

Aus dem Humangenetischen Institut
der Universität zu Köln
Direktorin: Frau Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Brunhilde Wirth

**Krankheitsverlauf der spinalen Muskelatrophie (SMA) Typ 1 in
Abhängigkeit von funktionellen und molekulargenetischen Parametern**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Christopher Philip Betzler
aus Heidelberg

Promoviert am 16. Dezember 2009

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Frau Universitätsprofessor Dr. rer. nat. B. Wirth
2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. J. von Kleist-Retzow

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Prof. Dr. rer. nat. Brunhilde Wirth
Herr Dr. Raoul Heller
Herr Dr. Radu Wirth
Herr Serjoscha Blick

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 07.09.2009

Christopher Betzler

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse wurden von mir mit Unterstützung des medizinisch-technischen Assistenten Herrn Serjoscha Blick im Labor des Humangenetischen Instituts der Universität zu Köln ermittelt.

Die Krankengeschichten wurden von mir selbst ausgewertet.

Danksagung

Frau Professor Dr. rer. nat. Brunhilde Wirth, Leiterin des Instituts für Humangenetik des Klinikums der Universität zu Köln, danke ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die sehr freundliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Raoul Heller und Herrn Dr. Radu Wirth, Institut für Humangenetik, Klinikum der Universität zu Köln, danke ich für Ihre ständige Betreuung und große Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Studie.

Herrn Serjoscha Blick danke ich für seine Hilfe im Labor bei der Bestimmung der *SMN2*-Kopienzahlen.

Meiner Mitdoktorantin Corinna Berg und ihrer Betreuerin, Frau Prof. Dr. Rudnik-Schöneborn, gebührt mein Dank für die Bereitstellung der Daten des Aachener Patienten-Kollektivs.

Bei meinem Schwager Robin Bartling möchte ich mich für seine Hilfe bei der Erstellung der Grafiken und Formatierung dieser Arbeit bedanken.

Zu guter Letzt danke ich allen Familien und behandelnden Ärzten, die aktiv an dieser Studie teilgenommen haben. Ohne ihre Teilnahme und ihren Einsatz wäre diese Studie nicht durchführbar gewesen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Spinale Muskelatrophie (SMA)	9
1.1.1	Häufigkeit /Epidemiologie	9
1.1.2	Klinische Diagnostik	10
1.1.3	Klinische Klassifikation	11
1.1.3.1	SMA Typ 1 (Akute infantile SMA, Typ Werdnig-Hoffmann)	12
1.1.3.2	SMA Typ 2 (Intermediäre SMA)	14
1.1.3.3	SMA Typ 3 (Typ Kugelberg-Welander)	14
1.1.3.4	SMA Typ 4 (Adulte SMA)	15
1.1.4	Differentialdiagnose der proximalen SMA	16
1.2	Formal- und Molekulargenetik der proximalen SMA	16
1.3	Gruppeneinteilung der SMA Typ 1 nach Amico et al. (pers. Mitteilung)	19
1.4	Therapeutische Maßnahmen	20
1.5	Wissenschaftliche Zielsetzung	22
2	Methodik	24
2.1	Probanden bzw. Patientenauswahl	24
2.2	Antrag an die Ethikkommission	24
2.3	Retrospektive Erhebung von SMA Typ 1-Patienten mittels Fragebogen	25
2.4	Bestimmung der <i>SMN2</i> - Kopienzahl auf der Basis der Real-time LightCycler PCR	31
2.5	Auswertung der Daten	35
2.6	Überlebenszeitkurve nach Kaplan-Meier	35
3.	Ergebnisse	37
3.1	Ergebnisse bezogen auf die Kölner Patienten	37
3.1.1	Fragebogen	37
3.1.2	Überlebenskurve aller Kölner Patienten (bis Beatmung)	39

3.1.3	Überlebenskurve der männlichen/weiblichen Kölner Patienten	40
3.1.4	Patienten unterteilt nach Erstmanifestation der Erkrankung	41
3.1.5	Überlebenskurve von Kölner Patienten differenziert nach vorhandener/nicht vorhandener Kopfkontrolle.....	43
3.1.6	Gruppenvergleich nach Amico et al. (pers. Mitteilung).....	44
3.2	Ergebnisse bezogen auf das vereinte Kollektiv von Kölner und Aachener Patienten.....	47
3.2.1	Überlebenskurve aller Patienten ohne VPA bis zum funktionellen Tod (N=56).....	47
3.2.2	Überlebenskurven der Kölner/Aachener Patienten:	48
3.2.3	Überlebenskurve von männlichen /weiblichen Patienten.....	49
3.2.4	Patienten unterteilt nach Erstmanifestation der Erkrankung (gesamtes Patientenkollektiv).....	50
3.2.5	Überlebenskurve der Kölner/Aachener Patienten differenziert nach vorhandener/nicht vorhandener Kopfkontrolle.....	51
3.2.6	Überlebenskurven unter Berücksichtigung von Pneumonien (Kölner und Aachener Patienten)	52
3.2.7	Überlebenskurve nach Erhalt einer PEG-Anlage (N=42)	53
3.2.8	Durchschnittsalter von Erkrankungsbeginn/Tod in Abhängigkeit von der <i>SMN2</i> -Kopienzahl.....	54
3.2.9	Angeborene Herzfehler in Abhängigkeit von der <i>SMN2</i> -Kopienzahl	55
3.2.10	Überlebenskurve der mit VPA behandelten Patienten im Vergleich zu den nicht behandelten Patienten.....	56
3.3	Beschreibung der Langzeitüberlebenden (>24 Monate) unter Einschluss motorischer und respiratorischer Funktionen.....	57
3.4	Patienten, die mit Valproinsäure behandelt wurden.....	58
3.5	Tabellarische Übersicht über das Patientenkollektiv	60
4.	Diskussion.....	61
4.1	Beurteilung des Fragebogens zur Erhebung von Patientendaten	61
4.2	Gruppeneinteilung der SMA Typ 1 Patienten abhängig vom Erkrankungsbeginn.....	62

4.3	Einfluss der <i>SMN2</i> -Kopienzahl auf den Krankheitsverlauf der SMA	64
4.4	Einfluss der <i>SMN2</i> -Kopienzahl auf die kardiale Entwicklung.....	67
4.5	Geschlechtsspezifität bei der SMA Typ 1	70
4.6	Therapeutische Bedeutung von Valproinsäure.....	71
4.7	Gruppeneinteilung nach Amico et al. (pers. Mitteilung).....	72
5	Zusammenfassung.....	75
6	Literaturverzeichnis	78
7	Eigene Veröffentlichungen	89
8	Anhang.....	90
8.1	Antrag an die Ethik-Kommission.....	90
8.2	Anschreiben an Einsender	98
8.3	Patientenaufklärung („Patienteninformation“).....	99
8.4	Einverständniserklärung.....	102
9	Lebenslauf.....	103

1 Einleitung

1.1 Spinale Muskelatrophie (SMA)

1.1.1 Häufigkeit /Epidemiologie

Spinale Muskelatrophien (SMA) umfassen eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe erblicher neuromuskulärer Erkrankungen, die nach heutiger Vorstellung durch einen selektiven, chronisch progredienten Untergang von Vorderhornzellen im Rückenmark und z.T. auch der motorischen Hirnnervenkerne des Hirnstamms charakterisiert ist.

Die autosomal-rezessiven spinalen Muskelatrophien stellen die zweithäufigste autosomal- rezessiv erbliche Erkrankung und eine wesentliche Ursache für Tod im frühen Kindesalter dar (Roberts et al. 1970; Pearn 1980; Czeizel and Hamula 1989).

Je nach der anatomischen Lokalisation des Manifestationsschwerpunktes werden proximale und distale Muskelatrophien unterschieden.

Die proximale SMA des Kindes- und Jugendalters stellt mit etwa 80-90% die große Mehrzahl aller spinalen Muskelatrophien dar.

Epidemiologische Daten für die SMA des Kindes- und Jugendalters sind von Emery (Emery 1991) zusammengestellt worden und zeigen, dass die autosomal-rezessive Form insgesamt eine Inzidenz von mindestens 1:10000 Geburten beträgt.

Die Inzidenzen bzw. Prävalenzen wurden in Abhängigkeit von der Verlaufsform getrennt berechnet und variieren zwischen 1:25000 und 1:10000 für die schwere infantile SMA (Typ Werdnig-Hoffmann) (Pearn 1973, Spiegler et al. 1990) und 1:25000 und 1:83000 für die chronischen Verlaufsformen (intermediäre SMA und milde SMA Typ Kugelberg-Welander) (Pearn 1978, Spiegler et al. 1990).

Für eine Häufigkeit von 1:10000, lässt sich aufgrund von direkten molekulargenetischen Untersuchungen eine Heterozygotenfrequenz von 1:35 berechnen (Feldkötter et al. 2002).

1.1.2 Klinische Diagnostik

Die klinischen Diagnosekriterien für die proximalen spinalen Muskelatrophien sind 1992 vom internationalen SMA-Konsortium definiert worden (Munsat und Davies 1992; Zerres et al. 1998):

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<p><u>1. Muskelschwäche:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - symmetrisch - proximal>distal - Beine>Arme - Rumpf- und Interkostalbeteiligung <p><u>2. Zeichen der Denervation:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - im EMG - in der Muskelbiopsie - Faszikulationen 	<ul style="list-style-type: none"> - ZNS-Beteiligung - Arthrogryposis - Beteiligung anderer Organe (z.B. der Ohren und Augen) - Sensibilitätsstörungen - Augenmuskelbeteiligung - deutliche Gesichtsmuskelbeteiligung - CK-Aktivität> 10-fach der oberen Norm - Motorische Nervenleitgeschwindigkeit >70 Prozent der Norm reduziert

Tab.1: Diagnostische Kriterien proximaler spinaler Muskelatrophien (Internationales SMA-Konsortium, 1992).

Bei einer schweren proximalen SMA ist eine klinische Zuordnung in den meisten Fällen gut möglich und basiert auf dem typischen klinischen Bild, charakteristischen elektrophysiologischen Befunden und muskelbiopsischen Befunden (Eine Muskelbiopsie sollte heutzutage nicht mehr erforderlich sein).

Bei der akuten infantilen SMA ist vor allem das klinische Bild eines floppy infant mit Zungenfibrillationen und Handtremor zu beobachten und damit diagnostisch richtungsweisend.

Elektrophysiologische Befunde entsprechen denjenigen anderer Vorderhornzell-erkrankungen. Der Verlust von Aktionspotentialen bei zunehmender Kontraktion und

der Nachweis pathologischer Spontanaktivität (Fibrillationspotentiale) sind typische Befunde.

In der Muskelbiopsie lassen sich als typische Folge der akuten Denervierung weitgehend unabhängig vom Krankheitsbeginn atrophische Fasern nachweisen. Bei den atrophischen Fasern handelt es sich sowohl um Typ-I-Fasern als auch Typ-II-Fasern. Es werden jedoch auch Muskelfasern von normalem Kaliber oder hypertrophierte Fasern gefunden, da nicht alle Vorderhornzellen gleichzeitig betroffen sind.

Die biochemischen Untersuchungen des Serums zeigen in der Regel keine typischen Auffälligkeiten. In der überwiegenden Zahl der Fälle mit frühem Erkrankungsbeginn (SMA Typ 1 und Typ 2) ist die Kreatinphosphokinaseaktivität (CK) im Serum allenfalls geringgradig erhöht, wogegen mehr als 90% der Patienten mit einer milden Verlaufsform (SMA Typ 3b) erhöhte CK-Werte ($>2SD$) zeigen.

In Anbetracht der Varianz der Verteilung der CK-Werte bei den verschiedenen Verlaufsformen kann man davon ausgehen, dass nicht der Schweregrad der SMA oder die erhaltene Funktion der Muskulatur, sondern die Menge der aufgebauten Muskelmasse für den CK-Ausstrom aus den Muskelzellen verantwortlich ist (Rudnik-Schöneborn et al. 1998).

1.1.3 Klinische Klassifikation

Das klinische Bild der proximalen spinalen Muskelatrophien umfasst ein breites Spektrum von Formen mit intrauterinem Beginn bis zu einem Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter. Der weitaus größte Teil wird jedoch im Neugeborenen bzw. Kindesalter klinisch manifest und geht namentlich auf die Erstbeschreiber Werdnig und Hoffmann (Werdnig-Hoffmann; MIM 253300) zurück. Die milde Verlaufsform mit Beginn zwischen dem 2. und 17. Lebensjahr wurde erst wesentlich später von Kugelberg und Welander (Kugelberg-Welander; MIM 253400) als Abgrenzung zur progressiven Muskeldystrophie beschrieben.

Das Internationale-SMA-Konsortium hat sich zur Vereinheitlichung auf eine gemeinsame Klassifikation verständigt, die sich im Wesentlichen an Erkrankungsbeginn und erreichten motorischen Meilensteinen orientiert, da diese Faktoren relevant für die

Prognose der durchschnittlichen Lebenserwartung sind (International SMA Consortium 1999).

Es werden demnach folgende SMA-Typen unterschieden: SMA Typ 1, SMA Typ 2, SMA Typ 3 und SMA Typ 4.

Definition	Wichtige Symptome
<u>Typ 1:</u> SMA Typ Werdnig-Hoffmann; Akute infantile SMA (#253300)	Sitzen nicht möglich; Erkrankungsbeginn intrauterin oder innerhalb der ersten 6 Monate; Tod in mehr als 90% der Fälle innerhalb der ersten 2 Jahre
<u>Typ 2:</u> Chronische infantile SMA; Intermediäre SMA (#253550)	Freies Sitzen wird erlernt; Gehen ohne Hilfe nie möglich; Erkrankungsbeginn nach dem 6. Lebensmonat; Überlebensrate über 90% nach 10 Jahren
<u>Typ 3:</u> SMA Typ Kugelberg-Welander; Juvenile SMA (#253400)	Gehen zumindest vorübergehend ohne Hilfe möglich; Typ 3a: Beginn < 3 Jahre Typ 3b: Beginn > 3 Jahre Milder Verlauf Lebenserwartung nicht deutlich reduziert
<u>Typ 4:</u> Adulte SMA	Erkrankungsbeginn nach dem 30. Lebensjahr; normale Lebenserwartung

Tab.2: Klassifikation der autosomal rezessiven SMA (Internationales SMA-Konsortium 1999).

Bei Diskrepanz zwischen Erkrankungsbeginn und erreichten motorischen Fähigkeiten im individuellen Fall sind letztere ausschlaggebend.

1.1.3.1 SMA Typ 1 (Akute infantile SMA, Typ Werdnig-Hoffmann)

Die ersten Symptome zeigen sich bei dieser schweren Verlaufsform meist kurz nach der Geburt in Form von Muskelhypotonie und ausbleibender motorischer Entwicklung. Die Muskelschwäche wird bei praktisch allen Fällen in den ersten sechs Lebensmonaten

manifest, bei etwa 1/3 der Patienten geben die Mütter verminderte Kindsbewegungen an (Pearn 1973). Symptome, die zur Verdachtsdiagnose führen, sind meist Bewegungsarmut, Probleme beim Kopfheben und eine unzulängliche Sitzbereitschaft.

Die Kinder erlernen selten sich herumzudrehen und können nicht frei sitzen. Die faziale und extraokuläre Muskulatur bleibt ausgespart, so dass die Patienten bei normaler mentaler Entwicklung im Kontrast zu ihren körperlichen Möglichkeiten durch einen auffällig wachen Blick charakterisiert sind. Da die Interkostalmuskeln betroffen sind, führt die reine Zwerchfellatmung zum Bild der sog. paradoxen Atmung, bei der sich die Rippen bei der Inspiration senken, statt sich zu entfalten. Respiratorische Probleme beherrschen schließlich den klinischen Verlauf in Verbindung mit Ernährungsschwierigkeiten. Viele Patienten benötigen eine Magensonde aufgrund einer erheblichen Schluckschwäche, welches ein Hinweis auf eine bulbäre Beteiligung ist. Die Muskelschwäche ist meist rasch progredient, so dass die Mehrzahl der Patienten innerhalb der ersten zwei Lebensjahre verstirbt. Nur 8% der SMA Typ1-Patienten leben länger als zehn Jahre (Zerres und Rudnik-Schöneborn 1995a).

Die Prognose hängt eng mit dem Erkrankungsbeginn zusammen und kann als schlecht eingestuft werden, wenn die ersten Symptome innerhalb der ersten drei Lebensmonate auftreten (Thomas und Dubowitz 1994, Zerres et al. 1997a). Als prognostisch ungünstige Faktoren können eine ausgeprägte respiratorische Insuffizienz, rezidivierende Pneumonien oder Ernährungsprobleme bis hin zu einer erforderlichen PEG-Anlage (PEG: perkutane endoskopische Gastrotomie) betrachtet werden (Ioos et al. 2004).

Die Verdachtsdiagnose lässt sich klinisch durch einen erfahrenen Neuropädiater stellen. Neben einer generalisierten Muskelschwäche bei normaler Mimik sind Zungenfibrillationen und fehlende Muskeleigenreflexe entscheidende diagnostische Wegweiser. Während Hüftgelenkluxationen bei SMA Typ 1 gehäuft vorkommen und sich mit der Zeit eine deutliche ulnare Deviation der Handgelenke abzeichnet, sind ausgeprägte Gelenkkontrakturen in der Frühphase nicht typisch. Insbesondere sollte eine neurogen bedingte Arthrogryposis multiplex congenitata differentialdiagnostisch von einer klassischen SMA abgegrenzt werden (Vuopala et al. 1994), obgleich wenige Fälle mit molekulargenetisch gesicherter SMA beschrieben wurden, die bereits

intrauterin eine Bewegungsarmut mit Kontrakturen aufwiesen (Devriendt et al. 1996, Bingham et al. 1997).

1.1.3.2 SMA Typ 2 (Intermediäre SMA)

Während sich der Erkrankungsbeginn bei der chronischen SMA Typ 2 in vielen Fällen nicht von dem bei der SMA Typ 1 unterscheidet (30-40% erkranken ebenfalls vor dem sechsten Lebensmonat), ist diese Verlaufsform durch unterschiedlich lange Stillstandsphasen gekennzeichnet, womit auch die insgesamt wesentlich bessere Prognose zusammenhängt. Bis spätestens zum 18. Lebensmonat bzw. in einem mittleren Alter von acht Monaten (Median) werden die Kinder durch Muskelhypotonie und unzureichende motorische Entwicklung auffällig (Zerres u. Rudnik-Schöneborn 1995a). Im Unterschied zu SMA Typ 1-Patienten erlernen die SMA Typ 2-Patienten, ohne Unterstützung frei zu sitzen, ein Meilenstein, der für die Definition dieser Gruppe entscheidend ist. Das klinische Spektrum ist sehr breit und reicht von Kindern, die nur für kurze Zeit frei sitzen können, über solche, die krabbeln erlernen, bis hin zu Übergangsformen zur SMA Typ 3 (Patienten, die mit Hilfe stehen oder vorübergehend einige Schritte gehen können).

Vor allem im Hinblick auf die Lebenserwartung ist innerhalb der SMA Typ 2 keine weitere Unterteilung sinnvoll (Zerres et al. 1997b).

1.1.3.3 SMA Typ 3 (Typ Kugelberg-Welander)

Das klinische Spektrum der milden SMA Typ 3, die wie die SMA Typ 1 und SMA Typ 2 auf dem gleichen Genort lokalisiert wurde (siehe Kap. 1.2), ist im Hinblick auf den Erkrankungsbeginn (18-30 Jahre) so variabel, dass es in Anbetracht der erheblichen prognostischen Unterschiede sinnvoll ist, innerhalb dieser Gruppe eine weitere Unterteilung vorzunehmen.

Definitionsgemäß werden Patienten nur dann als SMA Typ 3 eingeordnet, wenn sie ohne Hilfe gehen gelernt haben (Internationales SMA Consortium 1992). Für die Bewältigung von Schule und Beruf ist es jedoch von entscheidender Bedeutung, ob die Patienten bereits in jungen Jahren auf den Rollstuhl angewiesen sind oder ob die

Erkrankung erst später, mit 10-20 Jahren, beginnt und die Gehfähigkeit für Jahrzehnte erhalten bleibt. Aus diesem Grund hat sich die Einteilung in SMA Typ 3a (Beginn in den ersten drei Lebensjahren, Aufstehen und Treppensteigen nur unter Schwierigkeiten erlernt) und SMA Typ 3b (Beginn mit 3-30 Jahren, normale motorische Entwicklung, Prognose umso günstiger, je später der Erkrankungsbeginn) bewährt (Zerres und Rudnik-Schöneborn 1995a, Zerres et al. 1997b). Erste Symptome entwickeln sich aufgrund einer Becken- bzw. Beinmuskelschwäche in Form von Problemen bei Laufbelastung oder Sport, beim Aufstehen (Gower-Zeichen) oder Treppensteigen.

Die Lebenserwartung ist bei der SMA Typ 3 nach bisherigen Daten nicht nennenswert eingeschränkt, der Krankheitsverlauf ist meist relativ mild mit langen Stillstandphasen. Der individuelle Verlauf ist bei der Diagnosestellung meist nicht vorhersehbar, jedoch ist ein Großteil der Patienten mit einer SMA Typ 3a innerhalb von 15-20 Jahren auf den Rollstuhl angewiesen, während die Hälfte der Patienten mit einer SMA Typ 3b nach Kaplan-Meier-Statistik noch 45 Jahre nach Erkrankungsbeginn gehfähig bleibt (Zerres und Rudnik-Schöneborn 1995a).

1.1.3.4 SMA Typ 4 (Adulte SMA)

Die sehr seltene Spätform der proximalen SMA spielt im Vergleich zu den Formen mit Beginn im Kindesalter nur eine untergeordnete Rolle. Patienten werden dann als SMA Typ 4 klassifiziert, wenn die Symptomatik nach dem 30. Lebensjahr beginnt und eine fehlende Familienanamnese auf einen autosomal-rezessiven Erbgang hindeutet.

Probleme beim Treppensteigen oder sportlicher Belastung können die ersten Zeichen sein. Die Gehfähigkeit bleibt meist lange erhalten, die Lebenserwartung ist praktisch nicht reduziert (Zerres und Rudnik-Schöneborn 1995a).

Es ist noch nicht eindeutig geklärt, inwieweit die adulte SMA auf Veränderungen in der SMA-Region auf Chromosom 5q zurückzuführen ist (siehe Kap. 1.2). Es sind jedoch einzelne Patienten beschrieben worden, die innerhalb der 4.-6. Dekade erkrankt sind und bei denen eine homozygote Deletion im *SMN1*-Gen (Survival of Motor Neuron-Gen 1) nachgewiesen werden konnte (siehe Kap. 1.2).

Diese Patienten wurden somit zum Spektrum der SMA mit Lokalisation auf Chromosom 5q gerechnet (Brahe et al. 1995, Clermont et al. 1995, Wirth et al. 2006).

1.1.4 Differentialdiagnose der proximalen SMA

Im Kindesalter kommt die umfangreiche Differentialdiagnose des „floppy infant“ in Betracht, hier sollte vor allem an kongenitale Myopathien gedacht werden (z.B. kongenitale Muskeldystrophien), die sich klinisch und histologisch von einer infantilen SMA unterscheiden lassen. Bei ausgeprägter muskulärer Hypotonie ohne neurogene Veränderungen kommen unter anderem das Prader-Willi-Syndrom sowie die hypotone Zerebralparese in Betracht. Auch das X-chromosomale Pelizaeus-Merzbacher-Syndrom kann klinisch wie eine infantile SMA imponieren, eine Diagnose ist dann nur durch den Nachweis von Hypomyelinisierungen im MRT oder durch den Mutationsnachweis im PLP-Gen möglich (Kaye et al. 1994).

Im Kindes- und Jugendalter sollten in erster Linie die Muskeldystrophien (Muskeldystrophie Typ Becker oder Gliedergürtelmuskeldystrophie) differentialdiagnostisch berücksichtigt werden. Der Nachweis von Deletionen im Dystrophingen bei einzelnen Patienten mit der klinischen Diagnose einer SMA zeigt, dass im Einzelfall die Diagnosestellung mit Schwierigkeiten verbunden sein kann (Rudnik-Schöneborn et al. 1996).

Die fazioskapulohumerale Muskeldystrophie wird bei nur geringer fazialer Beteiligung oftmals als SMA eingeordnet, insbesondere, da die CK nicht massiv erhöht ist und sich in EMG und Biopsie nicht selten neurogene Befunde erheben lassen (Rudnik-Schöneborn et al. 1996).

1.2 Formal- und Molekulargenetik der proximalen SMA

Unterschiedliche Erbgänge sind bei der proximalen spinalen Muskelatrophie bekannt, wobei der autosomal-rezessive Erbgang bei weitem überwiegt und nur selten eine autosomal-dominante Form vorliegt.

Die autosomal-rezessiven Formen sind unabhängig vom Erkrankungsalter genetisch wahrscheinlich einheitlich. Patienten mit einer autosomal-rezessiv erblichen SMA sind homozygot für eine *SMN1*-Mutation auf beiden Allelen, welche sie im allgemeinen von ihren gesunden (heterozygoten) Eltern erben.

Das Wiederholungsrisiko für Geschwister eines betroffenen Kinds liegt bei 25%.

Für die autosomal-rezessiv vererbten Formen der spinalen Muskelatrophie wurde 1990 eine Kopplung auf dem Chromosom 5q13 nachgewiesen (Brzustowicz et al. 1990, Gilliam et al. 1990, Melki et al. 1990a, Melki et al. 1990b). In dieser Region liegt ein 500 kb (Kilobasen, 1 kb = 1000 Basenpaare) großes dupliziertes und invertiertes Segment. 1995 wurde das „Survival of Motor Neuron“ *SMN*-Gen als das SMA-determinierende Gen identifiziert (Lefebvre et al. 1995). Dieses Gen kommt in zwei funktionellen Kopien vor: dem telomerisch gelegenen *SMN1*-Gen (telSMN) und dem zentromerisch gelegenen *SMN2*-Gen (cenSMN).

Beide Gene unterscheiden sich in nur fünf Nukleotiden (Bürglen et al. 1996).

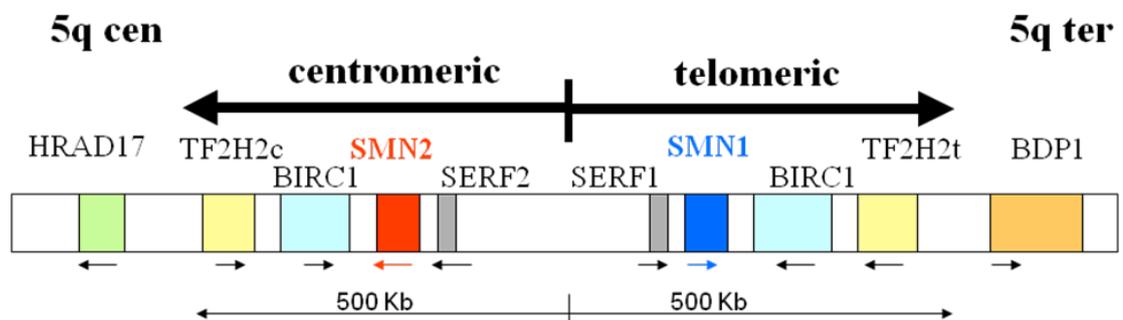


Abb.1: Schematische Darstellung der duplizierten und invertierten SMA-Region auf Chromosom 5q. Die Region wird proximal und distal von den Genen HRAD17 und BDP1 flankiert.

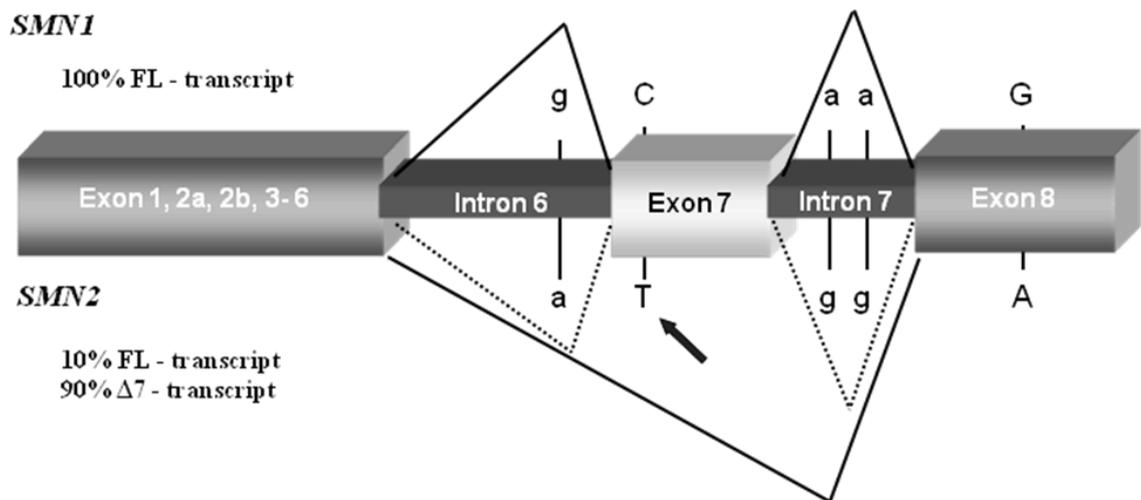


Abb.2: Lokalisation der Nukleotide, in denen sich *SMN1* und *SMN2* unterscheiden; der Pfeil markiert den funktionell wichtigsten Nukleotidaustausch an Position +6 in *SMN* Exon 7.

Die Basenpaardifferenzen haben keinen Einfluss auf die Proteinstruktur, jedoch wird von dem *SMN1*-Gen nur vollständige mRNA transkribiert, während das *SMN2*-Gen neben vollständigen Transkripten (ca. 10%) durch alternatives Spleißen hauptsächlich zur Bildung eines verkürzten Transkripts ohne Exon 7 führt (ca. 90%) (Lefebvre et al. 1995). 94% der an SMA Typ 1-3 Erkrankten weisen einen homozygoten Verlust des Exons 7 oder der Exone 7 und 8 des *SMN1*-Gens auf (Wirth 2000).

Dieser Verlust kann entweder aufgrund einer Deletion des *SMN1*-Gens oder aufgrund einer Genkonversion des *SMN1*-Gens zum *SMN2*-Gen entstehen, wodurch sich die Zahl der *SMN2*-Kopien erhöht (Hahnen et al. 1996, von der Steege et al. 1996, Burghes 1997, Wirth et al. 1997a, Wirth et al. 1997b).

3,4% der SMA-Patienten besitzen eine Deletion eines *SMN1*-Gens und eine intragenische Mutation des verbleibenden *SMN1*-Gens, was man als Compound-Heterozygotie bezeichnet (Wirth et al. 1999).

Grundsätzlich gilt für die SMA der Typen 1-4 das Vorliegen eines homozygoten Verlustes von mindestens Exon 7 oder das Vorliegen von compound-heterozygoten Mutationen des *SMN1*-Gens als diagnostischer Beweis.

Bei 2,6% der SMA-Patienten mit dem klinischen Phänotyp einer SMA sind keine Veränderungen des *SMN1*-Gens feststellbar (Wirth et al. 1999).

Bei 4% der Normalbevölkerung liegt ein homozygoter Verlust des *SMN2*-Gens vor, welcher allerdings keine pathologischen Auswirkungen zu haben scheint (Lefebvre et al. 1995, Wirth et al. 1999).

1.3 Gruppeneinteilung der SMA Typ 1 nach Amico et al. (pers. Mitteilung)

Ich gehe an dieser Stelle auf die Gruppeneinteilung der SMA Typ 1 nach Amico et al. (pers. Mitteilung) ein, da diese im späteren Verlauf der Arbeit als Vergleich herangezogen wird.

Das Ziel der Studie von Amico et al. (pers. Mitteilung) war es herauszufinden, ob es mit Hilfe klinischer Faktoren/Aspekte möglich wäre, Kinder, die an SMA Typ 1 erkrankt sind, verschiedenen Untergruppen zuordnen zu können.

Angaben zu der Studie von Amico et al. (pers. Mitteilung):

- Es haben nur Patienten an der Studie teilgenommen, bei denen in dem Zeitraum von 2000-2003 an vier italienischen Zentren SMA Typ 1 molekulargenetisch diagnostiziert worden ist.
- An der Studie nahmen 38 Patienten teil, von denen 36 vor dem 30. Lebensmonat verstarben. Die zwei weiteren Patienten lebten zu dem Zeitpunkt der Studie noch und waren ab dem 35,5. bzw. 49,6. Lebensmonat beatmet worden.
- Die Eltern der Patienten haben aktiv an der Studie teilgenommen, da sie den Fragebogen, welcher sechs Fragen enthielt, in einem Telefon-Interview beantwortet haben.

In dem Fragebogen wurden folgende Aspekte berücksichtigt:

1. verminderte Kindsbewegung
2. Atemschwierigkeiten bei Geburt
3. Auffälligkeiten in der frühgeburtlichen Phase (ersten 21 Tage)
4. Kopfkontrolle erreicht innerhalb von vier Monaten (Kopfheben möglich)
5. Kopfkontrolle später als mit vier Monaten erlangt
6. Fähigkeit mit Unterstützung zu sitzen

Anhand des Fragebogens wurden die Patienten der Studie von Amico et al. (pers. Mitteilung) in drei Gruppen (Cluster) unterteilt:

- **Gruppe 1** (N=10): Patienten mit normalen vorgeburtlichen Kindsbewegungen, ohne respiratorische Schwierigkeiten bei Geburt und Erlangen der Kopfkontrolle.
- **Gruppe 2** (N=23): Patienten ohne Atemschwierigkeiten bei Geburt, einige von diesen zeigen verminderte vorgeburtliche Kindsbewegungen und frühgeburtliche neurologische Auffälligkeiten.
- **Gruppe 3** (N=5): Patienten mit verminderter vorgeburtlicher Kindsbewegung, respiratorischen Schwierigkeiten bei Geburt, frühkindlichen neurologischen Auffälligkeiten und ohne Erlangen der Kopfkontrolle.

1.4 Therapeutische Maßnahmen

Eine kausale Therapie der SMA ist bis heute nicht möglich, allerdings prinzipiell denkbar.

SMA-Patienten, bei welchen eine homozygote Deletion des *SMN1*-Gens vorliegt, besitzen in Form des *SMN2*-Gens nämlich noch ein sehr ähnliches Gen in ihrem Genom.

Diese Tatsache versucht man für die Entwicklung einer Therapie auszunutzen, da die *SMN2*-Kopienzahl den Phänotyp beeinflusst (Wirth 2002).

Es sind folgende Therapieansätze denkbar:

1. Erhöhen der Menge der Volllänge-SMN2-RNA durch :
 - Antisense-RNA-Moleküle
 - Aktivierung von Spleißproteinen
(führen zu einer Umkehrung des Spleißmusters des *SMN2*-Gens)
2. Steigerung der Transkriptionrate der SMN-RNA über eine Aktivierung des SMN-Gen-Promotors (Wirth 2002)
3. Stabilisierung des SMN-Volllänge-Proteins
4. Ersatz der degenerierten alpha-Motoneurone im Rückenmark durch eine Stammzelltherapie

Einige Ideen wurden bereits umgesetzt und zeigten erste Erfolge ex vivo oder im Mausmodell.

Das Spleißmuster des *SMN2*-Gens kann in Zellkultur zu Gunsten des Volllänge-Transkripts durch Substanzen wie Natriumbutyrat (Chang et al. 2001), Aclarubicin (Andreassi et al. 2001), Natriumvanadat (Zhang et al. 2001) sowie durch das bereits als Arzneimittel zugelassene Antiepileptikum Natriumvalproat (Brichta et al. 2003) umgekehrt werden.

Valproat ist in der Lage, die Menge an SMN-Volllänge-Transkript durch Umkehrung des Spleißmusters des *SMN2*-Gens und Heraufregulation der Transkriptionsaktivität zu erhöhen.

Therapiestudien mit SMA Typ 1-Patienten sind geplant, können allerdings methodische Probleme aufwerfen.

Eine Doppelblind-Kontroll-Placebo-Studie z.B. mit Valproat ist im Hinblick auf die Auswertung der Studie ideal, jedoch aus praktischen Gründen schwer durchführbar.

Sollten die an der Studie teilnehmenden Eltern nämlich im Verlauf der Studie in Erfahrung bringen, dass sich ihr Kind in der Placebo- und nicht in der Therapiegruppe befindet, ist es nicht auszuschließen, dass diese ihre Kinder entweder aus der Studie herausnehmen oder ohne Benachrichtigung der Studienleitung unabhängig mit Valproinsäure behandeln lassen. Dieses hätte folglich für die Auswertung der Studie fatale Folgen.

Desweiteren würde es sich als schwierig darstellen die Anzahl der Studienteilnehmer, die für eine Doppelblind-Kontroll-Placebo-Studie erforderlich sind, zu erreichen.

Es erscheint daher sinnvoll, eine historisch unbehandelte Kontrollgruppe für eine einarmige Therapiestudie zu erfassen.

Solange eine kausale Therapie nicht zur Verfügung steht, sollten symptomatische Therapiemaßnahmen wie Physiotherapie, orthopädische Hilfen und Operationen sowie ggf. assistierte Beatmung in enger Absprache mit spezialisierten Zentren und den Eltern eingesetzt werden.

Passive und aktive Bewegungsübungen haben das Ziel, Kontrakturen zu mildern und vorhandene Funktionsausfälle mit Hilfe der intakten Muskulatur zu kompensieren.

Sitz-, Steh- und Gehhilfen bis hin zum Rollstuhl helfen, Funktionen zu erhalten und die Mobilität zu verbessern.

Bei Trink- und Schluckschwäche ist bei schweren Verlaufsformen eine Sondenernährung unumgänglich. Einer Verschlechterung der respiratorischen Funktion sollte durch Atemübungen und konsequente Infektbehandlung (Sekretdrainage, Antibiose) entgegengewirkt werden (Zusammenfassung der maximalen palliativ-therapeutischen Massnahmen nach TREAT-NMD, <http://www.treat-nmd.de>).

1.5 Wissenschaftliche Zielsetzung

Die frühkindliche Form der autosomal-rezessiven spinalen Muskelatrophie ist die schwerste Form dieser Erkrankung und führt in ca. 90% der Fälle innerhalb der ersten beiden Lebensjahre zum Tod, vorwiegend infolge von respiratorischen Komplikationen (Lungenentzündungen, Atemversagen).

Eine einarmige Therapiestudie mit Valproat (CARNIVAL TYPE I, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00661453) in Zusammenarbeit mit mehreren nordamerikanischen Kinderkliniken und der Universitäts-Kinderklinik Köln hat in der USA bereits begonnen und wird in Köln im Frühjahr 2009 beginnen.

Bei dieser Studie handelt es sich um eine multizentrische Studie, welche die Sicherheit und Wirkung von Valproinsäure bei der Behandlung von SMA Typ 1-Patienten erfassen soll.

Einschlusskriterien für diese Studie sind:

- Molekulargenetisch diagnostizierte SMA
- Klinische Diagnose der SMA Typ 1
- Alter zwischen zwei Wochen und neun Monaten

Ausschlusskriterien für diese Studie sind:

- Klinische oder labortechnische Zeichen einer Leber- oder Pankreasinsuffizienz

Demzufolge ist es relevant, auf eine historische, unbehandelte Kontrollgruppe zurückgreifen zu können, um einen evtl. therapeutischen Nutzen von Valproat (Valproinsäure) erkennen zu können.

Erstes Ziel meiner Dr.-Arbeit war es daher, eine solche historische Kontrollgruppe, die bisher nicht verfügbar war, durch Dokumentation des Krankheitsverlaufes bei Patienten mit frühkindlicher SMA zu erstellen, die zwischen 2000-2005 in Aachen, Köln oder anderen humangenetischen Laboren innerhalb Deutschlands diagnostiziert worden sind. Angestrebte Mindestzahl der zur Auswertung gelangenden Krankheitsverläufe ist ca. jeweils 30 über die beiden humangenetischen Institute Aachen und Köln.

Zu dieser Zahl gelangte man aufgrund folgender Überlegungen: Vor Beginn dieser Studie hatte man die Absicht eine Doppelblind-Kontroll-Placebo-Studie vorzunehmen, in der jeweils der Placebo-Kontrollarm als auch der Therapie-Kontrollarm 60-70 Patienten umfassen sollte.

Nachdem unsere Studie nun den Placebo-Kontrollarm ersetzen sollte, wurden die 60-70 Patienten dieses Kontrollarmes auf die beiden an der Studie beteiligten Zentren, nämlich Köln und Aachen, verteilt.

Zweites Ziel war, retrospektiv zu untersuchen, ob und wie eng die Zahl der individuell in unterschiedlicher Zahl vorhandenen *SMN2*-Genkopien mit dem jeweils beobachteten SMA-Krankheitsverlauf korreliert.

2 Methodik

2.1 Probanden bzw. Patientenauswahl

Einschlusskriterien waren:

- Gesicherte molekulargenetische Diagnose, d.h. Nachweis eines Stückverlustes (Exon 7) des ursächlichen *SMNI*-Gens sowohl auf dem Chromosom 5 mütterlicher als auch auf dem väterlicher Herkunft (homozygote *SMNI*-Deletion)
- Diagnose gestellt im Zeitraum 2000-2005
- Erkrankungsbeginn in den ersten sechs Monaten nach Geburt

2.2 Antrag an die Ethikkommission

- siehe Anhang

Kurzfassung

Geplant wurde die Erhebung und Analyse klinischer und genetischer Daten zur infantilen spinalen Muskelatrophie mittels Fragebogen, medizinischer Untersuchungsbefunde und molekulargenetischer Analysen. Potentielle Studienteilnehmer waren Eltern, deren Kind in den ersten sechs Lebensmonaten an einer infantilen spinalen Muskelatrophie erkrankt und wo die klinische Diagnose durch eines der an der Studie beteiligten Laboratorien molekulargenetisch durch den Nachweis eines homozygoten *SMNI*-Verlusts bestätigt worden war.

Das Projekt wurde zeitgleich am Institut für Humangenetik der Universität Köln (Studienleitung: Frau Prof. Dr. rer. nat. B. Wirth/Dr. med. R. Heller) und Institut der RWTH Aachen (Studienleitung: Frau Prof. Dr. S. Rudnik-Schöneborn/Prof. Dr. K. Zerres) durchgeführt. Der Kontakt wurde über die einsendenden Ärzte hergestellt, sofern die Familien nicht direkt in unserer klinisch-genetischen Sprechstunde betreut worden waren.

Erfasst wurden nur Patienten, bei denen zwischen 2000 und 2005 eine molekulargenetische Diagnostik erfolgt war. Bei Patienten, deren Eltern einer wissenschaftlichen Verwendung der von ihrem Kind vorhandenen DNA-Probe zugestimmt haben, wurde, soweit noch nicht diagnostisch durchgeführt, eine

quantitative Analyse der *SMN*-Genkopien vorgenommen, um die Zahl der *SMN2*-Genkopien mit dem klinischen Verlauf vergleichen zu können.

2.3 Retrospektive Erhebung von SMA Typ 1-Patienten mittels Fragebogen

Kriterien für den Fragebogen :

- Kurze, einfach verständliche Fragen
- Klar gestellte Fragerichtung
- Vorgabe von eindeutigen Antwortmöglichkeiten
- Raum für freie Antworten

Fragebogen: siehe nächste Seite

-Kollaborative Studie- Krankheitsverlauf der infantilen spinalen Muskelatrophie

Studienleitung Aachen:
Prof. Dr. Sabine Rudnik-Schöneborn/Prof. Dr. Klaus Zerres
Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum der RWTH
Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen
Tel. 0241- 80 80178, Fax: 0241-80 82580
Email : srudnik-schoeneborn@ukaachen.de

Studienleitung Köln:
Dr. Raoul Heller/ Prof. Dr. Brunhilde Wirth
Institut für Humangenetik, Klinikum der Universität zu Köln
Kerpener Str. 34, 50924 Köln
Tel. 0221- 478 86464, Fax: 0221- 478 86812
Email: raoul.heller@uk-koeln.de

Name, Vorname (des Kindes): _____

Geburtsdatum: _____ gfs. Sterbedatum: _____

Betreuender Kinderarzt (Anschrift): _____

Wer füllt den Fragebogen aus (Verhältnis zum Kind)?

Name, Vorname: _____

1. Schildern Sie bitte zunächst den Krankheitsverlauf in eigenen Worten:

2. Haben sich bei der Schwangerschaft oder bei der Geburt des Kindes Auffälligkeiten ergeben?

- nein Geburt erfolgte nach ____ Schwangerschaftswochen
 ja, welche (z. B. verminderte Kindsbewegungen, vermehrtes Fruchtwasser, erschwerte Geburt)?

3. Wie verlief die kindliche Entwicklung in der ersten Lebenswoche?

- ohne Besonderheiten
 auffällig. Bitte erläutern Sie: _____

4. a) Wann fielen Ihnen bei dem Kind erstmalig Hinweise auf eine Muskelschwäche auf?

- mit ____ Lebenstagen mit ____ Lebenswochen mit ____ Lebensmonaten

4. b) Wann hat der Kinderarzt erstmalig den Verdacht auf eine Muskelschwäche geäußert?

- mit ____ Lebenstagen mit ____ Lebenswochen mit ____ Lebensmonaten

5. Was waren die ersten Symptome (z. B. allgemeine Muskelschlaffheit, verminderte Strampelbewegungen, Probleme beim Kopfheben)?

6. **Wie ist/war die Ernährung des Kindes?**

ohne Einschränkungen

Trink- bzw. Schluckschwierigkeiten ab ____ Wo/Mo Magensonde notwendig ab ____ Wo/Mo

7. **Machen Sie bitte genaue Angaben zur frühkindlichen Entwicklung, den motorischen Meilensteinen:**

Kopfdrehen im Liegen	<input type="radio"/> normal möglich mit ____ Wochen	<input type="radio"/> nie möglich
<input type="radio"/> nur schwach möglich mit ____ (Wo/Mo)	<input type="radio"/> nicht mehr möglich mit ____ (Wo/Mo)	
<input type="radio"/> keine Angaben möglich		
Kopfbeheben in Bauchlage	<input type="radio"/> normal möglich mit ____ Wochen	<input type="radio"/> nie möglich
<input type="radio"/> nur schwach möglich mit ____ (Wo/Mo)	<input type="radio"/> nicht mehr möglich mit ____ (Wo/Mo)	
<input type="radio"/> keine Angaben möglich		
Arme heben	<input type="radio"/> normal möglich mit ____ Wochen	<input type="radio"/> nie möglich
<input type="radio"/> nur Unterarme möglich mit ____ (Wo/Mo)	<input type="radio"/> nicht mehr möglich mit ____ (Wo/Mo)	
<input type="radio"/> keine Angaben möglich		
Beine heben	<input type="radio"/> normal möglich mit ____ Wochen	<input type="radio"/> nie möglich
<input type="radio"/> nur Knie angehoben halten mit ____ (Wo/Mo)	<input type="radio"/> nicht mehr möglich mit ____ (Wo/Mo)	
<input type="radio"/> keine Angaben möglich		
Körper drehen im Liegen	<input type="radio"/> normal möglich mit ____ Monaten	<input type="radio"/> nie möglich
<input type="radio"/> nur vom Bauch auf Rücken möglich mit ____ Monaten	<input type="radio"/> nicht mehr möglich mit ____ Monaten	
<input type="radio"/> keine Angaben möglich		
Sitzposition halten	<input type="radio"/> alleine möglich mit ____ Monaten	<input type="radio"/> nie möglich
<input type="radio"/> nur mit Rückenstütze möglich mit ____ Monaten	<input type="radio"/> nicht mehr möglich mit ____ Monaten	
<input type="radio"/> keine Angaben möglich		
Sich selber hinsetzen	<input type="radio"/> normal möglich mit ____ Monaten	<input type="radio"/> nie möglich
<input type="radio"/> nur mit Hilfe möglich mit ____ Monaten	<input type="radio"/> nicht mehr möglich mit ____ Monaten	
<input type="radio"/> keine Angaben möglich		
Flasche mit beiden Händen zum Mund führen	<input type="radio"/> alleine möglich mit ____ Monaten	<input type="radio"/> nie möglich
<input type="radio"/> nur mit Hilfe möglich mit ____ Monaten	<input type="radio"/> nicht mehr möglich mit ____ Monaten	
<input type="radio"/> keine Angaben möglich		

8. Ist/war irgendeine selbständige Fortbewegung des Kindes möglich (z. B. Rollen, Kriechen, Krabbeln)?

- _____ möglich mit ____ Monaten nie möglich
- nur schwach möglich mit ____ Monaten nicht mehr möglich mit ____ Monaten

9. Wird/wurde das Kind, abgesehen von Medikamenten im Rahmen einer Infektbehandlung, über einen längeren Zeitraum (mindestens einen Monat) mit anderen Medikamenten behandelt?

- nein ja, Behandlungen mit folgenden Präparaten:

_____ von ____ bis ____ (Lebensmonaten)

Hat sich dadurch Ihrer Ansicht nach der Krankheitsverlauf verändert?

- nein ja, bitte erläutern:

- keine Angaben möglich

10. Sind bei dem Kind operative Maßnahmen durchgeführt worden (z. B. Gelenk- oder Wirbelsäulenoperationen)?

- nein ja, folgende Operationen wurden durchgeführt:

_____ mit ____ Monaten

_____ mit ____ Monaten

_____ mit ____ Monaten

11. Wird/wurde das Kind krankengymnastisch behandelt?

- nein ja, wie oft? ____ mal pro Woche

Art der Behandlung: _____ durchgeführt von ____ bis ____ (Lebensmonaten)

Art der Behandlung: _____ durchgeführt von ____ bis ____ (Lebensmonaten)

Art der Behandlung: _____ durchgeführt von ____ bis ____ (Lebensmonaten)

Hat sich dadurch Ihrer Ansicht nach der Krankheitsverlauf verändert? o nein o ja,
bitte erläutern:

o keine Angaben möglich

12. Wird/wurde das Kind wegen schwerer Atemwegsinfektionen (Lungenentzündungen) ärztlich behandelt?

o nein o ja, Behandlungen erforderlich in folgenden Zeiträumen:

_____ mit ____ Monaten

13. Haben sich Probleme bei der Atmung ergeben?

o nein

o Erschwerte Atmung mit ____ Monaten o Atemhilfe erstmals mit ____ Monaten, welche:

14. Wenn das Kind beatmet wird/wurde, machen Sie hierzu bitte genaue Angaben (z. B. Beatmung bei Infektionen, nur nächtliche oder ganztägige Beatmung, Maskenbeatmung oder Anlage eines Zugangs über die Luftröhre, sog. Tracheostoma):

o Beatmung weniger als 16 Stunden pro Tag in folgenden Zeiträumen:

_____ mit ____ Monaten

_____ mit ____ Monaten

_____ mit ____ Monaten

_____ mit ____ Monaten

o Beatmung mehr als 16 Stunden pro Tag über mehr als 14 Tage ohne Pause in folgenden Zeiträumen:

_____ mit ____ Monaten

_____ mit ____ Monaten

_____ mit ____ Monaten

Wenn das Kind beatmet wird/wurde, durch welchen Arzt/Klinik wird/wurde die Beatmung veranlasst bzw. betreut? (Bitte vollständige Anschrift angeben)

15. Vereinzelt sind bei langzeit-beatmeten Kindern mit einer SMA Typ I im Laufe der Zeit Störungen des sog. vegetativen Nervensystems (z.B. auffällig langsamer oder schneller Herzschlag, Blutdruckschwankungen, vermehrtes Schwitzen) oder der Harnentleerung beschrieben worden. Haben Sie bei Ihrem Kind ähnliche Beobachtungen gemacht?

nein keine Angaben möglich ja, bitte genaue Angaben:

_____ mit ____ Monaten

_____ mit ____ Monaten

_____ mit ____ Monaten

16. Haben Sie zur Betreuung des Kindes besondere Hilfsmittel in Anspruch genommen (z. B. Sitzhilfen, Beinschienen o. ä.)?

nein ja, folgende Hilfsmittel werden/wurden verwendet:

_____ von ____ bis ____ (Lebensmonaten)

_____ von ____ bis ____ (Lebensmonaten)

_____ von ____ bis ____ (Lebensmonaten)

17. Möchten Sie weitere Bemerkungen, auch zu diesem Fragebogen, machen?

Datum

Unterschrift

Herzlichen Dank für Ihre Mitarbeit!

2.4 Bestimmung der *SMN2*- Kopienzahl auf der Basis der Real-time LightCycler PCR

Um die genaue Anzahl der *SMN2*-Genkopien zu bestimmen, wurde die von Feldkötter et al. 2002 spezifisch für *SMN* beschriebene quantitative PCR Methode eingesetzt.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt eine Methode zur Amplifizierung von Nukleinsäuren dar. Dabei ähneln die Reaktionsabläufe denen der natürlichen Replikation. Die DNA-Polymerase synthetisiert, ausgehend von Startermolekülen, einen neuen DNA-Strang an einer einsträngigen Nukleinsäure-Matrize. Als Startermoleküle werden bei der PCR synthetische DNA- Oligonukleotide (Primer) verwendet, die an die Matrizen-DNA hybridisieren. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Oligonukleotidprimerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird.

Real-Time LightCycler PCR :

Im Gegensatz zur Endpunkt-PCR findet bei der Real-Time PCR die Quantifizierung nicht in der Plateau-Phase, sondern bereits in der exponentiellen Phase der PCR statt, da in dieser Phase mit jedem Zyklus eine exakte Verdopplung des eingesetzten Materials vorliegt und somit die Amplifizierung der DNA präzise und in allen Proben gleich gut stattfindet.

Der Messfehler in der exponentiellen Phase ist sehr klein. Dadurch wird eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit bei der Quantifizierung erreicht. Bei der Echtzeit-PCR (Real-Time-PCR) laufen prinzipiell die gleichen Vorgänge ab wie bei der traditionellen PCR:

Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch hohe Temperaturen, Entstehung von Einzelsträngen, Anlagerung der Primer an jeweils einen Strang, Verlängerung der Primer durch eine DNA-Polymerase und Herstellung von einer Kopie des jeweiligen DNA-Stranges, Wiederholung in mehreren Zyklen.

Der Name Echtzeit-PCR leitet sich von der Tatsache ab, dass ein Gerät (z.B. LightCycler der Firma Roche) in der Lage ist, nach jedem einzelnen Zyklus der PCR die Menge an DNA in der jeweiligen Probe zu bestimmen.

Mit diesen Geräten wird während der PCR für jede Probe „zeitnah“ eine Kurve erhalten, die nach jedem einzelnen PCR-Zyklus beschreibt, wie viel DNA gerade in der Probe vorhanden ist.

Für jede Probe wird während der PCR eine solche Kurve aufgezeichnet. Die Detektion der entstandenen doppelsträngigen DNA erfolgt über Fluoreszenzmessung, z.B. mit Hilfe des Farbstoffes SYBR Green. SYBR Green wird jeder Probe vor Beginn der PCR zugegeben. SYBR Green ist in der Lage, an doppelsträngige DNA zu binden. Nach erfolgter Bindung fluoresziert der DNA-SYBR Green-Komplex grün. Je mehr DNA also im Laufe der PCR gebildet wird, desto mehr kann SYBR Green binden und umso stärker wird die gemessene Fluoreszenz. Der Farbstoff ist jedoch nicht in der Lage, an einzelsträngige DNA zu binden. Dadurch können z.B. Primer nicht mit detektiert werden, da SYBR Green nicht an diese binden kann. Ungebunden fluoresziert SYBR Green nicht.

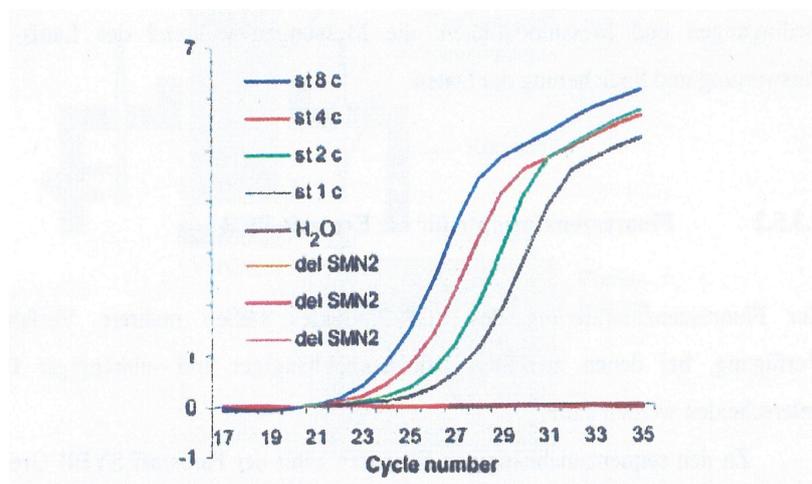


Abb.3: Typische Fluoreszenzsignalverlaufskurve. Auf der Abszisse ist die Zyklenzahl dargestellt, auf der Ordinate die relative Intensität des Fluoreszenzsignals. Durch Vergleich mit einem Standard wird die Zahl der *SMN2*-Kopien bestimmt. In der Legende entspricht die Abkürzung „st8c“ acht *SMN2*-Kopien, „st4c“ vier Kopien, „st2c“ zwei Kopien und „st1c“ einer Kopie (Feldkötter et al. 2002).

Nach Beendigung der PCR wird die aufgezeichnete Kurve mittels einer speziellen Computersoftware ausgewertet. Die Quantifizierung der ursprünglich eingesetzten DNA-Menge erfolgt nun auf der Basis des Messwertes in der exponentiellen Phase. Dazu wird ein sogenannter Schwellenwert (Treshold) festgesetzt. Dieser beschreibt einen Zeitpunkt während der PCR, an dem die Amplifikation schon einige Zyklen durchlaufen hat (eine Messung nach nur zu wenigen PCR-Zyklen hätte ungenaue Ergebnisse zur Folge, da die Messergebnisse noch nicht stabil sind). Der Schwellenwert muss sich aber gleichzeitig noch in der exponentiellen Phase der PCR befinden. Durch den Schnittpunkt der PCR-Kurve einer jeder einzelnen Probe mit der Waagerechten für den Schwellenwert ergibt sich ein sogenannter Ct-Wert.

Der Ct-Wert jeder Probe wird dann mit Hilfe einer Standardkurve umgerechnet. Die Standardkurve ergibt sich aus der Messung von Eichlösungen, die bekannte DNA-Mengen erhalten. Jeder dieser bekannten Proben kann nach der Messung ein Ct-Wert zugeordnet werden. Trägt man diese Ct-Werte dann in einem Koordinatensystem gegen die ursprünglich eingesetzte DNA-Menge auf, ergibt sich eine Standardkurve. Auf der Basis dieser Kurve können dann die Ct-Werte der unbekannt Proben umgerechnet werden und es kann eine Aussage getroffen werden, in welcher der analysierten Proben anfangs mehr DNA vorhanden war.

Im Gegensatz zur traditionellen PCR wird das bei der Echtzeit-PCR amplifizierte DNA-Fragment üblicherweise nicht auf ein Agarosegel aufgetragen und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Der Nachweis, dass auch tatsächlich das gewünschte DNA-Fragment während des PCR-Laufes entstanden ist und kein anderer (unerwünschter) DNA-Abschnitt amplifiziert wurde, erfolgt durch die Bestimmung der sogenannten Schmelztemperatur. Dies ist ein sehr schnelles und hochspezifisches Nachweisverfahren. Hierfür wird die Tatsache zunutze gemacht, dass die amplifizierten DNA-Fragmente am Ende der PCR als Doppelstrang vorliegen. SYBR Green ist an diese doppelsträngige DNA gebunden, in den Proben ist eine hohe Fluoreszenz messbar. Wird nun schrittweise die Temperatur erhöht, dann gibt es für jedes PCR-Produkt eine einzige ganz spezifische Temperatur, bei der sich die Doppelstränge aufspalten (schmelzen) und in Einzelstränge übergehen. Diese spezifische Temperatur hängt zum Einen von der Länge des PCR-Produktes ab (und damit von der Anzahl der Basen, aus denen das Produkt besteht), zum anderen aber auch von der Art und der Reihenfolge der Basen, aus denen sich das Produkt aufbaut (G und C bedingen höhere

Schmelztemperaturen als A und T). Geht das doppelsträngige PCR-Produkt in Einzelstränge über, kann SYBR Green nicht mehr binden. Damit kommt es bei Erreichen der spezifischen Schmelztemperatur zu einem rapiden Abfall der messbaren Fluoreszenz in der Probe.

Anders gesagt: Bei dieser spezifischen Temperatur ist eine starke Änderung der Fluoreszenz in der Probe messbar. Die Bestimmung der Schmelztemperatur ist sehr spezifisch, da auch Produkte gleicher Länge noch unterschieden werden können, wenn sie sich aus unterschiedlichen Basen zusammensetzen und sich die Basenabfolge im DNA-Fragment unterscheidet.

Die verwendeten Primer sind in der Lage genau zwischen *SMN1* und *SMN2* zu differenzieren, da diese exakt auf oder sehr nahe der Basenpaarunterschiede zwischen *SMN1* und *SMN2* in Exon 7 an Position 6 und Intron 7 an Position +214 binden.

SMN1 wird mit Hilfe des forward Primer telSMNex7forw (5'-TTTATTTTCCTTACAGGGTTTC-3') und des reverse Primer telSMNint7rev (5'-GTGAAAGTATGTTTCTTCCACgTA-3') amplifiziert.

SMN2 wird mit Hilfe des forward Primer cenSMNex7forw (5'-TTTATTTTCCTTACAGGGTTTTA-3') und des reverse Primer cenSMNint7rev (5'-GTGAAAGTATGTTTCTTCCACgCA-3') amplifiziert (Feldkötter et al. 2002).

Pipettierschema für die quantitative PCR:

Reaktionsansatz (10µl):	1,2µl DNA (5ng/µl)
	1,0µl FastStart DNA Master SYBR Green
	1,0µl Primer 1466 (10 pmol/µl)
	1,0µl Primer 1467 (10 pmol/µl)
	1,2µl MgCl ₂ (25 mM)
	4,6µl Aqua dest.

PCR-Bedingungen :

Initiale Denaturierung :	95°C für 10:00min
Gefolgt von 35 Zyklen bestehen aus:	95°C für 00:15min
	58°C für 00:05min
	72°C für 00:25min
	76°C für 00:01 min zur Fluoreszenzmessung

2.5 Auswertung der Daten

Alle Daten, welche sich aus den Fragebögen, Arztbriefen und Telefonaten mit den behandelnden Ärzten ergeben haben, wurden von mir in eine von Dr. Radu Wirth programmierte Access-Datenbank eingegeben. Alle Daten wurden zum Schluss von Dr. Radu Wirth in eine Excel-Tabelle zusammengefasst, so dass statistische und graphische Auswertungen möglich waren.

2.6 Überlebenszeitkurve nach Kaplan-Meier

In dieser Arbeit wird der Begriff „funktioneller Tod“ verwendet, der folgendermaßen definiert ist: Funktioneller Tod bedeutet, dass das Kind entweder gestorben ist oder aber über einen Zeitraum von mehr als 14 Tagen länger als 16 Stunden pro Tag beatmet wurde.

Die grafische Darstellung der Überlebenszeitverteilung erfolgt in Form einer umgekehrten Summenhäufigkeitsfunktion.

Zunächst werden die Überlebenszeitkurven berechnet, die angeben, nach welcher Zeit noch welcher Anteil der beobachteten Patienten am Leben war. Allerdings kann für diese Berechnung nicht einfach die anfängliche Zahl der Patienten als 100% gesetzt werden, weil nicht alle Patienten über die gesamte Dauer der Untersuchung beobachtet wurden.

Stattdessen wird für jeden Tag/Monat die Wahrscheinlichkeit errechnet, diesen lebend zu überstehen. Die Wahrscheinlichkeit, am Ende des x-ten Tages/Monats noch zu leben, ergibt sich nach dem Multiplikationssatz als Produkt aus der Wahrscheinlichkeit, zu Beginn des x-ten Tages/Monats zu leben, und der Wahrscheinlichkeit, den x-ten Tag/Monat lebend zu überstehen.

Für alle Tage/Monate, an denen niemand gestorben ist, beträgt die Wahrscheinlichkeit des Überlebens 100%, so dass nur für die Tage/Monate Berechnungen durchgeführt werden müssen, an denen Todesfälle aufgetreten sind.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit am Tage x berechnet sich als Quotient: überlebende Patienten/beobachtete Patienten, wobei die am Tage x noch unter Beobachtung stehenden Patienten berücksichtigt werden.

Die hier beschriebene Methode der Berechnung der Überlebenszeiten, die als Kaplan-Meier-Methode bekannt ist, berücksichtigt die Informationen aller Patienten so lange,

wie diese beobachtet worden sind. Der erste Teil der Überlebenskurve stellt eine relativ genaue Schätzung dar, weil er sich auf viele Patienten stützt. Der letzte Teil der Kurve bezieht sich nur auf wenige Patienten mit entsprechend langer Beobachtungszeit und ist deshalb mit einer größeren Ungenauigkeit behaftet (Volker Harms, Biomathematik, Statistik und Dokumentation 1998).

3. Ergebnisse

Ich habe nicht alle Punkte des Fragebogens bearbeitet, da es sich bei dieser Studie um eine gemeinschaftliche Studie mit dem Institut für Humangenetik der RWTH Aachen handelt und meine Mitdoktorantin Corinna Berg und ich die Fragen untereinander aufgeteilt haben.

3.1 Ergebnisse bezogen auf die Kölner Patienten

3.1.1 Fragebogen

Insgesamt wurden die Patienten während eines Jahres rekrutiert (03/2006-03/2007).

Vom Kölner Zentrum wurden insgesamt 75 Patienten angeschrieben, von denen 31 an der Studie teilgenommen haben. Von diesen 31 Patienten wurden 28 nicht mit Valproat behandelt und drei Patienten befanden sich bereits in einer Behandlung mit Valproat (Abb.4).

Vom Aachener Zentrum wurden 99 Patienten kontaktiert, von denen 35 an der Studie teilgenommen haben. Von diesen 35 Patienten wurden 29 nicht mit Valproat behandelt und sechs Patienten befanden sich bereits in einer Valproat-Behandlung (Abb.4).

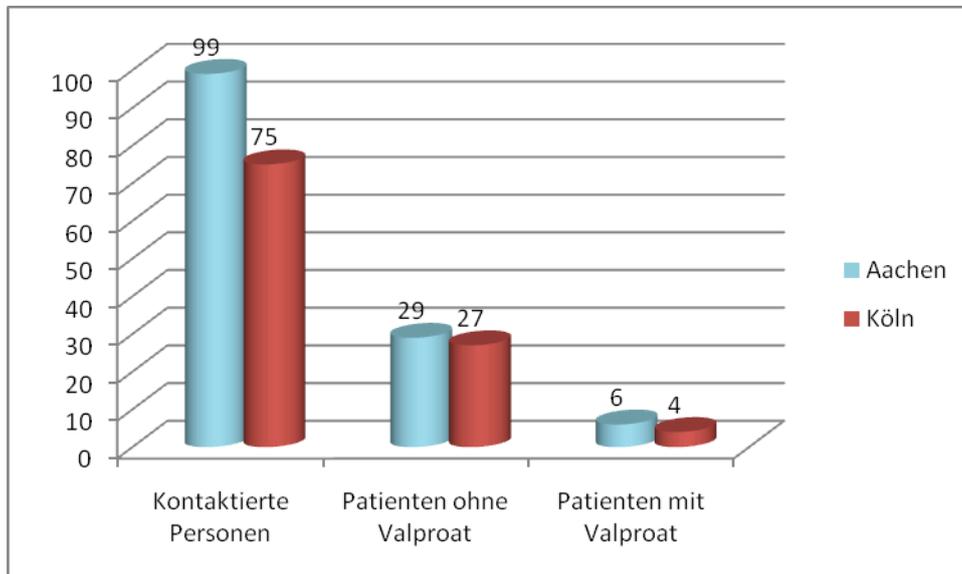


Abb.4: Darstellung der vom Kölner- und Aachener-Zentrum kontaktierten Patienten sowie der Anzahl der an der Studie teilnehmenden Patienten.

Von den insgesamt 75 kontaktierten Patienten haben wir aufgrund vorausgegangenem persönlichen Kontakt sechs Familien direkt angeschrieben, und 69 Briefe haben wir mit der Bitte um Weiterleitung dem jeweils behandelnden Arzt zugesandt (Tab.3).

Insgesamt haben sich von den ursprünglich 75 angeschriebenen Familien (direkt oder über behandelnde Ärzte) 31 (41%) durch Ausfüllen der Teilnahmeerklärung und des Fragebogens zur Teilnahme an unserer Studie bereiterklärt (Tab.3). Sechs Elternpaare wollten auf eigenen Wunsch hin nicht an der Studie teilnehmen. Diesen Wunsch haben wir selbstverständlich akzeptiert. Bei zwei Familien scheiterte das Ausfüllen des Fragebogens an der sprachlichen Barriere. In diesen Fällen wäre ein türkischer Fragebogen notwendig gewesen. Zu 11 Familien konnte kein Kontakt hergestellt werden, da diese unbekannt verzogen waren und weder von uns noch von den behandelnden Ärzten ausfindig gemacht werden konnten. Bei 25 Familien ist uns die genaue Ursache nicht bekannt, weswegen diese nicht an der Studie teilgenommen haben.

	Kölner-Zentrum	Aachener-Zentrum	Gesamtkollektiv
Brief an persönlich bekannte Familie	6	5	11
Brief an behandelnden Arzt	69	94	163
Teilnehmer an der Studie	31 (41%)	35 (35%)	66 (38%)

Tab.3: Übersicht über den Weg der Kontaktherstellung zu den Patienten und der daraus resultierenden Teilnehmerzahl.

Der prozentual bessere Rücklauf des Kölner- im Vergleich zum Aachener-Zentrum könnte damit zusammenhängen, dass das Kölner-Zentrum nur Patienten kontaktiert hat, die bereits in Köln diagnostiziert worden waren.

Dagegen hat das Aachener-Zentrum bei der Patientenrekrutierung zusätzlich zum eigenen auch auf das Patientenpool zwei weiterer humangenetischer Institute zurückgegriffen.

Es ist daher zu vermuten, dass die Bereitschaft der angeschriebenen Familien an einer Studie teilzunehmen geringer ist, wenn diese mit dem anschreibenden humangenetischen Zentrum zuvor noch nicht in Kontakt standen.

3.1.2 Überlebenskurve aller Kölner Patienten (bis Beatmung)

Die durchschnittliche Überlebensrate der 27 Kölner Patienten ohne VPA-Behandlung bis zu ihrem funktionellen Tod (Endpunkte „Tod“ oder „länger als 14 aufeinander folgende Tage mit mindestens 16-stündiger Beatmung“) betrug 9,1 Monate und die mediane Überlebensdauer betrug 7 Monate (Abb.5).

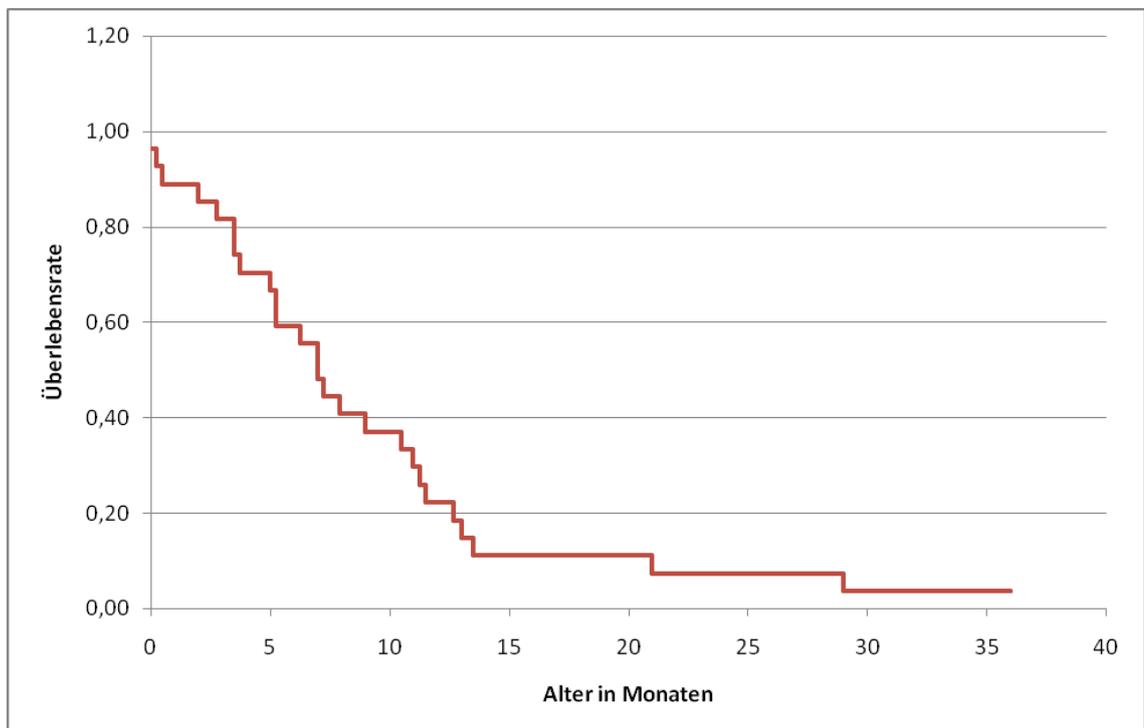


Abb.5: Darstellung aller teilnehmenden Kölner Patienten ohne VPA-Behandlung (N=27) bis zu ihrem funktionellen Tod (Endpunkte „Tod“ oder „länger als 14 aufeinander folgende Tage mit mindestens 16-stündiger Beatmung“) anhand einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve.

3.1.3 Überlebenskurve der männlichen/weiblichen Kölner Patienten

Die durchschnittliche Überlebensrate bei den männlichen Kindern (N=15) betrug 6,25 Monate und die mediane Überlebensdauer betrug 5,25 Monate (Abb.6).

Bei den weiblichen Kindern (N=12) lag die durchschnittliche Überlebensrate hingegen bei 12,7 Monaten und die mediane Überlebensdauer betrug 11,4 Monate (Abb.6).

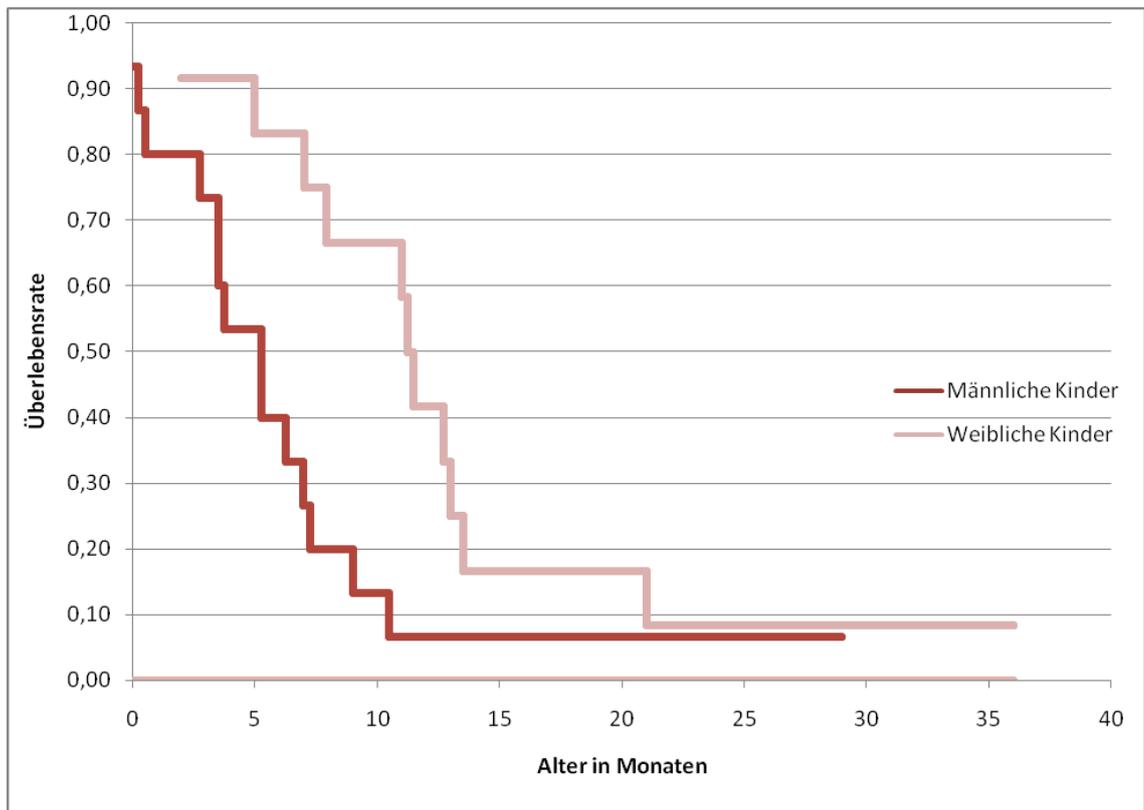


Abb.6: Darstellung der Überlebenskurven der männlichen (N=15) und weiblichen (N=12) Kölner Kinder bis zu ihrem funktionellen Tod (Endpunkte „Tod“ und „länger als 14 aufeinander folgende Tage mit mindestens 16-stündiger Beatmung“).

3.1.4 Patienten unterteilt nach Erstmanifestation der Erkrankung

Die Patienten wurden abhängig von ihrem Erkrankungsbeginn in drei Gruppen unterteilt (Tab.4).

Gruppe I umfaßt die Patienten, bei denen die Erstmanifestation innerhalb des ersten Lebensmonats auftrat. Die Gruppe II umfaßt Kinder, deren Erkrankungsbeginn zwischen dem ersten und zweiten Lebensmonat lag, und in der Gruppe III befinden sich die Kinder, welche nach dem zweiten Lebensmonat erste Krankheitszeichen aufgewiesen haben.

Bei den 13 Kindern der Gruppe I fielen bei sieben (53,8%) verminderte fetale Bewegungen auf. Keines dieser Kinder konnte den Kopf heben oder mit Unterstützung sitzen. Sieben Kinder (53,8%) hatten im Verlauf ihrer Erkrankung eine oder mehrere Pneumonien und vier (30,7%) hatten innerhalb der ersten zwei Lebenswochen Atemschwierigkeiten. Sechs Patienten (46,1%) wurden zu irgendeinem Zeitpunkt beatmet. Das mediane Überlebensalter betrug 4,28 Monate (Tab.4, Abb.7).

In der Gruppe II (N=7) zeigte sich bei vier Patienten eine verminderte fetale Bewegung, ein Kind konnte den Kopf heben, aber keines der Kinder konnte mit Unterstützung sitzen. Vier Kinder dieser Gruppe erlitten während ihres Lebens eine oder mehrere Pneumonien. Drei Kinder (48,8%) wurden beatmet, jedoch hatte kein Kind innerhalb der ersten zwei Lebenswochen Atemprobleme. Das mediane Überlebensalter betrug 12 Monate (Tab.4, Abb.7).

Bei den Kindern aus der Gruppe III (N=7) fielen bei zwei (28,6%) verminderte vorgeburtliche Kindsbewegungen auf. Zwei Kinder besaßen die motorische Fähigkeit ihren Kopf zu heben, allerdings konnte keines mit Unterstützung sitzen. Kein Kind aus dieser Gruppe hatte innerhalb der ersten zwei Lebenswochen respiratorische Probleme, dennoch wurden fünf beatmet und ein Kind erlitt mindestens eine Pneumonie. Das mediane Überlebensalter betrug 15,1 Monate (Tab.4, Abb.7).

	Gruppe I (N=13) Beginn: < 1 Monat	Gruppe II (N=7) Beginn: 1-2 Monate	Gruppe III (N=7) Beginn: > 2 Monate
Verminderte vorgeburtliche Kindsbewegung	7 (53,8%)	4 (57%)	2 (28,6%)
Kopfkontrolle vorhanden	0 (0%)	1 (14,2%)	2 (28,6%)
Mit Unterstützung sitzen	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Pneumonien (klinisch-anamnestisch)	7 (53,8%)	4 (57%)	1 (14,3%)
Atemprobleme in den ersten 2 Lebenswochen	4 (30,7%)	0 (0%)	0 (0%)
Beatmung	6 (46,1%)	3 (42,8%)	5 (71,4%)
Medianes Überleben	4,28 (0-13,5)	12 (3,75-29)	15,07 (7-36)

Tab.4: Unterteilung der Kölner Patienten (N=27) abhängig von ihrem Erkrankungsbeginn in drei Gruppen.

Bei dieser Unterteilung der SMA Typ 1-Patienten in drei Gruppen, abhängig vom Zeitpunkt der Erstmanifestation, sind deutliche Unterschiede bezüglich Schweregrad der Erkrankung und motorischer Entwicklung zwischen den Gruppen zu erkennen (Tab.4, Abb.7).

Eine Einteilung der SMA Typ 1-Patienten in diese drei Gruppen kann daher als grobe Orientierung hinsichtlich der Prognostik des Krankheitsverlaufes und der Überlebenslänge angesehen werden, jedoch erlaubt diese Einteilung keine sicheren und zuverlässigen prognostischen Aussagen (siehe z.B. die Spannweite der Überlebenslänge in den einzelnen Gruppen).

Die Patienten, welche der Gruppe I zugeordnet wurden, haben die ungünstigste Prognose; die Patienten der Gruppe III besitzen die beste Prognose.

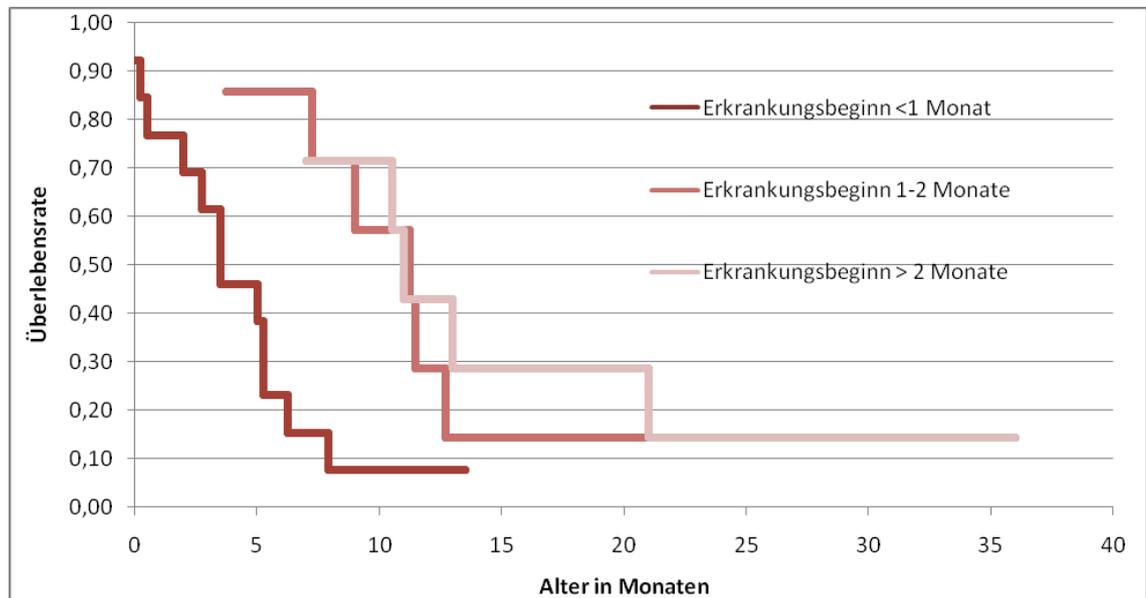


Abb.7: Darstellung der Überlebenskurven der Kölner Patienten (N=27) abhängig von ihrem Erkrankungsbeginn.

3.1.5 Überlebenskurve von Kölner Patienten differenziert nach vorhandener/nicht vorhandener Kopfkontrolle

Bei den Patienten, die ihren Kopf zu heben in der Lage waren (Kopfkontrolle, N=3), betrug die durchschnittliche Überlebensrate 19 Monate und die mediane Überlebensdauer 21 Monate (Abb.8).

Die Patienten, die keine Kopfkontrolle erlangten (N=24), überlebten durchschnittlich 7,9 Monate und die mediane Überlebensdauer betrug 6,6 Monate (Abb.8). Aus diesen Zahlen geht eindeutig hervor, dass der Faktor „Kopfkontrolle“ bei den SMA Typ 1-Patienten mit der Lebensdauer positiv korreliert.

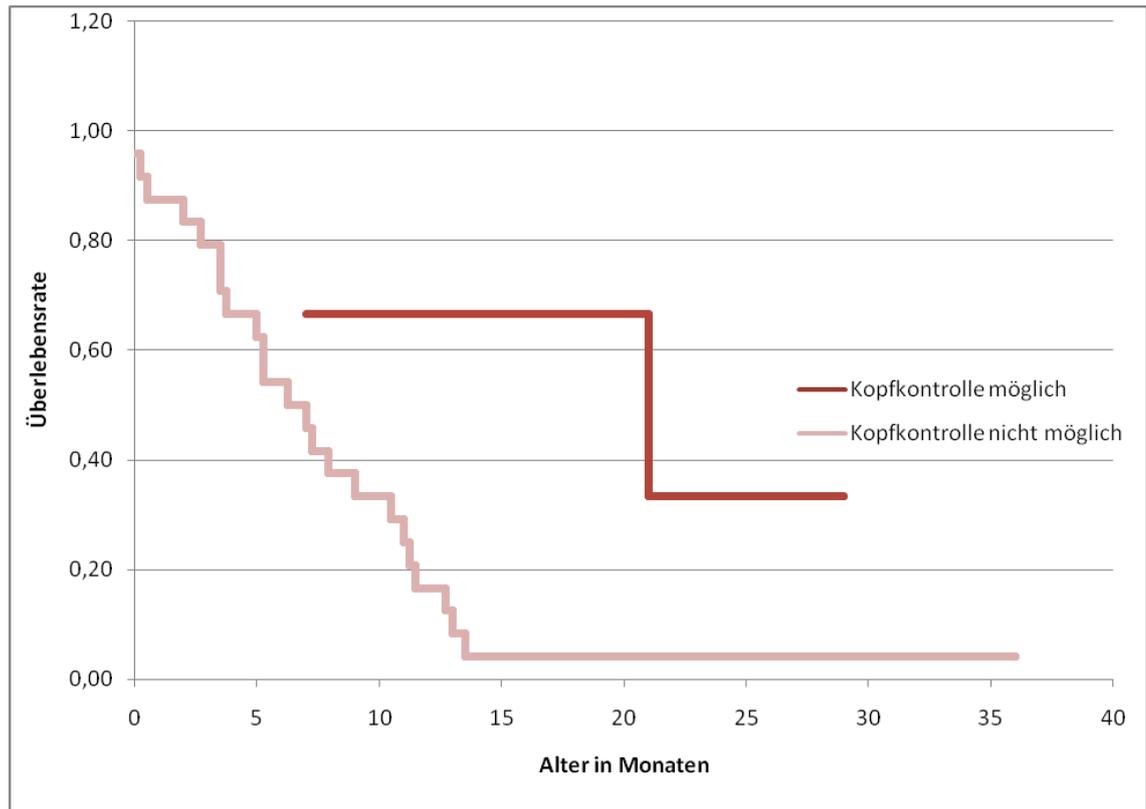


Abb.8: Überlebenskurven der Kölner Patienten (N=27) unterteilt nach der Fähigkeit, ob Kopfkontrolle vorhanden war (N=3) oder nicht (N=24).

3.1.6 Gruppenvergleich nach Amico et al. (pers. Mitteilung)

Von den 27 Patienten, welche an unserer Studie teilgenommen haben, waren 15 (55,6%) männlich und 12 (44,4%) weiblich.

Bei 12 (44,4%) traten verminderte fetale Bewegungen auf. Drei Patienten (11,1%) hatten bereits bei Geburt respiratorische Schwierigkeiten, wohingegen bei 12 Patienten (44,4%) neonatale Auffälligkeiten (neurologische Zeichen) zu erkennen waren. Ihren Kopf selbstständig heben konnten innerhalb des normalen Zeitraums (4 Monate) nur drei Kinder (11,1%), und überhaupt nicht dazu in der Lage waren 24 Kinder (88,9%). Keines der 27 Kinder war in der Lage, mit Unterstützung zu sitzen. Das mittlere Überlebensalter betrug 9,1 Monate (Tab.5).

	Anzahl	%
Verminderte vorgeburtliche Kindsbewegung	12	44,4
Atemschwierigkeiten bei Geburt	3	11,1
Kopfkontrolle innerhalb von 4 Mon.	3	11,1
später als 4 Mon.	0	0
nie	24	88,9
Frühgeburtliche neurologische Auffälligkeiten	12	44,4
Mit Unterstützung sitzen	0	0
Zum Zeitpunkt der Studie noch am Leben	3	11,1
Medianes Überleben (in Monaten)	9,1	-

Tab.5: Kölner Patienten (N=27) unterteilt nach den in der Studie von Amico et al. (pers. Mitteilung) berücksichtigten Untersuchungskriterien.

Wenn die Untersuchungskriterien und Schwerpunkte der Studie von Amico et al. (pers. Mitteilung), welche in der Einleitung erläutert wurden, auf die Kölner Patienten übertragen werden, entstehen dabei folgende Ergebnisse (Tab.6):

Aus der 1. Gruppe (Kopfkontrolle, N=3) zeigte ein Kind verminderte vorgeburtliche Kindsbewegungen. Alle Patienten dieser Gruppe erlangten innerhalb von vier Monaten motorische Kontrolle über ihren Kopf. Keines der Kinder aus dieser Gruppe hatte direkt nach der Geburt respiratorische Schwierigkeiten oder zeigte frühgeburtliche motorische Auffälligkeiten. Desweiteren war kein Kind in der Lage mit Unterstützung zu sitzen. Das mediane Überlebensalter betrug 19 Monate (Tab.6).

In der 2. Gruppe (keine neonatalen, respiratorischen Probleme, N=21) fielen bei neun (42,8%) verminderte vorgeburtliche Kindsbewegungen auf, und ebenfalls neun (42,8%) waren innerhalb der ersten 21 Tage motorisch auffällig. Keines dieser Kinder war je in

der Lage, den Kopf zu heben oder mit Unterstützung zu sitzen. Das mediane Überlebensalter betrug 8,8 Monate (Tab.6).

Aus der 3. Gruppe (N=3) zeigten alle Kinder verminderte Kindsbewegungen und respiratorische Schwierigkeiten bei Geburt, wie per Definition gefordert, sowie auch motorische Auffälligkeiten innerhalb der ersten 21 Tage. Keines dieser Kinder erlangte die motorische Fähigkeit, den Kopf zu heben oder mit Unterstützung zu sitzen. Das mediane Überlebensalter betrug 1,25 Monate (Tab.6).

	Gruppe 1 (N=3)	Gruppe 2 (N=21)	Gruppe 3 (N=3)
Verminderte vorgeburtliche Kindsbewegung	1 (33,3%)	9 (42,8%)	3 (100%)
Atemschwierigkeiten bei Geburt	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
Neonatale neurologische Auffälligkeiten	0 (0%)	9 (42,8%)	3 (100%)
Kopfkontrolle	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Mit Unterstützung sitzen	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Medianes Überleben (in Monaten)	19	8,8	1,25

Tab.6: Kölner Patienten (N=27) unterteilt in die von Amico et al. (pers. Mitteilung) definierten Gruppen (Cluster).

Gruppendefinition :

Gruppe 1: Patienten mit normalen vorgeburtlichen Kindsbewegungen, ohne respiratorische Schwierigkeiten bei Geburt und Erlangen der Kopfkontrolle.

Gruppe 2: Patienten ohne Atemschwierigkeiten bei Geburt, einige von diesen zeigen verminderte vorgeburtliche Kindsbewegungen und frühgeburtliche neurologische Auffälligkeiten.

Gruppe 3: Patienten mit verminderten vorgeburtlichen Kindsbewegungen, respiratorischen Schwierigkeiten bei Geburt, frühkindlichen neurologischen Auffälligkeiten und ohne Erlangen der Kopfkontrolle.

Aus Tabelle 6 geht eindeutig hervor, dass es bedeutende Unterschiede hinsichtlich der motorischen Entwicklung und des Schweregrades des Krankheitsverlaufes zwischen diesen drei Gruppen gibt.

Die Unterteilung der SMA Typ 1-Patienten in diese drei, von Amico et al. (pers. Mitteilung) definierten Gruppen (Cluster), erscheint daher als sinnvoll.

3.2 Ergebnisse bezogen auf das vereinte Kollektiv von Kölner und Aachener Patienten

3.2.1 Überlebenskurve aller Patienten ohne VPA bis zum funktionellen Tod (N=56)

Die durchschnittliche Überlebensrate aller an der Studie teilnehmenden Patienten ohne Valproinsäure-Behandlung betrug 6,9 Monate.

Die mediane Überlebensdauer betrug 6 Monate (Abb.9).

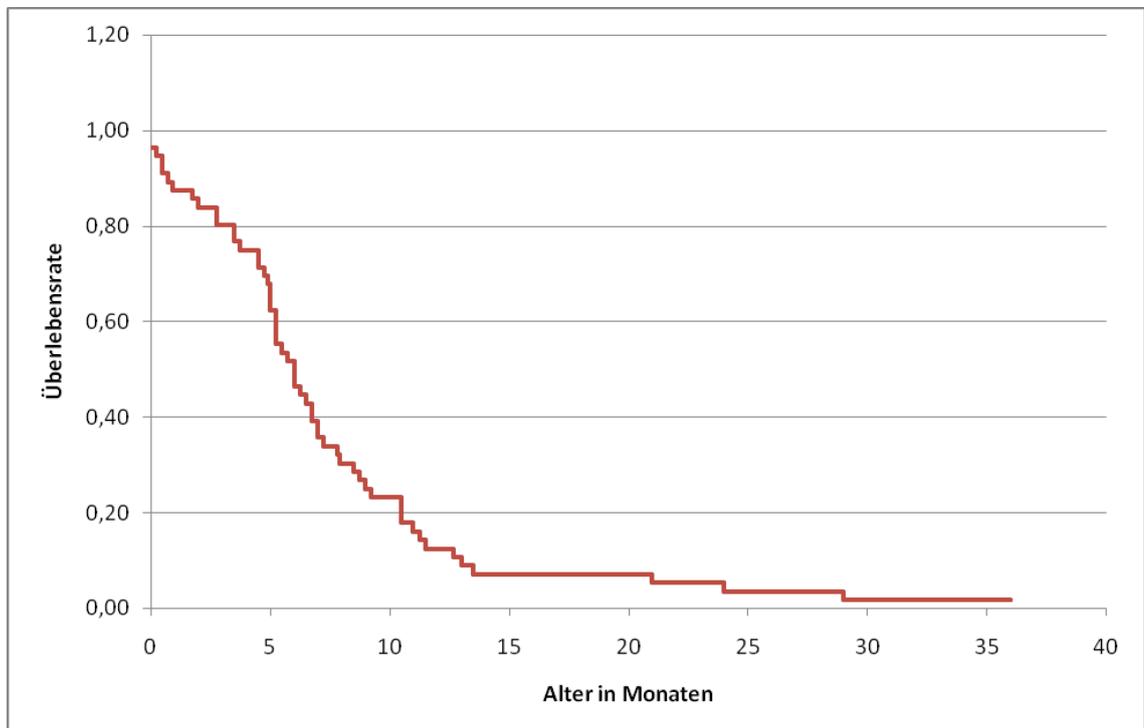


Abb.9: Darstellung der Überlebenskurve aller Patienten des vereinten Kollektivs der Aachener und Kölner Patienten ohne Valproinsäure-Behandlung (N=56) bis zu ihrem funktionellen Tod (Endpunkte „Tod“ und „länger als 14 aufeinander folgende Tage mit mindestens 16-stündiger Beatmung“).

3.2.2 Überlebenskurven der Kölner/Aachener Patienten:

Die Aachener Patienten (N=29) überlebten im Durchschnitt sechs Monate und die mediane Überlebenszeit betrug 5,5 Monate (Abb.10).

Bei den Kölner Patienten (N=27) belief sich die mediane Überlebensdauer auf 7 Monate und durchschnittlich blieben diese 9,1 Monate am Leben (Abb.10).

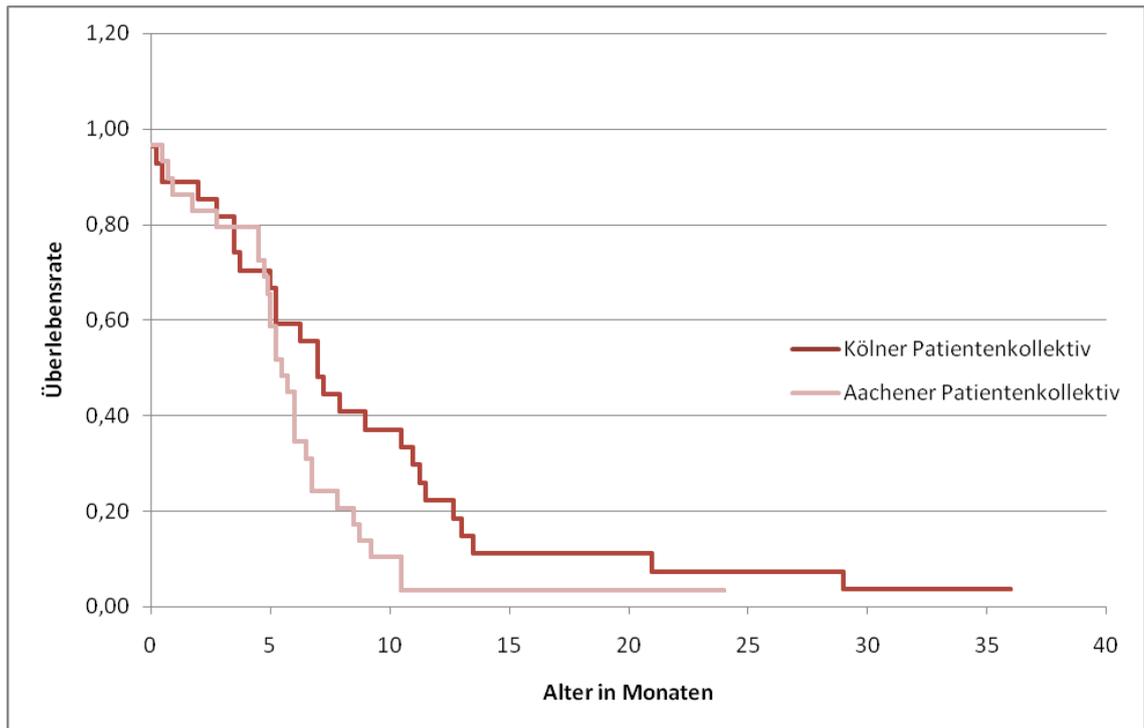


Abb.10: Überlebenskurven des Kölner (N=27) und Aachener (N=29) Patientenkollektivs.

Der deutlich vorhandene Unterschied dieser beiden Überlebenskurven ist möglicherweise wesentlich auf folgende zwei Faktoren zurückzuführen:

1. In dem Kölner Patientenkollektiv sind mehr und extremere Ausreißer bezüglich der Überlebenszeit vorhanden als dies in dem Aachener Patientenkollektiv der Fall ist.

Das Kölner Patientenkollektiv weist folgende Ausreißer auf: 21 Monate, 29 Monate, 36 Monate (Überlebenszeit).

Das Aachener Patientenkollektiv weist lediglich folgenden Ausreißer auf: 24 Monate (Überlebenszeit).

2. Von den Kölner Patienten besitzen zwei der 27 Patienten 3 *SMN2*-Kopien wohingegen von den Aachener Patienten keiner der 29 Patienten 3 *SMN2*-Kopien aufweist.

3.2.3 Überlebenskurve von männlichen /weiblichen Patienten

Bei den männlichen Kindern (N=28) betrug die durchschnittliche Überlebensrate 5,2 Monate und das mediane Überleben 5,25 Monate (Abb.11). Die weiblichen Kinder (N=26) überlebten durchschnittlich 9,5 Monate und die mediane Überlebensdauer belief sich auf 7,45 Monate (Abb.11). Diese Daten deuten darauf hin, dass ein Geschlechtseinfluss bezüglich des Krankheitsverlaufes der SMA Typ 1 vorliegt (siehe Kap. 4.4).

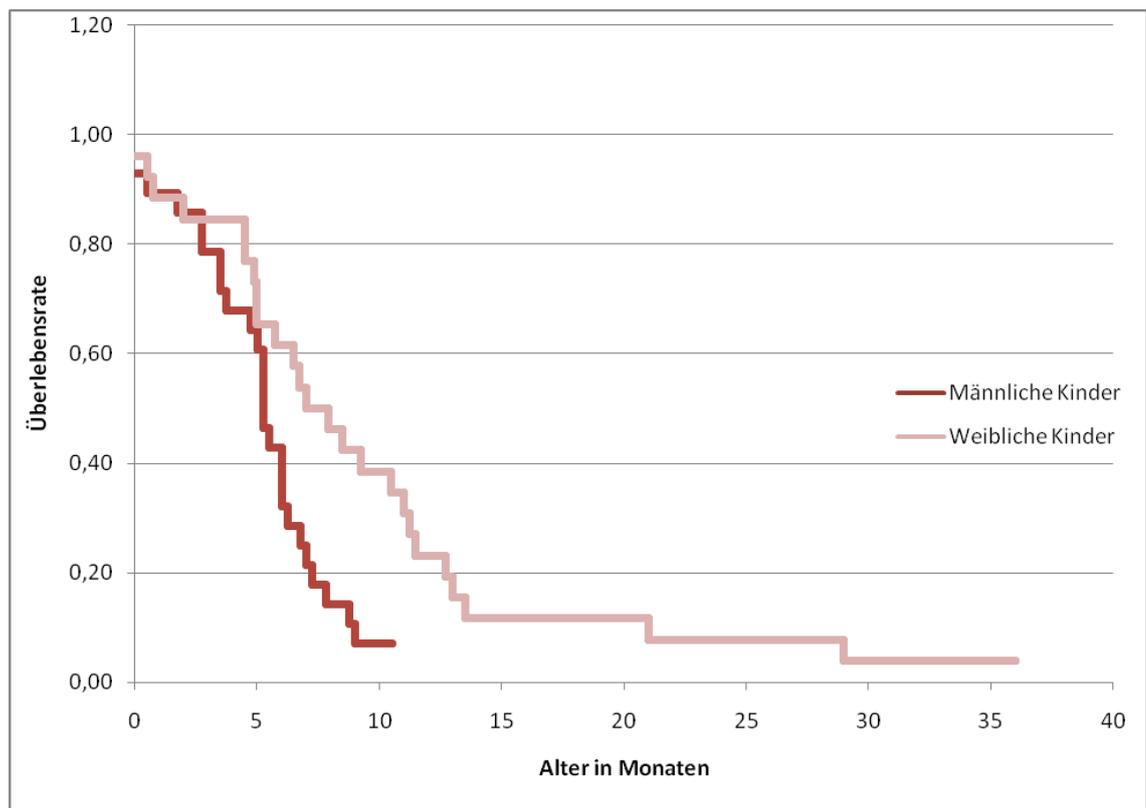


Abb.11: Darstellung der Überlebensrate der männlichen (N=28) und weiblichen (N=26) teilnehmenden Patienten (ohne VPA) anhand von Kaplan-Meier-Überlebenskurven.

3.2.4 Patienten unterteilt nach Erstmanifestation der Erkrankung (gesamtes Patientenkollektiv)

Bei den Kindern, bei denen die Erstmanifestation innerhalb des ersten Lebensmonats aufgetreten war, beträgt das mediane Überlebensalter 4,4 Monate und die durchschnittliche Überlebensdauer 4,3 Monate.

Die Kinder, deren Erkrankungsbeginn zwischen dem ersten und zweiten Lebensmonat lag, überlebten durchschnittlich 9,7 Monate und hatten eine mediane Überlebensrate von 7,5 Monaten.

Die Patienten, welche die ersten Krankheitszeichen erst nach dem zweiten Lebensmonat aufgewiesen haben, besaßen eine mediane Überlebensdauer von 10,5 Monaten und überlebten im Durchschnitt 15,9 Monate.

Aus diesen Daten geht deutlich hervor, dass der Zeitpunkt der Erstmanifestation der Erkrankung mit der durchschnittlichen und medianen Überlebensdauer in Zusammenhang steht (siehe Abb. 12).

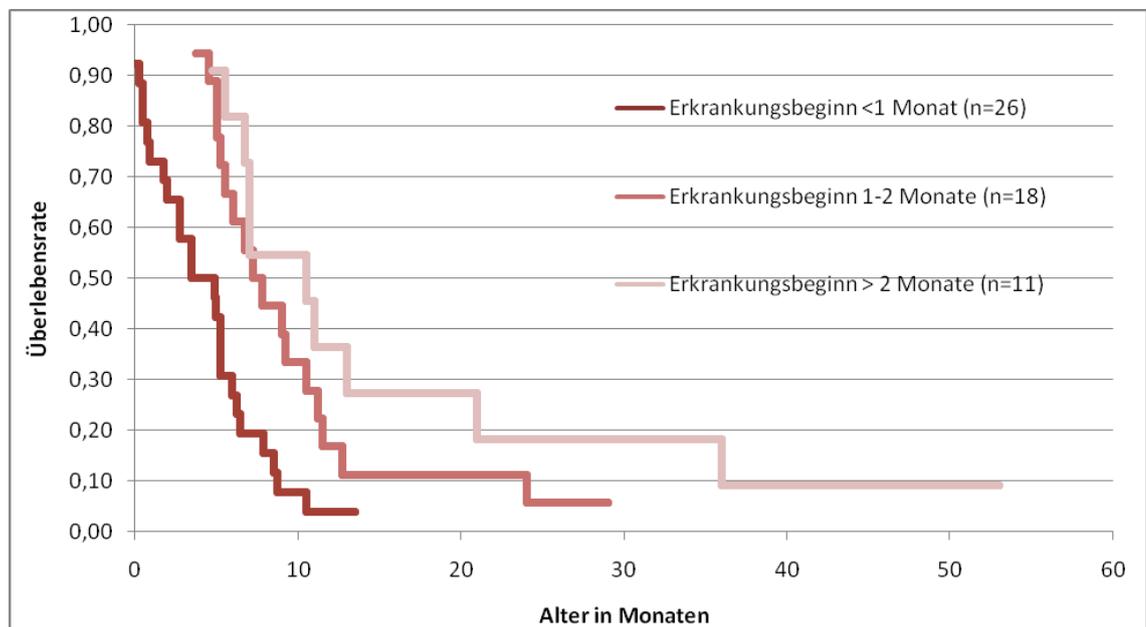


Abb.12: Darstellung der Überlebenskurven der Patienten abhängig vom Erkrankungsbeginn (siehe Legende).

3.2.5 Überlebenskurve der Kölner/Aachener Patienten differenziert nach vorhandener/nicht vorhandener Kopfkontrolle

Die Patienten, die in der Lage waren ihren Kopf zu heben (N=4), haben durchschnittlich 15,4 Monate überlebt und deren mediane Überlebensdauer betrug 14 Monate (Abb.13).

Die Patienten, die ihren Kopf zu heben nicht in der Lage waren (N=52), hatten eine mediane Überlebensdauer von 5,9 Monaten und eine durchschnittliche Überlebensrate von 6,9 Monaten (Abb.13).

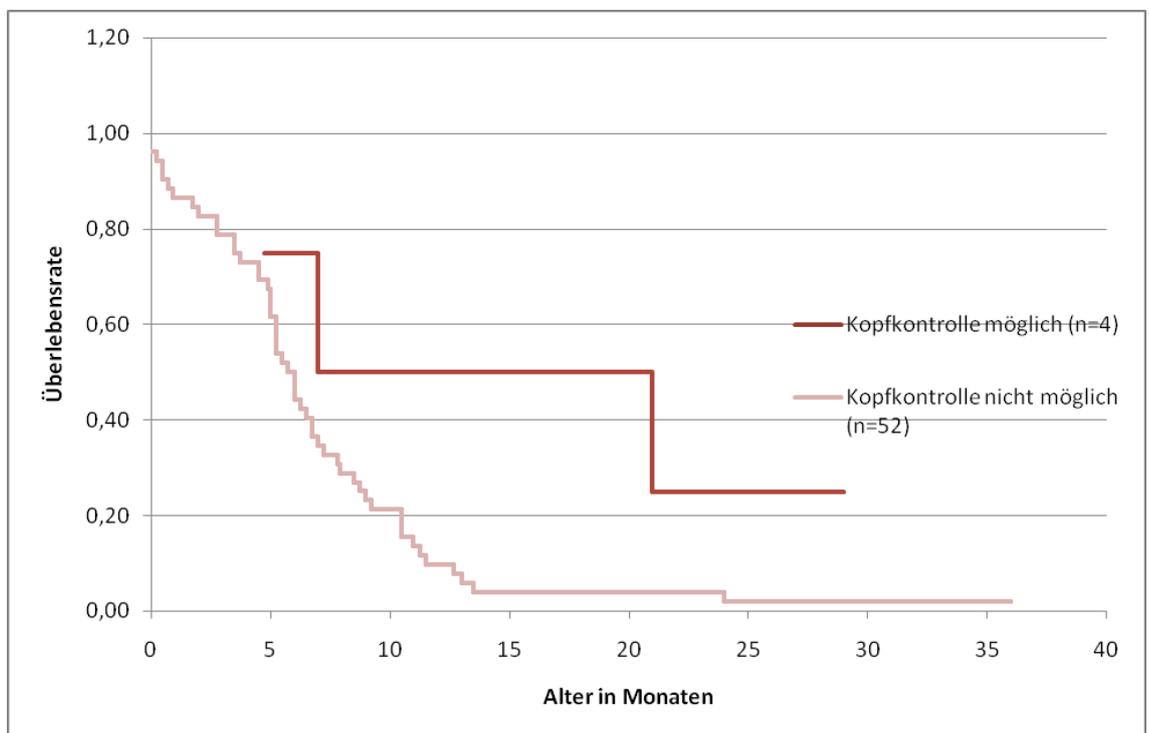


Abb.13: Darstellung der Überlebenskurven der Patienten differenziert nach vorhandener (N=4) bzw. nicht vorhandener (N=52) Kopfkontrolle.

Auch aus dieser Abbildung geht hervor, dass es sich bei der Erlangung der Kopfkontrolle um einen wichtigen motorischen Meilenstein handelt, der ebenfalls Einfluss auf die Überlebensrate zu haben scheint (siehe Kap. 3.1.5).

3.2.6 Überlebenskurven unter Berücksichtigung von Pneumonien (Kölner und Aachener Patienten)

Die Kinder ohne Pneumonie (N=24) haben durchschnittlich 6,8 Monate gelebt und ihre mediane Überlebensdauer betrug 5,25 Monate.

Die durchschnittliche Überlebensrate der Kinder, die in ihrem Leben eine oder mehrere anamnestisch gesicherte Pneumonien hatten (N=24) war 7 Monate und das mediane Überleben betrug 5,6 Monate.

Keines der Kinder mit Pneumonien hat länger als 24 Monate überlebt (Abb.14).

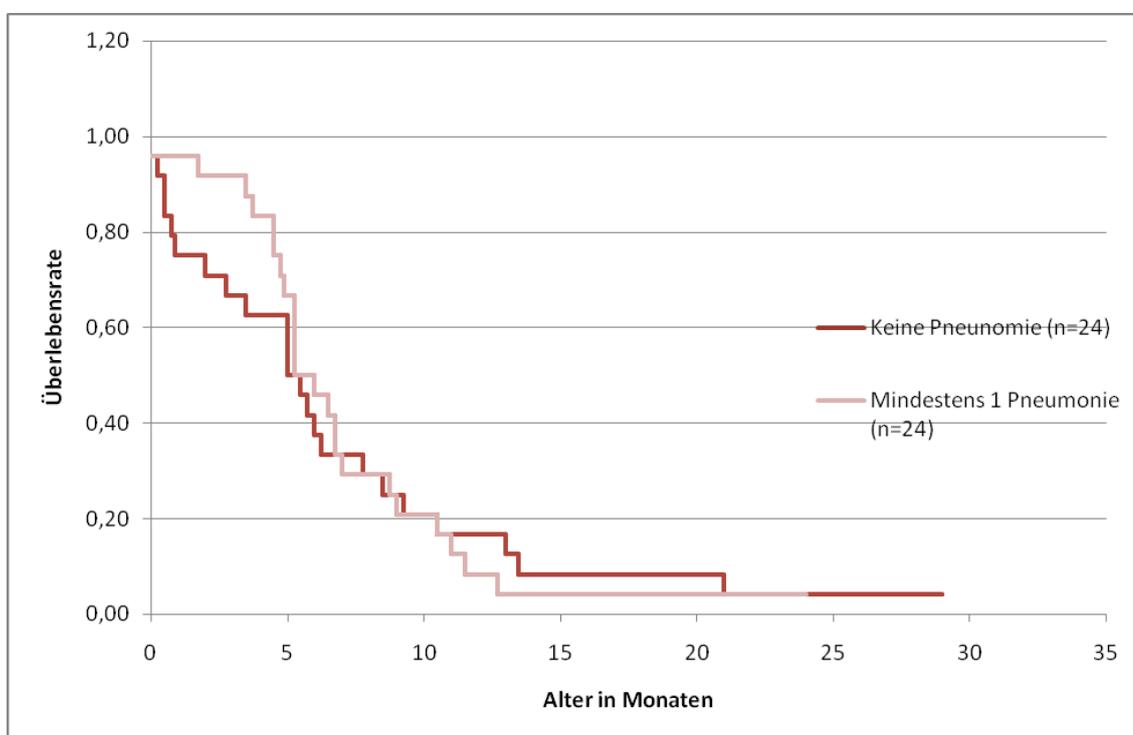


Abb.14: Darstellung der Überlebenskurven der Patienten, die im Verlauf ihrer Erkrankung mindestens eine anamnestisch gesicherte Pneumonie erlitten haben als auch der Patienten, die im Verlauf ihrer Erkrankung keine Pneumonie erlitten haben.

Diese Daten werden so gedeutet, dass das Auftreten von Pneumonien bei SMA Typ 1-Patienten keinen derart gravierend negativen Einfluss auf die Überlebensrate hat, wie erwartet werden könnte.

Eine mögliche Assoziation zwischen dem Auftreten von Pneumonien und der Überlebensrate sollte jedoch weiterhin beobachtet werden.

3.2.7 Überlebenskurve nach Erhalt einer PEG-Anlage (N=42)

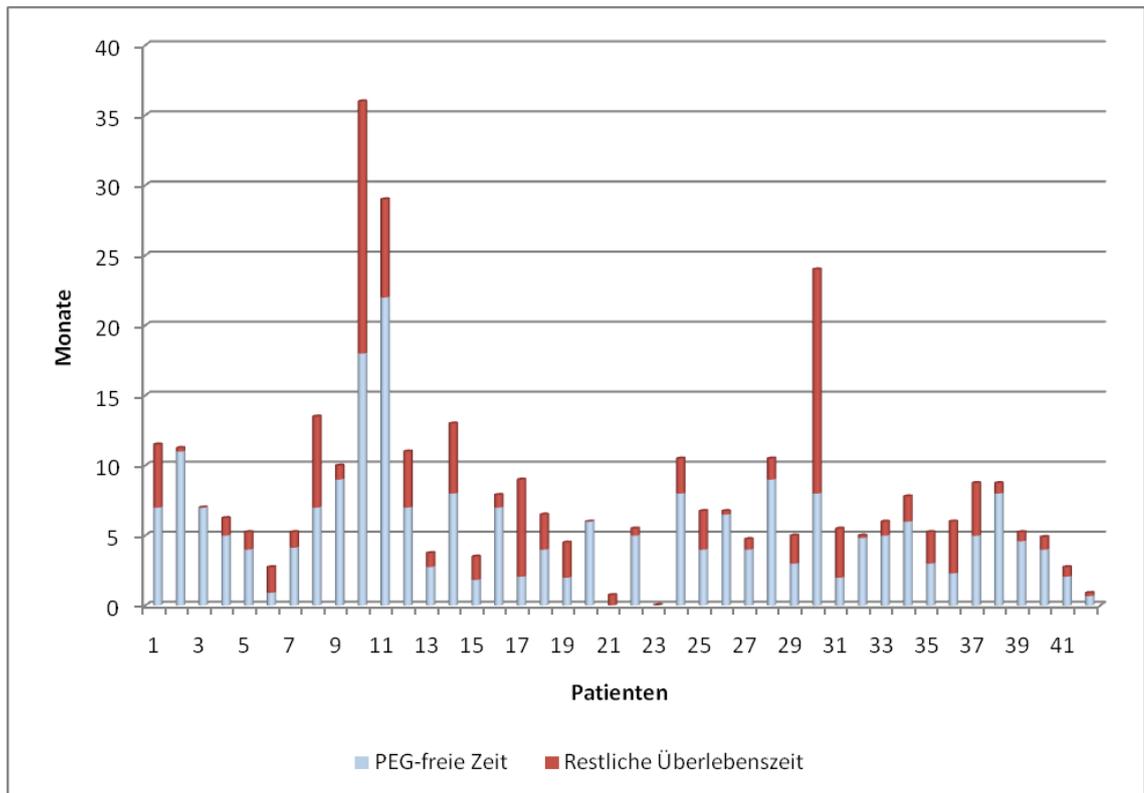


Abb.15: Darstellung des Zeitpunktes, zu dem die 42 Patienten, welche im Verlauf ihrer Erkrankung eine PEG benötigen, diese erhalten haben, sowie der restlichen Überlebenszeit nach PEG-Erhalt.

Durchschnittlich haben diese Kinder die PEG mit 5,5 Monaten erhalten und dann noch 2,7 Monate gelebt (Abb.15).

Die 42 Patienten, die eine PEG-Anlage erhalten haben, haben durchschnittlich 8,2 Monate überlebt. Die durchschnittliche Überlebensrate der 14 Patienten, die im Verlauf ihrer Erkrankung keine PEG-Anlage bekommen haben, betrug 5,6 Monate.

Einige Kinder haben sehr von der PEG profitiert, wohingegen dies bei anderen Kindern nicht der Fall war, ohne jedoch einen eindeutigen Kausalitätszusammenhang feststellen zu können.

3.2.8 Durchschnittsalter von Erkrankungsbeginn/Tod in Abhängigkeit von der *SMN2*-Kopienzahl

Zunächst soll die Häufigkeitsverteilung der Anzahl der *SMN2*-Kopien im Gesamtkollektiv gezeigt werden: Von den insgesamt 56 Patienten besaßen vier (7,1%) nur 1 *SMN2*-Kopie, 50 (89,3%) und damit die große Mehrheit 2 *SMN2*-Kopien und zwei (3,6%) 3 *SMN2*-Kopien. Bei den Kindern mit 1 *SMN2*-Kopie lag der mediane Erkrankungsbeginn bei 0,03 Monaten und das mediane Todesalter bei 0,175 Monaten (Abb.16). Kinder, welche über 2 *SMN2*-Kopien verfügten, erkrankten median mit einem Monat und die mediane Überlebensdauer betrug 6 Monate (Abb.16). Der mediane Erkrankungsbeginn von Kindern, die 3 *SMN2*-Kopien besaßen, lag bei 3 Monaten und der mediane Todeszeitpunkt lag bei 25 Monaten (Abb.16). Diese Zahlen verdeutlichen die Bedeutung der *SMN2*-Kopienzahl im Hinblick auf die Erstmanifestation der Erkrankung und die mittlere Überlebensdauer (Abb.17).

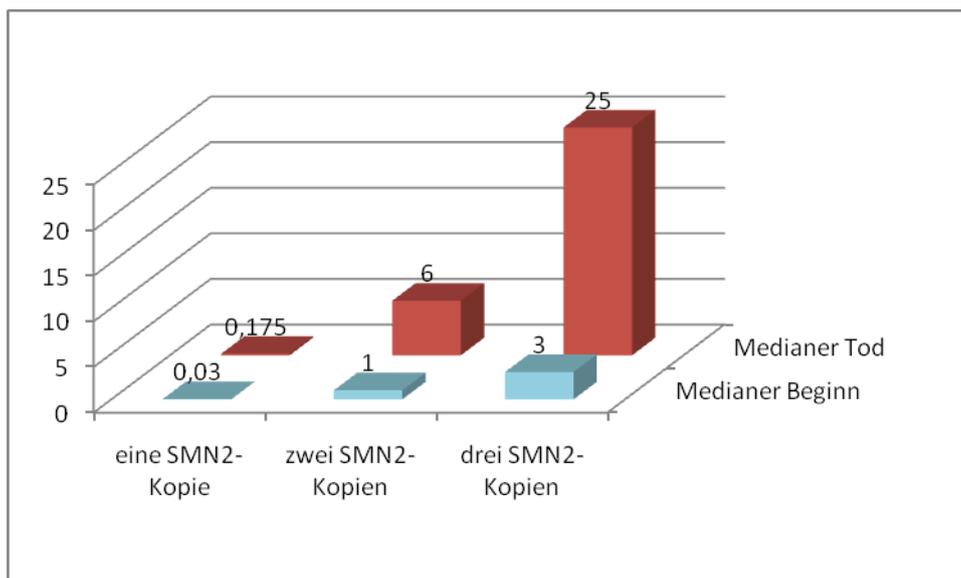


Abb.16: Darstellung des medianen Beginns der Erkrankung und des medianen Todesalters der Patienten in Abhängigkeit von der Anzahl der *SMN2*-Kopien.

Interessant ist ebenfalls die Tatsache, dass von den vier Patienten des Gesamtkollektivs (ohne VPA), welche den Kopf zu heben in der Lage waren, immerhin zwei über 3 *SMN2*-Kopien verfügten.

Es ist also zu vermuten, dass zwischen der Anzahl der *SMN2*-Kopien und dem wichtigsten motorischen Parameter „Kopfbeheben“ eine Korrelation besteht.

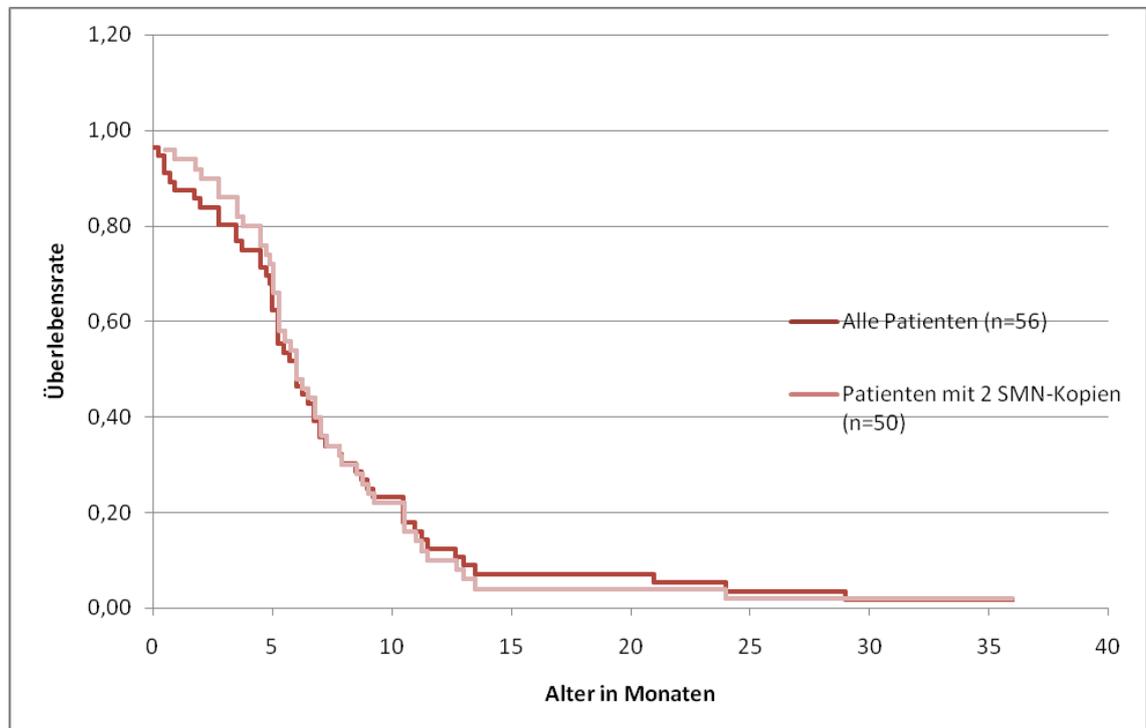


Abb.17: Darstellung der Überlebenskurve aller Patienten (N=56) im Vergleich zur Überlebenskurve der Patienten mit 2 *SMN2*-Kopien (N=50).

3.2.9 Angeborene Herzfehler in Abhängigkeit von der *SMN2*-Kopienzahl

Von den insgesamt 56 Patienten des Gesamtkollektivs (ohne VPA-Patienten) besaßen vier (7,1%) nur 1 *SMN2*-Kopie, 50 (89,3%) 2 *SMN2*-Kopien und zwei (3,6%) 3 *SMN2*-Kopien. Der Krankheitsverlauf der vier Patienten mit 1 *SMN2*-Kopie war schwerwiegend mit pränatal verminderter Kindsbewegung und respiratorischen Schwierigkeiten ab Geburt. Das mediane Todesalter dieser vier Kinder lag bei 0,175 Monaten. Drei dieser vier Patienten (75%), die nur 1 *SMN2*-Kopie besaßen, wiesen angeborene hämodynamisch relevante Vorhof- oder Ventrikelseptumdefekte auf. Die Diagnose dieser kardialen Anomalien wurde durch wiederholte Echokardiografie-Untersuchungen bestätigt.

Bei sechs der 50 Patienten (12%) mit 2 *SMN2*-Kopien wurden unwesentliche Herzanomalien festgestellt, die sich jedoch spontan korrigierten: vier Kinder wiesen ein Foramen ovale auf, bei einem Patienten lag ein Ductus arteriosus Botalli vor und ein Kind zeigte einen kleinen Ventrikelseptumdefekt. Die zwei Patienten mit 3 *SMN2*-Kopien wiesen keinerlei kardiologische Malformationen auf.

3.2.10 Überlebenskurve der mit VPA behandelten Patienten im Vergleich zu den nicht behandelten Patienten

Die mit Valproat behandelten Kinder (N=10) überlebten durchschnittlich 21,9 Monate und die mediane Überlebensdauer betrug 12,9 Monate (Abb.18).

Die unbehandelten Kinder (N=56) wiesen eine mediane Überlebensrate von 6 Monaten auf und überlebten im Durchschnitt 6,9 Monate (Abb.18).

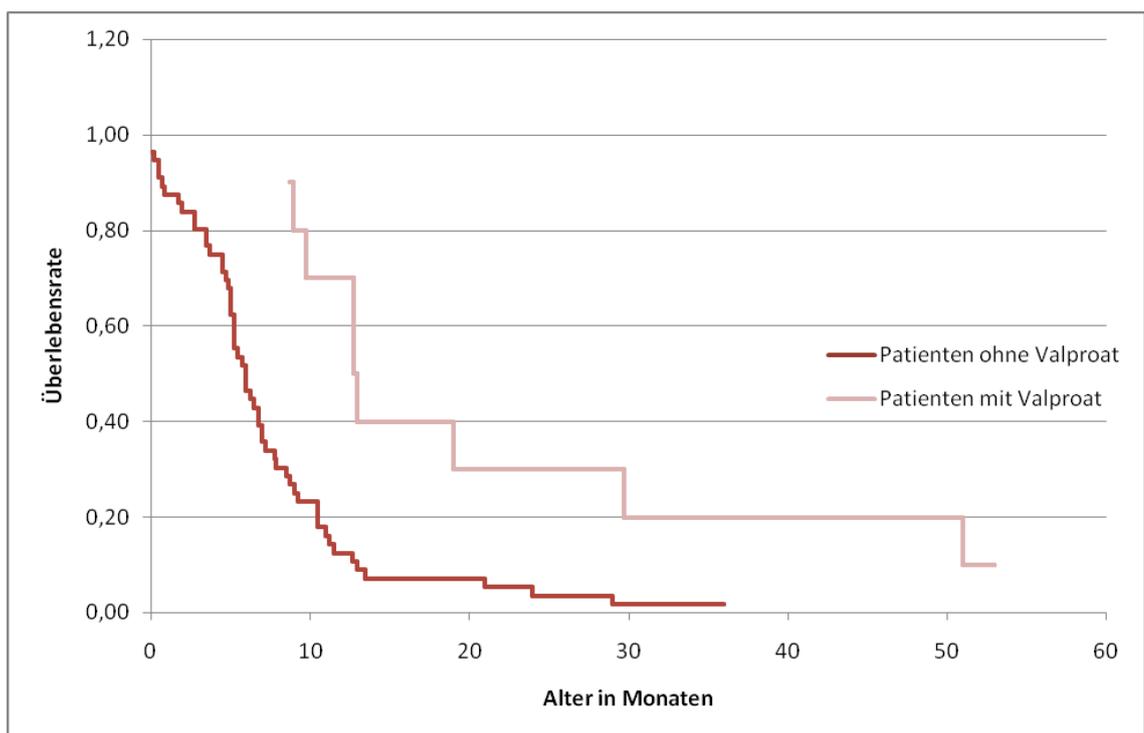


Abb.18: Darstellung der Überlebenskurven der Patienten, die entweder mit Valproat (N=10) behandelt worden waren oder keinen kausalen Therapieversuch mit Valproat oder anderen Medikamenten unternommen hatten (N=56).

Diese Überlebenskurven müssen jedoch vorsichtig interpretiert werden, da von den insgesamt zehn Kindern, die mit Valproat behandelt wurden, fünf Kinder bereits vor Beginn der kausalen Therapie mit Valproat den Kopf heben konnten und drei dieser Kinder 3 *SMN2*-Kopien aufweisen (siehe Kap. 3.4).

Desweiteren waren die Patienten, die mit Valproat behandelt wurden, im Durchschnitt schon 11,4 Monate alt, als bei ihnen die Behandlung begonnen wurde (siehe Kap. 3.4).

Es ist daher nicht zu beurteilen, ob die offensichtlich längere Überlebensrate auf die positive Wirkung von Valproinsäure auf SMA Typ 1-Patienten oder den bei einem Teil der Patienten bereits vor Behandlungsbeginn vorhandenen milderen Krankheitsverlauf zurückzuführen ist.

3.3 Beschreibung der Langzeitüberlebenden (>24 Monate) unter Einschluss motorischer und respiratorischer Funktionen

Von den 66 Patienten haben sieben Kinder (10,1%) länger als 24 Monate gelebt. Von diesen sieben Kindern wurden drei (42,9%) mit Valproinsäure behandelt.

Der mediane Erkrankungsbeginn lag bei den Kindern mit VPA-Behandlung bei 3,5 Monaten, von denen ein Kind verminderte Kindsbewegungen zeigte, und bei den Kindern ohne VPA-Behandlung bei 2,45 Monaten (Tab.7).

Kopfkontrolle erlangten von den mit Valproat behandelten Kindern zwei und von den nicht behandelten Kindern ebenfalls zwei.

Keines der Kinder, die länger als 24 Monate lebten, war jemals in der Lage mit Unterstützung zu sitzen.

Von den Patienten, die mit Valproat behandelt wurden, erlitten alle drei Kinder im Verlauf ihres Lebens mindestens eine Pneumonie und zwei dieser Kinder mussten beatmet werden. Bei den unbehandelten Patienten entwickelte ein Kind eine oder mehrere Pneumonien und ein Kind musste beatmet werden (Tab.7).

Die mittlere Überlebensdauer betrug bei den Kindern mit VPA-Behandlung 44,6 Monate und bei den Kindern ohne VPA-Behandlung 27,5 Monate (Tab.7).

Untersuchungspunkte	Patienten mit VPA-Behandlung (N=3)	Patienten ohne VPA-Behandlung (N=4)
Verminderte Kindsbewegung	1 (33,3%)	0 (0%)
Erkrankungsbeginn (in Monaten)	Mittelwert: 3,3 Monate Median: 3,5 Monate	Mittelwert: 2,8 Monate Median: 2,45 Monate
Kopfkontrolle	2 (66,7%)	2 (50%)
Mit Unterstützung sitzen	0 (0%)	0 (0%)
Pneumonien	3 (100%)	1 (25%)
Beatmung	2 (66,7%)	1 (25%)
Mittleres/Medianes Überleben	Mittelwert: 44,6 Monate Median: 51 Monate	Mittelwert: 27,5 Monate Median: 26,5 Monate

Tab.7: Tabellarische Darstellung der Patienten, die länger als 24 Monate überlebt haben, unter Berücksichtigung der Tatsache, ob diese mit Valproat behandelt wurden oder nicht.

3.4 Patienten, die mit Valproinsäure behandelt wurden

Von den 66 an der Studie teilnehmenden Kindern, wurden im Verlauf Ihrer Erkrankung zehn (15,2%) mit Valproinsäure behandelt. Zu Beginn der Behandlung mit Valproinsäure waren die Kinder durchschnittlich 11,4 Monate alt (medianer Behandlungsbeginn: 7 Monate). Die durchschnittliche Therapiedauer betrug 10,94 Monate (Median: 7 Monate). Von den 10 Patienten, die mit Valproinsäure behandelt wurden, besaßen sieben Kinder 2 *SMN2*-Kopien und drei Kinder 3 *SMN2*-Kopien.

Die Erstmanifestation dieser Erkrankung zeigte sich bei diesen Kindern durchschnittlich in einem Alter von 2,3 Monaten und die durchschnittliche Überlebensdauer nach Therapiebeginn betrug 11,9 Monate (mediane Überlebensrate nach Therapiebeginn: 7,75 Monate).

Fünf dieser Patienten erlangten bereits vor Therapiebeginn Kopfkontrolle, und neun Kinder entwickelten während des Krankheitsverlaufes mindestens eine Pneumonie.

Von den zehn behandelten Kindern besaßen bereits drei vor Therapiebeginn eine PEG-Sonde und sechs Patienten erhielten diese nach Behandlungsbeginn.

Die mittlere Überlebensrate dieser Patienten betrug 22,88 Monate und die mediane Überlebensdauer lag bei 15,86 Monaten (Tab.8).

Beginn der Behandlung	Mittelwert: 11,4 Monate Median: 7 Monate
Therapiedauer	Mittelwert: 10.94 Monate Median: 7 Monate
SMN2-Kopienzahl der VPA-Patienten	1 SMN2-Kopie: 0 Patienten 2 SMN2-Kopien: 7 Patienten 3 SMN2-Kopien : 3 Patienten
Erkrankungsbeginn	Mittelwert: 2,3 Monate Median: 2,6 Monate
Überlebensdauer nach Therapiebeginn	Mittelwert: 11,9 Monate Median: 7,75 Monate
Kopfkontrolle vor Therapiebeginn	5 Patienten
Pneumonien während des Krankheitsverlaufes	9 Patienten
PEG-Sonden vor/während VPA-Therapie	vor Therapiebeginn: 3 Patienten nach Therapiebeginn: 6 Patienten
Mittlere/ Mediane Überlebensdauer	Mittelwert: 22,88 Monate Median: 15,86 Monate

Tab.8: Tabellarische Darstellung einiger Untersuchungspunkte bei den mit Valproinsäure behandelte Kindern (N=10).

3.5 Tabellarische Übersicht über das Patientenkollektiv

Initialen der Patienten	DNA-Nr.	Valproinsäure	Anzahl der SMN2- Kopien	Geburtsdatum	Sterbedatum
v.D.F.	6926	ja	2	10.05.2003	08.02.2004
M.F.	8358	ja	2	06.08.2005	28.08.2006
W.S.	7639	ja	2	31.08.2004	25.06.2005
H.J.	6846	ja	3	08.02.2003	
R.S.	6005	nein	1	17.04.2001	17.08.2001
W.J.	7613	nein	1	02.01.2005	11.01.2005
A.B.Z.	7612	nein	2	13.10.2004	29.09.2005
A.K.M.	6153	nein	2	08.10.2001	22.10.2001
B.L.	6561	nein	2	09.08.2002	17.07.2003
C.S.	5755	nein	2	09.07.2000	09.02.2001
G.F.	6158	nein	2	25.08.2001	04.03.2002
G.S.	7123	nein	2	06.03.2004	12.08.2004
H.M.	5963	nein	2	26.02.2001	31.07.2001
H.S.	6091	nein	2	06.07.2001	29.09.2001
I.J.	5464	nein	2	04.01.2000	20.02.2001
M.A.	6798	nein	2	23.12.2002	
M.S.	7567	nein	2	22.04.2004	
N.H.	6151	nein	2	22.08.2001	09.09.2002
N.L.	6321	nein	2	10.10.2001	10.09.2002
P.D.	6239	nein	2	26.11.2001	29.01.2002
S.J.	6542	nein	2	27.08.2002	23.12.2002
S.S.	7670	nein	2	18.08.2004	16.09.2005
S.S.	6126	nein	2	23.05.2001	21.10.2001
Ü.B.	6108	nein	2	10.04.2001	17.11.2001
W.F.	6535	nein	2	02.08.2002	28.03.2003
W.L.M.	8096	nein	2	10.08.2005	21.11.2005
W.P.	6556	nein	2	24.09.2002	04.01.2003
W.R.	6902	nein	2	22.04.2003	08.03.2004
Z.P.	5604	nein	2	01.02.2000	31.10.2000
N.T.O.	8001	nein	3	02.11.2004	
Z.L.		nein	3	20.08.2005	

4. Diskussion

Erstes Ziel dieser Arbeit war es, eine historische Kontrollgruppe, die bisher nicht verfügbar war, durch Dokumentation des Krankheitsverlaufes bei Patienten mit SMA Typ 1 zu erstellen, die zwischen 2000-2005 in Aachen, Köln oder anderen humangenetischen Laboren innerhalb Deutschlands diagnostiziert worden waren. Angestrebte Mindestzahl der zur Auswertung gelangenden Krankheitsverläufe war ca. jeweils 30 über die beiden humangenetischen Institute Aachen und Köln.

Das zweite Ziel war, retrospektiv zu untersuchen, ob und wie eng die Zahl der individuell in unterschiedlicher Zahl vorhandenen *SMN2*-Genkopien mit dem jeweils beobachteten SMA-Krankheitsverlauf korreliert und ob es klinisch-prognostische Parameter gibt.

Insgesamt haben 66 Patienten (Familien/Eltern/behandelnde Ärzte) aktiv an dieser Studie teilgenommen. Davon wurden 35 Patienten über das humangenetische Institut in Aachen und 31 über das humangenetische Institut in Köln rekrutiert.

Es ist uns gelungen, den natürlichen Verlauf der SMA Typ 1-Patienten darzustellen. Wir haben gezeigt, dass eine Unterteilung innerhalb der SMA Typ 1-Patienten sowohl nach den Kriterien von Amico et al. (pers. Mitteilung) als auch nach dem Zeitpunkt der Erstmanifestation der Erkrankung durchaus sinnvoll ist.

Die prognostische Bedeutung von Faktoren wie dem Erlangen der Kopfkontrolle, vorgeburtliche oder neonatale Symptome, respiratorische Schwierigkeiten bei Geburt sowie die Anzahl der *SMN2*-Genkopien auf die Schwere des Krankheitsverlaufs und die Lebenserwartung gehen aus dieser Arbeit deutlich hervor.

4.1 Beurteilung des Fragebogens zur Erhebung von Patientendaten

Ein Fragebogen erwies sich bei einer retrospektiven Studie wie dieser durchaus als geeignet.

Es muss jedoch attestiert werden, dass man bei dieser Art der Datenerhebung sowohl in erster Linie auf die aktive Mitarbeit der Familien als auch auf die der behandelnden Ärzte angewiesen war, da diese die Unterlagen (Fragebogen, Teilnahmebescheinigung) an die Familien weiterleiten mussten, was wiederum zum Teil ebenfalls nur nach mehrmaliger Aufforderung geschehen ist.

Im Nachhinein wäre es eventuell effektiver gewesen, in allen Fällen nur die Teilnahmeerklärung an die Familie (Eltern) des betroffenen Kindes zu schicken und anschließend den Fragebogen telefonisch mit diesen zu bearbeiten. In diesem Fall hätte auch die Möglichkeit bestanden, Unklarheiten oder fachliche Verständnisschwierigkeiten direkt auszuräumen.

Rückblickend wäre es für die Familien einfacher gewesen, wenn man in den Fragebögen nur ganz konkrete Fragen gestellt hätte, auf welche der den Fragebogen Ausfüllende nur mit ja oder nein und einer zeitlichen Angabe hätte antworten (bzw. ankreuzen) müssen. Dieses wäre auch für die statistische Auswertung der Fragebögen von Vorteil gewesen.

Ein Fehler, der die praktische Arbeit sehr erschwert hat, war, dass in dem Fragebogen nur die Adresse, nicht jedoch die Telefonnummer der teilnehmenden Personen verlangt war, da diese bei jeder Nachfrage recherchiert werden musste und sich dieses nicht immer ganz einfach gestaltete.

Es ist uns gelungen, anhand der Auswertung der Fragebögen den Einfluss gewisser Faktoren auf den Krankheitsverlauf der infantilen spinalen Muskelatrophie wie auch die Bedeutung einiger Parameter bezüglich prognostischer Vorhersagen, zu erkennen.

4.2 Gruppeneinteilung der SMA Typ 1 Patienten abhängig vom Erkrankungsbeginn

Die Patienten wurden abhängig von Ihrem Erkrankungsbeginn in drei Gruppen unterteilt:

Gruppe 1 : Erkrankungsbeginn <1 Monat

Gruppe 2 : Erkrankungsbeginn 1-2 Monate

Gruppe 3 : Erkrankungsbeginn >2 Monate

Wie man der Tabelle 4, der Abbildung 7 (siehe Kap. 3.1.4) und der Abbildung 12 (siehe Kap. 3.2.4) entnehmen kann, besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns und dem Schweregrad des Krankheitsverlaufes sowie auch der Lebenslänge.

Die Prognose scheint umso schlechter zu sein, je früher der Zeitpunkt der Erstmanifestation der Erkrankung ist. Zu diesem Resultat kamen bereits Zerres und Rudnik-Schöneborn (1995) sowie Amico et al. (pers. Mitteilung).

Die in den Studien von Thomas N und Dubowitz V (1994) sowie von Ignatius J (1994) präsentierten Überlebensstatistiken von SMA Typ 1-Patienten, welche andeuten, dass alle Patienten, welche innerhalb der ersten sechs Lebensmonate erkranken, innerhalb der ersten zwei Lebensjahre sterben, können anhand unserer Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Differenzierung bezüglich des Erkrankungszeitpunktes bei SMA Typ 1-Patienten in „Beginn vor dem dritten Lebensmonat“ und „Beginn nach dem dritten Lebensmonat“, wie diese z.B. von K. Zerres et al. (1997) vorgenommen wurde, zu ungenau ist.

Es erscheint daher sinnvoll, hinsichtlich des Erkrankungszeitpunktes (Onset) eine differenziertere Einteilung vorzunehmen, da bereits die verschiedenen Zeitpunkte der Erkrankung innerhalb der ersten drei Lebensmonate (<1 Monate, 1-2 Monate, >2 Monate) gravierende Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf zu haben scheinen.

Das Erlangen der Kopfkontrolle, innerhalb des normalen Zeitraums oder später, scheint sich deutlich protektiv auf den Krankheitsverlauf auszuwirken.

Das Vorhandensein von vorgeburtlichen oder neonatalen Symptomen sowie das Erlangen der Kopfkontrolle scheinen die aussagekräftigsten Indikatoren im Hinblick auf den Schweregrad des Krankheitsbildes und die Lebensdauer darzustellen.

Frühgeburtliche respiratorische Schwierigkeiten scheinen mit einem schweren Krankheitsverlauf und einer kurzen Lebensdauer verbunden zu sein.

Diese Informationen haben nicht nur einen prognostischen Wert, sondern sollten in Zukunft auch bei der Planung therapeutischer Studien berücksichtigt werden, um homogene Patientengruppen zu schaffen.

4.3 Einfluss der *SMN2*-Kopienzahl auf den Krankheitsverlauf der SMA

Das *SMN2*-Gen, welches sich nur in fünf Nukleotiden vom *SMN1*-Gen unterscheidet, produziert nur 10% der Volllänge-SMN-RNA (funktionstüchtiges SMN-Protein) und stellt einen guten Ansatzpunkt für eine mögliche Therapie dar (siehe Kap. 4.4). Verschiedene klinische Studien mit Arzneimitteln wie z.B. mit den HDAC-Inhibitoren Valproinsäure oder Phenylbutyrat, welche die SMN-Protein-Menge erhöhen, sind bereits angelaufen oder befinden sich in der Planung (Wirth et al. 2006, Sumner et al. 2006).

Solide historische Daten bezüglich des Krankheitsverlaufes der SMA sind unentbehrlich, um eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp zu erkennen, und die Ergebnisse der klinischen Studien beurteilen zu können.

Wie man aus den Abbildungen 16 und 17 (siehe Kapitel 3.2.8) eindeutig entnehmen kann, hat die Anzahl der *SMN2*-Kopien einen großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der infantilen spinalen Muskelatrophie.

Von den insgesamt 56 Patienten besaßen vier (7,1%) nur 1 *SMN2*-Kopie, 50 (89,3%) und damit die große Mehrheit 2 *SMN2*-Kopien und zwei (3,6%) 3 *SMN2*-Kopien.

Bei den Kindern mit 1 *SMN2*-Kopie lag der mediane Erkrankungsbeginn bei 0,03 Monaten und das mediane Todesalter bei 0,175 Monaten (Abb.16).

Kinder, die über 2 *SMN2*-Kopien verfügten, erkrankten median mit einem Monat und die mediane Überlebensdauer betrug 6 Monate (Abb.16).

Der mediane Erkrankungsbeginn von Kindern, die 3 *SMN2*-Kopien besaßen, lag bei 3 Monaten und der mediane Todeszeitpunkt lag bei 25 Monaten (Abb.16).

Man könnte anhand der vorhandenen Daten folgende Einteilung vornehmen:

- 1 *SMN2*-Kopie (7,1%) : neonatale/letale SMA
- 2 *SMN2*-Kopien (89,3%) : klassische SMA Typ 1
- 3 *SMN2*-Kopien (3,6%) : milde/chronische SMA Typ 1

Damit haben wir in unserer Studie gezeigt, dass eine Korrelation zwischen der *SMN2*-Kopienzahl und dem Schweregrad der SMA (SMA Typ 1) besteht.

Zu diesem Ergebnis gelangte auch die Studie von Feldkötter et al. (2002). In dieser Studie wurde die *SMN2*-Kopienzahl von 188 Patienten mit SMA Typ 1, 110 Patienten mit SMA Typ 2 und 77 Patienten mit SMA Typ 3 analysiert.

80% der SMA Typ 1-Patienten besaßen 1 oder 2 *SMN2*-Kopien, 82% der SMA Typ 2-Patienten besaßen 3 *SMN2*-Kopien und bei 96% der SMA Typ 3-Patienten lagen 3 oder 4 *SMN2*-Kopien vor.

19,7% der Patienten mit SMA Typ 1 zeigten 3 *SMN2*-Kopien, keiner dieser Patienten verfügte über 4 *SMN2*-Kopien. Von den Patienten mit SMA Typ 2 zeigten 10,9% 2 *SMN2*-Kopien und 7,3% besaßen 4 *SMN2*-Kopien. Keiner der SMA Typ 3-Patienten verfügte über nur 1 *SMN2*-Kopie und lediglich 3,9% besaßen 2 *SMN2*-Kopien (Tab.9).

	1 <i>SMN2</i>-Kopie	2 <i>SMN2</i>-Kopien	3 <i>SMN2</i>-Kopien	4 <i>SMN2</i>-Kopien	Gesamt
SMA Typ 1	13 (6,9%)	138 (73,4%)	37 (19,7%)	0 (0,0%)	188
SMA Typ 2	0 (0,0%)	12 (10,9%)	90 (81,8%)	8 (7,3%)	110
SMA Typ 3	0 (0,0%)	3 (3,9%)	39 (50,6%)	35 (45,5%)	77
Total	-	-	-	-	375

Tab.9: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse aus der Studie von Feldkötter et al. (2002).

In dieser Studie wurde desweiteren der Zusammenhang zwischen der *SMN2*-Kopienzahl und der Überlebensdauer von 113 Patienten mit SMA Typ 1 untersucht. Bei neun dieser 113 Patienten wurde 1 *SMN2*-Kopie gefunden. Das mediane Überlebensalter betrug bei diesen neun Patienten 7 Monate; keiner lebte länger als 11 Monate. 94 der 113 Patienten besaßen 2 *SMN2*-Kopien, mit einer medianen Überlebensdauer von 8 Monaten; abgesehen von sechs dieser 94 Patienten starben alle vor dem 21. Lebensmonat. Zehn der 113 Patienten zeigten 3 *SMN2*-Kopien und hatten eine mediane Überlebensrate von 37,5 Monaten; acht dieser zehn Patienten lebten 33-66 Monate lang.

Feldkötter et al. (2002) berechneten in seiner Studie, dass ein Kind mit 1 *SMN2*-Kopie ein Risiko von >99% und mit 2 *SMN2*-Kopien von >97% besitzt, eine SMA Typ 1 zu entwickeln. Ein Kind mit 3 *SMN2* -Kopien hat ein Risiko von 82,2% eine SMA Typ 2 und ein Kind mit 4 *SMN2*-Kopien besitzt ein Risiko von 83,6% eine SMA Typ 3 zu entwickeln.

Zerres et al. (2005) verdeutlichen in einer Übersichtsarbeit, dass die Analyse der *SMN2*-Kopienzahl einen statistischen Zusammenhang zwischen Schweregrad und Anzahl der *SMN2*-Kopienzahl zeigt, die den Mangel an *SMN1*-Kopien offensichtlich mildern oder sogar ganz kompensieren kann. Aus dieser Arbeit geht hervor, dass viele schwer betroffene SMA Typ 1-Patienten mit nur 1 *SMN2*-Kopie der „early lethal SMA“ oder „congenital SMA“ mit postnataler Ateminsuffizienz und häufig kongenitalen Gelenkkontrakturen entsprechen (Devriert et al. 1996, Garcia-Cabezas et al. 2004). Die Mehrzahl der Patienten mit einer SMA Typ 3 haben 3 bis 4 *SMN2*-Kopien, selten sind noch höhere Kopienzahlen (bis zu 8) bei milden Verläufen mit einem Beginn nach dem 20. Lebensjahr nachgewiesen worden (Vitali et al. 1999). Ein Teil der nicht-betroffenen Anverwandten von SMA-Patienten, die ebenfalls homozygote *SMN1*-Deletionen tragen, haben hohe *SMN2*-Kopienzahlen, die damit eine Ausprägung der Erkrankung weitgehend unterdrücken können (Prior et al. 2004).

In der Studie von Wirth et al. (2006) wurde ebenfalls der positive Einfluss der *SMN2*-Kopienzahl, welcher zu einem späteren Erkrankungsbeginn und einer besseren Prognose bei SMA-Patienten führt, deutlich.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anzahl der *SMN2*-Kopien ebenfalls einen Einfluss auf die Herzentwicklung zu haben scheint. Drei der vier Kinder (75%), die nur 1 *SMN2*-Kopie besaßen, wiesen angeborene hämodynamisch relevante Vorhof- oder Ventrikelseptumdefekte auf. Bei sechs der 50 Patienten (12%) mit 2 *SMN2*-Kopien wurden unwesentliche Herzanomalien festgestellt, die sich jedoch spontan korrigierten. Die zwei Patienten mit 3 *SMN2*-Kopien wiesen keinerlei kardiologische Malformationen auf.

Es besteht eindeutig ein klinisch bedeutsamer Zusammenhang zwischen *SMN2*-Kopienzahl und Schweregrad der proximalen SMA. Die Phänotyp-Variabilität kann damit dennoch nicht vollständig erklärt werden.

Hinsichtlich des Ausprägungsgrades der proximalen spinalen Muskelatrophie müssen noch weitere modifizierende Faktoren existieren, die jedoch bislang nicht genau bekannt sind (Brahe et al. 1993, Cobben et al. 1995, Hahnen et al. 1995, Helmken et al. 2003, Wang et al. 1996).

Oprea et al. (2008) beschreiben in ihrer Studie den protektiven Effekt von Platin 3 bei SMA-Patienten. In dieser Studie wurden unter anderem sechs SMA-Familien untersucht, bei denen acht Frauen völlig asymptomatisch waren, obwohl diese eine homozygote *SMN1*-Deletion und die gleiche Anzahl an *SMN2*-Kopien aufwiesen wie ihre betroffenen Anverwandten. Es konnte gezeigt werden, dass alle nicht betroffenen Personen mit homozygoter Deletion des *SMN1*-Gens eine erhöhte PLS3-Expression vorwiesen, wohingegen dies bei allen betroffenen Patienten, abgesehen von einem männlichen Patienten, nicht der Fall war. Aus der Studie geht hervor, dass der protektive Effekt von PLS3 geschlechtsspezifisch für Frauen gilt. Die Ursache hierfür ist jedoch nicht bekannt.

Eine individuelle Vorhersage des Krankheitsverlaufes ist demnach auf der Basis der *SMN2*-Kopienzahl alleine nicht möglich.

4.4 Einfluss der *SMN2*-Kopienzahl auf die kardiale Entwicklung

Im Unterschied zu früheren Studien (Bürglen et al. 1995, Rudnik-Schöneborn et al. 1996, Devriendt et al. 1996, Mulleners et al. 1996, Jong et al. 1998, Macleod et al. 1999, El-Matary et al. 2004 Garcia-Cabezas et al. 2004, Cook et al. 2006) bezüglich infantiler spinaler Muskelatrophie in Verbindung mit kardialen Malformationen, versuchten wir in unserer Studie den natürlichen Verlauf der SMA Typ 1 in Abhängigkeit von der Anzahl der *SMN2*-Kopien zu definieren. Da sich die quantitative Analyse der *SMN2*-Kopienzahl erst seit kurzem als Routine-Analyse etabliert hat, war die Anzahl der *SMN2*-Kopien in den vorangehenden Studien weitestgehend unbekannt.

Das klinische Bild der Patienten mit verminderten pränatalen Kindsbewegungen, angeborenen Kontrakturen, respiratorischen Schwierigkeiten ab Geburt in Verbindung mit einer sehr kurzen Überlebensdauer und Herzfehlern, über die bisher berichtet wurde, läßt die Vermutung zu, dass diese Patienten möglicherweise nur über 1 *SMN2*-Kopie verfügten.

Die Inzidenz der SMA Typ 1 beträgt ca. 1/20000 (Ogino et al. 2002), wobei die Anzahl der SMA Typ 1-Patienten mit 1 *SMN2*-Kopie in verschiedenen Studien zwischen 7 und 19% variiert (Zerres et al. 2005). Dies führte dazu, dass SMA Typ 1-Patienten mit 1 *SMN2*-Kopie meistens als Ausnahmefälle in kleineren Studien betrachtet wurden. Angeborene Herzfehler liegen in ca. 1% der Lebendgeburten vor, wohingegen Septumdefekte eine Inzidenz von ca. 4/1000 bei Neugeborenen aufweisen (Garne et al. 2006). Das Vorhandensein eines Foramen ovale oder Ductus arteriosus Botalli wird bei gesunden Neugeborenen regelmäßig diagnostiziert, ist jedoch in den meisten Fällen asymptomatisch.

Wenn die Inzidenz für SMA Typ 1-Patienten mit 1 *SMN2*-Kopie und die Inzidenz für angeborene kardiale Septumdefekte kombiniert wird, würde ein gemeinsames Auftreten bei weniger als einem von 50 Millionen Individuen vorliegen.

Die Tatsache, dass in unserer Studie drei von vier Patienten mit 1 *SMN2*-Kopie einen großen Vorhofseptumdefekt, Ventrikelseptumdefekt oder einen kompletten atrioventrikulären Septumdefekt aufwiesen, deutet auf einen kausalen Zusammenhang hin.

Einblicke in die genetische Regulation der kardialen Entwicklung sind in umfangreichem Maße durch Tierstudien ermöglicht worden (Maslen et al. 2004, Clark et al. 2006). Während das Foramen ovale (sek. ASD) den häufigsten Vorhofdefekt bei Kindern darstellt, ist beim primären Vorhofseptumdefekt der untere Teil des Vorhofseptums involviert und gehört somit zum Spektrum der atrioventrikulären Septumdefekte. Die definierten Strukturen, welche die Vorhöfe und Ventrikel voneinander trennen, sind fast ausschließlich muskuläre Strukturen (Anderson et al. 2003). An den verschiedenen Stadien der kardialen Entwicklung sind zahlreiche Wachstums- und Transkriptionsfaktoren beteiligt. Vor allem in späteren Stadien der Herzentwicklung, wenn Vorhöfe und Ventrikel voneinander getrennt werden, agieren die Transkriptionsfaktoren NKX2.5, GATA4 und TBX5 als Partner in einem Komplex, der die Aktivierung kardialer Gene induziert, z.B. ANF und Connexin 40. Mutationen in den korrespondierenden Genen NKX2.5, GATA4 und TBX5 verursachen Vorhofseptumdefekte, Ventrikelseptumdefekte, atrioventrikuläre Septumdefekte sowie weitere schwerwiegende komplexe Herzdefekte bei Menschen (Clark et al. 2006). Die Trennung der Vorhöfe ist zudem durch weitere Wachstumsfaktoren reguliert. In diesem Kontext könnte es von besonderem Interesse sein, dass fibroblastische

Wachstumsfaktoren (FGF-2 und FGF-4) die kardiale Entwicklung beeinflussen können, indem sie die Expression kardialer Transkriptionfaktoren induzieren (Lopez-Sanchez et al. 2002). Erst vor kurzem ist gezeigt worden, dass das SMN-Protein mit dem nuklearen Wachstumsfaktor FGF-2 interagiert; dies deutet auf eine neue Rolle des Wachstumsfaktors FGF-2 im RNA-Metabolismus hin (Claus et al. 2003). Während die physiologische Relevanz dieser Interaktion noch nicht vollständig geklärt ist, erscheint ein Einfluss auf die Herzentwicklung äußerst wahrscheinlich.

Infantile SMA ist durch einen Mangel an Volllänge SMN-Protein bedingt (Lefebvre et al. 1995). Eine besonders große Menge des SMN-Proteins wird in den spinalen Motoneuronen gefunden. Studien, die fetales Gewebe untersucht haben, zeigten, dass das *SMN1*-Gen überwiegend in den Vorderhornzellen des Rückenmarks exprimiert wird, wohingegen das *SMN2*-Gen vermehrt in Muskel, Niere und Myokard exprimiert wird (Soler-Botija et al. 2005).

Tierstudien zum Krankheitsbild der spinalen Muskelatrophie haben bislang keine eindeutige Korrelation zu einer gestörten Herzentwicklung aufgezeigt. Mäuse, bei denen das *SMN*-Gen durch menschliche *SMN2*-Gene ersetzt wurde, entwickeln eine SMA mit unterschiedlichem Schweregrad (Monani et al. 2000). Es wurde beobachtet, dass die große Mehrheit der Mäuse mit 1 *SMN2*-Kopie embryonal oder kurz nach der Geburt versterben (Lunn et al. 2004). Es ist nicht bekannt, ob manche dieser Tiere angeborene Anomalien aufwiesen.

Eine französische Studie an Mäusen hat ein neues Licht auf die SMN-Funktion in verschiedenen Geweben geworfen. Mäuse mit einem SMN-Protein-Mangel wiesen einen Untergang der Vorderhornzellen des Rückenmarks auf (Frugier et al. 2000), allerdings konnten auch zellspezifische pathologische Manifestationen induziert werden, wenn das Exon 7 des *SMN*-Gens nur im Muskel (Cifuentes-Diaz et al. 2001) oder in der Leber (Vitte et al. 2004) entfernt wurde. Es wurde geschlußfolgert, dass das Entfernen des *SMN*-Gens in jeglicher Zelle schädlich für deren Überleben sei. Das SMN-Protein ist mit verschiedenen weiteren Proteinen feste assoziiert, die als Bestandteil eines makromolekularen Komplexes betrachtet werden (Monani et al. 2005). Die *SMN*-Aktivität und ihre Expressionsmenge variiert in Abhängigkeit von dem jeweiligen Gewebe und der speziellen Entwicklungsstufe. Gegenwärtige Ansichtweise ist, dass eine deutliche Reduktion der *SMN*-Expression einerseits die snRNP-Biogenese

und andererseits das axonale Wachstum betrifft (McWhorter et al. 2003, Pellizzoni et al. 2007). Es ist höchstwahrscheinlich, dass das SMN-Protein weitere Funktionen hat, seitdem zahlreiche Bindungspartner identifiziert und SMN-Protein in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert wurde.

In weiteren Studien muss nun die genaue Bedeutung des SMN-Proteins auf die einzelnen Schritte der Herzentwicklung untersucht werden.

4.5 Geschlechtsspezifität bei der SMA Typ 1

Der statistisch nicht signifikante, aber deutliche Unterschied bezüglich der Überlebensrate weiblicher Patienten im Vergleich zu männlichen Patienten (siehe Kap. 3.1.3 und Kap. 3.2.3) könnte die Vermutung zulassen, dass das Krankheitsbild der spinalen Muskelatrophie Typ 1 bei weiblichen Patienten milder ausgeprägt sei als dies bei männlichen Patienten der Fall ist.

Klinisch wird schon lange ein Geschlechtseinfluss bei der SMA beobachtet, in der Form, dass bei der SMA Typ 3 ab der Pubertät deutlich weniger Frauen erkranken und bei diskordanten Geschwistern das klinische Bild im weiblichen Geschlecht oft milder ist oder sogar subklinisch verläuft (Hausmanowa-Petrusewicz et al., 1979; Zerres und Rudnik-Schöneborn, 1995a; Hahnen et al., 1995). Dies spricht möglicherweise für einen protektiven Effekt weiblicher Geschlechtshormone bei der milden SMA.

Desweiteren wurde bereits gezeigt, dass es sich bei den Individuen, welche eine homozygote Deletion des *SMN1*-Gens besitzen, jedoch keine Krankheitssymptome aufweisen, mit wenigen Ausnahmen um weibliche Individuen handelt (Helmken et al. 2003).

In der Studie von Oprea et al. (2008) wurde der protektive Effekt von Plastin 3 bei Frauen mit homozygoter Deletion des *SMN1*-Gens dargestellt. Der Grund für die geschlechtsspezifisch-modifizierende Wirkung von Plastin 3 ist jedoch nicht bekannt.

4.6 Therapeutische Bedeutung von Valproinsäure

Das *SMN2*-Gen unterscheidet sich von dem *SMN1*-Gen nur in fünf Nukleotiden, von denen ein Nukleotid jedoch im Exon 7 an einer Stelle lokalisiert ist, welche für den Spleißvorgang von entscheidender Bedeutung ist (Spleißverstärker) (Lefebvre et al. 1995, Bürglen et al. 1996).

Daraus resultiert, dass nur ein kleiner Teil (10%) der *SMN2*-Transkripte das Exon 7 enthalten und somit das funktionstüchtige SMN-Protein kodieren (Wirth et al. 2006).

Demzufolge ist das *SMN2*-Gen nicht in der Lage den Verlust des *SMN1*-Gens zu kompensieren, so dass die SMA aus einem Defizit an SMN-Protein resultiert (Lefebvre et al. 1995).

Brichta et al. (2003) beschrieben erstmals, dass Natriumvalproat in Fibroblasten von SMA-Patienten die *SMN2*-RNA-Protein-Menge signifikant erhöht.

In der Studie von Sumner et al. (2003) wurde ebenfalls gezeigt, dass Valproinsäure die SMN-Protein-Menge in Fibroblasten von vier SMA Typ 1-Patienten erhöhen kann. Es wurde in dieser Studie gezeigt, dass in Fibroblasten Valproinsäure zu einer signifikanten Erhöhung von Exon 7-enthaltender SMN-RNA, SMN-Protein-Menge und „Gems“-Anzahl führt. Sowohl Brichta et al. (2003) als auch Sumner et al. (2003) zeigen, dass Valproinsäure die SMN-Protein-Menge zum einen über eine Aktivierung des SMN-Gen-Promotors und zum anderen durch eine Veränderung des Spleißmusters des *SMN2*-Gens, welche ein Volllänge-Transkript zur Folge hat, erhöht.

In der Studie von Brichta et al. (2006) wurde das Blut von 20 SMA Typ 1-3-Patienten, die sich in einer individuellen VPA-Behandlung befanden, auf die *SMN2*-Gen-Aktivität untersucht. Ein Drittel der Patienten zeigte eine erhöhte Menge an Volllänge-*SMN2*-Transkript, bei einem Drittel der Patienten waren keinerlei Veränderungen festzustellen und bei dem restlichen Drittel reduzierte sich die Menge an Volllänge-*SMN2*-Transkript.

Diese Studie belegt deutlich, dass die Behandlung mit Valproinsäure bei SMA-Patienten zu einer erhöhten SMN-Protein-Menge führen kann. Diese Erkenntnis stellt einen großen Schritt hinsichtlich der Entwicklung einer Therapie für SMA-Patienten dar.

Tsai et al. (2006) demonstrierten zum ersten mal den positiven therapeutischen Effekt von Valproinsäure im Mausmodell.

In dieser Studie war bei den „SMA-Mäusen“, welche mit VPA behandelt wurden, ein deutlicher Anstieg der SMN-Protein-Menge festzustellen, der teilweise zur Erlangung normaler motorischer Fähigkeiten führte.

Unsere retrospektive Studie ermöglicht jedoch nicht die Schlussfolgerung, dass die Behandlung mit VPA bei SMA Typ 1-Patienten mit einer signifikanten Verbesserung des Krankheitsverlaufes assoziiert ist, da unser Patientenkollektiv, welches mit VPA behandelt wurde, nicht repräsentativ ist.

Fünf dieser zehn Patienten erlangten bereits vor Therapiebeginn Kopfkontrolle, drei Patienten besaßen 3 *SMN2*-Kopien und die VPA-Therapie begann bei diesen Kindern durchschnittlich mit 11,4 Monaten.

Um den tatsächlichen Effekt von Valproinsäure bei SMA-Patienten feststellen zu können, wird nun eine systematische einarmige Studie durchgeführt (CARNIVAL TYPE I, ClinicalTrials.govIdentifier: NCT00661453).

4.7 Gruppeneinteilung nach Amico et al. (pers. Mitteilung)

In der Studie von Amico et al. (pers. Mitteilung) wurden unter Berücksichtigung von 5 Kriterien (siehe Tab.5, Kapitel 3.1.6) 38 Kinder, bei denen SMA Typ 1 diagnostiziert worden war, in drei Gruppen unterteilt:

- **Gruppe 1** (N=10): Patienten mit normalen vorgeburtlichen Kindsbewegungen, ohne respiratorische Schwierigkeiten bei Geburt und Erlangen der Kopfkontrolle.
- **Gruppe 2** (N=23): Patienten ohne Atemschwierigkeiten bei Geburt, einige von diesen zeigen verminderte vorgeburtliche Kindsbewegungen und frühgeburtliche neurologische Auffälligkeiten.
- **Gruppe 3** (N=5): Patienten mit verminderter vorgeburtlicher Kindsbewegung, respiratorischen Schwierigkeiten bei Geburt, frühkindlichen neurologischen Auffälligkeiten und ohne Erlangen von Kopfkontrolle.

	Gruppe 1 (Kölner Studie, N=3)	Gruppe 1 (Amico Studie, N=10)	Gruppe 2 (Kölner Studie, N=21)	Gruppe 2 (Amico Studie, N=23)	Gruppe 3 (Kölner Studie, N=3)	Gruppe 3 (Amico Studie, N=5)
Verminderte Kindsbewegung	1 (33,3%)	0 (0,0%)	9 (42,8%)	5 (21,7%)	3 (100%)	5 (100%)
Atemschwierigkeiten bei Geburt	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (100%)	5 (100%)
Neonatale neurologische Auffälligkeiten	0 (0,0%)	2 (20%)	9 (42,8%)	14 (60,9%)	3 (100%)	5 (100%)
Kopfkontrolle	3 (100%)	10 (100%)	0 (0,0%)	1 (4,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Mit Unterstützung sitzen	0 (0,0%)	3 (30%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Medianes Überleben (in Monaten)	19	15	8,8	6	1,25	4

Tab.10: Tabellarische Darstellung der italienischen (N=38) und Kölner (N=27) Patienten entsprechend der Gruppeneinteilung von Amico et al. (pers. Mitteilung).

Die Ergebnisse, zu denen man gelangt, wenn man die Untersuchungskriterien und Schwerpunkte der Studie von Amico et al. (pers. Mitteilung) auf die Kölner Patienten bezieht, zeigen eindeutige Parallelen zu den Ergebnissen der Studie von Amico et al. (pers. Mitteilung) (siehe Tab. 10).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann man mit Sicherheit formulieren, dass das Auftreten von motorischen Auffälligkeiten innerhalb der ersten 21 Lebenstage als auch das Vorhandensein von respiratorischen Schwierigkeiten bei Geburt sowie verminderte fetale Kindsbewegungen sehr ungünstige prognostische Faktoren für die Überlebenszeit darstellen.

Grundsätzlich ist die Einteilung nach Amico et al. (pers. Mitteilung) sehr sinnvoll und aussagekräftig. Diese Einteilung hat jedoch den Nachteil, dass man die Kinder erst retrospektiv oder im späteren Verlauf ihres bisweilen sehr kurzen Lebens eindeutig einer bestimmten Gruppe zuordnen kann, sodass z. B. therapeutische Maßnahmen nur schwierig an die Gruppeneinteilung adaptiert werden können.

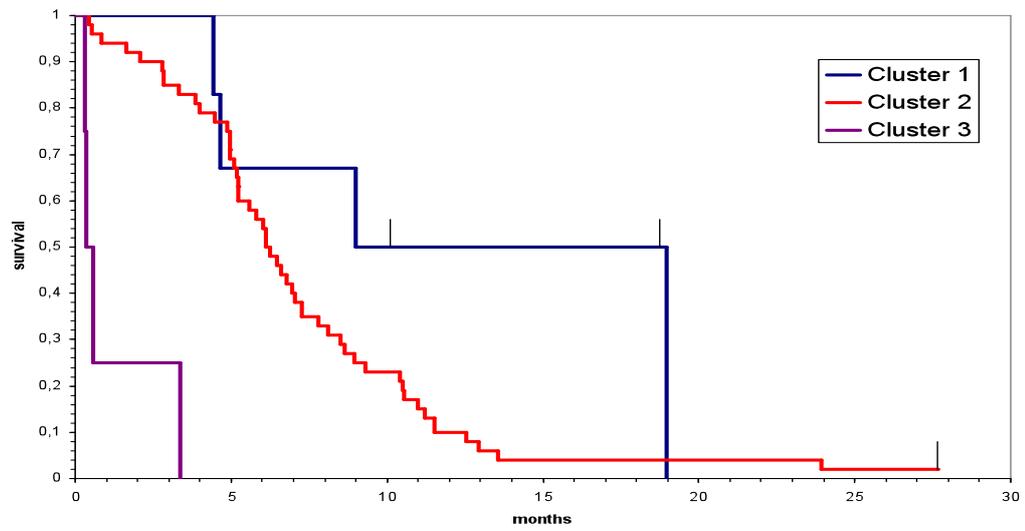


Abb.19: Überlebenskurven der italienischen Patienten entsprechend der Gruppeneinteilung von Amico et al. (pers. Mitteilung) (Grafik wurde aus der Studie von Amico et al. (pers. Mitteilung) übernommen).

5 Zusammenfassung

Die autosomal rezessiv erbliche proximale spinale Muskelatrophie (SMA) wird durch den Funktionsverlust des *SMN1*-Gens meist in Folge einer homozygoten Deletion des *SMN1*-Gens verursacht. Das in unmittelbarer Nachbarschaft auf Chromosom 5 liegende *SMN2*-Gen kodiert einen im Vergleich zum *SMN1*-Gen sehr kleinen Anteil an vollständigem SMN-Protein (10%) (Wirth et al. 2006) und ist nicht in der Lage den Verlust des *SMN1*-Gens zu kompensieren (Lefebvre et al. 1995). Der Mangel an SMN-Volllängeprotein führt zum selektiven, chronisch progredienten Untergang von Vorderhornzellen im Rückenmark und zum Teil auch der motorischen Hirnnervenkerne des Hirnstamms.

Die Patienten werden in vier Typen klassifiziert, SMA Typ 1 - SMA Typ 4, welche sich an Erkrankungsbeginn und erreichten motorischen Meilensteinen orientieren. Ca. 60% aller SMA-Patienten weisen eine SMA Typ 1 mit hoher Sterblichkeit innerhalb der ersten Lebensjahre auf.

Eine kausale Therapie der SMA ist bis heute nicht möglich, allerdings prinzipiell denkbar, indem man die Menge der Volllänge-SMN2-RNA und somit die SMN-Protein-Menge erhöht.

Brichta et al. (2003) beschrieben erstmals, dass Natriumvalproat in Fibroblasten von SMA-Patienten die SMN2-RNA-Protein-Menge signifikant erhöht. Valproinsäure erhöht die SMN-Protein-Menge zum einen über eine Aktivierung des SMN-Gen-Promotors und zum anderen durch eine Veränderung des Spleißmusters des *SMN2*-Gens, welche ein Volllänge-Transkript zur Folge hat. Eine Pilotstudie beim Menschen zeigte, dass Valproat eine Aktivierung des *SMN2*-Gens auch in vivo bewirkt (Brichta et al. 2006).

Erstes Ziel meiner Arbeit war die Dokumentation des Krankheitsverlaufes bei Patienten mit SMA Typ 1, die zwischen 2000-2005 in Aachen, Köln oder anderen humangenetischen Laboren innerhalb Deutschlands diagnostiziert worden waren. Angestrebte Mindestzahl der ausgewerteten Krankheitsverläufe waren jeweils ca. 30 Patienten (in Anlehnung an ca. 60-70 Patienten pro Arm in einer zukünftigen zweiarmigen Doppelblind-Therapiestudie) über die humangenetischen Institute Aachen

und Köln. Die Daten zum Krankheitsverlauf sollten der Definition einer historischen Kontrollgruppe für einarmige Therapiestudien dienen.

Das zweite Ziel war, retrospektiv zu untersuchen, ob und wie eng die individuell unterschiedliche Anzahl der *SMN2*-Genkopien mit dem jeweils beobachteten SMA-Krankheitsverlauf korreliert und ob es klinisch-prognostische Parameter gibt.

Insgesamt haben 66 Patienten (Familien/Eltern/behandelnde Ärzte) aktiv an dieser Studie teilgenommen. Davon wurden 35 Patienten über das humangenetische Institut in Aachen und 31 über das humangenetische Institut in Köln rekrutiert. Wir haben gezeigt, dass eine Unterteilung innerhalb der SMA Typ 1-Patienten sowohl nach den Kriterien von Amico et al. (pers. Mitteilung) als auch nach dem Zeitpunkt der Erstmanifestation der Erkrankung durchaus sinnvoll ist.

Die prognostische Bedeutung von Faktoren wie dem Erlangen der Kopfkontrolle, vorgeburtliche oder neonatale Symptome, respiratorische Schwierigkeiten bei Geburt sowie die Anzahl der *SMN2*-Genkopien auf die Schwere des Krankheitsverlaufs und die Lebenserwartung gehen aus dieser Arbeit deutlich hervor.

Die durchschnittliche / mediane Überlebensdauer aller rekrutierten Patienten ohne VPA-Behandlung (N=56) betrug 6,9 / 6 Monate. Diejenigen Patienten, die in der Lage waren, ihren Kopf zu heben (N=4), haben durchschnittlich / median 15,4 / 14 Monate überlebt. Die Patienten, die keine Kopfkontrolle erlangten (N=52), hatten eine durchschnittliche / mediane Überlebensdauer von 6,9 / 5,9 Monaten.

Von den insgesamt 56 Patienten ohne VPA besaßen vier (7,1%) nur 1 *SMN2*-Kopie, 50 (89,3%) und damit die große Mehrheit 2 *SMN2*-Kopien und zwei (3,6%) 3 *SMN2*-Kopien.

Bei 1 *SMN2*-Kopie lag der mediane Erkrankungsbeginn bei 0,03 Monaten und das mediane Todesalter bei 0,175 Monaten. Kinder, welche über 2 *SMN2*-Kopien verfügten, erkrankten median mit einem Monat, und die mediane Überlebensdauer betrug sechs Monate. Der mediane Erkrankungsbeginn bei 3 *SMN2*-Kopien, lag bei drei Monaten, und der mediane Todeszeitpunkt lag bei 25 Monaten.

Unsere Ergebnisse deuten außerdem darauf hin, dass die Anzahl der *SMN2*-Kopien einen Einfluss auf die Herzentwicklung hat. Drei der vier Kinder (75%), die nur 1 *SMN2*-Kopie besaßen, wiesen angeborene hämodynamisch relevante Vorhof- oder

Ventrikelseptumdefekte auf. Bei sechs der 50 Patienten (12%) mit 2 *SMN2*-Kopien wurden unwesentliche Herzanomalien festgestellt, die sich jedoch spontan korrigierten. Die zwei Patienten mit 3 *SMN2*-Kopien wiesen keinerlei kardiologische Malformationen auf.

Eine Wirkung der Valproat-Behandlung auf Basis individueller Heilversuche bei zehn SMA Typ 1-Kindern konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig belegt werden, war jedoch auch nicht primäre Fragestellung. Klinisch relevante, VPA-assoziierte Zwischenfälle kamen nicht vor.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass SMA Typ 1-Patienten mit 2 *SMN2*-Genkopien und einem Erkrankungsbeginn innerhalb der ersten zwei Lebensmonate eine homogene historische Kontrollgruppe darstellen.

Diese Arbeit stellt somit eine exzellente Grundlage für die bereits angelaufene internationale einarmige open-label CARNIVAL TYPE I-Therapiestudie (VPA+L-Carnitin) mit Beteiligung des Kölner Universitätsklinikums dar.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Amico A, Cuttini M, Rava L, Mercuri E, Messina S, Pane M, Mastella C, Chiarini-Testa M, Brahe C, Tiziano D, Vita G, Bertini E (pers. Mitteilung) Clinical and genetic factors as predictors of survival in spinal muscular atrophy type1
- 2 Anderson RH, Webb S, Brown NA, Lamers W, Moorman A (2003) Development of the heart: (2) septation of the atriums and ventricles. *Heart* 89:949-958
- 3 Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, Coover DD, Monani UR, Chen X, Whitney M, Pollok B, Zhang M, Androphy E, Burghes AH (2001) Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type1 spinal muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet* 10:2841-9
- 4 Bingham PM, Shen N, Rennert H, Rorke LB, Black AW, Marin-Padilla MM, Nordgren RE (1997) Arthrogryposis due to infantile neuronal degeneration associated with deletion of the SMN2 gene. *Neurology* 49:848-851
- 5 Brahe C, Zappata S, Velona I, Bertini E, Servidei S, Tonali P, Neri G (1993) Presymptomatic diagnosis of SMA III by genotype analysis. *Am J Med Genet* 45:408-411
- 6 Brahe C, Servidei S, Zappata S, Ricci E, Tonali P, Neri G (1995) Genetic homogeneity between childhood-onset and adult-onset autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 346:741-742
- 7 Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehnrubl FA, Raschke H, Blumche I, Eyupoglu IY, Wirth B (2003) Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 12:2481-9

- 8 Brichta L, Holker I, Haug K, Klockgether T, Wirth B (2006) In vivo activation of SMN in spinal muscular atrophy carriers and patients treated with valproate. *Ann Neurol* 59:970-975
- 9 Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla, Penchaszadek GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, Dubowitz V, Zerres K, Hausmanova-Petrusewicz I, Ott J, Munsat TL, Gilliam TC (1990) Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* 344:540-541
- 10 Bürglen L, Spiegel R, Ignatius J, Cobben JM, Landrieu L, Lefebvre S, Munnich A, Melki J (1995) SMN gene deletion in a variant of infantile spinal muscular atrophy. *Lancet* 346:316-317
- 11 Bürglen L, Amiel J, Viollet L, Lefebvre S, Burlet P, Clermont O, Raclin V, Landrieu P, Verloes A, Munnich A, Melki J (1996) Survival motor neuron gene deletion in the arthrogryposis multiplex congenita – spinal muscular atrophy association. *J Clin Invest* 98:1130-1132
- 12 Burghes AHM (1997) When is a deletion a deletion ? When it is converted. *Am J Hum Genet* 61:9-15
- 13 Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K (1997) Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 61:40-50
- 14 Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9808-13
- 15 Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacène E, Roblot N, Joshi V, Moreau MH, Melki J (2001) Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J Cell Biol* 152:1107-1114

- 16 Clark KL, Yutzey KE, Benson DW (2006) Transcription factors and congenital heart defects. *Annu Rev Physiol* 68:97-121
- 17 Claus P, Doring F, Gringel S, Müller-Ostermeyer F, Fuhlrott F, Kraft T, Grothe C (2003) Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival motoneuron protein. *J Biol Chem* 278:479-485
- 18 Clermont O, Burlet P, Lefebvre S, Bürglen L, Munnich A, Melki J (1995) SMN gene deletions in adult-onset spinal muscular atrophy. *Lancet* 346:1712-1713
- 19 Cobben JM, Steege van der, Grootsholten P, Visser M de, Scheffer H, Buys CHCM (1995) Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 57:805-808
- 20 Cook AL, Curzon CL, Milazzo AS (2006) An infant with hypoplastic left heart syndrome and spinal muscular atrophy. *Cardiol Young* 16:78-80
- 21 Coovert DD, Le TT, Mc Andrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 6:1205-1214
- 22 Czeizel A, Hamula J (1989) A Hungarian study on Werdnig-Hoffmann disease. *J. Med Genet* 26:761-3
- 23 Devriendt K, Lammens M, Schollen E, Van Hole C, Dom R, Devlieger H, Cassiman JJ, Fryns JP, Matthijs G (1996) Clinical and molecular genetic features of congenital spinal muscular atrophy. *Ann Neurol* 40:731-738
- 24 El-Matary W, Kotagiri S, Cameron D, Peart I (2004) Spinal muscular atrophy type 1 (Werdnig-Hoffmann disease) with complex cardiac malformation. *Eur J Pediatr* 163:331-332

- 25 Emery AEH (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey. *Neuromuscul Disord* 1:19-29
- 26 134th ENMC International Workshop: Outcome Measures and Treatment of Spinal Muscular Atrophy, 11-13 February 2005, Naarden, Netherlands, *Neuromuscular Disorders* 15:802-16
- 27 Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B (2002) Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 70:358-68
- 28 Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A, Le Meur M, Melki J. Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9:849-858
- 29 Garcia-Cabezas MA, Garcia-Alix A, Martin Y, Guitérrez M, Hernandez C, Rodriguez JI, Morales C (2004) Neonatal spinal muscular atrophy with multiple contractures, bone fractures, respiratory insufficiency and 5q13 deletion. *Acta Neuropathol (Berl)* 107:475-478
- 30 Garne E (2006) Atrial and ventricular septal defects – epidemiology and spontaneous closure. *J Matern Fetal Neonatal Med* 19:271-276
- 31 Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH, Lehner T, Penchaszadeh GK, Daniels R (1990) Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* 336:271-273
- 32 Hahnen E, Forkert R, Marke C, Rudnik-Schöneborn S, Schönling J, Zerres K, Wirth B (1995) Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum Mol Genet* 4:1927-1933

- 33 Hahnen E, Schönling J, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Wirth B (1996) Hybrid survival motor neuron genes in patients with autosomal recessive spinal muscular atrophy: new insights into molecular mechanisms responsible for the disease. *Am J Hum Genet* 59:1057-1065
- 34 Harms V (1998) *Biomathematik, Statistik und Dokumentation*
- 35 Helmken C, Hofmann Y, Schoenen F, Oprea G, Raschke H, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Wirth B (2003) Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1. *Hum Genet* 114:11-21
- 36 Hausmanowa-Petrusewicz I, Zaremba J, Borkowska J (1979) Chronic form of childhood spinal muscular atrophy: are the problems really solved ? *J Neurol Sci* 43:313-327
- 37 Ioos C, Leclair-Richerd D, Mrad S, Barois A, Estournet-Mathiaud B (2004) Respiratory capacity course in patients with infantile spinal muscular atrophy. *Chest* 126:831-837
- 38 Jong Y-J, Chang J-G, Wu J-R (1998) Large-scale deletions in a Chinese infant associated with a variant form of Werdnig-Hoffmann disease. *Neurology* 51:878-879
- 39 Kaye EM, Doll RF, Narowicz MR, Smith FI (1994) Pelizaeus-Merzbacher disease presenting as spinal muscular atrophy: clinical and molecular studies. *Ann Neurol* 36:916-919
- 40 Kelter AR, Herchenbach J, Wirth B (2000) The transcription factor-like nuclear regulator (TFNR) contains a novel 55-amino-acid motif repeated nine times and maps closely to SMN1. *Genomics* 70:315-26

- 41 Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Le Paslier D, Frezal J, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A, Melki J (1995) Identification and characterization of spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80:155-165
- 42 Lopez-Sanchez C, Climent V, Schoenwolf GC, Alvarez IS, Garcia-Martinez V (2002) Induction of cardiogenesis by Hensen's node and fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res* 309:237-249
- 43 Lunn MR, Root DE, Martino AM, Flaherty SP, Kelley BP, Coover DD, Burghes AH, Man NT, Morris GE, Zhou J, Androphy EJ, Sumner CJ, Stockwell BR (2004) Indoprofen upregulates the survival motor neuron protein through a cyclooxygenase-independent mechanism. *Chem Biol* 11:1489-1493
- 44 Macleod MJ, Taylor JE, Lunt PW, Mathew CG, Robb SA (1999) Prenatal onset spinal muscular atrophy. *Eur J Paediatr Neurol* 3:65-72
- 45 Maslen CL (2004) Molecular genetics of atrioventricular septal defects. *Curr Opin Cardiol* 19:205-210
- 46 Mc Andrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR, Prior TW, Burghes AH (1997) Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMN1 and SMN2 gene copy number. *Am J Hum Genet* 60:1411-1422
- 47 McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE (2003) Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol* 162:919-931
- 48 Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot MF, Burlet P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carriere JP, Fardeau M (1990a) Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 344:767-768

- 49 Melki J, Sheth P, Abdelhak S, Burlet P, Bachelot MF, Lathrop MG, Frezal J, Munnich A (1990b) Mapping of acute (type1) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators. *Lancet* 336:271-273
- 50 Monani UR, Coovert DD, Burghes AHM (2000) Animal models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9:2451-2457
- 51 Monani UR (2005) Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* 48:885-896
- 52 Mulleners WM, van Ravenswaay CM, Gabreels FJM, Hamel BCJ, van Oort A, Sengers RCA (1996) Spinal muscular atrophy combined with congenital heart disease: a report of two cases. *Neuropediatr* 27:333-334
- 53 Munsat TL, Davies KE (1992) International SMA consortium meeting. (26-28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord* 2:423-8
- 54 Ogino S, Wilson RB (2002) Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Genet* 111:477-500
- 55 Oprea GE, Kröber S, McWorther ML, Rossoll W, Müller S, Krawczak M, Bassell GJ, Beattie CE, Wirth B (2008) Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* 320:524-527
- 56 Pearn J (1973a) Gene frequency of acute Werdnig-Hoffmann disease (SMA type 1): a total population survey in North-East England. *J Med Genet* 10:260-265
- 57 Pearn J (1973b) Fetal movements and Werdnig-Hoffmann disease. *J Neurol Sci* 18:373-379
- 58 Pearn J (1978) Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 15:409-413

- 59 Pearn J (1980) Classification of spinal muscular atrophies. *Lancet* 1:919-22
- 60 Pellizzoni L (2007) Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO reports* 8:340-345
- 61 Prior TW, Swoboda KJ, Scott HD, Hejmanowski AQ (2004) Homozygous *SMN1* deletions in unaffected members and modification of the phenotype by *SMN2*. *Am J Med Genet* 130A:307-310
- 62 Roberts DF, Chavez J, Court SD (1970) The genetic component in child mortality. *Arch Dis Child* 45:33-8
- 63 Rudnik-Schöneborn S, Forkert R, Hahnen E, Wirth B, Zerres K (1996) Clinical spectrum and diagnostic criteria of infantile spinal muscular atrophy: further delineation on the basis of SMN gene deletion findings. *Neuropediatrics* 27:8-15
- 64 Rudnik-Schöneborn S, Lützenrath S, Borkowska J, Karwanska A, Hausmanowa-Petrusewicz I, Zerres K (1998) Analysis of creatine kinase (CK) activity in 504 patients with proximal spinal muscular atrophy (SMA) types 1-3 from the point of view of progression and severity. *Eur Neurol* 39:154-162
- 65 Soler-Botija C, Cusco I, Caselles L, Lopez E, Baiget M, Tizzano EF (2005) Implication of fetal *SMN2* expression in type 1 SMA pathogenesis: protection or pathological gain of function. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:215-223
- 66 Spiegler AWJ, Hausmanowa-Petrusewicz I, Borkowska J, Klopocka A (1990) Population data on acute infantile and chronic childhood spinal muscular atrophy in Warsaw. *Hum Genet* 85:211-214
- 67 Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, Perhac JS, Hill B, Coover DD, Schussler K, Chen X, Jarecki J, Burghes AHM, Taylor JP, Fischbeck KH (2003): Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol* 54:647-654

- 68 Taylor JE, Thomas NH, Lewis CM, Abbs SJ, Rodrigues NR, Davies KE, Mathew CG (1998) Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 6:467-474
- 69 Thomas NH, Dubowitz V (1994) The natural history of type 1 (severe) spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 4:497-502
- 70 Tsai LK, Tsai MS, Lin TZ, Hwu WL, Li H (2006): Establishing a standardized therapeutic testing protocol for spinal muscular atrophy. *Neurobiology of Disease* 24:286-295
- 71 Valesco E, Valero C, Moreno F, Hernandez-Chio C (1996) Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype. *Hum Mol Genet* 5:257-263
- 72 Van der Steege G, Grootsholten PM, Cobben JM, Zappata S, Scheffer H, den Dunnen JT, Van Ommen GJ, Brahe C, Buys CH (1996) Apparent gene conversions involving the SMN gene in the region of the spinal muscular atrophy locus on chromosome 5. *Am J Hum Genet* 59:834-8
- 73 Vitali T, Sossi V, Tiziano F, Zappata S, Giuli A, Paravatou-Petsotas M, Neri G, Brahe C (1999) Detection of the survival motor neuron (SMN) genes by FISH: further evidence for a role for *SMN2* in the modulation of disease severity in SMA patients. *Hum Mol Genet* 8:2525-2532
- 74 Vitte JM, Davoult B, Roblot N, Mayer M, Joshi V, Courageot S, Tronche F, Vadrot J, Moreau MH, Kemeny F, Melki J (2004) Deletion of murine exon 7 directed to the liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload. *Am J Pathol* 165:1731-1741
- 75 Vuopala K, Leisti J, Herva R (1994) Lethal arthrogryposis in Finland – a clinic-pathological study of 83 cases during thirteen years. *Neuropediatrics* 25:308-315

- 76 Wang CH, Xu J, Carter Ta, Ross BM, Dominski MK, Bellcross CA, Penchaszadek GK, Munsat TL, Gilliam TC (1996) Characterization of survival motor neuron (SMNT) gene deletions in asymptomatic carriers of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 5:359-365
- 77 Wirth B, Tessarolo D, Hahnen E, Rudnik-Schöneborn S, Raschke H, Liguori M, Giacanelli M, Zerres K (1997a) Different entities of proximal spinal muscular atrophy within one family. *Hum Genet* 100:676-680
- 78 Wirth B, Schmidt T, Hahnen E, Rudnik-Schöneborn S, Krawczak M, Müller-Myhsok B, Schönling J, Zerres K (1997b) De novo rearrangement found in 2% index patients with spinal muscular atrophy: Mutational mechanisms, parental origin, mutation rate and implications for genetic counseling. *Am Hum Genet* 61:1102-1111
- 79 Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schöneborn S, Wienker T, Zerres K (1999) Quantitative analysis of SMN copies: identification of subtle SMNt mutations in SMA patients, genotype-phenotype correlation and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 64:1340-1356
- 80 Wirth B (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* 15: 228-37
- 81 Wirth B (2002) Spinal muscular atrophy: state-of-the-art and therapeutic perspectives. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 3:87-95
- 82 Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmüller H, Blick S, Baasner A, Heller R (2006) Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet* 119:422-8

- 83 Yosuke H, Retno S, Ahmad H, Tomoko A, Yasukiro T, Hiroko W, Masafumi M, Hisahide N (2002) Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity. *J Neurol* 249:1211-1219
- 84 Zhang ML, Lorson CL, Androphy EJ, Zhou J (2001) An in vivo reporter system for measuring increased inclusion of exon 7 in SMN2 mRNA : potential therapy of SMA. *Gene Ther* 8:1532-8
- 85 Zerres K, Rudnik-Schöneborn S (1995a) Natural history in proximal spinal muscular atrophy (SMA): clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol* 52:518-523
- 86 Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Dubowitz V (1995b) Guidelines for symptomatic therapy in spinal muscular atrophy SMA. *Acta Cardiomiol* 7:61-66
- 87 Zerres K, Wirth B, Rudnik-Schöneborn S (1997a) Spinal muscular atrophy – clinical and genetic correlations. *Neuromuscul Disord* 7:202-207
- 88 Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Forrest E, Lusakowska A, Borkowska J, Hausmanowa-Petrusewicz I (1997b) A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA):569 patients. *J Neurol Sci* 146:67-72
- 89 Zerres K, Rudnik-Schöneborn S, Wirth B (1998) Proximale spinale Muskelatrophien. *Deutsches Ärzteblatt* Heft 26, 26.6.1998:A-1667
- 90 Zerres K, Grimm T, Rudnik-Schöneborn S (2005) Modifikation des Phänotyps der proximalen spinalen Muskelatrophie (SMA) durch die *SMN2*-Genkopie. *Medgen* 17:161-165

7 Eigene Veröffentlichungen

Rudnik-Schöneborn S, Heller R, Berg C, **Betzler C**, Grimm T, Eggermann T, Eggermann K, Wirth R, Wirth B, Zerres K (2008) Congenital heart disease is a feature of severe infantile spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 45:635-638

Rudnik-Schöneborn S, Berg C, Zerres K, **Betzler C**, Grimm T, Eggermann T, Eggermann K, Wirth R, Wirth B, Heller R: Genotype-phenotype studies in infantile spinal muscular atrophy type I: implications for future clinical trials. *Clinical Genetics* 2008, accepted

Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Berg C, **Betzler C**, Grimm T, Eggermann T, Eggermann K, Wirth R, Wirth B, Heller R (2008) Genotype-phenotype study in infantile spinal muscular atrophy type I – important information for future clinical trials. *Medizinische Genetik* 1, P138:120-121

8 Anhang

8.1 Antrag an die Ethik-Kommission

Antrags-Nr.: 06-060

**Antrag an die Ethik-Kommission
der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln**

**Kollaborative Studie zum Krankheitsverlauf der
infantilen spinalen Muskelatrophie**

Prof. Dr. Brunhilde Wirth

Institut für Humangenetik der Universität zu Köln

Kerpener Str. 34

50931 Köln

Tel. 0221 - 478 86864

Fax 0221 - 478 86465

A Formales

1. Bezeichnung des Vorhabens

Retrospektive Datenerhebung per Fragebogen (Eltern), medizinischer Untersuchungsbefunde und ggf. telephonischem Interview (betreuende Ärzte) zum Krankheitsverlauf (natural history) bei der infantilen Form der spinalen Muskelatrophie (SMA).

Sofern noch nicht im Rahmen der molekulargenetischen Diagnosesicherung durchgeführt, nachträgliche molekulargenetische Bestimmung der *SMN2*-Kopienzahl an bereits vorhandenen DNA-Proben.

Statistische Analyse bzgl. der Endpunkte „Tod“ und „länger als 14 aufeinander-folgende Tage mindestens 16stündiger Beatmung“ sowie bzgl. einer möglichen Korrelation zwischen Krankheitsverlauf und *SMN2*-Kopienzahl.

2. Antragsteller/in

Prof. Dr. rer. nat. Brunhilde Wirth

Dr. med. Raoul Heller
(D.Phil.)

Fachhumangenetikerin

Facharzt für Humangenetik

Institut für Humangenetik

Institut für Humangenetik

Universität zu Köln

Universität zu Köln

Kerpener Str. 34

Kerpener Str. 34

50931 Köln

50931 Köln

Tel.: 0221 - 478 86833

Tel.: 0221- 478 86832

Fax: 0221 - 478 86465

Fax: 0221- 478 86465

brunhilde.wirth@uk-koeln.de

raoul.heller@uk-koeln.de

3. Art und Zahl der Prüfstellen.

Institut für Humangenetik der Universität zu Köln, Institut für Humangenetik der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen

4. Wurde schon ein Antrag in gleicher Sache bei einer anderen Ethik-Kommission gestellt?

Ja, mit dem vorliegenden Antrag koordinierte Eingabe von Herrn Prof. Dr. med. Zerres, Leiter des Instituts für Humangenetik der RWTH Aachen,

bei der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen.
Referenz-Nr. *EK-03606*, s. beiliegende Kopien des Antrags (Anlage 1) und der
Begutachtung (Anlage 2).

5. **Schriftliche Einverständniserklärung des Direktors der jeweiligen Klinik mit der Studie.**
siehe Anhang.

6. **Darlegung der studienbedingten Mehrkosten, Finanzierungsplan.**
s. Punkt 7.

7. **Angaben darüber, in wie weit die Studie fremdfinanziert wird.**
z. Zt. keine Fremdfinanzierung.

8. **Schriftliche Einverständniserklärung dazu, dass die im Falle industriell gesponsorter Studien anfallende Beratungsgebühr unmittelbar von einem bei der Verwaltung des Klinikums zu Köln (Frau Landvogt) geführten Drittmittelkonto des Antragstellers abgebucht werden darf.**
Entfällt.

9. **Bei Multicenterstudien: Angaben darüber, wieviele Patienten/Probanden an der Universität zu Köln in die Studie einbezogen werden sollen.**
ca. 60 in Köln, ca. 60 in Aachen

10. **„Hiermit erkläre ich gegenüber der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln, dass ich die sachlichen, personellen und organisatorischen Anforderungen der klinischen Prüfungen gewährleisten werde.“**

11. **Anwendung radioaktiver Stoffe oder ionisierender Strahlung am Menschen.**
Entfällt.

B. Studienbeschreibung

1. Wissenschaftliche Zielsetzung.

Die frühkindliche Form der autosomal-rezessiven spinalen Muskelatrophie ist die schwerste Form dieser Erkrankung und führt in ca. 70% der Fälle innerhalb der ersten beiden Lebensjahre zum Tode, vorwiegend infolge von respiratorischen Komplikationen (Lungenentzündungen, Atemversagen).

Eine Therapiestudie mit Valproat in Zusammenarbeit mit mehreren universitären Kinderkliniken, der SMA-Selbsthilfe-Gruppe, einem pharmazeutischen Hersteller aus Deutschland sowie dem KKS ist in Vorbereitung. Es wird sich um eine einarmige Studie handeln, da ein Placebo-Kontrollarm aus mehreren Gründen nicht realisiert werden kann. Demzufolge wird auf eine historische, unbehandelte Kontrollgruppe zurückgegriffen werden müssen, um einen evtl. therapeutischen Nutzen von Valproat erkennen zu können.

Erstes Ziel der Studie des vorliegenden Antrages ist es daher, eine solche historische Kontrollgruppe rezenteren Datums und damit vergleichbarer medizinischer Versorgung durch Dokumentation des Krankheitsverlaufes bei Patienten mit frühkindlicher SMA zu erfassen, die zwischen 2000-2005 in Aachen, Köln oder anderen humangenetischen Laboren innerhalb Deutschlands diagnostiziert worden sind. Angestrebte Mindestzahl der zur Auswertung gelangenden Krankheitsverläufe ist ca. 70 Patienten, also ungefähr gleich viele, wie in die VPA-Therapiestudie aufgenommen werden sollen.

Es ist bekannt, dass das dem *SMN1*-Gen ähnliche *SMN2*-Gen ca. 10% funktionstüchtiges SMN-Eiweiß produziert. Zweites Ziel ist daher, retrospektiv zu untersuchen, ob und wie eng die Zahl der individuell in unterschiedlicher Zahl vorhandenen *SMN2*-Genkopien (zwischen 1 und 3 Genkopien pro Genom in Patienten mit frühkindlicher SMA) mit dem jeweils beobachteten SMA-Krankheitsverlauf korreliert. Tendentiell wird beobachtet, dass bei höherer *SMN2*-Kopienzahl Patienten mit SMA durchschnittlich länger überleben. Sollte eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden können, wird die *SMN2*-Kopienzahl auch in der geplanten Valproattherapiestudie zur prognostischen Stratifizierung eingesetzt werden.

Ein Teil des Projekts (retrospektive Datenerhebung per Fragebogen, Auswertung der medizinischen Untersuchungsbefunde und Interview am Telefon) wird im Rahmen von medizinischen Doktorarbeiten in unserem und im Aachener Institut durchgeführt.

2. Prüfplan.

a) Untersuchungsinstrumente: Fragebögen, Analyse vorhandener DNA-Proben.

b) Patientenkollektiv: Patientin mit infantiler spinaler Muskelatrophie (SMA), die in den beteiligten Laboratorien zu diagnostischen Zwecken molekulargenetische untersucht wurden.

c) Studienziel: Erfassung, wie variabel der Krankheitsverlauf sein kann, Korrelation klinischer Daten (motorische Funktion, Überlebenszeit, Beatmungspflicht) mit der Zahl der *SMN2*-Genkopien.

d) Einschlusskriterien: s. Punkt 4

e) Ablauf:

- Kontakt mit Eltern betroffener Kinder, deren DNA-Proben in den beteiligten Laboratorien vorhanden sind, über die einsendenden Ärzte (s. Anlage 3). In beiden Zentren zusammen erfüllen ca. 120 Patienten die Einschlusskriterien. Je nach Rücklauf ist geplant, weitere diagnostische Laboratorien mit einzubeziehen.
 - Zusendung von Studienunterlagen an die Eltern von SMA-Patienten. Bei Einverständnis nach Lektüre der Patienteninformation (Anlage 4) Rücksendung der Einwilligungserklärung (Anlage 5) und des ausgefüllten Fragebogens zum Krankheitsverlauf (Anlage 6).
 - Nach Eingang der Studienunterlagen elektronische Erfassung der klinischen Daten.
 - Molekulargenetische Untersuchung des *SMN2*-Gens bei den Patienten, wo dies im Rahmen der Diagnostik noch nicht durchgeführt wurde.
- f) Voraussichtliche Dauer 04/2006 - 12/2006

3. Vorgesehene Eingriffe bzw. Belastungen der Probanden bzw. Patienten.

Unterzeichnen der Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie, Ausfüllen eines 4seitigen Fragebogens (s. Anlage 6)

4. Probanden- bzw. Patientenauswahl (Ein- und Ausschlußkriterien).

- ◆ Gesicherte molekulargenetische Diagnose, d.h. Nachweis eines Stückverlustes des ursächlichen *SMN1*-Gens sowohl auf dem Chromosom 5 mütterlicher als auch auf dem väterlicher Herkunft (homozygote *SMN1*-Deletion).
- ◆ Diagnose gestellt im Zeitraum 2000-2005
- ◆ Erkrankungsbeginn in den ersten 6 Monaten nach Geburt.

5. Tierversuche.

Keine geplant.

6. Art der Prüfung.

a) Retrospektive Datenerhebung zum SMA Krankheitsverlauf per Fragebogen und Auswertung medizinischer Befundberichte.

b) Retrospektive Ergänzung der vorhandenen molekulargenetischen Diagnostik durch Bestimmung der *SMN2*-Kopienzahl mittels quantitativer PCR in Labor des Instituts für Humangenetik, Universität zu Köln.

7. Welche gesetzlichen Bestimmungen/Verordnungen sind zu berücksichtigen?
Gentechnikgesetz (GenTG).

8. Bei nicht zugelassenen Arzneimitteln.
Entfällt.

9. Mögliche Komplikationen und/oder Risiken.
Emotionale Belastung der Eltern insbesondere von bereits verstorbenen Kindern.

10. Nutzen-Risiko-Abwägung.

Nutzen

- Die an der Erhebung teilnehmenden Familien haben keinen unmittelbaren Nutzen von der Studie.
- Die Studie ist unverzichtbar für eine geplante Therapiestudie, da ausreichende Daten zum natürlichen Krankheitsverlauf bei infantiler SMA insbesondere jüngerer Datums bisher noch nicht existieren.
- Die Beratung zukünftiger Familien hinsichtlich des zu erwartenden Krankheitsverlaufes und daran anzupassender medizinischer Interventionen soll verbessert werden.

Risiken

- Das Anschreiben weist auf die Möglichkeit einer Kontaktaufnahme von Seiten der Eltern zur humangenetischen Beratung hin. Im Rahmen einer solchen Beratung kann auf evtl. Familienplanung und falls erforderlich auf das Angebot einer psychotherapeutischen Unterstützung eingegangen werden.
- Es besteht keine Alternative zur freiwilligen Befragung, um den natürlichen Krankheitsverlauf zu dokumentieren.

11. Zwischenauswertung und Abbruchkriterien

Bei zu geringem Rücklauf Einbeziehung weiterer diagnostischer Labore.

12. Inhalt der Probanden-/Patientenaufklärung

s. Anlage 4: „Patienteninformation“.

13. Einverständniserklärung

s. Anlage 5: „Einverständniserklärung“.

14. Es muß darauf hingewiesen werden, dass alle Patientendaten der ärztlichen Schweigepflicht unterliegen

s. Anlage 4: „Patienteninformation“.

15. Versicherungsschutz Nicht anwendbar.

16. Welche Überlegungen bestehen hinsichtlich der Kostendeckung der Studie?

Die anstehenden Kosten werden teils aus den Mitteln der Lehre und Forschung gedeckt. Ein gemeinsamer Antrag der beiden Prüfstellen (Köln und Aachen) an die Elternvereinigung „Forschung und Therapie für SMA“ ist in Vorbereitung.

C. Kurzfassung

Geplant ist eine Erhebung und Analyse klinischer und genetischer Daten zur infantilen spinalen Muskelatrophie mittels Fragebogen, medizinischer Untersuchungsbefunde und molekulargenetischer Analysen. Potentielle Studienteilnehmer sind Eltern, deren Kind in den ersten 6 Lebensmonaten an einer infantilen spinalen Muskelatrophie erkrankt und wo die klinische Diagnose durch eines der an der Studie beteiligten Laboratorien molekulargenetisch durch den Nachweis eines homozygoten *SMN1*-Verlusts bestätigt worden ist.

Das Projekt wird zeitgleich am Institut für Humangenetik der Universität Köln und Institut der RWTH Aachen (Studienleitung: Prof. Dr. med. K. Zerres, Antragstellerin: Frau Prof. Dr. med. Rudnik-Schöneborn) durchgeführt. Der Kontakt wird über die einsendenden Ärzte hergestellt.

Erfasst werden nur Patienten, bei denen zwischen 2000 und 2005 eine molekulargenetische Diagnostik erfolgt ist. Bei den Patienten, deren Eltern einer wissenschaftlichen Verwendung der von Ihrem Kind vorhandenen DNA-Probe zugestimmt haben, ist vorgesehen, soweit noch nicht diagnostisch durchgeführt, eine quantitative Analyse der *SMN*-Genkopien vorzunehmen, um die Zahl der *SMN2*-Genkopien mit dem klinischen Verlauf korrelieren zu können.

Anhang

- (1) Kopie des Ethik-Antrags des Instituts für Humangenetik der RWTH Aachen (federführend)
- (2) Votum der dortigen Ethik-Kommission
- (3) Anschreiben an Einsender
- (4) Probanden-/Patientenaufklärung („Patienteninformation“).
- (5) Einverständniserklärung
- (6) Fragebogen zum klinischen Verlauf

8.2 Anschreiben an Einsender

-Kollaborative Studie- Krankheitsverlauf der infantilen spinalen Muskelatrophie

Studienleitung Aachen:
Prof. Dr. Sabine Rudnik-Schöneborn/Prof. Dr. Klaus Zerres
Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum der RWTH
Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen
Tel. 0241- 80 80178, Fax: 0241-80 82580
Email : srudnik-schoeneborn@ukaachen.de

Studienleitung Köln:
Dr. Raoul Heller/ Prof. Dr. Brunhilde Wirth
Institut für Humangenetik, Klinikum der Universität zu Köln
Kerpener Str. 34, 50924 Köln
Tel. 0221- 478 86464, Fax: 0221- 478 86812
Email: raoul.heller@uk-koeln.de

Herr/Frau

Name des Patienten :

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

wir führen eine Untersuchung zum Krankheitsverlauf der schweren infantilen spinalen Muskelatrophie (SMA) durch und möchten deshalb mit Eltern Kontakt aufnehmen, bei deren Kind diese Diagnose gestellt wurde.

Sie gehören zu jenen Einrichtungen, die uns in den Jahren 2001-2005 eine Blut- bzw. DNA-Probe des o. g. Kindes zur molekulargenetischen Diagnostik bei infantiler SMA zugesandt haben. Die Diagnose einer infantilen SMA ließ sich bei dem Kind mit dem Vorliegen einer homozygoten Deletion des SMN1-Gens bestätigen. Wir möchten mit Hilfe eines vierseitigen Fragebogens Einzelheiten zum Krankheitsverlauf des Kindes in Erfahrung bringen. Darüber hinaus ist vorgesehen, eine ergänzende genetische Untersuchung an der von dem Kind vorhandenen DNA-Probe durchzuführen. Einzelheiten können Sie der beiliegenden Patienteninformation entnehmen. Eingeschlossen werden nur Patienten, bei denen die genetische Untersuchung in den ersten 6 Lebensmonaten eingeleitet wurde.

Wir möchten Sie bitten, beiliegende Studienunterlagen an die Familie des o. g. Kindes weiterzuleiten. Wenn Sie keinen Kontakt zu der Familie haben, möchten wir Sie bitten, uns die Adresse der Familie zu nennen, damit wir uns selbst mit den Eltern in Verbindung setzen können. Alternativ wären wir Ihnen dankbar, wenn Sie uns die Anschrift der/des betreuenden Kinderärztin/Kinderarztes mitteilen würden, damit wir über diesen Weg mit den Eltern in Kontakt treten können.

Bitte faxen Sie das beiliegende Rücksendeformular an uns (Fax 0221- 478 86812) zurück, damit wir das weitere Vorgehen mit Ihnen abstimmen können.

Wir danken Ihnen im Voraus für Ihre Mitarbeit und stehen Ihnen für ergänzende oder persönliche Fragen gerne zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen

Prof.Dr.Brunhilde Wirth

Dr.med. Raoul Heller

8.3 Patientenaufklärung („Patienteninformation“)

-Kollaborative Studie- Krankheitsverlauf der infantilen spinalen Muskelatrophie

Studienleitung Aachen:
Prof. Dr. Sabine Rudnik-Schöneborn/Prof. Dr. Klaus Zerres
Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum der RWTH
Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen
Tel. 0241- 80 80178, Fax: 0241-80 82580
Email : srudnik-schoeneborn@ukaachen.de

Studienleitung Köln:
Dr. Raoul Heller/ Prof. Dr. Brunhilde Wirth
Institut für Humangenetik, Klinikum der Universität zu Köln
Kerpener Str. 34, 50924 Köln
Tel. 0221- 478 86464, Fax: 0221- 478 86812
Email: raoul.heller@uk-koeln.de

Patienteninformation

Sehr geehrte Damen, sehr geehrte Herren,

über die Ihr Kind betreuende Einrichtung erhalten Sie diese Unterlagen, mit der Bitte unsere Studie zu unterstützen. Wir führen eine Untersuchung zum Krankheitsverlauf der infantilen spinalen Muskelatrophie (SMA) durch und möchten deshalb mit Eltern Kontakt aufnehmen, bei deren Kind diese Diagnose gestellt wurde.

Welche Ziele verfolgen wir mit unserer Untersuchung?

Die SMA kann sehr unterschiedlich verlaufen und wird in drei Typen (SMA I-III) untergliedert. Der Übergang zwischen den einzelnen Formen ist fließend. Bis heute ist nicht bekannt, warum der Verlauf bei vergleichbarer genetischer Veränderung sehr verschieden sein kann.

Die Mehrzahl der SMA-Patienten zeigt einen Stückverlust (Deletion) beider Kopien des sog. *SMN1*-Gens. Man spricht von einer homozygoten Deletion des *SMN1*-Gens. Neben dem *SMN1*-Gen gibt es eine zweite, sehr ähnliche Erbanlage, das *SMN2*-Gen. Beide Gene bilden einen lebensnotwendigen Eiweißstoff, das sog. SMN-Protein; jedoch wird über das *SMN2*-Gen nur ein Bruchteil des SMN-Proteins hergestellt. Bei SMA-Patienten, denen beide *SMN1*-Genkopien fehlen oder durch eine genetische Veränderung ausgeschaltet sind, reicht die Proteinbildung über das *SMN2*-Gen aber nicht aus, den Ausbruch der SMA zu verhindern. Patienten, die einen milderen Krankheitsverlauf zeigen, verfügen oftmals über mehr *SMN2*-Genkopien als Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf und weisen damit eine etwas höhere Bildung des SMN-Proteins auf.

Für zukünftige Therapiestudien ist es sehr wichtig zu wissen, wie der natürliche Verlauf der SMA ist. Nur dann kann man den eventuellen Erfolg einer Behandlung auch tatsächlich vom natürlichen Krankheitsverlauf unterscheiden. Wir möchten in unserer Studie gezielt Verläufe von SMA-Patienten dokumentieren, bei denen die Diagnose in den ersten 6 Lebensmonaten gestellt wurde. Darüber hinaus möchten wir die von den betroffenen Kindern vorhandene Erbsubstanz (DNA) hinsichtlich der Zahl der SMN2-Genkopien untersuchen, um die genetische Veränderung mit dem klinischen Bild vergleichen zu können.

Warum sprechen wir Sie an?

Sie gehören zu dem Kreis der Familien, bei deren Kind in den Jahren von ca. 2001 bis 2005 in einem der an der Untersuchung beteiligten Laboratorien die Diagnose einer SMA durch eine Genuntersuchung gesichert wurde. Eingeschlossen werden nur Patienten, bei denen die genetische Untersuchung in den ersten 6 Lebensmonaten eingeleitet wurde.

Da es hierbei mehrheitlich um Patienten mit einem schweren Verlauf handelt, ist uns bewusst, dass ein Teil der Patienten bereits verstorben ist. Die Information von verstorbenen Patienten ist für uns ebenfalls sehr wichtig, da sie uns eine Aussage zur möglichen Lebenserwartung bei der SMA erlaubt. Wir wissen, dass es für Sie nicht leicht ist, sich an unserer Studie zu beteiligen, wenn Sie ein Kind mit einer SMA verloren haben, aber wir hoffen dennoch auf Ihre Mitarbeit. Wir möchten mit unserer Untersuchung in Zukunft Familien helfen, deren Kinder an einer SMA erkrankt sind.

Wie können Sie uns unterstützen?

Wenn Sie mit der Teilnahme einverstanden sind, füllen Sie bitte die beiliegende Teilnahmezusage und den vierseitigen Fragebogen zum Verlauf der Erkrankung aus. Kosten entstehen Ihnen hierbei nicht, für die Rücksendung der Unterlagen erhalten Sie einen frankierten Rückumschlag.

In Ergänzung zu den von Ihnen gemachten Angaben benötigen wir ärztliche Untersuchungsbefunde zu speziellen Fragestellungen und vor allem bei durchgeführten Behandlungen. Auf dem Teilnahmeformblatt werden Sie gebeten, die behandelnden Ärzte von der Schweigepflicht zu entbinden. Erst dann ist es uns möglich, Einsicht in die jeweiligen ärztlichen Befunde zu erlangen.

Es ist keine ärztliche Untersuchung vorgesehen; bei Unklarheiten würden wir mit Ihnen in jedem Fall Kontakt aufnehmen. Die Bearbeitung des Fragebogens nimmt etwa eine halbe Stunde Zeit in Anspruch. Je nach Fragestellung und Stand der Forschung werden wir uns möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt mit der Bitte um eine weitere Mitarbeit an Sie wenden.

Zeitgleich bitten wir Sie um Erlaubnis, die von Ihrem Kind zu diagnostischen Zwecken gewonnene Erbsubstanz (DNA-Probe) für unsere wissenschaftliche Fragestellung zu verwenden. Es ist keine erneute Blutabnahme vorgesehen, Ihr Kind wird durch unsere Untersuchungen demnach nicht belastet.

Was geschieht mit persönlichen Angaben?

Bei wissenschaftlichen Studien werden persönliche Daten und medizinische Befunde erhoben. Die Weitergabe, Speicherung und Auswertung dieser studienbezogenen Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen ohne Namensnennung. Wir werden keinerlei persönliche Daten an Dritte weitergeben. Weitere Analysen – zum Beispiel statistische Auswertungen – werden ausschließlich mit verschlüsselten Daten durchgeführt.

Die Teilnahme an der Studie ist ganz und gar freiwillig. Sie können jederzeit und ohne Angaben von Gründen Ihr Einverständnis zur Teilnahme zurücknehmen, ohne dass Ihnen hieraus irgendwelche Nachteile entstehen.

Wir wären Ihnen für Ihre Mitarbeit sehr dankbar und stehen Ihnen für ergänzende oder persönliche Fragen gerne zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen

Für die Arbeitsgruppe Aachen:

Prof. Dr. med. Sabine Rudnik-Schöneborn

Prof. Dr. med. Klaus Zerres

Für die Arbeitsgruppe Köln:

Dr. med. Raoul Heller

Prof. Dr. Brunhilde Wirth

8.4 Einverständniserklärung

-Kollaborative Studie- Krankheitsverlauf der infantilen spinalen Muskelatrophie

Studienleitung Aachen:
Prof. Dr. Sabine Rudnik-Schöneborn/Prof. Dr. Klaus Zerres
Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum der RWTH
Pauwelsstr. 30, 52074 Aachen
Tel. 0241- 80 80178, Fax: 0241-80 82580
Email : srudnik-schoeneborn@ukaachen.de

Studienleitung Köln:
Dr. Raoul Heller/ Prof. Dr. Brunhilde Wirth
Institut für Humangenetik, Klinikum der Universität zu Köln
Kerpener Str. 34, 50924 Köln
Tel. 0221- 478 86464, Fax: 0221- 478 86812
Email: raoul.heller@uk-koeln.de

Teilnahmeerklärung

Name, Vorname des betroffenen Kindes: _____

Geburtsdatum: _____

Wir sind/ich bin bereit, die Studie zum Krankheitsverlauf der infantilen spinalen Muskelatrophie zu unterstützen und die gewünschten Angaben zu machen.

Wir sind/Ich bin ferner damit einverstanden, dass Sie mit den Ärzten, die mein Kind behandeln bzw. behandelt haben, Kontakt aufnehmen, um Einsicht in medizinische Befundberichte nehmen zu können.

Darüber hinaus sind wir/bin ich damit einverstanden, dass die von unserem/meinem Kind vorhandene DNA-Probe für wissenschaftliche Fragestellungen in den Arbeitsgruppen Aachen bzw. Köln herangezogen wird.

Uns/mir ist bewusst, dass die Auswertung mit verschlüsselten Daten erfolgt und sich aus den Untersuchungsergebnissen für unsere/meine persönliche Situation keine unmittelbaren Konsequenzen für die medizinische Betreuung ergeben werden.

Name, Vorname des Erziehungsberechtigten: _____

Anschrift: _____ (Str., Haus-Nr.)

_____ (PLZ, Ort)

_____ (Tel.-Nr.)

Datum

Unterschrift/en

9 Lebenslauf

Anschrift:

Name: Christopher Betzler
Anschrift: Brachtstraße 21, 45133 Essen
Tel.: 0179 - 66 81 771
E-Mail: chrisbetzler@web.de

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 05.03.1982
Geburtsort: Heidelberg
Staatsangehörigkeit: deutsch, französisch
Familienstand: ledig
Eltern: Prof. Dr. med. Michael Betzler, Chirurg
Frau Jeanne Betzler, geb. Reichling, Betriebswirtin
Geschwister: Aurélie, Maximilian und Alexander Betzler

Schulbildung:

1988-1991 Heiligenberg-Grundschule, Heidelberg
1991-1992 Graf-Spee-Grundschule, Essen
1992-2001 Goethe-Gymnasium, Essen
2001 Abitur
1999-2000 9 Monate (3 terms) Wellington-College, England

Zivildienst:

09/2001-06/2002 Alfried Krupp von Bohlen und Halbach Krankenhaus,
Essen

Studium:

10/2002 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der med.
Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
10/2004 Ärztliche Vorprüfung
10/2004 Wechsel an die med. Fakultät der Universität zu Köln
Praktisches Jahr:
08/2007-12/2007 1. Tertial: Chirurgie, Lariboisiere-Saint-Louis, Paris
12/2007-04/2008 2. Tertial: Orthopädie, Universitätsklinik Köln
04/2008-06/2008 3. Tertial: Innere Medizin, St.-Franziskus Hospital Köln
04/2009 Ärztliche Prüfung

Famulaturen:

03/2005-04/2005 Innere Medizin, Praxis Dr. G. Garanin, Essen
08/2005-09/2005 Plastische Chirurgie, Kaiserswerther Diakonie, Düsseldorf
03/2006-04/2006 Gefäßchirurgie, Clinique Sainte Marthe, Dijon, Frankreich
09/2006-10/2006 Gynäkologie, Universitätsklinikum Essen
02/2007-03/2007 Orthopädie, Universitätsklinikum Köln
03/2007-04/2007 Plastische Chirurgie, Kaiserswerther Diakonie, Düsseldorf
07/2007-08/2007 Plastische Chirurgie, Bergmannsheil, Bochum

Zusatzqualifikationen:

Sprachen:

Französisch, fließend in Wort und Schrift

Englisch, fließend in Wort und Schrift

Persönliche Interessen:

Fußball, Tennis, Skifahren, Schwimmen, Reisen, Kunst

Köln, den 07.09.2009