

**Zur Häufigkeit der Mutation *CFTR*dele2,3(21kb) im Gen *CFTR* in einem deutschen  
Patientenkollektiv**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen**

**vorgelegt von Dirk Stolz  
aus Trier**

**Giessen 2006**

Aus dem Institut für Humangenetik des  
Universitätsklinikums Giessen und Marburg, Standort Giessen  
Leiter:  
Prof. Dr. med. Ulrich Müller

Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Müller

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 4. Dezember 2006

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind eingehalten.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Form einer Posterpräsentation auf der „European Human Genetics Conference 2004“ in München vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

- Stolz D, Happel P, Nohl C, Müller U, Nolte D (2004) *CFTR*dele2,3(21kb) in German patients. *European Journal of Human Genetics* 12: 215

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Historie der Zystischen Fibrose</b> .....	1
<b>1.2 Klinik der CF</b> .....	2
<b>1.3 Diagnostik der CF</b> .....	2
1.3.1 Klinische Diagnostik der CF.....	2
1.3.2 Der Schweißtest.....	3
1.3.3 Elektrophysiologische Diagnostik.....	3
1.3.4 Genetische Diagnostik.....	4
<b>1.4 Epidemiologie und Vererbung der Zystischen Fibrose</b> .....	5
<b>1.5 Das die Zystische Fibrose verursachende Gen und sein Produkt</b> .....	5
1.5.1 Identifizierung des <i>CFTR</i> -Gens.....	5
1.5.2 Das Genprodukt des <i>CFTR</i> -Gens.....	7
<b>1.6 Mutationen des <i>CFTR</i>-Gens</b> .....	8
1.6.1 Mutationsklassen des <i>CFTR</i> -Gens.....	9
1.6.2 Die Mutation $\Delta F508$ .....	9
1.6.3 Häufige Mutationen des <i>CFTR</i> -Gens und deren Verteilung.....	10
1.6.4 Die Mutation <i>CFTR</i> dele2,3(21kb).....	10
1.6.5 Aufgabenstellung.....	11
<b>2 Materialien</b> .....	12
<b>2.1 Geräte und Zubehör</b> .....	12
<b>2.2 Chemikalien</b> .....	12
<b>2.3 Verwendete Kits</b> .....	13
<b>2.4 Enzyme und Nukleotide</b> .....	13
<b>2.5 Lösungen</b> .....	13
<b>3 Methoden</b> .....	15
<b>3.1 DNA-Extraktion</b> .....	15

3.1.1	DNA-Extraktion durch Phenol-Chloroform-Extraktion.....	15
3.1.2	DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen.....	16
3.1.3	DNA-Extraktion mit dem BACC2-Kit von Nucleon, Amersham.....	17
<b>3.2</b>	<b>Polymerasekettenreaktion (PCR)</b> .....	<b>17</b>
3.2.1	Durchführung.....	19
<b>3.3</b>	<b>Gelelektrophorese</b> .....	<b>21</b>
3.3.1	Durchführung.....	21
<b>3.4</b>	<b>Bisherige Standarddiagnostik</b> .....	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Häufigkeit der Mutation <i>CFTR</i>dele2,3(21kb) in 1390 Proben</b> .....	<b>23</b>
4.1.1	Heterozygote Häufigkeit der <i>CFTR</i> dele2,3(21kb) und der übrigen gefundenen Mutationen.....	24
4.1.2	Genotyp von CF-Patienten unter besonderer Berücksichtigung der <i>CFTR</i> dele2,3(21kb)-Mutation.....	26
4.1.3	Relative Häufigkeit der einzelnen Allele.....	27
<b>4.2</b>	<b>Beschreibung der Mutation <i>CFTR</i>dele2,3(21kb) positiv getesteten Fällen</b> .....	<b>28</b>
4.2.1	Fall 1.....	28
4.2.2	Fall 2.....	29
4.2.3	Fall 3.....	29
4.2.4	Fall 4.....	30
4.2.5	Fall 5.....	31
4.2.6	Fall 6.....	31
4.2.7	Fall 7.....	31
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>37</b>
6.1	Zusammenfassung (Deutsch).....	37
6.2	Synopsis (English).....	38
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>39</b>

<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>41</b>
<b>9 Danksagung.....</b>	<b>44</b>
<b>10 Lebenslauf.....</b>	<b>45</b>

## 1 Einleitung

Das Fachgebiet der Humangenetik befasst sich mit den in der DNA des Menschen verschlüsselten Erbanlagen. Durch das Erforschen von Defekten in den menschlichen Erbanlagen und Charakterisierung der phänotypischen Auswirkungen erblich verursachter Krankheiten nimmt die molekulare Humangenetik den Platz einer Schlüsseldisziplin in der Medizin ein. Neben der deskriptiven Erfassung des Phänotyps und der ausführlichen Stammbaumanalyse hat sich die molekulare Untersuchung der Gene und ihrer krankheitsauslösenden Mutationen zum unerlässlichen Bestandteil der Forschung entwickelt. Bei diesen Untersuchungen werden die Auswirkungen von Mutationen auf Ebene der DNA, des resultierenden Transkripts bis hin zum Genprodukt und dessen gestörter Funktion in der Zelle analysiert. Das komplexe Krankheitsbild der monogen vererbten Zystischen Fibrose (cystic fibrosis, CF) gehört heute zu den wohl am meisten untersuchten genetischen Erkrankungen. Die Klonierung des bei CF mutierten Gens war ein Durchbruch in der Humangenetik und eröffnete neue Gesichtspunkte für die Diagnostik und Therapie der CF.

### 1.1 Historie der Zystischen Fibrose

Das Krankheitsbild der Zystischen Fibrose (auch Mukoviszidose genannt) ist eine variable Multisystemerkrankung, deren phänotypische Beschreibung bis in die 30er-Jahre des 20. Jahrhunderts zurück reicht. Fanconi grenzte die CF als eigenständiges Krankheitsbild vom Zöliakiesyndrom ab (Fanconi et al., 1936). Auf das Vorliegen einer funktionellen Störung wies 1953 die Gruppe um di Sant'Agnese hin, die eine abnorme Elektrolytzusammensetzung im Schweiß von CF-Patienten beschrieben. Das Phänomen des erhöhten Salzverlustes über den Schweiß veranlasste Gibson und Cooke, den Schweißtest zu etablieren (Gibson et al., 1959). Dieser Test war über die Jahre der einzige und ist bis heute noch fester Bestandteil der klinischen Diagnostik. Durch Kopplungsanalysen („linkage“) gelang es 1985, das bei CF mutierte Gen auf dem langen Arm von Chromosom 7 zu lokalisieren. Als 1989 die Klonierung des für CF codierenden Gens „*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*“ (CFTR) gelang, führte dies zu einer Fülle von Arbeiten, die sich bis in die Gegenwart mit diesem komplexen Krankheitsbild der CF befassen und die Entwicklung der molekularen Diagnostik entscheidend geprägt haben.

## 1.2 Klinik der CF

Die Cystische Fibrose ist eine besonders schwere Multisystemerkrankung, welche besonders die Epithelien des Respirationstrakts, des exokrinen Pankreas, des Magen-Darm-Trakts, des männlichen Genitaltrakts, des hepatobiliären Systems und der exokrinen Schweißdrüsen betrifft. Vor allem das Bronchialsystem neigt durch eine starke Zähigkeit und Verdickung des Schleimes zu Infektionen, die besonders die tieferen Atemwege betreffen und zu chronischen endobronchialen Infektionen fortschreiten, die im Endstadium zu extensiver Zerstörung der Atemwege (Zysten und Abszesse) und zu einer Lungenfibrose führen können. Der Schweregrad der pulmonalen Erkrankung ist meist auch die Ursache für die frühe Sterblichkeit. Neben diesen schweren Verläufen gibt es auch harmlosere Phänotypen infolge unterschiedlicher Mutationen. Etwa 85% der Patienten entwickeln eine Pankreasinsuffizienz und ein daraus bedingtes Malabsorptionssyndrom. Bei Neugeborenen mit CF tritt in etwa 5-10% ein Mekoniumileus auf und bei etwa 2-5% der Patienten existiert eine Beteiligung der Leber (Passarge, 2004). Mehr als 95% der Männer mit CF sind infertil aufgrund einer Azoospermie. Ursache ist das Fehlen, die Atrophie oder die Fibrosierung der Strukturen der Vasa deferentia (Tait et al., 2001). Es gibt auch Männer, die keinerlei pulmonale oder gastrointestinale Symptome haben, aber dennoch infertil aufgrund eines heterozygoten Vorliegens einer CF-Mutation sind. Die beidseitige Abwesenheit der Samenleiter bei diesen Patienten bezeichnet man auch als *congenital bilateral absence of the vas deferens* (CBAVD). Häufig findet sich ein 5T-Polymorphismus. Es handelt sich um eine Mutation mit variabler Penetranz, eine dem 3'-Ende von Intron 8 des *CFTR*-Gens nahe liegende Gruppe von 5 Thymidinen. Dieses 5T-Allel tritt mit etwa 5% Frequenz auf (Tait et al., 2001) und kann in Kombination mit einer in trans (d. h. auf dem anderen Chromosom) liegenden krankheitsverursachenden Mutation (z.B.  $\Delta F508$ ) eine CBAVD oder eine milde CF-Form hervorrufen. Trotz therapeutischer Fortschritte liegt die Lebenserwartung eines an CF erkrankten Patienten (Pankreasinsuffiziente Formen) bei etwa 20-30 Jahren.

## 1.3 Diagnostik der CF

### 1.3.1 Klinische Diagnostik der CF

Der Verdacht auf eine vorliegende CF ergibt sich meist mit dem Auftreten von klinischen Symptomen oder der Anamnese der Familie. Ein Mekoniumileus im Säuglingsalter oder

sogar intrauterin, rezidivierende Bronchitiden, Gedeihstörungen, rezidivierende Nasenpolypen, unklare Hepatopathie und männliche Infertilität sind die wichtigsten Symptome, die an eine CF denken lassen müssen. Sie lassen sich nochmals gesondert in Gruppen einteilen, zum Beispiel können sich die chronisch sinopulmonalen Erkrankungen durch chronischen Husten und Sputumproduktion, persistierende Keimbesiedlung durch CF-typische Keime (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*), durch Obstruktion der Atemwege (Giemen, Überblähung im Röntgenthorax), oder als Trommelschlegelfinger manifestieren. Die Gruppe der gastrointestinalen Störungen erstreckt sich vom Mekoniumileus über Verschluss syndrome des Darmes, Pankreasinsuffizienz, Leberfunktionsstörungen bis hin zur Zirrhose und den entsprechenden Folgen in Form von Wachstumsstörungen, mit Ödemen einhergehendem Proteinmangel und Vitaminmangel. Das Salzverlustsyndrom macht sich durch starkes Schwitzen bei Hitze mit starkem Salzverlust und/oder einer metabolischen Alkalose bemerkbar. Die männliche Infertilität stellt eine weitere Gruppe dar, die in der Adoleszenz als Symptom in Erscheinung tritt. Treten ein oder mehrere phänotypische Merkmale auf oder ist ein Geschwister an CF erkrankt, sollte weitergehende Diagnostik durchgeführt werden (Reinhardt et al., 2001).

### 1.3.2 Der Schweißtest

Der sogenannte Schweißtest galt wie unter 1.1 beschrieben lange Zeit als der einzige, sichere Test. Neben seiner Sicherheit ist er ein schmerzfreier und schnell durchzuführender Test, der auch von Säuglingen gut toleriert wird. Nach etwa 60min lässt sich der Chloridwert ablesen ( $\text{Cl}^- > 60\text{mmol/l}$  gilt als positiv). Dieser Test wird auch heute noch in standardisierter Form durchgeführt (Reinhardt et al., 2001).

### 1.3.3 Elektrophysiologische Diagnostik

Ebenfalls können zwei elektrophysiologische Untersuchungen, die nasale Potentialmessung (nPD) und die Messung des Kurzschlussstromes (ICM) bei einer Rektumbiopsie durchgeführt werden. Bei der nasalen Potentialdifferenzmessung werden eine Sonde im unteren Nasengang (z. B. Nabelvenenkatheter) und eine subkutan liegende Referenzelektrode platziert, die beide über ein hochohmiges Voltmeter verbunden sind. CF-Patienten haben gegenüber Gesunden eine negativere Spannungsdifferenz.

Seit den 90er Jahren wird die Messung von Parametern der Chloridsekretion in Rektumbiopsien (ICM) in der CF-Diagnostik angewendet. Eine einfach und schmerzfrei zu gewinnende rektale Saugbiopsie von 3-4mm Durchmesser wird in eine modifizierte Ussing-Kammer eingespannt, anschließend wird die Chloridsekretion durch Gabe von Carbachol stimuliert. Die unterschiedliche Stimulationsantwort ermöglicht eine Unterscheidung von Gesunden und CF-Patienten (Reinhardt et al., 2001).

#### 1.3.4 Genetische Diagnostik

Genetische Untersuchungen auf CF-Mutationen liefern mit entsprechenden Verfahren genaue und eindeutige Ergebnisse. Besonders für eine Krankheit wie die CF, deren klinischer Verlauf oft aufgrund der vielen möglichen Mutationen und Umwelteinflüsse sehr heterogen ist, tragen genetische Analysen zur Sicherung entscheidend bei. Dennoch können diese Methoden bei negativem Ergebnis keinen sicheren Ausschluss einer CF gewähren, da bei einer Fülle von über 1000 bekannten Mutationen entweder eine aufgrund ihrer Seltenheit nicht mitgetestete Mutation oder eine unbekannte Mutation vorliegen kann. Werden jedoch 2 krankmachende CF-Mutationen, eine auf jedem der beiden homologen Chromosomen 7 des Patienten gefunden, ist die Diagnose gesichert. Meist werden heutzutage in den Laboratorien kommerzielle Kits verwendet, welche die etwa 25 häufigsten Mutationen erfassen. Im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Giessen wurde zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit das Elucigene CF 29-Kit + 5T-Polymorphismus-Kit verwendet (getestete Mutationen siehe Kapitel 3.4). Die aus Patientenblut gewonnene DNA-Probe wird mittels Multiplex-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) in einem standardisierten Verfahren auf die entsprechenden Mutationen getestet und nach Auftragung auf ein Gel untersucht. Solche Kits stellen den „Diagnostischen Standard“ dar und sind relativ schnell und einfach durchzuführen. Eine weitere Möglichkeit für den Nachweis von Sequenzvarianten in mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmenten besteht in der Single-strand-conformation-polymorphism-Analyse (SSCP). Mit ihr können mehr als 70-80% aller Sequenzveränderungen, egal ob bekannt oder nicht bekannt, detektiert werden (Reinhardt et al., 2001). Eine Sequenzierung ist bei vermuteten, unbekanntem Mutationen die Methode der Wahl. Diese Möglichkeiten stehen jedoch nicht allen Laboren, die CF-Diagnostik betreiben, zur Verfügung.

## 1.4 Epidemiologie und Vererbung der Zystischen Fibrose

Die Zystische Fibrose ist eine monogene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung die am häufigsten in der kaukasischen Bevölkerung und viel seltener in anderen ethnischen Gruppen auftritt. Ursache sind Mutationen im *CFTR*-Gen, welches für ein Protein codiert, das den transmembranen Durchfluss von Chloridionen besonders in Epithelgeweben reguliert. Da es sich um eine genetisch bedingte Krankheit handelt, bestehen auch hier in Populationen verschiedener ethnischer Herkunft unterschiedliche Häufigkeiten im Auftreten von CF. Gegenüber nur 1 an CF erkrankten Kind von 100000 in der asiatischen Population und 1 von 17000 in der afrikanisch-amerikanischen Population, liegt die Häufigkeit der Inzidenz bei der weißen Bevölkerung Nordamerikas und Europas bei 1/2500 und 1/1600 (Reinhardt et al., 2001). Wie es für autosomal-rezessive Erbgänge typisch ist, sind Heterozygote (Carrier) klinisch gesund, tragen aber neben einem Normalallel auch ein mutiertes Allel. Dies trifft für 4-5% der kaukasischen Bevölkerung Nordeuropas und Nordamerikas zu. Wenn beide Partner für eine CF heterozygot sind, beträgt die Wahrscheinlichkeit, ein an CF erkranktes Kind zu bekommen, für jede Schwangerschaft 25%. Bei autosomal rezessiven Erkrankungen besteht für Geschwister eines Erkrankten eine Wahrscheinlichkeit von 2/3, heterozygoter Genträger zu sein.

## 1.5 Das die Zystische Fibrose verursachende Gen und sein Produkt

### 1.5.1 Identifizierung des *CFTR*-Gens

Das *CFTR*-Gen ist wie viele eukaryote Gene als DNA-Abschnitt organisiert, der aus kodierenden Abschnitten (Exone) und nichtkodierenden Abschnitten (Introne) besteht. Nach der Transkription werden die Introne aus dem Primärtranskript durch Spleißen entfernt, sodass die Boten-RNA (mRNA) als Vorlage für die Proteinsynthese steht.

Durch Kopplungsanalysen wurde der CF-Genlocus auf dem langen Arm des Chromosom 7 (Bande 7q31) lokalisiert (Tsui et al., 1985; Wainwright et al., 1985; White et al., 1985). Nach weiterer Feinkartierung des CF-Genlocus (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989) wurde die Kandidatengenregion auf einen DNA-Abschnitt von etwa 1500kb (Kilobasen) eingengt. Durch eine Kombination von Chromosomenwalking, Chromosomenjumping und Positionsklonierung wurde ein Abschnitt von etwa 250kb isoliert und die dort liegenden Kandidatengene auf Mutationen geprüft. Bei den untersuchten CF-Patienten wurde

in etwa 70% eine Deletion von 3 Basenpaaren entdeckt, die bei den gesunden Kontrollpersonen fehlte. Weitere Klarheit erbrachte die Sequenzierung der Basensequenz und die Festlegung der kodierenden Exone und nichtkodierenden Introne. Ein Zusammenhang mit dem Chloridionentransport in epithelialen Geweben wurde erkannt, doch man war sich nicht einig, ob das vom *CFTR*-Gen kodierte Protein als Chloridkanal oder als Regulator eines solchen Kanals funktioniert. Wegen diesen beiden Möglichkeiten, wurde für das Genprodukt der Name „*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*“ (CFTR) gewählt, der für beide Möglichkeiten zutrifft.

Das mit 250kb sehr große *CFTR*-Gen enthält 27 Exone, deren Größe von 38 bis 724bp (Basenpaaren) reicht (Zielenski und Tsui, 1995). Die meisten Exone liegen jedoch im Schnitt bei einer Größe von etwa 200bp. Das Gen codiert für eine 6.5kb große mRNA, die durch Northernblot vor allem in den von CF betroffenen Geweben (Lunge, Pankreas, Schweißdrüsen, Leber, Speicheldrüsen und Kolon) nachgewiesen werden kann. Anhand dieses Transkripts wird ein Protein von 1480 Aminosäuren gebildet. Durch alternatives Spleißen der mRNA werden gewebespezifisch unterschiedliche Genprodukte gebildet.

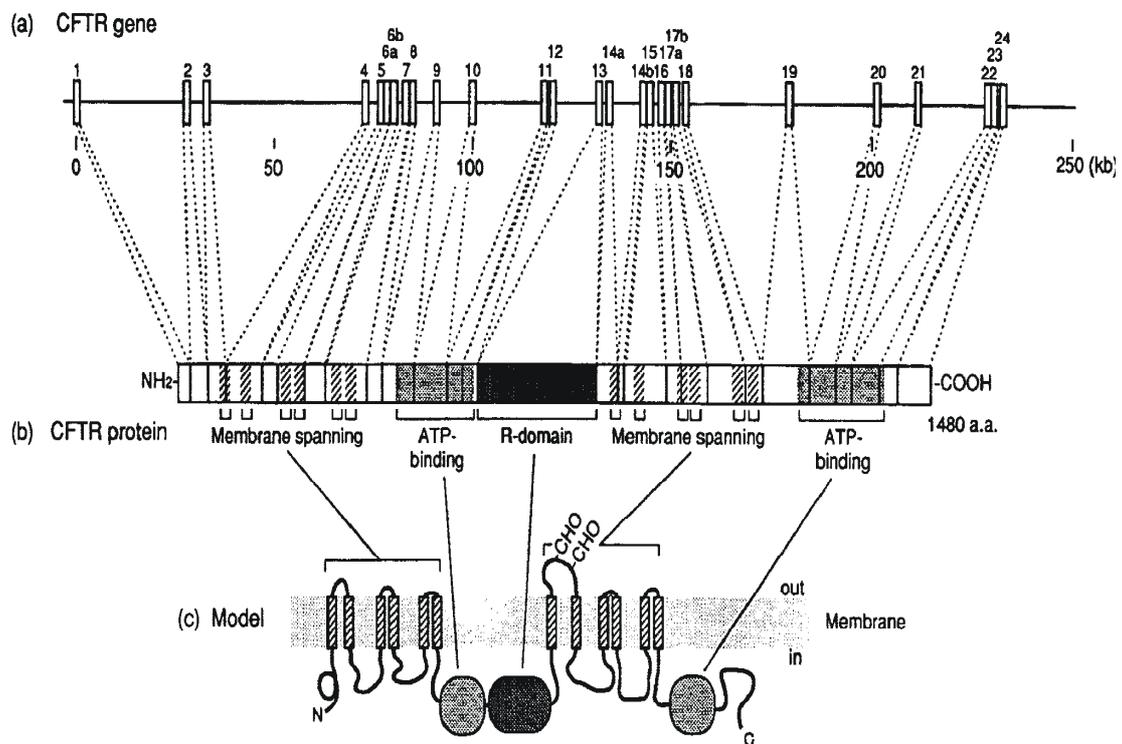


Abb. 1.1: Das *CFTR*-Gen (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* gene). Das schematische Diagramm zeigt in a) die Struktur des *CFTR*-Gens mit 27 Exons (dargestellt als offene Boxen, die Suffixe „a“ und „b“ sind historische Bezeichnungen), b) die abgeleiteten Polypeptide mit den verschiedenen hervorgehobenen Domänen, und c) das Model des CFTR-Proteins und seine angenommene Lage in der apikalen Membran einer sekretorisch epithelialen Zelle. CHO zeigt die Glykosylierung an. (nach Zielenski und Tsui, 1995)

### 1.5.2 Das Genprodukt des *CFTR*-Gens

Das 1480 Aminosäuren große, membrangebundene CFTR-Protein ist ein glykosyliertes Transmembranprotein und besitzt eine Reihe von strukturellen und funktionellen Domänen.

Das CFTR-Protein besteht aus zwei transmembranen Domänen (TMD) mit je sechs transmembranen, hydrophoben Schleifen (Loops). Die Loops I-VI bilden die transmembrane Domäne 1 (TMD1) und die Loops VII-XII bilden TMD2. Für TMD1 codieren die Exons 3-7 (Exons 3 (I), 4 (II), 6a (III,IV), 7 (V,VI)) und die Exons 14a-18 codieren für TMD2 (14a (VII), 15 (VIII), 17a (IX,X), 17b (XI), und 18 (XII) kodiert.

Die zwei nukleotidbindenden Regionen NBD1 und NBD2 (in Abb. 1.1 ATP-binding), die den Exons 9-12 und im Carboxy-Ende den Exons 19/20-23 entsprechen, binden ATP. Aufgrund dieser Primärstruktur zählt man das CFTR-Protein auch zur Superfamilie der ABC-Transporter (ATP-binding cassette). Andere Nomenklaturen bezeichnen diese Strukturen auch als Nukleotidbindungsfalten (NBFs). Die beiden transmembranen Domänen sind ähnlich aufgebaut, aber funktionell stellt nur NBD1 die Verbindung zur cAMP-regulierten (zyklisches Adenosinmonophosphat) Aktivität des Chloridionenkanals her.

Eine von den Exonen 12-14a codierte regulatorische Region (R-domain) stellt gegenüber den anderen Mitgliedern dieser Ionentransporterfamilie eine Besonderheit dar. Sie verbindet die beiden symmetrischen Teile des Proteins (TMD1, NBD1-TMD2, NBD2) und trägt zahlreiche geladene Seitenketten und Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase A und C. Befindet sich die R-Domäne in phosphoryliertem Zustand, öffnet sich der Kanal, sodass es zum Chloridionentransport kommen kann, fehlende Phosphorylierung führt zu einer Unterbrechung dieses Transports.

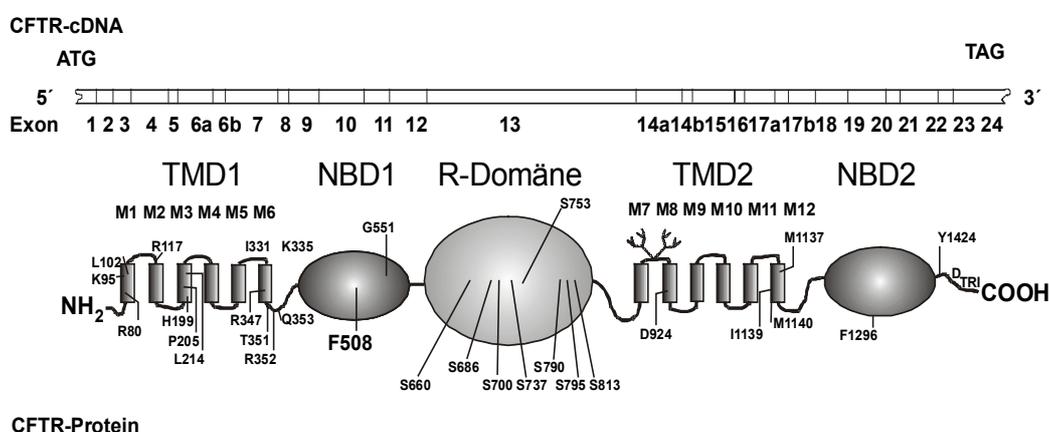


Abb. 1.2: Topologie von CFTR. Struktur mit 5 Untereinheiten: 2 transmembrane Domänen (TMD1, TMD2), mit 6 membrandurchdringenden Segmenten (TMD1: M1-M6; TMD2: M7-M12), denen je eine nukleotidbindende Domäne (NBD1, NBD2) folgt. Die häufigste Mukoviszidose hervorrufende Mutation führt zur Deletion der in NBD1 eingezeichneten Aminosäure F508 (nach Reinhardt et al., 2001).

N- und C-Terminus von CFTR, die beiden NBDs und die R-Domäne befinden sich auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite. Die beiden transmembranen Domänen bilden die Kanalporen durch die Membran. Die verbindenden Segmente der Abschnitte M1-M6 für TMD1, sowie M7-M12 für TMD2, liegen in abwechselnder Reihenfolge innerhalb und außerhalb des Zytoplasmas (siehe Abb. 1.2).

Der Chloridionenfluss erfolgt passiv entlang des Konzentrationsgradienten. Je nach Zell- und Epitheltyp ist CFTR an Chloridsekretion und –absorption beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen setzt die Aktivierung der CFTR-Kanäle ihre Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A sowie die zytoplasmatische Verfügbarkeit von hydrolysierbaren Nukleosidtriphosphaten voraus.

Der zellbiologische Basisdefekt der CF besteht in der fehlenden Aktivierbarkeit transmembraner Chloridströme durch cAMP aufgrund einer Mutation im für CFTR kodierenden Gen. Beispielsweise zeigen CFTR-Deletionsmutanten, denen eine NBD fehlt, keine fluoreszenzmikroskopisch nachweisbare Anionen-Leitfähigkeit (Rich et al., 1993). Neben seiner Eigenschaft als Chloridkanal beeinflusst CFTR die Aktivität anderer Chloridkanäle (z.B. ORRCs: *outwardly rectifying chloride channels*), die epitheliale Natriumabsorption, die Sekretion von  $\text{HCO}_3^-$  und den epithelialen Natriumtransport.

Durch alternatives Spleißen der vom CFTR-Gen transkribierten mRNA findet sich das Genprodukt in erster Linie in epithelialen Zellen. Hohe CFTR-Expression findet man besonders im Darmtrakt, im biliären Epithel, in der Lunge, den Pankreasgängen, im Speichel, den Schweißdrüsen sowie in der Niere und in den Geschlechtsorganen.

## 1.6 Mutationen des *CFTR*-Gens

Das *CFTR*-Gen ist wie bereits oben erwähnt mit einer Größe von 250kb ein sehr großes Gen. Die Zahl der mittlerweile bekannten Mutationen liegt bei über 1000 und sie sind über das ganze Gen verteilt. Der Bestand der bekannten Mutationen wird offiziell von dem „*Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium*“ archiviert und kann in aktualisierter Form im Internet abgefragt werden (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>).

Es sind im *CFTR*-Gen alle möglichen Formen von Punktmutationen, Minideletionen und Miniinsertionen zu finden. Auch einige wenige größere Deletionen, die sich über mehrere Exone erstrecken, kommen vor, diese sind jedoch meist für Familien spezifisch. Während sich das Mutationsspektrum auf 40% Missense-Mutationen, 18% Nonsense-Mutationen, 18% Splice-Site-Mutationen und 22% Frameshift-Mutationen verteilt, macht die Gruppe der

Promoter-Mutationen, Inframe-Deletionen und großen Deletionen, nur circa 2% aus (Reinhardt et al., 2001).

### 1.6.1 Mutationsklassen des *CFTR*-Gens

Die durch die Mutationen ausgelösten phänotypischen Störungen lassen sich in 6 Klassen einteilen. Diese sind in Abb. 1.3 tabellarisch dargestellt.

Klasse	Phänotyp	Beispiele
I	CFTR Proteinsynthese fehlt oder ist gestört	<i>CFTR</i> dele2,3(21kb), G542X, 3905insT
II	Intrazelluläre Reifung und Transport des CFTR-Proteins gestört	G480C, R1066C, N1303K
III	Regulation des CFTR-Ionenkanals defekt	G551D, S1255P
IV	Kanaleigenschaften verändert (Öffnungszeiten, Leitfähigkeit)	R117H, R334W, R347P
V	Verminderte Produktion an Wildtyp CFTR	3849+10kb C-T, 3272-26 A-G
VI	Verminderte Stabilität von CFTR (Halbwertszeit erniedrigt)	L1389X, 4279insA

Abb. 1.3: Klassifikation von CFTR-Mutationen nach molekularem Phänotyp (nach Haardt et al., 1998, Welsh et al., 1993 und Zielenski et al., 1995)

Zu Klasse I gehören große Deletionen, Leserasterverschiebungen und Stopmutationen, welche ein vorzeitiges Stopcodon erzeugen. Meistens wird die fehlerhafte mRNA bereits im Zellkern erkannt und abgebaut. Im Gewebe von CF-Patienten, die homozygot für die Deletion *CFTR*dele2,3(21kb), G542X oder R553X waren, konnte man kein CFTR-Protein nachweisen (Kälin et al., 1999). Somit kodieren diese also für ein Nullallel (Allel ohne Genexpression). Klasse-II-Mutationen werden intrazellulär nicht regelrecht prozessiert und transportiert. Funktionsmutationen beziehen sich auf 2 Klassen, wobei in Klasse III die Regulation und in Klasse IV die Kanaleigenschaften defekt sind. Bei Klasse-V-Mutationen wird zu wenig CFTR gebildet und bei Klasse VI wird das gebildete CFTR schneller abgebaut. Die häufigste Mutation  $\Delta F508$  besitzt je nach Gewebetyp Anteile aus den Klassen II, III, oder IV.

### 1.6.2 Die Mutation $\Delta F508$

Die mit etwa 65-70% der Patienten weltweit häufigste Mutation ist die  $\Delta F508$  (Passarge, 2004). In Deutschland tritt sie mit einer Häufigkeit von 71% auf (Reinhardt et al., 2001). Es

handelt sich um eine 3 Basenpaare umfassende „Inframe“-Deletion der ersten Nukleotidbindungsdomäne (NBD1) in Exon 10, was zu einem Verlust der Aminosäure Phenylalanin (F) an Position 508 führt. Sie hat phänotypisch schwere Auswirkungen. Wie unter 1.6.1 beschrieben, besitzt  $\Delta F508$  Klasse II-, III- und IV-Anomalien. Je nach Gewebe- und Zelltyp dominiert das Auftreten der einen oder anderen Störung. In Europa besteht eine von Südost nach Nordwest zunehmende Häufigkeit dieser Mutation (European Working Group on CF Genetics, 1990). Auf der Basis von DNA-Marker Haplotypanalysen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Verbreitung der  $\Delta F508$  während des Neolithikums mit der Migration früher Bauern aus dem mittleren Osten nach Nordwesteuropa zusammenhänge (Zielenski und Tsui, 1995).

### 1.6.3 Häufige Mutationen des *CFTR*-Gens und deren Verteilung

Neben der  $\Delta F508$ -Mutation treten die nächst häufigeren Mutationen im einstelligen Prozentbereich auf. Die Nonsense-Mutation G542X in Exon 11 tritt mit einer Frequenz von 2,4% am zweithäufigsten auf, am dritthäufigsten die Missense-Mutation G551D. Zu der Gruppe der Mutationen mit einer Frequenz über 1% sind noch die Missense-Mutation N1303K (1,3%) und die Nonsense-Mutation W1282X (1,2%) zu nennen (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). In Deutschland sind R553X (2%), G542X (1,4%), N1303K (1,3%), R347P (1,2%) und G551D (1,2%) recht häufig auftretende CF-Mutationen (Reinhardt et al., 2001). Auf weitere ethnische und geographische Unterschiede der einzelnen Mutationsfrequenzen soll hier nicht weiter eingegangen werden.

### 1.6.4 Die Mutation *CFTR*dele2,3(21kb)

Die Mutation *CFTR*dele2,3(21kb) ist eine große genomische Deletion des *CFTR*-Gens, die besonders oft in Mittel- und Osteuropa auftaucht. Die Deletion betrifft einen 21.080bp großen Abschnitt, der sich über die Introne 1-3 des *CFTR*-Gens erstreckt. Intron 1 ist zu 25%, Exon 2, Intron 2 und Exon 3 sind komplett und Intron 3 ist zu 45% deletiert. Die Mutation ist charakterisiert durch den Verlust der Exone 2 und 3 in der mRNA und ein durch Frameshift entstehendes Stopcodon (Codon 106) in Exon 4, welches zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führt. Wie zuvor beschrieben wurde, sind größere Deletionen eher selten und familienspezifisch. Die *CFTR*dele2,3(21kb) dagegen kommt wie auch weiter unten beschrieben für eine Deletion recht häufig vor. Der klinische Vergleich von homozygoten

Trägern der *CFTR*dele2,3(21kb), von compound heterozygoten Trägern von  $\Delta F508/CFTR$ dele2,3(21kb) und von homozygoten Trägern der  $\Delta F508$  konnten zeigen, dass die *CFTR*dele2,3(21kb) eine schwere Mutation darstellt, die im frühen Alter zu Symptomen führt und meist mit einer Pankreasinsuffizienz und schwerem Lungenleiden einhergeht. Während des 4. bis 6. Jahrhunderts nach Christus begannen während des Niederganges des römischen Reiches slawische Stämme aus den Gebieten des Baltikums, Polens und der Ukraine nach Mitteleuropa vorzudringen. Zu derselben Zeit zogen germanische Stämme, wie die Markomannen oder Langobarden nach Südeuropa. Neuere Daten zeigen eine besondere Häufung der *CFTR*dele2,3-Mutation in Tschechien (6,4% aller Chromosomen), Russland (5,2%), Weißrussland (3,3%), Österreich (2,6%), Deutschland (1,5%), Polen (1,5%), Slowenien (1,5%), Ukraine (1,2%) und Slowakei (1,1%). Desweiteren wurde sie in Litauen, Lettland, Mazedonien, Griechenland, sogar in Kanada, USA, Frankreich, Spanien, Türkei, und Großbritannien gefunden. In Bulgarien, Kroatien, Rumänien und Serbien wurde sie bisher nicht nachgewiesen (Dörk et al., 2000).

#### 1.6.5 Aufgabenstellung

Die CF-Mutation *CFTR*dele2,3(21kb) ist Gegenstand dieser Arbeit. Da die Mutation *CFTR*dele2,3(21kb) bisher nicht in ein kommerzielles Testkit aufgenommen wurde, könnte diese recht häufige Mutation in Screeningverfahren oft übersehen werden. Deshalb soll in dieser Arbeit ein Probenkollektiv von 1390 CF-Proben aus der bisherigen CF-Routinediagnostik des Institutes für Humangenetik des Universitätsklinikums Giessen retrospektiv mittels der von Dörk et al. entwickelten Duplex-PCR-Methode auf das Vorliegen dieser Mutation getestet werden.

Mittlerweile gehört das Institut für Humangenetik zum Universitätsklinikum Giessen und Marburg, Standort Giessen. Im folgenden Text wird noch die alte Institutsbezeichnung verwendet, da die Anfertigung dieser Arbeit vor der Zusammenlegung dieser beiden Standorte stattgefunden hat.

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte und Zubehör

Biometra UNO Thermoblock	Biometra, Göttingen
Bioprint System	Mitsubishi, Japan
Gelkammern: horizontal (groß)	von Keutz Laborgeräte, Reiskirchen
horizontal (klein) Horizon 58	Bethesda Research Laboratories
Heizblock: Techne Driblock DB3	Techne
Eiszubereiter: Icematic F100 compact	Icematic
Mikrotiterplatten: Thermowell C96	Costar
Netzgeräte: Biometra	Biometra, Göttingen
EC-103 und EC-105	E-C-Apparatus Corporation
Pipetten: P10, P1000	Eppendorf, Hamburg
P100	Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen: gelb, blau, weiß	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator Macro Vue UV-25	Hoefler
Vortex: RS1	IDL
Waage: Lab Style 5001	Mettler Toledo
Wasserbad	GFL
Wippschüttler Thermolyne Speci-Mix	Sybrom
Zentrifugen: Tischzentrifuge: Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau

### 2.2 Chemikalien

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Genagarose L.E.	Inno-Train
Mineral Oil	Sigma
Tris (Trishydroxymethylaminoethan)	USB, Braunschweig
Tris-HCl	USB, Braunschweig

### 2.3 Verwendete Kits

DNA Mini Kit QIAamp	Qiagen, Hilden
BACC2-Kit	Nucleon, Amersham

### 2.4 Enzyme und Nukleotide

Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Peqlab
DNA Grössenstandards: 50 bp ladder	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

### 2.5 Lösungen

Kernextraktionspuffer	10,95g Saccharose 0,5ml 1M MgCl <sub>2</sub> 1ml 1M Tris-HCl pH 8,0 1ml Triton X-100 Detergentium ad 100ml H <sub>2</sub> O dd steril filtrieren, im Kühlschrank lagern (4°C)
DNA-Extraktions-Puffer	5ml 1M Tris-HCl pH 7,6 0,2ml 0,5M EDTA 2ml 5M NaCl ad 100ml H <sub>2</sub> O dd steril filtrieren, im Kühlschrank lagern (4°C)
Ladepuffer (10x Probepuffer)	40% = 40g Sucrose 10ml 10x TBE 0,25% Bromphenolblau (BPB) = 0,25g 0,25% Xylene Cyanol (XC) = 0,25g ad 100ml H <sub>2</sub> O dd
10x PBS (phosphate buffered saline, Waschpuffer)	2,23g KCl 11,35g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

	2,04g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 81,8g $\text{NaCl}$ ad 1000ml $\text{H}_2\text{O}$ dd
1x PBS	100ml 10x PBS ad 1000ml $\text{H}_2\text{O}$ dd
10x PCR-Puffer (Hauspuffer)	100mM Tris-HCl pH 8,3 500mM KCl 15mM $\text{MgCl}_2$ 0,1% Gelatine
10x PCR-Puffer (Qiagen)	Laut Hersteller (Mengenangaben nicht angegeben): Tris-HCl pH 8,7(20°C) KCl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15mM $\text{MgCl}_2$
10x TBE (Tris-Borat-EDTA)	545g Tris-Base 278g Borsäure 200ml EDTA 0.5M, pH 8,2-8,4 ad 5000ml $\text{H}_2\text{O}$ dd
1x TBE	250 ml 10x TBE ad 2500ml $\text{H}_2\text{O}$ dd
100x TE (Tris-EDTA)	12,11g Tris-HCl 0,37g EDTA ad 100ml $\text{H}_2\text{O}$ dd

### 3. Methoden

#### 3.1 DNA-Extraktion

Es gibt mehrere Möglichkeiten die genomische DNA aus kernhaltigen Zellen des Menschen zu gewinnen. Die für diese Arbeit verwendeten Patienten-DNAs wurden aus EDTA-Blut über die Zeit mit unterschiedlichen Verfahren gewonnen. Die älteren DNA-Proben wurden nach dem recht aufwendigen Verfahren der Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen, bei den jüngeren Proben wurde ein Kit der Firma Qiagen standardmäßig verwendet.

##### 3.1.1 DNA-Extraktion durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Das Prinzip besteht darin, die genomische DNA aus kernhaltigen weißen Blutzellen mittels alkalischer Lyse zu gewinnen. In einem ersten Schritt der Kernextraktion wird eine Lösung verwendet, die das nichtionische Detergens Triton X-100 und Saccharose enthält. Dadurch wird das Auflösen der Zellmembran bewirkt, ohne jedoch den Zellkern zu lysieren. In einem zweiten Schritt folgt die Freisetzung der DNA durch Zerstörung der Kernmembran durch EDTA und SDS. Es wurden 5ml EDTA-Blut in ein 50ml Falcon Tube Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 1x PBS Waschpuffer auf insgesamt 40ml aufgefüllt und danach 15 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand bis auf 1cm über der die Leukozyten enthaltenden Interphase abpipettiert und verworfen.

Im nächsten Schritt wurden 10ml Kernextraktionspuffer in das Falcon Röhrchen gegeben und das Gemisch ca. 20 mal vorsichtig zum Durchmischen geschwenkt und dann erst einmal für 30 Minuten auf Eis gestellt, sodaß die Zellen in dieser Zeit anschwellen und zerplatzen konnten. Die nun aus den lysierten Zellen freigewordenen Zellkerne konnten nun in einer Zentrifugation von 20 Minuten Dauer bei 2200rpm pelletiert werden. Der Überstand wurde komplett verworfen.

Nun konnte man zur Lyse der Kernmembranen das Pellet in 1ml DNA-Extraktionspuffer lösen, in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß geben und dort 25µl SDS (20%) und 10µl Proteinase K (10 mg/ml) hinzugeben. Dieses Gemisch wurde dann entweder über Nacht bei 37°C im Heizblock oder für drei Stunden bei 50°C im Wasserbad inkubiert.

Die wässrige Lösung aus Proteinen und Nukleinsäuren musste nun noch von den Proteinen befreit werden.

Dazu wurde die Lösung halbiert und auf zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und mit je einem Volumenanteil Phenol gemischt, 30 Minuten auf den Wippschüttler gelegt und danach für 10 Minuten bei 11000rpm zentrifugiert. Danach befanden sich die Proteine mit dem Phenol in der unteren Phase und der Interphase, die DNA in der wässrigen oberen Phase. Dieser Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde dann nochmals ein Volumenanteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 50:49:1) hinzugegeben, für 30 Minuten auf den Wippschüttler gelegt und 10 Minuten bei 10000rpm zentrifugiert. Die danach entstandene, die DNA enthaltende Oberphase wurde nochmals in einem frischen Gefäß mit einem Volumenanteil Chloroform versetzt und erneut nach 20 Minuten auf dem Wippschüttler für 8 Minuten bei 10000rpm zentrifugiert werden.

Um nun aus der von Proteinen befreiten DNA-Lösung die DNA auszufällen gab man 1/20 Volumenanteil 8M LiCl hinzu, da einwertige Kationen eines Salzes den Nukleinsäuren die für ihre Wasserlöslichkeit benötigte Hydrathülle entziehen, und 2,5 Volumenanteile Ethanol absolut. Nach gründlichem Mischen wurde für 15 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet nochmals mit 70%igem Ethanol zur Entfernung der Salze gewaschen und anschließend für 5 Minuten bei 10000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur oder im Heizblock vorsichtig getrocknet und dann in 200-500µl 1x TE oder 10mM Tris-HCl oder H<sub>2</sub>O dd gelöst und im Kühlschrank gelagert.

### 3.1.2 DNA-Extraktion mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen

Dieses Verfahren, das nach Anleitung des Begleitheftes des Herstellers und mit den Gefäßen und Reagenzien des Kits durchgeführt wird, stellt eine einfachere und schnellere Alternative zu der oben genannten Methode dar, liefert jedoch geringere Mengen an DNA.

Zu Beginn wurden 20 µl Qiagen Protease (oder Proteinase K) in ein 1,5ml großes Mikrozentrifugenröhrchen gegeben. Dann wurden 200µl EDTA-Blut von den Patientenproben und 200µl Buffer AL (Lysepuffer) hinzugegeben und das Ganze ca. 15 Sekunden auf dem Vortex gut durchmischt. Nach 10 Minuten Inkubation im Wasserbad bei 56°C wurden 200µl Ethanol (96-100%) hinzugegeben und auf dem Vortex für 15 Sekunden durchmischt.

Danach wurde das Gemisch vorsichtig in einen Säulenfilter (QIAamp Spin Column), der in einem 2ml Auffangröhrchen steckte, gegeben und für 1 Minute bei 8000rpm zentrifugiert. Die DNA war nun an das Filtermaterial der Säule gebunden und diese wurde nun auf ein neues Auffangröhrchen gesetzt, während das alte mit dem Filtrat verworfen wurde.

Auf die Säule wurden nun 500 µl Buffer AW1 (Waschpuffer 1) gegeben und es wurde erneut für 1 Minute bei 8000rpm zentrifugiert. Die Säule wurde wieder in ein neues Auffangröhrchen gesetzt, um dann mit 500 µl Buffer AW2 (Waschpuffer 2) erneut zu waschen und für 3 Minuten bei 13000rpm zu zentrifugieren. Um noch kleine Reste des Puffers aus dem Filter zu lösen wurde dieser in einem neuen Röhrchen ohne Zugabe eines Puffers für 1 weitere Minute bei 13000rpm zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurden dann nach dem Umsetzen der Säule auf ein 1,5ml Mikrozentrifugenröhrchen 200µl des Elutionspuffers Buffer AE oder H<sub>2</sub>O dd hinzugegeben und dann nach 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur (15-25°C) für 1 Minute bei 8000rpm zentrifugiert. Die vorher am Filter gebundene DNA befand sich nun im Eluat. Nach dieser Methode wurden die DNA-Proben der letzten 3 Jahre extrahiert.

### 3.1.3 DNA-Extraktion mit dem BACC2-Kit von Nucleon, Amersham

Einige der älteren DNA-Proben wurden nach diesem System extrahiert. Die Zellen wurden durch einen Kernextraktionspuffer (Reagenz A) alkalisch lysiert und die Kernmembran wurde durch Reagenz B lysiert. Deproteiniert wurde mit Natriumperchlorat und im Anschluss daran wurde mit Chloroform und einem Nucleon-Resin die DNA extrahiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

## 3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, PCR) ist eine Technik, mit der man definierte Ziel-DNA-Sequenzen eines bestimmten Ausgangsmaterials in vitro schnell vervielfältigen kann (Strachan und Read, 1996). Dieses Ausgangsmaterial stellt in dieser Arbeit die aus den Patientenproben gewonnene genomische DNA der entsprechenden Patienten dar. Jedoch müssen die Sequenzen, welche die Ziel-Sequenz einrahmen, bekannt sein, da man diese Information zur Konstruktion mindestens zweier Oligonukleotidprimer (Starter-DNA) mit jeweils 15-30 Nukleotiden braucht. Diese Primer binden an solch einem komplementären Ende der entsprechenden Ziel-Sequenz und dienen als Startpunkte für die Synthese der zur Ziel-Sequenz komplementären Stränge in Gegenwart von hinzugegebenen Desoxynukleosidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und hitzestabiler Taq-DNA-Polymerase. Die PCR basiert auf zyklischer Temperaturveränderung, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht:

1. Denaturierung der DNA. Menschliche genomische DNA wird bei circa 93-95°C denaturiert (Strachan und Read, 1996), die doppelsträngige DNA wird also in zwei Einzelstränge getrennt.
2. Die sogenannten Amplimere, also die Primer, lagern sich bei Temperaturen zwischen 50-70°C an und hybridisieren mit der DNA (annealing).
3. DNA-Synthese (extension). Ausgehend von den hybridisierten Primern synthetisiert die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase aus den Desoxyribonukleosidtriphosphaten die zu den entsprechenden Ziel-DNA-Abschnitten komplementären neuen DNA-Abschnitte, die amplifiziert werden sollen. Die Synthese erfolgt bei etwa 70-75°C.

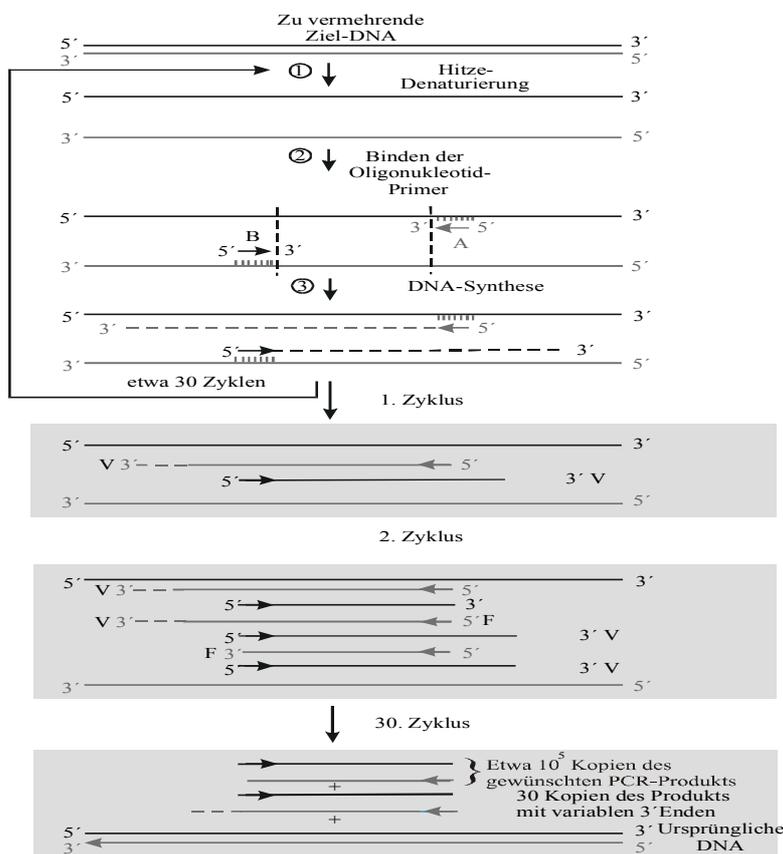


Abb. 3.1: Prinzip der Polymerasekettenreaktion (nach Strachan und Read, 1996)

Die dafür benötigte hitzestabile DNA-Polymerase stammt von Mikroorganismen wie zum Beispiel *Thermus aquaticus* (Taq), die in freier Natur in heißen Quellen ihren Lebensraum haben. Ihre optimale Arbeitstemperatur liegt bei 80°C und ihre Hitzebeständigkeit reicht bis 94°C.



10x PCR-Puffer	70µl
Nukleotidmix	140µl
Primer 2,3F (50 pmol/µl)	6µl
Primer 2,3R (50 pmol/µl)	6µl
Primer 3i-5F	6µl
Primer 3i-3R	6µl
Taq-DNA-Polymerase	7µl
H <sub>2</sub> O dd	ad 700µl

Es wurden also 2 Primerpaare verwendet, einmal um einen Teil des normalen Allels und einmal um die eventuell vorhandene CFTRdele2,3(21 kb) zu verfielfältigen, um beide später in der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, sodass man zwischen negativen, heterozygoten und homozygoten Testergebnissen unterscheiden konnte.

Die mutationsspezifischen Primer (nach Dörk et al., 2000) haben folgende Sequenz:

Primer CFTR 2,3F: 5'-GAGCTTCTGAAATTAATTGACCAC-3'

Primer CFTR 2,3R: 5'-GAACCCATCATAGGATAACAATG-3'

Sequenz der Kontrollprimer:

Primer CFTR 3i-5F 5'-CTTGGGTTAATCTCCTTGGA-3'

Primer CFTR 3i-3R 5'-ATTCACCAGATTTTCGTAGTC-3'

Die Primer flankieren die Bruchstücke der Deletion und führen zu einem Produkt von 207bp Größe. Die Sequenzen der Kontrollprimer 3i-5F und 3i-3R liefern ein 309bp großes Produkt, welches das CFTR-Exon 3 enthält (Dörk et al., 2000, nach Zielenski et al 1991).

Die oben genannten Substanzen wurden also auf eine Mikrotiterplatte pipettiert, die dann auf Eis gestellt wurde, damit die dann erst hinzugefügte Taq-DNA-Polymerase nicht zu früh aktiviert wurde und unspezifische Produkte lieferte. Nach Überschichtung mit Mineralöl wurden die Platten dann in den Thermocycler gestellt und das oben aufgeführte Programm aktiviert.

### 3.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten unterschiedlicher Größe. Es handelt sich um eine Art Siebeffekt (Strachan und Read, 1996). Die DNA wandert auf Grund der negativ geladenen Phosphatgruppen durch die Poren im Gel zu der positiven Elektrode des angelegten elektrischen Feldes hin. Kleinere Moleküle wandern schneller und weiter im Gel als größere. Für diese Arbeit wurden Gele aus Agarose verwendet und als Farbstoff Ethidiumbromid. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und fluoresziert unter Bestrahlung mit UV-Licht, sodass man die Banden auf dem Transilluminator erkennen und fotografieren kann.

#### 3.3.1 Durchführung

Die Gele wurden als 2% Agarosegele gegossen, meist von der Größe um 30 Proben aufzutrennen (20cm x 10cm). Für 150ml Gel wurden 3g Agarose in einem Glaskolben mit 150ml 1x TBE aufgefüllt und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nachdem etwa 15µl Ethidiumbromid hinzugegeben worden waren, wurde es in Form gegossen und bei Raumtemperatur abgekühlt. In feuchten Zellstoff und Folie gewickelt wurden sie im Kühlschrank bei etwa 4°C aufbewahrt.

Bevor die fertigen PCR-Proben, die je 20µl umfassten, aufgetragen werden konnten, wurde jeder Probe 5µl des Ladepuffers (10x Probepuffer) hinzugefügt. Dann wurde das Gel in die Gelkammer gesetzt, welche dann mit 1x TBE-Puffer soweit aufgefüllt wurde, dass das Gel gerade bedeckt war. Danach wurden je 15 µl der Proben und eine DNA-Leiter (50 bp ladder) aufgetragen.

### 3.4 Bisherige Standarddiagnostik

Die 1390 Patientenproben wurden über die Zeit mit unterschiedlichen Screening-Kits getestet, die alle nicht die CFTRdele2,3 erfasst haben. Vor April 1999 wurde noch im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Giessen mit dem INNO-LiPA CF-Kit (Zwijndrecht, Holland) getestet. Es erfasste folgende Mutationen:

- |         |             |          |         |
|---------|-------------|----------|---------|
| - ΔF508 | - N1303K    | - W1282X | - R553X |
| - G542X | - 1717-1G>A | - G551D  | - ΔI507 |

Ab April 1999 wurde das Elucigene CF 20-Kit + T-Polymorphismus-Kit der Firma Orchid Bio Sciences Europe (Oxon, UK) eingesetzt. Neben den bereits schon oben aufgeführten Mutationen wurden folgende mitgetestet:

- 3849+10kbC>T      - R1162X              - 2183AA>G              - R347P
- 621+1G>T              - R334W              - 3659delC              - S1251N
- R117H                      - A445E              - 1078delT              - E60X

Ab Juli 2002 wurde dann mit dem Elucigene CF 29-Kit + T-Polymorphismus-Kit derselben Firma das Spektrum der getesteten Mutationen um folgende erweitert:

- D1152H                      - 2184delA              - R506T                      - 2789+5G>A
- G85E                              - I148T                      - 3120+1G>A              - 1898+1G>A
- 711+1G>T

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Häufigkeit der Mutation *CFTR*dele2,3(21kb) in 1390 Proben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1390 DNA-Proben mittels PCR auf die Mutation *CFTR*dele2,3(21kb) getestet. Bei diese Proben handelt es sich um Anforderungen für eine Routine-CF-Diagnostik im Zeitraum von Juni 1994 bis Juni 2003 am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Giessen. Sie wurden in den entsprechenden Zeiträumen auf die in Kapitel 3.4 aufgeführten Mutationen getestet. Aufgabe dieser Arbeit war es, dieses Patientenkollektiv retrospektiv auf das Vorliegen der Mutation *CFTR*dele2,3(21kb) zu testen. Die Proben wurden blind, d. h. ohne Kenntnis der Vorbefunde getestet. Deshalb sind auch Proben darunter, die bereits homozygot oder compound heterozygot für andere Mutationen getestet wurden. Sie sind in den Ergebnissen mitaufgeführt. Die Proben sind nach dem Eingangsdatum chronologisch numeriert. Mit der Bearbeitung wurde mit den neuesten Proben begonnen. Einschließlich der Positiv-Probe mit der Nummer CF1183 wurden insgesamt sieben Personen als Träger dieser Mutation ermittelt. In vier Fällen wurde die Mutation heterozygot ohne weitere CF-Mutation nachgewiesen. In den restlichen drei Fällen fand sich eine compound heterozygote Situation mit einer anderen CF-Mutation. In der folgenden Statistik wird die *CFTR*dele2,3(21kb) mit den übrigen bei den Patienten bisher getesteten Mutationen aufgeführt.

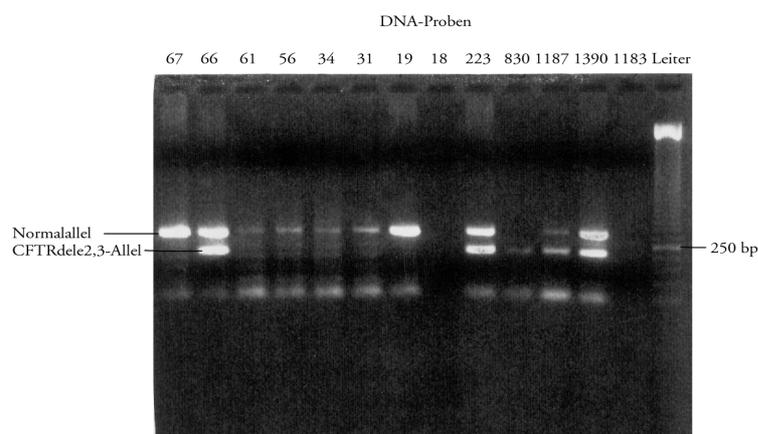


Abb. 4.1: Typisches Gel (1) einer Multiplex-Testung auf die Mutation *CFTR*dele2,3(21kb). Dargestellt sind alle positiv getesteten Proben. Bei diesen wird zusätzlich zur 309 bp großen Normalbande ein 207 bp Fragment nachgewiesen. Die Probe CF830 erschien in einer weiteren Testung deutlich positiv. Die ausgefallene Probe CF18 wurde in einer weiteren Nachtestung negativ getestet. Die Probe CF1183 ist in Abb. 4.2 als Positiv-Kontrolle aufgetragen. Die Banden des Größenstandards betragen Größenabstufungen von Fragmenten um 50 bp. Die dicke Bande entspricht 250 bp.

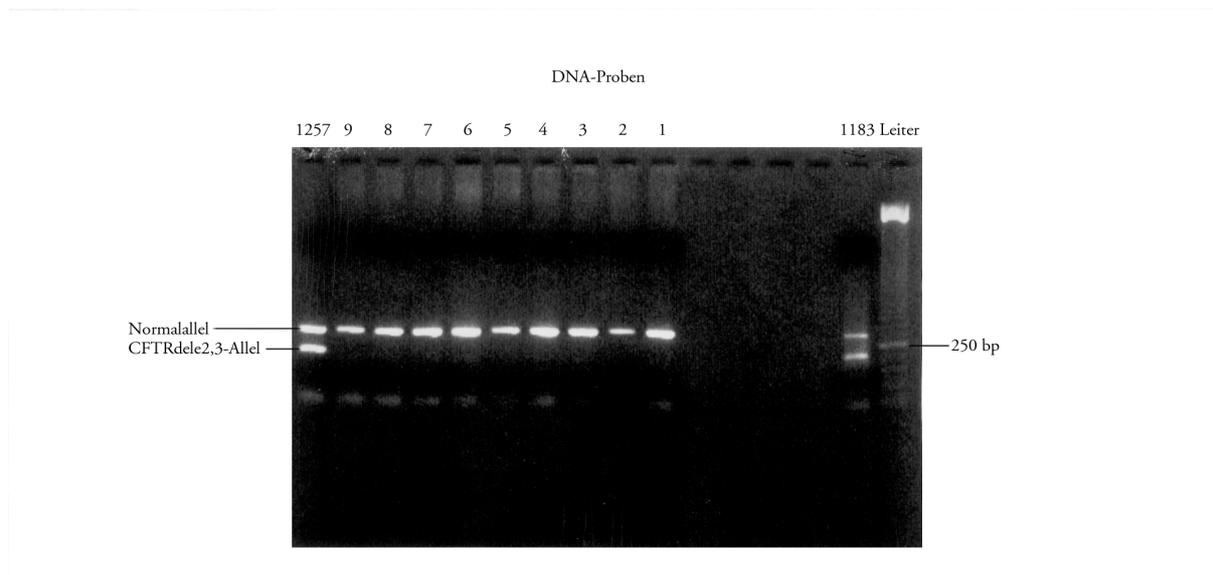


Abb. 4.2: Typisches Gel (2) einer Multiplex-Testung auf die Mutation *CFTRdele2,3*(21kb). Aufgetragen sind die Proben CF1 bis CF9, die positive Probe CF1257 und die Positiv-Kontrolle CF1183. Fragmentgrößen und Leiter entsprechen jenen aus Abb. 4.1.

#### 4.1.1 Heterozygote Häufigkeit der *CFTRdele2,3*(21kb) und der übrigen gefundenen Mutationen

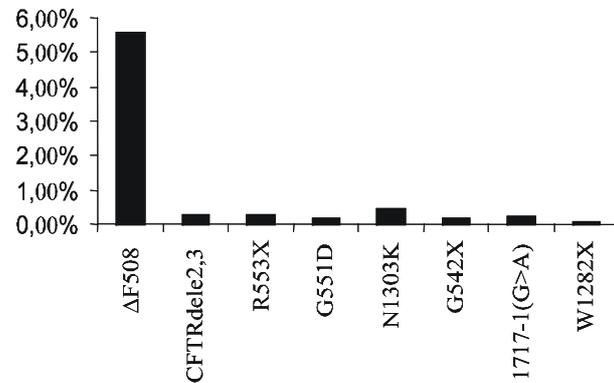
Auf die Gesamtzahl von 1390 getesteten Proben konnte das Auftreten der Mutation *CFTRdele2,3*(21kb) bezogen werden. Von den 1390 Proben wurden die Proben CF1 bis CF757 noch durch das INNO-LiPA CF-Kit getestet, welches die 8 Mutationen  $\Delta F508$ , R553X, G551D, N1303K, G542X, 1717-1G>A, W1282X und  $\Delta I507$  erfasst. Da die folgenden Test-Kits diese 8 Mutationen ebenfalls erfassen, konnten die nach der Probe CF757 gefundenen Mutationen ebenso auf 1390 Proben bezogen werden. In Abb. 4.3A/B sind die heterozygot nachgewiesenen Mutationen aufgeführt.

Ab April 1999 konnte durch den Einsatz des Elucigene CF 20-Kits und des T-Polymorphismus-Kits zusätzlich zu den o. g. 8 Mutationen auf die Mutationen R117H, 3849+10kbC>T, R334W, 621+1G>T, R1162X, A445E, 2183AA>G, 3659delC, 1078delT, R347P, S1251N und E60X getestet werden. Damit wurden insgesamt 454 Proben getestet, da aber auch diese Mutationen von dem darauffolgenden Kit erfasst werden, wurden die heterozygot nachgewiesenen Mutationen in Abb. 4.4A/B auf das gesamt verbleibende Patientenkollektiv von 633 Proben bezogen.

Seit Juli 2002 wird das Elucigene CF 29-Kit und das T-Polymorphismus-Kit in der CF-Diagnostik verwendet. Es erfasst zusätzlich die Mutationen I148T, D1152H, G85E, 711+1G>T, 2184delA, R506T, 3120+1G>A, 2789+5G>A und 1898+1G>A. Von diesen Mu-

tationen wurde, in dem verbleibenden Kollektiv von 179 Proben, eine in heterozygoter Form nachgewiesen und in Abb. 4.5A/B dargestellt.

Heterozygote Mutationen	absolut
$\Delta F508$	77
<i>CFTR</i> dele2,3	4
R553X	4
G551D	2
N1303K	6
G542X	2
1717-1(G>A)	3
W1282X	1



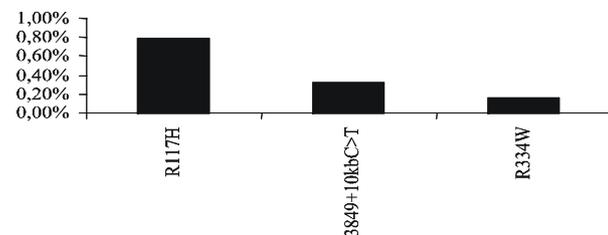
A

B

Abb. 4.3A: Tabellarische Darstellung der absoluten Häufigkeit der nachgewiesenen heterozygot vorliegenden CF-Mutationen in einem Patientenkollektiv von 1390 Proben

Abb. 4.3B: Graphische Darstellung der relativen Häufigkeit der nachgewiesenen heterozygot vorliegenden CF-Mutationen in einem Patientenkollektiv von 1390 Proben

Heterozygote Mutationen	absolut
R117H	5
3849+10kbC>T	2
R334W	1



A

B

Abb. 4.4A: Tabellarische Darstellung der absoluten Häufigkeit der nachgewiesenen heterozygot vorliegenden CF-Mutationen in einem Patientenkollektiv von 633 Proben

Abb. 4.4B: Graphische Darstellung der relativen Häufigkeit der nachgewiesenen heterozygot vorliegenden CF-Mutationen in einem Patientenkollektiv von 633 Proben

Heterozygote Mutationen	absolut
I148T	1



A

B

Abb. 4.5A: Tabellarische Darstellung der absoluten Häufigkeit der nachgewiesenen heterozygot vorliegenden CF-Mutation in einem Patientenkollektiv von 179 Proben

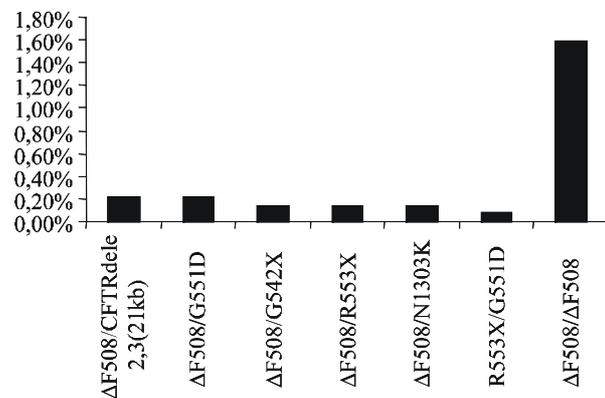
Abb. 4.5B: Graphische Darstellung der relativen Häufigkeit der nachgewiesenen heterozygot vorliegenden CF-Mutation in einem Patientenkollektiv von 179 Proben

#### 4.1.2 Genotyp von CF-Patienten unter besonderer Berücksichtigung der *CFTR*dele2,3(21kb)-Mutation

Wie unter 4.1.1 beschrieben wurden hier die nachgewiesenen Mutationen je auf die Anzahl der Proben bezogen, die über die Zeit mit den unterschiedlichen Testkits getestet wurden. Von denjenigen Mutationen, die man auf 1390 Proben beziehen konnte, sind die compound heterozygot beziehungsweise homozygot nachgewiesenen Mutationen aus den Vorbefunden und die Befunde unter Beteiligung der *CFTR*dele2,3(21kb) in Abb. 4.6A/B aufgeführt. Die nachgewiesenen Mutationen, die man auf 633 Proben beziehen konnte, sind in Abb. 4.7A/B aufgeführt.

Compound Heterozygot	absolut
$\Delta F508/CFTR\ dele2,3(21kb)$	3
$\Delta F508/G551D$	3
$\Delta F508/G542X$	2
$\Delta F508/R553X$	2
$\Delta F508/N1303K$	2
$R553X/G551D$	1
Homozygot	absolut
$\Delta F508/\Delta F508$	22

A



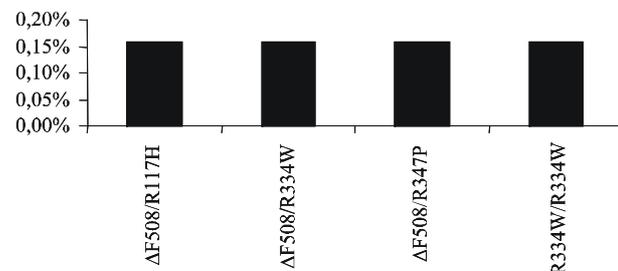
B

Abb. 4.6A: Tabellarische Darstellung der absoluten Häufigkeit der nachgewiesenen compound heterozygot und homozygot vorliegenden CF-Mutationen in einem Patientenkollektiv von 1390 Proben

Abb. 4.6B: Graphische Darstellung der relativen Häufigkeit der nachgewiesenen compound heterozygot und homozygot vorliegenden CF-Mutationen in einem Patientenkollektiv von 1390 Proben

Compound Heterozygot	absolut
$\Delta F508/R117H$	1
$\Delta F508/R334W$	1
$\Delta F508/R347P$	1
Homozygot	absolut
$R334W/R334W$	1

A



B

Abb. 4.7A: Tabellarische Darstellung der absoluten Häufigkeit der nachgewiesenen compound heterozygot und homozygot vorliegenden CF-Mutationen in einem Patientenkollektiv von 633 Proben

Abb. 4.7B: Graphische Darstellung der relativen Häufigkeit der nachgewiesenen compound heterozygot und homozygot vorliegenden CF-Mutationen in einem Patientenkollektiv von 633 Proben

Häufigster Genotyp für eine Cystische Fibrose war  $\Delta F508$  in homozygoter Form.

#### 4.1.3 Relative Häufigkeit der einzelnen Allele

Nach der Betrachtung, in welcher Form die einzelnen CF-Mutationen in diesem Patientenkollektiv anteilig vorlagen, werden in diesem Abschnitt die relativen Häufigkeiten der einzelnen Allele auf den Chromosomen aufgeführt. Für die Mutation *CFTR*dele2,3(21kb) wurden insgesamt 7 Allele nachgewiesen. Dies entspricht bezogen auf die getesteten Chromosomen einer prozentualen Frequenz von 0,25%. Die übrigen Allele werden in Abb. 4.8A/B/C aufgeführt.

Mutierte Allele	relativ
$\Delta F508$	4,89%
<i>CFTR</i> dele2,3	0,25%
R553X	0,25%
G551D	0,21%
N1303K	0,29%
G542X	0,14%
1717-1(G>A)	0,11%
W1282X	0,04%

A

Mutierte Allele	relativ
R117H	0,47%
3849+10kbC>T	0,16%
R347P	0,08%
R334W	0,32%

B

Mutiertes Allel	relativ
I148T	0,28%

C

Abb. 4.8A: Tabellarische Darstellung der relativen Häufigkeit der Allele der nachgewiesenen CF-Mutationen in einem Kollektiv von 2780 Chromosomen

Abb. 4.8B: Tabellarische Darstellung der relativen Häufigkeit der Allele der nachgewiesenen CF-Mutationen in einem Kollektiv von 1266 Chromosomen

Abb. 4.8C: Tabellarische Darstellung der relativen Häufigkeit eines Allels einer nachgewiesenen CF-Mutation in einem Kollektiv von 358 Chromosomen

Das Probenkollektiv kann man jedoch auch anders betrachten. Insgesamt 101 Proben wurden aufgrund eines klinischen Verdachts auf CF untersucht, 62 davon sind jedoch nicht positiv oder nur heterozygot getestet worden, da zur fraglichen Zeit unterschiedliche Kits verwendet worden sind (siehe 4.1.1), deren Erfassungsspektren für entsprechende Mutationen noch geringer waren. Diese CF-Patienten sind auch aufgrund der damit verbundenen Kosten und der klinisch gesicherten CF nicht mehr mit dem neuesten Kit nachgetestet worden. Nimmt man dann die Anzahl dieser klinisch bestätigten 101 Patienten (202 Chromosomen) als Bezugsgröße und setzt sie mit den 3 CF-Patienten, die Träger der *CFTR*dele2,3(21kb) sind ins

Verhältnis, so ergibt sich eine Frequenz dieser Mutation von 1,48%. In der Veröffentlichung von Dörk und Mitarbeitern von 2000 wird innerhalb der Deutschen Bevölkerung eine Frequenz von 1,5% der dort untersuchten CF-Patienten beschrieben.

## 4.2 Beschreibung der auf die Mutation *CFTR*dele2,3(21kb) positiv getesteten Fällen

### 4.2.1 Fall 1

Der Ratsuchende J. W., 1966 geboren, und dessen Frau T. W. kamen wegen Kinderwunschs zur genetischen Beratung und ließen sich auf das Vorliegen von CF-Mutationen testen, da die 1962 geborene Schwester von J. W. im Alter von 14 Jahren an Zystischer Fibrose erkrankte und mit 22 Jahren daran verstarb. Eine molekulare Diagnose war bei der Schwester nicht durchgeführt worden. Gleichzeitig wurden auch Proben der Mutter C. W. und des Vaters F. W. molekular getestet. In dieser Arbeit wurde bei C. W. mit der DNA-Nummer CF66 die Mutation *CFTR*dele2,3(21kb) in heterozygoter Form nachgewiesen.

Diese vier Proben gingen 1995 im Institut ein und wurden noch mit dem INNO-LIPA CF-Kit untersucht, welches wie bereits oben beschrieben, nur 8 Mutationen erfasst. Beim jetzigen Nachtesten ergab sich, dass J. W. heterozygoter Träger der Mutation R347P ist. T. W. trägt keine der getesteten Mutationen. Mittlerweile haben beide ein gesundes Kind, welches bisher noch nicht molekulargenetisch untersucht wurde. Über die Wahrscheinlichkeit von 50%, dass jedes ihrer Kinder heterozygoter Träger der Mutation R347P sein kann, wurde das ratsuchende Ehepaar unterrichtet. Aufgrund dieser oben genannten Informationen und einiger Aufzeichnungen der Patientenakte, ergab sich folgender Stammbaum:

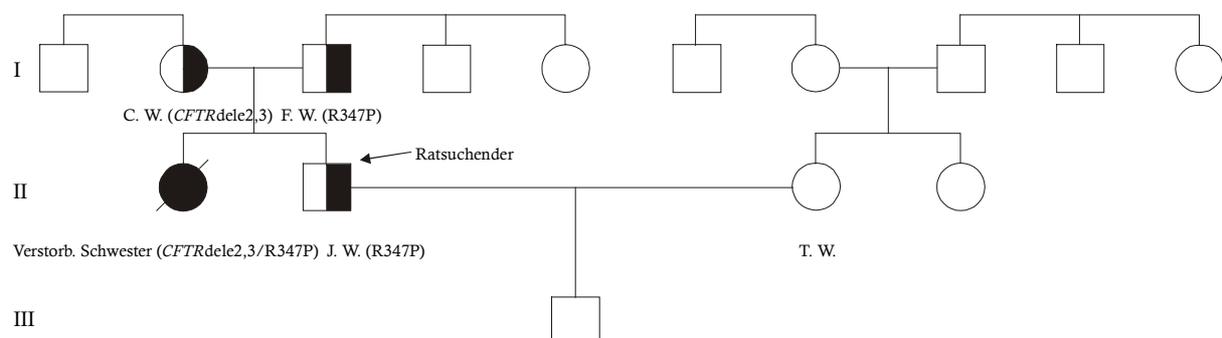


Abb. 4.9: Stammbaum von Familie 1. Symbolerklärung: Weißes Quadrat = Mann ohne Mutation; weißer Kreis = Frau ohne Mutation; halbschwarzes Quadrat = Mann mit heterozygot vorliegender Mutation; halbschwarzer Kreis = Frau mit heterozygot vorliegender Mutation; schwarzes Quadrat = Mann mit compound heterozygot oder homozygot vorliegender Mutation; schwarzer Kreis = Frau mit compound heterozygot oder homozygot vorliegender Mutation; schräg durchgestrichenes Symbol = verstorbene Person.

## 4.2.2 Fall 2

1997 kam der Ratsuchende D. O. mit seiner Frau D. O. zur genetischen Beratung, um eine CF-Diagnostik durchführen zu lassen, da dessen Neffe an Zystischer Fibrose erkrankt und verstorben war. Zusätzlich wurde die Mutter des Ratsuchenden E. O. untersucht. Bei der 1928 geborenen Frau mit der DNA-Nummer CF223 wurde durch diese Arbeit die Mutation *CFTR*dele2,3(21kb) in heterozygoter Form nachgewiesen. D. O. ist nicht Träger dieser Mutation und auch seine Frau wurde für keine der untersuchten Mutationen positiv getestet. Die Kinder seiner an einem Herzleiden verstorbenen Schwester können heterozygote Genträger der *CFTR*dele2,3(21kb) sein. Sie können aber auch Träger der paternal vererbten Mutation sein, jedoch lagen keine Proben des Vaters sowie des verstorbenen Neffen zur Testung vor. Der Ratsuchende wurde darauf hingewiesen, dass bei seinen gesunden Neffen bei bestehendem Kinderwunsch eine genetische Testung sinnvoll sei, vor allem unter Einbeziehung des Schwagers, dessen Mutation bisher unbekannt ist. Aus den vorhandenen Daten ergab sich folgender Stammbaum:

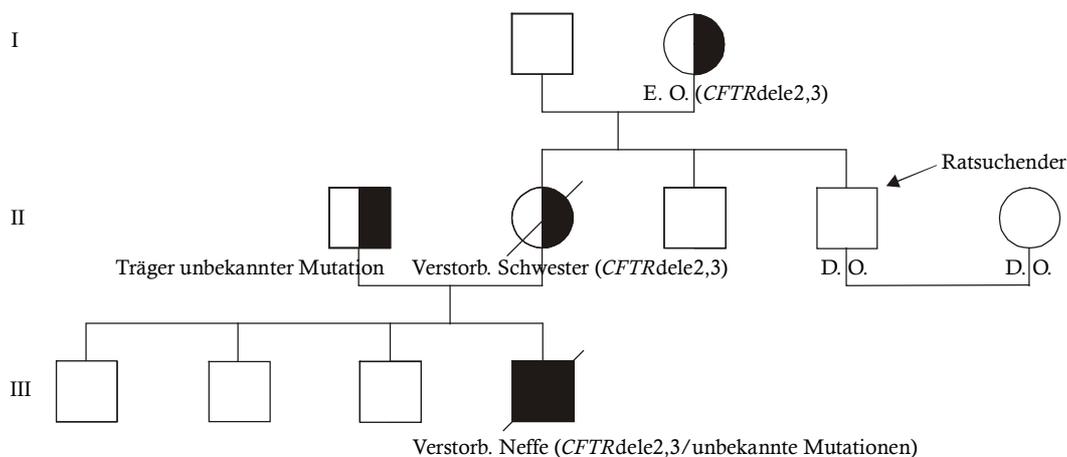


Abb. 4.10: Stammbaum von Familie 2. Die Bedeutung der Symbole entspricht jener aus Abb. 10.

## 4.2.3 Fall 3

S. H., geboren im Juni 1999, mit der Probennummer CF830 ist an einer klinisch gesicherten Zystischen Fibrose erkrankt. Im November 1999 wurde er positiv auf die Mutation  $\Delta F508$  getestet und 2003 wurde er im Rahmen dieser Doktorarbeit auf *CFTR*dele2,3(21kb) positiv getestet. Zu diesem Patienten sind auch einige klinische Daten bekannt. Die Schwangerschaft verlief normal und S. wurde per Kaiserschnitt entbunden. Der postpartale Stuhlgang erschien

normal und er wurde normal gestillt. Im postpartalen Screening wurde ein erhöhtes Immunreaktives Trypsin von 211 ng/ml (Norm: bis 80 in den ersten 2 bis 3 Lebenswochen) festgestellt. 5 Tage später war es auf 296 ng/ml angestiegen. Nach weiteren 6 Tage lag es bei 449 ng/ml. GOT und GPT lagen bei 22 beziehungsweise 16 U/l, die Lipase war mit 354 U/l erhöht, die Pankreas-Amylase war mit 2 U/l normal, die Elastase war im Stuhl mit unter 15 µg/g Stuhl erniedrigt. Die wiederholt erhöhten Werte des Immunreaktiven Trypsins gaben Anlaß zum Verdacht auf Zystische Fibrose, die Lipase-Erhöhung sei am ehesten Ausdruck einer sich manifestierenden Pankreasinsuffizienz, die bei niedriger Elastase klinische Relevanz entwickle. Ansonsten befand sich der Patient zur Zeit der Aufzeichnung der Unterlagen in einem guten Allgemeinzustand. Eine im Anschluß durchgeführte Iontophorese ergab einen Normalbefund. Danach wurde die o. g. genetische Untersuchung durchgeführt, die durch das Auffinden der *CFTR*dele2,3(21kb) vervollständigt wurde. Zur Erstellung eines Stammbaumes war leider zu wenig über die Familienanamnese bekannt. Proben der Eltern lagen nicht vor.

#### 4.2.4 Fall 4

D. P., geboren Juni 1984, ist klinisch an einer Zystischen Fibrose erkrankt. Er hat Bronchiektasien, die aufgrund rezidivierender Infektionen engmaschig kontrolliert und antibiotisch therapiert werden. Zusätzlich leidet er an einer exokrinen Pankreasinsuffizienz, welche sich zu einem insulinpflichtigen Diabetes mellitus ausgeweitet hat. Den Umständen entsprechend befindet sich der Patient zur Erstellungszeit dieser Arbeit in einem guten Allgemeinzustand. Seine DNA-Probe mit der Nummer CF1183 wurde während der Untersuchungen als Kontroll-DNA verwendet, da er als erster Patient im Institut auf die *CFTR*dele2,3(21kb)-Mutation positiv getestet wurde. Im Vorfeld wurde bereits das Vorliegen der Mutation  $\Delta F508$  festgestellt. 1991 wurde die gesamte Familie auf insgesamt 5 Mutationen getestet. Bei der Mutter E. P. lag  $\Delta F508$  heterozygot vor, sowie bei ihrer Tochter M. P.. Beim Vater wurde damals keine bekannte Mutation gefunden. Es ist also anzunehmen, dass er heterozygoter Träger der *CFTR*dele2,3(21kb) ist. Von dem Vater lag jedoch keine Probe zur weiteren Testung vor. Die Schwester des Vaters trägt keinerlei CF-Mutationen. Aus den Informationen ergab sich folgender Stammbaum:

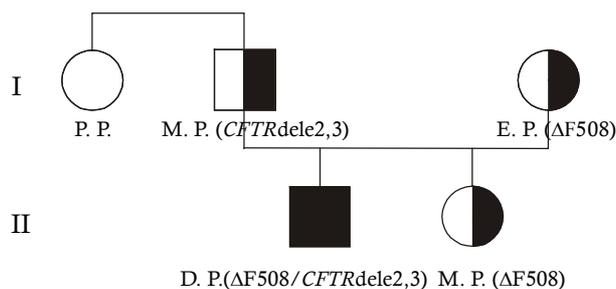


Abb. 4.11: Stammbaum von Familie 4. Die Bedeutung der Symbole entspricht jener aus Abb. 11.

#### 4.2.5 Fall 5

Der 1964 geborene C. K. kam 2002 zur genetischen Beratung wegen Kinderwunschs. Seine Probennummer lautet CF1187. Er und seine Frau M. K. wurden damals unter Verwendung eines 20 CF-Mutationen erfassenden Testkits negativ getestet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde C. K. als heterozygoter Träger der *CFTR*dele2,3(21kb) erkannt. Seine Frau trägt keine der untersuchten Mutationen. Über die Wahrscheinlichkeit von 50 %, dass ein mit einem gesunden Partner gezeugtes Kind heterozygoter Träger dieser Mutation werden kann, wurde der Ratsuchende unterrichtet.

#### 4.2.6 Fall 6

Der 1971 geborene A. S. mit der Probennummer CF1257 und wurde ebenfalls nachträglich als heterozygoter Träger der *CFTR*dele2,3(21kb) getestet. Er und seine Partnerin kamen 2002 zur genetischen Beratung, da der Bruder von A. S. an Zystischer Fibrose erkrankt war. Da die Partnerin C. H. keine bisher getestete Mutation aufweist, liegt auch hier das Risiko bei 50 %, dass ein Kind heterozygoter Mutationsträger ist. Aufgrund der unzureichenden Informationen über die restliche Familienanamnese konnte kein Stammbaum erstellt werden.

#### 4.2.7 Fall 7

Der Patient T. K. wurde 1976 geboren und trägt die Probennummer CF1390. Er ist klinisch an Zystischer Fibrose erkrankt. Klinisch leidet er einer chronischen, bronchopulmonalen Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus*, rezidivierender Polyposis nasi (mehrfach operativ versorgt), einer exokrinen Pankreasinsuffizienz und seit 1995 an einem insulinpflichtigen Diabetes mellitus. Bei ihm liegt eine compound

Heterozygotie für die Mutationen *CFTR*dele2,3(21kb) und  $\Delta$ F508 vor. Auch hier konnte aufgrund fehlender Informationen über die Familie kein Stammbaum erstellt werden.

## 5 Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der von Dörk und anderen im Jahr 2000 publizierten CF-Mutation *CFTRdele2,3(21kb)*, welche in homozygoter oder compound heterozygoter Form eine schwere Variante der CF hervorrufen kann. Die Mutation ist nicht familienspezifisch und tritt besonders häufig in Mittel- und Osteuropa auf. Diese große genomische Deletion betrifft einen 21.080bp großen Abschnitt des *CFTR*-Gens, der sich über die Introne 1-3 erstreckt (Dörk et al., 2000). Die Aufnahme einer solch großen Deletion in ein kommerzielles CF-Testkit ist bisher durch die Industrie nicht erfolgt. Gerade auch aus diesem Gesichtspunkt heraus bestand das Ziel dieser Arbeit darin, ein reguläres CF-Probenkollektiv zu testen und die Häufigkeit der *CFTRdele2,3(21kb)*-Mutation in diesem Kollektiv zu bestimmen. Das Proben-Kollektiv bestand aus 1390 DNA-Proben, welche in dem Zeitraum von Juni 1994 bis Juni 2003 als Anforderungen für eine Routine-CF-Diagnostik am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Giessen bearbeitet wurden. 101 Proben aus diesem Kollektiv stammen von klinisch bestätigten CF-Patienten, 591 von männlichen Personen aus Fertilitätsprogrammen und die restlichen Proben stammen von Rat suchenden Verwandten und Risikopersonen. Von den 101 klinisch bestätigten CF-Patienten konnte bisher bei 39 Patienten der Genotyp eindeutig bestimmt werden. Bei den verbleibenden 62 Patienten konnte nur eine oder keine Mutation nachgewiesen werden, da diese Patienten mit einem der älteren Kits getestet wurden, die nur ein begrenztes Mutationsspektrum erfassten. Eine andere Erklärung ist, dass bei diesen Patienten andere, bisher unbekannte Mutationen vorliegen. Nicht nachgewiesene Mutationen können auch darin begründet sein, dass ein nicht unerheblicher Teil der Proben von türkischstämmigen Personen stammt, die eine andere Häufigkeit in der Mutationsverteilung zeigen und auch für ihre ethnische Gruppe spezifische CF-Mutationen aufweisen. Die Patienten und Familien, die positiv auf *CFTRdele2,3(21kb)* getestet wurden und für diese Mutation heterozygot waren, wurden auch mit dem zum Zeitpunkt dieser Arbeit aktuell verwendeten Elucigene 29CF-Kit und T-Polymorphismus-Kit nachgetestet.

Die retrograde Testung der vorliegenden 1390 DNA-Proben ergab, dass in sieben Proben die Mutation *CFTRdele2,3(21kb)* nachgewiesen wurde. Von diesen sieben gefundenen *CFTRdele2,3*-Allelen lagen vier in heterozygoter Form vor. Unter den 101 CF-Patienten trat dieses Allel bei drei Patienten in einer compound heterozygoten Konstellation auf, jeweils immer in Kombination mit der  $\Delta F508$ -Mutation. Als häufige Mutationen, neben der weltweit

mit Abstand am häufigsten vorkommenden  $\Delta F508$ , bezeichnet man Mutationen, deren Frequenz 1% oder darüber hinaus betragen. Die *CFTR*dele2,3(21kb), die mit 7% in Weißrussland (Mosse et al., 2004) und 6,4% in Tschechien als zweithäufigste CF-Mutation vorkommt, kommt in Deutschland mit einer Frequenz von 1,5% unter den CF-Patienten vor (Dörk et al., 2000). Einige Untersuchungen stellten in unterschiedlichen deutschen Städten unterschiedliche Frequenzen für die *CFTR*dele2,3(21kb) fest. In Rostock beträgt diese 2,5%, in Freiburg 1,7%, in Hannover 1,5%, in Münster 1,5% in Magdeburg 0,9%, in Erlangen 0,5% und in Leipzig 0% (Dörk et al., 2000). Die unter den 101 CF-Patienten gefundenen drei *CFTR*dele2,3-Allele ergeben für das Probenkollektiv des Institutes für Humangenetik des Universitätsklinikums Giessen eine Frequenz von 1,48%. Vergleicht man diese Frequenz mit den oben genannten Daten von Dörk und Mitarbeitern, so lässt sich feststellen, dass sich die gefundene Frequenz in dem von Dörk und Mitarbeitern für Deutschland beschriebenen Bereich von 1,5% befindet. Weitere in Deutschland bei CF-Fällen häufig auftretende Mutationen sind R553X (2%), G542X (1,4%), N1303K (1,3%), R347P (1,2%) und G551D (1,2%) (Reinhardt et al., 2001). Auch in diesem Zusammenhang ist die *CFTR*dele2,3(21kb) als dritthäufigste CF-Mutation in Deutschland anzusehen, was auch durch das Ergebnis dieser Arbeit bestätigt werden konnte.

Die Häufigkeiten der anderen gefundenen Mutationen stammen aus der schriftlichen Dokumentation des Institutes. Sie sind im Ergebnisteil nach Verwendung des jeweiligen diese Mutationen enthaltenden Testkits geordnet. Unter den 101 getesteten Personen mit klinisch gesicherter CF sind auch einige dieser Mutationen compound heterozygot mit  $\Delta F508$  aufgetreten. Die Mutation R553X wurde bei zwei Patienten gefunden, was bezogen auf die Anzahl der CF-Chromosomen eine Frequenz von etwa 1% (0,99%) ergibt. G542X trat einmal auf und hat eine Frequenz von 0,5%. N1303K hat mit zwei Positiven ebenfalls 1% und G551D kommt mit drei Positiven auf 1,48% Frequenz. Diese getesteten Mutationen befinden sich alle im Testspektrum des acht Mutationen erfassenden INNO-LiPA CF-Kits. Zusätzlich wurden mit dem ab April 1999 eingesetzten Elucigene CF 20-Kit und T-Polymorphismus-Kit zwei weitere Mutationen unter den CF-Patienten detektiert. Deshalb können diese nur auf die in diese Zeit fallenden 72 CF-Patienten bezogen werden. Die einmal aufgetretene Mutation R347P hat eine Frequenz von 0,69%. R334W wurde dreimal detektiert und hat eine Frequenz von 2,08%, was sich jedoch auch damit erklärt, dass einer der Patienten homozygot für R334W ist. Die für Deutschland angegebene Frequenz auf CF-Fälle bezogen beträgt 0,06% (Reinhardt et al., 2001). Da jedoch ein Großteil der älteren Proben nicht auf diese Mutationen getestet wurden, kann man die gefunden Mutationen nur auf ein jeweils kleines Kollektiv

beziehen. Würde man das damals nur auf 8 Mutationen getestete Kollektiv von 757 Proben, beziehungsweise das auf 20 Mutationen getestete Kollektiv von 454 Proben erneut mit dem neuesten Kit testen, ist anzunehmen, dass sich die gefundenen Häufigkeiten eher in der Nähe der angenommenen Häufigkeiten befinden würden. Ein solches Vorgehen wäre jedoch sehr Zeit- und Kostenintensiv.

Diese also zum Kreise der in Deutschland häufigen Mutationen zu zählende *CFTR*dele2,3(21kb) führt in homozygotem beziehungsweise compound heterozygotem Zustand zu einer schweren klinischen Ausprägung der CF, die oft schon in sehr frühem Lebensalter klinisch diagnostizierbar wird und zu einer Pankreasinsuffizienz und einem schweren Lungenleiden führen kann. Dies trifft auch bei genauer Betrachtung auf die in dieser Arbeit gefundenen Fallbeispiele zu.

Der 1999 geborene S. H. (4.2.3.) ist compound heterozygot für die Mutation  $\Delta F508$  und *CFTR*dele2,3(21kb) und klinisch erkrankt. Die für diese Arbeit zur Verfügung stehenden klinischen Daten stammen aus der Zeit kurz nach seiner Geburt. Der Patient litt zu dieser Zeit nicht an einem Mekoniumileus, aber seine Laborwerte (IRT, GOT, GPT und Lipase) gaben Anlass, eine CF mit sich bereits entwickelnder Pankreasinsuffizienz anzunehmen.

Der 1984 geborene D. P. (4.2.4), dessen DNA-Probe in dieser Arbeit als Positivprobe verwendet wurde, hat eine schwere Form der CF entwickelt. Neben den bereits ektatisch veränderten Bronchien, in denen sich wiederkehrende Infekte festsetzen, leidet auch er an einer schweren Pankreasinsuffizienz, die sich schon zu einem insulinpflichtigen Diabetes mellitus ausgeweitet hat. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit befand der Patient sich aufgrund einer suffizienten Behandlung in einem verhältnismäßig guten gesundheitlichen Zustand.

Auch der 1976 geborene T. K. (4.2.7) ist chronisch bronchopulmonal von Keimen besiedelt und hat neben rezidivierenden Nasenpolypen eine schwere Pankreasinsuffizienz mit Ausweitung zu einem Diabetes mellitus vom Typ I. Auch dieser Patient befand sich zur Erstellungszeit in relativ guter Verfassung.

Aus den Fallbeispielen der heterozygot getesteten Personen ließen sich einige interessante Sachverhalte feststellen. So konnte anhand der Stammbaumdaten der Familie des Ratsuchenden J. W. (4.2.1) festgestellt werden, dass seine mit 14 Jahren an CF verstorbene Schwester den compound heterozygoten Genotyp *CFTR*dele2,3(21kb)/R347P gehabt haben muss. Die Missense-Mutation R347P hat eine weltweite Frequenz von 0,2% und soll in Kombination mit  $\Delta F508$  zu einem eher milderem Phänotyp führen, aber es sind auch Fälle

beschrieben, wo sie zu einem schweren Bild mit Pankreasinsuffizienz und früher Lungenbeteiligung führen kann (Varon et al., 1995). Über die Kombination mit *CFTR*dele2,3(21kb) liegen wenig Literaturdaten vor. Da die Schwester jedoch recht früh verstorben ist, muss es sich auch hier um eine schwere Form der CF gehandelt haben.

Ebenso verhält es sich mit dem an CF verstorbenen Neffen des Ratsuchenden D. O.. Nach Analyse der Stammbaumdaten musste er compound heterozygot für *CFTR*dele2,3(21kb) und eine weitere, bis heute unbekannt Mutation gewesen sein. Über sein Erkrankungsalter und die Ausprägung seiner Erkrankung lagen keine Unterlagen vor, jedoch ist auch hier ein schwerer Verlauf anzunehmen. Die zweite Mutation in dieser Familie konnte noch nicht identifiziert werden, da der Vater des betroffenen Kindes eine Testung ablehnte.

Mit 1,5% Häufigkeit in der deutschen Bevölkerung steht die *CFTR*dele2,3(21kb) unter den oben angegebenen häufigsten Mutationen nach  $\Delta$ F508 und R553X in Deutschland an dritter Stelle. Auch die hier vorliegende Arbeit konnte in dem Kollektiv der CF-Patienten mit einer Frequenz von 1,48% einen nahezu identischen Wert für die *CFTR*dele2,3(21kb)-Mutation demonstrieren. Betrachtet man das aus 1390 Proben bestehende Gesamtkollektiv, so wurden einschließlich der heterozygoten Träger 7 *CFTR*dele2,3(21kb)-Mutationen nachgewiesen. Dieses entspricht einer Frequenz von 0,25%. Auch im Vergleich mit den anderen gefundenen Mutationen bezogen auf das Gesamtkollektiv, tritt *CFTR*dele2,3(21kb) am dritthäufigsten auf. Aufgrund der Häufigkeit und der schweren von ihr hervorgerufenen Ausprägung der CF, erscheint eine Aufnahme der *CFTR*dele2,3(21kb)-Testung in die Routinediagnostik überaus sinnvoll. Das Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Giessen hat nicht zuletzt aufgrund dieser Arbeit die *CFTR*dele2,3(21kb) bereits in das Spektrum seiner CF-Routine-Diagnostik aufgenommen.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Zusammenfassung (Deutsch)

Diese Arbeit befasst sich mit der Testung der Häufigkeit der Mutation *CFTR*dele2,3(21kb), die in heterozygotem und compound heterozygotem Zustand eine schwere Form der Zystischen Fibrose (CF) hervorrufen kann und besonders oft in Mittel- und Osteuropa auftritt. Aber auch in Deutschland wird die *CFTR*dele2,3(21kb) unter den CF-Patienten mit einer Frequenz von 1,5% angenommen (Dörk et al., 2000). Die *CFTR*dele2,3(21kb) beschreibt eine große, nicht familienspezifische Deletion in dem für das CFTR-Protein codierenden Gen. Sie führt zum Verlust der Exone 2 und 3 in der mRNA und einem durch Frameshift entstehenden Stopcodon in Exon 4. Trotz der relativ hohen Frequenz ist die *CFTR*dele2,3(21kb) in keinem in Deutschland verwendeten kommerziellen Kit zur CF-Routinediagnostik vorhanden. In dieser Arbeit wurden deshalb 1390 DNA-Proben, die von Juni 1994 bis Juni 2003 dem Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Giessen zur Routinetestung zugesandt worden waren, auf die *CFTR*dele2,3(21kb) retrograd getestet. Dieses geschah mittels Duplex-PCR, die separat zu den käuflichen Routine-CF-Kits durchgeführt wurde.

Bei sieben voneinander unabhängigen Personen konnte die *CFTR*dele2,3(21kb) nachgewiesen werden. Davon sind vier Personen gesunde heterozygote Träger (Carrier) der *CFTR*dele2,3(21kb). Die anderen drei Patienten sind compound heterozygot für *CFTR*dele2,3(21kb) und  $\Delta F508$  und sind an einer schweren CF erkrankt. Von den 1390 DNA-Proben stammten 101 von an CF erkrankten Personen, 591 von männlichen Personen aus Fertilitätsprogrammen, der Rest von Ratsuchenden Verwandten und Risikopersonen. Bezieht man die drei auf die *CFTR*dele2,3(21kb) positiv getesteten CF-Patienten auf die 101 klinisch bestätigten CF-Patienten (202 Chromosomen), ergibt sich eine Frequenz von 1,48%. Dieses korreliert gut mit der von Dörk und Mitarbeitern für Deutschland beschriebenen Frequenz von 1,5%.

Durch die hier vorliegende Arbeit konnten einige CF-Fälle, bei denen eine der krankheitsverursachenden Mutationen nicht bekannt war, durch das Auftreten der *CFTR*dele2,3(21kb) geklärt werden. In zwei Fällen konnte anhand von Stammbaumdaten, die für das Versterben eines an CF erkrankten Verwandten verantwortlichen Mutationen ermittelt werden. In einem Fall konnte einem Ratsuchenden Verwandten eines an CF Verstorbenen klar nachgewiesen werden, dass er kein Träger der *CFTR*dele2,3(21kb) ist. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass man die *CFTR*dele2,3(21kb) zusätzlich in die Routinetestung aufnehmen sollte.

## 6.2 Synopsis (Englisch)

This doctoral thesis is about testing the frequency of the mutation *CFTR*dele2,3(21kb) in German patients, which can cause in a homocygous or compound heterocygous constellation a severe form of cystic fibrosis and is especially often found in Central and Eastern Europe. Also in German CF patients the frequency of *CFTR*dele2,3(21kb) is estimated at about 1,5% (Dörk et al., 2000). The *CFTR*dele2,3(21kb) describes a large, not family specific deletion in the *CFTR* gene, which results in a loss exons 2 and 3 in the *CFTR* mRNA that causes a frameshift and a premature termination signal within exon 4. Nevertheless presenting with this high frequency, the *CFTR*dele2,3(21kb) is not currently included in commercial kits used for routine CF testing in Germany. Therefore in this doctoral thesis 1390 DNA samples were tested retrospectively for *CFTR*dele2,3(21kb). The samples have been collected by the Institute for Human Genetics of the University Clinic of Giessen from about June 1994 till June 2003 for routine CF testing.

Seven unrelated persons were tested positive for *CFTR*dele2,3(21kb). Four of them are healthy heterozygous carriers of *CFTR*dele2,3(21kb). The other three patients are compound heterozygous for *CFTR*dele2,3(21kb) and  $\Delta$ F508 and have severe CF phenotype. The 1390 DNA samples include 101 CF affected patients, 591 male persons in fertility-programs the rest contents of persons at risk and relatives. If you relate the three CF patients, who are positive for *CFTR*dele2,3(21kb), to the group of 101 CF patients (202 Chromosomes), the three patients account for a frequency of 1,48%. This fits well with the 1,5% frequency of *CFTR*dele2,3(21kb) alleles in German CF patients estimated in German CF patients estimated by Dörk and coworkers.

Because of this doctoral thesis the question in some CF cases, where the second responsible mutation for clinical CF was not known, could be answered because of the appearance of *CFTR*dele2,3(21kb). Also two cases of deceased relatives and their responsible mutations could be made clear by studying their pedigrees. In one case a propositus of a because of CF deceased relative could be tested, that he is not a carrier of this mutation. Because of the results presented here and in addition with the data of Dörk and coworkers gives evidence, that *CFTR*dele2,3(21kb) screening should be included in routine CF testing.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
H <sub>2</sub> O dd	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBAVD	congenital bilateral absence of the vas deferens
cDNA	komplementäre DNA
CF	cystic fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
d. h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
Fa.	Firma
g	Gramm
GOT	Glutamatoxalacetattransaminase
GPT	Glutamatpyrovattransaminase
http	hyper text transfer protokoll
ICM	intestinal current measurements, Messung der Ionenströme am Kolonepithel
IRT	immunreaktives Trypsin
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Mol

mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmol	Millimol
mRNA	messenger RNA
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NBF	Nukleotidbindungsfalte
ng	Nanogramm
nPD	nasale Potentialdifferenz
o. g.	oben genannte
ORRC	outwardly rectifying chloride channels
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSCP	Single-strand-conformation-polymorphism-Analyse
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TMD	transmembrane Domäne
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
U	Unit
UV	ultraviolett
VT	Volumenteil
www	world wide web
XC	Xylene Cyanol

## 8 Literaturverzeichnis

di Sant'Agnesse PA, Darling RC, Perera GA, Shea E (1953) Sweat electrolyte disturbances associated with childhood pancreatic disease. *Am J Med* 15:777-784

Dörk T, Macek Jr M, Mekus F, Tümmler B, Tzountzouris J, Casals T, Krebsová A, Koudová M, Sakmaryová I, Macek Sr M, et al (2000) Characterisation of a novel 21-kb deletion, *CFTR*dele2,3(21kb), in the *CFTR* gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet* 106: 259-268

European Working Group on CF Genetics (1990) Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. *Hum Genet* 85:436-41

Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C (1936) Das Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibrose und Bronchiektasien. *Wien Med Wochenschr* 86:753-756

Gibson LE, Cooke RE (1959) A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibroses of the pancreas utilising pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23:545-546

Haard M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL (1998) C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis conductance regulator without impairing its biogenesis. *J Biol Chem* 274:21873-21877

Kälin N, Claaß A, Sommer M, Puchelle E, Tümmler B (1999) DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 103:1379-1389

Kerem BS, Rommans JM, Buchanam JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsu LC, (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245i:1073-1080

Moose K, Mosse N, Tsukerman G (2004) Molecular Diagnosis of Cystic Fibrosis in Belarus: Update. *European Journal of Human Genetics* 12: 225

Passerge E (2004) Taschenatlas der Genetik. Georg Thieme Verlag Stuttgart

Reinhardt D, Götz M, Kraemer R (2001) Cystische Fibrose, Handbuch für das CF-Team. Springer-Verlag Berlin; Heidelberg; New York

Rich DP, Gregory RJ, Cheng SH, Smith AE, Welsh MJ (1993) Effect of the deletion mutations on the function of CFTR chloride Channels. *Receptors Channels* 1:221-232

Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterisation of complementary DNA. *Science* 245:1066-1027

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-1065

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA, (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostabile DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-491

Strachan T, Read AP (1996) Molekulare Humangenetik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin; Oxford

Tait JF, Gibson RL, Marshall SG, Stern DL, Cheng E, Cutting G (2001) Cystic Fibrosis. *Gene Reviews*

Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Brahman JC, Knowlton RG, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N (1985) Cystic Fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 230:1054-1057

Varon R, Stuhmann M, Macek M Jr, Kufardjieva A, Angelicheva D, Magdorf K, Jordanova A, Savov A, Wahn U, Macek M (1995) Pancreatic insufficiency and pulmonary disease in

German and Slavic cystic fibrosis patients with the R347P mutation. *Hum Mutat* 6(3):219-25

Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Lae HJ, Farral M, Cooke HJ, Eiberg H, Williamson R (1985) Localisation of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature* 318:384-385

Welsh MJ, Smith AE (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73:1251-1254

White R, Woodward S, Leppert M, O'Connell P, Nakamura Y, Hoff M, Herbst J, Lalouel JM, Dean M, VandeWoude G (1985) A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature* 318:382-384

Zielenski J, Tsui L-C (1995) Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 29: 777-807

## **9 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Müller für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine wissenschaftliche Unterstützung und gute Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit und für die großzügigen Arbeitsbedingungen in seinem Labor.

Ein ganz herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Dagmar Nolte, deren Rat mir stets eine wertvolle Hilfe war, und Frau Petra Happel und Frau Christel Nohl für die hervorragende Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden, ihrem tatkräftigen Engagement und das freundliche und kollegiale Arbeitsklima.

Meiner Familie danke ich für ihre geduldige und großzügige Unterstützung, durch die sie mir meine Ausbildung ermöglicht hat und ihr stetes Interesse am Wachsen dieser Arbeit.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Dirk Stolz  
 Geburtsdatum/Ort: 02.09.1978 in Trier  
 Adresse: Seltersweg 5  
 35390 Giessen  
 Telefon: 0641/9718545, Mobil: 0151/15227351  
 Email: stolz.dirk@gmx.de  
 Familienstand: ledig  
 Nationalität: deutsch  
 Konfession: römisch katholisch  
 Eltern: Edith Stolz, Beruf: Kfm. Angestellte  
 Rudolf Stolz, Beruf: VBP und Steuerberater  
 Geschwister: Petra Stolz-Wagner, verheiratet,  
 Beruf: Diplom-Sozialpädagogin

### Schulbildung:

08/1985 - 05/1989 Grundschole in Trier-Heiligkreuz  
 08/1989 - 06/1998 Hindenburg-Gymnasium Trier mit Abschluss des Abiturs

### Zivildienst:

09/1998 - 09/1999 Zivildienst in der Mensa des Studentenwerks Trier

### Studium:

10/1999 - 04/2006 Student der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen  
 09/2001 Ärztliche Vorprüfung  
 08/2002 Erstes Staatsexamen  
 03/2005 Zweites Staatsexamen  
 04/2006 Drittes Staatsexamen  
 04/2005 - 08/2005 PJ am Ev. Krankenhaus Giessen, Abteilung Chirurgie, Leitung:  
 Prof. Dr. med. K.-H. Muhrer  
 08/2005 - 12/2005 PJ am Ev. Krankenhaus Giessen, Abteilung Innere Medizin,  
 Leitung: Dr. med. F.-F. Hodapp  
 12/2005 - 03/2006 PJ am Uniklinikum Giessen und Marburg, Orthopädische Klinik am  
 Standort Giessen, Leitung: Prof. Dr. med. H. Stürz

### Praktika:

03/2000 und 09/2000 Pflegepraktikum im Ev. Elisabeth-Krankenhaus in Trier

**Famulaturen:**

02/2002 - 03/2002

Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Trier, III. Med. Abteilung  
(Kardiologie und Pneumologie), Leitung:  
Dr. med. K.-E. Hauptmann und Dr. med. J. Vogt

09/2002 - 10/2002

Campus-Virchow-Klinikum der Charité Berlin, Klinik für Unfall-  
und Wiederherstellungschirurgie, Leitung:  
Prof. Dr. med. N. Haas

03/2003 - 04/2003

Kardiologische Praxis von Dr. med. G. Noeske in Giessen

09/2003 - 10/2003

Auslandsfamulatur im Indus Hospital in Shimla, Indien,  
Leitung: Balak R. Verma, MD

**Studentische  
Nebentätigkeiten:**

WS 2001/2002

Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie und Zellbiologie im  
Kursus der makroskopischen Anatomie

SS 2002

Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie und Zellbiologie im  
Kursus der Anatomie des ZNS

**Beschäftigung:**

Seit 07/2006

Assistenzarzt in der Chirurgischen Abteilung der Asklepios Klinik  
Lich, Leitung: Prof. Dr. med. P. Hild

**Promotion:**

11/2002 - 07/2004

Anfertigung der Dissertation am Universitätsklinikum Giessen und  
Marburg, Institut für Humangenetik am Standort Giessen  
Thema: Zur Häufigkeit der Mutation *CFTR*dele2,3(21kb) im Gen  
*CFTR* in einem deutschen Patientenkollektiv

05/2004

Posterpräsentation auf der „European Human Genetics Conference  
2004“ in München und als Abstract veröffentlicht:

Stolz D, Happel P, Nohl C, Müller U, Nolte D (2004)  
*CFTR*dele2,3(21kb) in German patients. European Journal of Human  
Genetics 12: 215

**Ehrenamtliche Tätigkeiten:**

Grundschulzeit

Messdiener in der Pfarrei St. Maternus in Trier während der  
gesamten Grundschulzeit

1992 - 1998

Jugendarbeit im Segelkreis der Ev. Kirchengemeinde Trier, von 1995  
bis 1998 als Betreuer auf Segelfreizeiten

**Sonstiges/Hobbys:**

Englisch seit 5. Klasse in Wort und Schrift, Medical English, gute  
EDV-Kenntnisse, Segeln, Karate