene Panel Sequencing (Partial Exome Sequencing, PES) abgelöst worden. Moderne NGS-Methoden sind ebenso hochdurchsatzfähig, erlauben aber die Variantendetektion in einem Schritt, d.h. eine anschließende Sanger-Sequenzierung erübrigt sich in den allermeisten Fällen. Ausserdem ist die Sensitivität und die Spezifität der Detektion mit NGS deutlich höher als die in ihrer Sensitivität limitierte Schmelzkurvenanalyse.

Aus diesem Grund ist es notwendig, die Sensitivität der Schmelzkurvenanalyse im Vergleich zum NGS-Verfahren abzuschätzen. Das ist im Rahmen dieser Arbeit dadurch möglich, dass zwei Kontrollkollektive untersucht wurden. Zum Einen das KORA-Kollektiv (n=702), das mit der Schmelzkurvenanalyse untersucht wurde, zum Anderen wurde das ESP-Kollektiv als weiteres Kontrollkollektiv verwendet. Dieses ist mit WES für sämtliche exonische Varianten untersucht worden. Wie aus dem Ergebnisteil zu entnehmen ist, ergab der direkte Vergleich zwischen KORA und ESP eine im Mittel über alle Varianten auf 37% (CI: 22%-62%, $p=8,0 \times 10^{-5}$) reduzierte Sensitivität der Variantendetektion in KORA (Tabelle 26). Für verschiedene Arten von Varianten schwankte die Sensitivität zwischen 34% und 40%.

Da das KORA-Kollektiv mit demselben Verfahren und damit mutmaßlich auch mit derselben Sensitivität auf Varianten untersucht wurde wie die Patientenkollektive, ist der direkte Vergleich dieser Kollektive statthaft. Beim Vergleich von Patientenkollektiven mit dem ESP-Kontrollkollektiv ist immer die im Ersteren reduzierte Sensitivität der Variantendetektion gegenüber ESP zu berücksichtigen.

6.4 Assoziation der *OLFML2B*-Varianten mit arrhythmogenen Erkrankungen

Die in dieser Arbeit neu aufgefundenen seltenen und sehr seltenen Varianten sind statistisch signifikant häufiger bei Patienten als in den Kontrollkollektiven anzutreffen. Die Assoziation im Burden-Test für die seltenen Varianten (MAF $\leq 1\%$, Tabelle 27) zeigt für alle Patienten zusammen ein OR von 4,18 (2,38-7,37) $p=9,3 \times 10^{-8}$ im Vergleich zum KORA-Kollektiv und ein OR von 1,55 (1,15-2,10) $p=3,7 \times 10^{-3}$ im Vergleich zum ESP-Kollektiv. Unter Bewertung der Tatsache, dass die Sensitivität der Mutationsdetektion im Fallkollektiv nur 37% des ESP-Kollektives ausmachte, würde sich im Falle von 100% Mutationsdetektion auch für den Vergleich mit dem ESP-Kollektiv ein OR von 4,19 ergeben.

Bei der Beschränkung der Analyse auf die sehr seltenen Varianten (MAF $\leq 0,1\%$, Tabelle 28) zeigt die Assoziation im Burden-Test für alle Patienten zusammen ein OR von 7,11 (2,98-16,95)

$p=3,2 \times 10^{-7}$ im Vergleich zum KORA-Kollektiv und ein OR von 2,57 (1,75-3,79) $p=7,1 \times 10^{-7}$ im Vergleich zum ESP-Kollektiv. Das sind deutlich höhere Werte als für alle Varianten mit $MAF \leq 1\%$ zusammen, was nahelegt, dass die Varianten mit Allelfrequenzen unter 0,1% eine größere Bedeutung für die Krankheitsverursachung haben. Das ist in Übereinstimmung mit der populationsgenetisch belegten Hypothese, dass die Allelfrequenz pathogener Genvarianten invers korreliert ist mit ihrer Allelfrequenz.

Der anschließend durchgeführte Vergleich der nichtsynonymen Missense- und Nonsense-Varianten mit den synonymen Varianten sollte im Falle einer krankheitskausalen Bedeutung eine stärkere Assoziation bei den nichtsynonymen Varianten belegen, da ausschließlich diese unter einem autosomal-dominanten Krankheitsmodell als kausal angesehen werden. Synonymen Varianten wird dagegen zumindest in Eukaryonten zumeist keine phänotypische Bedeutung beigemessen. Ausgenommen sind dabei nur die Fälle, wo synonyme Varianten das Splicen oder die Regulation der Expressionslevel beeinträchtigen können, aber auch diese sind so selten, daß sie die statistische Betrachtung nicht wesentlich verzerren.

In dieser Arbeit zeigen die sehr seltenen nichtsynonymen Varianten ($MAF \leq 0,1\%$) genau dieses vorhergesagte Bild, s. Tabelle 27+28. Sie sind im Burden-Test stärker mit dem Erkrankungsstatus assoziiert (OR=8,67 (2,59-29,02) $p=2,7 \times 10^{-7}$ vs. KORA, OR=2,98 (1,81-4,90) $p=6,2 \times 10^{-6}$ vs. ESP) als die synonymen Varianten (OR=5,20 (1,49-18,19) $p=4,0 \times 10^{-3}$ vs. KORA, OR=2,06 (1,13-3,78) $p=1,6 \times 10^{-2}$ vs. ESP). Die seltenen nichtsynonymen Varianten ($MAF \leq 1\%$) verhalten sich jedoch entgegen der Erwartung. Sie sind im Burden-Test schwächer mit dem Erkrankungsstatus assoziiert (OR=3,81 (2,03-7,16) $p=8,7 \times 10^{-6}$ vs. KORA, OR=1,42 (1,01-2,00) $p=4,1 \times 10^{-2}$ vs. ESP) als die synonymen Varianten (OR=5,20 (1,49-18,19) $p=4,0 \times 10^{-3}$ vs. KORA, OR=2,06 (1,13-3,78) $p=1,6 \times 10^{-2}$ vs. ESP).

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer besonderen Bedeutung der sehr seltenen Varianten ($MAF \leq 0,1\%$) für die Auslösung arrhythmogener Erkrankungen unter einem monogenen autosomal-dominanten Erkrankungsmodell. Auch dieser Befund stärkt die Hypothese einer kausalen Beteiligung. Aufgrund theoretischer evolutionsbedingter populationsgenetischer Überlegungen haben seltene Varianten ein höheres Potential krankheitsdisponierend zu wirken [Wright, 1984]. Dass sich genau dieser erwartete Befund hier bestätigt, unterstreicht die Annahme einer kausalen Beteiligung der aufgefundenen Varianten, und zwar insbesondere für die sehr seltenen Varianten.

6.5 Assoziation der *OLFML2B*-Varianten mit einzelnen arrhythmogenen Erkrankungen

Bei der differenzierten Betrachtung der vier untersuchten proarrhythmogenen Erkrankungen gegenüber den Kontrollkollektiven setzt sich der oben gewonnene Eindruck der signifikanten Assoziation fort (Tabelle 29 und 30).

Die drei Kollektive mit LQT (OR=9,00, $p=9,7 \times 10^{-7}$ vs. KORA), diLQT (OR=8,31, $p=7,9 \times 10^{-8}$ vs. KORA) und SIDS (OR=6,59, $p=4,5 \times 10^{-4}$ vs. KORA) zeigen eine deutliche Assoziation im Burden-Test während das SCD-Kollektiv keine Assoziation zeigt (OR=1,25, $p=8,4 \times 10^{-1}$ vs. KORA). Bei allen drei assoziierten Kollektiven ist die Assoziation von nichtsynonymen Missense-Varianten LQT (OR=11,75, $p=1,4 \times 10^{-5}$ vs. KORA), diLQT (OR=9,59, $p=2,0 \times 10^{-5}$ vs. KORA) und SIDS (OR=10,47, $p=1,6 \times 10^{-4}$ vs. KORA) deutlich höher als die von synonymen Varianten LQT (OR=5,73, $p=1,7 \times 10^{-2}$ vs. KORA), diLQT (OR=6,55, $p=1,3 \times 10^{-3}$ vs. KORA) und SIDS (OR=2,53, $p=4,1 \times 10^{-1}$ vs. KORA).

Auch diese Befunde sind im Einklang mit dem monogen autosomal-dominanten Erkrankungsmodell durch sehr seltene nichtsynonyme Varianten und unterstützen die Hypothese, dass diese Varianten die Funktion des OLFML2B-Proteins signifikant beeinträchtigen und dadurch Repolarisationsstörungen verursachen können, die zu ventrikulären Arrhythmien und zum plötzlichen Herztod führen können.

Unter allen vier Kollektiven ist nur für das Erwachsenenkollektiv mit plötzlichem Herztod (SCD) keine signifikante Assoziation mit den OLFML2B-Varianten nachweisbar, und zwar weder für die Varianten mit $MAF \leq 1\%$ noch für die mit $MAF \leq 0,1\%$. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass die Arrhythmie in diesen Patienten in weitaus der Mehrzahl der Fälle nicht primär durch den Repolarisationsprozeß, sondern vielmehr ischämisch bedingt ist, d.h. durch eine koronare Herzerkrankung mit oder ohne Myokardinfarkt bzw. durch ein akutes Koronarsyndrom getriggert wird. Diese Ätiologie wird in ca. 80-90% der adulten Fälle von akutem Herztod als verantwortlich angesehen.

In Übereinstimmung mit dieser Sichtweise spielen primär myokardiale proarrhythmische Prädispositionen, wie sie mutmaßlich von *OLFML2B*-Mutationen verursacht werden, eine signifikante Rolle bei LQT, diLQT und SIDS, während ihnen bei SCD keine signifikante Bedeutung zukommt.

6.6 Auswahl von 14 *OLFML2B*-Varianten mit statistischen Merkmalen

Aus der Gesamtzahl der 86 Varianten identifizierten wir 14 nichtsynonyme Varianten, die in den untersuchten Patienten vorkamen und in den Kontrollen eine $MAF \leq 0,1\%$ hatten (s. Tabelle 31). Diese Varianten zeigten einige auffällige statistische Merkmale:

- (1) Nur vier der 14 Varianten wurden auch in mindestens einer Person aus der Normalbevölkerung gesehen, zehn der 14 Varianten kamen in keinem der beiden Kontrollkollektive vor;
- (2) Bis auf drei Mutationen (T149A, R347W, T610I) wurden sie alle nur einmal in einem Patienten beobachtet;
- (3) Alle Varianten, die auch in den Kontrollkollektiven beobachtet wurden, hatten dort eine niedrigere Allelfrequenz als in den Patienten;

- (4) Die nicht tolerierten Mutationen waren deutlich in der C-terminalen Domäne des OLFML2B-Proteins geclustert, d.h. hinter dem Codon 480. Die Mutationen in dieser Region des Proteins wiesen auch geringere Allelfrequenzen in den beiden Kontrollkollektiven auf. Von sieben C-terminalen Mutationen wird nur eine (Y557H) in der Normalbevölkerung gesehen, von den sieben N-terminalen waren es drei Mutationen (A12S, S113L und T149A).

6.7 Weiterführende funktionelle Untersuchungen von drei *OLFML2B*-Varianten

Im Rahmen von weiterführenden funktionellen Untersuchungen, die nicht Teil dieser Doktorarbeit, sondern einer parallel dazu durchgeführten naturwissenschaftlichen Dissertation waren, wurde die Funktion dieser ausgewählten 14 Mutationen genauer untersucht [Schäfer, 2010].

Insbesondere fokussierten sich diese funktionellen Untersuchungen auf die drei in SIDS-Patienten gefundenen Varianten P504L, G515E und Y557H. Diese drei Mutationen befinden sich alle in der β -Faltblattstruktur des OLFML2B-Proteins (AA 435-730). Alle drei Lokalisationen sind hochkonserviert (8/8) in acht Orthologen von 8 verschiedenen Spezies.

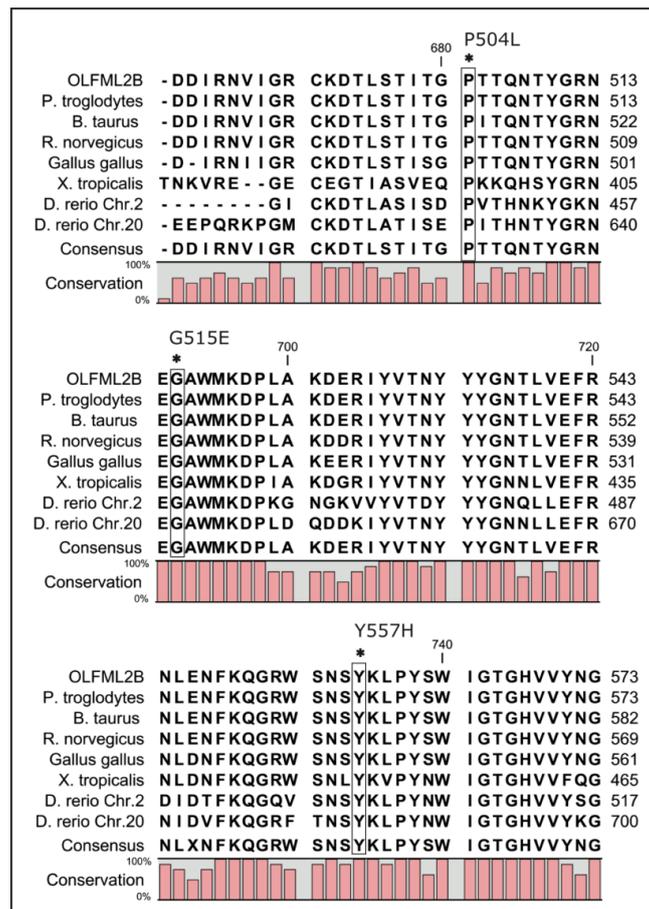


Abbildung 23: Alignment von acht orthologen OLFML2B-Proteinen aus acht verschiedenen Spezies.

Dargestellt sind acht verschiedene orthologe OLFML2B-Proteine in verschiedenen Spezies, die im Rahmen von funktionellen Untersuchungen weiter analysiert wurden. Alle drei gefundenen Lokalisationen (P504L, G515E und Y557H) sind hoch konserviert [Schäfer, 2010].

6.7.1 Zellbiologische Versuche zur Sekretion des OLFML2B-Proteins

Analysen der Zellbiologie des OLFML2B mit Westernblot und Immunfluoreszenz in der parallel durchgeführten naturwissenschaftlichen Dissertation ergaben folgende Ergebnisse [Schäfer, 2010].:

- (A) Durch Immunoblotanalysen wurde die endogene Expression des OLFML2B-Proteins im menschlichen Herzen, Skelettmuskel sowie im Gehirn gezeigt.
- (B) OLFML2B kolokalisiert mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) Marker PDI.
- (C) Durch Immunopräzipitation von OLFML2B aus der extrazellulären Matrix (ECM) konnte gezeigt werden, dass OLFML2B an die ECM bindet.

Die Analyse der 14 ausgewählten Varianten auf eine Suppression der Sekretion, wie es für Mutationen im *MYOC*-Gen beim Primären Offenwinkelglaukom bereits beschrieben wurde, zeigte folgende Ergebnisse [Schäfer, 2010]. Die Versuche wurden an HEK 293T-Zellen durchgeführt. Als positive

Kontrolle für die Sekretion wurde neben dem Wildtyp die häufige Variante P289L (rs4656343, MAF= 5,7%) verwendet.

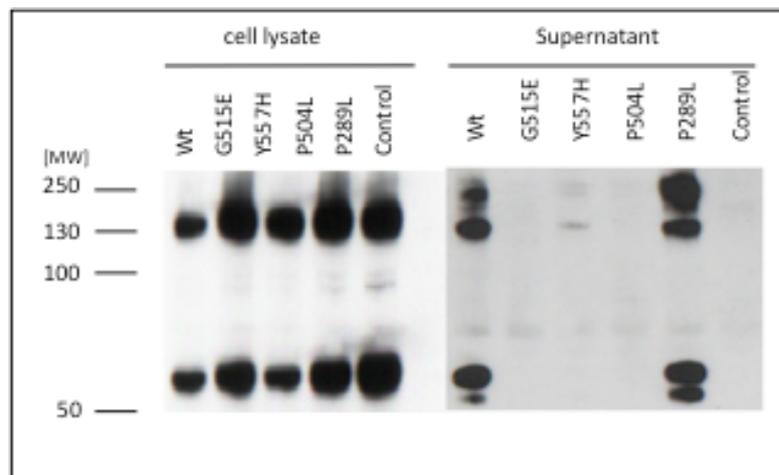


Abbildung 24: Westernblotanalyse zur Expression und Sekretion des Wildtyps und der Mutanten des OLFML2B-Proteins.

HEK293-Zelllinien wurden transient mit verschiedenen cDNA-Klonen von OLFML2B transfiziert. Intrazellulär (cell lysate) zeigt der Westernblot eine gleichmäßige Proteinexpression aller Klone. Im Überstand wird nur bei den Wildtyp- und den P289L-transfizierten Zellen OLFML2B-Protein gefunden. Die drei pathogenen SIDS-assoziierten Varianten P504L, G515E und Y557H verhindern die Sekretion des Proteins aus den erfolgreich transfizierten Zellen. (55kD: N-terminales Fragment von OLFML2B; 140kD: glykosyliertes Monomer von OLFML2B; 210kD: glykosyliertes Dimer von OLFML2B) [Schäfer, 2010].

Alle drei bei SIDS gefundenen Varianten führen zu einer im Vergleich zum Wildtyp stark eingeschränkten Sekretion (P504L, G515E, Y557H). Dabei kann ER-Stress durch Akkumulation der mutanten OLFML2B-Proteine im endoplasmatischen Retikulum jedoch nicht nachgewiesen werden.

Alle drei Varianten unterdrücken die Sekretion sowohl von mutantern als auch vom Wildtyp-Protein auch in der Koexpression (Mutante: Wildtyp; 1:1 oder auch 1:2). Dieser dominant-negative Effekt geht auf die Bildung von Dimeren und höheren Oligomeren des OLFML2B zurück und unterstützt ebenfalls die Hypothese, dass diese Varianten kausal zu den betreffenden Krankheiten beitragen.

Zwei dieser drei Varianten (P504L, G515E) werden in keinem der beiden Kontrollkollektive gesehen. Dadurch sind diese Varianten als quasi private Varianten anzusehen, die im Sinne einer monogenen Erkrankung als krankheitsverursachend gelten können. Lediglich die Variante Y557H wird einmal in einem heterozygoten Träger im KORA-Kollektiv (n=702) und einmal in einem heterozygoten Träger im ESP-Kollektiv (n=4.300) beobachtet. Aufgrund dieser äußerst niedrigen Allelfrequenz, die nicht signifikant höher liegt als die Prävalenz von SIDS in der Normalbevölkerung

(0.3/1.000), kann auch diese Variante als potentiell kausal im Sinne einer monogenen Erkrankung angesehen werden.

Krankheitsvarianten können mit sehr niedriger Allelfrequenz in der Allgemeinbevölkerung durchaus vorkommen, da auch in der Normalbevölkerung Patienten mit seltenen Erkrankungen vorkommen und da auch die aus seltenen Varianten resultierenden Krankheitsmanifestationen nicht in allen Trägern identisch sein müssen. Im Sonderfall kann es sogar bei einzelnen Mutationsträgern zu gar keiner Krankheitsmanifestation kommen (Nonpenetranz). In den Studien zu seltenen Varianten, die das ESP-Projekt als Kontrolle nutzen, wird üblicherweise bei 0 bis 2 Allelen in dem Kollektiv von 4.300 Personen noch davon ausgegangen, dass es sich bei der betreffenden Variante um eine Krankheitsvariante einer Mendelschen Erkrankung handeln kann. Bei drei oder mehr Beobachtungen gilt die Variante als so häufig, dass sie üblicherweise nicht mehr unter einem monogenen Erkrankungsmodell als krankheitsverursachend gilt.

6.7.2 Zellulär-elektrophysiologische Untersuchungen des OLFML2B-Proteins

Ebenso wurden die mutanten OLFML2B-Proteine in *Xenopus laevis* Oozyten elektrophysiologisch untersucht, um zu beweisen, dass diese Varianten zu Veränderungen in Ionenströmen im Herzen führen können [Schäfer, 2010]. Diese Arbeit wurde durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Guiscard Seebom in Münster (vormals Bochum).

Es konnte gezeigt werden, dass das OLFML2B-Protein spezifisch den stromabhängigen Kaliumkanal KCNH2/Kv11.1 hemmt, der für den I_{Kr} -Strom verantwortlich ist. I_{Kr} und I_{Ks} (durch KCNQ1) haben den größten Einfluss auf die repolarisierenden $K(+)$ -Ströme am Ende der Diastole. Durch mRNA des OLFML2B-Wildtyps wurde der Strom im I_{Kr} im Vergleich zur Wasserinjektion deutlich reduziert. Durch die Injektion von OLFML2B-mutanter mRNA konnte für alle drei Mutationen (P504L, G515E und Y557H) eine noch deutliche Reduktion des I_{Kr} -Stroms festgestellt werden. Diese fiel beim wt-OLFML2B deutlich geringer aus, die Reaktion war aber gegenüber der Kontrolle noch signifikant.

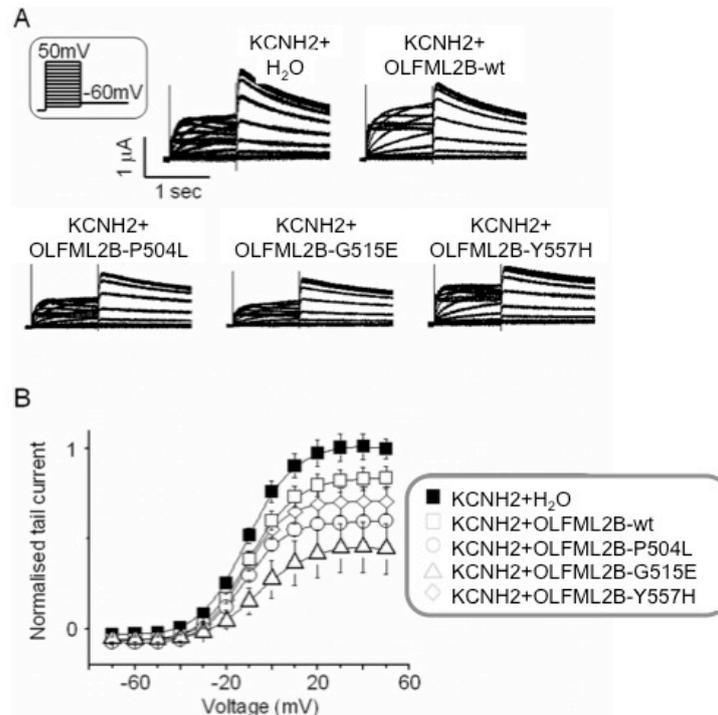


Abbildung 25: Elektrophysiologische Untersuchungen in Xenopusoocyten des OLFML2B-Wildtyps, darunter der häufigen Variante P289L und der drei gefundenen Mutationen.

Funktionelle Untersuchungen in Xenopusoocyten des OLFML2B-Wildtyps zeigten, dass der OLFML2B-Wildtyp den I_{Kr} -Strom schwach reduziert ($-7.7 \pm 4.66\%$), während die SIDS-Mutanten P504L ($-33.0 \pm 3.2\%$), G515E ($-49.9 \pm 11.4\%$) und Y557H ($-17.6 \pm 6.4\%$) den Strom extrem stark weiter abschwächen [Schäfer, 2010].

Der OLFML2B-Wildtyp reduziert den I_{Kr} -Strom schwach ($-7.7 \pm 4.66\%$) während die SIDS-Mutanten P504L ($-33.0 \pm 3.2\%$), G515E ($-49.9 \pm 11.4\%$) und Y557H ($-17.6 \pm 6.4\%$) den Strom extrem stark weiter abschwächen. Auch diese funktionellen Daten unterstützen die Hypothese eines kausalen Einflusses des OLFML2B-Proteins auf die kardiale Repolarisation und legen nahe, dass dieser Effekt über den von KCNH2/Kv11.1 getragenen I_{Kr} -Strom vermittelt wird.

6.8 Implikation für die Familie der Olfactomedine und ihrer Proteine

Unsere Ergebnisse bezüglich des OLFML2B-Gens und dessen Einfluss auf die kardiale Repolarisation sind neu. Wir beschreiben seine Funktion als eine lokal synthetisierte und sezernierte Komponente in der extrazellulären Membran der Herzmuskelzelle und charakterisierten die aufgefundenen Varianten mit bioinformatischen und statistisch-epidemiologischen Methoden.

Eine ähnliche Pathophysiologie (Störung der Funktion des Ziliarmuskels und Suppression der Proteinsekretion) wurde für die paralogen Gene *Myocilin* (MYOC) und *Olfactomedin 2* (Noelin, OLFM2), die beide ebenfalls aus der Familie der Olfactomedine stammen, in Bezug auf das monogene primäre Offenwinkelglaukom (POAG) festgestellt. Das POAG ist eine autosomal-dominant vererbte

Form des Glaukoms, das für 2% aller Glaukomfälle verantwortlich ist [Kwon et al., 2009]. Beim POAG kommt es durch dominant-negative Mutationen im *MYOC*- oder im *OLFM2*-Gen zu Strukturveränderungen der Proteine, die Sekretion wird verhindert, und es folgt eine intrazelluläre Akkumulation [Caballero et al., 2001], [Joe et al., 2003]. So wie die gefundenen Mutationen im *OLFML2B*-Gen, sind die krankheitsverursachenden *MYOC*- und *OLFM2*-Mutationen überwiegend am C-Terminus des Proteins in der Olfactomedin-Domäne lokalisiert. Es kommt beim POAG zu einer Korrelation zwischen mutationsbedingt verringerter Sekretion und stärkerer Phänotypmanifestation. Eine Über- oder Unterexpression des Wildtyp-Proteins führt dagegen zu keinem Glaukom [Vollrath et al., 2006]. Es wird angenommen, dass das mutierte nicht sezernierte Protein mit der Kontraktion des Ziliarmuskels interferiert, was wiederum zu einer Augeninnendruckerhöhung und der Entwicklung eines Glaukoms führt. Es bleibt offen, ob spannungsabhängige Ionenkanäle in die Pathophysiologie des *MYOC*- und *OLFM2*-mutationsinduzierten POAG Einfluss haben.

6.9 Implikationen für SIDS

In früheren Studien wurde gezeigt, dass eine Prädisposition für SIDS in Assoziation mit kardialen Repolarisationsstörungen steht. Dies gilt nicht nur für Patienten, die bereits an SIDS verstorben sind, sondern auch für ihre Familienmitglieder aufgrund von monogenen Mutationen in spannungsabhängigen Kationenkanälen [Schwartz et al., 1998].

Die gleichen Mutationen findet man in 50-72% der Fälle mit monogenem Long-QT Syndrom [Tester et al., 2005b] und bis zu 40% bei Patienten mit medikamenten-induziertem Long-QT Syndrom [Napolitano et al., 2005]. Monogene Arrhythmiesyndrome werden meist durch Mutationen in den Untereinheiten von Ionenkanälen gefunden, die eine Funktion in Bezug auf die Öffnung der Kanäle, teils aber auch regulatorische Funktionen, haben [Napolitano et al., 2005], [Ackerman, 1998] oder in die räumliche Aufteilung der Ionenkanäle involviert sind [Mohler et al., 2003].

Die Möglichkeit, dass seltene Mutationen im *NOS1AP*-Gen zu SIDS führen können, wurde bereits untersucht [Caballero et al., 2001] und in weiteren Untersuchungen aus unserem Labor von 752 Fällen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Mutationen im *NOS1AP*-Gen und SIDS bzw. SCD unter einem monogenen Krankheitsmodell festgestellt werden.

Diese Studie identifiziert einen bisher unentdeckten Pathway, der mutmaßlich in den plötzlichen kardialen Herztod und kardiale Rhythmusstörungen involviert ist. Bisher war das *OLFML2B*-Gen und seine Wirkung auf die kardiale Physiologie völlig unbekannt, so dass im Rahmen dieser Studie ein völlig neues pathophysiologisches Prinzip für genetische Herzerkrankungen beschrieben wird. Unsere Entdeckung einer neuen Proteinklasse, der Olfactomedine, und des *OLFML2B*-Gens als mögliches Krankheitsgen von SIDS, erweitert das Spektrum der monogenen kardialen Krankheitsgene um die Klasse der sezernierten Glykoproteine der Olfactomedinfamilie. In weiteren Studien ist es wichtig, Interaktionspartner des *OLFML2B*-Proteins herauszufinden, mit

denen man diese gestellte Hypothese, dass dieses Protein direkt mit I_{K_r} -Ionenkanälen interagiert und somit den repolarisierenden Kaliumstrom reduziert, belegen und den gesamten Pathway aufklären kann.

6.10 Implikationen für zukünftige genomweite Untersuchungen

In der letzten Dekade sind genomweite Assoziationsstudien (GWAS) eine wichtige wissenschaftliche Methode geworden, um im Genom häufige Varianten zu identifizieren („mapping“), die zu multifaktoriellen Erkrankungen prädisponieren bzw. quantitative Merkmale („Traits“) modulieren.

Obwohl GWAS ein sehr starkes Werkzeug zur Kartierung von genetischen Varianten sind, geben sie methodenbedingt keine Auskunft über die funktionellen Mechanismen, die sich hinter den Assoziationssignalen verbergen. Sie identifizieren nicht einmal das kausale Gen in solchen assoziierten Loci, in denen mehrere potentiell kausale Gene liegen. Fast alle der bereits identifizierten GWAS-Assoziationssignale bedürfen daher einer funktionellen Charakterisierung.

Aufgrund der gegenwärtigen Popularität der GWAS und somit der Menge an Assoziationssignalen sind möglichst systematische und einfach messbare funktionelle weiterführende Untersuchungen notwendig [Han et al., 2009]. Einige Autoren haben sich bereits mit dieser Frage genauer beschäftigt und haben Anforderungen genauer analysiert und Strategien vorgeschlagen, um eine Kausalität der vielen genetischen Variationen herzustellen [Katsanis, 2009]. Dieser Prozess scheint nicht unähnlich den Koch-Henleschen Postulaten zu sein, die sich ebenfalls auf die Beziehung von Infektionskrankheiten und dem Pathogen beziehen [Inglis, 2007].

Damals wurden folgende wichtige Punkte definiert:

- A) Reproduzierbarkeit der Assoziation;
- B) Existenz einer Allelserie an dem genomischen Locus, wo seltene Allele mit gleichen aber auffälligeren Phänotypänderungen assoziiert sind, was die Transition von schwachen Varianten und polygenen bzw. oligogenen Kausalmodellen („sub-mendelian“) zu starken Varianten und monogenen Kausalmodellen aufzeigt [Chan et al., 2009];
- C) Veränderungen auf zellulärer Ebene aufgrund von Umwelteinflüssen, die einen natürlichen Prozess im menschlichen Gewebe, eine Veränderung in der mRNA-Expression, proteomische Veränderungen und funktionelle Veränderungen durchgemacht haben;
- D) Die gleichen Punkte wie unter C nachdem eine transgene Variante ins zelluläre Modell oder Tiermodell eingebaut wurde;
- E) Abschwächung, Veränderung, Abkürzung des involvierten pathophysiologischen Prozesses nach einer spezifischen biomedizinischen Intervention.

Es ist durchaus akzeptiert, dass es keine einzige richtige Methode gibt, um diese Punkte zu erreichen, es hängt viel mehr vom physiologischen Kontext, dem Gen, dem Protein und der zu untersuchenden Variante ab, die sich gegenseitig beeinflussen. Am besten kombiniert man verschiedene Ansätze, die sich teils auch überlappen, um ein möglichst zuverlässiges Ergebnis zu erhalten.

Eine häufige Situation bei GWAS ist, wenn ein assoziierter Locus mehrere potentielle kausale Gene beherbergt. Um die Funktionalität auseinanderzuhalten, kann man alternativ oder zusätzlich die Kausalität nach Option B abwägen.

Am einfachsten ist es das kausale Gen bei monogenen Erkrankungen zu erforschen, wenn es um extreme Phänotypen geht wie zum Beispiel Typ 1 Diabetes. Diese Strategie wurde erfolgreich in der mit Typ 1 Diabetes assoziierten Region Chr. 2q24 angewendet und *IFIH1* als das am ehesten kausale Gen identifiziert [Nejentsev et al., 2009].

6.11 Schlussfolgerung

Im Jahr 2006 wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen häufigen SNP-Varianten in der *OLFML2B/NOS1AP*-Genregion und ihr Einfluss auf das QT-Intervall entdeckt [Arking, 2006]. Durch die genetischen, bioinformatischen und epidemiologisch-statistischen Ergebnisse dieser medizinischen Dissertation wurde die funktionelle Charakterisierung des *OLFML2B-NOS1AP*-Genortes begonnen. Diese Arbeit war mit der Identifikation seltener Mutationen im *OLFML2B*-Gen, die signifikant häufiger in Patienten mit arrhythmogenen Erkrankungen vorkommen, der Grundstein für die in der Folge durchgeführten funktionsanalytischen Untersuchungen.

Diese Arbeit stützt die Schlussfolgerung, dass das *OLFML2B*-Protein an der kardialen Repolarisation und seine seltenen und sehr seltenen Varianten an ihrer genetischen Variabilität beteiligt sind. Damit können *OLFML2B*-Varianten die myokardiale Repolarisationsreserve beeinträchtigen, was in der Folge zu Arrhythmien im Rahmen vom Long-QT Syndrom, diLQT, SIDS und ggf. auch zum plötzlichen Herztod prädisponieren kann.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Herzrhythmusstörungen gewinnen in der westlichen Welt als Todesursache kontinuierlich an Bedeutung. Bis zu 50% aller kardiovaskulär bedingten Todesfälle werden in diesen Ländern durch Kammerflimmern hervorgerufen. Zur Identifizierung neuer Gene, genetischer Varianten und Pathomechanismen, die einen Einfluss auf komplexe, d.h. polygene Erkrankungen ausüben, stehen der medizinischen Forschung als innovative Methode seit der Mitte der letzten Dekade die genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) zur Verfügung. Durch eine solche GWAS-Untersuchung wurde die Region Chr. 1q23.3 als der stärkste quantitative Trait-Locus (QTL) in Bezug auf zwei Gene, das bereits bekanntere *NOS1AP*- und das bisher noch wenig erforschte *OLFML2B*-Gen, beschrieben. Von letzterem wird ein sekretiertes Glykoprotein abgelesen, das ein Bestandteil der kardialen extrazellulären Matrix (ECM) ist. Knockout-Untersuchungen im Zebrafisch bestätigten, dass der Verlust eines jeden der beiden Gene zu Störungen der kardialen Repolarisation und zu kardialer Dilatation führen kann.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in dieser Dissertation bei Patienten mit Veranlagung zu Herzrhythmusstörungen durch Long-QT Syndrom (LQT), medikamenteninduziertem Long-QT Syndrom (drug induced LQT bzw. diLQT), plötzlichem Herztod (sudden cardiac death, SCD) oder plötzlichem Kindstod (sudden infant death syndrome, SIDS) das *OLFML2B*-Gen auf seltene Mutationen untersucht, die die genannten Erkrankungen verursachen bzw. begünstigen können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei den untersuchten Patienten insgesamt 14 potentiell krankheitsauslösende heterozygote Missense-Mutationen innerhalb des *OLFML2B*-Gens identifiziert aus insgesamt 86 aufgefundenen Varianten in allen Kollektiven einschließlich der Kontrollen. Die aufgefundenen Mutationen wurden nicht in der Kontrollgruppe aus der Normalbevölkerung bzw. nur im Rahmen der Häufigkeit der genannten Erkrankungen in der Normalbevölkerung und vier- bis zwölfmal häufiger in den Patientenkollektiven gesehen. Insbesondere wurden in dieser Arbeit drei heterozygote Missense-Varianten bei Kindern mit SIDS gefunden. In Rahmen einer weiteren parallel durchgeführten Dissertation zeigten funktionelle Untersuchungen, dass alle drei Varianten zu einer vollständigen Unterbindung der zellulären Proteinsekretion führen und den Stromfluß durch den repolarisierenden Kaliumkanal $KCNH2$ (I_{Kr}) an der Zelloberfläche beeinflussen. In Zusammenschau dieser Daten kann angenommen werden, dass die aufgefundenen Varianten die Repolarisationsreserve im menschlichen Herzen reduzieren, was wiederum zu einer Prädisposition für plötzlichen Kindstod (SIDS), LQTS und diLQT führen kann.

Übergeordnet tragen die Erkenntnisse dieser Dissertation dazu bei, dass ausgehend von einer genomweiten Assoziationsstudie, ein bisher unbekannter Pathomechanismus für kardiale Arrhythmien gefunden werden kann. Dadurch könnten sich mittelfristig potentiell neue diagnostische und therapeutische Implikationen ergeben.

8 SUMMARY

The number of deaths caused by arrhythmia is increasing in Western countries. Up to 50% of all the cardiovascular deaths in these countries for instance are caused by ventricular fibrillation. To discover novel genetic variants, genes and pathomechanisms influencing the complex polygenic diseases, genome-wide association studies (GWAS) have been utilized as an innovative tool in medical research since the middle of the past decade. Through such an investigation, chromosome 1q23.3 has been identified as the most prominent quantitative trait locus (QTL) related to the electrocardiographic measurement of QT-interval. In this chromosomal region, two genes, the already known *NOSIP*-gene and the so far little explored *OLFML2B*-gene have been identified. Knockout studies in zebrafish confirmed that the loss of any of the two genes can lead to disturbance of the cardiac repolarization and cardiac dilatation.

Based on these findings, patients with predisposition to arrhythmia (long QT syndrome, drug induced LQT), sudden cardiac death (SCD) and sudden infant death syndrome (SIDS) were investigated in this thesis for the presence of rare mutations of the *OLFML2B*-gene associated with the disease or its predisposition. In my work, 14 of 86 identified variants within this gene were found in patients within the defined groups with potential high relevance for phenotype changes. These mutations could be found four to twelve times more frequent in the patient groups than in the general population control group. In particular there were three heterozygous missense-mutations found in children with SIDS. The extended functional studies from another thesis had revealed that these three variants result in a reduction of *OLFML2B* secretion. It had also been shown that the *OLFML2B* protein influences the activity of the voltage-gated potassium channels on the cell surface. Taken together, it can be assumed that the described mutations in this gene can cause a diminishment of the repolarization reserve in cardiac cells leading to SIDS, long QT syndrome and drug induced QT syndrome. The findings show that, by means of GWAS, an entirely new pathomechanism for complex polygenic diseases can be identified with potential implications for diagnosis and therapy.

9 LITERATURVERZEICHNIS

Aarnoudse, A.J., Newton-Cheh, C., de Bakker, P.I., Straus, S.M., Kors, J.A., Hofman, A., Uitterlinden, A.G., Witteman, J.C.Stricker, B.H. (2007). Common NOS1AP variants are associated with a prolonged QTc interval in the Rotterdam Study. *Circulation* 116, 10-16.

Ackerman, M.J. (1998). The long QT syndrome: ion channel diseases of the heart. *Mayo Clin Proc* 73, 250-269.

Ackerman, M.J., Siu, B.L., Sturner, W.Q., Tester, D.J., Valdivia, C.R., Makielski, J.C.Towbin, J.A. (2001). Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome. *JAMA* 286, 2264-2269.

Ackerman, M.J., Tester, D.J.Porter, C.J. (1999). Swimming, a gene-specific arrhythmogenic trigger for inherited long QT syndrome. *Mayo Clin Proc* 74, 1088-1094.

Adam, M.F., Belmouden, A., Binisti, P., Brezin, A.P., Valtot, F., Bechettille, A., Dascotte, J.C., Copin, B., Gomez, L., Chaventre, A., Bach, J.F.Garchon, H.J. (1997). Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet* 6, 2091-2097.

Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S.Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7, 248-249.

Altshuler, D., Daly, M.J.Lander, E.S. (2008). Genetic mapping in human disease. *Science* 322, 881-888.

Alward, W.L., Fingert, J.H., Coote, M.A., Johnson, A.T., Lerner, S.F., Junqua, D., Durcan, F.J., McCartney, P.J., Mackey, D.A., Sheffield, V.C.Stone, E.M. (1998). Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A). *N Engl J Med* 338, 1022-1027.

Alward, W.L., Kwon, Y.H., Khanna, C.L., Johnson, A.T., Hayreh, S.S., Zimmerman, M.B., Narkiewicz, J., Andorf, J.L., Moore, P.A., Fingert, J.H., Sheffield, V.C.Stone, E.M. (2002). Variations in the myocilin gene in patients with open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 120, 1189-1197.

Arking, D.E.Chakravarti, A. (2009). Understanding cardiovascular disease through the lens of genome-wide association studies. *Trends Genet* 25, 387-394.

Arking, D.E., Pfeufer, A., Post, W., Kao, W.H., Newton-Cheh, C., Ikeda, M., West, K., Kashuk, C., Akyol, M., Perz, S., Jalilzadeh, S., Illig, T., Gieger, C., Guo, C.Y., Larson, M.G., Wichmann, H.E., Marban, E., O'Donnell, C.J., Hirschhorn, J.N., Kaab, S., Spooner, P.M., Meitinger, T., Chakravarti, A. (2006). A common genetic variant in the NOS1 regulator NOS1AP modulates cardiac repolarization. *Nat Genet* 38, 644-651.

Arnheim, N., Erlich, H. (1992). Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem* 61, 131-156.

Bal, R.S., Anholt, R.R. (1993). Formation of the extracellular mucous matrix of olfactory neuroepithelium: identification of partially glycosylated and nonglycosylated precursors of olfactomedin. *Biochemistry* 32, 1047-1053.

Beaufort-Krol, G.C., van den Berg, M.P., Wilde, A.A., van Tintelen, J.P., Viersma, J.W., Bezzina, C.R., Bink-Boelkens, M.T. (2005). Developmental aspects of long QT syndrome type 3 and Brugada syndrome on the basis of a single SCN5A mutation in childhood. *J Am Coll Cardiol* 46, 331-337.

Bennett, P.B., Yazawa, K., Makita, N., George, A.L., Jr. (1995). Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 376, 683-685.

Blackwell, C.C., Moscovis, S.M., Gordon, A.E., Al Madani, O.M., Hall, S.T., Gleeson, M., Scott, R.J., Roberts-Thomson, J., Weir, D.M., Busuttill, A. (2004). Ethnicity, infection and sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42, 53-65.

Caballero, M., Borrás, T. (2001). Inefficient processing of an olfactomedin-deficient myocilin mutant: potential physiological relevance to glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 662-670.

Caballero, M., Rowlette, L.L., Borrás, T. (2000). Altered secretion of a TIGR/MYOC mutant lacking the olfactomedin domain. *Biochim Biophys Acta* 1502, 447-460.

Challa, P., Herndon, L.W., Hauser, M.A., Broome, B.W., Pericak-Vance, M.A., Ababio-Danso, B., Allingham, R.R. (2002). Prevalence of myocilin mutations in adults with primary open-angle glaucoma in Ghana, West Africa. *J Glaucoma* 11, 416-420.

Chan, G., Kalaitzidis, D., Usenko, T., Kutok, J.L., Yang, W., Mohi, M.G., Neel, B.G. (2009). Leukemogenic Ptpn11 causes fatal myeloproliferative disorder via cell-autonomous effects on multiple stages of hematopoiesis. *Blood* 113, 4414-4424.

Chang, K.C., Barth, A.S., Sasano, T., Kizana, E., Kashiwakura, Y., Zhang, Y., Foster, D.B., Marban, E. (2008). CAPON modulates cardiac repolarization via neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4477-4482.

Chien, A., Edgar, D.B., Trela, J.M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127, 1550-1557.

Chou, L.S., Lyon, E., Wittwer, C.T. (2005). A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model. *Am J Clin Pathol* 124, 330-338.

Cordell, H.J., Clayton, D.G. (2005). Genetic association studies. *Lancet* 366, 1121-1131.

Curran, M.E., Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Green, E.D., Keating, M.T. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80, 795-803.

Donegan, R.K., Hill, S.E., Turnage, K.C., Orwig, S.D., Lieberman, R.L. (2012). The Glaucoma-associated Olfactomedin Domain of Myocilin Is a Novel Calcium Binding Protein. *J Biol Chem* 287, 43370-43377.

Dovichi NJ, Z.J. (2000). How Capillary Electrophoresis Sequenced the Human Genome This Essay is bas. *Angewandte Chemie*.

Eichmann, C. (1998). Multimediale Simulationen physiologischer Grundprozesse und ihre Einbettung in interaktive Lernsysteme. Inaugural-Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Eijgelsheim, M., Aarnoudse, A.L., Rivadeneira, F., Kors, J.A., Witteman, J.C., Hofman, A., van Duijn, C.M., Uitterlinden, A.G., Stricker, B.H. (2009). Identification of a common variant at the NOS1AP locus strongly associated to QT-interval duration. *Hum Mol Genet* 18, 347-357.

Elming, H., Holm, E., Jun, L., Torp-Pedersen, C., Kober, L., Kircshoff, M., Malik, M., Camm, J. (1998). The prognostic value of the QT interval and QT interval dispersion in all-cause and cardiac mortality and morbidity in a population of Danish citizens. *Eur Heart J* 19, 1391-1400.

ExomeVariantServer (2013). NHLBI Exome Sequencing Project (ESP). <http://evsgswashington.edu/EVS/>.

Fearn, S. (1834). Sudden and unexplained death of children. *Lancet*.

Fingert, J.H., Heon, E., Liebmann, J.M., Yamamoto, T., Craig, J.E., Rait, J., Kawase, K., Hoh, S.T., Buys, Y.M., Dickinson, J., Hockey, R.R., Williams-Lyn, D., Trope, G., Kitazawa, Y., Ritch, R., Mackey, D.A., Alward, W.L., Sheffield, V.C., Stone, E.M. (1999). Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum Mol Genet* 8, 899-905.

Frazer, K.A., Ballinger, D.G., Cox, D.R., Hinds, D.A., Stuve, L.L., Gibbs, R.A., Belmont, J.W., Boudreau, A., Hardenbol, P., Leal, S.M., Pasternak, S., Wheeler, D.A., Willis, T.D., Yu, F., Yang, H., Zeng, C., Gao, Y., Hu, H., Hu, W., Li, C., Lin, W., Liu, S., Pan, H., Tang, X., Wang, J., Wang, W., Yu, J., Zhang, B., Zhang, Q., Zhao, H., Zhou, J., Gabriel, S.B., Barry, R., Blumenstiel, B., Camargo, A., Defelice, M., Faggart, M., Goyette, M., Gupta, S., Moore, J., Nguyen, H., Onofrio, R.C., Parkin, M., Roy, J., Stahl, E., Winchester, E., Ziaugra, L., Altshuler, D., Shen, Y., Yao, Z., Huang, W., Chu, X., He, Y., Jin, L., Liu, Y., Sun, W., Wang, H., Wang, Y., Xiong, X., Xu, L., Waye, M.M., Tsui, S.K., Xue, H., Wong, J.T., Galver, L.M., Fan, J.B., Gunderson, K., Murray, S.S., Oliphant, A.R., Chee, M.S., Montpetit, A., Chagnon, F., Ferretti, V., Leboeuf, M., Olivier, J.F., Phillips, M.S., Roumy, S., Sallee, C., Verner, A., Hudson, T.J., Kwok, P.Y., Cai, D., Koboldt, D.C., Miller, R.D., Pawlikowska, L., Taillon-Miller, P., Xiao, M., Tsui, L.C., Mak, W., Song, Y.Q., Tam, P.K., Nakamura, Y., Kawaguchi, T., Kitamoto, T., Morizono, T., Nagashima, A., Ohnishi, Y., Sekine, A., Tanaka, T., Tsunoda, T., Deloukas, P., Bird, C.P., Delgado, M., Dermitzakis, E.T., Gwilliam, R., Hunt, S., Morrison, J., Powell, D., Stranger, B.E., Whittaker, P., Bentley, D.R., Daly, M.J., de Bakker, P.I., Barrett, J., Chretien, Y.R., Maller, J., McCarroll, S., Patterson, N., Pe'er, I., Price, A., Purcell, S., Richter, D.J., Sabeti, P., Saxena, R., Schaffner, S.F., Sham, P.C., Varilly, P., Stein, L.D., Krishnan, L., Smith, A.V., Tello-Ruiz, M.K., Thorisson, G.A., Chakravarti, A., Chen, P.E., Cutler, D.J., Kashuk, C.S., Lin, S., Abecasis, G.R., Guan, W., Li, Y., Munro, H.M., Qin, Z.S., Thomas, D.J., McVean, G., Auton, A., Bottolo, L., Cardin, N., Eyheramendy, S., Freeman, C., Marchini, J., Myers, S., Spencer, C., Stephens, M., Donnelly, P., Cardon, L.R., Clarke, G., Evans, D.M., Morris, A.P., Weir, B.S., Mullikin, J.C., Sherry, S.T., Feolo, M., Skol, A., Zhang, H., Matsuda, I., Fukushima, Y., Macer, D.R., Suda, E., Rotimi, C.N., Adebamowo, C.A., Ajayi, I., Aniagwu, T., Marshall, P.A., Nkwodimmah, C., Royal, C.D., Leppert, M.F., Dixon, M., Peiffer, A., Qiu, R., Kent, A., Kato, K., Niikawa, N., Adewole, I.F., Knoppers, B.M., Foster, M.W., Clayton, E.W., Watkin, J., Muzny, D., Nazareth, L., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Yakub, I., Birren, B.W., Wilson, R.K., Fulton, L.L., Rogers, J., Burton, J., Carter, N.P., Clee, C.M., Griffiths, M., Jones, M.C., McLay, K., Plumb, R.W., Ross, M.T., Sims, S.K., Willey, D.L., Chen, Z., Han, H., Kang, L., Godbout, M., Wallenburg, J.C., L'Archeveque, P., Bellemare, G., Saeki, K., An, D., Fu, H., Li, Q., Wang, Z., Wang, R., Holden, A.L., Brooks, L.D., McEwen, J.E., Guyer, M.S., Wang, V.O., Peterson, J.L., Shi, M., Spiegel, J., Sung, L.M., Zacharia, L.F., Collins, F.S., Kennedy, K., Jamieson, R., Stewart, J. (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449, 851-861.

Furutani, Y., Manabe, R., Tsutsui, K., Yamada, T., Sugimoto, N., Fukuda, S., Kawai, J., Sugiura, N., Kimata, K., Hayashizaki, Y., Sekiguchi, K. (2005). Identification and characterization of photomedins: novel olfactomedin-domain-containing proteins with chondroitin sulphate-E-binding activity. *Biochem J* 389, 675-684.

Fuse, N. (2010). Genetic bases for glaucoma. *Tohoku J Exp Med* 221, 1-10.

GeneralSIDSreference General SIDS reference.

GHDP (2010). Genetic Heart Disease Program for Inherited Causes of Sudden Death, Long QT Syndrome, S.L.s.-R.H. Center, ed. (New York, USA).

Gingeras, T.R., Higuchi, R., Kricka, L.J., Lo, Y.M., Wittwer, C.T. (2005). Fifty years of molecular (DNA/RNA) diagnostics. *Clin Chem* 51, 661-671.

Gotthardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M.F., Shelton, J., Richardson, J.A., Stockinger, W., Nimpf, J., Herz, J. (2000). Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J Biol Chem* 275, 25616-25624.

Graham, R., Liew, M., Meadows, C., Lyon, E., Wittwer, C.T. (2005). Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting. *Clin Chem* 51, 1295-1298.

Griffin, T.J., Smith, L.M. (2000). Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol* 18, 77-84.

Gundry, C.N., Vandersteen, J.G., Reed, G.H., Pryor, R.J., Chen, J., Wittwer, C.T. (2003). Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem* 49, 396-406.

Guntheroth, W.G., Spiers, P.S. (2002). The triple risk hypotheses in sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 110, e64.

Han, B., Kang, H.M., Eskin, E. (2009). Rapid and accurate multiple testing correction and power estimation for millions of correlated markers. *PLoS Genet* 5, e1000456.

Haverkamp W, H.F., Breithardt G (2002). Medikamentenbedingte QT-Verlängerung und Torsade de pointes: Ein multidisziplinäres Problem. *Deutsches Ärzteblatt Heft* 28.29, A 1972-1979.

Hedley, P.L., Jorgensen, P., Schlamowitz, S., Moolman-Smook, J., Kanters, J.K., Corfield, V.A.Christiansen, M. (2009). The genetic basis of Brugada syndrome: a mutation update. *Hum Mutat* 30, 1256-1266.

Hein, L. (2009). Wenn das Herz aus dem Takt gerät. *Pharmazeutische Zeitung* 10.

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R.Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7276-7280.

Ibelgaufits, H. (1993). *Gentechnologies von A bis Z*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

IdahoTechnology (2008). Small amplicon genotyping using internal temperature calibration and high resolution-melting. *Biotechniques* 44, 577-578.

Inglis, T.J. (2007). Principia aetiologica: taking causality beyond Koch's postulates. *J Med Microbiol* 56, 1419-1422.

Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H.Brow, M.A. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9436-9440.

Jaffrey, S.R., Benfenati, F., Snowman, A.M., Czernik, A.J.Snyder, S.H. (2002). Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3199-3204.

Jaffrey, S.R., Snowman, A.M., Eliasson, M.J., Cohen, N.A.Snyder, S.H. (1998). CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron* 20, 115-124.

Jervell, A.Lange-Nielsen, F. (1957). Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* 54, 59-68.

Joe, M.K., Sohn, S., Hur, W., Moon, Y., Choi, Y.R.Kee, C. (2003). Accumulation of mutant myocilins in ER leads to ER stress and potential cytotoxicity in human trabecular meshwork cells. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 592-600.

- Kao, W.H., Arking, D.E., Post, W., Rea, T.D., Sotoodehnia, N., Prineas, R.J., Bishe, B., Doan, B.Q., Boerwinkle, E., Psaty, B.M., Tomaselli, G.F., Coresh, J., Siscovick, D.S., Marban, E., Spooner, P.M., Burke, G.L., Chakravarti, A. (2009). Genetic variations in nitric oxide synthase 1 adaptor protein are associated with sudden cardiac death in US white community-based populations. *Circulation* 119, 940-951.
- Karali, A., Russell, P., Stefani, F.H., Tamm, E.R. (2000). Localization of myocilin/trabecular meshwork--inducible glucocorticoid response protein in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 729-740.
- Karavanich, C., Anholt, R.R. (1998). Evolution of olfactomedin. Structural constraints and conservation of primary sequence motifs. *Ann N Y Acad Sci* 855, 294-300.
- Karls-Universität-Prag (2013). Fallbeispiel des Institutes für klinische Pharmakologie der Karls-Universität Prag. <http://www.lfhk.cunicz/farmakol/anglicka/Hughes/Html>.
- Katsanis, N. (2009). From association to causality: the new frontier for complex traits. *Genome Med* 1, 23.
- Kennan, A.M., Mansergh, F.C., Fingert, J.H., Clark, T., Ayuso, C., Kenna, P.F., Humphries, P., Farrar, G.J. (1998). A novel Asp380Ala mutation in the GLC1A/myocilin gene in a family with juvenile onset primary open angle glaucoma. *J Med Genet* 35, 957-960.
- Kinney, H.C., Thach, B.T. (2009). The sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 361, 795-805.
- Kubota, R., Kudoh, J., Mashima, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Hejtmancik, J.F., Oguchi, Y., Shimizu, N. (1998). Genomic organization of the human myocilin gene (MYOC) responsible for primary open angle glaucoma (GLC1A). *Biochem Biophys Res Commun* 242, 396-400.
- Kulkarni, N.H., Karavanich, C.A., Atchley, W.R., Anholt, R.R. (2000). Characterization and differential expression of a human gene family of olfactomedin-related proteins. *Genet Res* 76, 41-50.
- Kwon, Y.H., Fingert, J.H., Kuehn, M.H., Alward, W.L. (2009). Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med* 360, 1113-1124.
- Lam, D.S., Leung, Y.F., Chua, J.K., Baum, L., Fan, D.S., Choy, K.W., Pang, C.P. (2000). Truncations in the TIGR gene in individuals with and without primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1386-1391.

Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Chang, S.Y., Landre, P.A., Abramson, R.D., Gelfand, D.H. (1993). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl* 2, 275-287.

Lay, M.J., Wittwer, C.T. (1997). Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem* 43, 2262-2267.

Lowel, H., Doring, A., Schneider, A., Heier, M., Thorand, B., Meisinger, C. (2005). The MONICA Augsburg surveys--basis for prospective cohort studies. *Gesundheitswesen* 67 Suppl 1, S13-18.

Mabuchi, F., Yamagata, Z., Kashiwagi, K., Ishijima, K., Tang, S., Iijima, H., Tsukahara, S. (2001a). A sequence change (Arg158Gln) in the leucine zipper-like motif region of the MYOC/TIGR protein. *J Hum Genet* 46, 85-89.

Mabuchi, F., Yamagata, Z., Kashiwagi, K., Tang, S., Iijima, H., Tsukahara, S. (2001b). Analysis of myocilin gene mutations in Japanese patients with normal tension glaucoma and primary open-angle glaucoma. *Clin Genet* 59, 263-268.

Machaalani, R., Say, M., Waters, K.A. (2011). Effects of cigarette smoke exposure on nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha7 and beta2 in the sudden infant death syndrome (SIDS) brainstem. *Toxicol Appl Pharmacol* 257, 396-404.

Madabhushi, R.S. (1998). Separation of 4-color DNA sequencing extension products in noncovalently coated capillaries using low viscosity polymer solutions. *Electrophoresis* 19, 224-230.

Mansergh, F.C., Kenna, P.F., Ayuso, C., Kiang, A.S., Humphries, P., Farrar, G.J. (1998). Novel mutations in the TIGR gene in early and late onset open angle glaucoma. *Hum Mutat* 11, 244-251.

Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 560-564.

Medeiros-Domingo, A., Iturralde-Torres, P., Ackerman, M.J. (2007). [Clinical and genetic characteristics of long QT syndrome]. *Rev Esp Cardiol* 60, 739-752.

Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16, 1215.

Mitchell, E.A. (2009). SIDS: past, present and future. *Acta Paediatr* 98, 1712-1719.

Mohler, P.J., Schott, J.J., Gramolini, A.O., Dilly, K.W., Guatimosim, S., duBell, W.H., Song, L.S., Haurogne, K., Kyndt, F., Ali, M.E., Rogers, T.B., Lederer, W.J., Escande, D., Le Marec, H.Bennett, V. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 421, 634-639.

Moon, R.Y., Horne, R.S.Hauck, F.R. (2007). Sudden infant death syndrome. *Lancet* 370, 1578-1587.

Morissette, J., Clepet, C., Moisan, S., Dubois, S., Winstall, E., Vermeeren, D., Nguyen, T.D., Polansky, J.R., Cote, G., Anctil, J.L., Amyot, M., Plante, M., Falardeau, P.Raymond, V. (1998). Homozygotes carrying an autosomal dominant TIGR mutation do not manifest glaucoma. *Nat Genet* 19, 319-321.

Moss, A.J., Zareba, W., Hall, W.J., Schwartz, P.J., Crampton, R.S., Benhorin, J., Vincent, G.M., Locati, E.H., Priori, S.G., Napolitano, C., Medina, A., Zhang, L., Robinson, J.L., Timothy, K., Towbin, J.A.Andrews, M.L. (2000). Effectiveness and limitations of beta-blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 101, 616-623.

Murray, J.C., Buetow, K.H., Weber, J.L., Ludwigsen, S., Scherpbier-Heddema, T., Manion, F., Quillen, J., Sheffield, V.C., Sunden, S., Duyk, G.M.et al. (1994). A comprehensive human linkage map with centimorgan density. Cooperative Human Linkage Center (CHLC). *Science* 265, 2049-2054.

Napolitano, C., Priori, S.G., Schwartz, P.J., Bloise, R., Ronchetti, E., Nastoli, J., Bottelli, G., Cerrone, M.Leonardi, S. (2005). Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA* 294, 2975-2980.

Nejentsev, S., Walker, N., Riches, D., Egholm, M.Todd, J.A. (2009). Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* 324, 387-389.

Newton-Cheh, C., Eijgelsheim, M., Rice, K.M., de Bakker, P.I., Yin, X., Estrada, K., Bis, J.C., Marciante, K., Rivadeneira, F., Noseworthy, P.A., Sotoodehnia, N., Smith, N.L., Rotter, J.I., Kors, J.A., Witteman, J.C., Hofman, A., Heckbert, S.R., O'Donnell, C.J., Uitterlinden, A.G., Psaty, B.M., Lumley, T., Larson, M.G.Stricker, B.H. (2009). Common variants at ten loci influence QT interval duration in the QTGEN Study. *Nat Genet* 41, 399-406.

NG, P.C. (2003). SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research* 31, 3812-3814.

Ohlmann, A., Goldwisch, A., Flugel-Koch, C., Fuchs, A.V., Schwager, K., Tamm, E.R. (2003). Secreted glycoprotein myocilin is a component of the myelin sheath in peripheral nerves. *Glia* 43, 128-140.

Opdal, S.H., Rognum, T.O. (2011). Gene variants predisposing to SIDS: current knowledge. *Forensic Sci Med Pathol* 7, 26-36.

Ortego, J., Escribano, J., Coca-Prados, M. (1997). Cloning and characterization of subtracted cDNAs from a human ciliary body library encoding TIGR, a protein involved in juvenile open angle glaucoma with homology to myosin and olfactomedin. *FEBS Lett* 413, 349-353.

Pfeufer, A., Jalilzadeh, S., Perz, S., Mueller, J.C., Hinterseer, M., Illig, T., Akyol, M., Huth, C., Schopfer-Wendels, A., Kuch, B., Steinbeck, G., Holle, R., Nabauer, M., Wichmann, H.E., Meitinger, T., Kaab, S. (2005). Common variants in myocardial ion channel genes modify the QT interval in the general population: results from the KORA study. *Circ Res* 96, 693-701.

Pfeufer, A., Sanna, S., Arking, D.E., Muller, M., Gateva, V., Fuchsberger, C., Ehret, G.B., Orru, M., Pattaro, C., Kottgen, A., Perz, S., Usala, G., Barbalic, M., Li, M., Putz, B., Scuteri, A., Prineas, R.J., Sinner, M.F., Gieger, C., Najjar, S.S., Kao, W.H., Muhleisen, T.W., Dei, M., Happel, C., Mohlenkamp, S., Crisponi, L., Erbel, R., Jockel, K.H., Naitza, S., Steinbeck, G., Marroni, F., Hicks, A.A., Lakatta, E., Muller-Myhsok, B., Pramstaller, P.P., Wichmann, H.E., Schlessinger, D., Boerwinkle, E., Meitinger, T., Uda, M., Coresh, J., Kaab, S., Abecasis, G.R., Chakravarti, A. (2009). Common variants at ten loci modulate the QT interval duration in the QTSCD Study. *Nat Genet* 41, 407-414.

Pokorny, J., Stanek, V., Vrana, M. (2011). Sudden cardiac death thirty years ago and at present. The role of autonomic disturbances in acute myocardial infarction revisited. *Physiol Res* 60, 715-728.

Polansky, J.R., Fauss, D.J., Chen, P., Chen, H., Lutjen-Drecoll, E., Johnson, D., Kurtz, R.M., Ma, Z.D., Bloom, E., Nguyen, T.D. (1997). Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product. *Ophthalmologica* 211, 126-139.

Post, W., Shen, H., Damcott, C., Arking, D.E., Kao, W.H., Sack, P.A., Ryan, K.A., Chakravarti, A., Mitchell, B.D., Shuldiner, A.R. (2007). Associations between genetic variants in the NOS1AP (CAPON) gene and cardiac repolarization in the old order Amish. *Hum Hered* 64, 214-219.

Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238, 336-341.

Rand, C.M., Berry-Kravis, E.M., Zhou, L., Fan, W., Weese-Mayer, D.E. (2007). Sudden infant death syndrome: rare mutation in the serotonin system FEV gene. *Pediatr Res* 62, 180-182.

Rasinski, K.A., Kuby, A., Bzdusek, S.A., Silvestri, J.M., Weese-Mayer, D.E. (2003). Effect of a sudden infant death syndrome risk reduction education program on risk factor compliance and information sources in primarily black urban communities. *Pediatrics* 111, e347-354.

Reed, G.H., Kent, J.O., Wittwer, C.T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 8, 597-608.

Reed, G.H., Wittwer, C.T. (2004). Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem* 50, 1748-1754.

Ricard, C.S., Agapova, O.A., Salvador-Silva, M., Kaufman, P.L., Hernandez, M.R. (2001). Expression of myocilin/TIGR in normal and glaucomatous primate optic nerves. *Exp Eye Res* 73, 433-447.

Roden, D.M. (2008). Clinical practice. Long-QT syndrome. *N Engl J Med* 358, 169-176.

Romano, C., Gemme, G., Pongiglione, R. (1963). [Rare Cardiac Arrhythmias of the Pediatric Age. I. Repetitive Paroxysmal Tachycardia]. *Minerva Pediatr* 15, 1155-1164.

Rychlik, W., Spencer, W.J., Rhoads, R.E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res* 18, 6409-6412.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Sanger, F., Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94, 441-448.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24, 104-108.

Sarfarazi, M. (1997). Recent advances in molecular genetics of glaucomas. *Hum Mol Genet* 6, 1667-1677.

Schäfer, Z. (2010). Genetic variation and functional analysis of the cardiomedin gene. In Lehrstuhl für Tierzucht (Technische Universität München).

Schechtman, V.L., Harper, R.M., Wilson, A.J., Southall, D.P. (1991). Sleep apnea in infants who succumb to the sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 87, 841-846.

Schwartz, P.J. (1985). Idiopathic long QT syndrome: progress and questions. *Am Heart J* 109, 399-411.

Schwartz, P.J. (2006). The congenital long QT syndromes from genotype to phenotype: clinical implications. *J Intern Med* 259, 39-47.

Schwartz, P.J., Moss, A.J., Vincent, G.M., Crampton, R.S. (1993). Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* 88, 782-784.

Schwartz, P.J., Priori, S.G., Bloise, R., Napolitano, C., Ronchetti, E., Piccinini, A., Goj, C., Breithardt, G., Schulze-Bahr, E., Wedekind, H., Nastoli, J. (2001a). Molecular diagnosis in a child with sudden infant death syndrome. *Lancet* 358, 1342-1343.

Schwartz, P.J., Priori, S.G., Cerrone, M., Spazzolini, C., Odero, A., Napolitano, C., Bloise, R., De Ferrari, G.M., Klersy, C., Moss, A.J., Zareba, W., Robinson, J.L., Hall, W.J., Brink, P.A., Toivonen, L., Epstein, A.E., Li, C., Hu, D. (2004). Left cardiac sympathetic denervation in the management of high-risk patients affected by the long-QT syndrome. *Circulation* 109, 1826-1833.

Schwartz, P.J., Priori, S.G., Dumaine, R., Napolitano, C., Antzelevitch, C., Stramba-Badiale, M., Richard, T.A., Berti, M.R., Bloise, R. (2000). A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 343, 262-267.

Schwartz, P.J., Priori, S.G., Spazzolini, C., Moss, A.J., Vincent, G.M., Napolitano, C., Denjoy, I., Guicheney, P., Breithardt, G., Keating, M.T., Towbin, J.A., Beggs, A.H., Brink, P., Wilde, A.A., Toivonen, L., Zareba, W., Robinson, J.L., Timothy, K.W., Corfield, V., Wattanasirichaigoon, D., Corbett, C., Haverkamp, W., Schulze-Bahr, E., Lehmann, M.H., Schwartz, K., Coumel, P., Bloise, R. (2001b). Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 103, 89-95.

Schwartz, P.J., Stramba-Badiale, M., Segantini, A., Austoni, P., Bosi, G., Giorgetti, R., Grancini, F., Marni, E.D., Perticone, F., Rosti, D.Salice, P. (1998). Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 338, 1709-1714.

Shimizu, S., Lichter, P.R., Johnson, A.T., Zhou, Z., Higashi, M., Gottfredsdottir, M., Othman, M., Moroi, S.E., Rozsa, F.W., Schertzer, R.M., Clarke, M.S., Schwartz, A.L., Downs, C.A., Vollrath, D.Richards, J.E. (2000). Age-dependent prevalence of mutations at the *GLC1A* locus in primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 130, 165-177.

Shouten, A. (1991). JHR J.L.C. Pompe van Meerdervoort. *Nieuwe Ned Bijdr Geschied Geneeskd Natuurwet* 36, 93-103.

Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B.Hood, L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321, 674-679.

Snyder, D.A., Rivers, A.M., Yokoe, H., Menco, B.P.Anholt, R.R. (1991). Olfactomedin: purification, characterization, and localization of a novel olfactory glycoprotein. *Biochemistry* 30, 9143-9153.

Statistisches-Bundesamt (2006). Daten des statistischen Bundesamtes. www.destatis.de.

Statistisches-Bundesamt (2008). Daten des statistischen Bundesamtes. www.destatis.de.

Stockwell, E.G., Swanson, D.A.Wicks, J.W. (1988). Economic status differences in infant mortality by cause of death. *Public Health Rep* 103, 135-142.

Straus, S.M., Kors, J.A., De Bruin, M.L., van der Hooft, C.S., Hofman, A., Heeringa, J., Deckers, J.W., Kingma, J.H., Sturkenboom, M.C., Stricker, B.H.Witteman, J.C. (2006). Prolonged QTc interval and risk of sudden cardiac death in a population of older adults. *J Am Coll Cardiol* 47, 362-367.

Sullivan, F.M.Barlow, S.M. (2001). Review of risk factors for sudden infant death syndrome. *Paediatr Perinat Epidemiol* 15, 144-200.

Sultana, A., Nakaya, N., Senatorov, V.V.Tomarev, S.I. (2011). Olfactomedin 2: expression in the eye and interaction with other olfactomedin domain-containing proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 2584-2592.

Suzuki, R., Hattori, Y., Okano, K. (2000). Promoter mutations of myocilin gene in Japanese patients with open angle glaucoma including normal tension glaucoma. *Br J Ophthalmol* 84, 1078.

Suzuki, Y., Shirato, S., Taniguchi, F., Ohara, K., Nishimaki, K., Ohta, S. (1997). Mutations in the TIGR gene in familial primary open-angle glaucoma in Japan. *Am J Hum Genet* 61, 1202-1204.

Taniguchi, F., Suzuki, Y., Shirato, S., Araie, M. (2000). The Gly367Arg mutation in the myocilin gene causes adult-onset primary open-angle glaucoma. *Jpn J Ophthalmol* 44, 445-448.

Technology, I. (2008). Small amplicon genotyping using internal temperature calibration and high. *Biotechniques*.

Tennessen, J.A., Bigham, A.W., O'Connor, T.D., Fu, W., Kenny, E.E., Gravel, S., McGee, S., Do, R., Liu, X., Jun, G., Kang, H.M., Jordan, D., Leal, S.M., Gabriel, S., Rieder, M.J., Abecasis, G., Altshuler, D., Nickerson, D.A., Boerwinkle, E., Sunyaev, S., Bustamante, C.D., Bamshad, M.J., Akey, J.M. (2012). Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science* 337, 64-69.

Tester, D.J., Ackerman, M.J. (2005a). Sudden infant death syndrome: how significant are the cardiac channelopathies? *Cardiovasc Res* 67, 388-396.

Tester, D.J., Will, M.L., Haglund, C.M., Ackerman, M.J. (2005b). Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2, 507-517.

The International HapMap Consortium (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299-1320.

Universitätsklinikum-Heidelberg (2013). Long-QT-Syndrom. <http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Long-QT-Syndrom1117370.html>.

Vandersteen, J.G., Bayrak-Toydemir, P., Palais, R.A., Wittwer, C.T. (2007). Identifying common genetic variants by high-resolution melting. *Clin Chem* 53, 1191-1198.

Vasconcellos, J.P., Melo, M.B., Costa, V.P., Tsukumo, D.M., Basseres, D.S., Bordin, S., Saad, S.T., Costa, F.F. (2000). Novel mutation in the MYOC gene in primary open glaucoma patients. *J Med Genet* 37, 301-303.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nuskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigo, R., Campbell, M.J., Sjolander, K.V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A.Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

Virmani, R., Burke, A.P., Farb, A. (2001). Sudden cardiac death. *Cardiovasc Pathol* 10, 275-282.

Viskin, S.Halkin, A. (2009). Treating the long-QT syndrome in the era of implantable defibrillators. *Circulation* *119*, 204-206.

Vollrath, D.Liu, Y. (2006). Temperature sensitive secretion of mutant myocilins. *Exp Eye Res* *82*, 1030-1036.

von Ahsen, N. (2005). Two for typing: homogeneous combined single-nucleotide polymorphism scanning and genotyping. *Clin Chem* *51*, 1761-1762.

Waggener, T.B., Southall, D.P.Scott, L.A. (1990). Analysis of breathing patterns in a prospective population of term infants does not predict susceptibility to sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* *27*, 113-117.

Wang, Q., Curran, M.E., Splawski, I., Burn, T.C., Millholland, J.M., VanRaay, T.J., Shen, J., Timothy, K.W., Vincent, G.M., de Jager, T., Schwartz, P.J., Toubin, J.A., Moss, A.J., Atkinson, D.L., Landes, G.M., Connors, T.D.Keating, M.T. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* *12*, 17-23.

Wang, Q., Shen, J., Li, Z., Timothy, K., Vincent, G.M., Priori, S.G., Schwartz, P.J.Keating, M.T. (1995a). Cardiac sodium channel mutations in patients with long QT syndrome, an inherited cardiac arrhythmia. *Hum Mol Genet* *4*, 1603-1607.

Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J.L., Moss, A.J., Towbin, J.A.Keating, M.T. (1995b). SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* *80*, 805-811.

Weese-Mayer, D.E., Berry-Kravis, E.M., Maher, B.S., Silvestri, J.M., Curran, M.E.Marazita, M.L. (2003). Sudden infant death syndrome: association with a promoter polymorphism of the serotonin transporter gene. *Am J Med Genet A* *117A*, 268-274.

Wikipedia (2013). Long-QT Syndrom. <http://dewikipediaorg/wiki/QT-Syndrom>.

Wittwer, C.T., Reed, G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G.Pryor, R.J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* *49*, 853-860.

Wittwer CT, R.G., Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry*.

Wright, S. (1984). *Evolution and the Genetics of Populations: Genetics and Biometric Foundations v. 2 (Theory of Gene Frequencies)*, New Edition edn (University of Chicago Press).

Yokoe, H., Anholt, R.R. (1993). Molecular cloning of olfactomedin, an extracellular matrix protein specific to olfactory neuroepithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 4655-4659.

Zeng, L.C., Han, Z.G., Ma, W.J. (2005). Elucidation of subfamily segregation and intramolecular coevolution of the olfactomedin-like proteins by comprehensive phylogenetic analysis and gene expression pattern assessment. *FEBS Lett* *579*, 5443-5453.

Zhou, L., Wang, L., Palais, R., Pryor, R., Wittwer, C.T. (2005). High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. *Clin Chem* *51*, 1770-1777.

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Die Abbildung zeigt die räumliche Aufteilung der kardialen Erregungsleitung ausgehend vom Sinusknoten bis zum Ventrikel.	11
Abbildung 2:	Aktionspotential des Herzmuskels und Charakterisierung der einzelnen Erregungsphasen.	12
Abbildung 3:	Bildliche Darstellung eines Ionenkanals, der aus alpha- und beta-Untereinheiten aufgebaut ist.	13
Abbildung 4:	12-Kanal EKG, das eine ventrikuläre Tachykardie vom Torsade de pointes-Typ (TdP) zeigt.	15
Abbildung 5:	EKG bei Long-QT Syndrom mit Tachykardie.	16
Abbildung 6:	EKG bei Long-QT Syndrom mit T-Wellen-Einkerbungen (links) sowie alternierende T-Wellen (rechts).	16
Abbildung 7:	Daten des statistischen Bundesamtes über die Fälle von plötzlichem Kindstod in Bayern.	24
Abbildung 8:	Fine-mapping der Assoziation mit dem QTc-Intervall von SNPs aus der <i>NOS1AP</i> -Genregion (Locusplot) und Darstellung ihres Linkage disequilibrium (LD).	29
Abbildung 9:	Darstellung der genomweiten Assoziation des QTc-Intervalls aus einer GWAS.	28
Abbildung 10:	Einheitliche gemeinsame Struktur der Proteine der Olfactomedinfamilie.	31
Abbildung 11:	Darstellung des PCR-Produktes mittels Gelelektrophorese.	48
Abbildung 12:	Idaho LightScanner (Idaho Technology).	49
Abbildung 13:	Melting Wizard Software.	52
Abbildung 14:	Sanger-Sequencing mit einem Kapillarsequencer (ABI-Life Technologies).	54
Abbildung 15:	Molekulare Darstellung eines dNTPs (oben) und ddNTPs (unten).	57
Abbildung 16:	Zerstörung der Duplexe mit Exonuklease III (EXO III) und Basenextensionsreaktion.	58
Abbildung 17:	Darstellung der Sequenzen von OLFML2B.	61
Abbildung 18:	Maldi-TOF MS (Sequenom).	62
Abbildung 19:	Homogenous Mass Extend-Reaktion (hME).	63
Abbildung 20:	Schematischer Aufbau des Maldi-TOF MS.	64
Abbildung 21:	Plattenbelegung der 384er Platten mit eingebauten Kontrollen.	67
Abbildung 22:	Nachweis der Mutationen: P504L, G515E und Y557H.	87
Abbildung 23:	Alignment von acht orthologen OLFML2B-Proteinen aus acht verschiedenen Spezies.	94
Abbildung 24:	Westernblotanalyse zur Expression und Sekretion des Wildtyps und der Mutanten des OLFML2B-Proteins.	95

Abbildung 25: Elektrophysiologische Untersuchungen in Xenopusoocyten des
OLFML2B-Wildtyps.....97

11 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Darstellung der verschiedenen Gene, in denen monogene Mutationen zu LQTS führen..	18
Tabelle 2:	Gewichtung der Punkte im Schwartz-Score	20
Tabelle 3:	Medikamente, die ein LQTS auslösen können	22
Tabelle 4:	SIDS-Fälle zwischen 1990 bis 2008 in Deutschland.....	24
Tabelle 5:	Charakteristika der untersuchten Patienten und Kontrollen	39
Tabelle 6:	Protokoll: RBC-Lyse-Puffer-Herstellung	41
Tabelle 7:	Protokoll: SE-Puffer-Herstellung	42
Tabelle 8:	Protokoll: TE-Puffer-Herstellung	42
Tabelle 9:	PCR-Primer zur Amplifikation der Exons des <i>OLFML2B</i> -Gens	44
Tabelle 10:	PCR-Protokoll	47
Tabelle 11:	Touch-down-Protokoll/PCR	47
Tabelle 12:	Protokoll für Gelelektrophorese	48
Tabelle 13:	Herstellung ExoSAP Mix.....	59
Tabelle 14:	Protokoll: ExoSAP Mix-Programm	59
Tabelle 15:	Herstellung eines Sequenziergemisches	60
Tabelle 16:	DNA-Sequenzierungsprogramm.....	60
Tabelle 17:	PCR-Primer für Genotypisierung der 14 nichtsynonymen Varianten	66
Tabelle 18:	Standard Master-Mix zur Aufreinigung mit SAP	67
Tabelle 19:	Protokoll: ExoSAP Mix-Programm	68
Tabelle 20:	Mastermix für die Basenextensionsreaktion bei hME	68
Tabelle 21:	Temperaturprofil für die hME-Reaktion	69
Tabelle 22:	Extensions-Primer für die hME-Genotypisierung	69
Tabelle 23:	Aufgefundene Varianten im <i>OLFML2B</i> -Gen	73
Tabelle 24:	Aufgefundene Varianten im <i>OLFML2B</i> -Gen	74
Tabelle 25:	Liste aller 86 untersuchten Varianten in diesem Projekt	75
Tabelle 26:	Detektionswahrscheinlichkeit sämtlicher seltener und sehr seltener Varianten, die im <i>OLFML2B</i> -Gen identifiziert wurden	78
Tabelle 27:	Darstellung der Anzahl der Träger sämtlicher seltener Varianten (MAF $\leq 1\%$), die im <i>OLFML2B</i> -Gen identifiziert wurden	80
Tabelle 28:	Darstellung der Anzahl der Träger sämtlicher sehr seltener Varianten (MAF $\leq 0.1\%$), die im <i>OLFML2B</i> -Gen identifiziert wurden	81
Tabelle 29:	Assoziation seltener Varianten im <i>OLFML2B</i> -Gen mit dem Erkrankungsstatus	82
Tabelle 30:	Assoziation sehr seltener Varianten im <i>OLFML2B</i> -Gen mit dem Erkrankungsstatus	83
Tabelle 31:	Liste der 14 Missense-Mutationen mit hoher Wahrscheinlichkeit für Krankheitskausalität	85
Tabelle 32:	Klinische Daten zu den drei gefundenen Mutationen im <i>OLFML2B</i> -Gen	88

12 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. Dipl. Ing. Arne Pfeufer, Humangenetiker und Biochemiker, für die Betreuung meiner Arbeit und gleichzeitig für die Ermöglichung der Durchführung bedanken.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Thomas Meitinger, Direktor des Instituts für Humangenetik der Technischen Universität München, der mir ermöglichte meine Doktorarbeit in den Laboren seines Instituts durchzuführen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei der I. Medizinischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, insbesondere bei Herrn Prof. Käab und Herrn Dr. Sinner für die Betreuung sowie wissenschaftliche Kooperation bedanken.

Die Ausarbeitung eines solch großen Projekts bedarf auch immer einer stets angenehmen und hilfsbereiten Zusammenarbeit des gesamten Teams. Dafür möchte ich mich bei allen Kollegen, insbesondere in der Abteilung für Humangenetik am Helmholtz Zentrum München, für diese schöne und lehrreiche Zeit im Labor bedanken.

Zum Schluss möchte ich auch meinen lieben Eltern und meinem Freund Stefan danken, die mich stets in allen Phasen der Durchführung meiner Doktorarbeit mit viel Liebe unterstützt haben und immer für mich da waren.

Vielen Dank!

13 CURRICULUM VITAE

Michaela Hanna Dominica Prucha

geb. in Giessen, 02.11.1982

Schulische Ausbildung

1993 – 2002 Liebigschule Giessen, Gymnasium

Universitäre Ausbildung

2002-2009 Studium der Humanmedizin,
Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)

2004 **Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München**

Praktisches Jahr

2007/2008 **Innere Medizin/Kardiologie**
· LMU München, 1. Medizinische Klinik, Klinikum Großhadern
· Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital (MGH),
Boston, USA

Chirurgie

· Universitätsspital Zürich, Schweiz

Dermatologie

· LMU München, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und
Allergologie

2009 **Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**
Approbation als Arzt

Beruflicher Werdegang

2009 **Klinik für Dermatologie und Phlebologie, Klinikum Stuttgart,**
Assistenzärztin

seit 2010 **Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein,**
TU München, Assistenzärztin