

### **3. Methoden**

#### **3.1 DNA-Extraktion**

Die DNA-Extraktion erfolgte mittels Affinitätssäulen nach dem Protokoll der Firma Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit).

#### **3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die PCR ist eine von Mullis und Mitarbeitern entwickelte *in-vitro* Technik, bei der bestimmte Abschnitte der Ziel-DNA amplifiziert werden können. Anfang und Ende des zu amplifizierenden Abschnitts werden 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 die Wiederholung der Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz.

Ein PCR Reaktionsansatz enthielt 18,4 µl aqua dest., 2,5 µl Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Gelatine), 1,0 µl dNTPs (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 0,25 µl Primer (vorwärts, rückwärts) und 0,5 U AmpliTaq Gold (0,1 µl). Nach Zugabe der DNA wurde das Gesamtvolumen von 25 µl mit einem Tropfen Öl (Bayol F) überschichtet, um eine Verdunstung zu vermeiden. Die PCR wurde in einem Biometra Trio Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung der DNA sowie Denaturierung und Dissoziation der monoklonalen Antikörper von der AmpliTaq (sogenannter „hot start“) für 12 min bei 95 °C. Anschließend 49 Zyklen: Denaturierung für 15 sek bei 95 °C, Annealing für 30 sek (primerspezifische Temperaturen siehe Tabelle 1-3), Extension für 90 sek bei 72 °C und nach 49 Zyklen abschließende Extension für 2 min bei 72 °C.

#### **3.3 Primer**

Die bei der SSCP und der Sequenzierung eingesetzten Primer (Tabelle 1-3) wurden von TIB MOLBIOL, Berlin, hergestellt.

**Tabelle 1:** Sequenz und Annealing-Temperatur der Primer für PCR, Sequenzierung und SSCP-Analyse des *CFTR*.

Exon	Primer (sense)	Primer (antisense)	Annealing
1	5-ggCACCCAgAgTAgTAggTC	5-CCT-TTACCCCAAACCCAACC	58°C
2	5-CAAgTgAATATCTgTTCCTCC	5-gCCACCATACTTggCTCCTAT	58°C
3	5-gTTAAgggAAATAggACAAC	5-ATTCACCAgATTTcTgTAgTC	54°C
4-1	5-TCACATAtggTATgACCCTC	5-gCCTATgCCTAgATAAATCgCg	58°C
4-2	5-gTACAgCCTCTCTTACTGgg	5-TTgTACCagCTCACTACCTA	58°C
5	5-TGAATGCATAATAACTGAATTAGTC	5-AAgCTAgAgCTgAgCAAgAC	54°C
6A	5-TggAAgATACAATgACACCTg	5-TATgCATAgAgCAGTCCTgg	58°C
6B	5-TgACTTAAAACCTTgAgCAGTTC	5-ATgAggTggAAgTCTACCATg	58°C
7	5-CggAAggCAgCCTATgTgAg	5-gTTCATTAgAACTgATCTATTgACTg	58°C
8	5-ATAAGATgTAGCACAATgAgAg	5-TCgCCATTAggATgAAATCC	58°C
9	5-gCATCTATTgAAAATATCTgACAAACTC	5-AgAgACAtggACACCAAATTAAgTTC	62°C
10-1	5-gCAAgTgAATCCTgAgCgTg	5-gCATgCTTTgATgACgCTTCTg	58°C
10-2	5-gAgAACTggAgCCTTCAgAg	5-CTTTTgggTAgTgTgAAgggTTC	58°C
11	5-gCCTTTCAAATTCAgATTgAgC	5-TTACATgAATgACATTTACAgC	58°C
12	5-CATCTACACTAgATgACCAg	5-CTgCCATACCAACAATggTg	58°C
13	5-TgggATgTgATTCTTTCgACC	5-TCAgAATCCTCTTCgATgCC	58°C
13-1	5-TgCTAAAATACgAgACATATTgC	5-TggCTgTAGATTTTggAgTTCTg	58°C
13-2	5-ggAACATTTAAAgAAAgCTgAC	5-TgAgAAACggTgTAAggTCT	54°C
13-4	5-CTCAATCCAATCAACTCTATACg	5-TTCgTgTggATgCTgTTgTC	58°C
13-5	5TCTgAACCTgATgACACAC	5-CTACTCAATTgCATTCTgTggg	58°C
14A	5-CACAATggTggCATgAAACTg	5-TgTATACATCCCCAAACTATCT	58°C
14B	5-ATgggAggAATAggTgAAgATg	5-CACTACCATAATgCTTgggAg	62°C
15-1	5-TCAgTAAgTAACTTTggCTgCC	5-AgTATgCACCAgTggTAGACC	58°C
15-2	5-CAgTgATTATCACCAgCACCAg	5-CCTATTgATggTggATCAgCAg	58°C
16	5-TgAATgCgTCTACTgTgATCC	5-TAATACAgACATACTTAACggTAC	58°C
17A	5-CTgACACACTTTgTCCACTTTgC	5-AgATgAgTATCgCACATTCCTg	58°C
17B-1	5-CTAATTTAgTCTTTTTTCaggTACAAG	5-TTggAACCAGCgCAGTgTTg	58°C
17B-2	5-ggACACTTCgTgCCTTCggA	5-AATgCTTAgCTAAAgTAAATgAgTTC	58°C
18	5-TgTgCCCTAaggAgAAgTgTg	5-TACTCATACTTTgTTACTTgTCTg	58°C
19-1	5-CAAATAATTgTgAAATTgTCTgCC	5-CAGATgTCATCTTCTTCACgTg	58°C
19-2	5-CATACAAgAATggCCAACCTCTC	5-CAGTCTAACAAAgCAAgCAGTg	58°C
20	5-gTCACAgAAgTgATCCATCAC	5-CTTgAgTACAAgTATCAAATAgCAg	58°C
21	5-TTg-AgAgAACTTgATggTAAgTAC	5-AAgTgTgTAGAATgATgTCAgC	58°C
22	5-TAgAATgTCAACTgCTTgAgTg	5-TgATTCTgTTCCCACTgTgC	58°C
23	5-ATACAgATCATTACTgTTCTgTg	5-TgCAggAACTATCACATgTgAg	58°C
24	5-CCCAGATCTCACTAACAgCC	5-CATgAgCAAATgTCCCATgTC	58°C

**Tabelle 2:** Sequenz und Annealing-Temperatur der Primer für PCR und Sequenzierung des *SPINK1*. Wenn nicht näher klassifiziert wurden die Primer für PCR und Sequenzierung eingesetzt. P: PCR-Primer, S: Sequenzier-Primer.

Exon	Primer (sense)	Primer (antisense)	Annealing
1	5-TTTgAgTTCATCTTACA <sub>gg</sub> TgAg	5-gTgCTTCACAAA <sub>g</sub> CAACA <sub>gg</sub> TC	56°C
2 P	5-gggTggggAATgAAA <sub>g</sub> AgCC	5-TTggTgATTgggAgAgCTgC	56°C
2 S	5-CACA <sub>g</sub> TCTgCAATgAAA <sub>g</sub> CAgAg	5-gCCAACATggTCAA <sub>ACT</sub> ggCTg	56°C
3	5-CCAATCACAgTTATTCCCCA <sub>g</sub> Ag	5-CACCACTTATggTCACTgAgg	56°C
3 S	-	5-gTTTgCTTTTCTCggggTgAg	56°C
4	5-gATTATAAATCTCAAACCTCTCC	5-TCATgATCATCTgTgCTCTgCC	56°C

**Tabelle 3:** Sequenz und Annealing-Temperatur der Primer für PCR und Sequenzierung des *PRSSI*.

Exon	Primer (sense)	Primer (antisense)	Annealing
1	5-gAgTggCCAAACATAgCCAg	5-gCATTTgTCggCCAggAACg	58°C
2	5-CgCCACCCCTAACATgCTAT	5-CTCTCCCaggCAgACTggCC	64°C
3	5-AAggTgggATaggTgCCCTg	5-ggATggAgggAAgTAgAAggACT	58°C
4	5-gACCCACATTTCTACTTCCTTTgATC	5-CTCAgCATgggAAggTTgg	58°C
5	5-TATTCCTCCTCCATCTCTCCATAC	5-CAgTgTgAAggAgTgAgAgg	54°C

### 3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

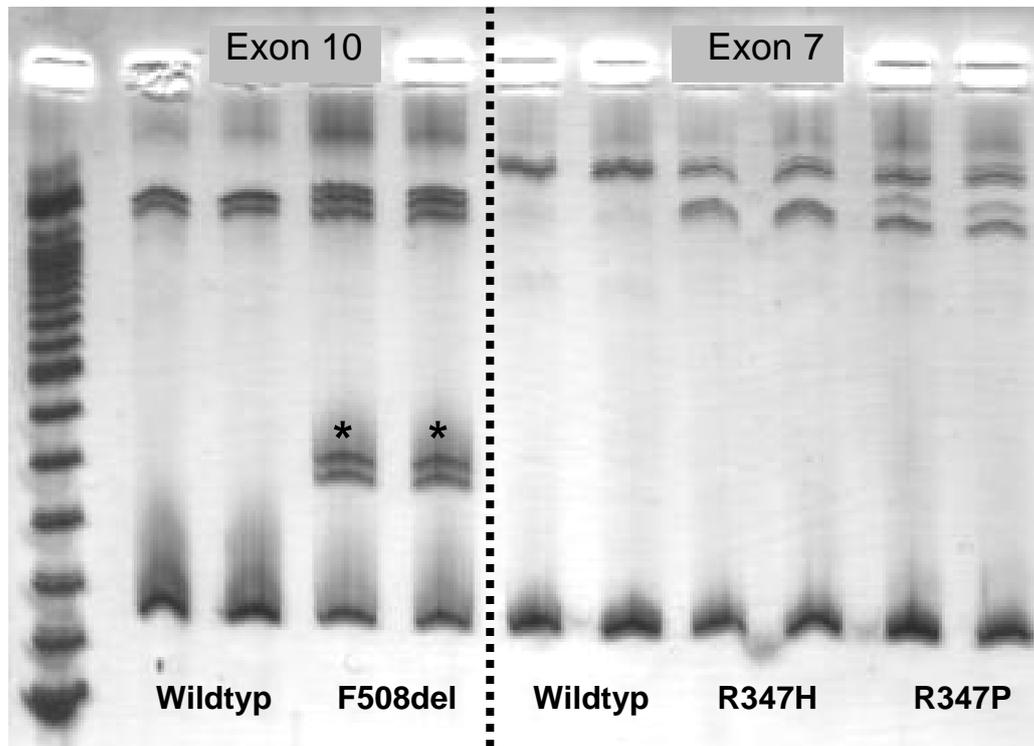
Geladene Moleküle wandern in einem elektrischen Feld in Richtung der Elektrode, die ihrer Ladung entgegengesetzt ist. Aufgrund unterschiedlicher Größe, Ladung und Gelzusammensetzung kommt es zur Auftrennung eines Molekülgemisches. Unter Ausnutzung der negativen Ladung der DNA-Phosphatgruppen können Polyacrylamid-Gele zur Auftrennung von PCR-Produkten eingesetzt werden.

#### 3.4.1 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analyse

Bei 128 Patienten, die aus dem Berliner Zentrum stammten, wurde der gesamte kodierende Bereich des *CFTR*-Gens mittels SSCP-Analyse auf Mutationen untersucht.

Durch die SSCP-Analyse können Veränderungen der thermisch denaturierten DNA-Einzelstränge (ssDNA), bis hin zum einzelnen Basenaustausch, sichtbar gemacht werden. Diese Veränderungen können zu unterschiedlichen intramolekularen Basenpaarungen führen, welche die elektrophoretische Mobilität verändern und somit zu einem vom Wildtyp (WT) verschiedenen Bandenmuster führen (Orita *et al.* 1989). Ein unterschiedliches Bandenmuster ist

jedoch nicht bei allen Veränderungen bzw. nicht unter allen Auftrennungsbedingungen zu sehen. Deshalb wird die Temperatur, die Laufdauer und die Gelzusammensetzung variiert, um Veränderungen mit größerer Wahrscheinlichkeit zu detektieren. In der Abbildung 7 ist exemplarisch das unterschiedliche Wanderungsverhalten einiger Variationen im Vergleich zum Wildtyp dargestellt.



**Abbildung 7:** SSCP-Analyse des Exons 10 (links) und des Exons 7 (rechts) des *CFTR*-Gens. Am oberen Gelende, nahe der Probenauftragstaschen, zeigen sich die DNA-Einzelstränge. Am unteren Gelende finden sich die schneller wandernden Doppelstränge. Bei F508del sind zusätzlich Heteroduplices zu sehen (\*), wie sie typischerweise bei kleineren Insertionen oder Deletionen zu finden sind.

### 3.4.2 Herstellung der Polyacrylamidgele

Nach Reinigung beider Glasplatten mit Ethanol (70 %) wurde die gummierte Platte mit 7 Schichten Paketklebeband beklebt. An definierten Stellen wurden Taschen (2 Reihen à 26) ausgeschnitten und das überschüssige Klebeband entfernt. Um das Gel nach dem Gießen leichter von den Platten lösen zu können, wurden die Glasplatten mit Repel-Silan beschichtet.

Um eine größere mechanische Stabilität und eine bessere Handhabung zu erreichen, wurden die Gele auf eine GelBond PAG-Folie gegossen. Hierfür wurde die Folie auf die Glasplatte gelegt und mit Hilfe eines Gummirollers fest an die Platte gedrückt. Die einzelnen Reagenzien für das

Acrylamidgel wurden gemäß der Tabellen 4 und 5 zusammen gegeben und mittels einer 5 ml-Pipette in die Gelkassette gegossen. Die Polymerisation dauerte 60 min.

**Tabelle 4:** Stammlösungen für C<sub>2</sub>-, C<sub>0,5</sub>- und MDE-Gele.

	T <sub>30</sub> C <sub>2</sub> Gel 12 %	T <sub>30</sub> C <sub>0,5</sub> Gel 12 %
Acrylamid	29,4 g	29,85 g
Bis-Acrylamid	0,6 g	0,15 g
Aqua dest.	ad 100 ml	ad 100 ml

**Tabelle 5:** Gelzusammensetzung für die SSCP-Analyse.

	C <sub>2</sub> Gel	C <sub>0,5</sub> Gel	MDE Gel
Stammlösung	12 g	12 g	12 g
Harnstoff	1,8 g	-	-
5x TBE	6 ml	6 ml	6 ml
PEG 5 %	3 ml	3 ml	-
H <sub>2</sub> O	ad 30 ml	ad 30 ml	ad 30 ml
TEMED	24 µl	24 µl	24 µl
APS 40 %	48 µl	48 µl	48 µl

Zur Herstellung des 5x TBE-Puffers (890 mM Tris-Borat pH 8,3, 25 mM EDTA) wurden 55 g Borsäure, 107,7 g Tris und 9,3 g EDTA in 2 l Aqua bidest. gelöst.

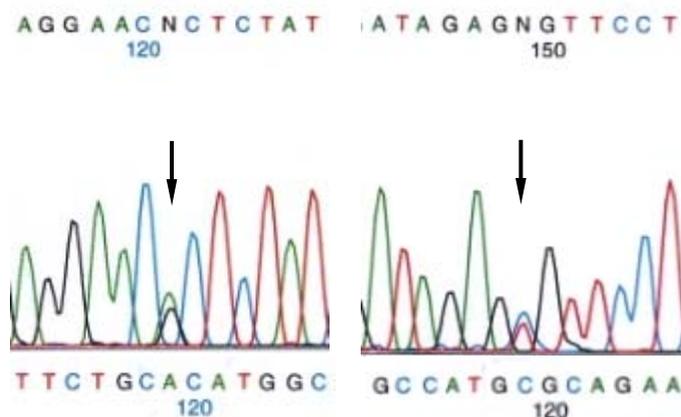
### 3.4.3 Elektrophorese der PCR-Produkte und Silberfärbung

Die gegossenen Gele wurden aus den Glaskassetten entnommen und auf die Kühlplatte der Elektrophoresekammer gelegt. Die Kühlplatte wurde mit Aqua bidest. beschichtet, um durch die Adhäsionskräfte des Wassers eine möglichst gleichmäßige Auflagefläche zwischen Gel und Kühlplatte und eine optimale Temperaturübertragung zu erreichen. Auf die Enden des Gels wurden mit 1x TBE-Puffer getränkte Papierstreifen aufgelegt, damit eine gleichmäßige Verbindung zwischen Elektroden und Gel entsteht. 5 µl PCR-Produkt wurde mit 25 µl Stopplösung (95 % Formamid, 10 mM NaOH, 10 mM EDTA, 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 % Xylencanol FF) versetzt. Nach zweiminütiger Denaturierung dieses Gemisches bei 95 °C erfolgte eine unmittelbare Abkühlung in Eiswasser, um der Renaturierung der Einzelstränge vorzubeugen. Von den Ansätzen wurden 4,5 µl, in die dafür vorgesehenen Taschen am kathodischen Gelende aufgetragen. Zur Bestimmung der Größe der Fragmente wurden in die erste und in die letzte Tasche einer Reihe 4,5 µl DNA Leiter (100 bp DNA-Ladder, GIBCO BRL) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5 °C und 30 min Laufdauer

für C<sub>2</sub>- und C<sub>0,5</sub>-Gele, sowie bei 15 °C und 25 min Laufdauer für C<sub>2</sub>- und MDE-Gele. Im Multiphor II-Elektrophoresesystem wurde eine konstante Spannung von 1200 V gewählt. Abschließend erfolgte die Silberfärbung nach geringfügig modifizierter Methode von Riesner *et al.* (Riesner *et al.* 1989). Im ersten Schritt wurde das aufgetrennte PCR-Produkt 10 min fixiert (10 % Ethanol, 2 % Essigsäure). Vor und nach der folgenden 20 minütigen Silberfärbung (0,2 % AgNO<sub>3</sub>) wurden die Gele in Aqua bidest. für 30 sek gewaschen. Im letzten Schritt wurde das Gel in alkalischem Milieu (1,5 % NaOH, 0,01 % NaBH<sub>4</sub>, 750 µl Formaldehyd) entwickelt. Zur Aufbewahrung und Konservierung wurden die Gele in Plastikfolien eingeschweißt.

### 3.5 Sequenzierung

Das gewünschte DNA-Segment wird mittels PCR amplifiziert. Mit Hilfe von dNTPs, fluoreszenzmarkierten ddNTPs, Primern (vorwärts oder rückwärts) und einer DNA-Polymerase wird das aufgereinigte PCR-Produkt linear vervielfältigt (cycle sequencing). Wenn anstelle eines dNTP ein ddNTP mit fehlender Hydroxygruppe am 3'-C-Atom eingebaut wird, bricht die Kettenverlängerung ab (Sanger *et al.* 1977). Es entstehen fluoreszenzmarkierte Fragmente jeder Länge, deren endständige Basen und somit die Sequenz durch eine elektrophoretische Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel mittels Photodetektion bestimmt werden kann. In den Abbildungen 8a und b sind exemplarisch Sequenzierungen des Vorwärts- und des Rückwärtsstranges zweier *CFTR*-Variationen dargestellt.



**Abbildung 8a:** R117H (Exon 4)

Elektropherogramm des Vorwärts- (links) und zugehörigen Rückwärtsstranges (rechts). Es handelt sich hierbei um einen Austausch von Guanin zu Adenin (Pfeile), der zu einem Austausch der Aminosäure Arginin (R) gegen Histidin (H) im Codon 117 führt.

**Abbildung 8b:** R347H (Exon 7)

Elektropherogramm des Vorwärts- (links) und zugehörigen Rückwärtsstranges (rechts). Es handelt sich hierbei um einen Austausch von Guanin zu Adenin (Pfeile), der zu einem Austausch der Aminosäure Arginin (R) gegen Histidin (H) im Codon 347 führt.

PCR-Produkte, die in der SSCP auffällig waren oder die eine in der Schmelzkurvenanalyse vom Wildtyp und der spezifisch nachzuweisenden Mutation abweichende Schmelzkurve zeigten, wurden bidirektional sequenziert. Zusätzlich wurde jedes *CFTR*-Exon mindestens einmal sequenziert. Die Analyse der für *SPINK1* und *PRSSI* kodierenden Gene erfolgte komplett mittels Sequenzierung. 10 µl PCR-Produkt wurden mit 0,25 U alkalischer Phosphatase (shrimp alkaline phosphatase, GE, Amersham USB, Freiburg) und 2,5 U Exonuklease I (GE, Amersham USB, Freiburg) versetzt und für 40 min bei 37 °C und anschließend zur Inaktivierung der Enzyme für 20 min bei 85 °C inkubiert. Aus 3 µl aufgereinigtem PCR-Produkt, je 1 µl Primer (vorwärts oder rückwärts), 3 µl H<sub>2</sub>O und 3 µl BigDye Terminator Mix (ddNTPs, dNTPs, AmpliTaq DNA Polymerase, MgCl<sub>2</sub>, Tris HCl Puffer pH 9,0, Aqua bidest.) wurde der Reaktionsansatz hergestellt und mit einem Tropfen Öl (Bayol F) überschichtet. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen: initial 2 min Denaturierung bei 95 °C, dann 30 Zyklen 20 sek Denaturierung bei 95 °C, 30 sek Primeranlagerung (Annealing-Temperatur siehe Tabelle 1-3) und 30 sek Extension bei 72 °C. Zur Entfernung überschüssiger ddNTPs wurden die Sequenzierungsprodukte auf Sephadex G-50 gefüllte Säulen aufgetragen und zentrifugiert. Die gewonnen Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac) für 3 h eingedampft. Als Ladepuffer wurden 5 µl Formamid/EDTA (5:1; EDTA 50 mM) zugegeben. Vor dem Auftragen wurden die Proben 2 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eiswasser gestellt. Die Sequenzanalyse erfolgte in einem 6 % Polyacrylamid-Gel (10 ml Acrylamid:Bis (19:1), 14 ml 5x TBE-Puffer, 19 ml Aqua bidest., 33 g Harnstoff, 175 µl APS 10 %, 28 µl TEMED), das bei Raumtemperatur innerhalb einer Stunde auspolymerisierte. Als Elektrophorese-Puffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet. Die Sequenzanalyse erfolgte zu Beginn an einem ABI 373A Fluoreszenzsequenzierer. Im weiteren Verlauf wurden ABI 3700 und 3730 Fluoreszenzsequenzierer verwendet, bei denen die Sequenzierungsprodukte direkt ohne Eindampfen in einer Vakuumzentrifuge und Aufnahme in Ladepuffer analysiert wurden. Die Aufzeichnung und Auswertung der Basensequenz erfolgte computergesteuert (ABI Prism Version 3.7).

### **3.6 Hybridisierungssonden**

Die bei der Schmelzkurvenanalyse eingesetzten Sonden (Tabelle 6) wurden von TIB MOLBIOL, Berlin, hergestellt.

**Tabelle 6:** Sequenz der FRET-Sonden mit Angabe der Variation, die spezifisch detektiert wird. Abkürzungen: E=Exon, I=Intron, FL=Fluoreszein. LNA-modifizierte Nukleotide sind mit einem "+" vor der Base gekennzeichnet.

Variation	Donor -Sonde	Akzeptor-Sonde
E3: p.E60X	CATCgCCgAAgggCATTAATgAgTTTAaggATT-FL	LC Red640-CTTTgAAgCCAgtATCTATCCCATTCTCTACA-PH
E3: p.R75Q	CTggCTTCAAAGAAAAATCCTAAACTCATTA-FL	LC Red705-CCCTTCggCAATgTTTTTTT-PH
E3: p.G85E	CCCTTCggCgATgTTTTTTCTggAgATT-FL	LC Red640-CTATgAAATCTTTTTATATTTAagg-PH
E4: p.R117H	AAgAATCATAgCTTCCTATgACCCggA-FL	LC Red640-AACAaggAggAACACTCTATCgC-PH
E4: p.I148T	TgAggACACTgCTCCTACACCCAgtCCA-FL	LC Red705-TTTggCCTTCATCACCTggAATgCAgA-PH
I4: c.621+1G>T	TAgTTTgATTTATAAgAAgTTAATACTTC-FL	LC Red640-TTgCACaggCCCCATggCACATATA-PH
I5: c.711+1G>T	ggACAACCTgTTAgTCTCCTTTCCAACAACCTgAACA-FL	LC Red705-gATgAATTATgTACCTATTgATTTAATCTTTTAggC-PH
E7: c.1078delT	TACTTCAATAgCTCAgCCTTCTTCTTCTCA-FL	LC Red705-ggTTCTTgTggTgTTTTTATCT-PH
E7: p.R334W	gAACAATgCAGAAAgATgAgATggTggT-FL	LC Red640-AATATTTTCCAgAggATgATTCCT-PH
E7: p.R347P	TCTCATTTCTgCATTgTTCTgCCCATggCg-FL	LC Red640-TCACTCggCAATTTCCCTgggCT-PH
I8: TG-repeat (12)	AAACACACACACACACACACACACATCAAAAATAA-FL	LC Red640-gA+TgAg+T+T+Tg+TCAgA+TA+T+T+T+T+TCAA+TAg-PH
I8: TG-repeat (13)	ACACACACACACACACACACACACATCAAAAATAA-FL	LC Red640-gA+TgAg+T+T+Tg+TCAgA+TA+T+T+T+T+TCAA+TAg-PH
I8: 5T/7T/9T	TgTgTgTTTTTAACAgggATTTgg-FL	LC Red640-gAATTATTTgAgAAAgCAAAACAAAACAAT-PH
E9: p.A455E	gAACAAAAGAACTACCTTgCCTgCTCCAgTggA-FL	LC Red640-CCAgCAACCTCCAACAAGTgTCCTCTTTC-PH
E10: p.M470V	CTCCAgTTCTCCATAATCACCATT-FL	LC Red705-gAAgTgAAgTCTggAAATAAAACCCATCAT-PH
E10: p.F508del	TTTTCTgATTATgCCTggCACCATTAA-FL	LC Red640-gAAAATATCATTggTgTTTCCTATg--PH
E10: c.1716G>A	CATAgTTTCTTACTTCTTCTAgTT-FL	LC Red705-gCATgCTTTgATgACgCTTCTgTATCT-PH
I10: c.1717-1G>A	TTTggTAATAAGACATCTCC-FL	LC Red705-gTTTgCAGAgAAAgACAATATAgTTCT-PH

Variation	Donor -Sonde	Akzeptor-Sonde
E11: p.G542X	gCTAAAgAAATTCTTgCTCATTgACC-FL	LC Red705-gTgATTCCACCTTCTCAAAGAA-PH
E11: p.S549N	gCTAAAgAAATTCTTgCTCATTgACC-FL	LC Red640-CCATTCAgTgTgATTCC-PH
E11: p.R553X	gCTAAAgAAATTCTTgCTCATTgACC-FL	LC Red640-CTCAgTgTgATTCCACCTTCTCCAAgAACT-PH
E11: p.R560T	CAgCAAATgCTTgCTAgACC-FL	LC Red705-ATAATTAgTTATTCACgTTgCTA-PH
I12: c.1898+1G>A	TCAAAGAACACACCTTTCAAATATTTCTTT-FL	LC Red705-TCTgTTAAAACATCTAggTATCCAAAaggAgAgTC-PH
E13: c.2143delT	ACACCgTTTCTCATAgAAggA-FL	LC Red705-ATgCTCCTgTCTCCTggACAgAA-LC705
E13: c.2183AA>G	FAM-ATgCTCCTgTCTCCTggACAgAA-FL	LC Red640-CAAAAAGCAATCTTTTAAACAgACTggAgAgT-PH
E14A: c.2694T>G	AAAATTAAGCTCTTgTggACCgTA-FL	LC Red640-ATCgAAggTATgTgTTCCATgTAgTCACTg-PH
I14B: c.2789+5G>A	AAAgTgAATATTCCATgTCCTATTgT-FL	LC Red705-TAgATTgTgTTTTATTTCTgTTgATTAAAT-PH
E17A: p.L997F	TgTTTACTCACCAACATgTTTTCTT-FL	LC Red705-gATCTTACAgTTCTTATTAATTgTg-PH
E17A: p.I1005R	TgTgATTggAgCTAgAgCAGTTgTC-FL	LC Red705-CAgTTTTACAACCCTACATCTTTgTTgC-PH
E17B: p.Y1092X	gCCAAGTggTTCTTgTAACTgTCAAC-FL	LC Red705-CTgCgCTggTTCCAAATgAgAATAgAAAT-PH
E18: p.D1152H	CCAAgCTATCCACATgTATgCTgg-FL	LC Red640-TTTACAgCCCAGTgCAATgTACTCATgAT-PH
E19: p.R1162X	CCTTCTgTTggCATgTCAATgAACTTAAA-FL	LC Red640-CTCAgCTCACAgATCgCATC-PH
E19: c.3659del C	TAAACCTA CAAgTCAACCAAAC-FL	LC Red640-ACAAgAATggCCAAGTCTCgAAAgT-PH
E19: p.S1235R	ACATTTCTTCTCAATAaggCCTg-FL	LC Red705-CCAgAgggTgAgATTTgAACACTgC-PH
E20: p.S1251N	gCTgATAACAAAgTATTCTTCCCTg-FL	LC Red640-CCAgTTCTTCCCAAgAggCCCACC-PH
E20: p.W1282X	AACTTTgCAACAgTgAAggAAAgCCTT-FL	LC Red640-ggAgTgATACCACAggTgAgCAAAAagg-PH
E21: p.N1303K	TTCTTgATCACTCCACTgTTCATAggg-FL	LC Red705-TCCAAGTTTTTCTAAATgTT-PH
E24: c.4521G>A	CACCggAACTCAAGCAAgTgCAAgTC-FL	LC Red705-AgCCCCAAATTgCTgCTCTgA-PH

Zur Analyse der F508del-Region im Exon 10 sowie des Polypyrimidintraktes und der TG-Wiederholungen im Intron 8 wurde eine Vielzahl von LNA-modifizierten Sonden getestet, um eine optimale Trennschärfe dieser hochvariablen Regionen zu erhalten.

TG-Wiederholungen (9-13TG):

Für die Analyse der TG-Repeats (Intron 8) wurden zwei LNA-haltige Anker-Sonden getestet:

GTI\_Anker: LC Red640-g**ATgAgTTTgTC**Ag**ATATTTTCA**ATAg-PH  
 GTI\_Anker++: LC Red640-g**ATgAgTTTgTC**Ag**ATATTTTCA**ATAg-PH

Insgesamt wurden 25 verschiedene Sensor-Sonden getestet, die größtenteils komplementär zu 13TG waren, wobei einige Sonden partiell LNA-Nukleotide (Großbuchstaben fett markiert) oder Basenfehlpaarungen (fett markiert) enthielten:

13GT-8: ACACACACACACACACACACACACACACATCAAAAA-FL  
 13GT-8A: ACACACACACACACACACAC**g**ACAC**g**ACATCAAAAA-FL  
 13GT-8B: ACACACACACAC**g**ACAC**g**ACACACACATCAAAAA-FL  
 13GT-8C: ACACACACACAC**g**ACAC**g**ACAC**g**ACATCAAAAA-FL  
 13GT-8D: ACAC**g**ACAC**g**ACAC**g**ACACACACATCAAAAA-FL  
 13GT-8E: ACACACACACAC**g**AC**g**ACACACACATCAAAAA-FL  
 13GT-8F: ACACACACACAC**g**AC**g**ACACACACATCAAAAA-FL  
 13GT-8G: ACACACACACAC**g**AC**g**AC**g**ACACACATCAAAAA-FL  
 13GT-8H: ACACACACAC**g**AC**g**AC**g**ACACACACATCAAAAA-FL  
 13GT-8I: ACACACACAC**g**AC**g**AC**g**ACACACACATCAAAAA-FL  
 13GT-8J: ACACACACACAC**g**ACAC**g**ACACACAC**g**ATCAAAAA-FL  
 13GT-8K: ACACACACACAC**g**ACAC**g**ACACAC**g**ATATCAAAAA-FL  
 13GT-8L: ACACACACACAC**g**ACAC**g**ACATAC**g**ATCAAAAA-FL  
 13GT-8M: ACACACACACAC**g**ACAC**g**ACAC**g**ACAC**g**ATCAAAAA-FL  
  
 13GT-5: **ACACACACACACACACACACACACACATCAAAAA**-FL  
 13GT-6: **ACACACACACACACACACACACACACATCAAA**-FL  
 13GT-7: **ACACACACACACACACACACACACACATCAA**-FL  
 13GT-9: ACACACACACACACACACACACACACATCAAA-FL  
 13GT-10: ACACACACACACACACACACACACACATCAA-FL  
 13GT-10L5: **ACACACACACACgACACgACACgACATCAA**-FL  
 13GT-11: ACACACACACACACACACACACACACATC-FL  
  
 9GT-1: AAAAACACACACACACACACACACATCAAAAATAA-FL  
 9GT-2: AAAAACACACACACACACACACATCAAA-FL  
 10GT-1: AAAAACACACACACACACACACACATCAAAAATAA-FL  
 10GT-2: AAAAACACACACACACACACACATCAAA-FL

### 5T/7T/9T-Allele:

Für die Analyse der Längenvariation des Polypyrimidintraktes im Intron 8 (5T/7T/9T) wurden zwei Anker-Sonden getestet, eine mit LNA-Basen (Großbuchstaben fett markiert):

1342 Anchor: LC640-gAATTATTTgAgAAAgCAAACAAAACAAT-PH  
1342 LNA: LC640-g**AATTATTT**gAgAAAgCAAACAAAACAAT-PH

Insgesamt wurden 9 verschiedene Sensor-Sonden getestet, die komplementär zu 5T waren, wobei einige Sonden partiell LNA-Nukleotide enthielten (fett markiert):

1342[5T]+: TgTgTgTTTTTAACAgggATTTgg-FL  
TTA: TgTgTg**TTTTT**AACAgggATTTgg-FL  
TTTA: TgTgTg**TTTTT**AACAgggATTTgg-FL  
TTAC: TgTgTg**TTTTT**AACAgggATTTgg-FL  
TTTAC: TgTgTg**TTTTT**AACAgggATTTgg-FL  
Modell 1: TgTgTg**TTTTT**AACAgggATTTg -FL  
Modell 4: TgTgTg**TTTTT**AACAgggATTTg -FL  
5T-ggTT: TgTgTg**TTTTT**AACAgggATTTg -FL  
5T-gTT: TgTgTg**TTTTT**AACAgggATTTg -FL

### F508del:

Für die F508del-Variation wurden zwei Anker-Sonden getestet:

508FLU: 5'-ttttcctggattatgcctggcaccattaa-FL  
CFTRlong: 5'-gttctcagttttcctggattatgcctggcaccattaa-FL

Insgesamt wurden 19 verschiedene Sensor-Sonden getestet, wobei einige Sonden partiell pdU- oder LNA-Nukleotide enthielten (fett markiert):

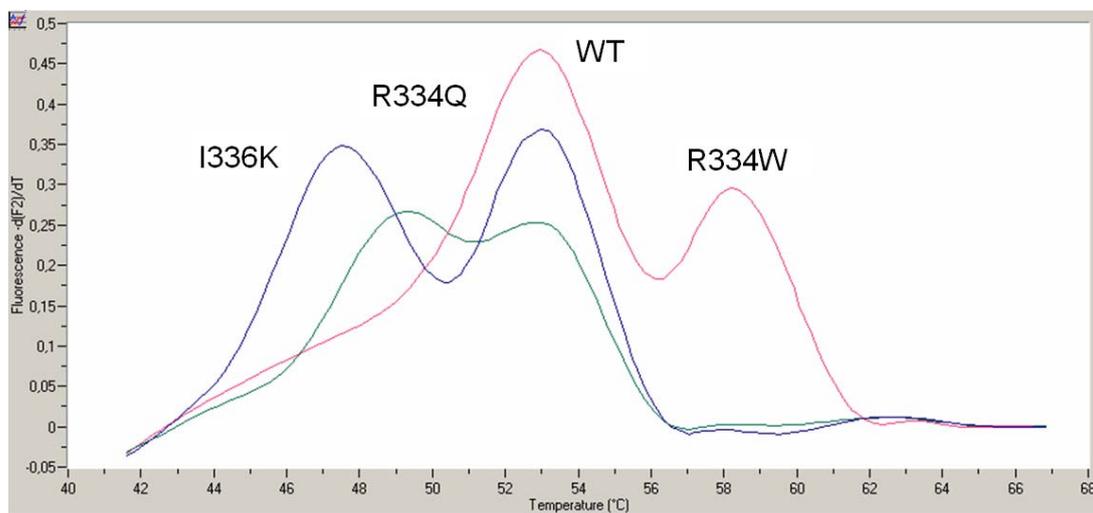
LCR24: LC640-gaaaatatcatctttggtgtttcc  
LNA24: LC640-gaaaatatcatc**TtT**ggtgtttcc  
LNA24-4: LC640-gaaaatatc**AtcTTT**ggtgtttcc  
LCR23: LC640-aaaatatcatctttggtgtttcc  
pdU23: LC640-aaaatatcatc**UtU**ggtgtttcc  
LNA23-4: LC640-aaaat**AtcatcTTT**ggtgtttcc  
LNA23-5: LC640-aaaat**AtcAtcTTT**ggtgtttcc  
LCR22: LC640-aaaatatcatctttggtgtttcc  
4LNA: LC640-aaaatatca**TC**TTTggtgtttcc  
LNA: LC640-aaaatatcatc**TtT**ggtgtttcc  
LNA22-5: LC640-aaaat**AtcatC**TTTggtgtttcc  
LNA22-6: LC640-aaaat**AtcAtC**TTTggtgtttcc

LNA22-8: LC640- aAaAtAtcAtC**TTTT**ggtgtttc  
 LNA20-8: LC640- aAaAtAtcAtC**TTTT**ggtggtt  
 LNA18-8: LC640- aAaAtAtcAtC**TTTT**ggtg  
 5LNA: LC640-gaaaatatca**TCTTT**ggtgtttc  
 LNA2: LC640- aaaatatca**TCTTT**ggtg  
 LNA3: LC640- aaata**TcaTCTTT**gg  
 LNA3-1: LC640- aa**TaTcaTCTTT**g

### 3.7 Schmelzkurvenanalyse

Zur Mutationsanalyse wurden die PCR-Produkte einer Schmelzkurvenanalyse mittels Hybridisierungssonden unterzogen. Die Sonden werden als Donor (5'-...FL; FL: 5,6-carboxyfluoreszein) und Akzeptor (5'-LC-...-ph; LC: Light Cycler Red 640/705) bezeichnet. Liegt eine Variation bei einer mutationsspezifischen Sonde vor, so ist die Schmelztemperatur höher als die des Wildtyps. In der Abbildung 9 ist beispielhaft die Etablierung der variationsspezifischen Sonde für p.R334W, die unspezifisch die Variationen p.I336K und p.R334Q im Exon 7 des *CFTR*-Gens nachweisen kann, dargestellt.

**Abbildung 9:** Schmelzkurvenanalyse mit einer Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Sonde, die spezifisch für die *CFTR*-Variante p.R334W ist und unspezifisch p.I336K und p.R334Q nachweisen kann.



Es wurden 4 µl PCR-Produkt und 2 µl Sondenmix (1,8 µl Aqua bidest., 0,16 µl FL-Sonde, 0,16 µl LC-Sonde) in LightCycler-Kapillaren gegeben und mit einem Deckel verschlossen (Sondensequenz siehe Tabelle 6). Im Anschluß wurden die Kapillaren 20 sek bei 2000 U/min zentrifugiert. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte im LightCycler unter folgenden Bedingungen: Schritt 1: 95 °C für 60 sek (Rampe: 20 °C/s), Schritt 2: 33 °C für 30 sek (Rampe: 20 °C/s), Schritt 3: Erhöhung der Temperatur auf 75 °C mit 0,1 °C/sek, Schritt 4: 40 °C für 2 sek (Rampe:

20 °C/s). Die Aufzeichnung und Auswertung der Schmelzkurvenanalyse erfolgt computergesteuert (Roche Molecular Biochemicals, Version 3.5).

### **3.8 Statistik**

Für die statistischen Auswertungen wurden der Chi-Quadrat-Test und der Fisher-Exakt-Test verwendet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Wenn angebracht, wurde eine Korrektur nach Bonferroni durchgeführt. Für die statistischen Analysen wurde das Programm SPSS (Version 11.0 für Windows, Chicago, USA), verwendet. Für die TDT-Analysen (transmission disequilibrium test) wurde das Programm „Transmission Disequilibrium Test Allowing for Errors“ (TDTAE, Version 2.04) verwendet (Gordon *et al.* 2001, Gordon *et al.* 2004).