Aus dem Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin,

Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie
der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin.

**Dissertation**

# Einfluss von *MBL2*-Varianten auf den pulmonalen Verlauf der zystischen Fibrose

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt von

**Stefan Deckena**

aus Norden/Ostfriesland

| | |
|---|---|
| Gutachter: | 1. Priv. Doz. Dr. med. R. Nickel |
| | 2. Prof. Dr. med. A. Schuster |
| | 3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Ockenga |

Datum der Promotion: 19.09.2008

# Inhaltsverzeichnis

**INHALTSVERZEICHNIS** ..... **1**

**VORWORT** ..... **3**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS** ..... **4**

**1 EINLEITUNG** ..... **5**

1.1 ZYSTISCHE FIBROSE ..... 5

*1.1.1 Pathophysiologie und allgemeine klinische Fakten* ..... *5*

*1.1.2 Genetik der CF* ..... *6*

*1.1.3 CFTR- Genotypen und Phänotypkorrelationen* ..... *7*

*1.1.4 Lungenerkrankung bei CF* ..... *7*

*1.1.5 Typisches Keimspektrum* ..... *9*

1.2 MODIFIER-GENE BEI CF ..... 12

1.3 MANNOSE-BINDENDES LEKTIN (MBL) ..... 12

*1.3.1 Physiologische Funktion* ..... *12*

*1.3.2 Struktur* ..... *13*

*1.3.3 MBL2: Exon-1- und Promotorvarianten* ..... *14*

*1.3.4 Auswirkungen der MBL2-Varianten auf den MBL- Spiegel* ..... *15*

*1.3.5 Klinische Relevanz des MBL- Mangels* ..... *16*

1.4 *MBL2* ALS MODIFIER-GEN BEI CF ..... 17

1.5 FRAGESTELLUNG ..... 19

**2 MATERIAL UND METHODEN** ..... **20**

2.1 POPULATIONEN ..... 20

*2.1.1 CF-Patienten aus Berlin; Einschlusskriterien* ..... *20*

*2.1.2 CF-Patienten aus Prag; Einschlusskriterien* ..... *21*

2.2 MATERIALIEN ..... 21

*2.2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien* ..... *21*

*2.2.2 Software* ..... *23*

2.3 EXPERIMENTELLE METHODIK ..... 23

*2.3.1 Blutentnahme und DNA– Gewinnung* ..... *23*

*2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)* ..... *23*

*2.3.3 Schmelzkurvenanalyse* ..... *24*

2.4 KLINISCHE DATENERHEBUNG ..... 29

*2.4.1 Deutsche CF-Patienten* ..... *29*

*2.4.2 Tschechische CF-Patienten* ..... *30*

2.5 ETHIKKOMMISSION UND EINVERSTÄNDNIS ZUR STUDIENTEILNAHME ..... 30

2.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG ..... 30

**3 ERGEBNISSE** ..... **32**

3.1 DEMOGRAPHISCHE FAKTEN DER UNTERSUCHTEN POPULATIONEN ..... 32
3.2 *CFTR*-GENOTYPEN ..... 33
3.3 *MBL2*: ALLEL-UND GENOTYPFREQUENZEN ..... 34
3.4 LUNGENFUNKTION ..... 35
*3.4.1 Deutsche CF- Population ..... 36*
*3.4.2 Tschechische CF-Population ..... 38*
*3.4.3 Vergleich der $FEV_1$-Werte in der tschechischen und deutschen CF-Populationen . 40*
*3.4.4 $FEV_1$ nach CF-spezifischen Perzentilen ..... 40*
3.5 BAKTERIELLE BESIEDLUNG ..... 41
*3.5.1 Deutsche CF- Population ..... 41*
*3.5.2 Tschechische CF-Population ..... 43*
**4 DISKUSSION ..... 45**
4.1 ZUR VORLIEGENDEN STUDIE UND ROLLE VON MBL BEI CF ..... 45
*4.1.1 Weitere potentiell modifizierende Gene bei CF ..... 45*
*4.1.2 Studienpopulation ..... 49*
*4.1.3 Lungenfunktionsparameter bei CF ..... 50*
*4.1.4 Keimbesiedlung ..... 52*
*4.1.5 MBL bei CF: Schlussfolgerungen ..... 53*
4.2 PROBLEMATIK DER PHÄNOTYPDEFINITION ..... 54
*4.2.1 Lungenfunktionsanalysen ..... 54*
*4.2.2 CF-spezifische $FEV_1$-Perzentilen ..... 55*
*4.2.3 Mikrobiologische Untersuchungen ..... 56*
*4.2.4 Genotypisierung vs. Serumspiegelbestimmung ..... 57*
*4.2.5 Technik der Genotypisierung ..... 58*
4.3 AUSSAGEKRAFT VON ASSOZIATIONSSTUDIEN ..... 59
4.4 EXOGENE EINFLÜSSE IN DER VORLIEGENDEN STUDIE ..... 60
*4.4.1 Gen-Umwelt-Einflüsse ..... 60*
*4.4.2 Gen-Gen-Interaktionen ..... 61*
4.5 MBL ..... 61
*4.5.1 Ethnische Unterschiede ..... 61*
*4.5.2 MBL-Substitution ..... 62*
4.6 AUSBLICK ..... 62
**5 ZUSAMMENFASSUNG ..... 64**
**6 LITERATURVERZEICHNIS ..... 66**
**7 LEBENSLAUF ..... 74**
**8 DANKSAGUNG ..... 75**
**9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG ..... 77**

# Vorwort

Die Mukoviszidose oder zystische Fibrose (CF) ist die im europäischen Raum häufigste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung.

Genetik und Pathophysiologie der CF sind inzwischen weitgehend verstanden. Trotz aller Fortschritte in der Therapie, abzulesen an einer deutlichen Verlängerung des mittleren Überlebens, ist die Krankheit aber noch immer nicht heilbar. Die Patienten versterben in den meisten Fällen an respiratorischer Insuffizienz.

Es wird immer deutlicher, dass modifizierende Gene eine wichtige Rolle im interindividuellen Verlauf zwischen einzelnen Patienten spielen müssen. Insbesondere betrifft dies den Grad der pulmonalen Beteiligung.

Studien zu diesen „Modifier-Genen" sind zum Teil auf einzelne Kohorten mit geringen Fallzahlen beschränkt und manche Assoziationen ließen sich nur einmalig zeigen, waren danach aber von anderen Autoren nicht mehr nachweisbar. So bleibt der Bedarf nach weiteren Studien groß, da sich aus der Analyse von krankheitsmodifizierenden Genen potentielle Behandlungsansätze ergeben. Diese Arbeit soll den Einfluss von Varianten im Gen für Mannosebindendes Lektin (Gen: *MBL2*) auf den Verlauf der CF untersuchen, nachdem gerade für dieses Protein bzw. das kodierende Gen eine wichtige modifizierende Rolle diskutiert wurde. MBL ist ein aktivierender Faktor des Komplement- und Immunsystems. Anhand von zwei Kollektiven wird untersucht, welchen Einfluss verschiedene Allelvarianten im kodierenden Gen *MBL2* auf den Verlauf der CF haben. Bei deutschen und tschechischen CF-Patienten wurden dazu retrospektiv klinische Daten zur Lungenfunktion und Keimbesiedlung analysiert. Nach Bestimmung des *MBL2*-Genotyps soll sich zeigen, ob der Verlauf der CF tatsächlich vom *MBL2*-Genotyp als diskutiertem Einflussfaktor abhängig ist.

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| α-1-ACT | Alpha-1-Antichymotrypsin |
| α-1-AT | Alpha-1-Antitrypsin |
| β-2–AR | Beta-2-Adrenorezeptor |
| cAMP | Cyklisches Adenosinmonophosphat |
| CC 16 | Clara-Cell-Protein 16 |
| CF | cystic fibrosis, zystische Fibrose |
| CFTR | cystic fibrosis transmembrane conductance regulator |
| COPD | Chronic obstructive pulmonary disease, Chronisch- obstruktive Lungenerkrankung |
| DNA | Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphate |
| et al. | und Mitarbeiter |
| F508del | Delta-F-508- Mutation |
| $FEV_1$ | Forciertes exspiratorisches Volumen der ersten Sekunde |
| FL | Fluoreszein |
| FRET | fluorescence resonance energy transfer |
| FVC | Forcierte Vitalkapazität |
| GST | Glutathion–S–Transferase |
| IL 13 | Interleukin 13 |
| J | Jahre |
| Kb | Kilobase |
| L | Liter |
| LC | Light Cycler® |
| MBL | Mannose-bindendes Lektin |
| MASP | MBL-assoziierte Serinprotease |
| MEF | Mittlerer exspiratorischer Fluß |
| MgCl2 | Magnesiumchlorid |
| Min | Minute(n) |
| µl | Mikroliter |
| mmol | Millimolar |
| p.a. | per annum; pro Jahr |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| Rpm | Rounds per minute; Umdrehungen/Minute |
| S | Sekunde(n) |
| SD | Standard deviation: Standardabweichung |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism |
| TGF-β | Transforming-growth-factor Beta |
| TNF–α | Tumornekrosefaktor Alpha |
| U | units, Einheiten |

# 1 Einleitung

## 1.1 Zystische Fibrose

### 1.1.1 Pathophysiologie und allgemeine klinische Fakten

Die Mukoviszidose oder zystische Fibrose (CF) ist die häufigste autosomal-rezessive Stoffwechselerkrankung im europäischen Raum und tritt mit einer Häufigkeit von ca. 1:2500 Lebendgeburten auf. Schon aus dem Mittelalter sollen Fallberichte existieren, gemäß denen „Kinder, die salzig schmecken, auch früh sterben". Die Erkrankung wurde aber erst 1936 als eigenständiges Syndrom von Fanconi ausführlich beschrieben.[1] Nach der Erkenntnis, daß der Schweiß von CF-Patienten einen erhöhten Natriumchloridgehalt aufweist, wurde im Jahr 1959 ein quantitativer Schweißtest entwickelt, der die Diagnose einer CF über mehrfach erhöhte Natriumchloridwerte im Schweiß ermöglichte und noch heute zu den ersten Schritten der CF-Diagnostik gehört.[2]

Die CF wird durch Mutationen im „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator" (*CFTR*)- Gen ausgelöst und führt zu einer verminderten oder fehlenden Produktion des CFTR-Proteins. CFTR arbeitet als cAMP-gesteuerter, membranüberspannender Anionenkanal in der apikalen Membran exokriner Zellen und reguliert dort den Chloridionentransport.[3] Das *CFTR*-Gen wurde 1989 von Riordan et al. identifiziert.[4] Durch den Gendefekt kommt zu einer erhöhten Viskosität von Sekreten, wodurch an vielen Organen Schäden resultieren. Betroffen sind Gastrointestinaltrakt, Leber, Pankreas, Reproduktionsorgane und ganz allgemein sekretorische Zellen. Bei allen CF-Patienten sind auch Lungen und oberer Respirationstrakt betroffen, wo es regelhaft zu chronischen bakteriellen Infektionen kommt. Die unterschiedlichen Schweregrade der pulmonalen Beteiligung und die Rolle von möglicherweise modifizierenden Genen sind Gegenstand dieser Arbeit. Der Schweregrad insbesondere der

pulmonalen Beteiligung variiert auch bei identischem *CFTR*-Genotyp stark. Es kann daher angenommen werden, dass andere genetische Faktoren bzw. modifizierende Gene eine Bedeutung haben.

Im Mittelpunkt der therapeutischen Bemühungen steht heute die intensive Physiotherapie, eine ausreichende Kalorienzufuhr, Substitution von Pankreasenzymen, die frühzeitige und, bei persistierender Infektion, regelmäßige Behandlung von Infektionen durch orale, intravenöse oder inhalative Antiinfektiva sowie die frühzeitige Therapie anderer Organkomplikationen, z.B. eines Diabetes mellitus.[5,6] Künftige therapeutische Ansätze werden möglicherweise eine somatische Gentherapie beinhalten.[7]

Der größte Teil der CF-Patienten in Westeuropa und den USA wird regelmäßig in speziellen CF-Ambulanzen behandelt. Die Prognose von CF-Patienten hat sich in den letzten Jahren deutlich verbessert. Die Überlebenswahrscheinlichkeit stieg in den USA von 14 Jahren im Jahr 1969 auf 32,9 Jahre im Jahr 2003[8], in Deutschland liegt sie aktuell bei 36,4 Jahren.[9]

Da die Diagnose einer CF typischerweise im Neugeborenen-, Säuglings- oder Kindesalter gestellt wird, liegt die CF- Behandlung primär ganz überwiegend in pädiatrischer Hand. Auch Patienten jenseits des achtzehnten Lebensjahrs werden meist –wie in Berlin- weiterhin in derselben CF-Ambulanz weiterbehandelt.

### 1.1.2 Genetik der CF

Das *CFTR*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 7 lokalisiert und umfasst etwa 250 kb. Es unterteilt sich in 27 Exone und codiert für das 1480 kb große *CFTR*-Protein.[10,11,12] Bislang sind mehr als 1400 verschiedene *CFTR*-Mutationen bekannt, eine aktuelle Version bekannter Mutationen liefert das „Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium".[13]

Mit einer Häufigkeit von weltweit ca. 66% ist die Delta-F-508-Mutation („F508del") am bedeutsamsten, bei der an Position 508 im Exon 10 ein Phenylalanincodon fehlt und stattdessen Arginin gebildet wird.[14] Bei der Häufigkeit dieser Mutation gibt es

große ethnische Unterschiede; während 82% der dänischen CF-Patienten positiv für F508del sind, konnte man die Mutation in der Türkei nur bei 32% aller Betroffenen feststellen.[15]

Man unterteilt die *CFTR*-Mutationen in fünf Klassen: Klasse I-Mutationen haben eine fehlerhafte mRNA-Transkription zufolge. Bei Klasse-II-Mutationen kommt es zur defekten Proteinprozessierung, Klasse III-Mutationen vermindern die Reagibilität des CFTR-Kanals. Klasse-IV- und V- Mutationen beeinflussen die Aktivität bzw. Menge des CFTR-Proteins.[16]

### 1.1.3 CFTR- Genotypen und Phänotypkorrelationen

Zwischen Patienten mit der gleichen *CFTR*- Mutation zeigen sich große Unterschiede hinsichtlich des Phänotyps. Die Häufigkeit einer Pankreasdysfunktion korreliert eher mit dem *CFTR*-Genotyp[17], während der Grad der Lungenbeteiligung nicht mit *CFTR*-Mutationen korreliert.[18,19]

Ausnahmen sind seltene *CFTR*-Genotypen aus den Klassen IV- und V: ΔI507 (Allelfrequenz 1,6%), R117H, 3849+10kB (Allelfrequenzen jeweils 0,7%) und A455E (Allelfrequenz 0,1%). Diese Genotypen gehen mit einem insgesamt milderen Krankheitsverlauf und auch einer besseren Lungenfunktion einher.[20]

Selbst unter Geschwistern mit der gleichen *CFTR*-Mutation besteht allerdings häufig ein deutlicher Unterschied des pulmonalen Schweregrades.[21,22] Diese Erkenntnisse haben dazu geführt, dass mittlerweile eine Vielzahl von potentiell modifizierenden Genen untersucht worden sind.

### 1.1.4 Lungenerkrankung bei CF

Bei der Mukoviszidose kommt es durch eine Sekretretention infolge eines gestörten Salz- und Wassertransportes zu Störungen im Ventilations-Perfusions-Verhältnis der Lungen, zur Ausbildung von Bronchiektasen und Atelektasen und zur Obstruktion der tieferen Atemwege. Infolge einer eingeschränkten mukoziliären Clearance, bedingt

durch die erhöhte Viskosität des Schleims, kann das Sekret nicht oder nur erschwert expektoriert werden. Diese Bedingungen bieten problematischen Keimen eine Angriffsfläche und die Elimination dieser Keime ist stark erschwert. Die Progression der pulmonalen Entzündungsreaktion mit zunehmender respiratorischer Insuffizienz ist maßgeblich für die immer noch hohe Morbidität und Mortalität der Erkrankung.[23]

**Abbildung 1: Röntgen Thorax: Massive Bronchiektasen bei einer 26-jährigen CF-Patientin (nach[24])**

**Abbildung 2: CT Thorax derselben Patientin**

### 1.1.5 Typisches Keimspektrum

Schon bei Kindern häufig vorkommende virale Infekte, insbesondere durch das Respiratory-syncytial-Virus, ziehen bei CF-Patienten häufiger bakterielle Superinfektionen nach sich als bei gesunden Vergleichspopulationen.[25,26]

An bakteriellen Erregern ist im Besonderen die sehr häufige Infektion mit Pseudomonas aeruginosa von großer Bedeutung, da eine resultierende Zerstörung von Schleimhaut, Lungenparenchym und -gerüst zu starker Exazerbation der Erkrankung führen kann. Entsprechend stehen Bemühungen, eine Kolonisation mit bakteriellen Keimen frühzeitig zu erkennen und eine chronische Besiedlung herauszuzögern, im Mittelpunkt der klinischen Betreuung von CF-Patienten.

#### *1.1.5.1 Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)*

P. aeruginosa ist ein aerobes, gramnegatives, stäbchenförmiges und ubiquitär vorkommendes Bakterium, das beim Lungengesunden wenig pathogen ist, bei Immunkomprimierten jedoch als wichtiger opportunistischer Keim aufgefasst werden muß. P. aeruginosa ist mittlerweile der häufigste und prognostisch wichtigste Keim bei der CF.[27] Reservoire für Pseudomonaden stellen feuchte Milieus dar. Das Bakterium verfügt über Virulenzfaktoren, die die Inflammationsreaktionen in der bereits geschädigten Lunge weiter triggern: Proteasen, Exotoxin A, Pyocyanin etc. Der Keim ist zu starker Adhärenz befähigt und siedelt sich primär meist als nichtmukoider Stamm an. Durch Alginat- und Pilusbildung sowie Motilitätsverlust kommt es sekundär häufig zur Umwandlung zu schleimbildenden Stämmen, die vor körpereigenen und auch pharmakologischen Angriffen besser geschützt sind als nichtmukoide Formen.[26,28] Das Spektrum „CF-typischer" Keime, unter denen P. aeruginosa die wichtigste Rolle einnimmt, ist relativ begrenzt. Eine Ursache für die zentrale Stellung von P. aeruginosa könnte sein, dass das CFTR-Membranprotein einen Rezeptor zur Internalisierung und nachfolgenden Inaktivierung von P. aeruginosa darstellt.[7,27,29] Bei fehlerhaftem oder vermindertem CFTR ist diese Clearancefunktion gestört und es kann zu einer höheren alveolären und endobronchialen Konzentration von P. aeruginosa kommen.

Insbesondere mit steigendem Lebensalter der Patienten steigt die Prävalenz einer chronischen Kolonisation mit nachfolgender Inflammationsreaktion. Nach einer Untersuchung der Cystic Fibrosis Foundation weisen in den USA im Alter von 2-5 Jahren etwa 30%, jenseits von 26 Jahren etwa 81% der Patienten eine Kolonisation mit P. aeruginosa auf.[30]

In den 1980er Jahren wurde zunächst angenommen, dass die unter CF-Patienten zunehmende Verbreitung des Keims auf die CF- Behandlung in spezialisierten Zentren zurückzuführen sei.[31,32] Bis vor einiger Zeit wurden die Isolate lediglich phänotypisiert; durch Genotypisierungen stellte sich aber später heraus, dass eine große genetische Variabilität existiert und die Kolonisation bei der Mehrzahl von Patienten nicht nosokomial ist.[27]

Es liegen eine Reihe von Studien vor, die den Zusammenhang zwischen der Besiedlung mit Pseudomonas aeruginosa und dem mittleren Überleben sowie einer Verschlechterung der Lungenfunktion bei CF zeigen.

Im „Wisconsin CF Neonatal Screening Project" beschleunigten sich radiologisch sichtbare Lungenveränderungen nach Besiedlung mit P. aeruginosa signifikant, die jährliche Abnahme der $FEV_1$/FVC-Ratio nahm bei Kindern innerhalb der ersten Lebensjahre inbesondere nach Umwandlung in mukoide Formen zu.[33,34] In einer anderen Studie wurde durch jährliche Bronchiallavagen innerhalb der ersten drei Lebensjahre und anschließende Rachenabstriche der P.- aeruginosa-Status festgestellt. Bis zum Alter von 7 Jahren waren 45% der Patienten besiedelt, das mittlere Alter der Kolonisation lag im 45. Lebensmonat. Die positiven Patienten hatten mit 7 Jahren signifikant niedrigere Lungenfunktionswerte und wiesen eine höhere Hospitalisierungsrate auf.[35] Auch bei erwachsenen CF-Patienten belegen zahlreiche Studien den wichtigen pathophysiologischen Einfluss des Keims.[7,27]

#### *1.1.5.2 Andere häufige Keime*

Staphylococcus aureus (Staph. aureus) ist ein fakultativ anaerobes Bakterium und

auch im Nasenraum gesunder Erwachsener in 10-40% nachweisbar. Bei CF-Patienten findet sich der Keim in bis zu 50% nach den ersten beiden Lebensjahren[36], mit zunehmendem Alter auch im unteren Respirationstrakt.[37] Da die mukoziliäre Clearance bei der CF gestört ist und Staph. aureus besonders zur Adhärenz am CF-typischen, zähen Mukus befähigt ist[38], gelingt es kaum, den Keim wieder zu eliminieren.

Die prognostische Bedeutung einer alleinigen Kolonisation mit Staph. aureus ist dennoch noch nicht geklärt. Eine Infektion mit Staph. aureus ändert die Progredienz der CF offenbar nicht wesentlich[39], obgleich eine Publikation nahe legt, daß es beim gleichzeitigen Vorliegen der auch in dieser Arbeit untersuchten *MBL2*-Varianten zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion kommen könnte.[67] Die Datenmenge scheint jedoch für abschließende Beurteilungen nicht groß genug. Eine Metaanalyse von 13 Studien zum therapeutischem Nutzen staphylokokkenwirksamer Antibiotika zeigte keine Verbesserung der Lungenfunktion durch den Einsatz der Präparate.[40] Nachfolgend stellte sich heraus, dass sich bei regelmäßiger oder kontinuierlicher staphylokokkenwirksamer Antibiotikatherapie das Risiko einer Aquisition von P. aeruginosa erhöht, dessen Bedeutung bei der CF wie oben ausgeführt sehr groß ist.[28]

Burkholderia cepacia (B. cepacia) lässt sich deutlich seltener bei CF-Patienten nachweisen als P. aeruginosa, gewinnt als Keim mit z. T. rasch progredienten Infektionsfolgen jedoch zunehmend an Bedeutung. Die Prävalenz einer Infektion liegt für CF-Patienten bei ca. 6%.[36] Insbesondere in den ersten beiden Jahren nach erstmaliger Infektion ist die Letalität gegenüber nichtinfizierten Kontrollgruppen signifikant erhöht. Besonders werden Patienten mit ohnehin schon geschwächter Abwehrfunktion besiedelt.[41]

Der Schimmelpilz Aspergillus fumigatus kann bei CF-Patienten zu zunächst begrenzten und disseminierten pulmonalen Inflammationsreaktionen führen. Nach Sensibilisierung gegen Pilzantigene können sich IgE- und IgG-vermittelte Reaktionen bis zur allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) mit z.T. schwerer respiratorischer Insuffizienz, chronischen granulomatösen Veränderungen und zentralen Bronchiektasen entwickeln.[28]

## 1.2 Modifier-Gene bei CF

Nach Identifikation des *CFTR*-Gens 1989 stellte sich heraus, daß unterschiedliche Mutationen im *CFTR*-Gen nur sehr bedingt Einfluss auf den Schweregrad der Erkrankung haben. Es wurden daher in den folgenden Jahren und bis heute unterschiedliche (Nicht-*CFTR*) Gene dargestellt, die ihrerseits den Verlauf der CF beeinflussen sollen. Unter diesen sind Gene für Zytokine wie Transforming growth factor−Beta (TGF−β)[42,43,49] und Tumornekrosefaktor Alpha (TNF−α)[42-44,50], der Beta-2-Adrenorezeptor (β-2-AR)[46-49] sowie das Angiotensin-I- Converting Enzyme (ACE)[50]. Alpha-1−Antichymotrypsin (α1−ACT) und Alpha-1-Antitrypsin (α1−AT) als Proteaseinhibitoren folgten.[51-55] Auch für Genpolymorphismen für Antioxidantien wie den Glutathion−S−Transferasen (GST)[45,56,57] und NO-Synthethasen[58] wurden in unterschiedlichem Maße Einflüsse beschrieben.

Einer der wichtigsten Bestandteile des angeborenen, unspezifischen Immunsystems und Aktivator von Komplementreaktionen, das Mannose-bindende Lektin (MBL), wird seit einigen Jahren als modifizierender Faktor bei der CF diskutiert. Auch die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zentral mit dem Einfluss von MBL und den Polymorphismen im kodierenden Gen *MBL2* auf den Verlauf bei der CF.

Nachfolgend werden dieses Protein und sein kodierendes Gen daher ausführlicher dargestellt.

## 1.3 Mannose-bindendes Lektin (MBL)

### 1.3.1 Physiologische Funktion

Das in der Leber synthetisierte MBL gehört zur Familie der Kollektine. MBL bindet kalziumabhängig an Oligosaccharide wie Mannose und N-Acetylglukosamine, die auf vielen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen, Viren und Protozoen vorkommen.[59]

MBL kann nach der Bindung an diese Oberflächenmoleküle direkt oder im Zusammenspiel mit MBL-assoziierten Serinproteasen (MASP 1-3) und dem sogenannten MBL-assoziierten Protein (MAP19) die Komplementkaskade über Aktivierung von Komplementfaktoren starten; man spricht vom „Lektin-Aktivierungsweg" des Komplementsystems. Nachfolgend setzen Effektormechanismen wie Agglutination und Neutralisation ein.[60-63] Alternativ kann das MBL die Zielzelle nach erfolgter Bindung auch direkt opsonisieren oder phagozytieren.[64]

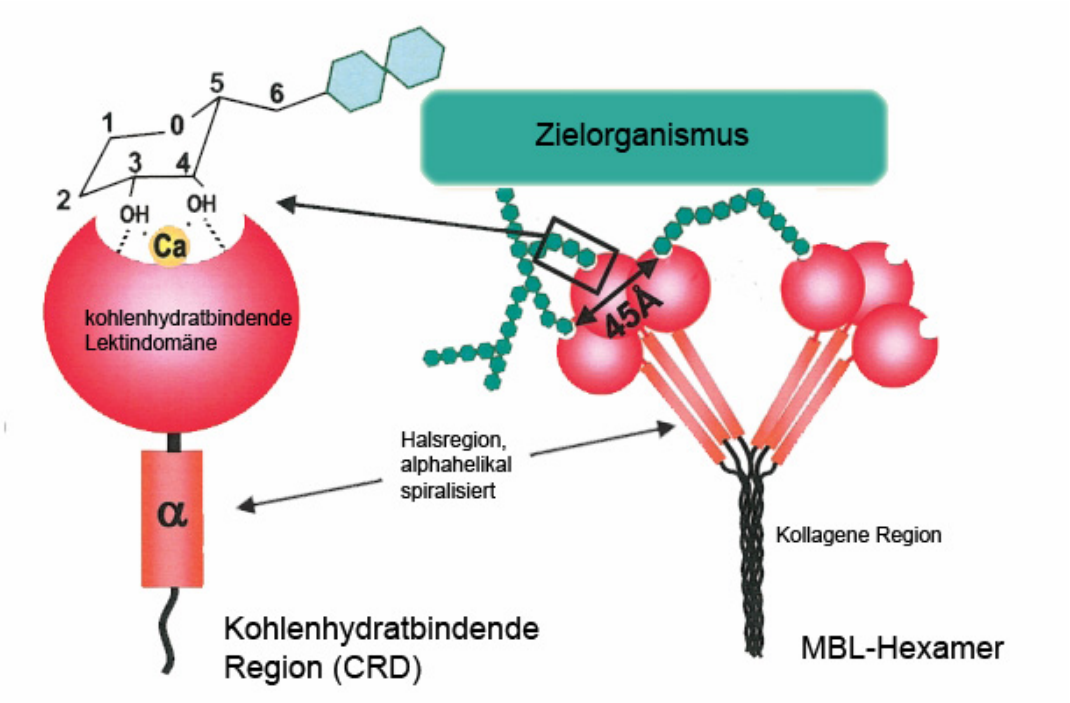



**Abbildung 3: Bindung einer einzelnen kohlenhydratbindenden Region und eines MBL-Hexamers an eine Mikroorganismenoberfläche (nach[65])**

### 1.3.2 Struktur

Eine MBL-Untereinheit besteht aus drei Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von 25,5 kDa und zeichnet sich durch eine kollagene Region und eine kohlenhydratbindende Lektindomäne aus, die miteinander durch eine alphahelikal spiralisierte Halsregion verbunden sind.[66]

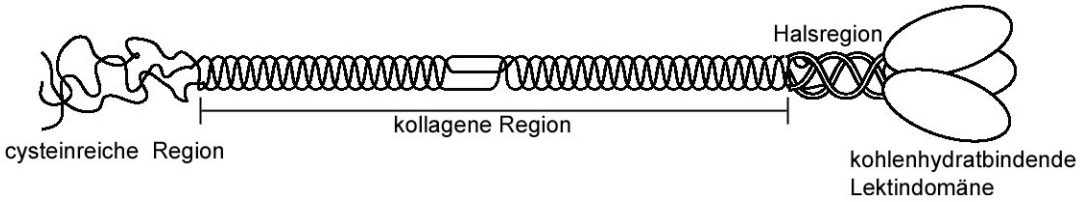



**Abbildung 4: Struktur einer MBL- Untereinheit (nach[66])**

Die Untereinheiten sind durch N-terminale Cysteinbindungen verbunden und werden als Oligomere von 2-8 Untereinheiten freigesetzt.[66,67]

Die biologische Aktivität von MBL nimmt mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad zu; umgekehrt zeigen MBL-Monomere schlechtere Komplementbindungseigenschaften und können schneller abgebaut werden.[62]

### 1.3.3 *MBL2*: Exon-1- und Promotorvarianten

#### *1.3.3.1 Allgemeines*

Das humane für MBL kodierende Gen (*MBL2*) wurde 1989 durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen kloniert und sequenziert. Es liegt auf Chromosom 10q11.1-q21. Die für das Protein kodierende Region besteht aus vier Exonen, die durch drei Introns von jeweils 600, 1350 und 800 Basenpaaren unterbrochen werden.[68,69] Das in derselben chromosomalen Region liegende *MBL1* (MBL1P1) ist ein Pseudogen.[67,70]

#### *1.3.3.2 Polymorphismen im MBL2-Gen*

Im Exon 1 des *MBL2*- Gens sind drei funktionelle Varianten bekannt, die über Änderungen der Tertiärstruktur des Proteins den Spiegel an funktionsfähigem MBL in unterschiedlichem Maße beeinflussen.[71-73]

- Nukleotid 223, Codon 52 (Arginin->Cystein, Allel D, vgl. Madsen et al.[72])
- Nukleotid 230, Codon 54 (Glycin->Aspartat, Allel B, vgl. Sumiya et al.[71])
- Nukleotid 239, Codon 57 (Glycin->Glutamat, Allel C, vgl. Lipscombe et al.[73])

In der Promotorregion existieren 3 Varianten, die den MBL-Spiegel in geringerem Maße als die Mutationen im Exon 1 beeinflussen.[74] Diese Promotorpolymorphismen

befinden sich an den Positionen -550 („H/L"); -221 („X/Y") sowie an Position +4 („P/Q").

### 1.3.4 Auswirkungen der *MBL2*-Varianten auf den MBL- Spiegel

Vor allem die Punktmutationen im Exon 1 haben einen starken Einfluss auf den MBL-Spiegel und verhindern die Oligomerisierung zu biologisch wirksameren MBL-Polymeren. In eine Messung der MBL-Spiegel mittels ELISA an 1187 Patienten und korrespondierender Genotypisierung zeigten Garred et al., dass der MBL-Spiegel bei für eine Exon-1-Mutation homozygoten bzw. Compound-heterozygoten Individuen bei einer unteren Nachweisgrenze des Assays von 20 µg/l nicht messbar war.[67] Heterozygotie (mit einem intakten Wildtyp-Allel) insbesondere für die Allele B und C senkt den Spiegel bereits um ca. 90%. Steffensen et al. bestätigten dies.[129]

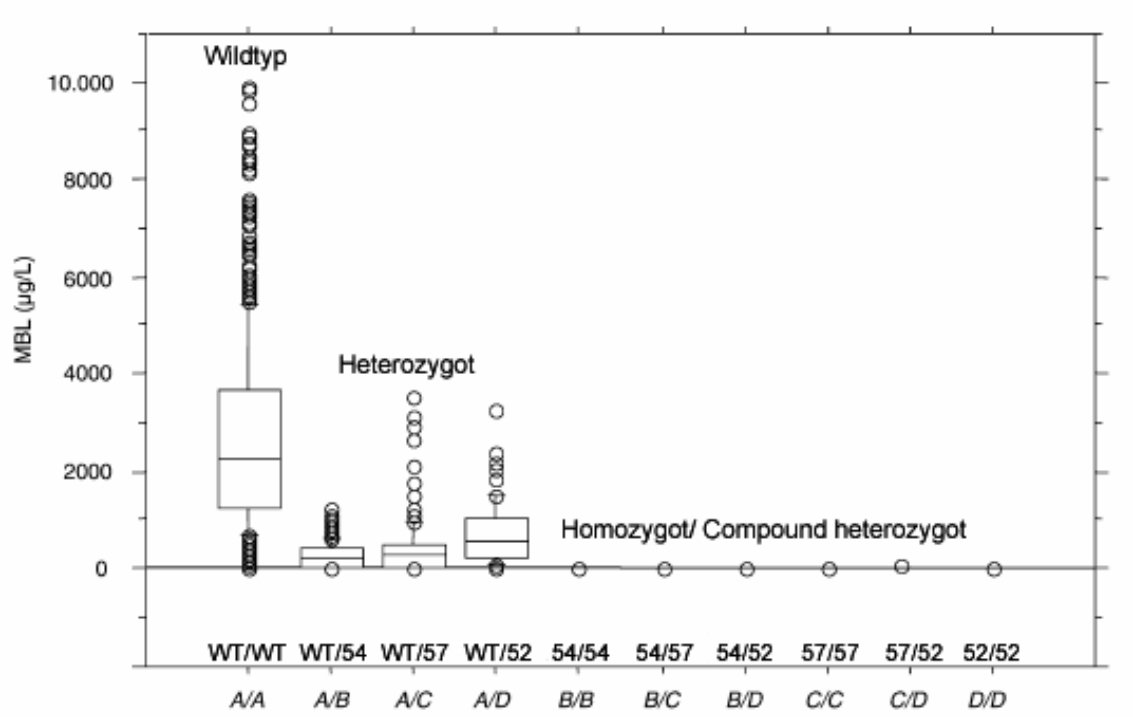



**Abbildung 5: MBL-Spiegel in Abhängigkeit vom Genotyp in Exon 1 (nach Garred[67]). WT: Wildtyp**

An Promotorpolymorphismen hat vor allem die Punktmutation an Position -221 („X/Y") eine relevante Auswirkung auf den MBL-Spiegel. Der Wildtyp („Y") führt über eine hohe Promotoraktivität zu höheren MBL-Spiegeln als der „X"-Genotyp. Zwi-

schen dem Genotyp „X" in der Promotorregion und dem Wildtyp im Exon 1 besteht ein Kopplungsungleichgewicht, d.h. der Genotyp „X" geht immer mit einem intakten „A"-Allel einher, während der Genotyp „Y" unabhängig von Exon-1-Polymorphismen ist.[67,74]

### 1.3.5 Klinische Relevanz des MBL- Mangels

Es wird angenommen, dass MBL insbesondere in der vulnerablen Periode vor der Entwicklung des spezifischen Immunsystems eine zentrale Rolle beim Schutz vor bakteriellen und viralen Infektionen gewährleistet.

1968 wurde erstmals ein Phagozytosedefekt bei einem Kind, das unter Dermatitis und persistierender Diarrhoe litt, beschrieben. Das humorale, plasmatische Abwehrsystem gegenüber verschiedenen Keimen war bei dem Mädchen und einigen Familienmitglieder offensichtlich stark eingeschränkt, was durch Plasmatransfusionen behoben werden konnte.[75] Später konnten andere Gruppen zeigen, dass mit dem beschriebenen Defekt gehäuft Infektionen der Atemwege, Diarrhoen, atopische Disposition und Gedeihstörungen in der Kindheit einhergehen[76]; erst 1989 konnte dieser Defekt als Folge eines MBL-Mangels gedeutet werden.[77]

Es besteht ein Zusammenhang zwischen varianten *MBL2*-Allelen, einem daraus resultierenden geringeren MBL-Serumspiegel und einem erhöhten Risiko verschiedener Infektionen während der Kindheit[78], aber auch im Erwachsenenalter.[79] MBL-defiziente grönländische Kinder hatten gegenüber jenen mit dem *MBL2*-Wildtyp ein zweifach erhöhtes Risiko, an akuten Infekten des Respirationstraktes zu erkranken, wobei homozygote schwerere Verläufe als heterozygote Individuen aufwiesen und zwischen dem 6. und 17. Lebensmonat das höchste Infektrisiko hatten.[80]

Nach einer britischen Studie ist das Risiko invasiver Pneumokokkeninfektionen bei *MBL2*-Exon-1-Homozygotie bzw. Compound-Heterozygotie auch im Erwachsenenalter erhöht.[81] Ebenfalls beschrieben sind erhöhte Risiken für rezidivierende Otitiden, kutane und pharyngeale Abszedierungen und Meningokokkeninfektionen bei Kindern.[82] Bei Immunsuppression (z.B. Chemotherapie, Knochenmarkstransplantation, Neutro-

penie) ist ein MBL-Mangel als Risikofaktor für fieberhafte Komplikationen beschrieben.[82] Die Rolle von MBL wurde auch bei nichtinfektiösen Erkrankungen untersucht: Ein geringer MBL-Spiegel scheint das Risiko für einen systemischen Lupus erythematodes gering zu erhöhen.[85,86] Beim Kawasaki-Syndrom und MBL-Defizienz zeigten sich häufiger Koronarläsionen[87], wie auch bei Erwachsenen Zusammenhänge zwischen Atherosklerose und MBL-Spiegel beschrieben worden sind.[88,89]

2004 erschien demgegenüber eine Negativstudie aus Dänemark, die über Jahre an einem großen (n=9245) Erwachsenenkollektiv aus der Normalbevölkerung einen Zusammenhang zwischen *MBL2*-Status und allgemeiner Morbidität und Mortalität untersuchte.[90] Es ergab sich unter Berücksichtigung anerkannter Risikoparameter (Alter, Rauchen, BMI, Cholesterin, Blutdruck etc.) bei einer *MBL2* 0/0-Homozygotenfrequenz von 5% und A-0-Heterozygotenfrequenz von 37% keinerlei Hinweis auf ein allgemein erhöhtes Krankheits- oder Mortalitätsrisiko bei varianten *MBL2*-Allelen. Inbesondere stellte sich keine Assoziation zu Infektionskrankheiten oder erhöhter kardiovaskulärer Mortalität heraus.

## 1.4 *MBL2* als Modifier-Gen bei CF

Anstoß für die vorliegende Untersuchung waren verschiedene Studien, die sich ebenfalls mit dem Einfluss von genetischen Polymorphismen im Gen für humanes MBL, dem MBL-Spiegel und klinischen Verläufen bei CF-Patienten beschäftigten.

In einer 1999 publizierten Studie von Garred et al.[91] lagen die durchschnittlichen Lungenfunktionswerte von CF-Patienten im Kindes- und Erwachsenenalter mit zwei *MBL2*-Wildtyp-Allelen signifikant höher als in Gruppen mit hetero- oder homozygoten Exon-1-Allelvarianten. Insbesondere unter den P.-aeruginosa-kolonisierten CF-Patienten zeigte sich in der *MBL2*-Wildtyp-Gruppe ein höheres $FEV_1$ als in Gruppen mit varianten Allelen. Gabolde et al. zeigten im selben Jahr bei für variante *MBL2*-Allele homozygote Patienten eine signifikant schlechtere Lungenfunktion.[92] Bei heterozygoten Patienten stellten sich keine signifikanten Unterschiede dar.

Davies et al. konnten in einer retrospektiven Studie an CF-kranken Kindern keine signifikanten klinischen Effekte unterschiedlicher *MBL2*-Genotypen zeigen.[93] Unter den erwachsenen CF-Patienten erwies sich Homozygotie für ein defizientes Exon-1-Allel als Risikofaktor für einen schwereren pulmonalen Verlauf. *MBL2*-Exon1-heterozygote „A/0"-Patienten hatten keine signifikant schlechteren spirometrischen Werte und ein Zusammenhang zur X/Y-Promotorvariante ließ sich nicht darstellen.

Nach einer Untersuchung von Yarden et al. lässt sich nur bei sehr mild betroffenen CF-Patienten ($FEV_1$ im Alter von 12-15 Jahren >90% vom Soll) ein Vorteil von Patienten mit 2 Wildtyp-Allelen und XY- oder YY-Promotorgenotyp gegenüber den anderen Gruppen darstellen.[94]

Carlsson et al. konnten an 112 schwedischen CF-Patienten keine der vorbeschriebenen Korrelationen zwischen MBL-Defizienz und schwererem Krankheitsverlauf bestätigen.[63] Ein Einfluss von *MBL2*-Polymorphismen auf die Lungenfunktion der Patienten zeigte sich nicht.

Die aktuellste Assoziationsstudie von Drumm et al., 2005 erschienen im New England Journal of Medicine, untersuchte bei einem außerordentlich großen Kollektiv aus ausschließlich F508del-homozygoten Patienten mit entweder mildem (n=545) oder schwerem (n=263) pulmonalen Verlauf den Einfluss verschiedener potentieller genetischer Modifier-Gene, darunter auch *MBL2*. Auch hier stellte sich weder in Bezug auf Exon-1-Varianten noch auf die XY-Promotorvariante ein Einfluss auf den Krankheitsverlauf bei der Mukoviszidose dar.[43]

## 1.5 Fragestellung

Folgende Fragen sollten im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Haben *MBL2*-Varianten einen Einfluss auf den Schweregrad der pulmonalen Beteiligung bei CF, gemessen mittels der Einsekundenkapazität $FEV_1$?
2. Besteht ein Einfluss von *MBL2*-Varianten auf die chronische Besiedlung mit den CF-typischen Keimen Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa und Burkholderia cepacia? Erwerben Patienten mit zwei varianten *MBL2*-Allelen diese Keime früher als jene mit zwei Wildtyp-Allelen?
3. Besteht ein Einfluss von *MBL2*-Varianten auf das mittlere Überleben von CF-Patienten?

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Populationen

### 2.1.1 CF-Patienten aus Berlin; Einschlusskriterien

Aus den in der CF-Ambulanz der Kinderabteilung Heckeshorn (Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Wahn) betreuten Patienten wurden 148 in die vorliegende Studie eingeschlossen (78 männlich), der Einschluss endete 2002. Es wurden ausschließlich zu Beginn der Untersuchung 2002 aktuell in Betreuung befindliche Patienten eingeschlossen, die Auswertung der klinischen Daten erfolgte retrospektiv.

Alle Patienten bzw. die Erziehungsberechtigten waren mit der Verwertung ihrer Daten für diese Studie einverstanden, ein positives Votum der lokalen Ethikkommission lag vor.

Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten waren an CF erkrankt, die Diagnose CF war durch den Nachweis einer Mutation im *CFTR*-Gen und/oder eindeutige klinische Symptomatik und Diagnostik wie eine pathologische Pilocarpiniontophorese gesichert worden. Es wurden Patienten ab einem Alter von fünfeinhalb Jahren eingeschlossen, da erst ab diesem Alter verwertbare Lungenfunktionsuntersuchungen durchgeführt werden können. Zugleich lagen von allen Patienten mikrobiologische Untersuchungen des Rachens bzw. Sputums vor. Die Betreuung der Patienten in der CF-Ambulanz umfasste regelmäßige ambulante Vorstellungen, bei denen jeweils eine klinische Untersuchung, eine Lungenfunktionsprüfung und eine mikrobiologische Sputumuntersuchung durchgeführt wurden. Zudem kamen viele der Patienten, die eine chronische Besiedlung mit Problemkeimen (insbesondere P. aeruginosa) aufwiesen, regelmäßig zur stationären intravenösen Antibiotikatherapie nach Heckeshorn.

### 2.1.2 CF-Patienten aus Prag; Einschlusskriterien

Die Einschlußkriterien der Patienten der Universitätsklinik Motol & 2. Medizinischen Klinik der Karlsuniversität Prag, Tschechische Republik, umfassten wie in der deutschen Population eine gesicherte CF-Diagnose, ein Alter über fünfeinhalb Jahren bei der ersten Lungenfunktion und das Einverständnis zu Studienteilnahme.

Die klinischen Daten entstammten wie in Berlin ambulanten Vorstellungen, bei denen eine klinische Untersuchung, eine Lungenfunktionsprüfung und eine Sputumprobe bzw. ein tiefer Rachenabstrich untersucht wurden. Es lagen klinische Daten und DNA von insgesamt 210 CF-Patienten vor, von denen 193 Patienten in die vorliegende Studie eingeschlossen wurden, da die Voraussetzungen (Alter über fünfeinhalb Jahren, erfolgreiche *MBL2*-Genotypisierung) erfüllt wurden.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

**Tabelle 1: Geräte**

| | |
|---|---|
| **Pipetten** | Eppendorf Multipette plus, Eppendorf AG, Hamburg |
| | 3,5ml Transferpipette, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht |
| | Eppendorf Research Pipetten 0,5-10µl;10-100µl; 100-1000µl, Eppendorf AG, Hamburg |
| | Multichannel Finnpipette 5-50µl, Thermo Labsystems, Egelsbach |
| | Finnpipette 40-200µl Thermo Labsystems, Egelsbach |
| **Zentrifugen** | Varifuge RF, Heraeus Sepatech, Hanau |
| | Centrifuge 5415D, Eppendorf AG, Hamburg |
| **Vortexer** | Minishaker MS1, IKA-Works Inc., Wilmington, NC, U.S.A. |
| **Thermoblock** | Thermostat 3401, Eppendorf AG, Hamburg |
| **PCR-Maschinen** | Tpersonal, Biometra GmbH, Göttingen |

| | |
|---|---|
| | T3 Thermocycler, Biometra GmbH, Göttingen |
| **Kapillarzentrifuge** | LC Carousel Centrifuge, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| **Light Cycler®** | LightCycler® II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

| | |
|---|---|
| **Reaktionsgefäße** | Safe-Lock Microcentrifuge Tubes 1,5ml, Eppendorf AG, Hamburg |
| | QUIAGEN Collection Tubes 15ml, QUIAGEN GmbH, Hilden |
| | Tubes 4ml 75x11,5mm, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| | Polystyrolröhrchen Falcon konisch 15 / 50ml, Becton Dickinson Labware, Meylan Cedex, Frankreich |
| **Blutabnahmeröhrchen** | EDTA Monovetten, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| **DNA-Extraktionskit** | QIAamp DNA Midi Kit, QUIAGEN GmbH, Hilden, BRD |
| **Pipettenspitzen** | Combitips plus 2,5ml u. 10ml, Eppendorf AG, Hamburg |
| | Eurotips in Racks 100µl u. 1000µl, Eppendorf AG, Hamburg |
| | 10µl, 100µl, 1000µl, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| **PCR-Reaktionsgefäße** | PCR Tubes ultradünn 0,2ml Stripes a 8 Tubes u. Caps, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf |
| | PCR Softstrips 0,2ml Stripes a 8 Tubes u. Caps, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf |
| | Multiply-Pro Cap 0,2ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht |
| Parafilm American National Can, Menaska, WI, U.S.A | |
| Mikrotiterplatte Nunc, Roskilde, DK | |
| LightCycler Capillaries, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim | |

**Tabelle 3: Allgemeine Laborreagenzien**

| | |
|---|---|
| **Ethanol, absolut (100%)** | Merck KgaA, Darmstadt |
| **Steriles Wasser** | Aqua ad injectabile, Braun, Melsungen |
| **PCR-Öl** | Bayol F, Serva, Heidelberg |

**Tabelle 4: Enzyme, Puffer, Desoyxnukleotide**

| | |
|---|---|
| **Taq-Polymerase** | Taq-Polymerase 5U/µl, AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, Roche, Mannheim |
| **dNTPs** | dNTPs, je 2,5mM, Applied Biosystems, Roche, Mannheim |
| **PCR-Puffer** | PCR-Puffer 10x PCR buffer (+15mM $MgCl_2$), Applied Biosystems, Roche, Mannheim |

**Tabelle 5: Primer und Sonden**

| | |
|---|---|
| **PCR-Primer** | 10µM, TIBMOLBIOL, Berlin, Sequenzen s.u., Roche, Mannheim |
| **Sonden** | 5µM, TIBMOLBIOL, Berlin, Sequenzen s.u. |

### 2.2.2 Software

LightCycler Software, Version 3.5, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

SPSS Version 13.0, The Apache Software Foundation; Chicago, USA
Microsoft Office, Microsoft Corp., USA

## 2.3 Experimentelle Methodik

### 2.3.1 Blutentnahme und DNA– Gewinnung

Durch Venenpunktion gewonnenes EDTA-Blut wurde bei –20°C gelagert. Genomische DNA wurde mittels QIAamp DNA Midi Kit der QIAGEN GmbH, Hilden, BRD, aus Vollblut nach dem Arbeitsprotokoll des Herstellers verwendet.[95] Die Lagerung der DNA erfolgte bei –20°C.

### 2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels der PCR können bestimmte Abschnitte einer Ziel-DNA amplifiziert und exponentiell vermehrt werden. Anfang und Ende des zu amplifizierenden Abschnitts wer-

den durch komplementäre, einzelsträngige Primer definiert, die sich an die 3`Enden der Ziel-DNA anlagern. Durch zyklische Temperaturveränderung wird die DNA denaturiert und nach dem Anlagern der Primer (Annealing) durch eine DNA-Polymerase verlängert (Extension). Durch Wiederholung der Zyklen entsteht DNA als PCR-Produkt, welches für weitere Analysen zur Verfügung steht.[96] Für die PCR wurden Promotor und Exon 1 des *MBL2*-Gens amplifiziert, es wurden der Vorwärtsprimer 5´-CTCTGCCAGGGCCAACGTAG-3` und der Rückwärtsprimer 5'-CTCCTCATATCCCCAGG-CAG-3' benutzt. (Gen Bank No. AF080508.1)

Die PCR lief unter folgenden Konditionen ab:

**Tabelle 6: PCR-Protokoll**

| | | |
|---|---|---|
| **Initialer Denaturierungsschritt** | 95°C | 12 min |
| **Denaturierung** | 95°C | 20 sec |
| **Annealing** | 56°C | 40 sec |
| **Elongation** | 72°C | 90 sec |

Es wurde mit 48 Zyklen gearbeitet. Nach zweiminütiger Finalelongation bei 72°C wurde auf 5°C abgekühlt. Die Gesamtdauer betrug 3h 30min 5sec.

### 2.3.3 Schmelzkurvenanalyse

#### *2.3.3.1 Roche LightCycler®*

Der LightCycler® besteht aus einer Thermocyclereinheit und einer Einheit zum Messen sequenzspezifischer Fluoreszenzen. Er fasst 32 Glaskapillaren für jeweils 20 µl Flüssigkeit. Die Proben werden durch Licht einer Wellenlänge von 470 nm angeregt. Die Detektion von Licht aus angeregten Proben erfolgt durch drei Photoelemente, die Licht der Wellenlängen 530nm, 640nm und 710nm erfassen.

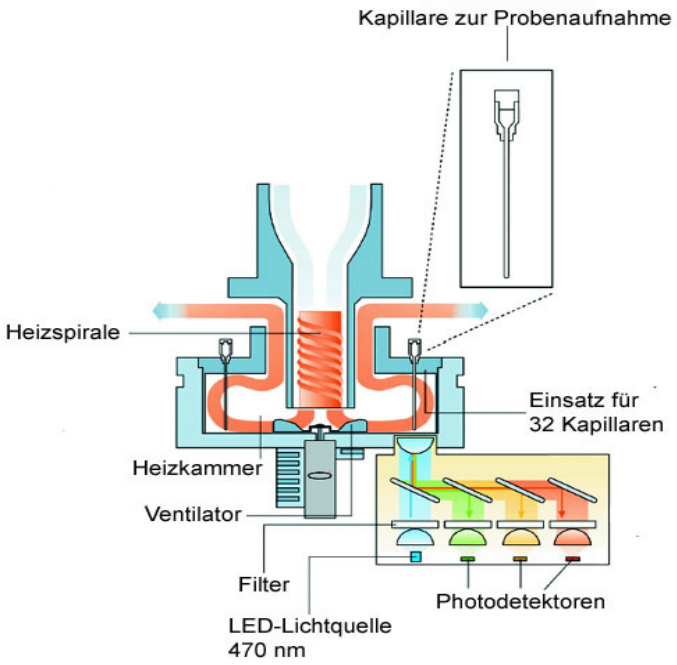



**Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Roche®- LightCyclers® (nach LightCycler® Manual[97])**

### *2.3.3.2 Hybridisierung der Proben*

Zum Nachweis einer Punktmutation wird ein PCR-Produkt mit zwei fluoreszenzmarkierten Sonden hybridisiert. Die erste Sonde (= Sensor) bindet an den 5'-Abschnitt einer zu untersuchenden Sequenz und ist am 3'-Ende an den Farbstoff Fluoreszein gekoppelt. Die zweite Sonde (= Anchor), bindet an den 3'-Abschnitt der spezifischen genomischen DNA und ist am eigenen 5'-Ende mit dem Farbstoff LightCyclerRed-640 oder LightcyclerRed-705 gekoppelt. Die Farbstoffe liegen in unmittelbarer Nähe zueinander, sofern beide Sonden an den Zielabschnitt der genomischen DNA binden. Bei Anregung des Sensors durch eine Leuchtdiode wird Energie an den Anchor weitergegeben. Der Anchor wird dadurch angeregt und emittiert Licht einer anderen Frequenz, was die Photoelemente des LightCyclers® als Emission detektieren. Dieses Emissionskette wird als Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) bezeichnet und ist von der Bindung sowohl von Anchor als auch Sensor mit konsekutiver Kopf-an-Kopf-Anordnung ihrer Farbstoffe abhängig.

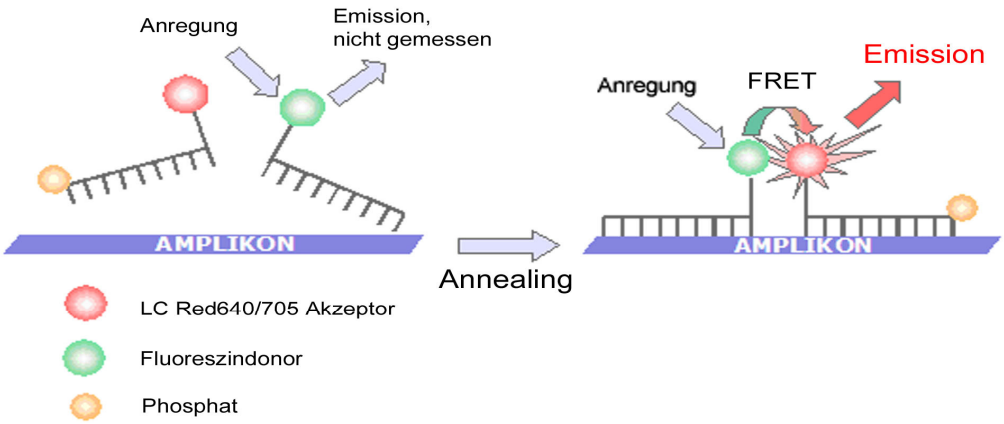



**Abbildung 7: Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) nach LightCycler® Manual[97]**

Die Sequenz der Sensorsonden ist sowohl im Fall der Exon-1-Polymorphismen des *MBL2*-Gens wie auch beim Promotorallel XY komplementär zum varianten Allel. Daher ist der Komplex zwischen Sensorsonde und varianten Allel sehr stabil und es ergibt sich eine hohe Schmelztemperatur. Bei Vorliegen einer Basen-Fehlpaarung zum Amplikon resultieren bei allen anderen Allelen sowie bei Vorliegen des Wildtyps tiefere Schmelzpunkte. (siehe Abb. 8 und 9)

Ein Messvorgang im LightCycler® läuft folgendermaßen ab:

1. 95°C für 60 Sekunden nach Temperaturanstieg von 20°C/s (initiale Denaturierung)
2. 45°C für 30 Sekunden nach Temperaturabfall von 20°C/ s
3. Temperaturanstieg von 0,1°C/ s bis zu einer Temperatur von 80°C
4. (Aufzeichnung der Fluoreszenzen zur Mutationsanalyse)
5. Abkühlung auf 40°C mit 20°C/ s

Die FRET-Sonden haben die in Tabelle 7 dargestellten Sequenzen.

**Tabelle 7: Sequenz der FRET-Sonden (Sen: Sensor = Donor, Anc: Anchor; Anker = Akzeptor, ph = Phosphat, FL = 5,6-Carboxy-Fluoreszein)**

| | |
|---|---|
| **MBL-Sen X/Y** | 5´-TCTCACTGCCACCGAAAGCAT-FL |
| **MBL-Anc Y/X** | 5´-LC705-TTTATAGTCTTCCAGCAGCAACGCCA ph |
| **MBL-Sen R52C** | LC640-CTCCCTTGGTGCCATCACACCCA ph |
| **MBL-Sen G54D** | LC640-CTCCCTTGGTGTCATCACGCCCA ph |
| **MBL-Sen G57E** | LC640-TCTTCCTTGGTGCCATCACGCCCA p |
| **MBL-Anc 52/54/57** | 5´-CAGCCCAACACGTACCTGGTTCCCCCT-FL |

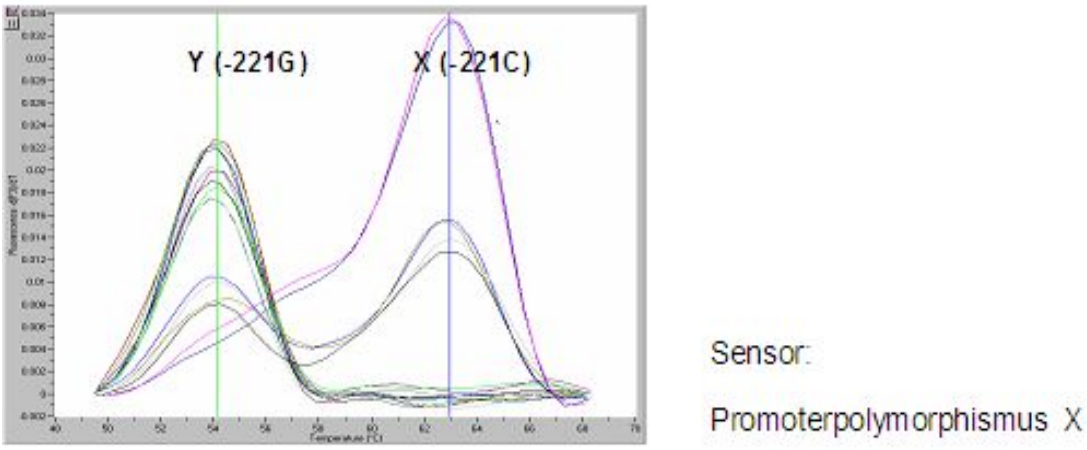
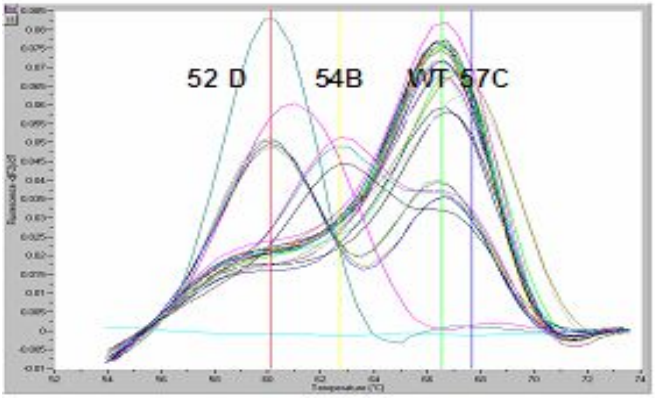
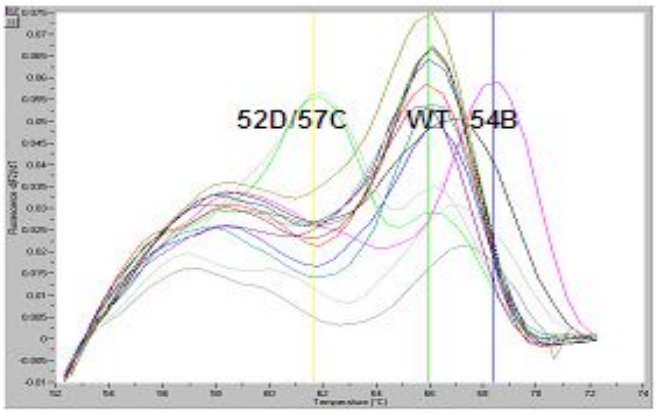


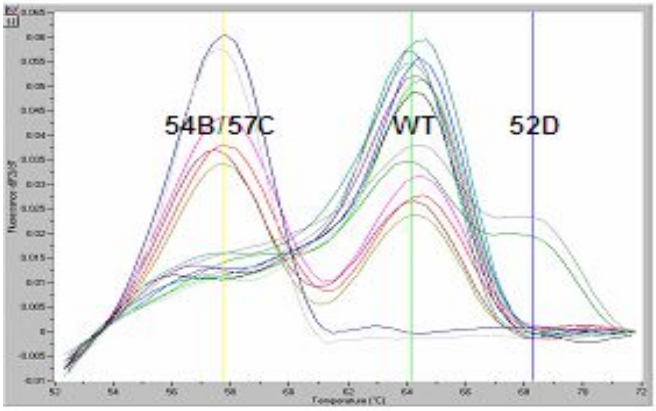

**Abbildung 8: Schmelzkurven für den Promotorpolymorphismus an Position -221 (Wildtyp= Y). Polymorphismusspezifische FRET- Sonde**




Sensor:
Polymorphismus 57 C




Sensor:
Polymorphismus 54 B




Sensor:
Polymorphismus 52 D

**Abbildung 9: Schmelzkurvenanalysen für Exon-1-Polymorphismen. Die Sonden sind jeweils spezifisch für die Mutation, bei Vorliegen des gesuchten Polymorphismus resultiert der jeweils höchste Schmelzpunkt.**

## 2.4 Klinische Datenerhebung

### 2.4.1 Deutsche CF-Patienten

Die klinischen Daten der vorliegenden Studie wurden für die deutsche Population retrospektiv aus den Krankenakten der CF-Ambulanz in der Kinderabteilung Heckeshorn, Berlin, erhoben. Die weit überwiegende Zahl der Daten stammt aus regulären ambulanten Vorstellungen. Wenige Daten wurden auch bei planmäßigen stationären Aufenthalten erhoben. Daten aus Episoden akuter Exazerbation wurden nicht verwertet.

Die Lungenfunktionsprüfungen wurden mit einem Ganzkörperplethysmographen (Master-Lab, E. Jäger, Würzburg, BRD) durchgeführt. Daten für die Lungenfunktionsprüfung wurden erst ab einem Alter von fünfeinhalb Jahren zur Auswertung herangezogen, da für verläßliche Ergebnisse eine ausreichende Mitarbeit der Patienten erforderlich ist, die erst ab diesem Alter gewährleistet ist. Ausgewertet wurde die Einsekundenkapazität $FEV_1$.

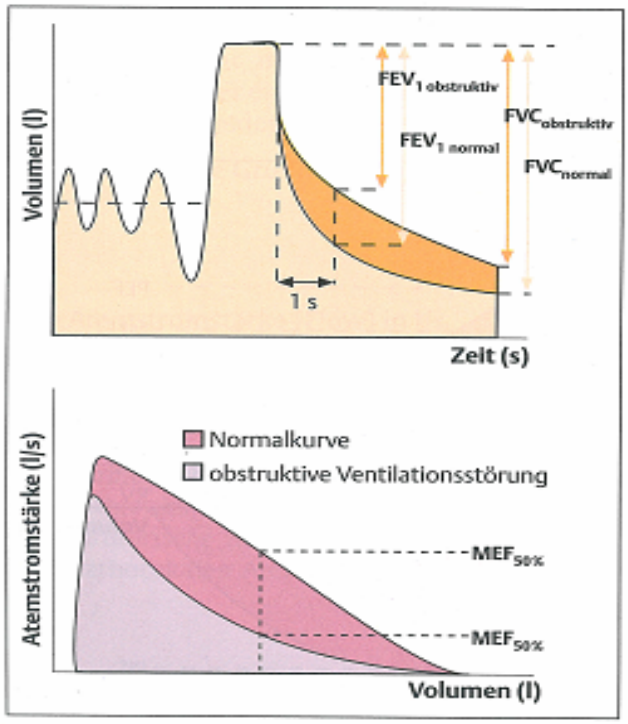



**Abbildung 10: Spirometrie; Normalbefund und obstruktive Ventilationsstörung, nach[98]**

Bei den ambulanten Visiten der in Berlin eingeschlossenen Patienten wurde jeweils expektoriertes Sputum untersucht. War eine Expektoration von Sputum nicht möglich, so wurde durch die zuständige Ambulanzschwester in einem standardisierten Verfahren ein tiefer Rachenabstrich entnommen. Die Kultur erfolgte im mikrobiologischen Labor des Zentralkrankenhauses Emil von Behring.

### 2.4.2 Tschechische CF-Patienten

Klinische Daten einer tschechischen Population von CF-Patienten entstammten der CF-Abteilung der Universitätsklinik Motol der Karlsuniversität Prag, Tschechische Republik. An Daten lagen Geburts- und ggf. Todestag, Geschlecht sowie die Dauer der chronischen Besiedlung mit P. aeruginosa und B. cepacia sowie pro Patient jeweils ein $FEV_1$- Wert vor.

## 2.5 Ethikkommission und Einverständnis zur Studienteilnahme

Die Blutproben wurden den CF-Patienten für klinische Fragestellungen abgenommen. Aus ihnen wurde für genetische Untersuchungen DNA isoliert. Für beides lagen sowohl die Einverständniserklärungen der Patienten bzw. der Erziehungsberechtigten als auch ein positives Votum der lokalen Ethikkommission vor. Experimente mit Tieren oder genetisch veränderten Organismen wurden nicht durchgeführt.

## 2.6 Statistische Auswertung

Die Dateneingabe erfolgte im Programm Microsoft Excel, Microsoft Corporation. Die statistischen und graphischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm SPSS (Statistical Package for Social science), Version 13.0.

Die Darstellung der Patientencharakteristika erfolgte auf der deskriptiven Ebene. Angegeben wurden hier i.d.R. Mittelwert und Standardabweichung bzw. bei ordinalskalierten Merkmalen Median und Spannweite (Range). Verteilungen und Häufigkeiten

wurden mittels Chi-Quadrat-Tests verglichen. Unterschiede in der Lungenfunktion wurden mittels t-Test (beim Vergleich von zwei Gruppen wie z. B. Keimbesiedlung ja/nein) bzw. varianzanalytisch (einfaktorielle ANOVA beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen) analysiert. Da im Rahmen einer univariaten Varianzanalyse ein signifikantes Ergebnis bedeutet, dass sich mindestens zwei Gruppen statistisch signifikant ($p < 0,05$) unterscheiden, wurden multiple Vergleiche mit post-hoc Vergleichstests nach Scheffé untersucht. Auf diese Weise ließ sich lokalisieren, zwischen welchen Paaren ein statistisch signifikanter Mittelwertsunterschied zum simultanen Signifikanzniveau besteht. Die Analyse der Zeit bis zur Keimbesiedlung wurde mittels Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. Hierbei wurde die Besiedlung mit P. aeruginosa bzw. Staph. aureus als Zielereignis gewertet und der Zeitraum zwischen der Geburt des Patienten und dem Auftreten eines der o. g. Keime berechnet, sofern der Keim auch in drei nachfolgenden Kulturen nachgewiesen werden konnte. Patienten, die (noch) keine Keimbesiedelung aufwiesen, gingen hierbei als zensierte Fälle in die Analyse ein. Der Vergleich der Ereigniszeiten zwischen den erfolgte mittels Log-Rank-Test. Als globales Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ festgelegt. Die vorliegende Studie hat mehr explorativen als konfirmatorischen Charakter, so dass auf eine Adjustierung des Signifikanzniveaus verzichtet wurde.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Demographische Fakten der untersuchten Populationen

Das deutsche Kollektiv an CF-Patienten zeichnete sich durch ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis und überwiegend deutsche Nationalität bzw. Ethnizität aus. Lungenfunktionsdaten wurden ab einem Patientenalter von fünfeinhalb Jahren in die Studie einbezogen. Manche Patienten wurden erst ab einem höheren Lebensalter in der CF-Ambulanz Heckeshorn betreut, das Alter bei der ersten Lungenfunktionsuntersuchung ist daher heterogen. Die Anzahl und der abgebildete Zeitraum an Spirometrien variierte je nachdem, wie lange der jeweilige Patient in der CF-Ambulanz betreut wurde.

**Tabelle 8: Charakterisierung der Berliner CF- Population.**

| **Berlin** | |
|---|---|
| Geschlecht (% weiblich) | 47,3 |
| Ethnizität (% deutsch) | 95,9 |
| Mittleres Alter bei der ersten Lungenfunktionsuntersuchung in Jahren (SD) | 16,0 (9,3) |
| Mittleres Alter bei der letzten/aktuellsten Lungenfunktionsuntersuchung in Jahren (SD) | 22,5 (9,8) |
| Mittlerer Untersuchungszeitraum in Jahren (SD) | 6,5 (4,7) |
| Mittlere Anzahl an Lungenfunktionswerten (SD) | 13,8 (9,1) |
| Mittleres Alter bei Diagnose der CF in Jahren (SD) | 3,3 (5,3) |

Bei vielen Berliner Patienten wurde die CF bereits im ersten (n=77) und zweiten (n=24) Lebensjahr diagnostiziert, bei einzelnen Studienteilnehmern jedoch auch erst im Jugend- oder frühen Erwachsenenalter. Grund für eine frühe Diagnose kann ein CF-Screening sein, aber auch eine erweiterte Diagnostik wegen einer CF- verdächtigen Symptomatik im Neugeborenen- und Säuglingsalter.

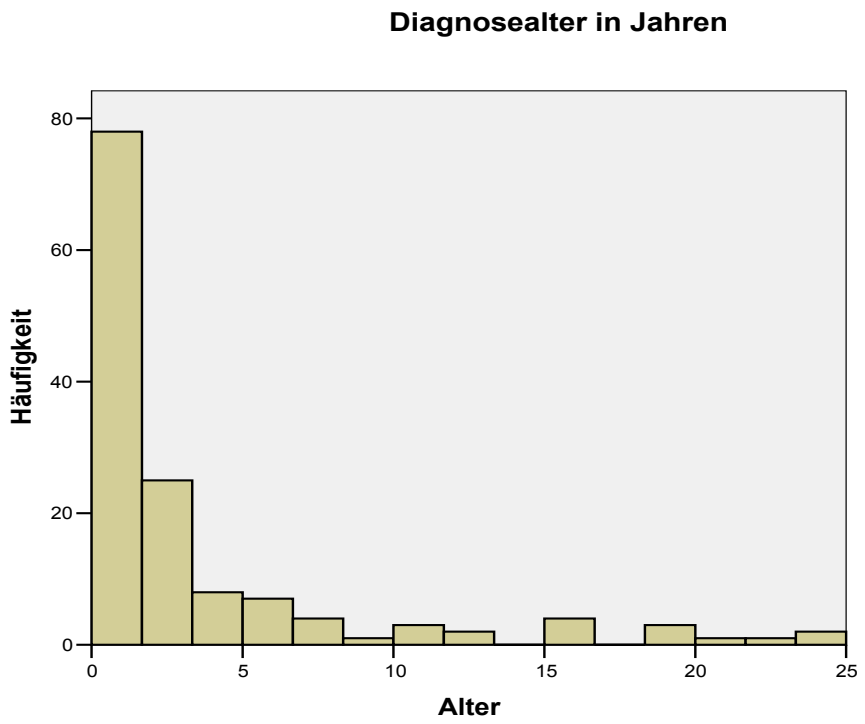



**Abbildung 11: Diagnosealter der deutschen CF-Population**

Das Patientenkollektiv aus der tschechischen Republik hat ein ebenfalls homogenes Geschlechterverhältnis, alle Patienten sind tschechischer Ethnizität. Zur Auswertung lag pro Patient jeweils ein $FEV_1$-Wert vor.

**Tabelle 9: Charakterisierung der tschechischen CF-Population**

| **Prag** | |
|---|---|
| Geschlecht (% weiblich) | 52,3 |
| Ethnizität (% tschechisch) | 100 |
| Alter bei ausgewerteter Lungenfunktion (SD) | 16,5 (6,5) |

## 3.2 *CFTR*-Genotypen

Die *CFTR*-Mutationen waren sowohl bei den deutschen wie auch bei den tschechischen Patienten überwiegend bekannt.

**Tabelle 10: *CFTR*-Genotypen (CF- Populationen Berlin und Prag)**

| ***CFTR*-Mutation** | **Berlin** | **Prag** |
|---|---|---|
| ΔF508-homozygot (F508-del/F508-del) | 60 (40,6%) | 97 (50,6%) |
| F508-del heterozygot | 43 (29%) | 78 (40,1%) |
| Nicht- F508-del-Mutation mit unbekannter zweiter Mutation | 0 | 3 (6,9%) |
| Zwei Nicht-F508-del-Mutationen | 14 (9,7%) | 13 (1,6%) |
| Unbekannter Genotyp | 31 (20,4%) | 1 (0,5%) |
| Gesamt | 148 | 193 |

## 3.3 *MBL2*: Allel-und Genotypfrequenzen

In der Schmelzkurvenanalyse zeigten sich Polymorphismus-spezifische Schmelzpunkte.

**Tabelle 11: Schmelzpunkte der untersuchten Polymorphismen. Die Allelfrequenzen zwischen deutscher und tschechischer Population unterschieden sich nicht signifikant. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien an CF-kranken und gesunden Patienten.[43,90,91]**

| | **Allel** | **Schmelzpunkt TS** |
|---|---|---|
| **Exon 1** | Wildtyp (mit Sen 52/54/57) | 64,2/ 66,0/ 66,2 °C |
| | 52 "Allel D" | 68,2 °C |
| | 54 "Allel B" | 68,2 °C |
| | 57 "Allel C" | 67,8 °C |
| **Promotor** | Polymorphismus X | 63 °C |

**Tabelle 12: Ergebnisse der *MBL2*-Genotypisierung**

| | Berlin (n= 148) | | Prag (n= 193) | |
|---|---|---|---|---|
| | **Anzahl** | **%** | **Anzahl** | **%** |
| **Exon 1** | | | | |
| A/A | 81 | 54,7 | 113 | 58,5 |
| A/O | 55 | 37,2 | 73 | 37,9 |
| A/B (WT/G54D) | 28 | 18,9 | 40 | 20,7 |
| A/C (WT/G57E) | 6 | 4,0 | 9 | 4,7 |
| A/D (WT/R52C) | 21 | 14,3 | 24 | 12,4 |
| O/O | 12 | 8,1 | 7 | 3,6 |
| B/B (G54D/G54D) | 1 | 0,7 | 3 | 1,6 |
| C/C (G57E/G57E) | 0 | 0 | 1 | 0,5 |
| D/D (R52C/R52C) | 0 | 0 | 1 | 0,5 |
| B/C, B/D, C/D | 11 | 7,4 | 2 | 1 |
| **Promotor** | | | | |
| Y/Y (-221GG) | 94 | 63,5 | 112 | 58,0 |
| Y/X (-221GC) | 50 | 33,8 | 73 | 37,8 |
| X/X (-221CC) | 4 | 2,7 | 8 | 4,1 |

Es ergibt sich für den Wildtyp bzw. die varianten Allele B /D/ C eine Allelfrequenz von 0,74/ 0,12/ 0,11/ 0,02 (Berlin) gegenüber 0,77/ 0,12/ 0,07/ 0,03 (Prag).

Die Frequenz des Promotorallels X liegt bei 0,20 (Berlin) bzw. 0,23 (Prag).

## 3.4 Lungenfunktion

Die untersuchten Populationen wurden für die Auswertung in je drei Gruppen unterteilt, bei denen nach dem *MBL2*-Genotyp von einem hohen, mittleren bzw. sehr niedrigen Spiegel an funktionstüchtigem MBL ausgegangen werden kann. Die Gruppierung richtet sich nach dem Genotyp der strukturellen Genvarianten im Exon 1 des *MBL2*-Gens bzw. nach dem Promotorpolymorphismus an Position -221. (s. Tabelle 13) Diese Einteilung beruht u.a. auf Davies[93], der nach Genotypisierung zahlreicher

Individuen MBL-Serumspiegelbestimmungen durchführte. Auch Garred[67], auf dessen Arbeiten in der vorliegenden Studie maßgeblich eingegangen werden soll, bedient sich dieser Einteilung.

**Tabelle 13: Unterteilung der Populationen nach *MBL2*-Genotyp in Exon 1 und Promotorpolymorphismus an Position -221 (angelehnt an[67,93])**

| Gruppe | MBL-Spiegel | Genotyp | Berlin | Prag |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Hoch | Homozygot für den Wildtyp in Exon 1 (A/A) | 81 (54,7%) | 114 (59,1%) |
| 2 | Mittel | Heterozygot für den Wildtyp in Exon 1 (A/O) | 45 (30,4%) | 53 (27,5%) |
| 3 | Sehr niedrig | Homozygot/Compound heterozygot für ein defizientes Allel in Exon 1 (0/0) oder heterozygot (A/0) mit variantem Promotorallel -221 (XA/0) | 22 (14,9%) | 26 (13,5%) |
| Gesamt | | | 148 (100%) | 193 (100%) |

### 3.4.1 Deutsche CF- Population

Die Patienten wurden zur Auswertung der Lungenfunktionswerte in Altersstufen von jeweils 5 Jahren zusammengefaßt. Die erste Altersstufe umfasst nur 4,5 Jahre, da erst ab einem Alter von fünfeinhalb Jahren eine verwertbare Lungenfunktionsdiagnostik zu erwarten ist. Innerhalb der drei MBL-Gruppen mit den Genotypen für einen hohen, mittleren und sehr niedrigen Spiegel ergeben sich zwischen den Gruppen keine signifikant unterschiedlichen $FEV_1$-Werte.

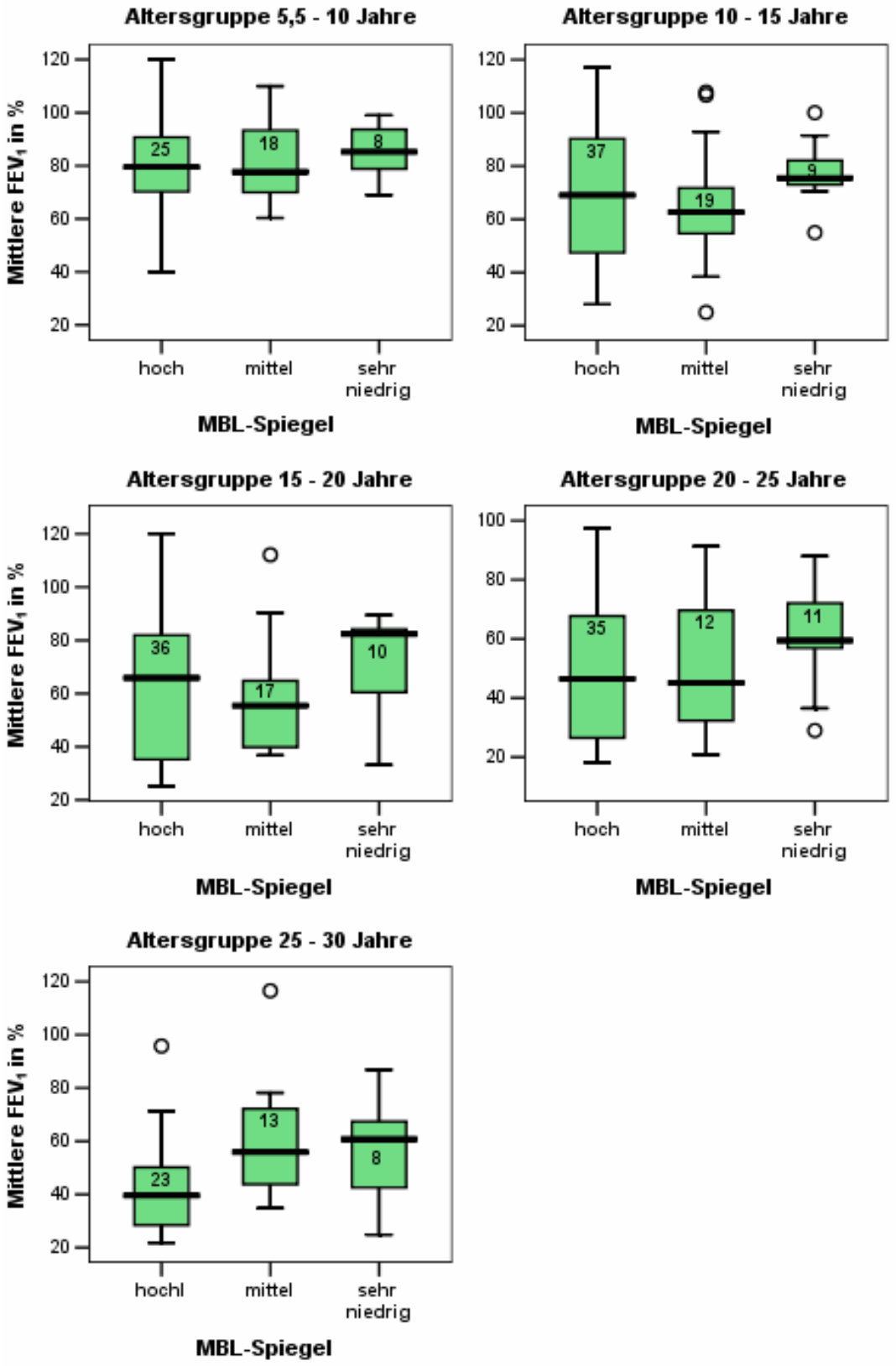



**Abbildung 12: Mittlere $FEV_1$-Werte der deutschen CF-Patienten; Alter 5,5 – 30 Jahre nach Altersgruppen und MBL-Gruppierung**

Die Analyse der Lungenfunktion im Gesamtverlauf bei Patienten mit hohem, mittlerem und sehr niedrigem MBL-Spiegel erfolgte mittels univariater Varianzanalyse (A-NOVA).

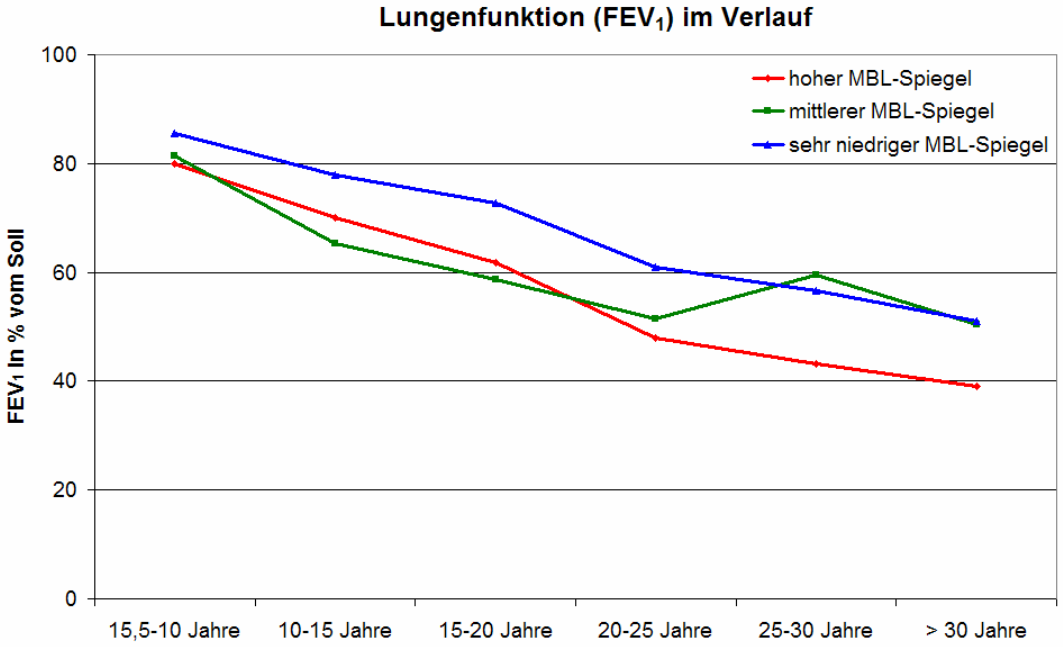



**Abbildung 13: Die Lungenfunktionsuntersuchungen im Alter von 5,5-10 Jahren sind in allen drei Gruppen vergleichbar und liegen im Bereich zwischen 80 und 85% vom Soll. Mit zunehmendem Alter zeigen sich in allen Gruppen deutliche Einbußen im $FEV_1$. Die Patienten in der Altergruppe über 30 Jahre verfügen nur noch über ein $FEV_1$ von 37-51% vom Soll. Vorhandene Unterschiede zwischen Patienten mit hohem und jenen mit mittlerem oder sehr niedrigem MBL-Spiegel sind allesamt nicht statistisch signifikant.**

### 3.4.2 Tschechische CF-Population

In der CF-Population aus Prag zeigen sich zwischen den drei *MBL2*-Genotypgruppen keine Unterschiede im $FEV_1$.

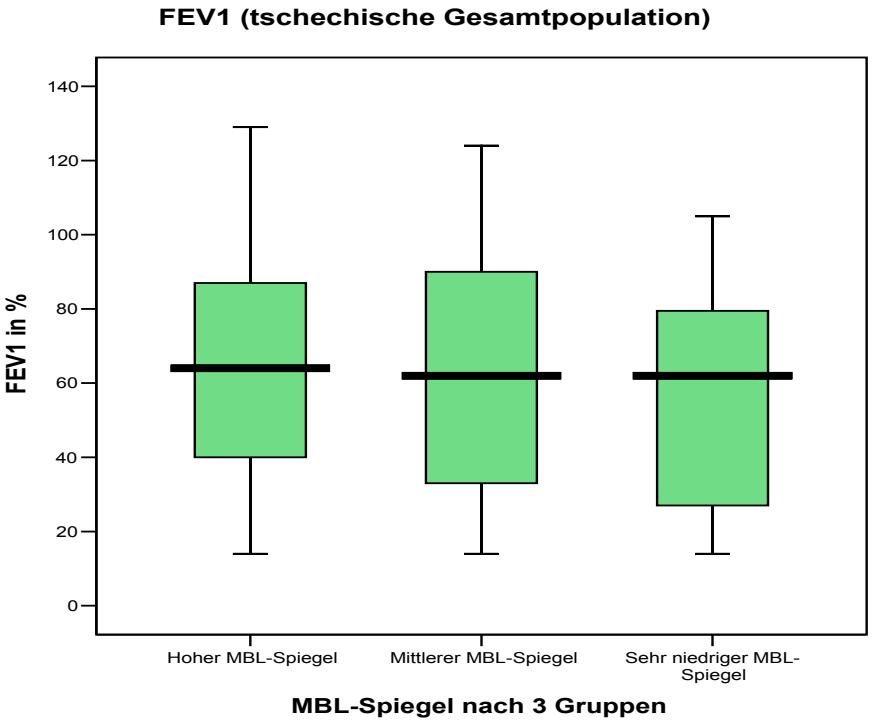



**Abbildung 14: $FEV_1$ in % vom Soll, tschechische Population, n=193 (114/53/26 Patienten für hohen, mittleren bzw. sehr niedrigen Spiegel). Die Altersstruktur unterscheidet sich innerhalb der drei MBL-Gruppen nicht: Das mittlere Alter zum Untersuchungszeitpunkt ist mit 16,7/ 16,2 bzw. 16,3 Jahren für die Gruppe mit hohem, mittlerem bzw. sehr niedrigem Spiegel vergleichbar.**

Unter 193 tschechischen Patienten, bei denen DNA und klinische Daten vorlagen, waren 61 zum Zeitpunkt der ersten Datenauswertung 2002 bereits verstorben. Eine Subanalyse zeigte keinen Einfluss des MBL-Spiegels auf die mediane Überlebenszeit:

**Tabelle 14: Subanalyse der verstorbenen tschechischen Patienten: Kein signifikanter Einfluss des MBL-Spiegels auf das mittlere Überleben (p: 0,855)**

| MBL-Spiegel (n) | Medianes Überleben (Jahre) |
|---|---|
| Hoch (34) | 19,03 |
| Mittel (17) | 19,46 |
| Sehr niedrig (10) | 19,83 |
| Gesamt (61) | 19,55 |

### 3.4.3 Vergleich der $FEV_1$-Werte in der tschechischen und deutschen CF-Populationen

Die $FEV_1$-Werte der unterschiedlichen Altersgruppen in den untersuchten Kollektiven wurden mittels t-Test bei unabhängigen Stichproben verglichen. Die Fragestellung für diese Auswertung war, ob (unabhängig vom *MBL2*-Genotyp) zwischen den Populationen ein spirometrisch messbarer Unterschied im pulmonalen Krankheitsgrad besteht.

Die $FEV_1$-Werte zwischen den beiden untersuchten Populationen unterscheiden sich nicht signifikant:

**Tabelle 15: Vergleich der medianen $FEV_1$ Berlin/Prag; Alter bis 30 Jahre. Die Spalte „Prag 2002" beinhaltet nur Patienten, die zu Beginn der Datenauswertung 2002 noch lebten. Der P*-Wert ergibt sich aus dem Vergleich der „Berlin 2002" mit der „Prag 2002" Kohorte, gebildet aus den im Jahr 2002 aktuellen Patienten. Auch im Vergleich der jeweils aktuellsten $FEV_1$-Werte (2001-2002) in den beiden Patientenkollektiven ohne verstorbene tschechische Patienten sind keine signifikanten $FEV_1$-Unterschiede zwischen den Kollektiven ableitbar.**

| Alter (J) | Berlin (n) | Prag (n) | P | Berlin 2002 | Prag 2002 | p* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **5,5-10** | 81,3% (51) | 80,6% (35) | 0,89 | 89,9% (11) | 94,0% (32) | 0,38 |
| **10-15** | 69,7% (65) | 71,5% (41) | 0,73 | 66,8% (22) | 78,0% (38) | 0,07 |
| **15-20** | 62,6% (63) | 60,2% (64) | 0,6 | 64,2% (33) | 74,0% (40) | 0,1 |
| **20-25** | 51,2% (58) | 42,8% (37) | 0,95 | 49,8% (29) | 52,8% (24) | 0,65 |
| **25-30** | 50,4% (44) | 53,2% (10) | 0,78 | 52,1% (18) | 65,1% (8) | 0,24 |

### 3.4.4 $FEV_1$ nach CF-spezifischen Perzentilen

Grundlage der nachfolgenden $FEV_1$-Perzentilenberechnung nach krankheits-spezifischen Perzentilen ist die Arbeit von Kulich et al. auf Basis von Lungenfunktionsmessungen an mehreren zehntausend US-amerikanischen CF-Patienten im Kindes- und

Erwachsenenalter.[99]

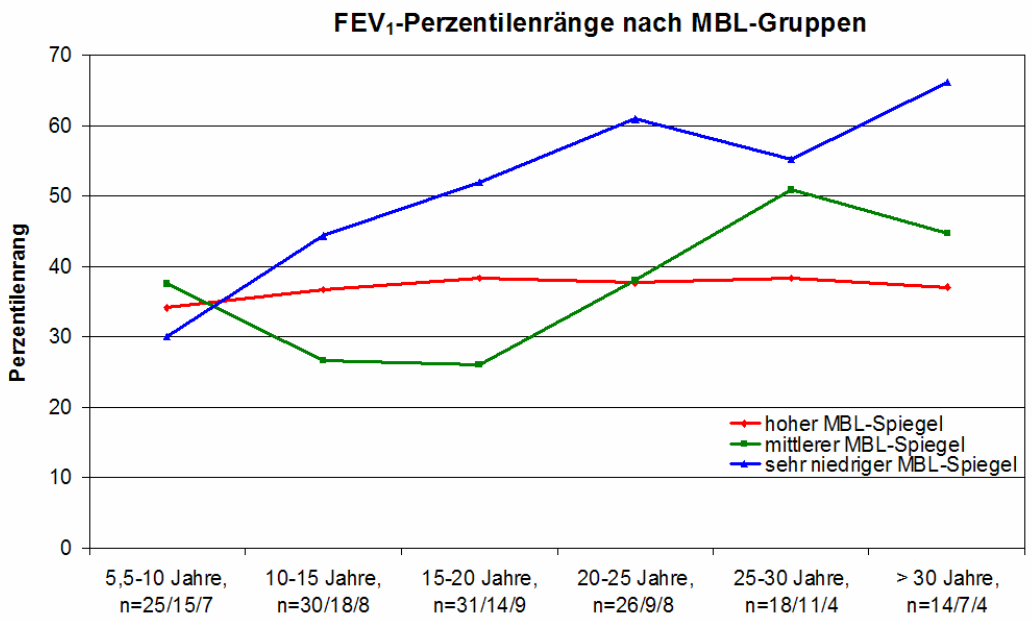



**Abbildung 15: Berliner CF Population: CF-spezifische $FEV_1$-Perzentilenränge nach Kulich et al.[99] abhängig vom MBL-Spiegel. Im Alter zwischen 15 und 20 Jahren liegen die Perzentilenränge der Patienten mit sehr niedrigen MBL-Spiegel signifikant über denen mit mittleren Spiegel. (p= 0,04), im Alter von 30-35 Jahren über beiden anderen Gruppen (p=0,038 gegenüber mittleren bzw. p=0,007 gegenüber hohem Spiegel). Zu beachten sind jedoch die relativ geringen Fallzahlen von n=9/14/31 (15-20 Jahre) und 4/7/14 (30-35 Jahre), für jeweils sehr niedrigen/mittleren/hohen MBL-Spiegel.**

## 3.5 Bakterielle Besiedlung

### 3.5.1 Deutsche CF- Population

Die Frage, ob Patienten mit varianten *MBL2*-Allelen eher einen CF- typischen Keim erwerben, wurde anhand der longitudinalen Verlaufbeobachtungen auf zweierlei Weise untersucht:

1. Werden diese Patienten häufiger als Patienten mit Wildtyp-Allelen chronisch kolonisiert?
2. Erwerben diese Patienten in früherem Alter eine chronische Kolonisation als Patienten mit Wildtyp-Allelen?

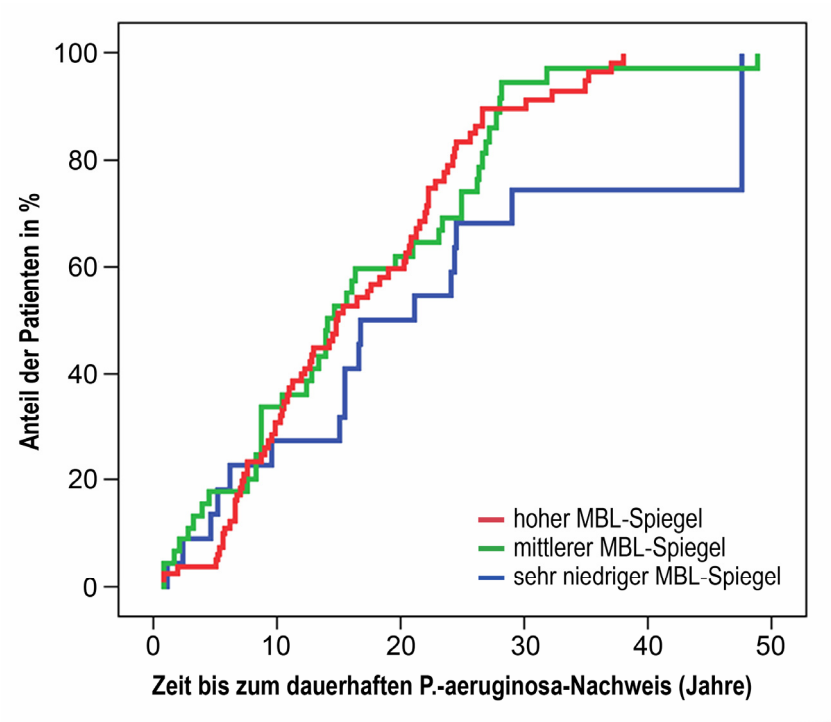



**Abbildung 16: Zeit bis zum dauerhaften Pseudomonas-aeruginosa-Nachweis**

Vergleicht man eine Keimbesiedlung irgendwann im gesamten Verlauf versus keine dokumentierte Keimbesiedlung, so zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($\chi^2$-Test, p= 0,166 für Staph. aureus bzw. p= 0,128 für P. aeruginosa). Interpretiert man „eher" als zu einem früheren Zeitpunkt, so kann man eine Kaplan-Meier-Analyse anwenden. Auch hier zeigen sich mit dem Log Rank Test keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten der drei MBL-Gruppen (p= 0,907). Ein etwas höheres Alter beim ersten Nachweis von P. aeruginosa unter den Patienten mit niedrigem MBL-Spiegel ist nicht signifikant (p= 0,072)

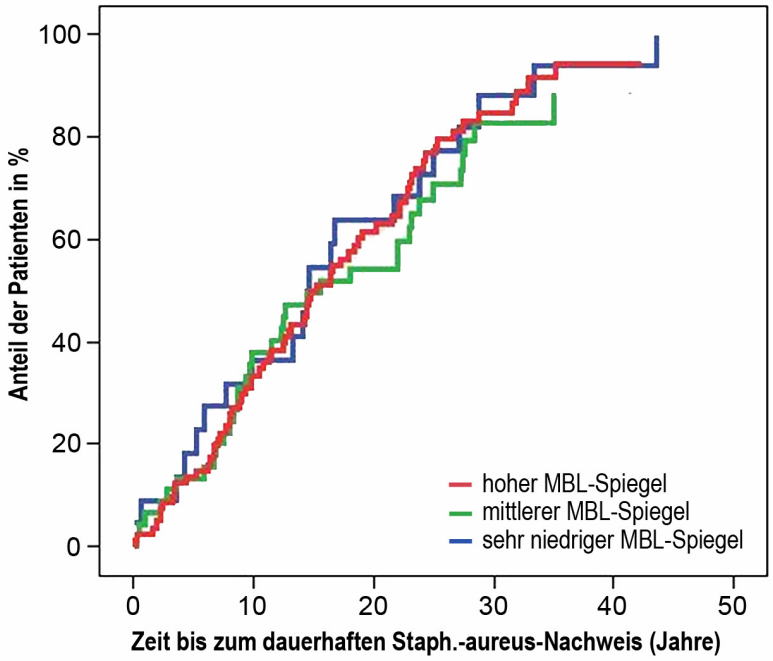



**Abbildung 17: Zeit bis zum dauerhaften Staphylococcus-aureus-Nachweis**

### 3.5.2 Tschechische CF-Population

Aus Prag lagen Daten über den Zeitraum der chronischen Besiedlung mit P. aeruginosa vor. Im tschechischen Kollektiv lag die Rate der P.-aeruginosa-positiven Patienten bei n= 132 (68 %) mit einer mittleren Dauer der Besiedlung von 10,2 Jahren. (SD: 5,8). In der Subanalyse der verschiedenen MBL-Gruppen ergaben sich bei den tschechischen Patienten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Zeitpunkt, seitdem P. aeruginosa dauerhaft nachgewiesen werden konnte (p= 0,12/ 0,79).

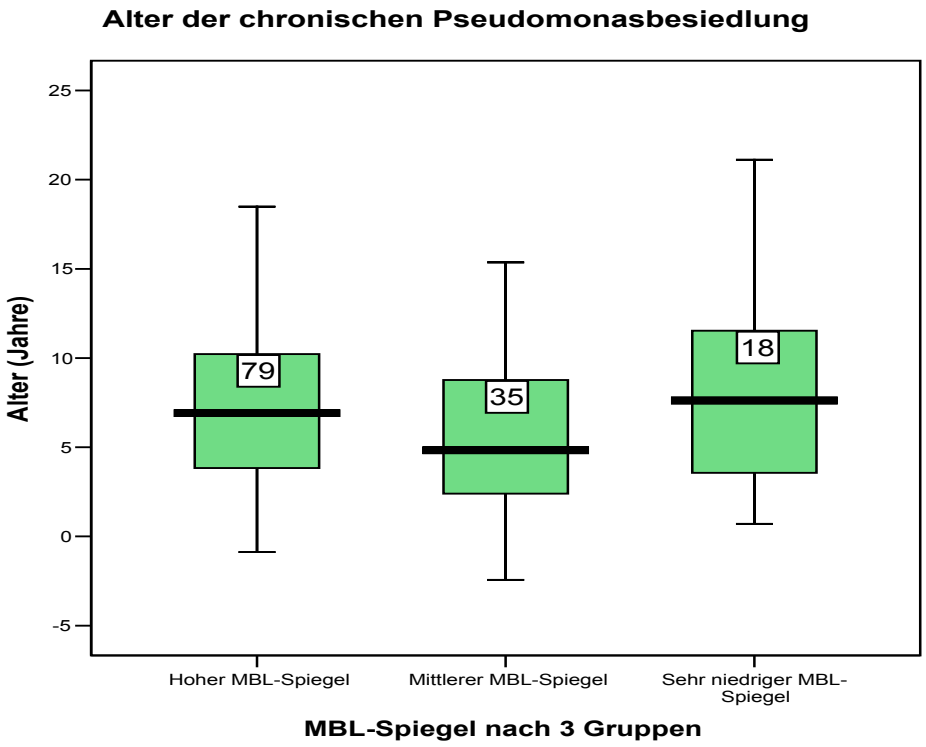



**Abbildung 18: Mittleres Alter bei chronischer P.-aeruginosa-Kolonisation: Keine signifikanten Unterschiede zwischen den MBL-Gruppen. Unter den verstorbenen 61 Patienten waren nur 2 bei ihrem Tod bzw. zum Zeitpunkt der letzten klinischen Untersuchung nicht P.-aeruginosa-infiziert.**

# 4 Diskussion

## 4.1 Zur vorliegenden Studie und Rolle von MBL bei CF

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob sich in zwei großen Populationen von deutschen und tschechischen CF-Patienten mit varianten *MBL2*-Allelen ein schnellerer Verlauf der CF-assoziierten Lungenerkrankung zeigt und ob eine dauerhafte Kolonisation mit den typischen Keimen Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus und Burkholderia cepacia früher erfolgt.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie kann *MBL2* nicht als Modifier-Gen des pulmonalen Verlaufs bei der Mukoviszidose angesehen werden. Weder Heterozygotie noch Homozygotie bzw. Compound-Homozygotie für ein defizientes Exon-1-Allel waren mit einem niedrigeren $FEV_1$ vergesellschaftet. Dies galt für CF-Patienten im Kindes-, Jugend- und Erwachsenalter. Ein Einfluss des *MBL2*-Genotyps auf den Zeitpunkt einer chronischen Besiedlung mit P. aeruginosa und Staph. aureus war nicht erkennbar, bei B. cepacia waren Assoziationen aufgrund sehr geringer Fallzahl nicht auszuwerten.

In einer Subanalyse an verstorbenen tschechischen Patienten zeigte sich kein Einfluss des *MBL2*-Genotyps auf das mittlere Überleben bei der CF. Die Allelfrequenzen im *MBL2*- Gen unterschieden sich zwischen den Kollektiven nicht signifikant und stehen im Einklang mit anderen Studien zu MBL innerhalb europäischer Populationen.

### 4.1.1 Weitere potentiell modifizierende Gene bei CF

Vor Identifikation des *CFTR*-Gens im Jahr 1989 ging man davon aus, dass sich die große Bandbreite von Schweregraden bei der CF durch unterschiedliche Mutationen des noch zu entschlüsselnden Gens würde erklären lassen. Studien in den nachfolgenden Jahren zeigten tatsächlich, dass es z. B. einen Zusammenhang zwischen dem *CFTR*-Genotyp und dem Schweregrad der exokrinen Pankreasinsuffizienz gibt. Muta-

tionen der Klassen 1-3 führen hier sehr häufig zur Insuffizienz, während bei Klasse-4- und Klasse-5-Mutationen die exokrine Funktion eher erhalten bleibt.[17,100] Bei der pulmonalen Affektion gelingt eine Zuordnung zur *CFTR*-Mutationen nur sehr eingeschränkt: Lediglich bei einigen Klasse-4 und Klasse-5-Mutationen stellt sich ein milderer Verlauf dar. Bei den mit insgesamt mit >90% häufigen Mutationen der Klassen 1-3 sieht man aber sämtliche Schweregrade einer Lungenerkrankung.[18-22]

Mittlerweile existieren einige Hinweise auf potentielle Modifier-Gene, die im Folgenden dargestellt werden. Diese Gene modifizieren die Erkrankung über unterschiedliche Mechanismen wie Immunmodulation, antioxidative Wirkungen oder Interaktion mit dem CFTR-Protein. Auch der Einfluss anderer Chloridkanäle als des CFTR wird diskutiert. Es ist allerdings zu bemerken, dass viele der nachfolgend zitierten Studien nicht repliziert wurden und insofern von begrenzter Aussagekraft sind.

Der Transforming growth factor−Beta (TGF−β) wirkt als Zytokin im Respirationstrakt auf Fibroblasten und führt zur Ablagerung von Kollagen. Es existieren zwei Polymorphismen im *TGFB1*--Gen, die zu einer verminderten Zytokinproduktion führen. In einer Studie an F-508del-Patienten wurde dargestellt, dass Träger des Wildtyps mit entsprechend höheren TGF−β-Spiegeln geringere Lungenfunktionswerte aufweisen als Patienten mit einem *TGFB1*-Genpolymorphismus in Codon 10 und konsekutiv geringerer TGF-β-Konzentration in den Atemwegsepithelien.[101] Die Ergebnisse in Bezug auf den *TGFB1*-Polymorphismus in Codon 10 ließ sich in einer späteren Studie derselben Autoren nicht reproduzieren, hingegen war nun ein vergleichbarer Einfluss des anderen bekannten Allels in Codon 10 sichtbar.[50] Eine große Studie aus den USA[43] zeigte schließlich eine signifikante Assoziation zwischen dem CC-Genotyp in Codon 10 und einem schwereren pulmonalen Verlauf der CF.

Tumornekrosefaktor Alpha (TNF−α) wird als proinflammatorischer Mediator durch Makrophagen gebildet. Bei CF-Patienten liegt eine hohe TNF-α- Konzentration im Respirationtrakt vor[103], die Lungenfunktionswerte korrelieren negativ mit einer endobronchial erhöhten TNF−α-Konzentration.

In einer Studie an n=53 CF-kranken Kindern hatten 38% der Patienten einen *TNFA*-

Promotorpolymorphismus an Position -308G/A, der zu einer höheren Transkription und Synthese von TNF-α führte. Diese Patienten hatten ein geringeres Körpergewicht und eine schlechtere Lungenfunktion als Träger des Wildtyps.[104] Nachfolgend ließ sich eine Relevanz des beschriebenen 308G/A-Polymorphismus durch verschiedene Gruppen nicht mehr darstellen.[43,50,105] 2005 wurden neue SNP´s beschrieben. Bei jugendlichen CF-Patienten ließ sich ein Zusammenhang zwischen Heterozygotie für den +691ins/del- Poly-morphismus und eines besseren $FEV_1$ (n= 13 heterozygot vs. n=100 homozygot für den Wildtyp) darstellen.[45]

Der Beta-2-Adrenorezeptor (β-2-AR) reguliert die cAMP-Konzentration im Epithel des Respirationstraktes mittels Stimulation der Adenylatcyklase. Diese Stimulation hat eine bronchodilatatorische Wirkung.[46] Unter verschiedenen Polymorphismen des *B2AR*-Gens konnte bei Vorliegen des 16Gly-Polymorphismus ein negativer Einfluss auf die Lungenfunktion bei pädiatrischen und jugendlichen CF-Patienten gezeigt werden.[47,48] Ursache könnte eine verminderte lymphozytäre cAMP-Produktion nach betaadrenerger Stimulation sein.[49]

Dem Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) werden profibrotische Effekte im Respirationstrakt zugeschrieben[109], die vermutlich über die Aktivierung von Zytokinen wie TGF-β-vermittelt sind. Entsprechend haben ACE-Inhibitoren antifibrotische Wirkungen. Das ACE wird von einem Gen auf Chromosom 17q23 kodiert.[110] Bei Vorliegen des DD-Genotyps im Intron 16 und konsekutiv höheren ACE-Spiegeln besteht nach Arkwright et al bei CF-Patienten eine signifikante Assoziation mit einem schwereren pulmonalen Verlauf. Zudem bestanden bei den „High-producer-Genotypen" unter CF- Patienten vermehrt sonographische Hinweise auf eine Leberzirrhose.[111]

Das immunmodulierende α1−Antichymotrypsin (α1−ACT) ist ein Proteaseinhibitor, das kodierende *AACT*-Gen ist auf Chromosom 14q31- 14q32.3 lokalisiert. Mahadeva et al. stellten dar, dass bei CF−Patienten ein α1−ACT-Mangel zu besserer Lungenfunktion und späterer Besiedlung mit den bei der CF typischen Problemkeimen (insbesondere P. aeruginosa) führte.[112.]

Alpha-1-Antitrypsin (α1−AT) schützt das Bronchialepithel vor schädigenden Protea-

senwirkungen und soll gleichzeitig die Abwehrfunktion dieser Proteine zulassen. Verminderte Produktion von α1−AT beschleunigt eine Reihe von Erkrankungen des Respirationtrakts.

Eine Studie bei CF-Patienten zeigte bei Trägern defizienter Allele mit geringerer α1−AT-Produktion die frühere Besiedlung mit P. aeruginosa.[113] Aus einer späteren Studie resultiert das Ergebnis, dass heterozygote Träger ebenjener Mutation eine bessere Lungenfunktion aufwiesen.[114] In einer folgenden Untersuchung von Patienten mit sehr schwerem und sehr milden pulmonalen Phänotyp war keinerlei Einfluss von *AAT*-Genpolymorphismen darstellbar.[115] Weitere, z. T. ebenfalls widersprüchliche bzw. Negativergebnisse wie aus einer großen kanadischen Multicenterstudie an 714 CF-Patienten[116] folgten.

Glutathion−S−Transferasen (GST) bilden eine Gruppe antioxidativ wirkender Enzyme, die die Bindung freier Radikale durch Glutathion katalysieren. Polymorphismen in den *GST*-Genen führen zu einer reduzierten oder komplett fehlenden Produktion der Enzyme. Das Vorhandensein defizienter Allele spielt eine Rolle bei der Entstehung verschiedener pulmonaler Erkrankungen wie der COPD und hat karzinogenen Einfluss. Bei der CF führten Studien zum Einfluss dieser Polymorphismen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während für das *GSTM1*-0-Allel homozygote CF-Patienten nach dem Ergebnis zweier Studien ein schlechteres Outcome hatten[44,117], konnten diese Ergebnisse in einer französischen Studie nicht bestätigt werden.[118]

NO-Synthethasen (NOS) regulieren die Produktion von Stickstoffmonoxyd (NO). Bei CF-Patienten kann eine verminderte NO-Produktion durch Allelvarianten im *NOS1*-Gen mit einem erhöhten Risiko für eine frühere chronische Kolonisation mit P. aeruginosa einhergehen.[119]

Chloridkanäle wie der Kanal CLC-2 existieren neben dem defekten CFTR im Epithel des Respirationstraktes. Es ist denkbar, dass sie einen Teil des Chloridtransports kompensatorisch übernehmen könnten. Eine erste Studie hat dazu SNPs im Gen *CLCN2* und das klinischen Outcome bei CF untersucht[120]. Hier zeigte sich keine Assoziation.

Wie dargestellt, sind die Ergebnisse in Bezug auf die oben genannten potentiell modifizierenden Faktoren z.T. uneinheitlich. Dies gilt auch für MBL und die regulierenden genetischen Grundlagen, wie unten ausgeführt wird.

### 4.1.2 Studienpopulation

Die Studienpopulation bestand aus zwei unabhängigen Kollektiven von 193 tschechischen und 148 deutschen CF-Patienten. Der klinische Zustand der Patienten variierte dem Krankheitsverlauf bei der CF entsprechend. In der longitudinalen Beobachtung innerhalb des deutschen Kollektivs wurden Daten aus akuten Krankheitsexazerbationen nicht verwendet. In Berlin wurden nur Patienten eingeschlossen, die zum Beginn der Datenauswertung noch aktuell in der CF-Ambulanz in Betreuung waren. Aus Prag lagen dagegen auch klinische Daten von bereits an CF verstorbenen Patienten vor und wurden in zusätzlichen Subananalysen ausgewertet. Im Verhältnis zu anderen Kandidatengenstudien wurde mit insgesamt 341 Patienten eine große Fallzahl untersucht. Vergleichsweise untersuchten Grasemann et al. n=75 CF-Patienten zum Einfluss der NO-Synthase 1; Mahadeva et al. n=157 CF-Patienten zum Einfluss von α-1-ACT-Defizienz; Döring et al. n=215 CF-Patienten zum Einfluss von α-1-AT und in nachfolgenden *AAT*-Studien Patientenzahlen von n=147 und n=77 (Untersuchung von Gewebeproben schwer betroffener CF-Patienten), Arkwright et al. n=171 Patienten zum Einfluss von TGFB-Varianten.

Insbesondere lag die Anzahl der Patienten höher als bei drei von insgesamt fünf anderen Studien, die einen *MBL2*-Einfluss bei CF untersuchten und in denen die Patientenzahlen bei n=104, 149, 164, 558 bzw. 808 lagen.[63,91,92,94,93,43]

Erstmals liegt hier zudem eine Studie vor, in der die Rolle vom *MBL2* an je einem -jeweils ethnisch sehr homogenen- deutschen und slawischen CF-Kollektiv untersucht wird. Die Bestätigung von Negativergebnisse in einem unabhängigen Kollektiv stellt eine große Stärke der vorliegenden Arbeit dar. Bisherige Studien waren überwiegend auf einzelne Populationen (wie dänische CF-Patienten bei Garred et al.[91], französische Patienten bei Gabolde et al.[92]) beschränkt.

### 4.1.3 Lungenfunktionsparameter bei CF

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit den Resultaten der 2005 erschienenen Studie von Drumm et al.[43] überein, welche in einer retrospektiven Datenanalyse der bisher größten untersuchten Population von CF-Patienten im Alter von 8-33 Jahren ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen *MBL2*-Polymorphismen und dem Krankheitsverlauf erkennen konnte. Drumm et al. bezogen ausschließlich US-amerikanische F508del-Patienten mit entweder mildem (n=545) oder schwerem (n=263) pulmonalen Verlauf ein. Sie wählten dabei nur Patienten aus, die ein $FEV_1$ (% vom Soll) innerhalb der niedrigsten bzw. höchsten Quartile aufwiesen. Als Referenzwerte wurden dabei Daten der US CF Registry[8] gewählt. Mit einem Alter von 15 bzw. 25 Jahren lag ein Patient z.B. dann innerhalb der „schwer betroffenen" Gruppe, wenn das $FEV_1$ unterhalb von 67% bzw. 34% des erwarteten Wertes lag, bei einem $FEV_1$ vom Soll über 97% bzw. 67% fiel ein 15- bzw. 25-jähriger Patient in die Gruppe der mild betroffenen Individuen. Es stellte sich in keiner der beiden extremen Phänotypgruppen eine Häufung varianter *MBL2*-Allele dar[43], so dass auch von Drumm et al. ein CF-modifizierender Einfluss von MBL verneint wurde.

Auch in einer schwedischen Untersuchung an 112 CF-Patienten im Kindes- und Erwachsenenalter ließ sich wie in den eigenen Untersuchungen kein Unterschied zwischen dem $FEV_1$ bei MBL-suffizienten bzw. –insuffizienten Patienten zeigen.[63] Gleichzeitig war kein Einfluss von Varianten im Gen für die MBL-assoziierte Serinprotease 2 (MASP2) erkennbar. Acht Patienten aus der Studienpopulation waren zuvor lungentransplantiert worden; es zeigte sich hier keine Häufung MBL-defizienter Patienten bzw. ein früherer Transplantationszeitpunkt. Es ist zu bemerken, daß in im Gegensatz zu der oben zitierten Studie von Drumm et al. und auch zu den vorliegenden Ergebnissen keine longitudinalen Daten gesammelt wurden. Daher liegen –auch in Hinblick auf die Patientenzahl von n=112- relativ wenige Daten zur Auswertung vor.

In Abweichung von diesen Ergebnissen existieren einige Studien, die in unterschiedlichem Ausmaß einen Einfluss des MBL-Spiegels bzw. der zugrunde liegenden unterschiedlichen Genotypen auf den pulmonalen CF-Phänotyp beschrieben haben.

Die früheste dahingehende Publikation durch Garred und Mitarbeiter beschreibt eine prospektive Studie an insgesamt 149 dänischen CF-Patienten im Alter von 7 bis 40 Jahren.[91] Eine klinische Verlaufsbeobachtung erfolgte durch monatliche Spirometrien und mikrobiologische Untersuchungen, die DNA der Patienten wurde auf *MBL2*-Varianten genotypisiert und der MBL-Gehalt im Serum bestimmt. Nach Unterteilung der Patienten in drei verschiedene Genotypen: („A/A";n=96/ „A/0";n=49/ „0/0"; n=4) zeigten Lungenfunktionsanalysen in der „A/A"-Gruppe signifikant höhere Werte für $FEV_1$ und FVC als bei beiden anderen Gruppen. In Kaplan-Meier-Analysen stellte sich für die Gruppe der XA/0- und 0/0-Patienten letztlich sogar ein signifikant früheres Erreichen eines primären Endpunktes (Lungentransplantation oder Tod) dar als bei für den Wildtyp homozygoten Patienten.

Die vorliegende Studie kann die Ergebnisse von Garred et al. in Bezug auf die Lungenfunktionsverschlechterung bei MBL-Defizienz nicht bestätigen. Aus der Subanalyse an verstorbenen tschechischen Patienten und der Analyse der Altersstruktur der 2002 eingeschlossenen Patienten war nicht zu erkennen, dass Patienten mit defizienten Allelen eine geringere Überlebenszeit aufweisen. Auch Drumm et al. konnten diese Ergebnisse anhand der DNA von insgesamt 56 verstorbenen oder lungentransplantierten Patienten nicht zeigen; bei diesen extrem schwer betroffenen Patienten lag die Homozygotenfrequenz für defiziente *MBL2*-Allele bei nicht erhöhten 5.3%, das mittlere Todes- bzw. Transplantationsalter der drei „0/0"-Patienten lag mit 32 Jahren sogar um 3,3 Jahre über dem der übrigen Patienten.

Eine französische Arbeit mit n=164 Patienten kam im Gegensatz zu Garred und Mitarbeitern zu dem Ergebnis, dass sich nur für „0/0"-Individuen mit kaum messbarem MBL-Spiegel eine signifikant schlechtere Lungenfunktion ergibt.[92] Elf „0/0"-Patienten (mittleres Alter 19 Jahre, SD 11,1) wurden mit MBL-suffizienten Patienten nach Alter und Geschlecht gematcht. Es zeigte sich in der MBL-defizienten Gruppe ein geringeres $FEV_1$ (46,8% vs. 75,7%, p=0,04.) Bei heterozygoten Patienten („A/0") waren im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe keine Unterschiede im $FEV_1$ und in der FVC erkennbar. Die Autoren geben keine Auskunft darüber, nach welchem Kriterium ein Lungenfunktionswert aus den klinischen Daten ausgewählt wurde. Zudem liegt den Berechnun-

gen im Gegensatz zur deutschen Population in der vorliegenden Untersuchung nur jeweils ein $FEV_1$/FVC- Wert zugrunde, so dass die Aussagekraft der Ergebnisse nicht nur aufgrund der geringen Patientenzahl begrenzt ist.

In einer weiteren Studie jüngeren Datums stellte sich der Zusammenhang zwischen MBL-Defizienz und dem Verlauf der CF noch weniger klar dar. Davies et al.[93] untersuchten *MBL2*-Genotyp und MBL-Serumspiegel bei 298 erwachsenen und 260 pädiatrischen CF-Patienten. Retrospektiv wurden Lungenfunktion, Keimbesiedlung und andere klinische Faktoren erhoben, im Mitte wurden sechs Lungenfunktionsuntersuchungen ausgewertet. Bei Kindern zeigten sich keine Unterschiede zwischen 0/0-, A/0- und A/A-Gruppe; ein Einfluss des XY-Promotorallels war nicht erkennbar.

Nach einer Untersuchung von Yarden et al. lässt sich nur bei sehr mild betroffenen CF-Patienten ($FEV_1$ im Alter von 12-15 Jahren > 90% vom Soll) ein Vorteil von Patienten mit 2 Wildtyp-Allelen und XY- oder YY-Promotor gegenüber den anderen Gruppen darstellen.[94]

### 4.1.4 Keimbesiedlung

In Bezug auf die Pseudomonasbesiedlung stimmen die eigenen Ergebnisse mit anderen Studien überein: MBL-defiziente Patienten werden nicht früher chronisch mit P.-aeruginosa besiedelt[91-93], es lässt sich auch keine entsprechende Tendenz erkennen. Lediglich nach Ergebnissen von Carlsson und Mitarbeitern[63] ließ sich eine chronische Kolonisation mit P. aeruginosa in Zusammenhang mit dem *MBL2*-Genotyp bringen und war interessanterweise unter den MBL-suffizienten Patienten (Exon-1: A/A oder YA/0) häufiger als bei MBL-insuffizienten Individuen. Nach Ergebnissen von Garred und Mitarbeitern hatten schließlich die MBL-insuffizienten („XA/0" und „0/0") unter den P.-aeruginosa-kolonisierten CF-Patienten ein signifikant geringeres $FEV_1$: 52% vs. 64% vom Soll, p= 0,005. Drumm und Mitarbeiter[43] konnten dagegen in ihrer großen Untersuchung an schwer und mild betroffenen CF-Patienten auch an Subanalysen Pseudomonas-positiver Patienten keine Häufung der beschriebenen varianten *MBL2*-Allele inklusive des XY-Promotorpolymorphismus zeigen. Auch in der vorlie-

genden Untersuchung zeigten P.-aeruginosa-positive Patienten mit defizienten *MBL2*-Allelen keine geringeren Lungenfunktionswerte. Bei Carlsson et al. ließen sich in einer Subgruppe von mit S. aureus kolonisierten Patienten (n=20 in der Gruppe mit hohem vs. n=7 in der Gruppe mit niedrigem MBL-Spiegel) Unterschiede im $FEV_1$ zeigen: MBL-defiziente und mit S. aureus kolonisierte Patienten hatten hier ein signifikant geringeres $FEV_1$; (p=0,04).[63] Eine solche Assoziation lässt sich auch mit Ergebnissen eines Mausmodells von Takahashi et al. in Einklang bringen: Bei MBL-Knockout-Tieren hatte sich nach intravenöser Inokulation von Staph aureus eine erhöhte Sterblichkeit durch septische Komplikationen gezeigt.[121] Eine frühere Besiedlung mit Staph. aureus bei MBL-Defizienz konnten wir nicht zeigen, Unterschiede in der Lungenfunktion bestanden zwischen den MBL-Gruppen nicht. Eine frühere und häufigere Kolonisation mit Burkholderia cepacia bei MBL-Defizienz zeigten in den genannten Studien nur Garred et al, Davies et al. konnte diesen Zusammenhang nicht bestätigen. Im eigenen Patientengut waren nur sechs deutsche und acht tschechische Patienten chronisch mit B. cepacia kolonisiert; statistische Korrelationen ließen sich bei dieser kleinen Fallzahl nicht sinnvoll untersuchen.

### 4.1.5 MBL bei CF: Schlussfolgerungen

Wenige Gene wurden vor einigen Jahren so stark als potentielle Modifier diskutiert wie das *MBL2*. Nach den eigenen Ergebnissen und der großen Studie von Drumm et al.[43], die einen *MBL2*-Einfluss ebenfalls negiert, ist eine Relevanz von MBL-Polymorphismen auf den pulmonalen Krankheitsverlauf bei der CF in verschiedenen untersuchten Populationen (deutsche, tschechische, schwedische und US-amerikanische Patienten) nun jedoch als sehr unwahrscheinlich zu werten.

## 4.2 Problematik der Phänotypdefinition

### 4.2.1 Lungenfunktionsanalysen

Die vorliegende Arbeit basiert maßgeblich auf spirometrischen Daten zweier großer Kollektive von CF-Patienten. Im deutschen Patientenstamm konnten dabei spirometrische Daten aus dem Verlauf einiger Jahre verwendet werden. Bei 29% der Patienten konnten Daten aus einem Zeitraum von mehr als zehn Jahren ausgewertet werden.

Die Beurteilung der Lungenfunktion hat als Maß für das Fortschreiten der CF zentralen Stellenwert. Die mit der Krankheit einhergehende bronchiale Obstruktion lässt sich dabei am besten durch das $FEV_1$ darstellen.[123,124] Ein zunächst absoluter (Liter-)Wert des exspiratorischen Volumens innerhalb der ersten Sekunde kann dann nach Geschlecht, Größe und Alter in die Vergleichswerte eingeordnet werden; es resultiert eine Angabe als Prozent des erwarteten Wertes. Die Normwerte stammten für beide Populationen von Zapletal[124] bzw. bei Erwachsenen von der Europäischen Gesellschaft für Kohle und Stahl (EGKS).[125]

Jede Lungenfunktionsuntersuchung erfordert die aktive Mitarbeit des Patienten und ist abhängig von äußeren Einflüssen. Durch personelle Konstanz in der CF-Ambulanz und Benutzung stets desselben Bodyplethysmographen werden diese Faktoren minimiert, jedoch nicht gänzlich ausgeschaltet.

Trotz der Tatsache, daß bei nahezu allen CF-Assoziationsstudien mit dem $FEV_1$ gearbeitet wird, fehlt eine verbindliche Standardisierung bei der Erhebung des Phänotyps, so daß die Vergleichbarkeit von Populationen erschwert wird. Dies beginnt in der technischen Ausstattung und geht über personelle Faktoren bis hin zu z.T. unterschiedlichen Referenzwerten für die Sollvolumina.[99]

Zwischen den beiden Populationen aus Prag und Berlin ließen sich keine signifikanten Unterschiede darstellen. Beim vorliegenden deutschen Patientenkollektiv (n=148) existieren mit im Mittel 13,8 Lungenfunktionswerten pro Patient im Vergleich zu an-

deren Publikationen relativ viele Werte. Zugleich konnten sowohl Kinder als auch Erwachsene untersucht werden. Die klinischen Daten aus der tschechischen Republik sind im Vergleich zu den in Berlin erhobenen Daten von geringerer statistischer Wertigkeit: Pro Patient lag jeweils nur ein Lungenfunktionswert vor, der innerhalb gewisser Grenzen letztlich eine Momentaufnahme darstellt. Dennoch sind die Ergebnisse der Prager Population relevant, da die Ergebnisse in zwei ethnisch unterschiedlichen Kollektiven verglichen werden konnten.

### 4.2.2 CF-spezifische $FEV_1$-Perzentilen

Bisherige CF-Studien haben meist das Verfahren des Vergleichs von $FEV_1$-Werten mit jenen einer definierten Normpopulation angewandt.

Eine europäische Arbeitsgruppe publizierte erstmals im Jahr 2000 eine Studie, die anhand eines großen CF-Kollektivs krankheitsspezifische Lungenfunktionsverläufe zeigte, ohne die Berechnungsformeln allerdings zu veröffentlichen.[126] Im Jahr 2005 wurden dann von Kulich et al. als neue Referenzwerte CF-spezifische Lungenfunktionsperzentilen vorgeschlagen und deren Berechnungsformeln veröffentlicht. Diese Perzentilen wurden anhand von 290000 Einzelmessungen in den USA errechnet.[99] Die Autoren argumentieren, dass der bei CF häufige Minderwuchs und eine verzögerte Pubertätsentwicklung zu Verzerrungen führe, wenn man die Lungenfunktionsergebnisse mit einem gesunden Normkollektiv vergleiche. Nach ihren Daten lässt sich nun abhängig von Geschlecht, Alter und Größe ein für die CF spezifischer Perzentilenrang darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst nach dem herkömmlichen Verfahren gearbeitet, d.h. die einzelnen $FEV_1$-Werte als Prozent vom erwarteten Wert angegeben. Dann wurden die absoluten $FEV_1$-Werte der deutschen Patienten nach den von Kulich et al. bereitgestellten Formeln in einem weiteren Auswertungsschritt in Perzentilen umgerechnet. Hier lag bei unter 10-jährigen Patienten das mittlere $FEV_1$ zunächst nur auf der 35. Perzentile, um im Erwachsenenalter dann bis zur 45. Perzentile anzusteigen. Bei dem Vergleich der unterschiedlichen MBL-Gruppen ergab sich in der Alters-

stufe 15-20 Jahre ein schwach signifikant besseres $FEV_1$ der Patienten mit 2 varianten Allelen gegenüber Patienten mit mittlerem MBL-Spiegel (26. vs. 51. Perzentile, p= 0,04), bei Patienten zwischen 30-35 Jahren lag das $FEV_1$ der MBL-defizienten „0/0"-Patienten sogar signifikant (p=0,038 bzw. p=0,007) über den Werten beider anderer Gruppen. Bei einer Subgruppenfallzahl von n=9/14/31 (15-20 Jahre) und 4/7/14 (30-35 Jahre, jeweils für sehr niedrigen/mittleren/hohen MBL-Spiegel) sind diese Ergebnisse allerdings kritisch zu bewerten. Auch da die von Kulich et al. erhobenen Perzentilen zwar für die Krankheit CF spezifisch sind, aber nicht in einer europäischen Population zusammengetragen wurden, können sie nur als Hinweis auf einen zuvor nicht erwarteten Vorteil bei MBL-Homozygotie gewertet werden, weitergehende Schlussfolgerungen sind aber nicht zulässig. Aus der Beobachtung, daß die deutschen Patienten im Mittel mit dem $FEV_1$ unterhalb der 50. Perzentile liegen, kann nicht zwangsläufig die Schlussfolgerung einer generell schlechteren Lungenfunktion der deutschen gegenüber den amerikanischen CF-Patienten abgeleitet werden. Ein Unterschied in der Auswahl der Werte ist etwa, daß in den teilnehmenden US-Zentren bei mehreren Lungenfunktionsmessungen pro Quartal nur der beste Quartalswert verwandt wurde, während in der vorliegenden Studie der beste Wert jedes Lungenfunktionszeitpunktes aufgenommen wurde. Daß sich das $FEV_1$ der deutschen Patienten im Kindesalter deutlicher unterhalb der 50. Perzentile bewegt als im Erwachsenenalter (im Mittel auf der 45. Perzentile), könnte dagegen Abbild eines Therapieerfolgs sein, gleichzeitig auch durch die im Erwachsenenalter selteneren Lungenfunktionszeitpunkte bedingt sein, wegen denen auch bei Kulich et al. mit zunehmenden Alter nicht zwischen verschiedenen Quartalswerten ausgewählt werden konnte.

### 4.2.3 Mikrobiologische Untersuchungen

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Zeitpunkt der chronischen Besiedlung mit P. aeruginosa und Staph. aureus in Bezug auf die MBL-Klassen untersucht, eine Korrelation zum *MBL2*-Genotyp stellte sich hier nicht dar. Die diagnostische Wertigkeit von mikrobiologischen Kulturen aus dem oberen Respirationstrakt von CF-

Patienten ist je nach Verfahren unterschiedlich. Ist der Patient zur Expektoration von Sputum in der Lage, so besitzt die Sputumprobe zur Erkennung einer P.-aeruginosa-Infektion annähernd dieselbe Wertigkeit wie eine Bronchiallavage. Dagegen wird die Aussagekraft von Rachenabstrichen unterschiedlich gewertet. Insbesondere im jungen Alter schließt der fehlende Nachweis von P. aeruginosa im Rachenabstrich eine Kolonisation der tieferen Atemwege nicht aus. Letztlich nimmt die Wertigkeit des Rachenabstrichs in seiner positiven und negativen Prädiktivität mit dem Fortschreiten der Erkrankung und mit zunehmendem Alter zu.[127] Es wurde nach jedem klinischen Prüfzeitpunkt eine Kultur angelegt. Die Pflegekräfte versuchten stets, den Patienten zu einer Expektoration zu bewegen; alternativ wurde nur ein Rachenabstrich angefertigt, obgleich diesem eine geringere Prädiktivität zukommt als der Kultur nach tiefer Expektoration von Sputum. Eine Bronchoskopie mit Lavage stellt in der Beurteilung einer Kolonisation der tiefen Atemwege mit Keimen den Goldstandard dar, ist aber bei klinisch stabilem Zustand aus nahe liegenden Gründen nicht indiziert. Daher schließt sich die vorliegende Studie dem Verfahren zahlreicher anderer Studien an, indem auch Rachenabstriche in die Auswertung miteinbezogen wurden.

Ein Patient wurde dann als chronisch P.-aeruginosa- oder Staph.-aureus-besiedelt angesehen, wenn sich der jeweilige Keim aus mindestens drei aufeinanderfolgenden Proben kultivieren ließ. Dieses Vorgehen entspricht den europäischen Normen.[128]

### 4.2.4 Genotypisierung vs. Serumspiegelbestimmung

Die meisten Studien zur Rolle von MBL bedienen sich der Genotypisierung des *MBL2*-Gens, die in unterschiedlicher Weise durchgeführt werden kann. In einigen Studien zum Thema wurde aber sowohl eine Genotypisierung als auch eine Bestimmung des MBL-Serumspiegels durchgeführt.

Für die vorliegende Untersuchung wurde auf die Serumspiegelbestimmung verzichtet, da in verschiedenen Untersuchungen übereinstimmende Korrelationen zwischen Genotyp und resultierendem Serumspiegel gezeigt werden konnten.[67,93,129] Danach liegt der MBL- Serumspiegel bei Homozygotie bzw. Compound-Heterozygotie

für variante Allele im Exon 1 zwischen 8 und 64 µg/l, bei Heterozygotie bei 1000 µg/l, bei zwei intakten Allelen dagegen bei medianen 2000 µg/l. Auch bei Wildtyp-Homozygotie im Exon 1 und zwei defizienten Promotorallelen an Position -221 („XX") liegt der MBL-Spiegel nach Davies et al. bei immer noch zwischen 1500 und 2000 µg MBL/l Serum.[85] In der vorliegenden Untersuchung wurden insgesamt 12 Patienten mit dem Genotyp XA/XA daher in die Gruppe eines mutmaßlich hohen MBL-Spiegels eingeordnet. Wenigstens ein Spiegel von mehr als 200 µg MBL/l Plasma scheint notwendig zu sein, um durch Infusionen bei MBL-Defizienz eine in-vitro-Funktion von MBL wiederherzustellen.[130] Homozygote und compound-heterozygote Patienten können damit sicher als MBL-defizient eingestuft und von den anderen Gruppen (insbesondere von der Gruppe mit 2 Wildtyp-Allelen) diskriminiert werden.

Zugleich gibt es bis zu dreifache Erhöhungen des MBL-Spiegels im Sinne von Akute-Phase-Reaktionen, die eine potentielle Fehlerquelle darstellen könnten.[66,132] Ein Nebenergebnis in der Studie von Carlsson[63] war, daß der mediane MBL-Spiegel bei CF-Patienten gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe auch nach Korrektur der zugrunde liegenden *MBL2*-Genotypen höher lag (1442 ug/l vs. 649 ug/l; p=0,0002) Die MBL-Spiegel waren dabei unabhängig vom Alter der Patienten. Das C-reaktive Protein als klassisches Akute-Phase-Protein lag innerhalb der CF-Gruppe im Normbereich von unter 5 mg/l, war jedoch gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Daher ist anzunehmen, daß sich in den höheren MBL-Spiegeln die mit der CF typischerweise einhergehende pulmonale Inflammationsreaktion widerspiegelt. Auch Individuen mit defizienten *MBL2*-Allelen können im Übrigen monomere Formen von MBL produzieren, die mit den üblichen Verfahren (z.B. ELISA) nicht nachgewiesen werden können.[67]

### 4.2.5 Technik der Genotypisierung

Mit dem System des LightCyclers® wurde in der vorliegenden Untersuchung nach Herstellung der entsprechenden FRET-Sonden eine Methode benutzt, in der eine sichere Diskrimination der vorliegenden Mutationen möglich ist. Neben der Messung

jeweils der höchsten Schmelzpunkte bei Verwendung einer jeweils allelspezifischen FRET-Sonde konnte das Vorliegen einer Mutation in folgenden LightCycler®-Läufen bestätigt werden, da auch bei Nicht-Allelspezifität der Sensorsonde ein typischer Schmelzpunkt resultiert. (siehe Abb. 8 und 9) Es wurden keine nicht-CF-erkrankten Kontrollgruppen analysiert, da das Ziel der Studie war, den Einfluss von MBL innerhalb der CF zu untersuchen, anstatt allgemeine Allelfrequenzen der *MBL2*-Mutationen darzustellen.

## 4.3 Aussagekraft von Assoziationsstudien

Im Gegensatz zu einer Kohortenstudie mit prospektiver Betrachtung einer klar definierten Studienpopulation handelt es sich bei der vorliegenden Studie um eine retrospektive Untersuchung. Eine Kohortenstudie wäre prinzipiell möglich gewesen, das retrospektive Vorgehen schien jedoch aus verschiedenen Gründen sinnvoller: Nahezu alle eingeschlossenen Patienten in Berlin waren auch in der Vergangenheit eng an die CF-Ambulanz angebunden und stellten sich daher regelmäßig zu den o.g. Untersuchungen (Lungenfunktionsprüfung, Rachenabstriche, Sputummikrobiologie) vor. Die verfügbaren klinischen Daten wurden zunächst ohne Kenntnis des *MBL2*-Genotyps akquiriert; erst danach erfolgte die Genotypisierung und Datenanalyse.

Bedingt durch therapeutische Fortschritte bei der CF sind inzwischen, anders als noch vor einigen Jahrzehnten, auch erwachsene Patienten in Behandlung von CF-Ambulanzen. Bei der Studienplanung wurde entschieden, auch diese Patienten mit einzuschließen, da wie oben dargestellt inkohärente Ergebnisse in Bezug auf einen Alterseinfluss einer MBL-Defizienz bei der CF existieren. Die Patienten mussten allerdings wenigstens fünfeinhalb Jahre alt sein und verwertbare Spirometrien liefern können, um in die Studie aufgenommen werden zu können.

Grundsätzlich gibt es stets verschiedene Ansätze, Einflussfaktoren bzw. Krankheitsrisiken zu erkennen. Man kann zum einen innerhalb bestimmter Patientengruppen nach Einflüssen eines biologischen Parameters suchen, was zunächst der sinnvollere und meist wenig aufwändigere Weg ist. Im Fall von MBL sind die meisten

Studien auf diese Weise entstanden, auch die vorliegende Arbeit geht diesen Weg.

Die andere Möglichkeit wurde z.B. in der berühmten, seit 1948 laufenden amerikanischen Framingham-Studie[132,133] zu kardiovaskulären Risikofaktoren und für die Frage nach einer Relevanz von MBL in der dänischen Querschnittsstudie von Dahl et al.[90] verwirklicht: Anhand großer Kohorten aus der Normalbevölkerung können Risikofaktoren für bestimmte Erkrankungen identifiziert werden. In der Framingham-Studie wurde z.B. ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Gesamtcholesterin und kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität nachgewiesen; in der MBL-Studie von Dahl und Mitarbeitern hat sich ein Einfluss von MBL nicht dargestellt.

Es ist zu bemerken, dass modifizierende genetische Einflüsse meist erst anhand sehr großer Fallzahlen erkannt werden können. Im konkreten Fall ist von anderen Gruppen jedoch auch an vergleichbaren Patientenzahlen eine erhebliche Beeinflussung des Krankheitsgeschehens bei der CF gezeigt worden. Demgegenüber stehen nun Negativergebnisse in bereits drei untersuchten Kollektiven.

Mithilfe der für diese Arbeit erfolgten Charakterisierung zweier CF-Populationen und nach Erstellung einer Datenbank wird die Studienpopulation weiter in bezug auf die Rolle anderer potentiell modifizierender Faktoren, die wie CC16, TLR, IL 13 und GSTP mit inflammatorischen Prozessen vergeselllschaftet sind, untersucht.

## 4.4 Exogene Einflüsse in der vorliegenden Studie

### 4.4.1 Gen-Umwelt-Einflüsse

Die pulmonale Beteiligung bei CF ist multifaktoriell bedingt. Von maßgeblicher Bedeutung sind verschiedene Umweltfaktoren (insbesondere Ernährung, Tabakrauchexposition, Medikation, virale und bakterielle Infektionen). Diese Umweltfaktoren wurden in den untersuchten Populationen jedoch nicht standardisiert erfasst. Daher konnten in dieser Arbeit Gen-Umweltinteraktionsanalysen nicht durchgeführt werden.

### 4.4.2 Gen-Gen-Interaktionen

Der Schweregrad der pulmonalen Beteiligung wird vermutlich nicht durch einzelne genetische Faktoren determiniert. Neben Gen-Umwelt-Interaktionen (s.o.) spielen vermutlich auch Gen-Gen-Interaktionen eine Rolle. So ist es denkbar, daß *MBL2*-Varianten in Zusammenspiel mit Varianten in funktionell verwandten Genen (z.B. *MASP1-3, C3, C5*) einen Einfluss auf die bakterielle Besiedlung und die Progredienz der Lungenerkrankung bei CF haben.

## 4.5 MBL

### 4.5.1 Ethnische Unterschiede

Zwischen verschiedenen Kontinenten existieren unterschiedliche Häufigkeiten varianter *MBL2*-Allele. In der vorliegenden Untersuchung lagen die Frequenzen der varianten Allele R52C (Allotyp D), G54N (Allotyp B) und G57E (Allotyp C) bei 0,11, 0,12 bzw. 0,02 (Berlin) und 0,07, 0,12 bzw. 0,03 (Prag). Aus anderen Publikationen sind für kaukasische Populationen vergleichbare Allelfrequenzen berichtet worden.[129,135] Nach Untersuchungen von Madsen et al. findet sich der in Europa häufigste variante Allotyp B auch in Asien in einer Frequenz von >0,12 und in einigen südamerikanischen Stämmen sogar mit Frequenzen von >0,4, er ist dagegen aber im südlichen Afrika sehr selten. Demgegenüber kommt der Allotyp C im südlichen Afrika mit Frequenzen >0,25 vor, während er in Europa und Südamerika selten ist. Der Allotyp D kommt in den vergleichenden Untersuchungen von Madsen et al. mit einer Freuenz von 0,06 nur in Europa vor.[135] Homozygote oder compound-heterozygote Individuen sind mit 6-16% bei in der afrikanischen und südamerikanischen Population häufiger als bei europäischen Populationen, wo das Auftreten zweier varianter Allele bei ca. 5% liegt. Aus solchen je nach Kontinent unterschiedlichen Verteilungsmustern wird z.B. geschlossen, daß die strukturelle Mutation G54N (Allotyp B) sich innerhalb der letzten 50000 Jahre entwickelt haben muß, da sie sich ansonsten in der vor einigen

zehntausend Jahren eingewanderten australischen Aboriginebevölkerung häufiger finden ließe.[135] Zum anderen stellte sich die Frage nach einem Heterozygotenvorteil wie bei der Sichelzellanämie: Intrazelluläre Erreger könnten komplementvermittelte Phagozytoseprozesse für ihre Ansiedlung in Wirtszellen nutzen. Tatsächlich konnte bei hohem MBL-Spiegel ein höheres Risiko für eine viszerale Leishmaniose gezeigt werden[136], nach anderen Ergebnissen ist auch das Risiko für eine Mykobakterieninfektion bei diesen Patienten erhöht.[137,138]

### 4.5.2 MBL-Substitution

Pragmatisch ist vorgeschlagen worden, den Mangel an MBL erst dann als Ursache verschiedener Krankheiten und Infektionen anzunehmen, wenn die Substitution von gereinigtem MBL die jeweiligen Krankheitszustände beheben kann.[83] Zu einer solchen Substitution gibt es bis dato lediglich Einzelfallberichte. Unter diesen befindet sich auch eine Falldarstellung der MBL-Substitution bei einer 21-jährigen CF-Patientin mit sehr schwerem pulmonalen Verlauf und dem *MBL2*-Genotyp XA/0. Der pulmonale Zustand stabilisierte sich kurzfristig auf sehr niedrigem Niveau, ehe die Patientin letztlich an respiratorischem Versagen verstarb. Der Therapieansatz blieb damit ohne eindeutig positives Ergebnis.[84] Nach den inzwischen vorliegenden Ergebnissen gibt es zu einer MBL-Substitution bei der CF keine Indikation.

## 4.6 Ausblick

Als Teil der Komplementkaskade fungiert MBL als Mediator von direkter Zytotoxizität und rezeptorvermittelter Schädigung von Fremdorganismen. Vor allem scheint diese Funktion dann relevant zu sein, wenn das spezifische Immunsystem noch unterentwickelt ist, z.B. im Kleinkindesalter nach Ende des so genannten Nestschutzes durch mütterliche Antikörper. Darauf deuten verschiedene Studien hin, die z.B. zum einen bei ansonsten gesunden Kindern durch Homozygotie für *MBL2*-Exon-1-Varianten eine Verdopplung des Risikos respiratorischer Infekte sahen.[78,80] Jenseits des frühen Kin-

desalters scheint ein MBL-Mangel vor allem dann zum Tragen zu kommen, wenn das Immunsystem durch einen primären oder sekundären Defekt kompromittiert ist, wie etwa während einer Chemotherapie, nach Stammzell-Transplantationen oder bei Autoimmunerkrankungen.[82] Gleichzeitig existiert eine Untersuchung an einem sehr großen dänischen Kollektiv aus der Normalbevölkerung, die bei Erwachsenen mit *MBL2*-Polymorphismen keinen Einfluss auf eine erhöhte Mortalität und Morbidität aufgrund nachweisen konnte.[90]

MBL kann insgesamt als wichtiger Bestandteil des Immunsystems aufgefasst werden. In den kommenden Jahren werden weitere Untersuchungen folgen, die vermehrt Interaktionen mit MBL-assoziierten Serinproteasen untersuchen werden, anstatt den *MBL2*-Genotyp oder MBL-Spiegel isoliert zu betrachten. Auch die Rolle von MBL auf Apoptoseprozesse ist noch weitgehend unverstanden, weitere Ergebnisse stehen hier aus.

# 5 Zusammenfassung

Die zystische Fibrose (CF) ist in Europa die häufigste autosomal-rezessive Stoffwechselerkrankung. Über 1400 *CFTR*-Mutationen wurden bisher identifiziert, welche – je nach Auswirkung auf CFTR-Funktion, Aktivität und Konzentration – in fünf Mutationsklassen eingeteilt werden. Während Korrelationen zwischen *CFTR*-Genotyp und Pankreasinsuffizienz beschrieben sind, gibt es kaum eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation hinsichtlich des Schweregrades der pulmonalen Beteiligung. Es wird vermutet, dass funktionelle Varianten in Genen der angeborenen Immunität den Schweregrad der pulmonalen Erkrankung bei CF bzw. das Risiko einer chronischen bakteriellen Besiedlung massgeblich beeinflussen. Funktionelle Varianten im *MBL2*-Gen (Protein: Mannose-bindendes Lektin) wurden mit einem erhöhtem Risiko für zahlreiche Infektions- und inflammatorische Erkrankungen in Verbindung gebracht. Auch eine schwerere pulmonale Beteiligung bei CF wurde mit *MBL2* -Varianten beschrieben, die Bedeutung von MBL bei CF wird jedoch kontrovers diskutiert.

Ziel der Arbeit war es daher, in zwei großen europäischen CF-Populationen den Einfluss von *MBL2*-Genotypen auf den Schweregrad der pulmonalen Beteiligung sowie auf den Zeitpunkt der chronischen bakteriellen pulmonalen Besiedlung (Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus) zu evaluieren.

Es wurden 148 deutsche und 193 tschechische CF-Patienten klinisch charakterisiert (Spirometrie, mikrobiologische Untersuchungen) und für drei *MBL2*-Exon-1 und eine Promotor-Variante genotypisiert.

Die *MBL2*-Allelfrequenzen zwischen deutschen und tschechischen Patienten unterschieden sich nicht signifikant. Es zeigt sich in keiner Altersgruppe und in keinem der beiden untersuchten Kollektive ein signifikanter Zusammenhang zwischen *MBL2*-Genotyp und dem Lungenfunktionsparameter $FEV_{1.}$ Häufigkeit und Zeitpunkt einer chronischen bakteriellen Besiedlung waren ebenfalls unabhängig vom *MBL2*- Genotyp. Auch in einer Subanalyse von verstorbenen CF-Patienten zeigte sich kein Einfluss von *MBL2*-Varianten auf das mittlere Überleben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen damit keinen Einfluss von *MBL2*-Varianten auf den Schweregrad der pulmonalen Beteiligung bei CF.

# 6 Literaturverzeichnis


1 Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C: Das Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasien. Wien med Wochenschr 1936; 867: 53–56

2 Gibson LE, Cooke RE: A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophesis. Pediatrics 1959; 23 (3): 545-549

3 Riordan JR: The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Annu Rev Physiol 1993; 55: 609-630

4 Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, et al.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989; 245: 1066-1073

5 Staab D: Cystic fibrosis- therapeutic challenge in cystic fibrosis children. Eur J Endocrin 2004; 15: 177-180

6 Kerem E, Conway S, Elborn S, et al.: Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. J Cyst Fibros 2005; 4: 7-26

7 Ratjen F, Doering G: Cystic fibrosis. Lancet 2003; 361: 681-689

8 Cystic Fibrosis Foundation Registry Annual Report 2003. Bethseda, Maryland, USA

9 Sens B, Busse O, Wenzlaff P (Hrsg.): Qualitätssicherung Mukoviszidose- Überblick über den Gesundheitszustand 2002. http//www.muko.info

10 Kerem BS, Rommens JM, Iannuzzi MC, et al.: Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science 1989; 245: 1059-1065

11 Zielenski J: Genotype and phenotype in cystic fibrosis. Respiration 2000; 67: 117-133

12 Witt H: Chronic pancreatitis and cystic fibrosis. Gut 2003; 52 (Suppl 2): 31-41

13 http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr

14 Kerem E, Corey M, Kerem BS, et al.: Clinical and genetic comparisons of patients with cystic fibrosis, with or without meconium ileus. J Pediatr 1989; 114(5): 767-773

15 Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, et al.: The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. Nat Genet 1994; 7: 169-175

16 Welsh M, Smith A: Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. Cell 1993; 73: 1251-1254

17 Kristidis P, Bozon D, Corey M, et al.: Genetic determination of exocrine pancreas function in cystic fibrosis. Am J Hum Genet 1992; 50: 1178-1184

18 Kerem E, Corey M, Kerem BS, et al.: The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis: Analysis of the most common mutation (deltaF508). N Engl J Med 1990; 323(22): 1517-1522

19 Mickle JE, Cutting GR: Genotype–phenotype relationships in cystic fibrosis. Med Clin North Am 2000; 84: 597-607

20 McKone E, Emerson S, Edwards K et al.: Effect of genotype and phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. Lancet 2003; 361: 1671-1676

21 Bronsveld I, Mekus F, Bijman J et al.: Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of dF508 homozygous twins and siblings. J Clin Invest 2001; 108: 1705-1715

22 Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I et al.: Categories of dF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. Twin Res 2000; 3: 277-293

23 Orenstein DM, Winnie GB, Altman H: Cystic fibrosis: A 2002 update. J Pediatr 2002; 140(2): 156-164

24 Hirche T, Smaczny C, v. Mallinckrodt C, et al.: Pulmonale Manifestation der Mukoviszidose im Erwachsenenalter. Dtsch Arztebl 2003; 100(5): A 264–270

25 Abman SH, Ogle JW, Butler-Simon N, et al.: Role of respiratory syncytial virus in early hospitalization for respiratory distress of young infants with cystic fibrosis. J Pediatr 1988; 113(5): 826-830

26 Hiatt PW, Grace SC, Kozinetz CA, et al.: Effects of viral lower respiratory tract infections on lung function in infants with cystic fibrosis. Pediatrics 1999; 103(3): 619-626

27 Davies JC: Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. Paed Resp Rev 2002; 3: 128-134

28 Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB: Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2002; 15(2): 193-222

29 Reiniger N, Ichikawa JK, Pier GB: Influence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on gene expression in response to Pseudomonas aeruginosa infection of human bronchial epithelial cells. Infect Immun 2005; 73(10): 6822-6830

30 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 1995 Annual Report, Bethseda, Maryland, USA

31 Zimakoff J, Høiby N, Rosendal K, et al.: Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa infection and the role of contamination of the environment in a cystic fibrosis clinic. J Hosp Infect 1983; 4: 31-40

32 Pederson SS, Jensen T, Pressler T, et al.: Does centralized treatment of cystic fibrosis increase the risk of Pseudomonas aeruginosa? Acta Paediatr Scand 1986; 75: 840-845

33 Kosorok M, Zeng L, et al.: Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after Pseudomonas aeruginosa acquisition. Pediatr Pulmonol 2001; 32: 277-287

34 Demko C, Byard P, Davis P, et al.: Gender differences in cystic fibrosis: Pseudomonas aeruginosa infection. J Clin Epidemiol 1995; 48(8): 1041-1049

35 Nixon G, Armstrong D, Carzino R, et al.: Clinical outcome after early Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. J Pediatr 2001; 138(5): 699-704

36 Gilligan PH: Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 1991; 4(1): 35-51

37 Cystic Fibrosis Foundation Patients Registry Annual Report 1998. Bethseda, Maryland, USA

38 Ramphal R: The role of bacterial adhesion in cystic fibrosis including the staphyloccocal aspect. Infection 1990; 18: 53-56

39 Huang NN, Schidlow DV, et al.: Clinical features, survival rates, and prognostic rates in young adults with cystic fibrosis. Am J Med 1987; 82: 871-879

40 McCaffery K, Olver R, Franklin M, et al.: 1999 Systematic review of antistaphylococcal antibiotic therapy in cystic fibrosis. Thorax 1999; 54(5): 380-383

41 Lewin LO Byard PY, Davis PB: Effect of Pseudomonas cepacia colonization on survival and pulmonary function of cystic fibrosis patients. J Clin Epidemiol 1990; 43: 125–131

42 Arkwright PD, Laurie S, Super M, et al.: TGF−β(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. Thorax 2000; 55(5): 459-462

43 Drumm M, Konstan MW, Schluchter MD, et al.: Genetic Modifiers of Lung Disease in Cystic Fibrosis. N Engl J Med 2005; 353(14): 1443-1453

44 Hull J, Thomson AH: Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. Thorax 1998; 53(12): 1018-1021

45 Yarden Y, Radojkovic D, De Boeck K, et al.: Association of tumour necrosis factor alpha variants with the CF pulmonary phenotype. Thorax 2005; 60: 320-325

46 Insel PA: Adrenergic receptors- evolving concepts and clinical implications. N Engl J Med 1996; 334: 580-585

47 Büscher R, Herrmann V, Insel PA: Human adrenoceptor polymorphisms: evolving recognition of clinical importance. Trends Pharmacol Sci 1999; 20: 94-99

48 Büscher R, Eilmes K, Grasemann H, et al.: Beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms in cystic fibrosis lung disease. Pharmacogenetics 2002; 12(5): 347-353

49 Feldman RD, Fick RB, McArdle W, Lai CC: Are lymphocyte β−adrenoreceptors altered in patients with cystic fibrosis? Clin Sci 1987; 73: 407-410

50 Arkwright PD, Pravica V, Geraghty PJ, et al.: End-organ dysfunction in cystic fibrosis: Association with angiotensin I converting enzyme and cytokine gene polymorphisms. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167(3): 289-290

51 Mahadeva R, Sharples L, Ross−Russell RI, et al.: Association of α−1-antichymotrypsin deficiency with milder lung disease in patients with cystic fibrosis. Thorax 2001; 56: 53-58

52 Döring G, Krogh-Johansen H, Weidinger S, et al.: Allotypes of alpha 1-antitrypsin in patients with cystic fibrosis, homozygous and heterozygous for delta F 508. Pediatr Pulmonol 1994; 18(1): 3-7

53 Mahadeva R, Westerbeek R, Perry D, et al.: Alpha-1 antitrypsin deficiency alleles and the Taq-I G->A allele in cystic fibrosis lung disease. Eur Respir J 1998; 11: 873-879

54 Mahadeva R, Stewart S, Bilton D, et al.: Alpha-1 antitrypsin deficiency alleles and severe cystic fibrosis lung disease. Thorax 1998; 53: 1022-1024

55 Frangolias D, Ruan J, Wilcox P et al.: Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Alleles in Cystic Fibrosis Lung Disease. Am J Respir Cell Mol Biol 2003; 29: 390-396

56 Baranov VS, Ivaschenko T, Bakay B, et al.: Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases. Hum Genet 1996; 97(4): 516-520

57 Flamant C, Henrion-Caude A, Boelle PY, et al.: Glutathione-S-transferase M1, M3, P1

and T1 polymorphisms and severity of lung disease in children with cystic fibrosis. Pharmacogenetics 2004; 14(5): 295-301

58 Grasemann H, Knauer N, Büscher R, et al.: Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxidase synthase gene. Am J Respirat Crit Care Med 2000; 162: 2172-2176

59 Neth O, Jack DL, Dodds AW, et al.: Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. Infect Immunol 2000; 68: 688–693

60 Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, et al.: A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. Nature 1997; 386: 506-510

61 Vorup-Jensen T, Petersen SV, Hansen AG, et al.: Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. J Immunol 2000; 165: 2093–2100

62 Petersen SV, Thiel S, Jensenius JC: The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. Mol Immunol 2001; 38(2-3): 133-149

63 Carlsson M, Sjöholm A, Eriksson L, et al.: Deficiency of the mannan-binding lectin pathway of complement and poor outcome in cystic fibrosis: bacterial colonization may be decisive for a relationship. Clin Exp Immunol 2004; 139: 306-313

64 Turner MW: The role of mannose-binding lectin in health and disease. Mol Immunol 2003; 40: 423–429

65 Takahashi K, Eddie WK, Ip, Michelow IC, et al.: The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. Curr Op Immunol 2006; 18: 16–23

66 Holmskov U, Thiel S, Jensenius J: Collectins and ficolins: Humoral lectins of the innate immune defense. Annu Rev Immunol 2003; 21: 547-578

67 Garred P, Larsen F, Madsen O: Mannose-binding lectin deficiency- revisited. Mol Immunol 2003; 40: 73-84

68 Taylor ME, Brickell, PM, Craig, RK, et al.: Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. Biochem J 1989; 262: 762-771

69 Sastry K, Herman GA, Day L, et al.: The human mannose-binding protein gene- exon structure reveals its evolutionary relastionship to a human pulmonary surfactant gene and localisation to chromosome 10. J Exp Med 1989; 170: 1175-1189

70 Guo N, Mogues T; Weremowicz S, et al.: The human ortholog of rhesus mannose-binding protein-A is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10. Mamm Genome 1998; 99: 246-249

71 Sumiya M, Super M, Tabona T, et al.: Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. Lancet 1991; 337: 1569-1570

72 Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JAL, et al.: A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. Immunogenetics 1994; 40: 37-44

73 Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, et al.: High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. Hum Mol Genet 1992; 17: 9-15

74 Madsen HO, Garred P, Thiel S, et al.: Interplay between promotor and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. J Immunol 1995; 155(6): 3013-3020

75 Miller M, Seals J, Kaye R, et al.: A familial, plasma associated defect of phagocytosis: new cause of recurrent bacterial infection. Lancet 1968; 2: 60-63

76 Richardson V, Larcher V, Price JF: A common congenital immunodefiency predisposing to infection and atopy in infancy. Arch Dis Child 1983; 58: 799-802

77 Super M, Thiel C, Lu J, et al.: Association of low levels of mannan-binding protein with a common opsonic in immunodeficient children. Lancet 1989; 2: 1236-1239

78 Summerfield J, Sumiya M, Levin M, et al.: Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. BMJ 1997; 314: 1229-1232

79 Summerfield J, Ryder S, Sumiya M: Mannose binding protein mutations associated with unusual and severe infections in adults. Lancet 1995; 345: 886-889

80 Koch A, Melbye M, Madsen HO, et al.: Acute respiratory tract infections and mannose binding lectin insufficiency during early childhood. JAMA 2001; 285: 1316-1321

81 Roy S, Knox K, Segal S, et al.: MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: A case-control study. Lancet 2002; 359: 1569-1573

82 Eisen P, Minchinton R: Impact of Mannose-binding Lectin on Susceptibility to Infectious Diseases. Clin Infect Dis 2003; 37: 1496-1505

83 Valdimarsson H, Stefansson M, et al.: Reconstitution of Opsonizing Activity by Infusions of Mannan-Binding Lectin to MBL-Deficient Humans; Scand J Immunol 1998; 48: 116-123

84 Garred P, Pressler T, Lanng S, et al.: Mannose-binding lectin (MBL) therapy in an MBL-deficient patient with severe cystic fibrosis lung disease. Pediatr Pulmonol 2002; 33: 201-207

85 Davies EJ, Snowden N, Hillarby D, et al.: Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1995; 38: 110-114

86 Lau YL, Lau CS, Chan J, et al.: Mannose-binding protein in Chinese patients with SLE Arthritis. Rheumatology 1996; 39: 706-708

87 Biezeveld MH, Kuipers IM, Geissler J, et al.: Association of mannose-binding lectin genotype with cardiovascular abnormalities in Kawasaki disease. Lancet 2003; 361: 1268-1270

88 Madsen H, Videm V, et al.: Association of mannose-binding lectin defiency with severe atherosclerosis. Lancet 1998; 352: 959-60

89 Hegele R, Ban M, et al.: Infection susceptibility alleles of mannose-binding lectin are associated with increased carotid plaque area. J Investig Med 2000; 48: 198-203

90 Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, et al.: A population-based study of morbidity and mortality in mannose- binding lectin defiency. J Exp Med 2004; 199: 1391-1399

91 Garred P, Pressler T, Madsen HO, et al.: Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. J Clin Invest 1999; 104(4): 431-437

92 Gabolde M, Guilloud-Bataille M, Feingold J, et al: Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: A cohort study. Br Med J 1999; 319: 1166-1167

93 Davies JC, Turner MW, Klein N: Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated MBL-2 alleles. Eur Respir J 2004; 24(5): 798-804

94 Yarden J, Radojkovic D, De Boeck K, et al.: Polymorphisms in the mannose binding lectin gene affect the cystic fibrosis pulmonary phenotype. J Med Genet 2004; 41: 629-633.

95 QIAmp DNA Mini Kit and QIAmp DNA Blood Mini Kit Handbook, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany, 9/2006. http:// www.quiagen.com

96 Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 1987; 155: 335-350

97 LightCycler Operator´s Manual, Version 3.5: October 2000, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

98 Atmen – Atemhilfen. Hrsg. Oczenski W, Andel H, Werba A. 7. Auflage 2006. Georg Thieme Verlag Stuttgart

99 Kulich M, Rosenfeld M, Campbell J, et al.: Disease-specific equations for lung function in patients with cystic fibrosis. Am J Res Crit Care Med 2005; 172: 885-891

100 Knauer N, Ratjen F, Grasemann H: Modifizierende Gene bei der zystischen Fibrose. Pneumologie 2005; 59: 395-404

101 Arkwright PD, Laurie S, Super M, et al.: TGF−β(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. Thorax 2000; 55(5): 459-46

102 Drumm M, Konstan MW, Schluchter MD, et al.: Genetic Modifiers of Lung Disease in Cystic Fibrosis. N Engl J Med 2005; 353(14): 1443-1453

103 Greally P, Hussein MJ, Cook AJ, et al.: Sputum tumour necrosis factor-alpha and leukotriene concentrations in cystic fibrosis. Arch Dis Child 1993, 68(3): 389-392

104 Hull J, Thomson AH: Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. Thorax 1998; 53(12): 1018-1021

105 Yarden Y, Radojkovic D, De Boeck K, et al.: Association of tumour necrosis factor alpha variants with the CF pulmonary phenotype. Thorax 2005; 60: 320-325

106 Insel PA: Adrenergic receptors- evolving concepts and clinical implications. N Engl J Med 1996; 334: 580-585

107 Büscher R, Herrmann V, Insel PA: Human adrenoceptor polymorphisms: evolving recognition of clinical importance. Trends Pharmacol Sci 1999; 20: 94-99

108 Büscher R , Eilmes K , Grasemann H, et al.: Beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms in cystic fibrosis lung disease. Pharmacogenetics 2002; 12(5): 347-353

109 Uhal BD, Gidea C, Bargout R, et al.: Captopril inhibits apoptosis in human lung epithelian cells: A potential antifibrotic mechanism. Am J Physiol 1998: 275; 1013-1017

110 Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, et al.: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-1-converting enzyme accounting for half the variance of serum enzyme levels. J Clin Invest 1990; 86(4): 1343-1346

111 Arkwright PD, Pravica V, Geraghty PJ, et al.: End-organ dysfunction in cystic fibrosis: Association with angiotensin I converting enzyme and cytokine gene polymorphisms. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167(3): 289-90

112 Mahadeva R, Sharples L, Ross−Russell RI, et al.: Association of α−1-antichymotrypsin deficiency with milder lung disease in patients with cystic fibrosis. Thorax 2001; 56: 53-58

113 Döring G, Krogh-Johansen H, Weidinger S, et al.: Allotypes of alpha 1-antitrypsin in patients with cystic fibrosis, homozygous and heterozygous for delta F 508. Pediatr Pulmonol 1994; 18(1): 3-7

114 Mahadeva R, Westerbeek R, Perry D, et al.: Alpha-1 antitrypsin deficiency alleles and the Taq-I G->A allele in cystic fibrosis lung disease. Eur Respir J 1998; 11: 873-879

115 Mahadeva R, Stewart S, Bilton D, et al.: Alpha-1 antitrypsin deficiency alleles and severe cystic fibrosis lung disease. Thorax 1998; 53: 1022-1024

116 Frangolias D, Ruan J, Wilcox P et al.: Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Alleles in Cystic Fibrosis Lung Disease. Am J Respir Cell Mol Biol 2003; 29: 390-396

117 Baranov VS, Ivaschenko T, Bakay B, et al.: Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases. Hum Genet 1996; 97(4): 516-520

118 Flamant C, Henrion-Caude A, Boelle PY, et al.: Glutathione-S-transferase M1, M3, P1 and T1 polymorphisms and severity of lung disease in children with cystic fibrosis. Pharmacogenetics 2004; 14(5): 295-301

119 Grasemann H, Knauer N, Büscher R, et al.: Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxidase synthase gene. Am J Respirat Crit Care Med 2000; 162: 2172-2176

120 Blaisdell C, Howard T, Stern A: CLC-2 single nucleotide polymorphisms (SNPs) as potential modifiers of cystic fibrosis disease severity. BMC Med Genet 2004; 5: 26

121 Takahashi K, Ezekowitz RA: The role of the mannose-binding lectin in innate immunity. Clin Infect Dis 2005, 41; 440-444

122 Aurora P, Wade A, Whitmore P, et al.: A model for predicting life expectancy of children with cystic fibrosis. Eur Respir J 2000; 16: 1056–1060.

123 Davis PB, Byard PJ, Konstan MW: Identifying treatments that halt progression of pulmonary disease in cystic fibrosis. Pediatr Res 1997; 41: 161-165

124 Zapletal A, Samanek M, Paul T: Lung function in children and adolescents.Methods.Reference values. Studied healthy subjects. In: Herzog H (Hrsg.): Progress in Respiration Research. Basel: Karger; 1987; 22(1-3): 192-196

125 Quanjer P, Tammeling G, et al.: Report Working Party Standardization of Lung Function Tests. European Community for Steel and Coal. Eur Respir J Suppl 1993; 16: 5-40

126 Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I et al.: Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. Twin Res 2000; 3: 277–293.

127 Jung A, Kleinau I, Schönian G, et al: Sequential genotyping of Pseudomonas aeruginosa from upper and lower airways of cystic fibrosis patients. Eur Respir J 2002, 20:

1457-1463.

128 De Boeck K: Improving standards of clinical care in cystic fibrosis. Eur Respir J 2000; 16: 585–587

129 Steffensen R, Thiel S, Varming K, et al.: Detection of structural gene mutations and Promotor polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. J Immunol Meth 2000; 241: 33-42

130 Valdimarsson H, Vikingsdottir T, Bang P, et al.: Human plasma-derived mannose-binding lectin: a phase I safety and pharmacokinetic study. Scand J Immunol 2004; 59: 97-102

131 Kilpatrick DC: Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. Transfus Med 2002; 12(6): 335-352

132 Dawber TR, Meadors GF, Moore FEJ: Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. Am J Public Health 1951; 41: 279-286

133 http://www.nhlbi.nih.gov/about/framingham

134 Super M, Gillies SD, Foley S, et al.: Distinct and overlapping functions of allelic forms of human mannose binding protein. Nature Genet 1992; 2: 50–55

135 Madsen HO, Satz ML, Hogh B, et al.: Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. J Immunol 1998; 161: 3169–3175

136 Santos IK, Costa CH, Krieger H, et al.: Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. Infect Immun 2001; 69: 5212–5215

137 El Sahly HM, Reich RA, Dou SJ, et al.: The effect of mannose binding lectin gene polymorphisms on susceptibility to tuberculosis in different ethnic groups. Scand J Infect Dis 2004; 36: 106–108

138 Hoal-Van Helden EG, Epstein J, Victor TC, et al.: Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. Pediatr Res 1999; 45: 459–464

# 7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht mit veröffentlicht.

# 8 Danksagung

Ich danke meiner Betreuerin und „Doktormutter", Frau Privatdozentin Dr. med. Renate Nickel, für den Anstoß zu dieser Arbeit und die stetige geduldige Begleitung dieses Projektes. Ohne die positiven Rückkopplungen zu ihr und regelmäßige neue Denkanstöße hätte diese Arbeit nicht entstehen können. Ihre kritische Art in der Betrachtung wissenschaftlicher Ergebnisse wird mich dauerhaft prägen und mir für meinen weiteren Berufsweg ein Vorbild sein.

Mein weiterer großer Dank gebührt Herrn PD Dr. med. Heiko Witt, der mich in die Welt der Genanalysen und Polymorphismendetektion einführte. Auch mit ihm konnte ich meine Ergebnisse immer ausführlich diskutieren. In dem Labor, das er gemeinsam mit Renate Nickel leitet, habe ich mit Freude gearbeitet.

Dabei haben mich die technischen Assistenten Markus Braun und Claudia Güldner zu akribischem Arbeiten angeleitet und mir überhaupt sehr geholfen. Für die immer sehr angenehme Zusammenarbeit danke ich ihnen von ganzem Herzen. Auch mit meinen Mitdoktoranden Anna Hachfeld und Dr. med. Philipp Deindl habe ich mich über meine und ihre Ergebnisse immer rege austauschen können, wofür ich ihnen danke.

Für die Planung dieser Studie kamen wertvolle Hinweise von Frau Dr. med. Doris Staab und Prof. Dr. med. Bodo Niggemann. Beide bewundere ich auch für die menschlich-warmherzige Art, mit der sie ihre kleinen Patienten betreuen. Den Mitarbeiter der CF-Ambulanz danke ich dafür, daß sie mich in ihren Räumlichkeiten herzlich aufgenommen haben. Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Wahn danke ich dafür, daß ich in seiner Klinik promovieren und erfahren konnte, wie Wissenschaft und klinische Arbeit eine fruchtbare Symbiose eingehen können.

Für die Statistik kamen mir die Hinweise von Herrn Dr. med. Thomas Keil und Frau Dr. rer. nat. Beate Bestmann sehr zugute, ohne welche sich mir die Anforderungen an eine solche Untersuchung nur schwer erschlossen hätten.

Für die Überlassung der DNA sowie der klinischen Daten gebührt mein Dank Herrn

Professor Milan Macek und Frau Dr. Monika Koudova aus Prag.

Den CF-Patienten danke ich dafür, daß ich ihre Krankheitsgeschichten analysieren und ihre DNA untersuchen durfte. Ich bewundere viele unserer Patienten sehr für ihre Art, die Erkrankung zu meistern und dabei den Lebensmut nicht zu verlieren.

Meine Freundin Veronika hat mich insbesondere in der Phase der Fertigstellung durch ihre immer positive Grundeinstellung sehr motiviert. Für dies und alles andere alles danke ich ihr sehr.

Vor allem danke ich meiner Familie und hier ganz besonders meinen Eltern Ruth und Willm Deckena. Sie ermöglichten mir, mein Berufsziel des Arztes zu verwirklichen und ich bin glücklich, ihnen mit der Fertigstellung dieser Arbeit nun eine Freude machen zu können.

Stefan Deckena, im August 2007

# 9 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Stefan Deckena, erkläre an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Einfluss von *MBL2*-Polymorphismen auf den pulmonalen Verlauf der zystischen Fibrose" eigenständig verfasst habe. Sämtliche benutzte Literatur ist im Anhang verzeichnet. Ich habe weder beim experimentellen Teil noch bei der Auswertung der Ergebnisse unzulässige Hilfe von dritter Seite angenommen und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten benutzt.

Die „Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis" der Charité habe ich befolgt.

Stefan Deckena, im August 2007