

## 2. Studienteilnehmer und Materialien

### 2.1 Patienten

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Charité (Antragsnummer 181/2001) und der Ethikkommission der Universität Leipzig genehmigt. Alle Patienten wurden über die wissenschaftlichen Ziele und die Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen aufgeklärt. Die Entnahme venösen Blutes erfolgte nach Aufklärung und Zustimmung der Patienten.

In die Studie wurden insgesamt 533 Patienten eingeschlossen. Das Patientenkollektiv aus Berlin umfaßte 311 Patienten (176 weiblich, 135 männlich; Altersmedian 12 Jahre (Mittelwert 13,1 Jahre), Bereich 1-62 Jahre; 200 idiopathische CP, 75 hereditäre CP, 36 Patienten mit nicht eindeutiger Unterscheidung; rekrutiert zwischen 1998 und 2006). Weiterhin wurden 211 Eltern der untersuchten Patienten eingeschlossen (115 Mütter, 96 Väter; Altersmedian 39 Jahre, Bereich 26-58 Jahre, 51 ohne Altersangabe; 179 gesund, 21 erkrankt, 11 fraglich an CP erkrankt).

Das Patientenkollektiv aus Leipzig umfaßte 222 Patienten (118 weiblich, 104 männlich; Altersmedian 23 Jahre, Bereich 5-81 Jahre; 143 idiopathische CP, 45 hereditäre CP, 34 Patienten mit nicht eindeutiger Unterscheidung; rekrutiert zwischen 1997 und 2003).

Als Einschlußkriterium für die Patienten in dieser Studie galten mindestens zwei eindeutig voneinander unabhängige Episoden von wiederkehrenden Bauchschmerzen mit erhöhten Pankreasenzymwerten im Serum (Lipase, Amylase) und pathologischen bildgebenden Befunden (Abdomensonographie, Computertomographie, Magnet-Resonanz-Tomographie).

Eine hereditäre CP wurde bei positiver Familienanamnese mit mindestens zwei betroffenen Verwandten ersten Grades ohne weitere offensichtliche Risikofaktoren diagnostiziert. Die Diagnose idiopathische CP wurde bei Patienten gestellt, bei denen prädisponierende Risikofaktoren wie beispielsweise Alkoholabusus, Trauma, Medikamenteneinnahme, Infektionen, metabolische Störungen oder eine positive Familienanamnese fehlten.

Bei 128 Patienten, die aus dem Berliner Zentrum stammten, wurde der gesamte kodierende Bereich des *CFTR*-Gens (27 Exone) mittels „single strand conformation polymorphism“ (SSCP)-Analyse auf Mutationen untersucht.

Alle 533 Patienten wie auch alle 211 Patienteneltern wurden zudem auf insgesamt 37 verschiedene *CFTR*-Varianten getestet: p.E60X, p.R75Q, p.G85E, p.R117H, p.I148T, c.621+1G>T, c.711+1G>T, c.1078delT, p.R334W, p.R347P, 9/10/11/12/13TG, 5T/7T/9T,

p.A455E, p.M470V, p.F508del, c.1716G>A (p.E528E), c.1717-1G>A, p.G542X, p.S549N, p.R553X, p.R560T, c.1898+1G>A, c.2143delT, c.2183AA>G, c.2694T>G, c.2789+5G>A, p.L997F, p.I1005R, p.Y1092X, p.D1152H, p.R1162X, c.3659delC, p.S1235R, p.S1251N, p.W1282X, p.N1303K und c.4521G>A.

Im weiteren wurden bei den 311 Berliner Patienten alle 4 Exone des *SPINK1* sowie die Exone 2 und 3 des *PRSSI* bidirektional, die Exone 1, 4 und 5 des *PRSSI* unidirektional sequenziert. Bei den 222 Patienten aus Leipzig wurden bidirektional das Exon 1 des *SPINK1* und unidirektional die Exone 2, 3 und 4 des *SPINK1* sowie die Exone 2 und 3 des *PRSSI* sequenziert. Die *PRSSI*-Sequenzierungen der Leipziger Proben wurden in der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Leipzig durch die dortigen Mitarbeiter durchgeführt.

## 2.2 Kontrollen

Wir untersuchten insgesamt 1828 Kontrollpersonen auf *CFTR*-Varianten. 552 Kontrollen, die in Berlin und Leipzig rekrutiert worden sind, wurden auf 37 verschiedene Varianten untersucht (siehe oben).

Das Kontrollkollektiv aus Berlin umfaßte 438 Personen (210 weiblich, 191 männlich, 37 mit unbekanntem Geschlecht; Altersmedian 43 Jahre, Bereich 22-101 Jahre). Von diesen 438 wurden 191 Probanden im Rahmen der „Berlin Aging Study (BASE)“ zwischen 1993 und 1995 rekrutiert. Zusätzlich wurden 247 Medizinstudenten und medizinisches Personal, die von 1996 bis 1998 rekrutiert wurden, eingeschlossen.

Das Kontrollkollektiv aus Leipzig umfaßte 114 Personen (34 weiblich, 28 männlich, 52 mit unbekanntem Geschlecht; Altersmedian 44 Jahre, Bereich 20-64 Jahre). Bei den Leipziger Kontrollpersonen handelte es sich um Blutspender, die im Jahr 2000 rekrutiert wurden.

Einzelne Varianten wurden zusätzlich an einem weiteren Kontrollkollektiv untersucht, das aus 1276 Personen bestand (757 weiblich, 499 männlich, 20 mit unbekanntem Geschlecht; Altersmedian 31 Jahre, Bereich 17-68 Jahre). Hierbei handelte es sich um 1074 Eltern gesunder Neugeborener, die im Jahr 1990 rekrutiert worden sind und um 202 Blutspender des Universitätsklinikums. Bei allen 1276 Probanden wurden die *CFTR*-Varianten p.R117H, p.I148T, p.L997F, p.D1152H und p.S1235R analysiert. Das TG-Repeat und der Polypyrimidin-Trakt (5T/7T/9T) im Intron 8 wurden bei 666 bzw. 673 Kontrollpersonen bestimmt, p.R75Q wurde bei 283, p.M470V bei 667, p.F508del bei 674 und c.1716G>A (p.E528E) bei 287 Kontrollpersonen analysiert.

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

---

QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Oligonukleotide	TIB MOLBIOL, Berlin
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystem, Weiterstadt
GeneAmp 10x PCR-Puffer, MgCl <sub>2</sub> , dNTPs	Applied Biosystem, Weiterstadt
Bayol F	Serva, Heidelberg
PCR-Gefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
Acrylamid, Bisacrylamid	Biorad Laboratories, München
Ammoniumpersulfat	Biorad Laboratories, München
Harnstoff / Polyethylenglykol	Biorad Laboratories, München
N,N,N`N`-Tetramethylethylendiamin	Biorad Laboratories, München
Repel-Silan	Pharmacia Biotech
LightCycler-Kapillaren	Roche Diagnostics, Mannheim
Alkalische Phosphatase, Exonuklease	GE, Amersham USB, Freiburg
ABI Prism BigDye Terminator Kit	Applied Biosystem, Weiterstadt
Centri Sep-Säulen	Princeton Separations, Adelphia, USA
Sephadex G-50	Amersham, Uppsala, Schweden
Glasplatten (SSCP/Sequenzierung)	Pharmacia Biotech

---

## 2.4 Geräte

---

Elektrophoresekammern Multiphor II	Pharmacia Biotech
Thermostat DC3-K20/Steuerung DC10 (Elektrophorese)	Haakle
Netzteil Power Pac 3000 (Elektrophorese)	Biorad Laboratories, München
Zentrifuge Labofuge 400 (DNA-Extraktion)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5417R (PCR, Cycle Sequencing Aufreinigung)	Eppendorf, Köln
Vortex	IKA, Staufen
Thermoblock Thermostat 3401	Eppendorf, Köln
Analysenwaage 2006MP	Sartorius, Göttingen
Biometra Trio Thermoblock (PCR)	Biometra, Göttingen
Sequencer ABI 373A und ABI 31000	Applied Biosystems, Weiterstadt
LightCycler 3.5 (Schmelzkurvenanalyse)	Roche Diagnostics, Mannheim
LightCycler-Zentrifuge	Roche Diagnostics, Mannheim

---