

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. B. Ringelstein –

**Genetischer Hintergrund des zentralen Schlafapnoe-Syndroms:  
Mutationsanalyse des Paired-like homeobox 2b-Gens**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät der

Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

**Olga Kogan**

aus Kirowograd, Ukraine

2011

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

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

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. P. Young
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. G. Kurlemann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2011

**Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Neurologie  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. B. Ringelstein –**

**Referent: Univ.-Prof. Dr. med. P. Young  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Kurlemann**

### **Zusammenfassung**

Kogan, Olga

#### **Genetischer Hintergrund des zentralen Schlafapnoe-Syndroms: Mutationsanalyse des Paired-like homeobox 2b-Gens**

Das paired-like homeobox 2b (PHOX2B)-Gen ist für die embryonale Entwicklung des autonomen Nervensystems verantwortlich. Es agiert als Transkriptionsaktivator der neuronalen Differenzierung und der Expression der Ausdifferenzierung von Motoneuronen. Außerdem inhibiert es die Expression von Hemmstoffen der Neurogenese. Es reguliert auch den noradrenergen Phänotyp in Wirbeltieren. Ein Ausfall von PHOX2B führt also zu Missbildungen im autonomen Nervensystem und zu einem Ungleichgewicht zwischen Sympathikus und Parasympathikus, welches sich, Tierexperimenten nach, schon im frühen postnatalen Stadium in Form von schweren Atemstörungen manifestiert. In vielen Studien wurden Mutationen in diesem Gen für krankheitsverursachend für das Kongenitale zentrale alveoläre Hypoventilationssyndrom (CCHS) sowie das Late onset zentrale Hypoventilationssyndrom (LO-CHS) befunden. Eine besonders wichtige Rolle spielte die Verlängerung des Polyalaninrepeats in Exon 3.

Die Aufgabe dieser Arbeit war nun, die kodierende Sequenz des paired-like homeobox 2b-Gens auf mögliche Sequenzveränderungen zu prüfen und auch anhand von zwei Patienten mit nachgewiesener primärer alveolärer Hypoventilation, einem Synonym für das LO-CHS, die vorherigen Studien zu bestätigen. Hierfür wurden 33 Probanden untersucht, von denen 18 die Diagnose CSA hatten. Weiterhin wurden 11 Patienten mit gemischtem SAS und 2 mit sekundärer alveolärer Hypoventilation hinzugenommen. Allen Probanden wurde venöses Blut abgenommen und daraus die DNA isoliert, die mithilfe direkter PCR-basierter Gensequenzierung auf Mutationen untersucht wurde.

In keiner Gruppe wurde eine Mutation festgestellt und auch die Repeatlänge befand sich im Normbereich. In Exon 3 wurde jedoch ein Polymorphismus mit der Referenznr.: rs17885864 in der Position c.870 gefunden, der zu einem Aminosäureaustausch p.P290P führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit der Nachweis erbracht, dass es in der vorliegenden Kohorte keine Assoziation zwischen Phox2B und weder dem zentralen noch dem gemischten Schlaf-Apnoe-Syndrom gibt.

Dies sollte in der molekulargenetischen Diagnostik entsprechende Bewertung finden.

Auch der Nachweis des Zusammenhangs mit dem LO-CHS war nicht erfolgreich, was einerseits darauf beruhen kann, dass nicht bei allen Patienten mit dieser Diagnose eine Sequenzänderung eintritt und dass andererseits die von uns untersuchte Patientengruppe zu klein war, um eine statistische Aussagekraft zu haben.

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2011

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:  
Genetischer Hintergrund des zentralen Schlafapnoe-Syndroms: Mutationsanalyse des Paired-  
like homeobox 2b-Gens

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):  
Universitätsklinikum Münster Klinik und Poliklinik für Neurologie der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

unter Anleitung von:  
Univ.-Prof. Dr. med. Peter Young

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Münster, den 06.04.2011

## **Widmung**

Diese Arbeit ist meinen Eltern und Alex gewidmet, die mir in jeder Lebenslage Beistand leisten.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>A. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
I.    Physiologie des Schlafes.....	1
II.   Physiologie der Atemregulation beim Gesunden.....	2
III.  Vorstellung und Pathogenese der Krankheiten.....	4
1.    Kongenitales zentrales alveoläres Hypoventilations-	
syndrom (CCHS).....	4
2.    Primäre alveoläre Hypoventilation.....	6
3.    Sekundäre alveoläre Hypoventilation.....	6
a)    Lungenparenchymerkrankungen, Veränderungen der Lungengefäße	
und Hämoglobinopathien.....	6
b)    Obstruktive Lungenerkrankungen.....	7
c)    Neuromuskuläre und Brustwand-Störungen.....	7
4.    Obstruktives Schlafapnoe Syndrom (OSAS).....	7
5.    Zentrales Schlafapnoe Syndrom (CSA).....	8
IV.   Therapie der CSA.....	11
V.    Definitionen und Klassifikationen der Schlaf-Apnoe.....	12
VI.   Diagnosestellung.....	13
VII.  CSA und Genetik.....	14
VIII. Die Rolle von Phox2B.....	16

<b>B. Fragestellung .....</b>	<b>21</b>
<b>C. Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
I.    Patientenkollektiv .....	22
II.   Blutentnahme und DNA-Isolierung.....	22
III.  Polymerasekettenreaktion .....	24
1.  Primer und PCR-Bedingungen .....	27
a)  Exon 1 .....	30
b)  Exon 2 .....	30
c)  Exon 3 .....	31
IV.   Agarosegelelektrophorese.....	32
V.    Aufreinigung der PCR-Produkte .....	33
1.  Aufreinigung mit MinElute PCR Purification Kit.....	33
a)  Verfahren und Vorgehensweise .....	33
b)  Vorgehen bei der Aufreinigung von Exon 3 .....	34
2.  Aufreinigung mit Millipore .....	35
VI.   Sequenzierungsreaktion nach Sanger .....	36
1.  Sequenzier-PCR.....	38
2.  Aufreinigung der Sequenzier-Produkte.....	39
VII.  Statistik .....	39
<b>D. Ergebnisteil.....</b>	<b>39</b>
I.    Klinik .....	40
1.  Geschlechterverteilung.....	43
2.  Alter.....	43
3.  BMI .....	44
4.  Schlafphasen.....	45
5.  Atmungsparameter .....	47
6.  Sauerstoffsättigung.....	48

7.	Prävalenz der Risikofaktoren für die Entwicklung eines CSAS .....	54
II.	Analyse ermittelter Sequenzvarianten .....	55
III.	Ergebnisse der Mutationsanalyse.....	55
<b>E.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
I.	Auswertung der erfassten Parameter .....	61
II.	Analyse der Risikofaktoren.....	63
III.	Auswertung der genetischen Analyse.....	63
IV.	Mögliche weitere Kandidatengene für das zentrale Schlafapnoe-Syndrom	66
1.	Kandidaten für die Atemkontrolle .....	66
2.	Kandidaten für Adipositas .....	70
3.	Kandidaten für den Schlaf.....	73
V.	Zusammenfassung und Ausblick.....	75
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>XIII</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
A	Adenin
A (bei SNP)	Alanin
Abb.	Abbildung
ADRB3	<i>β-adrenergic rezeptor 3</i>
AF	Atrial fibrillation
AHI	Apnoe-Hypopnoe-Index
AI	Apnoeindex
ANS	Autonomes Nervensystem
Arg	Arginin
ASV	Adaptive Servo-Ventilation
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BiPAP	<i>Bilevel positive airway pressure</i>
BMI	<i>Body mass index</i>
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CCHS	Kongenitales zentrales alveoläres Hypoventilationssyndrom
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cl	Chlorid
CLOCK	<i>circadian locomotor output cycles kaput gene</i>
CMT	Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung
CPAP	<i>Continuous positive airway pressure</i>
CREB	<i>cyclic adenosine monophosphate response element binding protein</i>
CSA	zentrales Schlafapnoe Syndrom
CSB	<i>Cheyne-Stokes breathing</i>
dbSNP	<i>database single nucleotide polymorphism</i>
ddNTP	Didesoxy-Nukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease (Enzym)

dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
ECE-1	<i>endothelin converting enzyme 1</i>
EEG	Elektroenzephalographie
EGR-2	<i>early growth factor 2</i>
EKG	Elektrokardiographie
EMG	Elektromyogramm
EOG	Elektrookulogramm
ET-1	Endothelin-1
FTO	<i>fat mass and obesity associated gene</i>
g	Gramm
G	Guanin
G (bei SNP)	Glycin
GABRB1	<i>γ-aminobutyric acid receptor β1-gene</i>
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GS	Gegenstrang
GSAS	Gemischtes Schlafapnoe Syndrom
h	Stunde
HCRT	Hypocretin-Gen
HMSN	Hereditäre motorische und sensible Neuropathie
Hox	Homeobox
hPER2	<i>human period 2 peptide</i>
HPLC-H <sub>2</sub> O	<i>high performance liquid chromatography</i> Wasser
ICSA	Idiopathisches zentrales Schlafapnoe Syndrom
JAK/STAT	Janus-Kinase
kg	Kilo (als Vorsatz von SI-Einheiten 10 <sup>3</sup> )
l	Liter
LJ.	Lebensjahr
LO-CHS	<i>Late-onset central hypoventilation syndrome</i>
M	Mol
m	Milli (als Vorsatz von SI-Einheiten 10 <sup>-3</sup> )
MC4R	Melanocortin 4 Rezeptor
MCH	Melanin-konzentrierendes Hormon

Mg	Magnesium
min	Minute
MSH	<i>anorexigenic factor <math>\alpha</math>-melanocyte stimulating hormone</i>
MSLT	Multipler-Schlaf-Latenz-Test
MUT	Mutation
NonREM	nicht <i>rapid eye movment</i>
ODI	<i>oxygen desaturation index</i>
OHS	<i>obesity hypoventilation syndrome</i>
OSAS	obstruktives Schlafapnoe Sndrom
p	Piko (als Vorsatz von SI-Einheiten 10 <sup>*</sup> -12)
P	Primer
P(bei SNP)	Prolin
p.a.H.	primäre alveoläre Hypoventilation
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCSK1	Prohormone-Konvertase 1/3
pFRG	parafaziale respiratorische Gruppe
Phox2B	<i>paired-like homeobox 2b</i>
POMC	Pro-Opiomelanokortin
PSG	Polysomnographie
REM	<i>rapid eye movement</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTN	retrotrapezoider Nukleus
S	Strang
s.a.H.	sekundäre alveoläre Hypoventilation
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
SIDS	<i>Sudden infant death syndrome</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA

TSNS	Tumoren des sympathischen Nervensystems
™	geschützte eingetragene Warenzeichen ( <i>registered trademark</i> )
U	Einheit ( <i>unit</i> )
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-H <sub>2</sub> O	vollentsalztes Wasser
W	Watt
w/v	Gewicht/Volumenverhältnis
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ	Mikro (als Vorsatz von SI-Einheiten 10 <sup>-6</sup> )

## A. Einleitung

### I. Physiologie des Schlafes

Während des Schlafes ändern sich die Aktivitäten des Körpers, um dem Organismus Erholung zu gewährleisten. Zu den charakteristischen Veränderungen gehören verringerte Aufnahmebereitschaft und sinkender Muskeltonus. Insgesamt dominiert der Parasympathikus. Die Atmung ist vertieft und unregelmäßig mit periodischen Schwankungen. Es können Atempausen von mehr als 10s auftreten, was zu einem Abfall des Sauerstoffpartialdrucks führt. Auch die Schlaftiefe ändert sich und mit zunehmender Tiefe vermindert sich der Atemtrieb, was einen Anstieg des CO<sub>2</sub>-Partialdrucks zur Folge hat.

Physiologischerweise können aufeinander folgende Schlafstadien unterschieden werden. Ihre Einteilung erfolgt nach Elektroenzephalographie-Aktivität (EEG) und Elektrookulogramm (EOG). Beide Verfahren können, ohne den Schlaf zu stören eingesetzt werden.

Beim wachen Menschen herrschen  $\beta$ -Wellen vor. Sobald aber die Augen geschlossen werden und Entspannung eintritt, werden  $\alpha$ -Wellen registriert, die beim Einschlafen von  $\theta$ -Wellen abgelöst werden.

Beim Schlaf selbst unterscheidet man zwischen sogenanntem orthodoxen und paradoxen Schlaf. Beim ersteren, der auch als „*slow-wave-sleep*“ bezeichnet wird, nimmt die EEG-Frequenz immer mehr ab. Der orthodoxe Schlaf lässt sich in vier Stadien einteilen:

Im ersten, dem Einschlafstadium sind  $\beta$ -Wellen geringer Amplitude und  $\theta$ -Wellen zu registrieren. Die Klarheit des Bewusstseins lässt immer mehr nach und es können Träume auftreten. Oft kommt es auch zu langsamen Bewegungen der Augäpfel und Zuckungen der Lider. In diesem Stadium kann man sehr leicht geweckt werden.

Das zweite Stadium ist der leichte Schlaf. Dieser tritt ca. 10-15min nach dem Zubettgehen zum ersten Mal auf. Hier zeigen sich im EEG sogenannte Schlafspindeln, rasche Potentialschwankungen, deren Amplituden spindelförmig an- und abschwellen. Außerdem können K-Komplexe auftreten. Dies sind bi- oder polyphasische Komplexe, die ähnlich den Schlafspindeln ca. 1s dauern und hohe Amplituden besitzen. Sie stehen für synchrone neuronale Aktivität.

In den Stadien drei und vier nimmt die Schlaftiefe immer mehr zu, was dazu führt, dass die Weckschwelle immer höher wird und ihr Maximum nach ca. einer Stunde erreicht, um

dann wieder abzunehmen. Diese Stadien sind durch K-Komplexe,  $\theta$ - und  $\delta$ -Wellen gekennzeichnet. Diese sind hochamplitudige ( $>100\mu\text{V}$ ), aber langsame ( $\theta$ - 4-7 Hz,  $\delta$ -Wellen 0,5-4 Hz) Wellen.

Nach dem Durchlauf des Tiefschlaf-Stadiums findet der Übergang in den paradoxen Schlaf statt, der als „*fast-wave-sleep*“ bezeichnet wird, weil seine EEG-Ableitungen paradoxerweise an die eines wachen Menschen erinnern. In dieser Phase ist praktisch kein Muskeltonus mehr vorhanden. Es treten jedoch kurze Zuckungen, besonders der Gesichtsmuskulatur auf. Kennzeichnend für diesen Schlaf sind sekundendauernde, richtungslose, 1,4 Hz schnelle Augenbewegungen, die als „*Rapid Eye Movements (REM)*“ bezeichnet werden, weswegen diese Art von Schlaf auch REM-Schlaf heißt, im Gegensatz zum orthodoxen Schlaf, der als Non-REM-Schlaf bezeichnet wird. Während des REM-Schlafes kann eine Erhöhung von Herzfrequenz und Blutdruck vermerkt werden, was zu einer Atmungsbeschleunigung und verbesserten Durchblutung führt. Besonders charakteristisch für diese Phase ist das Auftreten von Träumen. Der Anteil des REM-Schlafes ändert sich mit dem Alter des Menschen. Beim Neugeborenen liegt er noch bei 50% und sinkt bis zum 5. LJ. auf 20%. Aufgrund dieser Verteilung wird vermutet, dass dieser Schlaf besonders wichtig für die ontogenetische Entwicklung des ZNS ist.

Normalerweise werden die vier Stadien und der REM-Schlaf 3-5 Mal durchlaufen, wobei ein Zyklus 90-100min dauert. Die ersten beiden Zyklen sind besonders wichtig für die Erholung, weswegen sie als Kernschlaf zusammengefasst werden. Die folgenden Zyklen werden als Füllschlaf bezeichnet, denn die maximale Schlaftiefe nimmt immer mehr ab und der Anteil des REM-Schlafes immer mehr zu. Dieser Schlaf ist nicht überlebenswichtig.

## **II. Physiologie der Atemregulation beim Gesunden**

Die Regulation der Atmung erfolgt beim Gesunden über die Medulla oblongata. Deren Signale werden über die Spinalnerven und die Nn. phrenici an die Atemmuskulatur inklusive Diaphragma geleitet. Der Regelkreis des Atemantriebs wird über die von Chemorezeptoren des Gehirns und der Glomerula carotica empfangenen Messwerte von pH,  $\text{pCO}_2$  und  $\text{pO}_2$  gesteuert. Besonders empfindlich reagiert die Atmung auf eine Hyperkapnie, worauf Atemfrequenz und -zugvolumen gesteigert werden. Jedoch haben Werte über

70mmHg, genauso wie Hypokapnie und Alkalose, bei nicht adaptierten Personen, eine atemlähmende Wirkung (Ullrich 2005: Intensivpflege und Anästhesie). Bei einer chronischen Hyperkapnie findet eine Adaptation und Hochregulation statt, so dass es zu verstärkten Atemexkursionen kommt.

Im Schlaf, hier besonders in der REM-Phase, kommt es zu stärkeren Atemschwankungen, die mit respiratorischen Pausen und Gasdruckänderungen einhergehen. Einerseits entsteht dieser Zustand durch die direkte Wirkung des Schlafes auf das Atemzentrum und andererseits durch den erhöhten Widerstand der oberen Atemwege, deren Muskeltonus im Schlaf erschlafft, so dass sie kollabieren. Normalerweise kommt es dabei beim Gesunden zu keiner körperlichen Einschränkung. Endexpiratorischen CO<sub>2</sub>-Werte lassen sich jedoch auch im Normalzustand für die Ermittlung der Schlaftiefe nutzen.

**Tab. 1:** Atmungsparameter während des Schlafes

Parameter	REM	NREM
Atemrhythmus	unregelmäßig, mit/ohne Apnoe	periodisch, regelmäßig
arterielle O <sub>2</sub> -Konzentration	↓↓	↓ (3-10 mmHg)
arterielle CO <sub>2</sub> -Konzentration	↑↑	↑ (2-8mmHg)
alveoläre Ventilation	↓↓	↓
Atemvolumen	↓↓	↓
hypoxische Atemantwort	↓↓	↓
hyperkapnische Atemantwort	↓↓	↓
O <sub>2</sub> -Verbrauch	↓	↓↓ (15-25%)
Widerstand der oberen Atemwege	↑↑	↑

In Anlehnung an Deetjen 2005: Physiologie

Die sogenannten schlafbezogenen Atmungsstörungen lassen sich in obstruktive und nicht obstruktive Störungen einteilen. Die von uns ausgesuchten Patientengruppen mit dem zentralen Schlaf-Apnoe Syndrom (CSA), dem kongenitalen zentralen alveolären Hypoventilationssyndrom (CCHS) und der primären und sekundären alveolären Hypoventilation gehören zu den nicht obstruktiven Erkrankungen. Das gemischte Schlafapnoe Syndrom umfasst beide Gruppen.

### **III. Vorstellung und Pathogenese der Krankheiten**

Hierbei möchte ich besonders auf das CCHS und das CSA eingehen, denn durch das Erste lässt sich die Funktion des PHOX2B besonders gut darstellen und das Zweite ist das Hauptthema dieser Arbeit (in Anlehnung an ICSD 2005 und Lund und Clarenbach 1992).

#### **1. Kongenitales zentrales alveoläres Hypoventilationssyndrom (CCHS)**

Das CCHS ist eine seltene, noch wenig erforschte Krankheit, von der weltweit ca. 160-180 Patienten betroffen sind, deren Mehrheit von Männern gebildet wird. Die Inzidenz beträgt 1/200000 Lebendgeburten (Amiel et al. 2009).

Die Diagnosekriterien wurden 1999 von Weese-Mayer et al. etabliert: 1) Persistierende zentrale Hypoventilation ( $\text{PaCO}_2 > 60\text{mmHg}$ ), festgestellt mittels einer Polysomnographie im Schlaf während der Patient spontan Raumluft atmet; 2) Ausfall einer adäquaten Atemantwort auf eingeatmetes  $\text{CO}_2$ ; 3) Abwesenheit von primären Lungen-, neuromuskulären oder Herzerkrankungen.

Die Ätiologie beruht vermutlich auf dem Versagen der zentralen Chemorezeptoren, deren Funktionsfähigkeit sich bei den betroffenen Patienten vor allen Dingen mit dem Übergang ins Schlafstadium reduziert, womit der Atemantrieb ausfällt, was zu periodischer Hypoventilation führt. Charakteristischerweise wird die Erkrankung schon in der Kindheit augenscheinlich, bei den meisten Betroffenen schon bei der Geburt, wenn die Spontanatmung fehlt oder das Neugeborene nur unterbrochen atmet. Wegen dieses perinatalen Auftretens und dem damit verbundenen möglichen plötzlichen Kindestod (SIDS), wird das CCHS auch als Undine-Syndrom bezeichnet (Gaultier et al. 2004). Kennzeichnend ist, dass die Betroffenen keine Abnormalitäten in Lunge oder Gehirn aufweisen. Die besondere Gefahr bei Kindern ist auch, dass diese keine Zeichen von Atemnot zeigen, so dass die Beschwerden oft erst gemerkt werden, wenn es zum plötzlichen Herztod oder schwerer Dekompensation kommt.

Die Symptome des LOCHS und des CCHS sind Hypoventilation im Wachzustand und/oder im Schlaf, wobei das CCHS sich insofern von anderen Schlafatemstörungen unterscheidet, als dass die Beschwerden während der Non-REM- Phase zunehmen, so dass ein Aufwachen häufig nicht möglich ist (Gaultier et al. 2004). Die sich verstärkenden Hypoxie und Hyperkapnie führen schließlich zu häufigen Arousals, was die Schlafqualität

erheblich beeinträchtigt, so dass viele Patienten über Tagesmüdigkeit und morgendliche Kopfschmerzen klagen. Die Episoden flacher Atmung dauern über 10sec. In diesen Phasen kann eine Brady-oder Tachykardie vermerkt werden. Ödeme und Lethargie können frühe Anzeichen der Atemstörung sein. Das Hauptmerkmal bleibt jedoch unumstritten die verminderte kongenitale Chemosensitivität mit fehlender Atemantwort auf Hyperkapnie (Gaultier et al. 2004).

Labormedizinisch lassen sich im Schlaf abnormale arterielle Gase messen. Es sind auch eine kompensierte respiratorische Azidose, Polycytämie und ein erhöhter Bikarbonatspiegel zu vermerken.

Bildgebende Verfahren des Kopfes zeigen keine Abnormalitäten, was auch darauf beruhen kann, dass die Technik noch nicht ausreichend entwickelt ist. Es lässt sich eine pulmonale Hypertension sowie ein damit verbundenes Cor pulmonale feststellen. Lungenfunktions-tests sind weitgehend unauffällig.

Die Patientengruppen sind heterogen, da die Hypoventilationszeitpunkte unterschiedlich sind und auch die möglichen begleitenden Erscheinungen, wie Morbus Hirschsprung (Agangliose des Darms), autonome Dysfunktion des Herzens, neurale Tumoren (wie z.B. Neuroblastoma, Ganglioneuroblastoma und Ganglioneuroma), Schluckstörungen und mentale Retardierung, wenn die Behandlung in Form einer Beatmung nicht früh genug einsetzt, variieren (Trochet et al. 2005).

Nachgewiesen ist eine genetische Ursache, die in Mutationen des stark konservierten PHOX2B-Gens auf Chromosom 4p12, das für die embryonale Entwicklung des autonomen Nervensystems von Bedeutung ist, liegt. Das Gen agiert als Transkriptionsaktivator der neuronalen Differenzierung. Außerdem inhibiert es die Expression von Hemmstoffen der Neurogenese. Es reguliert auch den noradrenergen Phänotyp in Wirbeltieren. Ein Ausfall von PHOX2B führt also zu Missbildungen im autonomen Nervensystem und zu einem Ungleichgewicht zwischen Sympathikus und Parasympathikus (Amiel et al. 2003).

Die meisten Mutationen finden sich in Exon 3. Besonders charakteristisch ist eine Verlängerung des Alanin-Repeats auf Position 25-33 Wiederholungseinheiten. Diese Veränderung ist meiosestabil und wird autosomal dominant, aber mit unterschiedlicher Penetranz vererbt, was erklären würde, warum die Fälle meistens einzeln auftreten (Trochet et al. 2008).

## **2. Primäre alveoläre Hypoventilation**

Eine möglicherweise andere Form der CCHS ist das *Late-onset*-CHS, das erst im späteren Lebensverlauf auftritt, aber dieselbe Symptomatik aufweist. Der Zusammenhang wird durch die Ähnlichkeit der Symptomatik und durch vererbare PHOX2B-Mutationen hergestellt, die jedoch nicht immer symptomatisch werden (Weese-Mayer et al. 2005). Das LO-CHS wird von manchen Wissenschaftlern, wie z.B. in Katz et al. 2000 beschrieben, als eine andere Entität des CCHS, vorstellig mit einer anderen Klinik und vergesellschaftet mit einer Hypothalamus-Dysfunktion, betrachtet. Aufgrund dieser Meinungsverschiedenheiten bleibt der Zusammenhang, bis auf die Tatasche der manchmal vorliegenden Mutationen, ungeklärt (Trochet et al. 2004).

## **3. Sekundäre alveoläre Hypoventilation**

Das Kennzeichnende dieser Erkrankungen ist das Vorliegen einer Reduktion oder Störung des Gasaustauschs über die Alveolarmembran:

### **a) Lungenparenchymerkrankungen, Veränderungen der Lungengefäße und Hämoglobinopathien**

Es findet eine Hämoglobin-Entsättigung statt. Die besondere Unterscheidung zu CSA und OSAS sind konstante, mehrere Minuten andauernde Hypoventilation und Hypoxämie. Bei CSA und OSAS kommt es dagegen zu periodischen, kurzen Änderungen der Sauerstoffsättigung.

Diese Patienten haben ein erhöhtes Risiko für arterielle Hypertonie, Cor pulmonale und neurokognitive Dysfunktion.

### **b) Obstruktive Lungenerkrankungen**

Dies führt zu heterogener Ventilationsverteilung in der Lunge mit minder- und überbelüfteten Abschnitten. Die charakteristischen Krankheiten werden im Terminus COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung) zusammengefasst. Hierbei handelt es sich um chronische Bronchitis und Lungenemphysem. Die wichtigsten auslösenden Faktoren sind Rauchen, arbeitsbedingte Stäube sowie Dämpfe und Alpha1-Antitrypsin-Mangel.

Mukoviszidose gehört auch zu den Faktoren, die den Atemwiderstand erhöhen. Während der Körper im Wachzustand die Hypoxämie noch zu kompensieren vermag, sinken im Schlaf die Chemosensitivität und die Atemmuskelaktivierung, so dass der Zustand nicht mehr ausgeglichen werden kann.

#### **c) Neuromuskuläre und Brustwand-Störungen**

Dies führt zum Versagen der Atemantriebspumpe, so dass nicht adäquat ein- und ausgeatmet werden kann und es zu Hypoxämie und Hyperkapnie kommt.

Zu den genannten Störungen führen Erkrankungen wie z.B. Diaphragmaparalyse, Myasthenia gravis, Lambert-Eaton Syndrom und Verletzungen des Rückenmarks. Auch Myopathien und Motoneuronerkrankungen können auslösende Faktoren sein.

#### **4. Obstruktives Schlafapnoe Syndrom (OSAS)**

Diese Störung ist das häufigste SAS. Die Prävalenz beträgt unter Männern 3-7%, unter Frauen 2-5% (Caylak 2009). Die direkte Ursache des OSAS ist die Obstruktion der oberen Atemwege, die auf verschiedenen Wegen zustande kommen kann. Ein Grund ist die Entspannung der Muskulatur der oberen Atemwege während der Schlafphase. Dadurch kann dem bei der Inspiration entstehenden Unterdruck kein Widerstand entgegengesetzt werden, so dass der Rachen kollabiert und zu einem Hindernis wird, was als Schnarchgeräusch wahrgenommen werden kann. Dadurch kommt es zu wiederholten über 10sec andauernden Apnoen, welche eine Hypoxämie zur Folge haben. Diese wiederum führt zu einem Weckstimulus, um die Atmung wieder herzustellen.

Komplikationen sind kardiopulmonale Erkrankungen, wie schon beschrieben, Tagesmüdigkeit und Konzentrationsstörungen. Zusätzlich können auch Depressionen, Stresserkrankungen wie Magenerkrankungen, Diabetes mellitus und Impotenz auftreten.

Risikofaktoren sind metabolisches Syndrom (d.h. Adipositas, Diabetes mellitus und Hypertonie), Alkohol und Nikotinkonsum, Polypen und Nasenscheidewandkrümmungen, vergrößerte Tonsillen, konstitutionelle Veränderungen der Muskulatur der oberen Atemwege, Fehlbildungen und -Stellungen des Unterkiefers und Weichteilvergrößerung durch z.B. Akromegalie (Volgin et al. 2006, Jean-Louis et al. 2008, Redline et al. 2000).

## 5. Zentrales Schlafapnoe Syndrom (CSA)

Das CSA ist eine Störung, von der meistens ältere Patienten betroffen sind. Die Prävalenz ist 5% unter allen Patienten mit Schlafapnoen (Mayo Klinik 2009). In einigen Krankheitsgruppen scheint jedoch eine höhere Prädisposition vorzuliegen. So haben Eckert et al. (2007) festgestellt, dass 37% aller Patienten mit Linksherzversagen und linksventrikulärer Ejektionsfraktion  $<45\%$  die Diagnose CSA aufweisen, wobei hier auch Patienten mit Cheyne-Stokes-Atmung hinzugerechnet wurden.

Die Ätiologie der Erkrankung ist bei dem idiopathischen CSA (ICSA) unbekannt. Das typische Charakteristikum sind wiederholte Atemunterbrechungen, besonders während des Übergangs in den Non-REM-Schlaf, ohne dass der auftretende Atemstillstand einen Atemantrieb auslösen würde. Der Wechsel von Unterbrechung und Wiedereinsetzen der Atmung führt zu Schlafstörungen und häufigen Arousels. Dies hat zur Folge, dass die Betroffenen an ausgeprägter Tagesmüdigkeit und nächtlichen Durchschlafstörungen leiden (Eckert et al. 2007). Während des Wachzustandes neigen die Patienten dazu, niedrige PaCO<sub>2</sub>-Werte zu haben (unter 40mmHg). Während des Schlafes kann es zu Sauerstoffsättigungen von 70% kommen.

Typische Symptome, die beobachtet werden können sind: 1) Episoden unterbrochener oder gestörter Atmung im Schlaf, 2) Plötzliche Arousels, begleitet von Kurzatmigkeit, 3) Kurzatmigkeit, die eine Besserung beim Aufsetzen zeigt, 4) Schlaflosigkeit (Insomnie), 5) Tagesschläfrigkeit (Hypersomnie), 6) Konzentrationsschwäche und 7) Schnarchen (Mayo Klinik 2009).

Es gibt einige Faktoren, die als prädisponierend diskutiert werden und entsprechend derer die CSA in Subgruppen aufgeteilt wird:

Zum einen wäre das eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Sensibilität der Chemorezeptoren, die dazu führt, dass niedrige arterielle PaCO<sub>2</sub> unter der PaCO<sub>2</sub> Apnoe-Schwelle ein Sistieren des Atemantriebs hervorrufen. Da sich die Drücke auch schon im Wachzustand nahe dieser Schwelle bewegen, reicht eine minimale Hyperventilation, die ja zu einer Hypokapnie führt, schon aus, um einen Atemstillstand zu provozieren (Eckert et al. 2007).

Insomnie ist auch ein Umstand, der CSA begünstigen kann, da instabiler Schlaf mit wiederholten Unterbrechungen zu Störungen der Atemregulation führen kann. Eine niedrige Arouschwelle kann ein wichtiger prädisponierender Faktor sein (Eckert et al. 2007).

Ein anderer diskutierter Faktor sind neurologische Störungen wie z.B. Multisystem-Atrophien oder Morbus Parkinson, da diese ebenfalls eine Dysfunktion des autonomen Systems zur Folge haben können.

Gesundheitliche Störungen, wie vorangegangene Schlaganfälle, Tumoren, Encephalitiden und Traumata des Gehirns, aber auch Nieren- und Herzschäden können eine CSA hervorrufen. Patienten mit Linksherzversagen, aber auch, wenn nicht sogar besonders, Vorhofflimmern, neigen sehr stark zur Entwicklung eines CSA (Mayo Klinik 2009). Bei Patienten mit Herzerkrankungen tritt besonders oft die sogenannte Cheyne-Stokes Atmung (CSB) auf, die durch Periodizität und länger anhaltende Zyklen (60-90sec) der Atemstörung gekennzeichnet ist (Yumino et al. 2008). Diese erhöhte Dauer liegt an der verlängerten Zirkulation beim Herzversagen (Eckert et al. 2007).

Übergewicht, sowie das metabolische Syndrom an sich, spielt wie beim OSAS, auch hier eine wichtige Rolle. Da die Tendenz global steigt, ist auch eine Zunahme an dem so genannten *obesity hypoventilation syndrome* (OHS) zu vermerken. Das OHS wird bei einem BMI  $>30\text{kg/m}^2$  und einer Hyperkapnie im Wachzustand  $>45\text{mmHg}$  diagnostiziert (Eckert et al. 2007).

Auch das Geschlecht spielt eine Rolle, denn wie auch beim OSAS, sind Männer öfter betroffen (Mayo Klinik 2007).

Auch Medikamente und Drogen, insbesondere Opiate, die länger als zwei Monate eingenommen wurden, sind ein wichtiger Entstehungsgrund. Hierbei kommt es zur Atemdepression aufgrund der Interaktion der Stoffe mit den  $\mu$ -Rezeptoren auf der Vorderseite der Medulla oblongata (Eckert et al. 2007, Aktories 2005: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie).

Zentrale Apnoen treten auch im Rahmen einer wegen eines OSAS eingeleiteten CPAP-Therapie auf. Dieses Phänomen wird dann als komplexes SAS bezeichnet und gleichfalls in dieser Arbeit behandelt. Javaheri et al. (2009) schreiben in ihrer Arbeit, dass 6,5% aller CPAP-Patienten ein CSA entwickeln. Meistens eliminierte sich dieses Phänomen selbst ca. 8 Wochen nach Therapieschluss, doch in 1,5% persistierte es. Die Risikofaktoren hierfür waren die Schwere des OSAS und eine vorherige Opioidbehandlung.

Eine andere Form der CSA ist die primäre Schlafapnoe bei Kindern. Hierbei sind insbesondere Frühgeborene betroffen, bei denen Atemregulationsmechanismen im zentralen Antrieb, Chemo- und Mechanorezeptoren und den oberen Atemwegreflexen noch nicht voll ausgebildet sind. Begünstigende Faktoren sind dabei Temperaturinstabilität, gastroösophagealer Reflux, Stoffwechselstörungen, Infektionen, Abnormalitäten im Kopfbereich, aber auch Medikamenten- und Anästhesiegabe sowie falsch eingestellte Oxygenierung. Solche Kinder neigen zu verschiedenen Apnoen und das CSA macht 10-25% davon aus. Besonders Babys mit einem Gewicht unter 2000g sind prädisponiert. Bei Kindern tritt CSA überwiegend im REM-Schlaf auf. Die Episoden dauern nicht länger als 20sec und sind nicht vergesellschaftet mit Bradykardie oder Sauerstoffentsättigung.

Da bei dieser Schlafstörung der Erwachsenen im Gegensatz zu anderen, nur selten Hypoxie und Hyperkapnie auftreten, kommt es auch seltener zu den dafür typischen kardiopulmonalen Komplikationen. In den 10sec oder länger andauernden Apnoe-Phasen kommt es zu einer leichten O<sub>2</sub>-Entsättigung. Nichtsdestotrotz ist das Risiko für Schlaganfälle und Herzversagen erhöht (Eckert et al. 2007, Mayo Klinik 2009). Der Grund dafür sind plötzliche Abfälle der arteriellen Sauerstoffsättigung, die zu einer Hypertension und Beanspruchung des kardiovaskulären Systems führen.

Wie schon erwähnt, gibt es auch seltene Fälle der CSA, bei denen sich keine Ursache feststellen lässt. Diese werden dann als idiopathisch bezeichnet (ICSA).

Als letzte Prädisposition darf auch der normale physiologische Zustand beim Gesunden nicht vergessen werden. Beim Aufenthalt in großer Höhe (>4572m) treten bei den meisten Menschen aufgrund der verringerten Atemgasdrücke und der dadurch bedingten Hypoxie,

zentrale Schlafapnoen auf. Diese verschwinden dann beim Zurückkehren zu den gewohnten Bedingungen (Mayo Klinik 2009).

Das CSA wird in zwei große Gruppen aufgeteilt: Die hyperkapnische und die hypo- bzw. eukapnische. Patienten mit beeinträchtigter expiratorischer Kapazität neigen dazu hyperkapnisch zu werden. Während des Schlafes verschlimmert sich dieser Zustand aufgrund von physiologischen, schon beschriebenen, Änderungen. Somit kommt es zu einer schlafbedingten Hypoventilation, die das Leitsymptom der hyperkapnischen CSA darstellt. Zu dieser Kategorie gehören Tumor-, Trauma- oder Schlaganfall bedingte Läsionen, CCHS, Opiod bedingte Atemdepression, OHS, neuromuskuläre Störungen, aber auch Kyphoskoliose und Thoraxwunderkrankungen. Die zweite, nicht hyperkapnische Kategorie beinhaltet die Cheyne-Stokes Atmung und das ICSA (Eckert et al. 2007).

**Tab. 2:** Zusammenstellung der Risikofaktoren für CSA

<b>Risikoparameter für CSA</b>
Metabolisches Syndrom
Chronisches Nierenversagen
Herzversagen, Vorhofflimmern
Opiate
Schlaganfall
Encephalitis
Hirnstammtumor
Neuromuskuläre Erkrankungen
Kyphoskoliose
Schädel-Hirn-Trauma

#### **IV. Therapie der CSA**

Die primäre Therapie besteht in der Ursacheneleminierung, d.h. in der Therapie der jeweiligen Grunderkrankung und nach Möglichkeit, in einer Medikamentenumstellung bei Opioiden. Als Medikamente kann man Atemstimulanzien wie z.B. Acetazolamide und Theophylline verabreichen (Eckert et al. 2007).

Als nächste Möglichkeit steht die nichtinvasive, nämlich die Maskenbeatmung zur Verfügung. Dabei gibt es verschiedene Alternativen. *Continuous positive airway pressure* (CPAP) wird auch in der Therapie von OSAS gebraucht und erzeugt einen kontinuierlichen positiven Druck auf die oberen Atemwege, wodurch sie offengehalten werden. *Bilevel positive airway pressure* (BiPAP) erzeugt einen höheren Druck bei der Inspiration und einen geringeren bei der Expiration. Der Vorteil dabei ist, dass die abgeschwächte Atmung beim CSA gestärkt wird. Die dritte und letzte Möglichkeit ist die Adaptive Servo-Ventilation (ASV), welche für die Behandlung von zentralem und komplexem SAS eingesetzt wird. Dabei wird die Atmung durch einen Computer überwacht, der durch Druckausübung das Atemmuster reguliert und die ggf. auftretenden Apnoen verhindert (Mayo Klinik 2009).

## V. Definitionen und Klassifikationen der Schlaf-Apnoe

**Apnoe:** Synonym: Atemstillstand. Verminderung des Atemflusses auf max. 20% des vorherigen Atemflusses für mehr als 10sec Dauer. Dabei kommt es zu einem Sättigungsabfall von mehr als 4%. In den Einschlafphasen, während der REM-Phasen und nach Körperbewegungen sind Apnoen auch bei gesunden Personen möglich.

**Hypopnoe:** Verminderung des Atemstromes über Mund und Nase für mehr als 10sec Dauer um 50% oder Verminderung des Atemstromes geringeren Ausmaßes, verbunden mit einem Abfall der O<sub>2</sub>-Sättigung  $\geq 4\%$  oder einem Arousal.

**Apnoe-Hypopnoe-Index(AHI):** Anzahl der Apnoe- und Hypopnoephasen pro Stunde Schlaf.

**Apnoe-Index (AI):** Anzahl der Apnoen pro Stunde Schlaf

**Zentrale Apnoe:** Falls die Apnoekriterien erfüllt sind und gleichzeitig keine Atmungsanstrengung während der Dauer des nicht vorhandenen Luftflusses besteht

**Sauerstoff-Entsättigungsindex (ODI):** Anzahl der Sauerstoffentsättigungen pro Stunde Schlaf

**Schlafapnoe Syndrom:** Schlafapnoe mit kardiozirkulatorischen oder zentralnervösen Folgerscheinungen

## VI. Diagnosestellung

Um den Verdacht CSA äußern zu können, muss der Patient über entweder Schlaflosigkeit oder auch extreme Tagesschläfrigkeit und über regelmäßige Episoden von nächtlichen Atemabschwächungen – und/oder Unterbrechungen berichten. Es reicht auch, wenn diese Befunde von Außenstehenden beobachtet werden. Außerdem können im Schlaf Auffälligkeiten wie plötzliches Husten, Schnarchen, abrupte Körperbewegungen oder zyanotische Hautverfärbung auftreten.

Um die Verdachtsdiagnose zu bestätigen, muss eine polysomnographische Untersuchung (PSG) im Schlaflabor durchgeführt werden, wobei unterschiedliche Parameter während der Schlafphasen kontinuierlich registriert werden. Zum einen werden mittels der Elektroenzephalographie (EEG) die Hirnströme des Patienten gemessen, die die Identifizierung des jeweiligen Schlafstadium ermöglichen. Das Elektrookulogramm (EOG) dient dazu, die Augenbewegungen zu registrieren. Mit dem Elektrokardiogramm (EKG) wird die Herzaktivität überwacht. Mittels Bauch- und Beingurten, die mit piezoelektrischen Sensoren versehen sind, werden thorakale und abdominelle Atemexkursionen erfasst. Die Sauerstoffsättigung des Blutes wird mithilfe der Pulsoxymetrie gemessen und die Ergebnisse der kapnographischen Atemflussmessung zeigen die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der endexpiratorischen Luft an und dienen dazu, die Apnoe- und Hypopnoe-Phasen zu detektieren. Parallel werden auch noch Blutdruck, Temperatur, der Magensäurerückfluss gemessen und eventuelle Erektionen registriert. Um ggf. später Atemmasken zu verschreiben, wird zusätzlich noch ein Maskendruck gemessen. Vom schlafenden Patienten wird dabei eine Video- und Tonaufnahme angefertigt, auf der man das Schlafverhalten, insbesondere auch Beinbewegungen, die auch mit der *Musculus-tibialis-anterior*-Myographie abgeleitet werden, und die Körperlage nachverfolgen kann.

Ab einem Apnoe-Index (AI) >5/h und bei Vorliegen einer entsprechenden Symptomatik spricht man von Schlafapnoe-Syndrom. Der AI wird definiert als die Zahl der Apnoen pro Stunde Schlaf. Um die Diagnose CSA bestätigen zu können, muss das PSG Apnoe-Phasen von über 10sec zeigen und zusätzlich dazu ständige Arousals, Bradytachykardie und/oder

Sauerstoffentsättigung aufweisen. Außerdem muss der Anteil der zentralen Apnoen >50% betragen. Eine zentrale Apnoe wird definiert als eine Atempause, bei der die Apnoekriterien erfüllt sind und gleichzeitig keine Atmungsanstrengung während der Dauer des nicht vorhandenen Luftflusses besteht.

Der Multiple-Schlaf-Latenz-Test, der die Zeit bis zum Einschlafen und Beginn des REM-Schlafes misst, kann möglicherweise eine Schlaflatenz von unter 10 Minuten zeigen (ICSD 2005). Ein Schlaf-Latenz-Test, PSG miteinbegriffen, wird für die Beurteilung übermäßiger Tagesschläfrigkeit durchgeführt.

**Tab. 3:** Einteilung nach AHI und AI

Apnoe-Hypopnoe-Index 10-20 =	leichtgradige Schlafapnoe
Apnoe-Hypopnoe-Index 20-40 =	mittelgradige Schlafapnoe
Apnoe-Hypopnoe-Index > 40 =	schwergradige Schlafapnoe
Apnoeindex 5 - 10	= leichtgradiges Schlafapnoe-Syndrom
Apnoeindex 10 - 20	= mittelschweres Schlafapnoe-Syndrom
Apnoeindex > 20	= schwergradiges Schlafapnoe-Syndrom

<http://www.schlafapnoezahnmedizin.de/schlafap.html>

## VII. CSA und Genetik

Bezüglich der Genetik des zentralen Schlafapnoe Syndroms liegen noch keinerlei Studien vor. Bei anderen Schlafstörungen, wie z.B. beim obstruktiven Schlafapnoe Syndrom (Redline et al. 2000 etc.), bei Narkolepsie und *Restless Legs* Syndrom (Caylak 2009) und auch beim kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndrom und *Late onset-CHS* (Matera et al. 2004, Trochet et al. 2005 etc.) wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt, die Hinweise auf genetische Einflussfaktoren, z. T. sogar eine genetische Mitverursachung, liefern.

Die Pathogenese des CSA, ähnlich wie beim OSAS, kann multifaktoriell sein und die Ätiologie des idiopathischen CSA ist noch komplett unbekannt. Auch die veränderte CO<sub>2</sub>-Sensibilität bei CSA und mehrere vorliegende Studien, die PHOX2B Mutationen nicht nur bei CCHS, sondern auch beim LO-CHS bestätigt haben, lassen die Vermutung zu, dass auch die CSA genetischen Einflüssen unterliegt (Katz et al. 2000, Weese-Mayer et al.

2005, Doherty et al. 2007). Da hierzu noch keine Daten vorliegen, ist es die Aufgabe dieser Arbeit, einen möglichen Zusammenhang zu untersuchen.

**Tab. 4:** Mögliche Kandidatengene für die Entstehung von CSA

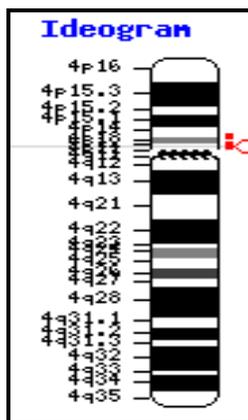
<b>Phänotypen</b>	<b>Kandidatengene</b>
Übergewicht	Leptin/ Leptin receptor Pro-opiomelanocortin Insulin growth factor Glucokinase Adenosine deaminase Melanocortin-3 receptor Tumor necrosis factor $\alpha$ Glucose regulatory protein Agouti protein and protein related peptide $\beta$ -3 Adrenergic receptor Orexine
Atemkontrolle	RET-proto-oncogene, receptor tyrosine kinase Neutrophic growth factors (BDNF, GDNF, GFRA1) Endothelin-1 Endothelin-3 Retinoic acid receptor Leptin/ Leptin receptor Orexine (?) HASH1 transcription factor PHOX2A transcription factor Bone morphogenetic protein 2 Endothelin converting enzyme 1
Schlafregulation	Orexine Leptin

In Anlehnung an GeneReviews CCHS und Redline et al. 2000

### VIII. Die Rolle von Phox2B

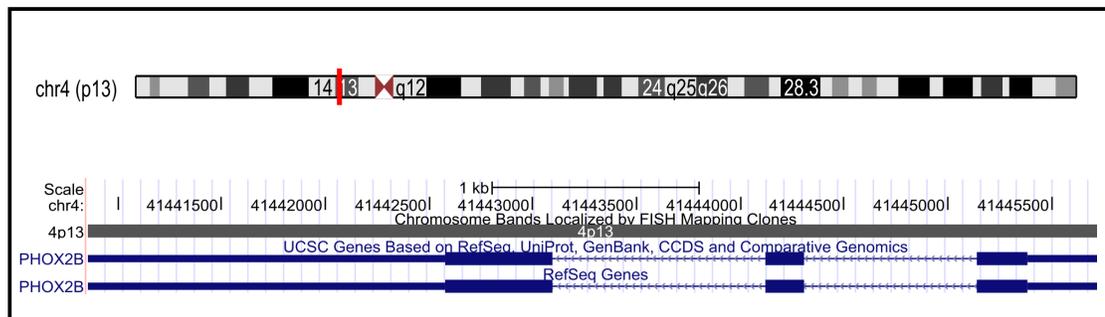
Das *paired-like homeobox 2b* (PHOX2B)-Gen liegt auf Chromosom 4p12 und kodiert für ein Protein, nämlich den sehr konservierten Homeobox Transkriptionsfaktor der Länge von 314 Aminosäuren. Dieses besitzt zwei kurze Polyalanin-Repeats, deren Länge bei Gesunden 9 bzw. 20 beträgt (Amiel et al. 2003). Das PHOX2B-Gen ist verantwortlich für die Entwicklung des autonomen und zentralen Nervensystems. Versuche mit Mäusen haben gezeigt, dass Knockout-Individuen mit defektem oder ausgeschaltetem Gen, noch *in utero* versterben, da die neuronalen Zellen weder in der Lage sind, sich weiter zu differenzieren noch zu migrieren (Young et al. 1999).

Abb. 1: Ideogramm von Chromosom 4.



Der rote Pfeil markiert die Lage von PHOX2B auf Chromosom 4p12 (<http://genome.ucsc.edu> Version März 2006)

Abb. 2: Genomische Struktur von PHOX2B



Kodierende Sequenz in Form von dicken Balken, dazwischen nichtkodierende Sequenz. Von rechts nach links (3' -> 5') gelesen Ex1, Ex2 und Ex3 (<http://genome.ucsc.edu> Version März 2006)

Beim Menschen hat man ebenfalls einen Zusammenhang mit bestimmten Entwicklungsstörungen und PHOX2B –Defekten gefunden. Um diese nachvollziehen zu können, ist jedoch essentiell, die Funktion des Gens zu kennen, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Matera et al. (2003) beschreiben in ihrer Arbeit die Expression des Transkriptionsfaktors im embryonalen Rhombencephalon, im peripheren Nervensystem, in allen noradrenergen Zentren und viszerale Moto- sowie Branchiomotoneuronen der Hirnnerven. Branchiomotoneurone bilden die speziell-viszerale efferente Zellsäule, die Motoneurone für die Muskulatur enthält, welche sich aus den Kiemenbögen ableitet. Dazu gehören die Kau-muskeln, die mimische Muskulatur, die Muskulatur von Larynx und Pharynx, sowie zwei Halsmuskeln. Die Beteiligung von PHOX2B wird auch in Neuronen erwähnt, die für die autonomen Reflexkreise in der Medulla oblongata verantwortlich sind. Amiel et al. (2003) stellten die Expression von PHOX2B schon am 32. Entwicklungstag im 7., 9. und 10. Ganglion und am 33. Tag im Rhombencephalon, enterischen und sympathischen Ganglien und schließlich in der Carotisgabel fest. Auch Dubreuil et al. (2002) fanden wichtige Erkenntnisse bezüglich der Funktion des Gens. Es aktiviert die Differenzierung aller neuronalen Zellen und fördert die Hochregulation der proneuronalen Gene, sowie die Expression von anderen, für die Neurogenese wichtiger Gene, wie z.B. MASH1. Außerdem stellten sie fest, dass PHOX2B auf einem anderen Weg die Expression von Inhibitoren der Neurogenese hemmt. Die Expression von Enzymen wie Tyrosinhydroxylase, Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase und auch RET, deren Mangel zu bestimmten Krankheitserscheinungen führt, wird auch PHOX2B zugeschrieben (Lo et al. 1999). Auffällig ist, dass +1-*Out of frame*-Mutationen zu massivem Transaktivationspotential-Verlust der Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase und zu einem voll ausgeprägten Phänotyp des CCHS führen, während es bei +2-*Out of frame*-Translationen zu geringerem Verlust und milderer Ausprägung des Phänotyps kommt (Trochet et al. 2007).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass der Einfluss des Gens sich auf alle Bereiche der Stimulation und Disinhibierung der zentralen und autonomen Neurogenese erstreckt und somit eine Balance zwischen sympathischem und parasympathischem Nervensystem herstellt.

Ganz eindeutig wurde die Rolle von PHOX2B-Mutationen bei CCHS von zahlreichen Studien hervorgehoben. Alle Veränderungen fanden sich in Exon 3, dessen Polyalanin-

Repeat als Mutationshotspot bezeichnet werden kann (Matera et al. 2003). Dabei handelte es sich in 92% um *In-frame* Duplikationen, die zu einer Verlängerung von zwischen +5 bis zu +13 Alaninen im 20-Alanin Abschnitt am Carboxyende des Proteins führte, d.h. zu einer Gesamtrepeatanzahl von 33 (Trochet et al. 2005). Außerdem fanden sich, jedoch wesentlich seltener, nämlich in nur 8%, einige *Missense*, *Nonsense* und *Out-of-frame* Mutationen (Sasaki et al. 2003, Weese-Mayer et al. 2003). Trochet et al. (2005) untersuchten Patienten mit CCHS, von denen 92,6% eine PHOX2B-Mutation aufwiesen, weswegen sie ein genetisches Screening als phänotypunabhängige Diagnosesicherung vorschlugen, wobei die mutationsfreien Probanden jedoch keine Unterscheidung in der Klinik zeigten. In dieser Arbeit wird auch auf einen Zusammenhang zwischen PHOX2B und anderen entweder zusätzlich zum CCHS oder eigenständig auftretenden Erkrankungen hingewiesen, wie malignen Tumoren des sympathischen Nervensystems (TSNS) (in 5-10% in Patienten mit CCHS), z.B. Neuroblastom, Ganglioneuroblastom und Ganglioneurom und Morbus Hirschsprung (in 20% in Patienten mit CCHS als sogenanntes Haddad Syndrom). Diese Erkrankungen treten mit einer hohen Prävalenz bei CCHS auf (Rohrer et al. 2002). Auffällig dabei war, dass die Mutationen spezifisch waren. Bei Patienten mit TSNS fanden sich entweder *Missense* oder *Frameshift* heterozygote Mutationen während bei isoliertem CCHS meist heterozygote, aber auch homozygote *In-frame*-Mutationen vorhanden waren. Bei der Untersuchung vom LO-CHS fanden sich genauso PHOX2B-Mutationen, die sich besonders durch die kurze Verlängerung des Repeats auf nur +5 Alanine, aber auch durch *Frameshift* und *Missense*-Mutationen auszeichneten, so dass sich hier die Frage stellte, ob man LO-CHS und CCHS nicht zusammen fassen sollte (Sasaki et al. 2003, Matera et al. 2004, Trochet et al. 2007). Dabei gibt es jedoch Definitionsschwierigkeiten, da es prinzipiell einen Unterschied zwischen einem LO-CHS aufgrund einer Mutation und einem früher beschriebenen LO-CHS aufgrund von hypothalamischen Störungen und Übergewicht gibt (Katz et al. 2000, Ize-Ludlow et al. 2007). Trochet et al. (2007) stellten fest, dass sich in 17 von 25 Patienten mit LO-CHS eine heterozygote PHOX2B-Mutation fand. In den meisten Fällen handelte es sich dabei um eine Keimbahnmutation, die zu einer Repeat-Verlängerung von +5 führte. Dabei fanden sie auch, dass die Transaktivierung (Verstärkung der Genexpression) der Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase erst ab einer Repeat-Verlängerung von +9 aufwärts abnahm, jedoch nicht bei +5. Dies erklärten sie damit, dass das mutierte, falsch gefaltete Protein im Zytoplasma aggregiert und sogenannte Chaperone (Proteine, die für

die korrekte Faltung von neu synthetisierten Proteinen verantwortlich sind) aktiviert, die dann in der Lage sind, das korrekte Faltungsmuster wieder herzustellen. Dieser Mechanismus funktioniert aber nur bei der milden Form vom CCHS, nämlich beim LO-CHS mit +5 Alaninen.

Interessanterweise stellen Parodi et al. (2008) den Fall eines 15-monatigen männlichen Babys vor, das eine erstmals dokumentierte Kombination vom LO-CHS und rekto-sigmoidalem Morbus Hirschsprung aufwies, normalerweise kommt das LO-CHS nämlich immer isoliert vor. Bei der genetischen Analyse fand sich eine schon bekannte, jedoch seltene *Missense*-Mutation p.A140E, in der ein Alanin mit Glutamin substituiert war. D'Alessandro et al. (2005) fanden ihrerseits einen Fall von einem 5-jährigen Jungen, der an einem neudiagnostizierten schwersten LO-CHS litt. Dieser Patient wies weder eine hypothalamische Dysfunktion auf, noch war er übergewichtig und seine genetische Analyse war ebenfalls komplett unauffällig. Diese Fallbeispiele spiegeln die Vielfalt der genetischen Ausprägung und die Komplexität der Syndrome wieder.

Was weitere Wirkungen von Phox2b-Mutationen betrifft, so beschreiben Amiel et al. (2003) einen die Augen betreffenden Phänotyp. Hierbei wird spekuliert, dass das mutierte Protein einen dominanten negativen Effekt auf PHOX2A ausübt, so dass es zu einer Fibrose der Extraokularmuskeln Typ 2 kommt.

Der Zusammenhang zwischen der Repeatlänge und dem Phänotyp ist kontrovers. Matera et al. (2004) versichern ein steigendes Krankheitsausmaß und einen früheren Krankheitsbeginn mit wachsender Repeatverlängerung während Trochet et al. (2005) der Meinung sind, dass man aus dem Genotyp keine Vorhersagen treffen könne. Jedenfalls haben Trochet et al. (2008) herausgefunden, dass es auch CCHS-Patienten gibt, die zwar eine homozygote Mutation aufweisen, die auch zu einer Repeatverlängerung führt. Diese befindet sich jedoch unterhalb der Schwelle, die zu dem Phänotyp eines dominanten CCHS führen würde, und sich somit rezessiv verhält. Der Schluss den man daraus ziehen kann, ist, dass die phänotypische Expression nicht nur von der Länge des Repeats bestimmt wird, sondern auch von der dominanten bzw. rezessiven Vererbung des mutanten Allels.

Bei der Frage der Vererbung jedoch ist man sich einig. Entweder wird die Mutation autosomal dominant vererbt oder es kommt zu einer somatischen Neumutation, einem sogenannten somatischen Mosaizismus, in der ersten Generation, welche man bei 5-10% der Eltern der Betroffenen identifizieren konnte (Amiel et al. 2003, Trochet et al. 2007).

Was die Vererbung von LO-CHS betrifft, so wurde von Doherty et al. (2007) eine ganze Familie beschrieben, in der 4 von 5 Kindern, sowie der Vater phänotypisch unauffällig, jedoch in Untersuchungen und vom Genotyp symptomatisch waren, was für eine reduzierte Penetranz spricht. Diese ist nur eine von mehreren Studien, die eine Vererbbarkeit nahe legen.

Da PHOX2B offensichtlich eine sehr wichtige Rolle für die Atemregulation spielt, liegt die Vermutung nahe, dass seine Mutationen auch maßgeblich an der Pathogenese des CSA beteiligt sein könnten.

## **B. Fragestellung**

Mit der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Findet sich in einer Gruppe von Patienten, insbesondere mit CSA, eine Häufung von Polymorphismen oder Mutationen im PHOX2B-Gen?
- 2) Findet sich ein verlängerter Alanin-Repeat bei den Patienten mit Verdacht auf LOCHS und bei der Diagnose CSA?
- 3) Lassen sich die Studien, die eine Assoziation von Phox2B zum LOCHS beschreiben, bestätigen?
- 4) Was gibt es für weitere Kandidatengene, die für ein CSA in Frage kommen?

Dazu wurden die drei Exons von PHOX2B der Patienten mit CSA, LO-CHS, sek. alveolärer Hypoventilation und gemischtem SAS, durch direkte DNA-Sequenzierung untersucht. Hierbei wurden besonders die Länge des Polyalaninrepeats in Exon 3 und mögliche Mutationen und Polymorphismen in diesem Exon betrachtet. Besonderer Wert wurde vor allen Dingen auf dieses Exon gelegt, da in vorherigen Studien nachgewiesen wurde, dass dies ein prädisponierter Ort für Veränderungen ist. Die anderen beiden Exons wurden auch analysiert.

## **C. Material und Methoden**

### **I. Patientenkollektiv**

Die Untersuchungen wurden mit DNA-Proben von insgesamt 33 Patienten gemacht, die klinisch und somnographisch entsprechend den schon beschriebenen Diagnosekriterien, der jeweiligen Erkrankung zugeordnet worden waren. Das Kollektiv gliederte sich in 18 Probanden mit der Diagnose CSA, 11 mit GSAS, 2 mit primärer alveolärer und 2 mit sekundärer alveolärer Hypoventilation.

Alle Patienten wurden in der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Münster im Schlaflabor untersucht und betreut.

### **II. Blutentnahme und DNA-Isolierung**

Das Blut für die molekulargenetischen Untersuchungen wurde ausschließlich nach schriftlicher Einverständniserklärung der Probanden durch eine Venenpunktion gewonnen und im EDTA-Röhrchen aufbewahrt. Zur DNA-Isolierung und -Reinigung aus Vollblut wurde das QIAamp-Blood-Kit (Quiagen) verwendet. Die dazugehörigen QIAamp-Zentrifugiersäulen mit absorbierender Kieselerdemembran erbrachten eine Ausbeute von ca. 2µg reiner DNA.

Bei der Gewinnung wurden die in Tab. 6 genannten Schritte ausgeführt.

**Tab. 6:** Übersicht über den Ablauf der DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

1.	zu 200µl Vollblut 20µl Proteinase-K und 200µl Buffer AL hinzugeben
2.	15sec mixen und für 10min bei 56°C inkubieren
3.	200µl Ethanol hinzugeben
4.	15sec mixen
5.	Probengemisch in 2µl Säule (Quiagen) überpipettieren und bei 8000rpm 1min zentrifugieren
6.	Säule in ein neues 2µl-Qiagen-Gefäß stellen und 500µl AW-1 hinzugeben
7.	bei 14000rpm 3min zentrifugieren
8.	Säule in ein Eppendorfgefäß stellen und 200µl Buffer AE hinzugeben
9.	1min stehen lassen und anschließend 1min bei 8000rpm zentrifugieren

### III. Polymerasekettenreaktion

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich chromosomale Abschnitte schnell amplifizieren. Für die zu amplifizierende chromosomale Region kann man mit Hilfe des Programms Exonprimer (<http://ihg2.helmholtzmuenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>) spezifische Primer entwerfen. Die Primer werden so gelegt, dass sie sich im mittleren Bereich befinden und ein Exon einschließen. Sie sind ca. 20bp groß und haben eine Annealingtemperatur von ca. 60°C. Diese Primer lagern sich an die komplementäre DNA-Abschnitte in 5'-3' und 3'-5'-Richtung an und schließen dabei die gewünschte Sequenz zwischen sich ein.

Um eine PCR durchführen zu können, braucht man ein Template, eine thermostabile DNA-Polymerase, Vor- und Rückwärts-Primer, Wasser, Puffer und dNTPs.

Die PCR findet in einem Cycler statt und läuft in 3 Schritten ab:

Im ersten Schritt wird die DNA 15min lang bei 95°C denaturiert, wobei sie sich in zwei Einzelstränge aufspaltet, was für die Anlagerung der Primer unbedingt notwendig ist.

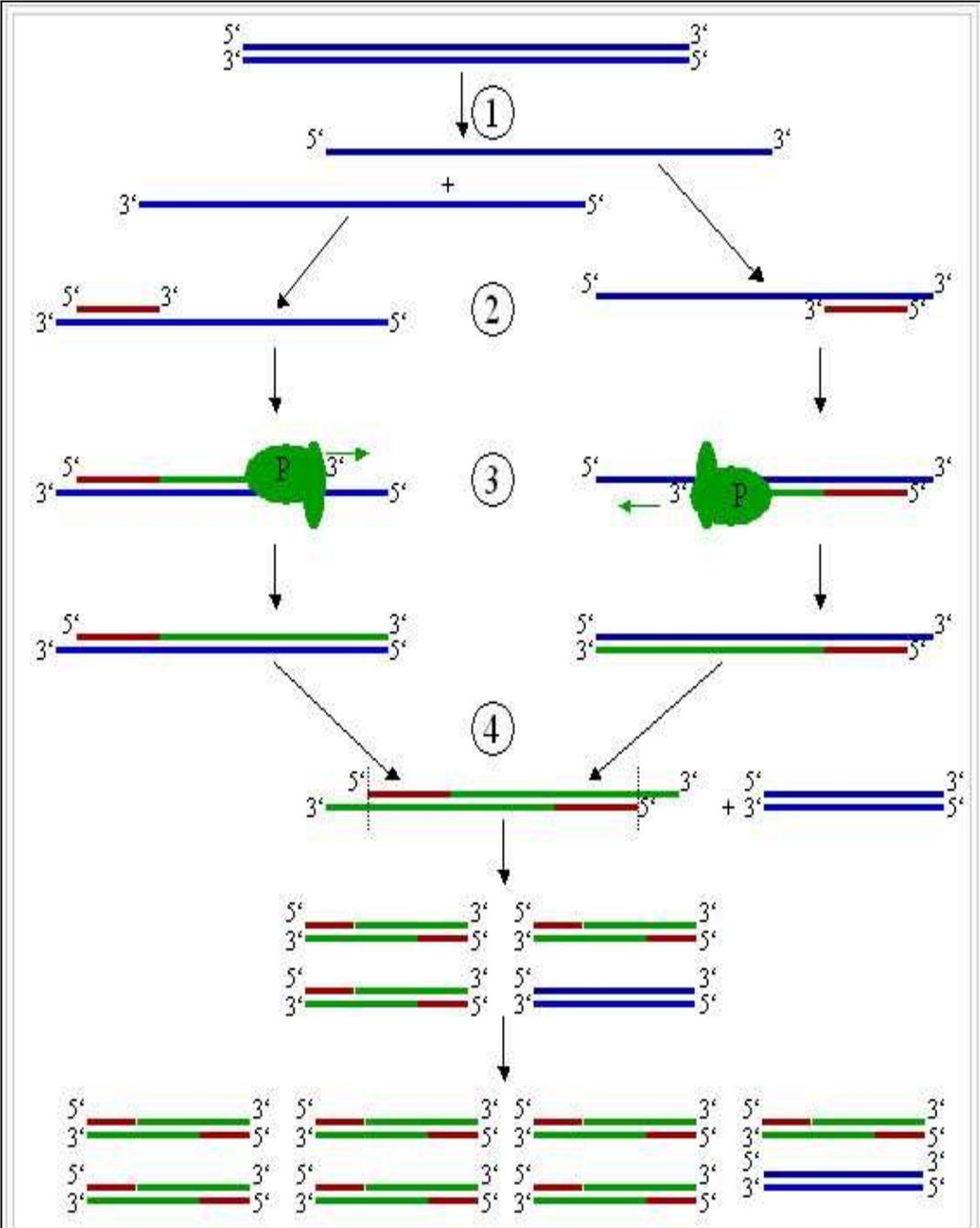
Der zweite Schritt heißt „*Annealing*“. Dabei lagern sich die Primer, bei der für sie spezifischen Temperatur, die bei 45-65°C liegt, an den spezifisch komplementären DNA-Bereich an. Diese optimale Temperatur wird durch Testen eines breiten Temperaturspektrums ermittelt. In schwierigen Fällen, wie z.B. Bereichen mit hohem GC-Anteil, fügt man dem Grundansatz zusätzlich zum Primerpaar 5x Q-Solution (Qiagen) hinzu. Dieses Manöver bewirkt eine Veränderung des Schmelzverhaltens der DNA und erleichtert damit die Primeranlagerung. Die ermittelte *Annealing*-Temperatur wird auch bei allen weiteren PCR-Zyklen verwendet. Sie resultiert aus der Primer-Länge, Nukleotidzusammensetzung, -verteilung sowie seiner Schmelztemperatur. Als Schmelztemperatur definiert man diejenige Temperatur, bei der die Primer-DNA-Moleküle zu 50% denaturiert werden. Sie lässt sich anhand der Zusammensetzung aus GC- und AT-Paaren berechnen. Die Anlagerungstemperatur ist besonders abhängig vom GC-Gehalt, denn eine höhere Anzahl von Wasserstoffbrücken hat eine höhere Temperatur zur Folge, da die Stabilität der Bindungen stärker ist. Ein GC-Paar trägt mit 4°C und ein AT-Paar mit 2°C zur Schmelztemperatur bei. Oft wählt man auch eine *Annealing*-Temperatur, die ca. 5°C unter der errechneten Schmelztemperatur des Primers liegt.

Im dritten Schritt findet die DNA-Synthese statt. Das Gemisch wird 10min lang auf 72°C aufgeheizt, was die optimale Arbeitstemperatur für die DNA-Polymerase ist, die aus thermophilen Bakterien gewonnen wird, z.B. aus *Thermophilus aquaticus*. In diesem Schritt verlängert das Enzym die Primer am freien 3`-OH-Ende durch Anbindung der hinzugegebenen dATP, dGTP, dCTP und dTTP.

Die Schritte eins-drei werden 30 Mal wiederholt, wobei die Menge an amplifizieren Produkten bei jedem Zyklus exponentiell ansteigt.

Schließlich wird die Reaktion auf 12°C abgekühlt (In Anlehnung an Rassow 2006, Duale Reihe Biochemie).

Abb. 3: Ablauf einer PCR



**Figure 2:** Schematic drawing of the PCR cycle. (1) Denaturing at 94-96°C. (2) Annealing at (eg) 68°C. (3) Elongation at 72°C (P=Polymerase). (4) The first cycle is complete. The two resulting DNA strands make up the template DNA for the next cycle, thus doubling the amount of DNA duplicated for each new cycle.

Aus <http://serc.carleton.edu/15924>

## 1. Primer und PCR-Bedingungen

Um die optimale Temperatur für die Primeranlagerung herauszufinden, wurde für jedes Exon eine PCR mit 25µl auf dem Gradienten durchgeführt. Der Nachweis erfolgte dann mittels Gel-Elektrophorese. Nach dem Erhalt der optimalen Temperatur wurde eine 50µl PCR angesetzt.

Alle PCR zur Gradientenermittlung, sowie die PCR bei optimaler Temperatur von Exons 1 und 2 wurden entsprechend den notwendigen Bedingungen für die Hotstar Taq wie in der Tab. 7 beschrieben, durchgeführt.

**Tab. 7:** PCR-Schritte bei Verwendung der Hotstar Taq

<i>Prozess</i>	<i>Zeit</i>	<i>Temperatur in °C</i>	<i>Anzahl</i>
Initiale Denaturierung	15min	95	1
Denaturierung	0,45min	94	
Annealing	0.45min	45-65	30
Elongation	45sec	72	
Finale Elongation	10min	72	1
Kühlschritt	forever	12	

**Tab. 8:** PCR-Reaktionsgemisch für den Gradienten von Exons 1 und 3

<i>Ingredienten</i>	<i>Pro Strip und Pat. in in µl</i>
HPLC-Wasser	9,3
PCR-Puffer 10x	2,5
Q-Solution 5x	5
Primer 1&2 (je 10pmol)	je 2,5
dNTPs (je 10mmol)	1
Hotstar Taq (5U/µl)	0,2
DNA (~ 50ng/µl)	2
Summe	25

**Tab. 9:** PCR-Reaktionsgemisch für den Gradienten von Exon 2

<i><b>Ingredienten</b></i>	<i><b>Pro Strip und Pat. in in <math>\mu</math>l</b></i>
HPLC-Wasser	14,3
PCR-Puffer 10x	2,5
Primer 1&2 (je 10pmol)	je 2,5
dNTPs (je 10mmol)	1
Hotstar Taq (5U/ $\mu$ l)	0,2
DNA (~ 50ng/ $\mu$ l)	2
Summe	25

**Tab. 10:** Übersicht über die verwendeten Primer für die 3 kodierenden Exons des PHOX2B-Gens

<b>Exon 1</b>	
<i>Vorwärts</i>	1F: GGCATCTCATAGGAGGCTTTT
<i>Rückwärts</i>	1R: AATTACCCCTCCCTGCAATC
<b>Exon 2</b>	
<i>Vorwärts</i>	2F: GCCGTATGACCTGACCTTG
<i>Rückwärts</i>	2R: CCAGGACTTSGAATTCACC
<b>Exon 3 aussen</b>	
<i>Vorwärts</i>	3-1F: AGAACTTGGGCCACCCTAAC
<i>Rückwärts</i>	3-2R: ACAAAGCCTTGGGCCTACC
<b>Exon 3 innen</b>	
<i>Vorwärts</i>	3-1R: GAGCCCAGCCTTGTCCAG
<i>Rückwärts</i>	3-2F: AAGAGGCCAAGAGCACTGAC

<i><b>Amplimere</b></i>	<i><b>Größe, bp</b></i>	<i><b>Anlagerungstemperatur in <math>^{\circ}</math>C</b></i>
Exon 1	329	56,6-59,2
Exon 2	260	57
Exon 3 aussen	627 (EX3 gesamt)	55,4
Exon 3 innen		55

**a) Exon 1**

Für Exon 1 wurde für jeden Patienten eine PCR angesetzt.

**Tab. 11:** PCR-Reaktionsgemisch für Exon 1

<i><b>Ingredienten</b></i>	<i><b>Pro Strip und Patient in <math>\mu</math>l</b></i>
HPLC-Wasser	14,8
PCR-Puffer 10x	5
Q-Solution 5x	15
Primer 1r (10pmol)	5
Primer 1f (10pmol)	5
dNTPs (je 10mmol)	1
Hotstar Taq (5U/ $\mu$ l)	0,2
DNA (~ 50ng/ $\mu$ l)	4
Summe	50

Der Ansatz wurde auf Eis hergestellt, im Vortexer gemischt, auf Strips verteilt und zentrifugiert. Anschließend wurde er bei den mittels Gradienten vorher ermittelten Temperaturen von 56,6°C und 59,2°C in den MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler gestellt.

**b) Exon 2****Tab. 12:** PCR-Reaktionsgemisch für Exon 2

<i><b>Ingredienten</b></i>	<i><b>Pro Strip und Patient in <math>\mu</math>l</b></i>
HPLC-Wasser	29,8
PCR-Puffer 10x	5
Primer 2r (10pmol)	5
Primer 2f (10pmol)	5
dNTPs (je 10mmol)	1
Hotstar Taq (5U/ $\mu$ l)	0,2
DNA (~ 50ng/ $\mu$ l)	4
Summe	50

Die Reaktion wurde auf Eis durchgeführt, gevortext, auf die Strips verteilt und zentrifugiert. Dann wurde der Ansatz bei einer Annealingtemperatur von 57°C in den Mastercycler epgradient S von Eppendorf gestellt.

**c) Exon 3**

Da Exon 3 eine sehr GC-reiche Region aufgrund des Repeats enthält, war, wie bei Matera et al. 2004 beschrieben, die Verwendung von RocheKit erforderlich.

Für jeden Patienten wurde eine PCR auf 50µl angesetzt.

**Tab. 13:** PCR-Schritte bei Verwendung des GC- rich RocheKits

<i>Prozess</i>	<i>Zeit</i>	<i>Temperatur in °C</i>	<i>Anzahl</i>
Initiale Denaturierung	3min	95	1
Denaturierung	30sec	95	
Annealing	30sec	55,4	30
Elongation	45sec	68	
Finale Elongation	7min	68	1
Kühlschritt	forever	12	

Entsprechend der RocheKit Anleitung wurden die PCR in zwei Schritte aufgeteilt:

**Tab. 14:** Erstes Reaktionsgemisch der PCR von Exon 3

<i>Ingredienten</i>	<i>Pro Strip und Patient in µl</i>
HPLC-Wasser	8
GC rich resolution solution (5M)	10
Primer 3-1f (10pmol)	5
Primer 3-2r (10pmol)	5
dNTPs (je 10mmol)	1
DNA (~ 50ng/µl)	6
Summe	35

**Tab. 15:** Zweites Reaktionsgemisch der PCR von Exon 3

<i>Ingredienten</i>	<i>Pro Strip und Patient in <math>\mu</math>l</i>
HPLC-Wasser	4
GC rich reaction buffer 5x	10
Taq (2U/ $\mu$ l)	1
Summe	15

Dann wurde der Inhalt beider Cups zusammenpipettiert und im Vortexer gemischt. Die Verteilung auf die Strips erfolgte auf Eis. Anschließend wurden die Strips kurz zentrifugiert und bei einer Annealingtemperatur von 55,4°C in den MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler gestellt.

#### **IV. Agarosegelelektrophorese**

Man verwendet die Gelelektrophorese, um DNA nach ihrer Ladung und Größe aufzutrennen. Da PCR-Produkte auch geladen sind, lässt sich der Erfolg der Amplifizierungsreaktion mit Hilfe dieser Methode gut überprüfen.

Agarose ist ein aus Meeresalgen gewonnenes Polysaccharid. Beim Aufkochen in TBE-Puffer löst es sich auf und verwandelt sich beim Abkühlen in ein Gel. Dabei entstehen Polysaccharid-Doppelhelices, die durch Aggregation ein dichtes Netzwerk bilden.

Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf der durch die angelegte Spannung hervorgerufenen Wanderung der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA im elektrischen Feld zur Anode. Die Gelmatrix sorgt für die Auftrennung der Fragmente nach Größe. Ihre Laufstrecke ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Länge der Fragmente. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist unter anderem von der Länge und Konformation der DNA abhängig. Um die ungefähre Länge der Fragmente zu bestimmen, lässt man einen Standard mitlaufen. Damit die in Banden aufgetrennten Fragmente überhaupt sichtbar werden, wird dem Gel der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid beigemischt. Das Wirkprinzip ist wie folgt: Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNA und erscheint unter UV-Licht orangerot, so dass Banden sichtbar werden.

Für die Kontrolle der PCR und Bestimmung der DNA-Produktgrößen verwendete man 1,5%ige (w/v) Gele. Um ein 1,5% Agarosegel für DNA-Produktgröße von 0,2-3kb herzustellen, wurden 7,5g SeaKem® LE Agarose (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) in 500ml 1xTBE (89 mmol/l Tris pH 7,6; 89 mmol/l Borsäure; 2,5 mmol/l EDTA) durch mehrmaliges Aufkochen aufgelöst. Eine Horizontal-Gel-Elektrophorese-Kammer (Harnischmacher Labortechnik, Arnsberg) wurde mit der Agarose und 5µl Ethidiumbromid (1mg/ml) luftblasenfrei gefüllt. In die Kammer wurde vorher eine Taschenschablone am oberen Rand der Kammer (Kathodenseite) eingesetzt. Nach der Polymerisation wurde das Gel mit 1xTBE –Puffer überschichtet und die Schablone entfernt. Diese Lösung wurde bei 60°C in einem Wasserbad aufbewahrt.

Es wurden 2µl PCR mit 1µl Bromphenolblau-Ladepuffer aufgetragen und bei 126V ca. 10min lang aufgetrennt, wobei diese aufgrund ihrer negativen Gesamtladung von der Kathode zur Anode wanderten. Als Längenstandard wurden 3µl des GeneRuler™ 100bp DNA ladder (0,5µg/µl) von Fermentas mitgeführt. Zur Detektierung stand das UV-Licht-Kamerasystem (MultiImage® Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA) zur Verfügung, womit die Ergebnisse photographisch festgehalten wurden. Der Vergleich der einzelnen Banden des PCR-Produktes mit den Banden des mitgeführten Standards im Gel erlaubte eine ungefähre Größeneinteilung und Überprüfung der PCR-Produkte.

### **V.     Aufreinigung der PCR-Produkte**

Nach der PCR mussten die PCR-Produkte aufgereinigt werden. Die Aufreinigung erfolgte, je nach Stärke des PCR-Produktes bei der Gelelektrophorese, auf drei Wegen.

#### **1.     Aufreinigung mit MinElute PCR Purification Kit**

##### **a)     Verfahren und Vorgehensweise**

Diese Methode wurde bei besonders schwachen Signalen verwendet. Alle Schritte wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers ausgeführt:

**Tab. 16:** Vorgehen bei der Aufreinigung mit MinElute PCR Purification Kit

1.	50µl PCR und 500µl Puffer PB im Eppendorfgefäß mischen und dann auf MinElute-Säule pipettieren
2.	1min bei 13000U/min zentrifugieren, Bodenrest verwerfen
3.	750µl Puffer PE hinzugeben -> 1min bei 13000U/min zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
4.	Säule in sauberes Eppendorfgefäß überführen
5.	17µl dest. Wasser hinzugeben und 1min stehen lassen ->1min bei 13000U/min zentrifugieren

**b) Vorgehen bei der Aufreinigung von Exon 3**

Bei Exon 3 wurden, um ein spezifisches Produkt zu erhalten, die Hauptbanden von den mehreren Hintergrundbanden getrennt. Dafür wurde ein dickeres Gel hergestellt, womit man mit jeweils 50µl PCR und 5µl Bromphenolblau-Ladepuffer eine Gelelektrophorese durchgeführt hat. Anschließend hat man die gewünschten Banden unter der UV-Lampe mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten und in einzelne Eppendorf-Gefäße überführt. Die weiteren Schritte verliefen gemäß der Anleitung des Herstellers:

**Tab. 17:** Vorgehen bei der Aufreinigung von Exon 3 mit dem Qiagen Gel Extraction Kit

1.	100µl Gel im Cup + 300µl Buffer QG
2.	Bei 50°C 10min inkubieren, jede 2-3min schütteln
3.	100µl Isopropanol hinzugeben
4.	Ins MinElute column überführen -> 1min bei 14000U/min zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
5.	500µl QG hinzugeben -> 1min bei 14000U/min zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
6.	750µl PE hinzugeben -> 1min bei 14000U/min zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
7.	1min bei 14000U/min zentrifugieren und Säule dann in ein sauberes Eppendorfgefäß überführen
8.	17µl Wasser hinzugeben -> 1min stehen lassen -> 1min bei 14000U/min zentrifugieren

## 2. Aufreinigung mit Millipore

Die Standardaufreinigung der PCR-Produkte erfolgte gemäß Tab. 18 mit Millipore.

**Tab. 18:** Protokoll der Arbeitsschritte bei der Aufreinigung mit Millipore

1.	50µl HPLC-Wasser und dann dieselbe Menge des PCR-Produktes in die Vertiefung der Millipore Platte geben
2.	15min lang mit der Vakuumpumpe bei ca. 30mmHg absaugen
4.	die Platte 20min lang bei 800rpm auf dem Thermomixer mixen
5.	30µl aufgereinigten Produktes herauspipettieren und in ein sauberes Cup geben

## VI. Sequenzierungsreaktion nach Sanger

Die Sequenzierung wurde nach der Sanger-Methode unter Verwendung des BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kits durchgeführt. Der Ablauf ähnelt prinzipiell dem einer gewöhnlichen PCR. Man braucht einen Sequenzierungsprimer, das o.g. Kit, HPLC-Wasser und ein *Template*.

BigDye® enthält die vier jeweils unterschiedlich fluoreszent markierten Didesoxynucleotide (ddNTPs), die sich nur insofern von dNTPs unterscheiden, als dass sie am 3'-Kohlenstoff keine Hydroxylgruppe besitzen, so dass an dieser Stelle keine Phosphodiester-Bindung gebildet wird, also keine Kettenverlängerung stattfinden kann.

Wenn man nun alle Ingredienten zusammen gibt und in den Cycler stellt, wird die DNA zuerst denaturiert, so dass sich der Primer an den ihm komplementären Einzelstrang anlagern kann. Dieser Primer kennzeichnet die Region, die für die Sequenzierung bestimmt ist. Dann verlängert die Polymerase den Strang mit Hilfe der vorhandenen dNTPs. Da sie nicht zwischen dNTPs und ddNTPs differenzieren kann, werden die letzteren, die in einer viel geringeren Anzahl vorhanden sind, nach dem Zufallsprinzip eingebaut, so dass die Kettenabbrüche zufällig stattfinden.

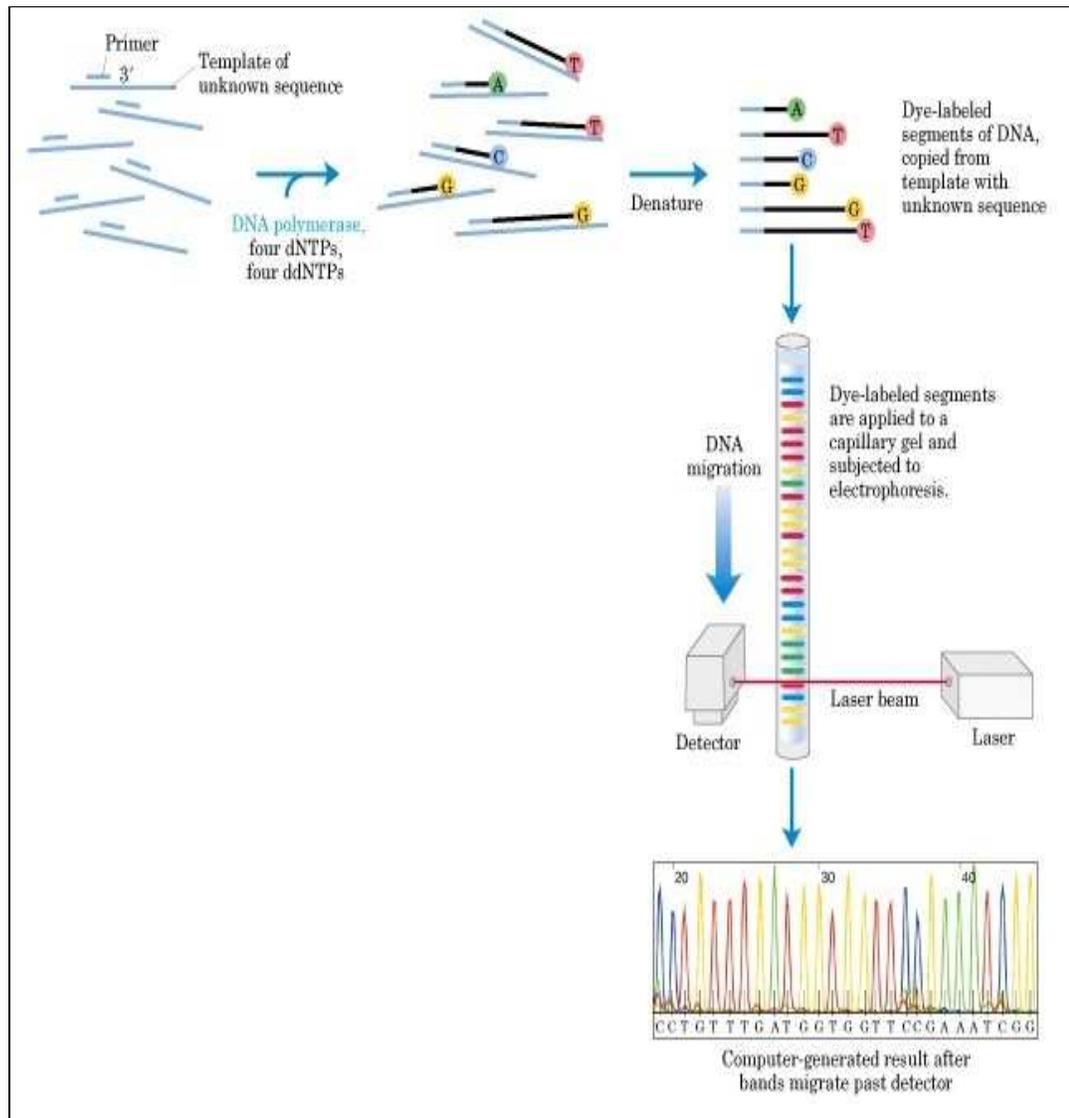
**Tab 19:** Ablauf der Sequenzier-PCR

Temperatur	Zeit	Prozess
95°C	10 sec	Denaturierung der DNA
55°C	10 sec	<i>Annealing</i> des Oligonukleotid-Primers
60°C	4 min	DNA-Synthese mit Kettenabbruch durch Einbau eines fluoreszierenden Didesoxynukleotids

Diese PCR-Sequenzen lassen sich nun mittels Kapillargelelektrophorese auftrennen und mit einem Fluoreszenz-Detektor basenspezifisch identifizieren. Die dadurch erhaltenen Sequenzen können dann mit speziellen Computerprogrammen, wie „*Seqman*“ ausgewertet

und die Sequenzen mit Vorlagen aus Datenbanken abgeglichen werden (In Anlehnung an Strachan 1996, Molekulare Humangenetik; Spektrum Lehrbuch und Brown 1999, Genomes).

**Abb. 4:** Ablauf einer Sequenzierung nach Sanger und Detektion mittels Kapillarelektrophorese



Aus [http://departments.oxy.edu/biologyStillman/bi221/092200/lecture\\_notes.html](http://departments.oxy.edu/biologyStillman/bi221/092200/lecture_notes.html)

## 1. Sequenzier-PCR

Um mit der Sequenzierung fortzufahren, setzte man erneut eine Sequenzier-Reaktion an, wofür man das BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit verwendete. Das Reaktionsgemisch betrug 10µl und man verwendete das aufgereinigte PCR-Produkt als *Template*. Für jeden Patienten wurden 2 Ansätze (einmal mit dem Vorwärts- und einmal mit dem Rückwärts-Primer) angesetzt. Bei Exon 3 hat man 4 PCR pro Patient angesetzt, da es aufgrund der nicht vorhandenen Auswertbarkeit von Sequenzen über 500bp zusätzlich zu den externen auch interner Primer bedarf (1f, 2f, 1r, 2r), um den ganzen Bereich auswerten zu können. Jede PCR wurde entsprechend der Beschreibung in Tab. 20 angesetzt:

**Tab. 20:** Sequenzier-Reaktion

<i><b>Ingredienten</b></i>	<i><b>Pro Reaktion in µl</b></i>
HPLC-Wasser	3
BigDye® 3.1	2
Sequenzierungspuffer 5x	1
Aufgereinigts PCR-Produkt (~ 100ng/µl)	3,5
Jeweiliger Primer (10pmol/µl)	0,5
Summe	10

Der Ansatz wurde auf Eis hergestellt, gevortext und kurz zentrifugiert.

Das Programm umfasste bei Exon 1 und Exon 2 25 Zyklen mit folgenden Stufen: 10sec – 95°C, 10sec - 55°C, 4min - 60°C.

Bei Exon 3 wurde eine Optimierung auf folgende Werte vorgenommen: 20sec – 97°C, 15sec - 55°C, 4min - 60°C.

Dieser Zyklus wurde 25mal wiederholt. Im Anschluss musste eine Aufreinigung der Sequenzier-Produkte vorgenommen werden, um die überschüssigen fluoreszenzmarkierten dNTPs heraus zu lösen.

## 2. Aufreinigung der Sequenzier-Produkte

Die Sequenzen wurden mit dem Millipore System aufgereinigt.

Die Vertiefungen in der Metallplatte wurde mit Sephadex™ 6-50 ultrapure fine DNA Grade komplett gefüllt und der Überstand verworfen. Dann wurde die Platte auf eine Multiscreen HV-Platte (MSHVN4510) geschoben und abgeklopft, bis sich das komplette Pulver in der Multiscreen Platte befand. Nun wurde in jede Pore 300µl Wasser pipettiert und die Sephadex Säule wird 3h bei Raumtemperatur quellen gelassen. Die Platte wird bei 910rcf 5min lang zentrifugiert. Jetzt wurden die Sequenzierungs-PCR auf die Sephadex Säule pipettiert. Anschließend wurde wieder bei 910rcf 5min lang zentrifugiert und die Reaktion in der Detection Plate (Abgene Ab100) unter der HV-Platte aufgefangen. Im letzten Schritt gab man zu Zwecken der Volumenvergrößerung 10µl HPLC-Wasser zu jeder Reaktion. Die Reaktion wurde mit dem Kapillarsequenzier 3+30 aufgetrennt.

## VII. Statistik

Bei allen Auswertungen wurde zunächst der arithmetische Mittelwert der Messwerte bzw. Zählergebnisse bestimmt.

Nach Errechnen der Mittelwerte wurde für alle Ergebnisse der Versuchsreihen zusätzlich die Standardabweichung ermittelt.

$$s_X^* := \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

**Abb. 6:** Formel zur Bestimmung der Standardabweichung.

Messwerte  $x_1 \dots x_n$ :  $x_i \quad i=1 \dots n$

## **D. Ergebnisteil**

Wie schon erwähnt, wurde die Sequenz des PHOX2B-Gens von insgesamt 33 Patienten, von denen 18 mit dem zentralen, 11 mit dem gemischten Schlafapnoesyndrom, 2 mit der primären alveolären und 2 mit der sekundären alveolären Hypoventilation diagnostiziert wurden, mittels PCR auf das Vorliegen von Mutationen, insbesondere auf eine Polyalanin-Repeat-Verlängerung im Exon 3 untersucht.

### **I. Klinik**

Die zu erfassenden Parameter waren Alter, Geschlecht, BMI, die drei Schlafphasen (REM, Tiefschlaf und Wachphase) und die Schlafeffizienz. Außerdem wurden die minimale und die mittlere Sauerstoffsättigung miteinbezogen. Die wichtigsten Parameter waren der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) und der Sauerstoff-Entsättigungsindex (ODI), sowie die Gesamtanzahl der zentralen Apnoen pro Schlafdauer. Der Apnoeindex (AI) wurde hinzugekommen, um die Zahl der Apnoen von den Hypopnoen zu differenzieren und um die Diagnose „Schlafapnoe“ zu bestätigen.

Zusätzlich zu den o.g. Parameter wurden die jeweiligen Vorerkrankungen betrachtet, um mögliche Risikofaktoren nachzuweisen.

Übersichtstabelle klinische Daten

Pat.-Nr.	m/w	Alter	Diagnose	BMI	REM%	Tiefschlaf%	Wach%	Schlafeff.%	ODI/h	AHI/h	z.Ap.	AI	mit.Sätt.%	min.Sättig.%
2342	m	73	zentral	29	14,6	26,4	14	85	16	48	33	20	92,5	86
2419	m	61	zentral	26	21,7	17,1	43	56	3,6	6,6	9	6	94	84
2466	m	67	komplex	29	9,6	19,5	52,2	47,5	18,9	41,8	4	15	91	79
2489	m	50	komplex	30	27,3	26,7	4,3	96,1	52,3	87,6	26	99	91	70
2507	m	74	zentral	27	4,9	28,6	5,7	105	39,6	51,6	17	9	92	80
2511	m	46	zentral	17	10,7	30,4	4,5	92	3,5	7,2	12	7	94	87
2692	m	83	komplex	28	8,9	7,8	3,1	100	14,7	42,2	71	42	86,7	65
2706	m	64	zentral	30	8,3	11,1	15,3	84	40,7	64,1	6	46	90	66
3236	m	49	p.a.H.	27	23,7	24	0,5	92	3,7	8,5	7	8,5	92	85
3265	w	32	komplex	74	6,5	28,1	14,9	68	14,7	2,8	10	50	91	84
3338	m	70	komplex	29	13,3	28	22,6	79,7	45,6	51	87	49	86	76
3381	m	75	komplex	25	8,3	13,3	29,6	58	22,8	38,6	24	35	94	84
3388	m	78	zentral	28	14,6	12	40	56	26,3	60,9	252	44	94	72
3398	w	45	p.a.H.	25	21,8	19,2	30,9	95,4	4,3	5,4	8	6,8	89	78
3410	m	68	zentral	28	3,1	25,8	29,6	43	39	74,4	6	19	93	74
3412	m	79	zentral	25	15,3	30,1	7,9	77	10,2	18,8	20	10	93	86
3424	w	73	zentral	38	18,1	33,3	3,2	95	89,9	67,8	535	57	92	78
3459	m	45	komplex	28	9	16,7	48,9	50,6	50	38	20	10	90	74
3463	m	52	s.a.H.	14	16,4	40,9	5,1	90	0,8	9	1	4,2	90	87
3517	m	48	s.a.H.	21	6,4	12,3	23,4	72	0,9	10	2	5,4	88	85
3579	m	59	komplex	39	21,1	23,7	9,7	85,38	49,7	67,2	110	59	82	41
3602	m	68	zentral	35	9,4	20,6	19,6	65	20,3	78	61	48	93	84
4061	m	62	zentral	27	10,2	4	15,4	84,6	54	103	14	3	94	79
4063	m	68	komplex	31	10,9	16,8	11,8	88,2	6,7	15	44	15	83	74
4080	m	66	zentral	27	15,8	18,1	20,1	82	19	14,4	12	5,6	93	77
4083	m	65	zentral	21	11,1	9,7	19,5	77	14	17,3	11	17	90	86
4084	m	61	komplex	29	16	28,9	10,8	86	12,2	28	6	1,9	94	85
4091	m	38	komplex	41	13	9,3	38,7	26	48,5	71,9	140	73	94	87
4092	m	73	zentral	25	3,1	41,7	19,4	64,2	29,5	31,7	25	30	90	80
4093	m	70	zentral	27	11,5	13,9	17,4	74	17,9	28,8	81	26	85	79
4094	m	51	zentral	37	17,4	5,4	20,7	77,3	99,5	76,6	568	77	90	63
4095	m	80	zentral	32	14,7	22,6	14,5	84	76	67,5	117	48	91	71
4158	m	68	zentral	27	3,8	10,4	31,5	61	10,7	47,2	2	1,6	96	87

Tab. 21: Übersicht über klinischen Daten

**z.Ap.:** Gesamtanzahl der zentralen Apnoen/Schlafdauer

**AI:** Apnoe-Index, **AHI:** Apnoe-Hypopnoe-Index, **ODI:** Oxygen Desaturation Index

**Mit. Sätt.:** Mittlere O<sub>2</sub>-Sättigung, **min. Sätt.:** Minimale O<sub>2</sub>-Sättigung

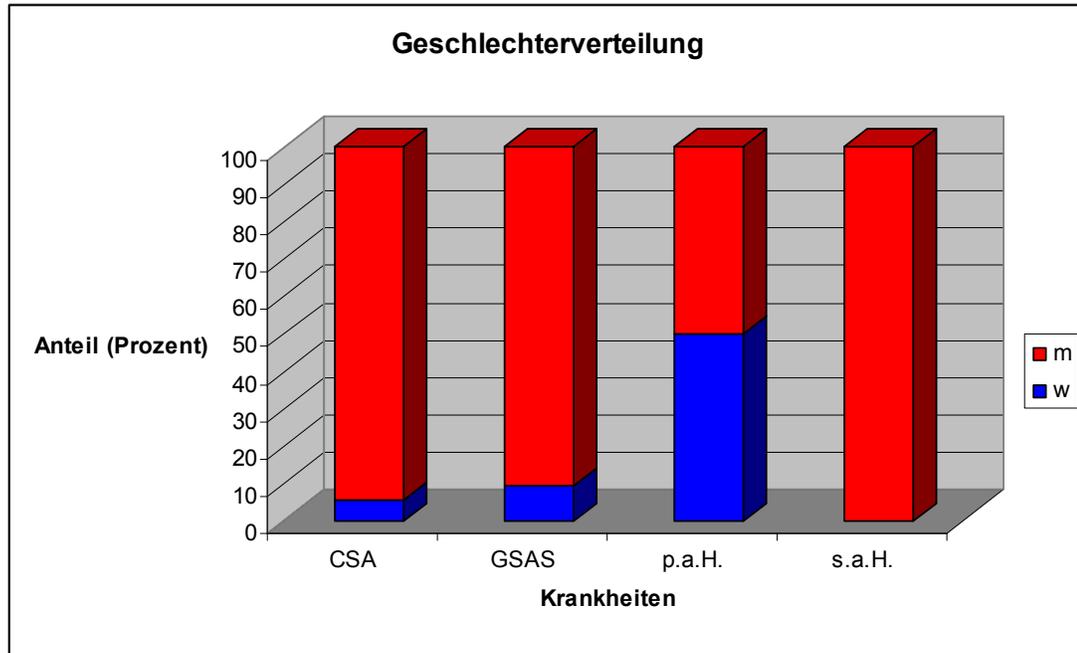
**Tab. 22:** Übersicht über die Vorerkrankungen der Patienten

Pat.-Nr.	m/w	Alter	Diagnose	Vorerkrankung
2342	m	73	zentral	Hirnstamminfarkt, RR, Hypercol., Parkinson, COPD, resp. Globalinsuf.
2419	m	61	zentral	Hirnstammencephalitis, RR, Diabetes mellitus
2466	m	67	gemischt	Leukoencephalopathie, Pseudobulb.para.
2489	m	50	gemischt	Adipositas, RR
2507	m	74	zentral	Mediainfarkt li, RR, DM, Hypercholesterinämie
2511	m	46	zentral	HMSN X (hereditäre moto-sens. Neuropathie)
2692	m	83	gemischt	Epilepsie, RR, Leukoenc.pat., Vorhofflimmern
2706	m	64	zentral	Adipositas
3236	m	49	p.a.H.	RR, Hyperlipidämie, Vorhofflimmern, Migräne
3265	w	32	gemischt	Adipositas per magna, Herzinsuffizienz
3338	m	70	gemischt	RR, Adipositas, Hyperlipidämie, Herzinfarkt
3381	m	75	gemischt	RR, Vorhofflimmern, Insult
3388	m	78	zentral	Normaldruckhydrocephalus, RR
3398	w	45	p.a.H.	COPD, Hyperlipidämie, atypische Angina pectoris
3410	m	68	zentral	Insult, RR, Adipositas, Hypercholesterinämie
3412	m	79	zentral	RR
3424	w	73	zentral	Chron.Schmerzsyndrom ->Morphin, Herzinsuffizienz, Hypercholesterinämie & -triglyzeridämie, DM
3459	m	45	gemischt	Insult, RR, COPD, Hypercholesterinämie, Herzinsuf.
3463	m	52	s.a.H.	(Muskeldystrophie) Glykogenose Typ II, RR

3517	m	48	s.a.H.	Kyphoskoliose
3579	m	59	gemischt	Adipositas, Hyperchol./trigly., RR
3602	m	68	zentral	RR, Hyperlipidämie, Mediainsult li, Herzinsuffizienz
4061	m	62	zentral	Insult, Hypercholesterinämie
4063	m	68	gemischt	Insult, RR, DM
4080	m	66	zentral	RR
4083	m	65	zentral	Herpes-Encephalitis
4084	m	61	gemischt	Hypercholesterinämie, Vorhofflimmern
4091	m	38	gemischt	Epilepsie, Adipositas
4092	m	73	zentral	Basilarisembolie,RR,Hypercol.
4093	m	70	zentral	Insult
4094	m	51	zentral	Hyperlipidämie, Adipositas
4095	m	80	zentral	Mediateilinfarkt li, Vorhofflimmern
4158	m	68	zentral	Epilepsie, Mediainfarkt re

## 1. Geschlechterverteilung

Unter den Patienten gab es 9,1% Frauen (n=3) und 90,9% Männer (n=30). Diese waren folgendermaßen aufgeteilt:



**Abb. 7:** Geschlechterverteilung unter den Patienten

**Tab. 23:** Verhältnis von Krankheit und Geschlecht

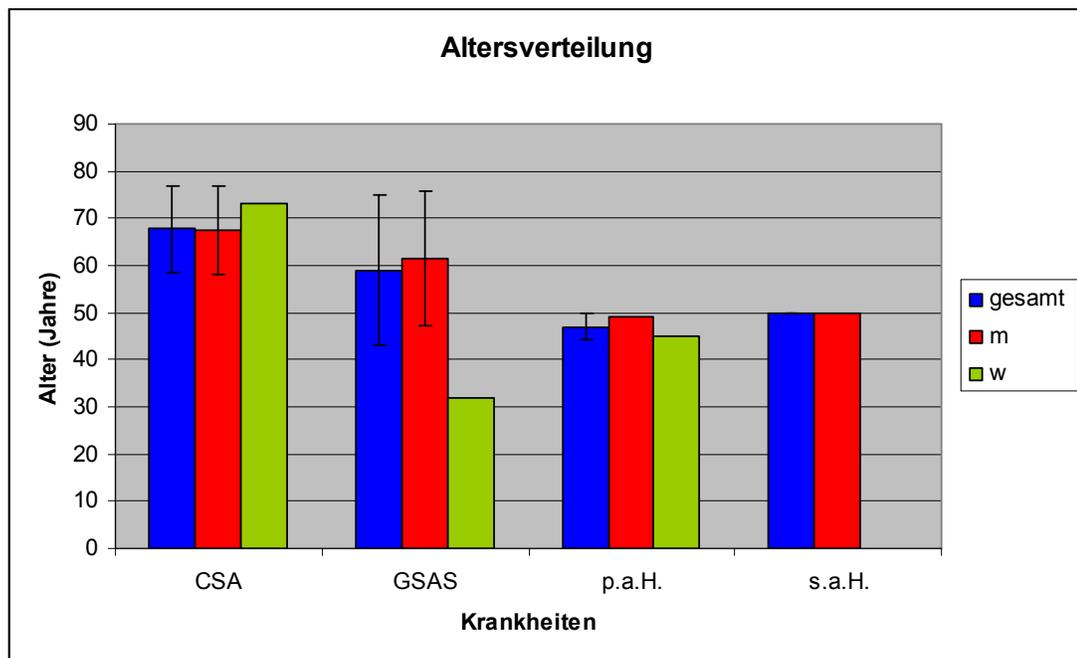
	CSA	GSAS	p.a.H.	s.a.H.
w	5,6% (n=1)	9,1% (n=1)	50% (n=1)	0
m	94,4% (n=17)	90,9% (n=10)	50% (n=1)	100% (n=2)
gesamt	100% (n=18)	100% (n=11)	100% (n=2)	100% (n=2)

## 2. Alter

Die Altersverteilung in den unterschiedlichen Gruppen, nach Geschlecht aufgetrennt, war folgendermaßen:

**Tab. 24:** Übersicht über die Altersverteilung

	CSA	GSAS	p.a.H.	s.a.H.
gesamt (SD)	67,7 ( $\pm$ 9,16)	58,9 ( $\pm$ 15,92)	47 ( $\pm$ 2,83)	50 (0)
m (SD)	67,4 ( $\pm$ 9,35)	61,6 ( $\pm$ 14,19)	49 (0)	50 (0)
w (SD)	73 (0)	32 (0)	45 (0)	0 (0)

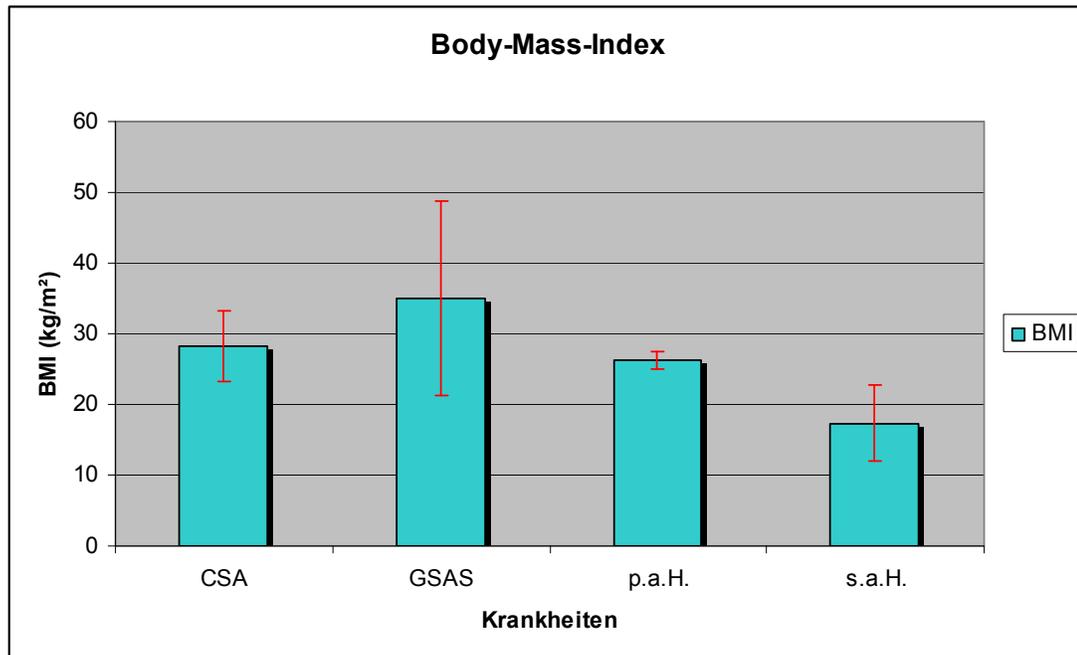
**Abb. 8:** Altersverteilung der Patienten. Dargestellt sind der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung

### 3. BMI

Da das Verhältnis von Körpergewicht und –Größe mit dem Auftreten der Schlafapnoen korrelieren, wurde der *Body-Mass-Index* mit erfasst. Er errechnet sich aus dem Quotienten des Körpergewichts einer Person in Kilogramm und dem Quadrat der Körpergröße in Metern (Gewicht/ Größe<sup>2</sup> [kg/m<sup>2</sup>]). Die normalen Werte liegen bei Frauen zwischen 20 und 25 und bei Männern zwischen 19 und 24.

**Tab 25:** Übersicht über die BMI-Verteilung

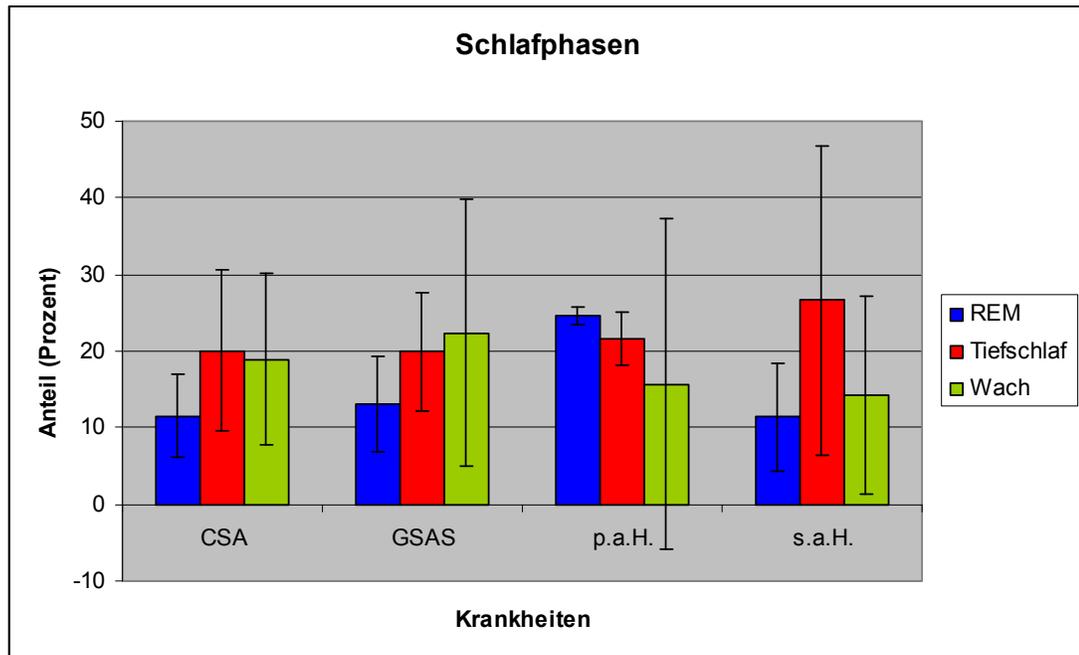
	<b>CSA</b>	<b>GSAS</b>	<b>p.a.H.</b>	<b>s.a.H.</b>
BMI	28,27	35,04	26,25	17,35
Standardabweichung	± 5,05	± 13,67	± 1,2	± 5,3

**Abb. 9:** Die BMI-Verteilung der Patienten. Dargestellt sind der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung.

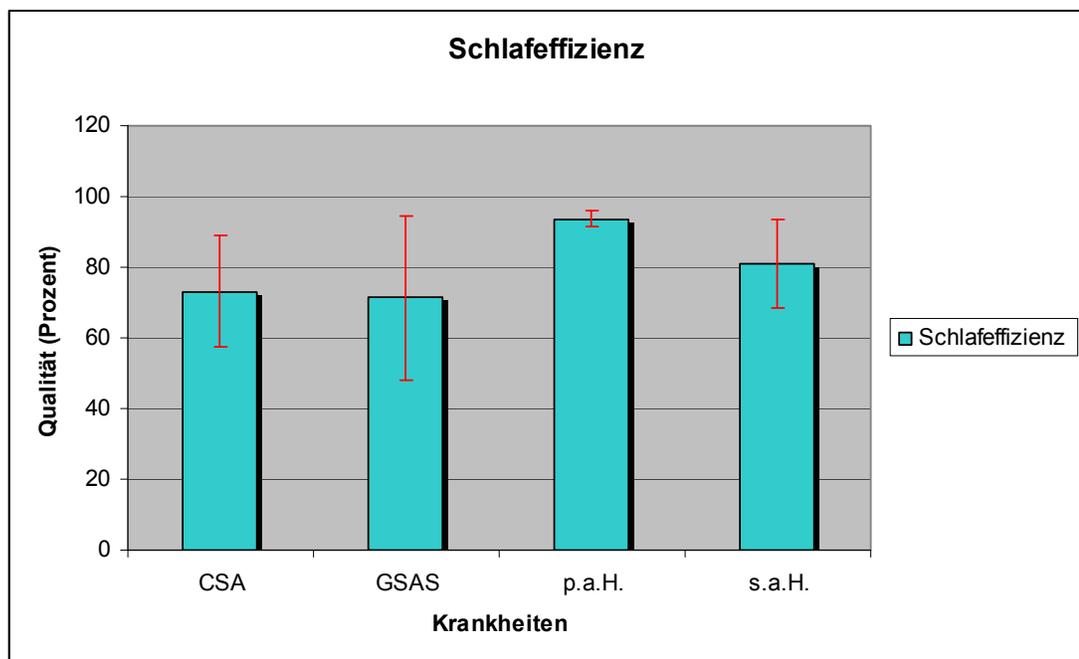
#### 4. Schlafphasenverteilung

**Tab. 26:** Übersicht über die Schlafparameter

	<b>CSA</b>	<b>GSAS</b>	<b>p.a.H.</b>	<b>s.a.H.</b>
REM (SD)	11,57 (± 5,45)	13,08 (±6,26)	24,55 (±1,2)	11,4 (±7,07)
Tiefschlaf (SD)	20,07 (±10,5)	19,89 (±7,73)	21,6 (±3,39)	26,6 (±20,22)
Wach (SD)	18,96 (±11,18)	22,42 (±17,53)	15,7 (±21,5)	14,25 (±12,94)
Schlafeffizienz (SD)	73,21 (±15,91)	71,41 (±23,33)	93,7 (±2,4)	81 (±12,73)



**Abb. 11:** Die Schlafphasen der Patienten mit Standardabweichung



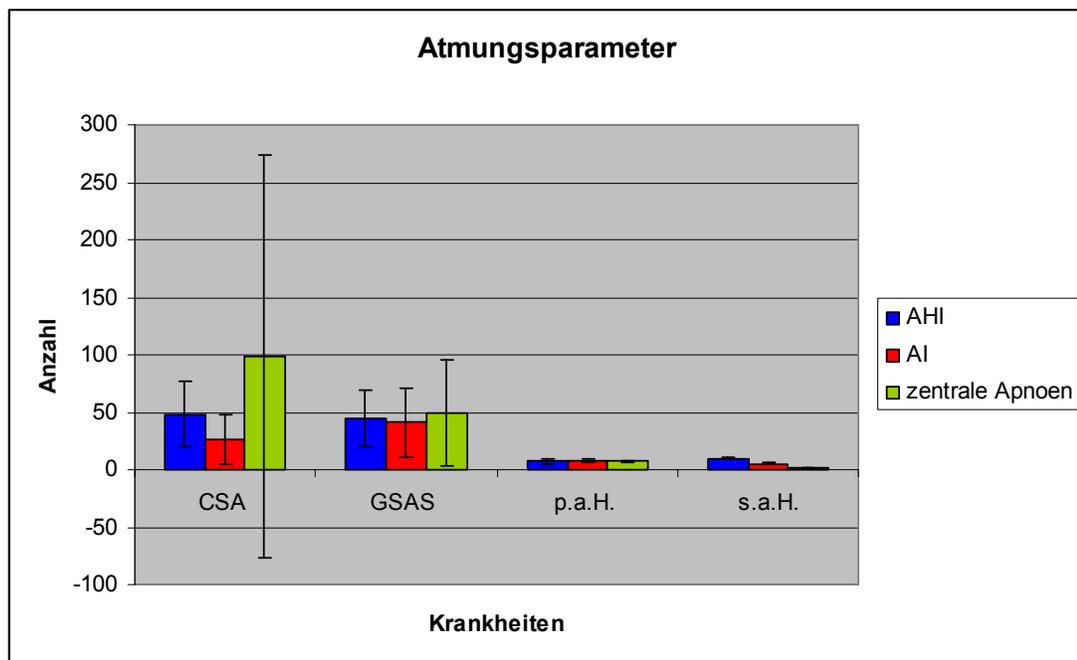
**Abb. 12:** Die Schlafeffizienz der Patienten. Dargestellt sind der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung.

## 5. Atmungsparameter

Die Atemparameter – AHI, AI und die Anzahl der zentralen Apnoen sind essentiell für die Diagnose von Schlafapnoe-Syndromen, insbesondere des CSAS, weswegen sie im Folgenden dargestellt werden.

**Tab. 27:** Übersicht über die Atemparameter

	CSA (n=18)	GSAS (n=11)	p.a.H. (n=2)	s.a.H.(n=2)
AHI (SD)	47,99 ( $\pm 28,27$ )	44,01 ( $\pm 24,77$ )	6,95 ( $\pm 2,19$ )	9,5 ( $\pm 0,71$ )
AI (SD)	26,37 ( $\pm 22,02$ )	40,84 ( $\pm 29,47$ )	7,65 ( $\pm 1,2$ )	4,8 ( $\pm 0,85$ )
Zahl zentraler Apnoen pro Schlafzeit (SD)	98,94 ( $\pm 175,44$ )	49,27 ( $\pm 46,2$ )	7,5 ( $\pm 0,71$ )	1,5 ( $\pm 0,71$ )

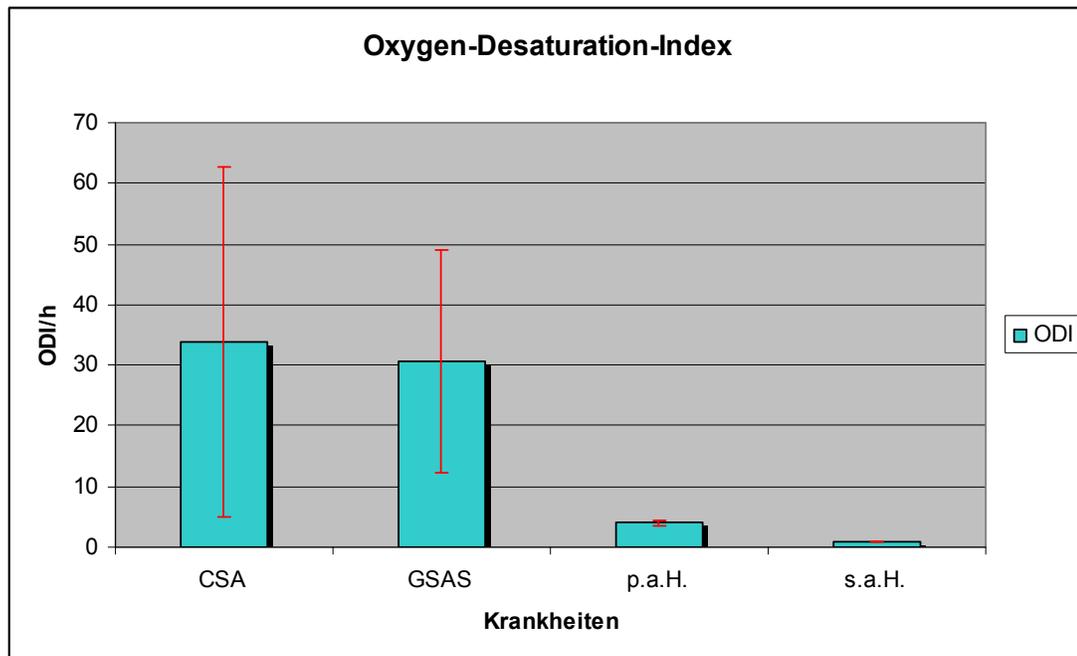


**Abb. 13:** Relevante Atmungsparameter der Patienten. Dargestellt sind der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung.

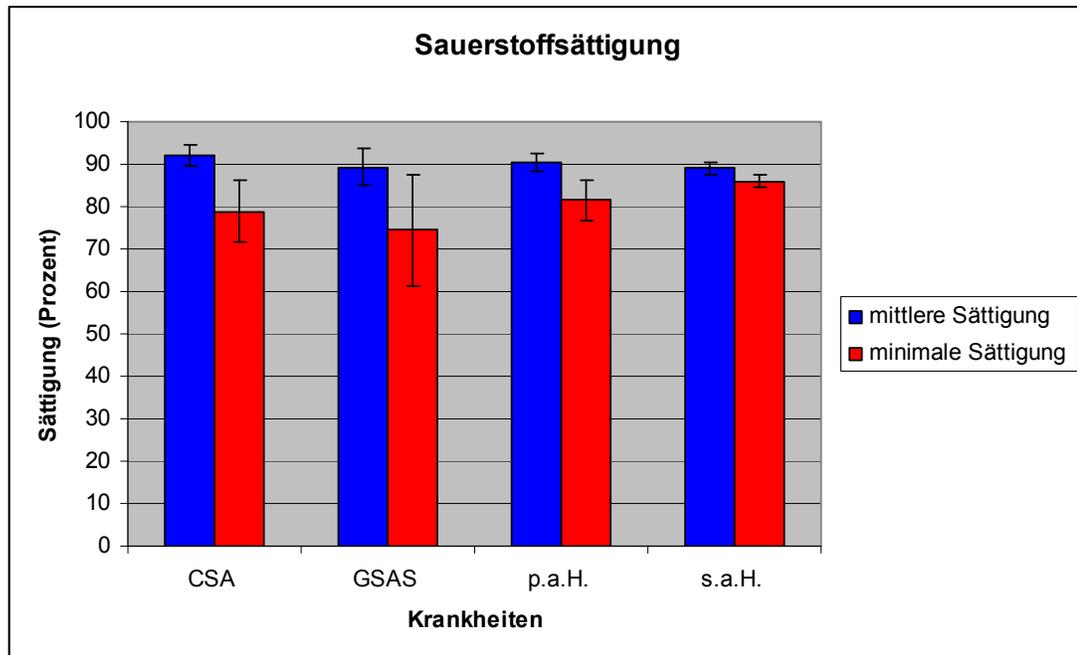
## 6. Sauerstoffsättigung

**Tab. 28:** Übersicht über die Sättigungs- bzw. Entsättigungsparameter

	CSA (n=18)	GSAS (n=11)	p.a.H. (n=2)	s.a.H. (n=2)
ODI/h (SD)	33,87 ( $\pm$ 28,82)	30,55 ( $\pm$ 18,36)	4 ( $\pm$ 0,42)	0,85 ( $\pm$ 0,07)
mittlere Sättigung (SD)	92,03 ( $\pm$ 2,45)	89,34 ( $\pm$ 4,31)	90,5 ( $\pm$ 2,12)	89 ( $\pm$ 1,41)
minimale Sättigung (SD)	78,83 ( $\pm$ 7,25)	74,45 ( $\pm$ 13,05)	81,5 ( $\pm$ 4,95)	86 ( $\pm$ 1,41)



**Abb. 14:** Der ODI der Patienten. Dargestellt sind der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung.



**Abb. 15:** Mittlere und minimale Sauerstoffsättigungen der Patienten in Prozent. Dargestellt sind der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung.

Aufgrund der Relevanz der Sauerstoffsättigung bzw. Entsättigung wurden die Mittelwerte des ODI mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests für zwei unverbundene Stichproben mit dem Programm *PASW Statistics 18* untereinander verglichen. Der Test dient zu Ermittlung der Signifikanz der Übereinstimmungen zweier Verteilungen. Die Nullhypothese  $H_0$  besagt, dass die Mittelwerte sich nicht signifikant, d.h. mit einer überzufälligen Wahrscheinlichkeit voneinander unterscheiden. Die Alternativhypothese  $H_1$  steht für einen signifikanten Unterschied. Wenn der im Test ermittelte Wert  $\alpha < 0,05$  ist, kann die  $H_0$  zugunsten der  $H_1$  abgelehnt werden und das Ergebnis bzw. der Unterschied gilt als statistisch signifikant. In den untenstehenden Tabellen steht der Begriff „Signifikanz“ für  $\alpha$  und somit entsprechen sich die jeweiligen Werte. Die signifikanten Werte sind rot markiert.

**Tab 29:** Mann-Whitney-U-Test Vergleich CSA und s. a. H.

Ränge			
Krankheiten	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ODI di CSA	18	11,50	207,00
m s.a.H.	2	1,50	3,00
e Gesamt	20		
n			
si			
o			
n			
l			

**Statistik für Test<sup>b</sup>**

	ODI
Mann-Whitney-U	,000
Wilcoxon-W	3,000
Z	-2,268
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	<b>,023</b>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	<b>,011<sup>a</sup></b>

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Krankheiten

**Tab 30:** Mann-Whitney-U-Test Vergleich GSAS und p. a. H.

Ränge			
Krankheiten	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ODI di GSAS	11	8,00	88,00
m p.a.H.	2	1,50	3,00
e Gesamt	13		
n			
si			
o			
n			
l			

**Statistik für Test<sup>b</sup>**

	ODI
Mann-Whitney-U	,000
Wilcoxon-W	3,000
Z	-2,174
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,030
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,026 <sup>a</sup>

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Krankheiten

**Tab 31:** Mann-Whitney-U-Test Vergleich CSA und GSAS

**Ränge**

Krankheiten	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ODI di CSA	18	14,83	267,00
m GSAS	11	15,27	168,00
e Gesamt	29		
n			
si			
o			
n			
l			

**Statistik für Test<sup>b</sup>**

	ODI
Mann-Whitney-U	96,000
Wilcoxon-W	267,000
Z	-,135
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,893
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,912 <sup>a</sup>

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Krankheiten

**Tab 32:** Mann-Whitney-U-Test Vergleich GSAS und s. a. H.

		<b>Ränge</b>		
Krankheiten		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ODI	di GSAS	11	8,00	88,00
	m s.a.H.	2	1,50	3,00
	e Gesamt	13		
	n			
	si			
	o			
	n			
	l			

<b>Statistik für Test<sup>b</sup></b>		ODI
Mann-Whitney-U		,000
Wilcoxon-W		3,000
Z		-2,174
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)		<b>,030</b>
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]		<b>,026<sup>a</sup></b>

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Krankheiten

**Tab 33:** Mann-Whitney-U-Test Vergleich p. a. H. und s. a. H.

		<b>Ränge</b>		
Krankheiten		N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ODI	di p.a.H.	2	3,50	7,00
	m s.a.H.	2	1,50	3,00
	e Gesamt	4		
	n			
	si			
	o			
	n			
	l			

**Statistik für Test<sup>b</sup>**

	ODI
Mann-Whitney-U	,000
Wilcoxon-W	3,000
Z	-1,549
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,121
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,333 <sup>a</sup>

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Krankheiten

**Tab 34:** Mann-Whitney-U-Test Vergleich CSA und p. a. H.

**Ränge**

Krankheiten	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ODI di CSA	18	11,28	203,00
m p.a.H.	2	3,50	7,00
e Gesamt	20		
n			
si			
o			
n			
l			

**Statistik für Test<sup>b</sup>**

	ODI
Mann-Whitney-U	4,000
Wilcoxon-W	7,000
Z	-1,764
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,078
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,095 <sup>a</sup>

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: Krankheiten

## 7. Prävalenz der Risikofaktoren für die Entwicklung eines CSAS

Die Erfassung der Vorerkrankungen ist wichtig, um zu sehen, welche prädisponierenden Faktoren für die Entstehung des Schlafapnoe-Syndroms ursächlich sein könnten. Im Folgenden werden die Vorerkrankungen in Gruppen eingeteilt. Herz-Kreislauf beinhaltet Hypertonie, sowie Vorhofflimmern, Herzinsuffizienz, Koronare Herzkrankheit und Herzbeschwerden jeglicher Art. Fettstoffwechselstörung enthält Adipositas, Hypercholesterinämie und Hypertriglyzeridämie.

**Tab. 35:** Übersicht über die prozentuale Einteilung der Vorerkrankungen

	<b>CSA</b>	<b>GSAS</b>	<b>p.a.H.</b>	<b>s.a.H.</b>
Schlaganfall	50% (n=9)	27,3% (n=3)	0	0
Encephalitis	11,1% (n=2)	0	0	0
Leukencephalopathie	0	18,2% (n=2)	0	0
Fettstoffwechselstörung	44,4% (n=8)	63,4% (n=7)	100% (n=2)	0
Herz-Kreislauf- Erkrankungen	61,1% (n=11)	72,7% (n=8)	100% (n=2)	50% (n=1)
Medikamente(Morphium)	5,6% (n=1)	0	0	0
Parkinson	5,6% (n=1)	0	0	0
Epilepsie	5,6% (n=1)	18,2% (n=2)	0	0
Muskel/Skelett- Erkrankungen	5,6% (n=1)	0	0	100%(n=2)
Diabetes mellitus	16,7% (n=3)	9,1% (n=1)	0	0
Hydrocephalus	5,6% (n=1)	0	0	0

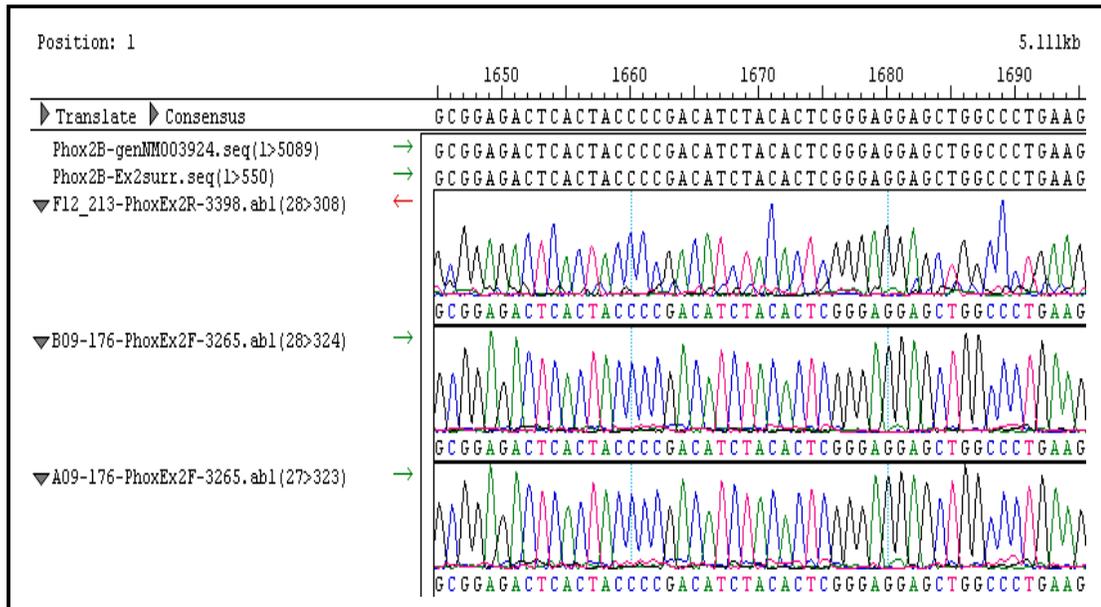
## II. Analyse ermittelter Sequenzvarianten

Die Sequenzen konnten zu Zwecken der Mutations – und Polymorphismen-Analyse des PHOX2B-Gens, mithilfe des Programms „*Seqman*“ miteinander und mit einer Referenzsequenz verglichen werden. Diese Methode ermöglicht die Ermittlung von Sequenzvariationen bei einzelnen Patienten. Wenn es sich um einen einzelnen Basenaustausch handelt, lässt sich dieser mithilfe der Datenbank dbSNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)) überprüfen. Wenn diese Sequenzveränderung in der SNP Datenbank aufzufinden ist, handelt es sich um einen Polymorphismus. Er stellt eine Sequenzveränderung dar, die bei einigen Individuen einer Population vorhanden ist, jedoch keine pathologischen Folgen nach sich zieht. In der Datenbank wird allen bekannten SNPs eine Referenznummer zugeordnet. Bei einigen findet man auch Angaben über die Allelfrequenz, die die Häufigkeit der einzelnen Allele in der entsprechenden Population angibt.

In der vorliegenden Arbeit wurden auf der Suche nach möglichen Mutationen und Polymorphismen Exons 1, 2 und 3 des PHOX2B-Gens sequenziert. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf Exon 3 gelegt, da dort, wie schon erwähnt, in vielen Studien Abweichungen von der Normalsequenz gefunden worden sind.

## III. Ergebnisse der Mutationsanalyse

Das Patientenkollektiv bestand aus 33 Probanden, von denen 18 diagnostisch zum zentralen SAS, 11 zum gemischten SAS, 2 zur primären alveolären und 2 zur sekundären alveolären Hypoventilation eingeordnet werden konnten. Bei der Sequenzanalyse des PHOX2B-Gens, wurde ein stummer Polymorphismus gefunden, der jedoch keinen Aminosäureaustausch zur Folge hatte, da der Basenaustausch nicht in der ersten, sondern in der dritten Position des Triplets stattgefunden hatte. Der Polymorphismus 870 C>A, p.P290P wurde bei NCBI als bekannt identifiziert und trägt die Referenznr. rs17885864. Er wurde erstmalig von Matera et al. 2004 beschrieben. Der Polyalaninrepeat selbst stellt einen „*deletion/insertion polymorphism*“ mit unbekannter Allelfrequenz dar und trägt die Referenznr. rs17879189.

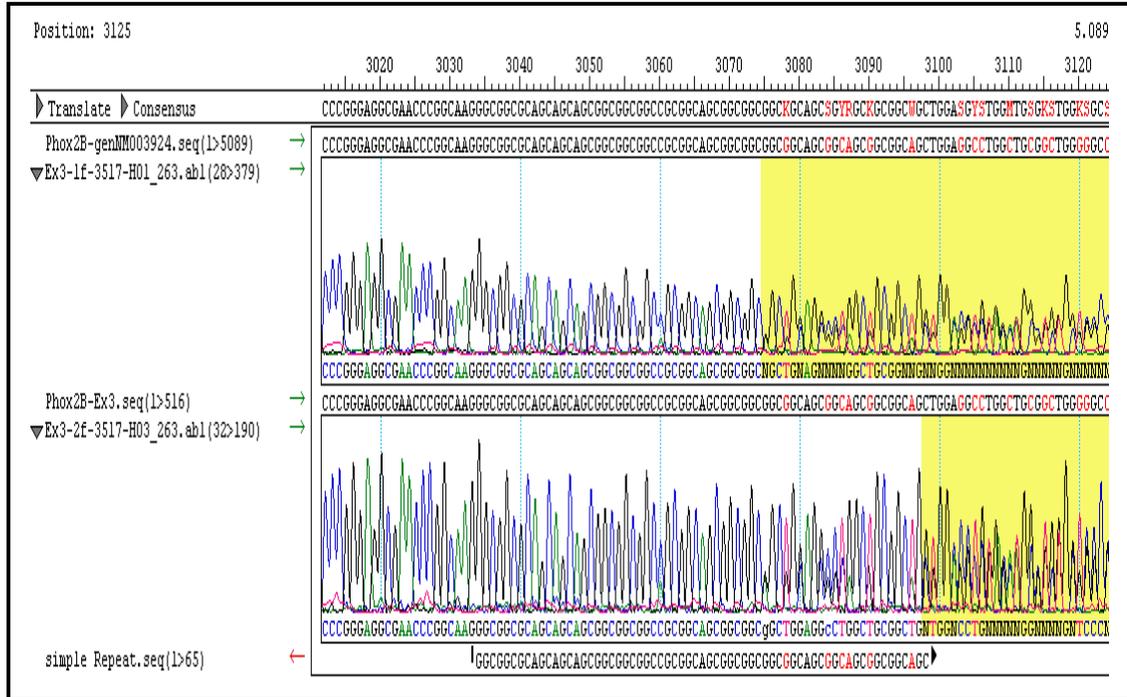


**Abb. 16:** Direktsequenzierung (PHOX2B, Exon 2), unauffällige Sequenz von Patienten 3398 und 3265. Der Rote Pfeil steht für die Rückwärts-Richtung, der grüne für die Vorwärts-Richtung.

Von primärem Interesse für diese Arbeit war die Länge des Polyalanin-Repeats. Diese wurde auf folgendem Wege bestimmt: Es wurde die Anfangssequenz GGCGGC des Repeats aufgesucht. Dann wurde die Anzahl der Alanine (GCX) bis zum Ende des Repeats durchgezählt. Die Hetero- bzw. Homozygotie wurde bestimmt, indem man die Sequenz des Partnerstrangs auf derselben Länge (überall dort, wo zwei Peaks zu finden waren) identifizierte und den unteren Peak statt des oberen mitberechnete. Auf diese Weise erhielten wir als Ergebnis, dass alle Patienten bis auf drei, heterozygot waren. Patienten 3398 und 3381 waren homozygot 20/20 und Patient 2489 war homozygot 9/9.

**Tab. 36:** Übersicht über die Repeatlängen

<b>Pat.-Nr.</b>	<b>Repeatlänge</b>
2342	9+20
2419	9+20
2466	9+20
2489	9+9
2507	9+20
2511	9+20
2692	9+20
2706	9+20
3236	9+20
3265	9+20
3338	9+20
3381	20+20
3388	9+20
3398	20+20
3410	9+20
3412	9+20
3424	9+20
3459	9+20
3463	9+20
3517	9+20
3579	9+20
3602	9+20
4061	9+20
4063	9+20
4080	9+20
4083	9+20
4084	9+20
4091	9+20
4092	9+20
4093	9+20
4094	9+20
4095	9+20
4158	9+20



**Abb. 17:** Direktsequenzierung (Phox2B, Exon 3), exemplarische Darstellung des Polyalanin-Repeats von Patient 3517.

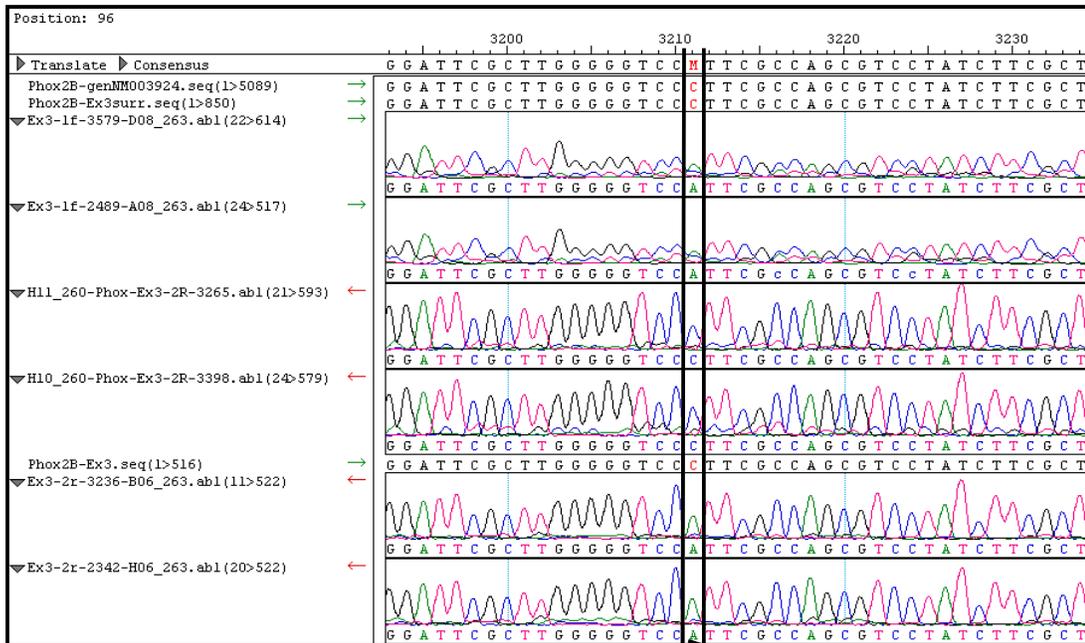
**Tab. 37:** Sequenzvariante des rs17885864 im PHOX2B-Gen

Pat.-Nr.	Diagnose	Exon1	Exon 2	Exon 3
2342	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P homozygot
2419	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
2466	GSAS	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
2489	GSAS	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
2507	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
2511	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
2692	GSAS	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
2706	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
3236	p.a.H.	-	-	c.870 C>A p.P290P homozygot
3265	GSAS	-	-	-
3338	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
3381	GSAS	-	-	-

3388	GSAS	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
3398	p.a.H.	-	-	-
3410	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P homozygot
3412	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
3424	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
3459	GSAS	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
3463	s.a.H.	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
3517	s.a.H.	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
3579	GSAS	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
3602	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
4061	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
4063	GSAS	-	-	-
4080	CSA	-	-	-
4083	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P homozygot
4084	GSAS	-	-	-
4091	GSAS	-	-	-
4092	CSA	-	-	-
4093	CSA	-	-	c.870 C>A p.P290P heterozygot
4094	CSA	-	-	-
4095	CSA	-	-	-
4158	CSA	-	-	-

Polymorphismus	Probandenanzahl			
	GSAS (n=11→	CSA (n=18→	p.a.H.(n=2→	s.a.H. (n=2→
<b>c.870 C&gt;A, p.P290P</b>				
	33,3%)	54,5%)	6,1%)	6,1%)
homozygot	0	16,6% (n=3)	50% (n=1)	0
heterozygot	54,5% (n=6)	61,1% (n=11)	0	100% (n=2)

**Tab 38:** Anteile der jeweiligen Gruppen



**Abb. 18:** Direktsequenzierung (PHOX2B, Exon3), exemplarische Darstellung des SNP rs17885864. Sichtbar innerhalb der Markierung. Man sieht sowohl die Basenabfolge CCC, wie auch CCA, die beide für die Aminosäure Prolin kodieren, somit ergibt sich ein stummer Polymorphismus. Da die A- und C-Peaks z.B. bei Patienten 3579 und 2489 untereinander liegen, handelt es sich um eine heterozygote Variante. Bei Pat. 3236 und 2342 liegen einzelne A-Peaks vor, also sind sie homozygot.

Zum Vergleich sieht man, dass bei Patient 3265 und 3398 die normale Basenfolge CCC vorliegt, da nur ein C-Peak vorhanden ist. Somit ergibt sich hier kein Polymorphismus.

**Tab. 39:** Farb- und Abkürzungsverzeichnis zu den Abb. der Direktsequenzierung

Farbe	Base	Abkürzung
Blau	Cytosin	C
Schwarz	Guanin	G
Grün	Adenin	A
Rot	Thymin	T

## **E. Diskussion**

### **I. Auswertung der erfassten Parameter**

Bei der Betrachtung der in dieser Studie erfassten demographischen, klinischen und polysomnographischen Parameter fällt auf, dass sich diese überwiegend mit den Literaturangaben decken.

Die Geschlechterverteilung zeigt, dass die Männer in allen Krankheitsgruppen eine deutliche Mehrheit bilden und insgesamt 90,9% ausmachen. Beim zentralen Schlafapnoe-Syndrom sind 94,4% Männer und beim gemischten bilden sie 90,9%, was sich auch mit den Literaturangaben deckt, da besonders beim obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom das männliche Geschlecht überwiegend betroffen ist (Caylak 2009). Bei den beiden Gruppen der alveolären Hypoventilation ist es aufgrund der geringen Probandenzahl nicht so deutlich, aber auch bei den Patienten mit primärer alveolärer Hypoventilation, also mit LOCHS, das ja zum CCHS gehört, weiß man, dass der Anteil der betroffenen Männer überwiegt (Amiel et al. 2009).

Wenn man das Alter betrachtet, so sieht man ebenfalls die von der Literatur beschriebenen Angaben, dass mit dem steigenden Alter die Prävalenz von jeglichen schlafbezogenen Störungen zunimmt, es sind nämlich 50% aller über 65-Jährigen betroffen. Punjabi (2008) schreibt, dass in einer Studie 70% der Männer und 56% der Frauen zwischen 65 und 99 Jahren an einem OSAS litten, mit definiertem AHI  $\geq 10$ . Beim CSA ist jeder 4. über 60 betroffen (<http://www.awo-dillenburg.de/book/export/html/143>). So ist das von uns registrierte Durchschnittsalter von CSA 67,7 mit einer Standardabweichung von  $\pm 9,16$  Jahren und von GSAS 58,9 mit einer Standardabweichung von  $\pm 15,92$  Jahren, den Angaben entsprechend. Bei der p. a. H. sind die Patienten wesentlich jünger, da sich die Erkrankung im jungen bis mittleren Alter äußert. Dieses sieht man auch am Durchschnittsalter von 47 mit einer Standardabweichung von  $\pm 2,83$  Jahren. Die s. a. H. kann prinzipiell in jedem Alter auftreten, da es darauf ankommt, wann es zu der Grunderkrankung kommt. In unserem Fall betrug das Durchschnittsalter 50 Jahre.

Das Gewicht, welches über den *Body-Mass-Index* erfasst wird, spielt bekanntlich eine führende Rolle als Risikofaktor beim CSAS und OSAS. Patel et al. (2008) bewiesen in ihrer

Studie, dass Übergewicht (BMI  $>2,5\text{kg/m}^2$  über dem Normalwert bei Männern bzw.  $1,8\text{kg/m}^2$  bei Frauen) zu verkürzter Schlafdauer von unter 5 Stunden und zur Schlafapnoe führt. Auch viele andere Studien bestätigen die Assoziation mit Adipositas als Risikofaktor. Bei unseren Patienten lag der Durchschnitts-BMI der CSA-Patienten bei  $28,7\text{kg/m}^2$  mit einer SD von  $\pm 5,05$ . Der BMI der GSAS-Patienten war um einiges höher, nämlich  $35,04\text{kg/m}^2$  mit einer SD von  $\pm 13,67$ . Dieses ist damit vereinbar, dass die Assoziation von Adipositas mit dem OSAS besser belegt ist als die mit dem CSAS. Der BMI bei den Patienten mit p. a. H. ist mit  $26,25\text{kg/m}^2$  und einer SD von  $\pm 1,2$  nicht wesentlich erhöht, da Adipositas bei diesem Krankheitsbild auch keinen Risikofaktor darstellt. Der BMI der Patienten von s. a. H. ist mit  $17,35\text{kg/m}^2$  sogar unterdurchschnittlich. Dieses lässt sich dadurch erklären, dass Muskelatrophie und Bewegungseinschränkung durch Skelettdeformitäten Gewichtsverlust zur Folge haben können.

Wenn man die Schlafparameter aller Gruppen betrachtet, so sieht man, dass die Schlafeffizienz bei allen nicht optimal ist, da der Schlaf fragmentiert ist und durch häufige Arousals unterbrochen wird. Auffällig ist, dass sowohl die Schlafeffizienz sowie auch die Zusammensetzung der Schlafphasen sich in zwei Gruppen aufgliedern lassen. Bei CSA und GSAS ist der Schlaf wesentlich ineffizienter und es wurden wesentlich längere Wachphasen registriert. Bei p. a. H. und s. a. H. ist die Schlafarchitektur positiver, da die Atemstörungen nur eine milde Form haben. Die p. a. H. zeichnet sich generell durch eine abgeschwächte Form aus und die s. a. H. hat die Atemstörung als Folge einer muskulären und skeletteren Erkrankung. Der Anteil des REM-Schlafes variiert entsprechend des Krankheitsbildes.

Bei der Analyse der Atemparameter richtet sich das Interesse insbesondere auf den AHI und die Anzahl der zentralen Apnoen. Dabei sieht man, dass alle von uns erfassten AHI  $>5$  liegen, was die Schwelle zum physiologischen Wert darstellt. Genauso wie bei der Schlafarchitektur sieht man auch hier einen wesentlich deutlicher ausgeprägten Schweregrad beim CSA und GSAS ( $47,99 \pm 28,27$  bzw.  $44,01 \pm 24,77$ ) während die beiden anderen Gruppen leicht pathologische Werte aufweisen ( $6,95 \pm 2,19$  bzw.  $9,5 \pm 0,71$ ). Die Anzahl der zentralen Apnoen entspricht ebenfalls der jeweiligen Erkrankung und ist somit beim reinen CSA mit  $98,94 \pm 175,44$  am höchsten, gefolgt von der gemischten Form mit

49,27 ± 46,2. Bei der milden primären Hypoventilation beträgt sie 7,5 ± 0,71 und bei der sekundären gibt es so gut wie gar keine zentralen Apnoen (1,5 ± 0,71).

Die Betrachtung der Sauerstoffsättigungswerte zeigt, dass es in keiner Krankheitsgruppe zu relevanten mittleren Sättigungsabfällen gekommen ist. Die mittlere Sauerstoffsättigung liegt bei allen um 90%, was zu Literaturangaben passen würde, die insbesondere beim CSA von keinen starken Entsättigungen sprechen (Yumino et al. 2007). Trotzdem ist der ODI wie die vorherigen Parameter auch, beim CSA und GSAS wesentlich höher als bei der primären und sekundären alveolären Hypoventilation (33,87 ± 28,82 bzw. 30,55 ± 18,36 gegen 4 ± 0,42 bzw. 0,85 ± 0,07), was darauf hinweist, dass es doch zu relevanten Entsättigungen gekommen sein muss, die unter der mittleren Sättigung lagen.

## **II. Analyse der Risikofaktoren**

Wie schon in der Einleitung beschrieben, gibt es eine ganze Reihe von prädisponierenden, wenn nicht sogar ursächlichen Faktoren, die zu einem CSA führen können. Im Ergebnisteil wurden diese in Gruppen zusammen gefasst, um die Auswertung zu erleichtern.

Ein sehr wichtiger Faktor, der beim CSA mit 50% und beim GSAS mit 27,3% repräsentiert war, ist Schlaganfall. Dieses ist verständlich, wenn man bedenkt, dass dieser die Zentren der Atemregulation befallen könnte. Der Zusammenhang zwischen Schlaganfällen und mit dem Schlaf verbundenen Atemstörungen, insbesondere zentralen Apnoen wurde schon vielfach untersucht und bestätigt. Z.B. kamen Hermann et al. (2009) in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass bei 50-70% der Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall Schlafapnoen, definiert mit einem AHI  $\geq 10$ , auftreten. Hierbei fand CSA sich besonders bei bilateralen Insulten mit Bewusstseinstörung und/oder Herzversagen. Die betroffenen Gebiete beinhalteten meist Zentren autonomer Regulation, wie z.B. die Insula und den Thalamus. Bei diesen Patienten trat im Verlauf eine Besserung ein. Was den Schweregrad des Schlaganfalles betrifft, so fand sich keine Korrelation zum Auftreten von SAS. Interessanterweise fanden NorAdina et al. (2006) heraus, dass Diabetes mellitus und vorausgegangener Nikotinkonsum wichtige Risikofaktoren für die Entstehung eines SAS (AHI  $\geq 15$ ) infolge eines Insultes darstellen. Dies führten sie auf mehrere Faktoren zurück. Bei Diabetes könnte es zum einen infolge von autonomer Neuropathie zu Veränderungen der zentralen Chemorezeptoren kommen. Zum Anderen könnte die kardiovaskuläre Dysfunktion, die oft bei

Diabetes auftritt und Linksherzversagen zur Folge hat, dafür verantwortlich sein, dass die verlängerte Kreislaufzeit zu Verzögerungen der Feedback-Kreisläufe von CO<sub>2</sub> und Sauerstoff führt, wobei hier die Chemorezeptoren im Gehirn und Herz betroffen sein könnten. Was das Rauchen betrifft, so wird der Effekt damit erklärt, dass dabei die endothelabhängige Vasodilatation nicht mehr erreicht werden kann. Diabetes war mit 16,7% unter den CSA-Patienten und mit 9,1% unter den GSAS-Patienten vorzufinden.

Auch die Rolle einer Encephalitis bedarf keiner besonderen Erklärung, da auch hier die Zentren der Atemregulation befallen werden können. Von unseren Patienten wiesen 11,1% der CSA-Gruppe eine Virusencephalitis in der Krankengeschichte auf, wobei der Hirnstamm betroffen war. Diese Kondition wurde z.B. von Thalhofer et al. (2007) erwähnt. Auch die Rolle der vom zur Gattung der Polyomaviren gehörendem JC-Virus hervorgerufenen Leukoencephalopathie, an der 18,2% der GSAS-Patienten erkrankt waren, lässt sich genauso durch den Befall von autonomen Zentren erklären. Da dies jedoch eine Erkrankung des ganzen ZNS ist, können auch motorische Störungen auftreten, was zu einem OSAS-Bild aufgrund von kollabierenden Atemwegen, führen kann.

Die wichtige Rolle von Adipositas wurde bereits erwähnt. Auch im vorliegenden Patientenkollektiv spiegelt sich dieser Faktor sehr stark wieder: 44,4% der CSA-, 63,4% der GSAS-, und alle Patienten mit p. a. H. litten an Adipositas, Hypertriglyzeridämie und/oder Hypercholesterinämie. Die höhere Prävalenz in der GSAS-Gruppe lässt sich wieder durch die stärkere Assoziation von Adipositas und OSAS erklären.

Auch der Faktor Herz-Kreislauf ist nicht minder relevant. 61,1% der CSA-, 72,7% der GSAS-, alle p. a. H. und einer von 2 s. a. H.-Patienten wiesen hierbei Auffälligkeiten auf. Dabei wurden in diese Gruppe Hypertonie, Herzinsuffizienz, Angina pectoris und Vorhofflimmern eingeordnet. Auch dieser Faktor wurde schon von vielen Studien belegt. Z.B. haben Bitter et al. (2009) erstmals festgehalten, dass neben dem schon bekannten OSA, CSA sehr oft bei Patienten mit AF vorkommt. Von allen Patienten mit AF, hatten 74% ein SAS (AHI  $\geq$ 5). Davon waren 43% OSA und 31% CSA. Die Betroffenen mit CSA wiesen einen höheren systolischen pulmonalarteriellen Druck, einen höheren Durchmesser des linken Ventrikels, einen höheren AHI und einen niedrigeren PCO<sub>2</sub> als OSA-Patienten auf.

Man erklärt sich das vermehrte Auftreten von CSA bei AF mit der aus dem Vorhofflimmern resultierenden diastolischen Dysfunktion, die zu einem erhöhten pulmonalkapillären Druck führt.

Ulrich et al. (2008) beschäftigten sich mit dem Zusammenhang zwischen pulmonaler Hypertension und auftretenden Schlafapnoen und fanden heraus, dass dieser Faktor sehr stark mit einer verminderten Schlaffeffizienz von 70%, Sauerstoffsättigungen <90% und mit zentralen Apnoen vergesellschaftet ist. Yumino et al. (2007) führten eine Studie durch, in der Patienten mit Linksherzversagen auf das Vorliegen von SAS untersucht wurden. Dabei wurde eine klare Assoziation mit der Cheyne-Stokes-Atmung augenscheinlich. Diese Patienten zeigten sich hypokapnisch, mit einem nah an der Apnoeschwelle liegendem PCO<sub>2</sub> und einer Neigung zu Hyperventilation. Dieses lässt sich mit der Stimulation der pulmonalen Rezeptoren durch die Lungenstauung erklären. Die Sensitivität der Chemorezeptoren ist dabei erhöht, die cerebrale Perfusion vermindert und es kommt zu vermehrten Arousals.

Die beschriebenen Faktoren – Fettstoffwechselstörungen, Hypertension und Diabetes mellitus bilden zusammen das metabolische Syndrom, welches als ein ausschlaggebender Risikofaktor angesehen werden kann. Dieses wurde unter anderem von Jean-Louis et al. (2008) untersucht und insbesondere für OSAS, aber auch für SAS allgemein bestätigt.

Wie schon erwähnt, kommt es bei bestimmten Medikamenten, insbesondere bei Opiaten zu zentralen Schlafapnoen. In unserem Kollektiv fand sich eine Patientin mit diesem ursächlichen Faktor. Sie erhielt aufgrund eines chronischen Schmerzsyndroms eine Morphin-Therapie und zeigte 535 zentrale Apnoen in der beobachteten Schlafperiode.

Von den neuromuskulären bzw. skelettären Erkrankungen war ein Patient mit CSA und alle aus der Gruppe der sekundären alveolären Hypoventilation betroffen. Der CSA-Patient litt an der hereditären moto-sensorischen Neuropathie, die auch als Charcot-Marie-Tooth-Syndrom (CMT) bezeichnet wird. Dematteis et al. (2001) fanden, dass pharyngeale Neuropathie das Bindeglied zwischen dem CMT und einem erhöhten Risiko eines schweren SAS darstellt. Bei den Patienten zeigten sich periodische Entsättigungen in Verbindung mit zentralen Apnoen. Dabei trat vermehrt Hyperkapnie auf. Veränderte Chemosensitivität und

inadäquate Atemantwort auf CO<sub>2</sub> könnten auch einen wichtigen Pathomechanismus darstellen.

Die Patienten mit s. a. H. litten an Muskeldystrophie aufgrund von einer Glykogenose Typ II (adulte Form des Morbus Pompe) und Kyphoskoliose. Bei der Glykogenose Typ II kommt es aufgrund von einer defekten lysosomalen  $\alpha$ -Glukosidase zu Glykogenablagerungen in der Muskulatur, wobei besonders die Atemmuskulatur und die rumpfnaher Skelettmuskulatur betroffen sind. Aus diesem Krankheitsbild und der veränderten Lungenlage bei der Kyphoskoliose erklären sich die Atemschwierigkeiten. Eckert et al. (2007) erwähnen in ihrer Arbeit den Zusammenhang zwischen Myopathien und Kyphoskoliose und hyperkapnischem CSA. Auch Kryger et al. (1991) beschreiben das Auftreten eines CSA bei zwei Schwestern (25 und 33 Jahre alt) mit einer angeborenen Muskeldystrophie und Kyphoskoliose. Betont wird hierbei, dass das Ausmaß der Atemstörung weit über das einer reinen Muskeldystrophie hinausging, so dass diese nicht als einzige Ursache dafür in Betracht kommen konnte.

### **III. Auswertung der genetischen Analyse**

Wie bereits erwähnt, war der Grund für die Sequenzierung des PHOX2B-Gens die in zahlreichen Studien bestätigte Tatsache, dass dieses bestimmte Veränderungen in Exon 3 aufweist, die sich unter anderem im Krankheitsbild eines CCHS bzw. LO-CHS, aber auch Tumoren des sympathischen Nervensystems bemerkbar machen. Am häufigsten waren es heterozygote Mutationen, die zu Verlängerungen des 20 Polyalanin-Repeats auf +5 bis +13 Alanine führten. Es fanden sich aber auch zahlreiche andere Mutationen und ein von Matera et al. 2004 beschriebener stummer Polymorphismus 870 C>A, p.P290P. Bei uns fanden sich keine Repeatveränderungen und keine Mutationen, aber der schon bekannten Polymorphismus. Dieser war bei den CSA-Patienten in 61,1% hetero- und in 11,1% homozygot. Von den GSAS-Patienten waren 54,5% heterozygot. Einer von den p. a. H.-Patienten wies eine homozygote Variante auf und von den s. a. H.-Patienten waren beide heterozygot.

Wie schon in der Einleitung beschrieben, spielt der Transkriptionsfaktor Phox2b als Produkt des Gens eine zentrale Rolle in der Entwicklung des autonomen, aber auch zentralen Nervensystems. In allen autonomen Ganglien sowie auch im Nebennierenmark findet die

Expression statt. Die einzige Ausnahme bilden die sympathischen präganglionären Neurone des Rückenmarks und Motoneurone der Atemmuskulatur, da diese in ihrem Transkriptionscode mehr den somatischen Motoneuronen ähneln (Dubreuil et al. 2009, Amiel et al. 2009). Besonders wichtig ist die Expression von PHOX2B aber im retrotrapezoiden Nukleus (RTN), welcher CO<sub>2</sub>-sensible Neuronen enthält und somit den Ort des Atemantiebes darstellt, und in einer ihn überlappenden parafazialen respiratorischen Neuronengruppe (pFRG), die für die Herstellung des Atemrhythmus in einigen Situationen, wie z.B. bei der Geburt, verantwortlich ist (Dubreuil et al. 2009). Andere wichtige Expressionsorte sind das Ganglion nodosum, welches die Zellkörper der pulmonalen Dehnungsrezeptoren enthält, das Ganglion petrosum, welches den Karotiskörper innerviert und im Nukleus tractus solitarius, welcher chemo- und barosensorische Information verarbeitet (Dubreuil et al. 2009). Auch der pre-Bötzinger Komplex, welcher eine zentrale Komponente in der Generierung des Atemrhythmus darstellt, und einige pontine und medulläre Nuklei, von denen ein atemmodulierender Einfluss bekannt ist, weisen PHOX2B-positive Neurone auf. Versuche mit Knockout-Mäusen wurden dadurch erschwert, dass die homozygoten Null-Mutanten schon *in utero* an Herzversagen verstarben. Heterozygote Mutanten wiesen verschieden starke Ausprägungen von Atemstörungen auf. Dubreuil et al. (2009) beschreiben auch die sogenannte „*specialized chemoreceptor theory*“, die dadurch bestätigt wird, dass Mutationen im PHOX2B-Gen die Zentren der CO<sub>2</sub>-Sensitivität ausschalten, ohne dabei andere atemrelevante Zentren zu beeinträchtigen. Solche CO<sub>2</sub>-sensible Zentren sind insbesondere der RTN und die Raphe-Kerne, hierbei insbesondere die serotonergen, die sich alle auf der Vorderseite der Medulla oblongata befinden. Versuche mit Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass sich bei Mutanten keine Antwort auf Hyperkapnie auslösen ließ, dass die arterielle Sauerstoffsättigung niedrig war und dass die Anzahl der PHOX2B-exprimierenden Neurone im RTN um 85% vermindert war. Die Raphe-Kerne jedoch waren vollkommen unauffällig (Dubreuil et al. 2009). Außerdem war die Schlafapnoe-Zeit um das 6-fache erhöht und die Atemfrequenz im Schlaf um 20% vermindert (Amiel et al. 2009).

Wie schon beschrieben, überlappt der RTN mit der pFRG, die für die Generierung des Atemrhythmus zuständig und auch PHOX2B-positiv ist. Sie ist an das pre-Bötzinger-Zentrum gekoppelt und verantwortlich für die aktive Expiration. Nachgewiesenerweise ändern der RTN sowie auch die pFRG ihre Funktion mit dem Übergang von der perinatalen zur erwachsenen Periode des Lebens, wodurch die starke Vermutung geäußert werden kann,

dass PHOX2B für das Einsetzen der Atmung bei der Geburt verantwortlich sein könnte. Dieses wird dadurch gestützt, dass das Neugeborene in schweren Fällen des CCHS keinerlei Atemantrieb zeigt (Amiel et al. 2009).

Dubreuil et al. (2009) haben auch in Bezug auf die evolutionsgenetische Entwicklung eine höchst interessante Vermutung geäußert. Auffällig ist, dass PHOX2B an Stellen der autonomen Atemregulation exprimiert wird, die phylogenetisch älter ist als die somatische Atemkontrolle, wie z.B. die respiratorische Muskulatur, die ja PHOX2B-negativ ist. Bei der Betrachtung der Informationsfortleitung über arterielle Sauerstoff- und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen, zeigt sich eine ununterbrochene Kette aus vier Gliedern, die alle PHOX2B exprimieren – Glomus caroticum, Ganglion petrosum, Nucleus tractus solitarius und der RTN.

Ziel dieser Arbeit war es, bei klinisch und polysomnographisch bestätigten CSA-, GSAS-, p. a. H.- und s. a. H.-Patienten mögliche Veränderungen der genetischen Sequenz des *paired-like homeobox 2b*-Gens zu finden, einem Gen, das bisher nur im Zusammenhang mit der Pathogenese von CCHS, LO-CHS, Morbus Hirschsprung und Tumoren des sympathischen Nervensystems genannt wurde.

Es ließen sich, bis auf den schon beschriebenen stummen Polymorphismus 870 C>A, p.P290P, in keinem der drei kodierenden Exons Abweichungen finden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten vorerst keinen Hinweis auf eine das zentrale Schlafapnoe-Syndrom krankheitsverursachende Mutation im PHOX2B-Gen geben oder die Diagnose der primären alveolären Hypoventilation bzw. des LO-CHS auf genetischer Ebene bestätigen. Das negative Ergebnis schließt die Diagnose LO-CHS bei diesen beiden Patienten jedoch nicht aus, da nur ein Teil der betroffenen Patienten eine Mutation aufweist. Bei der Analyse dieser Arbeit sollte man auch bedenken, dass das Patientenkollektiv zu klein war, um eine definitive Aussage über den möglichen Zusammenhang zwischen PHOX2B und dem CSA machen zu können. Eine größere Patientenzahl würde das Ergebnis der Untersuchung erheblich verschärfen. Weiterhin wäre es sinnvoll, die Auswahlkriterien für die CSA-Patienten einzuschränken, indem man typische Risikofaktoren wie Schlaganfall oder Herzinsuffizienz ausschließt. Dadurch würde man die Wahrscheinlichkeit, eine genetische Ursache zu finden, wesentlich erhöhen.

#### **IV. Mögliche weitere Kandidatengene für das zentrale Schlafapnoe-Syndrom**

Da in dieser Arbeit leider kein Hinweis auf eine Assoziation zwischen CSA mit Veränderungen vom PHOX2B-Gen gefunden werden konnte, werden im Folgenden weitere Kandidatengene, die als Ursache für das CSA in Betracht kommen könnten, diskutiert. Diese könnten auch als Anstoß für weitere Arbeiten in diesem Bereich dienen.

Die ausgewählten Gene beziehen sich auf die Faktoren Schlaf- und Atemkontrolle, sowie Übergewicht. Die anderen Risikofaktoren wurden ausgeschlossen, da z.B. beim Schlaganfall noch keine genetischen Ursachen gefunden werden konnten (Matarin et al. 2009) und die Betrachtung möglicher Kandidatengene für Herzversagen und Vorhofflimmern den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde.

##### **1. Mögliche Kandidatengene für die Atemkontrolle**

Wie schon im Verlauf dieser Arbeit beschrieben, ist die Atemkontrolle sehr komplexen Prozessen unterworfen, für die viele verschiedene Gene zuständig sind. In Folgenden soll auf einige, besonders wichtige eingegangen werden.

Das RET-Protoonkogen gehört zur Familie der Cadherine und kodiert für eine der Rezeptor-Tyrosinkinasen, die für die Signalübertragung in der Zelle bezüglich von Wachstum und Differenzierung verantwortlich sind. Das Gen spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Neuralleiste und ist sehr der onkogenetischen Aktivierung durch zytogenetische Veränderungen unterworfen. Die Assoziation zwischen dem sogenannten Haddad Syndrom (CCHS mit Morbus Hirschsprung) mit Mutationen im RET Protoonkogen wurde schon in vielen Studien bestätigt. Fitze et al. (2003) bestätigen diesen Zusammenhang ebenfalls und fügen hinzu, dass es außerdem Patienten mit CCHS ohne Morbus Hirschsprung gibt. Dazu beschreiben sie eine Patientin mit CCHS und Epilepsie jedoch vollkommen ohne intestinale Beschwerden. Bei der Analyse ihrer RET-Sequenz fand sich ein Austausch C>A in Position ds +54 in Intron 12, welchen die Betroffene von ihrem asymptomatischen Vater vererbt bekommen hatte und ihr gesunder Bruder ebenfalls aufwies. Daraus lässt sich vermuten, dass das RET-Onkogen auch direkt an der Atemkontrolle bzw. der Chemosensibilität der Rezeptoren beteiligt ist. Offensichtlich sind Mutationen aber unterschiedlich penetrant.

Der *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und der *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) sind beide Liganden der RET-Tyrosinkinase und auch sie könnten potentielle Kandidaten darstellen, da beide für die Entwicklung der peripheren chemoafferenten Neurone, die für den Hypoxie bedingten Atemantrieb sorgen, verantwortlich und im Karotiskörper exprimiert sind. BDNF und GDNF-Mutationen führen zu erhöhter Apoptoserate der Neurone, zum Verlust der synaptischen Kraft und Plastizität, aber auch zu schwerer Atemdepression, zum Auftreten von Apnoen und zur Funktionseinschränkung der chemoafferenten Rezeptoren (Katz 2003).

Vom *Endothelin converting enzyme 1* (ECE1) ist ebenfalls eine Assoziation mit Morbus Hirschsprung, aber insbesondere auch mit Herzdefekten und autonomischer Dysfunktion bekannt. Dieses Gen ist an der proteolytischen Prozessierung von Endothelin-Vorformen in biologisch aktive Peptide beteiligt. Was das Endothelin (ET-1) selbst betrifft, welches für die Vasokonstriktion verantwortlich ist, so beschäftigten sich Kuwaki et al. (1999) mit seiner Funktion im Herz-Kreislauf- und Atmungssystem. Ihre Versuche mit Knockout-Mäusen von ET-1 und seinen Rezeptoren haben beeindruckende Ergebnisse gezeigt. Die Mutanten wiesen eine arterielle Hypertonie auf. Außerdem war der PCO<sub>2</sub> deutlich höher und der PO<sub>2</sub> deutlich niedriger als bei den gesunden Mäusen. Die Experimente haben gezeigt, dass es zu einer Sympathikus-Aktivierung kam, während eine adäquate reflektorische Vagusaktivierung als Antwort auf Hypoxie und Hyperkapnie ausblieb. Aus den eben beschriebenen Beobachtungen lässt sich eindeutig schließen, dass das ET-1 eine wichtige Rolle in der zentralen neuronalen Regulation von Blutkreislauf und Atmung spielt.

Yue et al. (2005) untersuchten das Serotonin-Transporter-Gen (5-HTT) bei 104 Patienten mit Schlafapnoe-Syndrom und fanden, dass diese eine signifikant höhere Allelfrequenz vom Allel 10 aufwiesen als die gesunde Kontrollgruppe. Dieses weist auf eine direkte Verbindung zur Pathogenese des SAS hin.

Auch die Kaskade der Transkriptionsfaktoren HASH-1-PHOX2A-PHOX2B könnte als mögliche stör anfällige Stelle hinzugezogen werden, da sie eine wichtige Rolle in der Entwicklung von definitiv und transient noradrenergen Neuronen spielt. De Pontual et al. (2003) führten eine Serie von Experimenten mit HASH-1 Knockout-Mäusen durch und fanden, dass die Anzahl der noradrenergen Neurone signifikant abnahm. Außerdem werden in dieser Arbeit 3 Patienten mit CCHS und heterozygoten HASH-1 Substitutions-Mutationen im höchst konservativen Sequenzbereich, was eine Ähnlichkeit zu

PHOX2B-Mutationen zeigt. Die Ergebnisse dieser Studie und die Tatsache, dass HASH-1 im zentralen wie im peripheren Nervensystem exprimiert wird, weisen darauf hin, dass dieses Gen an der autonomen Atemkontrolle beteiligt sein und durch Modifizierung der noradrenergen Neurone in der frühen Entwicklung des Stammhirns zum Phänotyp des CCHS führen könnte.

De Geus et al. (2005) beschreiben eine offensichtliche Heritabilität von Atemmustern, da der Vergleich von Geschwistern gezeigt hat, dass die Atemfrequenz sich tagsüber zu 40-50%, im Schlaf aber zu 81% deckt. In dieser Studie wird ebenfalls die verstärkte Transkription von bestimmten Genen während der Nacht beschrieben. Die Suche nach für die nächtliche Atmung verantwortlichen Genen, zeigte eine Konzentrierung auf in drei Loci – 10q26, 3q27 und 22q12. Die größte Ansammlung von Genen fand sich in auf 10q26, welcher GFRA1, ADORA2L, FGR2, EMX2 und HMX2 als respiratorisch verantwortliche Gene enthält. Auf 3q27 befanden sich die HTRC3-Serotoninrezeptor-Gene und auf 22q12 ADORA2A-Adenosinrezeptor-Gene. Alle diese Gene könnten in künftigen Studien noch genauer untersucht werden.

Auch Champagnat et al. (2009) beschäftigten sich mit Genen, die einen Einfluss auf die Atemkontrolle ausüben. Dabei betonen sie, dass die Homeobox-Gene (Hox-Gene) eine führende Rolle in der anteroposteriorer Strukturierung des Rhombencephalons und in der frühen Entwicklung des Neuralrohres spielen. Diese Hypothese wird durch eine ganze Reihe mit Genen dieser Gruppe durchgeführten Mausexperimenten bestätigt. Dabei fand sich, dass die Inaktivierung von Zinkfinger-Protein Krox20 (beim Menschen entsprechend *early growth response 2* (EGR2)) die pFRG-Aktivität, d.h. den Atemrhythmus, eliminiert wobei bei den neugeborenen Mäusen lebensbedrohliche Apnoen im Wechsel mit sehr niedriger Atemfrequenz auftraten. Kompletter Atemausfall trat auf, wenn das pre-Bötzinger-Zentrum betroffen und somit kein Atemantrieb vorhanden war. Hoxa2-Mutanten, bei denen die embryonale Entwicklung des Pons gestört war, präsentierten sich mit verändertem inspiratorischem Muster, jedoch weder mit Apnoen noch mit veränderter Atemfrequenz. Dasselbe Bild zeigte sich auch bei PHOX2A-Knockouts, bei denen die Anzahl der chemoafferenten Neurone im Ganglion petrosus verändert war. Dies wurde durch Eliminierung der Acetylcholinesterase und durch Verabreichen von Retinsäure am 7. Entwicklungstag erreicht. Retinsäure führte zu veränderter Pons-Entwicklung.

Interessanterweise wiesen die so behandelten Mäuse eine Art Cheyne-Stokes-Atmung auf, die sich in einem periodischen, hyperpnoeischen Atemmuster äußerte. All das ist richtungsweisend dafür, dass Hox-Gene die passenden Kandidaten sein könnten.

Branchi et al. (2005) erwähnen auch die wichtige Rolle des MafB-Gens, welches die Entwicklung der Neurone der Rhythmogenese im pre-Bötzinger-Zentrum zu beeinflussen scheint. Neugeborene Knockout-Mäuse verstarben nach wenigen Minuten mit Zyanose und ausgedehnten Apnoen, die nur durch kurzandauernde Schnappatmung unterbrochen waren.

Allem Anschein nach spielen auch Kalium-Kanäle bzw., die für sie kodierenden Gene, auch eine Rolle in der Atemregulation. Mäuse mit mutierten säuresensitiven Kalium-Kanälen (TASK-1) zeigten eine reduzierte Atemantwort auf Hypoxie und Hyperkapnie. Die Präparation des Karotiskörpers mit dem dazugehörigen Nerven präsentierte auch erniedrigte Potentiale als Antwort auf die o.g. Umstände und zwar um 49% bei Hypoxie und um 68% bei Hyperkapnie. Diese Ergebnisse weisen auf eine Rolle in der Atemkontrolle durch periphere Chemorezeptoren hin (Trapp et al. 2008). Auch TASK-2 sind maßgeblich in die Atemkontrolle involviert. Gastreau et al. (2010) entdeckten interessanterweise, dass diese Kalium-Kanäle nur in wenigen Hirnstamm-Nuclei, inclusive der retrotrapezoiden Region, aufzufinden sind. Auffällig war außerdem, dass alle TASK-2-positiven Neurone in CCHS-Patienten mit PHOX2B-Mutationen verloren waren. Knockout-Mäuse zeigten eine Hypersensitivität zu niedrigen CO<sub>2</sub>-Levels, so dass sie zu Hyperventilation neigten. Zusätzlich dazu fehlte die Langzeit-Hypoxie-bedingte Atemdepression während die akute Atemantriebssteigerung durch den Karotiskörper vorhanden war. Die bei der Präparation vom Hirnstamm und Rückenmark ebenfalls fehlende neuronale Antwort auf Anoxie ließ eine zentral bedingte Ursache des Phänotyps vermuten. Aufgrund der o.g. Beobachtungen postulierten Gastreau et al. (2010) Die Hypothese, dass TASK-2 einerseits für die Stabilisierung des Membranpotentials der Chemorezeptoren verantwortlich ist und andererseits ein wichtiger Faktor für die zentrale O<sub>2</sub>-Chemorezeption. Die physiologische Atemdepression als Antwort auf Hypoxie ließe sich auf diese Weise damit erklären, dass die bei Hypoxie entstehenden Sauerstoff-Radikale zu einer Aktivierung der TASK-2 führen, die dann ihrerseits die RTN-Neurone ausschalten.

Die o.g. Gene bieten nur einen kleinen Einblick in das komplexe System der Atemregulation und zeigen, dass man für die Erklärung von Atemstörungen viele verschiedene Gene und Faktoren in Betracht ziehen muss.

## 2. Mögliche Kandidatengen für Adipositas

Übergewicht, sowie das Metabolische Syndrom an sich, stellt einen sehr relevanten Risikofaktor für die Entstehung eines CSA dar, was man auch schon bei der Betrachtung des BMI und des Anteils an Hypertonie- und Diabeteskranken im Patientenkollektiv sieht. Aus diesem Grund werde ich im Folgenden auf einige wichtige Details, insbesondere auf die genetischen Hintergründe eingehen.

Familien und Zwillingsstudien haben gezeigt, dass genetische Faktoren zusätzlich zu Umwelteinflüssen zu 40-70% an der individuellen Ausprägung der Adipositas beteiligt sind und im Verlauf der Zeit wurden viele genetische Loci gefunden, von denen mindestens 15 eindeutig mit der Entstehung des Übergewichts assoziiert sind. Besondere Bedeutung fanden die Gene für den *melanocortin 4 receptor* (MC4R), die *prohormone convertase 1/3* (PCSK1), den schon erwähnte BDNF und den  *$\beta$ -adrenergic rezeptor 3* (ADRB3) (Loos 2009).

MC4R wird in vielen Bereichen des ZNS exprimiert und spielt eine zentrale Rolle bei der Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase. Seltene Mutationen in diesem Gen sind die häufigste Ursache für schwere kindliche Adipositas.

PCSK1 kodiert für ein Enzym, das Vorläufer der am Energie-Metabolismus beteiligten Hormone, in die biologisch aktive Form überführt. Mutationen führen ebenfalls zu kindlichem Übergewicht.

BDNF ist neben seinen anderen Funktionen, in Essverhalten, Gewichtsregulation und Hyperaktivität involviert. Mutationen sind, genauso wie bei den vorherigen Genen selten, führen jedoch zu Esssucht und extremem Übergewicht.

Die Arg64Trp Variante des ADRB3-Gens war das erste Gen, welches mit Adipositas assoziiert worden ist. Es ist in die Lipolyse und Thermogenese involviert. Mittlerweile wurden weitere relevante Gene entdeckt. Eins davon ist das 2007 von drei großen, voneinander unabhängigen Studien gefundene *fat mass and obesity associated gene* (FTO). Interessanterweise wurden im ersten Intron dieses Gens einige mit Diabetes Typ II assoziierte

Polymorphismen gefunden (Loos 2009). Die Risikoallelfrequenz des FTO beträgt bei Europäern 63%, 16% sind sogar homozygot dafür. Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass der Einfluss des veränderten FTO durch entsprechende Änderung der Lebensweise gemindert werden kann. FTO gehört zur Familie der Nonhäm-Dioxygenasen und kodiert für eine 2-Oxoglutarat abhängige Nukleinsäure-Demethylase, die die Demethylierung von 3-Methylthymine in einsträngiger DNA katalysiert. Es wird verbreitet im Gehirn exprimiert, insbesondere aber im Hypothalamus, welcher das energetische Gleichgewicht reguliert. Das Auftreten von Risikoallelen führt zu einer Appetitsteigerung, reduziertem Sättigungsgefühl und somit zu erhöhter Nahrungsaufnahme. Versuche mit Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass das Fehlen von FTO zu Gewichtsreduktion und Sympathikusaktivierung führt. Interessanterweise ist die spontane Bewegungsaktivität vermindert, die Nahrungsaufnahme aber erhöht (Loos 2009). Dies deutet darauf hin, dass das FTO-Gen den Körperbau durch Kontrolle des Energieverbrauchs beeinflusst.

Kennedy et al. (2010) haben eine sehr interessante Studie durchgeführt, indem sie mögliche Kandidatengene für das metabolische Syndrom im Mausmodell prüften. Knockout-Mäuse für Leptin und den Leptin-Rezeptor bestätigten die schon bekannte Schlüsselrolle des Leptins im Stoffwechsel. Sie litten an Fresssucht, extremer Adipositas und Hyperglykämie, die sich im Verlauf zu Insulinresistenz und Diabetes entwickelte. Schon 4 Wochen alte Mäuse waren übergewichtig und ihr Körperwachstum sistierte auch bis zu 12 Monaten nicht. Der Cholesterinspiegel war erhöht, jedoch aufgrund von erhöhtem HDL, was zu einem Schutz vor Artherosklerose führte. Diese Beobachtung lässt sich aber leider nicht bei Menschen mit Leptindefekten machen. Zusätzlich waren bei den Mäusen Infertilität sowieso Störungen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und Schilddrüsen-Achse zu vermerken. Die nächste Serie der Knockout-Mäuse hatte eine Agouti-Protein-Defizienz. Das Agouti-Protein kompetitiert im Gehirn mit dem *anorexigenic factor  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone* (MSH) um die Bindung an den Melanokortin-4-Rezeptor(MC4R). Diese Mäuse spiegelten Übergewicht aufgrund Esssucht und Bewegungsmangel wieder. Die Ergebnisse waren ähnlich den Leptin-Knockouts. Zusätzlich zeigten diese Mäuse ein erhöhtes Entartungsrisiko. Die MC4R-Mutanten wiesen anormales Fressverhalten, welches sich in einem voll ausgeprägten Metabolischen Syndrom äußerte.

Die Modulation des Neuropeptid Y führte zu einer verstärkten Triglyzerid-Produktion der Leber, die in einer VLDL-Sekretion resultierte. Auch weitere Knockout-Modelle mit

mutieren Apolipoprotein E-, LDL- und dem in Adipozyten produziertem Adiponectin-Genen zeigten den erwünschten Effekt einer Adipositas, aber auch der anderen Ausprägungen des Metabolischen Syndroms.

Offensichtlich sind die metabolischen Effekte aber auch an die Atmung gekoppelt, denn Volgin et al. (2006) fanden heraus, dass chronisch-intermittierende Hypoxie, wie die bei SAS-Patienten, zur Aktivierung der Stoffwechsels führt, an der adrenerge, leptinerge und inflammatorische Wege beteiligt sind. Dieses könnte ein Hinweis dafür sein, dass Leptin nicht nur für die Appetitregulation verantwortlich ist, sondern auch die Atemregulation beeinflusst.

Ein noch als letztes genannter Kandidat sollte unbedingt noch, die ebenfalls in der eben erwähnten Arbeit, beschriebene Janus-Kinase (JAK/STAT) sein. Diese gehört zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren und spielt als Signalegeber und Aktivator der Transkription vieler Stoffwechselwege eine wichtige Rolle in der hypothalamischen Stoffwechselkontrolle.

Die JAK wird in den hinteren Hypothalamus-Neuronen exprimiert und ihre Aktivierung in Zellen, die Neuropeptid Y, Präpro-Orexin und Proopiomelanocortin synthetisieren, ist leptingesteuert. Aus diesem Grund kommt es auch zu einem Funktionsverlust der JAK in Leptin-Knockout, was auch weitere, mit den gerade aufgelisteten Stoffen verbundenen Störungen, nach sich zieht. Da Orexin und Melanin-konzentrierendes Hormon (MCH) nicht nur in den Metabolismus, sondern auch in die Schlafkontrolle involviert sind, kommt es bei Mutationen der JAK sowie auch des Leptins, auch in diesem Bereich zu Pathologika. Orexin- und MCH-synthetisierende Neurone exprimieren nicht nur die JAK, sondern auch  $\alpha 2A$ - adrenerge Rezeptoren, deren Bedeutung ebenfalls näher untersucht werden sollte, da ihre Ligand-Bindungsfähigkeit in genetisch adipösen Mäusen vermindert ist und sich diese Rezeptoren in besonderem Ausmass im posterioren Hypothalamus finden.

Die beschriebenen Gene bilden wieder nur einen kleinen Teil der tatsächlichen Möglichkeiten ab, da sie sich auf die relevanteste Information beschränken. Ein besonderes Augenmerk sollte auf die Gene mit doppelter Funktion, wie die von Leptin, Orexin und Melanin-konzentrierendem Hormon geworfen werden, da diese eine Assoziation zu der Schlaf- und Atemkontrolle darstellen.

### 3. Kandidatengene für den Schlaf

Viele Schlafstörungen, wie Narkolepsie, OSAS und das Restless-Legs-Syndrom wurden bereits in Studien auf mögliche genetische Hintergründe untersucht und dabei ist es auch gelungen, einige bedeutende Gene auszumachen. Zwillingsstudien haben ergeben, dass 53% des Schlafverhaltens, wie z.B. das Einschlaf- und Durchschlafvermögen, vererbt werden, was die Wichtigkeit von genetischen Faktoren unterstreicht (Caylak 2009).

Besonders die Narkolepsieforschung hat, zumindest in Tierversuchen, dazu beigetragen, wichtige Gene für die Schlafregulation zu entdecken. Die Orexine (Hypocretine) spielen dabei eine Schlüsselrolle. Wie schon erwähnt, befinden sich die Orexin-synthetisierenden Neurone im lateralen Hypothalamusanteil, welcher den Nukleus suprachiasmaticus enthält, und sind für die Regulation des energetischen Gleichgewichtes, aber auch des Wachzustandes verantwortlich. Im Nucleus chiasmaticus werden die von den retinalen Ganglienzellen geschickten Signale verarbeitet. In diesen befindet sich das Melanopsin, welches die Lichtsignale transduziert (Raizen et al. 2006). Das Hypocretin-Gen (HCRT) ist auf Chromosom 17q21-22 lokalisiert (Caylak 2009, Raizen et al. 2006).

Auch auf dem Locus 4p13-q21 fanden sich mögliche Kandidatengene. Das sogenannte CLOCK-Gen (*circadian locomotor output cycles kaput gene*) und das GABRB1-Gen (*γ-aminobutyric acid receptor β1-gene*) scheinen für die Erhaltung des zirkadianen Rhythmus verantwortlich zu sein, den Mutationen führen unter anderem zu Verschiebungen der Schlafphasen (Raizen et al. 2006, Caylak 2009).

Ein anderes wichtiges Gen wurde bei der Erforschung des Vorverlagerten-Schlafphasen-Syndroms entdeckt. Dabei schlafen die Betroffenen sehr früh (19h) ein und wachen entsprechend früh (4.30h) auf. Der Grund für diese Schlafphasenverschiebung scheint eine Mutation im hPER2-Gen (*human period 2 peptide*) auf Chromosom 2 zu sein. Diese wurde bis jetzt bei nur einer Familie gefunden. Die anderen Betroffenen scheinen eine andere Ursache zu haben. Bei der gefundenen Mutation wird die Phosphorylierung des PER-Protein durch die Kaseinkinase Iδ verhindert, die normalerweise zum Abbau des PER führen würde. Das stabile Protein führt nun zu verkürztem zirkadianem Rhythmus. Versuche mit *Drosophila melanogaster* Fliegen zeigten entsprechende Symptomatik des *Advanced-sleep-phase* –Syndroms. Ausser dem PER2 gibt es beim Menschen auch PER1 und 3, die ebenfalls durch CLOCK aktiviert werden und den zirkadianen Rhythmus regulieren und durch eigene wie auch durch die Mutationen der entsprechenden Kaseinkinasen gestört

sein können (Taheri et al. 2002, Raizen et al. 2006). Raizen et al. (2006) haben außerdem in Versuchen mit *Drosophila*-Fliegen herausgefunden, dass der Transkriptionsfaktor CREB (*cyclic adenosine monophosphate response element binding protein*) ebenfalls eine Rolle im Schlaf-Wach-Rhythmus zu spielen scheint, da Mutanten sich mit Hypersomnie präsentierten während eine ständige Aktivierung des CREB zu vermindertem Schlaf führte. CREB wird durch Lichtsignale aktiviert und führt dann selbst zu einer Suppression der CLOCK und dem ebenfalls an diesen Prozessen beteiligten BMAL1 (*brain and muscle Arnt-like protein 1*), so dass dadurch auch die PER-Expression inhibiert wird (Wulff et al. 2009).

Der zirkadiane Rhythmus an sich, ist an drei physiologische Variablen gekoppelt – den Schlaf, die Körperkerntemperatur und die Melatonin-Sekretion, so dass man prinzipiell auch diese Bereiche für eine genetische Untersuchung hinzuziehen könnte (Raizen et al. 2006). Einen weiteren Kandidaten stellt, wie schon erwähnt, die offensichtliche Verbindung zum Melanin-konzentrierenden Hormon (MSH) dar, welches für Essverhalten, Energiehaushalt und nun wahrscheinlich auch für die Schlafregulation verantwortlich ist. So präsentierten sich MCH-Rezeptor Typ1- Knockout-Mäuse mit einem Hypersomnie-Phänotyp (Wulff et al. 2009).

Die erwähnten Faktoren, die zu einem gesunde Schlaf beitragen bzw. seine Störung auslösen können, sind, wie man aus der o.g. Beschreibung sehen kann, noch nicht ausreichend erforscht und bieten somit viele Möglichkeiten für künftige Arbeiten.

## V. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte bei den untersuchten Patienten keinen Nachweis für eine Verbindung zwischen der Diagnose des zentralen Schlafapnoe-Syndroms sowie des Late-onset-CHS mit möglichen Sequenzveränderungen des *paired-like homeobox 2b*-Gens erbringen. Bei einem Großteil des untersuchten Patientenkollektivs fand sich der schon beschriebene stumme Polymorphismus 870 C>A, p.P290P, der jedoch keine pathologischen Folgen nach sich ziehen kann. Um eine abschließende Aussage bezüglich des PHOX2B als Kandidatengen für das CSA machen zu können, wäre ein größeres Patientenkollektiv und einschränkende Ausschlusskriterien notwendig. Zu diesem Zeitpunkt der Datenlage muss man jedoch das PHOX2B als genetische Ursache für das zentrale Schlafapnoe-Syndrom ausschließen. Das Fehlen von Mutationen bei den Patienten mit der Diagnose LO-CHS, deckt sich mit den Literaturangaben, da nicht alle Betroffenen eine Sequenzvariation aufweisen.

Das zentrale Schlafapnoe-Syndrom ist eine Krankheit, die aufgrund des Einflusses verschiedenster Faktoren, wie Vorerkrankungen, Umwelteinflüssen, Entwicklungsfaktoren und multiplen Genen sehr komplex gestaltet wird. Die Genetik des CSA ist bis jetzt nur sehr wenig erforscht und bietet somit ein breites Feld für künftige Studien, in denen der Einfluss möglicher Kandidatengene auf die Pathogenese der Erkrankung geprüft werden muss.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Untersuchung des Kandidatengens PHOX2B, eine Auswahl von besonders vielversprechenden anderen Kandidatengenen vorgeschlagen, die es erlauben könnten, ein Licht auf die genetischen Hintergründe des zentralen Schlafapnoe-Syndroms zu werfen. Dieses soll einen Beitrag zum Thema der Genetik des CSA und zum Fortschritt seiner Erforschung leisten.

## **Literaturverzeichnis**

### **Lehrbücher**

1. Aktories, Förstermann, Hoffmann, Starke. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage 2005; Elsevier Verlag. S. 242-253
2. American Academy of Sleep Medicine: Das AASM-Manual zum Scoring von Schlaf und assoziierten Ereignissen. Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine. Steinkopff Verlag 2007; S. 51-54
3. American Academy of Sleep Medicine: International Classification of Sleep Disorders, 2<sup>nd</sup> ed: diagnostic and coding manual. Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine, 2005; S. 35-78
4. Brown: Genomes; BIOS Scientific Publishers Ltd, 1999; S. 61-69
5. Deetjen, Speckmann, Heschleler: Physiologie; 4. Auflage 2005; Urban & Fischer Verlag S. 292-300
6. Herold: Innere Medizin, 2009; S. 317-320
7. Horst, Ibelgauf: Gentechnologie von A bis Z, Studienausgabe, VCH Verlagsgesellschaft GmbH 1992; S. 166-169
8. Lund und Clarenbach: Was ist gesichert in der Therapie? Schlafstörungen. Klassifikation und Behandlung; Arcis Verlag 1992; S. 56-59
9. Rassow, Hauser, Netzker, Deutzmann: Duale Reihe Biochemie; 2006 Georg Thieme Verlag; S. 492-498
10. Strachan, Read: Molekulare Humangenetik; Spektrum Lehrbuch; 1996 Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg – Berlin – Oxford; S. 152-361
11. Ullrich L, Stolecki D, Grünwald M: Intensivpflege und Anästhesie; 2005 Thieme Verlag; S. 320-321

## Publikationen

1. 1998-2010 Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER). Central sleep apnea. 2009
2. Amiel J, Dubreuil V, Ramanantsoa N, Fortin G, Gallego J, Brunet J, Goridis C. PHOX2B in respiratory control: Lessons from congenital central hypoventilation syndrome and its mouse models. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2009; 168:125–132
3. Bitter T, Langer C, Vogt J, Lange M, Horstkotte D, Oldenburg O. Sleep-disordered breathing in patients with atrial fibrillation and normal systolic left ventricular function. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(10):164-70
4. Blanchi B, Siewke MH. Mutations of brainstem transcription factors and central respiratory disorders. *Trends in Molecular Medicine (Science Direct)* 2005; 11(1):23-30
5. Caylak E. The genetics of sleep disorders in humans: Narcolepsy, restless legs syndrome, and obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Med Genet* 2009; Part A 149A:2612-2626
6. Champagnat J, Morin-Surun MP, Fortin G, Thoby-Brisson M. Developmental basis of the rostro-caudal organization of the brainstem respiratory rhythm generator. *Phil Tran R Soc* 2009; 364:2469-2476
7. De Geus EJC, Posthuma D, Kupper N, van den Berg M, Willemsen G, Beem AL, Slagboom PE, Boomsma DI. A whole genome-scan for 24-hours respiration rate: A major locus at 10q26 influences respiration during sleep. *Am J Hum Genet* 2005; 76:100-111
8. De Pontual L, Népote V, Attié-Bittach T, Al Halabiah H, Trang H, Elghouzzi V, Levacher B, Benihoud K, Auge J, Faure C, Laudier B, Vekemans M, Munnich A, Perricaudet M, Guillemot F, Gaultier C, Lyonnet S, Simonneau M, Amiel J. Noradrenergic neuronal development is impaired by mutation of the proneural HASH-1 gene in congenital central hypoventilation syndrome (Ondine`s curse). *Hum Mol Genet* 2003; 12(23):3173-3180

9. Dematteis M, Pépin J-L, Jeanmart M, Deschaux C, Labarre-Vila A, Lévy P. Charcot-Marie-Tooth disease and sleep apnea syndrome: A family study. *Lancet* 2001; 357:267-72
10. Doherty L.S., Kiely J.L., Doegan P.C., Nolan G, McCabe S, Green A.J., Ennis S, McNicholas W.T. Late-onset central hypoventilation syndrome: a family genetic study. *Eur Respir J* 2007; 29:312-316
11. Dubreuil V, Barhanin J, Goridis C, Brunet J-F. Breathing with Phox2b. *Phil Trans R Soc B* 2009; 364:2477-2483
12. Dubreuil V, Hirsch MR, Jouve C, Brunet JF, Goridis C. The role of Phox2b in synchronizing pan-neuronal and type-specific aspects of neurogenesis. *Development*. 2002; 129:5241-53
13. Eckert DJ, Jordan AS, Merchia P, Malhotra A. Central sleep Apnea: Pathophysiology and Treatment. *Chest* 2007; 131:595-607
14. Fritze G, Paditz E, Schläfke M, Kuhlisch E, Roesner D, Schackert HK. Association of germline mutations and polymorphisms of the RET proto-oncogene with idiopathic congenital central hypoventilation syndrome in 33 patients. *J Med Genet* 2003; 40:e10
15. Gaultier C, Amiel J, Dauger S, Trang H, Lyonnet S, Gallego J, Simmoneau M. Genetics and early disturbances of breathing control. *Pediatr Res* 2004; 55:729 – 733
16. Gestreau C, Heizmann D, Thomas J, Dubreuil V, Bundulik S, Reichold M, Bendahhou S, Pierson P, Sterner C, Peyronnet-Roux J, Benfriha C, Tegtmeier I, Ehnes H, Georgieff M, Lesage F, Brunet J-F, Goridis C, Warth R, Barhanin J. TASK2 potassium channels set central respiratory CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> sensitivity. *PNAS* 2010; 107(5):2325-2330
17. Hermann DM, Bassetti CL. Sleep-related breathing and sleep-wake disturbances in ischemic stroke. *Neurology* 2009; 73:1313-1322
18. Ize-Ludlow D, Gray J, Sperling MA, Berry-Krevis EM, Milunsky JM, Farooqi Is, Rand CM, Weese-Mayer DE. Rapid onset obesity with hypothalamic dysfunction, hypoventilation, and autonomic dysregulation presenting in childhood. *Pediatrics* 2007; 120:e179-88

19. Javaheri S, Smith J, Chung E. The Prevalence and Natural History of Complex Sleep Apnea. *J Clin Sleep Med* 2009; 5(3):205-211
20. Jean-Louis G, Zizi F, Clark LT, Brwon CD, McFarlane SI. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease: role of the metabolic syndrome and its components. *J Clin Sleep Med* 2008; 4(3):261- 272.
21. Katz D. Neuronal growth factors and development of respiratory control. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2003; 135:155-165
22. Katz ES, McGrath S, Marcus CL. Late-onset central hypoventilation with hypothalamic dysfunction: a distinct clinical syndrome. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29:62–68.
23. Kennedy AJ, Ellacott KLJ, King VL, Hasty AH. Mouse models of the metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms* 2010; 3:156-166
24. Kryger MH, Steljes DG, Yee WC, Mate E, Smith SA, Mahowald M. Central sleep apnea in congenital muscular dystrophy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1991; 54:710-712
25. Kuwaki T, Ling GY, Onodera M, Ishii T, Nakamura A, Ju KH, Cao WH, Kumada M, Kurihara H, Kurihara Y, Yazaki Y, Ohuchi T, Yanagisawa M, Fukuda Y. Endothelin in the central control of cardiovascular and respiratory functions. *Clinical and Experimental Phamacology and Physiology* 1999; 26:989-994
26. Lo L, Morin X, Brunet J, Anderson DJ. Specification of neurotransmitter identity by Phox2 proteins in neural crest stem cells. *Neuron* 1999; 22:593-705
27. Loos RJF. Recent progress in the genetics of common obesity. *Br J Clin Pharmacol* 2009; 68(6):811-829
28. Matarin M, Brown WM, Dena H, Britton A, De Vrieze FW, Brott TG, Brown RD Jr, Worrall BB, Case LD, Chanock SJ, Metter EJ, Ferruci L, Gamble D, Hardy JA, Rich SS, Singleton A, Meschia JF. Candidate gene polymorphisms for ischemic stroke. *Stroke* 2009; 40(11):3436-42
29. Matera I, Bachetti T, Di Duca M, Ravazzolo R, Ceccherini I, Morandi F, Casiraghi G M, Cilio M R, Hennekam R, Hofstra R, Schöber J G, Ottonello G. Polyalanin expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nature genetics* 2003; 33:1-3

30. NorAdina AT, Hamidon BB, Roslan H, Raymond AA. Risk factors for developing sleep-disorder breathing in patients with recent ischemic stroke. *Singapore Med J* 2006; 47(5):392-399
31. Patel SR, Blackwell T, Redline S, Ancoli-Israel S, Cauley JA, Hillier TA, Lewis CE, Orwoll ES, Stefanick ML, Taylor BC, Jaffe K, Stone KL. The association between sleep duration and obesity in older adults. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32(12):1825-1834
32. Punjabi NM. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5:136-143
33. Raizen DM, Mason TBA, Pack AI. Genetic basis for sleep regulation and sleep disorders. *Semin Neurol* 2006; 26:467-483
34. Redline S, Tishler PV. The genetics of sleep apnea. *Sleep Medicine Reviews* 2000; 4(6):583-602
35. Rohrer T, Trachsel D, Engelcke g, Hammer J. Congenital central hypoventilation syndrome associated with Hirschsprung's disease and neuroblastoma: Case of multiple neurocristopathies. *Pediatr Pulmonol.* 2002; 33:71-76
36. Sasaki A, Kanai M, Kijima K, Akaba K, Hashimoto M, Hasegawa H, Otaki S, Koizumi T, Kusuda S, Ogawa Y, Tuchiya K, Yamamoto W, Nakamura T, Hayasaka K. Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome. *Hum Genet* 2003; 114:22-6
37. Taheri S, Mignot E. The genetics of sleep disorders. *Lancet Neurology* 2002; 1:242-50
38. Thalhofer S, Dorow P. Central sleep apnea. *Respiration* 1997; 64(1):2-9
39. Trapp S, Aller MI, Wisden W, Gourine AV. A role for TASK-1 (KCNK-3) channels in chemosensory control of breathing. *The Journal of Neuroscience* 2008; 28(35):8844-8850
40. Trochet D, O'Brien M.L, Gozal D, Trang H, Nordenskjöld A, Laudier B, Svensson P, Uhrig S, Cole T, Munnich A, Gaultier C, Lyonnet S, Amiel J. PHOX2B Genotype allows for Prediction of Tumor Risk in Congenital Central Hypoventilation Syndrome. *Am J Hum Genet* 2005; 77:421-426
41. Trochet D, Ponual L, Estêvão M H, Mathieu Y, Munnich A, Feingold J, Goridis C, Lyonnet S, Amiel J. Homozygous Mutation of PHOX2B Gene in Congenital

- Central Hypoventilation Syndrome (Ondine`s Curse). *Human Mutation* 2008; Mutation in Brief #1003
42. Ulrich S, Fischler M, Speich R, Bloch KE. Sleep-related breathing disorders in patients with pulmonary hypertension. *Chest* 2008; 133:1375-1380
43. Volgin DV, Kubin L. Chronic intermittent hypoxia alters hypothalamic transcription of genes involved in metabolic regulation. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2006;126-127, 93-99
44. Weese-Mayer DE, Berry-Kavis EM, Zhou L, Maher BS, Silvestri JM, Curran ME, Marazita ML. Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: analysis of genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development and identification of mutations in PHOX2b. *Am J Med Genet* 2003; 123A:267-78
45. Weese-Mayer DE, Shannon DC, Keens TG, Silvestri JM. Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: diagnosis and management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 160:368-373
46. Weese-Mayer SE, Berry-Kravis EM, Zhou L. Adult identified with congenital central hypoventilation syndrome: mutation in PHOX2B gene and late-onset CHS. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 88.
47. Wulff K, Porchert K, Cussans E, Foster RG. Sleep and circadian rhythm disturbances: Multiple genes and multiple phenotypes. *Current Opinion in Genetics and Development* 2009; 19:237-246
48. Young HM, Cianpoli D, Hsuan J, Canty AJ. Expression of Ret-, p75 (NTR)-, Phox2a-, Phox2b-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by underdifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut. *Dev Fyn.* 1999; 216:137-52.
49. Yue WH, Liu PZ, Hao W, Zhang XH, Wang XP, Zhang JS, Zhou XH, Xie YB, Ni M. Association study of sleep apnea syndrome and polymorphisms in the serotonin transporter gene. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2005; 22(5):533-6.
50. Yumino D, Bradley TD. Central sleep apnea and Cheyne-Stokes respiration. *Pros Am Thorac Soc* 2008; 5:226-236

**Online-Links**

1. <http://www.jmedgenet.com>
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene>
4. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
5. <http://genome.ucsc.edu/>
6. <http://www.med.uni-marburg.de/stpg/awf/mta-schule/f032000/polysom.pdf>
7. <http://www.schlafapnoezahnmedizin.de/>
8. <http://serc.carleton.edu/15924>
9. [http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/092200/lecture\\_notes.html](http://departments.oxy.edu/biology/Stillman/bi221/092200/lecture_notes.html)
10. <http://www.awo-dillenburg.de/book/export/html/143>

---

## **Danksagung**

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Peter Young, für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die Betreuung im Verlauf der ganzen Arbeit bedanken.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der verschiedenen neurologischen Labore für Ihre Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank richtet sich an Frau Dr. rer. medic Anja Schirmacher für die Einführung in die praktische Genetik und in die Laborarbeit und für die herausragende fachliche und persönliche Betreuung während des experimentellen Teils der Arbeit.

Auch möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Matthias Boentert und Frau Dr. med. Anna Heidbreder für ihre gute Betreuung und Hilfe im klinischen Teil bedanken.

Als letztes richte ich ein grenzenloses Dankeschön an meine Eltern und an Alex, ohne deren stetigen Rückhalt und Unterstützung ich wohl kaum so weit gekommen wäre.

---

---