

# Methoden der Modifizier Suche am Beispiel der Cystischen Fibrose

Burkhard Tümmler und Frauke Stanke

Klinische Forschergruppe OE 6711  
Medizinische Hochschule Hannover

## Zusammenfassung

Die Cystische Fibrose ist für die große Variabilität des Schweregrades der Krankheitsmanifestation bekannt, obwohl es sich um eine monogene Erkrankung handelt. Studien zur Identifizierung vererbter Modulatoren der CF werden seit einigen Jahren durchgeführt. Zwar ist die Rolle modulierender Gene für die Ausprägung des Schweregrades dieser autosomal rezessiv vererbten Erkrankung bei CF Genetikern wie Ärzten anerkannt, aber für einige plausible Kandidatengene werden in verschiedenen Studien gegensätzliche Befunde publiziert. Dieser Übersichtsartikel beschreibt verschiedene Strategien zur Suche nach Modulatoren und beleuchtet Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden. Ursachen für widersprüchliche Ergebnisse werden diskutiert. Am Beispiel der europäischen CF Zwilings- und Geschwisterstudie und einer nordamerikanischen Studie zur Identifikation von Modulatoren der Lebererkrankung bei CF werden sinnvolle Kriterien zur Rekrutierung von Patienten für die erfolgreiche Suche nach genetischen Modulatoren bei CF abgeleitet.

**Schlüsselwörter:** Cystische Fibrose genetische Modulatoren, Modifier Assoziationsstudie, Kandidatengenaalyse

## Summary

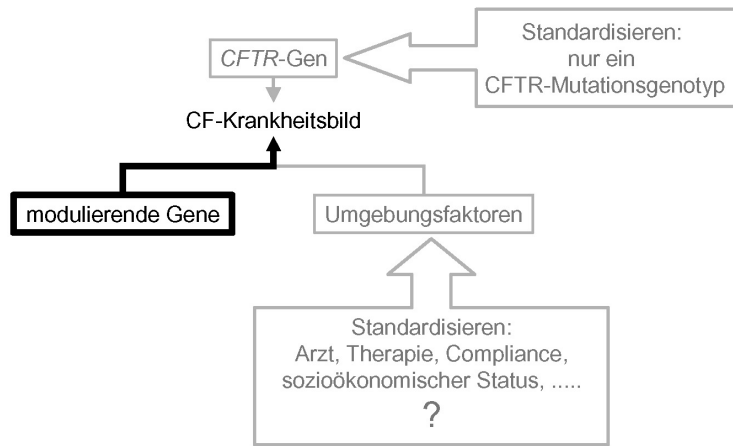
Cystic Fibrosis is known for a high patient-to-patient variability in the clinical course and the severity of the disease manifestation, even though CF is a monogenic disease. Within the last years, several studies have been conducted that aim at the identification of inherited modulators in CF. The impact of modulating genes for the manifestation of CF disease is accepted among CF geneticists and clinicians, but for some plausible candidate genes conflicting results have been published by different researchers. This review describes the different strategies that can be employed to search for modulators and discusses the advantages and disadvantages of the methods. Appropriate criteria for the selection of patients for successful studies of CF modifier genes are illustrated by the European CF Twin and Sibling Study and a North American Study aiming at the identification of modulators of CF liver disease.

**Keywords:** cystic fibrosis, genetic modulators, modifier, association study, candidate gene analysis

## Einleitung

Die autosomal rezessiv vererbte Mukoviszidose (syn. cystische Fibrose, CF) ist eine Systemerkrankung aller exokrinen Drüsen, wobei das klinische Krankheitsbild in erster Linie durch die exokrine Pankreasinsuffizienz, Untergewicht und die chronischen Infektionen der Atemwege mit sekundärem Umbau des Lungengewebes bestimmt wird (Lindemann et al., 2004). Die CF wird durch Mutationen im „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR)-Gen ausgelöst. Bisher sind über 1300 Mutationen im CFTR-Gen identifiziert worden. Der CFTR-Mutationsgenotyp entscheidet, ob der Patient von Geburt an exokrin pankreasinsuffizient ist (PI) oder nicht (PS). Bei Probanden mit einem oder zwei PS Allelen und klinisch signifikanter CFTR-Restfunktion entwickelt sich nicht immer das Vollbild der CF, sondern die einzigen klinischen Manifestationen können männliche Infertilität und/oder die genetische Disposition zu chronischer Pankreatitis und Atemwegserkrankungen sein.

Bei den Patienten mit dem Vollbild der Mukoviszidose wird der klinische Verlauf vom CFTR Mutationsgenotyp, Umgebungsfaktoren und weiteren genetischen Faktoren bestimmt. Selbst Patienten mit Homozygotie für die häufigste CFTR Mutation F508del zeigen die gleiche Bandbreite im pulmonalen und gastrointestinalen Befall wie die Gesamtpopulation der Mukoviszidosepatienten (Mekus et al., 2000). Die Verbesserung der symptomatischen Therapieprogramme ist



**Abb 1 Auswahl von Patienten zur Suche nach genetischen Modulatoren bei CF**

Die Suche nach genetischen Modulatoren wird erleichtert, wenn man andere Einflußgrößen so weit wie möglich standardisiert und so deren Wirkung als Störgröße minimiert. Bei der Mukoviszidose spielt der Mutationsgenotyp eine große Rolle, so dass man möglichst Patienten mit demselben *CFTR*-Mutationsgenotyp untersucht, was aufgrund der Fallzahl nur für *F508del-CFTR* homozygote Patienten realistisch ist. Ferner spielen Umwelt, sozioökonomischer Status und Therapie eine entscheidende Rolle für den Schweregrad der Erkrankung. Bei Studien am Menschen ist es nicht möglich, Umweltbedingungen vollständig zu standardisieren. Möglich ist aber die Untersuchung an Geschwisterpaaren, die während der Kindheit ihre familiäre Umwelt teilen. Zudem existieren in mehreren Ländern CF-Register, mit deren Hilfe regionale Unterschiede in der Versorgungsqualität erfaßt werden. Diese Datenbanken bieten die Möglichkeit, Patienten aus CF-Ambulanzen mit vergleichbarem Therapiestandard zu rekrutieren.

dabei der wichtigste Modulator des klinischen Verlaufs. Während noch vor 40 Jahren die meisten Patienten im Säuglings- und Kleinkindalter verstarben, wird für die heute geborenen CF-Patienten eine mittlere Lebenserwartung von über 50 Jahren prognostiziert. Grundpfeiler der Behandlung der CF sind die hochkalorische Ernährung, Supplementation von Pankreasenzymen und Vitaminen, die hochdosierte antimikrobielle Behandlung der chronischen bakteriellen Atemwegsinfektionen und Physiotherapie und Sport zur Drainage des Bronchialsekrets. Die heute mögliche Lebenserwartung und Lebensqualität lassen sich aber nur erzielen, wenn das Gesundheitssystem des Landes und das Umfeld in der Familie die Umsetzung der Therapieprogramme finanziell und zeitlich erlauben. Der individuelle und nationale sozioökonomische Status sind die derzeit wichtigsten Einflußgrößen für den Verlauf der Mukoviszidose (Schechter et al, 2001). Bei der Suche nach genetischen Modulatoren ist daher bei der Rekrutierung der Patienten Sorge zu tragen, über geeignete Stratifizierung den Einfluß des sozioökonomischen Status und der Qualität der medizinischen Versorgung zu minimieren (Abb. 1).

Die Studien zur Identifizierung genetischer Modulatoren der CF lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: entweder man sucht nach der genetischen Ursache von Sonderformen, die sich nur bei einer Minderheit der Patienten manifestieren (z.B. Mekoniumleues, Leberzirrhose, Diabetes mel-

litus, Restfunktion des Basisdefekts), oder man sucht nach Genen, die bei allen Patienten die prognoserelevanten Kenngrößen (Lungenfunktion und/oder Längensollgewicht) beeinflussen.

**Methoden der Modifier Suche: Ansätze, Kriterien, Vor- und Nachteile**

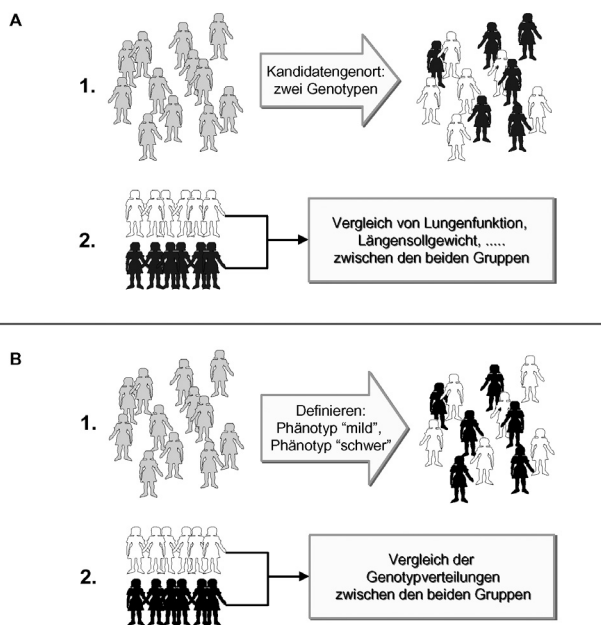
Mit Hilfe genomweiter Kopplungsanalysen ist die Ursache zahlreicher monogener Erkrankungen aufgeklärt worden. Analog läßt sich mit diesem hypothesenfreien Ansatz auch nach genetischen Modulatoren suchen. Der genomweite Ansatz erfordert hohe Probandenzahlen und Hochdurchsatzgenotypisierung mit hinreichend hoher Auflösung, um zu verhindern, dass Modulatoren aufgrund ihres großen genetischen Abstands vom Marker nicht übersehen werden. In Kanada sollen alle CF-Patienten genomweit mit informativen Markern genotypisiert werden, um alle krankheitsrelevanten Modulatorloci aufzuspüren. Man darf gespannt sein, ob das Ergebnis den notwendigen zeitlichen und finanziellen Aufwand rechtfertigen wird.

Der alternative Ansatz, ein Kandidatengen auf Assoziation mit den Phänotyp zu prüfen, ist der in der Literatur gängige Ansatz, um genetische Modulatoren zu identifizieren. Die Mukoviszidose ist hierbei keine Ausnahme, in allen publizierten Studien wurden Kandidatengene analysiert. Üblicherweise wird ein Polymorphismus mit bekannter funktioneller Konsequenz getestet. Wenn die Informati-

vität des Polymorphismus gering ist, besteht allerdings bei einer zu kleinen Stichprobe die Gefahr, das Kandidatengen nicht als Modulator zu erkennen (falsch negativer Befund). Alternativ kann man hochinformativ Marker wie Mikrosatelliten auf Assoziation mit dem Phänotyp prüfen. Dank der mittlerweile guten Qualität der primären Sequenzdaten des menschlichen Genoms lassen sich für jedes Gen solche Marker schnell und effizient finden. Zwar muß im nächsten Schritt über Feinkartierung, Haplotypisierung und Sequenzierung der Bereich weiter eingegrenzt werden, um den/die krankheitsrelevanten funktionellen Polymorphismen zu finden und anschließend die molekulare Ätiologie aufklären zu können. Aber auch wenn a priori funktionelle Polymorphismen getestet werden, sollte anschließend in der Kopplungsgruppe auf weitere funktionelle Varianten gescreent werden.

Studiendesign und die Auswahl der Patienten entscheiden über den Erfolg der Suche nach genetischen Modulatoren. Krankheitsdefinition und die mit der Krankheit assoziierten dichotomen und stetigen Variablen sollten robust, reliabel und durch vorherige Analysen validiert worden sein. Prinzipiell gibt es bei der Durchführung der Modulatorstudien zwei Ansätze (Abb. 2):

- a) Zuerst wird die Kohorte genotypisiert, und anschließend werden Genotypen, Haplotypen und Allelfrequenzen auf Assoziation mit



**Abb 2 Methoden zur Analyse von Kandidatengenomen**

**A** Zuerst werden die Patienten genotypisiert und anschließend Gruppen nach Genotyp in phänotypischen Merkmalen verglichen. Häufig werden die Genotypen zu zwei Klassen zusammengefaßt. Die Zusammensetzung der Gruppen ändert sich mit jeder genetischen Testung.

**B** Die Patienten werden nach klinischen Kriterien (Symptomatik oder Schweregrad) in Gruppen eingeteilt und anschließend genotypisiert. Die Einteilung der Gruppen nach Phänotyp bleibt bei allen genetischen Tests gleich.

phänotypischen Merkmalen geprüft (Abb. 2A).

b) Die Kohorte wird nach klinischem Phänotyp gruppiert und anschließend genotypisiert (Abb. 2B).

Ansatz A dominiert in der Literatur, weist aber zahlreiche Nachteile auf. Hochinformativ multiallelische Marker sind für die Analyse ungeeignet, da typischerweise Genotyp und Allelfrequenz auf Assoziation mit dichotomen Merkmalen A vs. nicht-A geprüft werden, so dass Genotypen zusammengefasst werden. Selbst bei einem dimorphen SNP werden heterozygote Genotypen häufig mit einem der beiden homozygoten Genotypen zusammengefasst. Ohne Kenntnis des molekularen Phänotyps sind diese Ansätze von fragwürdigem Wert; beispielweise kann Heterozygotie, nicht aber Homozygotie den Phänotyp modulieren, was bei binären und multiplen Proteinkomplexen häufig vorkommt. Sehr problematisch ist der explorative Ansatz, bei stetigen Variablen einen Schwellenwert zu definieren und anschließend die Verteilung der Genotypen ober- und unterhalb des Schwellenwerts miteinander zu vergleichen. Wenn zudem mehr als ein SNP im Kandidatengen geprüft wird, wird die Kohorte jedes Mal neu gruppiert.

Ansatz B hingegen ist auf jeden Polymorphismus anwendbar, da Programme für die Monte Carlo Simulation von  $k \times 2$  Tabellen zur Verfügung stehen (Sham und Curtis, 1995) und somit alle Allele unabhängig von ihrer Häufigkeit berücksichtigt werden. Zu-

dem bietet Ansatz B die Möglichkeit, Patienten mit extremen Phänotypen auszuwählen und somit die Informativität der genetischen Analysen zu erhöhen (Tanksley, 1993). Die rekrutierten Patienten werden anhand kontinuierlicher Variablen nach Rangzahl sortiert und anschließend Gruppen aus den Patienten mit den niedrigsten und höchsten Rangzahlen gebildet. Wenn hinreichend viele Patienten rekrutiert werden können, wird man kontrastierende nicht-überlappende Gruppen aus den unteren und oberen Perzentilen bilden, z.B. die untere und obere Quartile oder die Patienten unter der 10er und über der 90er Perzentile.

Auch bei Kandidatengenstudien sollten die Eltern rekrutiert werden, um familienbasierende Tests wie den „transmission disequilibrium test“ (TDT) und die Konstruktion von Haplotypen durchführen zu können. Zudem lassen sich „parent-of-origin“-Effekte erkennen. Beispielsweise ist die Konkordanz im klinischen Phänotyp von CF Geschwistern assoziiert mit fehlender Rekombination des paternalen CF Chromosoms über mehr als 20 cM telomerwärts vom *CFTR* Gen (Mekus et al., 2003). Genetische Modulatoren der Mukoviszidose sind sowohl innerhalb als auch außerhalb der *CFTR* Kopplungsgruppe auf Chr. 7q31 lokalisiert.

Ein inhärentes Problem aller Modifier Studien sind die bei multiplen Tests auftretenden falsch positiven Assoziationen, vor allem wenn nur unverbundene Stichproben von betroffenen

Patienten und gesunden Kontrollen untersucht werden. Familienstudien und TDT Tests sind hilfreich, um zumindest den offensichtlichen Fehler eines divergenten genetischen Hintergrunds zu eliminieren. Nützlich ist das pragmatische Vorgehen, in einer anderen Kohorte zu prüfen, ob sich die gefundene Assoziation replizieren lässt. Allerdings können komplexe Gen – Umwelt Interaktionen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, ohne dass die Befunde falsch positiv sind.

Ein Beispiel aus unseren eigenen Studien an verschiedenen CF-Patientenpopulationen in Europa mag dies verdeutlichen: Bei der Mukoviszidose haben sich Lebenserwartung und Prognose in den letzten 50 Jahren dramatisch gebessert. Ressourcen und Qualität der klinischen Versorgung sind entscheidend für den Gesundheitszustand des Patienten. Wenn man also gefundene Assoziationen in einer weiteren Patientenpopulation prüfen möchte, sollte anhand von Datenbankeinträgen zum selben Stichdatum die Versorgungsqualität in den prognosebestimmenden Parametern Längensollgewicht und Lungenfunktion als Maß für den gastrointestinalen und pulmonalen Befall geprüft werden. Bei den Patienten des CF-Zentrums A hatten wir einen Risikogenotyp identifiziert. Wenn dieselbe statistische Auswertung angewandt wurde, ließ sich diese Assoziation an Patienten des CF-Zentrums B nicht bestätigen. Der Risikogenotyp war allerdings derart unterrepräsentiert, dass die Genotypen sich nicht im

Hardy-Weinberg Gleichgewicht befanden: ein Beleg für eine erhöhte Letalität von Trägern des Risikogenotyps am Zentrum B.

Nur wenige der zahlreichen Modifier Studien bei Mukoviszidose erfüllen die o.g. Kriterien. Nachstehend wird über das Design zweier Studien berichtet, die den Einfluß von störenden Faktoren so weit wie möglich minimiert oder standardisiert haben, um mit größter Aussicht auf Erfolg genetische Modulatoren aufzuspüren.

#### **Die Europäische CF Geschwister- und Zwillingsstudie**

Die CF-Zentren aus Hannover und Rotterdam rekrutierten im Jahr 1996 in einer Fragebogenaktion Geschwister und Zwillinge mit Mukoviszidose (Mekus et al., 2000). Da CF-Geschwister innerhalb der Familie unter ähnlichen Bedingungen aufwachsen und typischerweise vom selben CF-Zentrum betreut werden, lässt sich gegenüber einer Stichprobe von Einzelpatienten der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Manifestation der Erkrankung reduzieren. Die Organisatoren sprachen CF-Ambulanzen aus Ländern an, die sich an der Dokumentation klinischer Daten in einem zentralen europäischen Register beteiligten und deren Gesundheitssysteme eine Behandlung gemäß dem Stand der Forschung erlauben. Gezielt wurden große Zentren mit anerkannter klinischer Erfahrung und hoher Versorgungsqualität angesprochen. Mit der Rekrutierung von Patienten aus zahlreichen erfahrenen CF-Zentren sollte der Einfluß nationaler, geographischer und sozioökonomischer Besonderheiten als auch der Einfluss von Gesundheitssystemen mit limitierten finanziellen Ressourcen so weit wie möglich minimiert werden. Die gemeldeten Patienten wurden in ihrem aktuellen Schweregrad anhand geschlechts- und alterskorrigierten Krankheitsperzentilen in Längensollgewicht und Lungenfunktion eingruppiert (Mekus et al., 2000). Pulmonaler und gastrointestinaler Befall wurde gleich stark bewertet, so dass als Maß für die relative Schwere der CF jedem Patienten eine Rangzahl innerhalb der Kohorte zugewiesen wurde. Als Referenz wurden Einträge

in einer Datenbank aus demselben Jahr herangezogen, in denen Länge, Gewicht und Lungenfunktion von mehr als 20000 CF-Patienten dokumentiert worden waren. Aus der Kohorte der dizygoten CF-Zwillinge und Geschwister wurden für die Suche nach genetischen Modulatoren die informativsten Paare mit standardisiertem *CFTR* Mutationsgenotyp ausgewählt, d.h. die Subgruppe der F508del homozygoten Paare mit extremem klinischen Phänotyp: A. konkordant sehr schwer betroffene Paare, B. konkordant sehr mild betroffene Paare, C. die am stärksten diskordanten Paare (Mekus et al., 2000). Die Gruppen A, B und C erlauben die Suche nach unterschiedlichen Typen von genetischen Modulatoren: Gruppe A: Risikofaktoren, Gruppe B: krankheitsabschwächende Faktoren, Gruppe C: Gensequenzen, die von Genen außerhalb der Kopplungsgruppe beeinflusst werden. Über die Genotypisierung von den Gruppen A und B werden cis-Effekte, über die Genotypisierung der Gruppe C werden trans-Effekte identifiziert. Gruppe C bietet somit die Möglichkeit, Signalketten zu erkennen, die von zwei oder mehr getrennten Loci im Genom kodiert werden. Eine Gruppe C läßt sich naturgemäß nur von Geschwistern, aber nicht aus unverwandten Einzelpersonen bilden.

Ein Großteil der in die Studie aufgenommenen F508del homozygoten Geschwisterpaare wurde vom Studienteam anhand eines standardisierten Protokolls zur Beschreibung des CF-Phänotyps in klinischen Parametern und im Basisdefekt untersucht (Bronsveld et al., 2001). Die im Fragebogen erhobenen Daten wurden somit vor Ort geprüft. Gleichzeitig wurden die Eltern um Blutproben zur Isolierung genomischer DNA gebeten. F508del homozygote monozygote CF Zwillingspaare dienten als Kontrollgruppe für die Genotypisierung. Das Protokoll zur Charakterisierung des CF-Phänotyps war 1993 in Vorbereitung auf die Studie auf einer Konsensuskonferenz von in der CF-erfahrenen Ärzten und Epidemiologen, *CFTR*-Grundlagenforschern und -Humangenetikern erarbeitet worden. Die Vorbereitung der Studie, Erstellung des

Studienprotokolls, Rekrutierung und Untersuchung der Geschwister erstreckte sich über einen Zeitraum von fünf Jahren. Im Anschluss wurde mit der Suche nach genetischen Modulatoren begonnen, und die ersten Ergebnisse sind mittlerweile publiziert worden (Mekus et al., 2003; Ritzka et al., 2004).

F508del *CFTR* ist die häufigste schwere Mutation bei einer monogenen Erkrankung in Europa, so dass sich an F508del Homozygoten exemplarisch die Frage prüfen läßt, welche genetischen Faktoren außerhalb des ursächlich betroffenen Gens die Schwere des Krankheitsbilds bei einer angeborenen Erkrankung modulieren. Die Europäische CF-Geschwister- und Zwillingsstudie hat sehr viel Zeit und Ressourcen darauf verwendet, eine Kohorte hochinformativer Patientenpaare mit identischem *CFTR*-Mutationsgenotyp zu rekrutieren, bei denen der Einfluß von nicht-genetischen Faktoren auf die Erkrankung so weit wie möglich standardisiert wurde.

Die CF Forschergruppen aus Cleveland und Chapel Hill haben in den letzten Jahren an allen großen CF-Ambulanzen der USA F508del homozygote CF-Patienten mit sehr mildem oder sehr schwerem Verlauf der Erkrankung für die Suche nach „genetic modifiers“ rekrutiert. Da beim Ranking auch die Algorithmen der Europäischen CF-Geschwister- und Zwillingsstudie berücksichtigt wurden, wird es in Zukunft möglich sein, die an Einzelpersonen oder Geschwistern identifizierten Modulatoren in der komplementären Studie zu validieren.

#### **Genetische Modulatoren der Lebererkrankung bei CF**

Schwere hepatobiliäre Komplikationen wie Leberzirrhose und portale Hypertension bestimmen die Prognose bei etwa 10% aller Patienten mit Mukoviszidose. Die CF-Forschergruppe in Chapel Hill sucht nach den genetischen Modulatoren der Lebererkrankung bei CF. In die internationale multizentrische Studie wurden nur Patienten aufgenommen, die an einer sehr schweren Hepatopathie leiden, lebertransplantiert sind oder an den

hepatobiliären Komplikationen verstorben sind. Experten der Studienleitung evaluierten von jedem in die Studie eingebrachten Patienten die vorgelegten klinischen, laborchemischen und histopathologischen Befunde. Zudem wurde gefordert, dass der hepatobiliäre Befall mit mindestens einem bildgebenden Verfahren objektiviert worden war. Das Studiendesign bietet daher beste Voraussetzungen, die genetische Disposition zur Lebererkrankung bei CF zu erforschen. Nach ersten vorläufigen Ergebnissen scheinen die S und Z Varianten des alpha1-Antitrypsin Gens und eine Promotervariante im TGF- $\beta$  Gen mit der Lebererkrankung bei CF assoziiert zu sein.

### Mekoniumileus

Bei 5% aller CF-Patienten entwickelt sich perinatal ein Mekoniumileus. Die familiäre Konkordanz ist hoch. Wenn beim erstgeborenen Kind mit CF ein Mekoniumileus auftritt, beträgt die Wiederholungswahrscheinlichkeit bei einem weiteren CF Kind in der Familie 80% (Picard et al., 2004). Da diese Komplikation zu einem Zeitpunkt auftritt, bevor mit den CF-spezifischen Therapieprogrammen begonnen wird, spielen postnatale Umgebungsfaktoren keine Rolle, und dementsprechend sollte sich die genetische Komponente in einer unselektierten Geschwisterpopulation identifizieren lassen. Bei der *cftr*-knock-out-Maus ist die intestinale Obstruktion das dominante CF-ähnliche Symptom, wobei die Letalität dieser Komplikation von einem Locus auf dem murinen Chromosom 7 bestimmt wird (Rozmahel et al., 1996). Bei Geschwistern mit CF wurde 1999 der Modulator für das Auftreten eines Mekoniumileus in der homologen Region auf Chromosom 19q13 kartiert (Zielenski et al., 1999). Bisher ist es allerdings nicht gelungen, die für den Phänotyp verantwortlichen Sequenzen zu identifizieren.

Dieses Beispiel verdeutlicht, dass sich an die Kartierung eines Modulators zeitaufwändige und anspruchsvolle Untersuchungen anschließen, bis die molekulare Ätiologie aufgeklärt ist. Sofern man es nicht mit der Testung bekannter funktioneller Polymorphismen beläßt, sind Modifizierstu-

dien langfristig angelegt. Der Aufwand wird sich jedoch lohnen. Die Entdeckung von bisher unbekanntem krankheitsmodulierenden Sequenzvarianten wird unser Verständnis über Ätiologie und Pathogenese vertiefen und gegebenenfalls auch zu neuen Therapiekonzepten führen, um körpereigene Stärken zu nutzen und Risiken zu minimieren. Die kontroversen Ergebnisse zahlreicher Modifier Studien bei CF, die überwiegend an unselektierten Populationen einer CF-Ambulanz erhoben wurden und auf deren Besprechung daher an dieser Stelle verzichtet werden soll, verdeutlichen aber auch, dass Studiendesign und Rekrutierung sehr sorgfältig zu planen sind, wenn man die Produktion krankheitsirrelevanter genetischer Daten vermeiden möchte.

### Literatur

Bronsveld I, Mekus F, Bijman J, Ballmann M, de Jonge HR, Laabs U, Halley DJ, Ellemunter H, Mastella G, Thomas S, Veeze HJ, Tümmler B (2001) Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings. *J Clin Invest* 108:1705-1715.

Lindemann H, Tümmler B, Dockter G Hrsg (2004) Mukoviszidose – Zystische Fibrose. 4. Aufl. Thieme, Stuttgart.

Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, Bijman J, Veeze H, Tümmler B (2000) Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *Twin Res* 3:277-293.

Mekus F, Laabs U, Veeze H, Tümmler B (2003) Genes in the vicinity of *CFTR* modulate the cystic fibrosis phenotype in highly concordant or discordant F508del homozygous sib pairs. *Hum Genet* 112:1-11.

Picard E, Aviram M, Yahav Y, Rivlin J, Blau H, Bentur L, Avital A, Villa Y, Schwartz S, Kerem B, Kerem E (2004) Familial concordance of phenotype and microbial variation among siblings with CF. *Pediatr Pulmonol* 38:292-297.

Ritzka M, Stanke F, Jansen S, Gruber AD, Pusch L, Woelfl S, Veeze HJ, Halley DJ, Tümmler B (2004) The CLCA gene locus as a modulator of the gastrointestinal basic defect in cystic fibrosis. *Hum Genet* 115:483-491.

Rozmahel R, Wilschanski M, Matin A, Plyte S, Oliver M, Auerbach W, Moore A, Forstner J, Durie P, Nadeau J, Bear C, Tsui LC (1996) Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. *Nat Genet* 12:280-287.

Schechter MS, Shelton BJ, Margolis PA, Fitzsimmons SC (2001) The association of socioeconomic status with outcomes in cystic fibrosis patients in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1331-1337.

Sham PC, Curtis D (1995) Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet* 59:97-105.

Tanksley SD (1993) Mapping polygenes. *Annu Rev Genet* 27:205-233.

Zielenski J, Corey M, Rozmahel R, Markiewicz D, Aznarez I, Casals T, Larriba S, Mercier B, Cutting GR, Kriebsova A, Macek M Jr, Langfelder-Schwind E, Marshall BC, DeCelle-Germana J, Claustres M, Palacio A, Bal J, Nowakowska A, Ferec C, Estivill X, Durie P, Tsui LC (1999) Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet* 22:128-129.

### Korrespondenzadresse

Dr. Frauke Stanke  
 Prof. Dr. Burkhard Tümmler  
 Klinische Forschergruppe OE 6711  
 Medizinische Hochschule Hannover  
 Carl-Neuberg-Str. 1  
 30625 Hannover  
 Tel. 0049-511-5322920  
 Fax 0049-511-5326723  
 tuemmler.burkhard@mh-hannover.de