

### Zusammenfassung

Die zystische Fibrose (CF) ist eine häufige autosomal rezessive Erbkrankheit, die durch Mutationen im Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gen hervorgerufen wird. Das CFTR-Gen kodiert einen Membran-gebundenen Chlorid Ionenkanal; Mutationen im CFTR-Gen führen zu einer gestörten Salz- und Flüssigkeitssekretion in verschiedenen Geweben. Die Symptome der CF können, selbst bei Geschwistern oder Zwillingen mit den gleichen CFTR-Mutationen, in ihrer Ausprägung sehr variabel sein. Neben Umwelteinflüssen wird der Verlauf der pulmonalen Erkrankung auch durch weitere genetische Faktoren, so genannte modifizierende Gene, beeinflusst. Das Verständnis der molekularen und zellulären Grundlagen der gefundenen Genotyp-Phänotyp-Assoziationen wird zum besseren Verständnis der Erkrankung beitragen und wird helfen neue Ziele für pharmakologische Interventionen bei der CF zu identifizieren.

### Abstract

Cystic fibrosis is a common autosomal recessive disease that is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. The CFTR gene encodes a membrane-bound chloride ion channel. CFTR gene mutations cause alterations in fluid and salt secretion of various tissues. The CF phenotype is highly variable even in siblings and twins carrying the same CFTR mutations. The course of CF pulmonary disease is modulated by both environmental and genetic factors independent of CFTR. This review summarises association studies that focused on disease modifier genes in CF. Understanding the molecular and cellular basis of the genotype-phenotype associations will help to better understand the disease and to identify new targets for therapeutic interventions in CF.

### Einleitung

Bei der CF handelt es sich um eine monogenetische Erkrankung, deren Ursache auf Mutationen im Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gen zurückzuführen ist. Mit einer Inzidenz von 1 : 2500 ist die zystische Fibrose (CF) die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung der weißen Be-

völkerung. Das klinische Bild ist vor allem durch eine chronisch fortschreitende Lungenerkrankung mit rezidivierenden Atemwegsinfektionen und durch exokrine Pankreasinsuffizienz, aber auch durch endokrine Pankreasinsuffizienz und zirrhotischen Umbau der Leber charakterisiert. Derzeit sind mehr als 1200 Mutationen und Varianten des CFTR-Gens bekannt. Die häufigste Mutation im CFTR-Gen, die  $\Delta F508$  Mutation, die bei fast 70%

#### Institutsangaben

<sup>1</sup>Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Abteilung für Allgemeine Pädiatrie, Universitätsklinikum Essen, Essen  
<sup>2</sup>Departement de Pneumologie Pédiatrique – INSERM E213, Hôpital d'enfants Armand Trousseau, Paris cedex 12, France

#### Korrespondenzadresse

PD. Dr. Hartmut Grasemann · Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin · Universitätsklinikum Essen · Hufelandstr. 55 · 45122 Essen, Germany · E-mail: hartmutg@hotmail.com

**Eingang:** 22. Dezember 2004 · **Nach Revision akzeptiert:** 3. März 2005

#### Bibliografie

Pneumologie 2005; 59: 395–404 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York  
DOI 10.1055/s-2004-830251  
ISSN 0934-8387

der CF-Patienten in Westeuropa und den USA vorliegt [1], beruht auf einer Deletion von drei Basenpaaren in Exon 10, die zu einem Verlust von Phenylalanin in der Position 508 des CFTR Proteins führt [2]. Etwa die Hälfte aller CF-Patienten in den oben genannten Regionen ist homozygot für die  $\Delta F508$  Mutation.

Das Krankheitsbild der CF variiert stark in Bezug auf den Verlauf und die Schwere der Erkrankung [3]. Mit Ausnahme der Pankreasinsuffizienz [4] besteht keine enge Korrelation zwischen dem klinischen Verlauf und den zugrunde liegenden CFTR-Mutationen [5–7]. Dies gilt auch für die  $\Delta F508$  homozygoten Patienten, die das ganze Spektrum der Erkrankung repräsentieren, obwohl sie Träger der gleichen Mutationen sind [5,8]. Unter Geschwistern und Zwillingen mit gleicher CFTR-Mutation kann ebenfalls eine eindrucksvolle Diskordanz bezüglich des pulmonalen Phänotyps bestehen [9–11]. Dies legt nahe, dass neben CFTR auch andere genetische Faktoren den Krankheitsverlauf der CF modifizieren.

Mittlerweile gibt es zahlreiche Studien zur Rolle von modifizierenden Genen bei der CF, wobei die Liste von potenziellen Kandidaten endlos erscheint. Einerseits könnten solche Gene direkt mit der CFTR-Proteinsynthese interagieren, z.B. bei der Transkription, zytosolischen Reifung oder zellulären Expression des CFTR Kanals. Andererseits kann eine Beeinflussung des CF-Phänotyps auch unabhängig von CFTR stattfinden, z.B. durch Modulatoren der Inflammation, der Keimabwehr oder der Regulation des bronchialen Widerstandes. Diese Übersichtsarbeit hat zum Ziel bisher veröffentlichte Studien zu Krankheits-modifizierenden Genen bei der CF zusammenfassend darzustellen.

## Mausstudien

Erste Hinweise auf chromosomale Regionen, die modifizierende Gene der CF enthalten könnten, ergaben sich aus Untersuchungen an *cfr*-„knockout“ Mäusen. Der Phänotyp dieser CF-Mäuse zeichnet sich weniger durch eine Lungenbeteiligung, als durch eine intestinale Obstruktion aus, die sich schon kurz nach der Geburt manifestiert und ohne eine spezifische Ernährung zum Tod führt. Diese intestinale Obstruktion der Maus ähnelt dem Mekoniumileus beim Menschen. Rozmahel u. Mitarb. konnten 1996 zeigen, dass durch das Einkreuzen bestimmter Mausstämmen (z.B. CD1, C57BL/6J oder BALB/c) eine Lebensverlängerung erzielt werden konnte, während die bei Kreuzungen mit anderen Mausstämmen nicht gelang. In Kopplungsanalysen zeigte sich, dass für diese Variabilität der intestinalen Obstruktion der Maus ein *cfr*-unabhängiger Locus auf dem proximalen Chromosom 7 verantwortlich war, die beim Menschen der Region 19q13 entspricht [12]. Die Kopplung dieser chromosomalen Region an die Entwicklung eines Mekoniumileus bei CF-Patienten konnte in einer Suche nach modifizierenden Genen beim Menschen von Zielenski u. Mitarb. bestätigt werden. Eine Verbindung dieser Region mit dem Ausmaß der pulmonalen Beteiligung der untersuchten CF-Zwillinge und ihrer Eltern bestand nicht [13].

Aus Studien an Mäusen ergeben sich auch Hinweise auf die Beteiligung mehrerer chromosomaler Regionen an der Ausbildung des pulmonalen Phänotyps der CF [14]. Haston u. Mitarb. konnten zeigen, dass unterschiedliche Regionen an der Ausbildung

verschiedener pulmonaler Phänotypen beteiligt sind. In histopathologischen Untersuchungen fanden sie Hinweise auf eine Kopplung unterschiedlicher chromosomaler Regionen für die pulmonale Fibrose, gemessen an der Kollagendeposition (Chromosom 1, 2, 6, 10, 17), die interstitielle Verdickung der Alveolen (Chromosom 2, 12) und die Anzahl der Alveolen in der Lunge (Chromosom 2, 7, 14, X) [15].

## Modifizierende Gene des pulmonalen Phänotyps

Im Folgenden werden Studien an Patienten mit CF genannt, in denen eine Assoziation zwischen CF-Phänotyp und modifizierenden Genen untersucht wurde. Die in diesen Studien untersuchten Genen werden, nach ihren vermuteten modifizierenden Mechanismen, in drei Gruppen zusammengefasst:

### Regulation von CFTR

#### $\beta_2$ -Adrenorezeptor

Der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ( $\beta_2$ -AR) gehört zu der Gruppe G-Protein gebundener Rezeptoren und ist über seine Stimulation der Adenylatzyklase maßgeblich an der Regulation der cAMP-Konzentration in den Atemwegen beteiligt [16]. Der  $\beta_2$ -AR spielt eine wichtige Rolle bei der Bronchodilatation aber auch bei der cAMP-abhängigen Aktivierung des CFTR Kanals. Lymphozyten von CF-Patienten produzieren nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation weniger cAMP- als Lymphozyten von Kontrollpersonen [17]. Das auf Chromosom 5q31–q32 liegende  $\beta_2$ -AR Gen enthält zahlreiche Polymorphismen, von denen 4 die Aminosäuresequenz des Proteins verändern, nämlich die Codons 16 Arg/Gly, 27 Gln/Glu, 34 Val/Met, und 164 Thr/Ile. Die beiden häufigsten dieser Polymorphismen bewirken Unterschiede in der Desensibilisierung des Rezeptors [18].

In einer Untersuchung an 126 CF-Patienten fand sich eine Assoziation zwischen dem 16 Arg/Gly Polymorphismus im  $\beta_2$ -AR Gen und der Lungenfunktion. Das Vorhandensein von mindestens einem 16Gly Allel war bei Patienten im Alter von 6–20 Jahren mit einer signifikant schlechteren Lungenfunktion ( $FEV_1$ , FVC und  $MEF_{50\%VC}$  in % der Norm) und einer größeren jährlichen Verschlechterung der  $FEV_1$  assoziiert [19]. Einen Hinweis auf die Ursache dieser Assoziation geben die in dieser Arbeit durchgeführten in-vitro-Versuche an peripheren Lymphozyten der Blutbahn, die bei den Trägern eines 16 Gly Allels eine verminderte lymphozytäre cAMP-Produktion nach Stimulation mit Isoproterenol zeigten. Die  $\beta_2$ -Response der CF-Patienten zeigte in dieser Untersuchung keine Abhängigkeit vom  $\beta_2$ -AR Genotyp [19].

### Regulation der Inflammation

#### Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  ist ein pro-inflammatorisches Zytokin welches vorwiegend von Makrophagen gebildet wird und in den Atemwegen von CF-Patienten in hohen Konzentrationen vorliegt [20]. TNF- $\alpha$  übt einen starken chemotaktischen Reiz auf neutrophile Granulozyten aus und trägt so zur typischen Neutrophilen-dominanten Inflammation der CF-Atemwege bei. Zwischen der Höhe der TNF- $\alpha$  Konzentration im Sputum und der Lungenfunktion besteht bei CF-Patienten eine negative Korrelation [21]. Das TNF- $\alpha$  Gen, das auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert ist, enthält in der Promotorregion einen biologisch relevanten Polymorphismus. Das

Tab. 1 Assoziationen mit Lungenfunktion oder radiologischen Veränderungen der Lunge

Gen (Chromosom)	Polymorphismus	Allel	Auswirkung	Phänotyp
TNF- $\alpha$ (6p21.3)	SNP – 308 A/G Promotor	G-Allel (TNF2)	[TNF- $\alpha$ ] $\uparrow$	FEV <sub>1</sub> mit 8 Jahren $\downarrow$ und Gewicht $\downarrow$ [24]
TGF- $\beta$ (19q13.1)	SNP + 869 T/C Codon 10	T-Allel	[TGF- $\beta$ ] $\downarrow$	FEV <sub>1</sub> < 50 % Risiko 2 $\times$ $\downarrow$ und FVC < 70 % 5 Jahre später [33]
	SNP + 915 G/C Codon 25	G-Allel	[TGF- $\beta$ ] $\downarrow$	später FEV <sub>1</sub> < 50 % bei $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508 [25]
$\beta$ 2-AR (5q31-q32)	SNP + 46 A/G Codon 16	G-Allel	$\beta$ 2-AR $\downarrow$	FEV <sub>1</sub> , FVC und MEF <sub>50%</sub> $\downarrow$ jährliche Abnahme der FEV <sub>1</sub> $\uparrow$ [19]
GST M1 (1p13.3)	Gendeletion	M1 – 0	kein Protein	Chrispin-Norman-Röntgen-Score $\downarrow$ Shwachman-Score $\downarrow$ [24]
GST M3 (1p13.3)	3 bp Deletion Intron 6	B-Allel	[GST M3] $\uparrow$	FEV <sub>1</sub> und FVC $\uparrow$ [47]
$\alpha$ 1-AT (14q32.1)	SNP, Codon 264 SNP G/A, Codon 342 SNP + 1237 3 Region, Enhancer	S-Allel	[ $\alpha$ 1-AT] $\downarrow$  Genexpression $\downarrow$	keine Assoziation mit Lungenfunktion [57]  Brasfield-Röntgen-Score $\uparrow$ [59]
		Z-Allel		
		A-Allel		
MBL2 (10q11.2-q21)	SNP C/T, Codon 52 SNP G/A, Codon 54 SNP G/A, Codon 57	D-Allel	[MBL] $\downarrow$	Risiko für Tod oder Lungentransplantation 3fach $\uparrow$ , FEV <sub>1</sub> und FVC $\downarrow$ [76] FEV <sub>1</sub> und FVC $\downarrow$ bei $\Delta$ F508/ $\Delta$ F508 [77]
		B-Allel	[MBL] $\downarrow$	
		C-Allel	[MBL] $\downarrow$	
$\alpha$ 1-ACT (14q31-q31.2)	SNP – 15 A/G Promotor	G-Allel	in dieser Studie keine Korrelation	FEV <sub>1</sub> % $\uparrow$ , radiologischer Score $\uparrow$ [65]
ACE (17q23)	287 bp Deletion Intron 16	DD	[ACE] $\uparrow$	früherer Abfall der FEV <sub>1</sub> < 50 % der Norm [25]
NOS1 (12q24.2–31)	GT-Repeat, 5' UTR	> 27 GTs	exhalirtes NO $\uparrow$	jährliche Abnahme der FEV <sub>1</sub> $\downarrow$ [100]

–308G (TNF2) Allel ist mit einer höheren Transkriptionsrate und einer bis zu 5-fach höheren konstitutiven und induzierbaren TNF- $\alpha$ -Synthese assoziiert [22, 23].

Hull und Thomson beschrieben 1998 eine Assoziation zwischen dem TNF2-Allel und der Lungenfunktion sowie dem Körpergewicht von CF-Patienten. Sie fanden in einer Untersuchung an 53 Kindern mit CF, dass Träger des TNF2-Allels im Alter von 8 Jahren eine signifikant niedrigere FEV<sub>1</sub> und einen schlechteren Gewichts-Score hatten als Patienten die homozygot für das TNF1-Allel waren [24]. Der Zusammenhang zwischen Lungenfunktion und TNF- $\alpha$ -Genotyp konnte in einer späteren Studie allerdings nicht bestätigt werden. In dieser Studie an 251 Kindern und Erwachsenen mit CF fand sich keine Assoziation zwischen dem TNF- $\alpha$  – 308 Promotor Polymorphismus und dem Verlauf der Lungenfunktion [25]. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser beiden Studien könnte an der Phänotypisierung der Patientenkollektive liegen. Während in der ersten Arbeit Pseudomonasbesiedlung, Chrispin-Norman Score, Shwachman-Score und Lungenfunktion mit FEV<sub>1</sub> im Alter von 8 Jahren zur Beurteilung der Lungenerkrankung herangezogen wurden [24], wurden die Patienten in der zweiten Studie nicht für ihr Alter normiert, dafür wurden aber longitudinale Daten wie Alter bei Erstbesiedlung der Atemwege mit pathogenen Keimen sowie Alter bei Unterschreiten der FEV<sub>1</sub> von 50 % der Norm [25] berücksichtigt. Die beschriebene Assoziation mit dem TNF2-Allel könnte auch durch ein Kopplungsungleichgewicht mit MHC-Allelen begründet sein, da das TNF- $\alpha$ -Gen zwischen den Genloci für die MHC Klasse I und Klasse II-Gene liegt [26].

### Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )

TGF- $\beta$  ist ein Zytokin mit sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Eigenschaften. Im Atemwegsepithel moduliert TGF- $\beta$  die Proliferation von Fibroblasten und die Ablagerung von Kollagen [27 – 29]. TGF- $\beta$  wird von dem TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Gen kodiert, welches auf Chromosom 19 in Position 19q13.1 liegt. Für zwei Polymorphismen an den Positionen + 869 (Codon 10) und + 915 (Codon 25), die jeweils zu einer Substitution von Leucin (+ 915) bzw. Arginin (+ 869) durch Prolin führen, konnte gezeigt werden, dass sie die Produktion von TGF- $\beta$  beeinflussen [30]. Die Allele, die zum Einbau von Prolin führen, sind jeweils mit einer verminderten TGF- $\beta$ -Produktion assoziiert. Diese Allele scheinen in bestimmten Situationen protektiv zu wirken, da sie z. B. nach Lungentransplantation mit einem verringerten Risiko einer pulmonalen Fibrose einhergehen [30, 31]. Individuen mit Leucin oder Arginin in dieser Aminosäuresequenz hingegen, produzieren mehr TGF- $\beta$  und entwickeln häufiger eine Lungenfibrosen auf pro-inflammatorische Reize, wie z. B. durch Bleomycin [32].

Der Einfluss der beschriebenen Polymorphismen im TGF $\beta$ <sub>1</sub>-Gen auf die Lungenerkrankung bei CF wurde erstmals von Arkwright u. Mitarb. untersucht. In einer Studie an 171 CF-Patienten, die allesamt homozygot für die CFTR  $\Delta$ F508 Mutation waren, fand sich eine Assoziation zwischen einer früheren Verschlechterung der Lungenfunktion mit dem „high-producer“ Genotyp in Codon 10 [33]. CF-Patienten mit Leucin in Codon 10 unterschritten eine FVC von 70% der Norm im Durchschnitt 5 Jahre früher als Träger von Prolin (p < 0,005). Das relative Risiko einer frühzeitigeren Verschlechterung der FEV<sub>1</sub> unter 50% der Norm und der FVC auf unter 70% der Norm war bei diesen Patienten jeweils fast zweifach erhöht. Eine Assoziation zwischen pulmonalem Phänotyp

Tab. 2 Assoziationen mit der pulmonalen Keimbeseidlung

Gen (Chromosom)	Polymorphismus	Allel	Auswirkung	Phänotyp
HLA II (6p21.3)		DR7		chronische Besiedlung mit <i>P. aeruginosa</i> ↑ Gesamt IgE ↑ [83]
$\alpha$ 1-AT (14q31-q32.3)	SNP, Codon 264 SNP G/A, Codon 342 SNP + 1237 A/G 5 Region, Enhancer	S-Allel Z-Allel	[ $\alpha$ 1-AT] ↓	frühere Besiedlung mit <i>P. aeruginosa</i> Pseudomonas-AK im Serum ↑ [55]
NOS1 (12q24.2–31)	AAT-Repeat Intron 20	A-Allel ≥ 12 AATs	Genexpression ↓ exhalirtes NO ↓	chronische Besiedlung mit <i>P. aeruginosa</i> ↓ [59] Besiedlung mit <i>P. aeruginosa</i> ↑ und Besiedlung mit <i>A. fumigatus</i> ↑ [97]
NOS3 (7q35–36)	SNP + 894 T/G Codon 298	G-Allel	exhalirtes NO ↓	Besiedlung mit <i>P. aeruginosa</i> ↑ [104]

und Codon 25-Allelen fand sich in dieser Untersuchung nicht [33]. In einer späteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe, die diesmal in einer größeren Gesamtpopulation von 259 Patienten Polymorphismen in mehreren Zytokingenen untersuchte, konnte die Assoziation mit den Codon 10 Allelen nicht bestätigt werden. Allerdings fand sich nun, im Gegensatz zur vorangegangenen Studie, in einer Subpopulation von 68 CFTR  $\Delta$ F508 homozygoten Patienten für den „high-producer“ Genotyp in Codon 25 eine signifikante Assoziation mit einer frühzeitigeren Verschlechterung der FEV<sub>1</sub> unter 50% der Norm. In der Gesamtpopulation der untersuchten CF-Patienten bestand diese Assoziation nicht [25].

### Glutathion-S-Transferasen

Chronische Inflammation und Infektionen führen bei der CF zu oxidativem Stress, der durch die Bildung freier Radikale zur Schädigung des pulmonalen Gewebes beiträgt [34, 35]. Ein wichtiges Antioxidanz der Lunge ist Glutathion [36]. Die Bindung von Glutathion an toxische Substanzen wird von einer Familie antioxidant wirkender Enzyme katalysiert, die Glutathion-S-Transferasen (GSTs) genannt werden [37].

Die GSTs werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert, unter anderem auch in Lunge und Leber. Für GSTM1 und GSTM3 sind Polymorphismen mit funktioneller Bedeutung beschrieben [38]. Das GSTM1 0-Allel (GSTM1-0), kodiert aufgrund einer ausgedehnten Deletion kein Protein. Der homozygote GSTM1-0 Genotyp ist mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung verschiedener Karzinome [39], Lungenemphysem [40] sowie chronischer Bronchitis assoziiert [41]. Der Polymorphismus in GSTM3 führt durch eine Deletion von drei Basenpaaren zu einer Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor YY1, was zu einer veränderten Expression von GSTM3 führt [38]. Das GSTM3 B-Allel ist mit dem Verlauf von inflammatorischen und rheumatoiden Erkrankungen assoziiert [42, 43]. Im GSTP1 Gen ist an Position +313 ein Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) beschrieben, der zu einem Austausch der Aminosäure Isoleuzin (Ile) zu Valin (Val) und darüber zu einer Veränderung der Enzymaktivität führt [44]. Homozygotie für das Val-Allel ist bei Asthma mit einer geringeren bronchialen Hyperreagibilität und mit einem geringeren Risiko für die Erkrankung als solche assoziiert [45].

Die bei der CF durchgeführten Assoziationsstudien mit den GST-Genen führten zu unterschiedlichen, teils widersprüchlichen Ergebnissen. Baranov u. Mitarb. zeigten an 194 CF-Patienten, dass Homozygotie für das GSTM1-0 Allel mit einer früheren Diagnose der CF sowie einer erhöhten Mortalität (Tod vor dem 5. Lebensjahr) assoziiert ist [46]. Hull und Thomson fanden in einer Untersuchung an 53 CF-Patienten, dass Patienten die homozygot für das 0-Allel waren, stärkere Veränderungen im Chrispin-Norman Röntgen Score und einen schlechteren klinischen Zustand (Shwachman Score) aufwiesen, als Patienten mit GSTM1 A- oder -B-Allelen [24]. Eine Assoziation des GSTM1-0 Genotyp mit einer schwereren Lungenerkrankung konnte jedoch in einer anderen Untersuchung an 146 CF-Patienten nicht bestätigt werden. In dieser Studie, in der Flamant u. Mitarb. alle vier oben beschriebenen Polymorphismen der GST-Gene (M1, M3, P1, T1) untersuchten, fand sich für Träger der GSTM1-Deletion eine signifikant bessere Lungenfunktion [47]. Für GSTP1 und GSTM1 fand sich in dieser Untersuchung kein Einfluss auf den pulmonalen Phänotyp.

In einer anderen Untersuchung derselben Arbeitsgruppe an 106 Patienten wurde für das GSTP1-Gen eine Assoziation mit einer CF-Lebererkrankung beschrieben. Patienten mit GSTP1 Ile/Ile-Genotyp waren signifikant häufiger von einer Lebererkrankung betroffen als Träger eines GSTP1 Val-Allels [48].

### $\alpha$ <sub>1</sub>-Antitrypsin ( $\alpha$ <sub>1</sub>-AT)

Das Akutphaseprotein  $\alpha$ <sub>1</sub>-Antitrypsin ( $\alpha$ <sub>1</sub>-AT) ist ein Glykoprotein, welches von Monozyten und Hepatozyten gebildet wird. Es gehört zur Familie der Antiproteasen, die für ein Gleichgewicht zwischen der antimikrobiellen, protektiven Wirkung der Proteasen und ihrer destruirenden Wirkung auf das Lungenepithel sorgen. Das Gleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen ist bei der CF gestört [49]. Dem  $\alpha$ <sub>1</sub>-AT kommt in der Lunge eine besondere Bedeutung zu, da es in besonders starkem Maße die Wirkung der exzessiv freigesetzten Neutrophilen-Elastase hemmt [50]. Eine Verminderung der  $\alpha$ <sub>1</sub>-AT-Konzentration führt zu Asthma, Bronchiektasie und Lungenemphysem [51–53]. Das kodierende Gen für  $\alpha$ <sub>1</sub>-AT liegt auf Chromosom 14q32.1. Eine Substitution von Glu durch Val in Codon 264 (S-Allel), und eine Substitution von Glu durch Lys in Codon 342 (Z-Allel) im  $\alpha$ <sub>1</sub>-AT-Gen führen zu verminderten  $\alpha$ <sub>1</sub>-AT-Konzentrationen [54]. Die

Tab. 3 Assoziationen mit Lebererkrankung

Gen (Chromosom)	Polymorphismus	Allel	Auswirkung	Phänotyp
<i>GST P1</i> (11q13)	SNP + 313 A/G Codon 105	G-Allel	veränderte Enzymaktivität	Risiko für Leberzirrhose ↓ [48]
<i>MBL2</i> (10q11.2-q21)	SNP C/T, Codon 52 SNP G/A, Codon 54 SNP G/A, Codon 57	D-Allel B-Allel C-Allel	[MBL] ↓	Risiko für Leberzirrhose ↑ bei ΔF508/ΔF508 [78]
<i>ACE</i> (17q23)	Deletion von 287 bp Intron 16	D-Allel	[ACE] ↑	Risiko für Leberzirrhose ↑ [25]

Frequenz dieser Polymorphismen ist, mit 8% für das S-Allel und 4% für das Z-Allel, allerdings niedrig.

Assoziationsstudien mit dem  $\alpha_1$ -AT-Gen führten bei der CF zu widersprüchlichen Ergebnissen. In einer Studie von Döring u. Mitarb. wurde zunächst bei Patienten mit  $\alpha_1$ -AT-Defizienz über eine frühere Besiedlung der Atemwege mit *P. aeruginosa* berichtet [55]. Mahadeva u. Mitarb. fanden in zwei anschließenden Untersuchungen aber das Gegenteil der erwarteten Relation von  $\alpha_1$ -AT-Defizienz Allelen und CF-Lungenphänotyp. 20 ihrer insgesamt 147 untersuchten CF-Patienten, die Träger eines  $\alpha_1$ -AT S- oder Z-Allels waren, zeigten im Vergleich zu CF-Patienten mit Normalallelen eine signifikant bessere Lungenfunktion [56]. In einer zweiten Studie, in der die gleiche Arbeitsgruppe die  $\alpha_1$ -AT-Allelfrequenzen bei 79 CF-Patienten mit extremen Phänotypen untersuchte, fanden sich keine Unterschiede in der Frequenz der  $\alpha_1$ -AT-Defizienz Allele zwischen Patienten mit schwerer Erkrankung die zur Lungentransplantation oder zum Tod im Kindesalter geführt hatte, und der erwarteten Allelfrequenz in der Normalbevölkerung [57]. Eine weitere Mutation im  $\alpha_1$ -AT-Gen liegt 1237 Basenpaare hinter dem letzten Exon in einer Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren, welche die Transkription des Gens beschleunigen (Enhancer). Henry u. Mitarb. fanden in einer Untersuchung an 124 Patienten mit CF nun wiederum, dass das 1237A-Allel, welches mit einer verminderten  $\alpha_1$ -AT-Genexpression einhergeht [58], bei den betroffenen 16 Patienten mit weniger pulmonalen Infektexazerbationen, einer niedrigeren Kolonisationsrate der Atemwege mit *P. aeruginosa* und weniger Veränderungen im Brasfield Röntgen Score assoziiert war [59]. Eine große kanadische Multi-Center Studie, die an über 700 CF-Patienten durchgeführt wurde, konnte keinen Zusammenhang zwischen der Lungenerkrankung bei CF und den verschiedenen  $\alpha_1$ -AT-Genvarianten finden. In dieser bisher größten publizierten Assoziationsstudie zum Thema, fanden sich weder eine Assoziation zwischen dem Verlauf der pulmonalen Erkrankung mit den S- und Z-Allelen, noch Hinweise auf einen protektiven Effekt der 3' 1237A-Mutation im  $\alpha_1$ -AT-Gen [60].

#### $\alpha_1$ -Antichymotrypsin

Bei  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin ( $\alpha_1$ -ACT) handelt es sich ebenfalls um einen Proteaseinhibitor, der von Monozyten und Hepatozyten gebildet wird [61] und, ähnlich wie  $\alpha_1$ -AT, an der Modulation von Immunreaktionen beteiligt ist [62]. Das  $\alpha_1$ -ACT-Gen ist auf Chromosom 14 in Position 14q31-q31.2 lokalisiert [63]. Zwei sehr seltene Mutationen im  $\alpha_1$ -ACT-Gen führen zu reduzierten

$\alpha_1$ -ACT-Plasmaspiegeln und sind mit familiärer chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) assoziiert [64].

Der Effekt eines  $\alpha_1$ -ACT-Mangels auf den Verlauf der CF wurde von Mahadeva u. Mitarb. an 157 CF-Patienten untersucht [65]. Zehn Patienten, bei denen sich ein Mangel an  $\alpha_1$ -ACT im Plasma fand, waren seltener mit *P. aeruginosa* infiziert und hatten eine mildere pulmonale Erkrankung mit besserer Lungenfunktion und besserem Röntgen Score als die Patienten mit normalem Plasma  $\alpha_1$ -ACT. Eine mituntersuchte Mutation im  $\alpha_1$ -ACT-Signalpeptid (-15Thr/Ala) korrelierte zwar nicht mit der Höhe der  $\alpha_1$ -ACT-Plasmaspiegel, der Genotyp -15Ala/Ala war aber mit einer mildereren pulmonalen Erkrankung assoziiert [65].

#### Angiotensin I Converting Enzyme (ACE)

Das Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) wird von einem Gen auf Chromosom 17q23 kodiert. Das ACE-Gen enthält eine biologisch relevante Genvariante in Intron 16, bei der es sich um eine 287 Basenpaare große Insertion/Deletion (I/D) handelt. Diese Genvariante ist für ca. 50% der Variabilität der normalen ACE-Serumspiegel verantwortlich [66]. ACE-Genotypen die mit hohen ACE-Spiegeln einhergehen, sind mit einer stärkeren körperlichen Leistungsfähigkeit assoziiert [67]. Außerdem konnte für ACE-Inhibitoren gezeigt werden, dass sie in den Atemwegen anti-fibrotische Effekte haben [68,69].

Bei der CF fand sich in einer Untersuchung an insgesamt 261 Patienten eine statistisch signifikante Assoziation des ACE DD-Genotyps mit sowohl schwerer pulmonaler Erkrankung (Alter bei dem eine FEV<sub>1</sub> von 50% d. N. unterschritten wird) als auch mit sonographischen Hinweisen auf eine Leberzirrhose (portale Hypertension) [25]. Die schon bei Gesunden beschriebene Assoziation des ACE-Gens mit den ACE-Serumkonzentrationen bestand auch bei 38 untersuchten CF-Patienten, wobei die Patienten mit II-Genotyp die niedrigsten ACE-Spiegel aufwiesen [25].

#### Beeinflussung der Infektion

##### *Mannose-bindendes Lectin (MBL)*

Das Serumprotein MBL ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und schützt vor bakteriellen sowie viralen Infektionen. In dem es an Liganden auf der Oberfläche von Mikroorganismen bindet, führt es, über die Aktivierung des Komplementsystems, zur Phagozytose [70]. Das für MBL kodierende Gen, *MBL2* genannt, liegt auf Chromosom 10 in Position 10q11.2-q21. In Exon 1 von *MBL2* befinden sich drei voneinander

unabhängige Missensemutationen, die jeweils zu einer erheblichen Verminderung der MBL-Serumkonzentration führen [71]. Diese Allelvarianten werden als MBL2-0-Allele bezeichnet, während die Normalallele MBL2-A-Allele genannt werden. Heterozygotie für die 0-Allele führt zu einer Verminderung der funktionellen MBL-Untereinheiten im Serum auf 10–20%, Homozygotie zur absoluten MBL-Defizienz [72]. Darüber hinaus wird MBL im Serum von einem Polymorphismus in Position –221 im MBL2-Promotor beeinflusst, der als Y-Allel zu einer hohen und als X-Allel zu einer niedrigen MBL-Expression führt [73]. In mehreren Studien konnte eine Assoziation zwischen den MBL2-0-Allelen und einem erhöhten Risiko für verschiedene Infektionen nachgewiesen werden [74, 75].

Bei der CF ist das Vorhandensein von MBL2-0-Allelen mit schwererer Lungenerkrankung und höherer Mortalität assoziiert. Garred u. Mitarb. fanden, in einer Gesamtpopulation von 149 CF-Patienten, im Vergleich zu homozygoten Wildtyp Trägern, bei *P. aeruginosa* besiedelten Trägern von MBL2-0-Allelen eine signifikant schlechtere Lungenfunktion sowie ein 3-fach erhöhtes Risiko für Tod oder die Notwendigkeit einer Lungentransplantation [76]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Gabolde u. Mitarb. in einer Population von 164  $\Delta$ F508 homozygoter CF-Patienten berichtet. Die 11 Patienten dieser Population die homozygot oder compound heterozygot für die MBL2-0-Allele der Codons 52, 54 und 57 waren, hatten, im Vergleich zu Trägern von Wildtyp-Allelen, ebenfalls eine signifikant schlechtere Lungenfunktion [77]. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte in einer späteren Studie auch eine Assoziation von MBL2 mit Leberzirrhose bei CF zeigen [78].

### **HLA Klasse II-Allele**

Allergische Symptome wie bronchiale Hyperreagibilität, positiver Hautpricktest, erhöhte Konzentrationen von Serum IgE und präzipitierende Antikörper, kommen bei der CF gehäuft vor [79, 80]. Atopische CF-Patienten scheinen einen schwereren Krankheitsverlauf zu haben, als nicht atopische [80]. Daher ist es vorstellbar, dass bestimmte Gene, die das Risiko an einer Allergie zu erkranken erhöhen, den Verlauf der CF negativ beeinflussen. Für einige der Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II-Allele (DR4–DR7) konnte in der Normalbevölkerung eine Assoziation mit allergischen Erkrankungen gezeigt werden [81, 82].

In einer Untersuchung an 98 Erwachsenen mit CF fand sich, im Vergleich zu Gesunden ohne Allergie, eine signifikante Häufung der HLA Klasse II-Allele DR4 und DR7 und des DR7/DQA\*0201 Haplotyps. In der Gruppe der CF-Patienten war das DR7-Allel mit erhöhtem Gesamt-IgE und mit chronischer *P. aeruginosa* Besiedlung assoziiert. Eine Assoziation zwischen HLA Klasse II-Allelen und FVC oder FEV<sub>1</sub> fand sich in dieser Untersuchung nicht [83].

### **Neuronale (NOS1) und endotheliale NO-Synthase (NOS3)**

Der Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) wird von Enzymen gebildet, die NO-Synthasen (NOS) genannt werden. NOS kommt in drei verschiedenen Isoformen vor: NOS1 (neuronale NOS), NOS2 (induzierbare NOS) und NOS3 (endotheliale NOS). Die NOS-Isoformen werden in unterschiedlichen Zellen der Atemwege exprimiert, wie in Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Endo-

und Epithelzellen, Nervenzellen und glatten Muskelzellen [84, 85]. In den Atemwegen ist NOS an der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse beteiligt, unter anderem an der Infektabwehr, der Regulation des bronchialen Widerstandes sowie der Neurotransmission [86–88]. Bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen der Atemwegen wie dem Asthma bronchiale sind die in der Ausatemluft messbaren Konzentrationen von NO erhöht. Trotz, oder vielleicht wegen, der chronischen pulmonalen Inflammation finden sich bei CF-Patienten jedoch erniedrigte expiratorische NO-Werte [89–92]. In einigen Studien zeigte sich bei CF-Patienten eine positive Korrelation zwischen der Höhe der pulmonalen NO-Konzentrationen und der Lungenfunktion [90, 91, 93–95]. Dies deutet darauf hin, dass der Verlauf der pulmonalen Erkrankung durch Unterschiede in der individuellen NO-Synthese beeinflusst wird.

Das Gen der NOS1 liegt auf Chromosom 12 in Position 12q24.2–q24.31. Bei Asthmatikern konnte gezeigt werden, dass eine Wiederholungssequenz in Intron 20 von NOS1 mit der Variabilität des expiratorischen NO assoziiert ist [96]. Der gleiche Polymorphismus ist auch bei der CF mit der Höhe des exhalieren NO assoziiert [97]. Patienten mit längeren Wiederholungssequenzen haben niedrigere NO-Konzentrationen als Patienten mit kürzeren Sequenzen. In einer Untersuchung an 75 CF-Patienten konnte außerdem gezeigt werden, dass die Träger der NOS1-Genvarianten, die mit niedrigerem NO assoziiert waren, ein höheres Risiko der Besiedlung der unteren Atemwege mit *P. aeruginosa* hatten [97]. Diese NOS1-Genotypen mit niedriger NO-Synthese scheinen auch die Besiedlung der oberen Atemwege durch pathogene Keime zu begünstigen [98, 99]. Die Bedeutung der NOS1 als modifizierendes Gen bei der CF konnte kürzlich bestätigt werden. In einer Untersuchung an 59 Erwachsenen mit CF wurde gezeigt, dass eine CA-Wiederholungssequenz im NOS1-Gen ebenfalls mit der Höhe des NO in den Atemwegen assoziiert ist. NOS1-Genotypen die zu einem höheren NO in den Atemwegen führen waren in dieser Untersuchung mit einer langsameren Verschlechterung der Lungenfunktion assoziiert [100].

Die zweite konstitutiv in den Atemwegen exprimierte NOS-Isoform ist NOS3. Sie wird von einem Gen kodiert, das auf Chromosom 7 in Position 7q35–36 liegt. Das NOS3-Gen enthält an Position 894 in Exon 7 eine G/T-Mutation, die im Codon 298 zum Austausch von Aspartat gegen Glutamat führt [101], was die Stabilität des NOS3-Proteins verändert [102]. Für diese Genvariante konnte, wiederum zunächst bei Patienten mit Asthma, gezeigt werden, dass sie ebenfalls mit der Höhe des exhalieren NO assoziiert ist [103].

In einer Studie an 70 CF-Patienten fand sich, ähnlich wie bei den Untersuchungen an NOS1, dass das NOS3 894G-Allel sowohl mit niedrigeren NO-Werten in der Ausatemluft, als auch mit einer höheren Kolonisationsrate mit *P. aeruginosa* assoziiert war. Diese Assoziation mit NOS3 bestand allerdings nur bei den weiblichen CF-Patienten [104]. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis liegt darin, dass die Aktivität von NOS3, z. B. im Gefäßendothel, durch Östrogene stimuliert werden kann, was zu einer höheren Aktivität dieses Enzyms bei Frauen im Vergleich zu Männern führt [105]. Da Frauen aber, im Vergleich zu Männern, eine um etwa 50% geringere NO-Produktion in den Atemwegen

haben [106], ist es vorstellbar, dass der Krankheitsverlauf bei Patientinnen, die aufgrund ihrer genetischen Disposition eine geringere NO-Synthese haben, in bestimmten Situationen nicht ausreichend NO produzieren können und so der Krankheitsverlauf negativ beeinflusst wird. Diese Hypothese wurde kürzlich durch eine Studie an Patienten mit Sichelzellanämie unterstützt. Bei der Sichelzellanämie handelt es sich ebenfalls um eine Erkrankung mit pulmonaler NO-Defizienz [107,108]. In dieser Studie fand sich, ähnlich wie bei der CF, eine Assoziation zwischen NOS3-Genvarianten mit verminderter NO-Synthese und pulmonalem Phänotyp bei Frauen aber nicht bei Männern [109].

### **Interleukine-10 (IL-10)**

IL-10 gehört zu den Zytokinen mit antiinflammatorischer Wirkung. Bei der CF ist die Bildung von IL-10 im Vergleich zu Gesunden vermindert [110–112]. Im IL-10 Gen existiert ein funktionell relevanter Polymorphismus an Position –1082 der Promotorregion. Aus Studien an Mäusen ergeben sich Hinweise, dass IL-10 eine wichtige Rolle bei der endobronchialen Infektion mit *P. aeruginosa* spielt [113,114] und an der Regulation der T-Zell-vermittelten Antwort auf eine Infektion mit *A. fumigatus* beteiligt ist [115–117].

In einer deutsch-französischen Kooperationsstudie an 387 Patienten mit CF konnte kürzlich gezeigt werden, dass CF-Patienten mit dem IL-10–1082 Allel, das mit einer erhöhten IL-10 Produktion assoziiert ist, eine signifikant erhöhte Kolonisationsrate mit *A. fumigatus* aufwiesen und ein erhöhtes Risiko hatten an einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) zu erkranken [118].

### **Probleme der bisherigen Studien und Ausblick**

Hauptprobleme der bisherigen Assoziationsstudien sind geringe Fallzahlen, kontroverse Ergebnisse (wie bei  $\alpha$ 1-AT, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , GST-M1) oder noch nicht in einer unabhängigen Population bestätigte Assoziationen (z. B. ACE, HLA-II,  $\beta$ 2-AR,  $\alpha$ 1-ACT). Bei den oben aufgeführten Studien wurde eine Kohortengröße von 100 Patienten nur selten überschritten. Die Größe der untersuchten Population ist aber von erheblicher Bedeutung, wie z. B. die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien zu  $\alpha$ 1-AT zeigen [55–57].

Ein weiteres Problem stellt die zum Teil recht unterschiedliche Definition des Phänotyps dar, welche sich unter anderem aus dem unterschiedlichen Studiendesign ergibt. Bei den Studien zu NOS1 z. B. fand sich in einer longitudinalen Untersuchung eine Assoziation mit dem Verlauf der Lungenfunktion aber nicht mit Keimbesiedlung [100], in einer Querschnittsuntersuchung hingegen eine Assoziation mit Keimbesiedlung, aber nicht mit der Lungenfunktion [97].

Bei der Diskussion der Auswahl der zu untersuchenden Marker des Phänotyps, gibt es die Möglichkeit nur extreme Phänotypen zu berücksichtigen, da die so gefundenen Assoziationen vielleicht stärker und daher glaubhafter sind. Andererseits führt diese Auswahl zu einer Verkleinerung der Population und so werden womöglich auch relevante Assoziationen mit diesem Design nicht erkannt. Dieses Problem kann kompensiert werden, indem

die Populationsgröße erheblich angehoben wird. In eine derzeit in den USA durchgeführten Multicenter-Studie zu modifizierenden Genen werden nur CF-Patienten mit gleichem CFTR-Genotyp (DF508/DF508) und extrem unterschiedlichen Phänotyp eingeschlossen. Die Patienten werden anhand ihrer longitudinal erhobenen FEV<sub>1</sub>-Werte einer von drei Gruppen zugeordnet: 1) schwere Lungenerkrankung, 2) milde Lungenerkrankung bei jüngeren (15–28 Jahre) und 3) milde Lungenerkrankung bei älteren (>29 Jahre) Patienten. In diese Studie wurden bereits über 900 Patienten eingeschleust. Vorläufige Auswertungen zeigen, etwas überraschend, dass die *P. aeruginosa* Besiedlung der Atemwege mit 85–89% in den drei Gruppen etwa gleich ist. Daten über das Alter bei Erstbesiedlung mit diesem Keim liegen nicht vor. In einer ersten Analyse wurden 10 Gene untersucht, für die von anderen Gruppen bereits eine Assoziation mit der CF-Lungenerkrankung beschrieben wurde. Mit dem Schweregrad der pulmonalen Erkrankung fand sich hier eine Assoziation mit drei genetischen Markern im TGF- $\beta$ -Gen. Mit den anderen Genen, darunter z. B. ACE, MBL, TNF- $\alpha$  und NOS3, fand sich keine Assoziation mit dem Verlauf der Lungenfunktion, was die vorherigen Studien zum Teil bestätigt, da diese, wie z. B. im Fall von NOS3, eine Assoziation mit der Keimbesiedlung aber nicht mit der Lungenfunktion beschrieben hatten [119].

Parallel zu dieser US-amerikanischen Initiative läuft derzeit in Kanada eine große multizentrische nationale Studie, an der 40 CF-Zentren beteiligt sind. Diese Studie hat zum Ziel, alle verfügbaren CF-Familien Kanadas (ca. 3000 Patienten) zu rekrutieren. In dieser Studie wird DNA sowohl von den Patienten, als auch von deren Eltern gesammelt und untersucht. Analysiert werden Marker in 1) bestimmten Genen, die schon in anderen Studien identifiziert wurden oder aus anderen Gründen als Kandidaten interessant erscheinen, 2) in speziellen genomischen Regionen, die z. B. mit bei der CF-Maus identifizierten Regionen korrespondieren, sowie 3) in Form eines Genom-weiten Scans in der Familien-DNA. Bis jetzt wurden 1382 Familien, darunter 570 Trios (CF-Patient plus beide Eltern), in die Studie aufgenommen. Zur Zeit liegen Ergebnisse für 56 genetische Marker in 39 Genen verschiedener funktioneller Kategorien vor. Bei 7 dieser getesteten Gene fand sich eine statistisch signifikante Assoziation mit mindestens einer klinischen Variable. Zu diesen Genen gehören TGF- $\beta$  und Cathepsin B, für die bei der CF auch schon in anderen Studien eine Assoziation mit dem pulmonalen Phänotyp beschrieben wurde, sowie TNF- $\beta$ , dem Kalzium-abhängigen Chloridkanal CLCA1, und SLC22A, einem Transporter für organische Ionen, für die erstmalig eine Assoziation mit der CF-Lungenerkrankung gefunden wurde [120].

Es bleibt abzuwarten, ob in den oben genannten Studien noch weitere, den Verlauf der CF modifizierende Gene identifiziert werden, und ob die jeweiligen Ergebnisse in den Studien mit unterschiedlichen Einschlusskriterien und Design untereinander reproduzierbar sind.

Zusammenfassend zeigen die aufgeführten Studien, dass modifizierende Gene für den Verlauf der Lungenerkrankung bei CF eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Bevor einzelne genetische Varianten jedoch eindeutig in ihrer Relevanz eingestuft werden können, bedarf es der Bestätigung der einzelnen Untersuchungsergebnisse in größeren, unabhängigen Populationen. Letztlich

besteht die Hoffnung, dass sich aus diesen Erkenntnissen neue Ansätze der Therapie ergeben und Risikogruppen definiert werden können, die einer früheren und intensiveren Behandlung zugeführt werden müssen (Tab. 1, Tab. 2, Tab. 3).

## Danksagung

Diese Arbeit wurde unterstützt durch Vaincre la Mucoviscidose und durch ein Forschungsstipendium der European Respiratory Society (ERS) an Frau Dr. med. Nicola Knauer.

## Literatur

- 1 Population variation of common cystic fibrosis mutations. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Hum Mutat* 1994; 4: 167–177
- 2 Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073–1080
- 3 Cystic Fibrosis Foundation, Patient Registry 2000 Annual Report. Bethesda, MD, 2001
- 4 Kristidis P, Bozon D, Corey M et al. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1178–1184
- 5 Kerem E, Corey M, Kerem BS et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis – analysis of the most common mutation ( $\delta F508$ ). *N Engl J Med* 1990; 323: 1517–1522
- 6 Kerem B, Kerem E. The molecular basis for disease variability in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 1996; 4: 65–73
- 7 Mickle JE, Cutting GR. Genotyp-phenotyp relationships in cystic fibrosis. *Med Clin North Am* 2000; 84: 597–607
- 8 Lester LA, Kraut J, Lloyd-Still J et al.  $\delta F508$  genotype does not predict disease severity in an ethnically diverse cystic fibrosis population. *Pediatrics* 1994; 93: 114–118
- 9 Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I et al. Categories of  $\delta F508$  homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *Twin Res* 2000; 3: 277–293
- 10 Bronsveld I, Mekus F, Bijman J et al. Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of  $\delta F508$  homozygous twins and siblings. *J Clin Invest* 2001; 108: 1705–1715
- 11 Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. *Am J Med Genet* 2002; 111: 88–95
- 12 Rozmahel R, Wilschanski M, Matin A et al. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat Genet* 1996; 12: 280–287
- 13 Zielinski J, Corey M, Rozmahel R et al. Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet* 1999; 22: 128–129
- 14 Kent G, Iles R, Bear CE et al. Lung disease in mice with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1997; 100: 3060–3069
- 15 Haston CK, McKerlie C, Newbigging S et al. Detection of modifier loci influencing the lung phenotype of cystic fibrosis knockout mice. *Mamm Genome* 2002; 13: 605–613
- 16 Insel PA. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Adrenergic receptors-evolving concepts and clinical implications. *N Engl J Med* 1996; 334: 580–585
- 17 Feldman RD, Fick RB, McArdle W, Lai CC. Are lymphocyte  $\beta$ -adrenoceptors altered in patients with cystic fibrosis? *Clin Sci (Lond)* 1987; 73: 407–410
- 18 Büscher R, Herrmann V, Insel PA. Human adrenoceptor polymorphisms: evolving recognition of clinical importance. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 94–99
- 19 Büscher R, Eilmes KJ, Grasemann H et al.  $\beta_2$ -adrenoceptor gene polymorphisms in cystic fibrosis lung disease. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 347–353
- 20 Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW et al. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 2111–2118
- 21 Greally P, Hussein MJ, Cook AJ et al. Sputum tumour necrosis factor- $\alpha$  and leukotriene concentrations in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1993; 68: 389–392
- 22 Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The –308 tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34: 391–399
- 23 Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the –308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 562–566
- 24 Hull J, Thomson AH. Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax* 1998; 53: 1018–1021
- 25 Arkwright PD, Pravica V, Geraghty PJIV et al. End-organ dysfunction in cystic fibrosis: association with angiotensin I converting enzyme and cytokine gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 384–389
- 26 Witt H. Chronic pancreatitis and cystic fibrosis. *Gut* 2003; 52 Suppl 2: ii31–41
- 27 Ignatz R, Massague J. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261: 4337–4345
- 28 Nakamura Y, Tate L, Ertl RF et al. Bronchial epithelial cells regulate fibroblast proliferation. *Am J Physiol* 1995; 269: L377–387
- 29 Kawamoto M, Romberger DJ, Nakamura Y et al. Modulation of fibroblast type I collagen and fibronectin production by bovine bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 425–433
- 30 Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P et al. Genotypic variation in the transforming growth factor- $\beta 1$  gene: association with transforming growth factor- $\beta 1$  production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998; 66: 1014–1020
- 31 El-Gamel A, Awad M, Sim E et al. Transforming growth factor- $\beta 1$  and lung allograft fibrosis. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998; 13: 424–430
- 32 Phan SH, Kunkel SL. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 1992; 18: 29–43
- 33 Arkwright PD, Laurie S, Super M et al. TGF- $\beta(1)$  genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2000; 55: 459–462
- 34 Hull J, Vervaart P, Grimwood K, Phelan P. Pulmonary oxidative stress response in young children with cystic fibrosis. *Thorax* 1997; 52: 557–560
- 35 Brown RK, Kelly FJ. Role of free radicals in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Thorax* 1994; 49: 738–742
- 36 Cantin AM, North SL, Hubbard RC et al. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* 1987; 63: 152–157
- 37 Wilkinson 4th J, Clapper ML. Detoxication enzymes and chemoprevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 216: 192–200
- 38 Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000; 61: 154–166
- 39 Strange RC, Matharoo B, Faulder GC et al. The human glutathione S-transferases: a case-control study of the incidence of the GST1 0 phenotype in patients with adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 1991; 12: 25–28
- 40 Harrison DJ, Cantlay AM, Rae F et al. Frequency of glutathione S-transferase M1 deletion in smokers with emphysema and lung cancer. *Hum Exp Toxicol* 1997; 16: 56–60
- 41 Baranova H, Perriot J, Albuissou E et al. Peculiarities of the GSTM1 0/0 genotype in French heavy smokers with various types of chronic bronchitis. *Hum Genet* 1997; 99: 822–826
- 42 Mann CL, Davies MB, Boggild MD et al. Glutathione S-transferase polymorphisms in MS: their relationship to disability. *Neurology* 2000; 54: 552–557
- 43 Matthey DL, Hassell AB, Plant M et al. Association of polymorphism in glutathione S-transferase loci with susceptibility and outcome in rheumatoid arthritis: comparison with the shared epitope. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 164–168
- 44 Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S et al. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 2001; 482: 21–26
- 45 Fryer AA, Bianco A, Hepple M et al. Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1437–1442
- 46 Baranov VS, Ivaschenko T, Bakay B et al. Proportion of the GSTM1 0/0 genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases. *Hum Genet* 1996; 97: 516–520



- 47 Flamant C, Henrion-Caude A, Boelle PY et al. Glutathione-S-transferase M1, M3, P1 and T1 polymorphisms and severity of lung disease in children with cystic fibrosis. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 295–301
- 48 Henrion-Caude A, Flamant C, Roussey M et al. Liver disease in pediatric patients with cystic fibrosis is associated with glutathione S-transferase P1 polymorphism. *Hepatology* 2002; 36: 913–917
- 49 Birrer P, McElvaney NG, Rudeberg A et al. Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 207–213
- 50 Suter S, Schaad UB, Tegner H et al. Levels of free granulocyte elastase in bronchial secretions from patients with cystic fibrosis: effect of antimicrobial treatment against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1986; 153: 902–909
- 51 Colp C, Pappas J, Moran D et al. Variants of  $\alpha$ 1-antitrypsin in Puerto Rican children with asthma. *Chest* 1993; 103: 812–815
- 52 King MA, Stone JA, Diaz PT et al.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency: evaluation of bronchiectasis with CT. *Radiology* 1996; 199: 137–141
- 53 Eriksson S. Studies in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand Suppl* 1965; 432: 1–85
- 54 Cook PJ. Genetic aspects of the Pi system. *Postgrad Med J* 1974; 50: 362–364
- 55 Döring G, Krogh-Johansen H, Weidinger S et al. Allotypes of  $\alpha$ 1-antitrypsin in patients with cystic fibrosis, homozygous and heterozygous for  $\delta$ F508. *Pediatr Pulmonol* 1994; 18: 3–7
- 56 Mahadeva R, Westerbeek RC, Perry DJ et al.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency alleles and the Taq-I G  $\rightarrow$  A allele in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 1998; 11: 873–879
- 57 Mahadeva R, Stewart S, Bilton D et al.  $\alpha$ 1 antitrypsin deficiency alleles and severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 1998; 53: 1022–1024
- 58 Morgan K, Scobie G, Marsters P et al. Mutation in an  $\alpha$ 1-antitrypsin enhancer results in an interleukin-6 deficient acute-phase response due to loss of cooperativity between transcription factors. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362: 67–76
- 59 Henry MT, Cave S, Rendall J et al. An  $\alpha$ 1-antitrypsin enhancer polymorphism is a genetic modifier of pulmonary outcome in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 273–278
- 60 Frangolias DD, Ruan J, Wilcox PJ et al.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency alleles in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 390–396
- 61 Burnett D, McGillivray DH, Stockley RA. Evidence that alveolar macrophages can synthesize and secrete  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 473–476
- 62 Hudig D, Haverty T, Fulcher C et al. Inhibition of human natural cytotoxicity by macromolecular antiproteases. *J Immunol* 1981; 126: 1569–1574
- 63 Kalsheker N, Morley S, Morgan K. Gene regulation of the serine proteinase inhibitors  $\alpha$ 1-antitrypsin and  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 93–98
- 64 Poller W, Faber JP, Weidinger S et al. A leucine-to-proline substitution causes a defective  $\alpha$ 1-antichymotrypsin allele associated with familial obstructive lung disease. *Genomics* 1993; 17: 740–743
- 65 Mahadeva R, Sharples L, Ross-Russell RI et al. Association of  $\alpha$ (1)-antichymotrypsin deficiency with milder lung disease in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2001; 56: 53–58
- 66 Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343–1346
- 67 Montgomery H, Clarkson P, Barnard M et al. Angiotensin-converting-enzyme gene insertion/deletion polymorphism and response to physical training. *Lancet* 1999; 353: 541–545
- 68 Uhal BD, Gidea C, Bargout R et al. Captopril inhibits apoptosis in human lung epithelial cells: a potential antifibrotic mechanism. *Am J Physiol* 1998; 275: L1013–1017
- 69 Molteni A, Moulder JE, Cohen EF et al. Control of radiation-induced pneumopathy and lung fibrosis by angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II type 1 receptor blocker. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: 523–532
- 70 Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 1992; 176: 1497–1502
- 71 Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 1994; 40: 37–44
- 72 Garred P, Madsen HO, Svegaard A. Genetics of human mannose-binding protein. In: Ezekowitz RA, Sastry K, Reid KBM (eds). *Collectins and innate immunity* AuscIn, TX:RG Landes, 1996: 139–164
- 73 Madsen HO, Garred P, Thiel S et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995; 155: 3013–3020
- 74 Summerfield JA, Sumiya M, Levin M et al. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *BMJ* 1997; 314: 1229–1232
- 75 Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M et al. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 1995; 345: 886–889
- 76 Garred P, Pressler T, Madsen HO et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999; 104: 431–437
- 77 Gabolde M, Guilloud-Bataille M, Feingold J et al. Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: cohort study. *BMJ* 1999; 319: 1166–1167
- 78 Gabolde M, Hubert D, Guilloud-Bataille M et al. The mannose binding lectin gene influences the severity of chronic liver disease in cystic fibrosis. *J Med Genet* 2001; 38: 310–311
- 79 Tobin MJ, Maguire O, Reen D et al. Atopy and bronchial reactivity in older patients with cystic fibrosis. *Thorax* 1980; 35: 807–813
- 80 Warner JO, Taylor BW, Norman AP et al. Association of cystic fibrosis with allergy. *Arch Dis Child* 1976; 51: 507–511
- 81 Aron Y, Swierczewski E, Lockhart A. HLA class II haplotype in atopic asthmatic and non-atopic control subjects. *Clin Exp Allergy* 1995; 25 Suppl 2: 65–67
- 82 Aron Y, Desmazes-Dufeu N, Matran R et al. Evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II alleles DR4 and DR7. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 821–828
- 83 Aron Y, Polla BS, Bienvenu T et al. HLA class II polymorphism in cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1464–1468
- 84 Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 1993; 48: 1034–1043
- 85 Asano K, Chee CB, Gaston B et al. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10089–10093
- 86 Belvisi MG, Stretton CD, Yacoub M et al. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur J Pharmacol* 1992; 210: 221–222
- 87 Dupuy PM, Shore SA, Drazen JM et al. Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. *J Clin Invest* 1992; 90: 421–428
- 88 Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 1997; 99: 2818–2825
- 89 Balfour-Lynn IM, Laverty A, Dinwiddie R. Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1996; 75: 319–322
- 90 Grasemann H, Michler E, Wallot M et al. Decreased concentration of exhaled nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1997 Sep; 24 (3): 173–177
- 91 Grasemann H, Ratjen F. Cystic fibrosis lung disease: the role of nitric oxide. *Pediatr Pulmonol* 1999; 28: 442–448
- 92 Wooldridge JL, Deutsch GH, Sontag MK et al. NO pathway in CF and non-CF-children. *Pediatr Pulmonol* 2004; 37: 338–350
- 93 Grasemann H, Ioannidis I, Tomkiewicz RP et al. Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. *Arch Dis Child* 1998; 78: 49–53
- 94 Ho LP, Innes JA, Greening AP. Exhaled nitric oxide is not elevated in the inflammatory airways diseases of cystic fibrosis and bronchiectasis. *Eur Respir J* 1998; 12: 1290–1294
- 95 Grasemann H, Lax H, Treseler JW et al. Dornase  $\alpha$  and exhaled NO in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2004; 38: 379–385
- 96 Wechsler ME, Grasemann H, Deykin A et al. Exhaled nitric oxide in patients with asthma: association with NOS1 genotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2043–2047
- 97 Grasemann H, Knauer N, Büscher R et al. Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase gene. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2172–2176
- 98 Grasemann H, Storm van Gravesande K, Gärtig S et al. Nasal nitric oxide levels are associated with a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase (NOS1) genes in cystic fibrosis patients. *Nitric Oxide* 2002; 6: 236–241

- <sup>99</sup> Grasmann H, Ratjen F. Pulmonary metabolism of nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis. *Pneumologie* 2002; 56: 376–381
- <sup>100</sup> Texereau J, Marullo S, Hubert D et al. Nitric oxide synthase 1 as a potential modifier gene of decline in lung function in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2004; 59: 156–158
- <sup>101</sup> Marsden PA, Heng HH, Scherer SW et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 17478–17488
- <sup>102</sup> Tesaro M, Thompson WC, Rogliani P et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2832–2835
- <sup>103</sup> Storm van's Gravesande K, Wechsler ME, Grasmann H et al. Association of a missense mutation in the NOS3 gene with exhaled nitric oxide levels. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 228–231
- <sup>104</sup> Grasmann H, Storm van's Gravesande K, Büscher R et al. Endothelial nitric oxide synthase variants in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 390–394
- <sup>105</sup> Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS et al. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 1997; 273: L119–126
- <sup>106</sup> Grasmann H, Storm van's Gravesande K, Büscher R et al. Effects of sex and of gene variants in constitutive nitric oxide synthases on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1113–1116
- <sup>107</sup> Sullivan KJ, Kissoon N, Duckworth LJ et al. Low exhaled nitric oxide and a polymorphism in the NOS I gene is associated with acute chest syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 2186–2190
- <sup>108</sup> Morris CR, Morris Jr SM, Hagar W et al. Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 63–69
- <sup>109</sup> Sharan K, Surrey S, Ballas S et al. Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. *Br J Haematol* 2004; 124: 240–243
- <sup>110</sup> Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW et al. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 2111–2118
- <sup>111</sup> Osika E, Cavaillon JM, Chadelat K et al. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. *Eur Respir J* 1999; 14: 339–346
- <sup>112</sup> Moss RB, Bocian RC, Hsu YP et al. Reduced IL-10 secretion by CD4+ T lymphocytes expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Clin Exp Immunol* 1996; 106: 374–388
- <sup>113</sup> Chmiel JF, Konstan MW, Knesebeck JE et al. IL-10 attenuates excessive inflammation in chronic *Pseudomonas* infection in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 2040–2047
- <sup>114</sup> Chmiel JF, Konstan MW, Saadane A et al. Prolonged inflammatory response to acute *Pseudomonas* challenge in interleukin-10 knockout mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1176–1181
- <sup>115</sup> Cenci E, Mencacci A, Fe d'Ostiani C et al. Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 1998; 178: 1750–1760
- <sup>116</sup> Roilides E, Dimitriadou A, Kadiltoglou I et al. IL-10 exerts suppressive and enhancing effects on antifungal activity of mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol* 1997; 158: 322–329
- <sup>117</sup> Kurup VP, Grunig G. Animal models of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mycopathologia* 2002; 153: 165–177
- <sup>118</sup> Brouard J, Knauer N, Boelle PY et al. Influence of Interleukin-10 on airways colonization by *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. *J Infect Dis* 2005; in press
- <sup>119</sup> Knowles MR, Konstan M, Schluchter M et al. CF gene modifiers: comparing variation between unrelated individuals with different pulmonary phenotypes. *Pediatric Pulmonol* 2004; Suppl 27: 139–140
- <sup>120</sup> Dorfman R, Sandford A, Markiewicz D et al. Analysis of candidate genes as modifiers of cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonol* 2004; Suppl 27: 220–221