
Genetische Diagnostik des kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms (Undine–Syndroms)

Helga Katharina Prißmann



München 2012

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig–Maximilians–Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. C. Klein

Genetische Diagnostik des kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms (Undine–Syndroms)

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig–Maximilians–Universität zu München

vorgelegt von
Helga Katharina Prißmann

aus
Bamberg

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Andreas Holzinger
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Elke Holinski-Feder Prof. Dr. Alexander Dietrich
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Markus Hammel
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	03.05. 2012

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom	1
1.1.1. Von Wassernymphen und Seegeistern	1
1.1.2. Inzidenz/Prävalenz	3
1.1.3. Klinisches Bild	3
1.2. Klassisches kongenitales zentrales Hypoventilationssyndrom – Undine-Syndrom	4
1.2.1. Primäradaptation des Neugeborenen mit CCHS	4
1.2.2. Alveoläre Hypoventilation im Schlaf	4
1.2.3. Ventilation im Wachzustand	5
1.3. Late-Onset zentrales Hypoventilationssyndrom	6
1.4. Komplikationen der alveolären Hypoventilation	6
1.5. Assoziierte Symptome	7
1.5.1. Gastrointestinaltrakt	7
1.5.1.1. Haddad-Syndrom: Megacolon congenitum (Morbus Hirschsprung) und CCHS	7
1.5.1.2. Weitere gastrointestinale Symptome	9
1.5.2. Kardiovaskuläre Symptome	9
1.5.2.1. Reduzierte Herzfrequenzvariabilität	10
1.5.2.2. Herzrhythmusstörungen	10
1.5.3. Ophthalmologische Symptome	10
1.5.4. Neurologische Symptome	11
1.5.4.1. Sekundärfolgen der Erkrankung	11
1.5.4.2. Tumore des sympathischen Nervensystems	11
1.5.5. Zusammenfassung der in der Literatur beschriebenen, assoziierten Symptome	11
1.6. Pathophysiologische Grundlagen des CCHS und seiner assoziierten Symptome	12
1.6.1. CCHS ist eine Neurocristopathie	12
1.6.1.1. Die Entwicklung der Neuralleiste	13
1.6.1.2. Neurocristopathien	14
1.7. Pathophysiologische Grundlagen der alveolären Hypoventilation im Rahmen eines CCHS	15
1.7.1. Steuerung der Atmung – Rhythmogenese	15

Inhaltsverzeichnis

1.7.2.	Steuerung der Atmung – Chemische Atemregulation	15
1.8.	Diagnosestellung	16
1.8.1.	Differentialdiagnosen der alveolären Hypoventilation	16
1.8.2.	Definition des kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms	17
1.8.3.	Erforderliche Untersuchungen zur Diagnosestellung	17
1.9.	Die genetische Grundlage des CCHS	18
1.9.1.	Familiäres Auftreten	18
1.9.2.	Kandidatengene	18
1.9.3.	Das <i>PHOX2B</i> Gen	19
1.9.4.	<i>PHOX2B</i> Funktion und Bedeutung	20
1.9.4.1.	<i>PHOX2B</i> steuert den Neuronalen Zellzyklus	20
1.9.4.2.	Expression von <i>PHOX2B</i> im Nervensystem	21
1.9.5.	Mutationen im <i>PHOX2B</i> Gen	21
1.9.5.1.	Mutationen im Polyalaninrepeat	22
1.9.5.2.	Ein Polyalaninrepeat ist auch bei CCHS betroffen	23
2.	Zielsetzung	25
3.	Material und Methoden	27
3.1.	Patienten	27
3.1.1.	Indexpatienten	27
3.1.2.	Familienangehörige	28
3.1.2.1.	Eltern/Geschwister	28
3.1.2.2.	Familiäre Fälle	28
3.1.3.	Kontrollprobanden	28
3.1.4.	Einverständnis	28
3.1.5.	Genetische Beratung/Befundmitteilung	28
3.1.6.	Fragebogen	29
3.1.7.	Arztbriefe	29
3.1.8.	Ausschluss von Patienten	29
3.2.	Material	31
3.3.	Methoden	31
3.3.1.	Extraktion genomischer DNA aus Vollblut	31
3.3.2.	Polymerase–Kettenreaktion	32
3.3.2.1.	Prinzip der PCR	32
3.3.2.2.	PCR Primer	32
3.3.2.3.	Temperaturen	32
3.3.2.4.	Guanin– und Cytosin–Reichtum des <i>PHOX2B</i> Gens, ein Problem der PCR	33

3.3.2.5. Gefahr des Allelverlusts	35
3.3.2.6. Optimierung der PCR Bedingungen	35
3.3.2.7. Nested-PCR	36
3.3.3. Ermittelte PCR Protokolle für die Amplifikation des <i>PHOX2B</i> Gens	36
3.3.4. Horizontale DNA-Elektrophorese im Agarosegel	40
3.3.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
3.3.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
3.3.7. Fragmentlängenanalyse	42
3.3.8. Sequenzierung des PCR-Produktes	43
3.3.8.1. Grundlagen	43
3.3.8.2. Präzipitation der DNA	45
3.3.8.3. Vorgehen	45
4. Ergebnisse	47
4.1. Eine orientierende Aussage über eine <i>PHOX2B</i> Mutation im Polyalaninrepeat ist bereits nach Amplifikation und Gelbilddarstellung möglich	47
4.2. Die Fragmentlängenanalyse eignet sich zur exakten Bestimmung der Größendifferenz zum Wildtypallel	48
4.3. Allelverluste werden durch PCR Sequenzierung ausgeschlossen	49
5. Patienten	51
5.1. Indexpatient D 17.1 mit einer 17 bp-Deletion (Frameshift Mutation)	51
5.2. Patientin E 18.1	54
5.3. Patientin E 18.2	55
5.4. Patientin E 18.3	56
5.5. Patientin E 18.4	57
5.6. Patient E 21.1	57
5.7. Patient E 21.2	58
5.8. Patientin E 17.1 mit einer 17 bp-Expansion (Frameshift Mutation)	59
5.9. Patient mit CCHS und Neuroblastom	60
5.10. Familiäre Fälle	61
5.10.1. Familie E 15	61
5.10.1.1. Familie E 15.II – Betroffene Tochter	61
5.10.1.2. Familie E 15.I – Klinisch gesunde Mutter	62
5.10.2. Familie E 39 – Zwei betroffene Töchter	63
5.11. Es besteht eine Genotyp-Phänotyp Korrelation	64
5.11.1. Genotyp-Phänotyp Beziehung – Beatmungszeiten	66
5.11.2. Genotyp-Phänotyp Beziehung – Gastrointestinale Symptome	66
5.11.3. Genotyp-Phänotyp Beziehung – ZNS/ANS-Symptome – Neuralleistentumore	67

Inhaltsverzeichnis

5.11.4. Genotyp–Phänotyp Beziehung – Kardiovaskuläre Symptome	67
6. Diskussion	69
6.1. Genetische Diagnostik	69
6.2. Genotyp–Phänotyp Korrelation	70
6.3. Klinische Empfehlungen zur Diagnosestellung und Diagnostik bei CCHS	72
6.4. Genetische Beratung betroffener Familien	76
6.4.1. Pränatale Diagnostik	76
6.5. Limitationen der Arbeit und Ausblicke	76
7. Zusammenfassung	79
A. Genomische DNA–Sequenz von PHOX2B	81
B. Primerliste CCHS	83
C. Fragebogen Verdacht auf Neurochristopathie/Undine–Syndrom	85
Abkürzungsverzeichnis	91
Literaturverzeichnis	103
Tabellenverzeichnis	106
Abbildungsverzeichnis	108
Danksagung	109
Lebenslauf	111

1. Einleitung

Gäbe ich einen Augenblick nicht acht,
vergäße ich (...) zu atmen.

(Giraudoux 1939)

1.1. Das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom

1.1.1. Von Wassernymphen und Seegeistern

In seinem Liber de Nymphis, sylphis, pygmaeis et salamandris beschreibt der Arzt, Alchemist, Mystiker und Philosoph Paracelsus, im 16. Jahrhundert, das Wesen der Wassergeister. Ausführlich geht er darauf ein, wie Wassernymphen und Seegeister, durch die Liebe eines Menschen, eine eigene Seele erhalten und selbst menschlich werden können. Paracelsus hält diese Verbindungen für möglich, warnt seine Leser jedoch vor den Gefahren solcher Beziehungen. Lässt die Liebe des Menschen zur Nymphe nach und wird er ihr untreu, so ist sie durch übergeordnete, alte Gesetze gezwungen und berechtigt, ihn zu töten. In seiner Veröffentlichung gibt Paracelsus den von ihm beschriebenen Nymphen den Namen Undine.

„Manch einem Fischer ward es schon so gut, ein zartes Wasserweib zu belauschen, wie sie über die Fluten hervorstieg und sang. Der erzählte dann von ihrer Schöne weiter, und solche wundersame Frauen werden von den Menschen Undinen genannt. Aber sie haben keine Seele. Sie sind verspielt, selbstsüchtig, wankelmütig, kapriziös, albern und unberechenbar.“ (Paracelsus 1581).



Abbildung 1.1.: J. W. Waterhouse – A Mermaid, 1900, www.suite101.com

1.1 Das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom

In der mittelalterlichen Sagenwelt wird dieses Motiv mehrfach aufgegriffen (Otto 2001).

Es verliebt sich die Meerjungfrau Undine in einen jungen Ritter. Romantisch widmet dieser jeden seiner wachen Atemzüge der Geliebten. Das Glück ist vollkommen, bis der Ritter der Nixe untreu wird und sich einer andern Frau zuwendet. Tief verletzt nimmt die Nixe ihm die unbewussten Atemzüge des Schlafes. Im Wachen bleibt der Fluch unbemerkt. Der Ritter kann bewusst an das Atmen denken und sich am Leben erhalten. Der Tod ereilt ihn, sobald er von Müdigkeit übermannt einschläft, er erstickt im Schlaf. Im frühen 19. Jahrhundert wird, in der Erzählung von Friedrich Baron de la Motte-Fouqué, die Atmung des untreuen Ritters durch einen Kuss der Nixe im Schlafgemach unterbunden (de la Motte Fouqué 1811).

„Und ihre Schleier schlug sie zurück, und himmlisch schön lächelte ihr holdes Antlitz daraus hervor. Beugend vor Liebe und Todesnähe neigte sich der Ritter ihr entgegen, sie küßte ihn mit einem himmlischen Kusse, aber sie ließ ihn nicht mehr los, (...) bis ihm endlich der Atem entging und er aus den schönen Armen als ein Leichnam sanft auf die Kissen des Ruhebettes zurücksank.“

1939 beschreibt Giraudoux in seinem Theaterstück das Leiden des Ritters Hans – fast schon medizinisch genau – durch den vollständigen Verlust der autonomen Steuerung der Körperfunktionen: *„Hans (...) verabschiedet sich sehnsüchtig von Undine. Sie: „Versuche zu leben ... Auch du wirst vergessen.“ Darauf Hans verzweifelt: „Versuche zu leben! Das ist leicht gesagt. Wenn mir nur daran läge, noch zu atmen! Seit du fort bist, muß ich meinem Körper alles befehlen, was er bisher von selbst tat. Ich kann nur sehen, wenn ich die Augen darum bitte. (...) Fünf Sinne habe ich ihre Pflicht zu lehren, und dreißig Muskeln, und alle meine Knochen. Gäbe ich einen Augenblick nicht acht, vergäße ich zu hören, zu atmen...“ (Giraudoux 1939).*

Der amerikanische Arzt J. Severinghaus wird 1962, durch den Besuch des neu aufgelegten Theaterstücks von Giraudoux, an einen seiner Patienten erinnert, der an einer Beeinträchtigung der autonomen Atmungskontrolle leidet. Bei der Vorstellung des Falles auf einem Kongress, vergleicht Severinghaus die Symptomatik des Patienten mit dem Fluch der Undine (Severinghaus JW 1962). In Anlehnung an die Literatur etabliert sich nun in der medizinischen Terminologie, nicht ganz korrekt, aber doch gebräuchlich, die Bezeichnung Undines Fluch (Undine's curse) für den Ausfall der autonomen Atmungskontrolle. Die Ursache der Symptomatik wird durch den Begriff nicht differenziert (Karenberg 2005).

Abzugrenzen ist das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom vom erworbenen zentralen Hypoventilationssyndrom. Auch hier fehlt den Patienten die automatische Atmungskontrolle im Schlaf, die bewusste Atmungssteuerung bleibt erhalten. Ursache dieser, früher ebenfalls als Undine-Syndrom bezeichneten Erkrankung, kann eine erworbene Hirnstammläsion sein, die z. B. nach Verletzungen, im Rahmen von Infektionen oder als schwere Komplikation neurochirurgischer Eingriffe im Hirnstammbereich, berichtet wird (Mullan & Hosobuchi 1968).

Da in der gesamten Ursprungs-Literatur genaugenommen kein einziger „Fluch“ der Undine vorkommt (Nannapaneni et al. 2005), sondern sich das ganze Leid auf übergeordnete, alte Regeln oder schwer

ausgeprägten Liebeskummer bezieht, benennen wir das Krankheitsbild, im Rahmen dieser Arbeit, als „Undine-Syndrom“ oder, um auch die Ursache der Symptome eindeutig zu differenzieren, mit seinem wissenschaftlichen Namen „kongenitales zentrales Hypoventilationssyndrom“.

Das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom (CCHS) führt zur Störung der autonomen Atemregulation. Analog zum Undine Mythos kommt es bei vielen betroffenen Kindern, vor allem im Schlaf, zur lebensbedrohlichen alveolären Hypoventilation, die in den meisten Fällen eine nächtliche Beatmung erforderlich macht. In vielen Fällen reicht im Wachzustand das Atemvolumen zur Sicherstellung einer ausreichenden Oxigenierung aus. Häufig atmen betroffene Kinder jedoch auch im Wachen oberflächlich, und müssen tiefe Atemzüge oder eine Erhöhung der Atemfrequenz bei Anstrengung bewusst durchführen (Weese-Mayer et al. 1992).

1.1.2. Inzidenz/Prävalenz

Zur Inzidenz des CCHS finden sich in der Literatur verschiedene Angaben. Im Rahmen einer Studie wurde die Inzidenz für Deutschland für die Jahre 1992 und 1993 erstmals errechnet (Schöber et al. 1994). Sie beträgt zu diesem Zeitpunkt 1:180.000 Geburten, das bedeutet, dass innerhalb eines Jahres in Deutschland ungefähr vier Kinder mit CCHS geboren werden. In französischen Veröffentlichungen wird eine Inzidenz von bis zu 1:50.000 genannt (Gaultier 2002). In hochindustrialisierten Ländern ist die Prävalenz der Erkrankung, aufgrund der besseren intensivmedizinischen Versorgungslage und der diagnostischen Möglichkeiten, höher. Die Geschlechterverteilung ist ausgeglichen. Nach den Angaben der Selbsthilfegruppe Undine-Syndrom gibt es in Deutschland derzeit ungefähr 100 betroffene Kinder (Cseke 2008).

1.1.3. Klinisches Bild

Um 1960 erscheinen in der Literatur erste Veröffentlichungen, in denen das Symptom der angeborenen nächtlichen Hypoventilation mit einer zentralen Störung der Atemkontrolle in Zusammenhang gebracht wird. In einer systematischen Literaturanalyse beschreiben Mellins et al. 1970 das Krankheitsbild (Mellins et al. 1970).

Grundlegend kommt es im Rahmen des CCHS zu einer Dysfunktion des autonomen Nervensystems, mit Veränderungen bzw. Einschränkungen in der Funktion und Reizweitergabe verschiedener Chemorezeptoren. Unter anderem sind die CO₂ erkennenden Chemorezeptoren von der Erkrankung betroffen. Hieraus erklärt sich das klinische Bild der zentralen Atemstörung mit alveolärer Hypoventilation in verschiedenen Ausprägungen (Guilleminault et al. 1981, Weese-Mayer et al. 2003).

1.2. Klassisches kongenitales zentrales Hypoventilationssyndrom – Undine-Syndrom

1.2.1. Primäradaptation des Neugeborenen mit CCHS

Die meisten Kinder werden termingerecht, nach unauffälliger Schwangerschaft geboren. Frühgeburtlichkeit, silentes CTG oder Polyhydramnion werden als Schwangerschaftskomplikationen berichtet, stellen jedoch keine Regel dar.

Direkt postpartal kann es zu den ersten Auffälligkeiten kommen. Das Kind ist oder wird zyanotisch und muss zum Aufrechterhalten der Atmung rezidivierend stimuliert werden. Die Verlegung auf eine Neugeborenenintensivstation und der Beginn einer trachealen oder nasalen Beatmung sind erforderlich (Gaultier 2002).

Diese Probleme treten jedoch nicht zwingend auf, in seltenen Fällen verlaufen die Primäradaptation und Neugeborenenzeit unauffällig (Weese-Mayer et al. 1992).

1.2.2. Alveoläre Hypoventilation im Schlaf

Vom Undine-Syndrom betroffene Kinder fallen, meist direkt in der Neugeborenenperiode, durch Hypoventilation und Zyanose während des Schlafes auf, die nicht durch organische Fehlbildungen, Stoffwechseldefekte, neuromuskuläre Erkrankungen oder Unreife zu erklären sind (ATS 1999).

Die Abnahme der Atemfrequenz und Atemzugtiefe führen zur alveolären Hypoventilation. Ein Abfall der Sauerstoffsättigung und Anstieg der $p\text{CO}_2$ -Werte im Blut sind die Folge. Es besteht eine fehlende oder deutlich verminderte Reaktion der Kinder auf Hyperkapnie. Die im Rahmen einer Hyperkapnie zu erwartenden klinischen Zeichen einer Atemnot (Erhöhung der Atemfrequenz, Zunahme des Atemzugvolumens, Anstieg der Herzfrequenz, Unruhe, Erwachen) werden bei Kindern mit Undine-Syndrom nicht oder nur schwach ausgeprägt beobachtet.

Die verminderte Reaktion auf Hyperkapnie macht, meist bereits in der Neugeborenenzeit, eine mechanische Beatmung erforderlich (Gaultier 2002).

Die Symptomatik ist von den, z. B. bei Frühgeborenen auftretenden, vollständigen zentralen Apnoen zu unterscheiden. Medikamentöse Therapieversuche werden in der Literatur uneinheitlich bewertet. Maitra et al. konnten in Therapieversuchen mit Methylxanthinen keine Besserung der alveolären Hypoventilation erreichen (Maitra et al. 2004). Trang et al. berichten hingegen von einer signifikanten Reduktion nächtlicher $p\text{CO}_2$ -Werte unter Coffeintherapie (Trang, Dehan, Beaufile, Zaccaria, Amiel & Gaultier 2005).

Das Ausmaß der alveolären Hypoventilation ist bei den meisten Patienten vom Schlafstadium abhängig. Im Stadium 3 und 4, den Non-REM Phasen des Tiefschlafes (Einteilung nach Rechtschaffen & Kales 1968), ist die alveoläre Hypoventilation am stärksten ausgeprägt. Hierdurch unterscheiden

sich Patienten mit CCHS deutlich von allen anderen hypoxie- und hyperkapnieassoziierten Krankheitsbildern im Schlaf. Bei diesen treten die Hypoxie- und Hyperkapnieereignisse insbesondere im „aktiven Schlaf“ den REM-Phasen auf (Huang et al. 2008). Schlaflaboruntersuchungen liefern hier den wichtigen differentialdiagnostischen Hinweis (Fleming et al. 1980, Marcus 2001, Maitra et al. 2004).

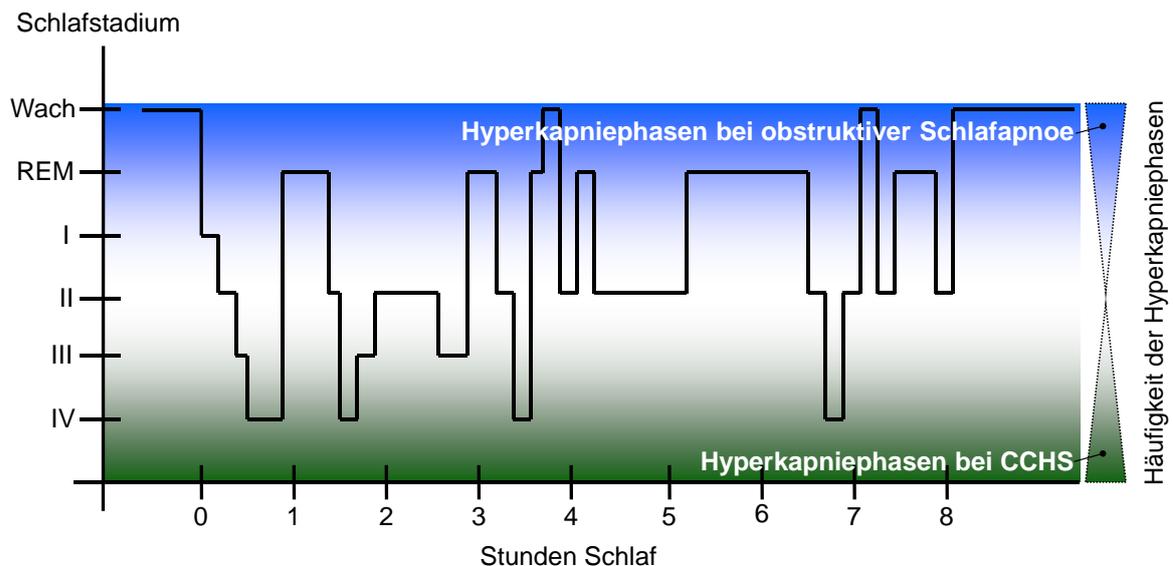


Abbildung 1.2.: Schlafstadienverlauf nach Rechtschaffen & Kales 1968

Hyperkapniephasen bei CCHS treten vor allem in den tiefen Schlafstadien (III–IV) auf. Bei allen übrigen hyperkapnieassoziierten Krankheitsbildern des Schlafs, kommt es vor allem im „aktiven Schlaf“ und den niedrigeren Schlafstadien (I–II) zu Symptomen.

1.2.3. Ventilation im Wachzustand

Bei Patienten mit einer schweren Ausprägung des CCHS kann eine kontinuierliche Abhängigkeit von einer mechanischen Atemhilfe bestehen, dies ist nach den Ergebnissen der aktuellsten Multicenterstudie bei etwa 10 % der Patienten der Fall (Vanderlaan et al. 2004).

Kinder, mit milderer Ausprägung des Syndroms, erreichen im Wachzustand ausreichende Tidalvolumina und Atemfrequenzen, sie benötigen somit im Wachen über lange Zeit keine Atemhilfe. Typischerweise entwickelt sich die Fähigkeit zum Aufrechterhalten der respiratorischen Homöostase, auch bei diesen Patienten, erst im Verlauf der ersten Lebensmonate. Retrospektiv benötigten 2/3 der milder betroffenen Kinder, in den ersten sechs Lebensmonaten bis zum Alter von einem Jahr, auch in Wachphasen, eine mechanische Atemhilfe (Shea et al. 1993). Eine Sonderstellung nehmen Zeiten mit Infekten der oberen Luftwege ein. Im Rahmen eines derartigen Infektes kann sich, auch

1.3 Late-Onset zentrales Hypoventilationssyndrom

bei einem ansonsten ohne Atemhilfe atmenden Kind, eine Beatmungsabhängigkeit entwickeln, oder sich eine bestehende Beatmungspflichtigkeit verschlechtern.

Trotz ausreichender Tidalvolumina besteht jedoch, auch nach Erreichen des Kleinkindalters, im Wachen bei den Patienten keine angemessene Reaktion auf Hyperkapnie oder Hypoxie. Unter körperlicher Anstrengung reagieren die Kinder nicht mit einer vertieften und beschleunigten Atmung, und müssen von Betreuern hierzu angehalten werden (Weese-Mayer et al. 1992).

Besonders deutlich werden die Auswirkungen dieses Defizits in dem durch Windisch 2004 veröffentlichten Fallbericht. Beschrieben wird ein 22-jähriger Patient mit, bis zu diesem Alter, nicht diagnostizierten und deshalb untherapierten CCHS. In der Kindheit fiel dieser Junge vor allem im Schwimmbad auf. Er konnte deutlich länger tauchen, als andere Kinder. Beim Auftauchen, zu dem er manchmal durch Dritten gezwungen werden musste, zeigte er bereits eine schwere Zyanose, aber keine Dyspnoe oder sonstige Atemnot (Windisch et al. 2004).

Diese fehlende Reaktion auf Hyperkapnie und Hypoxie macht es im Alltag erforderlich, dass betroffene Kinder, von Eltern und Pflegepersonen, dazu angehalten werden müssen situationsangemessen, tiefer oder schneller zu atmen. Für ältere Kinder und erwachsene Patienten mit CCHS stellt die Atmung lebenslang, auch in Wachphasen, einen bewussten und Aufmerksamkeit fordernden Prozess dar (Vanderlaan et al. 2004).

1.3. Late-Onset zentrales Hypoventilationssyndrom

In den meisten Fällen manifestiert sich das zentrale Hypoventilationssyndrom direkt bei Geburt oder in den ersten Lebenstagen. In seltenen Fällen werden Patienten jedoch erst im Laufe der Kindheit oder als Erwachsene, durch die Entwicklung einer Pulmonalen Hypertension oder durch eine bleibende respiratorische Insuffizienz nach einem Infekt, symptomatisch (Antic et al. 2006). Die Krankheitsgruppe des Late-Onset Ondine-Syndroms (LO-CCHS) ist heterogen, ein „spätes Erkennen“ muss von einem tatsächlichen „späten Auftreten“ differenziert werden.

Bislang ist noch nicht geklärt, ob die „Late-Onset“ Fälle auf die gleichen pathophysiologischen Grundlagen, wie die früh symptomatisch werdenden Fälle, zurückgeführt werden können, jedoch mehren sich die Anzeichen auf eine ähnliche Grundlage (Trang et al. 2004, Repetto et al. 2009). In Einzelfällen wird das Auftreten eines LO-CCHS auch nach einer schweren Infektion (z. B. Meningitis) berichtet (Tirupathi et al. 2008).

1.4. Komplikationen der alveolären Hypoventilation

Wird ein bestehendes Hypoventilationssyndrom nicht bereits in der frühesten Kindheit diagnostiziert, kommt es, zusätzlich zur grundlegenden Symptomatik, zu sekundären Komplikationen. Als Folge

der chronischen Hypoxie und Hyperkapnie besteht eine beständige Erhöhung des pulmonalen Widerstandes (Euler–Liljestrand–Reflex). Die Kinder entwickeln ein Cor Pulmonale mit Belastung des rechten Herzens und letztendlich Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz (Ödeme, kardiale Stauungszeichen, Anstieg der Leberwerte, Aszites) (Fine-Goulden et al. 2009).

In einigen Veröffentlichungen werden der plötzliche Kindstod (SIDS) und der knapp vermiedene Kindstod (ALTE–Ereignisse) mit undiagnostizierten CCHS Fällen in Verbindung gebracht (Gronli et al. 2008, Weese-Mayer et al. 1993, 2008).

Durch die rezidivierenden Hypoxien, im Rahmen des untherapierten CCHS, kommt es zu einer Beeinträchtigung der mentalen Entwicklung des Kindes in verschiedenem Ausmaß. Bei frühzeitiger Therapie können kognitive Einschränkungen durch Hypoxieepisoden vermieden und eine altersentsprechende Entwicklung erzielt werden. Die meisten Kinder mit CCHS besuchen eine normale Regelschule, haben bereits einen Beruf erlernt und ggf. eine Familie gegründet (Marcus et al. 1991, Silvestri et al. 2002, Maitra et al. 2004, Zelko et al. 2010).

1.5. Assoziierte Symptome

Die alveoläre Hypoventilation im Schlaf ist das primäre und krankheitsdefinierende Symptom des kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms. Seit langem werden jedoch enge Assoziationen mit dem Auftreten weiterer Dysfunktionen des autonomen Nervensystems berichtet (Mellins et al. 1970, Haddad et al. 1978).

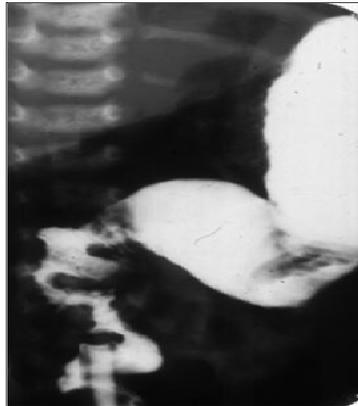
1.5.1. Gastrointestinaltrakt

1.5.1.1. Haddad–Syndrom: Megacolon congenitum (Morbus Hirschsprung) und CCHS

Der solitäre Morbus Hirschsprung tritt mit einer Häufigkeit von 1:5.000 Lebendgeborenen auf, Jungen sind viermal häufiger betroffen als Mädchen (Croaker et al. 1998).

Bei dieser Erkrankung besteht eine streckenweise Aganglionose des Dickdarmes. Durch das Fehlen von Ganglienzellen des Plexus submucosus bzw. myentericus kommt es zur Hyperplasie der vorgeschalteten Neuronen und hierdurch zu einer vermehrten Acetylcolinfreisetzung. Das aganglionäre Segment ist kontrahiert und behindert die Stuhlpassage. Die Kotstauung oberhalb dieses Abschnittes führt zum Symptom des Megakolons.

1.5 Assoziierte Symptome



(a) Colon-Kontrasteinlauf



(b) klinisches Bild

Abbildung 1.3.: M. Hirschsprung

Betroffene Kinder zeigen bereits im Säuglingsalter schwere Obstipationszustände mit Auftreibung des Bauches, evtl. besteht ein mechanischer Ileus. Bei der körperlichen Untersuchung sind ein enger Analkanal und eine leere Ampulla recti diagnostisch richtungsweisend (Rohrer et al. 2002).

Die Diagnose wird radiologisch und durch Biopsien gestellt, neben dem Fehlen der Ganglien kann, durch histochemische Verfahren, im Biopsat die Erhöhung der AcetylcholinKonzentration nachgewiesen werden.

Die Assoziation mit einem Morbus Hirschsprung, wird bei ca. 16 % der vom Undine-Syndrom betroffenen Patienten beobachtet. Dies sind 1,5 % aller M. Hirschsprung Fälle. Haddad beschreibt 1978 erstmals das wiederholte gemeinsame Auftreten der beiden seltenen Erkrankungen, in der Literatur etabliert sich in Folge die Bezeichnung „Haddad-Syndrom“ (Haddad et al. 1978). Im Rahmen des kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms tritt der Morbus Hirschsprung mit einer ausgeglichenen Geschlechterverteilung auf. Die Aganglionose ist deutlich schwerer ausgeprägt, in 59 % der Fälle besteht eine totale Aganglionose des gesamten Colons mit Beteiligung der distalen Abschnitte des Dünndarms.

Croaker stellt dies in seiner Veröffentlichung anschaulich dar (Croaker et al. 1998).

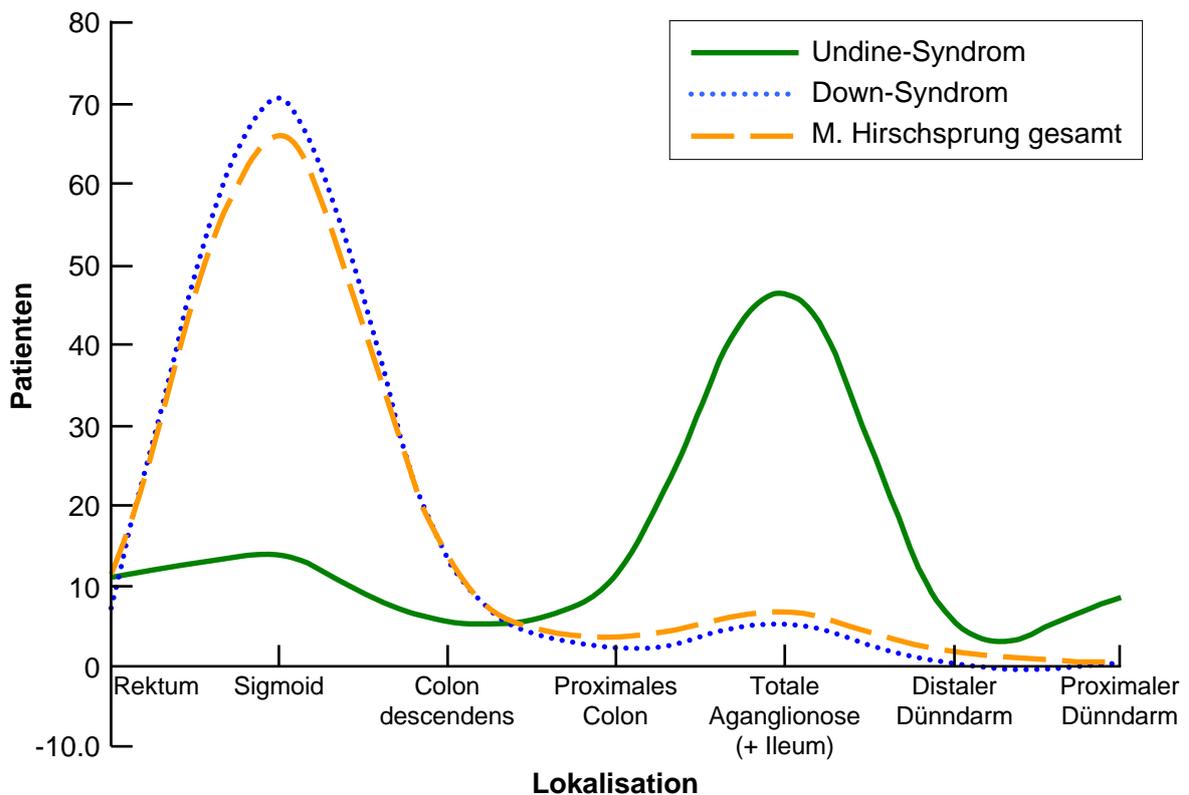


Abbildung 1.4.: Lokalisation der aganglionären Segmente bei Patienten mit M. Hirschsprung modifiziert nach Croaker et al. 1998

Interessanterweise ist das Auftreten eines Morbus Hirschsprung im Rahmen eines CCHS mit einer schwereren Ausprägung der respiratorischen Komponente der Erkrankung assoziiert. Bei Patienten, die 24 Stunden beatmungspflichtig sind, weisen 25 % einen Morbus Hirschsprung auf, ist eine Beatmung nur im Schlaf erforderlich, sind es ca. 15 % (Vanderlaan et al. 2004, Holzinger et al. 2005, Ou-Yang et al. 2007). Dieser Zusammenhang wird an späterer Stelle erläutert werden.

1.5.1.2. Weitere gastrointestinale Symptome

Neben der Assoziation mit M. Hirschsprung treten bei CCHS Patienten weitere gastrointestinale Beschwerden auf. 17,9 % der Patienten weisen einen gastroösophagealen Reflux auf, rezidivierendes Erbrechen, Diarrhoe oder Obstipationen werden gehäuft berichtet (Weese-Mayer et al. 2001).

1.5.2. Kardiovaskuläre Symptome

Die Folgen eines unbehandelten oder nicht ausreichend therapierten CCHS wurden bereits beschrieben. Das Entstehen eines Cor Pulmonale ist eine Folge der persistierenden alveolären Hypoventilation.

1.5 Assoziierte Symptome

Außer dieser Folgeerscheinung gibt es jedoch auch kardiovaskuläre Symptome, die unabhängig von Therapie und Diagnosezeitpunkt bei CCHS Patienten beobachtet werden.

1.5.2.1. Reduzierte Herzfrequenzvariabilität

Zusätzlich zum Reizbildungssystem des Herzens ist auch das autonome Nervensystem an der Herzfrequenzsteuerung beteiligt. Der Herzrhythmus unterliegt beständigen, autonomen Regulationsmechanismen.

Durch Absenkung des Blutdrucks kommt es bei gesunden Personen zu einem, über Barorezeptoren im Aortenbogen und Carotiden vermittelten, Anstieg der Herzfrequenz. Bei CCHS Patienten fällt diese Reflexantwort reduziert aus, nur 1/3 der normalen Reflexantwort wird erreicht. Durch den inadäquaten Anstieg der Herzfrequenz kommt es, bei ca. 23 % der CCHS Patienten, zum rezidivierenden Auftreten vasovagaler Synkopen (van de Borne 2005, Silvestri et al. 1995).

1.5.2.2. Herzrhythmusstörungen

Sinusbradykardien und -arrhythmien werden bei Kindern mit Undine-Syndrom überproportional häufig beobachtet. Durch Auswertungen von Langzeit EKG-Ableitungen konnte zeitweise eine signifikante Verlängerung des R-R Abstandes nachgewiesen werden. Maximale Pausen von bis zu 15 Sekunden sind aufgetreten. Zusätzlich konnte eine Zunahme des R-R Abstandes mit dem Alter der Kinder beobachtet werden (Gronli et al. 2008).

In Anästhesieprotokollen lässt sich eine Veranlagung der Undine-Patienten zu Asystolien und Sinusbradykardien unter Narkosebedingungen feststellen. Narkotika und Sedativa mit Einflüssen auf die Hämodynamik (z. B. Propofol[®]) sollten bei diesen Patienten vermieden werden (Strauser et al. 1999).

In neueren Veröffentlichungen wird inzwischen die jährliche Durchführung eines Langzeit-EKGs, zur Feststellung von Sinusbradykardien, empfohlen, gegebenenfalls ist der Einsatz eines Herzschrittmachers erforderlich, um dem plötzlichen Herztod vorzubeugen. Insbesondere in Infektzeiten muss auf die Neigung zu Bradykardien geachtet werden (Trang, Girard, Laude & Elghozi 2005, Diedrich et al. 2007, Gronli et al. 2008).

1.5.3. Ophthalmologische Symptome

Über 46 % der Undine-Patienten weisen ophthalmologische Probleme auf, die Dysfunktionen autonomer Reflexbögen widerspiegeln. Häufig ist eine reduzierte Reaktion der Pupillen auf Lichteinfall; differierende Pupillengrößen und Strabismus werden berichtet (Weese-Mayer et al. 2001).

1.5.4. Neurologische Symptome

1.5.4.1. Sekundärfolgen der Erkrankung

Zerebrale Krampfanfälle treten bei Kindern mit dem Undine-Syndrom in ca. 41 % der Fälle auf. Da bei den Patienten nur in seltenen Fällen eine zerebrale Missbildung vorliegt, können die Krampfanfälle bislang ätiologisch nicht zugeordnet werden. Die bei ca. 45 % der Patienten bestehende Entwicklungsverzögerung wird als Sekundärfolge der Erkrankung eingestuft. Je früher die Diagnose gestellt wird und je weniger Hypoxieereignisse auftreten, desto besser ist die neurologische Entwicklung der Patienten. Heute besuchen ca. 61 % der schulpflichtigen Kinder mit CCHS eine Regelklasse (Vanderlaan et al. 2004).

1.5.4.2. Tumore des sympathischen Nervensystems

Tumore mit Ursprung in der Neuralleistenentwicklung (Neuroblastome, Ganglioneurome und Ganglioneuroblastome) werden in der Literatur mehrfach mit dem CCHS assoziiert (Bachetti et al. 2010, Devriendt et al. 2000, Bourdeaut et al. 2005, Perri et al. 2005, McConville et al. 2006, Longo et al. 2008). Vanderlaan untersuchte 2004 die medizinischen Verläufe von 196 Patienten und fand bei 5 % der Patienten Tumorentwicklungen (Vanderlaan et al. 2004). 2002 beschrieb Rohrer ein 500-fach höheres Tumorrisiko bei CCHS Patienten (1:20–1:10) im Vergleich zur Normalbevölkerung (1:100.000). Häufig wird hier ein multifokales Auftreten der Tumore beobachtet (Trochet, O'Brien, Gozal, Trang, Nordenskjöld, Laudier, Svensson, Uhrig, Cole, Niemann, Munnich, Gaultier, Lyonnet & Amiel 2005).

1.5.5. Zusammenfassung der in der Literatur beschriebenen, assoziierten Symptome

	% Gesamt (n = 176)	% 24 h Beatmung (n = 20)
Gastrointestinal		
Obstipation (ohne M. Hirschsprung)	12	25
Dysphagie	37	Keine Angabe
M. Hirschsprung	16	25
Gastroösophagealer Reflux	18	35
Fehlender Würgereiz	11	10
Kardial		
Rhythmusstörungen	19	35
Synkopen	25	40

1.6 Pathophysiologische Grundlagen des CCHS und seiner assoziierten Symptome

	% Gesamt (n = 176)	% 24 h Beatmung (n = 20)
Schwitzen/kühle Extremitäten	43	65
Kein Fieber bei Infektion	22	30
Respiratorisch		
Alveoläre Hypoventilation	100	100
Gähnen bei Anstrengung	20	40
Auffällige Atemhaltefähigkeit	39	-
Ophthalmologisch		
Ophthalmologische Symptome allg.	46	50
Anisocorie	19	15
Pathologische Lichtreaktion	19	25
Tränensekretion pathologisch	29	30
Neurologisch		
Tumor aus Neuralleistenzellen	5	5
Zerebrale Krampfanfälle	42	70
Gestörtes Tiefenempfinden	15	25
Entwicklungsverzögerung	45	65
Lernstörung (belegt durch Test)	30	40
Metabolisch		
Hypoglycämie	9	20
Frühzeitige Pubertätsentwicklung	6	10
Wachstumshormon Defizit	2	0
Komplikationen		
Cor pulmonale	17	20
Rezidivierende Pneumonie	41	60
Kieferorthopädische Probleme	45	35

Tabelle 1.2.: Assoziierte Symptome, Tabelle modifiziert nach Vanderlaan et al. (2004)

1.6. Pathophysiologische Grundlagen des CCHS und seiner assoziierten Symptome

1.6.1. CCHS ist eine Neurocristopathie

Das simultane Auftreten zweier seltener Krankheiten, wie des CCHS und des M. Hirschsprung, und die beobachtete Assoziation dieser Krankheitskombination mit Tumoren des sympathischen Nervensystems, bringen Hinweise auf die zugrundeliegende Pathophysiologie des CCHS (Poceta et al. 1987).

Die beim M. Hirschsprung betroffenen Ganglienzellen des Plexus myentericus und submucosus entstammen der Neuralleiste. Auch die Tumore des sympathischen Nervensystems sind Derivate der Neuralleistenentwicklung. Der Zusammenhang mit einer Fehlfunktion in der Migration und Differenzierung der Neuralleistenzellen wird, aufgrund des gemeinsamen Auftretens, auch für das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom postuliert (Bolande 1997).

1.6.1.1. Die Entwicklung der Neuralleiste

In der Entwicklung des Embryos kommt es um den 25. Tag zum Zusammenschluss der Neuralplatte und damit zur Bildung des Neuralrohrs. An den Verbindungsstellen differenziert sich die Neuralleiste. Ihre Zellen beteiligen sich an der Bildung des peripheren Nervensystems, sie sind multipotent und zeichnen sich durch eine hohe Migrationsfähigkeit aus.

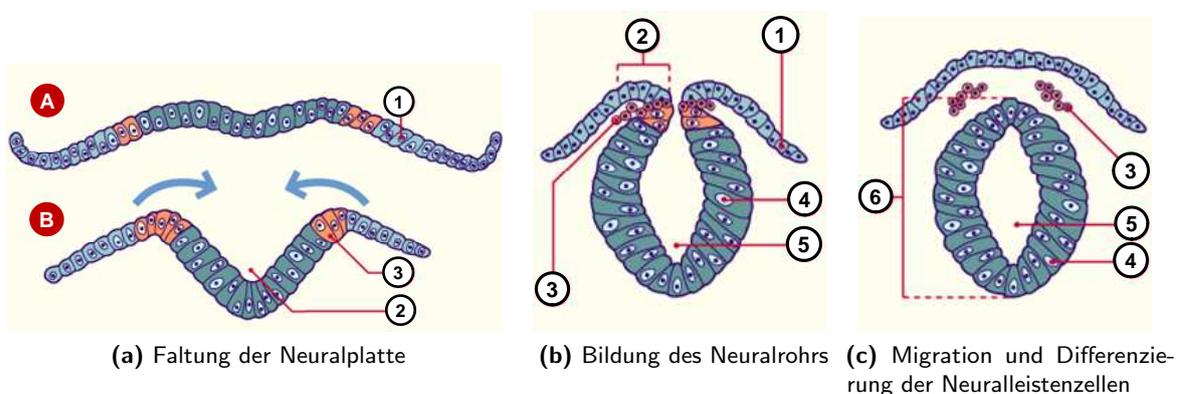


Abbildung 1.5.: Entwicklung des Neuralrohrs (Abbildung modifiziert nach www.embryology.ch)

Entsprechend ihres Ursprungs aus der kranialen, thorakalen, sakralen oder vagalen Neuralleiste, verteilen sich die Zellen im Embryo und bilden eine Vielzahl verschiedener Gewebetypen (Dubreuil et al. 2002, Huber et al. 2005).

1.6 Pathophysiologische Grundlagen des CCHS und seiner assoziierten Symptome

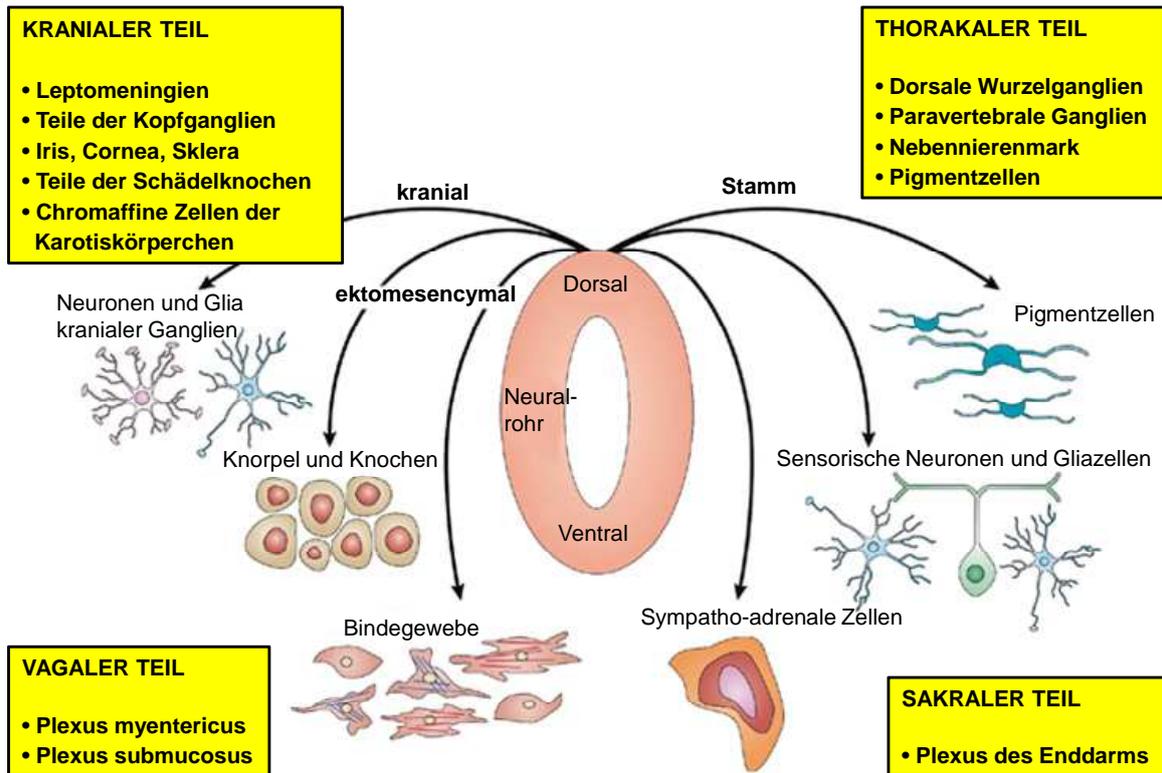


Abbildung 1.6.: Migration und Differenzierung der Neuralleistenzellen während der embryologischen Entwicklung (Abbildung modifiziert nach Gaultier et al. 2005)

Die mit dem CCHS assoziierten Symptome spiegeln das gesamte Symptomspektrum wieder, das mit einer Störung der Neuralleistenzellenentwicklung, oder Behinderung der Migration der Neuralleistenzellen, einhergeht. Sie betreffen das gesamte autonome Nervensystem und somit auch fast alle Organsysteme (Gaultier et al. 2005).

1.6.1.2. Neurocristopathien

Bolande definierte 1974 die Krankheitsgruppe der Neurocristopathien als Folgeerscheinungen einer frühen Störung der Migration der Neuralleistenzellen.

M. Hirschsprung, Neuroblastome, Phäochromozytome, medulläre Schilddrüsenkarzinome und Neurofibrome wurden, von diesem Zeitpunkt an, den Neurocristopathien zugeordnet. Aufgrund des assoziierten Auftretens mit M. Hirschsprung, wird auch das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom zu den Neurocristopathien gezählt (Bolande 1997). Die Entstehung der chromaffinen Zellen der Carotiskörperchen aus der Neuralleiste unterstützt diese Zuordnung. Diese Zellen stellen periphere Chemorezeptoren für die CO₂-Homöostase des Blutes dar. Eine Störung in der Entwicklung und Differenzierung dieser Zellen führt zu einer Störung der Atmungskontrolle (Gaultier & Gallego 2005).

1.7. Pathophysiologische Grundlagen der alveolären Hypoventilation im Rahmen eines CCHS

1.7.1. Steuerung der Atmung – Rhythmogenese

Zur Ermöglichung des pulmonalen Gasaustausches ist eine periodische Belüftung der Lungen, durch Zwerchfell und Brustkorbbewegungen, erforderlich. Die unwillkürliche Atmung wird durch mehrere Faktoren gesteuert. Die Periodik entsteht durch eine rhythmische neuronale Aktivität im respiratorischen Netzwerk der ventralen Medulla oblongata. Die zentralen chemosensiblen Strukturen liegen benachbart im dorsalen Teil der Medulla oblongata (Nucleus tractus solitarius). Hier bestehen Verknüpfungen mit afferenten Neuronen aus dem Herz-Kreislaufsystem (Klinke et al. 2005), auch der Grundtonus des autonomen Nervensystems geht in die Atmungssteuerung ein (Sympathikotonus/Parasympathikotonus) (Viemari 2008).

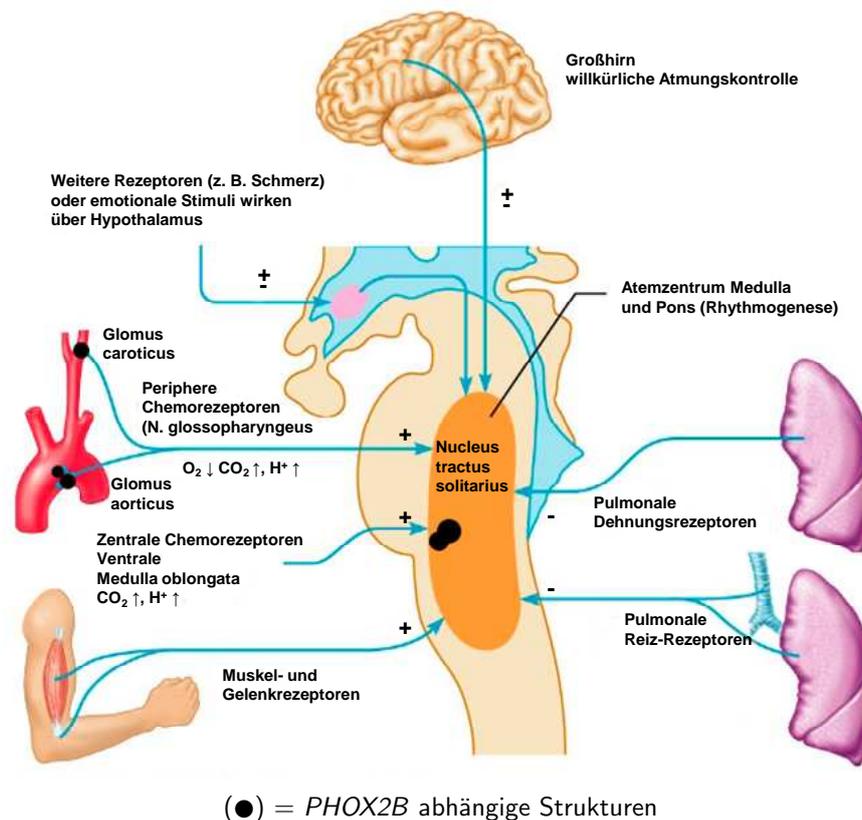


Abbildung 1.7.: Einflussgrößen auf die autonome Atmungskontrolle, modifiziert nach www.apsu.edu

1.7.2. Steuerung der Atmung – Chemische Atemregulation

Die chemische Atemregulation dient der Anpassung der Ventilation an die zellulären Stoffwechselbedürfnisse des Organismus, sie ermöglicht die Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase. Die Regelung erfolgt über arterielle Chemorezeptoren und chemosensible Strukturen im Hirnstamm. Die

1.8 Diagnosestellung

wichtigsten Regelgrößen sind der CO₂-Partialdruck (pCO₂), der pH-Wert und der O₂-Partialdruck (pO₂) im arteriellen Blut (Putnam et al. 2005, McCrimmon et al. 2008).

Periphere Chemorezeptoren sind an den Bifurkationen der Carotiden und am Aortenbogen gelegen (Glomera carotica und Glomera aortica) und reagieren vorwiegend auf Änderungen des pO₂ und des pH-Wertes. Veränderungen des pCO₂ werden über zentrale Chemorezeptoren an der Oberfläche des Hirnstammes detektiert. Die Weiterleitung der Informationen erfolgt über afferente Fasern zum Nucleus tractus solitarius, hier findet die Verschaltung und Verarbeitung aller empfangenen Afferenzen statt (McCrimmon et al. 2008, Klinka et al. 2005).

Typischerweise ist bei Patienten mit kongenitalem zentralem Hypoventilationssyndrom die Reaktion auf Hyperkapnie deutlicher beeinträchtigt, als die Reaktion auf Hypoxie. Ein Abfall des pCO₂ wird durch zentrale medulläre Chemorezeptoren registriert, diese entstammen nicht der Neuralleiste, sondern dem Neuralrohr und scheinen im Rahmen der Neurocristopathien intakt. Der grundlegende Defekt des kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms ist demzufolge nicht nur in der Reizaufnahme durch die Chemorezeptoren, sondern auch im Weitertransport und der Verarbeitung der Informationen zu vermuten (van de Borne 2005, Gaultier & Gallego 2008, Spengler et al. 2001).

1.8. Diagnosestellung

Das Symptom der Hypoventilation beinhaltet eine Vielzahl möglicher Differentialdiagnosen (Berry & Sriram 2009).

1.8.1. Differentialdiagnosen der alveolären Hypoventilation

Primär
Kongenitales zentrales Hypoventilationssyndrom (Undine-Syndrom)
Late-Onset zentrales Hypoventilationssyndrom
Sekundär
Hypoventilation des Adipösen
Zentrale Hypoventilation mit Schädigungen des Hirnstammes
Arnold-Chiari Malformation Typ I oder II
Hydrozephalus
Achondroplasie mit Einengung des Foramen ovale
Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie
Trauma
Blutung
Tumor
Angeborene Fehlbildungen
Meningoenzephalitis

Poliomyelitis
Zentrale Hypoventilation im Rahmen übergeordneter neurologischer Syndrome
Autonome Neuropathien
Mitochondriopathien
Neurodegenerative Syndrome
Sonstige Ursachen
Medikamente/Drogen
Hyperthermie
Hypothyreose
Stoffwechselerkrankungen

Tabelle 1.4.: Differentialdiagnosen des CCHS, modifiziert nach Marcus (2001) Sleep-disordered Breathing in Children

1.8.2. Definition des kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms

Persistierende alveoläre Hypoventilation, überwiegend im Schlaf, mit reduzierter oder fehlender Reaktion auf Hyperkapnie, die nicht durch primäre organische Fehlbildungen oder neuromuskuläre Erkrankungen verursacht wird. Nach den Richtlinien der American Thoracic Society (ATS) stellt das Undine-Syndrom eine Ausschlussdiagnose dar (ATS 1999).

1.8.3. Erforderliche Untersuchungen zur Diagnosestellung

Vor der Verfügbarkeit einer genetischen Diagnostik war, zum Ausschluss zugrundeliegender Erkrankungen, nach den Empfehlungen der ATS, eine Reihe ausführlicher, teils invasiver Untersuchungen erforderlich, um die Diagnose eines kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms zu stellen.

- Röntgen Thorax mit Darstellung der Zwerchfellbeweglichkeit
- Bronchoskopie
- Hyperkapnietest
- EKG und Echokardiographie
- Langzeitblutdruckmessung
- Neurologische Untersuchung
- Muskelbiopsie
- MRT des Gehirns und des Hirnstammes
- Darmbiopsie bei abdomineller Symptomatik

1.9 Die genetische Grundlage des CCHS

- Metabolische Untersuchungen in Urin und Blut (Carnitinspiegel, Fettstoffwechselstörungen)
- Augenärztliche Untersuchung
- Polysomnographie (Atemkontrolle im REM und Non-REM Schlaf, pO₂- und pCO₂-Messungen)

Die Seltenheit der Erkrankung und die vielen notwendigen Untersuchungen zur Stellung der Ausschlussdiagnose „Undine-Syndrom“ führten in der Vergangenheit häufig zu einer deutlichen Verzögerung der Diagnosestellung. Vor 1995 wurde die Diagnose im statistischen Mittel im Alter von 3½ Monaten nach Beginn der Symptomatik gestellt.

Durch neue Erkenntnisse und Nachweis der genetischen Grundlage des CCHS, vergehen derzeit weniger als zwei Wochen zwischen dem Beginn der respiratorischen Symptomatik und der Diagnosestellung (Trang, Dehan, Beaufils, Zaccaria, Amiel & Gaultier 2005).

1.9. Die genetische Grundlage des CCHS

1.9.1. Familiäres Auftreten

Eine genetische Grundlage der Erkrankung wird schon früh vermutet. In der Literatur finden sich Fallberichte von familiärem Auftreten der Symptome, bei Zwillingen, Geschwistern und auch Halbgeschwistern (Devriendt et al. 2000). In einer Fallkontrollstudie wird auch bei den Eltern von CCHS Patienten eine Häufung autonomer Dysfunktionen beobachtet, die in der Kontrollgruppe nicht bestehen (Fitze et al. 2003).

1.9.2. Kandidatengene

Gezielt erfolgt die Untersuchung an der Entwicklung der Neuralleiste beteiligter Gene.

- RET-Proto-Onkogen
- GDNF (Glial cell line-derived Neurotrophic Factor)
- Endothelin 3 Gen
- BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor)
- RNx-Gene

In diesen Gengruppen können bei CCHS Patienten vereinzelt Mutationen nachgewiesen werden, eine signifikante Häufung wird nicht beobachtet (Bolk et al. 1996, Young et al. 1999, Gaultier & Guilleminault 2001, Marazita et al. 2001, Weese-Mayer et al. 2002, Gaultier et al. 2003).

Aufgrund der ausgeprägten Beteiligung des autonomen Nervensystems (ANS) im Rahmen des CCHS, gerät *PHOX2B* als Schlüsselgen für die ANS Entwicklung in den Fokus der Untersuchungen.

2003 gelingt mehreren Arbeitsgruppen, fast zeitgleich, der Nachweis von heterozygoten Mutationen im *PHOX2B* Gen bei CCHS Patienten (Amiel et al. 2003, Weese-Mayer et al. 2003, Matera et al. 2004).

1.9.3. Das *PHOX2B* Gen

PHOX2B gehört zur Gruppe der Homeobox–Gene. Die Abkürzung entstammt der englischen Bezeichnung „Paired–like homeobox gene“. Homeobox–Gene beinhalten typischerweise einen sehr stabilen Genbereich, der aus 118 Basenpaaren besteht, in der Evolution nicht verändert wurde, und für eine DNA bindende Proteinregion (Homeodomäne) codiert. Homeobox–Gene sind Transkriptionsfaktoren mit besonderer Bedeutung während der embryologischen Entwicklung (Adachi et al. 2000, Pattyn et al. 1999).

Das Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4 (4p13) in einer hochkonservierten, also im Laufe der Evolution nur geringfügig veränderten, Genregion (Pattyn et al. 1997).

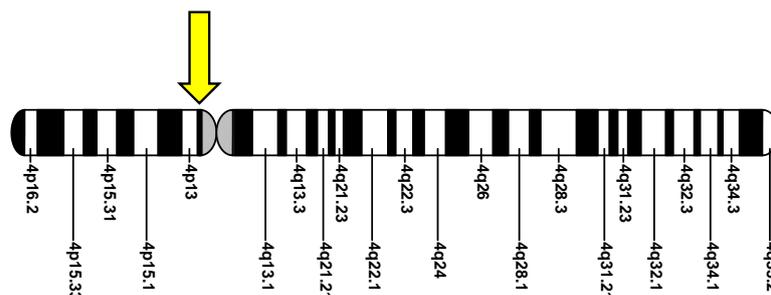


Abbildung 1.8.: Lokalisation *PHOX2B* auf Chromosom 4 nach www.nature.com

Im Allgemeinen sprechen derartig hochkonservierte Genregionen für eine besondere Bedeutung der hier kodierten Erbinformation. Individuen mit Veränderungen in diesem Bereich sind evolutionsgenetisch benachteiligt und können ihre Erbinformation nicht weitergeben, so dass diese Genregionen auch über Jahrtausende der evolutionären Entwicklung nicht verändert wurden (Pattyn, Hirsch, Goidis & Brunet 2000, Elworthy et al. 2005).

Die genetische Information des *PHOX2B* Gens ist auf drei Exons kodiert. Das Gen kodiert 314 Aminosäuren, hierunter ein konstanter Abschnitt mit 20 Alaninen am C-terminalen Ende des Proteins (Polyalaninrepeat, PA-Repeat).

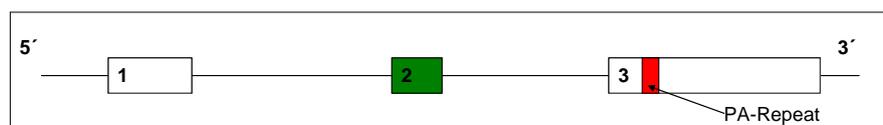


Abbildung 1.9.: *PHOX2B* schematisch

1.9 Die genetische Grundlage des CCHS

Aminosäuresequenz des Proteins mit Polyalaninrepeat (Markierung):

190	200	210	220	230	240
DDESKEAKST	DPDSTGGPGP	NPNPTPSCGA	NGGGGGGPSP	AGAPGAAGPG	GPGGEPGKGG
250	260	270	280	290	300
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	GGLAAAGGPG	QGWAPGPGPI	TSIPDSLGGP	FASVLSSLQR
310	320	330	340	350	360
PNGAKAALVK	SSMF*.....

Abbildung 1.10.: Aminosäuresequenz *PHOX2B* Exon 3 mit PA-Repeat (Markierung) bestehend aus 20 Alaninen (Wildtyp)

Dieser Polyalaninrepeat ist auf Exon 3 des *PHOX2B* Gens kodiert (Weese-Mayer et al. 2003). *PHOX2B* kodiert für einen Transkriptionsfaktor. Transkriptionsfaktoren formen Oligomere, die in der Lage sind direkt an DNS zu binden, und damit die Transkription der nachfolgenden Gene zu regulieren (Aktivierungskaskaden). Dem durch *PHOX2B* kodierten Transkriptionsfaktor wurde, in der frühen embryologischen Entwicklung des peripheren und autonomen Nervensystems, eine große Rolle nachgewiesen (Pattyn et al. 1999, Feldman et al. 2003).

1.9.4. PHOX2B Funktion und Bedeutung

1.9.4.1. PHOX2B steuert den Neuronalen Zellzyklus

In der Entwicklung der Wirbeltiere entstammen periphere Neuronen der Neuralleiste. Aus diesen Neuralleistenzellen entstehen eine Vielzahl verschiedener Zelltypen. Anfangs teilen sich die Neuralleistenzellen mitotisch in jeweils wieder identische Zellen (Poceta et al. 1987, Pattyn et al. 1999).

Neuronale Vorstufen entstehen und verteilen sich im sich entwickelnden Embryo. Zu einem bestimmten Zeitpunkt endet die mitotische Teilung, die Zellen beginnen sich zu differenzieren. Bei Fehlen des *PHOX2B* Gens, unterbleibt der Austritt der Zelle aus der mitotischen Teilung. Auch die Weiterdifferenzierung in funktionale Zellen (z. B. Neuronen) ist abhängig vom Vorhandensein von *PHOX2B* (Dubreuil et al. 2000, Pattyn, Goridis & Brunet 2000).

1.9.4.2. Expression von PHOX2B im Nervensystem

PHOX2B wird, während der Entwicklung des autonomen Nervensystems, in verschiedenen Neuronen–Unterklassen exprimiert (Rudzinski & Kapur 2010, Dubreuil et al. 2002).

Hierzu gehören alle autonomen Ganglien (sympatische, parasympatische und die Ganglien des enterischen Nervensystems des Darms), die distalen Ganglien der Hirnnerven N. facialis (VII), N. hypoglossus (IX), und N. vagus (X), die für die Verarbeitung von Afferenzen aus den peripheren Chemo-, Osmo-, und Barorezeptoren verantwortlich sind. Zudem sind im Zentralen Nervensystem die motorischen Kerne, der Nucleus des Tractus solitarius und die Area postrema betroffen, in denen die Afferenzen aus den Rezeptoren verarbeitet und weitergeleitet werden (Pattyn et al. 1997, Talikka et al. 2004).

Weiterhin reguliert *PHOX2B* die Expression von Schlüsselenzymen der Noradrenalsynthese (z. B. der Dopamin–beta–Hydroxylase) (Yang et al. 1998, Adachi et al. 2000, Pattyn, Golidis & Brunet 2000).

Die Vielzahl der *PHOX2B* exprimierenden Neuronen vereint eine Besonderheit: Sie schließen sich zur Bildung eng definierter neuronaler Reflexbögen zusammen (Dauger et al. 2003).

Bereits vor Bekanntwerden des Zusammenhangs mit CCHS wurde ein Mausmodell des Gendefekts entwickelt. Hier konnte nachgewiesen werden, dass das Vorhandensein von *PHOX2B* nicht nur die Entwicklung, sondern auch die Interaktion *PHOX2B* abhängiger Neuronen beeinflusst. Mäuse mit einer homozygoten Depletion des Gens (*PHOX2B* $-/-$) versterben bereits in utero oder kurz nach der Geburt. Histochemisch lässt sich bei diesen Tieren kein Nucleus tractus solitarius nachweisen. Heterozygote *PHOX2B* $+/-$ Tiere sind lebensfähig, zeigen jedoch Störungen im Atemmuster (Brunet & Pattyn 2002, Huber & Ernsberger 2006, Durand et al. 2005).



Abbildung 1.11.: Expression von *PHOX2B* im Gastrointestinaltrakt eines transgenen Mausembryos. Sichtbar gemacht durch die Expression von Cerulean Fluorescent Protein (blau–grün), unter der Kontrolle durch den *PHOX2B*–Promotor. Vergrößerung 48,5–fach (Southard-Smith 2008)

1.9.5. Mutationen im PHOX2B Gen

2003 gelingt mehreren Arbeitsgruppen, fast zeitgleich, der Nachweis von heterozygoten Mutationen im *PHOX2B* Gen bei CCHS Patienten (Amiel et al. 2003, Weese-Mayer et al. 2003, Matera et al. 2004). Bei über 2.000 Kontrollpersonen, ohne respiratorische Symptomatik, kann die Mutationen im *PHOX2B* Gen nicht nachgewiesen werden (Hung et al. 2007). Somit sind Mutationen im

1.9 Die genetische Grundlage des CCHS

PHOX2B Gen als ursächlich für das Krankheitsbild CCHS anzusehen.

Die nachgewiesene Mutationshäufigkeit differiert, möglicherweise technisch bedingt, zwischen den Arbeitsgruppen deutlich.

Quelle	Untersuchte Patienten	Nachweis (%) PHOX2B Mutationen
Sasaki et al. 2003	10	50 %
Amiel et al. 2003	29	62 %
Weese-Mayer et al. 2003	67	97 %

Tabelle 1.5.: Nachgewiesene Mutationshäufigkeit bei klinisch gesichertem CCHS. Literaturangaben verschiedener Arbeitsgruppen differieren deutlich. Siehe Kapitel 6.1. auf Seite 69.

Insbesondere Mutationen im Bereich des Polyalaninrepeats können bei der überwiegenden Zahl der Patienten nachgewiesen werden.

1.9.5.1. Mutationen im Polyalaninrepeat

In einer Analyse von 10.000 menschlichen Genen, können in 20 % homopolymere Bereiche in der kodierenden Sequenz nachgewiesen werden. 16 % dieser homopolymeren Bereiche bestehen aus Alaninketten unterschiedlicher Länge. Somit kann von ca. 300 Genen ausgegangen werden, die zumindest einen Polyalanin-Bereich besitzen. Mutationen in Polyalanin-Bereichen werden als ursächlich für mehrere Erkrankungen des Menschen beschrieben (Brown & Brown 2004, Albrecht & Mundlos 2005).

Erkrankung	Omim Nr.
Synpolydactylie Typ II	186000
Cleidocraniale Dysplasie	119600
Oculopharyngeale muskuläre Dystrophie	164300
Holoprosencephalie Hand-Fuß-Genital Syndrom	140000
Blepharophimose, Ptose und Epicantus inversus Syndrom	110100
X-gebundene mentale Retardierung mit isoliertem Wachstumshormondefizit	300123
Syndrom der infantilen Spasmen, X-gebunden	308350
Partington Syndrom	309510
Kongenitales Zentrales Hypoventilationssyndrom	209880

Tabelle 1.6.: Erkrankungen durch Mutationen in Polyalaninrepeaten

In den meisten Fällen, jedoch nicht immer, liegt den Mutationen eine fehlerhafte Rekombination, eine Art „Verrutschen“ im Rahmen der Replikation zugrunde, gefolgt von einem ungleichen Crossing over, das zu Tripletexpansionen unterschiedlichster Ausmaße führen kann. Die Auswirkungen der Polyalaninexpansionen im Bereich eines Transkriptionsfaktors sind multipel. Sie reichen von einem hemmenden Effekt des mutierten Proteins, über einen vollständigen Funktionsverlust, bis zu einem abnormalen, sogar toxischen, Funktionsgewinn hin (Brown & Brown 2004, Hung et al. 2007).

1.9.5.2. Ein Polyalaninrepeat ist auch bei CCHS betroffen

Auch bei den im Rahmen des CCHS nachgewiesenen Mutationen, handelt es sich überwiegend um heterozygote Expansionen im Bereich des Polyalaninrepeats. Im Wildtyp finden sich homozygot 20 Alaninreste, in einzelnen Fällen wird der Verlust einzelner Alaninreste beobachtet. Dies bleibt klinisch für das Individuum ohne Folgen. Bei Patienten werden heterozygote Expansionen von 25–33 Alaninresten beschrieben, homozygote Mutationen, im Bereich des *PHOX2B* Gens, wurden bislang beim Menschen nicht beobachtet (Amiel et al. 2003, Weese-Mayer et al. 2003, 2009). Die Tatsache, dass weder bei gesunden Kontrollen, noch bei Patienten, Expansionen von nur 21–24 Alaninresten beobachtet werden, spricht gegen ein reines „Verrutschen“ der DNA Stränge bei der Replikation (Weese-Mayer et al. 2003).

In seltenen Fällen werden Mutationen einzelner Basenpaare, Nonsens- oder Frameshift Mutationen nachgewiesen.

Eine Genotyp–Phänotyp Korrelation wird vermutet. Je größer die Zahl der Alaninreste bei einem Patienten ist, desto schwerer ist die zu erwartende Ausprägung der Symptomatik (Weese-Mayer et al. 2005).

Die meisten in der Literatur beschriebenen Mutationen entstehen „de novo“, können somit bei Eltern nicht nachgewiesen werden. Dennoch existieren in der Literatur Berichte von mehreren betroffenen Kindern einer Familie, sowie von vertikalen Übertragungen betroffener Mütter auf ihr Kind, dies spricht ebenfalls für das Vorliegen einer dominanten Mutation. Das veränderte Allel scheint meiotisch stabil zu sein. In Einzelfällen gelang der Nachweis eines elterlichen Mosaiks, zudem besteht die Möglichkeit, einer auf die Keimbahnen der Eltern beschränkten Mutation (Weese-Mayer et al. 2003).

2. Zielsetzung

Die Diagnostik des CCHS ist, solange sie als Ausschlussdiagnose gestellt werden muss, zeitaufwendig und invasiv. Sie stellt für das Kind eine große Belastung dar, für bildgebende Untersuchungen und Biopsien sind mehrere Narkosen erforderlich. Hypoxieepisoden im Rahmen eines unbehandelten, weil undiagnostizierten CCHS korrelieren mit kognitiven Defiziten der Patienten. Eine lange Latenz zwischen Verdachtsdiagnose und Bestätigung, erfordert einen initial längeren Krankenhausaufenthalt, führt zu einer großen psychischen Belastung der Eltern und verzögert nicht zuletzt die Einleitung und Organisation geeigneter Therapiemaßnahmen und häuslicher Hilfen.

2003 wurden erstmals heterozygote Expansionen im *PHOX2B* Gen als krankheitsverursachend beschrieben, hierbei bestand jedoch eine große Diskrepanz in der nachgewiesenen Mutationshäufigkeit.

Ein zuverlässiger Nachweis der Mutation im *PHOX2B* Gen, könnte die Diagnosestellung vereinfachen und beschleunigen.

Ziele dieser Doktorarbeit waren:

- Die laborinterne Etablierung einer zuverlässigen Methode zur molekulargenetischen Diagnostik des CCHS durch Nachweis der heterozygoten Polyalaninexpansionen im *PHOX2B* Gen
- Vermeidung eines Allelverlustes bei der Amplifikation
- Verifizierung der Ergebnisse durch Fragmentlängenanalyse
- Sequenzierung der kodierenden Bereiche des *PHOX2B* Gens
- Rekrutierung eines Patientenkollektives
- Entwicklung und Auswertung eines Fragebogens zur Patientenerkennung
- Die molekulargenetische Charakterisierung des Patientenkollektivs
- Die Evaluation der erhobenen Ergebnisse in Bezug auf eine mögliche Genotyp–Phänotyp Korrelation
- Die Ermöglichung einer frühzeitigen und nicht belastenden Diagnosestellung

3. Material und Methoden

3.1. Patienten

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden vier Gruppen von Probanden untersucht:

- Indexpatienten
- Familienangehörige (Geschwister und Eltern)
- Familiäre Fälle
- Late-Onset Undine-Patienten
- Gesunde Kontrollprobanden

3.1.1. Indexpatienten

Wir erhielten Proben (EDTA-Vollblut, genomische DNA) von insgesamt 17 Patienten aus verschiedenen Kliniken in Deutschland, bei denen die Verdachtsdiagnose eines CCHS postnatal durch die behandelnden Ärzte gestellt wurde. Alle durchgeführten Untersuchungen erfolgten mit Zustimmung der Erziehungsberechtigten.

Zur genauen Evaluation der Angaben wurden die Einsender um Ausfüllung eines Fragebogens gebeten. Dieser wurde von uns nach den Richtlinien der American Thoracic Society (ATS 1999) entwickelt, um das vorliegende Symptomspektrum genauestens zu erfassen. Zudem baten wir um die Zusendung bereits vorliegender medizinischer Berichte (Arztbriefe, Biopsieergebnisse, etc.).

Die erhaltenen Daten wurden von uns nach den Richtlinien der ATS ausgewertet. Es wurde versucht, die Diagnose „Undine-Syndrom“ als Ausschlussdiagnose anhand der erhaltenen Unterlagen zu bestätigen. Kinder mit ausgeprägten Fehlbildungen, Tracheomalazien, muskulärer Hypotonie, nur einmaliger Apnoephase oder anderen grundlegenden Erkrankungen, die als ursächlich für eine Hypoventilation gewertet werden konnten, wurden zur Bewertung der Methode nicht herangezogen. Bei sieben der obengenannten Patienten konnte bei Anwendung der Diagnosekriterien der ATS die Verdachtsdiagnose „Undine-Syndrom“ nicht verifiziert werden.

Wir bestätigten die Verdachtsdiagnose bei Patienten mit Beatmungspflichtigkeit oder CO₂-Retentionen ohne andere erkennbare Ursache. Zehn Patienten zeigen die klassischen Symptome des CCHS. Eine Beatmung im Schlaf ist erforderlich, bei ca. 50 % bestehen zudem zusätzliche autonome Dysfunktionen. Zwei Patientinnen waren bei genetischer Diagnosestellung bereits sechs bzw.

3.1 Patienten

14-Jahre alt. Bei allen anderen Patienten fanden genetische Untersuchung und Diagnosestellung im Säuglingsalter statt.

3.1.2. Familienangehörige

3.1.2.1. Eltern/Geschwister

Bei auffälligen Befunden in den initialen genetischen Untersuchungen wurde eine genetische Untersuchung der Familienangehörigen empfohlen, um Hinweise auf das Vorliegen somatischer Mosaik oder Keimbahnmutationen zu erhalten.

Wir erhielten DNA von sieben Elternpaaren und zwei Geschwistern.

3.1.2.2. Familiäre Fälle

Betroffene Geschwister Uns erreichte DNA eines Kindes, mit hochgradigem Verdacht auf ein CCHS, dessen Geschwisterkind anamnestisch an einem klassischen, klinisch gesicherten CCHS verstorben war. Genetisches Material des verstorbenen Kindes war nicht asserviert worden.

Die verstorbene Patientin war jedoch initial in unserem Hause betreut worden, so dass anhand der vorliegenden Arztbriefe und durch Akteneinsicht die Diagnose nochmals abgesichert werden konnte. Wir konnten DNA des erkrankten Geschwisterkindes und der leiblichen Eltern untersuchen.

Vertikale Vererbung Im Rahmen unserer Analysen konnte zudem eine weitere vertikale Vererbung einer Mutation in einer Familie nachgewiesen werden.

3.1.3. Kontrollprobanden

Vier Proben gesunder Kontrollpersonen konnten neben den Proben der untypischen Patienten und ihrer Eltern untersucht werden.

3.1.4. Einverständnis

Vor Durchführung der genetischen Untersuchung am *PHOX2B* Gen wurden die Eltern über Indikation und Aussagekraft, insbesondere auch über die Grenzen, einer genetischen Untersuchung informiert. Das schriftliche Einverständnis der Eltern zur Durchführung der Diagnostik im *PHOX2B* Gen bei den Indexpatienten, den Eltern und eventuellen Geschwisterkindern, wurde eingeholt und liegt vor.

3.1.5. Genetische Beratung/Befundmitteilung

Die Befundmitteilung erfolgte an die jeweils einsendenden Ärzte. Die Mitteilung der Befunde an die Eltern, im Rahmen eines ausführlichen genetischen Beratungsgesprächs, wurde von uns empfohlen.

3.1.6. Fragebogen

Anhand der von der American Thoracic Society veröffentlichten Richtlinien zur Diagnosestellung eines Undine-Syndroms, entwickelten wir einen Fragebogen, der auf Anfrage den behandelnden Ärzten zugeschickt wurde.

Zusätzlich zu den klinischen Diagnosekriterien eines CCHS enthält der von uns verfasste Fragebogen auch Fragen, mit denen die Funktion weiterer autonomer Regelkreise abgeprüft wird. (Fragebogen siehe Anhang C auf Seite 85.)

3.1.7. Arztbriefe

Bei den betroffenen Kindern wurden die Einsendungen durch Arztbriefe ergänzt, bei drei in unserem Haus behandelten Patienten, konnten die Akten in ihrer Gesamtheit eingesehen werden. Der Indexpatient dieser Doktorarbeit befand sich, zu Beginn dieser Arbeit, in stationärer Betreuung auf der Neugeborenenintensivstation unseres Hauses. Hier konnten die klinischen Befunde direkt erhoben und verifiziert werden. Ein Late-Onset Patient wurde bereits zu einem früheren Zeitpunkt, im Rahmen einer Publikation, ausführlich beschrieben (Rohrer et al. 2002).

3.1.8. Ausschluss von Patienten

Zur Entwicklung einer zuverlässigen Methode ist die strenge Selektion des Patientengutes unerlässlich, um die Zahl der falsch negativen Befunde zu minimieren und insbesondere eine Beurteilung der Zuverlässigkeit der Methode zu ermöglichen.

Durch die Ausführlichkeit des Fragebogens und der zudem, bei der Mehrzahl der Einsendungen, vorliegenden Arztbriefe, konnte bei den Patienten die Verdachtsdiagnose eines Undine-Syndroms überprüft werden. Die Verifikation erfolgte anhand der klassischen klinischen Kriterien als Ausschlussdiagnose (ATS 1999).

3.1 Patienten

Ausgeschlossene Patienten				
Name	Symptombeginn	Hyperkapnie	Beatmung nachts	Bemerkung
Patient S.	15. Lebensstag	nein	nein	2 mal Sättigungsabfall im Schlaf
Patient P.	keine Angaben	ja	ja	Kein Material, V. a. M. Hirschsprung
Patient K.	Geburt	nein, Polysomnographie unauffällig	nein	Laryngomalazie, Stridor, Reflux, hieraus schweres ABS erklärbar
Patient Sch.	Geburt	nein	nein	Pierre Robin Sequenz, Gaumenspalte, Hirnnervenausfall, Pontocerebelläre Hypoplasie MER reduziert
Patient R.	Keine Angaben	Nicht berichtet	nein	Ausgeprägte muskuläre Hypotonie mit resp. Insuffizienz
Patient D.	Keine Angaben	Hypoventilation im Schlaf, pCO ₂ um 60, keine Beatmung	nein	Keine weiteren Angaben
Patient A.	Geburt	Keine Hyperkapnie, deutliche Atemnot, obstruktive Phasen, V. a. obstruktive Schlafapnoe	CPAP	V. a. übergeordnetes Syndrom, Laryngo–Tracheo–Bronchomalazie, faciale Dismorphien, bifrontale Hirnatrophie

Tabelle 3.2.: Tabelle der nach klinischen Kriterien ausgeschlossenen und zur Methodenbewertung nicht herangezogenen Patienten – Eine Mutation im PA–Repeat konnte bei keinem dieser Patienten nachgewiesen werden

In die Auswertung wurden nur Kinder einbezogen, die eine klinische Bestätigung der Diagnose ermöglichen.

Patienten, bei denen die klinische Stellung der Ausschlussdiagnose, aufgrund assoziierter Erkrankungen (Hydrozephalus, Pierre–Robin–Sequenz, schwere Gehirnfehlbildungen, etc.) nicht möglich war, oder die unauffällige Untersuchungsergebnisse in Kernuntersuchungen z. B. in der Polysomnographie (Obstruktive Episoden) aufwiesen, wurden zur Bewertung der Methode nicht herangezogen.

Zur Vollständigkeit und zur Befunderstellung für die einsendenden Kollegen, erfolgte dennoch eine genetische Untersuchung der Patienten, eine Mutation im Polyalaninrepeat des *PHOX2B* Gens bestand bei keinem dieser Patienten.

3.2. Material

Als Untersuchungsmaterial erhielten wir EDTA-Vollblut oder genomische DNA des Patienten oder der zu untersuchenden Angehörigen.

3.3. Methoden

3.3.1. Extraktion genomischer DNA aus Vollblut

Zur DNA-Extraktion aus Leukozyten wurde die Aussalz-Methode nach Miller, Dykes und Polesky (Miller et al. 1988) angewandt.

Erythrozytenlyse und Abzentrifugation der Leukozyten

Zur Trennung von Leukozyten und Erythrozyten wird ein Erythrozytenlysepuffer dem EDTA-Vollblut zugesetzt (Verhältnis 1:3). Nach Lyse der Erythrozyten bei Raumtemperatur erfolgt das Abzentrifugieren (1.500 U/min) der Leukozyten.

Diese werden gereinigt, mit SDS lysiert und mit Proteinspaltenden Enzymen (Proteinase K) inkubiert, um die genomische DNA aus ihrer Proteinbindung zu lösen.

Inkubationsansatz:

- 1 ml Proteinase K-Puffer
- 25 µl Proteinase K
- 50 µl SDS 20 %

Inkubation über 2 Stunden bei 65 °C im Wasserbad

Reinigen der DNA

Die gelösten Proteine werden nach Spülung und Denaturierung mit 5 M NaCl-Lösung (300 µl) bei 4.500 U/min von der DNA getrennt. Der DNA-haltige Überstand wird nach der Zentrifugation mit Ethanol 100 % (4 ml) denaturiert. Durch leichtes Schwenken fällt die genomische DNA aus der Lösung aus und kann aus der Lösung genommen werden. Es erfolgt nun nochmals eine Reinigung mit kaltem Ethanol (70 %) (350 µl). Im Anschluss trocknet die DNA ca. eine Stunde bei Raumtemperatur. Es erfolgt die Resuspension in Tris-EDTA-Puffer. Die DNA bleibt bei einer Lagerung um ca. 4° stabil.

3.3 Methoden

3.3.2. Polymerase–Kettenreaktion

3.3.2.1. Prinzip der PCR

Das von Mullis entwickelte Verfahren ermöglicht die exponentielle in vitro Vermehrung definierter DNA Stücke (Mullis et al. 1986).

Hierzu werden nach der initialen Aufspaltung der DNA Doppelstränge (Denaturierung) zuerst spezifische kleine DNA Fragmente (Primer) an den Einzelstrang angelagert (Annealing). Polymerasen synthetisieren dem zum Einzelstrang komplementären DNA Strang. Durch Erhitzen werden die neu entstandenen Doppelstränge wieder aufgespalten, die Primer können sich erneut anlagern. Ein neuer Zyklus beginnt. Durch die Wiederholung dieses Prozesses (25–40 mal) gelingt die exponentielle Vermehrung der initial vorhandenen DNA, jeder neu gebildete Strang dient im weiteren Verlauf selbst als Matrize.

Naturgemäß ist die Funktion dieses Prozesses von der Qualität und Quantität der zugegebenen Produkte (Primer, Basen, Medium, Magnesiumionen) und den Umgebungsbedingungen (Temperatur, pH–Wert) abhängig.

3.3.2.2. PCR Primer

Die Oligonucleotid Primer lagern sich an den zu vervielfältigenden DNA Abschnitt an, es sind in vitro synthetisierte DNA Einzelstränge mit einer Länge von 15–50 Basenpaaren. Sie stellen den Startpunkt der in der PCR durchgeführten DNA Synthese dar. In einer klassischen PCR Reaktion werden jeweils zwei verschiedene Primer verwendet, wobei der Forward Primer die Sequenz des kodierenden Stranges und der Reverse Primer die Sequenz des dazu komplementären Stranges wiedergibt.

Der Primer weist die für die Polymerasen erforderlichen 3´OH–Enden auf, an die das Enzym die weiteren Basenpaare anlagern kann.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Primer wurden, entsprechend den in der Literatur und in Gendatenbanken veröffentlichten Sequenzen, durch die Firma Metabion, Martinsried, synthetisiert.

3.3.2.3. Temperaturen

Denaturierung

DNA liegt als Doppelstrang vor. Um eine Anlagerung der Primer, und damit die Vervielfältigung, zu ermöglichen, ist ein initiales Eröffnen dieser Doppelstränge erforderlich.

Hierfür wird das Reaktionsgemisch auf Temperaturen zwischen 94–96 °C erhitzt. Die hierdurch zugeführte thermische Energie sprengt die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen und teilt somit die Doppelstränge.

Ermittlung der Annealing Temperatur

Die Temperatur der Annealing Reaktion hängt von der Länge und der Zusammensetzung der Primer ab. Als Anhaltspunkt wurde die Annealing Temperatur errechnet nach der Formel: 4 °C für jedes Guanin (G) und Cytosin (C), 2 °C für jedes Adenin (A) und Thymin (T). Von der so errechneten Temperatur wurden jeweils 5–10 °C abgezogen, um die Zahl unspezifischer Bindungen zu reduzieren.

Elongation

Im nächsten Schritt verlängert eine DNA-abhängige DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) (Roche Pharma, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) die Nukleinsäure Sequenz im Anschluss an die 3'OH-Enden des Primers. Diese Reaktion benötigt Magnesium und dNTPs. Die Reaktion erfolgt temperaturabhängig und wurde je nach Enzym bei 68–74 °C (nach Herstellerangaben) durchgeführt. Jede PCR Reaktion besteht somit aus den Komponenten:

- Denaturierung
- Annealingreaktion
- Elongationsphase

Nach dem Ende einer Elongationsphase werden die gebildeten Doppelstränge wiederum denaturiert und somit wird ein neuer Zyklus der Reaktion begonnen. Die erforderlichen Temperaturen, Zeiten und die Anzahl der erforderlichen Zyklen, wurden entsprechend der verwendeten Primer und der vorliegenden DNA Sequenz optimiert.

3.3.2.4. Guanin- und Cytosin-Reichtum des PHOX2B Gens, ein Problem der PCR

Das *PHOX2B* Gen enthält zwei lange Polyalaninrepeats. Alanin wird im genetischen Code immer durch die Kombination GC und einer weiteren Base codiert.

3.3 Methoden

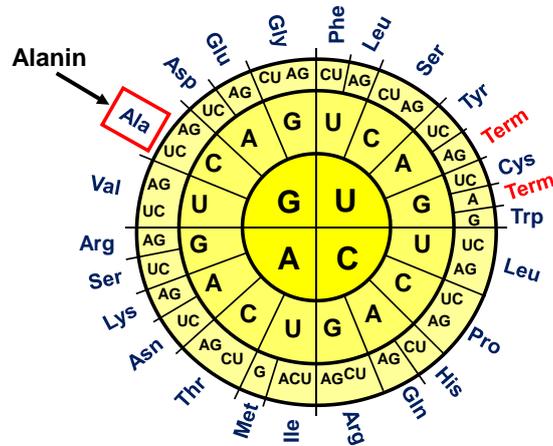


Abbildung 3.1.: Genetischer Code, modifiziert nach www.medigenomix.de

Die Polyalaninrepeats führen zu einem ausgeprägten GC Reichtum des zu amplifizierenden DNA Abschnittes von bis zu 72 % (Musso et al. 2006). Zusätzlich enthalten die mutierten DNA Stränge Expansionen des Polyalaninrepeats, sind somit noch GC-reicher als der Wildtyp. Dieser erhöhte Gehalt an Guanin und Cytosin muss im Rahmen der PCR Optimierung besonders beachtet werden (Mamedov et al. 2008).

Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen

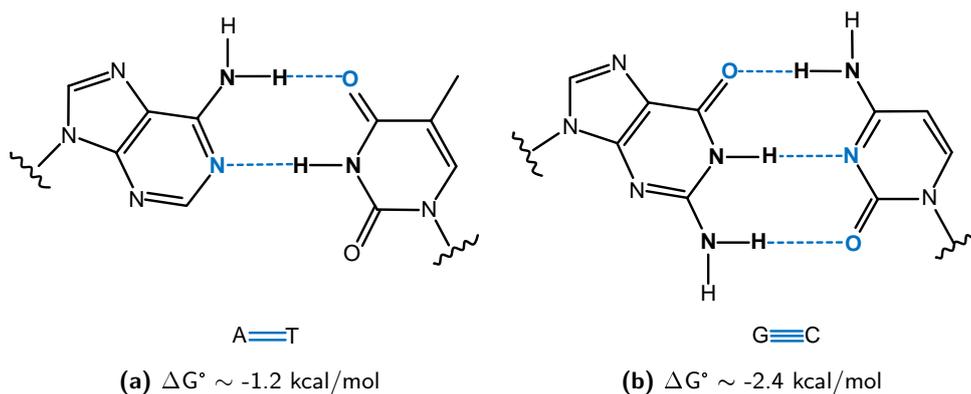


Abbildung 3.2.: Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Basen nach Graur & WenHsiung (1999)

Guanin und Cytosin bilden in der DNA-Doppelhelix drei Wasserstoffbrückenbindungen aus. Zur Auftrennung dieser drei Wasserstoffbrücken ist eine höhere Energie (2,4 kcal/mol) erforderlich, als zur Trennung der zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Thymin (1,2 kcal/mol). Die Annealingreaktion des PA-Repeats benötigte aus diesem Grund eine Temperatur von 59 °C,

um optimale Ergebnisse zu erreichen. Die Denaturierung der Doppelstränge erfolgte durch eine kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 95 °C vor Beginn eines neuen Zyklus.

3.3.2.5. Gefahr des Allelverlusts

Die Basen Guanin und Cytosin zeigen, aufgrund ihrer drei Bindungsmöglichkeiten, eine höhere Neigung zum Ausbilden unspezifischer intramolekularer Bindungen, nach der Auftrennung zum Einzelstrang. Diese Loops können bei der Synthese von der Taq-Polymerase übersprungen werden, ein verkürzter neuer DNA Strang ist die Folge. Dies ist, insbesondere zu frühen Zeitpunkten der PCR, von Bedeutung, da kürzere Stränge schneller amplifiziert, und dadurch in der PCR Reaktion bevorzugt und exponentiell vervielfältigt werden. Vor allem bei den Allelen mit Expansionen im Polyalaninrepeat und dem hieraus resultierendem besonders hohem GC-Reichtum, ist dieser Effekt von Bedeutung. Ein Verlust des gesamten Allels kann die Folge sein. Bei der Diagnostik des CCHS, einer heterozygoten Erkrankung, stellt dies ein gravierendes diagnostisches Problem dar. Das Auftreten von falsch negativen Befunden ist möglich, eine bestehende Heterozygotie kann übersehen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Amplifikation die Taq-DNA-Polymerase der Firma Roche Pharma (Grenzach-Wyhlen, Deutschland) verwendet.

3.3.2.6. Optimierung der PCR Bedingungen

Magnesium

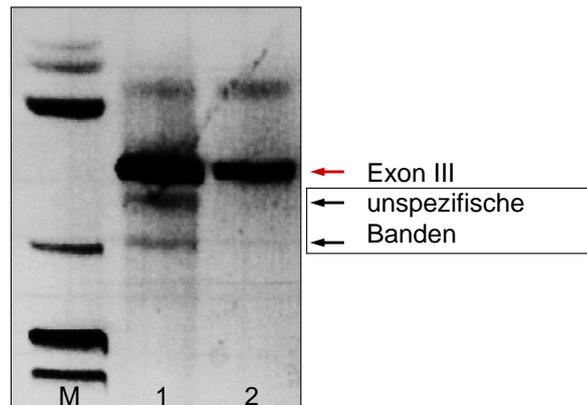
Die Magnesiumkonzentration hat Einfluss auf das Ergebnis der PCR Amplifikation. Primär ist die DNA-Polymerase ein magnesiumabhängiges Enzym. Durch Zugabe von $MgCl^{2+}$ lässt sich das Primerannealing und die Spezifität des PCR Ergebnisses verbessern, Fehler werden vermieden (Eckert & Kunkel 1991). Nach initialer Verwendung der magnesiumarmen Pufferlösung der Taq-Polymerase konnte kein PCR Produkt nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf wurden die Versuche mit dem angebotenen magnesiumhaltigen Puffer der Firma Roche Pharma (Grenzach-Wyhlen, Deutschland) durchgeführt („roter Puffer“). Die nach Verdünnung erzielte $MgCl^{2+}$ Endkonzentration betrug 1,5 mM. Unter dieser Konzentration konnte die PCR regelrecht ablaufen, das erhaltene Produkt zeigte jedoch noch mehrere unspezifische Banden.

Betain

Betain (N,N,N-Dimethylglycin) hat die Fähigkeit die Bildung von unerwünschten Sekundärstrukturen nach Auftrennen der DNA Stränge zu verhindern. Dies ist insbesondere in GC-reichen Sequenzen hilfreich. Ein positiver Effekt auf die Amplifikation auch GC-reicher mutierter Allele, wurde später auch in der Literatur beschrieben (Musso et al. 2006).

Durch die Zugabe von Betain zum PCR Ansatz, konnte eine Reduktion unspezifischer Produkte erzielt werden. Die optimale Betain Endkonzentration betrug für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit 1,25 M.

3.3 Methoden



- M: Marker 1kb
 1: Amplifikation ohne Betain, Auftreten unspezifischer Banden
 2: Amplifikation mit Betain 1,25 M, deutliche Reduktion der unspezifischen Banden

Abbildung 3.3.: Reduktion unspezifischer Banden durch Einsatz von Betain, am Beispiel der Amplifikation des Exon III

Zudem führten wir eine Sequenzierung der erhaltenen PCR Produkte zur Absicherung der Resultate durch. In heterozygot vorliegenden Genen bestätigte der Erhalt zweier überlappender Sequenzierungsbanden mit übereinstimmenden Gensequenzen vor, bzw. nach der Mutation, die regelrechte Amplifikation beider Allele.

3.3.2.7. Nested-PCR

Um, bei geringer Konzentration an Ausgangs-DNA, ausreichende Mengen des PCR-Produktes zu erhalten, oder, um problematisch zu amplifizierende DNA Bereiche ausreichend zu vermehren, wurde eine sogenannte „Nested-PCR-Analyse“ durchgeführt. Hierbei wird an die initiale PCR eine weitere PCR Reaktion angeschlossen. Die hierbei verwendeten Primer befinden sich innerhalb des ersten PCR Produktes. Das zu vervielfältigende DNA Stück wird – sozusagen in zwei Schritten – aus der Gesamt-DNA herausgeschnitten.

3.3.3. Ermittelte PCR Protokolle für die Amplifikation des PHOX2B Gens

Exon I und II	Temperatur (°C)	Zeit
I. Denaturierung initial	95	10 min
II. Denaturierung repeat	94	30 s
III. Annealing	57	30 s
IV. Elongation	72	30 s
V. Finale Elongation	72	10 min
Zyklen (II-IV)	35 mal	

Tabelle 3.3.: PCR Protokoll Exon I und II *PHOX2B* Gen

Zur Amplifikation des gesamten Exon III wurde, aufgrund des hohen GC Gehaltes, eine sogenannte „Nested-PCR Analyse“ durchgeführt, indem einer PCR eine weitere PCR mit erneuter Zugabe der Primer, oder mit innerhalb des ersten PCR Produktes liegenden Primern, angeschlossen wurde.

Exon III (1. Durchlauf)	Temperatur (°C)	Zeit
I. Denaturierung initial	95	15 min
II. Denaturierung repeat	94	40 s
III. Annealing	52	30 s
IV. Elongation	72	50 s
V. Finale Elongation	72	10 min
Zyklen (II-IV)	40 mal	

Nested-PCR Template = 1 µl des PCR Produktes Exon III 1. Durchlauf

Tabelle 3.4.: PCR Protokoll Exon III *PHOX2B* Gen (1. Durchlauf)

Es besteht die Möglichkeit, dass im Rahmen der Nested PCR ein Allel bevorzugt synthetisiert wird. Kontrollen erfolgten durch Patientenproben mit bekannter Expansion bei jedem Durchlauf. Wurde hier ein Allelverlust (Gelbild/Sequenzierung) beobachtet, erfolgte keine Verwertung der anderen Proben. Durch Optimierung der PCR Parameter konnte ein Auftreten dieses Effektes reduziert werden.

Exon III (Nested-PCR)	Temperatur (°C)	Zeit
I. Denaturierung initial	95	15 min
II. Denaturierung repeat	94	30 s
III. Annealing	52	30 s
IV. Elongation	72	30 s
V. Finale Elongation	72	10 min
Zyklen (II-IV)	35 mal	

Tabelle 3.5.: PCR Protokoll Exon III *PHOX2B* Gen (2. Durchlauf – Nested-PCR)

3.3 Methoden

Amplifikation des innerhalb des Exon III liegenden PA-Repeats (Mutationsstelle):

Exon III (PA-Repeat)	Temperatur (°C)	Zeit
I. Denaturierung initial	95	10 min
II. Denaturierung repeat	94	30 s
III. Annealing	59	30 s
IV. Elongation	72	30 s
V. Finale Elongation	72	10 min
Zyklen (II-IV)	40 mal	

Tabelle 3.6.: PCR Protokoll PA-Repeat des Exons III *PHOX2B* Gen

PCR Ansätze

PA-Repeat	
Reagenz	Menge
Roter Puffer	5 µl
Betain	15 µl
Primer PA <i>f</i>	1 µl
Primer PA <i>r</i>	1 µl
dNTPs	1 µl
Template	1 µl
Taq Polymerase	0,7 µl
Aqua dd	25,3 µl
Probenvolumen	50 µl

Tabelle 3.7.: PCR Ansatz Amplifikation PA-Repeat Exon III *PHOX2B* Gen

Exon I und II	
Reagenz	Menge
Roter Puffer	5 µl
Betain	15 µl
Primer I/II <i>f</i>	1 µl
Primer I/II <i>r</i>	1 µl
dNTPs	1 µl
Template	1 µl
Taq Polymerase	0,7 µl
Aqua dd	40,3 µl
Probenvolumen	50 µl

Tabelle 3.8.: PCR Ansatz Amplifikation Exon I und II *PHOX2B* Gen

Exon III (1. Durchlauf)	
Reagenz	Menge
Roter Puffer	5 µl
Betain	15 µl
Primer III <i>f</i>	1 µl
Primer III <i>r</i>	1 µl
dNTPs	1 µl
Template	1 µl
Taq Polymerase	0,7 µl
Aqua dd	25,3 µl
Probenvolumen	50 µl

Tabelle 3.9.: PCR Ansatz Amplifikation Exon III *PHOX2B* Gen – 1. Durchlauf

Exon III (Nested-PCR)	
Reagenz	Menge
Roter Puffer	5 µl
Betain	15 µl
Primer III <i>f</i>	1 µl
Primer III <i>r</i>	1 µl
dNTPs	1 µl
Template*	1 µl
Taq Polymerase	0,7 µl
Aqua dd	25,3 µl
Probenvolumen	50 µl

*Template = 1 µl PCR Produkt Exon III – 1. Durchlauf

Tabelle 3.10.: PCR Ansatz Amplifikation Exon III *PHOX2B* Gen – 2. Durchlauf

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) durchgeführt.

3.3 Methoden

Primerliste CCHS	
PA	
PA-f (und PA-F*)	5'- cca ggt ccc aat ccc aac - 3'
PA-r	5'- gag ccc agc ctt gtc cag - 3'
Exon I	
I-f	5'- gac ctc aga caa ggc atc tca - 3'
I-r	5'- aat tac ccc tcc ctg caa tca - 3'
Exon II	
II-f	5'- ctg ccg tat gac ctg acc tt - 3'
II-r	5'- aca gcc aca cca aat cca gt - 3'
Exon III – nested PCR	
1. Schritt	
IIIa-f	5'- cga agt aga act tgg gcc acc - 3'
IIIa-r	5'- ggc agc agc gac aat agc - 3'
2. Schritt	
III-f	5'- acc cta acc ggt gct ttt - 3'
III-r	5'- aca ata gcc ttg ggc cta cc - 3'

Tabelle 3.11.: Primerliste CCHS, Quelle (Weese-Mayer et al. 2003)

3.3.4. Horizontale DNA–Elektrophorese im Agarosegel

Die verwendeten Puffer:

TBE (Tris–Borat–EDTA) 10–fach		TBE–Puffer 10–fach (pH 8,3)	
Tris	510 g	Borsäure (Sigma, Steinheim)	1 M
Borsäure	275 g	Tris–HCl (Sigma, Steinheim)	1 M
EDTA	37,2 g	EDTA (Sigma, Steinheim)	200 mM
H ₂ O bidest. ad	5.000 ml	H ₂ O bidest. ad	5.000 ml

(a) TBE–Buffer

(b) TBE–Puffer pH 8.3

Tabelle 3.12.: TBE–Puffer

Für die Elektrophorese wurden 200 ml 10–fach Puffer mit H₂O bidest. auf 2.000 ml aufgefüllt und mit 60 µl Etidium Bromid (10 mg/ml) versetzt.

DNA loading Buffer 6–fach	
Ficoll	6 g
TBE 10–fach	18,1 ml
Auf 30 ml mit H ₂ O bidest. auffüllen und mit Bromthymolblau einfärben.	

Tabelle 3.13.: DNA loading Buffer 6–fach

Prinzipien und Durchführung

Die DNA wird im horizontalen Agarosegel, gemäß ihrer Größe und Ladung, im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei hängt die Konzentration des Gels von der Größe der aufzutrennenden Fragmente ab. Aufgrund der geringen Fragmentgröße < 300 bp der zu erwartenden PCR Produkte wurden in dieser Arbeit überwiegend 3%ige Gele verwendet. Eine Ausnahme stellte die Amplifikation von Exon I und II des *PHOX2B* Gens dar, hier wurden bei einer zu erwartenden Fragmentgröße von über 600 bp 1%ige Gele verwendet. Die entsprechende Menge DNA–Agarose (Biozym Scientific, Hess. Oldendorf) wurde in 100 ml TBE Puffer mit Ethidiumbromid Zusatz bei ca. 50–60 °C vollständig aufgelöst und dann in eine horizontale Wanne von 10 cm Länge mit entsprechenden Kämmen gegossen. Das Gel polymerisierte bei Raumtemperatur.

Die DNA–Proben wurden mit Loading Buffer gemischt und, bei DNA–Präparationen aus dem Gel, ein Volumen bis zu 40 µl, ansonsten 10 µl in die Geltaschen aufgetragen. Es wurde zudem ein geeigneter Marker (1 kb Ladder; Invitrogen, Karlsruhe bzw. Marker V; Boehringer, Mannheim) mit aufgetragen. Die Fragmente wurden bei 100 V (10 V/cm Laufstrecke) und 80–120 mA aufgetrennt. Durch den Farbstoff Ethidiumbromid, das zwischen den Basensprossen der DNA–Helix interkaliert und bei UV–Anregung leuchtet, konnte die DNA unter UV–Licht (366 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Im Gelbild ließen sich Genprodukte verschiedener Größen erkennen. Bei einer heterozygot vorliegenden Expansion oder Deletion erkannte man den Wildtyp DNA Strang und den jeweils kürzeren oder längeren veränderten DNA Strang.

Die Größe des veränderten Fragmentes lies sich anhand des beigefügten Markers und im Vergleich mit dem Wildtyp abschätzen. Eine exakte Längenanalyse war, allein durch die Gelelektrophorese, noch nicht möglich.

Marker der DNA Größe

Zur Auswertung von Agarosegelen und ungefähren Bestimmung der Größe der erhaltenen DNA Stränge, wurden Gemische verschiedener DNA Stücke mit einer definierten Basenzahl verwendet.

Marker 1 kb	Invitrogen (Karlsruhe)
Marker V	Roche (Mannheim)

3.3.5. Isolierung von DNA–Fragmenten aus Agarosegelen

Um eine größtmögliche Reinheit des PCR Produktes für weitere Untersuchungsgänge zu erzielen, bestand die Möglichkeit, das elektrophoretisch aufgetrennte PCR Produkt selektiv aus dem Agarosegel zu isolieren.

Hierfür konnte auf ein vorgefertigtes Set zurückgegriffen werden (Qiaquick Gel Extraction Kit der Firma Quiagen, Hilden). Die in der PCR erhaltenen DNA–Fragmente wurden initial gelelektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Unter langwelligem UV–Licht (366 nm) konnten die

3.3 Methoden

Banden sichtbar gemacht und identifiziert werden. Mit einem sterilen Skalpell wurden die benötigten Banden ausgeschnitten. Nach dem Wiegen des Produktes fügte man das dreifache Probenvolumen an QG-Puffer zu und inkubierte den Ansatz für 10 Minuten bei 50 °C. Die Probe wurde sorgfältig vermischt und mit einem Gelvolumen Isopropanol versetzt. Nun konnte die Mischung zur Reinigung auf eine vorgefertigte Quiagen Quick-Spin Säule gegeben und zentrifugiert werden (10.000 U/min für 1 Minute). Der Überstand wurde verworfen. Im Anschluss erneutes Zugeben von 0,5 ml des QG-Puffers mit anschließendem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes. Nach Zugabe von 0,75 ml PE-Puffer auf die Säule und Zentrifugation wurde der Überstand letztmalig verworfen und die Probe abschließend nochmals zentrifugiert. Im Anschluss wurde die eluierte Probe bei 37 °C für 15 Minuten getrocknet.

3.3.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung des DNA Gehaltes einer Probe, bzw. zur Ermittlung des Ausmaßes einer bestehenden Protein- oder Salzkontamination, wurde die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmt. Dies erfolgt fotometrisch in einem Biofotometer (Eppendorf). Die Extinktion wurde bei 260 und 280 nm gemessen. Einer DNA Konzentration von 50 ng/µl entspricht die Extinktion 1,0 bei 260 nm Wellenlänge. Der ermittelte Quotient OD 260/280 ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA. Optimal liegt dieser Quotient zwischen 1,5 bis 1,9. Ein signifikant kleinerer Wert zeigt eine Verunreinigung an.

3.3.7. Fragmentlängenanalyse

Die Länge, der bei der Gel-Elektrophorese detektierten varianten Allele, kann durch die Methode der Fragmentlängenanalyse exakt bestimmt werden.

Die Fragmentlängenanalyse stellt eine Variante der Elektrophorese dar. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-Proben wandern, je nach Größe, unterschiedlich schnell durch das Gel, so dass sie zu unterschiedlichen Zeitpunkten einen Detektor zur Differenzierung der Fluoreszenzfarbstoffe erreichen. Die Lichtsignale werden in elektrische Signale umgewandelt. Jedes detektierte Fragment erscheint als Peak im Elektropherogramm. Die Länge der Fragmente wird über die Messung des Abstandes zwischen Ausgangspunkt und Peak des jeweiligen Fragmentes berechnet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten hierdurch die unterschiedlichen Längen von Wildtypfragmenten und mutierten Fragmenten (Expansionen oder Deletionen) nachgewiesen und quantifiziert werden.

Ansatz	
Puffer rot	5 µl
Betain	15 µl
Primer phox 2b PA(r)	1 µl
Primer phox 2b FAM (f)*	1 µl
Taq Polymerase	0,7 µl
dNTP	1 µl
Template	1 µl
H ₂ O	2,52 µl

*fluoreszenzmarkiert

Tabelle 3.14.: Ansatz Fragmentlängenanalyse

Programm		
Fragmentlängenanalyse	Temperatur (°C)	Zeit
I. Denaturierung initial	95	10 min
II. Denaturierung repeat	95	30 s
III. Annealing	59	30 s
IV. Elongation	72	30 s
V. Finale Elongation	72	10 min
Zyklen (II–IV)	35 mal	

Tabelle 3.15.: Programm Fragmentlängenanalyse

3.3.8. Sequenzierung des PCR-Produktes

Nach Gelelektrophorese und Fragmentlängenanalyse sind Expansionen oder Deletionen im Gen nachgewiesen. Eine Größenbestimmung ist möglich. Die Sequenzierung dient der Analyse der DNA-Primärstruktur, sie stellt im Anschluss eine basengenaue Analyse des PCR-Produktes dar. Zur Mutationsanalyse der im Rahmen des kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms überwiegend auftretenden Mutationen (Expansionen und Deletionen), sind die initial erläuterten Methoden (Gelelektrophorese, Fragmentlängenanalyse) grundsätzlich ausreichend. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit die Etablierung eines neuen Diagnoseweges angestrebt wurde, und zudem in der Literatur Veränderungen der Basensequenz durch Punktmutationen und Allelverluste bei der PCR aufgrund des GC-Reichtums des Genes berichtet werden, erfolgte zur Bestätigung und Absicherung der Ergebnisse zusätzlich die Sequenzierung des Genbereichs.

3.3.8.1. Grundlagen

Die Sequenzierreaktion beruht auf der, 1980 durch den Chemie Nobelpreis ausgezeichneten, Kettenabbruchmethode von Frederick Sanger (Sanger et al. 1977).

Grundprinzip der Methode ist eine PCR Reaktion. Die Reaktion enthält nur einen Primer, um eine Verlängerung nur eines komplementären DNA Stranges zu erreichen. Zusätzlich zu den normalerweise

3.3 Methoden

benötigten Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP) werden Dideoxynucleosidtriphosphate (ddNTP) zum Reaktionsansatz gegeben. Diesen fehlt die zur Elongation des neuen DNA Stranges benötigte 3′-OH Gruppe. Wird nach einer beliebigen Anzahl dNTPs ein ddNTP in den neuen Strang eingebaut, ist keine Verlängerung dieses Stranges mehr möglich, es kommt zum Kettenabbruch. Nach dem Zufallsprinzip entstehen somit unvollendete DNA Stränge verschiedener Länge, die jeweils ein ddNTP an ihrem Ende tragen. Die ddNTPs tragen, entsprechend der auf ihnen enthaltenen Base (A, T, C, G), Markierungen und offenbaren hierdurch die Base, an der ein Kettenabbruch erfolgte.

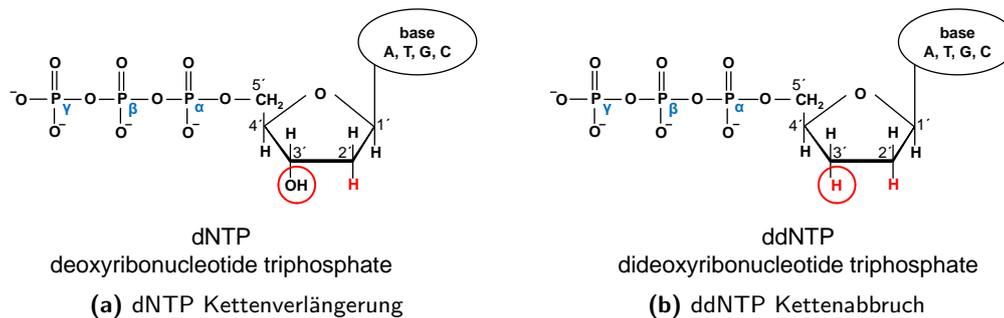


Abbildung 3.4.: dNTP Kettenverlängerung und ddNTP Kettenabbruch (Modifiziert nach Sanger et al. 1977)

Bei der ursprünglichen Methode nach Sanger et. al erfolgte diese Markierung radioaktiv. Der Reaktionsansatz musste, da eine Unterscheidung nicht möglich war, für jede Base einzeln durchgeführt und ausgewertet werden.

Seit Beginn der 90er Jahre ist die Markierung der Basen durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe möglich, Radioaktivität ist nicht mehr vonnöten. Zudem kann, durch die unterschiedlichen Farbstoffe, die Reaktion für die vier Basen gleichzeitig durchgeführt werden.

In der Auswertung werden die PCR Produkte elektrophoretisch aufgetrennt. Die Laufweite entspricht ihrer Länge. Die Farbe zeigt die Base, an der der Kettenabbruch erfolgte. Somit können die Basen zu ihrer Position auf dem DNA Strang in Beziehung gebracht werden. Die Basensequenz kann letztendlich abgelesen werden.

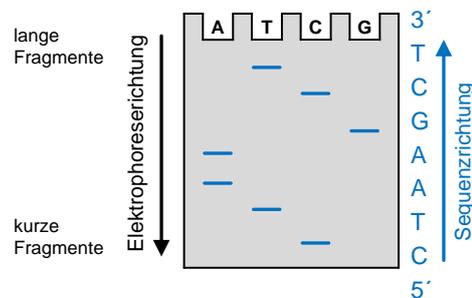


Abbildung 3.5.: Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte (Schema) nach www.uni-protokolle.de

Methode

In dieser Arbeit wurden mit Rhodamin–Farbstoffen markierte ddNTP’s (Rhodamin dye terminator Kit; Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet, wobei jede Base mit einer unterschiedlichen Farbe markiert ist. Es wurde jeweils nur ein Primer der vorherigen Amplifikation verwendet. Mit dieser Methode gelang es eine Länge von 500–600 bp in guter Qualität zu sequenzieren.

Sequenzieransatz		Programm		
Reagenz	Menge	Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (s)
Gereinigte DNA	1–2 µl	Denaturierung	96	15
Primer (10 µM)	1 µl	Annealing	53	15
Ready Reaction Mix	2 µl	Elongation	60	240
H ₂ O bidest.	ad 5 µl	Zyklusanzahl	30 mal	

(a) Sequenzieransatz

(b) Programm

Tabelle 3.16.: Sequenzieransatz und Programm

3.3.8.2. Präzipitation der DNA

Die Auswertung der Sequenz wurde als Auftragsarbeit durch die Firma Eurofins–Medigenomix durchgeführt, hierfür war eine vorherige Präzipitation der DNA erforderlich.

Die DNA wird zur Reinigung mit 0,1–fachem Volumen 3 M Na–O–Acetat (pH = 5,2) und 2,5–fachem Volumen 98%igem Ethanol in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit für 20 min gefällt, das Pellet vorsichtig mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen und durch eine achtminütige Zentrifugation auf den Boden eines Eppendorfgefäßes präzipitiert. Im Wärmeschrank wird das Präzipitat, nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes, 30 min bei 60 °C getrocknet.

Die Proben wurden auf einem 377 Sequenzer (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt) analysiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Chromas Lite der Firma Technelysium Pty Ltd., Australien.

3.3.8.3. Vorgehen

Initial wurden die in der Literatur genannten PCR Bedingungen in mehreren Versuchen optimiert. Insbesondere der Betaingehalt des Reaktionsansatzes wurde ermittelt. Durch Zugabe von Magnesiumionen ließen sich stabile Resultate erzielen.

Nach dem Erhalt einer Probe erfolgte die Präparation der DNA. Durch die PCR mit den entsprechenden Primern wurde initial der PA–Repeat des Exons III amplifiziert, da hier die häufigsten und wahrscheinlich krankheitstypischen Mutationen stattfinden.

3.3 Methoden

Im Gelbild konnten die ersten Hinweise auf eine Mutation erkannt werden. Das Vererbungsmuster der Mutation ist autosomal dominant. Im Falle der klassischen Mutation ließen sich im Gel zwei Banden (Wildtyp/Mutation) erkennen. Lag keine Mutation vor, entstand nur eine Bande der zwei sich überlagernden Wildtypallele.

Zeigte das Gelbild keine Mutation, so erfolgte die weitere Diagnostik entsprechend des klinischen Bildes. Bei klinisch gesunden Individuen (Eltern, Geschwister) beendeten wir die Diagnostik nach der gelelektrophoretische Darstellung des PA-Repeats des Exons III. Eine Sequenzierung des homozygoten Wildtypalles war, bei fehlendem klinischen Verdacht, nicht indiziert.

Beim Nachweis einer Mutation im Gelbild erfolgten die Fragmentlängenanalyse und im Anschluss, zum Ausschluss eines Allelverlustes im Rahmen der PCR Reaktion und Absicherung des Ergebnisses, die Sequenzierung der Region.

Bei dem einzigen Patienten der, trotz des hochgradigen klinischen Verdachts, keine Veränderung im Polyalaninrepeat des Exons III zeigte, erfolgte die Darstellung des gesamten Exon III im Gelbild, sowie zur Vollständigkeit ebenfalls die Amplifikation der Exone I und II. Abschließend wurde bei diesem Patienten die Sequenzierung der drei Exone durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Eine orientierende Aussage über eine PHOX2B Mutation im Polyalaninrepeat ist bereits nach Amplifikation und Gelbilddarstellung möglich

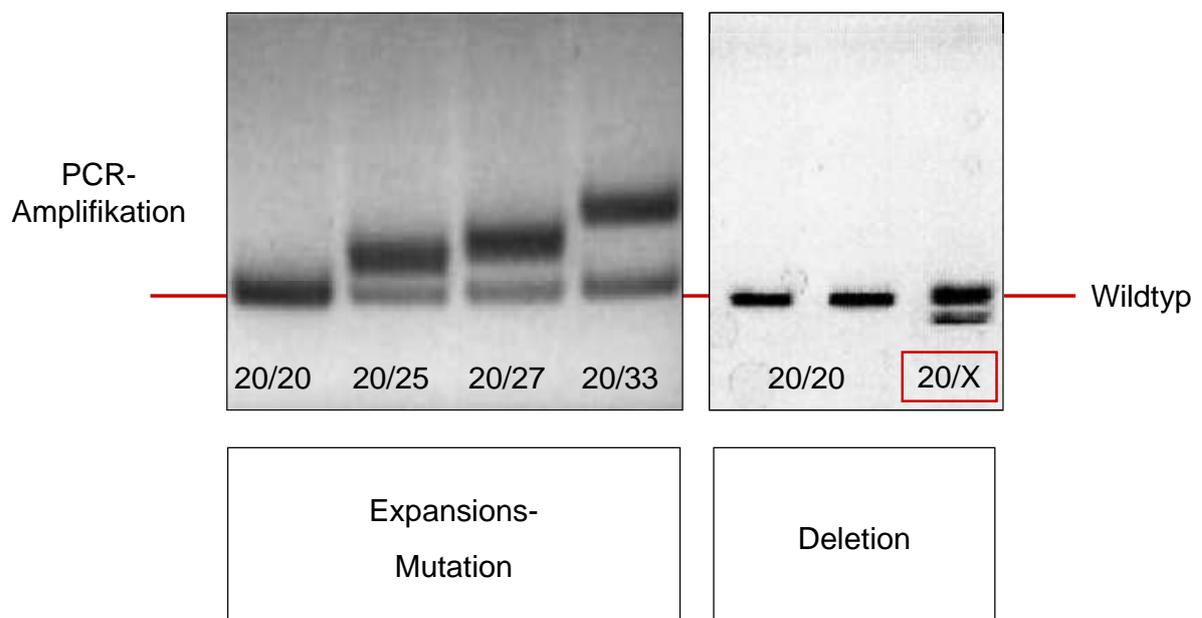


Abbildung 4.1.: Gelbild Amplifikation PA-Repeat *PHOX2B*, Rote Linie: Laufweite Wildtypallel 20 Alanine

4.2 Die Fragmentlängenanalyse eignet sich zur exakten Bestimmung der Größendifferenz zum Wildtypallel

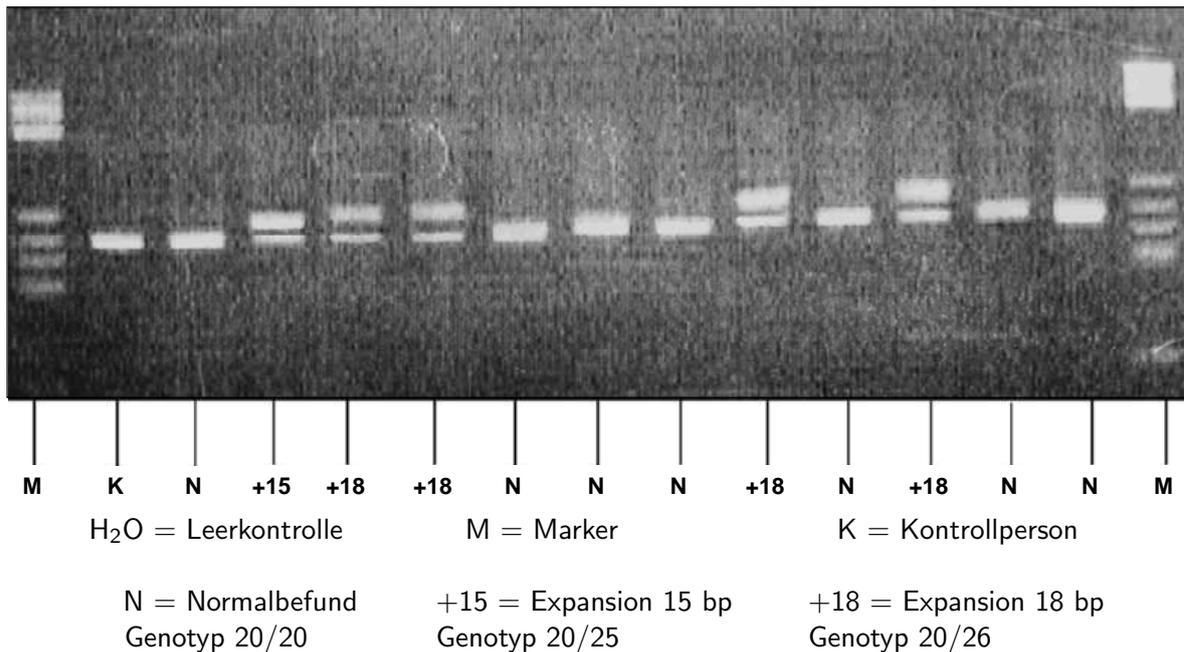


Abbildung 4.2.: *PHOX2B* PA-Repeat Amplifikation Befunde

Als schnellsten und durchaus richtungweisenden Befund, erhält man das Gelbild des in der PCR amplifizierten Genabschnittes. Besondere Bedeutung kommt hier der Amplifikation des PA-Repeats mit den Primern PA-r und PA-f zu. Im Rahmen dieser Amplifikation lassen sich in den meisten Fällen bereits die krankheitskausalen Veränderungen darstellen.

Die Mutation ist dominant, bereits im heterozygoten Zustand entwickelt sich das Vollbild der Erkrankung. Im Gelbild erkennt man das unveränderte Wildtyp-Allel, codierend für 20 Alanine. Im homozygoten Wildtyp (20/20), dem „gesunden“ Zustand, ergibt sich, durch die Überlappung der beiden gleichgroßen Genabschnitte, letztendlich nur eine sichtbare Bande. Bei heterozygoten Patienten erkennt man, neben dem Wildtyp-Allel, eine zweite Bande. Diese entsteht durch das mutierte Allel mit entsprechend mehr oder weniger genetischem Material. Aus den verschiedenen Größen des PCR Produktes resultiert in der Gelelektrophorese eine veränderte Laufweite. Der Abstand zur Wildtyp Bande gibt einen Hinweis auf die Größe der zugrundeliegenden Expansion oder Deletion. In unserem Patientengut erhielten wir ein Mutationsspektrum von einer 17 bp-Deletion mit Verschiebung des Leserasters bis zu einer 39 bp-Expansion.

4.2. Die Fragmentlängenanalyse eignet sich zur exakten Bestimmung der Größendifferenz zum Wildtypallel

Zur Bestimmung der Längendifferenz heterozygoter Allele eignete sich die Fragmentlängenanalyse. Die fluoreszent markierten PCR Produkte wurden, zusammen mit entsprechenden Größenmarkern, in ein ABI 377 DNA Sequenziergerät gegeben. Die Auswertung der Fluoreszenzpeaks zeigt die

Differenz in der Länge der PCR Fragmente. Diese Evaluationsmethode verfeinert und untermauert die aus dem Gelbild getroffenen Vermutungen. Das Mutationsspektrum von der 17 bp–Deletion bis zu 39 bp–Expansion wird bestätigt.

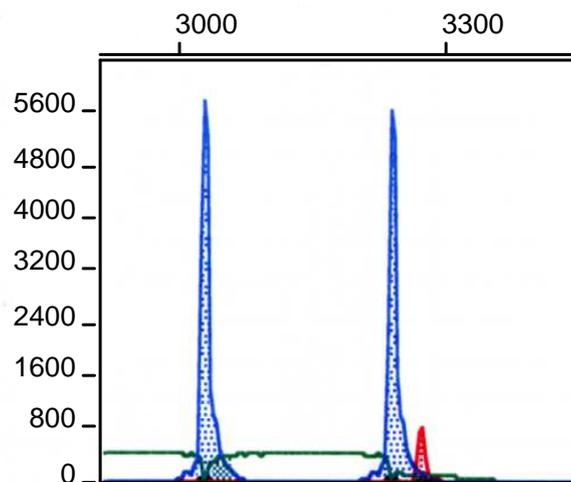


Abbildung 4.3.: Fragmentlängenanalyse einer 15 bp–Expansion

4.3. Allelverluste werden durch PCR Sequenzierung ausgeschlossen

Im Rahmen der PCR kann es zu einem Allelverlust kommen. Zum Ausschluss dieser Möglichkeit wurde die DNA jedes Patienten mit klinischem Verdacht auf das Vorliegen eines CCHS, unabhängig von Gelbefund und Fragmentlängenanalyse, sequenziert. In heterozygot vorliegenden Genen bestätigte der Erhalt zweier überlappender Sequenzierungsbanden, mit übereinstimmenden Gensequenzen vor bzw. nach der Mutation, die regelrechte Amplifikation beider Allele, sowie das Ausmaß und die Lokalisation der Mutation.

4.3 Allelverluste werden durch PCR Sequenzierung ausgeschlossen

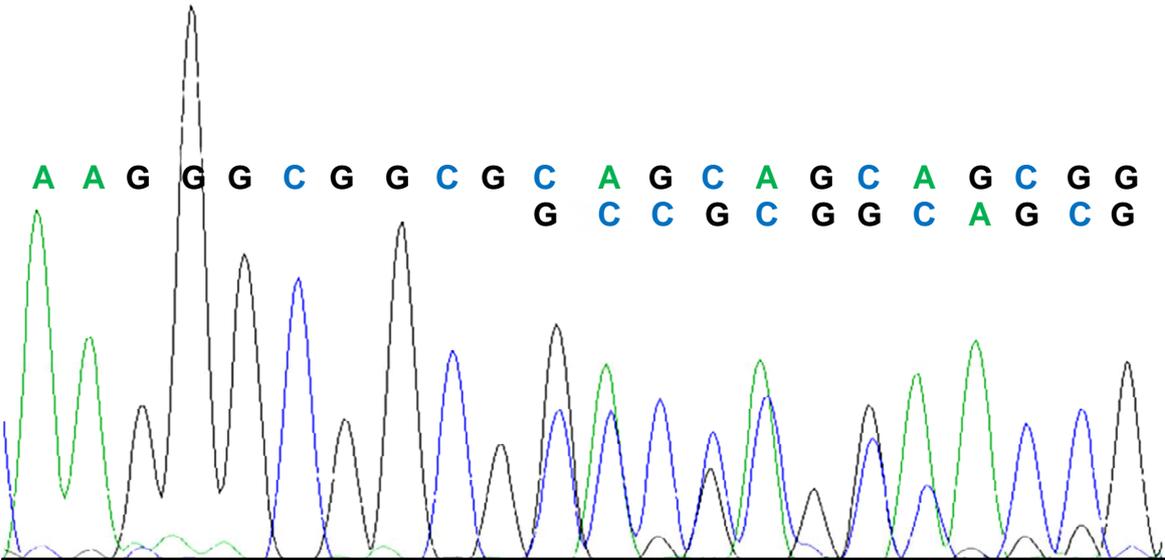


Abbildung 4.4.: Sequenzierreaktion mit Mutation (Doppelgipfel)

5. Patienten

5.1. Indexpatient D 17.1 mit einer 17 bp–Deletion (Frameshift Mutation)

Indexpatient D 17.1	17 bp–Deletion
Alter bei Symptombeginn	Geburt
Tracheostoma	●
24 h Beatmung	●
Nächtliche Beatmung	●
Kardiale Symptome	●
Gastrointestinale Symptome	●
ZNS Symptome	●
Tumore	○
Max. pCO ₂ (mmHg)	110

Tabelle 5.1.: Indexpatient D 17.1 mit einer 17 bp–Deletion

Klinische Angaben

Der Patient D 17.1 ist ein männliches Frühgeborenes der 32 Schwangerschaftswoche. Aufgrund eines auffälligen CTGs erfolgte die Geburt durch primäre Sectio cesarea. Das Geburtsgewicht betrug 1.900 g. Die Primäradaptation erfolgte verzögert, aufgrund einer respiratorischen Insuffizienz musste der Junge im Rahmen der Erstversorgung intubiert und beatmet werden. Ein Entwöhnen von der Beatmung war im weiteren klinischen Verlauf nicht möglich. Im Alter von drei Monaten wurde ein Tracheostoma angelegt.

Der durchgeführte Hyperkapnietest war pathologisch.

5.1 Indexpatient D 17.1 mit einer 17 bp-Deletion (Frameshift Mutation)

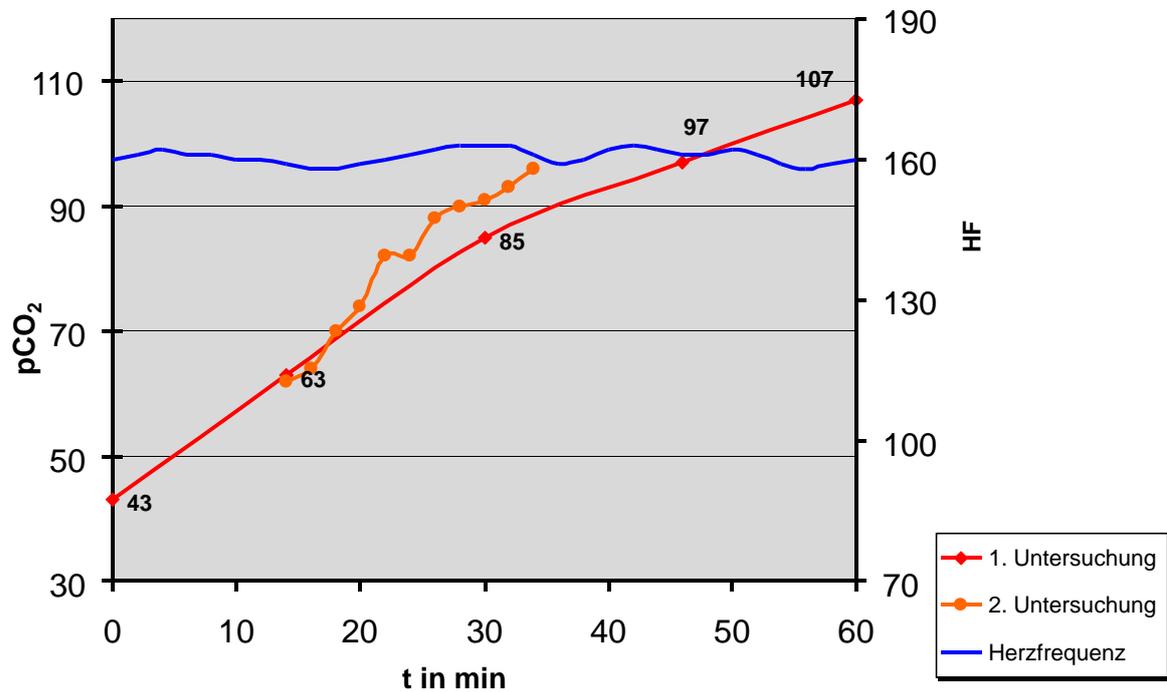


Abbildung 5.1.: Patient D 17.1 Hyperkapnietest Befunde, erkennbar ist der stabile Herzfrequenzverlauf trotz ansteigender CO₂-Werte, Zeichen der Atemnot (Aufregung, Agitation) treten nicht auf

Nach Präoxigenierung des Kindes und Pausierung der Atemhilfe wurde ein Anstieg des pCO₂ bis 100 mmHg beobachtet, ohne dass der Junge eine Änderung der Atemzugtiefe oder Atemfrequenz zeigte. Auch die Herzfrequenz blieb im Rahmen dieses Tests unverändert.

Es bestanden weitere Symptome.

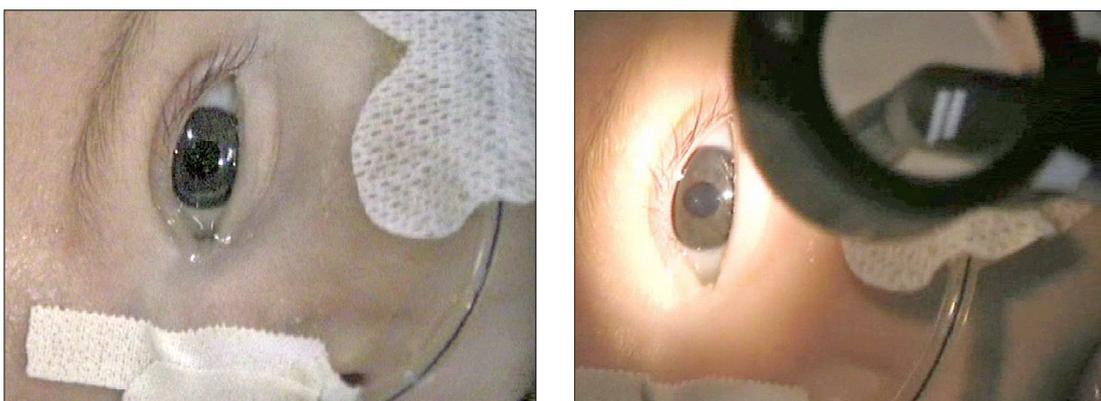


Abbildung 5.2.: Patient D 17.1, fehlende Pupillenreaktion auf Lichteinfall

Die Pupillen waren beständig mittelweit und zeigten keine Reaktion auf Lichteinfall. Intermittierende zerebrale Krampfanfälle werden beschrieben, im EEG zeigen sich vereinzelte Epilepsietypische Potentiale.

Orale Nahrungszufuhr wurde nicht toleriert. Radiologisch zeigte sich ein verzögerter Kontrastmitteltransport. Kontrastmittel war noch 14 Tage nach der Untersuchung im Darm nachweisbar. Biopsien aus verschiedenen Darmbereichen (Dünn- und Dickdarm) zeigten eine komplette Aganglionose der Submucosa und des intramuralen Plexus. Es wurden keine Acetylcholin positiven Nervenendigungen, wie sie für Morbus Hirschsprung typisch wären, gefunden. Im Magen fand sich eine regelrechte Ganglienzellenlokalisation. Die Anlage eines Ileostomas war erforderlich, die Ernährung erfolgte rein parenteral. Hämodynamisch blieb der Patient stabil, zeigte jedoch therapierefraktäre stark schwankende Blutdruckwerte. Eine erhöhte Katecholaminausscheidung im Urin oder eine Durchblutungsstörung der Nierenarterien konnte ausgeschlossen werden, die Ursache der Blutdruckschwankungen konnte nicht geklärt werden. Eine Assoziation zu den Störungen des autonomen Nervensystems im Rahmen des CCHS wird vermutet. Der Junge verstarb im Alter von einem Jahr. Tumore aus Neuralleistenzellen konnten nicht beobachtet werden. Zusammenfassend handelt es sich bei diesem Patienten, bereits nach dem klinischen Aspekt, um ein schwer ausgeprägtes Vollbild des CCHS mit mehreren assoziierten Symptomen. Betroffen sind neben der Atmung insbesondere der Gastrointestinaltrakt, das ZNS mit Krampfanfällen und fehlender Lichtreaktion der Pupillen, sowie die Blutdrucksteuerung.

Die laborchemische Untersuchung zeigte eine Deletion im Exon 3 des *PHOX2B* Gens (721del17). Die Deletion von 17 Basenpaaren führt zu einer kompletten Verschiebung des aus Triplets bestehenden Leserasters des genetischen Codes (Frameshift). Im mutierten Allel wird kein Polyalaninrepeat gebildet. Die folgende Aminosäuresequenz ist vollständig von der Wildtypsequenz verschieden. Ein normalerweise nach 314 Triplets auftretendes Stop-Codon fehlt, bzw. tritt erst wesentlich später auf. Das gebildete Nonsens-Protein weist eine Länge von 352 Aminosäuren auf. Die Eltern, sowie ein männliches Halbgeschwister des Jungen, weisen keine Mutation im untersuchten Bereich auf. Der Fall des Patienten wurde veröffentlicht (Holzinger et al. 2005).

Die laborchemische Untersuchung zeigte eine Deletion im Exon 3 des *PHOX2B* Gens (721del17). Die Deletion von 17 Basenpaaren führt zu einer kompletten Verschiebung des aus Triplets bestehenden Leserasters des genetischen Codes (Frameshift). Im mutierten Allel wird kein Polyalaninrepeat gebildet. Die folgende Aminosäuresequenz ist vollständig von der Wildtypsequenz verschieden. Ein normalerweise nach 314 Triplets auftretendes Stop-Codon fehlt, bzw. tritt erst wesentlich später auf. Das gebildete Nonsens-Protein weist eine Länge von 352 Aminosäuren auf. Die Eltern, sowie ein männliches Halbgeschwister des Jungen, weisen keine Mutation im untersuchten Bereich auf. Der Fall des Patienten wurde veröffentlicht (Holzinger et al. 2005).

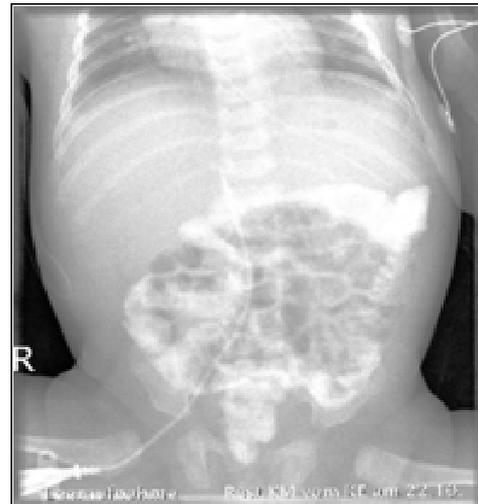


Abbildung 5.3.: Pat. D 17.1 Abdomen–Leeraufnahme, Kontrastmittel im Darm von 14 Tage zurückliegender Untersuchung nachweisbar

5.2. Patientin E 18.1

Patientin E 18.1	18 bp–Expansion
Alter bei Symptombeginn	Geburt
Tracheostoma	○
24 h Beatmung	○
Nächtliche Beatmung	○
Kardiale Symptome	○
Gastrointestinale Symptome	○
ZNS Symptome	●
Tumore	○
Max. pCO ₂ (mmHg)	120

Tabelle 5.2.: Patientin E 18.1 mit einer 18 bp–Expansion

Das Mädchen wurde reif geboren, die Schwangerschaft verlief, bis auf ein Polyhydramnion, unauffällig. Die Geburt erfolgte durch Sectio in der 40. Schwangerschaftswoche. Im Rahmen der Erstversorgung kam es zum verzögerten Einsetzen der Eigenatmung, bei persistierenden Apnoen erfolgte die tracheale Intubation des Mädchens in den ersten Lebensminuten. Im weiteren Verlauf bestand, für die ersten sieben Lebenswochen, die Notwendigkeit der mechanischen Ventilation. In der achten Lebenswoche war die Extubation des Mädchens möglich. In den Blutgasanalysen zeigten sich schwankende pCO₂ Werte zwischen 40 und 120 mmHg, wobei die erhöhten Werte in Ruhe und Schlafphasen beobachtet wurden. Im Rahmen der Hyperkapniephasen kam es zu keinem erhöhten Sauerstoffbedarf. Zerebrale Krampfanfälle, mit dem Nachweis multifokaler sharp waves im EEG, sistierten unter Valproattherapie. Die durchgeführte erweiterte Diagnostik (MRT des Schädels, Thorax und Abdomens, UKG, Stoffwechselfeldiagnostik) zeigte altersentsprechende Normalbefunde. Zusammenfassend handelt es sich, aufgrund des klinischen Bildes, um ein eher milde ausgeprägtes CCHS, ohne die Notwendigkeit einer dauerhaften Beatmung im Säuglingsalter. Neben den zerebralen Krampfanfällen werden keine weiteren assoziierten Symptome beschrieben.

In der molekulargenetischen Untersuchung zeigte sich eine heterozygote 18 bp–Expansion im Bereich des Polyalaninrepeats des *PHOX2B* Gens. Bei dieser In–Frame–Mutation kommt es zu keiner Verschiebung des Leserasters. Das gebildete Protein weist sechs zusätzliche Alanine auf. Die Untersuchung der genomischen DNA der Eltern erbrachte keine Auffälligkeiten im Polyalaninrepeat.

5.3. Patientin E 18.2

Patientin E 18.2	18 bp–Expansion
Alter bei Symptombeginn	Geburt
Tracheostoma	●
24 h Beatmung	○
Nächtliche Beatmung	●
Kardiale Symptome	○
Gastrointestinale Symptome	●
ZNS Symptome	●
Tumore	○
Max. pCO ₂ (mmHg)	> 100

Tabelle 5.3.: Patientin E 18.2 mit einer 18 bp–Expansion

Die Geburt erfolgte nach unauffälliger Schwangerschaft. Apgar 6/8/3 nach 1, 5 und 10 Minuten. Die respiratorische Adaptation verlief verzögert, es ergab sich keine ausreichende Eigenatmung. Das Mädchen wurde rezidivierend maskenbeatmet und nach der ersten Lebensstunde tracheal intubiert. Der Hyperkapnietest war pathologisch, im Schlaf zeigten sich pCO₂ Werte > 100 mmHg, ohne Einsetzen der Eigenatmung. Ein Tracheostoma wurde angelegt, nächtliche Beatmung war erforderlich. In Wachphasen zeigte das Kind eine suffiziente Eigenatmung. Rezidivierendes Erbrechen wird berichtet, das Kind ist jedoch vollständig enteral ernährbar. Die Otoakustischen Emissionen sind beidseits pathologisch, der Säugling zeigt eine verstärkte Tränensekretion, bei sonst unauffälligem ophthalmologischem Befund. Ein MRT des Schädels zeigte einen altersentsprechenden Normalbefund.

Im EKG besteht ein Linkstyp, ansonsten keine weiteren Auffälligkeiten. Eine Bronchoskopie zeigt einen Normalbefund.

In der molekulargenetischen Untersuchung zeigte sich eine heterozygote 18 bp–Expansion im Bereich des Polyalaninrepeats des *PHOX2B* Gens.

5.4. Patientin E 18.3

Patientin E 18.3	18 bp–Expansion
Alter bei Symptombeginn	Geburt
Tracheostoma	●
24 h Beatmung	○
Nächtliche Beatmung	●
Kardiale Symptome	●
Gastrointestinale Symptome	●
ZNS Symptome	● (Fehlbildung)
Tumore	○
Max. pCO ₂ (mmHg)	> 150

Tabelle 5.4.: Patientin E 18.3 mit einer 18 bp–Expansion

Die Geburt des Mädchens erfolgte in der 32+5 Schwangerschaftswoche, nach einer durch ein Polyhydramnion komplizierten Schwangerschaft. Die postpartale Adaptation erfolgte verzögert, eine Intubation des Kindes wurde in der zweiten Lebensminute durchgeführt. Apgar Werte 2/2/4 nach 1, 5 und 10 Minuten. Im weiteren Verlauf erwies sich das Mädchen, insbesondere im Schlaf, als beatmungsabhängig. Auch in Wachphasen war intermittierend eine Beatmung erforderlich. Hyperkapniephasen mit pCO₂-Werten von über 150 mmHg wurden berichtet. Ein Tracheostoma wurde angelegt. Das Kind ist vollständig enteral ernährt, in der radiologischen Diagnostik zeigten sich jedoch eine Neigung zur Aspiration des Kontrastmittels, sowie eine pathologische, teils retrograd gerichtete Ösophagusperistaltik bei noch leerem Magen. Der Ösophagus erschien in seiner Gesamtheit hypoton. Hinweise auf weitere gastrointestinale Fehlbildungen bestanden nicht, Biopsien liegen nicht vor. Im MRT des Schädels zeigten sich eine Kleinhirnwurmhypoplasie, sowie eine Erweiterung der Cisterna magna. Aufgrund einer Asystolie im Rahmen einer Narkose, wurde, im Alter von drei Jahren, ein Langzeit EKG durchgeführt. Bei auftretenden Pausen bis zu 15 Sekunden, wurde die Indikation zur Schrittmacherimplantation gestellt.

In der molekulargenetischen Untersuchung zeigte sich eine heterozygote 18 bp–Expansion im Bereich des Polyalaninrepeats des *PHOX2B* Gens. Die Untersuchung der genomischen DNA der Eltern erbrachte keine Auffälligkeiten im Polyalaninrepeat.

5.5. Patientin E 18.4

Patientin E 18.3	18 bp-Expansion
Alter bei Symptombeginn	k. A.
Tracheostoma	●
24 h Beatmung	○
Nächtliche Beatmung	●
Kardiale Symptome	k. A.
Gastrointestinale Symptome	k. A.
ZNS Symptome	k. A.
Tumore	k. A.
Max. pCO ₂ (mmHg)	k. A.

Tabelle 5.5.: Patientin E 18.4 mit einer 18 bp-Expansion

Die Patientin ist tracheostomaversorgt. Eine Beatmungspflichtigkeit besteht nachts. Weitere Informationen liegen nicht vor. In der molekulargenetischen Untersuchung zeigte sich eine heterozygote 18 bp-Expansion im Bereich des Polyalaninrepeats des *PHOX2B* Gens.

5.6. Patient E 21.1

Patient E 21.1	21 bp-Expansion
Alter bei Symptombeginn	Geburt
Tracheostoma	●
24 h Beatmung	○
Nächtliche Beatmung	●
Kardiale Symptome	●
Gastrointestinale Symptome	○
ZNS Symptome	●
Tumore	○
Max. pCO ₂ (mmHg)	> 100

Tabelle 5.6.: Patient E 21.1 mit einer 21 bp-Expansion

Der Junge wurde in der 39. Schwangerschaftswoche spontan entbunden. Die Schwangerschaft verlief, bis auf ein erhebliches Polyhydramnion, unauffällig. Die respiratorische Adaptation verlief verzögert. Apgar Werte 6/6/7 in der 1., 5. und 10. Lebensminute. Das Kind zeigte, trotz Maskenbeatmung und erheblicher Stimulation, keine ausreichende Erholung. Die Intubation erfolgte in der ersten Lebensstunde. Im weiteren Verlauf zeigte der Junge, nach Extubationsversuchen, eine im Wachzustand ausreichende Spontanatmung. Nach dem Einschlafen kam es zum Abflachen der Atmung mit Hyperkapnieepisoden > 100 mmHg. Eine Methylxanthintherapie zeigte keinen Effekt. Die Anlage eines Tracheostomas war erforderlich.

5.7 Patient E 21.2

Es bestand eine ausgeprägte arterielle Hypotension, der Junge war bis zum dritten Lebenstag katecholaminpflichtig (Dobutamin).

Ein MRT des Schädels ergab, bei normaler Anatomie, fragliche Hinweise auf eine ältere Blutung im Bereich des Tentoriums, zudem ebenfalls fragliche und sehr diskrete Signalanhebungen im Bereich des Hypothalamus. Auffällig ist weiterhin eine Signalanhebung im Bereich der Hypophyse. Normale Markreifungsprozesse konnten vom beurteilenden Radiologen nicht ausgeschlossen werden. Der Junge zeigte, neben einer rumpfbetonten Verminderung des Muskeltonus, noch auffällige EEG Befunde mit Amplitudenminderung rechts zentro-parietal, Epilepsietypische Potentiale konnten nicht nachgewiesen werden. Die Okulomotorik war intakt. Auftretende Hypoglycämieepisoden machten in den ersten Lebenstagen eine intravenöse Glucosesubstitution erforderlich, sistierten aber im Verlauf spontan.

In der genetischen Untersuchung konnten wir eine 21 bp-Expansion nachweisen. Diese resultiert in einer Verlängerung des Polyalaninrepeats von 7 Alaninen.

5.7. Patient E 21.2

Patient E 21.2	21 bp-Expansion
Alter bei Symptombeginn	Geburt
Tracheostoma	k. A.
24 h Beatmung	k. A.
Nächtliche Beatmung	k. A.
Kardiale Symptome	k. A.
Gastrointestinale Symptome	k. A.
ZNS Symptome	k. A.
Tumore	k. A.
Max. pCO ₂ (mmHg)	k. A.

Tabelle 5.7.: Patient E 21.2 mit einer 21 bp-Expansion

Von diesem Patienten erhielten wir aus der Geburtsklinik nur die Einsendung des genetischen Materials. Weitere Informationen zum klinischen Krankheitsverlauf liegen uns nicht vor.

In der molekulargenetischen Untersuchung zeigte sich eine heterozygote 21 bp-Expansion im Bereich des Polyalaninrepeats des *PHOX2B* Gens. Die Untersuchung der genomischen DNA der Eltern erbrachte keine Auffälligkeiten im Polyalaninrepeat.

5.8. Patientin E 17.1 mit einer 17 bp–Expansion (Frameshift Mutation)

Patientin E 17.1	17 bp–Expansion
Alter bei Symptombeginn	Geburt
Tracheostoma	○
24 h Beatmung	○
Nächtliche Beatmung	○
Kardiale Symptome	○
Gastrointestinale Symptome	○
ZNS Symptome	○
Tumore	○
Max. pCO ₂ (mmHg)	60

Tabelle 5.8.: Patientin E 17.1 mit einer 17 bp–Expansion

Das Mädchen wurde mit 36+3 Schwangerschaftswochen durch primäre Sectio caesarea bei Placenta prævia entbunden. Das Kind zeigte postpartal eine unregelmäßige Spontanatmung. Eine pharyngeale Beatmung war zur Stabilisierung des Atemmusters nicht ausreichend, das Mädchen wurde am zweiten Lebenstag intubiert. Ein Entwöhnen von der Beatmung war nur zögerlich möglich, die Extubation erfolgte am achten Lebenstag. Weiterhin bestanden häufige und tiefe Sättigungsabfälle im Tiefschlaf. Eine Therapie mit Coffein reduzierte, nach klinischem Eindruck, die Häufigkeit der Sättigungsabfälle. Auffällig blieb ein ausgeprägt periodisches Atemmuster. Die Verdachtsdiagnose eines CCHS wurde ausgesprochen. Nach Extubation zeigte sich in den kapillären Blutgasen bei ausgeglichenem pH ein pCO₂ von 55 mmHg. Die Anlage eines Tracheostomas war nicht erforderlich, das Kind wurde im Alter von sechs Wochen mit einem Heimmonitor und Heimsauerstoff nach Hause entlassen. Die respiratorische Komponente des CCHS erscheint nur milde ausgeprägt. Über den weiteren Verlauf, eine eventuell auftretende Beatmungspflichtigkeit im Infektfall, liegen keine Informationen vor. Die genetische Untersuchung zeigt eine Expansion von 17 Basenpaaren (721dup17). Die Duplikation von 17 Basenpaaren führt, ähnlich wie bei unserem Indexpatienten, zu einer kompletten Verschiebung des aus Triplets bestehenden Leserasters des genetischen Codes (Frameshift). Da es durch die Duplikation zu einem vorzeitigen Auftreten eines Stop–Codons kommt, ist, im Gegensatz zum Indexpatienten, das resultierende Protein nur 313 Aminosäuren lang.

5.9. Patient mit CCHS und Neuroblastom

Patient Neuroblastom	Keine Mutation nachweisbar
Alter bei Symptombeginn	Geburt
Tracheostoma	●
24 h Beatmung	○
Nächtliche Beatmung	●
Kardiale Symptome	●
Gastrointestinale Symptome	○
ZNS Symptome	●
Tumore	○
Max. pCO ₂ (mmHg)	> 100

Tabelle 5.9.: Patient Neuroblastom

Der Junge wurde am Termin, nach einer unauffälligen Schwangerschaft, geboren. In der sechsten Lebensstunde war, aufgrund einer schweren Apnoeepisode, die Intubation erforderlich. Ausgeprägte Hypoventilationsepisoden mit Hyperkapnie von > 100 mmHg, machten ein Entwöhnen von der Beatmung unmöglich. Ein Tracheostoma wurde im Alter von zwei Monaten angelegt. Die Beatmung war auch tagsüber erforderlich. Im Alter von sechs Monaten konnte der Junge für 45 Minuten ohne Atemhilfe stabile Sättigungswerte erzielen. Bereits in der ersten Lebenswoche, wurde eine totale Aganglionose des Colons symptomatisch. Eine enterale Ernährung des Säuglings war nicht möglich. Der Junge zeigte weitere Symptome aus dem Formenkreis der Neurocristopathien. In der ophthalmologischen Untersuchung fiel eine Anisocorie mit erweiterten, nicht auf Licht reagierenden Pupillen auf. Der Augenschluss war unsymmetrisch, es bestand eine Ptosis des rechten Augenlides. Weiterhin wurde ein profuses Schwitzen des Säuglings beschrieben. Im Alter von fünf Monaten wurde ein schlecht differenziertes, abdominell gelegenes Neuroblastom diagnostiziert. Im PET-Scan zeigte sich eine beidseitig paravertebral und im Bereich der Nebennieren lokalisierte Tumormasse. Auch der rechte Lungenunterlappen war involviert. Aufgrund einer pränatal sonographisch gesehenen Urethererweiterung, wurde ein Bestehen des Tumors bereits zum Zeitpunkt der Geburt vermutet. Eine neoadjuvante Chemotherapie mit verschiedenen Schemata, konnte keine Reduktion der Tumormasse erreichen, zeitweise kam es unter der Chemotherapie zu einer starken Größenzunahme des Tumors. Rezidivierende septische Krankheitsbilder komplizierten den Verlauf und schlossen eine operative Tumorreduktion aus. Mit den Eltern wurde, angesichts der schlechten Prognose und der hohen Morbidität des Kindes, eine Therapiezieländerung vereinbart. Eine palliative Therapie des Jungen wurde begonnen. Er verstarb im Alter von 11 Monaten im Rahmen einer Sepsis. Der klinische Verlauf des Kindes wurde in der Literatur veröffentlicht (Rohrer et al. 2002). Zusammenfassend handelt es sich um ein schwer ausgeprägtes congenitales zentrales Hypoventilationssyndrom, mit typischen assoziierten Symptomen einer Dysfunktion des autonomen Nervensystems. Hinzu kommt das frühe Auftreten eines therapieresistenten Neuroblastoms.

Der Patient zeigte im Gelbild nach Amplifikation des PA–Repeats einen Normalbefund. Aufgrund des klinisch eindeutigen CCHS erfolgte initial die Sequenzierung des Exons III und anschließend, bei ebenfalls unauffälligem Ergebnis, die Sequenzierung der Exone I und II des *PHOX2B* Gens. In der genetischen Untersuchung konnte von uns, trotz des klassischen und schwer ausgeprägten Verlaufes, bislang keine Mutation im *PHOX2B* Gen nachgewiesen werden, eine weitere Diagnostik ist angestrebt.

5.10. Familiäre Fälle

5.10.1. Familie E 15

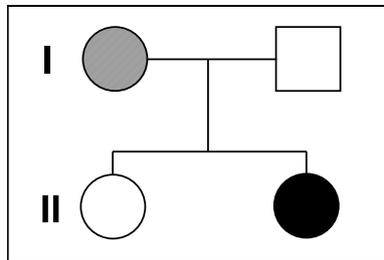


Abbildung 5.4.: Stammbaum Familie E 15, klinisch gesunde Mutter Genotyp 20/25, Tochter mit Vollbild CCHS Genotyp 20/25

5.10.1.1. Familie E 15.II – Betroffene Tochter

Fam E 15.II (Tochter)	15 bp–Expansion
Alter bei Symptombeginn	7 Stunden
Tracheostoma	○
24 h Beatmung	○
Nächtliche Beatmung	im Infekt ●
Kardiale Symptome	○
Gastrointestinale Symptome	●
ZNS Symptome	●
Tumore	○
Max. pCO ₂ (mmHg)	> 110

Tabelle 5.10.: Familiärer Fall E 15.II (Tochter)

Das Mädchen ist das zweite Kind einer klinisch gesunden 25-jährigen Mutter. Nach unauffälliger Schwangerschaft erfolgte die Spontangeburt am Termin. Postpartal wurde das Mädchen als schlapp beschrieben, die Primäradaption verlief ansonsten jedoch unauffällig. Apgar 8/9/10 nach 1, 5 und 10 Minuten. Im Alter von 7 Stunden kam es zum Auftreten einer Zyanosepisode. Im weiteren Verlauf fielen eine zeitweise sehr flache Atmung und kapilläre pCO₂-Werte von > 110 mmHg auf. Die weitere Diagnostik erbrachte Hinweise auf das Vorliegen einer Achalasie des Ösophagus sphinkters

5.10 Familiäre Fälle

mit rezidivierenden Refluxepisoden. Die Pupillen wurden als sehr miotisch beschrieben. Das Kind zeigte eine ausgeprägte Apnoereaktion auf jegliche Art sedierender Medikamente. Das Mädchen benötigte keine kontinuierliche Beatmung, die nächtliche Hypoventilation wurde bei stabilen $p\text{CO}_2$ -Werten von 50–60 mmHg toleriert. Im Infekt ist eine CPAP Beatmung erforderlich. Zur Prophylaxe einer pulmonalen Hypertension wird eine nächtliche CPAP Beatmung erwogen. In der genetischen Untersuchung zeigt das Kind eine klassische heterozygote 15bp-Expansion im PA-Repeat des *PHOX2B* Gens.

5.10.1.2. Familie E 15.I – Klinisch gesunde Mutter

Fam E 15.I (Mutter)	15 bp-Expansion
Alter bei Symptombeginn	keine Symptome
Tracheostoma	○
24 h Beatmung	○
Nächtliche Beatmung	○
Kardiale Symptome	○
Gastrointestinale Symptome	○
ZNS Symptome	○
Tumore	○
Max. $p\text{CO}_2$ (mmHg)	normal

Tabelle 5.11.: Familiärer Fall E 15.I (Mutter)

In der genetischen Untersuchung der Eltern zeigte sich die asymptomatische Mutter des Mädchens ebenfalls heterozygot für die 15bp-Expansion im PA-Repeat des *PHOX2B* Gens. Um eine Verunreinigung auszuschließen, baten wir um eine zweite Einsendung mütterlichen Blutes, auch hier bestätigte sich der Befund.

Eine detaillierte Schlafmedizinische Untersuchung der Mutter wurde veranlasst.

Im Schlafmuster zeigte sich eine etwas erhöhte Fragmentation des Schlafes, mit vermehrtem Auftreten von Wachepisoden, sonst ergaben sich keine pathologischen Befunde. Hypoventilationsepisoden sind nicht aufgetreten. Die Sauerstoffsättigung der Mutter lag im unteren Normbereich. Eine gastrointestinale Beteiligung kann bei der Mutter nicht festgestellt werden. Auch weitere Organsysteme sind nicht betroffen. Der Vater des Mädchens und die ältere Schwester weisen im Bereich des PA-Repeats einen Normalbefund auf.

5.10.2. Familie E 39 – Zwei betroffene Töchter

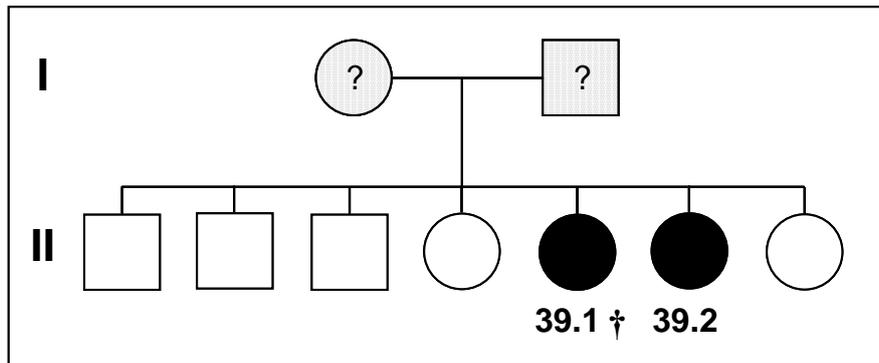


Abbildung 5.5.: Stammbaum Fam. E 39, zwei betroffene Töchter, V. a. elterliches Keimbahnmosaik, mütterlicher oder väterlicher Ursprung nicht geklärt

Gesunden Eltern wurden, im Abstand eines Jahres, zwei Kinder mit CCHS-Symptomatik geboren. Die Familie hatte bereits vier Kinder, drei gesunde Buben, ein gesundes Mädchen. Das ältere betroffene Mädchen wurde als fünftes Kind der Familie geboren. Die Geburt erfolgte spontan am errechneten Geburtstermin. Direkt postpartal zeigte das Kind eine insuffiziente Eigenatmung und musste intubiert werden. Im weiteren Verlauf war eine kontinuierliche Beatmung des Kindes erforderlich, ein Tracheostoma wurde angelegt. Ein Entwöhnen von der Beatmung war auch tagsüber nicht möglich. Assoziierte Symptome aus dem Formenkreis der Neurocristopathien sind nicht aufgetreten. Die ausführliche Diagnostik erbrachte keine pathologischen Befunde, die die respiratorische Insuffizienz erklären konnten. Das ein Jahr jüngere, sechste Kind der Familie, ebenfalls ein Mädchen, ist auch von CCHS betroffen. Der Krankheitsverlauf beider Kinder verlief annähernd gleich ausgeprägt. Beide Kinder wurden heimbeatmet entlassen und in Pflegefamilien betreut. Das ältere Mädchen verstarb im Alter von fünf Jahren, aufgrund einer unerkannten Diskonnektion von der Beatmungsmaschine. Das zweite Kind ist nun 14 Jahre alt und lebt weiterhin bei seiner Pflegefamilie (Hammel et al. 2009).

Eine genetische Untersuchung des überlebenden Kindes, der Eltern und der Geschwister, konnte durchgeführt werden. Von dem verstorbenen Kind war keine DNA asserviert. In der genetischen Untersuchung konnten wir bei der Patientin eine heterozygote 39 bp-Expansion im Polyalaninrepeat des *PHOX2B* Gens nachweisen. Es handelte sich um eine Duplikation der Basenpaare c. 738–776, die zu einer Verlängerung des Proteins um 13 Alaninreste führt. Nach bisherigen Veröffentlichungen stellt diese Mutation die längste bisher gefundene Expansion ohne Frameshift, innerhalb des Polyalaninrepeats dar (Weese-Mayer et al. 2009).

5.11 Es besteht eine Genotyp–Phänotyp Korrelation

Fam E 39 Pat 39.1 †	39 bp–Expansion
Alter bei Symptombeginn	Geburt
Tracheostoma	●
24 h Beatmung	●
Nächtliche Beatmung	●
Kardiale Symptome	○
Gastrointestinale Symptome	○
ZNS Symptome	○
Tumore	○
Max. pCO ₂ (mmHg)	k. A.

(a) Patient 39.1

Fam E 39 Pat 39.2	39 bp–Expansion
Alter bei Symptombeginn	Geburt
Tracheostoma	●
24 h Beatmung	●
Nächtliche Beatmung	●
Kardiale Symptome	○
Gastrointestinale Symptome	○
ZNS Symptome	○
Tumore	○
Max. pCO ₂ (mmHg)	k. A.

(b) Patient 39.2

Tabelle 5.12.: Familie E 39 Patienten 39.1 und 39.2

In der Leukozyten DNA der Eltern und der Geschwister fanden sich homozygote normale Allele. Die Identität der Eltern wurde durch Mikrosatellitenanalyse bestätigt. Als Analogschluss aus der annähernd identisch verlaufenden klinischen Symptomatik beider betroffener Kinder, kann man, auch bei dem verstorbenen Kind, auf ein Vorliegen der 39 bp–Expansion schließen. Es besteht der hochgradige Verdacht auf das Vorliegen eines Keimbahnmosaiks bei einem der Elternteile.

5.11. Es besteht eine Genotyp–Phänotyp Korrelation

Von mehreren Autoren wurde in der Literatur ein Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp der Patienten postuliert (Weese-Mayer et al. 2003), (Matera et al. 2004) und (Trochet, O'Brien, Gozal, Trang, Nordenskjöld, Laudier, Svensson, Uhrig, Cole, Niemann, Munnich, Gaultier, Lyonnet & Amiel 2005). Dieser lässt sich auch in unserem Patientengut bestätigen.

Patienten	Mut. bp	Genotyp	TS	24 h	Nachts	Infekt	GI	Kardio	ZNS	CO ₂
Fam E 15.II	15 Ex	20/25	○	○	○	○	○	○	○	normal
Fam E 15.II	15 Ex	20/25	○	○	○	●	●	○	●	110
E 17.1	17 Ex	20/ XFS	○	○	○	k. A.	○	○	○	60
E 18.1	18 Ex	20/26	○	○	●	●	○	○	●	120
E 18.2	18 Ex	20/26	●	○	●	●	●	○	●	100
E 18.3	18 Ex	20/26	●	○	●	●	●	●	●	150
E 18.4	18 Ex	20/26	●	○	●	●	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
E 21.1	21 Ex	20/27	●	○	●	●	○	●	●	100
E 21.2	21 Ex	20/27	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Fam E 39.1 †	39 Ex	20/33	●	●	●	●	○	○	●	k. A.
Fam E 39.2	39 Ex	20/33	●	●	●	●	○	○	●	k. A.
Indexpat. D 17.1	17 Del	20/ XFS	●	●	●	●	●	●	●	110
NB	V. a.	NPARM	●	●	●	●	●	○	●	> 100

Mut. bp = Mutation Basenpaare	TS = Tracheostoma	24 h = Beatmung 24 Stunden
Nachts = Beatmung nachts	Infekt = Beatmung in Infektzeiten	GI = Gastrointestinale Symptome
Kardio = Hämodynamische Symptome	ZNS = neurologische Symptome (ANS/ZNS)	CO ₂ = berichtete CO ₂ Werte
NPARM = Non-Polyalaninrepeat-Mutation	k. A. = keine Angaben	FS = Frameshift

Tabelle 5.14.: Genotyp-Phänotyp Korrelation; Vermehrtes Auftreten assoziierter Symptome bei zunehmender Mutationslänge

5.11 Es besteht eine Genotyp–Phänotyp Korrelation

5.11.1. Genotyp–Phänotyp Beziehung – Beatmungszeiten

Kinder mit CCHS benötigen in den meisten Fällen eine Atemhilfe, nur wenige Patienten kommen ohne eine Unterstützung aus und zeigen nur geringfügig erhöhte $p\text{CO}_2$ -Werte.

Unsere asymptotische Patientin E 15.I (Mutter) weist die kürzeste beschriebene Expansion 15 bp auf, ebenso ihre Tochter (E 15.II), die nur in Infektzeiten eine Atemhilfe benötigt.

In unserem Patientengut korreliert das Vorhandensein eines Tracheostomas mit einer bp-Expansion von mehr als 18 Basenpaaren, ebenso tritt eine nächtliche Beatmungspflichtigkeit bei den Kindern mit Expansionen ab 18 Basenpaaren auf. Eine 24-stündige Abhängigkeit von der Beatmung besteht bei den Patienten mit der längsten Expansion (+39 bp) bzw. einer kompletten Verschiebung des Leserasters, die zu einer Verlängerung des Proteines führt.

Ein Zusammenhang zwischen der Länge der nachgewiesenen Expansionen und der Ausprägung der angegebenen CO_2 -Retention, lässt sich nicht herstellen. Bereits Kinder mit dem Genotyp 20/25 entwickeln, ohne medizinisches Eingreifen CO_2 -Werte > 100 mmHg ohne Zeichen der Atemnot.

5.11.2. Genotyp–Phänotyp Beziehung – Gastrointestinale Symptome

Gastrointestinale Symptome sind mit dem kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndrom assoziiert. Die Maximalvariante, eine komplette Aganglionose des Darmes, ohne die für M. Hirschsprung typische erhöhte Acetylcholinesterase (erklärbar durch das vollständige Fehlen der Nervenzellen), bestand bei unserem Indexpatienten mit der Frameshift Mutation. Eine enterale Ernährung dieses Kindes war nicht möglich. Das Haddad Syndrom, die Kombination aus klassischem Morbus Hirschsprung und CCHS, ist in unserem Patientengut einmalig aufgetreten, hier gelang kein Nachweis einer Mutation innerhalb des Polyalaninrepeats. Die Beschreibung gastrointestinaler Probleme und die Schwere der Ausprägung nahm, bei den von uns untersuchten Patienten, mit der Länge der Expansionsmutation zu.

Patienten	Genotyp	Gastrointestinale Symptome
Fam E 15.I	20/25	Achalasie des Ösophagusphinkters, Trinkverhalten nicht beeinträchtigt
E 18.2	20/26	Rezidivierendes Erbrechen
E 18.3	20/26	Pathologische Ösophagusperistaltik, Gastroösophagealer Reflux, rez. Aspirationen
D 17.1	20/X Frameshift	Komplette Aganglionose des Darmes, parenterale Ernährung
NB	Klinisches CCHS PA unauffällig	M. Hirschsprung

Tabelle 5.15.: Genotyp–Phänotyp Gastrointestinale Symptome

5.11.3. Genotyp–Phänotyp Beziehung – ZNS/ANS–Symptome – Neuralleistentumore

In dem von uns entwickelten Fragebogen wurden Symptome für Fehlregulationen des autonomen Nervensystems erfragt. Wir fragten gezielt nach Schwitzen, verstärkter Tränensekretion, kalten/warmen Akren, Pupillenanomalien (Miosis, Mydriasis, fehlende Lichtreaktion). Zudem wurden Symptome des zentralen Nervensystems, sowie das Auftreten von Neuralleistentumoren erhoben. Ein Fall eines Neuroblastoms ist innerhalb unseres Patientengutes aufgetreten, hier konnte bei klinisch gesichertem CCHS keine Mutation im PA–Repeat nachgewiesen werden. Bei drei Kindern konnten visuelle Auffälligkeiten (verstärkte Tränensekretion, pathologische Pupillenreaktionen) festgestellt werden, eine genotypspezifische Zuordnung war nicht möglich. Muskuläre Hypotonie wurde bei vier Patienten unterschiedlicher Genotypen festgestellt. Bei der Auswertung der Befunde ist eine Zunahme der beschriebenen Einzelsymptome autonomer Dysfunktion festzustellen. Es konnte jedoch keine Zunahme bei den betroffenen involvierten Organsystemen festgestellt werden. Besonders hervorzuheben ist eine Patientin (E 18.3, Genotyp 20/26), bei der im MRT des Schädels cerebelläre Fehlbildungen nachgewiesen wurden. Nach den bisher angewandten klinischen Diagnosekriterien der ATS (ATS 1999), durfte bei gesicherten Gehirnfehlbildungen die Diagnose CCHS nicht gestellt werden.

Patienten	Genotyp	Neurologische Symptome
Fam E 15.II	20/25	Miotische Pupillen, keine Fixation, muskuläre Hypotonie, Blässe
E 18.1	20/26	Verstärkte Tränensekretion, Otoakustische Emissionen nicht auslösbar
E 18.2	20/26	Zerebrale Krampfanfälle, muskuläre Hypotonie
E 18.3	20/26	Zerebrale Fehlbildung, Kleinhirnwurmhypoplasie
E 21.1	20/27	Ausgeprägte muskuläre Hypotonie, fahriges Extremitätenbewegungen, EEG pathologisch, langsame Erholung nach Sedativgaben, Myoklonien der Füße
D 17.1	20/X Frameshift	Mittelweite, lichtstarre Pupillen, ausgeprägte muskuläre Hypotonie, zerebrale Krampfanfälle
NB	Klinisches CCHS PA unauffällig	Neuroblastom

Tabelle 5.16.: Genotyp–Phänotyp Neurologische Symptome

5.11.4. Genotyp–Phänotyp Beziehung – Kardiovaskuläre Symptome

Das Problemfeld der fehlenden autonomen Regulation kardiovaskulärer Parameter, trat auch in unserem Patientengut bei Patienten mit Expansionen über 18 Basenpaaren auf. Der Patient mit der Frameshift Mutation 17 Del/20 wies bereits im Neugeborenenalter schwer regulierbare Blutdruckschwankungen auf. Katecholaminpflichtigkeit bestand bei einem Reifgeborenen mit

5.11 Es besteht eine Genotyp–Phänotyp Korrelation

Genotyp 20/27 bis zum dritten Lebenstag. Bei einer Patientin mit dem Genotyp 20/26 (E 18.3) musste, im Alter von drei Jahren, aufgrund einer Asystolie bei einer Narkose und nachgewiesenen Pausen im Langzeit–EKG von > 15 Sekunden, ein Herzschrittmacher implantiert werden.

Patienten	Genotyp	Kardiovaskuläre Symptome
E 18.3	20/26	Asystolie narkoseassoziiert, Pausen im LZ–EKG > 15 sec, Herzschrittmacher
E 21.1	20/27	Katecholaminpflichtigkeit bis 3. Lebenstag
D 17.1	20/X Frameshift	Therapieresistente Blutdruckschwankungen

Tabelle 5.17.: Genotyp–Phänotyp Kardiovaskuläre Symptome

6. Diskussion

6.1. Genetische Diagnostik

Das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom ist eine multisymptomale Erkrankung des autonomen Nervensystems, durch Störung der Migration der Neuralleistenzellen, im Rahmen der embryologischen Entwicklung. Klinisches Hauptmerkmal stellt die alveoläre Hypoventilation der Patienten im Schlaf dar, die unter anderem durch eine Fehlfunktion der afferenten CO₂-Rezeptoren bedingt wird. Klinisch fehlt den Patienten der Automatismus des Atemantriebs, die Atmung im Wachen ist im klassischen Fall unbeeinträchtigt, nachts ist eine Beatmung erforderlich. Kompliziert wird das CCHS durch eine Reihe assoziierter Fehlfunktionen des autonomen Nervensystems. Die genetische Grundlage des kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms wurde 2003/2004 durch mehrere Arbeitsgruppen fast zeitgleich entdeckt. Krankheitsverursachend sind in mehr als 90 % der Fälle heterozygote Expansionen im Polyalaninrepeat des Exons 3 des *PHOX2B* Gens auf Chromosom 4 (Amiel et al. 2003, Weese-Mayer et al. 2003).

Durch einen Undine-Patienten auf der Neonatologischen Intensivstation unseres Hauses, im Jahr 2004, wurden wir mit der zu diesem Zeitpunkt üblichen, aufwendigen Diagnosestellung des Syndroms konfrontiert. Nach den Richtlinien der American Thoracic Society stellte das Undine-Syndrom eine Ausschussdiagnose dar, die viele invasive und belastende Untersuchungen für das Kind beinhaltete (incl. Darmbiopsie, Muskelbiopsie, MRT, etc.).

In dieser Arbeit wurde eine zuverlässige Methode zur molekulargenetischen Diagnostik des kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms in unserem Labor etabliert. Wir orientierten uns hierfür an dem von Weese-Mayer 2003 veröffentlichten Protokollen und Primern (Weese-Mayer et al. 2003). Auffällig war in der Literatur die deutliche Diskrepanz der nachweisbaren Mutationen bei verschiedenen Arbeitsgruppen. Wahrscheinlich sind niedrige Detektionsraten mit technischen Problemen des Nachweises erklärbar, da es sich um eine schwierig amplifizierbare DNA-Sequenz handelt.

Quelle	Untersuchte Patienten	PHOX2B Mutationen
Sasaki et al. 2003	10	50 %
Amiel et al. 2003	29	62 %
Weese-Mayer et al. 2003	67	97 %

Tabelle 6.1.: Nachgewiesene Mutationshäufigkeit bei klinisch gesichertem CCHS, Literaturangaben verschiedener Arbeitsgruppen

6.2 Genotyp–Phänotyp Korrelation

Dieses Phänomen wird durch den GC–Reichtum des *PHOX2B* Gens und einer selektiven Bevorzugung des kürzeren Allels bei der PCR–Amplifikation erklärt. Um diesem Effekt vorzubeugen, ergänzte unsere Arbeitsgruppe das ursprüngliche Protokoll (Weese-Mayer et al. 2003) durch die Zugabe von Betain bis zu einer Konzentration von 1,25 M. Hierdurch gelang uns der Mutationsnachweis im PA–Repeat bei 92,3 % unserer im Vorfeld als undineverdächtig eingestuften Patienten (n = 12). Bei den nach klinischen Kriterien ausgeschlossenen Patienten, konnte keine Mutation im PA–Repeat nachgewiesen werden (n = 7). Nach neueren Literaturangaben findet sich, im größten veröffentlichten Patientenkollektiv (Weese-Mayer et al. 2009), bei über 90 % der Patienten eine Mutation im PA–Repeat. Wir kontrollierten die im Gelbild erhaltenen Befunde zusätzlich durch Durchführung von Fragmentlängenanalysen und Sequenzierungen, um einen möglichen Allelverlust zu erkennen. Falsch Positive Befunde sind nicht aufgetreten, nach Optimierung des Protokolls und Zugabe von Betain, konnten auch falsch negative Befunde sicher vermieden werden.

Die Mutationen treten heterozygot auf, sechs unserer sieben untersuchten Elternpaare zeigten keine nachweisbaren Mutationen im PA–Repeat der Leukozyten DNA. Die bei den Kindern nachgewiesenen Mutationen müssen als „de novo“ betrachtet werden. Das Auftreten von isolierten Keimbahnmosaiken ist jedoch möglich und wurde bei uns in einer Familie mit hoher Wahrscheinlichkeit bestätigt. Dieser Tatsache muss in einer genetischen Beratung betroffener Familien berücksichtigt werden. Eine asymptomatische Mutter trug die bei ihrer Tochter krankheitsverursachende milde *PHOX2B* Mutation (Genotyp 20/25). Aufgrund dieser variablen Penetranz, lässt sich eine Beteiligung von Modifizier–Genen vermuten. Möglich ist auch das Vorliegen eines genetischen Mosaiks bei der Mutter, dies konnte in neueren Untersuchungen bei Familien mit ähnlicher Konstellation nachgewiesen werden (Parodi et al. 2008). Die Mutation ist autosomal dominant. Ein rezessiver Erbgang ist, angesichts der hohen Zahl klinisch gesicherter heterozygoter Fälle und nachgewiesener vertikaler Übertragung, auszuschließen.

6.2. Genotyp–Phänotyp Korrelation

Der von uns entwickelte Fragebogen erfasste Symptome mehrerer autonomer Regelkreise. Eine Genotyp–Phänotyp Korrelation wurde zu Beginn dieser Arbeit von einzelnen Arbeitsgruppen berichtet (Weese-Mayer et al. 2003). Insbesondere für die Abhängigkeit von der Beatmung, konnte im Rahmen dieser Arbeit eine klare Genotyp–Phänotyp Korrelation festgestellt werden.

Diese Befunde decken sich mit neueren Angaben der Literatur (Weese-Mayer et al. 2009). Selten betrifft ganztägige Abhängigkeit von der Beatmung Individuen mit den Genotypen 20/25 (Exp 15), hier sind Beatmungszeiten, wie bei unserer Patientin, mit Infekten oder Exposition zu atemdepressiven Stoffen assoziiert. Variable Beatmungspflichtigkeit im Wachen, die insbesondere vom Aktivitätslevel des Patienten beeinflusst werden kann, wird bei Genotypen 20/26 (Exp 18) beobachtet. Höhergradige Expansionen, Mutationen mit Leserasterverschiebungen und hieraus resultierenden Verlängerungen des Proteins, oder Mutationen außerhalb des Polyalaninrepeats, sind

mit einer hohen, meist dauerhaften Abhängigkeit von einer Atemhilfe assoziiert (Berry-Kravis et al. 2006). Eine Leserasterverschiebung, mit einer resultierenden Verkürzung des Proteins, führt in unserem Patientengut jedoch zu einer milden respiratorischen Ausprägung des CCHS.

Die Beschreibung gastrointestinaler Probleme und die Schwere der Ausprägung, nahm bei den von uns untersuchten Patienten mit der Länge der Expansionsmutation zu.

Ein signifikanter Zusammenhang zu einem einzelnen Symptom, konnte aufgrund der Vielfältigkeit der beschriebenen Probleme und unserer geringen Probandenzahl, hier nicht hergestellt werden. In der Literatur ist das Auftreten gastrointestinaler Beschwerden jedoch ebenfalls mit höhergradigen Expansionen, Frameshift oder seltenen Mutationen außerhalb des PA-Repeats assoziiert. Bei Expansionen von nur 15 oder 18 bp wurde bislang kein Patient mit assoziiertem Hirschsprung Syndrom beschrieben. Weese-Mayer benennt das Auftreten eines M. Hirschsprung bei einem CCHS Patienten, als besten Indikator für das Bestehen einer Mutation außerhalb des PA-Repeats (Weese-Mayer et al. 2009).

Fehlregulationen des autonomen Nervensystems (profuses Schwitzen, lichtstarre Pupillen, verstärkte Tränensekretion, Mundtrockenheit, etc.) werden im Rahmen des CCHS häufig beschrieben (Patwari et al. 2010). In dem von uns entwickelten Fragebogen wurden Symptome autonomer Dysfunktionen erfragt. Von den behandelnden Ärzten wurden mehrfach Symptome des zentralen Nervensystems (zerebrale Krampfanfälle, muskuläre Hypotonie, lichtstarre Pupillen) berichtet. Eine gewisse Verfälschung der Ergebnisse, durch das geringe Alter der untersuchten Patienten, die ungenaue klinische Überprüfbarkeit autonomer Symptome, stattgefundenen Reanimations- oder Asphyxieereignisse ist nicht auszuschließen (Axelrod et al. 2006). Besonders hervorzuheben ist eine Patientin (Genotyp 20/26), bei der im MRT des Schädels cerebelläre Fehlbildungen nachgewiesen wurden. Nach den bisher angewandten klinischen Diagnosekriterien der ATS (ATS 1999), durfte bei gesicherten Gehirnfehlbildungen die Diagnose CCHS nicht gestellt werden. Durch den Nachweis der Mutation im Rahmen dieser Arbeit, konnte das Krankheitsbild der Patientin jedoch klar als CCHS definiert werden.

Ein Fall eines Neuroblastoms ist innerhalb unseres Patientengutes aufgetreten. In Übereinstimmung mit der Literatur, lies sich bei diesem Patienten, trotz klinischem Vollbild des Syndroms, keine der typischen Expansionen im Polyalaninrepeat nachweisen, das Vorliegen einer Mutation außerhalb des Exon 3 wird vermutet (Berry-Kravis et al. 2006). In unseren Untersuchungen gelang jedoch bei diesem Patienten kein Mutationsnachweis in der gesamten codierenden Region des Gens. Weese-Mayer, et al. 2009 berichten insbesondere bei Patienten mit Mutationen außerhalb des Polyalaninbereiches, Frameshift oder Missence Mutationen von einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Neuralleistentumoren. Bei Patienten mit klassischen Polyalaninexpansionen, werden derartige Tumore bei höhergradigen Expansionen 20/29 (Exp 27), 20/33 (Exp 39) oder Frameshiftmutationen beobachtet. Für diese Patienten wird eine regelmäßige Bildgebung zur Suche nach Neuralleistentumoren empfohlen (Trochet, O'Brien, Gozal, Trang, Nordenskjöld, Laudier, Svensson, Uhrig, Cole, Niemann, Munnich, Gaultier, Lyonnet & Amiel 2005) (Weese-Mayer et al.

6.3 Klinische Empfehlungen zur Diagnosestellung und Diagnostik bei CCHS

2009). Auch unsere Patientin E 17.1, bei der es durch eine 17 bp-Duplikation zu einer Verschiebung des Leserasters kommt, wird engmaschigen Nachkontrollen zur Früherkennung von Neuroblastomen unterzogen werden. Bei einem in der Literatur vorbeschriebenen Fall, mit identischer Mutation, kam es im Alter von acht Monaten zum Auftreten zweier primärer Neuroblastome (van Limpt et al. 2004).

Das Problemfeld der fehlenden autonomen Regulation kardiovaskulärer Parameter, trat in unserem Patientengut bei Patienten mit Expansionen über 18 Basenpaaren und dem Patienten mit der Frameshift Mutation (D 17.1) auf. Diese Befunde werden durch die Literatur bestätigt und ergeben für die klinische Arbeit wichtige Aspekte. Tran et al. wiesen 2003 Veränderungen im zirkadianen Rhythmus der Blutdruckwerte bei CCHS Patienten nach. 2008 berichteten Gronli et al. (Gronli et al. 2008) von signifikanten Veränderungen in Langzeit-EKG Auswertungen von CCHS Patienten. Bei CCHS Patienten wurde ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines plötzlichen Herztodes, durch verlängerte "Beat-to-Beat" Abstände im Langzeit EKG nachgewiesen. Pausen zwischen zwei Herzaktionen traten häufiger und länger auf, als bei gesunden Vergleichspersonen. Bei bestimmten Patienten wurde, aufgrund dieser Befunde, ein Herzschrittmacher implantiert. Der Gruppe gelang es einen Zusammenhang zwischen dem Genotyp und den EKG Veränderungen festzustellen. Laut Gronli besteht ein erhöhtes Risiko insbesondere für Patienten mit den Genotypen 20/27 oder 20/26, jedoch wurden in der Studie nur wenige Patienten anderer Genotypen und keine Patienten mit Mutationen außerhalb des PA-Repeats untersucht. Da eine Langzeit-EKG Messung ein nicht invasives, kostengünstiges und auch von kleinen Kindern gut toleriertes diagnostisches Mittel darstellt, ist eine regelmäßige Kontrolle, nach unserer Ansicht, bei allen CCHS Patienten, unabhängig vom Genotyp, empfehlenswert. Längere Aufzeichnungsphasen (72 Stunden) sind laut Gronli zu Erfassung der Variabilitäten erforderlich. Nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, stellen Pausen > 3 Sekunden beim asymptotischen, herzgesunden Patienten keine Indikation zur Implantation eines Schrittmachers dar (Lemke et al. 2005). Dies sollte jedoch bei pädiatrischen Patienten mit bekanntem CCHS neu überdacht werden. Im Zweifel sollte bei einem CCHS Patienten, mit nachgewiesenen Pausen im LZ-EKG von mehr als drei Sekunden, angesichts des erhöhten Risikos eines plötzlichen Herztodes, die Entscheidung für eine Schrittmachertherapie getroffen werden (Gronli et al. 2008). Besondere Vorsicht ist auch bei der Verabreichung kardiodepressiver Substanzen (z. B. Propofol®) gegeben, dies muss bei geplanten Narkosen gesondert berücksichtigt werden (Strauser et al. 1999).

6.3. Klinische Empfehlungen zur Diagnosestellung und Diagnostik bei CCHS

In Anlehnung an die Ergebnisse dieser Arbeit und den vorliegenden Literaturberichten, konnte ein Algorithmus zum klinischen Vorgehen bei Verdacht auf das Vorliegen eines CCHS entwickelt werden. Als klinisch sensitives, jedoch nur bedingt spezifisches diagnostisches Merkmal, lässt sich die Hyper-

kapnie verwerten. Diese bestand bei unseren Patienten, unabhängig vom Genotyp, auch bei milden Varianten. Wird die Verdachtsdiagnose CCHS gestellt, so ist aufgrund der guten Durchführbarkeit und Zuverlässigkeit, bereits zu diesem Zeitpunkt eine genetische Untersuchung des PA-Repeats des *PHOX2B* Gens indiziert. Bis zum Erhalt des Ergebnisses, sollten weitere Untersuchungen zum Ausschluss anderer Hyperkapnieursachen durchgeführt werden. Eine weitergehende genetische Untersuchung (Sequenzierung des Gens), ist nur bei fortbestehendem klinischem Verdacht und unauffälligem Polyalaninrepeat erforderlich.

Aufgrund der bestehenden Genotyp-Phänotyp Korrelation, sollte nach Erhalt der genetischen Diagnosestellung der Umfang der erforderlichen weiteren Betreuung des Patienten abgestimmt werden.

Zudem ist es empfehlenswert, zum frühest möglichen Zeitpunkt die Planung einer Heimbeatmung mit entsprechender pflegerischer Unterstützung, sowie eine ausführliche Anleitung der Eltern zu organisieren (Fisher 1991, Cseke 2008).

6.3 Klinische Empfehlungen zur Diagnosestellung und Diagnostik bei CCHS

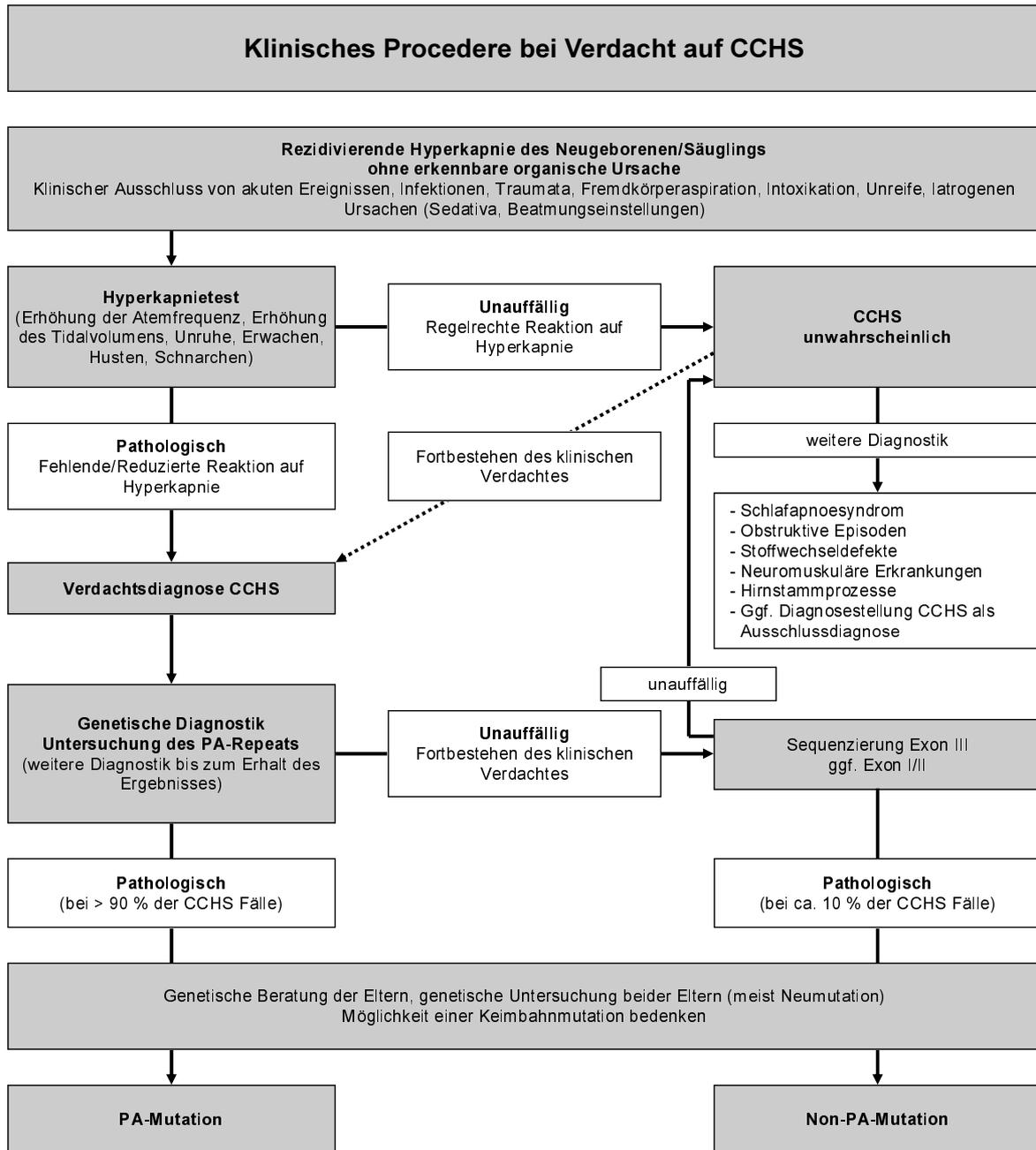


Abbildung 6.1.: Klinisches Procedere bei V. a. CCHS (Empfehlungen angelehnt an Gronli et al. 2008 und Weese-Mayer et al. 2009)

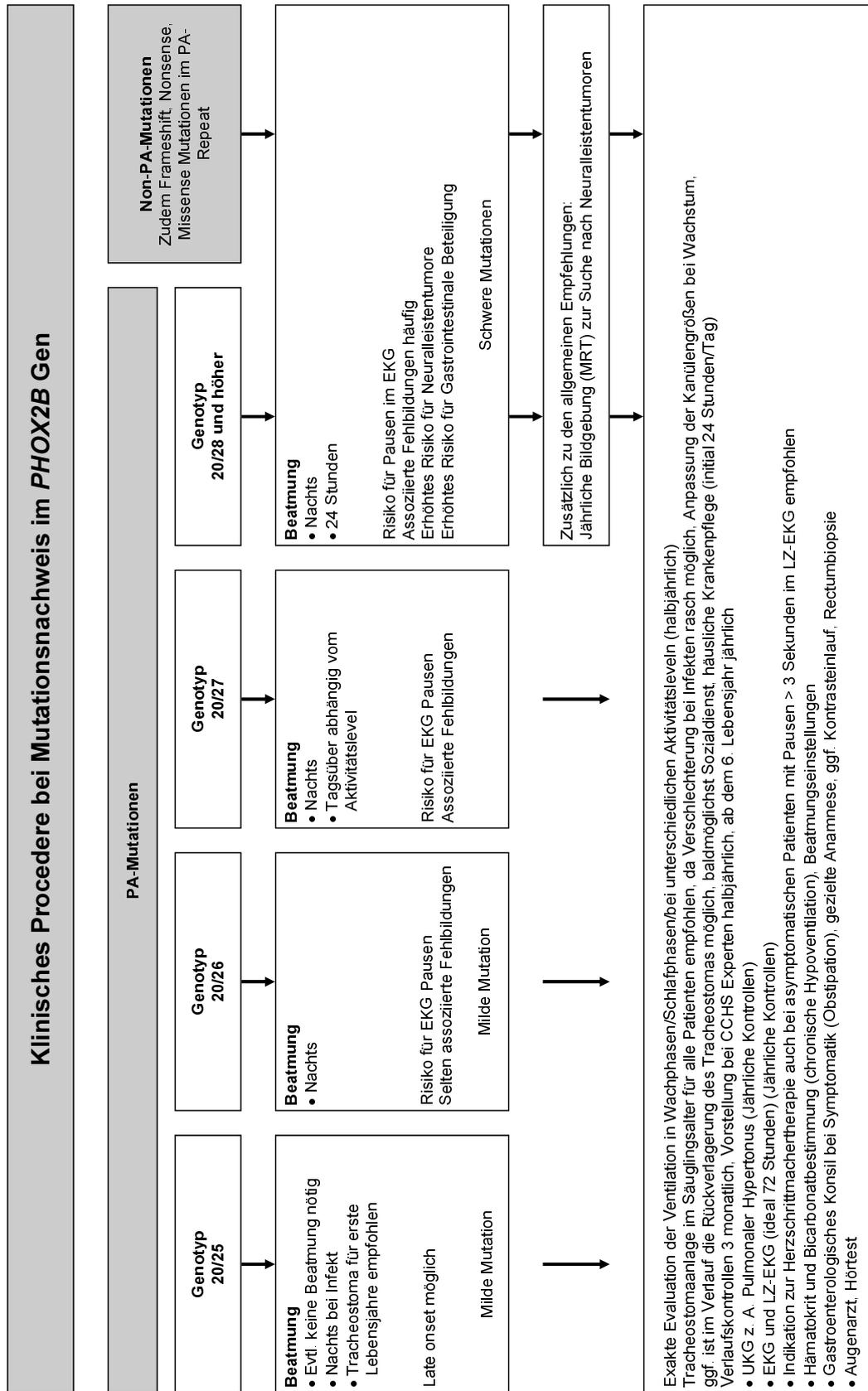


Abbildung 6.2.: Klinisches Procedere bei Mutationsnachweis im *PHOX2B* Gen (Empfehlungen angelehnt an Gronli et al. 2008 und Weese-Mayer et al. 2009)

6.4. Genetische Beratung betroffener Familien

Die Mutationen des *PHOX2B* Gens vererben sich autosomal dominant.

Kinder eines **CCHS–Patienten** haben, analog des dominanten Erbganges, ebenfalls ein 50%iges Risiko die Mutation, und damit auch das Krankheitsbild, zu erben.

Träger eines **somatischen Mosaiks** tragen eine „de novo“ entstandene Mutation, da die Übertragung eines somatischen Mosaiks genetisch nicht möglich ist.

Für Kinder eines Trägers mit genetischem Mosaik besteht ein Wiederholungsrisiko und Erkrankungsrisiko von bis zu 50 %. Dieses Risiko besteht nur für Kinder des Mosaikträgers, jedoch nicht für weitere Familienmitglieder (z. B. Geschwister des Mosaikträgers).

Träger eines **Keimbahnmosaiks** ohne klinische Symptome, können die Mutation über mehrere Generationen weitergeben oder ererbt haben (Weese-Mayer et al. 2009). Zum Abschätzen des Wiederholungsrisikos ist hier eine genetische Untersuchung aller Familienmitglieder empfohlen, die die Mutation ererbt haben könnten, meist lässt sich ein Indexfall feststellen.

6.4.1. Pränatale Diagnostik

Eine Pränatale Diagnostik ist möglich (Weese-Mayer et al. 2009).

Eine Empfehlung wird für Personen mit bekanntem somatischem Mosaik ausgesprochen. Ein überwiegend paternaler oder maternaler Erbgang konnte noch nicht nachgewiesen werden.

Da ein Keimbahnmosaik, auch bei unauffälliger genetischer Untersuchung von Eltern eines CCHS Patienten, nicht ausgeschlossen werden kann, ist eine pränatale Diagnostik für jede weitere Schwangerschaft empfehlenswert.

6.5. Limitationen der Arbeit und Ausblicke

Das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom fällt in die Gruppe der sogenannten „Orphan Diseases“ und ist mit einer Inzidenz von 1:180.000 Geburten (Schöber et al. 1994) als selten einzustufen. Rechnerisch werden in Deutschland jährlich vier Kinder mit CCHS geboren. Die in dieser Arbeit diagnostizierten Fälle ($n = 12$) erfassen statistisch einen Großteil der in Deutschland betroffenen Neugeborenen der Jahre 2004–2008.

Aussagen zur Genotyp–Phänotyp Korrelation werden naturgemäß mit steigender Patientenzahl fundierter, dies limitiert die Aussagekraft der hier erhobenen Befunde.

Es wurde versucht, dieses Defizit, durch Auswertung der vorhandenen Literatur und Vergleiche mit den eigenen Befunden, auszugleichen. Eine weitere Ungenauigkeitsquelle liegt in der schlechten Diagnostizierbarkeit autonomer Fehlfunktionen beim Neugeborenen (profuses Schwitzen, Schwindel, orthostatische Dysregulation). Ein Fall eines schwer ausgeprägten CCHS mit multiplen assoziierten Symptomen und Neuroblastom, konnte in unseren Untersuchungen nicht geklärt werden. Eine Mutation außerhalb des Polyalaninrepeats wurde vermutet, die Sequenzierung der drei Exone

ergab jedoch einen Normalbefund. Ein Übersehen einer klassischen Expansionsmutation erscheint unwahrscheinlich. Eine extrem lange Expansion könnte gegebenenfalls durch PCR-Stotter-Banden, wie sie in der Diagnostik des Fragilen-X-Chromosoms Verwendung finden (Saluto et al. 2005), nachgewiesen werden – eine derartige Mutation wurde jedoch in der Literatur bislang nicht beschrieben. In der Literatur wird, angesichts derartiger Fälle, die Frage nach dem Vorliegen von Modifier Genen aufgeworfen. Diese könnten ein Vollbild des CCHS, ohne Mutationsnachweis in den codierenden Regionen des *PHOX2B* Gens, erklären (Weese-Mayer et al. 2009). Hier ist weitere Diagnostik erforderlich. Ebenso sind funktionelle Untersuchungen nötig, um dominante Mutationen mit scheinbar unvollständiger Penetranz, wie sie bei der asymptomatischen Mutter einer unserer Patientinnen vorliegt, erklären zu können. Zudem muss geklärt werden, aus welchem Grund längere Expansionen zu schwereren Krankheitsbildern führen. Gibt es eine toxic gain of function, eine zunehmende Schädigung der Zellfunktionen durch das mutierte Protein, die über den reinen Ausfall des Proteins hinausgeht? Ein Gedankenmodell zur Untersuchung dieser Fragen wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt.

Aktivierung des Dopamin-beta-Hydroxylase-Gens durch das Genprodukt von PHOX2B

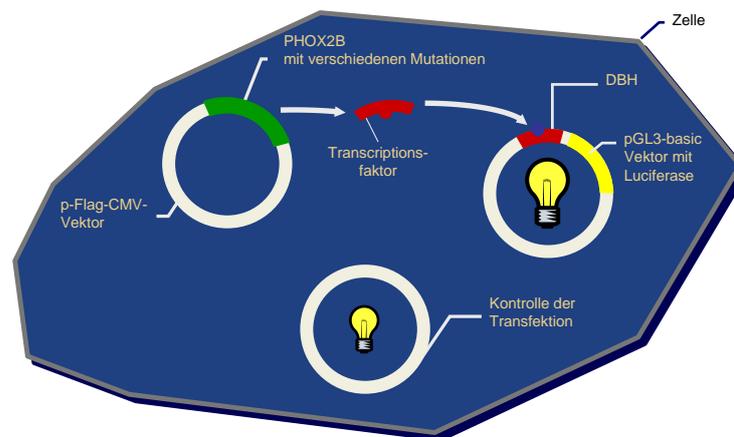


Abbildung 6.3.: Aktivierung des Dopamin- β -Hydroxylase-Gens (DBH) durch das Genprodukt von *PHOX2B*. Verschiedene Mutationen bewirken eine veränderte Funktionalität des Transkriptionsfaktors und somit eine veränderte Aktivierung der Luciferase (Leuchtkraft)

Verschiedene Arbeitsgruppen haben mit ähnlichen Modellen bereits Funktionsuntersuchungen durchgeführt (Trochet, Hong, Lim, Brunet, Munnich, Kim, Lyonnet, Goidis & Amiel 2005). Für das mutierte Protein konnte eine veränderte Bindungsfähigkeit an den Dopamin- β -Hydroxylase Promotor (DBH ist ein Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese) nachgewiesen werden. Zudem neigt das veränderte Protein zu Bildung von Aggregaten im Zytoplasma. Auch hier zeigt sich ein weites Feld interessanter Forschungsgebiete.

7. Zusammenfassung

Das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom ist eine multisymptomale Erkrankung des autonomen Nervensystems, durch Störung der Migration der Neuralleistenzellen, im Rahmen der embryologischen Entwicklung.

Klinisches Hauptmerkmal stellt die alveoläre Hypoventilation der Patienten im Schlaf dar. Den Patienten fehlt der Automatismus des Atemantriebs, die Atmung im Wachen ist im klassischen Fall unbeeinträchtigt, nachts ist eine Beatmung erforderlich. Die Diagnosestellung dieses Syndroms, war bislang nur als Ausschlussdiagnose, mit entsprechendem Zeitaufwand und klinischen Belastungen des Patienten, durch invasive Diagnostik möglich. Im Jahr 2003 wurden Mutationen im *PHOX2B* Gen als ursächlich für das Auftreten eines kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms nachgewiesen. Es gelang im Rahmen dieser Arbeit, in Anlehnung an ein in der Literatur veröffentlichtes Protokoll, eine genetische Diagnostik des CCHS in unserem Labor zu etablieren. Die initial auch in der Literatur beschriebenen Probleme der Allelverluste im Rahmen der PCR, konnten durch Modifikationen der Methode behoben werden. Zusätzlich wurden die im Gelbild erhobenen Befunde durch Fragmentlängenanalysen und Sequenzierungen des Genabschnittes verifiziert. Es konnten von 2004 bis 2008 bei 12 Patienten Mutationen im *PHOX2B* Gen nachgewiesen werden. Eine der nachgewiesenen Expansionsmutationen stellt die längste bislang in der Literatur beschriebene Expansion dar. Zudem wurden zwei familiäre Fälle aufgedeckt. Hierbei handelte es sich in einer Familie um eine Keimbahnmutation mit zwei betroffenen Kindern, und in einer zweiten Familie, um eine Übertragung von einer asymptotischen Mutationsträgerin auf ihre Tochter. In unserem Patientengut besteht bei 92 % der Patienten eine Mutation im 20 Alanine umfassenden Polyalaninrepeat des *PHOX2B* Gens. Dies stimmt mit der nachgewiesenen Mutationshäufigkeit in der Literatur überein. Es treten meist Expansionen, mit einer Verlängerung des Polyalaninrepeats von 25–39 Alaninen auf, jedoch sind auch Deletionen und Frameshiftmutationen möglich. Mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Fragebogen, wurden bei den einsendenden Ärzten Informationen zum Krankheitsbild erhoben. Eine Genotyp–Phänotyp Korrelation konnte nachgewiesen werden. Längere Expansionen (> 28 Alanine) wiesen, neben der respiratorischen Komponente, häufiger assoziierte Fehlbildungen aus dem Bereich der Neurocristopathien auf. Die genetische Untersuchung ermöglicht somit, neben der reinen Krankheitsdiagnose, auch noch eine prognostische Einschätzung des Krankheitsverlaufes, sowie eine Anpassung weiterer diagnostischer Schritte.

Zusammenfassend sind die für das CCHS ursächlichen *PHOX2B* Mutationen durch eine Mutationsanalyse gut und sicher nachweisbar. Amplifikation und Geldarstellung des Polyalaninrepeats stellen ein methodisch gut durchführbares, und für mögliche Verdachtspatienten kaum belastendes,

7. Zusammenfassung

Verfahren dar. Eine frühe und sichere Diagnosestellung des CCHS und – aufgrund der bestehenden Genotyp–Phänotyp Korrelation – auch eine Prognosebeurteilung, werden hierdurch ermöglicht. Der Status als „Ausschlussdiagnose“ mit der Notwendigkeit multipler, belastender und invasiver Diagnostik, ist für das kongenitale zentrale Hypoventilationssyndrom, nach heutigem Stand, nicht mehr gerechtfertigt.

A. Genomische DNA–Sequenz von PHOX2B

5101 aagcgccagc aataagacca accgctttgc tattgtccaa gtggaaagag ccaagtttat
5161 tatgaggact atatgctcta gagacctcag acaaggcatc tcataggagg ctttttcata
5221 aaactaggct ctgctggtag taaggaggcc agtttggagg caggcgttga gctgtgcaca
5281 tctccccact ccagccacct tctccatata catcttttat ttcatttttc cacttggctg
5341 agccatccag aaccttttca atgtataaaa tggaatattc ttacctcaat tcctctgcct
5401 acgagtctcg tatggctggg atggacacct cgagcctggc ttcagcctat gctgacttca
5461 gttcctgcag ccaggccagt ggcttccagt ataaccgat aaggaccact tttggggcca
5521 cgtccggctg cccttcctc acgccgggat cctgcagcct gggcaccctc agggaccacc
5581 agagcagtcc gtacgccgca ggttaaggacc ttcagctttc tcagcggagg aagccgcctt
5641 tccgcccgta tataggaagc cttgattgca tttgaaaatg gaaatgtgtt tagtatttac
5701 caaacgaaat ttgcttacac aaatgaaaga atttatcacg ttagaagcga ttgcagggag
5761 gggtaattca cttacagggt tacactatcc tagtcacacc cgaaccgcca acaaaattat
5821 cttaagctgc caaaatgata ggcataatth atttactttg cgatgagacg taaagcttag
5881 aaaataatta aataacaaag agtaaagctc attactggca gtgtctcttt ttttaagaac
5941 cgacagcggc tcacacctct ttggctggtc atttttatga ttatttcttt aatttattat
6001 tatttttttg cagctctttc cccaacttt tgagccgggt caactttctg agaattgaaa
6061 agttcccaaa gtgggactgt ttggtaactt ctttcctggc tccctgatat tccgactgat
6121 gttttttgat ttttttcctc tctggttttt tcctgctgaa agcactatct caagtccgtc
6181 acatcgcgct gtttcaatcc acccaaaggc gcttgtgcca gaaaggactc cgccaagccc
6241 gaagtttgag cccaggtttc cgagataac aaatttcctc ggtttcttcc cgcagcttct
6301 ctcggcaact ctctcgcgcg ggtgtaggta gcggtgccc tatgacctga ccttggagtc
6361 ctcacattct agctccacgg ccggcgagct gccggctgat ttgctcactt tctgtctcct
6421 ctgtcatact ctagtctctt acaaactctt cacggaccac ggcggcctca acgagaagcg
6481 caagcagcgg cgcatccgca ccactttcac cagtgccag ctcaaagagc tggaaagggt
6541 cttcgaggag actcactacc ccgacatcta cactcgggag gagctggccc tgaagatcga
6601 cctcacagag gcgagagtcc aggtacgcgc gcctggaac cgaccccgt ccgccgact
6661 ggtccgggga ggtgtggggt gaggggcggc tgggtgaaatt cgaagtcctg gagcctcgag
6721 tgagaaggac ctagggcccc atggccgatc agaaatctg gatttgggtgt ggctgtgcgt
6781 tcgagagagg cttagagcgc acgctcttgg cattttatth acagttgcca agtgtttccc
6841 accgagcag agacatgggg ggccttggga cgtggatgag cgatgcaatt tcggggacag
6901 gaagtgcctg tgggtggaagg tgtgcagact ttgctcccgt attataagtt tttccttctc
6961 ccctcccgcc ccccaaaaa atgcctccta actcaagtgc ttttaacctg gcccatggc

A. Genomische DNA-Sequenz von PHOX2B

7021 atataggttc attttcccg gaaactgtgac ttgcatcaga tttgcaaagg gtctgtgact
7081 tcatgaaggt caagaacat gacttactcc aacctgttaa acacaggtgc gctcacgagt
7141 tggccacagc gcctctctgg gtgagcccc gaccgagaag cggcgcac catcgcacgc
7201 tcttccaggc tcaaaggcc gggatgggca gcggagcaaa cccagagagg atcccttttc
7261 cttctaccaa ttagagtta actttagaac ttaggcttag gggatgaatgg cgagctcggg
7321 gcttgctcaa gaagccgact gaacagaggc ccacaaaat aaggccttcc cttttcgggt
7381 ctttctggga cctgcggctt tttaaactct gccgcaagcc ttcatgtccc tggcgtgctc
7441 actcccccta agaaagtttc tccgaaaatg cacagcaata agaagcggta gacttggtgg
7501 atgtgcgcgc gggggtgatc acagcgcagc gggaggaggg tgtaaaaca agc**cgaagta**
7561 **gaacttgggc cacc**ctaacc ggtgcttttc tttccattt tcttctttct cccctgctt
7621 caccgtctct ctttccgtct tgggcca**ggg** gtggttccag aaccgccgcg ccaagtttcg
7681 **caagcaggag cgcgacgagg cagccgacg** ggccgcggcc aagaacggct cctcgggcaa
7741 **aaagtctgac tcttccaggg acgacgagag** caaagaggcc aagagcactg acccggacag
7801 **cactgggggc ccaggtccca atcccaad**cc cacccccagc tgcggggcga atggaggcgg
7861 **cgccggcggg cccagcccgg ctggagctcc** gggggcggcg gggcccgggg gcccgaggg
7921 **cgaacccggc aagggcggcg cagcagcagc** ggccggcggcc **gcggcagcgg cggcggcggc**
7981 **agcggcagcg gcggcagctg** gaggcctggc tgcggctggg ggcc**ctggac aaggctgggc**
8041 **tc**ccggcccc ggccccatca cctccatccc ggattcgctt gggggtccct tcgccagcgt
8101 cctatcttcg ctcaaagac ccaacggcgc caaagccgc ttagtgaaga gcagtatgtt
8161 ctgatctgga atcctgcggc ggccggcggc gcggcgacag cgggcgagcc agggcccggg
8221 cgggcgagtg ggcgagcggg taggccaag **gctattgtcg tcgctgctgc** catggctttt
8281 tcattgaggg ctaaagtaa tcgcgctaag aataaaggga aaacggcgtc gccctcattt
8341 caacccact cctacccct tcctcaacc ccaaacaaaa caaacaaact tcctggctt
8401 cgcacctgcc tggggcctcg cagcggggcc agggctccgc ctgctgatcg ggggttgtga
8461 gcagcgcggc ctggacgagg ggcactctca gggggctgtg tctgctgtc agtttgtgtc
8521 tgtctcgggg aatgtgtgtc tgtggccca gacaggtgaca ggaagagatg gggggcctca
8581 accaacttag tgacttgttt agaaaaaaaa gacaaaaaag taaaaataa acaaaaaag
8641 ttggaaggca gaaaccatta aaaaacaaaa agccaacaac ccagaaagg ttaaaaaaca
8701 taaggaaaaa aaagacaaat taaaggagg gctaggggag aagctgcagc tggagctgaa
8761 ggctcgatct tgtgaacccc taaatccgct cctcctaac agcacggatt ctcttggggc
8821 tcttcttcag ggaagagtag ggacgccgtt ccagcccccc tctctatcgt gtccttgggt

Die Exone (I – III) des *PHOX2B* Gens sind durch Umrandung markiert. Die DNA-Sequenz des Polyalanin-Repeats in Exon III ist **schwarz hinterlegt**. Die Primer sind zur Orientierung in der Primerliste (Anhang B) farbig unterlegt.

B. Primerliste CCHS

Primerliste CCHS	
PA	
PA-f (und PA-F*)	5'- cca ggt ccc aat ccc aac - 3'
PA-r	5'- gag ccc agc ctt gtc cag - 3'
Exon I	
I-f	5'- gac ctc aga caa ggc atc tca - 3'
I-r	5'- aat tac ccc tcc ctg caa tca - 3'
Exon II	
II-f	5'- ctg ccg tat gac ctg acc tt - 3'
II-r	5'- aca gcc aca cca aat cca gt - 3'
Exon III – nested PCR	
1. Schritt	
IIIa-f	5'- cga agt aga act tgg gcc acc - 3'
IIIa-r	5'- ggc agc agc gac aat agc - 3'
2. Schritt	
III-f	5'- acc cta acc ggt gct ttt - 3'
III-r	5'- aca ata gcc ttg ggc cta cc - 3'

*fluoreszenzmarkiert

Die Primer sind zur Orientierung im Genom (Anhang A) farbig unterlegt.

C. Fragebogen Verdacht auf Neurochristopathie/Undine–Syndrom

C. Fragebogen Verdacht auf Neurochristopathie/Undine-Syndrom

Fragebogen Verdacht auf Neurochristopathie/Undine-Syndrom				
Einsender (Stempel)	Patient:			
	Geschlecht:			
	Geburtsdatum:			
Dr. von Haunersches Kinderspital der Universität München Arbeitsgruppe PD Dr. Holzinger Lindwurmstr. 4 80337 München	Hauptsymptome: <div style="text-align: right; font-weight: bold; font-size: small;">Bitte vorhandene Arztbriefe beilegen!</div>			
	JA	NEIN	UNKLAR	ANMERKUNGEN
Lungenfehlbildung bekannt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Beatmung notwendig	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
wenn ja				
im Schlaf	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
im Wachzustand	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hypoventilation im Schlaf	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
wenn ja				
mit Erwachen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ohne Erwachen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hyperkapnien aufgetreten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
wenn ja				
im Schlaf	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
im Wachzustand	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hyperkapnietest durchgeführt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hyperkapnietest pathologisch	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tracheostoma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Cardiovaskulär:				
Herzfehler bekannt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Arrhythmien	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Bewusstseinsverlust	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
plötzliche Gesichtsrötung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kopfschmerzen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kalte Extremitäten / Akren	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Blutdruckkrisen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

C. Fragebogen Verdacht auf Neurochristopathie/Undine-Syndrom

	JA	NEIN	UNKLAR	ANMERKUNGEN
Gastrointestinaltrakt:				
oral voll ernährbar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
rezidivierendes Erbrechen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Gastroösophagealer Reflux	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
M. Hirschsprung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
wenn ja				
histologisch gesichert?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Verstopfung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Diarrhoe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Gastrostoma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Anus präter	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Neurologie:				
Intrakranielle Fehlbildungen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Z. n. Asphyxie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Z. n. Hirnblutung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
OAE's ableitbar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Krämpfe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
verstärkte Tränensekretion	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Ophthalmologie:				
Pupillenomalien	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
lichtstarre Pupillen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Strabismus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Miosis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Ptosis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Neoplasien:				
Neuroblastom	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Ganglioneurom	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Ganglioneuroblastom	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Schilddrüsen CA (medullär)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Phäochromozytom	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Karzinoid	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Erhöhte Katecholamin- ausscheidung im Urin	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

C. Fragebogen Verdacht auf Neurochristopathie/Undine-Syndrom

	JA	NEIN	UNKLAR	ANMERKUNGEN
Durchgeführte Diagnostik:				
CCT	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
MRT Schädel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Gesamt Carnitin gemessen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Rektumbiopsie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
weitere Darmbiopsie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
EKG	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Echokardiogramm	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hyperkapnietest	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Bronchoskopie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Ausschluß neuromuskulärer Erkrankungen				
Elektromyogramm	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Nervenleitgeschwindigkeit normal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Muskelbiopsie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Schwangerschaftsanamnese:				
Frühgeburtlichkeit	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Übertragung	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Silentes CTG	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
sonstiges pathologisches CTG	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Asphyxie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Intubation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Zeitpunkt:				
Reanimation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Apgar Werte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Familienanamnese:				
SIDS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Abort	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Auftreten der genannten				
Symptome in der Familie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
wenn ja				
bei den Eltern	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
bei Geschwistern	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Abkürzungsverzeichnis

A

A	Adenosin
ABS	Apnoe–Bradykardie–Syndrom
ALTE	Apparent Life–Threatening Event – lebensbedrohliches Ereignis
ANS	Autonomes Nervensystem
ATS	American Thoracic Society

B

BDNF	Brain–derived Neurotrophic Factor
------	-----------------------------------

C

C	Cytosin
CCHS	kongenitales zentrales Hypoventilationssyndrom CCHS
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure
CTG	Cardiotokographie

D

DBH	Dopamin– β –Hydroxylase (Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese)
dd	bidestiliert
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm

F

FAM (f)	Primer Fragmentlängenanalyse fluoreszenzmarkiert
---------	--

Abkürzungsverzeichnis

G

G	Guanosin
GDNF	Glial cell line–derived Neurotrophic Factor

H

H ₂ O	Wasser
HCl	Hydrogenchlorid, Chlorwasserstoff (Salzsäure)

I

I-f	Primer Exon I forward
I-r	Primer Exon I reward
II-f	Primer Exon II forward
II-r	Primer Exon II reward
III-f	Primer Exon III forward
III-r	Primer Exon III reward
IIIa-f	Primer Exon IIIa forward
IIIa-r	Primer Exon IIIa reward

K

kb	Kilobasen
----	-----------

L

LO–CCHS	Late–Onset congenital central Hypoventilation Syndrome
---------	--

M

μl	Mikroliter = 10 ⁻⁶ l
M	molar
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Druckangabe) 1 mmHg = 133 Pascal
MRT	Magnetresonanztomographie

N

ng	Nanogramm
nm	Nanometer = 10 ⁻⁹ m
NTP	Nukleosidtriphosphat

O

OD Optische Dichte; Maß für die Abschwächung einer Strahlung nach Durchqueren eines Mediums

P

PA Polyalaninrepeat
PA-f Primer Polyalaninrepeat forward
PA-r Primer Polyalaninrepeat reward
pCO₂ Kohlenstoffdioxid Partialdruck
PCR Polymerase Chain Reaktion (Polymerase Kettenreaktion)
PET Positronen-Emissions-Tomographie
PHOX2B Paired-like homeobox gene
pO₂ Sauerstoffpartialdruck

Q

QC-Puffer Puffer zur Gelextraktion (Qiagen)

R

R-R Abstand Abstand zwischen zwei R-Zacken (Ausdruck der elektrischen Herzkammererregung) im Elektrokardiogramm
REM rapid eye movement – aktive Schlafphase, Traumphase
RNx Transkriptionsfaktor

S

SDS engl.: Sodium Dodecyl Sulfate
SIDS Sudden Infant Death Syndrome – plötzlicher Säuglingstod

T

T Thymin
TBE Tris Borat EDTA

U

U/min Umdrehungen pro Minute
UKG Ultraschallkardiogramm

Literaturverzeichnis

Adachi, M., Browne, D. & Lewis, E. J. (2000), 'Paired-like homeodomain proteins phox2a/arix and phox2b/nbphox have similar genetic organization and independently regulate dopamine beta-hydroxylase gene transcription.', *DNA Cell Biol* **19**(9), 539–554.

URL: <http://dx.doi.org/10.1089/104454900439773>

Albrecht, A. & Mundlos, S. (2005), 'The other trinucleotide repeat: polyalanine expansion disorders.', *Curr Opin Genet Dev* **15**(3), 285–293.

URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2005.04.003>

Amiel, J., Laudier, B., Attié-Bitach, T., Trang, H., de Pontual, L., Gener, B., Trochet, D., Etchevers, H., Ray, P., Simonneau, M., Vekemans, M., Munnich, A., Gaultier, C. & Lyonnet, S. (2003), 'Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene phox2b in congenital central hypoventilation syndrome.', *Nat Genet* **33**(4), 459–461.

URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ng1130>

Antic, N. A., Malow, B. A., Lange, N., McEvoy, R. D., Olson, A. L., Turkington, P., Windisch, W., Samuels, M., Stevens, C. A., Berry-Kravis, E. M. & Weese-Mayer, D. E. (2006), 'PHOX2B mutation-confirmed congenital central hypoventilation syndrome: presentation in adulthood.', *Am J Respir Crit Care Med* **174**(8), 923–927.

URL: <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200605-607CR>

ATS (1999), 'Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: diagnosis and management. american thoracic society.', *Am J Respir Crit Care Med* **160**(1), 368–373.

Axelrod, F. B., Chelimsky, G. G. & Weese-Mayer, D. E. (2006), 'Pediatric autonomic disorders.', *Pediatrics* **118**(1), 309–321.

URL: <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2005-3032>

Bachetti, T., Di Paolo, D., Di Lascio, S., Mirisola, V., Brignole, C., Bellotti, M., Caffa, I., Ferraris, C., Fiore, M., Fornasari, D., Chiarle, R., Borghini, S., Pfeffer, U., Ponzoni, M., Ceccherini, I. & Perri, P. (2010), 'PHOX2B-mediated regulation of ALK expression: in vitro identification of a functional relationship between two genes involved in neuroblastoma.', *PLoS One* **5**(10).

URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013108>

Berry-Kravis, E. M., Zhou, L., Rand, C. M. & Weese-Mayer, D. E. (2006), 'Congenital central hypoventilation syndrome: PHOX2B mutations and phenotype.', *Am J Respir Crit Care Med*

- 174**(10), 1139–1144.
URL: <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200602-305OC>
- Berry, R. B. & Sriram, P. (2009), 'Evaluation of hypoventilation.', *Semin Respir Crit Care Med* **30**(3), 303–314.
URL: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1222443>
- Bolande, R. P. (1997), 'Neurocristopathy: its growth and development in 20 years.', *Pediatr Pathol Lab Med* **17**(1), 1–25.
- Bolk, S., Angrist, M., Xie, J., Yanagisawa, M., Silvestri, J. M., Weese-Mayer, D. E. & Chakravarti, A. (1996), 'Endothelin-3 frameshift mutation in congenital central hypoventilation syndrome.', *Nat Genet* **13**(4), 395–396.
URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ng0896-395>
- Bourdeaut, F., Trochet, D., Janoueix-Lerosey, I., Ribeiro, A., Deville, A., Coz, C., Michiels, J.-F., Lyonnet, S., Amiel, J. & Delattre, O. (2005), 'Germline mutations of the paired-like homeobox 2b (PHOX2B) gene in neuroblastoma.', *Cancer Lett* **228**(1-2), 51–58.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2005.01.055>
- Brown, L. Y. & Brown, S. A. (2004), 'Alanine tracts: the expanding story of human illness and trinucleotide repeats.', *Trends Genet* **20**(1), 51–58.
- Brunet, J.-F. & Pattyn, A. (2002), 'PHOX2B genes - from patterning to connectivity.', *Curr Opin Genet Dev* **12**(4), 435–440.
- Croaker, G. D., Shi, E., Simpson, E., Cartmill, T. & Cass, D. T. (1998), 'Congenital central hypoventilation syndrome and hirschsprung's disease.', *Arch Dis Child* **78**(4), 316–322.
- Cseke, A. (2008). 'Undine-Syndrom - Ein Leben mit der Beatmungsmaschine/Medizin und Pflege sowie Perspektiven für betroffene Kinder und deren Familien'.
URL: www.undinesyndrom.de
- Dauger, S., Pattyn, A., Lofaso, F., Gaultier, C., Goridis, C., Gallego, J. & Brunet, J.-F. (2003), 'PHOX2B controls the development of peripheral chemoreceptors and afferent visceral pathways.', *Development* **130**(26), 6635–6642.
URL: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.00866>
- de la Motte Fouqué, F. (1811), 'Undine, Erzählung', *dtv Bibliothek der Erstaussgaben, originalgetreu nach dem Text von 1811* p. 144.
- Devriendt, K., Fryns, J. P., Naulaers, G., Devlieger, H. & Alliet, P. (2000), 'Neuroblastoma in a mother and congenital central hypoventilation in her daughter: variable expression of the same genetic disorder?', *Am J Med Genet* **90**(5), 430–431.
- Diedrich, A., Malow, B. A., Antic, N. A., Sato, K., McEvoy, R. D., Mathias, C. J., Robertson, D., Berry-Kravis, E. M. & Weese-Mayer, D. E. (2007), 'Vagal and sympathetic heart rate and blood

- pressure control in adult onset PHOX2B mutation-confirmed congenital central hypoventilation syndrome.', *Clin Auton Res* **17**(3), 177–185.
URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s10286-007-0421-4>
- Dubreuil, V., Hirsch, M.-R., Jouve, C., Brunet, J.-F. & Golidis, C. (2002), 'The role of PHOX2B in synchronizing pan-neuronal and type-specific aspects of neurogenesis.', *Development* **129**(22), 5241–5253.
- Dubreuil, V., Hirsch, M. R., Pattyn, A., Brunet, J. F. & Golidis, C. (2000), 'The PHOX2B transcription factor coordinately regulates neuronal cell cycle exit and identity.', *Development* **127**(23), 5191–5201.
- Durand, E., Dauger, S., Pattyn, A., Gaultier, C., Golidis, C. & Gallego, J. (2005), 'Sleep-disordered breathing in newborn mice heterozygous for the transcription factor PHOX2B', *Am J Respir Crit Care Med* **172**(2), 238–43.
- Eckert, K. A. & Kunkel, T. A. (1991), 'DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction.', *PCR Methods Appl* **1**(1), 17–24.
- Elworthy, S., Pinto, J. P., Pettifer, A., Cancela, M. L. & Kelsh, R. N. (2005), 'PHOX2B function in the enteric nervous system is conserved in zebrafish and is sox10-dependent.', *Mech Dev* **122**(5), 659–669.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2004.12.008>
- Feldman, J. L., Mitchell, G. S. & Nattie, E. E. (2003), 'Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity.', *Annu Rev Neurosci* **26**, 239–266.
URL: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131103>
- Fine-Goulden, M. R., Manna, S. & Durward, A. (2009), 'Cor pulmonale due to congenital central hypoventilation syndrome presenting in adolescence.', *Pediatr Crit Care Med* **10**(4), e41–e42.
URL: <http://dx.doi.org/10.1097/PCC.0b013e318198b219>
- Fisher, W. L. (1991), 'CCHS and home care.', *Home Healthc Nurse* **9**(5), 41–44.
- Fitze, G., Paditz, E., Schläfke, M., Kuhlisch, E., Roesner, D. & Schackert, H. K. (2003), 'Association of germline mutations and polymorphisms of the RET proto-oncogene with idiopathic congenital central hypoventilation syndrome in 33 patients.', *J Med Genet* **40**(2), E10.
- Fleming, P. J., Cade, D., Bryan, M. H. & Bryan, A. C. (1980), 'Congenital central hypoventilation and sleep state.', *Pediatrics* **66**(3), 425–428.
- Gaultier, C. (2002), 'Congenital central hypoventilation alveolar syndrome: an orphan disorder', Second International Symposium on CCHS. Faculté de Médecine Bichat, Université Paris.
- Gaultier, C., Dauger, S., Simonneau, M. & Gallego, J. (2003), 'Genes modulating chemical breathing control: lessons from mutant animals.', *Respir Physiol Neurobiol* **136**(2-3), 105–114.

Literaturverzeichnis

- Gaultier, C. & Gallego, J. (2005), 'Development of respiratory control: evolving concepts and perspectives.', *Respir Physiol Neurobiol* **149**(1-3), 3–15.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2005.04.018>
- Gaultier, C. & Gallego, J. (2008), 'Neural control of breathing: insights from genetic mouse models.', *J Appl Physiol* **104**(5), 1522–1530.
URL: <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.01266.2007>
- Gaultier, C. & Guilleminault, C. (2001), 'Genetics, control of breathing, and sleep-disordered breathing: a review.', *Sleep Med* **2**(4), 281–295.
- Gaultier, C., Trang, H., Darger, S. & Gallego, J. (2005), 'Pediatric disorders with autonomic dysfunction: what role for PHOX2B?', *Pediatr Res* **58**(1), 1–6.
URL: <http://dx.doi.org/10.1203/01.PDR.0000166755.29277.C4>
- Giraudoux, J. (1939), 'Ondine'. Undine nach der Erzählung von Friedrich de la Motte Fouqué.
- Graur, D. & WenHsiung, L. (1999), *Fundamentals of Molecular Evolution*.
- Gronli, J. O., Santucci, B. A., Leurgans, S. E., Berry-Kravis, E. M. & Weese-Mayer, D. E. (2008), 'Congenital central hypoventilation syndrome: PHOX2B genotype determines risk for sudden death.', *Pediatr Pulmonol* **43**(1), 77–86.
URL: <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.20744>
- Guilleminault, C., Briskin, J. G., Greenfield, M. S. & Silvestri, R. (1981), 'The impact of autonomic nervous system dysfunction on breathing during sleep.', *Sleep* **4**(3), 263–278.
- Haddad, G. G., Mazza, N. M., Defendini, R., Blanc, W. A., Driscoll, J. M., Epstein, M. A., Epstein, R. A. & Mellins, R. B. (1978), 'Congenital failure of automatic control of ventilation, gastrointestinal motility and heart rate.', *Medicine (Baltimore)* **57**(6), 517–526.
- Hammel, M., Klein, M., Trips, T., Priessmann, H., Ankermann, T. & Holzinger, A. (2009), 'Congenital central hypoventilation syndrome due to PHOX2B gene defects: inheritance from asymptomatic parents.', *Klin Padiatr* **221**(5), 286–289.
URL: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1220941>
- Holzinger, A., Mittal, R. A., Kachel, W., Priessmann, H., Hammel, M., Ihrler, S., Till, H. & Münch, H.-G. (2005), 'A novel 17 bp deletion in the PHOX2B gene causes congenital central hypoventilation syndrome with total aganglionosis of the small and large intestine.', *Am J Med Genet A* **139**(1), 50–51.
URL: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.30975>
- Huang, J., Colrain, I. M., Panitch, H. B., Tapia, I. E., Schwartz, M. S., Samuel, J., Pepe, M., Bandla, P., Bradford, R., Mosse, Y. P., Maris, J. M. & Marcus, C. L. (2008), 'Effect of sleep stage on breathing in children with central hypoventilation.', *J Appl Physiol* **105**(1), 44–53.
URL: <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.01269.2007>

- Huber, K. & Ernsberger, U. (2006), 'Cholinergic differentiation occurs early in mouse sympathetic neurons and requires PHOX2B.', *Gene Expr* **13**(2), 133–139.
- Huber, K., Karch, N., Ernsberger, U., Goidis, C. & Unsicker, K. (2005), 'The role of PHOX2B in chromaffin cell development.', *Dev Biol* **279**(2), 501–508.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.01.007>
- Hung, C.-C., Su, Y.-N., Tsao, P.-N., Chen, P.-C., Lin, S.-J., Lin, C.-H., Mu, S.-C., Liu, C.-A., Chang, Y.-C., Lin, W.-L., Hsieh, W.-S. & Hsu, S.-M. (2007), 'Unequal crossover recombination - population screening for PHOX2B gene polyalanine polymorphism using CE.', *Electrophoresis* **28**(6), 894–899.
URL: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200600383>
- Karenberg, A. (2005), *Amor, Äskulap und Co: Klassische Mythologie in der Sprache der modernen Medizin*, 1. edn, Schattauer, Stuttgart.
- Klinke, R., Pape, H.-C. & Silbernagl, S. (2005), *Physiologie*, 5. edn, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Lemke, B., Nowak, D. & Pfeiffer, D. (2005), 'Leitlinien zur Herzschrittmachertherapie', *Zeitschrift für Kardiologie* **94**, 704–720.
- Longo, L., Borghini, S., Schena, F., Parodi, S., Albino, D., Bachetti, T., Da Prato, L., Truini, M., Gambini, C., Tonini, G. P., Ceccherini, I. & Perri, P. (2008), 'PHOX2A and PHOX2B genes are highly co-expressed in human neuroblastoma.', *Int J Oncol* **33**(5), 985–991.
- Maitra, A., Shine, J., Henderson, J. & Fleming, P. (2004), 'The investigation and care of children with congenital central hypoventilation syndrome', *Current Paediatrics* **14**(4), 354–360.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0957583904000429>
- Mamedov, T. G., Pienaar, E., Whitney, S. E., TerMaat, J. R., Carvill, G., Goliath, R., Subramanian, A. & Viljoen, H. J. (2008), 'A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates.', *Comput Biol Chem* **32**(6), 452–457.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2008.07.021>
- Marazita, M. L., Maher, B. S., Cooper, M. E., Silvestri, J. M., Huffman, A. D., Smok-Pearsall, S. M., Kowal, M. H. & Weese-Mayer, D. E. (2001), 'Genetic segregation analysis of autonomic nervous system dysfunction in families of probands with idiopathic congenital central hypoventilation syndrome.', *Am J Med Genet* **100**(3), 229–236.
- Marcus, C. L. (2001), 'Sleep-disordered breathing in children.', *Am J Respir Crit Care Med* **164**(1), 16–30.
- Marcus, C. L., Jansen, M. T., Poulsen, M. K., Keens, S. E., Nield, T. A., Lipsker, L. E. & Keens, T. G. (1991), 'Medical and psychosocial outcome of children with congenital central hypoventilation syndrome.', *J Pediatr* **119**(6), 888–895.

Literaturverzeichnis

- Matera, I., Bachetti, T., Puppo, F., Di Duca, M., Morandi, F., Casiraghi, G. M., Cilio, M. R., Hennekam, R., Hofstra, R., Schöber, J. G., Ravazzolo, R., Ottonello, G. & Ceccherini, I. (2004), 'PHOX2B mutations and polyalanine expansions correlate with the severity of the respiratory phenotype and associated symptoms in both congenital and late onset central hypoventilation syndrome.', *J Med Genet* **41**(5), 373–380.
- McConville, C., Reid, S., Baskcomb, L., Douglas, J. & Rahman, N. (2006), 'PHOX2B analysis in non-syndromic neuroblastoma cases shows novel mutations and genotype-phenotype associations.', *Am J Med Genet A* **140**(12), 1297–1301.
URL: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.31278>
- McCrimmon, D. R., Mitchell, G. S. & Alheid, G. F. (2008), 'Overview: the neurochemistry of respiratory control.', *Respir Physiol Neurobiol* **164**(1-2), 1–2.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2008.07.021>
- Mellins, R. B., Balfour, Jr, H., Turino, G. M. & Winters, R. W. (1970), 'Failure of automatic control of ventilation (ondine's curse). Report of an infant born with this syndrome and review of the literature.', *Medicine (Baltimore)* **49**(6), 487–504.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. (1988), 'A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.', *Nucleic Acids Res* **16**(3), 1215.
- Mullan, S. & Hosobuchi, Y. (1968), 'Respiratory hazards of high cervical percutaneous cordotomy.', *J Neurosurg* **28**(4), 291–297.
URL: <http://dx.doi.org/10.3171/jns.1968.28.4.0291>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986), 'Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263–273.
- Musso, M., Bocciardi, R., Parodi, S., Ravazzolo, R. & Ceccherini, I. (2006), 'Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences.', *J Mol Diagn* **8**(5), 544–550.
URL: <http://dx.doi.org/10.2353/jmoldx.2006.060058>
- Nannapaneni, R., Behari, S., Todd, N. V. & Mendelow, A. D. (2005), 'Retracing 'ondine's curse'.', *Neurosurgery* **57**(2), 354–363.
- Otto, B. (2001), *Unterwasser-Literatur. Von Wasserfrauen und Wassermännern*, Königshausen & Neumann, Würzburg.
- Ou-Yang, M.-C., Yang, S.-N., Hsu, Y.-M., Ou-Yang, M.-H., Haung, H.-C., Lee, S.-Y., Hsieh, W.-S., Su, Y.-N. & Liu, C.-A. (2007), 'Concomitant existence of total bowel aganglionosis and congenital central hypoventilation syndrome in a neonate with PHOX2B gene mutation.', *J Pediatr Surg* **42**(2), e9–11.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2006.10.022>

- Paracelsus (1581), 'Liber de nymphis, sylphis, pygmaeis et salamandris et de caeteris spiritibus'.
- Parodi, S., Bachetti, T., Lantieri, F., Di Duca, M., Santamaria, G., Ottonello, G., Matera, I., Ravazzolo, R. & Ceccherini, I. (2008), 'Parental origin and somatic mosaicism of PHOX2B mutations in congenital central hypoventilation syndrome.', *Hum Mutat* **29**(1), 206.
URL: <http://dx.doi.org/10.1002/humu.9516>
- Pattyn, A., Golidis, C. & Brunet, J. F. (2000), 'Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene PHOX2B.', *Mol Cell Neurosci* **15**(3), 235–243.
URL: <http://dx.doi.org/10.1006/mcne.1999.0826>
- Pattyn, A., Hirsch, M., Golidis, C. & Brunet, J. F. (2000), 'Control of hindbrain motor neuron differentiation by the homeobox gene PHOX2B.', *Development* **127**(7), 1349–1358.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Golidis, C. & Brunet, J. F. (1997), 'Expression and interactions of the two closely related homeobox genes PHOX2A and PHOX2B during neurogenesis.', *Development* **124**(20), 4065–4075.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Golidis, C. & Brunet, J. F. (1999), 'The homeobox gene PHOX2B is essential for the development of autonomic neural crest derivatives.', *Nature* **399**(6734), 366–370.
URL: <http://dx.doi.org/10.1038/20700>
- Patwari, P. P., Carroll, M. S., Rand, C. M., Kumar, R., Harper, R. & Weese-Mayer, D. E. (2010), 'Congenital central hypoventilation syndrome and the PHOX2B gene: a model of respiratory and autonomic dysregulation.', *Respir Physiol Neurobiol* **173**(3), 322–335.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2010.06.013>
- Perri, P., Bachetti, T., Longo, L., Matera, I., Seri, M., Tonini, G. P. & Ceccherini, I. (2005), 'PHOX2B mutations and genetic predisposition to neuroblastoma.', *Oncogene* **24**(18), 3050–3053.
URL: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208532>
- Poceta, J. S., Strandjord, T. P., Badura, Jr, R. & Milstein, J. M. (1987), 'Ondine curse and neurocristopathy.', *Pediatr Neurol* **3**(6), 370–372.
- Putnam, R. W., Conrad, S. C., Gdovin, M. J., Erlichman, J. S. & Leiter, J. C. (2005), 'Neonatal maturation of the hypercapnic ventilatory response and central neural CO₂ chemosensitivity.', *Respir Physiol Neurobiol* **149**(1-3), 165–179.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2005.03.004>
- Rechtschaffen, A. & Kales, A. (1968), A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects., Technical report, US Government Printing Office.
- Repetto, G. M., Corrales, R. J., Abara, S. G., Zhou, L., Berry-Kravis, E. M., Rand, C. M. & Weese-Mayer, D. E. (2009), 'Later-onset congenital central hypoventilation syndrome due to a

Literaturverzeichnis

- heterozygous 24-polyalanine repeat expansion mutation in the PHOX2B gene.', *Acta Paediatr* **98**(1), 192–195.
URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.01039.x>
- Rohrer, T., Trachsel, D., Engelcke, G. & Hammer, J. (2002), 'Congenital central hypoventilation syndrome associated with hirschsprung's disease and neuroblastoma: case of multiple neurocristopathies.', *Pediatr Pulmonol* **33**(1), 71–76.
- Rudzinski, E. & Kapur, R. P. (2010), 'PHOX2B immunolocalization of the candidate human retrotrapezoid nucleus.', *Pediatr Dev Pathol* **13**(4), 291–299.
URL: <http://dx.doi.org/10.2350/09-07-0682-OA.1>
- Saluto, A., Brussino, A., Tassone, F., Arduino, C., Cagnoli, C., Pappi, P., Hagerman, P., Migone, N. & Brusco, A. (2005), 'An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile x mental retardation 1 gene.', *J Mol Diagn* **7**(5), 605–612.
URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60594-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60594-6)
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977), 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.', *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12), 5463–5467.
- Sasaki, A., Kanai, M., Kijima, K., Akaba, K., Hashimoto, M., Hasegawa, H., Otaki, S., Koizumi, T., Kusuda, S., Ogawa, Y., Tuchiya, K., Yamamoto, W., Nakamura, T. & Hayasaka, K. (2003), 'Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome.', *Hum Genet* **114**(1), 22–26.
URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-003-1036-z>
- Schöber, J. G., Neumayer, S., Meisner, H. & von Kries, R. (1994), 'Prävalenz und Inzidenz des Ondine-Syndroms in Deutschland', *Monatsschrift Kinderheilkunde* **142**.
- Severinghaus JW, M. R. (1962), 'Ondine's curse - failure of respiratory center automaticity while awake', *Clinical Research* **10**, 122.
- Shea, S. A., Andres, L. P., Paydarfar, D., Banzett, R. B. & Shannon, D. C. (1993), 'Effect of mental activity on breathing in congenital central hypoventilation syndrome.', *Respir Physiol* **94**(3), 251–263.
- Silvestri, J. M., Chen, M. L., Weese-Mayer, D. E., McQuitty, J. M., Carveth, H. J., Nielson, D. W., Borowitz, D. & Cerny, F. (2002), 'Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: the next generation.', *Am J Med Genet* **112**(1), 46–50.
URL: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.10819>
- Silvestri, J. M., Weese-Mayer, D. E. & Flanagan, E. A. (1995), 'Congenital central hypoventilation syndrome: cardiorespiratory responses to moderate exercise, simulating daily activity.', *Pediatr Pulmonol* **20**(2), 89–93.
- Southard-Smith, M. (2008), 'Expression of PHOX2B in the developing gut revealed in a transgenic mouse embryo by cerulean fluorescent protein (magnification 48,5x)', *Developmental Dynamics* **237**(4), 1119–1132.

- Spengler, C. M., Gozal, D. & Shea, S. A. (2001), 'Chemoreceptive mechanisms elucidated by studies of congenital central hypoventilation syndrome.', *Respir Physiol* **129**(1-2), 247–255.
- Strauser, L. M., Helikson, M. A. & Tobias, J. D. (1999), 'Anesthetic care for the child with congenital central alveolar hypoventilation syndrome (ondine's curse).', *J Clin Anesth* **11**(5), 431–437.
- Talikka, M., Stefani, G., Brivanlou, A. H. & Zimmerman, K. (2004), 'Characterization of xenopus PHOX2A and PHOX2B defines expression domains within the embryonic nervous system and early heart field.', *Gene Expr Patterns* **4**(5), 601–607.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.modgep.2004.01.012>
- Tirupathi, S., Webb, D. W., Phelan, E., Butler, K. & McMenemy, J. B. (2008), 'Central hypoventilation syndrome after haemophilus influenzae type b meningitis and herpes infection.', *Pediatr Neurol* **39**(5), 358–360.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2008.07.024>
- Trang, H., Dehan, M., Beaufile, F., Zaccaria, I., Amiel, J. & Gaultier, C. (2005), 'The french congenital central hypoventilation syndrome registry: general data, phenotype, and genotype.', *Chest* **127**(1), 72–79.
- Trang, H., Girard, A., Laude, D. & Elghozi, J.-L. (2005), 'Short-term blood pressure and heart rate variability in congenital central hypoventilation syndrome (ondine's curse).', *Clin Sci (Lond)* **108**(3), 225–230.
URL: <http://dx.doi.org/10.1042/CS20040282>
- Trang, H., Laudier, B., Trochet, D., Munnich, A., Lyonnet, S., Gaultier, C. & Amiel, J. (2004), 'PHOX2B gene mutation in a patient with late-onset central hypoventilation.', *Pediatr Pulmonol* **38**(4), 349–351.
URL: <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.20074>
- Trochet, D., Hong, S. J., Lim, J. K., Brunet, J.-F., Munnich, A., Kim, K.-S., Lyonnet, S., Golidis, C. & Amiel, J. (2005), 'Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction.', *Hum Mol Genet* **14**(23), 3697–3708.
URL: <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi401>
- Trochet, D., O'Brien, L. M., Gozal, D., Trang, H., Nordenskjöld, A., Laudier, B., Svensson, P.-J., Uhrig, S., Cole, T., Niemann, S., Munnich, A., Gaultier, C., Lyonnet, S. & Amiel, J. (2005), 'PHOX2B genotype allows for prediction of tumor risk in congenital central hypoventilation syndrome.', *Am J Hum Genet* **76**(3), 421–426.
URL: <http://dx.doi.org/10.1086/428366>
- van de Borne, P. (2005), 'New evidence of baroreflex dysfunction in congenital central hypoventilation syndrome.', *Clin Sci (Lond)* **108**(3), 215–216.
URL: <http://dx.doi.org/10.1042/CS20040360>

Literaturverzeichnis

- van Limpt, V., Schramm, A., van Lakeman, A., Sluis, P., Chan, A., van Noesel, M., Baas, F., Caron, H., Eggert, A. & Versteeg, R. (2004), 'The PHOX2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas.', *Oncogene* **23**(57), 9280–9288.
URL: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1208157>
- Vanderlaan, M., Holbrook, C. R., Wang, M., Tuell, A. & Gozal, D. (2004), 'Epidemiologic survey of 196 patients with congenital central hypoventilation syndrome.', *Pediatr Pulmonol* **37**(3), 217–229.
URL: <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.10438>
- Viemari, J.-C. (2008), 'Noradrenergic modulation of the respiratory neural network.', *Respir Physiol Neurobiol* **164**(1-2), 123–130.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2008.06.016>
- Weese-Mayer, D. E., Berry-Kravis, E. M., Ceccherini, I. & Rand, C. M. C. (2008), 'Congenital central hypoventilation syndrome (CCHS) and sudden infant death syndrome (SIDS): kindred disorders of autonomic regulation.', *Respir Physiol Neurobiol* **164**(1-2), 38–48.
URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2008.05.011>
- Weese-Mayer, D. E., Berry-Kravis, E. M. & Marazita, M. L. (2005), 'In pursuit (and discovery) of a genetic basis for congenital central hypoventilation syndrome', *Respir Physiol Neurobiol* **149**(1-3), 73–82.
- Weese-Mayer, D. E., Berry-Kravis, E. M., Zhou, L., Maher, B. S., Silvestri, J. M., Curran, M. E. & Marazita, M. L. (2003), 'Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: analysis of genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development and identification of mutations in PHOX2B.', *Am J Med Genet A* **123A**(3), 267–278.
URL: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.20527>
- Weese-Mayer, D. E., Bolk, S., Silvestri, J. M. & Chakravarti, A. (2002), 'Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: evaluation of brain-derived neurotrophic factor genomic DNA sequence variation.', *Am J Med Genet* **107**(4), 306–310.
- Weese-Mayer, D. E., Rand, C. M., Berry-Kravis, E. M., Jennings, L. J., Loghmanee, D. A., Patwari, P. P. & Ceccherini, I. (2009), 'Congenital central hypoventilation syndrome from past to future: model for translational and transitional autonomic medicine.', *Pediatr Pulmonol* **44**(6), 521–535.
URL: <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.21045>
- Weese-Mayer, D. E., Silvestri, J. M., Huffman, A. D., Smok-Pearsall, S. M., Kowal, M. H., Maher, B. S., Cooper, M. E. & Marazita, M. L. (2001), 'Case/control family study of autonomic nervous system dysfunction in idiopathic congenital central hypoventilation syndrome.', *Am J Med Genet* **100**(3), 237–245.
- Weese-Mayer, D. E., Silvestri, J. M., Marazita, M. L. & Hoo, J. J. (1993), 'Congenital central hypoventilation syndrome: inheritance and relation to sudden infant death syndrome.', *Am J*

- Med Genet* **47**(3), 360–367.
URL: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.1320470313>
- Weese-Mayer, D. E., Silvestri, J. M., Menzies, L. J., Morrow-Kenny, A. S., Hunt, C. E. & Hauptman, S. A. (1992), 'Congenital central hypoventilation syndrome: diagnosis, management, and long-term outcome in thirty-two children.', *J Pediatr* **120**(3), 381–387.
- Windisch, W., Hennings, E., Storre, J. H., Matthys, H. & Sorichter, S. (2004), 'Long-term survival of a patient with congenital central hypoventilation syndrome despite the lack of continuous ventilatory support.', *Respiration* **71**(2), 195–198.
URL: <http://dx.doi.org/10.1159/000076685>
- Yang, C., Kim, H. S., Seo, H., Kim, C. H., Brunet, J. F. & Kim, K. S. (1998), 'Paired-like homeodomain proteins, PHOX2A and PHOX2B, are responsible for noradrenergic cell-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene.', *J Neurochem* **71**(5), 1813–1826.
- Young, H. M., Ciampoli, D., Hsuan, J. & Canty, A. J. (1999), 'Expression of RET-, p75(NTR)-, PHOX2A-, PHOX2B-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut.', *Dev Dyn* **216**(2), 137–152.
URL: <http://dx.doi.org/3.0.CO;2-6>
- Zelko, F. A., Nelson, M. N., Leurgans, S. E., Berry-Kravis, E. M. & Weese-Mayer, D. E. (2010), 'Congenital central hypoventilation syndrome: neurocognitive functioning in school age children.', *Pediatr Pulmonol* **45**(1), 92–98.
URL: <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.21170>

Tabellenverzeichnis

1.2. Assoziierte Symptome, Tabelle modifiziert nach Vanderlaan et al. (2004)	12
1.4. Differentialdiagnosen des CCHS, modifiziert nach Marcus (2001) Sleep-disordered Breathing in Children	17
1.5. Nachgewiesene Mutationshäufigkeit bei klinisch gesichertem CCHS. Literaturangaben verschiedener Arbeitsgruppen differieren deutlich. Siehe Kapitel 6.1. auf Seite 69.	22
1.6. Erkrankungen durch Mutationen in Polyalaninrepeaten	22
3.2. Tabelle der nach klinischen Kriterien ausgeschlossenen und zur Methodenbewertung nicht herangezogenen Patienten – Eine Mutation im PA-Repeat konnte bei keinem dieser Patienten nachgewiesen werden	30
3.3. PCR Protokoll Exon I und II <i>PHOX2B</i> Gen	36
3.4. PCR Protokoll Exon III <i>PHOX2B</i> Gen (1. Durchlauf)	37
3.5. PCR Protokoll Exon III <i>PHOX2B</i> Gen (2. Durchlauf – Nested-PCR)	37
3.6. PCR Protokoll PA-Repeat des Exons III <i>PHOX2B</i> Gen	38
3.7. PCR Ansatz Amplifikation PA-Repeat Exon III <i>PHOX2B</i> Gen	38
3.8. PCR Ansatz Amplifikation Exon I und II <i>PHOX2B</i> Gen	38
3.9. PCR Ansatz Amplifikation Exon III <i>PHOX2B</i> Gen – 1. Durchlauf	39
3.10. PCR Ansatz Amplifikation Exon III <i>PHOX2B</i> Gen – 2. Durchlauf	39
3.11. Primerliste CCHS, Quelle (Weese-Mayer et al. 2003)	40
3.12. TBE-Puffer	40
3.13. DNA loading Buffer 6-fach	40
3.14. Ansatz Fragmentlängenanalyse	43
3.15. Programm Fragmentlängenanalyse	43
3.16. Sequenzieransatz und Programm	45
5.1. Indexpatient D 17.1 mit einer 17 bp-Deletion	51
5.2. Patientin E 18.1 mit einer 18 bp-Expansion	54
5.3. Patientin E 18.2 mit einer 18 bp-Expansion	55
5.4. Patientin E 18.3 mit einer 18 bp-Expansion	56
5.5. Patientin E 18.4 mit einer 18 bp-Expansion	57
5.6. Patient E 21.1 mit einer 21 bp-Expansion	57

Tabellenverzeichnis

5.7. Patient E 21.2 mit einer 21 bp–Expansion	58
5.8. Patientin E 17.1 mit einer 17 bp–Expansion	59
5.9. Patient Neuroblastom	60
5.10. Familiärer Fall E 15.II (Tochter)	61
5.11. Familiärer Fall E 15.I (Mutter)	62
5.12. Familie E 39 Patienten 39.1 und 39.2	64
5.14. Genotyp–Phänotyp Korrelation; Vermehrtes Auftreten assoziierter Symptome bei zunehmender Mutationslänge	65
5.15. Genotyp–Phänotyp Gastrointestinale Symptome	66
5.16. Genotyp–Phänotyp Neurologische Symptome	67
5.17. Genotyp–Phänotyp Kardiovaskuläre Symptome	68
6.1. Nachgewiesene Mutationshäufigkeit bei klinisch gesichertem CCHS, Literaturanga- ben verschiedener Arbeitsgruppen	69

Abbildungsverzeichnis

1.1.	J. W. Waterhouse – A Mermaid, 1900, www.suite101.com	1
1.2.	Schlafstadienverlauf nach Rechtschaffen & Kales 1968	5
1.3.	M. Hirschsprung	8
1.4.	Lokalisation der aganglionären Segmente bei Patienten mit M. Hirschsprung modifiziert nach Croaker et al. 1998	9
1.5.	Entwicklung des Neuralrohres (Abbildung modifiziert nach www.embryology.ch)	13
1.6.	Migration und Differenzierung der Neuralleistenzellen während der embryologischen Entwicklung (Abbildung modifiziert nach Gaultier et al. 2005)	14
1.7.	Einflussgrößen auf die autonome Atmungskontrolle, modifiziert nach www.apsu.edu	15
1.8.	Lokalisation <i>PHOX2B</i> auf Chromosom 4 nach www.nature.com	19
1.9.	<i>PHOX2B</i> schematisch	19
1.10.	Aminosäuresequenz <i>PHOX2B</i> Exon 3 mit PA–Repeat (Markierung) bestehend aus 20 Alaninen (Wildtyp)	20
1.11.	Expression von <i>PHOX2B</i> im Gastrointestinaltrakt eines transgenen Mausembryos. Sichtbar gemacht durch die Expression von Cerulean Flurescent Protein (blau–grün), unter der Kontrolle durch den <i>PHOX2B</i> –Promotor. Vergrößerung 48,5–fach (Southard-Smith 2008)	21
3.1.	Genetischer Code, modifiziert nach www.medigenomix.de	34
3.2.	Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Basen nach Graur & WenHsiung (1999)	34
3.3.	Reduktion unspezifischer Banden durch Einsatz von Betain, am Beispiel der Amplifikation des Exon III	36
3.4.	dNTP Kettenverlängerung und ddNTP Kettenabbruch (Modifiziert nach Sanger et al. 1977)	44
3.5.	Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte (Schema) nach www.uni-protokolle.de	44
4.1.	Gelbild Amplifikation PA–Repeat <i>PHOX2B</i> , Rote Linie: Laufweite Wildtypallel 20 Alanine	47
4.2.	<i>PHOX2B</i> PA–Repeat Amplifikation Befunde	48
4.3.	Fragmentlängenanalyse einer 15 bp–Expansion	49
4.4.	Sequenzierreaktion mit Mutation (Doppelgipfel)	50

Abbildungsverzeichnis

5.1. Patient D 17.1 Hyperkapnietest Befunde, erkennbar ist der stabile Herzfrequenzverlauf trotz ansteigender CO ₂ -Werte, Zeichen der Atemnot (Aufregung, Agitation) treten nicht auf	52
5.2. Patient D 17.1, fehlende Pupillenreaktion auf Lichteinfall	52
5.3. Pat. D 17.1 Abdomen-Leeraufnahme, Kontrastmittel im Darm von 14 Tage zurückliegender Untersuchung nachweisbar	53
5.4. Stammbaum Familie E 15, klinisch gesunde Mutter Genotyp 20/25, Tochter mit Vollbild CCHS Genotyp 20/25	61
5.5. Stammbaum Fam. E 39, zwei betroffene Töchter, V. a. elterliches Keimbahnmosaik, mütterlicher oder väterlicher Ursprung nicht geklärt	63
6.1. Klinisches Procedere bei V. a. CCHS (Empfehlungen angelehnt an Gronli et al. 2008 und Weese-Mayer et al. 2009)	74
6.2. Klinisches Procedere bei Mutationsnachweis im <i>PHOX2B</i> Gen (Empfehlungen angelehnt an Gronli et al. 2008 und Weese-Mayer et al. 2009)	75
6.3. Aktivierung des Dopamin- β -Hydroxylase-Gens (DBH) durch das Genprodukt von <i>PHOX2B</i> , Verschiedene Mutationen bewirken eine veränderte Funktionalität des Transkriptionsfaktors und somit eine veränderte Aktivierung der Luciferase (Leuchtkraft)	77

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Dietrich Reinhardt, dem ehemaligen Direktor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, und seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. Christoph Klein für die Möglichkeit, an ihrer Klinik promovieren zu können.

Mein herzlicher und besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Holzinger. Unter seiner Anleitung lernte ich ein klinisches Problem durch wissenschaftliche Methoden zu erfassen. Mit seinem unerschöpflich erscheinenden molekulargenetischen Wissen stand er mir stets hilfreich und zielführend zur Seite. Ich danke ihm für seine Initiative, die molekulargenetische Diagnostik des Undine-Syndroms in München zu etablieren, die Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und das große und andauernde Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit.

Im Besonderen möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Markus Hammel bedanken, der mich, wohl wie kein anderer, Tag für Tag intensiv betreute, mich in die molekulargenetischen Techniken einarbeitete, und mir bei allen kleineren und größeren Problemen zur Seite stand.

Des Weiteren gilt mein Dank dem gesamten Labor K0.21, die durch ihre Hilfsbereitschaft und die herzliche Arbeitsatmosphäre wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Allen Kollegen und Freunden des Arbeitskreises danke ich für die schöne und interessante gemeinsame Zeit im Kubus. Die Möglichkeit, in einer solch engagierten wie freundschaftlichen Atmosphäre zu forschen, war ein enormer wissenschaftlicher und persönlicher Gewinn.

Herrn Prof. Sven Dittrich, dem Leiter der Kinderkardiologie der Universität Erlangen, danke ich für seine große Unterstützung und seinen Glauben an mich.

Bei meinen Eltern Friedrich und Lieselotte Prießmann, meiner Schwester Christine und ganz besonders bei meinem Ehemann Thomas Ramspeck-Prießmann möchte ich mich für die liebevolle Unterstützung meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung bedanken.

Veröffentlichungen:

Holzinger, A., Kachel, W., Priessmann, H., Ihrler, S., Streiter, M., Bauer, M. & Münch, H.-G. (2004) 'Eine neue Frameshift-Mutation im Phox2b-Gen führt zu zentralem Hypoventilationssyndrom (Undine-Syndrom) mit totaler Aganglionose des Dün- und Dickdarms.', *Z Geburtshilfe Neonatol* **208** Suppl. 1, 32

Holzinger, A., Mittal, R. A., Kachel, W., Priessmann, H., Hammel, M., Ihrler, S., Till, H. & Münch, H.-G. (2005), 'A novel 17 bp deletion in the phox2b gene causes congenital central hypoventilation syndrome with total aganglionosis of the small and large intestine.', *Am J Med Genet A* **139**(1), 50–51

Hammel, M., Klein, M., Trips, T., Priessmann, H., Ankermann, T. & Holzinger, A. (2009) 'Congenital central hypoventilation syndrome due to phox2b gene defects: inheritance from asymptomatic parents.', *Klin Padiatr* **221**(5), 286–289

Vorträge/Poster:

Priessmann H., Hammel, M., Mittal, R. A., Holzinger, A., 'Genetische Diagnostik des kongenitalen zentralen Hypoventilationssyndroms', Vortrag, 31. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI), Magdeburg 2005

Priessmann H. et al., Hydrops fetalis, Anämie und persistierende Thrombozytopenie bei einem Frühgeborenen der 29. SSW, Postervorstellung, GNPI Tagung 2008

Hiedl S., Priessmann H. et al., Perinatales Management der feto–neonatalen Alloimmunthrombopenie (FAIT–NAIT), Postervorstellung, GNPI Tagung 2009

Buchbeiträge:

Priessmann, H., Heinen, F., Lipidspeicherkrankheiten In: Hufschmidt A., Lücking C. H., Rauer S., *Neurologie Compact*, 4.–6. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart – New York 2009, 369–379

Rosenecker J., Priessmann, H., Die Untersuchung des Kindes – Allgemeine Voraussetzungen und Inspektion und allgemeiner Eindruck – In: Rosenecker J., Schmidt H., *Pädiatrische Anamnese, Untersuchung, Diagnose*, Springer Verlag, Heidelberg 2008, 20–22