

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

**Genetischer Hintergrund des obstruktiven Schlaf-
Apnoe-Syndroms:
Mutationsanalyse des Early Growth Response 2-Gens**

INAUGURAL – DISSERTATION

Zur Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Canan-Soranka Toksoy

aus Bad Oeynhausen

2008

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

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Univ. Prof. Dr. med. P. Young

2. Berichterstatter : Univ. Prof. Dr. med. G. Kurlemann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.09.2008

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

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

Zusammenfassung

Genetischer Hintergrund des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms: Mutationsanalyse des Early Growth Response 2-Gens

Canan-Soranka Toksoy

Das *Early-Growth-Response-Gen* (EGR-2) kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der während der Embryogenese für die Somitenbildung und postnatal für die Myelinisierung im peripheren Nervensystem eine wichtige Rolle spielt. EGR-2-Mutationen führen zu schweren Formen von erblichen Neuropathien, die in früher Kindheit mit obstruktiven (OSAS) und zentralen Schlafapnoen (ZSAS) assoziiert sind. EGR-2-defiziente Mäuse zeigen im frühen postnatalen Stadium schwere Atemstörungen.

In der vorliegenden Studie wurde die Assoziation zwischen dem EGR-2 und OSAS untersucht.

Hierzu wurden 58 Patienten mit OSAS (Apnoe / Hypopnoeindex > 10 / Stunde) und 60 gesunde Kontrollen (Apnoe / Hypopnoeindex < 5 / Stunde) auf das Vorliegen von Mutationen im EGR-2 mittels direkter PCR-basierender Gensequenzierung untersucht.

In der OSAS-Gruppe wurden keine Mutationen in EGR-2 gefunden. In der Kontrollgruppe wurden zwei Patientinnen identifiziert, die einen seltenen (Allelfrequenz < 0.8 % in der noreuropäischen Normalbevölkerung), stummen Polymorphismus im kodierenden Bereich (Codon) des EGR-2 tragen. Der Polymorphismus stellt einen Austausch des Nukleotids Adenin zu Cytosin im Codon 362 dar und führt nicht zu einem Aminosäureaustausch auf Proteinebene (Arg(362)Arg). Die Allelfrequenz beträgt in der Kontrollgruppe 1,6 %.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit der Nachweis erbracht, dass es keine Assoziation zwischen EGR-2 und dem obstruktiven Schlaf-Apnoe.-Syndrom gibt.

Dies sollte in der molekulargenetischen Diagnostik entsprechende Bewertung finden.

Darüber hinaus werden in der vorliegenden Arbeit eine Reihe von Kandidatengen aufgezählt, die für den genetischen Hintergrund des OSAS möglicherweise eine Rolle spielen.

Tag der mündlichen Prüfung: 17.09.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Geschichtlicher Hintergrund	11
1.2	Physiologie des Schlafes	11
1.3	Pathomechanismus des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms	13
1.4	Definitionen und Klassifikationen der Schlaf-Apnoe	15
1.5	Diagnosestellung	15
1.6	OSAS und Genetik	16
1.7	OSAS und Neuropathien	20
1.8	EGR-2 als möglicher genetischer Kandidat für das OSAS	23
2	Fragestellung	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Patienten- und Kontrollpopulation	27
3.2	Blutentnahme und DNA-Isolation	27
3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
3.4	Agarosegelelektrophorese	33
3.5	Sequenzierung	34
3.6	Analyse ermittelter Sequenzvarianten	35
3.7	Statistik	37
4	Ergebnisteil	38
4.1	Beschreibung der OSAS Patienten und der Kontrollgruppe	38
4.1.1	Geschlechterverteilung der OSAS Gruppe und der Kontrollen	38
4.1.2	Alter	40
4.1.3	BMI	40
4.1.4	AHI	41
4.1.5	Ergebnis der Mutationsanalyse in der OSAS-Gruppe	42
4.1.6	Ergebnis der Mutationsanalyse in den Kontrollgruppen	43
5	Diskussion	47

Inhaltsverzeichnis		7
5.1	Auswahlkriterien der OSAS-Gruppe	47
5.2	Ergebnisse der OSAS-Gruppe	48
5.3	Auswahlkriterien der Kontrollgruppe	51
5.4	Ergebnisse der Kontrollgruppe	52
5.5	Mögliche weitere Kandidatengene für das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom	54
5.5.1	PMP-22, MPZ und CX-2 als mögliche Kandidaten	54
5.5.2	Kandidaten für die Atemkontrolle	55
5.5.3	Kandidaten für Adipositas	56
5.5.4	Kandidaten für craniofaziale Dysmorphien	57
5.5.5	Kandidaten für den Schlaf	58
5.6	Zusammenfassung und Ausblick	59
6	Literaturverzeichnis	60
7	Danksagung	71

Abb.	Abbildung
A	Adenin
AHI	Apnoe-Hypopnoe-Index
Arg	Arginin
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMI	<i>body mass index</i>
bp	Basenpaar
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMT	Charcot-Marie-Tooth'sche Erkrankung
CX32	Connexin-32
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalographie
EGR-2	<i>Early Growth Factor-2</i>
EKG	Elektrokardiographie
ET-1	Endothelin-1
EOG	Elektrookulogramm
dbSNP	<i>database single nucleotide polymorphism</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease (Enzym)
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DSS	Dejerine-Sottas-Syndrom
Fa.	Firma
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
Cl	Chlorid
g	Gramm
G	Guanin
GS	Gegenstrang
h	Stunde
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HMN	Hereditäre motorische Neuropathie

HMSN	Hereditäre motorische und sensible Neuropathie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
k	Kilo (als Vorsatz von SI-Einheiten 10^3)
l	Liter
Lj.	Lebensjahr
Lsg.	Lösung
μ	Mikro (als Vorsatz von SI-Einheiten 10^{-6})
M	Mol
m	Milli (als Vorsatz von SI-Einheiten 10^{-3})
Met	Methionin
Mg	Magnesium
min.	Minute(n)
MPZ	Myelin Protein Zero
m/s	Meter pro Sekunde
MUT	Mutation
Na	Natrium
NAP-Säule	Nukleinsäurereinigungssäule (<i>nucleic-acid-column</i>)
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
OD	optische Dichte
OSAS	obstruktives Schlafapnoesyndrom
P	Primer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMP	Peripheres Myelin-Protein
POMC	Pro-Opiomelanokortin
PU	Puffer
RDI	<i>respiratory disturbance index</i>
REM	<i>rapid eye movement</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Strang
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>

T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
Thr	Threonin
Tm	Schmelztemperatur
™	geschützte eingetragene Warenzeichen (<i>registered trademark</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-H ₂ O	Vollentsalztes Wasser
v/v	Volumen/ Volumen-Verhältnis
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumenverhältnis
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZS	Zentrifugiersäule

1 Einleitung

1.1 Geschichtlicher Hintergrund

Das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom wurde erstmals 1837 durch den englischen Autoren Charles Dickens in seinem Roman „*The Pickwickian*“ beschrieben. Dort wird ein fettleibiger Junge, „*little fat John*“, mit einer ausgeprägten Tagesschläfrigkeit beschrieben. In dem Jahr 1918 beschäftigte sich Sir William Osler mit dem Symptomenkomplex und fasste die Symptome Tagesschläfrigkeit, Fettleibigkeit und Zyanose als „Pickwick-Syndrom“ zusammen.

Gastaut dokumentierte 1966 zum ersten Mal multiple Atempausen bei einem Patienten mit dem Pickwick-Syndrom (Gastaut et al., 1966).

1.2 Physiologie des Schlafes

Mit der Elektroenzephalographie (EEG) und dem Elektrookulogramm (EOG) stehen zwei Methoden zur Verfügung, die es ermöglichen den Schlafverlauf fortlaufend aufzuzeichnen, ohne ihn zu stören. So kann man die verschiedenen Grade des Wachseins (von angespannt bis entspannt) und die verschiedenen Grade des Schlafes unterscheiden. Dem non-REM-Schlaf (REM = *rapid eye movement*), dem orthodoxen oder synchronisierten Schlaf mit seinen 4 Schlafstadien wird der REM-Schlaf, auch Traumschlaf oder paradoxer Schlaf bezeichnet, gegenübergestellt, die im folgenden näher beschrieben werden sollen.

Unter physiologischen Bedingungen kann man immer dieselbe Abfolge der verschiedenen Schlafstadien im EEG verfolgen. Bei einem wachen Menschen lassen sich mittels des EEGs α -Wellen ableiten, beim Übergang vom entspannten Wachsein (mit geschlossenen Augen) in das Schlafstadium 1 verschwinden die α -Wellen und die Klarheit des Bewusstseins wird vermehrt eingeschränkt. Traumartige Eindrücke sind in dieser Phase nicht selten. Das Auftreten von Myoklonien, langsamen Bewegungen der Augäpfel und Zuckungen der Augenlider kann oft beobachtet werden. Dieses wird auf die Umstellung der motorischen Kontrollsysteme beim Einschlafen zurückgeführt. Das Schlafstadium 1 wird leicht durch kurze Wachepisoden unterbrochen und ist somit

noch ein instabiler Zustand. Das darauf folgende Schlafstadium 2 wird als der eigentliche Schlafbeginn angesehen, man kann im EEG Schlafspindeln und K-Komplexe nachweisen. Die Schlaflatenz, die den Zeitraum zwischen dem Zubettgehen und dem ersten Durchlauf des Schlafstadiums 2 beträgt bei gesunden Erwachsenen etwa 10 bis 15 Minuten. Die Vertiefung des Schlafes erfolgt durch die Stadien 3 und 4, in denen sich die Weckschwelle für Reize entsprechend erhöht und ihren höchsten Wert ca. nach einer Stunde erreicht, um danach wieder stetig abzunehmen. Den Tiefschlaf bezeichnet man auch als Langsamen-Wellen-Schlaf (*slow-wave-slep*), da er von hochamplitudigen ($> 100\mu\text{V}$) θ -Wellen (4-7 Hz) und δ -Wellen (0,5 – 3 Hz) dominiert wird. Nun geht der Tiefschlaf in den ersten REM-Schlaf über. Die Schlafstadien 1-4 und der REM-Schlaf ergeben zusammen einen Schlafzyklus, die Nacht besteht schätzungsweise aus 4-5 Schlafzyklen, die jeweils eine Dauer von etwa 1,5 Stunden haben. Der REM-Schlaf wird auch als paradoxer Schlaf oder Traumschlaf bezeichnet. Man beobachtet in dieser Phase, in der emotional geträumt wird, sekundenlange Gruppen von 1.4 Hz schnellen Augenbewegungen. Das EEG zeigt ein Muster, das man mit dem Wachzustand vergleichen kann. Charakteristisch ist hier die Zunahme der Aktivität des autonomen und zentralen Nervensystems. Der Muskeltonus wird zentral aktiv gehemmt, es kommt zu episodisch einsetzenden schnellen, konjugierten Augenbewegungen, die Weckschwelle gleicht dem Stadium 2 und 3.

Der REM-Schlaf umfasst ca. ein Viertel des Gesamtschlafes, ebenso besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen Träumen und REM-Schlaf: ca. 70 % der Leute, die unmittelbar in dieser Phase geweckt werden, können sich an ihren Traum erinnern (In Anlehnung an Schmidt, Thews: Physiologie des Menschen; 27. Auflage 1997).

Die Klassifikation der *American Sleep Disorder Association* (Thorpy 1990) unterscheidet intrinsische und extrinsische Schlafstörungen, sowie Schlafstörungen des zirkadianen Rhythmus, Parasomnien und symptomatische Störungen des Schlafes bei internistischen, neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen. Zu dieser letzten Kategorie zählt man das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom (OSAS).

1.3 Pathomechanismus des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms

Beim Einschlafen bzw. im Schlaf kommt es bei Patienten, die am Schlaf-Apnoe-Syndrom leiden, zu einem Kollaps der oberen Atemwege, so dass trotz meist paradoxer thorakaler und diaphragmaler Atemexkursionen kein Luftfluss an Mund und Nase nachweisbar ist, und die kapilläre Sauerstoffsättigung sinkt (aus J. Jörg: Neurologische Therapie, 2001).

Beim gesunden und wachen Menschen werden bei der Inspiration kurz vor der Kontraktion des Zwerchfells die oropharyngealen Muskeln tonisiert. Grund dafür ist der Ausgleich des bei der Kontraktion des Zwerchfells entstehenden subatmosphärischen Druckes, der eine Einengung von Oro- und Hypopharynx bewirken würde. Beim schlafenden Erwachsenen vermindert sich die präinspiratorische Aktivierung dieser Muskeln, somit erhöht sich schon unter physiologischen Bedingungen der Widerstand der oberen Luftwege. Hiermit wird die Basis für Obstruktionen der oberen Atemwege geschaffen. Während des Schlafes zeigen sich bei der elektromyographischen Untersuchung funktionelle Verluste der präinspiratorischen neuronalen Aktivierung oropharyngealer Muskeln. Wenn die Apnoe weiterbesteht, wird der Atemantrieb durch die zunehmend eintretende Hypoxie und Hyperkapnie verstärkt. Dieses bedingt eine stärkere Kontraktion der Interkostalmuskulatur und des Zwerchfells, die wiederum den negativen pharyngealen Atemwegsdruck und die Obstruktion der oberen Luftwege verstärken und somit zum obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom führen können (Walther, Bardenheuer et al., 2001).

Das Leitsymptom des OSAS ist das laute und unregelmäßige Schnarchen, nächtliche Atempausen und die Tagesschläfrigkeit. Die nächtlichen Atempausen sind mit kardiopulmonalen Belastungen und Sauerstoffuntersättigung verbunden. Weiterhin führen die durch das OSAS verursachten häufigen nur sekundenlangen, elektrophysiologisch messbaren Weckvorgänge zu Folgeerkrankungen. Der Erholungswert des Schlafes nimmt erheblich ab. Klinisch gehören zum Vollbild des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms morgendliche Abgeschlagenheit, Mundtrockenheit und diffuse Kopfschmerzen. Auch können Wesensänderungen, intellektuelle Leistungsabfälle, Libido- und Potenzstörungen auftreten. Bei vielen Patienten mit Schlaf-Apnoe-Syndrom finden sich Be-

gleitumstände bzw. Begleiterkrankungen, die teilweise zu der Erkrankung beitragen oder auch für diese ursächlich sind (Tab.1).

Tab. 1: Beleiterkrankungen und Begleitumstände in Assoziation mit OSAS *

Obstruktives Schlaf-Apnoe-Syndrom		Zentrales Schlaf-Apnoe-Syndrom
Pathoanatomisch	Funktionell	Neuromuskulär / Neurologisch
Adipositas (per magna)	Diabetes mellitus	Myasthenia gravis
Akromegalie (Makroglossie)	Chronisches Nierenversagen	Myotone Muskeldystrophie
Nasenseptumdeviation	Hypothyreose	Phrenikusparese
Tonsillenhypertrophie	Achondroplasie	Hirnstammtumor
Nasopharyngeale Tumoren	Alkohol	Bilaterale zervikale Cordotomie
Mandibularhypoplasie, Mikrognathie	Medikamente (z.B. Benzoediazepine)	Enzephalitis
Larynxdeformationen		Bulbäre Poliomyelitis Schädel-Hirn-Trauma

*(nach A. Walther, H.J. Bardenheuer, 2001)

Die geschätzte Prävalenz des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms in einer Population Erwachsener mittleren Alters beträgt 1-4% (Walther, Bardenheuer et al., 2001). Sie steigt auf den dreifachen Wert bei Männern über 65 Jahren an, Frauen sind deutlich seltener betroffen. Das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom kann prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten, bevorzugt allerdings bei Männern ab dem 40. Lebensjahr. 30-60% der über 55jährigen erreichen in polysomnographischen Screeninguntersuchungen einen grenzwertigen Wert, nämlich einen Apnoe-Hypopnoe-Index von 5 oder über 5 (Young et al., 1993). Die Prävalenz von OSAS bei Kindern ist noch nicht gesichert, aber wird auf ca. 2.8% geschätzt (Ali et al., 1993).

Retrospektive Studien haben ergeben, dass es Assoziationen des OSAS mit einer Erhöhung der Morbidität und Letalität an zerebrovaskulären und kardiovaskulären Erkrankungen gibt (Kryger et al., 1988).

Weiterhin findet sich bei OSAS-Patienten eine erhöhte Inzidenz von Adipositas, jedoch sind auch häufig normalgewichtige Patienten zu finden. Die kardiovaskulären Veränderungen sind Hauptgrund der Letalität des OSAS, bei einer schweren Erkrankung beträgt die 8-Jahres-Letalität 37 % (He et al., 1988).

1.4 Definitionen und Klassifikationen der Schlaf-Apnoe

Apnoe. Unterbrechung des nasalen/oralen Luftstroms für mehr als 10 Sekunden. Es kommt 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. Inkomplette Unterbrechung des nasalen / oralen Luftstroms für mehr als 10 Sekunden, das Tidalvolumen sinkt dabei um mehr als 50%.

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

Schlaf-Apnoe-Syndrom. Schlaf-Apnoe mit kardiozirkulatorischen oder zentralnervösen Folgeerscheinungen.

1.5 Diagnosestellung

Der Patient gibt Schnarchen und Tagesschläfrigkeit an, anhand dieser Angaben kann man die Verdachtsdiagnose auf ein OSAS stellen. Jedoch kann man das Schlaf-Apnoe-Syndrom endgültig nur anhand einer polysomnographischen Untersuchung in einem Schlaflabor stellen. Die polysomnographische Untersuchung bedient sich mehrerer Messtechniken, um den Patienten ausgiebig zu untersuchen: mittels der Elektroenzephalographie (EEG) kann man die jeweiligen Schlafstadien differenzieren, durch die interkostale Elektromyographie (bzw. thorakale / abdominelle Bandspannung und ösophageale Manometrie), kann man die Atemanstrengungen des Patienten und dessen Atemexkursionen messen. Die kapnographische Atemflowmessung dient zur

Feststellung der Apnoe- bzw. der Hypopnoedetektion und der endotidalen CO₂-Konzentration. Die Sauerstoffsättigung kann man anhand der Pulsoxymetrie messen, das EKG dient zur kardialen Überwachung des schlafenden Patienten. Letztendlich wird der Patient in der Nacht videographiert, um das nächtliche Verhalten aufzuzeichnen, der Muskeltonus kann zusätzlich durch die *Musculus-tibialis-anterior*-Myographie abgeleitet werden. Man unterteilt das OSAS in Apnoe-Hypopnoe-Indices (AHI). Die obstruktive Apnoe ist definiert als eine 10 Sekunden andauernde Pause des nasalen und oralen Atemstroms mit Sauerstoffentsättigung (Taheri and Mignot, 2002). Liegt ein AHI > 10 vor, besteht das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom. Der Vorteil der AHI-Einteilung besteht in der einfachen Errechnung und ist für jede Nacht reproduzierbar (Redline et al., 1991). Viele Studien bedienen sich dieser Krankheitsgrad-Einteilung und machen sie so besser vergleichbar. Allerdings kann der AHI als Haupt-Indikator insofern von Nachteil sein, da es laborunterschiedliche Messbedingungen gibt, individuelle Ereignisse vorkommen und pathologische Hintergründe fehlen können. (Redline and Tishler, 2000)

1.6 OSAS und Genetik

Die Risikofaktoren des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms beinhalten Adipositas, zentrale Atemstörungen und craniofaziale Dysmorphien (Redline and Tishler, 2000) Jedoch ist das obstruktive Schlaf Apnoe Syndrom nicht einfach nur eine Krankheit von adipösen älteren Männern, oder Menschen, die an craniofazialen Anomalien leiden. In der Vergangenheit hat man festgestellt, dass genetische Faktoren eine große Rolle bei OSAS-Patienten spielen können. Die Hauptrisikofaktoren des OSAS wie Adipositas, neuronale Atemfunktionsstörungen und craniofaziale Dysmorphien basieren auf genetischen Aberrationen verschiedenster Art.

Des Weiteren kommen noch andere genetische Komponenten hinzu, die das Auftreten eines OSAS erklären könnten und die im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch erwähnt werden sollen. Das OSAS ist ein komplexes Zusammenspiel von multiplen Faktoren: zum einen sind persönliche Eigenschaften und Lebensstile stark mit der Entstehung von Schnarchen bis hin zum ausgeprägten OSAS assoziiert, wie zum Beispiel der Genuss von Tabak und Alkohol

(Jennum et al., 1992). Jedoch können diese Faktoren auch nur einen Teil der Prävalenz der Erkrankung erklären (Jennum et al., 1995). Deswegen kommen genetische Faktoren in Betracht, die ursächlich für die Entstehung des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms sind. Belegend für diese Hypothesen sind Studien der Vergangenheit, die zeigen, dass z.B. das OSAS gehäuft bei Familienmitgliedern der gleichen, der jüngeren oder der älteren Generation vorkommen (el Bayadi et al., 1990; Manon-Espaillat et al., 1988; Strohl et al., 1978; Wittig et al., 1988).

Das Schlaf-Apnoe-Syndrom wurde sowohl bei Kindern, bei adipösen und auch bei nicht adipösen Mitgliedern der betroffenen Familie beobachtet. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Erkrankung aus der Interaktion physiologischer und anatomischer Anomalien resultierten (Redline and Tishler, 2000). Weiterhin gibt es diverse Zwillingsstudien, die zeigten, dass das OSAS nicht nur durch äußerliche Einflüsse entstehen kann, sondern dass es wahrscheinlich auf einer genetischen familiären Komponente basieren muss (Ferini-Strambi et al., 1995; Jennum et al., 1995; Redline et al., 1992). Kaprio et al. belegten in ihrer Zwillingsstudie, die über 4000 finnische Zwillingspaare umfasste, dass Schnarchen eine genetische Ursache hat: das gemeinsame Auftreten von Schnarchen bei monozygoten Zwillingen war in der Studie stärker ausgeprägt als bei dizygoten Zwillingen. Genauso wiesen Ferini-Strambi et al. bei ihrer Zwillingsstudie nach, dass bei monozygoten Zwillingen die bekannten Risikofaktoren nicht so stark ausgeprägt waren wie bei dizygoten Zwillingen. Dieses wurde als Evidenz für genetische Faktoren des Schnarchens interpretiert (Ferini-Strambi et al., 1995).

Weiterhin zeigten Redline et al., dass Schnarchen, ausgeprägte Tagesmüdigkeit- und Tagesschläfrigkeit sowie Apnoen, bei Verwandten ersten Grades, zwei- bis viermal häufiger vorkamen als unter den Kontrollen. Diese Beobachtung war unabhängig von BMI, Tabak- und Alkoholkonsum, Alter und Geschlecht (Redline et al., 1992). Auch in der prospektiven Kopenhagener Studie wies man familiäres Schnarchen nach (Jennum et al., 1995). Redline et al. gaben aus unveröffentlichten Daten an, dass das familiäre OSAS öfter auftritt, als die rein sporadische Form.

Eine weitere Evidenz für eine genetische Ursache des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms zeigen Studien, die sich mit rassespezifischen und ethni-

schen Unterschieden des OSAS befassen. Zwar weiß man bis heute noch nicht sehr viel über das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom der nicht-kaukasischen Bevölkerung, aber gewisse Daten deuten darauf hin, dass bestimmte Völker ein höheres Risiko haben, an einem OSAS zu erkranken als andere (Redline and Tishler, 2000). Zum Beispiel zeigten Redline et al. in ihrer Cleveland-Studie, dass Afro-Amerikaner ein zweifach erhöhtes Risiko haben an einem OSAS zu erkranken als gleichaltrige Kaukasier, und im Falle der Erkrankung höhere AHI nachzuweisen sind als bei den kaukasischen Kontrollen. Baldwin et al. beobachteten, dass Maori (Ureinwohner Neuseelands) und die Bewohner der Pazifischen Inseln höhere Erkrankungsraten und schwerwiegendere Verläufe des OSAS aufweisen als Europäer (Ancoli-Israel et al., 1995; Redline et al., 1997b).

Wie schon erwähnt, sind die Hauptrisikofaktoren Adipositas und das männliche Geschlecht (Strohl and Redline, 1996). Hinzu kommen andere Risikofaktoren, wie die Anatomie der oberen Atemwege (Guilleminault et al., 1984; Lowe et al., 1997; Prachartam et al., 1996) und Charakteristiken der zentralen Atemkontrolle (Kunitomo et al., 1989; Redline et al., 1997a).

Diese Risikofaktoren werden genetisch bestimmt und durch äußere Einflüsse moduliert (Redline and Tishler, 2000). Tabelle 2 zeigt eine Auflistung von Kandidatengenen, die die Entstehung des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms beeinflussen könnten.

Tab. 2: OSAS-Risikofaktoren und deren mögliche Kandidatengene*

Phänotypen und mögliche Kandidatengene für OSAS	
Phänotypen	Kandidatengene
Adipositas	<ul style="list-style-type: none"> -Pro-opiomelanokortin (POMC) -<i>insulin growth factor</i> -Glukokinase -Adenosindeaminase -Melanocortin-3-Rezeptor -Tumornekrose Faktor-α -Glukose regulierendes Protein -Agouti Protein -Ghrelin -Adiponektin -Resistin -Orexin
Ventilationskontrolle	<ul style="list-style-type: none"> -RET-Proto-Onkogen, Rezeptor Tyrosinkinase -<i>neurotrophic growth factors (brain derived growth factor, glial derived growth factor)</i> -Endothelin-1 / Endothelin-3 -Krox-20 / homebox Gene -ACE -Retinsäure -Leptin -Orexin
Kraniofaziale Dysmorphien	<ul style="list-style-type: none"> -homebox Gene -Wachstumhormone -Wachstumsfaktoren -Retinsäure -Kollagen Typ I und II -Tumornekrose Faktor-α
Schlafregulation	<ul style="list-style-type: none"> -Orexin -Leptin -Tumornekrose Faktor-α -Melatonin -Cortistatin -Adenosin

*(nach S. Redline, P.V. Tishler, 2000)

Aus Tabelle 2 kann man multiple Kandidatengene für Adipositas entnehmen. Es hat in der Vergangenheit viele Studien bezüglich Adipositas gegeben, die besagen, dass die Adipositas einen genetischen Ursprung hat (Bodurtha et al., 1990; Smith et al., 1985; Stunkard et al., 1990). Die Fettleibigkeit ihrerseits stellt einen Risikofaktor für die Pathogenese des OSAS dar. Ebenso hat man Kandidatengene für die anderen Risikofaktoren (siehe Tabelle) gefunden, die einen erheblichen Einfluss auf die Pathogenese des OSAS nehmen.

Interessanterweise wurde festgestellt, dass das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom auch im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen auftritt, die ihrerseits einen genetischen Ursprung besitzen. Dieses ist wiederum ein Indiz für die genetische Kausalität der Erkrankung. Eine Studie zeigt, dass HLA-Genotypen oder HLA-Merkmale mit dem Auftreten eines OSAS in der japanischen Bevölkerung einhergehen (Yoshizawa et al., 1993).

Weitere drei Studien vermuten einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Apolipoprotein E4 und dem OSAS (Breslow, 2000; Chapman et al., 2001). Dematteis et al. zeigten in ihrer Arbeit aus dem Jahre 2001 einen möglichen Zusammenhang zwischen der hereditären Neuropathie CMT 1 und dem obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom, auf diese Arbeit soll im weiteren Verlauf näher eingegangen werden. (Dematteis et al., 2001)

1.7 OSAS und Neuropathien

In der Vergangenheit gab es wenige Arbeiten und Dokumentationen zu einer Assoziation zwischen dem OSAS und einer Neuropathie (Osanai et al., 1992). Dematteis et al. untersuchten in einer Familienstudie 13 Verwandte eines an der Charcot-Marie-Tooth'schen Erkrankung leidenden und zusätzlich an schwerem OSAS erkrankten Patienten. Insgesamt litten von 14 Familienmitgliedern 11 an der autosomal-dominanten demyelisierenden Form der CMT-Erkrankung einer PMP-22 Duplikation auf dem Chromosom 17. Erstaunlicherweise fand man allen betroffenen Familienmitgliedern zusätzlich ein Schlaf-Apnoe-Syndrom (Dematteis et al., 2001). Dematteis et al. interpretier-

ten diese Ergebnisse als pharyngeale Neuropathie, hervorgerufen durch die CMT-Erkrankung, die für das vorliegende OSAS ursächlich war.

Die Charcot-Marie-Tooth'sche Erkrankung (CMT) ist die häufigste, erbliche neurogene Muskelatrophie. Die Erstbeschreibung fand im Jahr 1886 statt. Dabei handelt es sich um keine isolierte Krankheitsentität, sondern um eine klinisch und genetisch heterogene Erkrankung. Die CMT 1 ist charakterisiert durch eine deutlich reduzierte und motorische Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) und durch morphologische Zeichen einer De- und Remyelinisierung in Biopsien des *Nervus suralis*. Die Erkrankung wird autosomal-dominant vererbt, es werden aber auch x-gekoppelte, autosomal-rezessive und sporadische Fälle beschrieben (Gabreels-Festen et al., 1992; Harding and Thomas, 1980a; Harding and Thomas, 1980b).

Eine 1.5 Tandem-Duplikation, die das PMP-22 Gen einschließt, wird als häufigste Ursache beschrieben (Nelis et al., 1996). PMP-22 ist ein Gen, das für Transmembranproteine, die in der Myelinscheide peripherer Nerven lokalisiert sind, kodiert. Weiterhin werden eine Deletion und Punktmutationen des PMP-22-Gens beschrieben, die unterschiedliche Formen von hereditären Neuropathien hervorrufen (Chance et al., 1994; Chance et al., 1993; Suh et al., 1997; Suter et al., 1992a; Suter et al., 1992b). Andere Gene, die für Transmembranproteine kodieren, sind das *Myelin Protein Zero* (MPZ, 1q22-23) und das *Connexin-32* (CX-32, Xq13.1), weiterhin zählt man den Transkriptionsfaktor *Early Growth Factor-2* (EGR-2) hinzu (Bruzzone and Ressot, 1997; Bruzzone et al., 1996; Filbin et al., 1990; Shapiro et al., 1996).

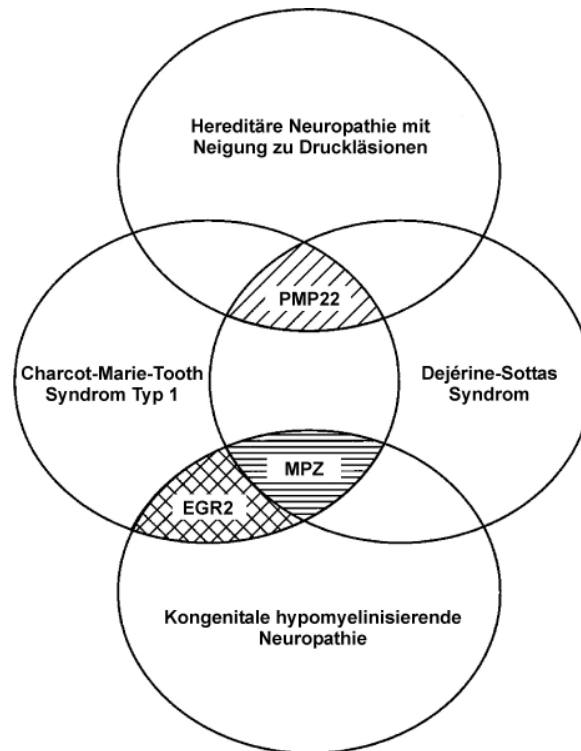


Abb. 1: Beziehungen und Überschneidungen zwischen Mutationen der genannten Kandidatengene PMP22, EGR-2 und MPZ und deren Neuropathien.

Die häufigsten Formen der CMT-Erkrankungen werden durch eine genetisch bedingte Demyelinisierung hervorgerufen, die alle peripheren Nerven des Körpers betreffen kann. So können auch Nerven betroffen sein, die die Atemhilfsmuskulatur, die Rachenmuskulatur und das Zwerchfell versorgen. Es gibt nur wenige Berichte über laryngeale und pharyngeale Dysfunktionen in Assoziation mit CMT (Thomas et al., 1997), jedoch wurde zumindest von einer Zwerchfell-Unterfunktion in Assoziation mit der CMT berichtet (Carter et al., 1992; Chan et al., 1987; Hardie et al., 1990; Laroche et al., 1988).

Larsson et al. berichteten 1992 in ihrer Arbeit von einer pharyngealen Neuropathie bei Patienten mit obstruktivem Schlaf-Apnoe-Syndrom. Dematteis et al. haben gezeigt, dass das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom mit der CMT 1 assoziiert sein kann.

1.8 EGR-2 als möglicher genetischer Kandidat für das OSAS

Bei Patienten mit hereditären Neuropathien (wie z.B. die Charcot-Marie-Tooth'sche Erkrankung, das Dejerine-Sottas-Syndrom und die congenitale Hypomyelinisierung) wurden in der Vergangenheit mehr als 250 Mutationen des PMP-22-Gens, des MPZ-Gens und des CX-32-Gens beschrieben (Nelis et al., 1999). Weiterhin wurde von Mutationen des Transkriptionsfaktors „*Early Growth Response- 2*“ (EGR-2) in Zusammenhang mit der congenitalen Hypomyelinisierung und der CMT1 berichtet (Warner et al., 1998).

Das EGR-2 gehört zu der EGR-Familie, die außerdem noch EGR-1, 3 und 4 einschließt. Gene dieser Familie kodieren für nukleare Transkriptionsfaktoren und Zinkfinger-DNA-bindende Proteine (Tamura et al.2004). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit soll jedoch nur auf das *Early Growth Response-2* eingegangen werden. EGR-2 ist auf dem menschlichen Chromosom 10q21.1-q22.1 lokalisiert. Das EGR-2 hat eine Größe von 4.3 kb und umfasst 2 codierende Exons. (Joseph et al., 1988)

Rangnekar et al. haben nachgewiesen, dass das EGR-2-Gen für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der 3 Tandem Zinkfinger der Cys2/His2 Klasse enthält. (Rangnekar et al., 1990; Swirnoff and Milbrandt, 1995):

Das *Early Growth Response* Protein ist für die Somitenbildung in der Embryogenese und später für die Myelinisierung des peripheren Nervensystems verantwortlich (Schneider-Maunoury et al., 1993; Sham et al., 1993; Wilkinson et al., 1989). Tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass die Inaktivierung des EGR-2-Gens bei Mäusen eine Hypomyelinisierung des gesamten peripheren Nervensystems bewirkt, außerdem beobachtete man extrem unterentwickelte Schwann'sche Zellen und eine reduzierte bzw. vollkommen fehlende Expression des späten Myelin Gens (Topilko et al., 1994).

Warner et al. berichteten von einer rezessiven und zwei dominanten Mutationen des EGR-2-Gens bei Patienten mit einer congenitalen Hypomyelinisierung und in einer Familie mit CMT-1 (Warner et al., 1998). Die dominanten Mutationen finden sich in der Zinkfinger Region des Gens und bewirken Veränderungen in der DNA-Bindungsfähigkeit. Der krankheitsauslösende Mechanismus

besteht wahrscheinlich in einem Verlust der Funktion des Transkriptionsfaktors. Die rezessive Mutation fällt in eine Repressor-bindende Region des EGR-2 Gens und sie wirkt vermutlich auf die transkriptionale Aktivität. Zusätzlich nennen Warner et al. eine weitere dominante Mutation, die bei Patienten mit Dejerine-Sottas-Syndrom (DSS) auftreten kann (Warner et al., 1999). Diese Mutation fällt ebenso wie die beiden anderen dominanten Mutationen in die Zinkfinger Region. Außerdem beschrieben Timmermann et al. einen stummen Polymorphismus, der ebenfalls in der Zinkfinger Region zu finden war (Abb.2).

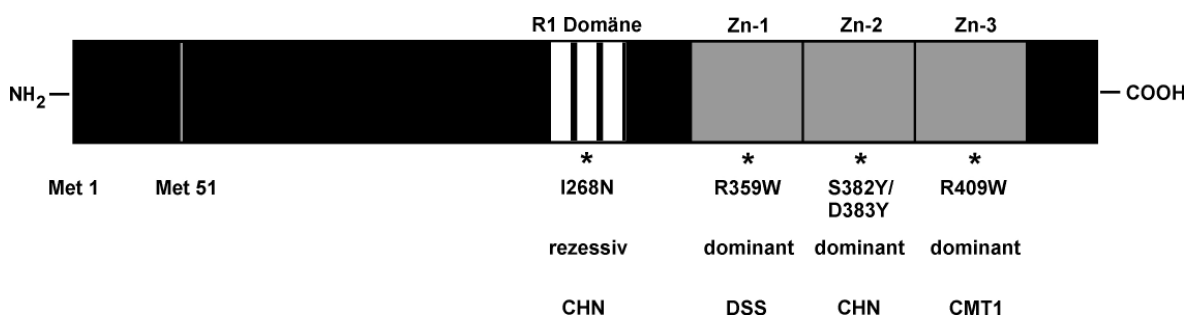


Abb. 2: Mutationen im *Early Growth Response 2*-Gen. Die Mutationen befinden sich im kodierenden Bereich des EGR-2. Met 1 und Met 51 beschreiben die Position des Start-Methionins.

Das menschliche EGR-2 ist das humane Homolog zum Krox-20, das man bei Mäusen findet. Beide Gene sind insgesamt zu 75 % homolog (in der codierenden Region sind 87 % und in der Zinkfinger Region sind 89 % homolog (Joseph et al., 1988)). Krox-20 ist ein Teil einer transkriptionalen Kaskade, die verantwortlich für die Entwicklung und Segmentierung des Rhombenzephalons ist (Sham et al., 1993). Des Weiteren wirkt das Krox-20-Gen auf die Entwicklung der motorischen und cranialen Nerven, und auf die Myelinisierung der Schwann'schen Zellen und deren mutmaßlichen Vorläufer (Topilko et al., 1994). Topilko et al. inaktivierten bei Mäusen das Krox-20-Gen und beobachteten, dass ein großer Teil der homozygoten *knockout*-Mäuse unmittelbar nach der Geburt starben. Die überlebenden *Knockouts* zeigten einen Phänotyp mit generalisiertem Zittern. Man fand eine Hypomyelinisierung des peripheren Nervensystems. Die Schwann'schen Zellen wiesen einen nur sehr geringgradigen Differenzierungsgrad auf.

Die *knockout*-Mäuse zeigten im Vergleich zu ihren gesunden Kontrollen eine weitaus langsamere Atemfrequenz, damit verbunden fiel auch das Atemminutenvolumen erheblich niedriger aus. Weiterhin waren die sonst als physiologisch beschriebenen Atempausen bei jungen Säugetieren (Apnoen > 3 Sekunden) im Ganzen länger. Insgesamt konnte man bei den *Krox-20-knockout*-Mäusen 10 mal länger andauernde Apnoen beobachten als bei ihren gesunden Wildtyp-Kontrollen (Jacquin et al., 1996). Diese Atemstörungen führen bei über 80 % der Tiere zum Tod.

Heterozygote *Krox-20* Tiere zeigten keine der genannten Beeinträchtigungen auf (Topilko et al., 1994). Sowohl Chatonnet et al., als auch Nagarajan et al. konnten diese Ergebnisse mit ihren ebenfalls homozygoten *Krox-20 knockout*-Mäusen bestätigen (Chatonnet et al., 2002; Nagarajan et al., 2001).

Timmermann et al. sequenzierten 1999 das EGR-2 von 50 nicht verwandten Patienten, die an der CMT-1, dem DSS oder einer unspezifischen Neuropathie erkrankt waren, auf der Suche nach möglichen Mutationen oder Polymorphismen. Dabei stießen sie auf einen Patienten, der eine stark ausgeprägte hypomyelinisierende Neuropathie aufwies. Bei diesem Patienten fanden sie eine der dominanten Mutationen in der Zinkfinger Region des EGR-2. In der Anamnese des Patienten fiel auf, dass er besonders in den ersten Lebenswochen an Störungen der Atmung litt. Mit 16 Jahren verstarb der Patient an Atemversagen infolge einer Pneumonie.

Diese Sachverhalte deuten daraufhin, dass das EGR-2 einen Einfluss auf die Atemkontrolle haben könnte. Das OSAS basiert auf multiplen Faktoren: Lebensstil, Vorerkrankungen und Genetik. Es handelt sich hierbei um eine multifaktorielle Erkrankung. Durch genauere Untersuchung dieser genannten Sachverhalte, könnte man das *Early Growth Response*-Gen als mögliches Kandidatengen, das zur Entwicklung eines OSAS führt, postulieren.

2 Fragestellung

Mit der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Findet sich in einer Gruppe von Patienten mit OSAS eine Häufung von Polymorphismen oder Mutationen im EGR-2-Gen?
2. Lässt sich eine Assoziation von EGR-2 zum OSAS feststellen?
3. Haben Polymorphismen im EGR-2-Gen einen Suszeptibilitätseffekt auf das OSAS?
4. Was gibt es für weitere Kandidatengene, die für ein OSAS in Frage kommen

Dazu wurde zunächst ein Genabschnitt des EGR-2 der Betroffenen durch direkte DNA-Sequenzierung, auf dem bekannte Mutationen liegen können, auf Punktmutationen und / oder Polymorphismen untersucht. Weiterhin sollte bei einem kleineren Teil der Betroffenen das gesamte EGR-2 sequenziert werden, um weitere mögliche Punktmutationen und / oder Polymorphismen zu finden.

Neben den OSAS-Patienten soll ein Kontrollkollektiv aus der Normalbevölkerung mit der gleichen direkten DNA-Sequenzierung bezüglich des Vorhandenseins und der Häufigkeit des Auftretens möglicher Punktmutationen und / oder Polymorphismen überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten- und Kontrollpopulation

Insgesamt wurden DNA-Proben von 58 Patienten, die klinisch und somnographisch als OSAS-Patienten mit einem AHI > 10 / h klassifiziert worden waren, untersucht. Als Kontrolle diente die DNA von 60 Patienten, die ebenfalls klinisch und polysomnographisch untersucht wurden und bei denen der AHI unter 10 / h lag.

Die Kontroll-Probanden lassen sich in zwei Gruppen unterteilen:

45 Probanden gehören zu der Gruppe mit einem AHI von 5 –10 / h, bei den restlichen 15 Probanden wurde ein AHI von < 5 / h beobachtet. Alle Patienten wurden in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Westfälischen Wilhelms-Universität im Schlaflabor untersucht und betreut.

3.2 Blutentnahme und DNA-Isolation

Die Blutentnahme zur molekulargenetischen Diagnostik erfolgte ausschließlich nach schriftlicher Einverständniserklärung der Probanden. Venöses Blut wurde durch Venenpunktion gewonnen. Zur DNA-Isolierung und –Reinigung aus Vollblut mit dem QIAamp-Blood-Kit (Qiagen) wurden spezielle QIAamp-Zentrifugiersäulen (*spin-column*) verwendet, die eine absorbierende Kieselerdemembran enthielten und eine Ausbeute von ca. 6 µg reiner DNA erbrachten. Der Algorithmus der DNA-Isolierung ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: DNA-Isolierungsschema und Materialbeschreibung

Menge/Reaktionsgefäß	Gebrauchslösung	Konzentration	Bestandteile
200 µl	Vollblut		Patientenblut + EDTA
20 µl	RNase A-Lösg.	20 mg/ml	RNase-Enzym
25 µl	QIAGEN-Protease	45mAU/mg	140 mg Lyophilisat + 7 ml dest. H ₂ O
200 µl	Puffer AL		44 ml Reagenz AL1 + 11 ml AL 2
Sofort 15 Sekunden (s) mischen, anschließend 10 Minuten bei 70° C inkubieren			
210 µl	Ethanol	96 – 100%	Ethanol
Kurz mischen, QIAamp-Zentrifugensäule (ZS) in ein 2 ml-QIAGEN-Gefäß, Probengemisch in ZS pipettieren			
1 Min. bei 8000 U/min. zentrifugieren, ZS in ein neues 2 ml-QIAGEN-Gefäß			
500µl	Puffer AW		81ml Waschpufferkonzentrat + 190 ml Ethanol (96 %)
1 Min. bei 8000 U/min. zentrifugieren (1.Waschschritt), ZS in ein neues 2ml-QIAGEN-Gefäß			
500µl	Puffer AW		(s.o.)
3 Min. bei 14 000 U/min. zentrifugieren (2.Waschschritt) ZS in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß			
200µl	Puffer AE		60 ml Elutionspuffer
4 - 12 µg gereinigte genomische DNA, 1-5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur (RT), 1 Min. bei 8000 U/min. zentrifugieren			

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, *in vitro* Nukleinsäuren zu amplifizieren. Ausgehend von einer Nukleinsäure-Matrize (Template-DNA) wird mittels einer DNA-Polymerase ein neuer komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Startermoleküle sind synthetische Oligonukleotide (Primer) die antiparallel zueinander an die beiden Matrizen-DNA-Stränge hybridisieren und von deren 3'-Ende die DNA-Polymerase den neuen DNA-Strang synthetisiert. Der Ablauf der PCR gliedert sich in drei Phasen, deren zyklische Wiederholung zu einer exponentiellen Amplifizierung der DNA führt. Die erste Phase ist die Denaturierungsphase des DNA-Doppelstrangs. Durch Hitze werden die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Strängen der Doppelhelix aufgeschmolzen, wodurch Einzelstränge entstehen. In der zweiten Phase, der Hybridisierungsphase, erfolgt die temperaturabhängige Primer-Hybridisierung an die komplementäre, einzelsträngige Matrizen-DNA. Die optimale Hybridisierungstemperatur (*Annealing*-Temperatur) für einen Primer ergibt sich aus dessen Länge, Nukleotidzusammensetzung, -verteilung sowie seiner Schmelztemperatur (T_m). Als Schmelztemperatur wird dabei die Temperatur bezeichnet, bei der die Primer-DNA-Moleküle zu 50 % denaturiert vorliegen. Die Schmelztemperatur der Primer-DNA (bis zu 25 Nukleotiden) lässt sich anhand der Zusammensetzung aus GC- und AT-Paaren berechnen. Ein GC-Paar trägt mit 4° C und ein AT-Paar mit 2° C zur Schmelztemperatur bei. Oft wird für die PCR eine *Annealing*-Temperatur 5° C unter der errechneten Schmelztemperatur des Primers gewählt. Durch das Testen eines großen Temperaturspektrums kann die optimale *Annealing*-Temperatur ermittelt werden. Wenn keine optimale *Annealing*-Temperatur ermittelt werden kann, wird das Primerpaar mit Zusatz von 5 x Q-Solution (Qiagen) zum Grundansatz getestet. Dies bewirkt eine Veränderung des Schmelzverhaltens der DNA und erleichtert in manchen Fällen die spezifische Anlagerung des Primers an die Matrize, so dass auch in kritischen Sequenzbereichen (z.B. hoher GC-Gehalt) die PCR erfolgen kann. Die mit dieser Methode ermittelte optimale für jeden Primer spezifische *Annealing*-Temperatur wird bei den weiteren PCR-Reaktionen benutzt. Während der dritten Phase eines PCR-Zyklus (Elongationsphase) folgt die Neusynthese der zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenz durch eine hitzestabile Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*.

Dabei entstehen die zur DNA-Matrize komplementären DNA-Fragmente. In der PCR eingesetzte Polymerasen sind hitzestabil und brauchen für weitere Zyklen nicht erneut zugegeben werden.

Die zuvor isolierte DNA (Tab.3) wurde mit folgenden Komponenten in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert (Tab.4). Die Proben genomischer DNA wurden für jeden OSAS-Patienten jeweils mit beiden Primerpaaren angesetzt. Die spezielle PCR für die separate Vervielfältigung der 9 einzelnen Exone des EGR-2-Gens verläuft im Wesentlichen wie oben dargestellt. Es wurden jedoch 9 verschiedene Primer als Startoligonukleotide (Tab.5) mit unterschiedlichen Zyklen (Tab.6 und Tab.7) verwendet. Diese 9 überlappenden Primerpaare basieren auf der cDNA, die von Joseph et al. und Rangnekar et al. veröffentlicht wurden (Joseph et al., 1988; Rangnekar et al., 1990).

Tab. 4: PCR-Mix pro DNA-Probe (50 µl)

Komponente	Menge
Aqua demin.	32,8 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
dNTP-Gemisch (je 10mM)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 Einheiten/µl)	0,2 µl
<i>Template</i> -DNA	3 µl

Tab. 5: Liste der Primer-Sequenzen für die 2 codierenden Exons des EGR-2 Gens

Primer	Sequenz	Größe
1.1f	5' AAGTGTGGAGGGAAAAGGA 3'	299 bp
1.1R	5' ACGCGGCTTACCTCCGGC 3'	
2.1f	5' TCCCCTCCCCAGATGGCATG 3'	248 bp
2.1R	5' TGACGCTGGATGAGGCTGTG 3'	
2.2f	5' GCTACCCAGAAGGCATAATC 3'	300 bp
2.2R	5' AGGAAGGAGGTGGTGGGTAG 3'	
2.3f	5' CCCTTCTGCGTTCCTGTGTCAG 3'	273 bp
2.3R	5' CAGGGTAAAGTTACGGATTG 3'	
2.4f	5' ACCCAGGTCTCTTCCCAATG 3'	396 bp
2.4R	5' GCAGGTGGTGTGGGTTATAG 3'	
2.5af	5' CAATCCGTAAC TTTACCCTG 3	286 bp
2.5aR	5' GGATGTGCCGTGTCAGCTCG 3'	
2.5bf	5' CGAGCTGACACGGCACATCC 3'	326 bp
2.5bR	5' CTCCGCCAAGACTGCTGCTG 3'	
2.5cf	5' CGCAAGTACCCCAACAGACC 3'	186 bp
2.5cR	5' GGTGGTCACTGCGGCTGAAG 3'	
2.6f	5' ATCGGTGCCAGCCCCCTCTA 3'	287 bp
2.6R	5' TAGGTGGAAAGGGGGCAGTG 3'	

Tab. 6: PCR-Ablauf

Prozess	Temperatur	Dauer
Aktivierung der HotStar®-Taq	95° C	15 Min
Denaturierung	94° C	1 Min
Primer- <i>Annealing</i>	X (Tab.7)	1 Min
Elongation	72° C	45 sec
Wiederholung der Schritte 2-4 (12-35 x, siehe Tab.7)		
Terminale Elongation	72° C	10 Min
Kühlschritt	4° C	∞

Tab. 7: Spezifische Zyklen für die EGR-2-Primer

Primer	Temperatur	Zykluswiederholung
1. EGR 1.1	64° C, 62° C, 60° C	Je 12 Zyklen
2. EGR 2.1	64° C, 62° C, 60° C	Je 12 Zyklen
3. EGR 2.2	54° C + Q – Solution	Je 35 Zyklen
4. EGR 2.3	54° C	Je 35 Zyklen
5. EGR 2.4	54° C + Q – Solution	Je 35 Zyklen
6. EGR 2.5a	48° C + Q – Solution	Je 35 Zyklen
7. EGR 2.5b	66° C, 64° C	Je 18 Zyklen
8. EGR 2.5c	64° C, 62° C, 60° C	Je 12 Zyklen
9. EGR 2.6	64° C, 62° C, 60° C	Je 12 Zyklen

3.4 Agarosegelelektrophorese

Agarose, ein Polysaccharid hergestellt aus roten Meeresalgen, lässt sich durch Aufkochen in Wasser bzw. Pufferlösung lösen und geliert beim Abkühlen. Die dabei entstehenden Polysaccharid-Doppelhelices lagern sich zu relativ dicken Fäden zusammen, wobei ein dichtes Netzwerk entsteht. Agarosegele können zur Trennung von einzel- oder doppelsträngiger DNA genutzt werden, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA von der Länge und Konformation derselben abhängt. Die Agarosegelelektrophorese erfolgte in einer horizontalen Gelkammer. Für die Genotypisierungen kamen 1,5 % ige (w/v) Gele zum Einsatz. Dafür wurde die Agarose (SeakemLE Agarose, Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf) durch Aufkochen in TAE-Puffer (1x) gelöst und bei 62° C gelagert. Für die Herstellung der Gele wurde eine Taschenschablone am oberen Rand der Kammer (Kathodenseite) eingesetzt und die Agarose (40 ml Agarose mit 5 µl Ethidiumbromid (1 mg / ml Gebrauchslösung)) luftblasenfrei in die Gelkammer gefüllt. Nach der Polymerisation wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet und die Taschenschablone entfernt. Die DNA-Proben (5µl) und der Größenmarker (5 µl) wurden mit 1 µl Loading-Dye (6x) (10 x TBE: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 7,4 g Na_2EDTA , Merck, in 1 l VE- H_2O) versehen und in die Geltaschen pipettiert. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (120 V) wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt, wobei diese aufgrund ihrer negativen Gesamtladung von der Kathode zur Anode wanderten. Nach ca. 10 Minuten wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert, wobei das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid fluoreszierte. Anschließend wurden die digitalen Fotos ausgewertet. Durch Vergleiche der einzelnen Banden des PCR-Produktes mit den Banden des mitgeführten Standards im Gel waren die Exons 2.1, 2.2, 2.3, .2.4, 2.5a/b/c und 2.6 des EGR-2 Gens deutlich erkenn- und differenzierbar.

3.5 Sequenzierung

Die mit Hilfe des PCR Purification Kits (Qiagen, siehe Tab.8), aufgereinigten PCR-Produkte wurden abermals zur Konzentrationsbestimmung auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen (2 µl), um die ungefähre Konzentration zu quantifizieren.

Tab. 8: Aufreinigung des PCR-Produktes gemäß Qiagen Protokoll

Menge/Reaktionsgefäß	Gebrauchslösung	Bestandteile
47 µl	PCR-Amplifikat	Amplifizierte Patienten-DNA
500 µl	Puffer PB	Siehe MinElute™ Handbuch
Zellsuspension (ZS) in ein 2ml Qiagen-Gefäß, Probengemisch in ZS pipettieren		
1 Min. bei 13000 U/min. zentrifugieren, Flüssigkeit aus Qiagen-Gefäß werfen		
750 µl	Puffer PE	Siehe MinElute™ Handbuch
Puffer in ZS pipettieren und bei 13000 U/min. 3 Min zentrifugieren		
ZS in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf)		
30 µl	dest. H ₂ O	-
H ₂ O in ZS pipettieren, Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Min., 1 Min. bei 13000 U/min. zentrifugieren		

Der Sequenzierungsalgorithmus entsprach der weiterentwickelten Sanger-Methode:

2 µl BD Terminator Cycle Sequencing Kit 3 (Applied Biosystems),

2 µl Puffer (200 mM Tris, 5 mM MgCl₂),

0,5 µl Primer (10 pmol/µl),

200 ng PCR-Produkt,

HPLC-H₂O zu einem Gesamtvolumen von 10 µl.

Die Sequenzier-Reaktion verlief in einem PCR-Cycler unter folgenden Bedingungen (Tab.9):

Tab. 9: Sequenzier-PCR

Temperatur	Zeit	Prozess
96° C	10 sec	Denaturierung der DNA
55° C	10 sec	Annealing des Oligonukleotid-Primers
60° C	4 min	DNA-Synthese mit Kettenabbruch mit Einbau eines fluoreszierenden Didesoxynukleotids

Dieser Zyklus wurde 25 mal wiederholt. Die DNA liegt als doppelsträngige Matrize vor. Bei der Sequenzier-Reaktion wird nur ein Primer eingesetzt, so dass die Vorwärts- und Rückwärtsprimer in zwei getrennten Reaktionsansätzen zum Einsatz kommen. Nach dem *cycle-sequencing* erfolgte die Aufreinigung der Sequenzier-Produkte mit Sephadex G 50 superfine (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) durch das Aufreinigungssystem von Millipore (Multiscreen HV mit 0,45 µm *hydrophilic low protein binding durapore membrane*, siehe Hersteller-Protokoll), um nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte ddNTPs zu eliminieren. Nach Zugabe von 10 µl HPLC-H₂O wurden die Sequenzelektrophoresen in einem 9700 Kapillarelektrophorese-Sequencer (Applied Biosystems) durchgeführt und die Sequenzen anschließend mit dem Programm SeqMan aus dem DNASTAR Programmpaket (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) ausgewertet.

3.6 Analyse ermittelter Sequenzvarianten

Zur Mutations- und Polymorphismusanalyse wurde das *Early Growth Response-2* Gen alternativ der vom OSAS betroffenen Personen und der nicht betroffenen Personen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden durch direkte Sequenzierung aus der Patienten-DNA Sequenzen erstellt, die untereinander und mit einer Referenzsequenz verglichen werden konnten. Diese Methode ermöglicht es, Sequenzvariationen bei einzelnen Patienten zu ermitteln. Handelt es sich dabei um einen einzelnen Basenaustausch, kann man diesen mit Hilfe der Datenbank dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) überprüfen. Würde

es sich bei einer möglichen Sequenzvariation um eine schon Bekannte handeln, bezeichnet man dies als einen Polymorphismus, der mit hoher Wahrscheinlichkeit in keinem kausalen Zusammenhang mit der Ausbildung eines OSAS steht. Einen sogenannten Polymorphismus bezeichnet man als SNP (*single nucleotide polymorphism*). Eine SNP ist eine Punktmutation, die bei einigen Individuen einer Population auftritt und keine krankheitsverursachende Variante darstellt, sondern als natürlich eingestuft wird. Jeder SNP besitzt zwei Allele. Die SNPs sind in der Datenbank alle mit einer Nummer erfasst. Einige SNPs enthalten in dieser Datenbank auch Angaben über ihre Allelfrequenz, aus der man entnehmen kann, mit welcher Häufigkeit die einzelnen Allele in der entsprechenden Population verteilt vorkommen. Bei Abweichungen von der Referenzsequenz, wurde durch Untersuchung von gesunden Kontrollen geprüft, ob es sich möglicherweise um einen SNP oder um eine möglicherweise pathogene Mutation handelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf der Suche nach möglichen Mutationen und Polymorphismen erst ein Teilbereich des EGR-2, der die Primer Paare 2.5 c und b umfasste (Tab.10), sequenziert. Dies geschieht an Anlehnung an Timmermann et al., die in ihrer Arbeit 1999 in diesem Bereich bereits Polymorphismen fanden.

Tab. 10: Primerpaar Sequenzen, der markierte Bereich zeigt die Primer Paare 2.5 c und b

Primer	Sequenz	Grösse
1.1f	5' AAGTGTGGAGGGAAAAGGA 3'	299 bp
1.1R	5' ACGCGGCTTACCTCCGGC 3'	
2.1f	5' TCCCCTCCCCAGATGGCATG 3'	248 bp
2.1R	5' TGACGCTGGATGAGGCTGTG 3'	
2.2f	5' GCTACCCAGAAGGCATAATC 3'	300 bp
2.2R	5' AGGAAGGAGGTGGTGGGTAG 3'	
2.3f	5' CCCTTCTGCGTTCCTGTCAG 3'	273 bp
2.3R	5' CAGGGTAAAGTTACGGATTG 3'	
2.4f	5' ACCCAGGTCTCTTCCCAATG 3'	396 bp
2.4R	5' GCAGGTGGTGTGGGTTATAG 3'	
2.5af	5' CAATCCGTAAC TTTACCCTG 3'	286 bp
2.5aR	5' GGATGTGCCGTGTCAGCTCG 3'	
2.5bf	5' CGAGCTGACACGGCACATCC 3'	326 bp
2.5bR	5' CTCCGCCAAGACTGCTGCTG 3'	
2.5cf	5' CGCAAGTACCCCAACAGACC 3'	186 bp
2.5cR	5' GGTGGTCACTGCGGCTGAAG 3'	
2.6f	5' ATCGGTGCCAGCCCCCTCTA 3'	287 bp
2.6R	5' TAGGTGGAAAGGGGGCAGTG 3'	

Nach dem Zufallsprinzip wurde in der OSAS-Gruppe bei 20, in der Kontrollgruppe bei 10 Patienten das gesamte EGR-2-Gen sequenziert.

3.7 Statistik

Bei allen Auswertungen wurde zunächst der arithmetische Mittelwert der Messwerte bzw. Zählerergebnisse bestimmt (Abb.3).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Abb. 3: Formel zur Bestimmung des arithmetischen Mittelwerts.

Nach Errechnen der Mittelwerte wurde für alle Ergebnisse der Versuchsreihen zusätzlich die Standardabweichung ermittelt (Abb.4).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_i (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}$$

Abb. 4: Formel zur Bestimmung der Standardabweichung.

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

4 Ergebnisteil

Unter Anwendung der PCR wurde die DNA des *Early Growth Response-2* von insgesamt 58 am obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom erkrankten Patienten auf Punktmutationen oder Polymorphismen untersucht.

Als Kontrolle dienten 60 Probanden, die ebenfalls wie die OSAS Patienten, zuvor polysomnographisch untersucht worden waren.

4.1 Beschreibung der OSAS Patienten und der Kontrollgruppe

58 Patienten mit gesichertem OSAS wurden in die Untersuchung mit einbezogen. Der Schweregrad ihrer obstruktiven Schlaf-Apnoe-Erkrankung wurde anhand des AHI (Apnoe-Hypopnoe-Index) erfaßt. Der AHI errechnet sich aus der Anzahl der Apnoen von jeweils mehr als 10 s Dauer pro Stunde. Liegt der AHI über 10, liegt das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom vor. Zusätzlich zum AHI wurden Alter und BMI der Probanden miterfasst.

Neben der DNA-Sequenzierung der OSAS-Gruppe, wurde auch die DNA des *Early Growth Response-2* eines Kontrollkollektivs von 60 Probanden sequenziert. Die Kontrollen wurden ebenfalls allesamt polysomnographisch untersucht und bei ihnen konnte ein OSAS mit einem AHI > 10 ausgeschlossen werden. Für die genauere Differenzierung wurde die Kontrollgruppe noch einmal aufgeteilt in eine Gruppe mit einem AHI von 0 – 5 und eine weitere Gruppe mit einem AHI zwischen 5 und 10.

4.1.1 Geschlechterverteilung der OSAS Gruppe und der Kontrollen

Die Stichprobe der OSAS-Patienten bestand zu 8,6 % aus Frauen (n=5) und zu 91,4 % aus Männern (n=53) (Abb. 5).

Von den insgesamt 60 Kontrollen machten die Frauen einen Anteil von 41,7 % (n=25), die Männer bildeten einen Anteil von 58,3 % (n=35) aus. (Abb. 5)

Die Gruppe mit einem AHI zwischen 5 und 10 umfasste 14 Patienten, wovon 10 Männer und 4 der Patienten Frauen waren.

Die zweite Gruppe mit dem AHI von 0 bis 5 hatte eine Anzahl von 21 Frauen und 24 Männern (Tab.11).

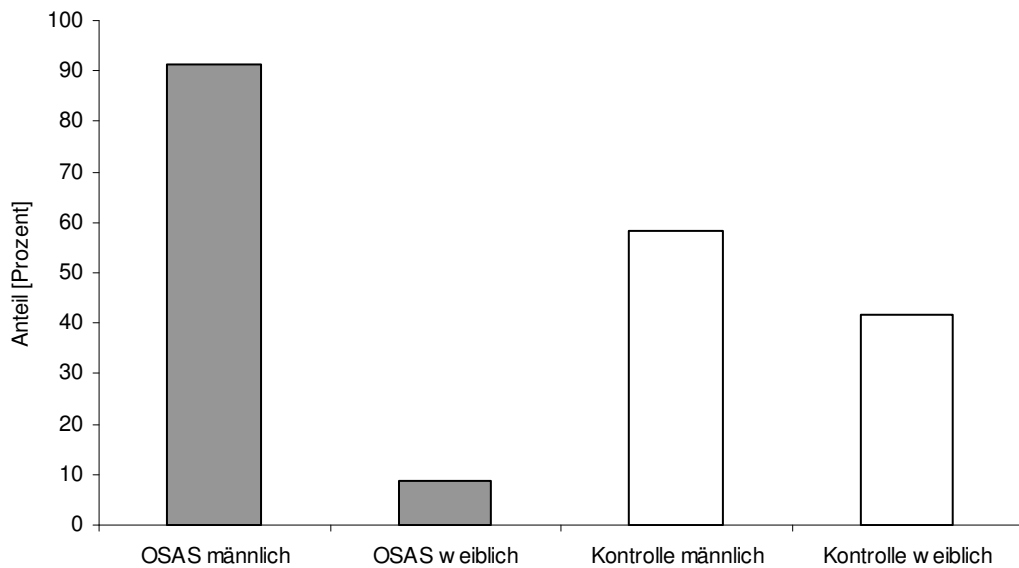


Abb. 5: Geschlechterverteilung unter den OSAS (Männer n = 53, Frauen n = 5) Patienten und den Kontrollen (Männer n = 35, Frauen n = 25)

Tab. 11: Verhältnis von Kontrollgruppen und Geschlecht (n = 60)

	Kontrollgruppe			Gesamt
Geschlecht		männlich	weiblich	
	AHI 5 - 10	10 71,4%	4 28,6%	14 100%
	AHI 0 - 5	25 54,3%	21 45,7%	46 100%
Gesamt		35 58,3%	25 41,7%	60 100%

4.1.2 Alter

Das Durchschnittsalter der OSAS Patienten lag bei $58,6 \pm 10,76$ Jahren. Das Durchschnittsalter der Frauen betrug $64,8 \pm 6,4$ Jahre, das der Männer $58,2 \pm 11$ Jahre.

Der Altersdurchschnitt der gesamten Kontrollen liegt bei $46,92 \pm 15,5$ Jahren. In der Gruppe AHI 0 – 5 beträgt der Mittelwert des Alters $46,13 \pm 15,11$ Jahre, die Gruppe mit dem AHI zwischen 5 und 10 hat einen Durchschnitt von $53,28 \pm 15,11$ Jahren, (Abb.6).

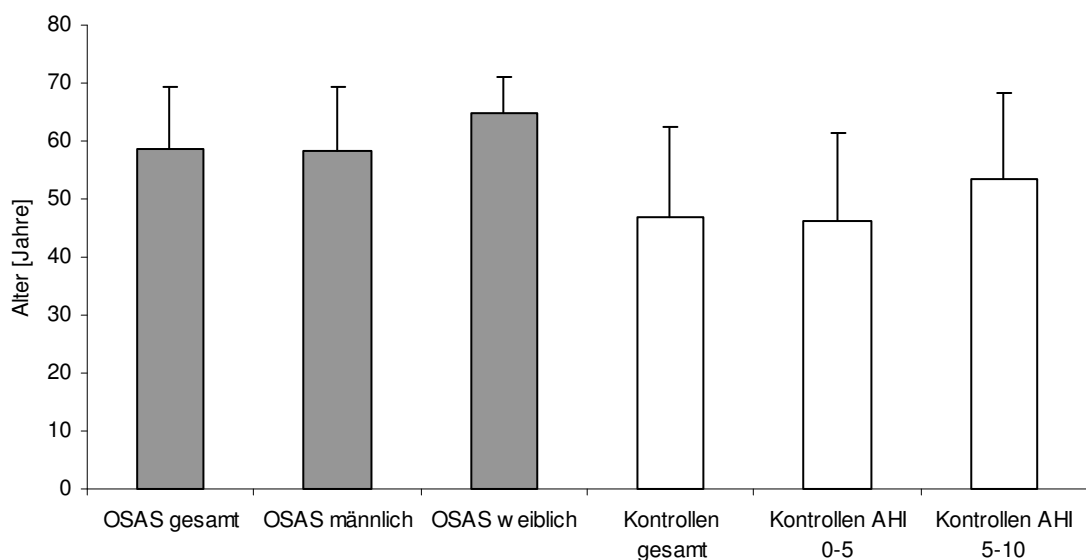


Abb. 6: Altersverteilung der OSAS Patienten und der Kontrollen. Dargestellt sind der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung

4.1.3 BMI

Als wichtiges Kriterium der OSAS-Erkrankung wurde der *Body-Mass-Index* der Probanden mit erfasst. Man errechnet ihn aus dem Quotienten des Körpergewichts einer Person in Kilogramm und dem Quadrat der Körpergröße in Metern ($\text{Gewicht} / \text{Größe}^2$ [kg / m^2]). Als normal gilt bei Männern ein BMI zwischen 20 und 25, bei Frauen zwischen 18 und 24.

Der Mittelwert des BMI der OSAS-Patienten lag bei $32,186 \pm 7,8$ ($n=58$).

Der Gesamtdurchschnitt des *Body-Mass-Index* der Kontrollen betrug $27,11 \pm 4,85$ (Abb.9). Innerhalb der Kontrollgruppe ergab sich ein durchschnittlicher BMI von $26,61 \pm 5,01$ für die Probanden mit einem AHI von 0 – 5 und ein BMI von $28,73 \pm 4$ für die Probanden mit einem AHI von 5 – 10. (Abb. 7)

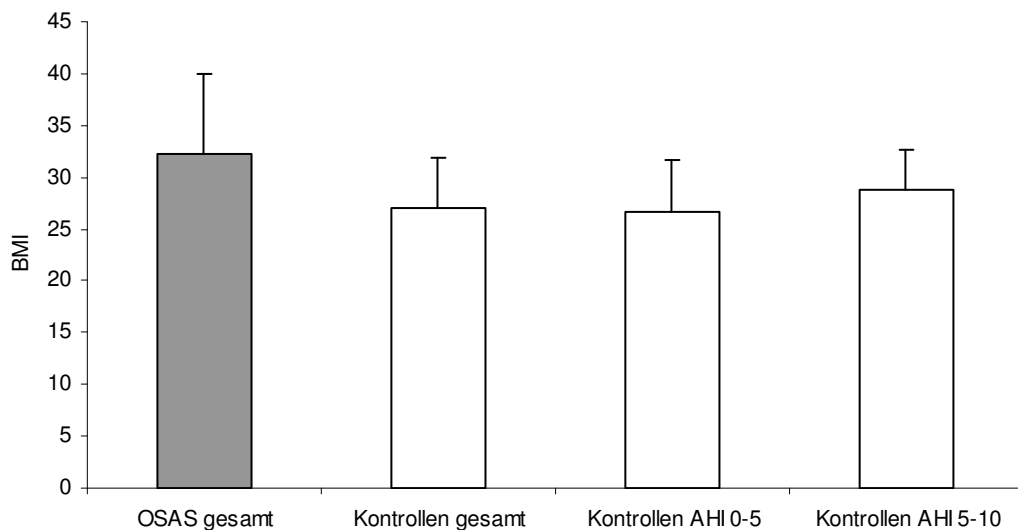


Abb. 7: Die BMI-Verteilung innerhalb der OSAS-Stichprobe und der Kontrollpatienten. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung.

4.1.4 AHI

Als ausschlaggebendes Kriterium bestimmte der AHI, ob die ausgewählten Patienten zur OSAS- oder Kontrollgruppe gehören sollten. Patienten mit einem AHI über 10 /h wurden der OSAS-Gruppe zugeteilt. Es wurde als Ausgangswert und Auswahlkriterium der AHI verwendet, der bei der ersten polysomnographischen Untersuchung der Patienten gemessen wurde. Der Durchschnittswert des AHI in der OSAS-Gruppe betrug $34,97 / h \pm 19,86$. Abb.8 zeigt die Verteilung des AHI unter den OSAS-Probanden.

Das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom liegt bei einem Apnoe-Hypopnoe-Index ab 10 vor, aufgrund dessen konnten Probanden mit einem AHI von unter 10 in die Kontrollgruppe aufgenommen werden. In der Kontrollgruppe lag der durchschnittliche AHI bei $27,11 / h \pm 4,85$

Nimmt man den Durchschnitt der Gruppe mit einem AHI zwischen 0 und 5, so liegt ein Wert von $1,29 \pm 1,36$ vor. In der Gruppe AHI 5 – 10 lässt sich ein AHI von $7,54 \pm 1,49$ errechnen (Abb. 8).

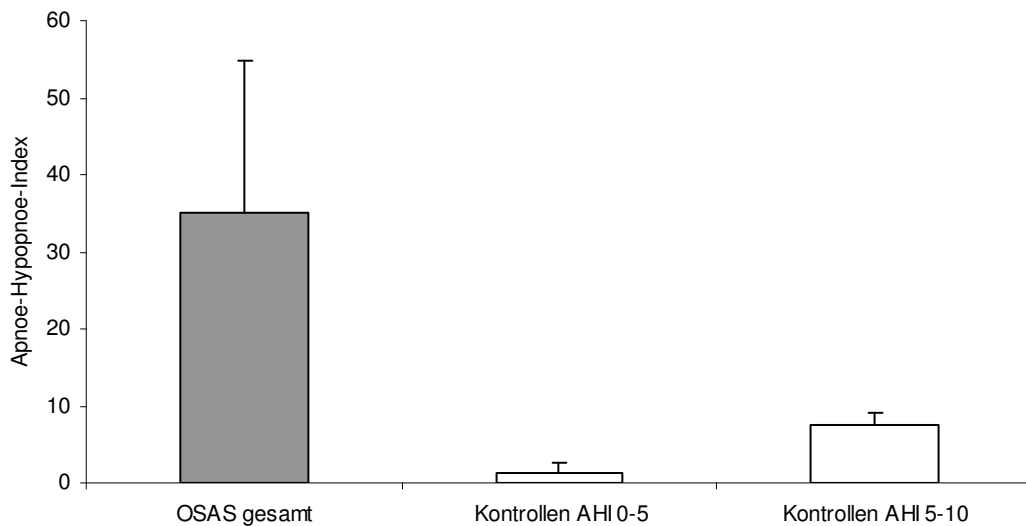


Abb. 8: Apnoe / Hypopnoe-Index der OSAS Patienten und der Kontrollen. Dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung.

4.1.5 Ergebnis der Mutationsanalyse in der OSAS-Gruppe

Es lagen keine Sequenzvariationen innerhalb der DNA der OSAS-Patienten vor. Es wurde eine fraktionelle Sequenzierung von Exon 2, die von den Prim-erpaaren 2.5b und 2.5c eingeschlossen wird, an allen 58 Patienten durchgeführt. Weiterhin wurde bei 20 Patienten, die durch Stichprobe ausgewählt wurden, noch einmal die gesamte Sequenzierung des EGR-2 durchgeführt. Bei dieser lag ebenfalls eine der Referenzsequenz identische DNA vor. Abb. 9 zeigt eine Beispielsequenz.

Die vier Nukleinbasen werden im Folgenden abgekürzt dargestellt: Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T).

Position: 3602

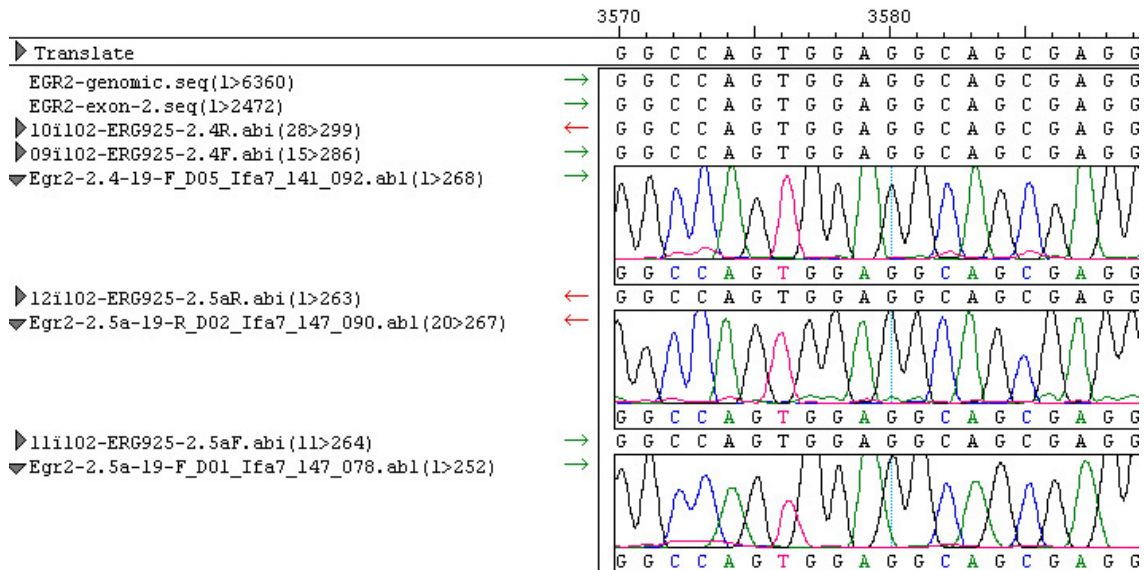


Abb. 9: Direktsequenzierung (EGR-2, Exon 2), unauffällige DNA-Sequenz eines OSAS-Patienten

4.1.6 Ergebnis der Mutationsanalyse in den Kontrollgruppen

In der Kontrollgruppe mit einem AHI zwischen 0 – 5 fanden sich zwei Patientinnen (Patienten Nummer 2083 und 2272), bei denen ein Polymorphismus identifiziert werden konnte. Dieser Polymorphismus liegt im kodierenden Bereich des EGR-2 und stellt einen Austausch des Nukleotids Adenin zu Cytosin im Codon 362 dar (Arg362Arg). Er führt auf Proteinebene zu keinem Aminosäureaustausch und wird somit als stummer Polymorphismus bezeichnet.

Es handelt sich bei dieser Sequenzvariation um einen in der Datenbank dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) nicht bekannten Polymorphismus. Dieser Polymorphismus wurde bereits von Timmermann et al. 1999 bei einem Patienten mit demyelinisierender Polyneuropathie mit leerer Familienanamnese, als auch bei einem von 70 Kontrollprobanden, entdeckt. Abbildung 10 zeigt den heterozygoten Polymorphismus.

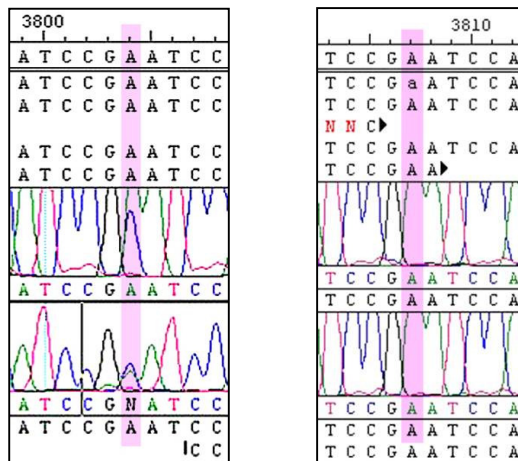


Abb. 10: Direktsequenzierung (EGR-2, Exon 5).

links: Das Originalfluorogramm der DNA-Sequenz eines Patienten; der heterozygote Polymorphismus (Arg362Arg) ist rosa gekennzeichnet, hier zeigt sich die normale Basenabfolge CGA, die für die Aminosäure Arginin kodiert, als auch die Basenabfolge CGC, die ebenfalls Arginin kodiert, somit ergibt sich hier ein stummer heterozygoter Polymorphismus

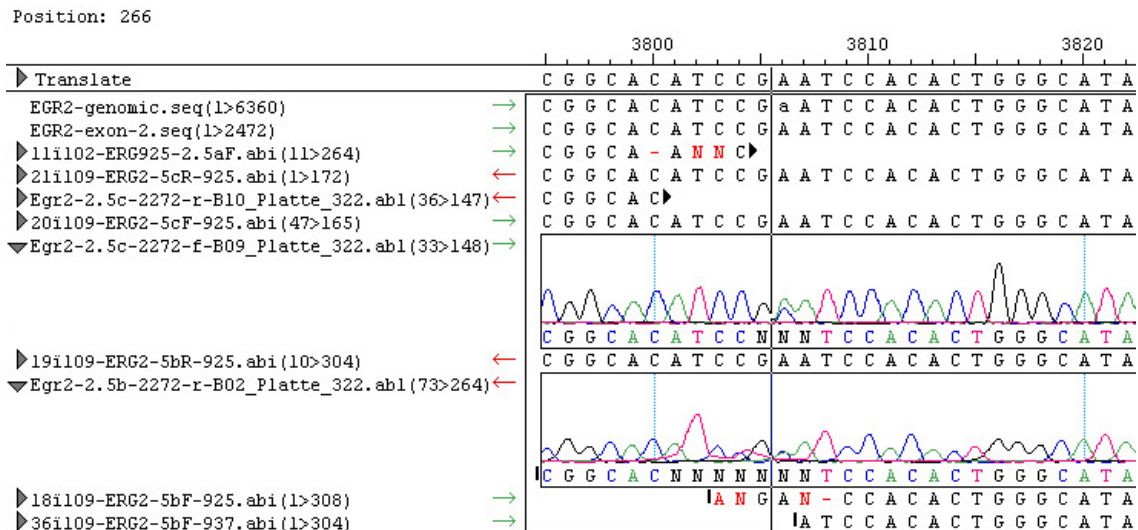
rechts: Zum Vergleich derselbe Abschnitt einer gesunden Kontrolle, Bereich ist rosa gekennzeichnet, hier findet sich die normale Basenabfolge CGA

Tab. 12: Farb- und Abkürzungsverzeichnis zu Abb. 9, 10 und 11

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

Bei einer weiteren Patientin konnte derselbe Polymorphismus festgestellt werden (Abb.11)

Abb. 11: Polymorphismus des Pat. 2272, rot markiert.



In dem Codon 362 (rosa markiert) zeigt sich eine heterozygote Sequenzabweichung, es findet ein Austausch von Adenin zu Cytosin statt

Die Allelfrequenz des stummen Polymorphismus betrug im Kontrollkollektiv 1,6 %

Wie in der OSAS-Gruppe wurde die DNA des Exon 5 von EGR-2 aller Kontroll-Probanden sequenziert. Weiterhin wurde nach dem Zufallsprinzip noch das gesamte Exon des *Early Growth Response*-Gen bei 10 Patienten des Kontroll-Kollektivs untersucht. Hierbei fanden sich keine weiteren Polymorphismen oder Mutationen.

Tabelle 13 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Mutationsanalyse des EGR-2 im OSAS- und Kontrollkollektiv:

Tab.13: Ergebnisse der Gensequenzierung von insgesamt 118 Patienten

	Sequenzierung des gesamten EGR-2	Teilsequenzierung Exon 5 / EGR-2	Ergebnisse
OSAS (n = 58)	20	58	Keine Mutation und / oder Polymorphismen
Kontrollkollektiv (n = 60)	10	60	1 stummer Polym. (Arg362) im codierenden Bereich bei 2 Patienten

5 Diskussion

5.1 Auswahlkriterien der OSAS-Gruppe

Ausschlaggebend für die OSAS-Gruppe war ein AHI von über 10. Weitere Kriterien, die miterfasst wurden, waren das Alter der OSAS-Patienten und der BMI. Betrachtet man die OSAS-Gruppe dieser Arbeit fällt auf, dass sie die typische Konstellation von der in der das OSAS beschreibenden Literatur besitzt: Männer sind häufiger vom obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom betroffen als Frauen. Dies zeigt sich ganz klar in der Geschlechterverteilung in der Stichprobe: von 58 OSAS Patienten sind 53 Patienten Männer und nehmen somit 91,4 % der gesamten OSAS-Gruppe ein. Die Epidemiologie des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms besagt, dass das OSAS in allen Altersklassen gefunden wird, jedoch häufiger auftritt bei Leuten über 55 Jahren, bei denen man vermehrt einen AHI von über 5 beobachtet (Young et al., 1993). Auch diese Tatsache lässt sich in der Stichprobe nachweisen: das Durchschnittsalter der ausgewählten OSAS-Patienten liegt bei 58,59 Jahren, mit einer Spannweite von 39 bis 87 Jahren. Dies deutet darauf hin, dass sich diese Erkrankung in unterschiedlichen Altergruppen manifestiert.

Betrachtet man den *Body-Mass-Index*, so beobachtet man einen Mittelwert von 32,186 kg / m² unter den OSAS-Patienten. Anhand dieses hohen Wertes lässt sich zeigen, dass auch in dieser Gruppe, der oft in der Literatur beschriebene Risikofaktor der Adipositas zutrifft, jedoch muss betont werden, dass knapp die Hälfte der Patienten einen BMI von unter 30 aufweisen. Diese Tatsache unterstützt die Aussage, dass auch viele Menschen von einem obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom betroffen sind, die eben nicht an einem überhöhten BMI leiden. (Taheri and Mignot, 2002)

5.2 Ergebnisse der OSAS-Gruppe

Grund für die primäre Teilsequenzierung der Primerabschnitte 2.5 b und c waren die in der Arbeit von Timmermann et al. (Timmermann et al., 1999) beschriebenen Mutation und Polymorphismen auf genau diesem Teilabschnitt des EGR-2 Gens. Timmermann et al. fanden dort eine Mutation, bei einem an einer stark hypomyelinisierenden Neuropathie leidenden Patienten, auf dem Codon 359 (CGG→TGG), die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Tryptophan auf Proteinebene führte. Ebenso fanden sie sowohl in ihrer Neuropathie-Gruppe als auch in ihrer Kontrollgruppe einen stummen Polymorphismus auf dem Codon 362 (CGA→CGC), der auf Proteinebene zu keinem Aminosäureaustausch führt. Jedoch vermuteten Timmermann et al. hinter dieser Sequenzvariation einen stummen Polymorphismus ohne krankheitsverursachende Wirkung. Sowohl diese Mutation als auch der stumme Polymorphismus fallen genau in die α -Helix Region der ersten Zinkfinger Region des EGR-2 Gens (Abb.2), deren Sequenz man mit Hilfe der Primer 2.5 b und c amplifizieren kann. Warner et al. gehen ebenfalls auf die Zinkfinger Region des EGR-2 ein und beschreiben neben der R359W Mutation zwei weitere dominante Mutationen innerhalb dieser Region: S382Y und R409 (Warner et al., 1998). Diese Mutationen treten im Zusammenhang mit Neuropathien wie dem Dejerine-Sottas-Syndrom, der Charcot-Marie-Tooth'sche Erkrankung sowie bei weiteren unspezifische Neuropathien auf. Wie schon in Kapitel 1 erwähnt, haben einige Arbeiten gezeigt, dass es möglich ist, Atemstörungen wie das innerhalb dieser Arbeit beschriebene obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom mit Veränderungen der Sequenz des *Early Growth Response-2* in Verbindung zu bringen sind. Dies lässt sich anhand von tierexperimentellen Studien vermuten: in der Vergangenheit wurde bewiesen, dass das so genannte mausspezifische Krox-20 Gen und das humane EGR-2-Gen in ihrer Struktur zu 75% übereinstimmen (der kodierende Bereich stimmt zu 87 % überein, die Zinkfinger Region allein hat eine Übereinstimmung von 89 % (Tononi and Cirelli, 2001)). Die Phänotypen von Mäusen, bei denen das Krox-20 Gen inaktiviert wurde, zeigten, dass dieses Gen ausschlaggebend für die Somitenbildung in der Embryogenese ist (Schneider-Maunoury et al., 1993; Swiatek and Gridley, 1993). Weiterhin zeigt sich bei den so genannten *knockout*-Mäusen eine fehlende Myelinisierung, Schwann'sche Zellen, die eine nur geringgradige Diffe-

renzung aufweisen, finden sich bei jeder *knockout*-Maus. Ein Großteil der Mäuse überleben nicht den ersten Lebenstag und die, die überleben, haben einen ausgeprägten Tremor und weisen Apnoen auf, die 10mal länger andauern als bei ihren gesunden Kontrollen (Jacquin et al., 1996).

Des Weiteren ist bei diesen Mäusen zu beobachten, dass sie neben den Apnoen auch verminderte Atemminutenvolumina aufgrund von geringen Atembewegungen und eine herabgesetzte unregelmäßige Atemfrequenz aufweisen. Diese Arbeiten veranlassten uns zu der Vermutung, dass man Atemstörungen in Verbindung mit dem *Early Growth Response*-Gen bringen kann. Unterstützend für diese Hypothese ist die Arbeit von Dematteis et al., in der nachgewiesen wurde, dass eine hohe Korrelation zwischen dem obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom und der Charcot-Marie-Tooth'schen Erkrankung innerhalb einer Familie besteht (Dematteis et al., 2001). Bei 11 von 14 Familienmitgliedern, die an der CMT-1 litten, wurde ein obstruktives Schlaf-Apnoe-Syndrom nachgewiesen. Die CMT-1 hatte bei diesen Familienmitgliedern ihren genetischen Ursprung in einer Gen-Duplikation des PMP-22 auf dem Chromosom 17. Das PMP-22 Gen ist ebenfalls, wie der Transkriptionsfaktor *Early Growth Response-2*, für die Myelinisierung des peripheren Nervensystems verantwortlich. Das Genprodukt des PMP-22 ist ein hydrophobes integrales Membranprotein, das in großen Mengen in den Schwann'schen Zellen des peripheren Nerven nachgewiesen werden kann (D'Urso and Muller, 1997; Suter and Snipes, 1995). Es gibt Hinweise, dass das PMP-22 für die Erhaltung und Stabilität des Myelins (D'Urso et al., 1997) sowie für die Regulation der Zellproliferation v.a. der Schwann'schen Zellen der peripheren Nerven zuständig ist (Suter and Snipes, 1995; Suter et al., 1994; Zoidl et al., 1995). Dematteis et al. vermuteten hinter dem gemeinsamen Auftreten dieser beiden Krankheitsbilder (CMT-1 und OSAS) eine pharyngeale Neuropathie.

Auch andere Arbeiten wiesen bei Patienten mit obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom Neuropathien nach, wie Lüdemann et al. im Jahr 2000: von 24 OSAS Patienten, alle mit einem AHI von über 10, wiesen 17 der Patienten klinische Zeichen einer Neuropathie auf. Allerdings wurde in dieser Arbeit die Ursache der Polyneuropathie mit dem Sauerstoffmangel, den die OSAS-Patienten nachts in ihren Apnoe-Phasen erleiden, begründet. Lüdemann et al. unterstrichen ihre Vermutung, dass die periphere Nervenfunktion sauerstoff-

abhängig ist, durch den Verweis auf die Ergebnisse anderer Autoren. (Low et al., 1985; Low et al., 1986; Tuck et al., 1984)

Dennoch haben viele Arbeiten in der Vergangenheit gezeigt, dass das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom durchaus mit Neuropathien in Verbindung zu bringen ist. Wie im ersten Kapitel bereits erläutert, liegen die Wurzeln beider Erkrankungen nicht nur in umweltbedingten äußeren Einflüssen, sondern es gibt sowohl bei der einen wie bei der anderen genügend Hinweise und Beweise, dass die Entstehung der Krankheit einen genetischen Ursprung hat.

Ziel dieser Arbeit war es bei klinisch und polysomnographisch bestätigten OSAS-Patienten mögliche Veränderungen der genetischen Sequenz des *Early Growth Response-2* Gens zu finden, einem Gen, das bis jetzt nur im Zusammenhang mit der Pathogenese von Neuropathien genannt wurde.

Leider ließen sich keine Abweichungen der Nukleotidsequenz des EGR-2 der 58 OSAS Patienten im Bereich der α -Helix Zinkfinger Region finden, die mit Hilfe der Primerpaare 2.5 c und b detektiert wurden, ausmachen. Per Stichprobe wurde bei 20 dieser OSAS-Patienten die gesamte Sequenz, einschließlich des ersten und des zweiten Exons, sequenziert und untersucht. Auch in diesen Bereichen waren keine Abweichungen von der Referenzsequenz zu finden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten vorerst keinen Hinweis auf eine mögliche Assoziation zwischen dem *Early Growth Response-Gen-2* und dem obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom geben. Allerdings sollte man an dieser Stelle anmerken, dass eine Stichprobe von 58 Patienten zu klein ist, um eine abschließende Aussage über einen möglichen Zusammenhang zwischen dem EGR-2 und dem OSAS machen zu können. Eine noch größere Patientenzahl wäre notwendig, um mit Sicherheit eine genaue Aussage machen zu können. Weiterhin wäre es sinnvoll, die Auswahlkriterien für die OSAS-Gruppe zu verschärfen: um die Wahrscheinlichkeit, eine genetische Ursache zu finden, zu erhöhen, sollten die für das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom typischen Risikofaktoren, wie z.B. Adipositas so weit wie möglich ausgeschlossen werden. Zum Beispiel könnten Personen mit einem BMI von über 30 von der Untersuchungsgruppe ausgeschlossen werden.

5.3 Auswahlkriterien der Kontrollgruppe

Es war wichtig für die vorliegende Arbeit ein Kontrollkollektiv zu aquirieren, das ebenfalls wie die OSAS-Gruppe im Vorfeld sowohl klinisch als auch polysomnographisch abgeklärt wurde, diese Grundlage gewährleistet die Vergleichbarkeit beider Gruppen. Zur Kontrolle gehören Personen, die in dem Schlaflabor der Universität Münster polysomnographisch untersucht wurden und bei denen ein obstruktives Schlaf-Apnoe-Syndrom ausgeschlossen werden konnte. Das Auswahlkriterium bestand darin, dass der AHI unter 10 lag und somit bei den Probanden ein obstruktives Schlaf-Apnoe-Syndrom klar ausgeschlossen werden konnte.

Verglichen mit der OSAS-Gruppe fällt auf, dass die Geschlechterverteilung in der Kontrollgruppe ausgeglichener ist: 42 % Frauen und 58 % Männer. Diese Verteilung in der Kontrollgruppe verglichen mit der OSAS-Gruppe unterstreicht, dass das Auftreten von OSAS zum größeren Teil unter Männern auftritt.

Vergleicht man den Altersdurchschnitt der Kontroll- und der OSAS-Gruppe, so fällt auf, dass das Alter der gesamten Kontrollgruppe mit 48,36 Jahren ca. 10 Jahre unter dem Durchschnitt der OSAS-Gruppe liegt. Betrachtet man die Unterteilung der Kontrollgruppe, so fällt auf, dass das Alter der Gruppe mit einem AHI von 0 – 5 (46,79 Jahre, siehe Kapitel 4.2.3) niedriger ist als in der Gruppe mit dem AHI von 5 – 10. Dort beträgt der Altersdurchschnitt 58,28 Jahre. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis von Young et al. aus dem Jahre 1993, welches zeigt, dass man ab der Altersgrenze von 55 Jahren vermehrt einen AHI ab 5 polysomnographisch feststellt. Vergleicht man nun diese Unterteilung der beiden Kontrollgruppen, fällt auf, dass das Alter in der Gruppe AHI 5 – 10 genau dieser Altersgruppe von Young et al. entspricht.

Der BMI der gesamten Kontrollgruppe liegt verglichen mit der OSAS-Gruppe (32,186 kg / m²) niedriger und beträgt 27,14 kg / m². Diese BMI-Verteilung könnte, wie in Kapitel 5.2 schon angedeutet, einen Hinweis darauf geben, dass in der vorliegenden Arbeit das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom der Patienten zu einem gewissen Teil auf den hohen BMI zurückzuführen ist.

5.4 Ergebnisse der Kontrollgruppe

Wie die OSAS-Gruppe, wurde ebenfalls das EGR-2, genauer genommen das zweite Exon in der Zinkfinger Region, des gesamten Kontrollkollektivs von 60 Probanden teilsequenziert. Hierbei fanden wir eine Sequenzvariation bei zwei Patientinnen (Abbildung 9 und 10). Es handelt sich bei dieser Variation, die im kodierenden Bereich liegt, um einen Austausch des Nukleotids Adenin zu Cytosin im Codon 362 (Arg362Arg). Es handelt sich hierbei um einen Basenaustausch ohne Änderung der Aminosäuresequenz. Dementsprechend nimmt diese Sequenzvariation keinen Einfluss auf den Phänotypen.

In der Datenbank dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) wurde diese Variation noch nicht verzeichnet. Es muss sich aufgrund dessen um einen seltenen Polymorphismus handeln, der in unserer Kontrollgruppe mit einer Allelfrequenz von 1,6 % auftritt. Timmermann et al. haben diese Sequenzvariation ebenfalls bei zwei Personen entdecken können. In jener Arbeit wurden 50 nicht verwandte Patienten, die entweder an der Charcot-Marie-Tooth'schen Erkrankung, dem Dejerine-Sottas-Syndrom oder einer nicht näher untersuchten Neuropathie litten, auf Mutationen und Polymorphismen im *Early Growth Response-2* gescreent. Bei einem Patienten aus dieser Gruppe und in der Kontrollgruppe bestehend aus 70 gesunden Probanden, fand man den Nukleotid austausch im Codon 362 (Arg362Arg). Die Allelfrequenz betrug in der Arbeit von Timmermann et al. 0,8 %. Timmermann et al. interpretierten diese Variation als seltenen Polymorphismus, der wahrscheinlich nicht in der Pathogenese der jeweiligen Neuropathie involviert ist. Bis auf diese veröffentlichten Daten von Timmermann et al., waren keine weiteren Daten in der Literatur zu dieser Variation zu finden.

Beide Probanden, bei denen dieser Basenaustausch gefunden wurde, waren Frauen. Es fällt auf, dass zwar bei beiden ein obstruktives Schlaf-Apnoe-Syndrom ausgeschlossen werden konnte, jedoch wurde sowohl bei Probandin 2083 als auch bei Probandin 2272 eine leichte bis mittelschwere depressive Episode diagnostiziert. Weitere Diagnosen der Probandin 2272 bestanden in einer nicht organisch bedingten Insomnie und der Verdacht auf ein *restless-legs*-Syndrom, der AHI betrug 3,9.

Probandin 2083 wies neben der depressiven Episode einen AHI von 0,3 auf. Inwiefern man diese Diagnosen mit der hier gefundenen Sequenzvariation in

Verbindung bringen könnte, ist unklar. Auffällig ist, dass bei beiden eine depressive Episode festgestellt werden konnte, allerdings ist es aus den zur Verfügung gestellten Unterlagen nicht zu entnehmen, wann und wie lange diese Erkrankungen schon vorliegen, in welchem Zusammenhang sie entdeckt wurden und wie die Familienanamnese in Bezug der Depression aussieht. Die oben genannten Diagnosen sind Nebendiagnosen, die in keinem Bezug zu dem obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom stehen. Definitionsgemäß läge ein Polymorphismus dann vor, wenn eine Mutation mit einer Allelfrequenz von mindestens 1 % in der Bevölkerung nachgewiesen werden kann (Passarge (1994): Taschenatlas der Genetik, *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart New York). In diesem Fall wäre es möglich diesen in dieser Arbeit gefundenen Nukleotidaustausch als Polymorphismus zu bezeichnen. Sind alle Mutationsträger gesund, handelt es sich um einen Polymorphismus, der keine krankheitsauslösende Wirkung hat. Die Ergebnisse von Timmermann et al. und die hier gefundenen Daten lassen darauf schließen, dass es sich bei dem Basenaustausch auf Codon 362 (Arg362Arg) um einen stummen Polymorphismus handelt, der keine krankheitsauslösenden Konsequenzen hat.

5.5 Mögliche weitere Kandidatengene für das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Patienten, die an dem obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom leiden, nach Sequenzvariationen des *Early Growth Response-2* gesucht. Leider konnten wir in der zu untersuchenden Gruppe keinen Hinweis darauf finden, dass das OSAS unserer Patienten genetisch im EGR-2 verankert sein könnte. Es wäre sinnvoll, größere Patientenkollektive zu untersuchen, um das EGR-2 als genetische Ursache für das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom sicher ausschließen zu können. Doch sollte man an dieser Stelle nicht außer Acht lassen, dass eine Menge anderer Gene als Kandidatengene für das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom in Betracht kommen.

Im Folgenden sollen weitere Kandidatengene, die als Ursache für das OSAS in Frage kommen könnten, diskutiert werden und als Anregung für weitere Arbeiten in diesem Bereich dienen.

5.5.1 PMP-22, MPZ und CX-2 als mögliche Kandidaten

Einzelfallberichte und die Familienstudie von Dematteis et al. legen den Verdacht nahe, dass die Charcot-Marie-Tooth'sche Erkrankung einen zusätzlichen und unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten eines OSAS darstellt. Ursächlich für die CMT ist u.a. das PMP-22, das für ein Membranprotein kodiert.

Auch andere Gene, die wie das EGR-2 (ein Transkriptionsfaktor, der Myelinguene induziert) und das PMP-22 (das Genprodukt ist ein Myelinprotein) in die Myelinisierung des peripheren Nervensystems eingreifen, kommen als mögliche Kandidatengene für das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom in Frage: es gäbe eine Möglichkeit, Patientenkollektive auf Sequenzvariationen im MPZ zu untersuchen. Das Genprodukt des MPZ (*myelin protein zero*) macht mit nahezu 50 % das Hauptprotein des peripheren Myelins aus. Mutationen des MPZ führen zu HMSN Ib (Lemke and Axel, 1985), ebenfalls einer Neuropathie. Um die Gruppe der Myelin-Gene abzuschließen, bleibt noch das CX-32 (*connexin-32*) als mögliches Kandidatengen zu erwähnen, dessen Protein ebenfalls

im peripheren Nerven vorkommt und dort wahrscheinlich für den Stofftransport als Transmembranprotein zwischen zwei benachbarten Nervenzellen verantwortlich ist (Bergoffen et al., 1993; Bruzzone et al., 1996; Martini, 1997).

5.5.2 Kandidaten für die Atemkontrolle

Durch komplexe Prozesse wie die Kontrolle über die Atemmuskulatur und die Kontrolle über neuromuskuläre Funktionen der oberen Atemwege, wird die Atemwegsdurchgängigkeit dynamisch beeinflusst. Vererbte Anomalien der Atemkontrolle könnten eine Disposition zum obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom darstellen im Sinne einer möglichen Verstärkung der Neigung zum Kollaps der oberen Atemwege.

Es hat mehrere Studien gegeben, die belegen, dass die Beeinträchtigung der Atemkontrolle Personen anfälliger für ein obstruktives Schlaf-Apnoe-Syndrom machen. 1990 zeigten El Bayadi et al. und 1997 Redline et al., dass Mitglieder aus OSAS-Familien signifikant reduzierte Atemantworten auf extreme Hypoxie, Hyperkapnie und bei körperlicher Belastung zeigten (el Bayadi et al., 1990; Redline et al., 1997a). Zusätzlich zeigten Redline et al., genauso wie Pillar et al., dass Verwandte von OSAS Patienten im Schlaf eine verstärkere Apnoe aufwiesen als Verwandte von gesunden Kontrollen (Pillar et al., 1997; Redline et al., 1997a). Diesen Daten zufolge könnte man vermuten, dass das familiäre OSAS in bestimmten Fällen bezüglich der Chemoregulation auch auf vererbten Anomalien der Atemkontrolle basieren könnte.

Des Weiteren gab es Tiermodelle, die auf Gene wie das Endothelin-1 (ET-1) aufmerksam machen: ET-1 ist ein potentes vasoaktives Peptid, das anscheinend an der Regulation der Atmung teilnimmt. Mäuse, bei denen das ET-1 inaktiviert wurde, zeigten unerwartet ein Atemversagen, Anomalien der Atemkontrolle, craniofaziale Dysmorphien und Hypertonie. Dies sind Charakteristiken in einer Kombination, die man beim Menschen sonst nur beim obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom findet (Kurihara et al., 1994). Zusätzlich zeigten Kuwaki et al., dass ET-1-*knockout*-Mäuse beeinträchtigte Atemantworten sowohl auf Hypoxie und Hyperkapnie aufwiesen (Kuwaki et al., 1996). Ein weiteres Kandidatengen stellt das *brain derived neurotrophic factor* – Gen (BDNF) dar. Erickson et al. konnten bei ihren homozygoten BDNF-*knockout*-Mäusen

eine unregelmäßige, schwache Atmung, verbunden mit spontanen Apnoen und Anomalien in der Atemregulation, nachweisen (Erickson et al., 1996). Tankersley et al. schlugen eine Reihe von Kandidatengenen vor, die für Neurorezeptoren kodieren, wie der Glycin-Rezeptor oder der Glutamat-Rezeptor. Weiterhin nannten sie Gene, die die postnatale Entwicklung der Lunge beeinflussen, wie zum Beispiel der *basic fibroblast growth factor* (bFGF). Tankersley et al. versuchten in einer Reihe von Arbeiten die genetische Herkunft von Respirationsmustern zu klären (Tankersley, 1999; Tankersley et al., 1997; Tankersley et al., 1993).

Alle Daten unterstreichen die Komplexität des Systems der Atemregulation. Man muss viele Gene, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Regulationsystems der Atmung, die Entwicklung der Lunge und der Atemwege an sich, in Betracht ziehen.

5.5.3 Kandidaten für Adipositas

OSAS und seine genetischen Ursachen im Bereich der neuronalen Gene sind nur ein kleiner Ausschnitt von Möglichkeiten die Ursache eines OSAS auf genetischer Basis zu finden. Alleine bei Betrachtung der Risikofaktoren des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms öffnet sich ein riesiger Bereich an möglichen Kandidatengenen für diese Erkrankung. Wie schon der BMI-Durchschnitt der OSAS-Gruppe dieser Arbeit zeigt, ist die Fettleibigkeit einer der Risikofaktoren des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms. Und auch die Adipositas lässt sich nicht ohne weiteres nur durch äußere Einflüsse erklären: viele Familien- und Zwillingsstudien haben gezeigt, dass man die Adipositas auf genetische Faktoren zurückführen kann (Bodurtha et al., 1990; Smith et al., 1985; Stunkard et al., 1990). Genetische Faktoren, die den Metabolismus, die Fettspeicherung und das Essverhalten beeinflussen, kommen als Ursache für Adipositas, die im weiteren Verlauf zum OSAS führen kann, in Betracht (Bray, 1989; Trayhurn, 1984). Ein Kandidat, der hierfür in Betracht kommen könnte, wäre zum Beispiel das Gen, das für das Pro-Opiomelanocortin kodiert, welches eine wichtige Rolle für die Appetitregulation zu spielen scheint, oder andere Gene, die für den β -3-Adreno-Rezeptor kodieren, der wiederum die Regulation des E-

nergie-Verbrauchs des Körpers beeinflusst. Beide Gene liegen in bestimmten Bereichen von den Chromosomen 2 und 8 und Comuzzi et al. haben eine mögliche Verbindung zwischen diesen Bereichen und dem Plasmaspiegel von Leptin, einem Protein, das im Plasma übergewichtiger Menschen erhöht ist, nachweisen können (Comuzzie et al., 1997). Sina et al. zeigten zusätzlich, dass vermutlich Mutationen des Melanocortin-4-Rezeptor Gens für extreme Adipositas verantwortlich sein könnten (Sina et al., 1999). Zwar muss man bedenken, dass das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom nicht nur bei adipösen Menschen auftritt, sondern auch bei schlanken Patienten, die einen BMI von unter $25 \text{ kg} / \text{m}^2$ haben können (siehe BMI-Verteilung des OSAS-Kollektivs und Kontrollen, Kapitel 4.1.3). Doch auch hier gibt es Hinweise darauf, dass genetische Faktoren, die Einfluss auf die regionale Fettverteilung nehmen, vielleicht ursächlich für die Entwicklung eines OSAS sein könnten. Denn Mortimore et al. haben 1998 festgestellt, dass auch relativ schlanke Leute mit einem OSAS besonders im Bereich der oberen anterolateralen Luftwege eine signifikante Fetteinlagerung aufweisen (Mortimore et al., 1998).

Die genannten Gene für Adipositas würden jedoch nicht nur wegen ihres Einflusses auf das Gewicht des Patienten als mögliche Kandidatengene für das OSAS in Betracht kommen, sondern auch wegen ihrer potenziellen Wirkung auf die Expression anderer Faktoren wäre es denkbar, sie als relevante Einflussfaktoren auf das OSAS verantwortlich zu machen. Einige Kandidatengene für Adipositas (wie zum Beispiel Leptin und der Melanocortin-4-Rezeptor) werden in bestimmten Geweben und Gehirnbereichen exprimiert, die wichtig für Atemregulation sind (Bray and Bouchard, 1997; Wiesner et al., 1999). Es gibt immer mehr Daten, die darauf hinweisen, dass zum Beispiel Leptin neben seinem Einfluss auf die Appetitregulation, auch das Lungenwachstum (Tsuchiya et al., 1999) und die Atemregulation beeinflussen könnte (O'Donnell C et al., 1999).

5.5.4 Kandidaten für craniofaziale Dysmorphien

Neben dem Bereich der Genetik der Adipositas kommt natürlich auch der Bereich der craniofazialen Morphologie in Betracht, die ebenfalls eine Hülle an Genen birgt, die womöglich auch als Kandidatengene für das obstruktive

Schlaf-Apnoe-Syndrom in Verdacht kommen. Es hat in der Vergangenheit eine große Menge an Arbeiten und Studien gegeben, die belegen, dass morphologische und anatomische Anomalien die Ursachen für ein obstruktives Schlaf-Apnoe-Syndrom darstellen. Es wurden reduzierte Sella-Basis-Winkel (Jamieson et al., 1986), reduzierte Größen der posterioren und superioren Atemwegsräume (Bacon et al., 1988), Vergrößerungen des weichen Palatums (Riley et al., 1983), Makroglossie und tonsilläre Hypertrophien (Bacon et al., 1988) bei OSAS-Patienten beobachtet. Ein weiterer Hinweis auf genetische Ursachen zeigt zum Beispiel, dass das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom sehr oft in Verbindung mit dem Down-Syndrom auftritt, welches bekanntlich mit craniofazialen Dismorphien assoziiert ist. Die genetische Basis für craniofaziale Dismorphien zeigt eine Vielzahl an Studien:

Bei Mathur et al. zeigten Verwandte von OSAS-Probanden ein herabgesetztes totales Rachenvolumen, eine retropositionierte Maxilla und ein längeres weiches Pallatum (Mathur and Douglas, 1995). Guilleminault et al. unterstützten diese Ergebnisse mit einer eigenen Studie und kamen auf ähnliche Ergebnisse wie Marthur et al. (Guilleminault et al., 1995). Redline et al. zeigten in ihrer Cleveland Studie, dass der AHI-Wert in Kaukasischen Familien sowohl von harten Strukturen (wie z.B. Kopfform) als auch durch weiche gewebliche Faktoren (z.B. Zungenvolumen und, Länge des weichen Pallatums) bestimmt wird (Redline et al., 1995).

Craniofaziale Dismorphien in Maus-Modellen wurden unter anderem durch das Fehlen des Wachstumsfaktors $\beta 2$ hervorgerufen (Sanford et al., 1997) oder durch Mutationen im Kollagen Gen Typ II und IV. Weitere Defekte zeigten *knockout*-Mäuse, bei denen das Endothelin-1-Gen (Kurihara et al., 1994) und das Gen für den *retinoic acid receptor- α* (Lohnes et al., 1994) ausgeschaltet wurden.

5.5.5 Kandidaten für den Schlaf

In der Narkolepsieforschung wurde das Orexin als Kandidatengen für Schlafstörungen bereits in vielen Arbeiten postuliert. Experimentelle Tierstudien (Hunde und Mäuse) haben gezeigt, dass Orexin-*knockout*-Tiere unterschiedliche Phänotypen der Narkolepsie (Unterschiede in Kataplexie, des REM –

Schlafes und Hypersomnolenz) aufwiesen (Chemelli et al., 1999). (Nishino and Mignot, 1997; Nishino et al., 2000). Chemelli et al. beschrieben 1999, dass das Orexin-Gen und / oder die Gene für dessen Rezeptoren einen potenziellen Einfluss auf den Muskeltonus haben. Ebenfalls ist der Einfluss auf Neurone der zentralen Respirationszentren bekannt (Chemelli et al., 1999).

5.6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Nachweis erbracht werden, dass das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom der zur Verfügung gestellten Patienten auf mögliche Sequenzvariationen des *Early Growth Response-2* Gens zurückzuführen ist. Es wurde in der Kontrollgruppe eine Sequenzvariation bei zwei Patientinnen beobachtet, die man als stummen Polymorphismus, der keinen Krankheitswert besitzt, bezeichnen kann. Um eine abschließende Aussage bezüglich des EGR-2 als Kandidatengen für das OSAS machen zu können, wären sicherlich noch größere Patientenkollktive und deren entsprechenden Kontrollen notwendig. An diesem Punkt der Datenlage muss man jedoch dass EGR-2 als genetische Ursache für das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom ausschließen.

Das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom ist eine komplexe Krankheit, die von multiplen Faktoren beeinflusst wird: Umwelteinflüsse, Entwicklungsfaktoren und dem Zusammenspiel von den verschiedensten Genen. Die Genetik im Bereich des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndrom ist ein Thema, das noch ausgiebig erforscht werden muss: es müssen verschiedene Kandidatengene und deren Einfluss auf die Pathogenese des obstruktiven Schlaf-Apnoe-Syndroms postuliert werden.

Die vorliegende Arbeit hat als Kandidatengen das *Early Growth Response-2* Gen in Bezug auf das obstruktive Schlaf-Apnoe-Syndrom untersucht und weitere Kandidatengene zur Erforschung des OSAS vorgeschlagen, und soll somit einen Beitrag zu dem Thema OSAS und Genetik leisten.

6 Literaturverzeichnis

Ali NJ, Pitson DJ, Stradling JR. Snoring, sleep disturbance, and behaviour in 4-5 year olds. *Arch Dis Child* 1993; 68: 360-6.

Ancoli-Israel S, Klauber MR, Stepnowsky C, Estline E, Chinn A, Fell R. Sleep-disordered breathing in African-American elderly. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1946-9.

Bacon WH, Krieger J, Turlot JC, Stierle JL. Craniofacial characteristics in patients with obstructive sleep apneas syndrome. *Cleft Palate J* 1988; 25: 374-8.

Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, et al.. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 1993; 262: 2039-42.

Bodurtha JN, Mosteller M, Hewitt JK, Nance WE, Eaves LJ, Moskowitz WB, et al.. Genetic analysis of anthropometric measures in 11-year-old twins: the Medical College of Virginia Twin Study. *Pediatr Res* 1990; 28: 1-4.

Bray G, Bouchard C. Genetics of human obesity: research directions. *Faseb J* 1997; 11: 937-45.

Bray GA. 1989 McCollum Award lecture. Genetic and hypothalamic mechanisms for obesity--finding the needle in the haystack. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 891-902.

Breslow JL. Genetics of lipoprotein abnormalities associated with coronary artery disease susceptibility. *Annu Rev Genet* 2000; 34: 233-254.

Bruzzone R, Ressot C. Connexins, gap junctions and cell-cell signalling in the nervous system. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 1-6.

Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 1996; 238: 1-27.

Carter GT, Kilmer DD, Bonekat HW, Lieberman JS, Fowler WM, Jr. Evaluation of phrenic nerve and pulmonary function in hereditary motor and sensory neuropathy, type I. *Muscle Nerve* 1992; 15: 459-62.

Chan CK, Mohsenin V, Loke J, Virgulto J, Sipski ML, Ferranti R. Diaphragmatic dysfunction in siblings with hereditary motor and sensory neuropathy (Charcot-Marie-Tooth disease). *Chest* 1987; 91: 567-70.

Chance PF, Abbas N, Lensch MW, Pentao L, Roa BB, Patel PI, et al. Two autosomal dominant neuropathies result from reciprocal DNA duplication/deletion of a region on chromosome 17. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 223-8.

Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, et al. DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 1993; 72: 143-51.

Chapman J, Korczyn AD, Karussis DM, Michaelson DM. The effects of APOE genotype on age at onset and progression of neurodegenerative diseases. *Neurology* 2001; 57: 1482-5.

Chatonnet F, Thoby-Brisson M, Abadie V, Dominguez del Toro E, Champagnat J, Fortin G. Early development of respiratory rhythm generation in mouse and chick. *Respir Physiol Neurobiol* 2002; 131: 5-13.

Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, et al. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999; 98: 437-51.

Comuzzie AG, Hixson JE, Almasy L, Mitchell BD, Mahaney MC, Dyer TD, et al. A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. *Nat Genet* 1997; 15: 273-6.

Dematteis M, Pepin JL, Jeanmart M, Deschaux C, Labarre-Vila A, Levy P. Charcot-Marie-Tooth disease and sleep apnoea syndrome: a family study. *Lancet* 2001; 357: 267-72.

D'Urso D, Muller HW. Ins and outs of peripheral myelin protein-22: mapping transmembrane topology and intracellular sorting. *J Neurosci Res* 1997; 49: 551-62.

D'Urso D, Schmalenbach C, Zoidl G, Prior R, Muller HW. Studies on the effects of altered PMP22 expression during myelination in vitro. *J Neurosci Res* 1997; 48: 31-42.

el Bayadi S, Millman RP, Tishler PV, Rosenberg C, Saliski W, Boucher MA, et al. A family study of sleep apnea. Anatomic and physiologic interactions. *Chest* 1990; 98: 554-9.

Erickson JT, Conover JC, Borday V, Champagnat J, Barbacid M, Yancopoulos G, et al. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing. *J Neurosci* 1996; 16: 5361-71.

Ferini-Strambi L, Calori G, Oldani A, Della Marca G, Zucconi M, Castronovo V, et al. Snoring in twins. *Respir Med* 1995; 89: 337-40.

Filbin MT, Walsh FS, Trapp BD, Pizzey JA, Tennekoon GI. Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 1990; 344: 871-2.

Gabreels-Festen AA, Gabreels FJ, Jennekens FG, Joosten EM, Janssen-van Kempen TW. Autosomal recessive form of hereditary motor and sensory neuropathy type I. *Neurology* 1992; 42: 1755-61.

Gastaut H, Tassinari CA, Duron B. Polygraphic study of the episodic diurnal and nocturnal (hypnic and respiratory) manifestations of the Pickwick syndrome. *Brain Res* 1966; 1: 167-86.

Guilleminault C, Partinen M, Hollman K, Powell N, Stoohs R. Familial aggregates in obstructive sleep apnea syndrome. *Chest* 1995; 107: 1545-51.

Guilleminault C, Riley R, Powell N. Obstructive sleep apnea and abnormal cephalometric measurements. Implications for treatment. *Chest* 1984; 86: 793-4.

Hardie R, Harding AE, Hirsch N, Gelder C, Macrae AD, Thomas PK. Diaphragmatic weakness in hereditary motor and sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990; 53: 348-50.

Harding AE, Thomas PK. Autosomal recessive forms of hereditary motor and sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1980a; 43: 669-78.

Harding AE, Thomas PK. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* 1980b; 103: 259-80.

He J, Kryger MH, Zorick FJ, Conway W, Roth T. Mortality and apnea index in obstructive sleep apnea. Experience in 385 male patients. *Chest* 1988; 94: 9-14.

Jacquin TD, Borday V, Schneider-Maunoury S, Topilko P, Ghilini G, Kato F, et al. Reorganization of pontine rhythmogenic neuronal networks in Krox-20 knockout mice. *Neuron* 1996; 17: 747-58.

Jamieson A, Guilleminault C, Partinen M, Quera-Salva MA. Obstructive sleep apneic patients have craniomandibular abnormalities. *Sleep* 1986; 9: 469-77.

Jennum P, Hein HO, Suadiciani P, Gyntelberg F. Cardiovascular risk factors in snorers. A cross-sectional study of 3,323 men aged 54 to 74 years: the Copenhagen Male Study. *Chest* 1992; 102: 1371-6.

Jennum P, Hein HO, Suadiciani P, Sorensen H, Gyntelberg F. Snoring, family history, and genetic markers in men. The Copenhagen Male Study. *Chest* 1995; 107: 1289-93.

Joseph LJ, Le Beau MM, Jamieson GA, Jr., Acharya S, Shows TB, Rowley JD, et al. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 7164-8.

Kunitomo F, Kimura H, Tatsumi K, Okita S, Tojima H, Kuriyama T, et al. Abnormal breathing during sleep and chemical control of breathing during wakefulness in patients with sleep apnea syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 164-9.

Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, et al. Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994; 368: 703-10.

Kuwaki T, Cao WH, Kurihara Y, Kurihara H, Ling GY, Onodera M, et al. Impaired ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia in mutant mice deficient in endothelin-1. *Am J Physiol* 1996; 270: R1279-86.

Laroche CM, Carroll N, Moxham J, Stanley NN, Evans RJ, Green M. Diaphragm weakness in Charcot-Marie-Tooth disease. *Thorax* 1988; 43: 478-9.

Lemke G, Axel R. Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell* 1985; 40: 501-8.

Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dolle P, Dierich A, Gorry P, et al. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 1994; 120: 2723-48.

Low PA, Nukada H, Schmelzer JD, Tuck RR, Dyck PJ. Endoneurial oxygen tension and radial topography in nerve edema. *Brain Res* 1985; 341: 147-54.

Low PA, Schmelzer JD, Ward KK, Yao JK. Experimental chronic hypoxic neuropathy: relevance to diabetic neuropathy. *Am J Physiol* 1986; 250: E94-9.

Lowe AA, Ozbek MM, Miyamoto K, Pae EK, Fleetham JA. Cephalometric and demographic characteristics of obstructive sleep apnea: an evaluation with partial least squares analysis. *Angle Orthod* 1997; 67: 143-53.

Manon-Espaillet R, Gothe B, Adams N, Newman C, Ruff R. Familial 'sleep apnea plus' syndrome: report of a family. *Neurology* 1988; 38: 190-3.

Martini R. Animal models for inherited peripheral neuropathies. *J Anat* 1997; 191 (Pt 3): 321-36.

Mathur R, Douglas NJ. Family studies in patients with the sleep apnea-hypopnea syndrome. *Ann Intern Med* 1995; 122: 174-8.

Mortimore IL, Marshall I, Wraith PK, Sellar RJ, Douglas NJ. Neck and total body fat deposition in nonobese and obese patients with sleep apnea compared with that in control subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 280-3.

Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J. EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron* 2001; 30: 355-68.

Nelis E, Haites N, Van Broeckhoven C. Mutations in the peripheral myelin genes and associated genes in inherited peripheral neuropathies. *Hum Mutat* 1999; 13: 11-28.

Nelis E, Van Broeckhoven C, De Jonghe P, Lofgren A, Vandenberghe A, Latour P, et al. Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur J Hum Genet* 1996; 4: 25-33.

Nishino S, Mignot E. Pharmacological aspects of human and canine narcolepsy. *Prog Neurobiol* 1997; 52: 27-78.

Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 2000; 355: 39-40.

O'Donnell C P, Schaub CD, Haines AS, Berkowitz DE, Tankersley CG, Schwartz AR, et al. Leptin prevents respiratory depression in obesity. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1477-84.

Osanai S, Akiba Y, Nakano H, Matsumoto H, Yahara O, Onodera S. Charcot-Marie-Tooth disease with diaphragmatic weakness. *Intern Med* 1992; 31: 1267-70.

Pillar G, Schnall RP, Peled N, Oliven A, Lavie P. Impaired respiratory response to resistive loading during sleep in healthy offspring of patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1602-8.

Prachartam N, Nelson S, Hans MG, Broadbent BH, Redline S, Rosenberg C, et al. Cephalometric assessment in obstructive sleep apnea. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1996; 109: 410-9.

Rangnekar VM, Aplin AC, Sukhatme VP. The serum and TPA responsive promoter and intron-exon structure of EGR2, a human early growth response gene encoding a zinc finger protein. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 2749-57.

Redline S, Leitner J, Arnold J, Tishler PV, Altose MD. Ventilatory-control abnormalities in familial sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1997a; 156: 155-60.

Redline S, Tishler PV. The genetics of sleep apnea. *Sleep Med Rev* 2000; 4: 583-602.

Redline S, Tishler PV, Hans MG, Tosteson TD, Strohl KP, Spry K. Racial differences in sleep-disordered breathing in African-Americans and Caucasians. *Am J Respir Crit Care Med* 1997b; 155: 186-92.

Redline S, Tishler PV, Tosteson TD, Williamson J, Kump K, Browner I, et al. The familial aggregation of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 682-7.

Redline S, Tosteson T, Boucher MA, Millman RP. Measurement of sleep-related breathing disturbances in epidemiologic studies. Assessment of the validity and reproducibility of a portable monitoring device. *Chest* 1991; 100: 1281-6.

Redline S, Tosteson T, Tishler PV, Carskadon MA, Millman RP. Studies in the genetics of obstructive sleep apnea. Familial aggregation of symptoms associated with sleep-related breathing disturbances. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 440-4.

Riley R, Guilleminault C, Herran J, Powell N. Cephalometric analyses and flow-volume loops in obstructive sleep apnea patients. *Sleep* 1983; 6: 303-11.

Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, et al. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental

defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 1997; 124: 2659-70.

Schneider-Maunoury S, Topilko P, Seitandou T, Levi G, Cohen-Tannoudji M, Pournin S, et al. Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* 1993; 75: 1199-214.

Sham MH, Vesque C, Nonchev S, Marshall H, Frain M, Gupta RD, et al. The zinc finger gene Krox20 regulates HoxB2 (Hox2.8) during hindbrain segmentation. *Cell* 1993; 72: 183-96.

Shapiro L, Doyle JP, Hensley P, Colman DR, Hendrickson WA. Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron* 1996; 17: 435-49.

Sina M, Hinney A, Ziegler A, Neupert T, Mayer H, Siegfried W, et al. Phenotypes in three pedigrees with autosomal dominant obesity caused by haploinsufficiency mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1501-7.

Smith PL, Gold AR, Meyers DA, Haponik EF, Bleecker ER. Weight loss in mildly to moderately obese patients with obstructive sleep apnea. *Ann Intern Med* 1985; 103: 850-5.

Strohl KP, Redline S. Recognition of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 279-89.

Strohl KP, Saunders NA, Feldman NT, Hallett M. Obstructive sleep apnea in family members. *N Engl J Med* 1978; 299: 969-73.

Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* 1990; 322: 1483-7.

Suh JG, Ichihara N, Saigoh K, Nakabayashi O, Yamanishi T, Tanaka K, et al. An in-frame deletion in peripheral myelin protein-22 gene causes hypomyelination and cell death of the Schwann cells in the new Trembler mutant mice. *Neuroscience* 1997; 79: 735-44.

Suter U, Moskow JJ, Welcher AA, Snipes GJ, Kosaras B, Sidman RL, et al. A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992a; 89: 4382-6.

Suter U, Snipes GJ. Peripheral myelin protein 22: facts and hypotheses. *J Neurosci Res* 1995; 40: 145-51.

Suter U, Snipes GJ, Schoener-Scott R, Welcher AA, Pareek S, Lupski JR, et al. Regulation of tissue-specific expression of alternative peripheral myelin protein-22 (PMP22) gene transcripts by two promoters. *J Biol Chem* 1994; 269: 25795-808.

Suter U, Welcher AA, Ozelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, et al. Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature* 1992b; 356: 241-4.

Swiatek PJ, Gridley T. Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene *Krox20*. *Genes Dev* 1993; 7: 2071-84.

Swirnoff AH, Milbrandt J. DNA-binding specificity of NGFI-A and related zinc finger transcription factors. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2275-87.

Taheri S, Mignot E. The genetics of sleep disorders. *Lancet Neurol* 2002; 1: 242-50.

Tankersley CG. Genetic control of ventilation: what are we learning from murine models? *Curr Opin Pulm Med* 1999; 5: 344-8.

Tankersley CG, Fitzgerald RS, Levitt RC, Mitzner WA, Ewart SL, Kleeberger SR. Genetic control of differential baseline breathing pattern. *J Appl Physiol* 1997; 82: 874-81.

Tankersley CG, Fitzgerald RS, Mitzner WA, Kleeberger SR. Hypercapnic ventilatory responses in mice differentially susceptible to acute ozone exposure. *J Appl Physiol* 1993; 75: 2613-9.

Thomas PK, Marques W, Jr., Davis MB, Sweeney MG, King RH, Bradley JL, et al. The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain* 1997; 120 (Pt 3): 465-78.

Tononi G, Cirelli C. Modulation of brain gene expression during sleep and wakefulness: a review of recent findings. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25: S28-35.

Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, et al. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 1994; 371: 796-9.

Trayhurn P. The development of obesity in animals: the role of genetic susceptibility. *Clin Endocrinol Metab* 1984; 13: 451-74.

Tsuchiya T, Shimizu H, Horie T, Mori M. Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor. *Eur J Pharmacol* 1999; 365: 273-9.

Tuck RR, Schmelzer JD, Low PA. Endoneurial blood flow and oxygen tension in the sciatic nerves of rats with experimental diabetic neuropathy. *Brain* 1984; 107 (Pt 3): 935-50.

Warner LE, Mancias P, Butler IJ, McDonald CM, Keppen L, Koob KG, et al. Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 1998; 18: 382-4.

Warner LE, Svaren J, Milbrandt J, Lupski JR. Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1245-51.

Wiesner G, Vaz M, Collier G, Seals D, Kaye D, Jennings G, et al. Leptin is released from the human brain: influence of adiposity and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2270-4.

Wilkinson DG, Bhatt S, Chavrier P, Bravo R, Charnay P. Segment-specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse. *Nature* 1989; 337: 461-4.

Wittig RM, Zorick FJ, Roehrs TA, Sicklesteel JM, Roth T. Familial childhood sleep apnea. *Henry Ford Hosp Med J* 1988; 36: 13-5.

Yoshizawa T, Akashiba T, Kurashina K, Otsuka K, Horie T. Genetics and obstructive sleep apnea syndrome: a study of human leukocyte antigen (HLA) typing. *Intern Med* 1993; 32: 94-7.

Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med* 1993; 328: 1230-5.

Zoidl G, Blass-Kampmann S, D'Urso D, Schmalenbach C, Muller HW. Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth. *Embo J* 1995; 14: 1122-8.

7 Danksagung

Herrn Prof. E.B. Ringelstein danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die freundliche Überlassung der Fragestellung.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. Young angefertigt. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank für die fachlich hervorragende Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit.

Anja Schirmacher möchte ich für die hilfsbereite Unterstützung und der Vermittlung ihres fachkompetenten Wissens danken.

Mein größter Dank gilt Gaby Berens-Kittner. Während der Einarbeitungsphase und des gesamten Verlaufs meiner Arbeit stand mir Gaby jederzeit hilfreich zur Seite. Für die lehrreiche Zusammenarbeit, für die Kompetenz und ihre Geduld möchte ich Gaby herzlichst danken.

Zu danken habe ich auch Jan Strecker, der mir beim schriftlichen Teil meiner Arbeit mit Rat und Tat, besonders bei technischen Schwierigkeiten, zur Seite stand. Mit seiner außergewöhnlichen Hilfsbereitschaft hat er mich und den Fortgang meiner Arbeit unterstützt. Danke Jan.