

## 4. Ergebnisse

### 4.1 CFTR-Variationen

Wir identifizierten 101 *CFTR*-Variationen bei 533 untersuchten Patienten (18,9 %). Hiervon wurden 74 *CFTR*-Variationen (74/311, 23,8 %) bei den Patienten, die in Berlin rekrutiert worden sind und 27 *CFTR*-Variationen (27/222, 12,2 %) bei den Patienten aus dem Leipziger Zentrum gefunden (Tabelle 7). Da 12 Patienten gemischt heterozygote Träger für *CFTR*-Variationen waren, wurde bei 89 Patienten mindestens eine *CFTR*-Variation nachgewiesen (89/533, 16,7 %).

**Tabelle 7:** *CFTR*-Variationen bei CP-Patienten (n=533) und Kontrollen (n=552).

Variation	Mutations- klasse	Exon/ Intron	Anzahl Patienten	Anzahl Kontrollen
F508del	schwer	10	37/533 (6,9 %)	13/552 (2,4 %)
R74Q	mild ?	3	2/533 (0,4 %)	0/552 (0 %)
Y84H	mild ?	3	0/533 (0 %)	1/552 (0,2 %)
R117H (gesamt)	mild	4	21/533 (3,9 %)	5/552 (0,9 %)
R117H (7/7)	mild	4	16/533 (3,0 %)	4/552 (0,7 %)
R117H (5/7)	mild	4	2/533 (0,4 %)	0/552 (0 %)
R117H (7/9)	mild	4	3/533 (0,6 %)	1/552 (0,2 %)
A120T	mild ?	4	0/533 (0 %)	1/552 (0,2 %)
I148T (17A WT)	mild ?	4	2/533 (0,4 %)	5/552 (0,9 %)
R347H	mild	7	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)
R347P	mild	7	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)
A455E	mild	9	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)
1717-1 G>A	schwer	10	3/533 (0,6 %)	1/552 (0,2 %)
G542X	schwer	11	1/533 (0,2 %)	1/552 (0,2 %)
E585X	schwer	12	0/533 (0 %)	1/552 (0,2 %)
2183 AA>G	schwer	13	0/533 (0 %)	1/552 (0,2 %)
G691R	mild ?	13	0/533 (0 %)	1/552 (0,2 %)
2789+5 G>A	mild ?	14B	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)
L997F	mild ?	17A	6/533 (1,1 %)	2/552 (0,4 %)
D1152H	mild	18	3/533 (0,6 %)	1/552 (0,2 %)
R1158X	schwer	19	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)
R1162X	schwer	19	2/533 (0,4 %)	0/552 (0 %)
S1235R (628 WT)	mild ?	19	9/533 (1,7 %)	2/552 (0,4 %)
N1303K	schwer	21	2/533 (0,4 %)	0/552 (0 %)

Die p.F508del-Variante fanden wir bei 37 Patienten (37/533, 6,9 %). Bezogen auf die Gesamtheit der detektierten Veränderungen entspricht dies einem Anteil von 36,6 % (37/101). Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zur CF, bei der F508del in etwa 66 % aller CF-Chromosomen gefunden wird.

Ausgewählte *CFTR*-Varianten wurden zusätzlich an einem größeren Kontrollkollektiv (n=1199 bzw. n=1828) untersucht (Tabelle 8). Bei Patienten waren die Variationen p.R117H (p.R117H gesamt; p<0,0001, OR=7,3, 95 % CI 3,4-15,6), p.L997F (p=0,02, OR=3,5, 95 % CI 1,1-10,7) und p.F508del (p<0,0001, OR=2,6, 95 % CI 1,6-4,3) statistisch signifikant häufiger, während p.I148T (p=0,24), p.D1152H (p=0,18) und p.S1235R (p=0,18) nicht signifikant vermehrt waren

(Tabelle 8). Nach Berechnung der kumulativen Frequenz der Variationen p.L997F, p.D1152H und p.S1235R, zeigte sich bei Patienten eine statistisch signifikante Mehranreicherung ( $p=0,009$ ,  $OR=2,2$ , 95 % CI 1,2-3,9) (nach Bonferroni-Korrektur  $p=0,027$ ) (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Frequenz der häufigsten *CFTR*-Variationen bei allen Patienten ( $n=533$ ; Berlin/Leipzig) und Kontrollen ( $n=1828$  bzw.  $n=1199$ , Berlin, Leipzig). *P*-Werte wurden mittels Chi-Quadrat- oder Fisher-Exact-Test berechnet. *P*-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant angesehen.

Variation	Exon	Patienten	Kontrollen	<i>P</i> -Wert	OR	95% CI
R117H (gesamt)	4	21/533 (3,9 %)	10/1828 (0,6 %)	<0,0001	7,3	3,4-15,6
R117H (5/7)	4	2/533 (0,4 %)	1/1828 (0,06 %)	0,12	-	-
R117H (7/7)	4	16/533 (3 %)	8/1828 (0,5 %)	<0,0001	7,0	3,0-16,5
R117H (7/9)	4	3/533 (0,6 %)	1/1828 (0,06 %)	0,04	10,3	1,1-99,6
I148T	4	2/533 (0,4 %)	11/1828 (0,6 %)	0,24	-	-
F508del	10	37/533 (6,9 %)	33/1199 (2,8 %)	<0,0001	2,6	1,6-4,3
L997F	17A	6/533 (1,1 %)	6/1828 (0,3 %)	0,02	3,5	1,1-10,7
D1152H	18	3/533 (0,6 %)	5/1828 (0,3 %)	0,18	-	-
S1235R	19	9/533 (1,7 %)	18/1828 (1,0 %)	0,18	-	-
997+1152+1235	17A/18/19	18/533 (3,4 %)	29/1828 (1,6 %)	0,009	2,2	1,2-3,9

Darüber hinaus wurde bei den untersuchten Kontrollen bei 7 von 552 (ohne p.R117H, p.I148T, p.F508del, p.L997F, p.D1152H und p.S1235R) eine *CFTR*-Variation nachgewiesen (7/552, 1,3 %) (Tabelle 7).

*CFTR*-Variationen lassen sich somit bei chronischer Pankreatitis deutlich häufiger nachweisen als in der Normalbevölkerung, wobei eine statistisch signifikante Mehranreicherung lediglich für p.R117H (gesamt), p.F508del und p.L997F und für die kumulative Berechnung von p.L997F, p.D1152H und p.S1235R besteht.

In den zu Beginn durchgeführten Untersuchungen mittels SSCP fanden wir bei 128 Patienten insgesamt 30 Variationen (30/128, 23,4 %; p.R75Q nicht berücksichtigt). Acht dieser Variationen (8/30, 26,6 %) wären bei einer alleinigen Schmelzkurvenanalyse nicht erfaßt worden (Tabelle 9). Dieses Ergebnis verdeutlicht, daß durch eine umfangreiche Untersuchung des *CFTR*-Gens weitere seltene Variationen gefunden werden können, deren pathophysiologische Bedeutung in den meisten Fällen jedoch weitestgehend unklar ist.

**Tabelle 9:** Mittels SSCP detektierte *CFTR*-Variationen (n=37) bei 128 Patienten (Berlin) sowie deren Mutationsklasse. \*=bei alleiniger Schmelzkurvenanalyse nicht detektierte Variationen.

Variation	Mutations- klasse	Exon	Anzahl
R75Q	mild	3	7
F508del	schwer	10	8
R117H	mild	4	4
I148T	mild?	4	2
L159S*	mild?	4	1
406-6 T>C*	mild?	4	1
R347P	mild	7	1
P750L*	mild?	13	1
V754M*	mild?	13	1
D924N*	mild?	15	1
M952T*	mild?	15	1
L997F	mild?	17A	4
F1052V*	mild?	17B	1
T1086A*	mild?	17B	1
D1152H	mild	18	1
S1235R	mild?	19	2

Betrachtet man die bei CP gefundenen *CFTR*-Variationen näher, zeigt sich, daß mehr als die Hälfte der gefundenen Variationen seltene und „milde“ „missense“-Variationen sind (55/101, 54,5 %, Tabelle 7 und 9). Bei diesen Variationen, wie z.B. p.R117H, läßt sich CFTR an der Zellmembran nachweisen, jedoch ist die Chloridkanal-Funktion deutlich beeinträchtigt.

Ebenso zeigt sich ein zur CF und CBAVD unterschiedliches Verteilungsmuster. Dies wird vor allem an der Frequenz der 24 bei CF am häufigsten nachweisbaren Variationen ersichtlich, die bei der CP und der CBAVD deutlich geringer ist (Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Dargestellt ist die Häufigkeit verschiedener *CFTR*-Variationen bei CP, CF und CBAVD in Bezug auf die Gesamtheit der gefundenen Variationen ohne Berücksichtigung des 5T-Allel.

\* Daten von Dörk *et al.*, 1997.

+ Daten von Claustres *et al.* 2000.

& Prozentualer Anteil aller Variationen außer den 24 weltweit häufigsten (ohne 5T-Allel).

° Berechnung anhand der 12 häufigsten Variationen von Claustres *et al.*, 2000.

Variation	CP	CF	CBAVD
F508del	36,6 % (37/101)	71,8 % <sup>+</sup>	36,3 % <sup>+</sup> /44,2 % <sup>*</sup>
R117H (gesamt)	20,8 % (21/101)	0,12-0,20 % <sup>+</sup>	7,3 % <sup>+</sup> /18,6 % <sup>*</sup>
L997F	5,9 % (6/101)	0 % <sup>+</sup>	0,78 % <sup>*</sup>
S1235R	8,9 % (9/101)	0,12-0,20 % <sup>+</sup>	0,78 % <sup>*</sup>
Rest (24) <sup>&amp;</sup>	30,7 % (31/101)	15,4 % <sup>+°</sup>	27,9 % <sup>*</sup>

## 4.2 CFTR-„Polymorphismen“

Neben den bereits beschriebenen *CFTR*-Variationen wurden häufige Sequenzalterationen untersucht, denen eine geringfügige Auswirkung auf die *CFTR*-Funktion zugesprochen wird. Ein statistisch signifikanter Unterschied in den Allelfrequenzen zeigte sich in einer ersten Berechnung für *TG10* ( $p=0,0002$ , OR=1,34, 95 % CI 1,15-1,57), *TG11* ( $p=0,006$ , OR=0,82, 95 % CI 0,71-0,94) und *470M* ( $p=0,034$ , OR=0,86, 95 % CI 0,74-0,99) (Tabelle 11). Bei Betrachtung der Genotypen wurden statistisch signifikante Wert für TG10/10 ( $p<0,0001$ , OR=1,91, 95 % CI 1,38-2,65) und 470MM ( $p=0,029$ , OR=1,32, 95 % CI 1,03-1,69) erhalten (Tabelle 12). Da jedoch die am häufigsten detektierten *CFTR*-Variationen p.F508del und p.R117H auf dem *TG10*- und dem *470M*-Allel liegen, ergaben sich nach Korrektur durch Herausrechnen der Variationsträger bei Patienten und Kontrollen sowohl für die Allelfrequenzen als auch für die Genotypen keine statistisch signifikanten Werte (Tabelle 11 und 13). Beim TG10/10-Genotyp zeigte sich nach Korrektur durch Herausrechnen der Variationsträger ein statistisch signifikanter p-Wert ( $p=0,024$ ) der nach Bonferroni-Korrektur nicht signifikant war ( $p=0,26$ ).

**Tabelle 11:** Allelfrequenzen der *CFTR*-Polymorphismen bei Patienten und Kontrollen. Statistische Berechnungen erfolgten mit dem Chi-Quadrat-Test oder Fisher-Exact-Test. *P*-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant angesehen. Für *TG10*, *TG11* und *470M* nach Korrektur (Herausnahme von p.R117H und p.F508del) keine Signifikanz (in Klammern).

Variation	Exon/ Intron	Patienten	Kontrollen	<i>P</i> -Wert	OR	95 % CI
<i>75Q</i>	3	31/1066 (2,9%)	20/1104 (1,8 %)	0,091	-	-
<i>TG 9</i>	8	1/1066 (0,1 %)	2/2436 (0,08 %)	0,60	-	-
<i>TG 10</i>	8	362/1066 (34 %)	675/2436 (27,7 %)	<b>0,0002</b> <b>(0,067)</b>	<b>1,3</b> <b>(1,17)</b>	<b>1,15-1,57</b> <b>(0,99-1,38)</b>
<i>TG 11</i>	8	597/1066 (56 %)	1485/2436 (61 %)	<b>0,006</b> <b>(0,23)</b>	<b>0,82</b> <b>(0,91)</b>	<b>0,71-0,94</b> <b>(0,78-1,06)</b>
<i>TG 12</i>	8	102/1066 (9,7 %)	268/2436 (11 %)	0,20	-	-
<i>TG 13</i>	8	4/1066 (0,4 %)	6/2436 (0,2 %)	0,76	-	-
<i>5T</i>	8	30/1066 (2,8 %)	81/2436 (3,3 %)	0,43	-	-
<i>7T</i>	8	893/1066 (83,8 %)	2081/2436 (85,4 %)	0,21	-	-
<i>9T</i>	8	143/1066 (13,4 %)	274/2436 (11,3 %)	0,069	-	-
<i>470M</i>	10	571/1066 (53,7 %)	1399/2436 (57,4 %)	<b>0,034</b> <b>(0,55)</b>	<b>0,86</b> <b>(1,05)</b>	<b>0,74-0,99</b> <b>(0,90-1,22)</b>
<i>c.1716A</i>	10	31/1066 (2,9 %)	24/1104 (2,2 %)	0,28	-	-
<i>668C</i>	13	5/1066 (0,5 %)	3/1104 (0,3 %)	0,69	-	-
<i>c.2694T&gt;G (T)</i>	14A	372/1066 (34,9 %)	355/1104 (32,2 %)	0,18	-	-
<i>c.2694T&gt;G (G)</i>	14A	694/1066 (65,1 %)	749/1104 (67,8 %)	0,18	-	-
<i>c.4521G&gt;A (G)</i>	24	796/1066 (74,7 %)	836/1104 (75,7 %)	0,57	-	-
<i>c.4521G&gt;A (A)</i>	24	270/1066 (25,3 %)	268/1104 (24,3 %)	0,57	-	-

**Tabelle 12:** Häufigkeiten der TG-, M470V-, c.2694T>G- und c.4521G>A-Genotypen bei Patienten und Kontrollen. Berechnungen erfolgten mit dem Chi-Quadrat-Test oder Fisher-Exact-Test. *P*-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant angesehen.

Variation	Patienten	Kontrollen	<i>P</i> -Wert	OR	95 % CI
10/10	72/533 (13,5 %)	92/1218 (7,6 %)	<b>&lt;0.0001</b>	<b>1,912</b>	<b>1,378-2,651</b>
10/11	185/533 (34,7 %)	406/1218 (33,3 %)	0,58	-	-
10/12	30/533 (5,6 %)	80/1218 (6,6 %)	0,46	-	-
10/13	3/533 (0,6 %)	3/1218 (0,2 %)	0,38	-	-
11/11	175/533 (32,8 %)	459/1218 (37,7 %)	0,051	-	-
11/12	60/533 (11,3 %)	159/1218 (13,1 %)	0,30	-	-
11/13	1/533 (0,2 %)	2/1218 (0,2 %)	1,0	-	-
12/12	6/533 (1 %)	14/1218 (1,1 %)	0,97	-	-
12/13	0/533 (0 %)	1/1218 (0,1 %)	1,0	-	-
9/10	0/533 (0 %)	2/1218 (0,2 %)	1,0	-	-
9/11	1/533 (0,2 %)	0/1218 (0 %)	0,30	-	-
470MM	123/533 (23,1 %)	226/1218 (18,6 %)	<b>0,029</b>	<b>1,317</b>	<b>1,028-1,687</b>
470MV	249/533 (46,7 %)	583/1218 (47,9 %)	0,66	-	-
470VV	161/533 (30,2 %)	409/1218 (33,6 %)	0,17	-	-
c.2694T>G (TT)	227/533 (42,6 %)	256/552 (46,4 %)	0,21	-	-
c.2694T>G (TG)	240/533 (45 %)	237/552 (42,9 %)	0,49	-	-
c.2694T>G (GG)	66/533 (12,4 %)	59/552 (10,7 %)	0,38	-	-
c.4521G>A (GG)	299/533 (56,1 %)	315/552 (57,1 %)	0,75	-	-
c.4521G>A (GA)	198/533 (37,1 %)	206/552 (37,3 %)	0,95	-	-
c.4521G>A (AA)	36/533 (6,8 %)	31/552 (5,6 %)	0,44	-	-

**Tabelle 13:** Häufigkeiten der TG- und M470V-Genotypen bei Patienten und Kontrollen nach Korrektur. Berechnungen erfolgten mit dem Chi-Quadrat-Test oder Fisher-Exact-Test. *P*-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant angesehen. Für TG10/10 und 470MM finden sich nach Korrektur (Herausnahme von p.R117H- und p.F508del-Trägern) und Bonferroni-Korrektur (Klammer) keine signifikanten Unterschiede mehr.

Variation	Patienten	Kontrollen	<i>P</i> -Wert	OR	95 % CI
10/10	50/477 (10,5 %)	84/1176 (7,1 %)	<b>0,024 (0,26)</b>	<b>1,522</b>	<b>1,05-2,20</b>
10/11	156/477 (32,7 %)	377/1176 (32,1 %)	0,80	-	-
10/12	26/477 (5,5 %)	75/1176 (6,4 %)	0,48	-	-
10/13	2/477 (0,4 %)	3/1176 (0,3 %)	0,63	-	-
11/11	175/477 (36,7 %)	459/1176 (39 %)	0,38	-	-
11/12	60/477 (12,6 %)	159/1176 (13,5 %)	0,61	-	-
11/13	1/477 (0,2 %)	2/1176 (0,2 %)	1,0	-	-
12/12	6/477 (1,3 %)	14/1176 (1,2 %)	1,0	-	-
12/13	0/477 (0 %)	1/1176 (0,1 %)	1,0	-	-
9/10	0/477 (0 %)	2/1176 (0,2 %)	1,0	-	-
9/11	1/477 (0,2 %)	0/1176 (0 %)	0,29	-	-
470MM	92/477 (19,3 %)	212/1176 (18 %)	<b>0,55</b>	-	-
470MV	224/477 (50,1 %)	555/1176 (47,2 %)	0,93	-	-
470VV	161/477 (33,8 %)	409/1176 (34,8 %)	0,69	-	-

#### 4.3 PRSSI- und SPINKI-Variationen

Bei 533 Patienten (Berlin/Leipzig) konnten wir 50 *PRSSI*-Varianten (14x p.A16V, 7x p.N29I, 2x p.R116C, 4x p.R122C, 23x p.R122H) und 111 *SPINKI*-Varianten (17x p.N34S hom., 78x p.N34S het., 11x c.1-215 G>A/c.194+2 T>C, je 1x p.M1T, p.L14P, p.L14R, p.R67C, c.27del C) nachweisen. Bei 552 Kontrollen wurden die *SPINKI*-Varianten p.N34S (5x) und [c.1-215G>A +

c.194+2T>C] (1x) detektiert (Tabelle 14). Statistisch signifikant angereichert waren die *PRSSI*-Varianten p.R122H (p<0,0001, OR=50,87, 95 % CI=3,08-840,2), p.A16V (p<0,0001, OR=30,84, 95 % CI=1,83-518,7) und p.N29I (p=0,007, OR=15,74, 95 % CI=0,90-276,5), ebenso wie die *SPINK1*-Variante p.N34S (gesamt; p<0,0001, OR=23,73, 95 % CI=9,57-58,85) (Tabelle 14).

**Tabelle 14:** *PRSSI*- und *SPINK1*-Varianten aller untersuchter Patienten und bei 552 Kontrollen (Berlin/Leipzig). P-Werte und die Odds Ratio (OR) wurden mittels Fisher-Exact-Test oder Chi-Quadrat-Test berechnet. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

Variation	Gen	Patienten	Kontrollen	P-Wert	OR	95 % CI
A16V	<i>PRSSI</i>	14/533 (2,6 %)	0/552 (0 %)	<0,0001	30,84	1,83-518,7
N29I	<i>PRSSI</i>	7/533 (1,3 %)	0/552 (0 %)	0,007	15,74	0,90-276,5
R116C	<i>PRSSI</i>	2/533 (0,4 %)	0/552 (0 %)	0,2	-	-
R122C	<i>PRSSI</i>	4/533 (0,8 %)	0/552 (0 %)	0,06	-	-
R122H	<i>PRSSI</i>	23/533 (4,3 %)	0/552 (0 %)	<0,0001	50,87	3,08-840,2
<b><i>PRSSI</i> Gesamt</b>	<b><i>PRSSI</i></b>	<b>50/533 (9,4 %)</b>	<b>0/552 (0 %)</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>115,4</b>	<b>7,10-1877</b>
[c.1-215G>A+c.194+2T>C]	<i>SPINK1</i>	11/533 (2,1 %)	1/552 (0,2 %)	0,003	11,61	1,49-90,30
M1T	<i>SPINK1</i>	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)	0,49	-	-
c.27del C	<i>SPINK1</i>	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)	0,49	-	-
L14P	<i>SPINK1</i>	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)	0,49	-	-
L14R	<i>SPINK1</i>	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)	0,49	-	-
N34S hetero + [c.1-215G>A+c.194+2T>C]	<i>SPINK1</i>	6/533 (1,1 %)	0/552 (0 %)	0,031	13,12	0,74-233,6
N34S (het.)	<i>SPINK1</i>	78/533 (14,6 %)	8/552 (1,5 %)	<0,0001	11,66	5,57-24,39
N34S (hom.)	<i>SPINK1</i>	17/533 (3,2 %)	0/552 (0 %)	<0,0001	37,44	2,24-624,6
N34S (gesamt)	<i>SPINK1</i>	95/533 (17,8 %)	8/552 (1,5 %)	<0,0001	14,75	7,09-30,69
R67C	<i>SPINK1</i>	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)	0,49	-	-
<b><i>SPINK1</i> Gesamt</b>	<b><i>SPINK1</i></b>	<b>111/533 (20,9 %)</b>	<b>5/552 (0,9 %)</b>	<b>0,0001</b>	<b>28,78</b>	<b>11,64-71,15</b>

#### 4.4 TDT-Analysen (*PRSSI*, *SPINK1* und *CFTR*)

Um TDT-Analysen durchführen zu können, wurden 211 Eltern der untersuchten Patienten eingeschlossen. Insgesamt konnten wir 97 komplette und 19 inkomplette (ein fehlender Elternteil) Trios in die Berechnungen einfließen lassen. Für die Varianten p.N29I, p.R116C, p.R122C (*PRSSI*), p.M1T, p.L14P, p.L14R (*SPINK1*) und c.406-6 T>C, p.I148T, p.L159S, p.R347P, p.V754M, p.D924N, p.M952T, p.T1086A, p.F1052V, p.R1158X, p.N1303K (*CFTR*) lag jeweils ein komplettes Trio vor, bei dem die jeweilige Variante an das betroffene Kind weitergegeben wurde. Die *CFTR*-Variante p.N1303I wurde in einem kompletten Trio nicht weitergegeben. Fehlte bei inkompletten Trios der Elternteil, der die Variante weitergegeben haben müsste, wurde das Weitergeben der Variante als fraglich gewertet (Tabelle 15). Bei allen Berechnungen wurden unter Verwendung von zwei „Fehler-Modellen“ identische Werte berechnet (Mote and Anderson 1965; Gordon *et al.* 2001). Die TDT-Berechnungen wurden mit dem TDTae Programm (Version 2.04) durchgeführt (Gordon *et al.* 2001; Gordon *et al.* 2004).

**Tabelle 15:** TDT-Berechnungen für *PRSSI*-, *SPINKI*- und *CFTR*-Varianten. \*=Summe von p.R117H, p.L997F, p.D1152H, p.S1235R.

Variation	Gen	Komplette Trios	Inkomplette Trios	Variation weitergegeben	Variation weitergegeben ?	P-Wert (TDT)
R122H	<i>PRSSI</i>	5	3	7/8 (87,5 %)	1/8	0,004
A16V	<i>PRSSI</i>	6	-	6/6 (100 %)	-	0,02
N34S	<i>SPINKI</i>	22	2	22/24 (91,7 %)	2/24	<0,0001
F508del	<i>CFTR</i>	8	3	9/11 (81,8 %)	2/11	0,0005
R117H	<i>CFTR</i>	5	-	4/5 (80 %)	-	0,4
L997F	<i>CFTR</i>	3	3	3/6 (50 %)	1/6	0,6
D1152H	<i>CFTR</i>	2	-	2/2 (100 %)	-	0,3
S1235R	<i>CFTR</i>	2	-	2/2 (100 %)	-	0,3
R75Q	<i>CFTR</i>	10	3	6/13 (46 %)	-	0,6
5T	<i>CFTR</i>	8	4	6/12 (50 %)	2/12	0,8
E528E	<i>CFTR</i>	9	1	7/10 (70 %)	1/10	0,6
Summe*	<i>CFTR</i>	12	3	12/15 (80 %)	1/15	0,049

Für die *PRSSI*-Varianten p.R122H (p=0,004), p.A16V (p=0,02) sowie für die *SPINKI*-Variante p.N34S (p<0,0001) zeigten sich statistisch signifikante Werte in der TDT-Analyse. Bei den *CFTR*-Varianten wies lediglich p.F508del (p=0,0005) einen statistisch signifikanten TDT-Wert auf. Bei den inkompletten Trios der p.R122H, der p.N34S und der p.F508del Varianten ist davon auszugehen, dass der fehlende Elternteil die jeweilige Variante an das betroffene Kind weitergegeben hat, so daß höchstwahrscheinlich in allen Fällen (100 %) die Varianten weitergegeben wurden. Die Varianten p.D1152H und p.S1235R wurden bei jeweils 2 kompletten Trios immer an das betroffene Kind weitergegeben. Die fehlende statistische Signifikanz bei diesen Varianten ist möglicherweise auf die geringe Anzahl der Trios zurückzuführen. Keine statistisch signifikanten Werte ergaben sich für p.R117H (p=0,4), p.L997F (p=0,6), p.R75Q (p=0,6), p.E528E (p=0,6) und das 5T-Allel (p=0,8). Berechnet man die TDT Analyse für die Summe der Varianten von p.R117H, p.L997F, p.D1152H, und p.S1235R, so ergibt sich eine statistische Signifikanz (p=0,049).

#### 4.5 Gemischt und *trans*-heterozygote Variationsträger

Zwölf der untersuchten Patienten (12/533, 2,3 %) waren gemischt heterozygot für zwei *CFTR*-Variationen, wobei zwei dieser Patienten zusätzlich je eine *PRSSI*- (p.A16V) oder eine *SPINKI*-Variation (p.N34S) aufwiesen (Tabelle 16). Bei den Kontrollen war nur eine gemischt heterozygot für *CFTR*-Varianten ([p.R117H (7/9) + p.F508del]) (1/552, 0,2 %, p=0,0015, OR=12,69, 95 % CI=1,64-97,99). Bei diesen Berechnungen wurden gemischt Heterozygote mit

den Variationen 5T, p.R75Q und c.1716G>A (p.E528E) aufgrund der fehlenden Assoziation dieser Varianten nicht gewertet (Tabelle 16).

Siebenundzwanzig (5,1 %) Patienten, aber nur eine Kontrolle ([p.F508del] + [p.N34S]) (0,2 %) waren *trans*-heterozygot (p<0,0001, OR=29,40, 95 % CI=3,98-217,3). Ein Patient wies Variationen in allen 3 untersuchten Genen auf (Tabelle 16; die Kombination von c.1716G>A (p.E528E), p.R116C und p.N34S wurde nicht gewertet, da c.1716G>A (p.E528E) nicht assoziiert ist). Die Mutter dieses Patienten wies ebenfalls die *CFTR*-Variation p.M952T auf, während der Vater heterozygot für p.A16V (*PRSSI*) und p.N34S (*SPINK1*) war. Beide Elternteile waren beschwerde- und symptomfrei.

**Tabelle 16:** Gemischt- und *trans*-heterozygote Mutationsträger aller Patienten (37/533, Berlin/Leipzig) für *CFTR*, *PRSSI* und *SPINK1*. Bei p.R117H ist in Klammern die Anzahl der Thymidine der Poly T-Variation angegeben. \*=nicht als gemischt-heterozygoter *CFTR*-Variationsträger gewertet. #=nicht als dreifach *trans*-heterozygoter Träger für *CFTR*, *SPINK1*, *PRSSI* gewertet.

<i>CFTR</i>	<i>PRSSI</i>	<i>SPINK1</i>	Anzahl
F508del/R117H (7/9)	-	-	1
F508del/R347H	-	-	1
F508del/D1152H	-	-	1
R117H (7/7)/1717-1G>A	-	-	1
R117H (7/7)/2789+5G>A	-	-	1
R117H (7/7)/R1158X	-	-	1
R117H (7/7)/R1162X	-	-	1
R117H (7/7)/S1235R (628 WT)	-	-	1
R117H (7/9)/N1303K	-	-	1
D1152H/N1303K	-	-	1
F508del/R117H (7/9)	-	N34S	1
F508del	R122C	-	1
V754M	R122H	-	1
L997F/R1162L	A16V	-	1
L997F	A16V	-	1
c.1716G>A (p.E528E)#	R116C	N34S	1
M952T	A16V	N34S	1
406-6T>C/5T*	-	N34S	1
R117H (7/7)/R75Q*	-	N34S	1
R117H/5T* (5/7)	-	N34S	1
R117H (7/7)	-	N34S	1
I148T (17A WT)	-	N34S	1
F508del/ c.1716G>A (p.E528E)*	-	N34S	1
F508del	-	N34S	7
S1235R (628 WT)	-	N34S	2
S1235R (628 WT)	-	N34S/ c.1-215g>A/ c.194+2T>C	1
F508del	-	c.1-215g>A/ c.194+2T>C	1
F1052V	-	N34S/ N34S	1
S1235R (628 WT)	-	N34S/ N34S	1
-	A16V	N34S	1

#### 4.6 Relatives Risiko bei *CFTR*-, *PRSSI*- und *SPINK1*-Variationen

Für die Berechnung des relativen Risikos für *CFTR*-Variationen wurden die Variationen p.G542X, p.E585X, p.F508del, c.1717-1 G>A, p.R1158X, p.R1162X, p.N1303K als „schwere“ Variationen gewertet. Als „milde“ *CFTR*-Variationen wurden alle weiteren Variationen außer den ausschließlich bei der SSCP gefundenen (p.L159S, c.406-6 T>C, p.P750L, p.V754M, p.D924N, p.M952T, p.F1052V, p.T1086A), gewertet.

Sowohl für die „schweren“ (CF hetero. <sup>schwer</sup>; p=0,0011, OR=2,671, 95 % CI 1,45-4,93) als auch für die „milden“ (CF hetero. <sup>mild</sup>; p=0,0079, OR=2,29, 95 % CI 1,22-4,27) heterozygoten *CFTR*-Variationen zeigte sich ein statistisch signifikante Mehranreicherung. Dies galt ebenso für die Summe aller heterozygoten *CFTR*-Variationsträger (CF hetero. gesamt; p<0,0001, OR=2,74, 95 % CI 1,78-4,22) (Tabelle 17). Darüber hinaus konnte dies für gemischt heterozygote *CFTR*-Variationsträger nachgewiesen werden (CF comp. hetero. gesamt; p=0,0015, OR=12,69, 95 % CI 1,64-97,99).

Im *SPINK1*-Gen zeigte sich eine signifikante Mehranreicherung der *SPINK1*-Variation in der heterozygoten (*SPINK1* hetero. gesamt; p<0,0001, OR=21,63, 95 % CI 8,71-53,74) und homozygoten Form (*SPINK1* homo. gesamt; p<0,0001, OR=50,87, 95 % CI 3,08-840,2) sowie bei den gesamten *SPINK1*-Variationen (*SPINK1* gesamt; p<0,0001, OR=26,84, 95 % CI 10,84-66,43). Im *PRSSI*-Gen wurde eine statistisch signifikante Mehranreicherung für *PRSSI*-Variationen im heterozygoten Zustand nachgewiesen (*PRSSI* gesamt; p<0,0001, OR=115,4, 95 % CI 7,1-1877).

Für *trans*-heterozygote Variationsträger ergab sich lediglich für die Kombination einer *CFTR*-Variation mit N34S im heterozygoten Zustand (p=0,0001, OR=17,05, 95 % CI 2,252-129,1) sowie für die Gesamtheit aller *trans*-heterozygoter Patienten eine statistische Signifikanz (p<0,0001, OR=29,40, 95 % CI 3,98-217,3) (Tabelle 17).

**Tabelle 17:** Relatives Risiko bei *CFTR*-, *PRSSI*- und *SPINK1*-Variationen. Erläuterungen: \*=die bei 128 Patienten mittels SSCP entdeckten 8 milden Variationen wurden nicht gewertet (Tabelle 9). Die trans-heterozygote Form p.E528E, p.R116C und p.N34S (Tabelle 16) wurde nicht als trans-heterozygot für alle 3 Gene gewertet. Die statistischen Berechnungen erfolgten mittels Chi-Quadrat- oder Fisher-Exact-Test. *P*-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

<b>Genotypen</b>	<b>Patienten</b>	<b>Kontrollen</b>	<b><i>P</i>-Wert</b>	<b>OR</b>	<b>95 % CI</b>
<b><i>CFTR</i> gesamt</b>	<b>89/533 (16,7 %)</b>	<b>33/552 (6,0 %)</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>3,15</b>	<b>2,07-4,794</b>
<i>CFTR</i> gesamt hetero.*	77/533 (14,4 %)	32/552 (5,8 %)	<0,0001	2,74	1,78-4,22
<i>CFTR</i> hetero. <sup>schwer</sup> *	37/533 (6,9 %)	15/552 (2,7 %)	0,0011	2,67	1,45-4,93
<i>CFTR</i> hetero. <sup>mild</sup> *	32/533 (6,0 %)	15/552 (2,7 %)	0,0079	2,29	1,22-4,27
<i>CFTR</i> comp. hetero. gesamt	12/533 (2,3 %)	1/552 (0,2 %)	0,0015	12,69	1,64-97,99
<i>CFTR</i> comp. hetero. <sup>schwer</sup>	9/533 (1,7 %)	1/552 (0,2 %)	0,0102	9,46	1,19-75,00
<i>CFTR</i> comp. hetero. <sup>mild</sup>	15/533 (2,8 %)	1/552 (0,2 %)	0,0002	15,96	2,10-121,3
<b><i>SPINK1</i> gesamt (homo. + hetero.)</b>	<b>105/533 (19,7 %)</b>	<b>5/552 (0,9 %)</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>26,84</b>	<b>10,84-66,43</b>
<i>SPINK1</i> hetero. gesamt	88/533 (16,5 %)	9/552 (1,8 %)	<0,0001	11,93	5,94-23,96
N34S hetero.	78/533 (14,6 %)	8/552 (1,5 %)	<0,0001	11,66	5,57-24,39
<i>SPINK1</i> homo./comp. hetero.	23/533 (4,3 %)	0/552 (0 %)	<0,0001	50,87	3,08-840,2
N34S homo.	17/533 (3,2 %)	0/552 (0 %)	<0,0001	37,44	2,24-624,6
<b><i>PRSSI</i> hetero. (gesamt)</b>	<b>50/533 (9,4 %)</b>	<b>0/552 (0 %)</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>115,4</b>	<b>7,10-1877</b>
<b><i>Trans</i> hetero. gesamt</b>	<b>27/533 (5,1 %)</b>	<b>1/552 (0,2 %)</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>29,40</b>	<b>3,98-217,3</b>
<i>CFTR</i> + <i>SPINK1</i> hetero.	16/533 (3,0 %)	1/552 (0,2 %)	0,0001	17,05	2,25-129,1
<i>CFTR</i> + <i>SPINK1</i> homo.	3/533 (0,6 %)	0/552 (0 %)	0,12	7,29	0,38-141,6
<i>CFTR</i> / <i>CFTR</i> + <i>SPINK1</i> hetero.	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)	0,49	3,11	0,13-76,64
<i>CFTR</i> + <i>PRSSI</i>	3/533 (0,6 %)	0/552 (0 %)	0,12	7,29	0,38-141,6
<i>CFTR</i> / <i>CFTR</i> + <i>PRSSI</i>	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)	0,49	3,11	0,13-76,64
<i>CFTR</i> + <i>SPINK1</i> + <i>PRSSI</i>	1/533 (0,2 %)	0/552 (0 %)	0,49	3,11	0,13-76,64
<i>SPINK1</i> + <i>PRSSI</i>	2/533 (0,4 %)	0/552 (0 %)	0,24	5,20	0,25-108,6

#### 4.7 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)/Schmelzkurvenanalyse

Die bei der Schmelzkurvenanalyse gefundenen Variationen wurden in einer zweiten unabhängigen PCR bestätigt. In den Abbildungen 10-12 sind Schmelzkurven mit Variationen beispielhaft dargestellt und im zugehörigen Text näher erläutert. Weiterhin ist beispielhaft der Einsatz von LNAs zur besseren Diskriminierung gezeigt.

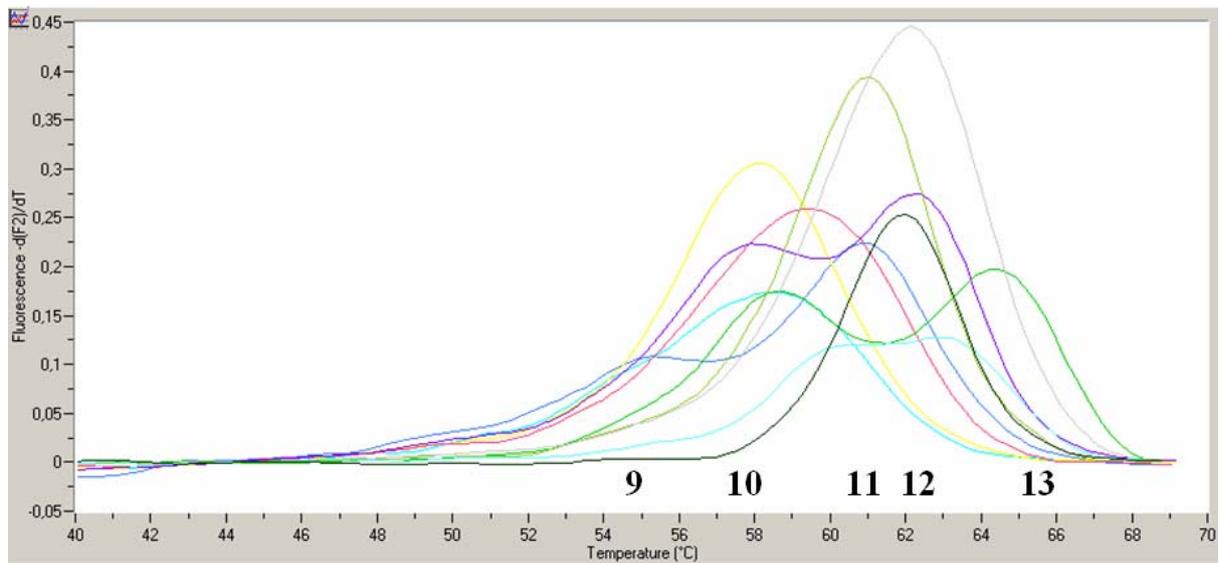
**Tabelle 18:** Darstellung der Temperaturunterschiede in °C, die sich teilweise durch den Einsatz von LNAs oder Basenfehlpaarungen bei der Untersuchung des TG-Repeats im Intron 8 ergeben. Erläuterungen: Rot=Schmelztemperatur der Sonde beim jeweiligen spezifischen TG-Repeat (9, 10, 11, 12, 13); Blau=Sondennummer (die zugehörigen Sondensequenzen sind im „Material und Methoden“-Teil zu finden); Schwarz=Temperaturunterschied zwischen den Schmelzpunkten der verschiedenen TG-Repeats.

Sonde	9	9-10	10	10-11	11	11-12	12	12-13	13	10-12
8	62,0	3,8	65,8	1,6	67,4	1,6	69,0	1,5	70,5	3,2
8A	53,3	4,5	57,8	2,2	60,0	2,1	62,1	1,6	63,7	4,3
8B	51,0	4,8	55,8	2,8	58,6	1,8	60,4	1,4	61,8	4,6
8C	45,5	5,8	51,3	3,1	54,4	1,8	56,2	1,8	58,0	5,1
8D	50,5	4,3	54,8	0,1	54,9	0,6	55,5	2,4	57,9	0,7

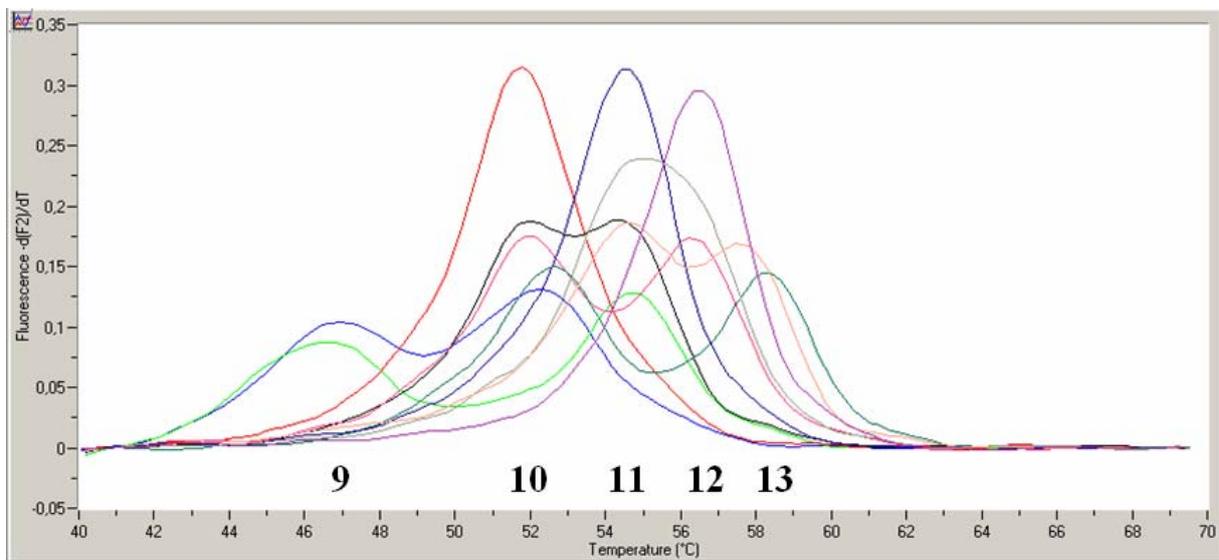
**Tabelle 19:** Darstellung der Temperaturunterschiede in °C, die sich teilweise durch den Einsatz von LNAs bei der Untersuchung des Polypyrimidin-Abschnitts im Intron 8 ergeben. Erläuterungen: Rot=Schmelztemperatur der Sonde beim jeweiligen spezifischen Polypyrimidin-Abschnitt (9, 7, 5); Blau=Sondennummer (die zugehörigen Sondensequenzen sind im „Material und Methoden“-Teil zu finden); Schwarz=Temperaturunterschied zwischen den Schmelzpunkten der verschiedenen Polypyrimidin-Abschnitte.

Sonde	9	9-7	7	7-5	5	9-5
1342[5T]+	52,2	2,6	54,8	5,1	59,9	7,7
TTA	54,9	3,3	58,2	5,5	63,7	8,8
TTTA	56,2	2,6	58,8	6,2	65,0	8,8
TTAC	55,4	3,0	58,4	7,0	65,4	10,0
TTTAC	56,8	3,1	59,9	6,2	66,1	9,3
Modell 1	53,5	3,8	57,3	6,1	63,4	9,7
Modell 4	54,6	3,3	57,9	6,2	64,1	9,5
5T-gTT	52,7	2,3	55,0	5,7	60,7	8
5T-ggTT	53,8	2,9	56,7	4,6	61,3	7,5

a)

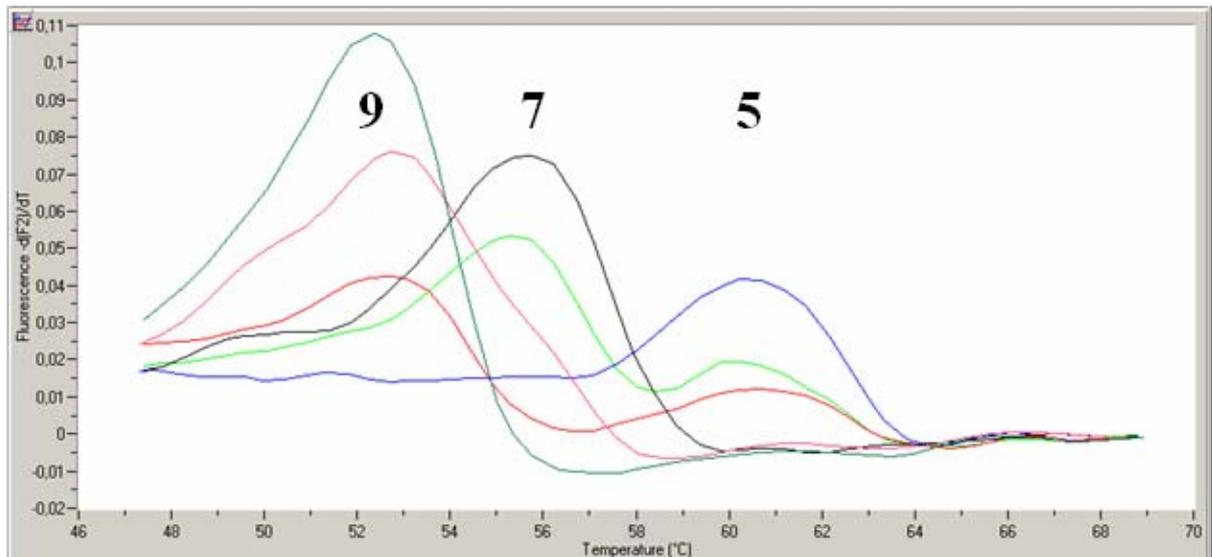


b)

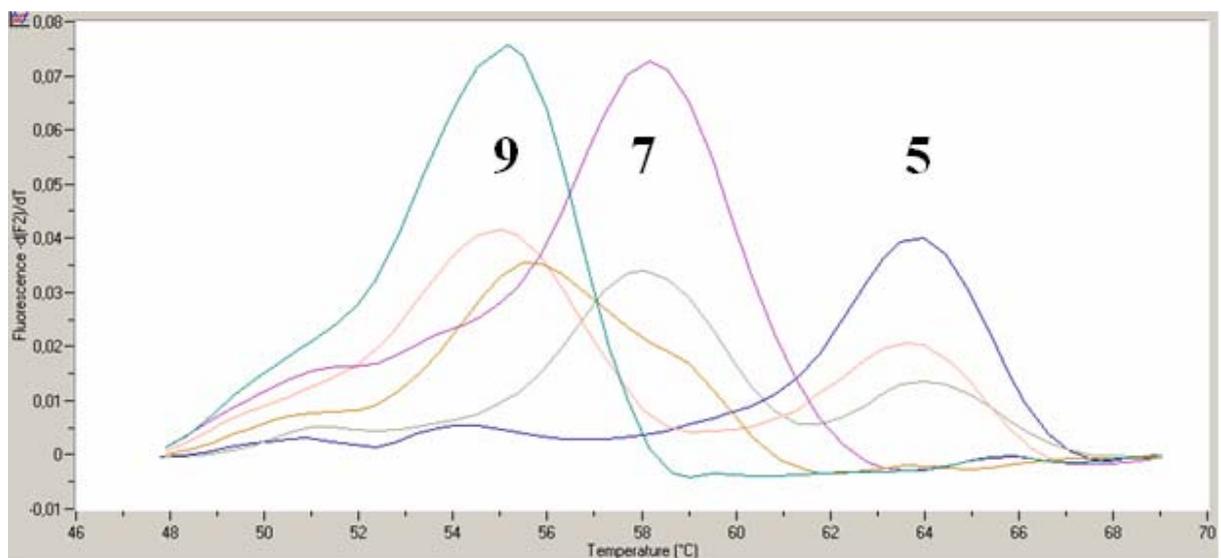


**Abbildung 10:** Schmelzkurvenanalyse des TG-Repeat unter Einsatz von LNAs. a.) Darstellung eines Schmelzkurvenassays ohne den Einsatz von LNAs in der Donor-Sonde (10GT-1). Der Schmelzbereich ist auf ca. 10°C beschränkt. Eine eindeutige Diskriminierung des TG-Repeat ist nicht möglich. b.) Schmelzkurvenassay unter Einsatz von LNAs (13GT-8C). Es resultiert ein Vergrößerung des Schmelzbereichs (ca. 12°C) und eine eindeutige Diskriminierung des TG-Repeat.

a)



b)

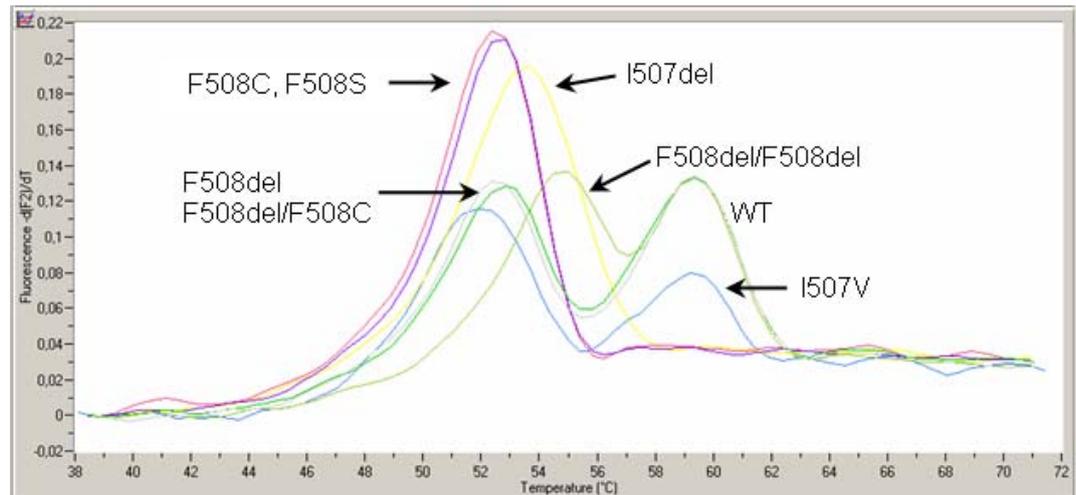


**Abbildung 11:** Schmelzkurvenanalyse des Polypyrimidin-Abschnittes in Intron 8. a.) Durch den Einsatz von LNAs in der Anchor-Sonde (1342LNA/1342[5T]+) ist eine Diskriminierung der Polypyrimidin-Variationen möglich. Jedoch ist der Schmelzbereich begrenzt und die Diskriminierung des 7/9-Genotyps unzureichend. b.) Durch die mit LNAs modifizierte Donor-Sonde (AnchorLNA/TTA) vergrößert sich der Schmelzbereich, wobei die Diskriminierung des 7/9-Genotyps sich nur geringfügig bessert.

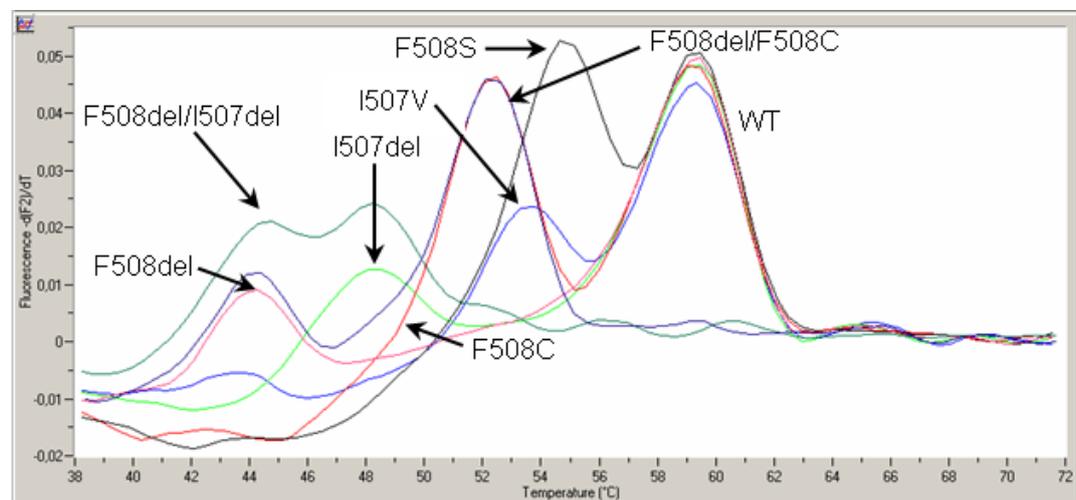
**Tabelle 20:** Darstellung der Temperaturunterschiede in °C, die sich teilweise durch den Einsatz von LNAs oder pdUs bei der Untersuchung der p.F508del Region im Exon 10 ergeben. Erläuterungen: Rot=Schmelztemperatur der Sonde bei der jeweiligen spezifischen *CFTR*-Variante (p.F508del, p.I507del, p.F508C, p.I507V, p.I506V, p.F508S, WT); Blau=Sonnennummer (die zugehörigen Sondensequenzen sind im „Material und Methoden“-Teil zu finden); Schwarz=Temperaturunterschied zwischen den Schmelzpunkten der verschiedenen *CFTR*-Varianten sowie des Gesamtbereichs.

<b>Sonde</b>	<b>F508del</b>	<b>Delta</b>	<b>I507del</b>	<b>Delta</b>	<b>F508C</b>	<b>Delta</b>	<b>I507V</b>	<b>Delta</b>	<b>I506V</b>	<b>Delta</b>	<b>F508S</b>	<b>Delta</b>	<b>WT</b>	<b>Bereich</b>
<b>LCR24</b>	47.7	<b>0.9</b>	48.6	<b>5.9</b>	54.5	<b>0.2</b>	54.3	<b>0.7</b>	55.0	<b>0.9</b>	55.9	<b>4.0</b>	59.9	<b>12.2</b>
<b>LCR22</b>	41.8	<b>1.9</b>	43.7	<b>6.3</b>	50.0	<b>0</b>	50.0	<b>0</b>	50.0	<b>1.6</b>	51.6	<b>4.4</b>	56.0	<b>14.2</b>
<b>LCR23</b>	44.3	<b>2.3</b>	46.6	<b>5.2</b>	51.8	<b>0.7</b>	52.5	<b>0</b>	52.5	<b>1.3</b>	53.8	<b>4.2</b>	58.0	<b>13.7</b>
<b>LNA2</b>	35.0	<b>6.8</b>	41.8	<b>7.5</b>	49.3	<b>0.4</b>	49.7	<b>1.2</b>	50.9	<b>1.9</b>	52.8	<b>5.1</b>	57.9	<b>22.9</b>
<b>LNA3</b>	<28	<b>?</b>	<28	<b>?</b>	42.9	<b>0</b>	42.9	<b>0</b>	42.9	<b>3.5</b>	46.4	<b>7.3</b>	53.7	<b>&gt;25.7</b>
<b>LNA3-1</b>	<28	<b>?</b>	<28	<b>?</b>	39.9	<b>0</b>	39.9	<b>0</b>	39.9	<b>3.2</b>	43.1	<b>8.3</b>	51.4	<b>&gt;23.4</b>
<b>LNA24</b>	49.0	<b>2.8</b>	51.8	<b>4.2</b>	56.0	<b>1.6</b>	57.6	<b>0</b>	57.6	<b>0.9</b>	58.5	<b>4.2</b>	62.7	<b>13.7</b>
<b>pdU23</b>	44.9	<b>3.2</b>	48.1	<b>4.7</b>	52.8	<b>0.4</b>	53.2	<b>0</b>	53.2	<b>2.1</b>	55.3	<b>4.2</b>	59.5	<b>14.6</b>
<b>4LNA</b>	46.0	<b>7.7</b>	53.7	<b>2.2</b>	55.9	<b>0.9</b>	56.8	<b>1.2</b>	58.0	<b>1.1</b>	59.1	<b>4.4</b>	63.5	<b>17.5</b>
<b>LNA22-5</b>	46.6	<b>5.7</b>	52.3	<b>3.5</b>	55.8	<b>1.5</b>	57.3	<b>0</b>	57.3	<b>1.2</b>	58.5	<b>5.0</b>	63.5	<b>16.9</b>
<b>LNA-18-8</b>	36.4	<b>3.0</b>	39.4	<b>6.4</b>	45.7	<b>7.2</b>	52.9	<b>6.3</b>	46.6	<b>2.9</b>	49.5	<b>6.6</b>	56.1	<b>19.7</b>
<b>LNA-22-6</b>	47.1	<b>5.7</b>	52.8	<b>4.5</b>	57.3	<b>0.8</b>	58.1	<b>0.7</b>	58.8	<b>1.4</b>	60.2	<b>4.2</b>	64.4	<b>17.3</b>
<b>LNA23-4</b>	48.5	<b>4.2</b>	52.7	<b>3.0</b>	55.7	<b>1.8</b>	57.5	<b>0.3</b>	57.8	<b>0.9</b>	58.7	<b>4.7</b>	63.4	<b>14.9</b>
<b>LNA23-5</b>	50.1	<b>2.8</b>	52.9	<b>4.0</b>	56.9	<b>1.4</b>	58.3	<b>0.3</b>	58.6	<b>1.0</b>	59.6	<b>4.7</b>	64.3	<b>14.2</b>
<b>LNA24-4</b>	51.3	<b>2.8</b>	54.1	<b>3.6</b>	57.7	<b>1.4</b>	59.1	<b>0.4</b>	59.5	<b>1.1</b>	60.6	<b>4.0</b>	64.6	<b>13.3</b>

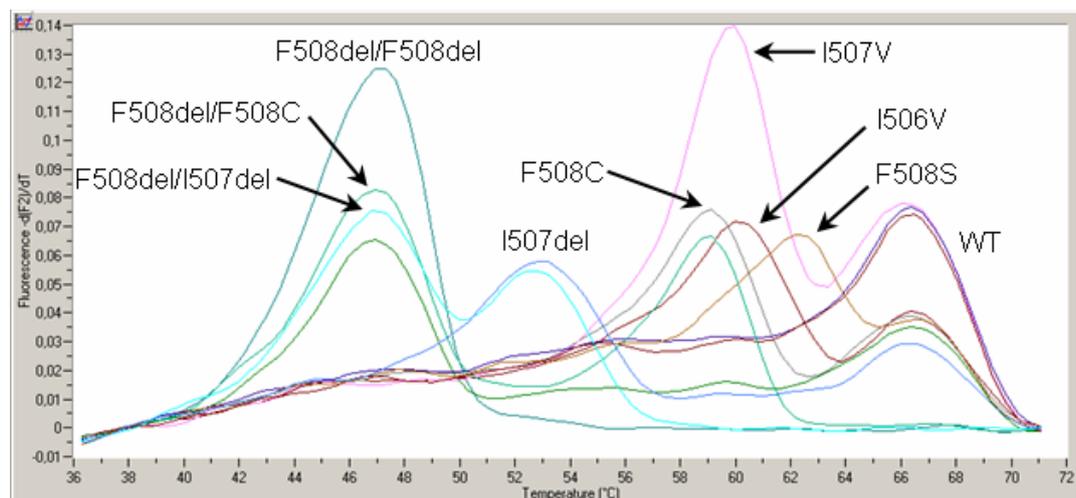
a)



b)



c)



**Abbildung 12:** Schmelzkurvenanalyse des Exon 10 unter Einsatz von LNAs. a) Darstellung eines Schmelzkurvenassays ohne den Einsatz von LNAs. Es zeigt sich eine mangelnde Diskriminierung (z.B. F508C vs. F508S). b) Durch die gezielte Modifikation der Donor-Sonde ist eine Verbesserung der Diskriminierung möglich. Die FRET-Sonden LCR23 diskriminieren lediglich I506V und I507V nicht (Tabelle 20). c) Durch den Einsatz von LNAs (LNA22-8) erhöht sich der gesamte Schmelzbereich. Weiterhin wird eine Diskriminierung aller Variationen möglich.