

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Allgemeine Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie)

**Der Einfluss der SNPs rs4077515 des *CARD9*-Gens und
rs3816527 des *PTX3*-Gens auf die Lungenerkrankung
der Zystischen Fibrose**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Schmidt, Sibylle

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Hartl
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Spitzer
Tag der Disputation: 18.03.2016

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Erkrankung Zystische Fibrose (CF)	1
1.1.1 Ätiologie.....	1
1.1.2 Symptome und Prognose	1
1.1.3 Das CFTR- Membranprotein	2
1.1.4 <i>CFTR</i> - Mutationen.....	3
1.1.5 Typische Lungeninfektionen bei CF	6
1.2 Genetischer Einfluss anderer Genpolymorphismen auf CF	7
1.3 Caspase Recruitment Domain Family Member 9 (CARD9)	9
1.4 Pentraxin 3 (PTX3).....	12
1.5 Ziele der Arbeit.....	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Probenmaterial und Patientencharakteristika	15
2.1.2 Geräte	19
2.1.3 Verbrauchsmaterial	20
2.1.4 Kits	20
2.1.5 Reagenzien	20
2.1.6 Restriktionsenzyme	21
2.1.7 Primer.....	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Extraktion der DNA.....	22
2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA.....	23
2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	23
2.2.4 Restriktionsenzymverdau und Agarosegelelektrophorese.....	24
2.2.5 Statistische Auswertung	26

3. Ergebnisse.....	27
3.1 Genotypverteilung des SNPs rs4077515 des <i>CARD9</i> Gens.....	27
3.2 Genotypverteilung des SNPs rs3816527 des <i>PTX3</i> Gens.....	28
3.3 Befallstatus der Lungenerreger des Kollektivs	29
3.4 Zusammenhang zwischen <i>CARD9</i> S12N (rs4077515) und dem Status des Erregerbefalles	32
3.5 Zusammenhang zwischen <i>CARD9</i> S12N (rs4077515) und der Lungenfunktion.....	38
3.6 Zusammenhang zwischen <i>PTX3</i> D48A (rs3816527) und dem Status des Erregerbefalls	41
3.7 Zusammenhang zwischen <i>PTX3</i> D48A (rs3816527) und der Lungenfunktion.....	45
4. Diskussion	47
4.1 Häufigkeiten der Genotypen.....	48
4.2 Befallstatus der Lungenerreger	48
4.3 rs4077515 des <i>CARD9</i> -Gens.....	49
4.4 rs3816527 des <i>PTX3</i> -Gens.....	51
4.5 Kritische Betrachtung der Heterogenität der Patienten	54
4.6 Ausblick.....	55
5. Zusammenfassung	57
6. Literaturverzeichnis.....	59
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	65
8. Danksagung.....	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die <i>CFTR</i> -Mutationen des Kollektivs	18
Tabelle 2: Geräteliste	19
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialliste	20
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Kits	20
Tabelle 5: Reagenzienliste	20
Tabelle 6: Liste der eingesetzten Restriktionsenzyme	21
Tabelle 7: Primerliste.....	21
Tabelle 8: PCR- Reaktionsgemisch bei CARD9 S12N und bei PTX3 D48A ..	23
Tabelle 9: PCR- Bedingungen bei CARD9 S12N	23
Tabelle 10: PCR- Bedingungen bei PTX3 D48A	24
Tabelle 11: Zusammensetzung des Restriktionsenzymverdaus bei CARD9 S12N.....	24
Tabelle 12: Zusammensetzung des Restriktionsenzymverdaus bei PTX3 D48A.....	25
Tabelle 13: CARD9 S12N (rs4077515) Allel-Häufigkeiten	28
Tabelle 14: PTX3 D48A (rs3816527) Allel-Häufigkeiten.....	29
Tabelle 15: Befallstatus der erhobenen bakteriellen Erreger der CF-Patientenlungen des Kollektivs.....	30
Tabelle 16: Befallstatus der erhobenen Pilze und Hefen der CF-Patientenlungen des Kollektivs.....	31
Tabelle 17: Befallstatus <i>P. aeruginosa</i> - CARD9 S12N rs4077515	33
Tabelle 18: Befallstatus <i>Aspergillus fumigatus</i> - CARD9 S12N rs4077515	34
Tabelle 19: Befallstatus <i>Candida albicans</i> - CARD9 S12N rs4077515.....	35
Tabelle 20: Stärke der Befallsrate durch <i>Candida albicans</i> bei CARD9 S12N rs4077515.....	37

Tabelle 21: ANOVA; FEV _{1(mean)} - CARD9 S12N rs4077515.....	39
Tabelle 22: Kruskal-Wallis Test; FEV _{1(mean)} - CARD9 S12N rs4077515.....	39
Tabelle 23: ANOVA; Slope- CARD9 S12N rs4077515.....	40
Tabelle 24: Kruskal-Wallis Test; Slope- CARD9 S12N (rs4077515)	40
Tabelle 25: Befallstatus <i>P. aeruginosa</i> - PTX3 D48A rs3816527	42
Tabelle 26: Befallstatus <i>Aspergillus fumigatus</i> - PTX3 D48A rs3816527	43
Tabelle 27: Befallstatus <i>Candida albicans</i> - PTX3 D48A rs3816527	44
Tabelle 28: ANOVA; FEV _{1(mean)} - PTX3 D48A rs3816527	45
Tabelle 29: Kruskal-Wallis Test; FEV _{1(mean)} - PTX3 D48A rs3816527	46
Tabelle 30: ANOVA; Slope - PTX3 D48A rs3816527	46
Tabelle 31: Kruskal-Wallis Test; Slope- PTX3 D48A rs3816527	46

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung vom <i>CFTR</i> -Gen zum <i>CFTR</i> -Membranprotein	3
Abbildung 2: Mutationstypen des <i>CFTR</i> - Membranproteins in Epithelzellen	5
Abbildung 3: Hauptbeschwerden der Zystischen Fibrose und relative Beteiligung modifizierender Gene bei Variationen der Krankheitsausprägung	8
Abbildung 4: Verbindung über <i>CARD9</i> von Dectin-1 mit dem NF- κ B-Pfad	10
Abbildung 5: Alter im Untersuchungsjahr der insgesamt 528 Patienten	16
Abbildung 6: Schwere der Lungenerkrankung nach Schluchter	17
Abbildung 7: Beispielhaftes Gelelektrophorese- Bild, <i>CARD9</i> S12N (rs4077515), Patientenproben Nr. 29-40 aus Graz	26
Abbildung 8: Gelelektrophorese Bild <i>CARD9</i> S12N (rs4077515), Patientenproben Nr. 29-40 aus Graz	27
Abbildung 9: Gelelektrophorese Bild des SNPs rs3816527 des Proteins <i>PTX3</i> D48A, Patientenproben Nr.1-41 aus Tübingen	28

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	engl., ATP Binding Cassette
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ANOVA	engl., analysis of variance (Varianzanalyse)
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-10	engl., B-cell lymphoma 10
bp	engl., base pair (Basenpaare)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CARD9	Caspase Recruitment Domain Family Member 9
CF	engl., Cystic Fibrosis (Zystische Fibrose)
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CRP	C-reaktive Protease
DNA	engl., Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
delF508	Verlust von Phenylalanin durch eine 3-Basenpaardeletion im Codon 508 des <i>CFTR</i> -Gens
FEV ₁	forcierte Einsekundenkapazität
FEV _{1(mean)}	mittlere forcierte Einsekundenkapazität
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kb	Kilo Basen
kDa	Kilo Dalton

LPS	Lipopolysaccharid
MALT1	engl., Mucosa-associated lymphoid tissue 1
MBL2	Mannose-Binding-Lektin 2
NBF1/2	engl., Nukleotid Binding Folds 1/2
NF- κ B	engl., nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMPS	engl., pathogen-associated molecular patterns
PCR	engl., Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PRR	engl., Pattern Recognition Receptor
PTX3	Pentraxin 3
RNS	engl., Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SAP	Serum amyloid P-Komponente
spp.	Spezies
TBE	TRIS- Borat- EDTA- Puffer
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNG14	Tumor-Nekrose-Faktor- Stimuliertes-Gen-14

Allele: A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin, T=Thymin

1. Einleitung

1.1 Die Erkrankung Zystische Fibrose (CF)

1.1.1 Ätiologie

Die Zystische Fibrose (CF) ist eine genetisch bedingte Stoffwechselstörung, die viele Organe betrifft. Die ursächliche Störung verursacht der defekte Chloridkanal Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). Er ist in der Epithelzellmembran vieler exokriner Drüsen für die Bildung von Schleim verantwortlich. Umgangssprachlich wird die Erkrankung deshalb auch Mukoviszidose (mucus lat.= Schleim, viscidus lat.= zäh, klebrig) genannt (Herold, 2013, Ciofu et al., 2013).

Mit einer Prävalenz von 1:2.500 Geburten gehört sie zu den häufigsten angeborenen Stoffwechselkrankheiten der hellhäutigen Bevölkerung Europas und der USA (Herold, 2013, Ciofu et al., 2013). In Deutschland leiden derzeit etwa 8000 Menschen an CF (Sens and Stern, 2012).

Die Krankheit wird autosomal-rezessiv vererbt. Die Häufigkeit der heterozygoten Merkmalsträger beträgt in Deutschland etwa 4% der Bevölkerung. Die verschiedenen *CFTR*- Mutationen (siehe *Kapitel 1.1.4*) und modifizierenden Gene (siehe *Kapitel 1.2*) haben einen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität, so dass eine große Varianz innerhalb des Krankheitsbildes Zystische Fibrose vorhanden ist (Herold, 2013). Heterozygote erkranken nicht oder haben einen mildereren Verlauf mit spätem Krankheitsbeginn (Pschyrembel, 2012).

1.1.2 Symptome und Prognose

CF ist eine Erkrankung der sekretorischen Organe wie Lunge, Pankreas, Dünndarm, Gallenwege, Reproduktionstrakt und der Haut. Durch den vom defekten Chloridkanal bedingten zähen Schleim kommt es zu Obstruktionen, Entzündungsprozessen, Infektionen, Zellumbau in Bindegewebe und dem daraus resultierenden Funktionsverlust der Organe. Charakteristisch ist eine Malabsorption von Fetten und Proteinen aufgrund einer exokrinen Pankreasinsuffi-

zienz, Fibrose bedingter Diabetes mellitus Typ II, Mekoniumileus, Steatorrhoe, Gedeihstörungen, Cholestase und Gallensteine, hohe Elektrolytkonzentrationen im Schweiß, bei Frauen eine verminderte Fertilität und bei Männern Infertilität aufgrund eines bilateralen Vas deferens- Verschlusses. Sowohl chronische als auch akute Atemwegsinfektionen dominieren das Krankheitsbild und sind mit 90% die häufigsten Todesursachen (Herold, 2013, Ciofu, 2013, Pschyrembel, 2012, Davis, 2006).

Die mittlere Lebenserwartung ist seit der Erstbeschreibung 1938 von wenigen Monaten bis nun zu ca. 32 Jahren gestiegen (Sens and Stern, 2012, Aitken, 1995). Sie ist abhängig von einer frühen Diagnostik und Behandlung. Die Therapie beruht bislang auf symptomatischen Behandlungen. Über eine somatische Gentherapie wird derzeit noch geforscht (Herold, 2013, Nährlich and Zimmer, 2013, Aitken, 1995).

1.1.3 Das CFTR- Membranprotein

Das *CFTR*- Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 7 Position q31.2. Es besteht aus etwa 250 kb und 27 Exons, die 1480 Aminosäuren kodieren (Riordan et al., 1989, Zielenski et al., 1991, Yang et al., 2015). Aus der Aminosäurekette formt sich ein Glykoprotein mit zwei symmetrischen Seiten, welche in der Mitte durch eine regulatorische Domäne (R-Domäne) miteinander verbunden sind. Jede Hälfte besteht aus einer im Zytoplasma befindlichen Nukleotidbindestelle (NBF1, NBF2= Nukleotid Binding Folds), welche ATP binden kann und sechs transmembranäre Helices, die gemeinsam den Chloridionenkanal bilden. Dieses CFTR-Glykoprotein gehört in die Familie der ABC-Transporter (ABC= engl. ATP Binding Cassette). Er befindet sich vor allem auf der apikalen Seite von Epithelzellen (Cheng et al., 1990, Riordan et al., 1989).

Bei einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels wird die R-Domäne mehrfach durch die cAMP-abhängigen Kinasen Protein Kinase A (PKA) und C (PKC) phosphoryliert. Daraufhin wird ATP an die NBF1 gebunden und hydrolysiert.

Es kommt zu einer Konformationsänderung des Ionenkanals und schließlich zu einem Chloridionenausstrom (Anderson et al., 1991, Nagel et al., 1992).

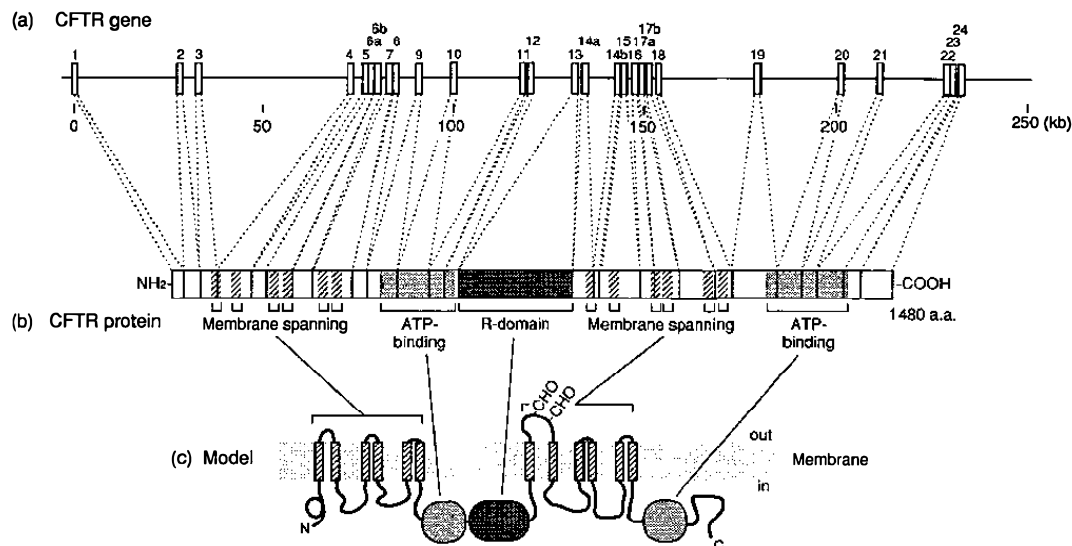


Abbildung 1: Schematische Darstellung vom *CFTR*-Gen zum *CFTR*-Membranprotein

(a) 250kb lange *CFTR*-Gen mit Introns und durchnummerierten Exons, (b) 1480 Aminosäuren lange *CFTR*-Protein mit Domänenbeschriftung: NH₂-Ende, sechs transmembranäre Einheiten 1, ATP-bindende NBF1, R-Domäne, sechs transmembranäre Einheiten 2, ATP-bindende NBF2, COOH-Ende, (c) Modell des *CFTR*-Proteins in der Zellmembran; aus (Zielenski and Tsui, 1995)

1.1.4 *CFTR*- Mutationen

Es sind etwa 2.000 Mutationen des *CFTR*-Gens bekannt, wodurch es zu verschiedenen Funktionsdefekten kommt. Eine drei Basenpaar-Deletion im Codon 508 führt zum Verlust von Phenylalanin (Mutation $\Delta F508$). Diese Mutation ist in der kaukasischen Bevölkerung die häufigste und kommt etwa bei 70% aller *CF*-Patienten vor (Herold, 2013). Sie befindet sich in der NBF1-Region (Kerem et al., 1990a). Alle weiteren Mutationen sind, mit einer Häufigkeit unter 4%, selten (Kristidis et al., 1992).

Die Funktionsdefekte werden in fünf Klassen eingeteilt:

In Klasse I sind alle Mutationsformen enthalten, welche zu einer gestörten Produktion des Proteins führen. Hinzu zählen Nonsense-, Frameshift- und Splice-Mutationen (z.B. G542X, R553X). Dabei kommt es zu einem vorzeitigem Ableseabbruch der DNA, einer Verschiebung des Leserasters oder einem falschen Spleißen des mRNA- Transkripts.

Zu Klasse II zählen die wegen defekter Proteinverarbeitung nicht glykolysierten Formen und deshalb im Endoplasmatischen Retikulum verbleibenden CFTR-Proteine. Sie gelangen nicht an ihren Bestimmungsort in der apikalen Membran der Epithelzellen (z.B. delF508, G480C).

In Klasse III befinden sich *CFTR*- Mutationen, welche zwar zu einem korrekten Einbau in die apikale Epithelzellmembran führen, jedoch dort durch cAMP nicht, gering oder nur vermindert reguliert werden können (z.B. G551D, S1255P, G551S, G1349D, R117H). Somit liegt eine defekte Regulation des Chloridkanals vor.

Klasse IV vereint Mutationen bei denen es zu einer fehlerhaften Chloridleitfähigkeit kommt. Die gestörte Leitfähigkeit kommt durch eine verminderte Ionenflussrate oder einer verkürzten Öffnungszeit des Kanals zustande. Die Proteinverarbeitung, der Einbau in die Membran und die Aktivierung durch cAMP sind bei Klasse IV Mutationen intakt (z.B. R117H, G314E, R334W, R347P).

Klasse V enthält *CFTR*-Genmutationen, die zu einer reduzierten Synthese aber ansonsten normalen CFTR-Proteinen führen. Die Synthese wird teilweise vermindert durch Nukleotidveränderungen, die zu alternativem Spleißen führen und Mutationen in der Promotorgegend, wodurch eine herabgesetzte Transkription erfolgt. Es kommt zu intakten aber in der Anzahl verringerten CFTR-Chloridkanälen in der apikalen Zellmembran der Epithelzellen (z.B. P574H, A455E) (Davidson and Porteous, 1998, Tsui, 1992, Welsh and Smith, 1993, Herold, 2013, Sheppard et al., 1993, Highsmith et al., 1994, Wilschanski et al., 1995).

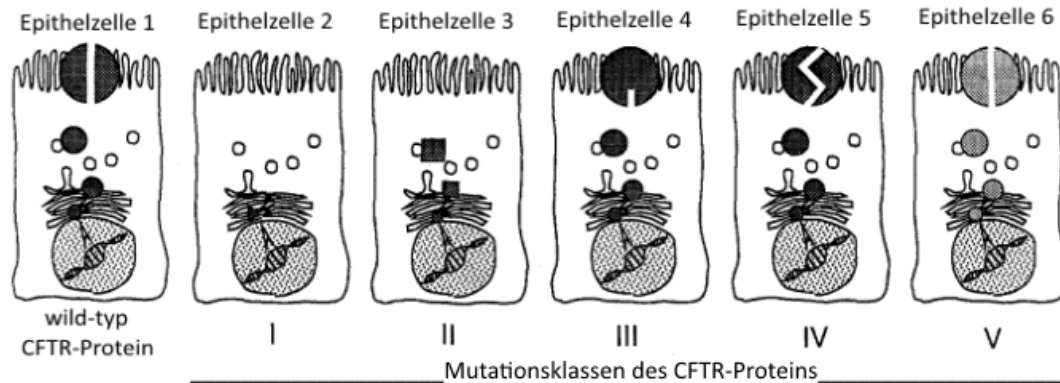


Abbildung 2: Mutationstypen des CFTR-Membranproteins in Epithelzellen

Epithelzelle 1: wild-typ CFTR-Protein - korrekt an der apikalen Epithelzellmembran lokalisiert, arbeitet als Chloridkanal; Epithelzelle 2, Klasse I: gestörte Proteinproduktion - es kann kein CFTR-Protein gebildet werden (Nonsense-, Framshift-, Splicemutationen); Epithelzelle 3, Klasse II: defekte Proteinverarbeitung - wegen fehlender Glykosylierung, Verbleib des CFTR-Proteins im Endoplasmatischen Retikulum; Epithelzelle 4, Klasse III: defekte Regulation - korrekter Membraneinbau, keine Aktivierung möglich; Epithelzelle 5, Klasse IV: defekte Chloridleitfähigkeit - korrekter Membraneinbau, verminderter oder verkürzter Chloridionenfluss; Epithelzelle 6, Klasse V: verminderte Synthese - intakter aber in der Anzahl verringerter CFTR-Chloridionenkanal (nach (Wilschanski et al., 1995))

Es wird von einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation zwischen den verschiedenen *CFTR*-Mutationen und der Pankreasfunktion berichtet (Sheppard et al., 1993, Kerem et al., 1990b).

Homozygote Mutationstypen I-III sind oft mit einer schweren Pankreasinsuffizienz assoziiert. Klasse IV und V gehen meist mit einem milden Typ der Pankreasinsuffizienz einher (Sheppard et al., 1993). Klasse I-III werden dadurch in Bezug zur Pankreasfunktion als „schwere“ Mutationen bezeichnet, Klasse IV und V als „milde“ (Kerem et al., 1990b). Wenn ein heterozygoter Genotyp, mit einer „schweren“ Mutation (z.B. $\Delta F508$) und einer „milden“ Mutation (z.B. R117H), vorliegt, verhält sich die „schwere“ Mutation rezessiv, mit einem funktionsfähigen Pankreas (Kristidis et al., 1992, Kerem et al., 1990b).

Eine Korrelation zwischen dem Genotyp und dem klinischen Phänotyp kann für die sehr unterschiedliche Schwere der Lungenerkrankung nicht eindeutig festgestellt werden.

Es wird vermutet, dass hierbei modifizierende Gene (siehe Kapitel 1.2), die Umwelt und sozioökonomische Einflüsse eine große Rolle bei der Krankheitsentwicklung spielen (Davidson and Porteous, 1998, Welsh and Smith, 1993).

1.1.5 Typische Lungeninfektionen bei CF

Außer den modifizierenden Genen, den Umwelt- und sozioökonomischen Einflüssen haben auch Atemwegsinfektionen bei CF-Patienten eine große Bedeutung. Durch Defekte des CFTR-Chloridkanals und dem daraus resultierenden zähen Schleimes ist die mukozilliäre *Clearance* der Lunge gestört. Dadurch können Erreger schwerer abtransportiert werden. Deshalb ist eine Infektion der luftleitenden Atemwege und der Lunge schon während den ersten Lebensmonaten typisch. Im Gegensatz zu anderen Organen, wie zum Beispiel dem Pankreas, Dünndarm oder den Vas deferens des Mannes fängt die Inflammation der Lunge erst postpartal an (Sturgess and Imrie, 1982). Die Schwere der Lungenerkrankung ist zwischen CF-Patienten sehr unterschiedlich (Middleton et al., 2013). Die genauen Mechanismen der Entzündungsreaktionen in CF-Patientenlungen sind bislang noch nicht alle verstanden (Khan et al., 1995).

Bei der Zystischen Fibrose ist die Lunge am häufigsten mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Hämophilus influenza* und *Staphylokokkus aureus* befallen (Muhlebach et al., 1999). Trotz Behandlung nehmen die Infektionen immer wieder einen chronischen Verlauf an und schädigen durch die ständige Entzündung das Lungengewebe. Dadurch kommt es zur Fibrosierung, wodurch eine stetige Verschlechterung der Lungenfunktion, bis hin zur Insuffizienz und nötigen Lungentransplantation folgt.

Auch Pilz- und Hefeinfektionen mit *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium apiospermum* oder Candidosen sind nicht selten (Nagano et al., 2010). *Aspergillus fumigatus* kann zu einem erniedrigten forcierten expiratorischen Volumen innerhalb 1 sek (FEV_1) und Exazerbationen führen. Dies trägt negativ zum Krankheitsverlauf bei (Amin et al., 2010). Die allergische bronchopulmonäre Aspergillose ist ebenfalls eine schwere Komplikation eines Befalles mit *Asper-*

gillus spp., welche zu einer erniedrigten Lungenfunktion führt (Elphick and Southern, 2014). Nach einer erfolgten Lungentransplantation endet eine Aspergillose bei CF-Patienten zum größten Teil tödlich (70%) (Paya, 2002).

Durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnene Proben aus CF-Lungen wurde festgestellt, dass häufig keine direkte Korrelation zwischen Erregerbefall und inflammatorischen Zellen oder Botenstoffen vorhanden ist. Muhlebach und Mitarbeiter stellten eine verhältnismäßig erhöhte Konzentration an neutrophilen Zellen und Interleukin 8 (IL-8) bei niedrigen Bakterienkonzentrationen fest (Muhlebach et al., 1999). Khan und Mitarbeiter erfassten sogar eine inflammatorische Reaktion, obwohl keine Keime in einer CF-Patientengruppe gefunden wurden (Khan et al., 1995). Dies lässt weitere Ursachen der Entzündungsentstehung im Lungengewebe vermuten.

1.2 Genetischer Einfluss anderer Genpolymorphismen auf CF

Eine Studie von Collaco und Mitarbeitern zeigt, dass in etwa 50% modifizierende Gene (*modifier genes*) für die unterschiedliche Ausprägung der Lungenerkrankung bei CF-Patienten verantwortlich sind (Collaco et al., 2010).

Schon über 50 verschiedene Gene, welche die Schwere der Lungenerkrankung beeinflussen, wurden bereits entdeckt. Der Review von Weiler und Drumm enthält eine Übersicht der bis 2013 publizierten modifizierenden Gene der Lungenerkrankung bei der Zystischen Fibrose (siehe: (Weiler and Drumm, 2013)). Beispiele daraus sind Varianten im Gen *Mannose-Binding-Lektin 2 (MBL2)*, welche zu einem früheren Auftreten einer chronischen *P. aeruginosa* Infektion und einer reduzierten Lungenfunktion führen (Davies et al., 2004, Dorfman et al., 2008).

Auch Variationen in den Genen *EFH* und *APIP* verändern die Lungenfunktion (Wright et al., 2011). Desgleichen wurden weitere modifizierende Gene beschrieben, die einen Einfluss auf andere Krankheitseigenschaften haben. Unter anderem zeigen Veränderungen im Gen *SLC26A9* ein erhöhtes Auftreten eines Mekoniumileus nach Geburt. Außerdem übt *SLC26A9* ebenso wie die Gene

TCF7L2, *CDKAL1*, *CDKN2A/B* und *IGF2BP2* einen Einfluss auf den Erkrankungsbeginn eines CF-bedingten Diabetes mellitus Typ II aus (Blackman et al., 2013). In Abbildung 3 befindet sich eine Übersicht von einigen *modifier genes* und ihren möglichen Einfluss bei CF-Patienten.

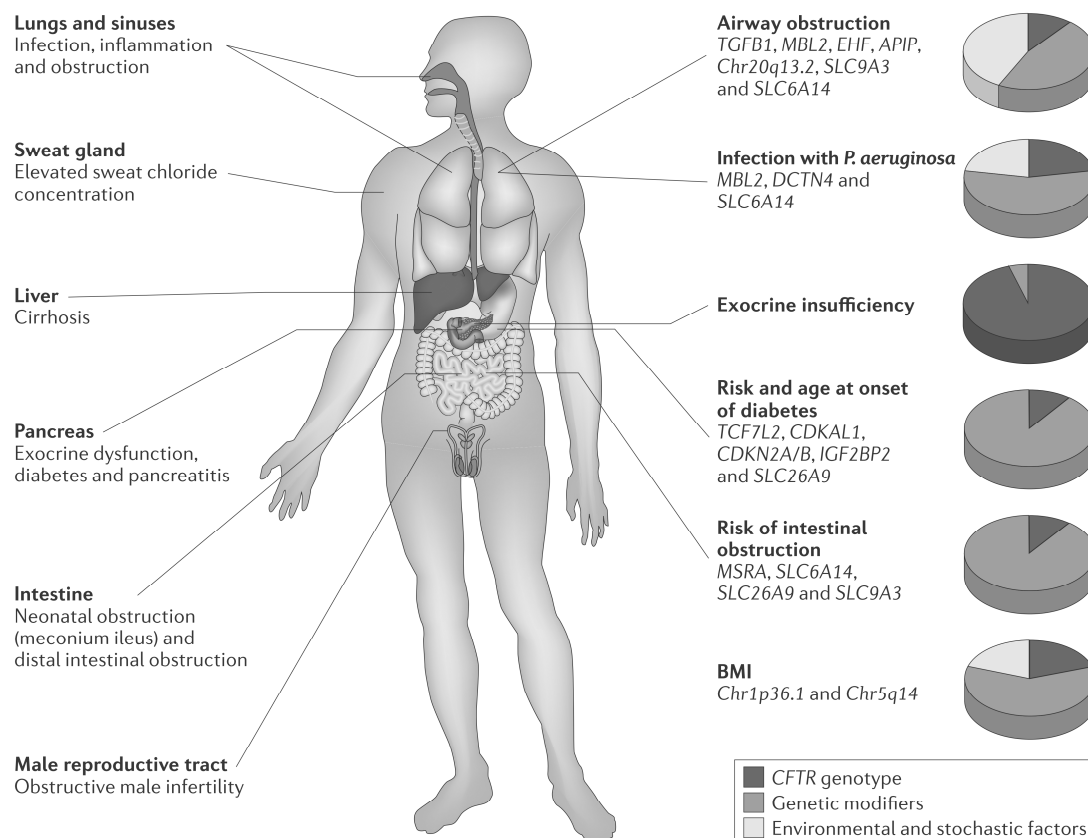


Abbildung 3: Hauptbeschwerden der Zystischen Fibrose und relative Beteiligung modifizierender Gene bei Variationen der Krankheitsausprägung

linke Spalte: Übersicht über die bei CF betroffenen Organe und eine Beschreibungen der Hauptsymptome; rechte Spalte: Auflistung einzelner Symptome, darunter: Beispiele von modifizierenden Genen, die einen Einfluss auf die jeweiligen Symptome haben; Kreisdiagramme: dunkelgrau- Einflussanteil des *CFTR*-Genotyps, mittelgrau- Einflussanteil modifizierender Gene, weiß- Einflussanteil von Umwelt- und stochastischen Faktoren auf das jeweilige Symptom. Abbildung entnommen aus (Cutting, 2015).

Die Erkenntnisse über genetische Einflüsse auf die CF-Lungenerkrankung können neue therapeutische Ziele hervorbringen.

Deshalb wurde in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen CF und dem Protein Caspase Recruitment Domain Family Member 9 (CARD9) ebenso wie ein Zusammenhang zwischen CF und Pentraxin3 (PTX3) untersucht.

Bei an CF Erkrankten wurde beobachtet, dass bestimmte Pilzinfektionen schwerwiegende Folgen für die Lungenfunktion haben können. Da sowohl CARD9 als auch PTX3 entscheidende Rollen in der Pilzabwehr spielen, wurden in dieser Arbeit jeweils in beiden Genen SNP (*Single Nucleotid Polymorphism*) auf einen Zusammenhang mit der CF-Lungenerkrankung geprüft. *P. aeruginosa* ist einer der häufigsten Lungenpathogene, welcher schwerwiegende Komplikationen hervorrufen kann. Das intakte PTX3-Protein spielt in der Erkennung und Beseitigung *P. aeruginosas* ebenfalls eine Rolle, weshalb auch hier ein Zusammenhang zwischen der Lungenfunktion von CF-Patienten und eines SNPs im Protein PTX3 untersucht wurde (Muhlebach et al., 1999, Nagano et al., 2010).

1.3 Caspase Recruitment Domain Family Member 9 (CARD9)

Das Adapterprotein CARD9 befindet sich auf Chromosom 9q34.3 und gehört zu der Familie der Kaspasen (Glocker et al., 2009). Das etwa 63,5 kDa schwere Protein besteht aus 13 Exons und 536 Aminosäuren.

Die N-terminale Region von CARD9 ähnelt CARD-Regionen anderer Apoptoseproteinen. Die zentrale Region beinhaltet eine coiled-coil-Domäne, welche für eine Proteinoligomerisation wichtig ist (Bertin et al., 2000).

Es wird vorwiegend in Monozyten, die sich zu Makrophagen und dendritischen Zellen weiterentwickeln, exprimiert. Somit gehört CARD9 zu dem System der angeborenen Immunabwehr (Hsu et al., 2007, Glocker et al., 2009).

β -Glucan ist ein Zellmembranbestandteil in Pilzen, Hefen und teilweise auch in Bakterien. Wenn β -Glucan an Dectin-1 gebunden wird, kommt es zu einer Akti-

vierung der Tyrosinkinase SYK. SYK kontrolliert einerseits die Dectin-1-abhängige Phagozytose. Andererseits führt SYK zu einer inflammatorischen Antwort gegen die detektierten Erreger. Dabei aktiviert SYK das Adapterprotein CARD9. Dieses verbindet sich mit BCL-10 und MALT1 zu einem CARD9-BCL-10- MALT1-Komplex und aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Dieser Komplex kontrolliert außerdem die JNK- und p38- Kinaseaktivität (Gross et al., 2006, Hara et al., 2007, Bertin et al., 2000, Goodridge et al., 2009).

Es kommt zu einer Myeloidzellaktivierung, Cytokinausschüttung (IL-6 und TNF α) und einer Aktivierung der angeborenen Immunantwort gegen den Erreger (Hara et al., 2007).

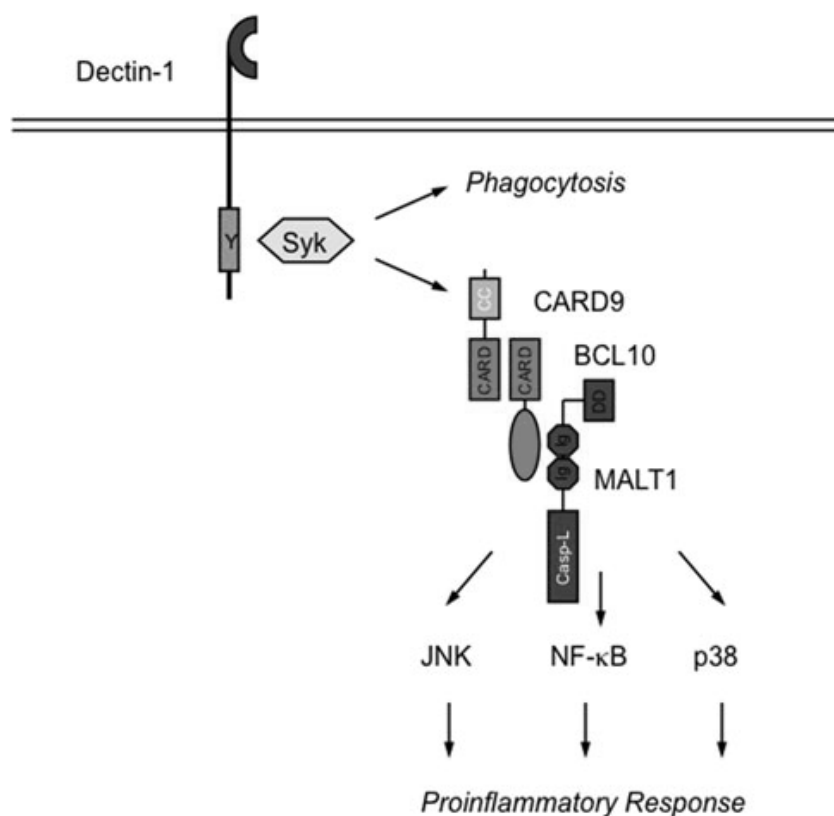


Abbildung 4: Verbindung über CARD9 von Dectin-1 mit dem NF- κ B-Pfad

Die Bindung eines β -Glucans mit dem Rezeptor Dectin-1 induziert eine SYK-Aktivierung. Dadurch wird die Phagozytose und Aktivierung des Adapterproteins CARD9 initiiert. CARD9 bildet eine Einheit mit BCL-10 und MALT1 um die Dectin-1-Signale an den NF- κ B-Pfad weiterzuleiten. Dadurch kommt eine proinflammatorische Antwort zustande. Zusätzlich kontrolliert der CARD9-BCL-10- MALT-1-Komplex die JNK- und p38-Kinaseaktivität. aus (Ruland, 2008)

Der CARD9-BCL-10- MALT1-Komplex ist wichtig für eine suffiziente Immunantwort gegen Erreger. Gross und Mitarbeiter haben zum Beispiel in Myeloidzellen mit fehlerhaftem CARD9 festgestellt, dass eine Eradikation eines *Candida albicans*-Befalles nicht mehr möglich war (Gross et al., 2006).

Eine unphysiologische Aktivierung von CARD9 durch Genmutationen oder Umweltfaktoren kann zu pathologischer Immunzellaktivierung, welche inflammatorische Erkrankungen verursachen, einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen oder zu bestimmten Krebsarten (B-Zell-Lymphom im Magen) führen (Ruland, 2008).

Patienten mit einer CARD9- Q295X Mutation im Exon 6 (Punktmutation C→T) zeigten laut Glocker und Mitarbeiter eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit auf, an einer Candidose zu erkranken. Kontrollgruppen mit wild-typ oder heterozygoten CARD9 Proteinen dieser Mutation, waren gesund. Das lässt auf eine autosomal rezessive Vererbung und ebenfalls auf eine zentrale Rolle von CARD9 in der Pilzabwehr schließen (Lanternier et al., 2013, Glocker et al., 2009, Gross et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde der SNP CARD9 S12N (rs4077515 A/G) bei CF-Patienten untersucht. Bei rs4077515 findet ein Basenwechsel von G zu A statt, wodurch anstatt der Aminosäure Serin, Asparagin ins Protein eingebaut wird (NCBI, Zugriff 20.07.2015b). In einer vorangegangenen Studie mit einer Population von 226 ursprünglich europäischen Probanden, wurde eine Verteilungshäufigkeit der Allele von AA 22%, AG 52%, GG 26% in der Normalbevölkerung angegeben (NCBI, Zugriff 20.07.2015c, NCBI, Zugriff 20.07.2015b).

Rosentul und Mitarbeiter konnten bei *CFTR*-Gen gesunden Probanden weder einen signifikanten Zusammenhang zwischen den verschiedenen Allelen des SNPs rs4077515 und einer unterschiedlichen Anfälligkeit gegenüber *Candida albicans*, noch eine Assoziation zwischen diesem SNP und der Cytokinausschüttung des Proteins CARD9, bestätigen. Die Studie beinhaltete 331 Patien-

ten, welche mit *Candida albicans* befallen waren und 351 Patienten zur Kontrolle, bei denen kein Befall nachweisbar war (Rosentul et al., 2011).

Pointon und Mitarbeiter fanden jedoch heraus, dass der SNP rs4077515 mit dem Expressionslevel des Proteins CARD9 assoziiert ist ($p= 4,6 \times 10^{-14}$) (Pointon et al., 2010).

In weiteren Studien wurde das CARD9-Defizit untersucht. In einer *in vivo* Studie konnte festgestellt werden, dass 50% der Mäuse mit einem vollständig funktionfähigem CARD9-Protein mehr als doppelt so lange nach einer *Candida albicans* Infektion überlebten (12 Tage), als die Mäuse mit einem fehlerhaften CARD9 Protein (5 Tage). In einem weiteren Versuch fand Gross mit Mitarbeitern heraus, dass die Niereninfiltrationsrate durch *Candida albicans* bei Mäusen mit einem fehlenden *CARD9*- Gen nach vier Tagen etwa 100-fach größer war, als bei Mäusen mit einem funktionierenden CARD9 Protein (Gross et al., 2006).

1.4 Pentraxin 3 (PTX3)

PTX3 gehört zur Familie der Pentraxine. Pentraxine gehören zu Akute-Phase-Proteinen und somit zum angeborenen Immunsystem.

Während C-reaktive Protease (CRP) und Serum amyloid P-Komponente (SAP) zu den kurzen Pentraxinen gehören, wurde PTX3, oder auch Tumor-Nekrose-Faktor-Stimuliertes-Gen-14 (TNG14) genannt, zu den langen Pentraxinen zugeteilt. Es befindet sich auf dem Chromosom 3q25, ist in 3 Exons organisiert, welche 381 Aminosäuren kodieren. Das Protein hat in unglykosilierter Form ein Gewicht von etwa 40 kDa und besteht aus zwei Domänen. Die β -Blatt formierte C-terminale-Domäne hat große strukturelle Ähnlichkeiten zu kurzen Pentraxinen, die α -helikale N-terminale-Domäne zeigt Unterschiede und ist länger. PTX3-Proteine ordnen sich zu Multimeren zusammen (Breviario et al., 1992, Bottazzi et al., 1997). PTX3 wird in vielen Zellen, vor allem in mononukleären Phagozyten, Endothelzellen, dendritischen Zellen und in Fibroblasten als Antwort infektiöser und inflammatorischer Signale wie z.B. IL-1, TNF α oder LPS

gebildet (Alles et al., 1994, Doni et al., 2003). PTX3 spielt daher eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort gegen Pathogene, in der Regulation von Entzündungsreaktionen und in der Beseitigung abgestorbener Zellen (Nauta et al., 2005).

PTX3 kann als Muster erkennender Rezeptor (PRR= *Pattern Recognition Receptor*) molekulare Strukturen von Pathogenen erkennen (PAMPS= *pathogen-associated molecular patterns*), diese binden und einerseits eine Komplementsystemaktivierung (über den Faktor C1q), andererseits eine Beseitigung dieser durch Makrophagen bewirken (Garlanda et al., 2002, Bottazzi et al., 1997). Beispielhafte Pathogene wären hierbei *Aspergillus fumigatus* (Garlanda et al., 2002), das in der Zellwand von Hefen lokalisierte Zymosan (Diniz et al., 2004) und *P. aeruginosa* (Chiarini et al., 2010). Diese Pathogene spielen bei CF-Patienten eine große Rolle in der Krankheitsentwicklung.

Kommt es zu Mutationen im PTX3-Gen, kann dies zu einem Funktionsverlust des PTX3-Proteins führen und damit zu einer höheren Anfälligkeit gegenüber Pathogenen (Chiarini et al., 2010), einer defekten Regulierung von Entzündungsprozessen oder dem Verbleib apoptotischer Zellen im Körper.

In dieser Arbeit wurde der SNP PTX3 D48A (rs3816527 (A/C)) bei CF-Patienten untersucht. rs3816527 befindet sich im zweiten Exon des Gens. Es findet ein Basenwechsel von C zu A statt, wodurch anstatt der Aminosäure Alanin, Asparagin ins Protein eingebaut wird (Chiarini et al., 2010). In vorangegangenen Studien wurde eine Verteilungshäufigkeit der Allele von AA 33%, AC 47%, CC 20% bei 662 europäischen Probanden der Normalbevölkerung angegeben (NCBI, Zugriff 20.07.2015d, NCBI, Zugriff 20.07.2015a).

Chiarini und Mitarbeiter fanden bei einer Fallzahl von 127 CF-Patienten heraus, dass CF-Patienten mit dem Genotyp C des SNPs rs3816527 des Gens *PTX3* signifikant öfter eine chronische Infektion mit *P. aeruginosa* aufwiesen, als CF-Patienten mit dem Genotyp A ($p= 0,038$). Diese statistische Signifikanz wurde allerdings nach einem Permutationstest, aufgrund der multiplen Tests, wieder aufgehoben. Einen Zusammenhang zwischen den Genotypen des SNPs

rs3816527 und FEV₁ konnte ebenfalls nicht gefunden werden (Chiarini et al., 2010).

Olesen und Mitarbeiter berichteten, dass der Genotyp A des SNPs rs3815527 in Kombination mit dem haploiden Genotyp G-A-G (SNPs: rs2305619- rs3816527- rs1840680) des Gens *PTX3* auch einen protektiven Effekt, an pulmonaler Tuberkulose zu erkranken, besitzt ($p= 0,0281$) (Olesen et al., 2007).

Denselben haploiden Genotyp G-A-G (SNPs: rs2305619- rs3816527- rs1840680) untersuchten auch May und Mitarbeiter. Sie untersuchten den Einfluss auf die Proteinproduktion, sowie einen Zusammenhang mit der weiblichen Fertilität. Ein Zusammenhang konnte nicht hinreichend bestätigt werden (May et al., 2010). Barbati und Mitarbeiter entdeckten allerdings, dass der haploide Genotyp G-A-G (SNPs: rs2305619- rs3816527- rs1840680) mit niedrigeren *PTX3*-Plasmawerten einherging, als A-C-A und A-A-A (Barbati et al., 2012).

1.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es den Zusammenhang zwischen den SNPs rs4077515 des Gens *CARD9* sowie rs3816527 des *PTX3*-Gens und der CF-Lungenerkrankung zu untersuchen. Der Einfluss der verschiedenen SNP-Genotypen auf die Erreger *P.aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans* wurde dabei betrachtet. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen den SNPs und der Lungenfunktion anhand von FEV_{1(mean)} und dem Slope ermittelt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Im folgenden Materialteil befindet sich eine Beschreibung und Auflistung über die Herkunft der DNA- Proben, die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Kits, Reagenzien, Restriktionsenzyme und Primer.

2.1.1 Probenmaterial und Patientencharakteristika

Das Kollektiv umfasste 528 Patienten, die alle an CF erkrankt sind. Die DNA-Proben stammten aus Graz (108 Patienten), München (311 Patienten) und Tübingen (109 Patienten). Sie wurden in den Jahren 2012-2013 in Graz, 2008-2010 in München und 2010-2013 in Tübingen entnommen. Die DNA-Extraktion von den Grazer und sieben Tübinger CF-Patienten wurde aus Vollblut von Laura Eichler, einer medizinischen Doktorandin in der Kinderklinik Tübingen, durchgeführt. Die restlichen Tübinger und Münchner DNA-Proben wurden bereits in der extrahierten Form erhalten.

Von den 528 Patienten waren 266 männlich (50,4%) und 262 weiblich (49,6%). Das durchschnittliche Alter im Untersuchungsjahr betrug 19+/- 10 Jahre. Der jüngste Patient war unter einem Jahr alt, der älteste 58 Jahre alt. Der Body-Maß-Index (BMI) betrug im Median 19,5 kg/m², das Minimum lag bei 10,96 kg/m², das Maximum bei 29,70 kg/m². Der Durchschnittswert der mittleren forcierten Einsekundenkapazität (FEV_{1 (mean)}) betrug 81% +/- 27%.

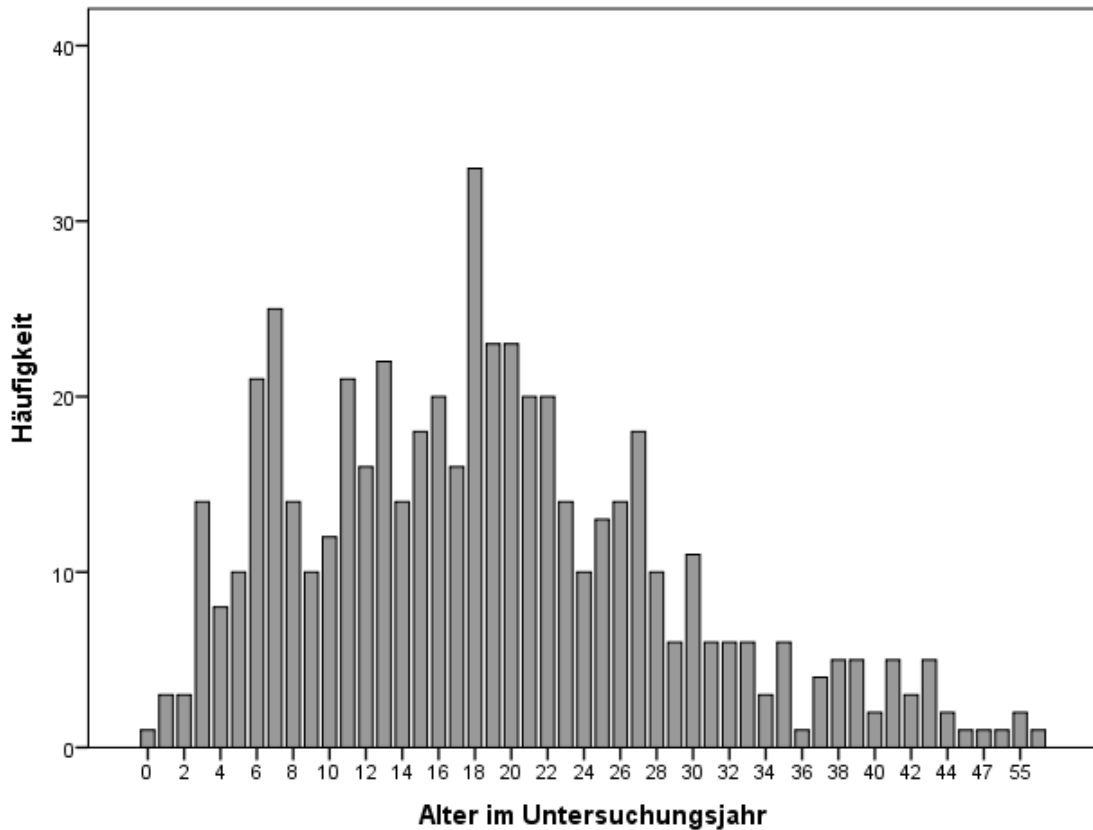


Abbildung 5: Alter im Untersuchungsjahr der insgesamt 528 Patienten

Die Patienten wiesen verschiedene Schweregrade der Lungenerkrankung auf. 47,5% hatten eine milde Form, 16,7% eine gemäßigt-milde, 18,6% eine mittel-mäßige und 11% eine schwere Form der Lungenerkrankung. Lungentransplantierte wurden von dieser Studie ausgeschlossen. Die Einteilung der Lungenerkrankung erfolgte anhand der $FEV_{1(\text{mean})}$ und des Alters nach dem Prinzip von Schluchter (siehe (Schluchter et al., 2006)). Bei 6,3% des Kollektivs war es aufgrund des zu jungen Alters nicht möglich den $FEV_{1(\text{mean})}$ -Wert zu ermitteln. So konnte bei diesen 33 Patienten die Schwere ihrer Lungenerkrankung nicht eingeteilt werden. In den Patientenakten wurden manche Merkmale nicht dokumentiert oder ermittelt. In der folgenden Arbeit wurde gekennzeichnet, auf wie viele Patienten sich das jeweilige Merkmal bezieht. Eine Übersicht über die *CFTR*-Genmutationen befindet sich in *Tabelle 1*.

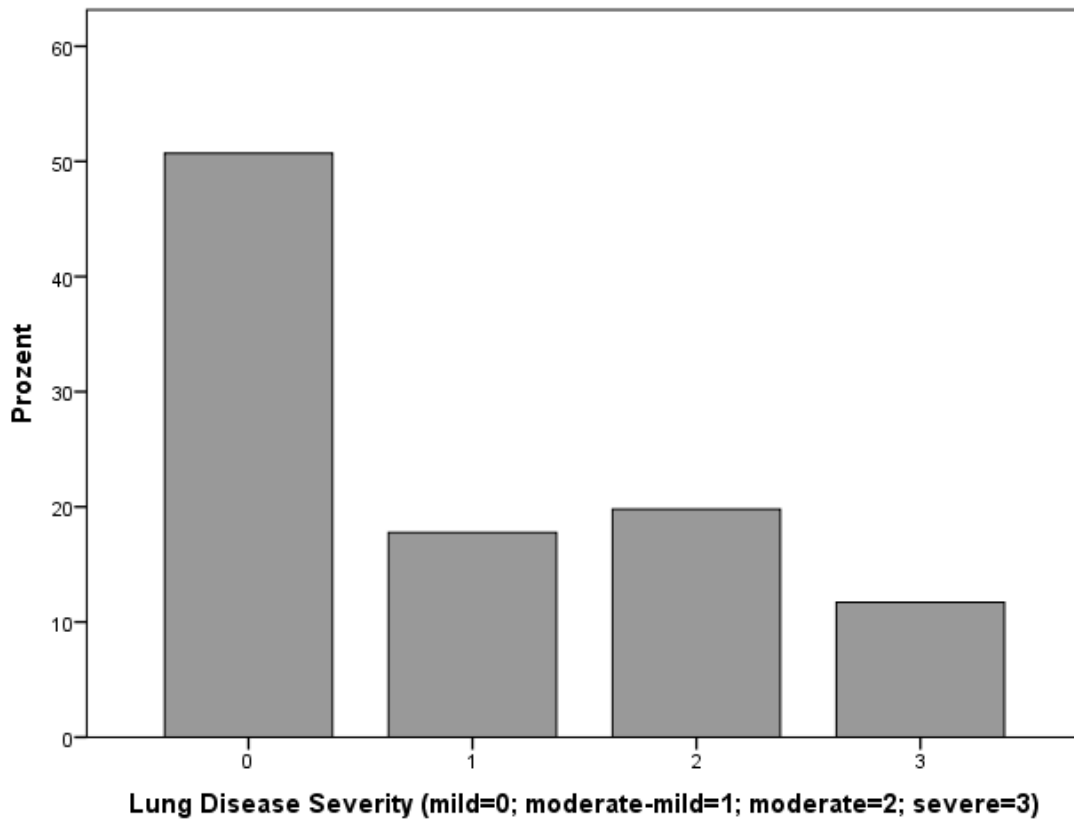


Abbildung 6: Schwere der Lungenerkrankung nach Schluchter

47,5% hatten eine milde Form(=0), 16,7% eine gemäßigt-milde(=1), 18,6% eine mit-telmäßige(=2) und 11% (=3) eine schwere Form der Lungenerkrankung

Tabelle 1: Übersicht über die *CFTR*-Mutationen des Kollektivs

Mutationen, welche nur bei einzelnen Patienten vorkamen, wurden nicht einzeln aufgelistet. Bei 72 Patienten war keine Angabe über *CFTR*-Genmutationen vorhanden.

<i>CFTR</i>-Mutation	Häufigkeit	Prozent
delF508	411	77,8
G542X	10	1,9
M1101K	3	0,6
R1162X	3	0,6
1717-1G→A	2	0,4
3659delC	2	0,4
E92X	2	0,4
G551D	2	0,4
N1303K	2	0,4
R553X	2	0,4
Einzelne Mutationen	17	3,2
Keine Angabe	72	13,6
Gesamtsumme	528	100

2.1.2 Geräte

Tabelle 2: Geräteliste

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Cycler	GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems
Gelkammer	Minnie-the-Gel Cicle™ Submarine Agarose Gel Unit	Hoefler
Gelkammer	40-1214	Peqlab Biotechnologie GmbH
Imaging System	Odyssey®Fc	Li-Cor®
Kühl- Gefrierschränke	-20°C Gefrierschrank	Kirsch
Kühl- Gefrierschränke	4°C Kühlschränk	Kirsch
Kühl- Gefrierschränke	-20°C Gefrierschrank	Liebherr
Magnetrührer	Agitateur manétique chauffant 10515	BioBlock scientific
Mikrowelle	Perfect	Délonghi
Photometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH
Pipetten	Reference 10µl	Eppendorf
Pipetten	Research plus 0,5-10µl	Eppendorf
Pipetten	Pipetman 100µl, 1000µl	Gilson
Plattformschüttler	Titramax 1000	Heidolph
Spannungsgerät	Power PAC 1000;200	Biorad
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Vortexer	MS1 Minishaker	IKA®
Waage	E400D	OHAUS® Europe GmbH
Wasserbad	1002	GFL®
Zentrifuge	Mikrozentrifuge	Carl Roth GmbH
Zentrifuge	Mikr 22R	Hettich

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialliste

Verbrauchsmaterial	Kennzeichen	Hersteller
PCR- Tubes	Multiply®-Pro 0,2ml; 0,5ml	Sarstedt
Pipettenspitzen	Filter Tips 0,5-20µl; 2-100µl	Biosphere®
Pipettenspitzen	Premium Tips, DNAase& RNAase frei, 10µl; 100µl; 1000µl	Biozym
Verschlussfolie	Parafilm®M, 4in.x250Ft. Roll	Bemis®

2.1.4 Kits

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
<i>QIAamp DNA Mini Kit</i>	Qiagen
<i>Go-Taq Colorless Master-Mix</i>	Promega

2.1.5 Reagenzien

Tabelle 5: Reagenzienliste

Reagenz	Hersteller
<i>10x Blue-Juice Loading Buffer</i>	Invitrogen
<i>CutSmart™ Buffer, 10x Concentrate 1,25ml</i>	New England Biolabs®INC
<i>DNA ladder 25bp;100bp</i>	Invitrogen
<i>GelRed Nucleic Acid Stain, 10.000x in water</i>	Biotum
<i>Purified BSA, 100x 10mg/ml</i>	New England Biolabs®INC
<i>Q-Gard®, Milli-Q</i>	Biocel
<i>Rotiphorese 10x TBE- Puffer</i>	Roth
<i>SeaKem® LE Agarose</i>	Lonza

2.1.6 Restriktionsenzyme

Tabelle 6: Liste der eingesetzten Restriktionsenzyme

in Klammer hinter dem Restriktionsenzymname steht die jeweilige Schnittstelle; die Sequenz ist 5'-3' angegeben, ^=Schnittstelle

Restriktionsenzyme	Hersteller
HpyCH4IV (5'...A [^] CGT...3')	New England Biolabs
HhaI (5'...GCG [^] C...3')	New England Biolabs

2.1.7 Primer

Die Primer wurden von der Firma MWG Eurofins Operon synthetisiert und bezogen. Die folgende Tabelle enthält eine Auflistung aller verwendeten Primer (5'-3' Richtung).

Tabelle 7: Primerliste

Primer	Sequenz 5'-3'
CARD9 S12N (rs4077515 A/G) forward	CAGCGTCTGAGAAGGAGTGG
CARD9 S12N (rs4077515 A/G) reverse	ACTCTGTGGTTGGGTTTGGG
PTX3 D48A (rs3816527 A/C) forward	CAAAGCACATCCAAGGCAGG
PTX3 D48A (rs3816527 A/C) reverse	CTGCGAGTTCTCCAGCATGA

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion der DNA

Die DNA wurde aus Patientenvollblut (siehe *Abschnitt 2.1.1*) nach Protokoll des Kits *QIAamp DNA Mini Kit* extrahiert.

Die Reagenzien und das Vollblut hatten etwa Raumtemperatur.

Als erstes wurden 200 µl Vollblut, danach 200 µl *Buffer AL* zu 20 µl *Qiagen Protease* hinzu pipettiert. Alles wurde 15 sek im Vortexer gemischt. Daraufhin wurde das Gemisch bei 56°C für 10 min im Wasserbad inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren von am Deckel befindlichen Tropfen wurden 200 µl Ethanol (96-100%ig) hinzugefügt, für 15 sek im Vortexer gemischt und abermals zentrifugiert. Vorsichtig wurde nun das Gemisch in eine *QIAamp Mini Spin* Säule innerhalb eines 2ml Auffangröhrchens gegeben und für 1 min bei 6000x g zentrifugiert. Das Auffangröhrchen wurde verworfen. Die *QIAamp Mini Spin* Säule mit dem darin befindlichen Filtrat wurde in ein sauberes 2ml Auffangröhrchen gegeben. Beim nächsten Schritt wurden 500 µl *Buffer AW1* pipettiert und der Zentrifugationsschritt bei 6000x g für 1 min und Auffangröhrchenaustausch wiederholt. Das alte Auffangröhrchen wurde wieder verworfen. Nun wurden 500 µl *Buffer AW2* pipettiert und bei einer Geschwindigkeit von 20.000x g für 3 min zentrifugiert. Nach dem Tausch des Auffangröhrchens wurde noch einmal für 1 min zentrifugiert. Auch hier wurde das Auffangröhrchen verworfen. Abschließend wurde die *QIAamp Mini Spin* Säule in ein sauberes Mikrozentrifugenröhrchen gegeben, 10 µl DNA- & RNAase freies H₂O hinzugefügt, bei Raumtemperatur (15-25°C) 1 min inkubiert und für 1 min bei 6000x g zentrifugiert. Die letzte Schrittabfolge wurde wiederholt, sodass am Ende die DNA in DNA- & RNAase freiem H₂O gewonnen wurde.

2.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die gewonnene Proben-DNA wurde mittels des Spektrophotometers auf ihre Konzentration geprüft. Dabei wurde 1 µl der Probe im NanoDrop vermessen. Als Referenz diente die gleiche Lösungssubstanz, wie bei der DNA- Probe (DNA-& RNAase freies H₂O).

2.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um die spezifischen DNA- Abschnitte der Patientenproben (siehe *Abschnitt 2.1.1*) zu amplifizieren wurde das konventionelle PCR-Schema verwendet. Bei den Proben wurde jeweils 1-5 µl genomische DNA (Konzentration: 10 ng) zu folgendem Reaktionsgemisch hinzugefügt:

Tabelle 8: PCR- Reaktionsgemisch bei CARD9 S12N und bei PTX3 D48A

Reagenz	Menge	Konzentration
Go-Taq Colorless Master- Mix	12,5 µl	1x
Primer forward	1,0 µl	0,2 µM
Primer reverse	1,0 µl	0,2 µM
H ₂ O	ad 25 µl	-

Die Amplifikation erfolgte im Cycler nach folgendem PCR-Schema:

Tabelle 9: PCR- Bedingungen bei CARD9 S12N

Schritt	Zyklen	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1	2 min.	95 °C
Amplifikation	35	20 sek.	95 °C
		30 sek.	58 °C
		30 sek.	72 °C
Elongation	1	5 min.	72 °C

Tabelle 10: PCR- Bedingungen bei PTX3 D48A

Schritt	Zyklen	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1	2 min.	95 °C
Amplifikation	32	20 sek.	95 °C
		15 sek.	60 °C
		15 sek.	72 °C
Elongation	1	5 min.	72 °C

Die gewonnenen DNA-Amplifikationen wurden anschließend mit Restriktionsenzymen verdaut.

2.2.4 Restriktionsenzymverdau und Agarosegelelektrophorese

Der Restriktionsenzymverdau erfolgte mit dem Enzym HpyCH4IV bei CARD9 S12N bzw. mit HhaI bei PTX3 D48A.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Restriktionsenzymverdaus bei CARD9 S12N

Reagenz	Menge	Konzentration
PCR- Produkt	8,4 µl	-
Cut- Smart	1 µl	1x
HpyCH4IV	0,5 µl	10 U
BSA 100x	0,1 µl	1x

Tabelle 12: Zusammensetzung des Restriktionsenzymverdaus bei PTX3 D48A

Reagenz	Menge	Konzentration
PCR- Produkt	8,4 µl	-
Cut- Smart	1 µl	1x
Hhal	0,5 µl	10 U

Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden bei 37 °C. Die dadurch entstandenen DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Anhand der Agarosegelelektrophorese ist eine Auftrennung nach Länge der DNA-Fragmente möglich, da diese eine unterschiedliche Laufgeschwindigkeit aufweisen.

Bei CARD9 S12N wurde ein 1,5%iges, bei PTX3 D48A ein 2%iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurde 1,5 g bzw. 2 g *SeaKem® LE Agarose* mit 100 ml *Rotiphorese 10x TBE- Puffer* gemischt, 10-15 min mit einem Rührfisch auf einem Magnetrührer gerührt, und ca. 5 min in der Mikrowelle aufgekocht bis es ein homogenes flüssiges Gel ergab. Nach einer kurzen Abkühlzeit von ungefähr 1 min (vor Beginn der Auspolymerisierung) wurden 10 µl *GelRed Nucleic Acid Stain* als fluoreszierender Farbstoff hinzugegeben, luftblasenfrei vermennt und diese Flüssigkeit zur Auspolymerisierung in eine Gelapparatur gegossen. Das nach etwa 30 min auspolymerisierte Gel wurde in eine mit TBE- Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. 9 µl der Probe wurden mit 1 µl *10x Blue-Juice Loading Buffer* versetzt und in die jeweilige Geltasche pipettiert. Zur Größenabschätzung liefen bei einer elektrischen Spannung von 100-120 V, 25 bp bzw. 100 bp DNA-Leitern mit. Die Auswertung erfolgte nach ca. 1-1,5 h mittels UV-Bilddokumentation eines Gelbild-Systems. Ein Beispiel dazu ist in *Abbildung 7* sichtbar.

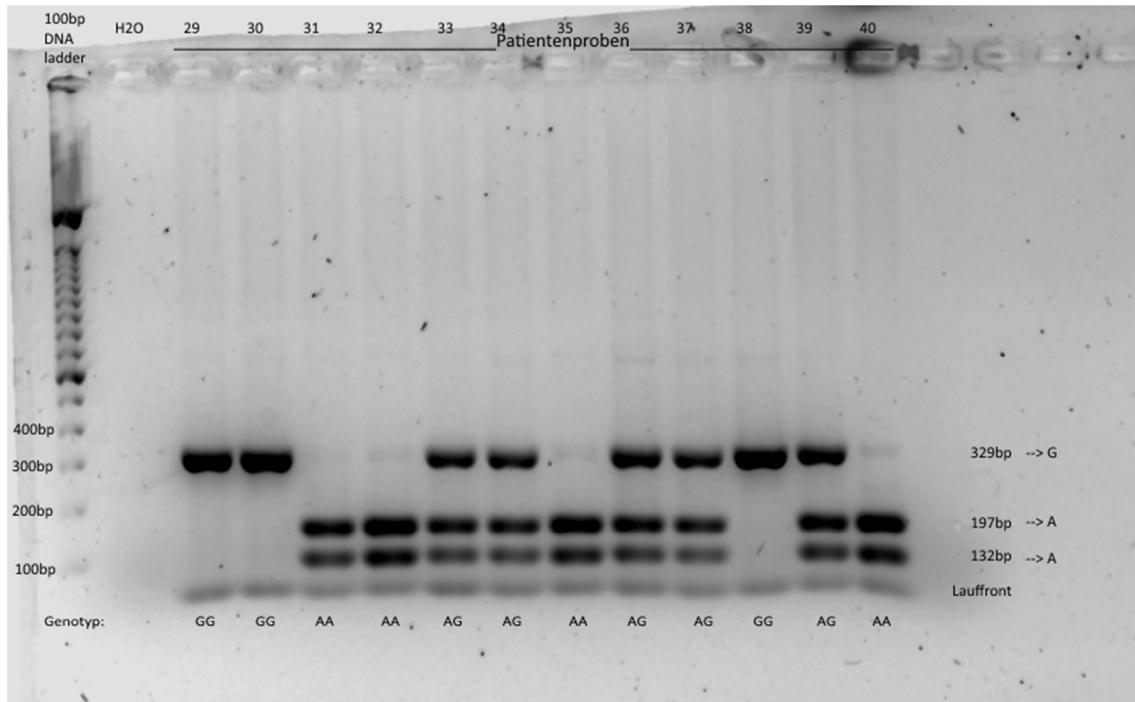


Abbildung 7: Beispielhaftes Gelelektrophorese- Bild, CARD9 S12N (rs4077515), Patientenproben Nr. 29-40 aus Graz

A=Adenin, G=Guanin; Genotypen: AA, AG, GG

2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics 22. Die Zusammenhänge zwischen den SNPs und dem Erregerbefall wurden anhand des Exakten Tests nach Fisher ermittelt. Um die Beeinflussung der Lungenfunktion durch die SNPs zu testen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) sowie der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Tabelle 13: CARD9 S12N (rs4077515) Allel-Häufigkeiten

Genotyp	Häufigkeit	Prozent
AA	91	17,2
AG	284	53,8
GG	153	29,0
Gesamtsumme	528	100,0

3.2 Genotypverteilung des SNPs rs3816527 des *PTX3* Gens

Die Allele wurden auch hier mittels PCR, Restriktionsenzymverdau und Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.3 und 2.2.4) ermittelt. Da das Enzym HhaI bei (5'...GCG^AC...3') nur nach der Wildtyp-Form mit der Base Cytosin (C) schneidet konnte, gab es bei der Agarosegelelektrophorese folgende drei verschiedene Möglichkeiten der Basen-Bandenkombination: das Allel AA bei 131 bp, AC bei 131 bp, 71 bp und 60 bp und das Allel CC bei 71 bp und 60 bp. Hier diente eine 25 bp DNA-ladder als Marker zum Ablesen der jeweiligen Basenpaarlängen.

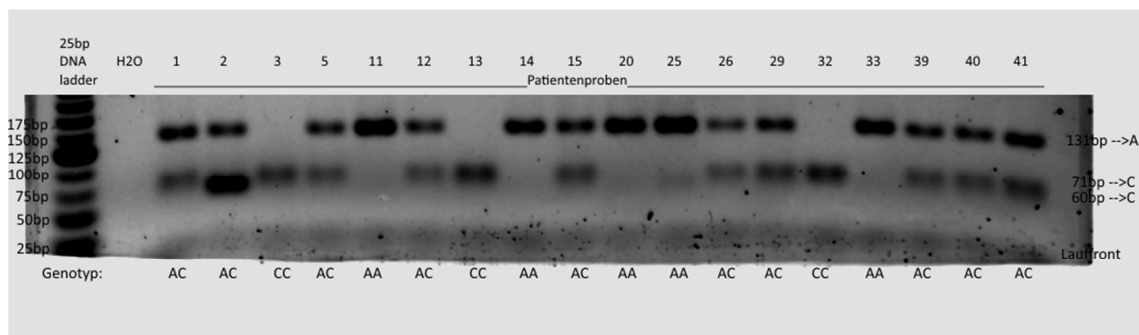


Abbildung 9: Gelelektrophorese Bild des SNPs rs3816527 des Proteins *PTX3* D48A, Patientenproben Nr.1-41 aus Tübingen

A= Adenin, C=Cytosin; Genotypen: AA, AC, CC

Die Häufigkeiten der Genotypen beim SNP rs3816527 des Gens *PTX3* des Patientenkollektivs sind in *Tabelle 14* aufgelistet. Die Form AA kommt 28,2% vor, das Allel AC 52,1% und die Form CC bei 19,7% des Kollektivs.

Tabelle 14: PTX3 D48A (rs3816527) Allel-Häufigkeiten

Genotyp	Häufigkeit	Prozent
AA	149	28,2
AC	275	52,1
CC	104	19,7
Gesamtsumme	528	100,0

3.3 Befallstatus der Lungenerreger des Kollektivs

Der Erregerstatus wurde eingeteilt nach „nie diagnostiziert“, „frei von Kolonisation“, „intermittierender“ und „chronischer“ Befall.

Der Befall mit *P. aeruginosa* bei 40,5% und *Staphylokokkus aureus* bei 30,9% aller Patienten stellten die häufigsten bakteriellen chronischen Lungenerkrankungen dar. Der häufigste chronische Pilzbefall der Lunge fand durch *Aspergillus fumigatus* bei 15,9% aller Patienten statt. Bei 18,2% konnte allerdings schon ein intermittierender Befall durch diesen Pilz festgestellt werden. Die meisten Patienten waren frei von einer Kolonisation von *Candida albicans*, wenige waren chronisch befallen (4,9%).

Im Folgenden befinden sich tabellarische Auflistungen des Befallstatus der wichtigsten erhobenen Lungenerreger.

Tabelle 15: Befallstatus der erhobenen bakteriellen Erreger der CF-Patientenlungen des Kollektivs

Staph. aur. = *Staphylokokkus aureus*; *Staph. epidermidis* = *Staphylokokkus epidermidis*;
 *Bei manchen Grazer Patienten wurden nicht alle Lungenerreger bestimmt. Die Anzahl der fehlenden Patienten stellt diese dar.

		Anzahl	Gesamtanzahl_%
<i>P. aeruginosa</i> Status	nie	109	20,6%
	frei von Kolonisation	146	27,7%
	intermittierend	59	11,2%
	chronisch	214	40,5%
	Gesamtsumme	528	
<i>Staph.aur.</i> Status	nie	60	11,4%
	frei von Kolonisation	209	39,6%
	intermittierend	72	13,6%
	chronisch	163	30,9%
	Gesamtsumme	504*	
<i>Staph. epidermidis</i> Status	nie	383	72,5%
	frei von Kolonisation	37	7,0%
	intermittierend	0	0,0%
	chronisch	0	0,0%
	Gesamtsumme	420*	
<i>Haemophilus influenzae</i> Status	nie	227	43,0%
	frei von Kolonisation	194	36,7%
	intermittierend	47	8,9%
	chronisch	36	6,8%
	Gesamtsumme	504*	

Tabelle 16: Befallstatus der erhobenen Pilze und Hefen der CF-Patientenlungen des Kollektivs

*Bei manchen Grazer Patienten wurden nicht alle Lungenerreger bestimmt. Die Anzahl der fehlenden Patienten stellt diese dar.

		Anzahl	Gesamtanzahl_%
<i>Aspergillus fumigatus</i> Status	nie	178	33,7%
	frei von Kolonisation	170	32,2%
	intermittierend	96	18,2%
	chronisch	84	15,9%
	Gesamtsumme	528	
<i>Aspergillus flavus</i> Status	nie	377	71,4%
	frei von Kolonisation	37	7,0%
	intermittierend	6	1,1%
	chronisch	0	0,0%
	Gesamtsumme	420*	
<i>Candida albicans</i> Status	nie	86	16,3%
	frei von Kolonisation	274	51,9%
	intermittierend	34	6,4%
	chronisch	26	4,9%
	Gesamtsumme	420*	

3.4 Zusammenhang zwischen CARD9 S12N (rs4077515) und dem Status des Erregerbefalles

Mittels des Exakten Tests nach Fisher wurde nach signifikanten Unterschieden zwischen den drei möglichen Allelvarianten AA, AG und GG des SNPs rs4077515 und des Erregerstatus in CF-Patientenlungen gesucht. Die Erreger *P.aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans* wurden dabei beleuchtet. Zunächst wurde eine Einteilung des Erregerstatus nach „negativ“ und „positiv“ vorgenommen. Die durch diagnostische Verfahren ermittelten Befälle des Erregerstatus „nie“ und „frei von Kolonisation“ wurden hierbei als ein „negativer“ Erregerstatus gewertet. Ein „intermittierender Befall“ und „chronischer Befall“ wurden als „positiver“ Erregerstatus gewertet.

Zwischen dem Unterschied eines „negativen“ bzw. „positiven“ Erregerstatus bei *P. aeruginosa* und den Allelvarianten des SNPs rs4077515 ergab sich ein p-Wert von $p=0,128$. Zwischen *Aspergillus fumigatus* und rs4077515 wurde ein p-Wert von $p=0,254$ erhalten. Bei *Candida albicans* und rs4077515 betrug der p-Wert $p=0,012$. Da nicht bei allen Patienten der Status des Erregerbefalles mit *Candida albicans* ermittelt wurde, beinhaltet diese Testung nur 420 Patienten.

Somit konnte zwischen den Allelvarianten des SNPs rs4077515 bei den Status „negativ“ oder „positiv“ der Erreger *P. aeruginosa* und *Aspergillus fumigatus* kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

Bei den Allelvarianten des SNPs rs4077515 und *Candida albicans* war jedoch interessanterweise ein auffällig kleiner p-Wert zu finden. Es konnte gezeigt werden, dass CF-Patienten mit dem Genotyp GG signifikant häufiger einen Befall durch den Erreger *Candida albicans* aufwiesen, als CF-Patienten mit dem Genotyp AG oder AA.

In den *Tabelle 17, 18 und 19* befinden sich die Übersichten über den Zusammenhang zwischen dem SNP rs4077515 des Proteins CARD9 S12N und dem Befallstatus der Erreger, sowie die Ergebnisse des Exakten Tests nach Fisher.

Tabelle 17: Befallstatus *P. aeruginosa*- CARD9 S12N rs4077515; A: SNP-Anzahl pro Status, B: Exakter Test nach Fisher

- A) SNP-Allelvarianten: AA, AG, GG; „0-1“: „0“= es konnte nie ein Befall festgestellt werden, „1“= „frei von Kolonisation“. „0-1“ werden als negativer Status von *P.aeruginosa* gewertet; „2-3“: „2“= „intermittierender Befall“, „3“= „chronischer Befall“. „2-3“ werden als positiver Status von *P. aeruginosa* gewertet.
 B) Exakte Sig. (zweiseitig) = Signifikanz/ p-Wert

A

		<i>P. aeruginosa</i> Status				Gesamtsumme
		0-1 → negativ		2-3 → positiv		
		negativ		positiv		
		Anzahl	Anzahl als Zeilen%	Anzahl	Anzahl als Zeilen%	
CARD9 S12N rs4077515	AA	39	42,9%	52	57,1%	91
	AG	132	46,5%	152	53,5%	284
	GG	84	54,9%	69	45,1%	153
Gesamtsumme		255	48,3%	273	51,7%	528

B

	Wert	Exakte Sig. (zweiseitig)
Exakter Test nach Fisher	4,110	0,128
Anzahl der gültigen Fälle	528	

**Tabelle 18: Befallstatus *Aspergillus fumigatus*- CARD9 S12N rs4077515;
A: SNP-Anzahl pro Status, B: Exakter Test nach Fisher**

- A) SNP-Allelvarianten: AA, AG, GG; „0-1“: „0“= es konnte „nie“ ein Befall festgestellt werden, „1“= „frei von Kolonisation“. „0-1“ werden als negativer Status von *Aspergillus fumigatus* gewertet; „2-3“: „2“= „intermittierender Befall“, „3“= „chronischer Befall“. „2-3“ werden als positiver Status von *Aspergillus fumigatus* gewertet.
- B) Exakte Sig. (zweiseitig) = Signifikanz/ p-Wert

A

		<i>Aspergillus fumigatus</i> Status				Gesamtsumme
		0-1 → negativ		2-3 → positiv		
		negativ		positiv		
		Anzahl	Anzahl als Zeilen%	Anzahl	Anzahl als Zeilen%	
CARD9 S12N rs4077515	AA	59	64,8%	32	35,2%	91
	AG	180	63,4%	104	36,6%	284
	GG	109	71,2%	44	28,8%	153
Gesamtsumme		348	65,9%	180	34,1%	528

B

	Wert	Exakte Sig. (zweiseitig)
Exakter Test nach Fisher	2,803	0,254
Anzahl der gültigen Fälle	528	

Tabelle 19: Befallstatus *Candida albicans*- CARD9 S12N rs4077515; A: SNP-Anzahl pro Status, B: Exakter Test nach Fisher

- A) SNP-Allelvarianten: AA, AG, GG; „0-1“: „0“= es konnte „nie“ ein Befall festgestellt werden, „1“= „frei von Kolonisation“. „0-1“ werden als negativer Status von *Candida albicans* gewertet; „2-3“: „2“= „intermittierender Befall“, „3“= „chronischer Befall“. „2-3“ werden als positiver Status von *Candida albicans* gewertet.
- B) Exakte Sig. (zweiseitig) = Signifikanz/ p-Wert; *=innerhalb des Signifikanzniveaus $\alpha=0,05$ (5%)

A

			<i>Candida albicans</i> Status		Gesamtsumme
			0-1 → negativ 2-3 → positiv		
			negativ	positiv	
CARD9 S12N rs4077515	AA	Anzahl	56	9	65
		Anzahl_%	86,2%	13,8%	100,0%
		Standardresiduum	0,0	-0,1	
	AG	Anzahl	214	25	239
		Anzahl_%	89,5%	10,5%	100,0%
		Standardresiduum	0,6	-1,6	
	GG	Anzahl	90	26	116
		Anzahl_%	77,6%	22,4%	100,0%
		Standardresiduum	-0,9	2,3	
Gesamtsumme		Anzahl	360	60	420
		Anzahl_%	85,7%	14,3%	100,0%

B

	Wert	Exakte Sig. (zweiseitig)
Exakter Test nach Fisher	8,689	0,012*
Anzahl der gültigen Fälle	420	

Um den auffällig kleinen p-Wert zwischen *Candida albicans* mit den Allelvarianten des SNPs rs4077515 genauer zu untersuchen wurde die Stärke des Erregerbefalls zusätzlich verglichen. Der Erregerstatus teilte sich nun in die Stärke der Befallsrate „nie“, „frei von Kolonisation“, „intermittierender Befall“ und „chronischer Befall“ ein.

Zwischen den Allelvarianten des SNPs rs4077515 und der Stärke des Erregerbefalls von *Candida albicans* berechnete sich der p-Wert erstaunlicherweise auf $p=0,081$. Dies überschreitet das Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ ($\alpha=5\%$) und ist damit als nicht signifikanter Zusammenhang zu werten. In *Tabelle 20* befindet sich eine Übersicht dessen.

Tabelle 20: Stärke der Befallsrate durch *Candida albicans*- CARD9 S12N rs4077515; A: SNP-Anzahl pro Status, B: Exakter Test nach Fisher

A) SNP-Allelvarianten: AA, AG, GG

B) Exakte Sig. (zweiseitig) = Signifikanz/ p-Wert

A

			Stärke des Befalls durch <i>Candida albicans</i>				Gesamtsumme
			nie	frei von Kolonisation	intermittierend	chronisch	
CARD9 S12N rs4077515	AA	Anzahl	10	46	4	5	65
		Anzahl_%	15,4%	70,8%	6,2%	7,7%	100,0%
	AG	Anzahl	55	159	14	11	239
		Anzahl_%	23,0%	66,5%	5,9%	4,6%	100,0%
	GG	Anzahl	21	69	16	10	116
		Anzahl_%	18,1%	59,5%	13,8%	8,6%	100,0%
Gesamtsumme		Anzahl	86	274	34	26	420
		Anzahl_%	20,5%	65,2%	8,1%	6,2%	100,0%

B

	Wert	Exakte Sig. (zweiseitig)
Exakter Test nach Fisher	11,043	0,081
Anzahl der gültigen Fälle	420	

3.5 Zusammenhang zwischen CARD9 S12N (rs4077515) und der Lungenfunktion

FEV_{1(mean)} und der Slope¹ beinhalten diagnostische Werte, die Aussagen über die Lungenfunktion von Patienten zulassen.

Um einen Zusammenhang zwischen dem SNP rs4077515 und FEV_{1(mean)} oder dem Slope zu finden, wurden diese Merkmale zunächst auf Normalverteilung geprüft. Da die Normalverteilung negativ ausgefallen war, bei der großen Fallzahl von 495 Patienten bei FEV_{1(mean)}, und 418 Patienten beim Slope aber mit einer Normalverteilung gerechnet werden darf, werden im Folgenden beide Ergebnisse aufgezeigt. Für die Annahme, dass die Daten aus einer Normalverteilung stammen, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Für die Annahme keiner Normalverteilung wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test gerechnet.

Da einige Patienten zu jung für eine FEV₁- Messung waren, beinhaltet diese Testung des Zusammenhangs zwischen FEV_{1(mean)} und den SNPs nur 495 Patienten. Da der Slope sich auf mehrere FEV_{1(mean)}-Werte bezieht und bei manchen Patienten zusätzlich keine Langzeitdaten vorhanden waren, beinhaltet die Testung des Zusammenhangs zwischen dem Slope und den SNPs nur 418 Patienten.

Zwischen dem SNP rs4077515 und FEV_{1(mean)} ergaben sich die p-Werte $p= 0,766$ (FEV_{1(mean)} ist normalverteilt) und $p= 0,589$ (FEV_{1(mean)} ist nicht normalverteilt). Zwischen dem SNP rs4077515 und dem Slope betragen die p-Werte $p= 0,424$ (Slope ist normalverteilt) und $p= 0,49$ (Slope ist nicht normalverteilt). Somit konnte kein signifikanter Zusammenhang weder zwischen dem SNP rs4077515 und FEV_{1(mean)}, noch zwischen dem SNP rs4077515 und dem Slope festgestellt werden. Auch ein direkter Einfluss des SNPs rs4077515 auf die Lungenfunktion kann dadurch nicht bestätigt werden.

¹ Slope gibt hier die Veränderung der Lungenfunktion anhand der Differenzen des FEV_{1(mean)} im Langzeitverlauf an. Er berechnet sich wie folgt:
 Slope = FEV_{1(mean)}[letzte Untersuchung] – FEV_{1(mean)}[vorletzte Untersuchung]

In den *Tabellen 21-24* befindet sich eine Übersicht der Ergebnisse der ANOVA und Kruskal-Wallis Teste des $FEV_{1(\text{mean})}$ bzw. des Slopes in Zusammenhang mit rs4077515.

Tabelle 21: ANOVA; $FEV_{1(\text{mean})}$ - CARD9 S12N rs4077515

Testung bei der Annahme, dass $FEV_{1(\text{mean})}$ normalverteilt ist; Gruppen= Allele AA, AG, GG; df= engl. degrees of freedom(=Freiheitsgrade); F= F-Wert (Teststatistik); Sig.= Signifikanz/ p-Wert

	Quadrat-summe	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Zwischen Gruppen	392,639	2	196,320	0,267	0,766
Innerhalb der Gruppen	361380,753	492	734,514		
Gesamtsumme	361773,393	494			

Tabelle 22: Kruskal-Wallis Test; $FEV_{1(\text{mean})}$ - CARD9 S12N rs4077515

Testung bei der Annahme, dass $FEV_{1(\text{mean})}$ nicht normalverteilt ist; df= engl. degrees of freedom(=Freiheitsgrade); Asymp. Sig.= Signifikanz/ p-Wert

	$FEV_{1(\text{mean})}$
Chi-Quadrat	1,060
df	2
Asymp. Sig.	0,589

Tabelle 23: ANOVA; Slope- CARD9 S12N rs4077515

Testung bei der Annahme, dass der Slope normalverteilt ist; Gruppen= Allele AA, AG, GG; df= engl. degrees of freedom (=Freiheitsgrade); F= F-Wert (Teststatistik); Sig.= Signifikanz/ p-Wert

	Quadrat-summe	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Zwischen Gruppen	6,846	2	3,423	0,859	0,424
Innerhalb der Gruppen	1653,077	415	3,983		
Gesamtsumme	1659,923	417			

Tabelle 24: Kruskal-Wallis Test; Slope- CARD9 S12N (rs4077515)

Testung bei der Annahme, dass der Slope nicht normalverteilt ist; df= engl. degrees of freedom (=Freiheitsgrade); Asymp. Sig.= Signifikanz/ p-Wert

	Slope
Chi-Quadrat	2,832
df	2
Asymp. Sig.	0,243

3.6 Zusammenhang zwischen PTX3 D48A (rs3816527) und dem Status des Erregerbefalls

Auch beim SNP rs3816527 des Proteins PTX3 D48A wurde nach einem Zusammenhang zwischen diesen SNPs und dem Erregerbefall der Lunge bei CF-Patienten gesucht. Es wurde, wie beim vorherigen SNP, nach signifikanten Unterschieden zwischen den Allelvarianten AA, AC, CC des SNPs rs3816527 und den Erregern *P. aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* sowie *Candida albicans* gesucht. Die Einteilung erfolgte wieder in einen „negativen“ und einen „positiven“ Erregerstatus. In der Gruppe des „negativen“ Erregerbefalls wurden alle Patienten eingeteilt, bei denen „nie“ dieser Erreger diagnostiziert werden konnte und alle Patienten, die „frei von einer Kolonisation“ waren. Die Gruppe des „positiven“ Erregerbefalls beinhaltete alle Patienten, die von einem „intermittierenden“ oder „chronischen“ Befall des Erregers betroffen waren.

Laut dem Exakten Test nach Fisher ergab sich zwischen *P. aeruginosa* und den Allelvarianten des SNPs rs3816527 ein p-Wert von $p=0,139$. Zwischen *Aspergillus fumigatus* und rs3816527 betrug der p-Wert $p=0,422$ und zwischen *Candida albicans* und rs3816527 wurde ein p-Wert von $p=0,374$ erhalten.

Das lässt auf keinen signifikanten Unterschied zwischen den Allelvarianten AA, AC und CC des SNPs rs3816527 und den Erregern *P. aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* oder *Candida albicans* schließen.

In den *Tabellen 25-27* befindet sich eine Übersicht über den Zusammenhang zwischen dem SNP rs3816527 des Proteins CARD9 S12N und dem Befallstatus der Erreger, sowie die Ergebnisse des Exakten Tests nach Fisher.

Tabelle 25: Befallstatus *P. aeruginosa*- PTX3 D48A rs3816527; A: SNP-Anzahl pro Status, B: Exakter Test nach Fisher

- A) SNP-Allelvarianten: AA, AC, CC; „0-1“: „0“= es konnte „nie“ ein Befall festgestellt werden, „1“= „frei von Kolonisation“. „0-1“ werden als negativer Status von *P.aeruginosa* gewertet; „2-3“: „2“= „intermittierender Befall“, „3“= „chronischer Befall“. „2-3“ werden als positiver Status von *P. aeruginosa* gewertet.
 B) Exakte Sig. (zweiseitig) = Signifikanz/ p-Wert

A

		<i>P. aeruginosa</i> Status				Gesamtsumme
		0-1 → negativ		2-3 → positiv		
		negativ		positiv		
		Anzahl	Anzahl als Zeilen%	Anzahl	Anzahl als Zeilen%	
PTX3 D48A rs3816527	AA	62	41,6%	87	58,4%	149
	AC	142	51,6%	133	48,4%	275
	CC	51	49,0%	53	51,0%	104
Gesamtsumme		255	48,3%	273	41,7%	528

B

	Wert	Exakte Sig. (zweiseitig)
Exakter Test nach Fisher	3,917	0,139
Anzahl der gültigen Fälle	528	

Tabelle 26: Befallstatus *Aspergillus fumigatus*- PTX3 D48A rs3816527; A: SNP-Anzahl pro Status, B: Exakter Test nach Fisher

A) SNP-Allelvarianten: AA, AC, CC; „0-1“: „0“= es konnte „nie“ ein Befall festgestellt werden, „1“= „frei von Kolonisation“. „0-1“ werden als negativer Status von *Aspergillus fumigatus* gewertet; „2-3“: „2“= „intermittierender Befall“, „3“= „chronischer Befall“. „2-3“ werden als positiver Status von *Aspergillus fumigatus* gewertet.

B) Exakte Sig. (zweiseitig) = Signifikanz/ p-Wert

A

		<i>Aspergillus fumigatus</i> Status				Gesamtsumme
		0-1 → negativ		2-3 → positiv		
		negativ		positiv		
		Anzahl	Anzahl als Zeilen%	Anzahl	Anzahl als Zeilen%	
PTX3 D48A rs3816527	AA	92	61,7%	57	38,3%	149
	AC	187	68,0%	88	32,0%	275
	CC	69	66,3%	35	33,7%	104
Gesamtsumme		348	65,9%	180	34,1%	528

B

	Wert	Exakte Sig. (zweiseitig)
Exakter Test nach Fisher	1,701	0,422
Anzahl der gültigen Fälle	528	

Tabelle 27: Befallstatus *Candida albicans*- PTX3 D48A rs3816527; A: SNP-Anzahl pro Status, B: Exakter Test nach Fisher

- A) SNP-Allelvarianten: AA, AC, CC; „0-1“: „0“= es konnte „nie“ ein Befall festgestellt werden, „1“= „frei von Kolonisation“. „0-1“ werden als negativer Status von *Candida albicans* gewertet; „2-3“: „2“= „intermittierender Befall“, „3“= „chronischer Befall“. „2-3“ werden als positiver Status von *Candida albicans* gewertet.
 B) Exakte Sig. (zweiseitig) = Signifikanz/ p-Wert

A

		<i>Candida albicans</i> Status				Gesamtsumme
		0-1 → negativ		2-3 → positiv		
		negativ		positiv		
		Anzahl	Anzahl als Zeilen%	Anzahl	Anzahl als Zeilen%	
PTX3 D48A rs3816527	AA	101	86,3%	16	13,7%	117
	AC	185	83,7%	36	16,3%	221
	CC	74	90,2%	8	9,8%	82
Gesamtsumme		360	85,7%	60	14,3%	420

B

	Wert	Exakte Sig. (zweiseitig)
Exakter Test nach Fisher	2,029	0,374
Anzahl der gültigen Fälle	420	

3.7 Zusammenhang zwischen PTX3 D48A (rs3816527) und der Lungenfunktion

Um auch hier nach einem Zusammenhang zwischen dem SNP rs3816527 des Proteins PTX3 D48A und der Lungenfunktion mittels $FEV_{1(\text{mean})}$ und dem Slope zu ermitteln, erfolgte die statistische Testauswahl wie beim vorherigen SNP (siehe *Kapitel 3.4*).

Zwischen $FEV_{1(\text{mean})}$ und den Allelvarianten des SNPs rs3816527 ergaben sich die p-Werte $p=0,738$ ($FEV_{1(\text{mean})}$ ist normalverteilt) und $p=0,795$ ($FEV_{1(\text{mean})}$ ist nicht normalverteilt). Zwischen dem Slope und rs3816527 betrug die p-Werte $p=0,386$ (Slope ist normalverteilt) und $p=0,243$ (Slope ist nicht normalverteilt). Somit konnte auch hier zwischen der Lungenfunktion und dem SNP rs3816527 des Proteins PTX3 D48A kein direkter signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

In den *Tabellen 28- 31* befindet sich eine Übersicht der Ergebnisse der ANOVA und Kruskal-Wallis Teste des $FEV_{1(\text{mean})}$ bzw. des Slopes in Zusammenhang mit rs3816527.

Tabelle 28: ANOVA; $FEV_{1(\text{mean})}$ - PTX3 D48A rs3816527

Testung bei der Annahme, dass $FEV_{1(\text{mean})}$ normalverteilt ist; Gruppen= AA, AC, CC; df= engl. degrees of freedom (=Freiheitsgrade); F= F-Wert (Teststatistik); Sig.= Signifikanz/ p-Wert

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Zwischen Gruppen	445,023	2	222,512	0,303	0,739
Innerhalb der Gruppen	361328,370	492	734,407		
Gesamtsumme	361773,393	494			

Tabelle 29: Kruskal-Wallis Test; FEV_{1(mean)}- PTX3 D48A rs3816527

Testung bei der Annahme, dass FEV_{1(mean)} nicht normalverteilt ist; df= engl. degrees of freedom (=Freiheitsgrade); Asymp. Sig.= Signifikanz/ p-Wert

	FEV_{1(mean)}
Chi-Quadrat	0,458
df	2
Asymp. Sig.	0,795

Tabelle 30: ANOVA; Slope - PTX3 D48A rs3816527

Testung bei der Annahme, dass der Slope normalverteilt ist; Gruppen= AA, AC, CC; df= engl. degrees of freedom (=Freiheitsgrade); F= F-Wert (Teststatistik); Sig.= Signifikanz/ p-Wert

	Quadrat-summe	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Zwischen Gruppen	7,602	2	3,801	0,955	0,386
Innerhalb der Gruppen	1652,322	415	3,981		
Gesamtsumme	1659,923	417			

Tabelle 31: Kruskal-Wallis Test; Slope- PTX3 D48A rs3816527

Testung bei der Annahme, dass FEV_{1(mean)} nicht normalverteilt ist; df= engl. degrees of freedom (=Freiheitsgrade); Asymp. Sig.= Signifikanz/ p-Wert

	Slope
Chi-Quadrat	2,832
df	2
Asymp. Sig.	0,243

4. Diskussion

Wie in *Kapitel 1.2* beschrieben, wurde gezeigt, dass in etwa 50% *modifier genes* für die Lungenerkrankung bei CF-Patienten verantwortlich gemacht werden (Collaco et al., 2010).

Um die vielen unbekanntenen Ursachen der CF-Lungenerkrankung weiter zu erforschen, wurden in dieser Arbeit die Genotypverteilungen der SNPs rs4077515 des *CARD9*-Gens und rs3816527 des *PTX3*-Gens bei insgesamt 528 CF-Patienten aus Deutschland und Österreich untersucht. Außerdem wurde nach einem Zusammenhang zwischen diesen SNPs und dem Erregerbefall der Lunge geforscht. Dabei wurde der Befall mit *P. aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans* betrachtet. Des Weiteren wurde nach einem Zusammenhang zwischen den SNPs und der Lungenfunktion mittels $FEV_{1(\text{mean})}$ und dem Slope gesucht.

Die Häufigkeiten der Genotypen entsprachen bei beiden Genen den Verteilungshäufigkeiten in der Normalbevölkerung.

Bei rs4077515 des *CARD9*-Gens wurde herausgefunden, dass Patienten mit dem Allel GG signifikant häufiger an *Candida albicans* erkrankten, als Patienten mit dem Genotyp AG oder AA ($p=0,012$). Bei der Befallsstärke in der Lunge durch *Candida albicans* war jedoch keine Abhängigkeit von rs4077515 erkennbar. Ebenfalls weder zwischen dem SNP und dem Befall durch die Erreger *P. aeruginosa* oder *Aspergillus fumigatus*, noch zwischen rs4077515 und $FEV_{1(\text{mean})}$ oder dem Slope wurde ein Zusammenhang festgestellt.

Zwischen dem SNP rs3816527 des *PTX3*-Gens und dem Lungenbefall durch die gleichen Erreger wie bei *CARD9* ist ferner kein Zusammenhang erkennbar. Genauso wenig konnte eine Beeinflussung zwischen rs3816527 und der Lungenfunktion anhand von $FEV_{1(\text{mean})}$ und dem Slope gefunden werden.

4.1 Häufigkeiten der Genotypen

Bei CARD9 S12N rs4077515 zeigte sich die Form AA bei 17,2%, das Allel AG bei 53,8% und die Form GG bei 29% der CF-Patienten. Das entspricht in etwa der Verteilung in der europäischen Normalbevölkerung, welche in einer Studie mit 226 Probanden mit AA 22%, AG 52% und GG 26% angegeben wurde (NCBI, Zugriff 20.07.2015b).

Auch bei *PTX3* rs3816527 entsprachen die Häufigkeiten der Genotypen der CF-Patienten (AA 28,2%, AC 52,1%, CC 19,7%) in etwa der Häufigkeitsverteilung der Normalbevölkerung (AA 33%, AC 47%, CC 20%).

Somit konnten keine großen Unterschiede der Genotyphäufigkeiten der untersuchten SNPs zwischen CF-Patienten und der Normalbevölkerung festgestellt werden.

4.2 Befallstatus der Lungenerreger

Das Patientenkollektiv dieser Arbeit wies zu 51,7% einen Lungenbefall durch *P. aeruginosa*, zu 44,5% durch *Staphylokokkus aureus*, 34,1% durch *Aspergillus fumigatus* und zu 11,3% durch *Candida albicans* auf. Durch das weitaus größere Patientenkollektiv konnten hiermit die Ergebnisse einer Studie von Muhlebach und Mitarbeitern bestätigt und verfestigt werden: *P. aeruginosa* und *Staphylokokkus aureus* gehören zu den häufigsten bakteriellen Lungenerregern bei CF-Patienten (Muhlebach et al., 1999). Ferner berichten Nagano und Mitarbeiter in einer Arbeit über die Untersuchung des Lungenbefalls durch Pilze und Hefen bei der Erkrankung Zystische Fibrose. Bei einem Kollektiv von 77 CF-Patienten zeigten 58% einen Befall durch *Candida albicans*. Dies ist bei weitem eine größere Befallsrate, als unser Kollektiv aufwies. Die unterschiedlich hohe Befallsrate könnte daran liegen, dass innerhalb der Studie von Nagano et al. 32% der untersuchten Patienten aufgrund von akuten pulmonalen Exazerbationen das Krankenhaus aufsuchten.

Im Gegensatz dazu handelte es sich bei den Daten des Kollektivs dieser Arbeit um diagnostische Daten aus Routineuntersuchungen. Genauso unterschied

sich auch der Altersmedian, welcher bei Nagano *et al.* 28,5 Jahre und bei dieser Studie 19 Jahre betrug (Nagano *et al.*, 2010).

In anderen Studien divergieren die Befallsraten durch *Candida albicans* bei CF-Patienten ebenfalls. In einer Studie von Wahab *et al.* wurde eine Befallsrate von 15% angegeben. Dort wird aufgezeigt, dass früher *Candida dubliniensis* fälschlicherweise ebenfalls als *Candida albicans* diagnostiziert wurde und dies zu den hohen Befallsraten geführt haben könnte (Wahab *et al.*, 2014).

Die Befallsrate durch *Aspergillus fumigatus* variiert laut unterschiedlichen Studien zwischen 5,2 – 57% (Nagano *et al.*, 2010, Bakare *et al.*, 2003, Nelson *et al.*, 1979, Schonheyder *et al.*, 1985, Burns *et al.*, 1998). Diese Unterschiede könnten, wie schon in einer Arbeit von Bakare und Mitarbeitern beschrieben, auf verschiedene Altersspannen oder Klimaunterschiede zurückzuführen sein (Bakare *et al.*, 2003).

Demzufolge ist der Befall der Lungenerreger bei den CF-Patienten dieser Arbeit mit vorherigen Studien vergleichbar und Unterschiede nachvollziehbar. Dadurch können auch die weiteren erhobenen Daten über die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Genotypen der SNPs und dem Erregerbefall der Lunge, auf andere an Zystischer Fibrose erkrankten Patienten übertragen werden.

4.3 rs4077515 des *CARD9*-Gens

Das Adapterprotein *CARD9* gehört zum System der angeborenen Immunabwehr (siehe *Kapitel 1.3*) (Hsu *et al.*, 2007, Glocker *et al.*, 2009). Genmutationen oder Umweltfaktoren können zu einer unphysiologischen Aktivierung des *CARD9*-Gens und dadurch zu einer pathologischen Immunzellaktivierung führen. Diese kann inflammatorische Erkrankungen oder eine veränderte Infektionsanfälligkeit verursachen (Ruland, 2008).

In dieser Arbeit wurde der SNP rs4077515 des *CARD9*-Gens untersucht. CF-Patienten mit dem Genotyp GG des *CARD9*-Gens wiesen signifikant häufiger einen Erregerbefall durch *Candida albicans* in der Lunge auf, als CF-Patienten

mit dem Genotyp AG oder AA ($p= 0,012$). Somit stellt die missense-Mutation von der Base G zu A und dem dadurch bedingten Wechsel der Aminosäure von Serin zu Asparagin, einen gewissen Schutz vor *Candida albicans* dar.

Es wurde herausgefunden, dass nur die Tatsache ob eine Neigung zu einem Befall vorliegt oder nicht, ausschlaggebend ist. Der Genotyp beeinflusst die Stärke (Ausmaß) des *Candida albicans* Befalles jedoch nicht. Zur Erklärung dieses Sachverhalts kann die Studie von Pointon *et al.* einen Beitrag leisten. Sie haben herausgefunden, dass der SNP rs4077515 mit dem Expressionslevel des Proteins CARD9 assoziiert ist ($p= 4,6 \times 10^{-14}$). Demnach würde der Genotyp GG zu einem erniedrigten CARD9-Proteinspiegel in den Zellen führen. Der Schluss liegt dadurch nahe, dass aufgrund eines erniedrigten CARD9-Proteinspiegels nicht alle *Candida albicans* Hefen erkannt werden, somit nur niederschwellige inflammatorische Antworten erfolgen und als Konsequenz zu einer erhöhten Befallsrate führen. In der Studie von Pointon *et al.* wird unzureichend klar, welcher Genotyp mit einem erhöhten und welcher mit einem niedrigen Expressionslevel einhergeht. Es wurden innerhalb der gleichen Studie viele SNPs betrachtet. Bei der genauen Berichterstattung im *Paper* wurden aber Abstriche gemacht (Pointon *et al.*, 2010). Mittels multipler Tests könnten zusätzlich falsch positive Ergebnisse entstanden sein. Ob die Erkenntnis über die Funktion des SNPs rs4077515 im *CARD9*-Gen von Pointon *et al.* reproduzierbar ist, wäre eine weitere Studie wert.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen fanden Rosentul und Mitarbeiter keine Beeinflussung der *Candida albicans* Infektion durch den SNP rs4077515 des *CARD9*-Gens. Allerdings unterschied sich der im Blut kultivierte *Candida albicans*-Befall bei *CFTR*-Gen gesunden Patienten ihrer Studie, mit dem diagnostizierten lokalen Lungenbefall bei CF-Patienten dieser vorliegenden Arbeit.

Ihre Studie beinhaltete 331 Patienten, welche eine Candidämie hatten, und 351 Patienten zur Kontrolle, bei denen kein Blutbefall nachweisbar war (Rosentul *et al.*, 2011). Eine Candidämie stellt einen stark invasiven Befall dar, sodass dies wiederum die oben beschriebenen Ergebnisse bekräftigt. Der Genotyp kann

allein für die Erkrankungsneigung, nicht jedoch für die Stärke des *Candida albicans*- Befalls verantwortlich gemacht werden.

Genauso wie *Candida albicans* enthalten *Aspergillus fumigatus* und *P. aeruginosa* in der Zellmembran β -Glukan, das über einen Signalweg von CARD9 erkannt wird (Lequette et al., 2007, De Vlieger et al., 2011, Ruland, 2008, Mezger et al., 2008). Eine Assoziation zwischen *Aspergillus fumigatus* oder *P. aeruginosa* und dem SNP rs4077515 des CARD9-Gens konnte in dieser Arbeit allerdings nicht gefunden werden. Dies wirft abermals die Frage nach der genauen Funktion von rs4077515 im CARD9-Gen auf, welche noch nicht vollständig erforscht wurde. Obwohl es bei diesem SNP zu einem Aminosäurewechsel von Serin zu Asparagin kommt und in einem Exon (Exon 12) lokalisiert ist, könnte es sein, dass er nur minimale Auswirkungen auf die Proteinstruktur und somit auch auf die Funktion ausübt. Dagegen sprechen würde, dass sich die beiden polaren Aminosäuren Serin und Asparagin in ihrer Größe und der Hydrophobizität und damit auch ihrer Interaktionen im Protein unterscheiden (Rosentul et al., 2011, NCBI, Zugriff 20.07.2015b, Löffler et al., 2007).

Auch zwischen der Lungenfunktion und dem SNP rs4077515 ergab sich kein signifikanter Zusammenhang. Eine weitere Studie, ob sich *Candida albicans* auf $FEV_{1(\text{mean})}$ und den Slope bei CF-Patienten auswirkt, könnte zur Klärung beitragen.

4.4 rs3816527 des PTX3-Gens

PTX3 gehört zu den Akute-Phase Proteinen und somit zum angeborenen Immunsystem. Als Muster erkennender Rezeptor (Pattern Recognition Particle= PRR) erkennt PTX3 molekulare Strukturen von Pathogenen, bindet sie, aktiviert das Komplementsystem und bewirkt eine Beseitigung dieser durch Makrophagen (siehe *Kapitel 1.4*) (Garlanda et al., 2002, Bottazzi et al., 1997).

Beispielhafte Pathogene, welche auch eine große Rolle in der Krankheitsentwicklung bei CF-Patienten spielen, wären *P. aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*

und das in Hefen befindliche Zymosan (Garlanda et al., 2002, Chiarini et al., 2010, Diniz et al., 2004). Deshalb wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen diesen Erregern und dem SNP rs3816527 des *PTX3*-Gens untersucht.

Es konnte keine signifikante Beeinflussung auf den Erregerbefall von *P. aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* oder *Candida albicans* durch die verschiedenen Genotypen des SNPs rs3816527 des Gens *PTX3* bei CF-Patienten festgestellt werden. Genauso wenig wurde ein Zusammenhang zwischen diesem SNP und der Lungenfunktion anhand $FEV_{1(\text{mean})}$ und dem Slope herausgefunden. Auch schon Chiarini et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen rs3816527 und FEV_1 belegen (Chiarini et al., 2010).

Bei einer Fallzahl von 127 kaukasischen CF-Patienten wurde in einer Studie beschrieben, dass CF-Patienten mit dem Genotyp C des SNPs rs3816527 des Gens *PTX3* signifikant häufiger eine chronische Infektion mit *P. aeruginosa* aufwiesen, als CF-Patienten mit dem Genotyp A ($p=0,038$). Diese statistische Signifikanz wurde allerdings nach einem Permutationstest, wegen multiplen Tests innerhalb der Studie, wieder aufgehoben (Chiarini et al., 2010). Auch in dieser Arbeit konnte bei einer größeren Fallzahl von 520 CF-Patienten kein Zusammenhang zwischen *P. aeruginosa* und dem SNP rs3816527 bestätigt werden.

Ein weiterer Teil der Studie Chiarinis et al. befasste sich mit dem haploiden Genotyp $G_1\text{-A-G}_2$ des *PTX3*-Gens, bei dem die Base A den SNP rs3816527 darstellt ($G_1=rs2305619$, $A=rs3816527$, $G_2=rs1840680$). Es zeigte sich, dass Patienten mit dem haploiden Genotyp G-A-G signifikant weniger an *P.aeruginosa* erkrankt waren, als Patienten mit dem haploiden Genotyp A-C-A oder A-A-A (Chiarini et al., 2010). Außerdem wurde über den protektiven Effekt des haploiden Genotyps G-A-G, an pulmonaler Tuberkulose zu erkranken, berichtet (Olesen et al., 2007). Dies lässt vermuten, dass die SNPs rs2305619, rs3816527 und rs1840680 des *PTX3*-Gens gemeinsam einen Einfluss auf die Funktion des *PTX3*-Proteins haben.

In einem Mausmodell zeigte sich, dass bei einer pulmonalen Aspergillose Mäuse, die eine hohe Konzentration an PTX3-Proteinen erhielten, signifikant resistenter gegenüber dem Erreger waren (Gaziano et al., 2004). Dies lässt auf eine wichtige Rolle des PTX3-Proteins in der Abwehr gegen *Aspergillus fumigatus* schließen. Gegenteilig dazu zeigten die Genotypen des SNP rs3816527 des PTX3-Gens bei CF-Patienten in dieser Arbeit allerdings keinen Einfluss auf den *Aspergillus fumigatus*-Befall der Lunge. Es könnte angenommen werden, dass die vom Körper gebildete PTX3-Proteinkonzentration bei CF-Patienten niedriger ist, als die zugeführte Proteinkonzentration bei Mäusen der erwähnten Studie. Eine weitere Überlegung wäre, dass rs3816527 keine entscheidende Rolle in der Funktion des PTX3-Proteins spielt.

Zyмосan kommt in der Zellmembran von Hefen wie zum Beispiel *Candida albicans* vor. Obwohl sich PTX3 an Zyмосan bindet (Diniz et al., 2004), konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen dem SNP rs3816527 des *PTX3*-Gens bei CF-Patienten und dem Befall von *Candida albicans* gefunden werden. Garlanda und Mitarbeiter fanden heraus, dass Konidien der Hefe *Candida albicans* bei Mäusen nicht von PTX3 gebunden werden (Garlanda et al., 2002). Das lässt die Hypothese zu, dass PTX3 auch beim Menschen *Candida albicans* nicht bindet und somit nicht für dessen Inaktivierung sorgt.

Die genaue Funktion des in dieser Arbeit untersuchten SNPs rs3816527 im PTX3-Protein wurde bislang noch nicht hinreichend erforscht. Im SNP rs3816527 des *PTX3*-Gens findet durch die Basenveränderung C zu A ein Aminosäurewechsel von Alanin zu Asparagin statt. Das ist ein Austausch von einer apolaren zu einer polaren Aminosäure, welche sich in ihrer Größe und Hydrophobizität sehr unterscheiden. Ob dies einen Einfluss auf die Funktion des PTX3-Proteins spielt, ist aber ebenfalls noch nicht geklärt (Löffler et al., 2007).

4.5 Kritische Betrachtung der Heterogenität der Patienten

Die Ergebnisse sowie ihre Interpretation sollten unter Betrachtung der Stärken und Schwächen dieser Studie erfolgen.

Die verwendeten Patientendaten stellen die jeweils zuletzt erhobenen Werte dar. Sie wurden in den CF-Zentren Graz, München und Tübingen dokumentiert. Da die Dokumentation der Patientendaten verschiedenen Zentren und damit auch vielen verschiedenen Ärzten unterlag, könnten trotz Leitlinien gerechtem Vorgehen Differenzen nicht sicher ausgeschlossen werden. In Graz zum Beispiel wurde nicht bei allen Patienten der *Candida albicans* Status geprüft.

Ein weiterer limitierender Faktor ist, dass beim Patientenkollektiv eine große Spannweite des Alters vertreten war. Der älteste CF-Patient wurde 1954 geboren, der Jüngste 2013. Dies ist ein langer Zeitraum, in dem sich in der Diagnostik und Therapie der Zystischen Fibrose viel getan hat.

Das *CFTR*-Gen wurde zum Beispiel erst 1989 entdeckt. Anfangs wurde geglaubt, dass die vielen Lungeninfektionen nur eine Folge der CF-Erkrankung sind, nicht jedoch dadurch bedingt werden. Nach und nach kamen neue Therapien zur Verbesserung der Obstruktionen der Luftwege sowie der Behandlung von Lungeninfektionen hinzu (Davis, 2006). Demnach ist der Vergleich der Genotypen der SNPs in der Zusammenschau der durchschnittlichen Lungenfunktion der älteren sowie jüngeren CF-Patienten kritisch zu betrachten.

Auch der Ernährungszustand der CF-Patienten variierte. Es kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass der Ernährungszustand nicht ebenfalls die Erregeranfälligkeit und Lungenfunktion beeinflusst.

Der Anteil an weiblichen und männlichen Patienten war hingegen ausgeglichen. Die häufigste *CFTR*-Mutation delF508 in der kaukasischen Bevölkerung stellte auch bei den CF-Patienten dieses Kollektivs den größten Anteil dar (siehe Kapitel 2.1.1).

In zukünftigen Studien könnte man -zur Minimierung der Patientenheterogenität- nur eine bestimmte Altersgruppe untersuchen, die in der Vergangenheit

vergleichbare Diagnostiken und Therapien wahrnehmen konnten. Eine prospektive Studienkonzeption mit standardisierten Probenentnahmen der Lungenerreger für eine longitudinale Datenanalyse könnte darüber hinaus zu einer Verbesserung der Vergleichbarkeit führen.

4.6 Ausblick

Wodurch die unterschiedliche Schwere der Lungenerkrankung bei CF-Patienten beeinflusst wird, ist derzeit Bestandteil vieler Forschungen. Diese Arbeit kommt zu dem Schluss, dass rs4077515 des Gens *CARD9* mit dem *Candida albicans* Befall in der Lunge assoziiert ist. Ein Zusammenhang zwischen *P. aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* sowie der Lungenfunktion und den beiden untersuchten SNPs konnte nicht gefunden werden. Genauso wenig wurde ein Zusammenhang zwischen rs3816515 des *PTX3*-Gens und *Candida albicans* erkannt. Bei CF-Patienten entsprechen die Häufigkeiten der Genotypen der SNPs rs4077515 des *CARD9*-Gens und rs3816515 des *PTX3*-Gens den Genotyphäufigkeiten der Normalbevölkerung.

Falls der Lungenbefall durch *Candida albicans* einen entscheidenden Einfluss auf die Lungenfunktion oder Exazerbationen und damit auch auf die Erkrankungsstärke bei CF-Patienten hat, könnte die Erkenntnis, dass Patienten mit dem Genotyp GG des SNPs 4077515 des *CARD9*-Gens eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Candida albicans* besitzen, in neuen präventiven Überlegungen eine Rolle spielen. Es könnten bei GG-Trägern engmaschigere Kontrollen vorgenommen werden, um schnell therapeutisch gegen den Erreger vorgehen zu können.

Offen geblieben ist, welche genaue Funktion die untersuchten SNPs im jeweiligen Protein spielen. Dies könnte weiterführend untersucht werden. Interessant wäre hierbei, ob diese eine Auswirkung auf die Proteinkonzentration ihres Gens haben. Des Weiteren könnte bei Makrophagen von CF-Patienten unterschiedlicher Genotypen des SNP rs4077515 des *CARD9*-Gens, *in vitro* die Konzentra-

tion der ausgeschütteten Cytokine IL-6 oder TNF α nach Stimulation durch *Candida albicans* untersucht werden.

Die weitere Forschung an modifizierenden Genen, welche die Entstehung der Lungenerkrankung bei CF-Patienten beeinflussen ist unverzichtbar um die Erkrankung Zystische Fibrose noch besser zu verstehen und aus diesen Erkenntnissen gewinnbringende Therapien entwickeln zu können.

5. Zusammenfassung

Die Zystische Fibrose (CF) ist in der kaukasischen Bevölkerung die häufigste genetisch bedingte Stoffwechselerkrankung. Sie betrifft viele Organe, vor allem den Gastrointestinaltrakt und die Lunge. Die ursächliche Störung verursacht der defekte Chloridkanal Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). Die verschiedenen Ausprägungen der Erkrankung des Gastrointestinaltraktes, nicht jedoch der Lungenerkrankung, sind weitgehend auf Mutationen im *CFTR*-Gen zurückzuführen. Um die vielen unbekanntenen Ursachen der CF-Lungenerkrankung weiter zu erforschen, wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen zwei SNPs von modifizierenden Genen und der Lungenfunktion sowie dem Erregerbefall untersucht.

Die DNA von 528 CF-Patienten aus Deutschland und Österreich wurde mittels des Kits *QIAamp DNA Mini Kit* aus Vollblut extrahiert. Anhand der PCR, dem Restriktionsenzymverdau und der Agarosegelelektrophorese wurden die Genotypen der SNPs rs4077515 des *CARD9*-Gens und rs3816527 des *PTX3*-Gens ermittelt.

Bei CF-Patienten entsprechen die Häufigkeiten der Genotypen der SNPs rs4077515 des *CARD9*-Gens und rs3816515 des *PTX3*-Gens den Genotyphäufigkeiten der Normalbevölkerung.

Diese Arbeit legt nahe, dass die Genotypen des SNPs rs4077515 des Gens *CARD9* bei CF-Patienten den *C. albicans* Befall in der Lunge beeinflussen. Des Weiteren konnte kein Zusammenhang zwischen *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* sowie der Lungenfunktion anhand von $FEV_{1(\text{mean})}$ und dem Slope bei rs4977515 des *CARD9*-Gens bestätigt werden. Ferner konnte genauso wenig eine Beeinflussung durch den SNP rs3816515 des *PTX3*-Gens und den Lungenerregern *P.aeruginosa*, *A. fumigatus* und *C. albicans* bei CF-Patienten erkannt werden. Auch die Lungenfunktion blieb durch die Genotypen von rs3816515 unbeeinflusst.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde herausgefunden, dass eine Beeinflussung durch die Genotypen eines SNPs des modifizierenden Gens *CARD9* auf den *C. albicans* Befall in der Lunge von CF-Patienten vorliegt. Dieses Erkenntnis kann als Ausgangspunkt für weitere Studien dienen, die einen Zusammenhang

zwischen dem Erregerbefall durch *C. albicans* und der Lungenfunktion untersuchen. Gegebenenfalls könnten präventive oder frühzeitige Therapien bei genotypisch anfälligeren CF-Patienten für einen verbesserten Krankheitsverlauf sorgen.

6. Literaturverzeichnis

- AITKEN, M. L. (1995). Cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*, 1, 425-34.
- ALLES, V. V., BOTTAZZI, B., PERI, G., GOLAY, J., INTRONA, M. & MANTOVANI, A. (1994). Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood*, 84, 3483-93.
- AMIN, R., DUPUIS, A., AARON, S. D. & RATJEN, F. (2010). The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest*, 137, 171-6.
- ANDERSON, M. P., BERGER, H. A., RICH, D. P., GREGORY, R. J., SMITH, A. E. & WELSH, M. J. (1991). Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell*, 67, 775-84.
- BAKARE, N., RICKERTS, V., BARGON, J. & JUST-NUBLING, G. (2003). Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses*, 46, 19-23.
- BARBATI, E., SPECCHIA, C., VILLELLA, M., ROSSI, M. L., BARLERA, S., BOTTAZZI, B., CROCIATI, L., D'ARIENZO, C., FANELLI, R., GARLANDA, C., GORI, F., MANGO, R., MANTOVANI, A., MERLA, G., NICOLIS, E. B., PIETRI, S., PRESBITERO, P., SUDO, Y., VILLELLA, A. & FRANZOSI, M. G. (2012). Influence of Pentraxin 3 (PTX3) Genetic Variants on Myocardial Infarction Risk and PTX3 Plasma Levels. *PLoS ONE*, 7, e53030.
- BERTIN, J., GUO, Y., WANG, L., SRINIVASULA, S. M., JACOBSON, M. D., POYET, J. L., MERRIAM, S., DU, M. Q., DYER, M. J., ROBISON, K. E., DISTEFANO, P. S. & ALNEMRI, E. S. (2000). CARD9 is a novel caspase recruitment domain-containing protein that interacts with BCL10/CLAP and activates NF-kappa B. *J Biol Chem*, 275, 41082-6.
- BLACKMAN, S. M., COMMANDER, C. W., WATSON, C., ARCARA, K. M., STRUG, L. J., STONEBRAKER, J. R., WRIGHT, F. A., ROMMENS, J. M., SUN, L., PACE, R. G., NORRIS, S. A., DURIE, P. R., DRUMM, M. L., KNOWLES, M. R. & CUTTING, G. R. (2013). Genetic modifiers of cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes*, 62, 3627-35.
- BOTTAZZI, B., VOURET-CRAVIARI, V., BASTONE, A., DE GIOIA, L., MATTEUCCI, C., PERI, G., SPREAFICO, F., PAUSA, M., D'ETTORRE, C., GIANAZZA, E., TAGLIABUE, A., SALMONA, M., TEDESCO, F., INTRONA, M. & MANTOVANI, A. (1997). Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem*, 272, 32817-23.
- BREVIARIO, F., D'ANIELLO, E. M., GOLAY, J., PERI, G., BOTTAZZI, B., BAIROCH, A., SACCONI, S., MARZELLA, R., PREDAZZI, V., ROCCHI, M. & ET AL. (1992). Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem*, 267, 22190-7.
- BURNS, J. L., EMERSON, J., STAPP, J. R., YIM, D. L., KRZEWSKI, J., LOUDEN, L., RAMSEY, B. W. & CLAUSEN, C. R. (1998). Microbiology

- of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis*, 27, 158-63.
- CHENG, S. H., GREGORY, R. J., MARSHALL, J., PAUL, S., SOUZA, D. W., WHITE, G. A., O'RIORDAN, C. R. & SMITH, A. E. (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, 63, 827-34.
- CHIARINI, M., SABELLI, C., MELOTTI, P., GARLANDA, C., SAVOLDI, G., MAZZA, C., PADOAN, R., PLEBANI, A., MANTOVANI, A., NOTARANGELO, L. D., ASSAEL, B. M. & BADOLATO, R. (2010). PTX3 genetic variations affect the risk of *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients. *Genes Immun*, 11, 665-70.
- CIOFU, O. (2013). Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.*, 19, 251-258.
- CIOFU, O., HANSEN, C. R. & HOIBY, N. (2013). Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*, 19, 251-8.
- COLLACO, J. M., BLACKMAN, S. M., MCGREADY, J., NAUGHTON, K. M. & CUTTING, G. R. (2010). Quantification of the relative contribution of environmental and genetic factors to variation in cystic fibrosis lung function. *J Pediatr*, 157, 802-7 e1-3.
- CUTTING, G. R. (2015). Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet*, 16, 45-56.
- DAVIDSON, D. J. & PORTEOUS, D. J. (1998). Genetics and pulmonary medicine. 1. The genetics of cystic fibrosis lung disease. *Thorax*, 53, 389-97.
- DAVIES, J. C., TURNER, M. W. & KLEIN, N. (2004). Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated MBL-2 alleles. *Eur Respir J*, 24, 798-804.
- DAVIS, P. B. (2006). Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*, 173, 475-82.
- DE VLIJGER, G., LAGROU, K., MAERTENS, J., VERBEKEN, E., MEERSSEMANN, W. & VAN WIJNGAERDEN, E. (2011). Beta-D-glucan detection as a diagnostic test for invasive aspergillosis in immunocompromised critically ill patients with symptoms of respiratory infection: an autopsy-based study. *J Clin Microbiol*, 49, 3783-7.
- DINIZ, S. N., NOMIZO, R., CISALPINO, P. S., TEIXEIRA, M. M., BROWN, G. D., MANTOVANI, A., GORDON, S., REIS, L. F. & DIAS, A. A. (2004). PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J Leukoc Biol*, 75, 649-56.
- DONI, A., PERI, G., CHIEPPA, M., ALLAVENA, P., PASQUALINI, F., VAGO, L., ROMANI, L., GARLANDA, C. & MANTOVANI, A. (2003). Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. *Eur J Immunol*, 33, 2886-93.
- DORFMAN, R., SANDFORD, A., TAYLOR, C., HUANG, B., FRANGOLIAS, D., WANG, Y., SANG, R., PEREIRA, L., SUN, L., BERTHIAUME, Y., TSUI, L. C., PARE, P. D., DURIE, P., COREY, M. & ZIELENSKI, J. (2008). Complex two-gene modulation of lung disease severity in children with cystic fibrosis. *J Clin Invest*, 118, 1040-9.

- ELPHICK, H. E. & SOUTHERN, K. W. (2014). Antifungal therapies for allergic bronchopulmonary aspergillosis in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 11, CD002204.
- GARLANDA, C., HIRSCH, E., BOZZA, S., SALUSTRI, A., DE ACETIS, M., NOTA, R., MACCAGNO, A., RIVA, F., BOTTAZZI, B., PERI, G., DONI, A., VAGO, L., BOTTO, M., DE SANTIS, R., CARMINATI, P., SIRACUSA, G., ALTRUDA, F., VECCHI, A., ROMANI, L. & MANTOVANI, A. (2002). Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*, 420, 182-6.
- GAZIANO, R., BOZZA, S., BELLOCCHIO, S., PERRUCCIO, K., MONTAGNOLI, C., PITZURRA, L., SALVATORI, G., DE SANTIS, R., CARMINATI, P., MANTOVANI, A. & ROMANI, L. (2004). Anti-Aspergillus fumigatus efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 4414-21.
- GLOCKER, E. O., HENNIGS, A., NABAVI, M., SCHAFFER, A. A., WOELLNER, C., SALZER, U., PFEIFER, D., VEELKEN, H., WARNATZ, K., TAHAMI, F., JAMAL, S., MANGUIAT, A., REZAEI, N., AMIRZARGAR, A. A., PLEBANI, A., HANNESSCHLAGER, N., GROSS, O., RULAND, J. & GRIMBACHER, B. (2009). A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med*, 361, 1727-35.
- GOODRIDGE, H. S., SHIMADA, T., WOLF, A. J., HSU, Y. M., BECKER, C. A., LIN, X. & UNDERHILL, D. M. (2009). Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol*, 182, 1146-54.
- GROSS, O., GEWIES, A., FINGER, K., SCHAFER, M., SPARWASSER, T., PESCHEL, C., FORSTER, I. & RULAND, J. (2006). Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*, 442, 651-6.
- HARA, H., ISHIHARA, C., TAKEUCHI, A., IMANISHI, T., XUE, L., MORRIS, S. W., INUI, M., TAKAI, T., SHIBUYA, A., SAIJO, S., IWAKURA, Y., OHNO, N., KOSEKI, H., YOSHIDA, H., PENNINGER, J. M. & SAITO, T. (2007). The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 8, 619-29.
- HEROLD, G. (2013). Innere Medizin : eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. *Elsevier eLibrary*. Köln: [Selbstverl.].
- HIGHSMITH, W. E., BURCH, L. H., ZHOU, Z., OLSEN, J. C., BOAT, T. E., SPOCK, A., GORVOY, J. D., QUITTEL, L., FRIEDMAN, K. J., SILVERMAN, L. M. & ET AL. (1994). A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N Engl J Med*, 331, 974-80.
- HSU, Y. M., ZHANG, Y., YOU, Y., WANG, D., LI, H., DURAMAD, O., QIN, X. F., DONG, C. & LIN, X. (2007). The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol*, 8, 198-205.
- KEREM, B. S., ZIELENSKI, J., MARKIEWICZ, D., BOZON, D., GAZIT, E., YAHAV, J., KENNEDY, D., RIORDAN, J. R., COLLINS, F. S.,

- ROMMENS, J. M. & ET AL. (1990a). Identification of mutations in regions corresponding to the two putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 8447-51.
- KEREM, E., COREY, M., KEREM, B. S., ROMMENS, J., MARKIEWICZ, D., LEVISON, H., TSUI, L. C. & DURIE, P. (1990b). The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med*, 323, 1517-22.
- KHAN, T. Z., WAGENER, J. S., BOST, T., MARTINEZ, J., ACCURSO, F. J. & RICHES, D. W. (1995). Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 151, 1075-82.
- KRISTIDIS, P., BOZON, D., COREY, M., MARKIEWICZ, D., ROMMENS, J., TSUI, L. C. & DURIE, P. (1992). Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet*, 50, 1178-84.
- LANTERNIER, F., PATHAN, S., VINCENT, Q. B., LIU, L., CYPOWYJ, S., PRANDO, C., MIGAUD, M., TAIBI, L., AMMAR-KHODJA, A., BOUDGHENE STAMBOULI, O., GUELLIL, B., JACOBS, F., GOFFARD, J. C., SCHEPERS, K., DEL MARMOL, V., BOUSSOFARA, L., DENGUEZLI, M., LARIF, M., BACHELEZ, H., MICHEL, L., LEFRANC, G., HAY, R., JOUVION, G., CHRETIEN, F., FRAITAG, S., BOUGNOUX, M. E., BOUDIA, M., ABEL, L., LORTHOLARY, O., CASANOVA, J. L., PICARD, C., GRIMBACHER, B. & PUEL, A. (2013). Deep dermatophytosis and inherited CARD9 deficiency. *N Engl J Med*, 369, 1704-14.
- LEQUETTE, Y., ROLLET, E., DELANGLE, A., GREENBERG, E. P. & BOHIN, J. P. (2007). Linear osmoregulated periplasmic glucans are encoded by the opgGH locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153, 3255-63.
- LÖFFLER, G., PETRIDES, P. & HEINRICH, P. (2007). Biochemie und Pathobiochemie. *Springer*, 45-47.
- MAY, L., KUNINGAS, M., VAN BODEGOM, D., MEIJ, H. J., FROLICH, M., SLAGBOOM, P. E., MANTOVANI, A. & WESTENDORP, R. G. (2010). Genetic variation in pentraxin (PTX) 3 gene associates with PTX3 production and fertility in women. *Biol Reprod*, 82, 299-304.
- MEZGER, M., KNEITZ, S., WOZNIOK, I., KURZAI, O., EINSELE, H. & LOEFFLER, J. (2008). Proinflammatory response of immature human dendritic cells is mediated by dectin-1 after exposure to *Aspergillus fumigatus* germ tubes. *J Infect Dis*, 197, 924-31.
- MIDDLETON, P. G., CHEN, S. C. & MEYER, W. (2013). Fungal infections and treatment in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*, 19, 670-5.
- MUHLEBACH, M. S., STEWART, P. W., LEIGH, M. W. & NOAH, T. L. (1999). Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 160, 186-91.
- NAGANO, Y., ELBORN, J. S., MILLAR, B. C., WALKER, J. M., GOLDSMITH, C. E., RENDALL, J. & MOORE, J. E. (2010). Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol*, 48, 166-76 e1.
- NAGEL, G., HWANG, T. C., NASTIUK, K. L., NAIRN, A. C. & GADSBY, D. C. (1992). The protein kinase A-regulated cardiac Cl⁻ channel resembles

- the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature*, 360, 81-4.
- NÄHRLICH, L. & ZIMMER, K.-P. (2013). Neugeborenen-Screening auf Mukoviszidose: Lasst uns beginnen! *Deutsches Ärzteblatt*, 110, 354-355.
- NAUTA, A. J., DE HAIJ, S., BOTTAZZI, B., MANTOVANI, A., BORRIAS, M. C., ATEN, J., RASTALDI, M. P., DAHA, M. R., VAN KOOTEN, C. & ROOS, A. (2005). Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. *Kidney Int*, 67, 543-53.
- NCBI (Zugriff 20.07.2015a).
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3816527.
- NCBI (Zugriff 20.07.2015b).
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=4077515.
- NCBI (Zugriff 20.07.2015c).
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_viewTable.cgi?pop=1409.
- NCBI (Zugriff 20.07.2015d).
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_viewTable.cgi?pop=15248.
- NELSON, L. A., CALLERAME, M. L. & SCHWARTZ, R. H. (1979). Aspergillosis and atopy in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*, 120, 863-73.
- OLESEN, R., WEJSE, C., VELEZ, D. R., BISSEYE, C., SODEMANN, M., AABY, P., RABNA, P., WORWUI, A., CHAPMAN, H., DIATTA, M., ADEGBOLA, R. A., HILL, P. C., OSTERGAARD, L., WILLIAMS, S. M. & SIRUGO, G. (2007). DC-SIGN (CD209), pentraxin 3 and vitamin D receptor gene variants associate with pulmonary tuberculosis risk in West Africans. *Genes Immun*, 8, 456-67.
- PAYA, C. V. (2002). Prevention of fungal infection in transplantation. *Transpl Infect Dis*, 4 Suppl 3, 46-51.
- POINTON, J. J., HARVEY, D., KARADERI, T., APPLETON, L. H., FARRAR, C., STONE, M. A., STURROCK, R. D., BROWN, M. A. & WORDSWORTH, B. P. (2010). Elucidating the Chromosome 9 Association with AS; CARD9 is a Candidate Gene. *Genes and immunity*, 11, 490-496.
- PSCHYREMBEL (2012). Klinisches Wörterbuch. *De Gruyter*, 263, 667-668.
- RIORDAN, J. R., ROMMENS, J. M., KEREM, B., ALON, N., ROZMAHEL, R., GRZELCZAK, Z., ZIELENSKI, J., LOK, S., PLAVSIC, N., CHOU, J. L. & ET AL. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245, 1066-73.
- ROSENTUL, D. C., PLANTINGA, T. S., OOSTING, M., SCOTT, W. K., VELEZ EDWARDS, D. R., SMITH, P. B., ALEXANDER, B. D., YANG, J. C., LAIRD, G. M., JOOSTEN, L. A., VAN DER MEER, J. W., PERFECT, J. R., KULLBERG, B. J., NETEA, M. G. & JOHNSON, M. D. (2011). Genetic variation in the dectin-1/CARD9 recognition pathway and susceptibility to candidemia. *J Infect Dis*, 204, 1138-45.
- RULAND, J. (2008). CARD9 signaling in the innate immune response. *Ann N Y Acad Sci*, 1143, 35-44.
- SCHLUCHTER, M. D., KONSTAN, M. W., DRUMM, M. L., YANKASKAS, J. R. & KNOWLES, M. R. (2006). Classifying severity of cystic fibrosis lung disease using longitudinal pulmonary function data. *Am J Respir Crit Care Med*, 174, 780-6.

- SCHONHEYDER, H., JENSEN, T., HOIBY, N., ANDERSEN, P. & KOCH, C. (1985). Frequency of *Aspergillus fumigatus* isolates and antibodies to aspergillus antigens in cystic fibrosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*, 93, 105-12.
- SENS, B. & STERN, M. (2012). Qualitätssicherung Mukoviszidose 2012-Berichtsband. *Hippocampus Verlag*.
- SHEPPARD, D. N., RICH, D. P., OSTEDGAARD, L. S., GREGORY, R. J., SMITH, A. E. & WELSH, M. J. (1993). Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature*, 362, 160-4.
- STURGESS, J. & IMRIE, J. (1982). Quantitative evaluation of the development of tracheal submucosal glands in infants with cystic fibrosis and control infants. *Am J Pathol*, 106, 303-11.
- TSUI, L.-C. (1992). The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends in Genetics*, 8, 392-398.
- WAHAB, A. A., TAJ-ALDEEN, S. J., KOLECKA, A., ELGINDI, M., FINKEL, J. S. & BOEKHOUT, T. (2014). High prevalence of *Candida dubliniensis* in lower respiratory tract secretions from cystic fibrosis patients may be related to increased adherence properties. *Int J Infect Dis*, 24, 14-9.
- WEILER, C. A. & DRUMM, M. L. (2013). Genetic influences on cystic fibrosis lung disease severity. *Front Pharmacol*, 4, 40.
- WELSH, M. J. & SMITH, A. E. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, 73, 1251-1254.
- WILSCHANSKI, M., ZIELENSKI, J., MARKIEWICZ, D., TSUI, L.-C., COREY, M., LEVISON, H. & DURIE, P. R. (1995). Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *The Journal of Pediatrics*, 127, 705-710.
- WRIGHT, F. A., STRUG, L. J., DOSHI, V. K., COMMANDER, C. W., BLACKMAN, S. M., SUN, L., BERTHIAUME, Y., CUTLER, D., COJOCARU, A., COLLACO, J. M., COREY, M., DORFMAN, R., GODDARD, K., GREEN, D., KENT, J. W., JR., LANGE, E. M., LEE, S., LI, W., LUO, J., MAYHEW, G. M., NAUGHTON, K. M., PACE, R. G., PARE, P., ROMMENS, J. M., SANDFORD, A., STONEBRAKER, J. R., SUN, W., TAYLOR, C., VANSKOY, L. L., ZOU, F., BLANGERO, J., ZIELENSKI, J., O'NEAL, W. K., DRUMM, M. L., DURIE, P. R., KNOWLES, M. R. & CUTTING, G. R. (2011). Genome-wide association and linkage identify modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis at 11p13 and 20q13.2. *Nat Genet*, 43, 539-46.
- YANG, X., SUN, Q., YUAN, P., LIANG, H., WU, X., LAI, L. & ZHANG, Y. (2015). Novel mutations and polymorphisms in the CFTR gene associated with three subtypes of congenital absence of vas deferens. *Fertil Steril*.
- ZIELENSKI, J., ROZMAHEL, R., BOZON, D., KEREM, B., GRZELCZAK, Z., RIORDAN, J. R., ROMMENS, J. & TSUI, L. C. (1991). Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*, 10, 214-28.
- ZIELENSKI, J. & TSUI, L. C. (1995). Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet*, 29, 777-807.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich die vorliegende Arbeit in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin in Tübingen angefertigt zu haben.

Prof. Dr. Dominik Hartl und Dr. Dr. Markus Mezger konzipierten die Studie sowie die Versuche des SNPs rs4077515 des Proteins CARD9 S12N. Sie entwarfen die Studie des SNPs rs3816527 des Proteins PTX3 D48A und waren an der Etablierung dieser Versuche größtenteils beteiligt. Die Arbeit wurde von ihnen betreut und das Manuskript korrigiert. Die Patientendaten wurden aus den CF-Zentren Graz, München und Tübingen zur Verfügung gestellt und von Dr. med. Andreas Hector zusammengefügt.

Die DNA-Extraktion (siehe Kapitel 2.2.1) von den Grazer und sieben Tübinger CF-Patienten wurde aus Vollblut von Laura Eichler, einer medizinischen Doktorandin in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, durchgeführt. Die restlichen Tübinger und Münchner DNA-Proben wurden bereits in der extrahierten Form erhalten. Die PCR, den Restriktionsenzymverdau sowie die Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.3 und 2.2.4) wurden nach Einarbeitung durch MTA Renate Koch von mir eigenständig durchgeführt. Die Auswertung der Elektrophorese sowie die statistische Auswertung aller weiteren Daten erfolgte ebenfalls durch mich.

Die vorliegende Schrift habe ich eigenständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet. Wörtlich und sinngemäß übernommene Textstellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Hiermit bestätige ich, dass weder im Inland, noch im Ausland eine gleiche oder ähnliche Dissertation einem Prüfungsamt vorgelegt wurde.

Tübingen, den 12. Oktober 2015

Sibylle Schmidt

8. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Vielen lieben Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Dominik Hartl für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei allen Fragen und Problemen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Dr. Markus Mezger für die vielen praktischen Tipps, seinen unermüdlichen Einsatz und die insgesamt ausgezeichnete Betreuung.

Außerdem möchte ich noch Dr. Andreas Hector für die Zusammenstellung und Kontrolle der klinischen Patientendaten sehr danken.

Mein herzlicher Dank geht an Renate Koch, die mich wunderbar mit ihrem tatkräftigen Engagement zum selbständigen Arbeiten im Labor angeleitet und stets ein offenes Ohr für Fragen hatte und mir Hilfestellungen gab, wo immer sie konnte.

Den Arbeitsgruppen André und Holzer der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin danke ich herzlich für die angenehme Atmosphäre, die vielen anregenden und unterhaltsamen Stunden im Labor und für ihre Hilfestellungen. Dabei besonders erwähnenswert sind Katharina, Karo, Marina, Karla, Anne, Kathrin, Sabrina, Aylene und Darina. Danke auch an meine Vordoktorandin Laura Eichler, die viele DNA-Proben extrahierte und an meine Mitdoktorandin Lisa Greiner, dass wir uns so gut ergänzen konnten.

Danke an die Diplom-Statistikerin Aline Naumann für den hilfreichen SPSS-Kurs und an Prof. Dr. Peter Martus für die Kontrolle meiner statistischen Auswertung.

Nochmals bedanke ich mich außerordentlich bei Prof. Dr. Dominik Hartl, Dr. Dr. Markus Mezger, Dr. Andreas Hector und dem Rhetoriker Frank Schuhmacher für die Korrektur der Niederschrift.

Meine tiefe Dankbarkeit gilt meinen Eltern Horst und Doris, meinen Brüdern Jürgen und Thomas, meiner restlichen Familie sowie Lukas, meiner Wohngemeinschaft und meinen anderen Freunden für die bedingungslose Unterstützung und Fürsorge.