

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Neurologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. E. B. Ringelstein-

Sequenzanalyse der Cryptochromgene CRY 1 und CRY 2 bei Patienten mit
Narkolepsie und dem Syndrom der verzögerten Schlafphase

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Meißner, Tilo
aus Münster
2010

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Young
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Gerd Kurlemann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.09.2010

Zusammenfassung:

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Neurologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. E. B. Ringelstein-
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Young
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Gerd Kurlemann

ZUSAMMENFASSUNG

Sequenzanalyse der Cryptochromgene CRY 1 und CRY 2 bei Patienten mit
Narkolepsie und dem Syndrom der verzögerten Schlafphase
Meißner, Tilo

Die Narkolepsie und das Syndrom der verzögerten Schlafphase (DSPS¹) sind mit einer Störung des Schlaf-Wach-Rhythmus assoziiert. Die Narkolepsie geht typischerweise mit Tagesschläfrigkeit und Kataplexien einher. Beim DSPS ist die zirkadiane Rhythmik zum Abend und in die Nacht verschoben.

Eine Assoziation mit den Genen der zirkadianen Rhythmik gilt beim DSPS als gesichert und wird bei der Narkolepsie diskutiert. Zu den zentralen Genen der zirkadianen Rhythmik gehören die Cryptochromgene CRY 1 und CRY 2, die Periodogene PER 1-3, sowie CLOCK und BMAL1. Die Cryptochrom- und Periodogene bilden Proteine, die ihre eigene Aktivierung unterdrücken. Durch den Abfall wird die Expression von BMAL1 und CLOCK angeregt und diese aktivieren die Cryptochrom- und Periodogene, wodurch ein Oszillator für den Schlaf-Wachrhythmus entsteht.

Ziel der Doktorarbeit war die Mutationsanalyse der proteinkodierenden Sequenz der Cryptochrome CRY 1 und CRY 2 unter Erfassung der angrenzenden intronischen Sequenzen. Dazu wurden diese Gene bei 17 Narkolepsie Patienten und 3 Patienten mit DSPS sequenziert und anschließend die gefundenen Sequenzvariationen auf deren Häufigkeit in einer Kontrollgruppe untersucht.

Es fanden sich drei einfache Basenaustausche. Hinweise auf eine Assoziation der gefundenen Polymorphismen zu den untersuchten Erkrankungen ergaben sich nicht, zur Sicherstellung sind allerdings weitere Untersuchungen mit größeren Probandenzahlen anzustreben.

Beim DSPS wird ein autosomal dominanter Erbgang mit verminderter Penetranz als Ursache diskutiert, konnte aber für die untersuchten Gene bei dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 03.09.2010

¹ *engl.*: Delayed Sleep Phase Syndrome

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Überblick über die Narkolepsie	6
1.1.1	Geschichte	6
1.1.2	Klinik	7
1.1.3	Pathogenetik und Pathophysiologie	11
1.2	Überblick über das Syndrom der verzögerten Schlafphase	13
1.2.1	Geschichte	13
1.2.2	Klinik	14
1.2.3	Pathophysiologie und Pathogenetik	15
1.3	Aufgabenstellung	18
1.3.1	Arbeitsansatz	18
1.3.2	Kandidatengene CRY 1 und CRY 2	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Überblick	20
2.2	Probandenauswahl und Blutentnahme	20
2.3	DNA-Isolierung	20
2.4	Primer-Konstruktion	22
2.5	Gradienten PCR	22
2.6	PCR	25
2.7	Sequenzierung	26
2.8	Sequenzbestimmung	27
2.9	Typisierung des Kontrollkollektivs	27
2.10	Chemikalien und Geräte	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Primerdesign für die Probandenkollektive	30
3.2	Primer und Enzyme für die RFLP-Analyse	31
3.3	Sequenzanalyse	32
3.4	Polymorphismen in CRY 1 und CRY 2	34
4	Diskussion	36
4.1	Fragestellung	36
4.2	Methodik	37
4.3	Mutationsanalyse	38
4.3.1	Narkolepsie	38
4.3.2	Syndrom der verzögerten Schlafphase	40

4.4	Fazit	41
5	Zusammenfassung	42
6	Literaturverzeichnis	43
7	Lebenslauf	54
8	Anhang	i

1 Einleitung

1.1 Überblick über die Narkolepsie

1.1.1 Geschichte

Im Jahre 1862 erwähnte Caffé einen Patienten, der unter imperativen Schlafattacken litt [10]. Westphal und Fisher waren 1877/78 die ersten, die die typische Klinik von Schläfrigkeit und Muskelschwäche bei Erregung als Kasuistiken beschrieben [28, 105]. Da die Mutter von Westphals und die Schwester von Fishers Patienten ähnliche Symptome zeigten, wurde eine erbliche Komponente vermutet. Kurz darauf beschrieb Gélinau, den Fall eines Fassverkäufers der regelmäßig von imperativen Schlafattacken überwältigt wurde [30]. Nach seinem Vorschlag wurde die neu entdeckte Krankheit Narkolepsie² genannt [64]. Löwenfeld beschrieb Anfang des 20. Jahrhunderts den durch Emotionen ausgelösten Muskeltonusverlust als eigenständiges Symptom und bezeichnete dies als Kataplexie³ [62].

Zunächst gab es nur wenige bekannte Erkrankungsfälle. Durch das vermehrte Auftreten der Encephalitis Lethargica Epidemica nach dem 1. Weltkrieg stieg die Zahl jedoch deutlich an und es konnten weitere mit der Narkolepsie assoziierte Symptome identifiziert werden. Hierzu gehörten hypnagoge Halluzinationen, Schlaf lähmungen, automatisches Verhalten, gestörter Nachtschlaf und Dissoziationszustände ("Wachanfälle"). Dies führte auch zu einer Kontroverse über die genaue Definition der Narkolepsie. [64, 65].

Es wurden psychosomatische, organische und hereditäre Erklärungsansätze in Erwägung gezogen. 1930 fand Van Economo Hinweise darauf, dass der posteriore Hypothalamus bei der Vigilanzsteuerung eine wichtige Rolle hat. Er vermutete bereits eine Störung dieser Region als wahrscheinliche Ursache der Narkolepsie [102].

Der erste therapeutische Fortschritt war die Therapie mit dem Amphetamin Benzedrin, die 1935 von Prinzmetal und Bloomberg vorgeschlagen wurde [82]. Sie löste die bis dahin wenig erfolgreichen Therapieversuche mit Strychnin, Koffein, Hydrotherapie und anderem ab. [64, 65].

Nachdem 1953 Hinweise auf den REM⁴-Schlaf entdeckt wurden [4], gelang Daly 1957 bei Narkolepsiepatienten der Nachweis eines ständigen Wechsels von Schlaf- und Wachableitungen [17]. Drei Jahre später fand Vogel Hinweise auf Sleep Onset REM-Perioden bei Narkolepsie Patienten [103]. Im gleichen Jahr wurde die Kataplexietherapie mit trizyklischen Antidepressiva eingeführt [1]. Noch heute gilt die Kom-

² *griech.*: narco=Schlaf, lepsis=ergreifen

³ *griech.*: kata=runter, plessein=schlagen

⁴ *engl.*: Rapid-Eye-Movement

bination aus Stimulanz und Antidepressivum als Therapie der Wahl bei Narkolepsie mit Kataplexien [74]. Desweiteren wurden ab 1973 Hypnotika zur Behandlung der nächtlichen Schlafstörungen eingeführt [79].

In den 80er Jahren wurde die erste genetische Assoziation vermutet (HLA-DR2) [41] und es kam der Verdacht einer autoimmunen Ätiologie auf, da eine HLA-Assoziation hierfür typisch erscheint. Im selben Jahr fand Baker ein Ungleichgewicht zwischen dem monoaminergen und cholinergen System [6]. Wenig später wurde der Multiple-Schlaf-Latenz-Test (MSLT) zur Diagnostik entwickelt [12], bei dem zu Diagnosezwecken versucht wird SOREMPs am Tag zu provozieren.

1992 ergaben genetische Analysen eine Assoziation mit HLA-DQB1*0602 [65]. Dieses Allel gilt heute als der wichtigste bekannte genetische Marker für die Narkolepsie. Bei Narkolepsie mit Kataplexie kann es bei 85-95% der Patienten nachgewiesen werden [19]. 1998 wurde das Peptid Hypocretin/Orexin identifiziert und dessen Dysregulation bei Narkolepsie beschrieben [57, 90, 93]. Nach heutigem Kenntnisstand gilt der Nachweis eines Hypocretinmangels als sehr spezifischer und relativ sensitiver diagnostischer Marker für Narkolepsie mit Kataplexie [19, 20, 24, 74].

Etwa zur selben Zeit wurde das Stimulanz Modafinil in die Narkolepsitherapie eingeführt [70] und hat sich heute als Medikament 1.Wahl zur Therapie von Tagesschläfrigkeit durchgesetzt [19, 72]. Seit Anfang des neuen Jahrtausends wird das bereits in den 70er Jahren erprobte Narkotikum γ -Hydroxybutyrat [8] und neuerdings dessen Salz Natriumoxybat vermehrt in der Narkolepsitherapie zur Verminderung der Kataplexien angewandt.

Der bis heute unbestätigte Verdacht einer autoimmunologischen Genese wurde 2009 durch den Nachweis einer starken Assoziation mit dem T-Zell Rezeptor Alpha Locus nochmals erhärtet. [19, 33, 65].

1.1.2 Klinik

Definition

Die deutsche Gesellschaft für Neurologie definiert die Narkolepsie als "... eine Schlaf-Wach-Störung mit REM und Non-REM-Schlafstadien assoziierten Symptomen wie länger als 6 Monate bestehende Tagesschläfrigkeit, Kataplexie, fraktionierter Nachtschlaf und automatisches Verhalten. Polysomnographisch treten verkürzte Einschlaf-latenzen und vorzeitiger REM-Schlaf (Sleep-Onset-REM = SOREM) auf." [24].

Die Erkrankung ist chronisch und nicht progredient [75].

Die Häufigkeit der Narkolepsie mit Kataplexie liegt weltweit bei 25-50/100.000 [19, 24, 44, 63]. Regional gibt es deutliche Unterschiede. In Israel waren 1987 nur 6 Patienten bekannt, selbst bei vorsichtigen Schätzungen wären mehr als 800 zu er-

warten gewesen [56]. In Japan hingegen zeigte sich eine unerwartet hohe Prävalenz von ca 1:600 [42]. Die Häufigkeit der Narkolepsie ohne Kataplexie ist aufgrund der schwierigen Differenzierung schwer abschätzbar. Vermutlich gibt es nach den aktuellen Diagnosekriterien viele falsch positive Einstufungen [63].

Die Ätiologie der Erkrankung ist bis auf einige symptomatische Fälle unklar [24]. Eine Kombination aus Umweltfaktoren und genetischer Prädisposition scheint wahrscheinlich [19].

Symptomatik

Zur klassischen Symptomatik der Narkolepsie gehören [19, 24]:

1. ausgeprägte Tagesschläfrigkeit mit Tagschlafepisoden
2. Kataplexie
3. Schlafähmung
4. hypnagoge/hypnopompe Halluzinationen
5. gestörter Nachtschlaf
6. automatisches Verhalten

Die Tagesschläfrigkeit gilt als annähernd obligat, ist aber aufgrund eines großen Feldes von Differentialdiagnosen nicht sehr spezifisch [24, 72]. Differentialdiagnostisch relevant ist der meist deutliche Erfrischungswert der kurzen Tagschlafepisoden von Narkolepsie Patienten [19]. Kataplexien finden sich bei 80-90% der Patienten [24, 64] und gelten am ehesten als spezifischstes Symptom. Sie werden meist durch positive Emotionen oder Wut getriggert und können die gesamte Willkürmuskulatur betreffen. Nicht selten sind sie jedoch auf einen Bereich der Muskulatur beschränkt [19]. Schlafähmungen, Halluzinationen beim Wechsel des Schlaf-Wach-Zustandes und gestörter Nachtschlaf sind häufig zu beobachten (ca. 50%) [19, 24, 64]. Sie kommen jedoch auch bei Gesunden häufiger vor und haben daher einen eingeschränkten diagnostischen Wert [19]. Neben dem automatischen Verhalten sind noch einige weitere, assoziierte Symptome beschrieben. Hierzu gehören Gedächtnisstörungen, einschlafbedingte Unfälle, Depressionen, Potenzstörungen und Persönlichkeitsveränderungen [24, 64].

Diagnostik

In den aktuellen Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie wird folgende Diagnostik empfohlen [24]:

1. gezielte Anamnese (v.a. Tagesschläfrigkeit, Kataplexie, Familienanamnese)
2. Dokumentation durch Schlafragebögen und Schlaftagebücher:
 - Epworth-Sleepiness-Score (ESS)
 - Abend- und Morgenprotokolle
 - Stanford Narcolepsy Questionnaire
 - Ullanlinna Narcolepsy Score (UNS)
 - Sleep-Propensity-during-Active-Situations-Score (SPAS)
3. Polysomnographie und MSLT (MSLT bei ca. 20% der Patienten falsch negativ)
4. Bestimmung des Hypocretin-Spiegels im Liquor (bei Narkolepsie ohne Kataplexie meist normal)
5. HLA-Klasse-II-Typisierung
6. zerebrale Bildgebung bei Verdacht auf sekundäre Narkolepsie

Die Punkte 1-3 gelten als Basisdiagnostik, 4-6 als mögliche Zusatzdiagnostik [24]. Es wird empfohlen den MSLT direkt im Anschluss an die Polysomnographie durchzuführen. Auf diese Weise können andere Ursachen wie das obstruktive Schlafapnoesyndrom (OSAS) als Ursache für die Tagesschläfrigkeit ausgeschlossen werden und es wird sichergestellt, dass der Patient vor Untersuchungsbeginn mindestens 6 Stunden Nachtschlaf hatte. Ferner können diagnostische Hinweise zum REM- und Tiefschlaf gewonnen werden. Beispielsweise zeigen ca. 40% der Narkolepsie Patienten eine auf unter 15 Minuten verkürzte REM-Schlaf Latenz [19] und häufig lässt sich fraktionierter Nachtschlaf beobachten [24].

Differentialdiagnostisch sind neben OSAS insbesondere die Epilepsie bei Kataplexien und psychiatrische Störungen bei Dyssomnie zu beachten. Beide Diagnosen sind umgekehrt auch typische Fehldiagnosen bei Narkolepsie Patienten [19, 75]. Desweiteren gibt es ein weites Spektrum an möglichen Differentialdiagnosen [24]. Sekundäre Narkolepsieformen sollten ausgeschlossen werden. Kataplexien können bei Hirnschäden unterschiedlicher Genese auftreten und narkoleptische Symptome ohne Kataplexien können durch Muskeldystrophie, Parkinson und bei jungen Kindern durch Niemann-Pick Typ C ausgelöst werden [19].

Therapie

Es ist keine kausale Therapie bekannt. Die angewandte Therapie setzt sich aus Verhaltensänderung und medikamentöser Unterstützung zusammen. [24, 73]

Verhaltensmodifizierend wird die Entwicklung einer guten Schlafhygiene und individueller Copingstrategien angestrebt [24]. Hierzu gehören feste Tagschlafzeiten, regelmäßiger Schlafrhythmus, eine angenehme Temperatur in den Schlafräumlichkeiten und Vermeidung von Alkohol, Coffein und Rauchen in den Abend- und Nachtstunden. Für einen ausgeglichenen Schlaf gelten körperliche Aktivität einige Stunden vor dem Schlafbeginn und entspannende Tätigkeiten unmittelbar vor dem zu-Bett-gehen als förderlich. Ferner ist der Besuch von Selbsthilfegruppen oftmals hilfreich. [73]

Die Patienten sollten auf die Gefahren beim Bedienen von Maschinen (z.B. Autos) hingewiesen werden, auch wenn es bei adäquat behandelten Patienten keine erhöhten Verkehrsunfallraten zu geben scheint [73].

Die medikamentöse Therapie setzt sich aus einer Kombination von Stimulanzien und Antidepressiva zusammen. Tagesschläfrigkeit wird meist mit Stimulanzien therapiert; Kataplexien, Schlaflähmungen und hypnagoge Halluzinationen mit Antidepressiva [19, 24, 72, 75].

Modafinil ist momentan Mittel der Wahl zur Therapie von Tagesschläfrigkeit. Es gilt als etwas weniger effektiv als amphetaminähnliche Substanzen, besitzt aber eine längere Wirkdauer, geringeres Abhängigkeitspotential und günstigeres Nebenwirkungsprofil [19]. Seine Effektivität wurde in Placebo-kontrollierten Doppelblindstudien kontrolliert [19, 72, 107]. Der Wirkmechanismus ist unklar. Armodafinil, das länger wirkende der beiden Modafinil Enantiomere, hat in einer ersten Studie positive Effekte gezeigt [36, 54].

Methylphenidat gilt als 2. Wahl. Es hat im Vergleich zu Modafinil einen kürzeren, ausgeprägteren Effekt auf die Vigilanz. Das Nebenwirkungsprofil gleicht dem der Amphetamine, gilt jedoch als deutlich abgeschwächt. Ferner wird der vesikuläre Monoamin Transport im Gegensatz zu Amphetaminen nicht gehemmt. Eine neuere, länger wirkende Formel könnte ein gleichmäßigeres Vigilanzniveau ermöglichen. [19] *Amphetamine* sind noch immer eine Therapieoption. Ihr Einsatz sollte wegen der teils starken Nebenwirkungen gut abgewägt und überwacht werden. [19, 73]

Weitere Optionen sind der MAO-B-Hemmer *Selegilin*, das Imidazolidinderivat *Mazindol*, der 5-HT₂-Antagonist *Ritanserlin* und *Natriumoxybat*, ein Salz der γ -Hydroxybuttersäure. [19, 72, 107]

Pemolin galt bis vor kurzem als eine gute Therapieoption [24], wird heute aufgrund der teils schweren Hepatoxizität jedoch nicht mehr empfohlen [19, 72].

Zur Therapie von Kataplexien wird seit kurzer Zeit *Natriumoxybat* eingesetzt, das auch gegen Tagesschläfrigkeit und Unterbrechungen des Nachtschlafes wirksam ist. Desweiteren kann es gegen hypnagoge Halluzinationen und Schlafparalysen wirken [19, 72, 107]. Zu beachten sind die Gefahr von Abhängigkeit bei kontinuierlich hohen Dosen und die nicht medizinischen Anwendungsmöglichkeiten als k.o.-Mittel und Droge [19, 73]. Bei abruptem Absetzen der Medikation kommt es zum Reboundphänomen, in schweren Fällen bis hin zum Status Kataplecticus [19].

Desweiteren werden Selektive-Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI), Tri- und Tetrazyklische Antidepressiva, der MAO-B-Hemmer *Selegilin* und *Venlafaxin* - ein selektiver Serotonin und Noradrenalin Wiederaufnahmehemmer - eingesetzt. Bei diesen größtenteils älteren Medikamenten ist die Studienlage schlechter, dafür die klinische Erfahrung größer [19, 72, 73, 107].

1.1.3 Pathogenetik und Pathophysiologie

Eine genetische Komponente bei Verwandten 1.Grades von Narkolepsie Patienten gilt als gesichert. Bei diesen ist die Prävalenz um das 10 bis 40-fache auf 1-2% erhöht und 10 bis 30% der Erkrankten haben Angehörige, die über verstärkte Tagesmüdigkeit klagen [19, 75, 32]. Trotz familiärer Häufung scheinen die meisten Fälle sporadisch zu sein [19, 75].

Bekannt ist eine ausgeprägte HLA Assoziation. 85-95% der Narkolepsie Patienten mit Kataplexie besitzen das HLA Allel DQB1 *0602. Homozygotie oder DQB1 *0301 als zweites Allel erhöhen das relative Erkrankungsrisiko, DQB1*0501 oder DQB1 *0601 senken es. Prävalenzstudien in den USA von DQB1*0602 in der Allgemeinbevölkerung ergaben bei Afro-Amerikanern 38%, Weißen 25% und Asiaten 12%, was die Spezifität des Allels als Marker deutlich einschränkt. Zusätzlich wird die Sensitivität beeinträchtigt durch Abfallen der Prävalenz bei familiären Erkrankungsfällen auf 75% und 40-60% bei Narkolepsie ohne Kataplexien. [19, 75]

Weniger aussagekräftige HLA Marker sind DRB1*15 (früher DR2) und DQA1 *0102 [68]. Letzterer gilt als der bessere der beiden, kommt aber auch bei 20-25% der Normalbevölkerung vor [67]. Die Ergebnisse zeigen, dass die entsprechenden HLA-Allele für die Entwicklung einer Narkolepsie prädisponieren, aber weder obligat noch ausreichend sind. Die HLA-Assoziation führte zum Verdacht einer autoimmun bedingten Genese. Daher wurden mit dem Immunsystem assoziierte Gene untersucht und es fanden sich beispielsweise im TNF α und Rezeptor-2 Gen Polymorphismen. [19]

Von klinischer Relevanz ist ein geschlechtlicher Dimorphismus der Catechol-O-Me-

thyltransferase (COMT), da er den therapeutischen Effekt von Modafinil beeinflusst [22].

Im Tierversuch gelang bei narkoleptischen Hunden der Nachweis eines autosomal-rezessiv vererbten "Narkolepsie Gens" mit vollständiger Penetranz. Das betroffene canarc-1-Gen konnte funktionell mit der Synthese von Immunglobulinen in Verbindung gebracht werden [69]. Ferner wurde eine Mutation des Hypocretin (Hcrt) 2 Rezeptorgens als Auslöser einer familiären Narkolepsie bei Hunden entdeckt [61], wohingegen bei der sporadischen Narkolepsieform von Hunden die Ursache weiter ungeklärt ist [19]. Hypocretine sind Neurotransmitter des dorsalen und lateralen Hypothalamus, die an der Regulation von Schlaf, Hunger und Energieverbrauch beteiligt und wahrscheinlich auch zum Belohnungssystem zugehörig sind [29].

Hcrt-negative knockout Mäuse zeigen ebenfalls narkolepsieähnliche Symptome [14] und werden daher als Tiermodell eingesetzt, um Grundlagen zu erforschen.

Beim Menschen scheint die genetische Komponente von Einzelfällen abgesehen nicht zur Krankheitsentstehung ausreichend und daher wird ein multifaktorielles Geschehen vermutet [19, 75]. Es gibt Hinweise auf verstärkten Stress von Narkolepsie Patienten im Jahr vor dem Krankheitsbeginn [77], auf einen Zusammenhang mit der Geburtsjahreszeit [21, 63] und mit Schädeltraumen [55]. Ein plötzlicher Wechsel im Schlaf-Wach-Rhythmus wird ebenfalls als Faktor in Erwägung gezogen [63, 75]. Es gibt eine erhöhte Prävalenz von Adipositas bei Narkolepsie Patienten. Ob diese schon vor Krankheitsausbruch besteht ist unklar [63]. Aufgrund der derzeitigen Datenlage ist die tatsächliche Korrelation mit diesen Faktoren noch nicht ausreichend zu bewerten [19, 63, 75].

Ähnliches galt bis vor kurzem für Hinweise auf ein immunologisches Geschehen [63]. Eine 2009 gefundene Assoziation mit dem T-Zell Rezeptor Apha lässt eine Verbindung jedoch sehr wahrscheinlich erscheinen [33].

Pathophysiologisch gesichert ist, dass es bei den meisten Fällen von mit Kataplexien assoziierter Narkolepsie zum Abfall der Hypocretin 1 Spiegel im Liquor unter 110 ng/L kommt [66]. Mutationen im Liganden oder Rezeptor der zugehörigen Gene sind selten [29]. Im Hirngewebe von verstorbenen Narkolepsie Patienten konnte weder Hypocretin noch dessen RNA nachgewiesen werden und es wurde der Nachweis einer selektiven Degeneration Hypocretin haltiger Zellen erbracht [81]. Die pathophysiologischen Prozesse die dazu führen sind noch unklar [19, 63, 75].

1.2 Überblick über das Syndrom der verzögerten Schlafphase

1.2.1 Geschichte

Erstmals beschrieben 1981 Weitzman et al. das Syndrom der verzögerten Schlafphase (=DSPS⁵) als Insomnie. Hierzu gehörte für sie die Unfähigkeit zur gewünschten Zeit einzuschlafen, bei gleichzeitig schon seit langen unternommenen Versuchen dies zu behandeln und der Fähigkeit zum regenerierenden Schlaf, sofern sich die Patienten nicht an einen konventionellen Zeitplan für den Schlafbeginn halten müssen [104]. Es wurde eine Unfähigkeit der Patienten vermutet ihre Schlafphase nach vorne zu verschieben. Daher kam es zum therapeutischen Versuch einer progredienter Phasenverschiebung zum Abend und in die Nacht hinein bis die gewünschte Rhythmik erreicht war. Diese Form der Chronotherapie zeigte in einer ersten Studie gute Erfolge [16].

1986 zeigten Czeisler et al. einen phasenverschiebenden Einfluß von grellem Licht in den Abendstunden auf die circadiane Rhythmik [15]. Wenige Monate später wurde gezeigt, dass dies auch für die Morgenstunden gilt und gleichzeitig einen antidepressiven Effekt haben könnte [60]. Nach diesen Erkenntnissen wurde die Therapie des DSPS mit starker Lichtexposition in den Morgenstunden untersucht und es konnte eine Phasenverschiebung nach vorn festgestellt werden [86].

1990 machte die Erforschung der zirkadianen Rhythmik durch die Identifizierung des SCN⁶ als übergeordneten Zeitgeber einen wichtigen Schritt nach vorn [84].

Zwei Jahre später veröffentlichten Oren und Wehr einen Fall von DSPS, bei dem die Chronotherapie zur Entwicklung eines unregelmäßigen Schlaf-Wach-Musters geführt hatte [78]. Daraufhin wurde diese heute noch übliche Therapieform restriktiver eingesetzt.

2002 zeigten Berson et al., dass die lichtgesteuerte Einstellung des zirkadianen Rhythmus über retinale Ganglionzellen erfolgt, die den SCN innervieren [7]. Im selben Jahr wurde Melanopsin als das aktive Pigment dieser Zellen identifiziert [37]. Aktuell sind vor allem die neuen Erkenntnisse in der Molekularbiologie und Genetik für das bessere Verständnis der zirkadianen Rhythmik und des DSPS verantwortlich. Den Anfang markierte hier die Entdeckung der Gene der zirkadianen Rhythmik bei Säugetieren (CLOCK 1997 [50], BMAL1 1997 [45], PER 1997 [94], CRY 1 und 2 1996 [43]). Deren Verbindung mit Störungen der zirkadianen Rhythmik wurde erstmals von Toh et al 2001 nachgewiesen (hPER 2 und ASPS) [98]. Das pathologische, physiologische und molekulargenetische Zusammenspiel der Gene der zirkadianen Rhythmik ist ein Schwerpunkt der heutigen Schlafforschung. Ob es sich hierbei um

⁵ engl. DSPS/D=Delayed Sleep Phase Syndrome/Disorder

⁶ engl. suprachiasmatic nucleus=Nucleus Suprachiasmaticus

den Oszillator selbst handelt oder lediglich dessen ausführende Funktionseinheit ist noch unklar [59].

1.2.2 Klinik

Definition und Symptomatik

Das Syndrom der verzögerten Schlafphase gehört zur Gruppe der zirkadianen Rhythmikstörungen. Für diese gilt, dass sie durch Veränderungen im System des zirkadianen Zeitgebers oder einem falschen Zusammenspiel des endogenen zirkadianen Rhythmus mit exogenen Faktoren zu Störungen von Dauer und Abfolge der individuellen Schlaf-Wach-Perioden führen [3]. Dies führt dazu, dass die entstehende zirkadiane Periodik nicht mehr den Anforderungen durch die Gesellschaft bzw. den Patienten selbst gerecht wird und sie sich im Alltag beeinträchtigt fühlen [88].

Das DSPS wird durch einen konstanten Schlafrhythmus gekennzeichnet, dessen Periodik deutlich zum Abend und in die Nacht verschoben ist. Dadurch kommt es zu Einschlafstörungen in frühen Nachtstunden und zu Problemen beim Erwachen zu gesellschaftlich normalen Weckzeiten.

Die Epidemiologie des DSPS ist unklar. Ältere Studien ergaben eine Prävalenz 0,2 -10 % [53]. Bei einer Telefonumfrage und anschließendem Interview bei Verdacht auf DSPS fand sich 1999 unter 1525 Befragten einer, auf den die diagnostischen Kriterien zutrafen [110]. Eine weitere Studie aus dem selben Jahr gibt Hinweise darauf, dass DSPS unter den zirkadianen Rhythmusstörungen am häufigsten ist (83%) [18]. Generell zeigen junge Menschen vermehrt verspätete Schlafgewohnheiten und Männer sind statistisch häufiger betroffen. Ob diesen beiden Faktoren allerdings eine ursächliche Bedeutung bei der Entstehung zukommt ist nicht gesichert [89].

Insgesamt ist die Studienlage zur Epidemiologie unzureichend und eine hohe Dunkelziffer wird vermutet [88].

Diagnostik

In der Anamnese zeigt sich die stabile Verlagerung der Schlafphase nach hinten mit Einschlaf- und Aufwachstörungen bei dem Versuch diese nach vorne zu verschieben. Ein Schlaftagebuch kann die Diagnose unterstützen, eventuell sind auch Fragebögen hilfreich [53, 89]. Die Verwendung des in Studien häufig verwendete MEQs (Morningness-Eveningness-Questionnaire) als Parameter zur Vorhersage der endogenen Periodik wird von der amerikanischen Akademie für Schlafmedizin noch kritisch gesehen, da Sensitivität und Spezifität nicht ausreichend evaluiert sind [88]. Als unterstützende apparative Diagnostik wird standardmäßig die Aktigraphie einge-

setzt. Aussagekräftiger ist das Durchführen von 2 Polysomnographien, eine mit freier Wahl der Schlafphase und eine weitere mit definierter Schlafphase, angepasst an eine normale Arbeitstagperiodik. Aufgrund der hohen Kosten wird diese Option selten verwendet. Aus dem selben Grund wird die Bestimmung von Markern der zirkadianen Rhythmik klinisch noch wenig eingesetzt, obwohl beispielsweise DLMO⁷ eine gutes Verfahren zur Differenzierung von Schlafstörungen mit und ohne Beteiligung der zirkadianen Rhythmik zu sein scheint. [83, 89]

Therapie

Ein wichtiger therapeutischer Bestandteil sind schlafhygienische Maßnahmen, die denen bei der Narkolepsie gleichen (S.10). Desweiteren wird eine Form der Chronotherapie eingesetzt, bei der zunächst die Schlafphase stufenweise nach hinten verschoben wird bis der gewünschte Rhythmus erreicht ist und dann ein strikter Schlafplan eingehalten werden soll. Es gibt Hinweise auf Erfolge mit Chronotherapie, eventuell besteht jedoch ein Risiko für die Entwicklung eines komplett unregelmäßigen Schlaf-Wach-Musters [78]. Ferner scheint eine gezielte Lichtexposition in den Morgenstunden zu einer Vorverlagerung des Schlafrhythmus zu führen. Bei beiden Therapieformen gilt die dauerhafte und strikte Compliance als verstärkt zu beachtendes Problem.

Medikamentös wird vor allem Melatonin eingesetzt, um dessen verspätete Sekretion auszugleichen und so eine Vorverlagerung der Schlafphase zu bewirken. Hypnotika in den Abendstunden und Stimulanzien am Morgen erscheinen als naheliegende Therapieoptionen sind aber unzureichend evaluiert. Im Sinne von evidenzbasierter Medizin erscheint die Therapie mit Melatonin, gezielter Lichtexposition und verbesserter Schlafhygiene am ehesten erfolgversprechend. Insgesamt ist die Studienlage schlecht. [85, 88, 89]

1.2.3 Pathophysiologie und Pathogenetik

Die Pathophysiologie des DSPS ist nicht geklärt. Diskutiert werden vor allem eine deutlich verlängerte zirkadiane Periodik oder eine Störung im System der Phasenverschiebung durch Licht, beispielsweise eine Überreaktion auf Lichtexposition in den Abendstunden. Andere Mechanismen sind jedoch denkbar und weitere Forschungsarbeit ist nötig, um Ätiologie und die zugehörigen pathophysiologischen Prozesse aufzudecken. [85, 89]

⁷ *engl.*: Dim Light Melatonin Onset

Bereits seit 1998 ist ein statistischer Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus im CLOCK Gen und den präferierten Einschlafzeiten bei klinisch gesunden bekannt. Personen mit dem Allel 3111C zeigten unabhängig von Alter, Geschlecht und ethnischer Herkunft eine Phasenverzögerung um 10 bis 44 Minuten [48].

Für das DSPS wird entweder ein autosomal dominanter Erbgang mit unvollständiger Penetranz oder ein multifaktorielles Geschehen vermutet [89]. Momentan liegt der Forschungsschwerpunkt auf der Identifizierung und Untersuchung der Kerngene der zirkadianen Uhr. Hierzu gehören beispielsweise Period 1,2&3, Cryptochrom 1&2, BMAL1, CLOCK und die Casein Kinasen 1 γ und ϵ [23, 38]. Die meisten codieren für Transkriptionsfaktoren, die beiden Casein Kinasen können diese phosphorylieren. Störungen der Kerngene wirken sich speziesübergreifend auf den circadianen Rhythmus aus [26]. Anscheinend bilden CLOCK und BMAL 1 sowie PER und CRY je einen Arm in einem über Rückkopplung gesteuerten Mechanismus (s. Abb 1). Ob dieser den Kern des zirkadianen Zeitgebers verkörpert oder lediglich ausführendes Organ ist muss noch geklärt werden [59].

Wie bei anderen Störungen der zirkadianen Rhythmik finden sich auch beim DSPS auf genetischer Ebene einige Assoziationen, die ein variables und heterogenes Bild ergeben [26, 89]. Archer et al. untersuchten 2003 einen Längenpolymorphismus im Period-Gen hPER 3, der bereits mit dem DSPS in Verbindung gebracht worden war [27] und bestätigten, dass dessen kürzere Form mit einer Verzögerung der zirkadianen Rhythmik und dem DSPS korreliert war [2]. Ein Zusammenhang wurde auch von einer Studie in Brasilien bestätigt, allerdings war hier die längere Variante mit einer Phasenverzögerung verknüpft. Die Autoren vermuteten einen Einfluss des Breitengrades als Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse [80].

Im PER 2-Gen wurden bei Mäusen Mutationen gefunden, die in Abhängigkeit vom Mutationsort einen unterschiedlichen zirkadianen Effekt zeigten [108] und im PER 1-Gen ein Polymorphismus, der mit einer Präferenz von extremen Schlafzeiten korrelierte, nicht aber mit dem DSPS [11].

Aufgrund der bereits erwähnten Ergebnisse von Katzenberg et al [48], die das CLOCK-Gen mit tageszeitlicher Schlafpräferenz in Verbindung brachten, wurde dieses bei DSPS Patienten untersucht. Hinweise auf einen Zusammenhang fanden sich dabei nicht [47]. Desweiteren wurde von Takano et al ein Allel (N408) der Casein Kinase 1 ϵ identifiziert, das einen protektiven Effekt gegen DSPS zu haben scheint [96].

Auch außerhalb der Clock Gene wurden genetische Assoziationen mit DSPS gefunden. Bereits 1999 brachte eine Arbeitsgruppe HLA-DR1 mit DSPS in Verbindung [40]. Außerdem wurde im Gen der Arylalkylamine N-acetyl transferase, dem Schlüs-

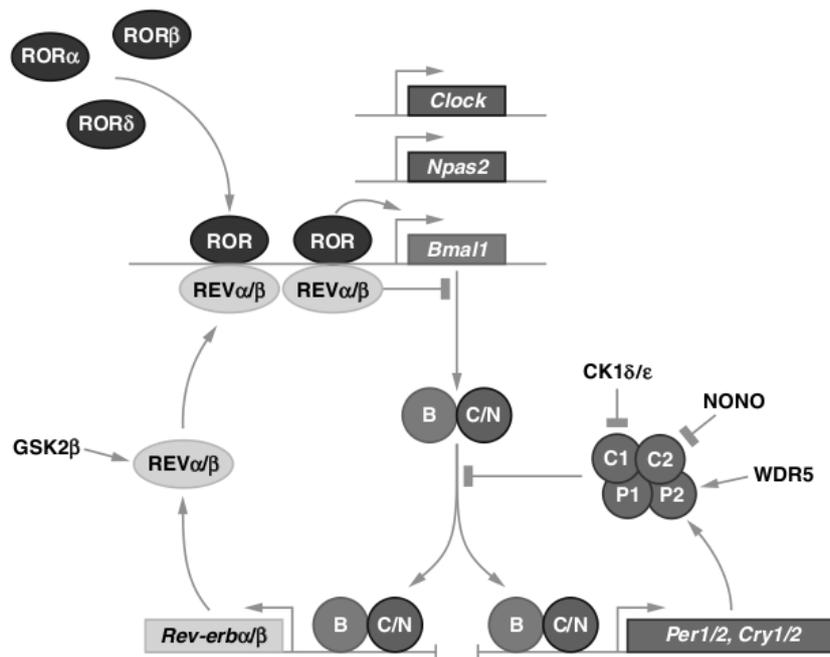


Abbildung 1: *Modell für den molekularen Oszillator bei Säugetieren:* CLOCK oder das paraloge NPAS2 bilden mit BMAL1 Heterodimere. Diese binden sich dann an E-box Regionen in Promotoren und Enhancern von Cryptochrom und Period Genen. Erhöht sich deren Konzentration entstehen Komplexe, die als Feedbackmechanismus den aktivierenden Einfluss von BMAL1/CLOCK bzw. BMAL1/NPAS2 auf CRY und PER wieder hemmen und so einen Oszillator entstehen lassen. [59]

selenzym der Melatoninsynthese, signifikant häufiger ein SNP⁸ entdeckt, der zu einem Aminosäureaustausch führte [39].

1.3 Aufgabenstellung

1.3.1 Arbeitsansatz

Aufgrund der Tagesschläfrigkeit und weiteren Symptomatik der Narkolepsie besteht der Verdacht auf eine Assoziation mit den Genen der zirkadianen Rhythmik. Bei dem Syndrom der verzögerten Schlafphase gilt dieser bereits als sicher. (vgl. Kap 1.3 und 2.3)

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die proteincodierende Region der beiden Gene Cryptochrom 1 und 2 bei von Narkolepsie oder DSPS betroffenen Patienten auf Sequenzveränderungen untersucht und mit Kontrollen verglichen. Die beiden Gene wurden aufgrund ihres funktionellen Zusammenhangs mit der Steuerung oder Entstehung des zirkadianen Rhythmus als Kandidatengene ausgewählt.

1.3.2 Kandidatengene CRY 1 und CRY 2

Das Cryptochrom 1 Gen liegt auf Chromosom 12 (q23.3) und codiert ein Polypeptid mit 586 Aminosäuren [100]. Cryptochrom 2 liegt auf Chromosom 11 (p11.2) und das zugehörige Peptid besitzt 589 Aminosäuren. Die molekulare Struktur des CRY 2 Peptides ist zu 73% mit dem von CRY 1 identisch. Sie können beide Maltose binden und besitzen die Chromophore FAD⁹ und Pterin als Cofaktoren. [43]

CRY 1 kommt wahrscheinlich vor allem in Mitochondrien vor, wohingegen CRY 2 im Zellkern lokalisiert ist [52]. Beide haben Ähnlichkeit mit Photolyasen anderer Tiere, beispielsweise der (6-4)Photolyase von Fliegen der *Drosophila* ssp. [97]. Bei vielen Tieren sind Photolyasen für die Reparatur von UV-induzierten Schäden verantwortlich, den Cryptochromen beim Menschen fehlt diese Funktion [43]. Die photolyasehomologe Domäne ist zur Photorezeption fähig, deren physiologischer Kontext ist aber noch nicht geklärt [9].

Sicher ist die Beteiligung der beiden Cryptochrome am negativen Arm der zirkadianen Feedbackschleife. Sie inhibieren direkt und lichtunabhängig die Aktivität der CLOCK:BMAL1 Heterodimere [31]. Ferner sind sie bei der Steuerung der zirkadianen Rhythmik funktionelle Antagonisten des Timeless Proteins, da dieses durch Bindung von CRY dem proteosomalen Abbau zugeführt wird [9]. Während CRY 1

⁸ *engl.*: single nucleotide polymorphism

⁹ Flavin-Adenin-Dinukleotid

stark mit PER 1 und BMAL1 sowie schwach mit PER 2 zu interagieren scheint, zeigt CRY 2 ein starkes Interaktionspotential mit PER 2 und ein schwaches mit CLOCK und TIM [31].

Homozygote CRY 1 knockout Mäuse entwickeln einen beschleunigten zirkadianen Rhythmus, wohingegen dieser sich bei CRY 2 $-/-$ Mäusen verlangsamt. Werden beide Cryptochrome gentechnisch ausgeschaltet, können sich diese Mäuse noch an einen Tag mit 12 stündiger Lichtexposition adaptieren, bei konstanter Dunkelheit entwickeln sie hingegen sofort ein unregelmäßiges Schlaf-Wach-Muster [99]. Ferner ist der Spiegel von Period Peptiden aufgrund der fehlenden Inhibition durch die Cryptochrome konstant erhöht und unabhängig vom Schlafverhalten sind andere zirkadiane Rhythmen gestört [76, 99, 101].

Der Abbau von Cryptochromen scheint lichtabhängig zu sein [9]. Passend dazu wird ein Peak der CRY-Spiegel in der Nachtmitte beobachtet.

Zu beachten ist, dass einige dieser Erkenntnisse aus Tierversuchen stammen und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen noch überprüft werden muss.

2 Material und Methoden

2.1 Überblick

Zur Darstellung der angewandten Materialien und Methoden wird sich im folgenden an die Versuchsreihenfolge gehalten:

1. Probandenauswahl und Blutentnahme
2. DNA-Isolierung
3. Primer-Konstruktion
4. Gradienten PCR
5. Amplifikation mittels PCR
6. Sequenzier-PCR
7. Sequenzbestimmung
8. Typisierung des Kontrollkollektivs

2.2 Probandenauswahl und Blutentnahme

Zunächst wurden 17 Narkolepsie Patienten ausgewählt. Deren klinische Symptomatik und durchgeführte Diagnostik sind in der folgenden Tabelle dargestellt. 14 Patienten zeigten klinisch Kataplexien. Desweiteren wurde ein Kollektiv von 3 Patienten mit gesichertem Syndrom der verzögerten Schlafphase mit aufgenommen. Diagnostiziert wurden diese nach der internationalen Klassifikation für Schlafstörungen [3].

Ferner wurde für beide Patientengruppen ein Kontrollkollektiv ausgewählt. Dabei wurde auf übereinstimmendes Geschlecht und annähernd gleiches Alter geachtet (S.21). Die Anzahl entsprach dem des jeweiligen Patientenkollektivs.

Die Blutentnahme erfolgte jeweils durch medizinisch übliche Venenpunktion in ein EDTA-Röhrchen.

2.3 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte aus den Lymphozyten des EDTA-Blutes. Dazu wurde das QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) mit dem zugehörigen Protokoll verwendet.

Tabelle 1: Klinik der untersuchten Narkolepsie Patienten

Patient	Kataplexie	MSLT	SOREM	HLA
1	Ja	14,0	1	DQB1 602 + 604
2	Ja		0	
3	Nein	11	1	DQB1 602
4	Nein	5,5	4	DQB1 602 + DQ 5(1)
5	Ja	5,5	2	DQB1 602
6	Nein	6,2	1	DQB1 601
7	Ja	6,3	2	DQB1 602
8	Ja		Ja	DR 15(2) + DQ6(1)
9	Ja	6,6	3	DQB1 602 + 102
10	Ja	8,8		DQB1 602 + 103
11	Ja		Ja	
12	Ja	1,4	3	DQB1 602 + 501
13	Ja			
14	Ja	11	0	DQB1 602
15	Ja	5,0	0	DQB1 602 + 604
16	Ja	3,0	4	DQB1 602
17	Ja		2	

Tabelle 2: Zusammensetzung der Patienten- und Kontrollkollektive

Kollektiv:	Narkolepsie	Kontrolle	DSPS	Kontrolle
Durchschnittsalter [Jahre]:	43,7	44,8	44	43,7
Geschlechterverteilung [m/w]:	12/5	12/5	3/0	3/0

Zunächst wurden die Lymphozyten durch Zugabe von Proteinkinase K und eines Lysepuffers mit anschließender Inkubation lysiert. Das Lysat wurde mit einer ebenfalls zum Kit gehörigen Säule aufgereinigt und die freie DNA dabei an die Oberfläche der Säule gebunden. Es folgten 2 Waschschrte und anschließend die Elution mittels eines Puffers. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mittels einer photometrischen Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, mit einem Eppendorf BIOPhotometer (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) gemessen. Als Nullabgleich wurde H₂O verwendet.

2.4 Primer-Konstruktion

Primer sollten an die zu amplifizierende Region angrenzen und über die von der DNA-Polymerase benötigte 3'-OH-Gruppe verfügen. Zur Spezifität tragen Länge, Selbst- und 3'-Komplementarität, CG-Gehalt, Schmelztemperatur und der Gehalt an Mononukleotid-Repeats bei.

Voraussetzung für das Entwerfen eines Primers ist, dass die Sequenzen der unmittelbaren Nachbarregionen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts oder des Abschnittes selbst bekannt sind und eine gewisse Größe nicht überschreiten. Dies ist bei den beiden untersuchten Genen der Fall. Als Referenzsequenzen wurden NM 004075 (CRY 1) und NM 021117 (CRY 2) aus der UCSC-Datenbank der Universität von Kalifornien (Santa Cruz) verwendet [49].

Das Entwerfen der Primer erfolgte mit dem Programm Primer3®2 [87], das vom Whitehead Institute for Biomedical Research (Cambridge, MA, USA) kostenfrei zur Verfügung gestellt wird. Dabei wurden Primer mit einer Größe von 17 bis 26 Basenpaaren so gewählt, dass sie sich bei einer Annealing-Temperatur von ca. 60° zwischen 30 und 50 Basenpaare von dem Exon entfernt anlagern. Die Synthese der Oligonukleotid-Primer übernahm die Firma Operon (Operon Biotechnologies GmbH, Köln, Deutschland), die diese in salzfreier Form lieferte. Alle Primer wurden mit HPLC-H₂O auf eine Konzentration von 10 pmol/ μ L verdünnt.

2.5 Gradienten PCR

Bei der Polymerase Kettenreaktion¹⁰ handelt es sich um eine in vitro Technik zur DNA-Amplifikation. Sie besteht aus den drei Phasen Denaturierung, Hybridisierung und Elongation.

Nachdem die DNA durch Erhitzen denaturiert und eine DNA-Polymerase aktiviert

¹⁰ *engl.*: Polymerase Chain Reaction=PCR

wurde, werden bei reduzierter Temperatur zwei Oligonukleotid-Primer in 5' und 3' Richtung des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts angelagert. Durch erneute Temperaturumstellung wird bei Anwesenheit von Desoxynukleotid-Triphosphaten und einem Puffer eine Kettenverlängerung gestartet. Durch Erhitzen werden die neu entstandenen Doppelstränge anschließend wieder getrennt und ein neuer Zyklus gestartet (s.Abb. 2).

Zur Bestimmung der notwendigen Annealing-Temperatur¹¹ wurde für jedes Exon eine Gradienten-PCR durchgeführt.

Nach einer 15 minütigen Denaturierungsphase bei 95°C folgten 35 gleiche Zyklen mit drei jeweils einminütigen Phasen. In der ersten dieser Phasen wurde die DNA bei 94°C denaturiert. Dann wurde bei einer pro Reaktionsgefäß unterschiedlichen, über alle Zyklen konstanten Annealing-Temperatur zwischen 45° und 65°C die Hybridisierung versucht. Im Anschluss erfolgte bei 72°C die Kettenverlängerung. Den Abschluss nach 35 Zyklen bildete eine 10-minütige Phase bei 72°, um sicherzustellen das alle Produkte die Kettenverlängerung abgeschlossen hatten.

Als PCR-Geräte wurden zwei DNA-Engine® Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ-Research Inc., Waltham, MA, USA) verwendet. Die dNTP-haltige Lösung kam von der Eppendorf GmbH (Hamburg, Deutschland), die HotStarTaq®-DNA-Polymerase und der PCR-Puffer von der Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland).

Tabelle 3: Ansatz der Gradienten-PCR

Substanz (Konzentration)	Menge
HPLC-H ₂ O, doppelt destilliertes, entionisiertes Wasser	36,8 µL
10-fach PCR-Puffer, MgCl ₂ (15mM/10µL)	5,0 µL
Vorwärtsprimer (10 pmol/µL)	2,0 µL
Rückwärtsprimer (10 pmol/µL)	2,0 µL
dNTP-Lösung [dATP, dTTP, dCTP, dGTP] (10mM/µL)	1,0 µL
Taq-DNA-Polymerase (5U/µL)	0,2 µL
DNA-Isolat einer Test-DNA (50ng/µL)	3,0 µL
Gesamtmenge	50 µL

Die Erfolgskontrolle erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

Dabei wurde das DNA-Produkt mit dem Marker Ethidiumbromid versehen und in Taschen eines Agarose-Gels gefüllt. Anschließend wurde für 20 Minuten eine Spannung von 130 mV angelegt. Aufgrund ihrer negativen Ladung wird die DNA von der Anode angezogen, wobei das Gel als molekulares Sieb wirkt. Dementsprechend

¹¹ engl.: Anlagerungstemperatur des Primers

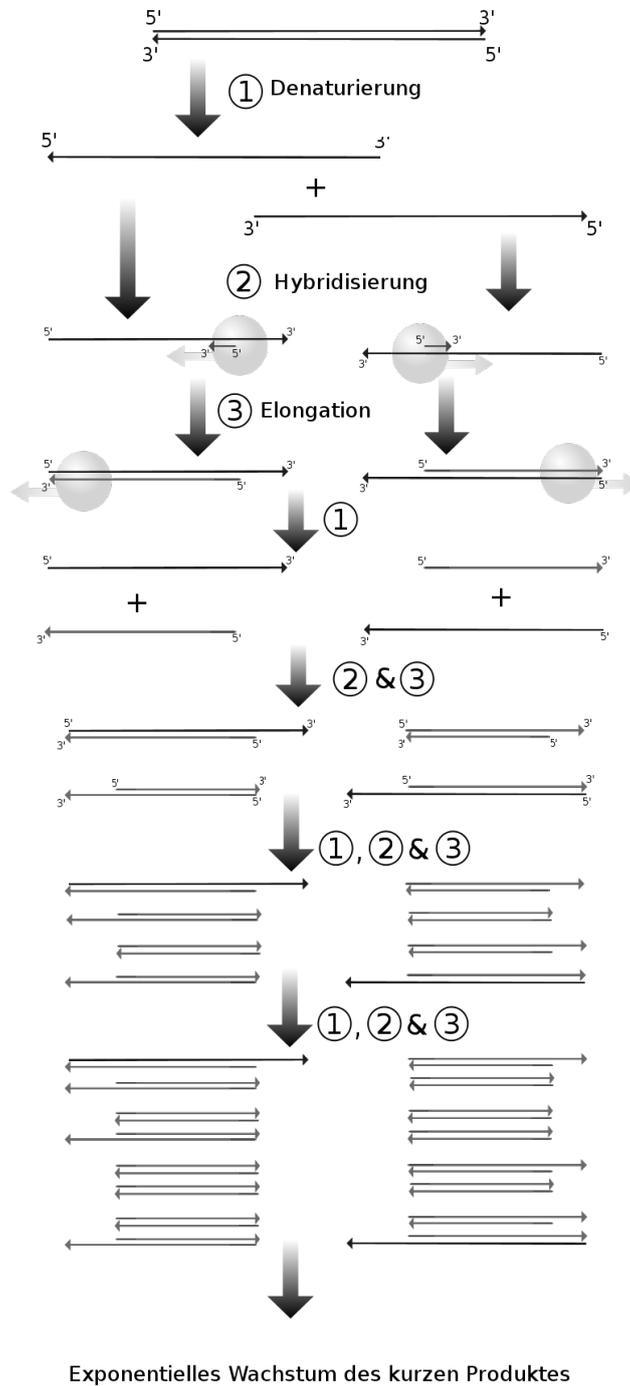


Abbildung 2: *DNA-Amplifikation durch PCR* [106]

wandern kleinere Fragmente schneller und es erfolgt eine Auftrennung nach Größe. Durch gleichzeitiges Auftragen eines Größenstandards mit den Fragmenten lässt sich deren Größe hinterher abschätzen. Abschließend wird die Laufweite der DNA durch eine Aufnahme mit UV-Licht visualisiert, da Ethidiumbromid fluoreszierende Eigenschaften besitzt und an DNA bindet.

Es wurde ein 1,5%-iges Agarose Gel hergestellt, indem zunächst durch Erhitzen 7,5g SeaKam LE Agarose (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) in 500 ml 1xTBE (10xTBE: 107,32g 0,89M TRIS, 55,03g 0,89M Borsäure, 7,44g 2mM EDTA; pH 8,3) aufgelöst und in einem Wasserbad von 60°C gelagert wurden. Abhängig von der Gelgröße (ca. 10x10cm² oder 15x15cm²) wurde dann dem Gel bei der Herstellung Ethidiumbromid hinzugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1µg/ml erreicht wurde. Die Geltaschen wurden durch Einführen eines Plastikkamms vor dem Erkalten erzeugt. Das entstandene 1,5% Agarose-Gel eignet sich für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe zwischen 0,2 und 3 kb.

Zur Elektrophorese wurden nun 0,3 µL eines 10x Bromphenolblau Ladepuffers (10ml 0,1% Bromphenolblau, 40ml H₂O, 40ml 20% Ficoll, 10ml 10xTBE) mit je 3 µL des PCR-Produktes versetzt und in die Geltaschen appliziert. Ebenfalls aufgetragen wurde der 100bp DNA Ladder Gene ruler® (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) als Größenstandard. Die Elektrophorese erfolgte in Horizontal-Gel-Elektrophorese-Kammern (Harnischmacher Labortechnik, Arnsberg, Deutschland), wobei 1xTBE als Laufpuffer diente. Zur Ergebnisdokumentation wurde ein UV-Licht-Kamerasystem eingesetzt (MultiImage® Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA), wobei die eingesetzte Wellenlänge des Lichtes 300 nm betrug.

Nach der Auswertung wurde für jedes Primerpaar¹² eine optimale Annealing-Temperatur festgelegt (S. 30/31).

2.6 PCR

Um ausreichend DNA für eine Sequenzierung zu erhalten wurde eine PCR mit den Isolaten der Probanden-DNA durchgeführt. PCR-Ansatz und Ablauf entsprachen dabei dem der Gradienten-PCR, wobei die ermittelten primerpaar-spezifischen Annealing-Temperaturen (S. 30/31) verwendet wurden. Im Anschluss erfolgte eine Erfolgskontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese. Diese war methodisch mit der bei der Gradienten-PCR eingesetzten identisch.

Anschließend wurde das Produkt aufgereinigt. Hierzu wurde das QIAquick® PCR-Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) mit dem zugehörigen Pro-

¹²Vor- und Rückwärtsprimer eines Exons

tokoll verwendet. Bei hoher Salzkonzentration und einem $\text{pH} < 7,5$ wurde die DNA an eine Silikat-Membran gebunden und mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen, um die PCR-Produkte zu isolieren. Mit Elutions-Puffer (10mM Tris-Cl; $\text{pH} 8,5$) wurde die DNA wieder von der Membran gelöst und anschließend eine Konzentrationsabschätzung durch Elektrophorese durchgeführt. Hierbei wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und das Ergebnis im Vergleich zu einem Längen- und Konzentrationsstandard (SmartLadder[®], Eurogentec, Köln, Deutschland) bewertet.

2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach Standardprotokoll durch eine modifizierte Form der Kettenabbruchreaktion nach Sanger [91]. Dabei wird einer PCR für jedes natürlich in die DNA eingebaute Desoxynukleotid-Triphosphat ein spezifischer Terminator mit jeweils unterschiedlicher Markierung beigegeben. Deren zufälliger Einbau führt durch die große Anzahl der Reaktionen zum Abbruch der Polymerasereaktion an allen dNTP-Paaren in dem untersuchten DNA-Bereich. Im Anschluss an die Sequenzierung wird das Produkt mittels Kapillarelektrophorese nach Größe aufgetrennt und die Sequenz über den Nachweis der unterschiedlichen Marker von den Terminatoren nachgewiesen.

Es wurde BigDye[®] Terminator 3.1 (PE Applied Biosystems, Langen, Deutschland) als "Terminatorlösung" verwendet. Darin enthalten sind dR110 [C], dR6G [A], dTAMRA [G] und dROX [T], die jeweils für die in eckigen Klammern angegebenen Nukleotide eingebaut werden, sowie AmpliTaq[®]-DNA-Polymerase. Als Primer dienten die bereits zur Amplifikation eingesetzten Primerpaare, wobei für die Vorwärts- und Rückwärtsprimer je ein eigener Ansatz verwendet wurde. Ferner wurde HPLC-H₂O, der zum Sequenzier-Kit gehörige 5x-Puffer und das aufgereinigte Produkt der Amplifikations-PCR hinzugegeben.

Es wurden 25 PCR-Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 96°C (10s), die Anlagerung bei 55°C (10s) und die Elongation bei 60°C (4min).

Im Anschluss wurden die Produkte aufgereinigt. Hierfür wurde das DyeEx[®] Spin Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Die nicht eingebauten Terminatoren wurden dabei nach Zugabe von 10 μL HPLC-H₂O in einer Sephadex-Säule zurückgehalten, wohingegen die Sequenzierprodukte zentrifugiert wurden.

Tabelle 4: Ansatz der Sequenzier-PCR

Substanz	Menge
aufgereinigtes Produkt der Amplifikations-PCR (200ng/ μ L)	2,0 μ L
BigDye®	2,0 μ L
Primer (10pm/ μ L)	0,5 μ L
5xPuffer	2,0 μ L
HPLC-H ₂ O	3,5 μ L
Gesamtmenge	10 μ L

2.8 Sequenzbestimmung

Die Sequenzanalyse der aufgereinigten Sequenzier-PCR-Produkte erfolgte mit einem ABI 3730-Sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Computergesteuert wurden die Sequenzdaten aufgenommen und anschließend mit der SeqMan® und EditSeq® Software (beide DNA-Star Inc., Madison, WI, USA) zusammengefügt und ausgewertet.

2.9 Typisierung des Kontrollkollektivs

Zur Bestimmung der Häufigkeit der bei den Probanden gefundenen SNPs (S.32) wurde die DNA der Kontrollprobanden zunächst mit den bereits beschriebenen Methoden isoliert.

Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, wobei man sich deren Eigenschaften zunutze macht, spezifisch bestimmte DNA-Sequenzen spalten zu können. Die Endonukleasen werden so gewählt, dass sie jeweils die entsprechende Sequenz des SNPs erkennen und dort die DNA schneiden. Im Anschluss werden die Fragmente mit einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Unterscheiden sich die entstehenden Produkte ausreichend in ihrer Größe, lässt sich an dem Ergebnis ablesen, welche Ausprägung des SNPs vorliegt. Aufgrund dieses Mechanismus werden solche Polymorphismen auch als Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) bezeichnet.

Mit Hilfe des Programmes WatCut® (University of Waterloo, Ontario, Canada) konnte für alle bei den Probanden gefundenen SNPs ein passendes Restriktionsenzym ausgewählt werden (S.31). Hergestellt wurden diese mit einer Aktivität von 10U/ μ L von der MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland). Gleichzeitig wurden für die zugehörigen PCRs neue Primer entworfen. Dabei wurden auch mutagene Primer gewählt, um so die Schnittstellenerkennung für die Enzyme zu

konstruieren.

Der Ablauf der Gradienten-PCR und die anschließende Amplifikation der Probanden DNA entsprachen dem bereits bei den anderen Primern verwendeten, wobei die neu hergestellten Primer eingesetzt wurden. Das Vorgehen bei der Agarose-Gelelektrophorese entsprach ebenfalls der bereits beschriebenen Methodik.

Anschließend erfolgte der Restriktionsverdau bei 37°C. Die Reaktionsansätze und Dauer sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 5: Ansatz der Verdaureaktion

SNP	rs3809237	rs8192440	rs2292913
PCR-Produkt	5,0 μ L	5,0 μ L	5,0 μ L
Enzym	0,3 μ L	0,1 μ L	0,1 μ L
Puffer	1,0 μ L	1,0 μ L	1,0 μ L
H ₂ O	3,7 μ L	3,9 μ L	3,9 μ L
Gesamtvolumen	10 μ L	10 μ L	10 μ L
Reaktionsdauer	4 Std.	8 Std.	8 Std.

Die folgende Gelelektrophorese der Restriktionsfragmente wurde mit einem 3%-igem Agarosegel ausgeführt. Dafür wurden 1g NUSieve 3:1 Agarose und 2g LE Agarose (beide Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) in 100ml 1xTBE aufgelöst. Das entstandene Agarosegel ermöglicht eine Auftrennung von Fragmenten mit einem Unterschied von 20-30 Basen. Ansonsten war die Methodik mit der bereits beschriebenen identisch.

2.10 Chemikalien und Geräte

Tabelle 6: Materialien und Geräte sofern nicht im Text beschrieben:

Material / Gerät	Hersteller
EDTA	ICN Biomedicals, Eschwege
TRIS	ICN Biomedicals, Eschwege
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (96%)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Eppendorf Reference® Pipetten (0,1-2,5µL, 0,5-10µL, 2-20µL, 10-100µL, 50-200µL, 100-1000µL)	Eppendorf GmbH, Hamburg
Eppendorf Standartips Pipetten-Spitzen	Eppendorf GmbH, Hamburg
Standard Reaktionsgefäß 3810 x (1,5 ml)	Eppendorf GmbH, Hamburg
Centrifuge 5810 R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Centrifuge 5417 C	Eppendorf GmbH, Hamburg
MS IKA-Minishaker (Vortexer)	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Analysenwaage Typ 1801	Sartorius AG, Göttingen
DU® 640 Spectrophotometer	Beckman Instruments GmbH, München
AlphaImage® Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA

3 Ergebnisse

3.1 Primerdesign für die Probandenkollektive

Die Sequenz der Primer und deren Produktgröße waren aufgrund des Designprozesses bekannt. Die Exongröße konnte mit den Referenzsequenzen bestimmt werden. Die Annealing-Temperaturen wurden mit einer Gradienten-PCR ermittelt.

Tabelle 7: Primer für CRY 1

Exon	Ex _{Gr} (bp)	Pr _{Gr} (bp)	T _A (°C)	Primersequenz 5'→3'
1-F	158	312	60	CTCTTGGGAAGCGAAGGTGTC
1-R	158	312	60	GGATCGCATGGAATTCATTAAC
2-F	109	459	54	AATAAGATGATAGGTTGGCATTTC
2-R	109	459	54	AGGGCAACGAGCAGTTTAAG
3-F	143	515	54	TGCCTAGAATCTAATGGGTTATGC
3-R	143	515	54	TCACTTAATTCTCCCATAACTCTGTG
4-F	185	351	54	TTTTAAGCCTTTTGGGAGC
4-R	185	351	54	CATGGCAAATTTAAAAGGGG
5-F	89	289	54	CTGCAAAGTAATTTGTTCTCCC
5-R	89	289	54	TGTTAATCCTCCCCTTTCAAC
6-F	141	359	54	TTTTATTCCCCAAGA ACTATGTAAC
6-R	141	359	54	GAAAGGGGAGGGGAACTG
7-F	312	573	54	TTTGTCATGTCGACTGTTTTACTTC
7-R	312	573	54	GGGAATTAAATGTTTTATCCACTG
8-F	152	319	54	CTTTGCCTTGACTTTGGCTC
8-R	152	319	54	AAGCATTGATTAAACATGAAAAGC
9&10-F	397	691	60	TGGGCAGCAGAGATGAGAAG
9&10-R	397	691	60	GAAGAGATGTGTCTGGGTGC
11&12-F	250	452	54	AAGCGCTAAAAGTTGGATTG
11&12-R	250	452	54	GCCTCAAGATTTTCTGGTTG

Die Tabellen geben eine Übersicht über die Verwendeten Primer. Die Sequenzierrichtung wurde dabei mit F (=Vorwärts) und R (=Rückwärts) angegeben. Exon- und Produktgröße mit der Anzahl der Basenpaare. T_A gibt die verwendete Annealing-Temperatur an.

Tabelle 8: Primer für CRY 2

Exon	Ex _{Gr} (bp)	Pr _{Gr} (bp)	T _A (°C)	Primersequenz 5'→3'
1-F	215	330	54	GGGTCCACGTCGCCTAC
1-R	215	330	54	GTCACCCCAGGGTCAGG
2-F	109	229	54	TGCTTTGTTAGGAAAGAGAGCC
2-R	109	229	54	AAACCGTCAGGGACAGAATC
3-F	143	271	54	ACTGAGAGTCCAGCTTCCCC
3-R	143	271	54	CAGGGGCCCAAATTACTAAC
4-F	185	292	54	AGGGACCCACATCACAGG
4-R	185	292	54	TACACAAAAGCAGGCACCAG
5-F	98	208	54	CGGGCTATCACTGAAATGG
5-R	98	208	54	CCTGTATCTCCTGCTGTGTGG
6-F	141	268	54	TCCTCTGTTACATCCAAGCC
6-R	141	268	54	TTAGGGTGA CTGACAAGCCC
7-F	312	432	54	CTGAGAGGCACCATGCTAAG
7-R	312	432	54	CTTTGACGGGCCTGACC
8&9-F	480	583	54	AAAACATGGCTGCATGTCC
8&9-R	480	583	54	GCCTGTAGGTGCTGTCCTTC
10-F	93	214	54	TGTAGCCCTCTGCAATCCTG
10-R	93	214	54	TGAATGACTGAAGTGGTGGC
11-F	140	266	54	AGCTGCTGCTGCATAGTGTG
11-R	140	266	54	CACTCCCAACTTCCTTCCTG

3.2 Primer und Enzyme für die RFLP-Analyse

Für die RFLP-Analyse der Kontrollgruppen wurden die in Tabelle 9 dargestellten Restriktionsenzyme gewählt. Eine Übersicht über die verwendeten Primer gibt Tabelle 10.

Bei den Primern für die Analyse der SNPs rs8192440 und rs2292913 handelte es sich um mutagene Primer. Diese tauschten jeweils eine Base aus, um die Schnittstelle des zugehörigen Restriktionsenzymes für eines der beiden Allele zu generieren.

Tabelle 9: Endonukleasen für den RFLP-Nachweis

SNP	Enzym	Basenpaar [Produktgrößen in Basenpaaren]
rs3809237	BanI	AA (241), AG (241, 119 & 121), GG (119 & 121)
rs8192440	Hpy8I	CC (207), CT (207, 178 & 29), TT (178 & 29)
rs2292913	Hpy8I	GG (155), GA (155, 126 & 29) AA (126 & 29)

Tabelle 10: Primer für den Restriktionsverdau

SNP	Pr _{Gr} (bp)	T _A (°C)	Primersequenz 5'→3'
rs3809237-F	241	60	GAGGCCCTCGAAGTTATGC
rs3809237-R	241	60	GGCTCATAGCCGACACCTTC
rs8192440-F	207	60	GGGCTTATTTAGGCCTTCAGTT
rs8192440-R	207	60	TTCCAAACGAGTAAGTGCTTCAGTTTGTCC
rs2292913-F	155	60	GTTATCACTAACAAGGCCTGTGTGGAGTCC
rs2292913-R	155	60	CTGCACGCTTACCTTGAACA

3.3 Sequenzanalyse

Mit der SeqMan®-Software (DNA-Star Inc., Madison, WI, USA) wurden die aufgezeichneten Ergebnisse der Sequenzier-PCR auf Hinweise für genetische Veränderungen in der DNA überprüft. Sofern sowohl Vorwärts- als auch Rückwärtssequenzierung nicht eindeutig waren, wurden diese wiederholt.

Für die gefundenen Sequenzveränderungen wurde deren Häufigkeit aufgeschlüsselt nach DSPS und Narkolepsie im Probandenkollektiv bestimmt. In der HapMap-Datenbank [35] wurde danach überprüft, ob diese Mutationen bereits bekannt waren und die Prävalenz in der europäischen Allgemeinbevölkerung (CEU¹³) als Vergleichswert ermittelt. Insgesamt wurden bei den Probanden 3 verschiedene Polymorphismen identifiziert. Als solche werden zwei oder mehr Sequenzvariationen an einem Genlocus in einer Population bezeichnet. Bei allen dreien handelte es sich um einfache Basenaustausche (SNP¹⁴), die bereits in der Datenbank beschrieben waren [35].

Im Cryptochrom 1 Gen fanden sich zwei SNPs. Der erste war ein A→G Austausch und in dem Intron vor dem 1. Exon lokalisiert (rs3809237). Bei dem zweiten handelte es sich um einen C→T Austausch im 5. Exon (rs8192440). Dieser befand sich an der Position 636 der codierenden Sequenz und führte zur Änderung des Triplets von GGT zu GGC. Da diese beiden zum Einbau von Glycin führen, kommt es nicht zum Aminosäureaustausch (G 212 G).

Der dritte SNP befand sich im intronischen Bereich vom Cryptochrom 2 Gen, 4 Basenpaare vor dem 2. Exon (rs2292913). Dabei handelte es sich um einen A→G Austausch. Bei den Narkolepsie Patienten kam dieser Polymorphismus im Probandenkollektiv nicht vor, bei den DSPS Patienten wurde er bei 2 der 3 Probanden heterozygot nachgewiesen.

¹³ *engl.*: Central European Population

¹⁴ *engl.*: single nucleotide polymorphism

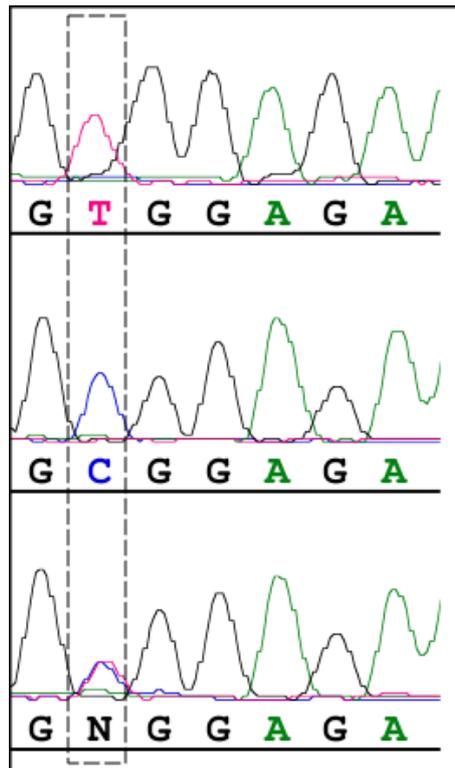


Abbildung 3: *Elektropherogramm von rs8192440 im Gen CRY 1*

Die gestrichelte Auswahl markiert die variante Position (c. 636 C>T p. G 212 G). Die oberen beiden Sequenzen sind an dieser Position homozygot für T bzw. C. Unten ist eine heterozygote Sequenz dargestellt. Das Beispiel zeigt den im Exon 5 von CRY 1 gefundenen SNP rs8192440.

3.4 Polymorphismen in CRY 1 und CRY 2

Tabelle 11: Ergebnisse der Mutationsanalyse von CRY 1 und 2 mit Kontrollen

SNP	Population	Genotypfrequenz*				Allelfrequenz*		
CRY 1 rs3809237 c.1 -173 A>G		GG	AG	AA	Anzahl	G	A	Anzahl
	Narkolepsie	24%	35%	41%	17	41%	59%	34
	Kontrollkollektiv (Narkolepsie)	0%	41%	59%	17	21%	79%	34
	DSPS	0%	67%	33%	3	33%	67%	6
	Kontrollkollektiv (DSPS)	0%	33%	67%	3	17%	83%	6
CRY 1 rs8192440 c.636 C>T p. G212G		CC	CT	TT	Anzahl	C	T	Anzahl
	Narkolepsie	35%	47%	18%	17	59%	41%	34
	Kontrollkollektiv (Narkolepsie)	41%	47%	12%	17	65%	35%	34
	DSPS	33%	33%	33%	3	50%	50%	6
	Kontrollkollektiv (DSPS)	67%	33%	0%	3	83%	17%	6
CRY 2 rs2292913 c.216 -4 A>G		AA	AG	GG	Anzahl	A	G	Anzahl
	Narkolepsie	0%	0%	100%	17	0%	100%	34
	Kontrollkollektiv (Narkolepsie)	0%	12%	88%	17	6%	94%	34
	DSPS	0%	67%	33%	3	33%	67%	6
	Kontrollkollektiv (DSPS)	0%	100%	0%	3	50%	50%	6

* Prozentangaben beziehen sich auf die Verteilung im Kollektiv

Tabelle 12: zentraleuropäische Vergleichspopulation CEU [35]

SNP	Genotypfrequenz*				Allelfrequenz*		
rs3809237	GG	AG	AA	Anzahl	G	A	Anzahl
	12%	56%	32%	59	40%	60%	118
rs8192440	CC	CT	TT	Anzahl	C	T	Anzahl
	33%	55%	12%	60	61%	39%	120
rs2292913	AA	AG	GG	Anzahl	A	G	Anzahl
	0%	9%	92%	59	4%	96%	118

* Prozentangaben beziehen sich auf die Verteilung im Kollektiv

4 Diskussion

4.1 Fragestellung

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde der Zusammenhang zwischen Sequenzvariationen in den Cryptochromgenen CRY 1 und CRY 2 und der Narkolepsie sowie dem Syndrom der verzögerten Schlafphase untersucht. Zur Klassifikation dienten bei der Narkolepsie die Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie [24] und bei dem Syndrom der verzögerten Schlafphasen die internationale Klassifikation von Schlafstörungen [3].

Bei beiden Erkrankungen handelt es sich um pathologische Schlafstörungen deren Ursache noch weitestgehend unbekannt ist. Es wird eine Störung des komplizierten Zusammenspiels der unterschiedlichen Gene der zirkadianen Rhythmik vermutet, die zur Ausbildung dieses Phänotyps führt. Die Steuerung der zirkadianen Rhythmik wird bestimmt durch ein Zusammenspiel von verschiedenen positiven und negativen Rückkopplungsschleifen, in denen die Expression verschiedener Gene einer Aktivierung oder Hemmung durch andere Gene unterliegt [26, 58, 59].

Eine Schlüsselfunktion spielen dabei die Cryptochrom Gene CRY 1 und CRY 2. Die Proteine von CRY bilden zusammen mit denen der Periodogene (PER 1-3) einen Komplex, der zunächst indirekt die Aktivierung der CRY und PER Gene unterdrückt [59]. In der Folge wird die Expression von CRY wieder verstärkt durch die vermehrte Bildung eines Komplexes von BMAL1 und CLOCK [58], wodurch ein Oszillator entsteht. Daher ist es denkbar, dass eine Veränderung der CRY Proteine verursacht durch eine Mutation in der proteinkodierenden Sequenz das Bindungsverhalten zu PER verändert und so zu einer gestörten zirkadianen Rhythmik führt. Weiterhin kann auch eine veränderte Expression durch eine Sequenzvariante im Intron von CRY zu dem gleichen Phänotyp führen. Deshalb wurden die Gene CRY 1 und CRY 2 in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

Zur Analyse wurde der Kandidatengenansatz gewählt, in dem das Gen über sein bekanntes Genprodukt postuliert wird. Bei diesem Ansatz wird zunächst ein Gen identifiziert, welches in einem funktionellen Zusammenhang mit der Ausbildung der zu untersuchenden Krankheit stehen könnte. Dieses wird dann in seiner kodierenden und den angrenzenden intronischen Sequenzen auf Sequenzabweichungen hin untersucht.

Ein alternativer Ansatz wäre eine Kopplungsanalyse gewesen. Dabei wird mit Hilfe einer computergestützten Zweimarkerkartierung eine verdächtige, chromosomale Region ermittelt und anschließend eine Mutationsanalyse der dort liegenden Kandidatengene durchgeführt. Das war hier nicht möglich, weil es sich bei den vorliegenden

Erkrankungen eher nicht um monogenetische sondern um komplexe Erkrankungen handelt [89, 95]. Bei dem DSPS waren zwar zwei betroffene Familienmitglieder, die im 1. Grad miteinander verwandt sind vorhanden, dies reicht aber zu einer Kopplungsanalyse nicht aus.

Für die Bestimmung von Anfälligkeitsallelen für komplexe Erkrankungen werden Assoziationsstudien und die Bestimmung eines Kopplungsungleichgewichtes herangezogen. Dabei werden Sequenzvarianten in einem großen Kollektiv von Patienten mit derselben Erkrankung ermittelt. Ihre Frequenz wird dann mit einem mindestens genau so großen Kollektiv von gesunden Kontrollen verglichen. Anschließend werden dann sogenannte Anfälligkeitsallele ermittelt. Diese Analyse ist in der vorliegenden Arbeit aufgrund der kleinen Größe des Patientenkollektivs nicht möglich gewesen.

4.2 Methodik

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden etablierte Verfahren zur Mutationsanalyse angewendet und auf die Cryptochrome CRY 1 und CRY 2 übertragen [91]. Bei der praktischen Durchführung im Labor wurden übliche Standards beachtet, so dass ein Verfälschen der Ergebnisse durch Verunreinigung oder Vertauschen von Proben unwahrscheinlich erscheint. Um dem Risiko von unspezifischem Primerannealing bei den PCRs vorzubeugen, wurden die Primer mit entsprechend hoher Spezifität und Länge für den jeweils gewünschten zu amplifizierenden Bereich entworfen. Bei dem Primerdesign erfolgte ein Abgleich mit einer humanen DNA-Datenbank durch ein BLAST¹⁵-Programm. Die Größe der amplifizierten Produkte wurde mit dem Erwartungswert verglichen [49]. Hieraus ergab sich kein Anhalt für Doppelprodukte oder unerwünschte Produkte.

Die generierten Sequenzen wurden mit einer aus dem Human Genome Browser [49] heruntergeladenen Referenzsequenz verglichen und das Alignment auf seine Richtigkeit überprüft. Dadurch wurde geprüft, dass sich die ermittelten Sequenzen auf den richtigen Genen und Exons befanden. Die ermittelten Sequenzabweichungen wurde in einer Datenbank überprüft [35, 92]. So wurde sichergestellt, dass es sich um bereits bekannte Polymorphismen handelt und das Übersehen von funktionell wichtigen Mutationen vermieden.

Aufgrund der verwendeten Größe der Patienten- und Probandenkollektive ist eine statistische Auswertung hinsichtlich einer möglichen Assoziation der gefundenen Polymorphismen zu dem Syndrom der verzögerten Schlafphase nicht sinnvoll. Bei der Narkolepsie sind die Patienten- und Probandenkollektive mit 17 lediglich groß

¹⁵ *engl.*: Basic Local Alignment Search Tool

genug um Tendenzen abzuschätzen. Aussagen zur statistischen Signifikanz sind daher in beiden Fällen erst nach weiteren Untersuchungen mit einer größeren Fallzahl möglich.

4.3 Mutationsanalyse

Die Mutationsanalyse der Gene CRY 1 und CRY 2 bei dem vorliegenden Kollektiv von Patienten wurde durchgeführt, um krankheitsverursachende Mutationen oder seltene Polymorphismen zu identifizieren, die in einem ursächlichen Zusammenhang mit der Ausbildung einer Narkolepsie oder des Syndroms der verzögerten Schlafphase stehen könnten.

4.3.1 Narkolepsie

Bei der Mutationsanalyse der Gene von CRY 1 und CRY 2 bei den 17 untersuchten Narkolepsie Patienten wurden drei Sequenzveränderungen gefunden.

Im CRY 1-Gen fanden sich die zwei Polymorphismen rs3809237 und rs8192440.

Bei rs3809237 handelt es sich um einen intronischen SNP, der bei 24% der Narkolepsie Patienten homozygot (GG) vorkam, in der Kontrollgruppe (n=17) hingegen überhaupt nicht. Bei der Überprüfung des SNPs in der Datenbank wurde festgestellt, dass der SNP dort bei n=118 untersuchte Chromosomen mit einer vergleichbaren Allelfrequenz vertreten war wie in dem Kollektiv von Narkolepsie Patienten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine positive Assoziation der Narkolepsie mit dem SNP nicht sehr wahrscheinlich ist. Aufgrund der um 20% verminderten Prävalenz des G-Allels in der Kontrollgruppe erscheint eine weitergehende Untersuchung mit größerer Probandenzahl möglicherweise sinnvoll, um einen protektiven Effekt auszuschließen. Dafür ist die Größe des vorliegenden Kollektivs zu klein weshalb keine statistisch gesicherte Aussagen über eine signifikante Assoziation getroffen werden kann.

Bei dem zweiten SNP handelt es sich um den im Exon 5 von CRY 1 gelegenen Polymorphismus rs8192440, der nicht zu einem Aminosäureaustausch führt und in der HapMap-Datenbank mit der Häufigkeit von 33% (CC) in einem Kollektiv von 118 gesunden Chromosomen gefunden wurde [35]. Die Häufigkeiten der einzelnen Allelvarianten und deren Verteilung sind in den Gruppen von Narkolepsie Patienten, gepaarten Kontrollen und der zentraleuropäischen Allgemeinbevölkerung ähnlich verteilt, so dass eine Assoziation sehr unwahrscheinlich erscheint. Desweiteren wäre eine pathophysiologische Bedeutung schwer erklärbar, da der SNP nicht zu

einem Aminosäureaustausch führt (G 212 G).

Im CRY 2-Gen fand sich ein intronischer SNP (rs2292913) in der Kontrollgruppe (12%) und bei der zentraleuropäischen Vergleichsbevölkerung (9%), der bei den Narkolepsie Patienten nicht vorkam. Da dieser ausschließlich heterozygot vorkam und die Allelfrequenz sich dadurch in einem ähnlichen Bereich bewegte (6%/4%/0%, respektive), ist ein protektiver Effekt dieses Allels eher unwahrscheinlich.

In einer aktuellen genomübergreifenden Assoziationsstudie von HLA-DQB1*-0602 positiven Narkolepsie-Patienten mit Kataplexie wurde gezeigt, dass es eine positive Assoziation mit dem T-cell receptor alpha gibt [33], was darauf hinweist, dass das Autoimmunsystem einen Einfluss auf die Ausbildung einer Narkolepsie haben könnte. In dem vorliegenden Probenkollektiv waren 14 Probanden HLA-DQB1*-0602 positiv. Es wäre daher denkbar und zu prüfen, ob auch hier eine Assoziation gefunden werden könnte. Andererseits sind auch regulative Effekte in der intronischen Sequenz (Intron 1 IVS1) von CRY 1 gefunden worden [34]. Dabei wurde festgestellt, dass das Fehlen von Intron 1 in transgenen Drosophila Tieren bewirkte, dass die Rhythmik der CRY 1 mRNA Expression gestört war. Daher kann davon ausgegangen werden, dass IVS1 wichtige regulatorische Elemente enthält, die für die Aufrechterhaltung der zirkadianen Rhythmik von Bedeutung sind. Insofern ist es auch nicht ausgeschlossen, dass ein intronischer Polymorphismus in dieser Region einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von CRY haben könnte. Ein solcher Zusammenhang wurde gezeigt bei der intronischen Sequenzvariante (IVS4+919G>A) in dem α -Galaktosidase A Gen, welche in einem ursächlichen Zusammenhang mit der Ausbildung einer kardialen Form von Morbus Fabry steht. Diese zeigte einen regulatorischen Effekt, indem sie die vermehrte Erkennung einer alternativen Splice Stelle bewirkte. Dadurch wurde dieses Transkript vermehrt exprimiert und die Expression des normalen Transkriptes stark herab gesetzt [46].

Den beiden im intronischen Bereich gelegenen SNPs rs3809237 und rs2292913 könnte eine Funktion bei der Krankheitsentstehung zukommen, wenn sie beispielsweise die Funktion eines Enhancers oder Silencers verändern oder eine branch-side beim splicing Prozess beeinflussen würde. Dies wäre durch weitergehende funktionelle Analysen durch Zellkulturexperimente nachzuweisen. Die ähnliche Verteilung in den Allelfrequenzen bei den hier untersuchten Narkolepsiepatienten, dem Kontrollkollektiv sowie der kaukasischen Vergleichspopulation [35] gibt für eine solche Annahme zunächst keinen Anlass. Aufgrund der zu geringen Probandenzahl sind jedoch weitere Untersuchungen anzustreben, um diese Tendenz zu überprüfen.

4.3.2 Syndrom der verzögerten Schlafphase

In den beiden Genen wurden dieselben Polymorphismen wie bei den Narkolepsie Patienten und deren zugeordneten Kontrollen entdeckt. Dabei handelte es sich um die SNPs rs3809237, rs8192440 und rs2292913. Der einzige exonische SNP rs8192440 fand sich in CRY 1 und führt nicht zu einem Aminosäureaustausch. Die Mutationsanalyse des DSPS Kollektives erfolgte neben der Polymorphismensuche auch mit der Frage, ob Hinweise auf einen autosomal dominanten Erbgang mit unvollständiger Penetranz vorliegen [89]. Da es sich bei 2 der 3 Patienten um Verwandte 1. Grades handelt, wäre es möglich, dass es sich in diesem Fall um einen autosomal dominanten, nach mendelndem Muster ablaufenden Erbgang handelt. Aufgrund der fehlenden Mutationen in der exonischen und angrenzenden intronischen Sequenz der Gene CRY 1 und CRY 2 können Sequenzveränderungen in diesen Genen als Ursache ausgeschlossen werden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die Ursache auf einem anderen Gen der zirkadianen Rhythmik lokalisiert ist. Um dies zu untersuchen könnte einerseits versucht werden, weitere Gene wie PER, BMAL1 oder CLOCK zu sequenzieren oder andererseits durch eine genaue Familienanamnese zu versuchen, weitere betroffene Familienmitglieder zu identifizieren, so dass eine Kopplungsanalyse durchgeführt werden kann. Das wäre ein interessanter Ansatz, da für das ASPS bereits familiäre Formen identifiziert wurden [98, 109]. Beim DSPS ist eine protektive Missense-Mutation bekannt [96] und ein variabler Längenspolymorphismus konnte mit der Erkrankung assoziiert werden [2]. Letzterer ist eher als genetischer Marker und nicht als krankheitsverursachend zu sehen. Insofern bleibt die genetische Komponente im DSPS bisher weiterhin unklar [89, 95].

Sollte es sich um einen polygenetischen Erbgang handeln, wäre eine Assoziation mit CRY 1 und CRY 2 weiter denkbar, da die Patientengruppe mit nur 3 Personen sehr klein ist. Daher muss die Größe der Kohorte zunächst erweitert werden. Dann könnte eine genomübergreifende Assoziationsstudie mögliche Loci identifizieren. Erschwert würden diese Untersuchungen allerdings durch die unklare epidemiologische Situation und Schwierigkeiten bei der Identifikation einer ausreichend großen Population von an DSPS erkrankten Personen.

Die Verteilung der Genotyp- und Allelfrequenzen bei den beiden intronischen SNPs zeigten auch im Bezug zur zentraleuropäischen Vergleichspopulation keine weiteren Auffälligkeiten [35].

4.4 Fazit

Sowohl bei der Narkolepsie als auch beim Syndrom der verzögerten Schlafphase sind die genetischen Komponenten der Erkrankung noch nicht geklärt. Bei beiden wird ein polygenetisches Geschehen vermutet, wobei Umweltfaktoren wahrscheinlich eine relevante Bedeutung zukommt.

Weder für die Narkolepsie noch für das Syndrom der verzögerten Schlafphase wurden in den Exons der Gene von CRY 1 und CRY 2 Krankheit verursachende Gene entdeckt. Für die drei gefundenen Polymorphismen, wovon zwei im intronischen Bereich lokalisiert waren, konnte aufgrund der kleinen Fallzahlen eine Assoziation mit den beiden Erkrankungen nicht ausgeschlossen oder belegt werden. Weitere Untersuchungen mit statistisch relevanter Fallzahl wären hier sinnvoll.

Bei dem DSPS konnte ein autosomal dominanter Erbgang im exonischen Bereich der untersuchten Gene ausgeschlossen werden.

5 Zusammenfassung

Bei der Narkolepsie und dem Syndrom der verzögerten Schlafphase handelt es sich um Erkrankungen, die mit einer Störung des Schlaf-Wach-Rhythmus assoziiert sind. Die Narkolepsie geht typischerweise mit Tagesschläfrigkeit, Kataplexien, fraktioniertem Nachtschlaf, automatischem Verhalten sowie polysomnographisch verkürzten Einschlafzeiten und vorzeitigem REM-Schlaf einher. Beim Syndrom der verzögerten Schlafphase ist die zirkadiane Rhythmik zum Abend und in die Nacht verschoben, so dass es zu Einschlafstörungen in frühen Nachtstunden und Problemen beim Erwachen zu gesellschaftlich normalen Weckzeiten kommt.

Eine Assoziation mit den Genen der zirkadianen Rhythmik gilt beim Syndrom der verzögerten Schlafphase als gesichert und wird bei der Narkolepsie diskutiert. Zu den zentralen Genen der zirkadianen Rhythmik gehören die Cryptochromgene CRY 1 und CRY 2, die Periodgene PER 1-3, sowie CLOCK und BMAL1. Die Cryptochrom- und Periodgene bilden Proteine, die über eine Komplexbildung ihre eigene Aktivierung unterdrücken. Im Verlauf wird nun die Expression von BMAL1 und CLOCK angeregt. Deren Produkte bilden ein Heterodimer, welches die Cryptochrom- und Periodgene wieder anregt und somit einen Oszillator für den Schlaf-Wachrhythmus entstehen lässt.

Ziel der Doktorarbeit war die Mutationsanalyse der proteinkodierenden Sequenz der Cryptochrome CRY 1 und CRY 2 unter Erfassung der angrenzenden intronischen Sequenzen. Dazu wurden diese Gene bei 17 Narkolepsie Patienten und 3 Patienten mit dem Syndrom der verzögerten Schlafphase sequenziert und anschließend die gefundenen Sequenzvariationen auf deren Häufigkeit in einer Kontrollgruppe untersucht.

Für beide Patientengruppen wurden in den untersuchten Genen keine neuen Sequenzvariationen entdeckt. Es fanden sich drei Polymorphismen, bei denen es sich jeweils um einen einfachen Basenaustausch handelte. Einer davon befand sich im exonischen Bereich, führte aber nicht zu einem Aminosäureaustausch. Hinweise auf eine statistisch relevante Assoziation der gefundenen Polymorphismen zu den untersuchten Erkrankungen ergaben sich nicht, zur statistischen Sicherstellung sind allerdings weitere Untersuchungen mit größeren Probandenzahlen anzustreben.

Beim Syndrom der verzögerten Schlafphase wird unter anderem ein autosomal dominanter Erbgang mit verminderter Penetranz als Ursache diskutiert. Dieser Vererbungsmodus konnte für die untersuchten Gene bei dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

6 Literaturverzeichnis

Literatur

- [1] Akimoto H, Honda Y, Takahashi Y. Pharmacotherapy in narcolepsy. *Disease Nerv Sys.* 1960. 21:704-6
- [2] Archer SN, Robilliard DL, Skene DJ, Smits M, Williams A, Arendt J, von Schantz M. A length polymorphism in the circadian clock gene *Per3* is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep.* 2003. 26(4):413-5
- [3] American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders: diagnostic and coding manual (2nd Ed.). Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine. 2005.
- [4] Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science.* 1953. 118(3062): 273-4
- [5] Barinaga M. Clock photoreceptor shared by plants and animals. *Science.* 1998. 282(5394):1628-30
- [6] Baker T, Dement WC. Neurochemical abnormalities in a canine model of narcolepsy/cataplexy syndrome: implications for basic sleep mechanisms. *Intl Congress Sleep Res.* 1983. 4:33
- [7] Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the Circadian Clock. *Science.* 2002. 295(5557):1070-3
- [8] Broughton R, Mamelak M. The treatment of narcolepsy-cataplexy with nocturnal gamma-hydroxybutyrate. *Can J Neurol Sci.* 1979. 6(1):1-6
- [9] Busza A, Emery-Le M, Rosbash M, Emery P. Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science.* 2004. 304:1503-1506
- [10] Caffè M. Maladie de sommeil. *J des Connaiss Med Pratiques.* 1862. 29:323
- [11] Carpen JD, von Schantz M, Smits M, Skene DJ, Archer SN. A silent polymorphism in the *PER1* gene associates with extreme diurnal preference in humans. *J Hum Genet.* 2006. 51(12):1122-5

- [12] Carskadon MA, Dement WC, Mitler MM, Roth T, Westbrook PR, Keenan S. Guidelines for the multiple sleep latency test (MSLT): a standard measure of sleepiness. *Sleep*. 1986. 9:519-524
- [13] Chavaillez O, Frey JG. Narcolepsie: le point actuel. *Revue Médicale Suisse*. 2007. 99:448-50,452-5
- [14] Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*. 1999. 98(4):437-51
- [15] Czeisler CA, Allan JS, Strogatz SH, Ronda JM, Sánchez R, Ríos CD, Freitag WO, Richardson GS, Kronauer RE. Bright light resets the human circadian pacemaker independent of the timing of the sleep-wake cycle. *Science*. 1986. 233(4764):667-71
- [16] Czeisler CA, Richardson GS, Coleman RM, Zimmerman JC, Moore-Ede MC, Dement WC, Weitzman ED. Chronotherapy: resetting the circadian clocks of patients with delayed sleep phase insomnia. *Sleep*. 1981. 4(1):1-21
- [17] Daly DD, Yoss RE. Electroencephalogram in narcolepsy. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1957. 9(1):109-120
- [18] Dagan Y, Eisenstein M. Circadian rhythm sleep disorders: toward a more precise definition and diagnosis. *Chronobiology International*. 1999. 16:213-22
- [19] Dauvilliers Y, Arnulf I, Mignot E. Narcolepsy with cataplexy. *Lancet*. 2007. 369:499-511
- [20] Dauvilliers Y, Baumann CR, Carlander B, Bischof M, Blatter T, Lecendreux M, Maly F, Besset A, Touchon J, Billiard M, Tafti M, Bassetti CL. CSF hypocretin-1 levels in narcolepsy, Kleine-Levin syndrome, and other hypersomnias and neurological conditions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003. 74(12):1667-73
- [21] Dauvilliers Y, Carlander B, Molinari N, Desautels A, Okun M, Tafti M, Montplaisir J, Mignot E, Billiard M. Month of birth as a risk factor for narcolepsy. *Sleep*. 2003. 26(6):663-5.

- [22] Dauvilliers Y, Neidhart E, Billiard M, Tafti M. Sexual dimorphism of the catechol-O-methyltransferase gene in narcolepsy is associated with response to modafinil. *Pharmacogenomics J.* 2002. 2:65-68
- [23] de Haro L, Panda S. Systems Biology of Circadian Rhythms: An Outlook. *Journal of biological Rhythms.* 2006. 21(6):507-518
- [24] Diener HC, Putzki N, Berlit P. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 3. überarbeitete Auflage. 2005. Georg Thieme Verlag. Stuttgart
- [25] Duffy JF, Wright KP Jr. Entrainment of Human Circadian System by Light. *Journal of Biological Rhythms.* 2005. 20(4):326-338
- [26] Ebisawa T. Circadian Rhythms in the CNS and Peripheral Clock Disorders: Human Sleep Disorders and Clock Genes. *J Pharmacol Sci.* 2007. 103:150-154
- [27] Ebisawa T, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Kamei Y, Katoh M, Watanabe T, Sekimoto M, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Ozeki Y, Sugishita M, Toyoshima R, Inoue Y, Yamada N, Nagase T, Ozaki N, Ohara O, Ishida N, Okawa M, Takahashi K, Yamauchi T. Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep.* 2001. 2(4):342-6
- [28] Fisher F. Epileptoide Schlafzustände. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten.* 1878. 8:200–203
- [29] Ganjavi H, Shapiro CM. Hypocretin/Orexin: a molecular link between sleep, energy regulation, and pleasure. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2007. 19(4):413-9
- [30] Gélinau JBE. De la Narcolepsie. *Gaz Hop.* 1880. 53:626-628,635-637
- [31] Griffin EA Jr, Staknis D, Weitz CJ. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science.* 1999. 286:768-771
- [32] Guilleminault C, Mignot E, Grumet FC. Familial patterns of narcolepsy. *Lancet.* 1989. 2(8676):1376-9
- [33] Hallmayer J, Faraco J, Lin L, Hesselson S, Winkelmann J, Kawashima M, Mayer G, Plazzi G, Nevsimalova S, Bourgin P, Hong SS, Honda Y, Honda M, Högl B, Longstreth WT Jr, Montplaisir J, Kemlink D, Einen M, Chen J, Musone SL, Akana M, Miyagawa T, Duan J, Desautels A, Erhardt C, Hesla

- PE, Poli F, Frauscher B, Jeong JH, Lee SP, Ton TG, Kvale M, Kolesar L, Dobrovolná M, Nepom GT, Salomon D, Wichmann HE, Rouleau GA, Gieger C, Levinson DF, Gejman PV, Meitinger T, Young T, Peppard P, Tokunaga K, Kwok PY, Risch N, Mignot E. Narcolepsy is strongly associated with the T-cell receptor alpha locus. *Nat Genet.* 2009. 41(6):708-11.
- [34] Hao Z, Ng F, Yixiao L, Hardin PE. Spatial and circadian regulation of cry in *Drosophila*. *J Biol Rhythms.* 2008. 23(4):283-95.
- [35] HapMap-Project <http://www.hapmap.org/>, Abruf: 31.01.08
- [36] Harsh JR, Hayduk R, Rosenberg R, Wesnes KA, Walsh JK, Arora S, Niebler GE, Roth T. The efficacy and safety of armodafinil as treatment for adults with excessive sleepiness associated with narcolepsy. *Curr Med Res Opin.* 2006. 22:761-74
- [37] Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science.* 2002. 295(5557):1065-70
- [38] Hirayama J, Sassone-Corsi P. Structural and functional features of transcription factors controlling the circadian clock. *Curr Opin Genet Dev.* 2005. 15(5):548-56
- [39] Hohjoh H, Takasu M, Shishikura K, Takahashi Y, Honda Y, Tokunaga K. Significant association of the arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) gene with delayed sleep phase syndrome. *Neurogenetics.* 2003. 4:151-153
- [40] Hohjoh H, Takahashi Y, Hatta Y, Tanaka H, Akaza T, Tokunaga K, Honda Y, Juji T. Possible association of human leucocyte antigen DR1 with delayed sleep phase syndrome. *Psychiatry Clin Neurosci.* 1999. 53(4):527-9
- [41] Honda Y, Asake A, Tanaka Y, Juji T. Discrimination of narcolepsy by using genetic markers and HLA. *Sleep Res.* 1983. 1(2):254
- [42] Honda Y. Census of narcolepsy, cataplexy, and sleep life among teenagers in Fujisawa City. *Sleep Res.* 1979. 8:191
- [43] Hsu DS, Zhao X, Zhao S, Kazantsev A, Wang RP, Todo T, Wei YF, Sancar A. Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavo-proteins. *Biochemistry.* 1996. 35(44):13871-7

- [44] Hublin C, Kaprio J, Partinen M, Koskenvuo M, Heikkila K, Koskimies S, Guilleminault C. The prevalence of narcolepsy: an epidemiological study of the Finnish Twin Cohort. *Ann Neurol.* 1994. 35(6):709-16
- [45] Ikeda M, Nomura M. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997. 233:258-264
- [46] Ishii S, Nakao S, Minamikawa-Tachino R, Desnick RJ, Fan J-Q. Alternative Splicing in the α -Galaktosidase A Gene: Increased Exon Inclusion Results in the Fabry Cardiac Phenotype. *Am J Hum Genet.* 2002. 70:994–1002
- [47] Iwase T, Kajimura N, Uchiyama M, Ebisawa T, Yoshimura K, Kamei Y, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Katoh M, Watanabe T, Nakajima T, Ozeki Y, Sugishita M, Hori T, Ikeda M, Toyoshima R, Inoue Y, Yamada N, Mishima K, Nomura M, Ozaki N, Okawa M, Takahashi K, Yamauchi T. Mutation screening of the human Clock gene in circadian rhythm sleep disorders. *Psychiatry Res.* 2002. 109(2):121-8
- [48] Katzenberg D, Young T, Finn L, Lin L, King DP, Takahashi JS, Mignot E. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep.* 1998. 21(6):569-76
- [49] Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Hausler D. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res.* 2002. 12(6), 996-1006
- [50] King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TDL, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS. Positional cloning of the mouse circadian Clock gene. *Cell.* 1997. 89:641-653
- [51] Klerman EB. Clinical Aspects of Human Circadian Rhythms. *Journal of Biological Rhythms.* 2005. 20(4):375-386
- [52] Kobayashi K, Kanno S, Smit B, van der Horst GTJ, Takao M, Yasui A. Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res.* 1998. 26:5086-5092
- [53] Lack LC, Wright HR. Clinical Management of Delayed Sleep Phase Disorder. *Behavioral sleep Medicine.* 2007. 5(1):57-76

- [54] Lankford DA. Armodafinil: a new treatment for excessive sleepiness. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008 Apr;17(4):565-73.
- [55] Lankford DA, Wellman JJ, O'Hara C. Posttraumatic narcolepsy in mild to moderate closed head injury. *Sleep*. 1994. 17(8 Suppl):S25-8
- [56] Lavie P, Peled R. Narcolepsy is a rare disease in Israel. *Sleep*. 1987. 10:608-9
- [57] de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci*. 1998. 95(1):322-7
- [58] Leloup JC, Goldbeter A. Toward a detailed computational model for the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003. 100(12):7051-6
- [59] Levi F, Schibler U. Circadian Rhythms: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007. 47:593-628
- [60] Lewy AJ, Sack RL, Miller LS, Hoban TM. Antidepressant and circadian phase-shifting effects of light. *Science*. 1987. 235(4786):352-4
- [61] Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*. 1999. 98:365-76
- [62] Löwenfeld L. Über Narkolepsie. *Münchener Medizinische Wochenschrift*. 1902. 49:1041-1045
- [63] Longstreth WT Jr, Koepsell TD, Ton TG, Hendrickson AF, van Belle G. The Epidemiology of Narcolepsy. *Sleep*. 2007. 30(1):13-26
- [64] Mayer G. *Narkolepsie - Genetik, Immunogenetik, Motorische Störungen*. 1. Auflage. 2000. Blackwell Verlag. Berlin
- [65] Mignot E. A hundred years of Research. nach: <http://med.stanford.edu/school/Psychiatry/narcolepsy/narcolepsyhistory.html>, Abruf: 29.12.2007
- [66] Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, Okun M, Nevsimalova S, Overeem S, Vankova J, Black J, Harsh J, Bassetti C, Schrader H, Nishino S. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol*. 2002. 59:1553-62

- [67] Mignot E, Hayduk R, Black J, Grumet FC, Guilleminault C. HLA DQB1*0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients. *Sleep*. 1997. 20:1012-1020
- [68] Mignot E, Lin X, Arrigoni J, Macaubas C, Olive F, Hallmayer J, Underhill P, Guilleminault C, Dement WC, Grumet FC. DQB1*0602 and DQA1*0102 (DQ1) are better markers than DR2 for narcolepsy in Caucasian and black Americans. *Sleep*. 1994. 17(8 Suppl):S60-7
- [69] Mignot E, Wang C, Rattazzi C, Gaiser C, Lovett M, Guilleminault C, Dement WC, Grumet FC. Genetic linkage of autosomal recessive canine narcolepsy with a mu immunoglobulin heavy-chain switch-like segment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991. 88(8):3475-78.
- [70] US Modafinil in Narcolepsy Multicenter Study Group. Randomized trial of modafinil for the treatment of pathological somnolence in narcolepsy. *Ann Neurol*. 1998. 43(1):88-97
- [71] Monk TH. Aging Human Circadian Rhythms - Conventional Wisdom May Not Always Be Right. *Journal of Biological Rhythms*. 20(4):366-373
- [72] Morgenthaler TI, Kapur VK, Brown T, Swick TJ, Alessi C, Aurora RN, Boehlecke B, Chesson AL Jr., Friedman L, Maganti R, Owens J, Pancer J, Zak R. Practice Parameters for the Treatment of Narcolepsy and other Hypersomnias of Central Origin. *American Academy of Sleep Medicine Report*. *Sleep*. 2007. 30(12):1705-11
- [73] National Institute of Neurological Disorders and Stroke. http://www.ninds.nih.gov/disorders/narcolepsy/detail_narcolepsy.htm. Abrufo: 04.01.08
- [74] Nishino S. Narcolepsy: pathophysiology and pharmacology. *J Clin Psychiatry*, 2007. Suppl13:9-15
- [75] Nishino S. Clinical and neurobiological aspects of narcolepsy. *Sleep Med*. 2007. 8(4):373-99.
- [76] Okamura H, Miyake S, Sumi Y, Yamaguchi S, Yasui A, Muijtjens M, Hoeijmakers JHJ, van der Horst GTJ. Photic induction of mPer1 and mPer2 in Cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science*. 1999. 286:2531-2534

- [77] Orellana C, Villemin E, Tafti M, Carlander B, Besset A, Billiard M. Life events in the year preceding the onset of narcolepsy. *Sleep*. 1994. 17(8 Suppl):S50-3.
- [78] Oren DA, Wehr TA. Hypernyctohemeral syndrome after chronotherapy for delayed sleep phase syndrome. *N Engl J Med*. 1992. 327(24):1762
- [79] Passouant P, Cadilhac J, Billiard M, Besset A. Suppression of paradoxical sleep with clomipramine. *Therapie*. 1973. 28(2):379-92
- [80] Pereira DS, Tufik S, Louzada FM, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Lemos NA, Korczak AL, D'Almeida V, Pedrazzoli M. Association of the length polymorphism in the human *Per3* gene with the delayed sleep-phase syndrome: does latitude have an influence upon it? *Sleep*. 2005. 28(1):29-32
- [81] Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*. 2000. 6:991-97
- [82] Prinzmetal M, Bloomberg W. The use of benzedrine for the treatment of narcolepsy. *Journal of the American Medical Association*. 1935. 105:2051-2054
- [83] Rahman SA, Kayumov L, Tchmoutina EA, Shapiro CM. Clinical efficacy of dim light melatonin onset testing in diagnosing delayed sleep phase syndrome. *Sleep Med*. 2009. 10(5):549-55.
- [84] Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 1990. 247(4945):975-8
- [85] Reid KJ, Phyllis CZ. Circadian Rhythm Disorders. *Seminars in Neurology*. 2004. 24(3):315-325
- [86] Rosenthal NE, Joseph-Vanderpool JR, Levendosky AA, Johnston SH, Allen R, Kelly KA, Souetre E, Schultz PM, Starz KE. Phase-shifting effects of bright morning light as treatment for Delayed Sleep Phase Syndrome. *Sleep*. 1990. 13(4):354-61

- [87] Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. 2000. Human Press, Totowa, NJ, pp365-386 <http://frodo.wi.mit.edu>
- [88] Sack RL, Auckley D, Auger RR, Carskadon MA, Wright KP Jr, Vitiello MV, Zhdanova IV. American Academy of Sleep Medicine. *Circadian Rhythm Sleep Disorders: Part I, Basic Principles, Shift Work and Jet Lag Disorders*. *Sleep*. 2007. 30(11):1460-83
- [89] Sack RL, Auckley D, Auger RR, Carskadon MA, Wright KP Jr, Vitiello MV, Zhdanova IV. American Academy of Sleep Medicine. *Circadian Rhythm Sleep Disorders: Part II, Advanced Sleep Phase Disorder, Delayed Sleep Phase Disorder, Free-Running Disorder, and Irregular Sleep-Wake Rhythm*. *Sleep*. 2007. 30(11):1484-501
- [90] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 1998. 92(4):573-85
- [91] Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975. 94(3):441-8.
- [92] Sherry ST, Ward M, Sirotkin K. dbSNP—Database for Single Nucleotide Polymorphisms and Other Classes of Minor Genetic Variation. *Genome Res*. 1999. 9:677–679.
- [93] Siegel JM. Narcolepsy: A key role for Hypocretins (Orexins). *Cell*. 1999. 98(4):409-12
- [94] Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC. RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell*. 1997. 90:1003-1011
- [95] Tafti M, Maret S, Dauvilliers Y. Genes for normal sleep and sleep disorders. *Ann Med*. 2005. 37(8):580-9.
- [96] Takano A, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Inoue Y, Kamei Y, Kitajima T, Shibui K, Katoh M, Watanabe T, Hashimoto Y, Nakajima

- T, Ozeki Y, Hori T, Yamada N, Toyoshima R, Ozaki N, Okawa M, Nagai K, Takahashi K, Isojima Y, Yamauchi T, Ebisawa T. A missense variation in human casein kinase I epsilon gene that induces functional alteration and shows an inverse association with circadian rhythm sleep disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2004. 29(10):1901-9
- [97] Todo T, Ryo H, Yamamoto K, Toh H, Inui T, Ayaki H, Nomura T, Ikenaga M. Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science*. 1996. 272:109-112
- [98] Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptáček LJ, Fu YH. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial Advanced Sleep Phase Syndrome. *Science*. 2001. 291:1040
- [99] van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*. 1999. 398:627-630
- [100] van der Spek PJ, Kobayashi K, Bootsma D, Takao M, Eker APM, Yasui A. Cloning, tissue expression, and mapping of a human photolyase homolog with similarity to plant blue-light receptors. *Genomics*. 1996. 37:177-182
- [101] von Schantz M, Archer SN. Clocks, genes and sleep. *J R Soc Med*. 2003. 96:486-89
- [102] Van Economo C. Sleep as a problem of localization. *Journal of Nervous and Mental Disease*. 1930. 71(3):249-259
- [103] Vogel G. Studies in psychophysiology of dreams. *Arch Gen Psychiatry*. 1960. 3:421-428
- [104] Weitzman ED, Czeisler CA, Coleman RM, Spielman AJ, Zimmerman JC, Dement W, Richardson G, Pollak CP. Delayed sleep phase syndrome, A chronological disorder with sleep-onset insomnia. *Archives of General Psychiatry*. 1981. 38(7):737-46
- [105] Westphal C. Eigenthümliche mit Einschlafen verbundene Anfälle. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*. 1877. 7:631-5
- [106] Wikipedia. <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:PCR.svg> Abruf: 21.01.08

- [107] Wise MS, Arand DL, Auger RR, Brooks SN, Watson NF. Treatment of Narcolepsy and other Hypersomnias of Central Origin. *American Academy of Sleep Medicine Review. Sleep.* 2007. 30(12):1712-1725
- [108] Xu Y, Toh KL, Jones CR, Shin JY, Fu YH, Ptácek LJ. Modeling of a human circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2. *Cell.* 2007. 128(1):59-70
- [109] Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, Saigoh K, Ptácek LJ, Fu YH. Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature.* 2005. 434(7033):640-4.
- [110] Yazaki M, Shirakawa S, Okawa M, Takahashi K. Demography of sleep disturbances associated with circadian rhythm disorders in Japan. *Psychiatry and Clinical Neurosciences.* 1999. 53:267-8

7 Lebenslauf

8 Anhang

Tabellenverzeichnis

1	Klinik der untersuchten Narkolepsie Patienten	21
2	Zusammensetzung der Patienten- und Kontrollkollektive	21
3	Ansatz der Gradienten-PCR	23
4	Ansatz der Sequenzier-PCR	27
5	Ansatz der Verdaureaktion	28
6	Materialien und Geräte	29
7	Primer für CRY 1	30
8	Primer für CRY 2	31
9	Endonukleasen für den RFLP-Nachweis	31
10	Primer für den Restriktionsverdau	32
11	Ergebnisse der Mutationsanalyse von CRY 1 und 2 mit Kontrollen . .	34
12	zentraleuropäische Vergleichspopulation CEU [35]	35

Abbildungsverzeichnis

1	Modell für den molekularen Oszillator bei Säugetieren	17
2	DNA-Amplifikation durch PCR	24
3	Elektropherogramm von rs8192440 im Gen CRY 1	33