

## 5. Diskussion

Bei unseren Untersuchungen fanden wir bei Patienten mit chronischer Pankreatitis eine signifikante Mehranreicherung von *CFTR*-Variationen: 89/533 (16,7 %) Patienten, aber nur 33/552 (6,0 %) Kontrollen wiesen eine *CFTR*-Variation auf ( $p < 0,0001$ , OR=3,15, 95 % CI 2,07-4,79). Betrachtet man einzelne *CFTR*-Variationen bei Patienten und Kontrollen, so läßt sich ein signifikanter Unterschied für p.R117H, p.F508del und p.L997F nachweisen. Die Variationen p.D1152H und p.S1235R zeigten erst nach kumulativer Berechnung mit p.L997F eine signifikante Anhäufung.

Bei den *PRSSI*-Variationen waren p.R122H (23/533 (4,3 %)) vs. 0/552;  $p < 0,0001$ , OR=50,87, 95 % CI 3,1-840,2), p.A16V (14/533 (2,6 %) vs. 0/552;  $p < 0,0001$ , OR=30,84, 95 % CI 1,83-518,7) und p.N29I (7/533 (1,3 %) vs. 0/552;  $p = 0,007$ , OR=15,74, 95 % CI 0,9-276,5) signifikant gehäuft zu finden.

Die Untersuchung des *SPINK1*-Gens ergab signifikante Werte für p.N34S (gesamt, 95/533 (17,8 %) vs. 5/552 (0,9 %);  $p < 0,0001$ , OR=23,73, 95 % CI 9,57-58,85) und [c.1-215G>A + c.194+2T>C] (11/533 (2,1 %) vs. 1/552 (0,2 %);  $p = 0,003$ , OR=11,61, 95 % CI 1,49-90,30).

Darüber hinaus konnten wir für gemischt-heterozygote *CFTR*-Variationsträger ( $p = 0,0015$ , OR=12,69, 95 % CI 1,64-97,99) und für *trans*-heterozygote Variationsträger ( $p < 0,0001$ , OR=29,40, 3,98-217,3) der obengenannten Gene eine signifikante Mehranreicherung berechnen. In früher publizierten Studien erfolgte in den meisten Fällen eine nur ungenügende Untersuchung auf genetische Veränderungen. So analysierten Noone und Mitarbeiter 39 Patienten, bei denen allerdings nur bei acht Patienten das gesamte *SPINK1*-Gen sequenziert wurde (Noone *et al.* 2001). Die *SPINK1*-Analyse der übrigen Patienten erfolgte mittels DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography). Untersuchungen an einem Kontrollkollektiv wurden nur für p.N34S bei 213 Kontrollen durchgeführt. Weitere genetische *SPINK1*- wie auch *PRSSI*- und *CFTR*-Veränderungen wurden bei den Kontrollen nicht untersucht. Ausgehend von der Häufigkeit der CF in der weißen amerikanischen Bevölkerung wurde in dieser Arbeit zur Risikoberechnung, die zu erwartende Häufigkeit von *CFTR*-Variationen herangezogen. Hierbei ist jedoch unklar, wie die Größe des „fiktiven“ Kontrollkollektives definiert wurde. Dementsprechend sollten die in dieser Studie angegebenen Risikoerhöhungen mit Vorsicht bewertet werden.

In einer weiteren Arbeit untersuchten Audrézet und Mitarbeiter bei 39 Patienten alle kodierenden Abschnitte der oben genannten Gene mittels DGGE (denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese) bzw. DHPLC (Audrézet *et al.* 2002). Auch in dieser Arbeit wurde ein Kontrollkollektiv lediglich auf die *SPINK1*-Variation p.N34S untersucht.

Eine brasilianische Arbeitsgruppe untersuchte zwar Kontrollen auf *PRSSI*- und *SPINK1*-Variationen, wendete aber mit der SSCP-Analyse ein nicht ausreichend sensitives Verfahren an (Bernardino *et al.* 2003). Auch hier erfolgte keine Analyse von *CFTR*-Variationen bei einem Kontrollkollektiv.

Bei Weiß und Mitarbeitern wurde zur Analyse des *CFTR*-Gen bei Patienten und Kontrollen die Sequenzierung als „Goldstandard“ verwendet (Weiß *et al.* 2005). Weiterhin wurde bei allen Patienten das gesamte *PRSSI*- und *SPINK1*-Gen auf Veränderungen untersucht. Eine Untersuchung der Kontrollen auf *PRSSI*- oder *SPINK1*-Varianten erfolgte jedoch nicht.

Es zeigt sich, daß die bisher veröffentlichten Studien in mancher Hinsicht keine ausreichenden Antworten über den Einfluß und die Bedeutung von *CFTR*-, *PRSSI*- und *SPINK1*-Variationen bei chronischer Pankreatitis geben. Die Fallzahlen der meisten Studien sind relativ klein und die verwendeten Analyse-Methoden teilweise unzureichend. Ferner erfolgte keine bzw. nur eine unvollständige Untersuchung eines Kontrollkollektives auf Veränderungen aller drei oben genannter Gene.

### **5.1 *CFTR*-Variationen bei CP**

Die Assoziation von *CFTR*-Variationen und CP wurde 1998 in zwei Studien erstmalig beschrieben. Cohn *et al.* untersuchten 27 Patienten (Altersmedian bei Diagnose 33 Jahre; Bereich 12-65 Jahre) mit ICP auf 17 *CFTR*-Variationen und den PolyT-Genotyp im Intron 8 (Cohn *et al.* 1998). Bei dieser Studie wurden bei 7 Patienten (25,9 %) insgesamt 8 Variationen (5x p.F508del, 2x p.R117H, 1x p.N1303K) sowie bei 5 Patienten ein 5T-Allel entdeckt (3x 5/7, 2x 5/9; Allelfrequenz 9,3 %). Ein Patient war gemischt-heterozygot ([p.R117H (7/9) + p.F508del]) und zwei weitere wiesen ein 5T-Allel (5/9) in Kombination mit p.F508del auf. Die von den Autoren angegebene doppelt so hohe Frequenz des 5T-Allels sowie die 6-mal höhere Frequenz von *CFTR*-Variationen bei CP Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung ist aufgrund der geringen Fallzahl vorsichtig zu werten. In unserer wie auch in anderen Studien fand sich keine Assoziation mit dem 5T-Allel.

In einer weiteren Studie wurden 134 Patienten (mittleres Alter 31,7 Jahre, Bereich 16-86 Jahre) mit CP (60x ICP, 71x ACP) auf 22 *CFTR*-Variationen und das 5T-Allel untersucht (Sharer *et al.* 1998). Achtzehn Patienten (13,4 %), davon 12 mit ICP, waren heterozygot für eine *CFTR*-Variation, während kein Patient gemischt-heterozygot für eine CF-relevante *CFTR*-Variation war. Vier Patienten waren gemischt-heterozygot für eine *CFTR*-Variation und das 5T-Allel (12x p.F508del, 2x p.R117H, je 1x p.Q493X, p.R553X, p.R560T, c.621+1 G>T, 14x 5T). Zusammengefaßt zeigte sich eine 2,5fach höhere Frequenz von *CFTR*-Variationen als erwartet.

Die Assoziation zwischen *CFTR*-Variationen und CP war jedoch nur für die idiopathische Form, aber nicht für die alkoholisch bedingte CP signifikant.

Kritikpunkte, die bei beiden Studien angeführt werden können, sind die fehlende Untersuchung eines Kontrollkollektivs und die Beschränkung der genetischen Analyse auf die häufigsten bei CF vorkommenden Varianten. Durch die Untersuchung der Patienten auf weitere *CFTR*-Variationen konnte gezeigt werden, daß sich das Variationsspektrum der Variationen bei CF und CP unterscheidet.

Castellani *et al.* veröffentlichten 2001 eine Studie, in der sie 67 Patienten (31x ICP, 33x idiopathisch rekurrende akute Pankreatitis, 3x idiopathisch akute Pankreatitis; mittleres Alter 35,6 Jahre) in einer ersten Screening-Phase auf 18 *CFTR*-Variationen und das *5T*-Allel untersuchten. Hierbei wurden 13 *CFTR*-Variationen bei 11 Patienten (16,4 %) und bei 5 Patienten ein *5T*-Allel gefunden. Aufgrund von klinischen Symptomen und auffälligen Schweiß-Test- und Nasalpotentialdifferenz-Messungen wurde bei 2 gemischt-heterozygoten Patienten und einem heterozygoten Patient die Diagnose CF gestellt. Diese Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen. In einer zweiten Phase wurden 14 ausgewählte Patienten auf seltene *CFTR*-Variationen mittels DGGE-Analyse aller 27 Exone und der Intron-Grenzen untersucht. Durch diese Analyse wurden bei 5 Patienten 6 weitere *CFTR*-Variationen entdeckt (3x p.L997F, je 1x, p.S1235R, p.D614G, c.3878delG). Nach Ausschluß der CF-Patienten wurden bei 11 Patienten (17,2 %) insgesamt 14 *CFTR*-Variationen gefunden (5x p.F508del, je 1x, c.2789+5 G>A, p.R1162X, c.3849+10 kb C>T und 6 weitere, siehe oben). Auch hier zeigte sich eine höhere Frequenz von *CFTR*-Variationen bei ICP als in der Normalbevölkerung erwartet ( $p < 0,0066$ , 95 % CI 1,85-16,27). Gehäuft wurde die p.L997F Variation gefunden (4/32), die bei CF selten vorkommt, jedoch vermehrt bei idiopathischen disseminierten Bronchiektasien und die auch bei der Neugeborenen-Hypertrypsinämie beschrieben wurde (Bombieri *et al.* 1998, Gomez Lira *et al.* 2000). Wie bei den bereits beschriebenen Studien ist auch hier als wichtiger Kritikpunkt die fehlende Untersuchung eines Kontrollkollektivs anzuführen. So bleibt z. B. unklar, ob bestimmte Variationen wie p.L997F und p.D614G im Vergleich zur Normalbevölkerung wirklich vermehrt angereichert sind.

Audrézet *et al.* untersuchten in ihrer 2002 veröffentlichten Studie 39 Patienten auf *CFTR*-, *PRSSI*- und *SPINK1*-Variationen mittels DGGE und DHPLC. Achtzehn *CFTR*-Variationen wurden bei 14 Patienten gefunden (5x p.F508del, je 1x, p.P5L, c.406-6 T>C, p.E217G, p.R352Q, p.G542X, p.V562I, p.L967S, p.A1136T, c.3601-20 T>C, p.W1282X, p.N1303K, p.Q1476X, c.4575+2 G>A, 7x *5T*). Weiterhin wurden eine *PRSSI*-Variation (p.R122H) und 7 veränderte *SPINK1*-Allele bei 6 Patienten (4x p.N34S, je 1x c.1-2C>A und c.1-41G>A)

beschrieben. Audrézet *et al.* folgerten, daß „gain of function“-Variationen im *PRSSI*-Gen selten bei der idiopathischen Form der CP zu finden sind, wohingegen „loss of function“-Variationen im *SPINK1*-Gen wie p.N34S gehäuft bei Patienten mit ICP vorkommen. Durch die Untersuchung von häufigen *CFTR*-Variationen wurden 8 Variationen bei 39 Patienten detektiert (20,5 %). Dies entspricht einer 7,4fach höheren Frequenz als in der Normalbevölkerung erwartet ( $p < 0,001$ ). Zusammenfassend stellten die Autoren fest, daß *CFTR*-Variationen im heterozygoten (mind. 20 %) und gemischt heterozygoten Zustand (ca. 10 %) gehäuft bei Patienten mit ICP vorkommen und daß in etwa 30 % aller Patienten mit ICP eine genetische Variation in einem der 3 oben genannten Gene aufweisen. Eine Assoziation zwischen dem 5T-Allel und idiopathischer CP fand sich in dieser Studie nicht.

Eine komplette Sequenzierung aller kodierenden Abschnitte des *CFTR*-Gen wurde von Weiß und Mitarbeitern bei 67 Patienten mit idiopathischer CP und bei 60 Kontrollen durchgeführt (Weiß *et al.* 2005). Vor Beginn der Untersuchungen wurden alle Patienten mit *PRSSI*-Variationen ausgeschlossen. Weiterhin erfolgte eine Analyse des *SPINK1*-Gen mittels Sequenzierung aller kodierenden Abschnitte bei Patienten und Kontrollen. Bei den untersuchten Patienten wurden 17 *CFTR*-Variationen bei 13 Patienten gefunden (19,4 %) (3x p.F508del, 3x p.S1235R, je 1x p.R31C, p.R75Q, p.R117H, p.R347P, p.M348V, p.G576A, c.2184insA, p.R668C, p.V754M, p.A1087P, p.D1152H; 7x 5/7, 1x 5/9), wohingegen 7 Kontrollen eine *CFTR*-Variation aufwiesen (11,7 %) (3x p.F508del, 2x p.R117H, 1x p.I148T, 1x p.L997F; 4x 5T). Eine *SPINK1*-Variation fand sich bei 10 Patienten (15 %) (8x p.N34S, 1x p.P55S, 1x c.194+2T>C) und bei 1 Kontrolle (1,6 %). Von den beschriebenen *CFTR*-Variationen werden allerdings p.R75Q und p.R668C von den meisten Autoren als nicht CF-assozierte Varianten aufgefaßt. p.V754M ist nur als komplexes Allel (in *cis* mit einer Deletion der Exone 3 bis 10 und 14B bis 16) eine CF-verursachende Veränderung (Niel *et al.* 2006). Die funktionelle Bedeutung von p.R31C, p.M348V, p.G576A, p.A1087P, p.D1152H und p.S1235R ist zurzeit weitgehend ungeklärt. Trotz Anwendung des methodischen „Goldstandards“ Sequenzierung und vollständiger Analyse der kodierenden Abschnitte bei Patienten wie auch Kontrollen kann jedoch auch durch diese Studie aufgrund der geringen Größe des Patienten- und Kontrollkollektives die Frage nach der Bedeutung von *CFTR*-Varianten bei CP nicht befriedigend beantwortet werden.

Aus den oben genannten Studien läßt sich ableiten, daß die Untersuchung kleiner Fallzahlen zu Assoziationen führt, die bei größeren Fallzahlen nicht reproduziert werden können. So konnte die von Cohn und Mitarbeitern beschriebene doppelte Anhäufung des 5T-Allels durch andere und unsere Untersuchung nicht bestätigt werden. Da einige Autoren das 5T-Allel und

„Polymorphismen“, die nicht mit CF assoziiert sind, in ihre Berechnungen integrierten, müssen aus unserer Sicht die beschriebenen Anreicherungen von *CFTR*-Variationen aufgrund der nicht durchgeführten Analyse von Kontrollpersonen nach unten korrigiert werden.

Darüber hinaus beschreiben alle Autoren, die eine umfangreiche Untersuchung ihrer Patienten durchgeführt haben, seltene *CFTR*-Variationen (z.B. p.P5L, p.R560T). Da bei diesen Variationen in den meisten Fällen jedoch keine Untersuchung eines Kontrollkollektivs vorliegt und ebenso funktionelle Daten häufig fehlen, müssen deren Bedeutung mit Einschränkungen gewertet werden.

## **5.2 *CFTR*-Mutationsspektrum und Verteilungsmuster bei CP, CF und CBAVD**

Betrachtet man die bei CP gefundenen *CFTR*-Variationen näher, zeigt sich, daß mehr als die Hälfte der gefundenen Variationen „seltene“ und „milde“ „missense“-Variationen waren (55/101, 54,5 %). Bei diesen Variationen, wie z. B. p.R117H, läßt sich *CFTR* an der Zellmembran nachweisen, jedoch ist die Chloridkanal-Funktion häufig deutlich beeinträchtigt. Dabei bleibt offen, ob manche dieser Variationen lediglich „Polymorphismen“ sind, die keinerlei Einfluß auf die Entstehung einer CP haben.

Weiterhin fanden wir ein zur CF und CBAVD unterschiedliches Verteilungsmuster der *CFTR*-Variationen. Dies wurde vor allem an der Frequenz der 24 bei CF am häufigsten nachweisbaren Variationen ersichtlich.

Der Anteil von p.F508del an der Gesamtheit der gefundenen *CFTR*-Variationen betrug in unserem CP-Kollektiv nur 36,6 % (37/101). Hier zeigte sich ein Unterschied zu CF-Patienten, bei denen der Anteil bei etwa 66 % liegt. Seltene Variationen wie p.R117H (20,8 %), p.L997F (5,9 %) und p.S1235R (8,9 %) wurden jedoch deutlich häufiger gefunden, als dies bei CF oder CBAVD angegeben wird. Das unterschiedliche Verteilungsmuster der Variationen bei CP, CF und CBAVD wurde ebenso beim Vergleich des Anteils der 24 weltweit am häufigsten vorkommenden Variationen an der Gesamtheit der gefundenen Variationen augenscheinlich. Bei CF entfielen etwa 84,6 % der gefundenen Variationen auf die 24 weltweit häufigsten *CFTR*-Variationen. Bei unseren Patienten betrug dieser Anteil 69,3 % (70/101) und bei der CBAVD 72,1 % (Dörk *et al.* 1997, Claustres *et al.* 2000). Auffallend war, daß bei CP häufiger „seltene“ und „milde“ *CFTR*-Variationen als bei der CF gefunden wurden und daß diese Variationen nicht denjenigen entsprachen, die bei der CBAVD gehäuft vorliegen.

Bei der CBAVD zeigen mindestens 60-70 % der Patienten eine Variation des *CFTR*-Gens (Dumur *et al.* 1990). Auch hier finden sich im Gegensatz zur CF hauptsächlich „milde“ *CFTR*-

Variationen (Klasse IV und V), die mit einer Restfunktion des CFTR-Proteins einhergehen. Charakteristisch ist die hohe Frequenz des 5T-Allel, das bei 16-50 % der Patienten vorliegt (Chillon *et al.* 1995; Zielenski *et al.* 1995; Claustres *et al.* 2000). Innerhalb der „splice acceptor site“ von Intron 8 gibt es 3 verschiedene Längenvarianten des Polypyrimidin-Abschnittes (5T, 7T, 9T), die zu einem unterschiedlichen Ausmaß des Splicings von Exon 9 führen (Chu *et al.* 1991, 1993). Die 5T-Variante führt zu einem ineffektiven Splicing und fehlender Exprimierung von Exon 9 sowie zu einer fehlerhaften Chloridkanal-Funktion (Strong *et al.* 1993). Darüber hinaus kann das 5T-Allel den Effekt anderer Variationen modifizieren, wenn es auf demselben Chromosom (in *cis*) lokalisiert ist (Kiesewetter *et al.* 1993). p.R117H in *cis* mit 5T findet sich bei CF und ist mit einem pulmonalen Phänotyp assoziiert, während p.R117H in *cis* mit 7T bei der CBAVD ohne Lungenbeteiligung zu finden ist. Hinsichtlich der 5T-Allelfrequenz zeigt sich ein Unterschied zwischen CP und CBAVD. Bei der CP beträgt die Allelfrequenz 2,8 % gegenüber 3,3 % bei unseren Kontrollen, wohingegen bei der CBAVD eine Assoziation zum 5T-Allel besteht (Allelfrequenz 16,31 %, Claustres *et al.* 2000).

Die Häufigkeit von p.R117H ist sowohl bei CP als auch bei CBAVD erhöht. Dörk *et al.* entdeckten bei 106 CBAVD Patienten eine Allelfrequenz von 11 %, was einem etwa 30fach höheren Wert im Vergleich zu deutschen CF Patienten entspricht (Dörk *et al.* 1997). Claustres *et al.* fanden bei 800 CBAVD Patienten eine p.R117H-Allelfrequenz von 4,4 % und bestätigten somit die beschriebene Assoziation. Auch bei unseren CP-Patienten war die Frequenz von p.R117H (3,9 %) gegenüber der erwarteten Frequenz bei CF-Patienten (0,11-0,19 %) erhöht (Claustres *et al.* 2000).

Bei den Variationen p.L997F und p.S1235R zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen CP, CF und CBAVD, da beide Variationen bei der CF und der CBAVD selten waren. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß bei der CP und der CBAVD unterschiedliche, vornehmlich „seltene“ und „milde“ CFTR-Variationen vorliegen.

### **5.3 CFTR-„Polymorphismen“**

Neben den 3 verschiedenen Längenvarianten des Polypyrimidin-Abschnittes innerhalb der „splice acceptor site“ von Intron 8 gibt es hier ein zusätzliches TG-Repeat, welches das Splicing des Exon 9 beeinflusst. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß in Abhängigkeit der Anzahl der vorhandenen TG-Repeats in Kombination mit dem 5T-Allel das Exon 9 im CFTR-Transkript gehäuft fehlte (Cuppens *et al.* 1998). Lag eine hohe Anzahl an TG-Repeats (TG11, TG12, TG13) in Kombination mit einem 5T-Allel vor, wurde das Exon 9 vermindert transkribiert. Insofern ist es möglich, daß die Penetranz des 5T-Allels durch mehrere genetische

Alterationen beeinflusst wird. Ebenso spielen bei der Regulation der Transkription des Exon 9 exonische „Enhancer-“ und „Silencer-“Elemente wie auch der intronische „Splicing-Silencer“ eine entscheidende Rolle (Pagani *et al.* 2000).

Weiterhin konnte für *470M* eine signifikant erhöhte „offen Wahrscheinlichkeit“ des Chloridionenkanals im Vergleich zu *470V* gezeigt werden (Cuppens *et al.* 1993). Liegen jedoch *470M* und *1235R* auf demselben Allel gemeinsam vor, wird dieser Effekt supprimiert und es zeigt sich ein Chloridionenkanal, der dem von *470V* entspricht (Wei *et al.* 2000). *1235R* in Kombination mit *470V* wiederum zeigte einen Chloridionenkanal mit einer signifikant höheren „offen Wahrscheinlichkeit“ im Vergleich zu *470V* alleine. Die Interpretation dieser funktionellen Daten spricht dafür, daß das Vorliegen von *470M* mit einem intakten Chloridionenkanal mit erhöhter „offen Wahrscheinlichkeit“ im Vergleich zu allen anderen untersuchten Kombinationen vergesellschaftet ist. Die funktionellen Daten unterstützen die Beobachtung, daß *470M* nach Korrektur (siehe Tabelle 11, 12, 13) nicht assoziiert ist.

Bei der Untersuchung von häufigen Sequenzalterationen, denen eine geringfügige Auswirkung auf die CFTR-Funktion zugesprochen wird, zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in einer ersten Berechnung in den Allelfrequenzen 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). Unter Berücksichtigung der Genotypen ergaben sich signifikante Werte 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). Da sich jedoch die am häufigsten detektierten *CFTR*-Variationen *p.F508del* und *p.R117H in cis* mit *TG10* und *470M* befinden, waren nach Korrektur (Ausschluß der *p.F508del*- und *p.R117H*-Variationsträger bei Patienten und Kontrollen) sowohl die Allelfrequenzen als auch die Genotypen nicht mehr signifikant verschieden. Lediglich für den *TG10/10*-Genotyp zeigte sich nach Korrektur ein signifikanter *p*-Wert ( $p=0,024$ ), der jedoch nach Bonferroni-Korrektur nicht mehr signifikant war ( $p=0,26$ ). Da *TG10* im Vergleich zu *TG11* und *TG12* quantitativ mehr intaktes CFTR aufweist (*TG11* 2,8fach mehr CFTR-Transkript ohne Exon 9, *TG12* 6fach mehr CFTR-Transkript ohne Exon 9, jeweils im Vergleich zu *TG10*), unterstützen die genetischen Daten die funktionellen Daten und umgekehrt (Cuppens *et al.* 1998).

Auch die Variationen *p.R75Q*, *c.1716G>A* (*p.E528E*), *p.R668C*, *c.2694T>G* und *c.4521G>A* waren nicht assoziiert. Dies ist insofern interessant, da einige dieser Variationen in vorangegangenen Untersuchungen, bei denen jedoch keine Kontrollpersonen auf diese Varianten analysiert wurden, als relevante *CFTR*-Variationen gewertet wurden. Da den Berechnungen eine fiktive *CFTR*-Variationsfrequenz von 5 % zugrunde gelegt worden war, ergaben sich aus unserer

Sicht zu hohe Werte für die Anreicherung von *CFTR*-Variationen und gemischt-heterozygoten sowie *trans*-heterozygoten Variationsträgern bei Patienten mit chronischer Pankreatitis.

#### **5.4 Gemischt-heterozygote Variationsträger**

Cohn *et al.* fanden in der Summation beider Studien 9 von 39 Patienten (23,1 %), die gemischt heterozygot für zwei *CFTR*-Variationen waren (inklusive *5T*-Allel) (Cohn *et al.* 1998; Noone *et al.* 2001). Ohne das *5T*-Allel zu berücksichtigen, reduziert sich die Zahl auf 6 Patienten (15,4 %). Bei 2 dieser Patienten lag p.F508del in Kombination mit p.D1152H vor. Weiterhin lag bei 3 Patienten eine Kombination einer *CFTR*-Variation mit einer der Variationen p.P574H, c.3120G>A und p.G1069R vor, deren Bedeutung nicht geklärt ist.

Dahingegen fanden Sharer *et al.* bei ihren Patienten lediglich 4, die gemischt-heterozygot für eine *CFTR*-Variation und das *5T*-Allel waren (2,9 %) (Sharer *et al.* 1998). Castellani *et al.* fanden bei 3 ihrer 67 Patienten (4,5 %) zwei *CFTR*-Variationen (Castellani *et al.* 2001) und Audrézet *et al.* entdeckten bei ihrer Untersuchung 4 gemischt-heterozygote Patienten (10,3 %) und 2 Patienten, die eine *CFTR*-Veränderung in Kombination mit einem *5T*-Allel aufwiesen (5,1 %). Auch bei diesen zuletzt genannten Patienten ist die Wertung als gemischt-heterozygote *CFTR*-Träger erschwert, da bei 3 von 4 Patienten seltene *CFTR*-Variationen vorlagen (p.P5L, p.E217G/p.A1136T, p.R352Q). Ähnliches gilt für die Untersuchung von Weiß und Mitarbeitern, bei der von 4 gemischt-heterozygoten Variationsträgern 2 mindestens eine nicht näher charakterisierte *CFTR*-Variation trugen (p.A1087P, p.S1235R/p.R668C).

Bei den Untersuchungen der p.S1235R-Variation konnte mittels elektrophysiologischer Experimente bei *I235R* ein signifikant höherer Chloridionenfluß der gesamten untersuchten Zellen nachgewiesen werden, der sowohl bei Kombination mit *470M* als auch in Kombination mit *470V* vorlag (Wei *et al.* 2000). Weiterhin wurde gezeigt, daß die Reifung des Proteins bei *I235R* nicht beeinträchtigt wird. Da bei *I235R* ein intakter Chloridkanal vorliegt, scheint dies keine CF-verursachende Variante zu sein. Jedoch ist es möglich, daß eine gestörte *CFTR*-Unterfunktion resultiert. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass p.S1235R als komplexes Allel mit p.G628R bei der CF vorliegt (Cuppens *et al.* 1993). Dieses komplexe Allel lag bei keinem unserer Patienten vor. Bei der Reifung des Proteins zeigte sich für R628 ein Defekt, der bei *R1235* nicht vorlag. Auch hier sprechen die funktionellen Daten dafür, daß *R1235* pathophysiologisch eine untergeordnete Rolle spielt (Wei *et al.* 2000).

In unserer Untersuchung waren 12 der untersuchten Patienten (12/533, 2,3 %) gemischt-heterozygot für zwei *CFTR*-Variationen, während nur eine Kontrolle gemischt-heterozygot war

([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 die gemischt-heterozygoten *CFTR*-Träger mit den Variationen 5T, p.R75Q und c.1716G>A (p.E528E) aufgrund der fehlenden Assoziation dieser Variationen in unserer Untersuchung nicht gewertet. Jedoch lagen auch bei unseren Patienten in 4 Fällen Kombinationen mit seltenen *CFTR*-Variationen vor (2x p.D1152H, je 1x p.S1235R, p.L997F/p.R1162L). Korrigiert man die Daten entsprechend, resultiert daraus ein geringerer, aber signifikanter p-Wert (8/533, 1,5 %; p=0,02, OR=8,4, 95 % CI 1,05-67,4). Damit zeigt sich, daß auch hier die in früheren Studien angegebenen Zahlen zu hoch lagen, da fraglich relevante und nicht assoziierte Variationen mit aufgeführt wurden. Weiterhin können wir anhand unserer Analysen das von Noone und Mitarbeitern angegebene 40fach bzw. 80fach höhere Risiko für gemischt-heterozygote *CFTR*-Träger mit einer „milden“ und einer „schweren“ *CFTR*-Variation nicht bestätigen. Der Unterschied der Ergebnisse kann darin begründet sein, dass Noone und Mitarbeitern ihre Berechnungen auf der Basis eines „fiktiven“ Kontrollkollektives unter Einbeziehung des 5T-Allels durchgeführt haben.

Der geringere Anteil gemischt-heterozygoter Variationsträger unserer Studie legt nahe, daß es sich bei diesen Patienten in den meisten Fällen nicht um eine atypische Form der CF handelt. Wir vermuten das Vorliegen einer gestörten *CFTR*-Unterfunktion, worauf auch die selten gefundenen „schweren“ Variationen hindeuten. Ein weiterer Aspekt ist, daß der Prozentsatz der normalen *CFTR*-Funktion bei asymptomatischen Patienten, die heterozygot für eine *CFTR*-Variation sind, bei 50-100 % liegt. Ein klinisch nachweisbarer pathologischer Schweißtest zeigt sich erst dann, wenn die *CFTR*-Funktion unter 5 % liegt. Erst bei einer *CFTR*-Funktion von unter einem Prozent manifestiert sich eine exokrine Pankreasinsuffizienz (Stern 1997).

Bei gemischt-heterozygoten *CFTR*-Trägern ist zu berücksichtigen, daß laut einem „Consensus statement“ von Rosenstein *et al.* die Diagnose einer CF bei einem Patienten mit einem für die CF charakteristischen klinischen Erscheinungsbild als gesichert gilt. Zu diesem klinischen Erscheinungsbild zählen sowohl die Pankreasinsuffizienz als auch die rekurrende Pankreatitis (Rosenstein *et al.* 1998). Bei Individuen mit nur einer *CFTR*-Mutation sollte die Diagnose auf klinischen Merkmalen und anderen Maßeinheiten der *CFTR*-Dysfunktion beruhen. Aber auch Individuen, die keine *CFTR*-Mutation aufweisen, können an einer CF erkrankt sein, wenn die Diagnose bei charakteristischer klinischer Symptomatik durch weitere Untersuchungen wie einen pathologischen Schweißtest bestätigt werden kann. Bezüglich der Aussagekraft von Laboruntersuchungen bei Patienten mit Verdacht auf CF ist die Messung der nasalen

Potentialdifferenz trotz des erhöhten technischen Aufwands anderen Verfahren überlegen (Stern 1997).

Werden diese Kriterien für die Diagnosestellung der CF für die bislang durchgeführten Studien berücksichtigt, müssten einige der Patienten aus den Berechnungen ausgeschlossen werden. Jedoch scheint die korrekte Klassifikation in einigen Fällen momentan nicht ohne weiteres möglich. Zurzeit ist es möglich, Patienten, bei denen Hinweise auf eine CF vorliegen, als Patienten mit einem atypischen CF Phänotyp zu klassifizieren, so daß exakte Richtlinien notwendig sind. In der Studie von Audrézet *et al.* hatten zwei gemischt-heterozygote Patienten erhöhte Werte im Schweißtest, woraus gefolgert wurde, daß bei Berücksichtigung des „Consensus Statement“ eine Aufteilung in CF-„Krankheit“ und CF-„Syndrom“ notwendig sei (Ren *et al.* 1999).

Nachdem in einer kürzlich erschienen Studie gezeigt wurde, daß Patienten ohne Veränderungen auf dem *CFTR*-Gen einen Phänotyp aufweisen können, der klinisch nicht von dem der klassischen durch *CFTR*-Veränderungen bedingten CF zu unterscheiden ist, scheint eine klare Differenzierung zwischen Patienten mit CF und Pankreasbeteiligung und Patienten mit CP und *CFTR*-Veränderungen wichtig zu sein (Groman *et al.* 2002).

### **5.5 PRSSI- und SPINK1-Variationen**

Bei unseren Untersuchungen führten wir bei 533 Patienten und 552 Kontrollen eine vollständige Analyse des *PRSSI*- und *SPINK1*-Gens mittels Sequenzierung durch. Ziel dieser umfangreichen Analyse war es, den Anteil der einzelnen Variationen bei CP möglichst genau abzubilden. Weiterhin sollte der Anteil *trans*-heterozygoter Variationsträger möglichst vollständig aufgedeckt werden. Von den gefundenen *PRSSI*-Variationen waren p.A16V, p.N29I und p.R122H statistisch signifikant angereichert. Bei den *SPINK1*-Variationen galt dies für [c.1-215G>A + c.194+2T>C] und p.N34S (Tabelle 14). In den bisherigen Studien lagen die Häufigkeiten der p.N34S Variation zwischen 0-23,1 % (Noone *et al.* 2001; Audrézet *et al.* 2002; Bernardino *et al.* 2003). Interessanterweise wurde p.N34S weder bei brasilianischen Patienten (82) noch bei brasilianischen Kontrollen (200) gefunden (Bernardino *et al.* 2003). Die Bedeutung der von Audrézet beschriebenen *SPINK1*-Variationen c.1-2C>A und c.1-41G>A (jeweils bei einem Patienten) ist noch unverstanden. Dieser Sachverhalt ist ähnlich zu bewerten wie bei zahlreichen seltenen *CFTR*-Variationen, bei denen die Untersuchung eines ausreichenden Kontrollkollektives fehlt. Unpublizierte Daten der eigenen Arbeitsgruppe legen nahe, daß c.1-41G>A keine pathogenetische Relevanz besitzt, da diese Variante in hoher Frequenz bei gesunden Schwarzafrikanern gefunden wird (H. Witt, persönliche Mitteilung).

Die Vergleichbarkeit der Häufigkeiten von *PRSSI*-Variationen mit früheren Untersuchungen ist erschwert, da in diesen teilweise das Vorhandensein einer p.R122H Variation oder einer positiven Familienanamnese als Ausschlußkriterium gewertet wurde. Dementsprechend ist die Häufigkeit der p.R122H Variation in diesen Untersuchungen geringer als in der vorliegenden (0-2,6 % gegenüber 4,3 %) (Noone *et al.* 2001; Audrézet *et al.* 2002; Bernardino *et al.* 2003).

Daß sowohl *PRSSI*- als auch *SPINK1*-Variationen einen Einfluß auf die Pathogenese der CP nehmen, zeigte auch die TDT-Analyse. Hier konnten wir für p.R122H, p.A16V und p.N34S signifikante *p*-Werte erhalten (Tabelle 15). Bei p.R122H ließ sich bei einer Familie nicht sicher entscheiden, ob die Variation von dem betroffenen Elternteil übertragen wurde, da kein Material für die genetische Analyse zur Verfügung stand. Dies traf ebenfalls auf 2 Familien mit *SPINK1* p.N34S zu. Geht man davon aus, daß in diesen Fällen der fehlende Elternteil die Variation an das betroffene Kind weitergegeben hatte, wie es bei den übrigen Familien der Fall war, so würde die Variation bei allen Familien weitergegeben worden sein. Wird eine Variation gehäuft von Eltern an das betroffene Kind weitergegeben, ist dies ein starker Hinweis darauf, daß eine genetische Alteration für die Pathogenese einer Erkrankung von Bedeutung ist.

### **5.6 *Trans*-heterozygote Variationsträger**

Der Einfluß, den das kombinierte Vorliegen von Veränderungen im *PRSSI*-, *SPINK1*- und *CFTR*-Gen auf die Pathogenese der CP hat, wurde bisher nur in wenigen Studien untersucht. Noone *et al.* folgerten aufgrund der dukulären *CFTR*-Expression und der azinären *SPINK1*-Expression, daß Veränderungen dieser Gene das Pankreatitisrisiko unabhängig voneinander beeinflussen (Noone *et al.* 2001). Sie berechneten anhand ihrer Daten ein 900fach höheres Risiko für gemischt-heterozygote *CFTR*-Träger mit einer p.N34S Variation an einer Pankreatitis zu erkranken, welches sie durch additive Effekte der beiden Gene begründeten. Da beide Gene unabhängig voneinander das Erkrankungsrisiko erhöhen, postulierten sie, daß bei Patienten mit CF und CBAVD das Vorhandensein von p.N34S für das gelegentliche Auftreten einer Pankreatitis verantwortlich sein könnte. Wie bereits vorab erwähnt, wurden in dieser Studie keine Kontrollen untersucht. Die Berechnung der Risiken erfolgte anhand der aus der Häufigkeit der CF bei der weißen amerikanischen Bevölkerung resultierenden, erwarteten Frequenz von *CFTR*-Variationen in der Normalbevölkerung. Da sich hieraus eine frei festlegbare Anzahl an „fiktiven“ Kontrollen ergibt, die in die Berechnung einfließen, sind die angegebenen Risiko-Berechnungen mit Zurückhaltung zu werten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß *trans*-heterozygote Variationsträger deutlich gehäuft vorgefunden wurden (5,1 gegenüber

0,2 %;  $p < 0,0001$ ,  $OR = 29,40$ , 95 %  $CI = 3,98-217,3$ ). Ein 900fach erhöhtes Risiko für die Kombination von p.N34S mit zwei *CFTR*-Variationen ergab sich jedoch nicht.

Sowohl Audrézet *et al.* als auch Gomez *et al.* konnten das Vorkommen von *trans*-heterozygoten Patienten für *CFTR*- und *SPINK1*-Variationen bestätigen, was auf eine Interaktion zwischen verschiedenen Genloci bei der Pathogenese der CP hindeutet.

Einer unserer *trans*-heterozygoten Patienten 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). Bei diesem Patienten wies die Mutter ebenfalls die *CFTR*-Variation p.M952T auf, wohingegen der Vater Träger der *PRSSI*-Variation p.A16V und der *SPINK1*-Variation p.N34S war. Interessanterweise waren beide Elternteile beschwerdefrei.

Bei der Kombination von *PRSSI*- mit *CFTR*-Variationen ist der modulierende Effekt der *CFTR*-Variation zu diskutieren. Die *CFTR*-Variationen (2x p.L997F, p.R1162L, p.V754M, p.M952T, p.F508del) scheinen bis auf p.F508del einen geringfügigen funktionellen Effekt zu haben. Für p.V754M ist bekannt, daß nur das komplexe Allel (Deletion von Exon 3 bis 10 und 14b bis 16 *in cis*) eine CF-verursachende Mutation ist (Niel *et al.* 2006). Ein weiteres komplexes Allel liegt bei p.I148T vor. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, daß es sich bei p.I148T um eine „schwere“ CF-verursachende Variation handelt. Eine kürzlich erschienene Studie zeigte aber, daß nicht p.I148T sondern nur das komplexe Allel [p.I148T + 3199del6] mit der CF assoziiert ist (Rohlf's *et al.* 2002). In unseren Untersuchungen wurde p.I148T häufiger bei Kontrollen als bei CP Patienten nachgewiesen (Tabelle 8), wobei kein Patient mit p.I148T die Deletion im Exon 17A (3199del6) besaß.

Diese Beispiele verdeutlichen, mit welcher Vorsicht genetische Daten und daraus resultierende funktionelle Studien beurteilt werden müssen und unterstreichen die Bedeutung der Untersuchung ausreichend großer Patienten- und Kontrollkollektive.

Die Rolle von p.R1162L ist aktuell noch nicht geklärt. Insofern ist es bis heute schwierig, eindeutige Schlußfolgerungen über den Kombinationseffekt von *CFTR*- und *PRSSI*-Variationen zu ziehen.

Anhand der Konstellation des gemischt-heterozygoten Patienten mit Variationen aller 3 Gene ist zu erkennen, daß in manchen Fällen ein sehr komplexes Zusammenspiel mehrerer Gene bei der Pathogenese der CP notwendig zu sein scheint. Jedoch ist es durchaus möglich, daß weitere bis heute noch unbekannte Gene oder andere modifizierende Faktoren eine Rolle spielen.

## 5.7 Methodische Aspekte

Um eine umfangreiche Analyse des *CFTR*-Gens durchzuführen, wurden 128 Patienten mittels SSCP untersucht. Hierbei wurden 7 Variationen gefunden, die mit alleiniger Schmelzkurvenanalyse nicht identifiziert worden wären (7/30, ohne R75Q, 23.3 %).

Zum heutigen Zeitpunkt bietet sich die Durchführung einer Sequenzierung an, da dieses Verfahren in den letzten Jahren deutlich effizienter und kostengünstiger geworden ist. Hierbei ist als Einschränkung anzuführen, daß es sich bei dem *CFTR*-Gen um ein relativ großes Gen mit 27 Exonen handelt und somit eine komplette Sequenzierung zum Zeitpunkt des Studienbeginns bei unserer Patienten- und Kontrollenzahl kein vertretbares Kosten-Nutzen-Verhältnis ergeben hätte. Weiterhin trifft dies ebenso für die durchgeführte gezielte Untersuchung einzelner Variationen bei Kontrollen zu.

Um ein schnelles und hochsensitives wie auch hochspezifisches Verfahren zu etablieren, wurde die Schmelzkurvenanalyse mittels FRET-Sonden unter Einsatz von LNAs herangezogen. Der Einsatz von LNAs war notwendig, da zum einen in manchen Fällen der Temperaturunterschied zwischen Wildtyp und Variation zu gering war, um diese zu diskriminieren, als auch in manchen Fällen Bereiche mit niedriger Schmelztemperatur und nahe beieinander liegenden Variationen auf diesem Weg diskriminiert werden konnten. Wie am Beispiel der F508del-Region zu sehen ist, gelang es mittels LNA einen Temperaturunterschied von ca. 20°C zwischen Wildtyp und spezifisch nachzuweisender Mutation zu generieren. Durch LNAs wird die Basenstapelung wie auch die Präorganisation des Phosphatrückgrates verstärkt. Hieraus resultiert eine höhere Affinität zu komplementärer DNA und RNA, was zu einer erhöhten Schmelztemperatur führt.

Wie anhand der im Ergebnisteil zu sehenden Abbildungen ersichtlich, reichte die Verkürzung der FRET-Sonden nicht aus, um eine ausreichende Diskriminierung zu erhalten. Anhand dieser Modifikationen mittels LNAs ist es uns gelungen, ein hochspezifisches, hochsensitives und erweiterbares „Test-Kit“ für die Detektion von *CFTR*-Variationen bei verschiedenen Fragestellungen zu etablieren, welches im Vergleich zu anderen Verfahren effizient und kostengünstig ist. Zudem lassen sich zahlreiche zusätzliche *CFTR*-Varianten neben der spezifisch nachzuweisenden Varianten detektieren.

In der Abbildung 13 ist beispielhaft die Etablierung der variationsspezifischen Sonden für p.E60X und p.G85E im Exon 3 des *CFTR*-Gens dargestellt.

**Abbildung 13:** Schmelzkurvenanalyse mit 2 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)-Sondenpaaren, die spezifisch für die *CFTR*-Varianten p.E60X und p.G85E sind. Neben den beiden nachzuweisenden Varianten erkennt man weitere Varianten, die aufgrund einer zusätzlichen Veränderung in der Basensequenz zwei Fehlpaarungen zur Sensor-Sonde und somit einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen als der Wildtyp (WT).

