

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

CFTR-Funktionsanalyse  
zur Diagnosestellung und kausalen Therapie bei Zystischer Fibrose  
–  
ein Vergleich von Biomarkern

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lea Pinders-Keßler  
aus Herdecke (Ruhr)

Datum der Promotion: 05.03.2021

## **Vorwort**

Einzelne Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits bei wissenschaftlichen Fachkongressen präsentiert und sind in Form von Abstracts veröffentlicht worden. Weitere Informationen zu diesen Veröffentlichungen sind am Ende der Arbeit unter dem Punkt „Anteilserklärung an erfolgten Publikationen“ aufgeführt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b>	<b>2</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>Abstrakt (Deutsch)</b>	<b>10</b>
<b>Abstract (Englisch)</b>	<b>12</b>
<b>1. Einleitung und Fragestellung</b>	<b>14</b>
1.1. Grundlegende Informationen zur Zystischen Fibrose (CF)	14
1.2. Genetik und Mutationsklassen bei CF	15
1.3. Pathophysiologie	17
1.4. Klinik	20
1.5. Diagnostik	22
1.6. Therapie bei CF	25
1.6.1. Allgemeine Behandlungsprinzipien	25
1.6.2. CFTR-Modulatoren	26
1.7. ST, NPD und ICM als Biomarker der CFTR-Funktion	27
1.7.1. Biomarker – Definition und Rolle in der Therapieentwicklung bei CF	27
1.7.2. Bisherige Anwendung von ST, NPD und ICM in der CF-Diagnostik zur Ermittlung der CFTR-Funktion	28
1.7.3. Bisherige Anwendung der CFTR-Biomarker zur Evaluation von Behandlungseffekten CFTR-modulierender Substanzen	29
1.8. Fragestellung	31
<b>2. Methoden</b>	<b>33</b>
2.1. Patientenkohorte und Messzeitpunkte	33
2.2. Schweißtest	35
2.2.1. Methode	35
2.2.2. Material und Durchführung	35
2.2.3. Auswertung und diagnostische Interpretation	36
2.3. Nasale Potentialdifferenz (NPD)	37
2.3.1. Methode	37
2.3.2. Durchführung und Material	37
2.3.3. Auswertung und diagnostische Interpretation	40
2.3.4. NPD-Messkurven	41
2.4. Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM)	43
2.4.1. Methode	43
2.4.2. Durchführung und Material	44
2.4.3. Auswertung und diagnostische Interpretation	47
2.4.4. ICM-Messkurven	48
2.5. Bestimmung der Serumspiegel von Ivacaftor	50
2.6. Statistische Auswertung	50
2.6.1. Deskriptive und induktive Statistik	50
2.6.2. Selbstorganisierende Kohonen Netzwerke (SOMs).	51
2.6.3. Klassifikationsalgorithmen	51
2.6.4. Multilayer Perceptrons (MLPs)	52
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>54</b>
3.1. Diskriminierung zwischen CF und Non-CF auf der Basis der CFTR-Biomarker ST, NPD und ICM (für Studiendaten aus Berlin)	54

3.1.1. Referenzwerte der CFTR-Biomarker und basale Messdaten (Berlin)	54
3.1.2. Rolle des Alters bei der Klassifikation CF versus Non-CF und PI-CF versus PS-CF	57
3.1.3. Korrelationen von ST, NPD und ICM	59
3.1.3.1. Korrelationen nach Spearman	59
3.1.3.2. Zwei- und dreidimensionale Darstellung der Zusammenhänge von ST, Wilschanski Score (NPD) und Derichs Score (ICM)	61
3.1.3.3. Zwei- und dreidimensionale Darstellung der Zusammenhänge der ICM-Antworten $\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX, $\Delta I_{sc}$ Carbachol und $\Delta I_{sc}$ Histamin	63
3.1.4. Die Klassifikationsgenauigkeit der CFTR-Biomarker für CF versus Non-CF: Berechnung optimaler Cutoff-Werte	65
3.1.5. Funktionaler Zusammenhang zwischen verschiedenen Biomarkern	70
3.1.6. Multivariate Analyse	71
3.2. Klassifikationsgenauigkeit für PI-CF versus PS-CF auf der Basis der CFTR-Biomarker ST, NPD und ICM (Studiendaten aus Berlin)	74
3.2.1. Berechnung bestmöglicher Cutoff-Werte	74
3.2.2. Multivariate Analyse	76
3.3. Selbstorganisierende Karten zur Klassifikation der Probanden in natürliche Gruppen auf Basis eines Ähnlichkeitsmaßes	79
3.4 Externe Validierung der Berliner ICM-Referenzwerte	85
3.4.1. Externe Validierung	85
3.4.2. Vergleich der ICM-Werte in den verschiedenen Zentren	87
3.4.3. Ursache des systematischen Messfehlers: Effekt der Begasungsgeschwindigkeit auf die Höhe der ICM-Antworten	92
3.4.4. Klassifikation zwischen Kontrollen und CF bei schneller Begasung	94
3.5. Evaluation des Effekts von Ivacaftor bei vier Patienten mit der G551D-Mutation	99
3.5.1 Ermittlung organspezifischer CFTR-Funktion im Behandlungsverlauf	99
3.5.2. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Ivacaftor	103
<b>4. Diskussion</b>	<b>106</b>
4.1. Neue ECFS-Referenzwerte zur Klassifikation in Kontrollen und CF	107
4.1.1. Vorzüge und Grenzen des Schweißtests	107
4.1.2. Vor- und Nachteile der nasalen Potentialdifferenzmessung (NPD)	108
4.1.3. Möglichkeiten der intestinalen Kurzschlussstrommessung (ICM)	109
4.1.4. Vergleich von ST, NPD und ICM zur Klassifikation in CF und Non-CF	112
4.2. ECFS-Referenzwerte zur Klassifikation in PI-CF und PS-CF	113
4.3. Externe ICM-Validierung	114
4.4. Organspezifischer Effekt von Ivacaftor bei vier G551D-Patienten als Ausblick für den Einsatz von ST, NPD und ICM in zukünftigen CFTR-Modulator-Studien	116
4.5. Vorteile und Limitationen dieser Studie	117
4.6. Schlussfolgerung	119
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>120</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>140</b>
<b>Anteilerklärung an erfolgten Publikationen</b>	<b>141</b>
<b>Curriculum vitae</b>	<b>142</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>143</b>
<b>Danksagung</b>	<b>144</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABPA	allergische bronchopulmonale Aspergillose
Amil	Amilorid <sup>[1]</sup> <sub>SEP</sub>
ASL	airway surface liquid, Atemwegsflüssigkeit
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
AUC	Area under the curve, Fläche unter der Kurve
C5.0	statistisches Entscheidungsbaum-Verfahren
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaCC	kalziumabhängige Chloridkanäle
CHAID	Chi-squared Automatic Interaction Detector (statistisches Verfahren)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CART	Classification and Regression Trees (statistisches Verfahren)
CBAVD	kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens <sup>[1]</sup> <sub>SEP</sub>
CCH	Carbachol <sup>[1]</sup> <sub>SEP</sub>
CF	cystic fibrosis, zystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CFTR <sub>0-4</sub>	Messzeitpunkte der CFTR-Funktionsanalyse
CFTR2	Website "Clinical and Functional Translation of CFTR"
CFTR-RD	CFTR-related disorder, CFTR-assoziierte Erkrankung
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CLSI	Clinical and Laboratory Standard
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure
DIOS	Distales intestinales Obstruktionssyndrom
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure <sup>[1]</sup> <sub>SEP</sub>
DNWG	Diagnostic Network Working Group, Arbeitsgruppe „Diagnostisches Netzwerk“
ECFS	European Cystic Fibrosis Society, europäische Gesellschaft für Zystische Fibrose
ENaC	epithelialer Natriumkanal
FDA	US Food and Drug Administration
FEV <sub>1</sub>	Einsekundenkapazität <sup>[1]</sup> <sub>SEP</sub>
Forsk	Forskolin
Forsk/IBMX	Forskolin/3-Isobutyl-1-Methylxanthin
Geni	Genistein
Hista	Histamin
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat
H <sub>2</sub> O	Wasser
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin <sup>[1]</sup> <sub>SEP</sub>
ICM	intestinal current measurement, intestinale Kurzschlussstrommessung
I <sub>sc</sub>	transepithelialer Kurzschlussstrom
ΔI <sub>sc</sub>	Änderung des transepithelialen Kurzschlussstroms
IRT	immunreactives Trypsinogen
Iso	Isoproterenol
K <sup>+</sup>	Kalium <sup>[1]</sup> <sub>SEP</sub>
KCl	Kaliumchlorid <sup>[1]</sup> <sub>SEP</sub>
KPI	Potassium Phosphate, Kaliumphosphat
L <sub>scc</sub>	Logistische Regression
M	mukosaler Kammerabschnitt
mmol/l	Millimol/Liter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule <sup>[1]</sup> <sub>SEP</sub>

mosmol/l	Milliosmol/Liter
$\mu\text{A}$	Mikroampère
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\text{Na}^+$	Natrium
NBF1/2	nucleotide-binding fold, Nukleotidbindende Domäne 1/2
Non-CF	non-cystic fibrosis, gesunde Kontrolle
NPD	nasale Potentialdifferenzmessung
OC1/0Cl <sup>-</sup>	chloridfreie Lösung
PAP	Pankreatitis-assoziiertes Protein
PD	Potentialdifferenz
$\Delta\text{PD}$	Änderung der Potentialdifferenz
PI-CF	zystische Fibrose mit exokriner Pankreasinsuffizienz
PS-CF	zystische Fibrose mit exokriner Pankreassuffizienz
PTC124	CFTR-Modulator Ataluren
RBF-Netze	Radiale-Basisfunktionen-Netze (statistisches Verfahren)
Ringers	Ringerlösung
ROC	Receiver-Operating-Characteristic
$R_t$	Gewebewiderstand
mRNA	messenger-ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
S	serosaler Kammerabschnitt
SOM	selforganizing map, selbstorganisierende Karte
SOP	standard operating procedure, Standardprotokoll
ST	Schweißtest
Tab.	Tabelle
TMD	transmembrane domain, transmembranbindende Domäne
vs.	versus, im Gegensatz zu
VX809	CFTR-Korrektor Lumacaftor
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
Z.n.	Zustand nach

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1</b>	Vereinfachtes Schema der Transportmechanismen an der Zelloberfläche des respiratorischen Epithels bei Non-CF	19
<b>Abb. 1.2</b>	Vereinfachtes Schema der veränderten Transportmechanismen an der Zelloberfläche des respiratorischen Epithels bei zystischer Fibrose	19
<b>Abb. 2</b>	Algorithmus zur CF-Diagnosestellung	24
<b>Abb. 3.1</b>	Evaluation des Effekts von Ivacaftor bei vier G551D-Patienten	34
<b>Abb. 3.2</b>	Pharmakokinetik von Ivacaftor	34
<b>Abb. 4</b>	Schweißsammler mit blau angefärbtem Schweiß	35
<b>Abb. 5</b>	NPD - schematischer Aufbau	40
<b>Abb. 6</b>	Ergebnisse der nasalen Potentialdifferenzmessung (NPD) bei Non-CF, PS-CF und PI-CF	42
<b>Abb. 7</b>	ICM – Aufbau	45
<b>Abb. 8</b>	ICM – Material zur Entnahme der Biopsie und Einspannung in Ussingkammer	46
<b>Abb. 9</b>	Ergebnisse intestinaler Kurzschlussstrommessung (ICM) an Rektum-saugbiopsien in Micro-Ussingkammern bei Non-CF, PS-CF und PI-CF	49
<b>Abb. 10</b>	Komponenten eines Klassifikationsalgorithmus	52
<b>Abb. 11.1</b>	Wilschanski Score in Abhängigkeit vom ST und vom ICM-Derichs Score	61
<b>Abb. 11.2</b>	ST in Abhängigkeit vom NPD - Wilschanski Score und vom ICM - Derichs Score	62
<b>Abb. 11.3</b>	ICM - Derichs Score in Abhängigkeit vom ST und vom NPD - Wilschanski Score	62
<b>Abb. 12.1</b>	$\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX in Abhängigkeit von $\Delta I_{sc}$ Carbachol und $\Delta I_{sc}$ Histamin	63
<b>Abb. 12.2</b>	$\Delta I_{sc}$ Carbachol in Abhängigkeit von $\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX und $\Delta I_{sc}$ Histamin	64
<b>Abb. 12.3</b>	$\Delta I_{sc}$ Histamin in Abhängigkeit von $\Delta I_{sc}$ Carbachol und $\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX	64
<b>Abb. 13.1</b>	ROC-Analyse der Chloridkonzentration im Schweiß	67
<b>Abb. 13.2</b>	ROC-Analysen der NPD-Parameter	67
<b>Abb. 13.3</b>	ROC-Kurven-Analysen der ICM-Parameter	68
<b>Abb. 14.1</b>	Klassifikation in CF und Non-CF mit NPD - Wilschanski Score	68
<b>Abb. 14.2</b>	Klassifikation in CF und Non-CF mit ICM - Derichs Score	69
<b>Abb. 14.3</b>	Klassifikation in CF und Non-CF mit Carbachol pre Washout	69
<b>Abb. 15.1</b>	Berechnung des Wilschanski Scores aus dem Schweißtest	70
<b>Abb. 15.2</b>	Berechnung des Derichs Scores aus dem Schweißtest	70
<b>Abb. 15.3</b>	Berechnung von $\Delta I_{sc}$ Carbachol pre Washout aus dem Schweißtest	71
<b>Abb. 15.4</b>	Berechnung des Derichs Scores aus $\Delta I_{sc}$ Carbachol pre Washout	71
<b>Abb. 16.1</b>	Entscheidungsbaum exhaustive CHAID unter Einschluss aller Biomarker	72
<b>Abb. 16.2</b>	Entscheidungsbaum C5.0 unter Einschluss aller Biomarker	73
<b>Abb. 17.1</b>	ROC-Kurven-Analysen zur Klassifikation in PI-CF und PS-CF	75
<b>Abb. 17.2</b>	Entscheidungsbaum (exhaustive CHAID) zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF	75
<b>Abb. 18</b>	Entscheidungsbaum (CART) zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF unter Einbeziehung aller Biomarker	76
<b>Abb. 19</b>	Normalisierte Wichtigkeit der einzelnen Biomarker in einem RBF-Netz zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF	79
<b>Abb. 20</b>	Zweidimensionale SOM-Karte mit den Clustern C1-C5	80
<b>Abb. 21</b>	SOM-Karten für die Chloridkonzentration im Schweiß sowie NPD- und ICM-Parameter für die Gruppen Non-CF Typ I und II (Cluster C2 und C5), PI-CF Typ I und II (Cluster C1 und C4) und PS-CF (Cluster C3)	81
<b>Abb. 22.1</b>	Cluster Profile für die Non-CF Typen I und II (C2, C5)	82

<b>Abb. 22.2</b>	Cluster Profile für die PI-CF Typen I und II (C1, C4)	83
<b>Abb. 23.1</b>	Vergleich der ICM-Antworten aller Probanden der drei Zentren	87
<b>Abb. 23.2</b>	Vergleich der ICM-Antworten aller CF-Patienten der drei Zentren	88
<b>Abb. 24</b>	Interpretation von Cohens d am Beispiel des Derichs Scores	90
<b>Abb. 25.1</b>	Verteilung von $\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX in den Zentren 1/ 2 und Zentrum 3	90
<b>Abb. 25.2</b>	Verteilung von $\Delta I_{sc}$ Carbachol in den Zentren 1/ 2 und Zentrum 3	91
<b>Abb. 25.3</b>	Verteilung von $\Delta I_{sc}$ Histamin in den Zentren 1/ 2 und Zentrum 3	91
<b>Abb. 25.4</b>	Verteilung des Derichs Scores in den Zentren 1/ 2 und Zentrum 3	91
<b>Abb. 26.1</b>	$\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX - Mittelwertvergleich bei langsamer und schneller Begasung	93
<b>Abb. 26.2</b>	$\Delta I_{sc}$ Carbachol - Mittelwertvergleich bei langsamer und schneller Begasung	93
<b>Abb. 26.3</b>	$\Delta I_{sc}$ Histamin - Mittelwertvergleich bei langsamer und schneller Begasung	94
<b>Abb. 26.4</b>	Derichs Score - Mittelwertvergleich bei langsamer und schneller Begasung	94
<b>Abb. 27</b>	Boxplots der Zentren 1-3 für Kontrollen und CF-Patienten	95
<b>Abb. 28</b>	Zentrum 3 - ROC-Kurven für Kontrollen vs. CF mit ICM-Parametern	96
<b>Abb. 29.1</b>	Zentrum 3 (schnelle Begasung) - Klassifikationsgenauigkeit von $\Delta I_{sc}$ Carbachol	97
<b>Abb. 29.2</b>	Zentrum 3 (schnelle Begasung) - Klassifikationsgenauigkeit des Derichs Scores	97
<b>Abb. 29.3</b>	Zentrum 3 (schnelle Begasung) - Klassifikationsgenauigkeit von $\Delta I_{sc}$ Histamin	98
<b>Abb. 30</b>	Die Chloridkonzentrationen im Schweiß im Behandlungsverlauf (Ivacaftor)	100
<b>Abb. 31.1.</b>	NPD - PD basal im Behandlungsverlauf (Ivacaftor)	101
<b>Abb. 31.2</b>	NPD - $\Delta$ PD Chloridfrei/Iso im Behandlungsverlauf (Ivacaftor)	101
<b>Abb. 31.3</b>	NPD - Wilschanski Score	102
<b>Abb. 32.1</b>	ICM – $\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX im Behandlungsverlauf (Ivacaftor)	102
<b>Abb. 32.2</b>	ICM - Derichs Score im Behandlungsverlauf (Ivacaftor)	103
<b>Abb. 33</b>	Pharmakokinetik von Ivacaftor	105

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1</b>	Kategorien von CFTR-Mutationsklassen	17
<b>Tab. 2</b>	Betroffene Organsysteme und klinische Manifestationen bei CF	21
<b>Tab. 3</b>	NPD - Zusammensetzung der benötigten Lösungen	39
<b>Tab. 4</b>	Basic Characteristics sowie NPD- und ICM-Referenzwerte	56
<b>Tab. 5.1</b>	Die Rolle des Alters bei der Klassifikation von CF vs. Non-CF	58
<b>Tab. 5.2</b>	Die Rolle des Alters bei der Klassifikation von PI-CF vs. PS-CF	58
<b>Tab. 6</b>	Korrelationen von ST, NPD- und ICM-Parametern	60
<b>Tab. 7</b>	Klassifikation in CF und Kontrollen mit ST, NPD und ICM	65
<b>Tab. 8</b>	Chloridkonzentration im Schweiß - Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit in Abhängigkeit verschiedener Cutoff-Werte	66
<b>Tab. 9</b>	Klassifikation in PI-CF und PS-CF mit ST, NPD und ICM	74
<b>Tab. 10</b>	Klassifikationsgenauigkeit eines logistischen Regressionsmodells zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF	77
<b>Tab. 11.1</b>	Klassifikationsgenauigkeit eines Multilayer Perceptron Netzes mit Chloridkonzentration im Schweiß und $\Delta I_{sc}$ Carbachol pre Washout (ICM) zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF	78
<b>Tab. 11.2</b>	Klassifikationsgenauigkeit eines Multilayer Perceptron Netzes mit allen Biomarkern zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF	78
<b>Tab. 12</b>	Klassifikationsgenauigkeit für das Regelsystem mit 6 Regeln und 1 Default Regel	84
<b>Tab. 13</b>	Basic Characteristics und ICM-Referenzwerte der Zentren 2 und 3	86
<b>Tab. 14</b>	Basisdaten, Differenz der Rohdaten und standardisierte Effektgrößen der ICM-Parameter für die Zentren 1/ 2 und Zentrum 3	89
<b>Tab. 15</b>	Zentrum 3 (schnelle Begasung) – Kontrollen vs. CF mit ICM-Parametern	95
<b>Tab. 16</b>	Cutoff-Werte zur Klassifikation von Kontrollen vs. CF in Abhängigkeit von der Begasung	96

## **Abstrakt (Deutsch)**

**Einführung:** Der Zystischen Fibrose (CF) liegen Mutationen im Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gen zu Grunde, welche zur Fehlfunktion des CFTR-Chloridkanals führen. Die Diagnosestellung ist schwierig, wenn die klinische Relevanz seltener Genvarianten unklar ist oder Goldstandard-Schweißtestwerte (ST) im diagnostischen Intermediärbereich liegen. Mit nasaler Potentialdifferenzmessung (NPD) und intestinaler Kurzschlussstrommessung (ICM) kann die CFTR-Funktion zur Diagnostik und Effektevaluation von CFTR-Modulatoren individuell charakterisiert werden.

### **Ziele:**

1. Ermittlung der diagnostischen Relevanz der NPD-/ICM-Biomarker (nach Standard Operating Procedures (SOPs) der European Cystic Fibrosis Society (ECFS)) im Vergleich zum Goldstandard ST
  - 1.a) zur Differenzierung zwischen CF/Kontrollen (Non-CF).
  - 1.b) zur Differenzierung zwischen pankreasinsuffizienten (PI-CF)/pankreassuffizienten CF-Patienten (PS-CF).
2. Beschreibung des funktionalen Zusammenhangs zwischen NPD-/ICM-Biomarkern mit dem ST.
3. Neue Klasseneinteilung der Probanden in „natürliche“ Gruppen (SOM-Klassen) nach Ähnlichkeiten bezüglich der CFTR-Biomarker. Vergleich der SOM-Klassen mit den Klassen PI-CF/PS-CF/Non-CF.
4. Externe Validierung der Berliner ICM-Ergebnisse.
5. Evaluation des Effektes des CFTR-Potentiators Ivacaftor bei vier Patienten mit der G551D-Genmutation.

### **Methodik:**

ST, NPD und ICM wurden bei 51 Berliner Probanden (Non-CF, PS-CF, PI-CF) entsprechend aktueller ECFS SOPs durchgeführt. Externe Validierung der Berliner ICM-Daten durch ICM-Messungen an zwei weiteren Zentren (57 Probanden). Kurz-, mittel- und langfristige Behandlungseffekte sowie die Pharmakokinetik von Ivacaftor wurden bei vier G551D-Patienten durch wiederholte CFTR-Funktionsanalysen bestimmt. Data-Mining Verfahren lieferten SOM-Klassen.

**Ergebnisse:** Organspezifische ECFS Referenz-/Cutoff-Werte wurden für ST/NPD/ICM erhoben. Mit dem ST, verschiedenen NPD- sowie ICM-Parametern konnte exzellent zwischen CF und Non-CF diskriminiert werden (area under the curve AUC > 0,95) mit folgenden signifikanten Cutoff-Werten: ST 46,5 mmol/l; Wilschanski Score 0,5; Derichs Score 36,7  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; Carbachol pre Washout 8,3  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ;  $p < 0,001$ . Eine >90%-ige Klassifikation zwischen PI-CF und PS-CF war mit ST/NPD/ICM nur multivariat (nicht univariat) möglich (Mulilayer-Perceptron, SOMs, logistische Regression, CART). SOMs zerlegten die Probanden in fünf jeweils homogene Untergruppen (2 Non-CF, 2 PI-CF, 1 PS-CF).

Die externe ICM-Validierung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Zentrum 1 und 2, allerdings hochsignifikante Unterschiede zu Zentrum 3. Eine schnellere Ussingkammer-Gasflussgeschwindigkeit in Zentrum 3 führte zu quantitativ höheren, qualitativ aber vergleichbaren  $I_{sc}$ -Werten.

Erste Behandlungsversuche mit Ivacaftor bei G551D-Patienten deuteten auf organspezifische Veränderungen hin: mit ST/ICM verbesserte sich die CFTR-Funktion im Verlauf individuell; die NPD-Veränderungen waren inkonsistent.

**Schlussfolgerung:** ST, NPD und ICM sind sehr gut zum Ausschluss von CF geeignet.

Die erste externe ICM-Validierung unterstützt die weitere Etablierung des Biomarkers in der Diagnostik und Therapieentwicklung.

Für zukünftige klinische Langzeitstudien zu CFTR-Modulatoren erscheint die kombinierte CFTR-Funktionsanalyse der Biomarker (besonders ST und ICM) und Korrelation dieser Biomarker mit Surrogatparametern auf Grund organspezifisch unterschiedlicher Ansprechbarkeiten sinnvoll.

## Abstract (English)

**Introduction:** Cystic fibrosis (CF) is caused by a defect of the CF transmembrane conductance regulator (CFTR) gen. Diagnosis can be difficult if clinical relevance of rare mutations is unclear or diagnostic sweat test (ST) results are unconvincing. Nasal potential difference (NPD) and intestinal current measurement (ICM) can characterize individual CFTR function for diagnostic purposes and evaluation of CFTR-modulator effects.

### Aims:

1. Evaluation of the diagnostic relevance of NPD/ICM biomarkers (using standard operating procedures (SOPs) of the European Cystic Fibrosis Society (ECFS)) in contrast to ST for
  - 1.a) differentiation between CF/controls (Non-CF) and
  - 1.b) differentiation between pancreatic insufficiency (PI-CF)/pancreatic sufficiency (PS-CF).
2. Description of the functional connection between NPD/ICM biomarkers and ST.
3. New classification of individuals in 'natural' groups (SOM classes) according to similarities of CFTR biomarkers. Comparison of SOM classification to the classes PI-CF/PS-CF/Non-CF.
4. External validation of Berlin ICM results.
5. Evaluation of effects of the CFTR potentiator Ivacaftor in patients with the G551D-mutation.

**Methods:** ST/NPD/ICM were conducted in 51 individuals (Non-CF, PS-CF, PI-CF). For external validation Berlin ICM data were compared to results of 57 individuals from two other centers. Short-, intermediate- and long-term effects and pharmacokinetics of Ivacaftor were evaluated in four G551D-patients by repeated CFTR functional analyses. Data-mining techniques delivered SOM classes.

**Results:** ECFS reference/cutoff values for ST, NPD and ICM were determined. ST and different NPD/ICM parameters were able to discriminate excellently between CF and Non-CF (area under the curve AUC > 0.95) and provided significant diagnostic cutoff values (ST 46.5 mmol/l; Wilschanski Score 0.5; Derichs Score 36.7  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ; Carbachol pre washout 8.3  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ;  $p < 0.001$ ). > 90% classification between PI-CF/PS-CF by ST/NPD/ICM was possible in

multivariate (not univariate) settings (multi-layer perceptrons, SOMs). SOMs discovered five subgroups (2 non-CF, 2 PI-CF, 1 PS-CF).

External ICM validation showed no significant differences between center 1 and 2 but significant differences to center 3. Higher ussing chambers gas-flow rates in center 3 caused quantitatively different but qualitatively comparable ICM values.

Ivacaftor therapy in G551D patients indicated organ-specific differences: CFTR function evaluated by ST/ ICM was improved individually; changes in NPD were inconsistent.

**Conclusion:** ST, NPD and ICM are suitable to exclude CF.

Our first external ICM validation supports a further establishment of ICM for diagnosis and therapy development.

For further long-term clinical trials on CFTR modulators combined CFTR functional analyses of these biomarkers (especially ST and ICM) and their correlation to surrogate parameters seem reasonable because of organ-specific different responsivenesses.

# 1. Einleitung und Fragestellung

## 1.1. Grundlegende Informationen zur Zystischen Fibrose (CF)

Zystische Fibrose (engl. *cystic fibrosis*, *CF*), auch Mukoviszidose genannt, ist die häufigste genetische Stoffwechselerkrankung mit autosomal rezessivem Erbgang. Sie tritt in Europa mit einer Prävalenz von 0,74/10.000 (1) bei ca. 1:2000-3000 Neugeborenen und in den USA mit einer Häufigkeit von etwa 1:3500 auf (2). Weltweit gibt es zwischen 70.000 und 100.000 CF-Patienten, wobei in Deutschland ca. 8000 Menschen bei ausgewogenem Geschlechterverhältnis (2016; 51.8% Männer) betroffen sind (3,4). Damit gehört CF zu den seltenen Erkrankungen (engl. *rare diseases* oder *orphan diseases*) (5) wobei es geographische und ethnische Schwankungen bei der Häufigkeit von CF und ihrem Mutationsspektrum gibt (4,6–8). CF entsteht durch Mutationen im Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gen, was einen beeinträchtigten oder nicht vorhandenen CFTR-Chloridkanal und damit reduzierten Flüssigkeits- und Ionen transport an der apikalen Membran exokriner Epithelzellen verursacht (9,10). Die dadurch veränderte Sekretzusammensetzung führt zu einem stark verdickten Mukus, der die Ausführungsgänge der Drüsen verstopft und Entzündungen bis hin zu zystisch-fibrotischen Umwandlungen der betroffenen Organe zur Folge hat. Zunächst fiel die veränderte Ionenzusammensetzung im Schweiß von CF-Patienten auf (11), noch bevor die zugrunde liegende Chloridabsorptionsstörung entdeckt wurde (12). Als eigenständiges Krankheitsbild wurde CF allerdings schon 1938 von Dorothy Hansine Andersen erstmals umfassend beschrieben (13). Es handelt sich bei ihr um eine fortschreitende Multiorganerkrankung die v.a. die Atemwege und den Verdauungstrakt mit Leber, Bauchspeicheldrüse und Darm sowie die männlichen Reproduktionsorgane betrifft. Neben der Weiterentwicklung medikamentöser Therapien profitieren CF-Patienten besonders von Physiotherapie, Sport und hochkalorischer Ernährung. Das führt insgesamt zu einer deutlich verbesserten Lebensqualität und längeren Lebenszeit (14). Dennoch steht am Ende häufig nur noch eine Lungen- oder auch Lebertransplantation als letzte Therapiemöglichkeit zur Verfügung. Die Lebenserwartung liegt derzeit etwa bei 40 Jahren (15). Neugeborene mit CF können voraussichtlich ein Alter von etwa 50 Jahren erreichen (16), einige von ihnen sogar das Rentenalter (17). 2012 wurde das erste Medikament aus der Gruppe der CFTR-Modulatoren, der CFTR-Potentiator Ivacaftor, für bestimmte Genmutationen zugelassen und machte Hoffnung auf eine neue Ära in der CF-Behandlung (18,19). Eine spezifische Gentherapie existiert bisher noch nicht (20).

## 1.2. Genetik und Mutationsklassen bei CF

CF wird durch Defekte im 1989 entdeckten CFTR-Gen verursacht (21). Damit die autosomal-rezessive Erbkrankheit ausbrechen kann, werden zwei defekte CF-Gene benötigt (je eins von einem Elternteil). Gesunde Anlageträger mit nur einem betroffenen Gen werden als Merkmalsträger bezeichnet – in Deutschland sind dies etwa 4% der Bevölkerung. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Anlageträger ein Kind mit CF bekommen, liegt bei 25% (2,22). Da auch zwei verschiedene Mutationen im CFTR-Gen zur Ausprägung der Mukoviszidose führen können, wird der Erbgang als compound-heterozygot bezeichnet.

Das betroffene Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 7 an Position q31.2 (23,24). Das CFTR-Protein ist das Translationsprodukt, welches aus 1480 Aminosäuren besteht. CFTR wirkt vor allem als cAMP-regulierter Chloridkanal an apikalen Membranen des Epithels sekretorischer Drüsen (25,26). Neben dem Chloridtransport wirkt der CFTR-Kanal auch am Transport von Bikarbonat mit (27), ist an der Regulation des epithelialen Natriumkanals (ENaC) und alternativer Chloridkanäle (CaCC) (26) beteiligt und beeinflusst den pH-Wert (28) wie auch den Flüssigkeitshaushalt des Extrazellulärraums (29,30). Funktionell gehört das CFTR-Protein zur Gruppe der ABC-Transporter (ABC: ATP-binding cassette) und besteht aus zwei nukleotidbindenden Domänen (NBF1 und NBF2), einer regulatorischen Domäne (R) und zwei transmembranbindenden Domänen (TMD1 und TMD2), die die Kanalpore bilden (25,31,32). In ihrer Gesamtheit sind diese fünf Domänen am Öffnungs- und Schließvorgang, dem sogenannten Gating, beteiligt (33–35). Phosphorylierung der R-Domäne mittels Proteinkinase A und Bindung von ATP an die NBF bewirken dabei die Öffnung des CFTR-Kanals (36). Unter ATP-Verbrauch dissoziieren die NBF und die Kanalpore schließt sich wieder (33,37).

Mittlerweile wurden über 1900 verschiedene CFTR-Mutationen beschrieben, wobei abgesehen von der am weitesten verbreiteten  $\Delta F508$ -Mutation nur vier andere Mutationen eine Frequenz von über 0,1% (G551D, W1282X, G542X and N1303K) und damit eine weltweite Prävalenz von etwa 1-3% aufweisen (35). Die klinische Relevanz vieler seltener genetischer Varianten ist dabei noch unklar (38–41). Die häufigste Mutation ist bekanntermaßen  $\Delta F508$  mit einer Allelfrequenz von etwa 90% (42). Bei ihr fehlt im Exon 10 an der Stelle 508 aufgrund einer Deletion von 3 Basenpaaren die Aminosäure Phenylalanin.  $\Delta F508$ , welche den Großteil aller Mutationen ausmacht, gehört zu den Klasse-II-Mutationen von insgesamt 6 Mutationsklassen. Die verschiedenen Klassen richten sich nach der Art des Gendefekts, wobei die einzelnen Schritte der Proteinsynthese ausgehend vom CFTR-Gen betroffen sein können: die Transkription von der DNA in mRNA, die Translation der mRNA in Proteine mittels Aminosäuren, die

Faltung der Proteine im endoplasmatischen Retikulum, die Modifikation im Golgi Apparat, der Transport („Trafficking“) des Kanals bis hin zur Expression an der Zelloberfläche sowie seine Gating-Funktion (43) (vgl. Tab. 1). Bei den Mutationen der Klasse I kommt es durch Nonsense- und Frameshift-Mutationen oder durch Fehler beim Spleißen der mRNA zu so schwerwiegenden Synthesestörungen, dass kein CFTR produziert werden kann (44). Die Translation instabiler mRNA-Moleküle kann durch vorzeitige Stopcodons beendet werden (45). Bei der Klasse II betrifft der Defekt die Faltung oder Reifung des Proteins. Bei  $\Delta F508$  werden fehlerhaft gefaltete Proteine durch Wegfall einer Aminosäure hergestellt, die nicht in die Zellmembran eingebaut, sondern vorzeitig entsorgt werden (37). Die Klasse-III-Mutationen zeichnen sich durch eine reduzierte Öffnungswahrscheinlichkeit des CFTR-Proteins durch ineffektive Nukleotidbindung aus, die Aktivierbarkeit der Kanäle ist somit eingeschränkt (46). Genvarianten wie G551D werden auch als Gating-Mutationen bezeichnet. Bei Klasse IV ist die Leitfähigkeit für Chloridionen am CFTR-Kanal verringert (47). Diese Mutationen führen zu mildereren Phänotypen durch CFTR-Restfunktion. Eine geringe Anzahl funktionsfähiger CFTR-Kanäle sind bei Klasse-V-Mutationen vor allem durch Defekte bei der Regulation der Transkription im Promotor bedingt (48). Instabile Kanäle an der Zelloberfläche haben bei der erst kürzlich hinzugekommenen Klasse VI eine verkürzte Insertionszeit (41). Klasse-III- und -IV-Mutationen verringern also kurz gesagt die Funktionsfähigkeit des CFTR-Kanals, wohingegen bei den anderen Mutationsklassen weniger CFTR in die Zellmembran eingebaut wird. Der CFTR-vermittelte Chloridtransport nimmt mit steigender Zahl der Klasse zu (35). So verursachen Mutationsformen der Klassen I bis III eine exokrine Pankreasinsuffizienz (PI), Patienten mit mildereren Gendefekten der übrigen Mutationsklassen hingegen sind in ihrer exokrinen Pankreasfunktion lediglich etwas eingeschränkt (pankreassuffizient: PS) (40). In den letzten Jahren wurde verstärkt zu CFTR-Modulatoren geforscht, die an den verschiedenen Stellen in der Zelle ansetzen (siehe Kapitel 1.6.2. CFTR-Modulatoren). Das Mutations-Klassifikationsmodell ist dennoch eine Vereinfachung, viele Mutationen weisen verschiedene Defekte gleichzeitig auf (47,49). Bei  $\Delta F508$  ist z.B. neben dem defekten Transport des CFTR-Proteins (Klasse II) auch die Öffnungswahrscheinlichkeit von CFTR eingeschränkt (Klasse III) und die Oberflächenstabilität des Proteins an der Zelle vermindert (Klasse VI) (50).

Neben Daten zum Zusammenhang von Mutationsklassen mit der klinischen Ausprägung gibt es Untersuchungen zum Phänotyp und der entsprechenden CFTR-Funktion (29,30,47,49). Rowe und Mitarbeiter gingen davon aus, dass gesunde Menschen 100% CFTR-Aktivität aufweisen, gesunde Träger einer schweren Mutation somit etwa 50% Restfunktion. Korrelationen des Chloridgehalts im Schweiß mit Expressionsraten des CFTR-Proteins führten zu der Annahme

von etwa 10% CFTR-Restfunktion bei PS-CF und von keiner oder minimaler Restfunktion bei PI-CF (35,51). Bei Patienten mit CFTR-assoziiierter Erkrankung (CFTR-related disorder, CFTR-RD) mit milden klinischen Verläufen und isoliertem Befall eines Organsystems ist diese Einteilung besonders schwierig, im Mittel soll bei ihnen etwa 15-50% CFTR-Aktivität bestehen (35,51–53).

Klasse	Defekt	Beispiele
I	Keine oder gestörte CFTR-Proteinsynthese	R553X, G542X, R1162X, W1282X, 1717-1G A
II	Fehlerhafte CFTR-Proteinverarbeitung und -reifung	ΔF508, N1303K, ΔI507, R560T, N1303K, A455E
III	Gestörte Regulation des CFTR-Kanals (Gating)	G551D, G551S, R792G, S1255P
IV	Eingeschränkte Chloridleitfähigkeit des CFTR-Kanals	R117H, R334W, R347P
V	Reduzierte Synthese von intaktem CFTR-Protein	3849+10kbC>T, 2789+5G>A, 3272-26A>G
VI	Vermehrter Abbau des CFTR-Kanals an der Zelloberfläche	4326delTC, Q1412X, 4279insA

**Tab. 1: Kategorien von CFTR-Mutationsklassen (modifiziert nach (29,30,47,49)).**

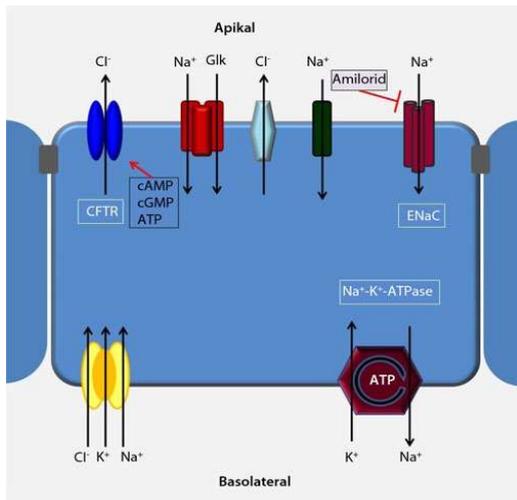
Klasse I-, II-, V- und VI-Mutationen verringern die Anzahl funktionaler CFTR-Proteine an der Zelloberfläche. Klasse III- und IV-Mutationen reduzieren dagegen die Funktion des CFTR-Proteins. Der CFTR-vermittelte Chloridtransport ist bei Klasse I-Mutationen am geringsten und nimmt mit jeder Klasse stetig zu, wobei Klasse IV- bis VI-Genvarianten am meisten CFTR-Funktion aufweisen.

### 1.3. Pathophysiologie

Da der Ausfall von CFTR das Lungenepithel am gravierendsten betrifft (54), soll im Folgenden die Pathophysiologie von CF an den Atemwegen und in Abweichung dazu die Pathologie in der Schweißdrüse erläutert werden. Bei gesunden Menschen wird Natrium in den Atemwegen apikal (also über das respiratorische Epithel) vor allem durch den ENaC-Kanal aufgenommen. Basolateral (interstitiell) wird es durch die Natrium-Kalium-ATPase wieder aus der Zelle geschleust. Chlorid wird dagegen basolateral über den Natrium-Kalium-Chlorid-Transporter resorbiert und apikal zum einen durch den CFTR-Kanal aus der Zelle sezerniert (29,55) und zum anderen über alternative CaCC (56), die von CFTR mitreguliert werden (vgl. Abb. 1.1). Wasser folgt dem Chlorid passiv in die Periziliarschicht der Atemwege. Dort sorgen die Zilien und die

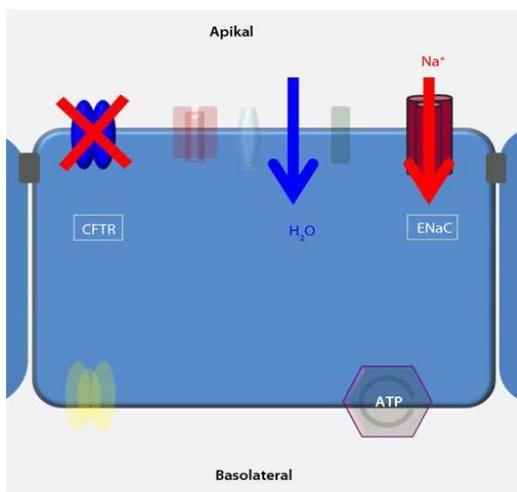
aufgelagerte Mukusschicht als Atemwegsflüssigkeit (engl. *Airway Surface Liquid, ASL*) durch Abtransport von Sekret für die mukoziliäre Clearance (57,58). Bei CF kommt es durch die Veränderungen von CFTR zu einer geringeren bis eingeschränkten Chloridsekretion aus der Zelle (59). Eine daraus resultierende Überexpression von ENaC führt zur vermehrten Absorption von Natrium nach intrazellulär (60,61) (vgl. Abb. 1.2). Weiter ergibt sich osmotisch bedingt ein vermehrter Wassereinstrom in die Zelle. Bei dieser „low volume“ Hypothese (62–64) kann die ausreichende Hydratation der ASL nicht mehr gewährleistet werden und die mukoziliäre Clearance kommt zum Erliegen (65,66). Der hochvisköse Schleim akkumuliert und verstopft die kleinen Atemwege. Für Keime, die ihrerseits auch nicht mehr ausreichend abtransportiert werden können, wird so ein optimaler Nährboden bereitet. So kommt es zu bakteriellen Exazerbationen, chronischer Entzündung und schließlich zu Bronchiektasen sowie einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion (29,54,67). Im Gegensatz dazu vermuteten Befürworter der „high salt“ Hypothese eine erhöhte Natriumchlorid-Konzentration in der ASL, die durch den mangelhaften Kochsalztransport des defekten CFTR-Proteins begründet wurde. Dies soll wiederum die antimikrobielle Aktivität von salzsensitiven Defensinen einschränken (68–70). Die beiden Hypothesen führten zu kontroversen Diskussionen (71–73). Da allerdings in mehreren Studien eine isotonische ASL nachgewiesen wurde (63,74–77), erscheint die Hypothese zur Einschränkung der mechanischen Clearance deutlich wahrscheinlicher (72,78,79).

Die Pathophysiologie der Schweißdrüse unterscheidet sich bei CF von den Pathomechanismen in den Atemwegen. Normalerweise wird vom sekretorischen Drüsenanteil eine isotone Lösung hergestellt, aus der dann durch Rückresorption von Natrium gefolgt von Chlorid im duktalem Lumen der hypotone Schweiß gemacht wird. Da Chlorid durch den defekten CFTR-Kanal bei CF-Patienten nicht ausreichend reabsorbiert werden kann, bleibt insgesamt mehr Natriumchlorid intraduktal in den Ausführungsgängen und präsentiert sich im Schweißtest in einer erhöhten Chloridkonzentration (29,80).



**Abb. 1.1:** Vereinfachtes Schema der Transportmechanismen an der Zelloberfläche des respiratorischen Epithels bei Non-CF (nach (81), mit freundlicher Genehmigung der Wissenschaftlichen Verlagsgesellschaft Stuttgart).

Über den ENaC-Kanal erfolgt apikal der größte Teil der Natriumaufnahme. Natrium wird unter ATP-Verbrauch über die basolaterale Natrium-Kalium-ATPase aus der Zelle geschleust. Über den basolateralen Natrium-Kalium-Chlorid-Transporter wird Chlorid resorbiert und dann über CFTR aus der Zelle sezerniert.



**Abb. 1.2:** Vereinfachtes Schema der veränderten Transportmechanismen an der Zelloberfläche des respiratorischen Epithels bei zystischer Fibrose (nach (81), mit freundlicher Genehmigung der Wissenschaftlichen Verlagsgesellschaft Stuttgart).

CFTR-Mutationen führen einerseits zu einer verminderten Chloridsekretion aus der Zelle (CFTR-Dysfunktion). Über den ENaC-Kanal kommt es andererseits zu einer vermehrten Absorption von Natrium (ENaC-Hyperaktivität). Osmotisch bedingt resultiert daraus ein vermehrter Wassereinstrom in die Zelle.

Na<sup>+</sup> Natrium; K<sup>+</sup> Kalium; Cl<sup>-</sup> Chlorid; Glk Glukose; ATP Adenosintriphosphat; cAMP zyklisches Adenosinmonophosphat; CFTR „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“; cGMP zyklisches Guanosinmonophosphat; ENaC epithelialer Natriumkanal, H<sub>2</sub>O Wasser.

## 1.4. Klinik

Da CF eine Multiorganerkrankung ist, soll zum besseren Verständnis an dieser Stelle ein kurzer Überblick über einige der wichtigsten klinischen Manifestationen gegeben werden (vgl. Tabelle 2). Am stärksten betroffen ist in den allermeisten Fällen die Lunge. Wie schon in Kapitel 1.3. zur Pathophysiologie beschrieben, kommt es durch eine Volumenreduktion der ASL zur Einschränkung der mukoziliären Clearance und damit zur bakteriellen Besiedlung, die chronische Infektionen und Entzündungsprozesse mit sich bringt. Hier steht der ubiquitär vorkommende Erreger *Pseudomonas aeruginosa* an erster Stelle (82). Weitere Keime sind u.a. *Staphylococcus aureus* (83), *Haemophilus influenzae* (45), *Stenotrophomonas maltophilia* (84) und *Burkholderia species* (85). Darüber hinaus kann es auch zu einer Kolonisation mit nichttuberkulösen Mykobakterien (86) oder Pilzerregern kommen. So sind rund 10% der CF-Patienten in Deutschland von einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) betroffen. Der Versuch des Körpers, die Infektion durch Neutrophile zu kontrollieren, führt wiederum zur Freisetzung von Proteasen und Oxidanzien. Diese können ihrerseits zu einer Schädigung der Lunge durch Matrixmetalloproteasen und durch Sekretbildung zu einer vermehrten Obstruktion der Atemwege führen (87,88). Die chronische Inflammation führt sukzessive zu strukturellen Lungenveränderungen wie Bronchiektasien und zu einem Funktionsverlust des Lungengewebes. Am Ende kommt es durch eine zunehmende obstruktive aber auch restriktive Ventilationsstörung zu einer respiratorischen Insuffizienz, wodurch die allermeisten CF-Patienten versterben (20,29,54). Die chronische Hypoxie zeigt sich klinisch anhand von Trommelschlegelfingern und Uhrglasnägeln. Auch eine pulmonale Hypertonie mit Rechtsherzinsuffizienz kann sich längerfristig auf dem Boden der Lungenveränderungen entwickeln (55,89). Die oberen Atemwege können in Form von rezidivierenden Sinusitiden und Nasenpolypen betroffen sein (20).

Am zweithäufigsten ist der Gastrointestinaltrakt betroffen. Bei Neugeborenen ist ein Mekoniumileus, ein Darmverschluss durch zähen fetalen Stuhl, häufig das erste Anzeichen für eine CF. Etwa 90-95% der CF-Patienten sind pankreasinsuffizient. Der Mangel an pankreatischen Enzymen führt zur Malabsorption und zu einem Mangel an fettlöslichen Vitaminen, was eine ausgeprägte Gedeihstörung und Steatorrhoe zur Folge haben kann. Der CF-assoziierte Diabetes mellitus entsteht bei etwa einem Viertel der erwachsenen CF-Patienten auf dem Boden eines autodigestiven fibrotischen Umbaus des Pankreas durch das eingedickte Pankreassekret. Pankreassuffiziente Patienten haben ein erhöhtes Risiko an Pankreatitiden zu erkranken. Durch eine verdickte Gallenflüssigkeit kann es zu Gallensteinen, Cholestase mit

rezidivierenden Cholangitiden, biliärer Zirrhose sowie zur Leberfibrose und Leberzirrhose mit ihren Folgen kommen. Im Darm kann sich auch das sogenannte Distale intestinale Obstruktionssyndrom (DIOS) manifestieren, was in etwa dem lebensbedrohlichen Mekoniumileus beim Neugeborenen entspricht. Des Weiteren kann es durch die Koprostase zum Rektumprolaps, Volvulus oder zur Invagination kommen (20,50,55,90).

Bei Männern führt CF in 99% der Fälle durch eine obstruktive Azoospermie in Folge einer kongenitalen bilateralen Aplasie des Vas deferens (CBAVD) zur Infertilität (91,92). Die weibliche Fertilität ist dagegen deutlich weniger eingeschränkt, wobei Infertilität vermutlich durch eine Verdickung des zervikalen Sekrets bedingt ist (92,93).

Zum Salzverlustsyndrom kann es bei Fieber oder starkem Schwitzen durch eine verminderte Reabsorption von Chloridionen über die CFTR-Kanäle in der Schweißdrüse kommen (50).

<b>ORGANSYSTEM</b>	<b>Manifestation</b>
<b>SINOPULMONALTRAKT</b>	
Lunge/ Atemwege	Infektionen & chronische Inflammation Bronchiektasen, Hämoptysen Obstruktive und restriktive Ventilationsstörung, respiratorische Insuffizienz Allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA)
Nase/ Nebenhöhlen	Nasenpolypen, chronische Sinusitis
<b>GASTROINTESTINALTRAKT</b>	
Pankreas	Pankreasinsuffizienz, Pankreatitis bei Pankreassuffizienz CF-assoziiertes Diabetes mellitus Mangel an fettlöslichen Vitaminen
Leber/ Gallengänge	Steatosis hepatis, Leberfibrose & -zirrhose mit portaler Hypertension Primär sklerosierende Cholangitis, Gallensteine
Magen/ Darm	Gastroösophagealer Reflux Verstopfung, Distales intestinales Obstruktionssyndrom (DIOS) Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
<b>WEITERE</b>	
Reproduktionssystem	Männliche Infertilität: Obstruktive Azoospermie Eingeschränkte weibliche Fertilität
Endokrines System	Verspätete Pubertät, Oligomenorrhoe Metabolisches Knochen Syndrom (Osteoporose)
Herz	Cor pulmonale, Hypertonie
Niere	Chronische Niereninsuffizienz, Nephrolithiasis
Salzverlustsyndrome	Dehydratation, metabolische Alkalose (hyponatriämisch, hypochlorämisch)
Psyche	Depression, Ängste

**Tab. 2: Betroffene Organsysteme und klinische Manifestationen bei CF (20,45,50).**

## 1.5. Diagnostik

Inzwischen gibt es detaillierte diagnostische Algorithmen für die CF-Diagnosestellung (39,52,94–96) (siehe Abb. 2). Generell muss zur Feststellung einer CF mindestens ein diagnostischer Hinweis auf CF vorliegen und eine CFTR-Funktionsstörung nachgewiesen sein (39,97). Zu den diagnostischen Hinweisen zählen (1) ein positives Neugeborenencreening oder (2) mindestens ein klinischer Hinweis auf CF oder (3) Geschwister mit etablierter Diagnose einer CF. Zu den klinischen Hinweisen gehören dabei Symptome einer chronischen sinopulmonalen Erkrankung (wie z.B. Husten, pathologische Bildgebung, persistierender Keimnachweis in Atemwegssekreten), einer gastrointestinalen Manifestation (z.B. mit Pankreasinsuffizienz, Mekoniumileus, chronischer Lebererkrankung, Dystrophie), sowie das Salzverlustsyndrom und die obstruktive Azoospermie (Einzelheiten siehe (97)). Eine CFTR-Funktionsstörung kann durch (1) mindestens zwei unabhängige Messungen des Chloridgehalts im Schweiß mit Werten  $\geq 60$  mmol/l oder (2) dem Nachweis von zwei CF-verursachenden CFTR-Mutationen oder (3) durch die Ermittlung einer charakteristischen Abweichung der CFTR-Funktion in der NPD oder der ICM festgestellt werden (52,97).

Besteht eine CFTR-assoziierte Erkrankung (engl. CFTR-related disorder, CFTR-RD) liegen isoliert entweder eine (1) obstruktive Azoospermie oder (2) eine chronische Pankreatitis oder (3) disseminierte Bronchiektasien vor. Darüber hinaus müssen 1-2 CFTR-Mutationen nachgewiesen werden, die für die CFTR-RD beschrieben wurden, oder eine CFTR-Funktionsstörung, welche nicht im CF-typischen Bereich liegt (Schweißchlorid zwischen 30 und 59 mmol/l in 2 unabhängigen Messungen oder NPD/ICM mit Restfunktion) (98). Die CF-Diagnosekriterien dürfen dabei nicht vollständig erfüllt sein, die klinischen Verläufe bei der CFTR-RD sind in den meisten Fällen milder (52,97).

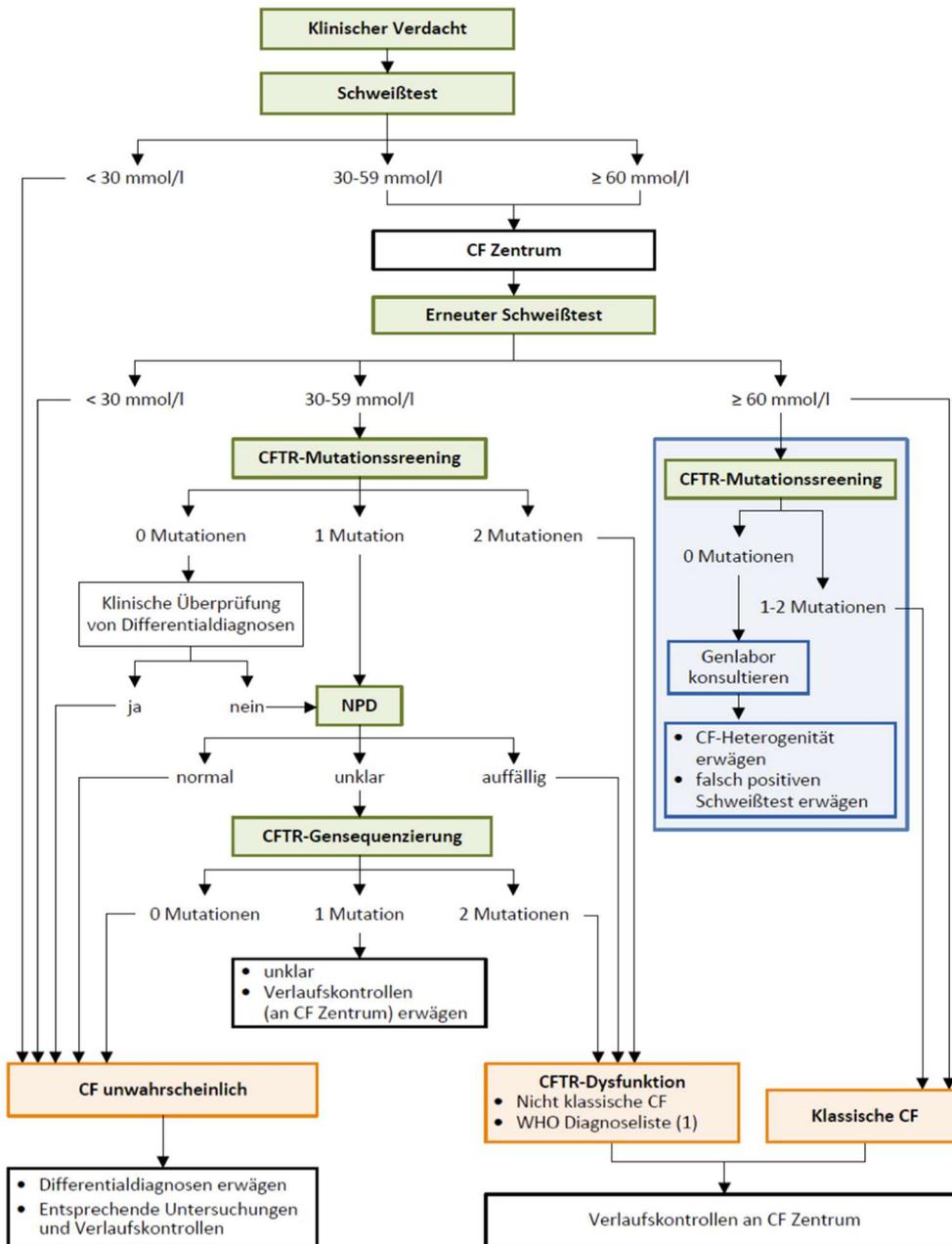
Am häufigsten führt zur CF-Diagnosestellung der klinische Verdacht oder ein positives Neugeborenencreening, was in Deutschland zum 1.9.2016 eingeführt wurde (99): die Konzentrationen der bei CF erhöhten pankreatischen Eiweiße immunreaktives Trypsinogen (IRT) und Pankreatitis-assoziiertes Protein (PAP) werden aus dem Kapillarblut bestimmt. An ein positives Neugeborenencreening schließt sich eine genetische Untersuchung sowie ein Schweißtest an, wodurch der Verdacht auf CF dann häufig bestätigt werden kann (100,101).

Der Goldstandard in der Diagnostik ist der Schweißtest, da er eine hohe Sensitivität 96,5% und Spezifität 99% aufweist (39,95,96,102,103). Weitere Informationen zur Durchführung finden sich im Methodenteil (Kapitel 2.2.). Chloridwerte  $\leq 29$  mmol/l sprechen für einen unauffälligen Schweißtest, Werte  $\geq 60$  mmol/l sind mit der Diagnose Mukoviszidose vereinbar und es wird

von typischer oder klassischer CF gesprochen. Wird ein grenzwertiger Schweißchloridgehalt von 30-59 mmol/l ermittelt, ist dieser kontrollbedürftig und erfordert weitere Diagnostik - hier kann es sich um atypische bzw. nicht-klassische Fälle von CF handeln (39,97).

An zweiter Stelle steht bei der CF-Diagnosefindung die molekulargenetische Diagnostik, während beim Verdacht auf eine CFTR-RD eine genetische Untersuchung und ein Schweißtest stattfinden sollten. Bei Geschwistern von CF-Patienten kann gezielt, teilweise schon im Rahmen der Pränataldiagnostik auf bestimmte Genmutationen getestet werden. Ansonsten empfiehlt sich eine Stufendiagnostik, bei der auf Grund der enormen Anzahl der verschiedenen Genmutationen (> 1900) zunächst nur nach den häufigsten gesucht wird, angepasst an deren ethnische Verteilung. Konnte bei klinischem Verdacht so nur eine oder keine Mutation ermittelt werden, kann eine komplette Sequenzierung des CFTR-Gens angezeigt sein, v.a. wenn die Ergebnisse des Schweißtests im Graubereich liegen. Bei der Einschätzung der klinischen Relevanz verschiedener Mutationen hilft die „Cystic Fibrosis Mutation Database“ (104) und die Webseite „Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2)“ (38) weiter. CFTR2 bietet Informationen zum Phänotyp sowie dazu, welche Mutationen wirklich „CF-verursachend“ sind (105). Dennoch gibt es noch viel Unklarheit über den klinischen Verlauf von seltenen genetischen Varianten (38–40), da nicht alle Mutationen krankheitsverursachend sind. 1-5% der Allele von Patienten mit klassischer CF (und bei atypischen Verlaufsformen noch mehr) können auch trotz breiter Genanalyse nicht ermittelt werden, da gewisse CFTR-Mutationen unter anderem in der Promotor-Region bisher nicht nachweisbar sind (106). Bei atypischen Verlaufsformen von CF und schließlich den CFTR-RD sind die Detektionsraten noch geringer. Diesen liegt ein multifaktorielles Geschehen auf dem Boden von CFTR-Mutationen zu Grunde, die nicht zwingend krankheitsverursachend sind, jedoch Anlagen für die Entwicklung von Symptomen bieten (40,97,98).

Die elektrophysiologische Messung der CFTR-Funktion mittels NPD und/ oder ICM steht für unklare diagnostische Fälle zur Verfügung (siehe diagnostischer Algorithmus Abb. 2), wenn der Schweißtest zwischen 30 und 59 mmol/l liegt oder keine 2 CF-verursachenden CFTR-Mutationen nachgewiesen werden können (96,97,107,108). Es kann mit ihrer Hilfe zwischen den Diagnosen „CF“ und „CF unwahrscheinlich“ unterschieden werden (39). Trotz der Einführung standardisierter Protokolle für NPD und ICM zur CF-Diagnosestellung bei Patienten mit milden Krankheitsverläufen gab es bisher noch keine Referenzwerte für die multizentrische Anwendung der ECFS SOPs (109). Mehr zum Prinzip von NPD und ICM ist im Kapitel 1.7.2. zu den Biomarkern und im Methodenteil (Kapitel 2.3. und 2.4.) nachzulesen.



**Abb. 2: Algorithmus zur CF-Diagnosestellung** (aus (110), modifiziert nach (39)).

NPD: Nasale Potentialdifferenz Messung; WHO Diagnoseliste aus 2001 für monoorganische Krankheitsbilder (isolierte obstruktive Azoospermie, chronische Pankreatitis, allergische bronchopulmonale Aspergillose, disseminierte Bronchiektasen, diffuse Panbronchiolitis, sklerosierende Cholangitis, neonatale Hypertrypsinogenämie) mit mindestens einer identifizierten CFTR-Mutation.

## 1.6. Therapie bei CF

### 1.6.1. Allgemeine Behandlungsprinzipien

Physiotherapie und Sport zur Sekretmobilisation sowie die kalorisch-bedarfsangepasste Ernährung zur Verhinderung einer Gedeihstörungen und die Pharmakotherapie sind die drei Hauptaspekte bei der Behandlung von CF (14,45). Dabei sollten sich CF-Patienten und ihre Angehörigen alle drei Monate in einem CF-Zentrum vorstellen zur Verlaufskontrolle mit Erfassung der Lungenfunktion und des Sputumerregerspektrums sowie zur Anpassung der medikamentösen Therapie. Medikamentös werden in der Lunge sekretolytische, antiinflammatorische und antiinfektive Ansätze zum Erhalt der Lungenfunktion verfolgt. Zur Sekretolyse stehen evidenzbasiert Dornase alfa zur DNA-Spaltung akkumulierter neutrophiler Leukozyten (111) sowie hypertone Kochsalz-Inhalation und inhalatives Mannitol zur Verfügung (112). Die verbesserte Hydratation und verminderte Mukusviskosität in den Atemwegen führt zu einer besser funktionierenden mukoziliären Clearance (54,113–115). Bei der antiinflammatorischen Therapie verbessert Azithromycin die Lungenfunktion und reduziert pulmonale Exazerbationen. Ibuprofen wird wegen seiner häufigen gastrointestinalen Nebenwirkungen nur selten angewendet. Zur frühzeitigen Eradikation von *Pseudomonas aeruginosa* oder der Behandlung einer chronischen Besiedlung mit diesem Problemkeim stehen inhalative Antibiotika wie Tobramycin, Colistin, Aztreonam und Levofloxacin als wichtige Bestandteile der Therapie zur Verfügung (116–118). Die intravenöse Antibiotikatherapie kann erforderlich sein, wenn die inhalative oder orale Anwendung besonders bei Erwachsenen mit CF und chronischer Besiedlung nicht ausreicht. Zur antiobstruktiven Therapie werden kurz- und langwirksame  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten erfolgversprechend eingesetzt (119). Bei respiratorischer Insuffizienz kommen schrittweise Sauerstoffsubstitution, nicht-invasive Maskenbeatmung und als Ultima Ratio die Lungentransplantation in Frage (120). Zur Behandlung gastrointestinaler Manifestationen werden Pankreasenzyme für Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz sowie fettlösliche Vitamine und Ursodesoxycholsäure bei Cholestase eingesetzt. Das intestinale Obstruktionssyndrom wird mit Einläufen, oralen Laxantien und Flüssigkeitsaufnahme unter Nahrungskarenz behandelt. Im Endstadium der Leberzirrhose kann eine Lebertransplantation notwendig sein. Der CF-assoziierte Diabetes ist fast immer mit Insulin einzustellen (20).

Seit den 90er Jahren wird ebenfalls zur Gentherapie geforscht, um normale CFTR-DNA zu bestimmten Zellen zu transportieren - bisher hat das allerdings noch keine klinischen Vorteile für CF-Patienten gebracht (121).

Die psychosoziale Begleitung der Patienten und ihrer Angehörigen ist neben der medizinischen Betreuung äußerst wichtig. Strategien zur Krankheitsbewältigung und gute Integration der erforderlichen Maßnahmen in den Alltag tragen zu einer möglichst hohen Lebensqualität bei (122).

### **1.6.2. CFTR-Modulatoren**

Um den ursächlichen Defekt im CFTR-Protein zu behandeln, wurden in den letzten Jahren CFTR-modulierende Medikamente entwickelt und erprobt (35,47,49). Diese CFTR-Modulatoren sind kleine Moleküle, die in der Zelle mutationsspezifisch angreifen. CFTR-Korrektoren sorgen für eine ausreichende Anzahl an funktionsfähigen CFTR-Proteinen und CFTR-Potentioren für mehr Aktivität der CFTR-Kanäle (123–126).

2012 wurde der erste CFTR-Potentiator Ivacaftor für Patienten mit der Klasse-III-Mutation G551D zugelassen. Die Substanz war durch Hochdurchsatz-Sequenzierung als VX770 entdeckt worden (127). Hier wird beim Gating die Öffnungswahrscheinlichkeit des CFTR-Kanals für Chloridionen erhöht. Die Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ ) erhöhte sich unter Ivacaftor in zwei Phase-III-Studien um 10%, die Anzahl pulmonaler Exazerbationen nahm ab und eine Zunahme von Patientengewicht und eine Verbesserung von gesundheitsbezogener Lebensqualität wurden aufgezeichnet (19,128). Auch Patienten mit fortgeschrittener Lungenerkrankung profitierten von Ivacaftor (129,130). Auf der Basis von in vitro Daten wurde von einem positiven Ivacaftor-Effekt auch in Bezug auf andere Mutationen ausgegangen (131). Der Potentiator verbesserte die  $FEV_1$  bei Patienten mit anderen Gating-Mutationen als G551D ebenfalls um 10% (132). Bei Trägern einer R117H-Mutation zeigten sich nur geringe Änderungen der  $FEV_1$ , dafür allerdings Verbesserungen bei sekundären Endpunkten wie Schweißchlorid und Lungenfunktion (133). Leider sind nur ca. 2-5% aller CF-Patienten, je nach ethnischer Verteilung, Träger von Gating-Mutationen (127).

Eine andere Gruppe der CFTR-modulierenden Substanzen sind Suppressoren von vorzeitigen Stop Codons bei Nonsense-Mutationen. Sie fördern das Überlesen dieser Stop Codons und beziehen sich auf Klasse-I-Mutationen. So sollen Aminoglykoside bewirken, dass Proteine in ihrer ganzen Länge translatiert werden. Dennoch berichteten verschiedene Studien zur Wirksamkeit von Gentamicin von unterschiedlichen Ergebnissen (134–136). Weiterhin wurde Ataluren (PTC124) als hier ansetzender Korrektor entwickelt (Welch 2007) und in klinischen Studien bis zur Phase III untersucht. Es zeigten sich mit Ataluren zunächst mittlere Effekte bei der Wirksamkeit auf die CFTR-Funktion (137–139), dann aber in einer weiteren Phase-III-Studie keine signifikanten Effekte mehr - es kam darum nicht zur Zulassung (140).

Korrektoren der CFTR-Reifung betreffen Klasse-II-Mutationen und damit auch die weitaus häufigste Mutation  $\Delta F508$ . Der Korrektor Lumacaftor (VX809) zeigte zunächst keine Effekte auf die FEV<sub>1</sub> bei  $\Delta F508$ -homozygoten Patienten (141). In einer folgenden Phase-II-Studie zur Kombinationstherapie aus Lumacaftor und Ivacaftor konnte dann eine Verbesserung klinischer Parameter trotz Medikamenteninteraktionen gezeigt werden (142). Die Phase-III-Studie zu dieser Kombination erzielte anschließend eine moderate Steigerung der vorhergesagten FEV<sub>1</sub> um bis zu 6,7%, wobei die Rate pulmonaler Exazerbationen um bis zu 39% deutlich gesenkt werden konnte (143). 2015 folgte dann die Zulassung von Lumacaftor zusammen mit Ivacaftor unter dem Namen Orkambi für  $\Delta F508$  homozygote Patienten ab 12 Jahren (144). Bei der Effektevaluation von Orkambi bei Kindern zwischen 6 und 11 Jahren zeigten sich zwar keine signifikanten Veränderungen der FEV<sub>1</sub>, dafür aber Verbesserungen von ST, BMI und Lung Clearance Index, der möglicherweise bei Kindern aussagekräftiger sein könnte als die FEV<sub>1</sub> (145). Diese Studie führte 2016 auch zur Zulassung der Kombination aus Lumacaftor und Ivacaftor für Kinder im Alter zwischen 6 und 11 Jahren. Weitere CFTR-modulierende Moleküle werden zur Zeit in klinischen Studien untersucht (146).

## **1.7. ST, NPD und ICM als Biomarker der CFTR-Funktion**

### **1.7.1. Biomarker – Definition und Rolle in der Therapieentwicklung bei CF**

Biomarker sind der Definition der US Food and Drug Administration (FDA) nach objektive Charakteristika als Indikatoren für normale oder pathologische biologische Prozesse sowie für biologische Antworten auf therapeutische Interventionen (147). Mit validen Biomarkern kann bei CF die CFTR-Funktion akkurat und reproduzierbar gemessen werden. Sie lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen: diagnostische Biomarker werden dazu verwendet, um den Gesundheits- oder Krankheitszustand eines Patienten einzuschätzen, prognostische Biomarker ermöglichen Aussagen über Krankheitsverlauf oder Heilungschancen, während prädiktive Biomarker die Wirksamkeit und das voraussichtliche Ansprechen bestimmter Therapien anzeigen (148).

In klinischen Phase-I- und Phase-II-Studien werden Biomarker verwendet, um den Wirkmechanismus von Medikamenten zu bestätigen oder Informationen zur Dosierung zu gewinnen. Um die Medikamentenentwicklung beschleunigen zu können, wird bei CF zunehmend nach Biomarkern geforscht, die die biologische Wirksamkeit bestimmter, meist personalisierter Therapien demonstrieren können. Folgende Grundvoraussetzungen sollten untersucht werden um die Qualifikation eines Biomarkers zum klinischen Outcome-Parameter

zu überprüfen: Reliabilität (Reproduzierbarkeit einer Untersuchung im Hinblick auf biologische Variationen und unterschiedliche Untersucher), Validität (Zusammenhang des Parameters mit dem Verlauf oder Schweregrad der Erkrankung) und Veränderungssensitivität (Fähigkeit einer Untersuchungsmethode, den Behandlungseffekt einer Intervention festzustellen) (149–151). Bei CF liegen für den ST bisher wenig Daten zur Reliabilität vor und neue Studien weisen auf eine substanzielle intra- und interindividuelle Variabilität hin (152,153). Für die NPD-Messung wurden Validität, Zuverlässigkeit und Ansprechbarkeit schon demonstriert (154,155). Über die Validität von ICM liegen Daten vor, aber abgesehen von vorläufigen Ergebnissen von Scheinert et al. gibt es keine Daten zur Reliabilität der ICM (156). Zur Veränderungssensitivität wurden kürzlich einzelne erste Daten veröffentlicht (157), die allerdings noch an größeren Patientengruppen überprüft werden sollten.

Es wird darüber diskutiert, die Weiterentwicklung der CFTR-Biomarker ST, NPD und ICM zu eigenständigen Surrogatparametern voranzutreiben. Surrogatparameter sind Messverfahren, die an Stelle von klinischen Endpunkten verwendet werden, weil sie kürzere Studienzeiträume benötigen (148). Bei CF sind FEV<sub>1</sub> und pulmonale Exazerbationsraten etablierte Surrogatparameter für Überlebensraten und werden in klinischen Studien als primäre Endpunkte verwendet (19,143,154). In Zeiten von Studiendesigns mit limitierten Behandlungszeiträumen sind sie nicht immer geeignete Parameter. Darüber hinaus kann der klinische Status durch die FEV<sub>1</sub> bei jüngeren Patienten mit beginnender Lungenerkrankung, Betroffenen mit milden Erkrankungsverläufen und normaler Baseline FEV<sub>1</sub>, wie auch bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung und geringer FEV<sub>1</sub> teilweise nicht adäquat abgebildet werden (158). Um die Eignung der CFTR-Biomarker als Outcome Parameter für klinische Studien zu untermauern, sollte auch der Nachweis eines Zusammenhangs der Biomarker mit bisherigen klinischen Endpunkten erfolgen (50,154,158,159).

### **1.7.2. Bisherige Anwendung von ST, NPD und ICM in der CF-Diagnostik zur Ermittlung der CFTR-Funktion**

Die Chloridkonzentration im Schweiß wird mit dem ST ermittelt, stellt den diagnostischen Goldstandard dar und weist mit hoher Sensitivität und Spezifität von 96,5% und 99% (97) in vielen Fällen auf eine eindeutige Diagnose hin. In etwa 5% der Fälle ermöglicht er allerdings keine sichere Diagnosestellung (160), da er im Grenzbereich zwischen 30 und 59 mmol/l liegt.

Die elektrophysiologischen Verfahren NPD zur in vivo Erfassung der Ionensekretion am respiratorischen Epithel und ICM zur ex vivo Messung des transepithelialen Kurzschlussstroms

an Rektumsaugbiopsien wurden neben dem ST entwickelt um die CFTR-Funktion in verschiedenen CFTR-exprimierenden Organen zu analysieren (108,161–167). Sie liefern Informationen über die CFTR-Restfunktion sowie über die Korrelationen zwischen Genotypen und Phänotypen (168–173). Bemühungen der letzten Jahre haben zur Standardisierung von NPD mit einem europäischem SOP (174), zu zentraler Datenanalyse innerhalb klinischer Studien und zu ersten multizentrischen Studiendesigns geführt (175–179). Mit NPD gelingt eine sichere Differenzierung zwischen Gesunden und PI-CF ohne Restfunktion - bei CF mit Restfunktion, CFTR-RD und Non-CF kann es allerdings zu Überlappungen kommen (162,168,180,181).

Bei der *ex vivo* Messung des intestinalen Kurzschlussstroms korreliert das Niveau der CFTR-Aktivität mit dem CFTR-Genotyp und Phänotyp (165,172). Der Biomarker verfügt über eine hohe Diskriminierungsfähigkeit von gesunden Kontrollen über PS-CF bis zu PI-CF mit einer bisherigen diagnostischen Sensitivität von 100% bei schwieriger Diagnosestellung (108,182,183). Wie auch NPD, so wurde ICM sukzessive weiter standardisiert (108,164), ein universeller SOP für klinische Studien steht inzwischen zur Verfügung (184) und erste multizentrische Studiendesigns wurden in den USA umgesetzt (185).

Dennoch wurde bis heute kein direkter Vergleich der drei Biomarker an einem Zentrum zur organspezifischen Unterscheidung zwischen CF und Kontrollen einerseits und zwischen PI-CF und PS-CF andererseits durchgeführt. Weder für NPD noch für ICM liegen bisher multizentrische Daten zu den aktuellen ECFS SOPs vor.

### **1.7.3. Bisherige Anwendung der CFTR-Biomarker zur Evaluation von Behandlungseffekten CFTR-modulierender Substanzen**

Die individuelle Charakterisierung der CFTR-Funktion hilft neben der Beschreibung von unbekanntem CFTR-Mutationen auch dabei, therapeutische Effekte von CFTR-Modulatoren präklinisch (*ex vivo*) und klinisch (*in vivo*) direkt zu quantifizieren (186–188). Trotz multizentrischer Bemühungen (175,176,178,185) und Fortschritten bei der Standardisierung und Validierung (179,189,190), kam es im Rahmen von klinischen Phase-II- und Phase-III-Studien zu den Effekten von CFTR-Modulatoren zur Diskussion über die Variation der CFTR-Funktion in verschiedenen CF-relevanten Organen und deren Korrelation mit der klinischen Verbesserung (19,137,140,191,192).

Deutliche Reduktionen des Chloridgehalts im Schweiß wurden in allen Studien zu Ivacaftor bei Patienten mit Gating-Mutationen beobachtet (19,128,132,191,193,194). Mittlere Effekte des Schweißtest wurden bei R117H-Patienten unter Ivacaftor registriert (133). Geringere

Auswirkungen auf den Chloridgehalt im Schweiß wurden dagegen bei  $\Delta F508$ -heterozygoten Patienten unter einer Kombinationstherapie von Ivacaftor und Lumacaftor festgestellt (142), sowie bei  $\Delta F508$ -Homozygoten unter Ivacaftor- (54) oder Lumacaftor-Monotherapie (141). Die Ergebnisse zum Zusammenhang der Biomarker mit der klinischen Verbesserung waren nicht eindeutig. In zwei Phase-III-Studien zu Ivacaftor korrelierten die Schweißtestergebnisse mit der Verbesserung von der FEV<sub>1</sub> und des pulmonalen Status (19,128). Eine andere Studie zeigte, dass der kurzfristige Abfall der Chloridkonzentration im Schweiß ein positiver prädiktiver Wert für die längerfristige Verbesserung der Lungenfunktion sein könnte (197). Fidler et al. veröffentlichten, dass die ST-Veränderung während einer Ivacaftorbehandlung für eine Verbesserung der Lungenfunktion als prädiktiver Biomarker nur im Rahmen einer Studienpopulation, nicht aber für individuelle Patienten verwendet werden kann (196). In zwei anderen Untersuchungen wurde kein Zusammenhang zwischen dem Chloridgehalt im Schweiß und der FEV<sub>1</sub> festgestellt (130,195).

Wurde NPD als Outcomeparameter verwendet, so waren die Ergebnisse noch unterschiedlicher. Bei Trägern einer Stopmutation verbesserte Gentamicin die mittels NPD evaluierte CFTR-Funktion (134,135), nasale Aminoglykoside hatten keinen positiven Effekt auf die NPD (192). Bei Patienten mit Nonsense-Mutationen der Klasse I zeigte Ataluren (PTC124) in klinischen Studien bis zur Phase III Verbesserungen der NPD aber nicht des STs, wobei die Ergebnisse je nach untersuchtem NPD-Parameter variierten (137–139). In einer weiteren Phase-III-Studie zu dem CFTR-Korrektor Ataluren wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und CF-Patienten mit NPD oder dem ST ermittelt (140). In der Ivacaftorstudie von Accurso et al., in der eine Verbesserung der CFTR-Funktion parallel zur Lungenfunktion festgestellt und sowohl der ST als auch NPD als Outcomeparameter erfasst wurden waren die Veränderungen des STs eindrücklicher als bei der NPD (191).

Graeber et al. lieferten bisher einzelne Hinweise auf den Zusammenhang von ICM mit dem klinischen Status bei mit Ivacaftor behandelten G551D-Patienten (157), ansonsten wurde ICM bis dato nicht in fortgeschrittenen klinischen Studien zur Effektevaluation verwendet (198–200). Dabei könnte das Wissen über CFTR-modulierende Substanzen aus Zellkulturen mit ICM schrittweise übertragen werden, um mutationsspezifische in vivo Therapieeffekte vorhersagen zu können (186,201). Weiterhin könnte mittels ICM der pure Effekt von oral verabreichten CFTR-Korrektoren am Gewebe unter ex vivo Potentiatorzugabe gemessen werden. In vivo wäre dagegen eine orale Kombination aus Korrektor und Potentiator nötig, um bei  $\Delta F508$  neben der Reparatur des CFTR-Proteins den Gating-Defekt zu überwinden (154). Allerdings gibt es noch

kein standardisiertes Verfahren für die ex vivo Medikamentenprüfung mittels ICM und deren Korrelation mit in vivo Effekten am Patienten.

## **1.8. Fragestellung**

Der Goldstandard bei der Diagnosestellung der CF ist der Schweißtest (97,202). CF-verursachende Genmutationen werden darüber hinaus molekulargenetisch ermittelt. Das diagnostische Beurteilungsvermögen des Schweißtests ist allerdings im Grenzbereich (30 bis 59 mmol/l) eingeschränkt und der molekulargenetische Nachweis von CF nicht in allen Fällen trotz klinischen Verdachts möglich, da die Relevanz einzelner der fast 2000 bekannten CFTR-Mutationen noch unklar ist (38–40,105). Besonders seit der Einführung des Neugeborenen Screenings (100) kommt es in etwa 10% der Fälle zu diagnostischen Dilemmata, bei denen auf ein positives IRT Screening-Ergebnis unklare Schweißtestergebnisse oder Genanalysen folgen (101,203,204).

In den letzten Jahrzehnten wurden NPD und ICM zur erweiterten CFTR-Funktionsanalyse in verschiedenen CFTR-exprimierenden Organen entwickelt (161,162,164,165,168,170). Durch die fortschreitende Validierung ihrer Methoden werden die CFTR-Biomarker nun zunehmend auch in diagnostischen Algorithmen berücksichtigt (39,52,96,97). Vor diesem Hintergrund wurden kürzlich standardisierte Protokolle zur einheitlichen Durchführung von NPD und ICM durch die European Cystic Fibrosis Society Diagnostic Network Working Group (ECFS DNWG) entwickelt (ECFS NPD SOP 2012; ECFS ICM SOP 2011). Erforderlich ist jetzt die Erhebung von zentrumsspezifischen Referenzwerten für NPD und ICM anhand von Kontrollen und bekannten CF-Patienten, um dann auch unklare diagnostische Fälle mit Hilfe der CFTR-Biomarker beurteilen zu können. Im nächsten Schritt sollen die unizentrischen Referenzwerte weiter validiert und die SOPs auf ihre multizentrische Anwendbarkeit hin überprüft werden.

Neben ihrer Bedeutung bei der Diagnosestellung haben die CFTR-Biomarker auch Potential zur Effektevaluation von CFTR-modulierenden Substanzen. Da die Mortalität nur langfristig und Veränderungen der FEV<sub>1</sub> meist erst im Verlauf nachvollziehbar sind, haben nun kurzfristiger messbare Effektgrößen wie die CFTR-Biomarker für die zügig fortschreitende Therapieentwicklung das Interesse erregt. Da mit dem ST und der NPD-Messung allerdings unterschiedliche Ergebnisse bei der Untersuchung von CFTR-Modulatoren auffielen (19,137,140,191,192), wurde über eine spezifische Ansprechbarkeit verschiedener CF-relevanter Organe auf diese Medikamente diskutiert (130,195–197). ICM wurde zum Zeitpunkt der Untersuchungen in klinischen Studien noch nicht zur Effektquantifizierung hinzugezogen.

Ziele unserer Studie waren, die drei CFTR-Biomarker ST, NPD und ICM für die CF-Diagnosestellung erstmals miteinander zu vergleichen und Lücken bei der Validierung von ICM weiter zu schließen - als Voraussetzung für den zukünftigen Einsatz von ICM als Outcomeparameter in klinischen Studien zur Wirksamkeit von CFTR-Modulatoren:

1. Primär sollte durch die Erhebung von unizentrischen Referenz- und Cutoff-Werten für NPD und ICM unter Anwendung der neuen ECFS SOPs deren diagnostische Relevanz im Gegensatz zum ST zur Klassifikation von gesunden Kontrollen und CF-Patienten einerseits und von PI-CF und PS-CF andererseits ermittelt werden.
2. Darüber hinaus sollten die Berliner ICM-Daten durch ICM-Messungen an zwei weiteren europäischen Zentren extern validiert (abgesichert) werden, um erstmals die multizentrische ICM-Durchführbarkeit nach dem ECFS SOP zu überprüfen.
3. Zuletzt sollte der Behandlungseffekt von Ivacaftor an vier Patienten mit der G551D-Genmutation mit den CFTR-Biomarkern exemplarisch ermittelt werden.

## 2. Methoden

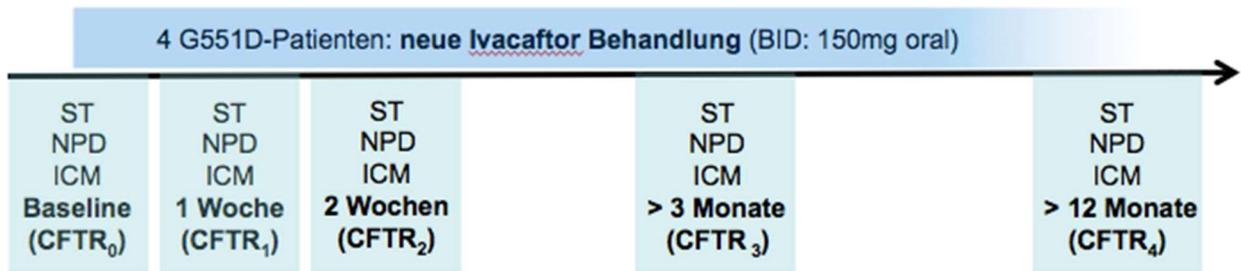
### 2.1. Patientenkohorte und Messzeitpunkte

Am Berliner Studienzentrum (Zentrum 1) wurden 51 Personen zwischen 2011 und 2013 prospektiv mit einer Kombination der drei Biomarker ST, NPD und ICM am selben Tag untersucht: 28 PI-CF Patienten, 9 PS-CF Patienten, und 14 gesunde Kontrollen (die Kohorte mit entsprechenden Genotypen wird im Ergebnisteil in der Tabelle 4 beschrieben).

Für diese Studie basierte die Diagnose auf den folgenden beiden Kriterien: CF-Phänotyp und Nachweis von zwei CF-verursachenden CFTR-Mutationen (39). Der Pankreas-Status wurde anhand der Genotypisierung nach Abgleich mit der Datenbank CFTR2 (38) bestimmt und durch Werte der Pankreaselastase im Stuhl überprüft (PI < 100 µg/g, PS-CF > 200 µg/g). Die Berliner Patienten stammten aus dem CF-Zentrum für Kinder und Erwachsene der Charité Universitätsmedizin Berlin. Als Kontrollen wurden freiwillige, gesunde, erwachsene Nichtraucher ohne klinische CF-Manifestationen eingeschlossen (Non-CF). Unter anderem wurden akute Infektionen der oberen Atemwege/Nase (weiteres siehe Kapitel 2.3. zu NPD) sowie Hämorrhoiden und Blutungsneigung (siehe Kapitel 2.4. zu ICM) bei allen Teilnehmern ausgeschlossen. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin zugelassen und die Teilnehmer erhielten vorab eine schriftliche Einverständniserklärung (bei Minderjährigen deren Eltern).

Darüber hinaus wurden ICM-Messungen an zwei weiteren Studienzentren der European Cystic Fibrosis Society Diagnostic Network Working Group (ECFS DNWG) zur multizentrischen Validierung des ECFS ICM SOPs durchgeführt. Am Zentrum 2 wurden 30 Probanden (12 PI-CF, 5 PS-CF und 13 Kontrollen) und am Zentrum 3 insgesamt 27 Testpersonen (11 PI-CF, 5 PS-CF und 11 Kontrollen) rekrutiert (die Kohorte mit entsprechenden Genotypen wird im Ergebnisteil in der Tabelle 13 beschrieben). An den beiden anderen europäischen CF-Zentren galten die selben Einschlußkriterien wie in Berlin (siehe oben).

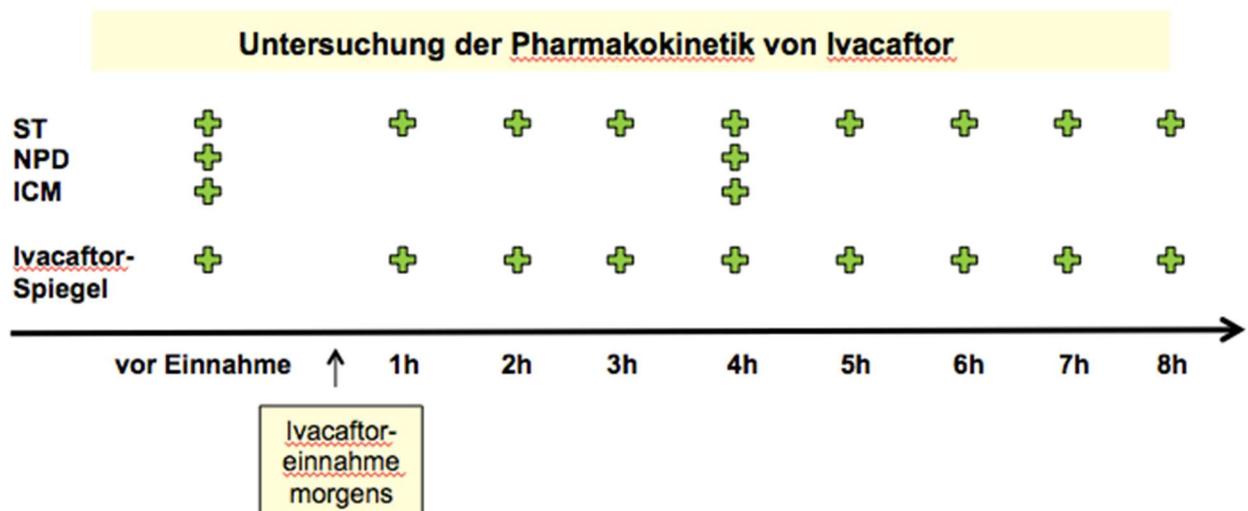
Eine Subgruppe von vier PI-CF Patienten (F508del/G551D n=3, G551D/G551D) aus Berlin begann erstmalig eine orale Routinemedikation mit dem CFTR-Potentiator Ivacaftor (150mg BID) und wurde einer wiederholten CFTR-Funktionsanalyse zu verschiedenen Zeitpunkten (CFTR<sub>0-4</sub>) mittels ST, NPD und ICM unterzogen, um den kurz-, mittel- und langfristigen Ivacaftoreffekt zu verdeutlichen: CFTR<sub>0</sub> wurde vor der ersten Einnahme gemessen, CFTR<sub>1</sub> nach einer Woche und CFTR<sub>2</sub> nach zwei Wochen. Es folgten Follow-up Untersuchungen nach 3-9 Monaten (CFTR<sub>3</sub>) und nach über einem Jahr (CFTR<sub>4</sub>) (siehe Abb. 3.1).



**Abb 3.1: Evaluation des Effekts von Ivacaftor bei vier G551D-Patienten.**

Ermittlung der CFTR-Funktion mit ST, NPD und ICM zu verschiedenen Zeitpunkten (CFTR<sub>0-4</sub>).

Um darüber hinaus die Gewebegängigkeit von Ivacaftor im Verlauf zu veranschaulichen, wurden die Serumspiegel von Ivacaftor und parallel dazu ST-Werte vor der morgendlichen Einnahme sowie 1-8 Stunden nach der Einnahme untersucht. Zur weiteren Darstellung der Pharmakokinetik des CFTR-Modulators wurde die CFTR-Funktion mittels NPD und ICM vor und 4 Stunden nach der Einnahme ermittelt (siehe Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Pharmakokinetik von Ivacaftor.**

Messung der Ivacaftorspiegel im Serum vor Routineeinnahme von Ivacaftor und stündlich danach, parallel dazu Evaluation der CFTR-Aktivität mittels ST. CFTR-Funktionsanalyse mit NPD und ICM vor der Ivacaftoreinnahme und vier Stunden danach.

## 2.2. Schweißtest

### 2.2.1. Methode

Der Schweißtest beruht auf dem Prinzip der Pilocarpin-Iontophorese. Dabei stimuliert Pilocarpin als direktes Parasympathomimetikum die  $\beta$ -adrenerge Schweißsekretion (202). Der Schweiß wird gesammelt und anschließend die Konzentration von Chloridionen darin bestimmt. Generell kann auch die Leitfähigkeit von Natrium- und Chloridionen gemessen werden, dieses Verfahren ist allerdings nur für Screeninguntersuchungen und nicht zur Diagnosestellung zulässig (97).

### 2.2.2. Material und Durchführung

Das Personal wurde im Vorfeld mit der Durchführung des Schweißtests vertraut gemacht. Zur Anregung der Schweißproduktion wurden Pilogelscheiben auf zwei Elektroden hintereinander an beiden Unterarmen für ca. 2-5 Minuten aufgesetzt. Zwischen denen Elektroden wurde mittels batteriebetriebener Spannungsquelle ein Gleichstrom erzeugt (Wescor Inc, Logan, USA). Bei der Iontophorese dringt das Pilocarpin in die Haut ein und regt die Schweißdrüsen zur Schweißproduktion an. Anschließend wurde der Schweiß mittels Macroductsystem ca. 30 Minuten gesammelt. Der Schweißtest wurde gemäß der 3. Auflage der Leitlinie des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) durchgeführt, ausführliche Erklärungen zu den einzelnen Arbeitsschritten können dort nachgesehen werden (103). Die Konzentration des Chloridgehalts im Schweiß wurde im Routinelabor des Universitätsklinikums der Charité mittels manueller oder coulometrischer Titration bestimmt.



*Abb. 4: Schweißsammler mit blau angefärbtem Schweiß.*

### **2.2.3. Auswertung und diagnostische Interpretation**

Die Qualitätskriterien für das Macroduct-System zur Auswertung des Schweißtests erfordern eine Mindestmenge von 15 µl Schweiß pro Unterarm nach 30-minütiger Sammlung (103), was in der Praxis etwa drei Umdrehungen voll mit blau angefärbtem Schweiß im schneckenförmigen Schweißsammler entspricht (siehe Abb. 4).

Lagen Schweißchloridwerte für beide Arme vor, so wurde für die Auswertung der Mittelwert daraus bestimmt.

Eine CF ist unwahrscheinlich bei Schweißchloridkonzentrationen  $< 30$  mmol/l. Bei Werten  $\geq 60$  mmol/l wird von CF ausgegangen. Liegen die Schweißchloridmittelwerte allerdings im Kontrollbereich zwischen 30 und 59 mmol/l ist eine weiterführende diagnostische Abklärung erforderlich (97).

## **2.3. Nasale Potentialdifferenz (NPD)**

### **2.3.1. Methode**

Die NPD beruht auf den Erkenntnissen von Knowles und Middleton (162,182) und ist eine elektrophysiologische Messmethode zur Erfassung der Funktion von Ionenkanälen am respiratorischen Epithel der Nasenschleimhaut. Dabei wird das gut erreichbare Nasenepithel stellvertretend für das Epithel des unteren Respirationstrakts untersucht. Die Sekretion und Absorption von Natrium und Chlorid führt zu einer messbaren Spannung oder Potentialdifferenz über dem Epithel. Die Aufzeichnung dieser transepithelialen Potentialdifferenz erfolgt dabei zwischen einem Katheter im unteren Nasengang und einer kutanen Referenzelektrode - nacheinander in beiden Nasenlöchern - zunächst in Ruhe und dann nach Superfusion von Lösungen, welche die Natrium- und Chloridkanäle am apikalen respiratorischen Epithel beeinflussen. Abnormale bioelektrische Vorgänge führen bei CF zu charakteristischen Veränderungen bei der NPD-Messung und reflektieren den Defekt im CFTR-Gen. Auf Grund einer Hyperaktivität des epithelialen Natriumkanals (ENaC), der Natriumionen in die Zelle transportiert, ist bei CF die basale Potentialdifferenz (PD) deutlich negativer als bei Non-CF. Die anschließende Hemmung des ENaCs mittels Amilorid führt folglich bei CF zu einer verstärkten PD-Reduktion (205). Weiterhin können CF-Patienten an einer geringeren oder ausbleibenden Antwort auf chloridfreie Lösung und Isoproterenol als Ausdruck fehlender Chloridsekretion erkannt werden. Isoproterenol bewirkt bei Gesunden eine Aktivierung des CFTR-Kanals durch die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration (206). Die Perfusion mit Adenosin 5'-Triphosphat (ATP) führt bei CF im Gegensatz zu gesunden Kontrollen vorübergehend zu einer großen Änderung der PD (162,182). ATP stimuliert alternative Chloridkanäle und nicht CFTR als intrazelluläres Cosubstrat der kalziumabhängigen Proteinkinase C (207). Die ATP-Antwort wird auch als Marker für die Durchlässigkeit des Epithels verwendet.

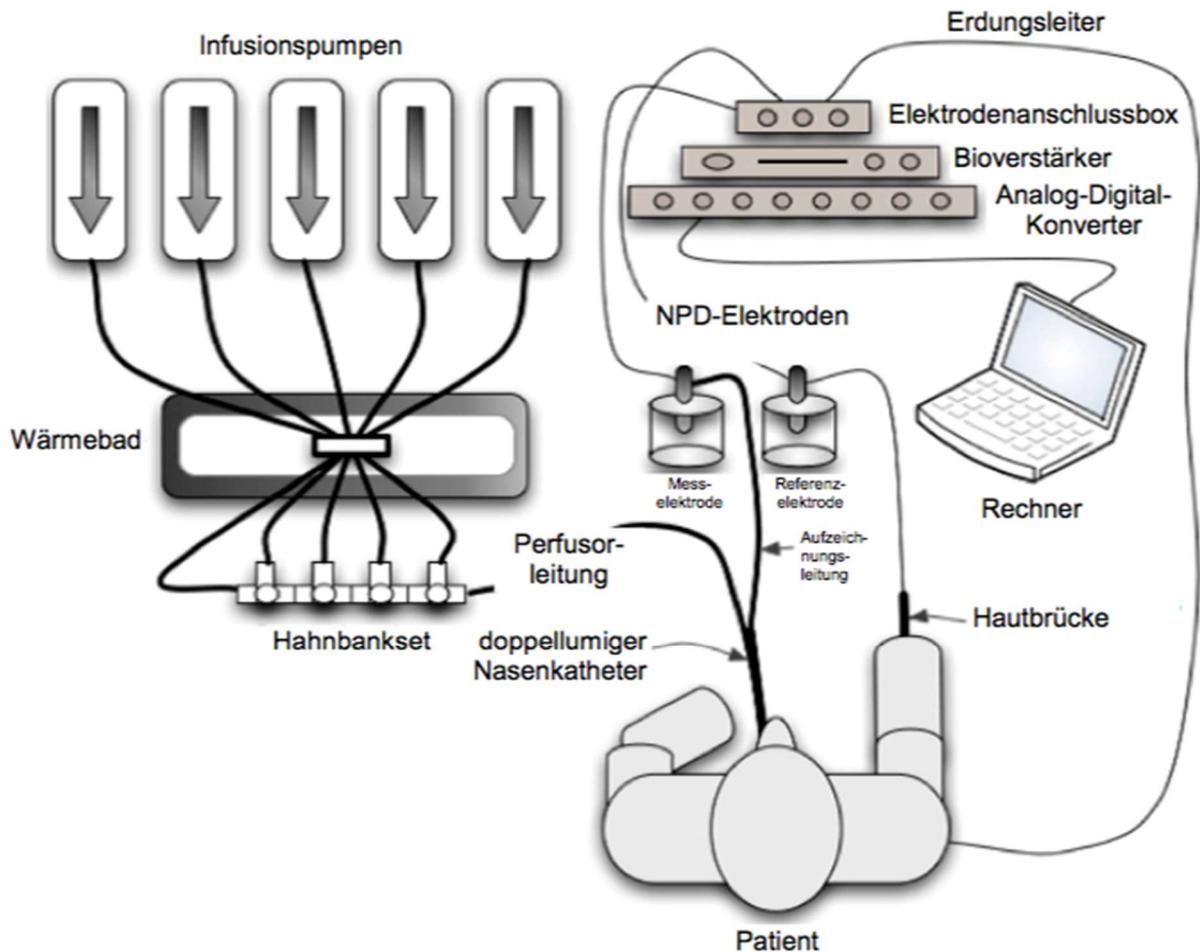
### **2.3.2. Durchführung und Material**

Die Voraussetzung für das durchführende Personal war ein vorausgegangenes NPD-Training. Im Vorfeld der Untersuchung mussten folgende Punkte anamnestisch und durch anteriore Rhinoskopie bei allen Patienten ausgeschlossen und dokumentiert werden, da sie die NPD-Befunde im Sinne einer vermeintlichen Beeinträchtigung der CFTR-Chloridkanalfunktion beeinflussen können: Nasenpolypen der unteren Nasenmuscheln, anatomische Besonderheiten der Nasenhöhle (z.B. Septumdeviation oder Z.n. einer Nasen-Operation) und Veränderungen der nasalen Mukosa z.B. durch Inflammation bei Rhinitis und Nikotin-Abusus (97,106,174).

Die NPD wurde bei den Probanden in beiden Nasenlöchern nach dem SOP der European Cystic Fibrosis Society durchgeführt (174). Nach der Inspektion des Nasenepithels wurde ein kommerzieller doppellumiger Nasenkatheter (IS2020US, Marquat Genie Biomedical, France) von 80 cm Länge mit einem seitlichen Loch auf dem Boden des Nasenloches befestigt und eine Referenzbrücke subkutan am Unterarm angebracht um die Potentialdifferenz zu erfassen. Das apikal entstehende Potential wurde dabei von einer Elektrode erfasst, die mit der Nasensonde verbunden war und das basolaterale oder interstitielle Potential von der an den Hautzugang gekoppelten Elektrode. Sowohl der Nasenkatheter als auch die Referenznadel waren mit dreiprozentigem in Ringerlösung gelöstem Agar befüllt und über Kalomel-Elektroden (Radiometer Analytical, Loveland, USA) mit einem hochohmigen Verstärker (BMA-200 AC/DC, AD Instruments, New South Wales, Australia) verbunden. Nach dem Einführen der Nasensonde unter die untere Nasenmuschel wurde der Punkt auf dem Nasenboden mit dem negativsten basalen PD-Wert aufgesucht und eine Stabilisierung der PD abgewartet. Zur Registrierung der PD zwischen den beiden Elektroden wurde Power Lab mit LabChart Software Version 7.2 verwendet (beides AD Instruments) (vgl. Abb. 5). Während der Messung wurde das Nasenepithel mit verschiedenen Lösungen mit 300ml/h durch ein zweites Lumen des Nasenkatheters nach einem standardisierten Protokoll perfundiert. Die Perfusion erfolgte dabei mit jeder Lösung mindestens drei Minuten lang in folgender Reihenfolge: (1) Ringerlösung, um eine stabile Spannungsdifferenz - die basale PD - zu erreichen; (2) Amilorid, um die Natriumabsorption durch den epithelialen ENaC-Kanal zu blockieren; (3) chloridfreie Lösung mit Amilorid, um die osmotisch induzierte basale Chloridpermeabilität zu bestimmen; (4) Isoproterenol, um die cAMP-vermittelte CFTR-Leitfähigkeit zu untersuchen; (5) ATP, um die kalziumabhängige, alternative Chloridsekretion zu messen. Als Qualitätskontrolle der Messung diente hierbei ATP ( $\Delta PD < 0$ ). Am Ende wurde wieder Ringerlösung verwendet um zur basalen PD zurückzukehren. Die Zusammensetzung der Perfusionslösungen kann in Tab. 3 nachgesehen werden. Weitere Einzelheiten zum Versuchsaufbau, zum detaillierten Messablauf oder zur Datenerhebung können im ECFS NPD SOP (174) und bei Klosinski (110) nachgelesen werden.

Salz-Stamm-Lösung	1,65g Kalziumchlorid Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) + + 1,5g Kaliumchlorid (KCl) + + 1,2g Magnesiumchlorid Hexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) + + 500ml destilliertes Wasser (Aqua dest)
KPI-Stamm-Lösung	0,5g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) + + 4,2g Dikaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) + + 100ml Aqua dest
Adenosin 5'-Triphosphat (ATP) Stock	55mg ATP in 2ml Aqua-bi-dest lösen
Ringerlösung (1)	8,58g Natriumchlorid (NaCl) in 500ml Aqua dest + + 100ml Salz-Stamm-Lösung + + 390ml Aqua dest + 10ml KPI-Stamm-Lösung
Amilorid-Lösung (2)	456ml von Lösung (1) + + 13,7mg Amilorid ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{ClN}_7\text{O} \times \text{HCl}$ )
Chloridfreie Lösung + Amilorid (3)	17,2g Natriumglukonat ( $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NaO}_7$ ) + + 0,5g Calciumglukonat ( $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{CaO}_{14}$ ) + + 0,5g Kaliumglukonat ( $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{KO}_7$ ) + + 0,2g Magnesium Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) + + 527,7ml Aqua dest + + 5,33ml KPI-Stamm-Lösung + + 16mg Amilorid
Chloridfreie Lösung + Amilorid + Isoproterenol (4)	100ml von Lösung (3) + + 0,5ml Isoproterenol ( $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3 \times \text{HCl}$ )
ATP (5)	50ml von Lösung (4) + + 100 $\mu\text{l}$ von ATP Stock

**Tab. 3: NPD - Zusammensetzung der benötigten Lösungen (174).**



**Abb. 5:** NPD - schematischer Aufbau (modifiziert nach (110) und ECFS NPD SOP, Version 1.8; Mai 2014).

### 2.3.3. Auswertung und diagnostische Interpretation

Für alle NPD-Parameter wurden Mittelwerte aus den Ergebnissen des rechten und linken Nasenlochs gebildet, um die Variabilität der Messungen bei einem Individuum so gering wie möglich zu halten. Die Daten wurden in die Auswertung eingeschlossen, sofern die Messkurven dabei den folgenden Qualitätskriterien genügten: (1) eine mindestens 30 Sekunden lang stabile basale PD mit einer maximalen Abweichung von  $\pm 1$  mV am Ende jeder Lösung; (2) eine abnehmende Negativität der PD unter Amilorid-Zugabe; (3) eine eindeutige ATP-Antwort (besonders bei ausbleibenden Reaktionen auf chloridfreie Lösung und Isoproterenol) welche sich als zunehmende Negativität der PD darstellt (174).

Bei der NPD sind die basale PD,  $\Delta$ PD Amilorid und  $\Delta$ PD Chloridfrei/ Isoproterenol (0Cl/Iso) wichtige diagnostische Parameter. Zur besseren Unterscheidung zwischen den Diagnosen „CF“ und „CF unwahrscheinlich“ etablierten sich im Verlauf zwei aus ihnen berechnete Scores:

der sogenannte Wilschanski Index ( $e^{\Delta PD (0Cl^-/Iso) / \Delta PD Amilorid}$ ) (162) und der sogenannte Sermet Score ( $- 0,11 \times \Delta PD (0Cl^-/Iso) - 0,05 \times \Delta PD Amilorid$ ) (169), die auch in dieser Arbeit verwendet werden. Bisher gelten Werte oberhalb des Cutoff-Werts des Wilschanski Scores von 0,7 als hinweisend auf eine CF (162). Beim Sermet Score indizieren Werte kleiner 0,27 bislang eine CF (169).

#### 2.3.4. NPD-Messkurven

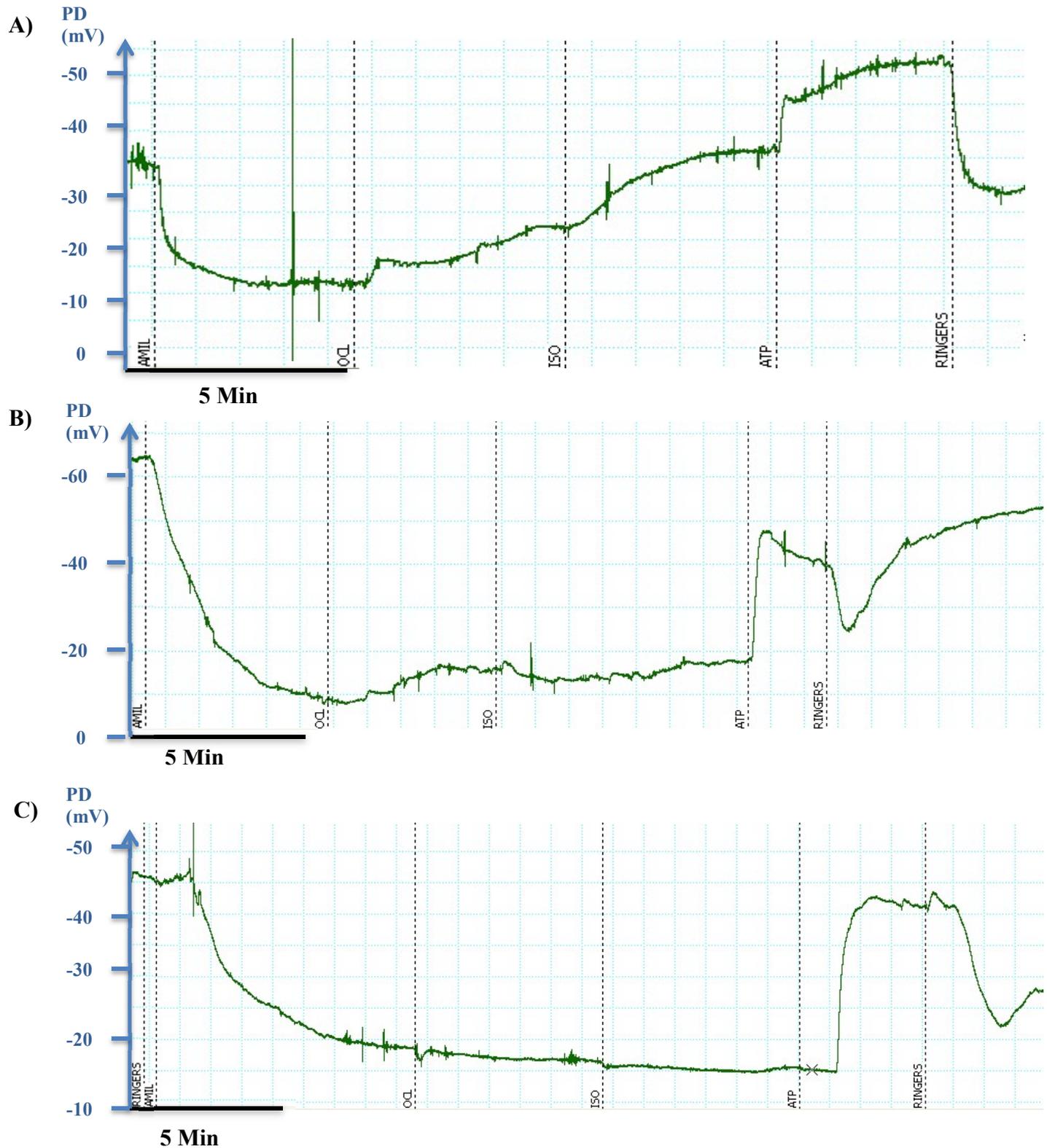
In den folgenden Abbildungen (siehe Abb. 6) sind exemplarisch Messkurven einer gesunden Kontrolle, eines PS-CF ( $\Delta F508/2789+5G>A$ ) und eines PI-CF Patienten ( $\Delta F508/\Delta F508$ ) aufgeführt.

Bei CF (Abb. C) kommt es durch eine ENaC-Hyperaktivität zu besonders negativen Werten der basalen PD im Gegensatz zu gesunden Kontrollen. Unter Amilorid-Einfluss steigt das Potential bei CF deutlich an (wobei das Potential weiter negativ bleibt). Bei der Messkurve zeigt sich dies in Form eines stärkeren Absinkens der Kurve bei CF als bei Non-CF. Ein kleines  $\Delta PD 0Cl^-/Iso$  spiegelt bei CF die geringere Chloridsekretion wieder (161,162), während ATP über kalziumabhängige alternative Chloridkanäle bei CF zu einer großen Stimulation führt.

Die unterschiedlichen Anteile der Chloridsekretion sind bei Gesunden (Abb. A) durch die Anstiege bei  $\Delta PD 0Cl^-$  (osmotisch induziert),  $\Delta PD Iso$  (CFTR-vermittelt) und  $\Delta PD ATP$  (kalziumabhängig) erkennbar.

Bei PS-CF (Abb. B) mit residualer Chloridfunktion ergeben sich Werte zwischen CF und Non-CF.

Die Perfusion mit Ringer-Lösung am Ende spült die vorher applizierten Substanzen aus und die Kurve kehrt langsam zu den anfänglichen basalen PD-Werten zurück.



**Abb. 6: Ergebnisse der nasalen Potentialdifferenzmessung (NPD) bei normaler, residualer und fehlender Chloridleitfähigkeit.**

Originalaufzeichnungen der Messkurven A) eines Gesunden, B) eines PS-CF Patienten ( $\Delta F508/2789+5G>A$ ) und C) eines PI-CF Patienten ( $\Delta F508/\Delta F508$ ) aus der Kohorte unter sukzessiver Perfusion mit Ringerlösung (RINGERS), Amiloridlösung (AMIL), chloridfreier Lösung (OCL), Isoproterenollösung (ISO) und ATP-Lösung (ATP). x-Achse: Zeit in Minuten (blaues Kästchen entspricht einer Minute), y-Achse: Potentialdifferenz in Millivolt (mV).

## 2.4. Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM)

### 2.4.1. Methode

Das ex vivo Verfahren wurde von Veeze und Mitarbeitern 1991 in Rotterdam entwickelt, um die Funktion des cAMP-medierte CFTR-Chloridkanals zu untersuchen, welcher im Kolon stark exprimiert wird (208). Rektumsaugbiopsien von CF-Patienten und gesunden Kontrollen werden in rezirkulierende Micro-Ussingkammern gespannt und anschließend der elektrogene transepitheliale Ionen-transport von  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{HCO}_3^-$  als Kurzschlussstrom registriert (163,164,166). Unter Zugabe verschiedener inhibierender und stimulierender Substanzen können bei funktionalem und dysfunktionalem CFTR unterschiedliche Änderungen des transepithelialen Kurzschlussstroms aufgezeichnet werden.

ICM basiert dabei auf dem Wissen, dass cAMP-Aktivatoren wie Forskolin und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) bei Gesunden im Darm zusammen mit Kalziumagonisten wie Carbachol und Histamin synergistisch die CFTR-abhängige Chloridsekretion an der apikalen Membran des Epithels stimulieren (182). Die cholinerge Co-Aktivierung mittels Carbachol und Histamin verstärkt bei Non-CF die CFTR-abhängige Chloridsekretion über die Stimulation basolateraler Kaliumkanäle, welche die elektrische Triebkraft für den Ausstrom der Chloridionen über den CFTR-Kanal erhöhen (172,209). Bei den Carbachol- und Histamin-Antworten ergeben sich dadurch zwei Komponenten: ein lumennegativer Strom, verursacht durch den Kaliumausstrom und ein lumenpositiver Strom durch CFTR-vermittelte Chloridsekretion. Der lumennegative Teil wird bei Gesunden vom größeren lumenpositiven Chloridausstrom verdeckt.

Bei CF führt der cAMP-abhängige CFTR-Agonist Forskolin dagegen zu reduzierten Antworten (154). Durch den funktionslosen CFTR-Kanal kommt es hier zu abnormalem Transport von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ . Die kalziumabhängige cholinerge Co-Stimulation führt dann lediglich zu basolateraler Kaliumsekretion bei fehlender apikaler Chloridsekretion (210) oder bei milden CF-Formen zu biphasischen Antworten durch einen Rest an Chloridausstrom (108,154,160,164,170). In mehr als 25 Jahren wurde ICM kontinuierlich weiterentwickelt. Das ursprüngliche Verfahren von Veeze wurde sukzessive modifiziert (164). Als überarbeitetes Rotterdam-Protokoll (108) war es die Grundlage für das in dieser Studie verwendete SOP, welches von der ECFS Diagnostic Network Working Group und der ECFS Clinical Trials Network entwickelt wurde (184). Eine andere Modifikation stellt das Freiburg-Protokoll dar (172,209), welches hier nur kurz erwähnt werden soll (Details finden sich bei De Boeck et al 2011 (182)). Das Freiburg-Protokoll unterscheidet sich unter anderem durch die Aufzeichnung der transepithelialen Spannung bei offenem Stromkreislauf an Stelle der Messung des Kurzschlussstroms bei

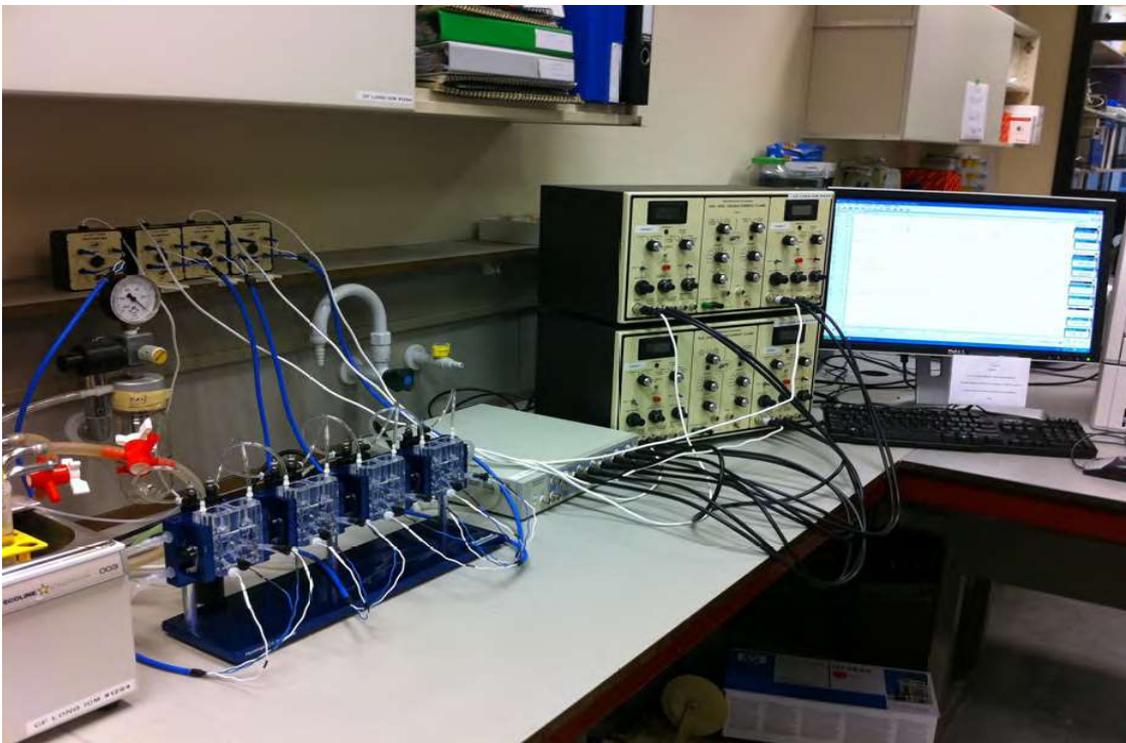
geschlossenem Stromkreislauf, durch die Reihenfolge der Substanzzugabe und durch die perfundierten unbegasteten Ussingkammern anstelle des begasteten rezirkulierenden Kammersystems aus dem Rotterdam-Protokoll (211).

#### **2.4.2. Durchführung und Material**

Vor der Biopsieentnahme wurden Hämorrhoiden und bekannte Blutungsneigung anamnestisch ausgeschlossen, da es nach der Probenentnahme kurzzeitig zu oberflächlichen Blutungen der Rektumschleimhaut kommen kann. Darüber hinaus wurde die Einnahme antiallergischer Medikamente im Vorfeld erfragt, da durch diese Substanzen die Reaktion der Biopsien auf die Histamingabe während der Messung beeinträchtigt werden kann (97,184).

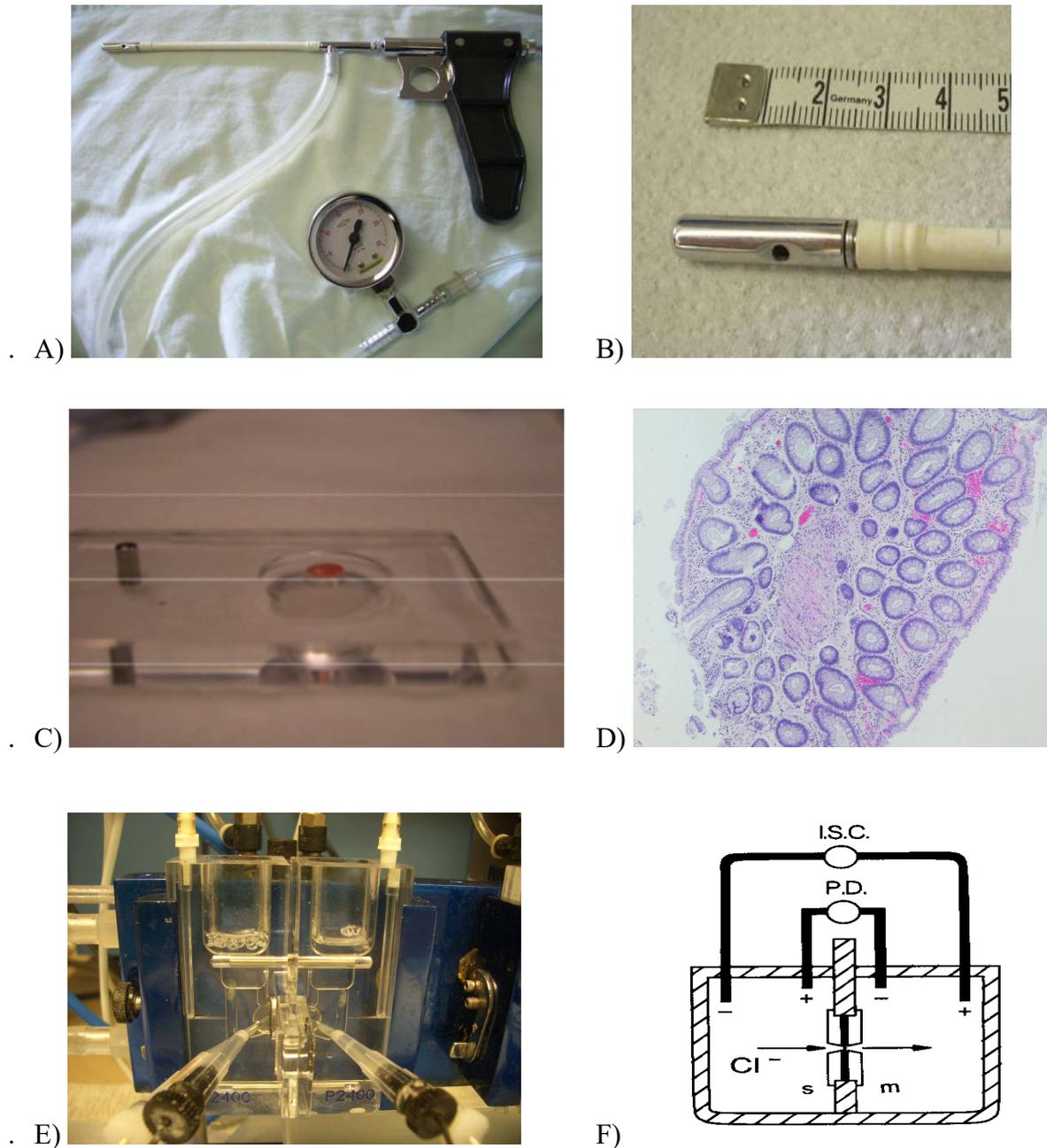
Alle Messungen wurden entsprechend des standardisierten Protokolls durchgeführt (184) und das Personal wurde einem vorherigen Training an den Ussingkammern unterzogen. Mit einer Saugzange zur Gewinnung von Rektumbiopsien (Trewavis Surgical, Boronia, Australia) wurde rektales Schleimhautgewebe mit einem Durchmesser von 2-3 mm unter einem definierten Druck von 5 mmHg entnommen. Da hierbei keine Schmerzen bei den Probanden ausgelöst werden, ist eine Sedierung nicht erforderlich. Um die intraindividuelle Variabilität zu kontrollieren, wurde die Messung an bis zu acht Biopsien bei den Probanden durchgeführt. Für den Transport wurden die Schleimhautproben in eisgekühlter Pufferlösung gelagert, die zur Hemmung der endogenen cAMP-abhängigen Chloridsekretion mit Indomethacin versehen worden war. Anschließend wurden die Biopsien in rezirkulierende Ussing-Kammern (P2400, Physiologic Instruments, San Diego, USA) eingespannt, mit je 2 ml Meyler-Puffer (Substanzen jeweils in mmol/l: Hepes 10; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4; MgCl<sub>2</sub> 1,0; CaCl<sub>2</sub> 1,3; KCl 4,7; NaCl 128; NaHCO<sub>3</sub> 20,2; D-Glukose 10; Indomethacin 0,01. Osmolarität 300 mosmol/l; pH-Wert 7,4) pro Kammerhälfte. Um physiologische Bedingungen zu simulieren, wurde die Temperatur bei 37°C gehalten und die Proben mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> begast. Die Ussing-Kammern waren über KCl-Agarbrücken mit Kalomel-Spannungselektroden verbunden, die Stromelektroden waren aus Platin. Am Anfang (und am Ende) der Messung (nach etwa 90 bis 120 Minuten) wurden als Parameter für basale Gewebeeigenschaften die Potentialdifferenz (PD basal) und der Gewebswiderstand (R<sub>t</sub> basal) nach einem kurzen Stromimpuls von 15 µA im offenen Kreislauf über einen hochohmigen Verstärker (z. B. DVC-1000/ DVC-3, World Precision Instruments, Sarasota, USA) bestimmt. Nach dem Abklemmen wurde der basale Kurzschlussstrom (I<sub>sc</sub> basal) bestimmt. Anschließend wurden 100 µM Carbachol (CCH) in die zur serosalen Biopsiefläche gerichtete Ussingkammerhälfte gegeben, um die eingespannte Gewebeprobe auf ihre korrekte Ausrichtung

und Reaktivität zu überprüfen und die rein cholinerg vermittelte cAMP-unabhängige CFTR-Funktion (in Abwesenheit von Forsk/IBMX) zu ermitteln. Während der anschließenden etwa 40-minütigen Equilibrierungs- und Auswaschphase (*englisch*: washout) im geschlossenen Kreislauf (voltage clamp mode, 0 mV), wurde die Pufferlösung drei mal nach jeweils 10 Minuten ausgetauscht. Anschließend wurde der transepitheliale Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) in  $\mu A$  als direktes Mass des Ionentransports entlang des Epithels aufgezeichnet, während verschiedene Substanzen in einer definierten Reihenfolge nach einem abzuwartenden Mindestzeitraum und Stabilisierung der Kurve mukosal (M) oder serosal (S) zugegeben wurden: (1) Amilorid (Amil) 100  $\mu M$  (M) zur Inhibition der ENaC-vermittelten Natriumabsorption, (2) Forskolin und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (Forsk/IBMX) 10/100  $\mu M$  (M+S) zur Messung der cAMP-abhängigen CFTR-Leitfähigkeit, (3) Genistein (Geni) 10  $\mu M$  (M+S) zur Verstärkung der CFTR-Restfunktion, (4) Carbachol (CCH) 100  $\mu M$  (S) zur cholinergen Kostimulation der CFTR-Chloridleitfähigkeit über Kalzium und Proteinkinase C, (5) 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedischwefelsäure (DIDS) 200  $\mu M$  (M) zur Inhibition DIDS-sensitiver alternativer, kalziumabhängiger Chloridkanäle und (6) Histamin (Hista) 500  $\mu M$  (S) zur Ermittlung der DIDS-insensiblen, cholinerg vermittelten, kalziumabhängigen Chloridsekretion. Alle Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA bezogen.



**Abb. 7: ICM - Aufbau (aus ECFS ICM SOP; Version 2.7; Oktober 2011).**

Von links nach rechts: Wasserbad; Gasquelle; Ussingkammersystem (4-kanalig); PowerLab; Spannungsklemme; Rechner.



**Abb. 8: ICM – Material zur Entnahme der Biopsie und Einspannung in Ussingkammer.**

A) Biopsiezange mit Saugleitung und Druckanzeige; B) Spitze der Biopsiezange mit Öffnung zum Ansaugen der Biopsie; C) Slider mit Rektumsaugbiopsie; D) Mikroskopische Vergrößerung einer Rektumsaugbiopsie; E) Ussingkammer mit eingespannter Biopsie; F) Schematische Darstellung der Funktion einer Ussingkammer (aus (170); I.S.C.: intestinaler Kurzschlussstrom, P.D.: Potentialdifferenz, Cl<sup>-</sup>: Chloridionen, +: positive Ladung, -: negative Ladung, s: serosaler Kammerabschnitt; m: mukosaler Kammerabschnitt); Fotos aus unserem Labor mit freundlicher Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

### 2.4.3. Auswertung und diagnostische Interpretation

Die Qualitätskriterien für auswertbare Biopsien wurden im ECFS ICM SOP wie folgt festgelegt: (1) basaler Gewebewiderstand ( $R_t$  basal) von mindestens  $10 \Omega/\text{cm}^2$ , da Biopsien mit einem geringeren Widerstand auf Grund ihrer Qualität, Größe oder eines Lecks unzulässig waren; (2) keine Abweichung vom konstanten  $I_{sc}$  zu Messbeginn (kein Drift vor der Zugabe von Amilorid) um ein stabiles Messniveau zu garantieren; (3) mindestens eine Reaktion des  $I_{sc}$  auf eine der zugegebenen Substanzen zur Gewährleistung eines vitalen Zustands der untersuchten Biopsie.

Alle Ergebnisse als Reaktionen auf die Stimulation mit den spezifischen Substanzen wurden als maximale Nettoänderung des Kurzschlussstroms ( $\Delta I_{sc}$ ) angegeben, welche die Summe des negativen und positiven Gipfels darstellt (108,164,170,212). Dabei weist eine negative Nettoantwort auf ein geringes Maß an Chloridleitfähigkeit hin, wohingegen eine positive Nettoantwort des  $I_{sc}$  viel Chloridsekretion anzeigt. Danach wurden die Antworten auf  $1\text{cm}^2$  normalisiert. In die Analysen wurden zunächst alle Einzelwerte der Biopsien eingeschlossen und anschließend die mittleren individuellen Ergebnisse der basalen Gewebeparameter sowie des  $\Delta I_{sc}$  bestimmt.

Im Fokus der diagnostischen Auswertungen standen die CFTR-Stimulatoren Forsk/IBMX und CCH sowie die zusätzliche kalziumunabhängige Chloridsekretion unter Histamin (Amilorid wurde lediglich zur Inhibition der ENaC-vermittelten Natriumabsorption, Genistein zur Verstärkung der CFTR-Restfunktion und DIDS als Vorbereitung für Histamin zur Inhibition alternativer, kalziumabhängiger Chloridkanäle zugegeben). Im Vorfeld hatten Derichs et al 2010 veröffentlicht, dass der beste diagnostische Parameter zur Diskriminierung zwischen CF und Non-CF die Summe aus den ICM-Anworten  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  Carbachol und  $\Delta I_{sc}$  Histamin sei. Bei Werten unterhalb des Cutoffs von  $35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  wurde von CF ausgegangen (108). Auch  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout wurde als prädiktiver diagnostischer ICM-Parameter hinzugezogen, wobei Werte unterhalb von  $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  hinweisend für CF sein sollten (108, 110).

Die Auswertung der ICM-Tracings der beiden anderen ECFS DNWG Zentren erfolgte zentral am Berliner Studienzentrum durch einen trainierten Interpreten und wurde von einem weiteren erfahrenen ICM-Experten kontrolliert.

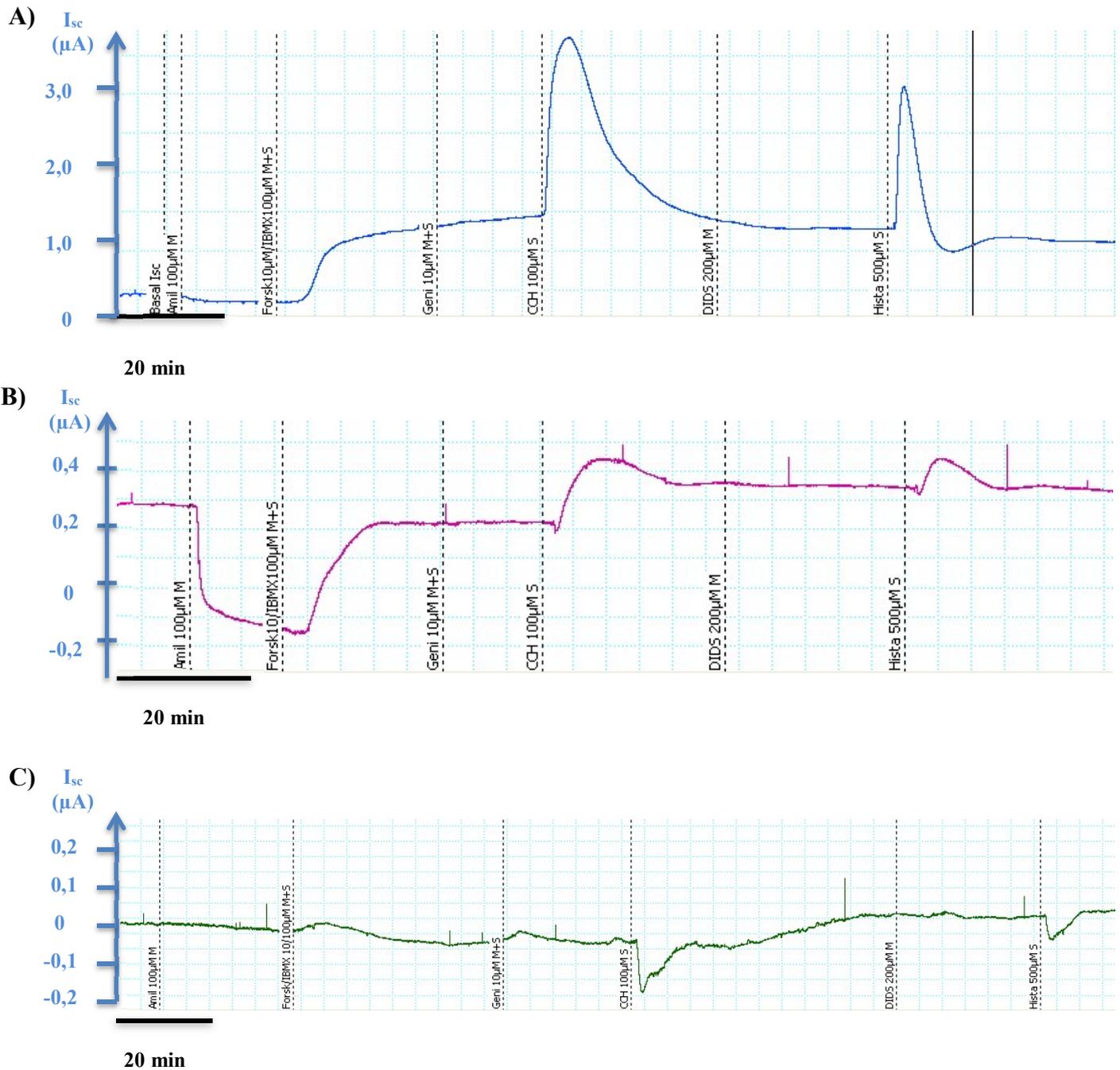
#### 2.4.4. ICM-Messkurven

Hier sind beispielhaft drei ICM-Messkurven abgebildet – jeweils eine für Non-CF, PS-CF ( $\Delta F508/3849+10kbC-T$ ) und PI-CF ( $\Delta F508/\Delta F508$ ) (siehe Abb. 9).

Bei gesunden Kontrollen mit normaler CFTR-Funktion (Abb. A: Non-CF) werden positive Antworten des  $I_{sc}$  auf Forsk/IBMX (durch eine cAMP-vermittelte CFTR-Aktivierung), auf CCH (durch die cholinerge Kostimulation von CFTR) und auf Histamin (durch die kalziumabhängige, DIDS-insensible Chloridsekretion) festgestellt. Der induzierte hohe Chloridausstrom verdeckt dabei den gegenläufigen Kaliumausstrom.

Bei CFTR-Restfunktion (Abb. B: PS-CF) kommt es zu einem geringeren Anstieg der Messkurve als bei Non-CF oder zu biphasischen Kurven mit einem negativen Gipfel durch die Kaliumsekretion und einem positiven Gipfel durch den Chloridausstrom.

Bei fehlender CFTR-Funktion (Abb. C: PI-CF) bleibt der Anstieg der Kurve auf Grund der fehlenden Chloridsekretion meist ganz aus und es kann unter Zugabe von Forsk/IBMX einerseits und CCH andererseits zu einem Absinken der Kurve durch die unmaskierte apikale Kaliumsekretion kommen.



**Abb. 9: Ergebnisse intestinaler Kurzschlussstrommessung (ICM) an Rektumsaugbiopsien in Micro-Ussingkammern bei normaler CFTR-Funktion sowie an Biopsien mit und ohne Restfunktion.**

Original ICM-Messkurven: A) gesunde Kontrolle, B) PS-CF ( $\Delta F508/3849+10kbC-T$ ) und C) PI-CF ( $\Delta F508/\Delta F508$ ) aus unserer Kohorte. Ermittlung des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) in rezirkulierenden Micro-Ussingkammern in Anwesenheit von Indomethacin unter Zugabe verschiedener Substanzen: Amilorid (Amil 100  $\mu M$  M), Forskolin und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (Forsk10/IBMX100  $\mu M$  M+S), Genistein (Geni 10  $\mu M$  M+S), Carbachol (CCH 100  $\mu M$  S), 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure (DIDS 200  $\mu M$  M) sowie Histamin (Hista 500  $\mu M$  S). X-Achse: Zeit in Minuten (min, ein blauer Strich entspricht 5 Minuten); Y-Achse: Stromstärke in Mikroampere ( $\mu A$ ).  $\mu M$ : Mikromolar; M: mukosaler Kammerabschnitt; S: serosaler Kammerabschnitt.

## **2.5. Bestimmung der Serumspiegel von Ivacaftor**

Zur Bestimmung der Ivacaftorkonzentration im Patientenserum erfolgte zu definierten Zeitpunkten (vor der Einnahme von Ivacaftor, sowie stündlich 1 bis 8 Stunden danach) wiederholt eine venöse Blutentnahme. Die befüllten Serumröhrchen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und eisgekühlt zur Auswertung in das Freiburger Labor von M. Hug geschickt. Dort wurde für die Analysen eine validierte Methode der Flüssigchromatographie mittels Massenspektrometer verwendet.

## **2.6. Statistische Auswertung**

Im Rahmen der Statistik wurden folgende Methoden verwendet:

- 1) Deskriptive und induktive Statistik
- 2) Selbstorganisierende neuronale Netzwerke (= SOMs, Kohonen-Karten)
- 3) Baumklassifikationsalgorithmen wie Entropiebasierte Lernverfahren (C5.0), exhaustive CHAID (Chi-squared Automatic Interaction Detector) und CART (Classification and Regression Trees)

### **2.6.1. Deskriptive und induktive Statistik**

Nominale Werte wurden durch ihre absolute und relative Häufigkeit beschrieben, ordinale Werte zusätzlich durch den Median. Quantitative Werte wurden durch Mittelwerte und Mediane und als Streuungsparameter durch ihre Standardabweichungen bzw. Spannweiten (Maximum-Minimum) charakterisiert. Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (auch: Mann-Whitney-U-Test) als parameterfreier statistischer Test für die in dieser Arbeit verwendeten nicht normalverteilten Parameter diente zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen (vgl. auch Abb. 25.1-25.4).

Als parameterfreies Maß für den linearen Zusammenhang zwischen zwei CFTR-Biomarkern wurden die Korrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Zur visuellen Darstellung der Zusammenhänge von drei Variablen wurden 3D-Surface Plots bzw. 2D-Heat-Maps verwendet. Die diagnostische Qualität zur Bestimmung der Genauigkeit von Vorhersagen einzelner CFTR-Biomarker wurde mit Hilfe von ROC-Kurven (Receiver-Operating-Characteristics Kurven) ermittelt. Die diagnostische Qualität wird durch die Area under the curve (AUC) beschrieben. Die Werte für AUC liegen zwischen 0,5 und 1. Ein Wert von 0,5 für AUC bedeutet „die Ergebnisse sind rein zufällig bzw. der Test ist nicht besser als Würfeln“, Werte im Bereich 0,8-0,9 bedeuten „sehr gute Klassifikationsgenauigkeit“ und Werte im Bereich 0,9-1 „exzellente

Genauigkeit“. AUC=1 bedeutet „alle Patienten werden richtig klassifiziert – Sensitivität und Spezifität 100%“. Die Gleichheit der Klassifikationsgenauigkeit zweier CFTR-Biomarker wurde mit einem Äquivalenztest für verbundene Stichproben geprüft. Der polynomiale Zusammenhang zwischen CFTR-Biomarkern wurde mit einem Approximationsverfahren berechnet. Die Ansprechbarkeit von G551D-Patienten auf Ivacaftor wurde auf der Basis der in dieser Studie berechneten unizentrischen Cutpoints für CF-Patienten und gesunde Kontrollen ermittelt. Bei der multizentrischen Analyse wurden die Unterschiede zwischen den drei Zentren mit Hilfe des F-Tests berechnet. Das Signifikanzniveau wurde mit 5% ( $p=0,05$ ) festgesetzt. Für die statistische Auswertung wurden Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, USA), SPSS Version 24 (IBM, Armonk, USA) und NCSS Version 12 (NCSS LLC, Kaysville, Utah, USA) sowie R (Version 3.3.3; <https://www.r-project.org/>) verwendet.

### **2.6.2. Selbstorganisierende Kohonen Netzwerke (SOMs).**

Zur Berechnung der a priori nicht bekannten Cluster wurden selbstorganisierende Karten (selforganizing maps: SOMs) verwendet. SOMs (hier Kohonen-Karten nach Teuvo Kohonen (213)) sind Typen von künstlichen neuronalen Netzen mit einem unüberwachten Lernverfahren mit dem Ziel eine topographische Merkmalskarte in Form von Clustern des Eingaberaums (Patientendaten) zu erreichen. Ziel ist es zu erreichen, dass die Patienten innerhalb eines Clusters maximal homogen und zwischen den Clustern maximal inhomogen sind.

Hiermit lassen sich komplexe Zusammenhänge zwischen einer beliebigen Anzahl von Variablen visualisieren und Vorhersagen z.B. in der Diagnostik mit hoher Genauigkeit treffen.

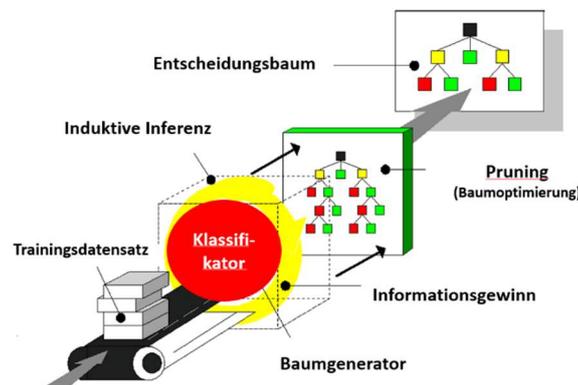
### **2.6.3. Klassifikationsalgorithmen**

Zur Auswertung der Modelle verwendeten wir drei verschiedene Klassifikationsalgorithmen: (1) Entropiebasierte Lernverfahren (C5.0), (2) Exhaustive CHAID und (3) CART. Im Folgenden findet sich eine allgemeine Beschreibung zur Funktionsweise von solchen Entscheidungsbäumen (betrifft die erwähnten drei Verfahren gleichermaßen - die Unterschiede beziehen sich einzig auf das jeweilig verwendete Informationsmaß): Baumklassifikationsalgorithmen klassifizieren Fälle in Gruppen oder prognostizieren Werte einer Zielvariablen (hier CF oder Non-CF) auf Basis von Werten der Biomarker. Sie ermöglichen Vorhersagen oder Klassifizierungen zu zukünftigen Beobachtungen auf Basis einer Reihe von Entscheidungsregeln.

Hierbei wird aus einer Trainingsmenge von Beispielen (in dieser Arbeit aus der Gesamtmenge aller Probanden) mit bekannter Klassenzugehörigkeit mit Hilfe des Klassifikationsalgorithmus

ein Klassifikator in Form von Entscheidungsbäumen oder einem Satz von Regeln generiert. Die Größe des Entscheidungsbaumes wird im nächsten Schritt reduziert (Pruning: Reduktion der Komplexität), indem solche Verzweigungen wegfallen, die wenig zur Klassifikationsgenauigkeit beitragen. Dies erhöht die Gesamtgenauigkeit durch das Vermeiden von möglichem „Overfitting“.

Die Klassifikation grenzt sich vom Clustering (siehe SOMs) dadurch ab, dass bei der Klassifikation die Klassen a priori bekannt sind, während beim Clustering die Klassen erst gesucht werden müssen.



**Abb. 10: Komponenten eines Klassifikationsalgorithmus.**

### 2.6.4 Multilayer Perceptron (MLP)

Neuronale Netze sind informationsverarbeitende Systeme, die aus einer grossen Anzahl einfacher Einheiten (Neuronen) bestehen. Diese sind durch gerichtete und gewichtete Kanten miteinander zu Netzwerken verbunden. Über diese senden sich die Neuronen Information in Form ihrer Aktivierung zu. Alle Neuronen des Netzwerks sind in Schichten (Layers) eingeteilt (Eingabeschicht, eine oder mehrere verdeckte (hidden) Schicht(en) sowie eine Ausgabeschicht. Das wesentliche Element dieser künstlichen Neuronalen Netze ist ihre Lernfähigkeit. Diese Fähigkeit, z.B. ein Klassifikationsproblem selbständig aus Trainingsbeispielen zu lernen, machen Neuronale Netze universell einsetzbar. Neben den selbstorganisierenden Karten verwenden wir Multilayer Perceptrons. Ein MLP ist ein mehrschichtiges Feedforward Neuronales Netz. Ein Neuron einer Schicht ist mit allen Neuronen der nächsten Schicht verbunden. Es gibt keine Verbindungen zur vorherigen Schicht und keine Verbindungen, die eine Schicht überspringen. Die Verbindungen zwischen den Neuronen sind unidirektional und nicht zyklisch. Eine typische Anwendung eines MLPs ist die Approximation einer unbekannt und analytisch schwer fassbaren Funktion  $f$ . Von dieser mehrdimensionalen Abbildung sind  $k$

diskrete Werte  $(x_i, f(x_i); i=1, \dots, k)$  bekannt. Das Ziel ist es, dass das Neuronale Netz die Funktion anhand der exemplarischen Werte erlernt und dadurch in der Lage ist, den Funktionsverlauf zu generalisieren, so dass für jeden möglichen Ausgangswert  $x$  der entsprechende Funktionswert  $y=f(x)$  berechnet werden kann ( $x$  und  $y$  können  $n$ - bzw.  $m$ -dimensionale Vektoren sein). MLPs sind sogenannte universelle Approximatoren, d.h. sie können Funktionen beliebig genau approximieren können.

Wir verwenden ein Multilayer Perceptron Netzwerk mit 2 Hidden Layers, dem hyperbolischen Tangens als Aktivierungsfunktion für die Hidden Layers und einem Output Layer für die abhängige Variable mit den Werten PI-CF oder PS-CF. Die Aktivierungsfunktion für den Output Layer ist Softmax und die Fehlerfunktion "Cross Entropie".

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Diskriminierung zwischen CF und Non-CF auf der Basis der CFTR-Biomarker ST, NPD und ICM (für Studiendaten aus Berlin)**

##### **3.1.1. Referenzwerte der CFTR-Biomarker und basale Messdaten (Berlin)**

Zunächst konnte die Durchführbarkeit der drei Verfahren ST, NPD und ICM unter Anwendung der aktuellen ECFS SOPs für NPD und ICM am selben Tag am Berliner Studienzentrum demonstriert werden. Die Erfolgsquote bei der Erhebung der CFTR-Biomarker in der Studienkohorte war hoch. Der Schweißtest wurde in > 97% der Fälle erfolgreich durchgeführt. Bei der NPD konnte lediglich bei zwei Patienten auf Grund von Nasenpolypen nur eines der beiden Nasenlöcher untersucht werden. 368 Rektumsaugbiopsien des Berliner Zentrums erfüllten die definierten Qualitätskriterien (siehe Methodenteil 2.4.3.) und wurden in die weiteren Analysen eingeschlossen (86,4%).

Die grundlegenden Charakteristika der Berliner Studienkohorte sowie Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen und Median mit Minimum und Maximum für die ECFS SOPs wie auch die Signifikanz der Gleichheit der Verteilungen in den Untergruppen CF und Non-CF bzw. PI-CF und PS-CF sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Alle untersuchten CFTR-Biomarker sind nicht normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov). Während CF-Patienten signifikant jünger ( $p < 0,01$ ) als gesunde Kontrollen waren (siehe Kapitel 3.1.2.), bestanden zwischen pankreasinsuffizienten und pankreassuffizienten Patienten bezüglich des Alters keine signifikanten Unterschiede. Bei der Geschlechterverteilung gab es zwischen den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Genotypen waren in den beiden CF-Gruppen komplett verschieden. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ) zwischen CF und Non-CF bestanden beim BMI, beim Chloridgehalt im Schweiß sowie bei allen aufgeführten NPD-Parametern und den mittels ICM erhobenen Parametern der CFTR-Funktion ( $\Delta I_{sc}$  von CCH pre Washout, Forsk/IBMX, CCH, Hista und Derich Score). Die Unterschiede zwischen PS-CF und PI-CF waren beim Schweißtest hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Signifikante Ergebnisse lieferten darüber hinaus auch die ICM-Parameter  $\Delta I_{sc}$  Forsk/IBMX und  $\Delta I_{sc}$  CCH pre Washout für die Unterscheidung zwischen PI-CF und PS-CF ( $p < 0,05$ ). Nahezu identische Mittelwerte des basalen Gewebewiderstands bei PI-CF, PS-CF und Kontrollen kennzeichneten die hohe Qualität der Biopsien zu Beginn der ICM und wiesen auf eine generell gute Vergleichbarkeit zwischen den drei Gruppen hin.

Beim Schweißtest lag nur ein pankreassuffizienter CF-Patient unserer Kohorte unterhalb des gängigen diagnostischen ST-Cutoffs für CF  $> 60$  mmol/l. Im Gegensatz dazu lagen die ST-Werte von neun der untersuchten Kontrollen (64%) im Grenzbereich zwischen 30 und 59 mmol/l.

Zum Vergleich der Verteilungen verschiedener Parameter in zwei Gruppen wurde jeweils der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Verteilungen der angegebenen Biomarker (ST, NPD- und ICM-Parameter) in den Gruppen CF und Non-CF sind ganz überwiegend hochsignifikant verschieden ( $p < 0,001$ ), mit Ausnahme der beiden Parameter  $R_t$  basal und  $\Delta I_{sc}$  Amilorid ( $p > 0,05$ ). Betrachtet man die Untergruppen PI-CF und PS-CF, so sind nur für die Biomarker Schweißchlorid-Konzentration,  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX und  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout die Verteilungen signifikant ( $p < 0,05$ ) verschieden. Für alle übrigen Biomarker kann die Nullhypothese „Die Verteilungen des betreffenden Biomarkers sind in den Untergruppen identisch“ nicht widerlegt werden ( $p > 0,05$ ).

Die letzte Aussage ist ein Grund dafür, dass viele der Parameter einzeln nicht so gut zur Klassifikation von Patienten in PI-CF bzw. PS-CF geeignet sind.

## NPD- und ICM-Referenzwerte (Berlin)

	Kontrollen (n=14)	CF gesamt (n=37)	PI-CF (n=28)	PS-CF (n=9)	Signifikanz	
					Kontrollen vs CF alle	PI-CF vs PS-CF
<b>Alter (Jahre)</b>	39,7±16,9 36,5 (18; 72)	28,5±10,1 28,0 (12; 47)	27,0±9,3 25,5 (12; 44)	33,1±11,7 30,0 (12; 47)	0,005	0,117
<b>Geschlecht</b>	<b>Frauen</b> 8 (57,1%) <b>Männer</b> 6 (42,9%)	20 (54,1%) 17 (45,9%)	15 (53,6%) 13 (46,4%)	5 (55,6%) 4 (44,4%)	0,843	0,917
<b>Body Mass Index</b>	24,6±3,9 24,7 (19,9; 32,7)	20,6±2,7 20,5 (15,2; 26,0)	20,3±2,3 20,0 (17,2; 25,3)	21,7±3,6 22,5 (15,2; 26,0)	<0,001	0,172
<b>Schweißchlorid-Konzentration (mmol/l)</b>	30,2±8,0 32,5 (15,5; 46,5)	89,6±15,6 92,5 (49,0; 115,0)	95,0±11,6 97,0 (67,5; 115,0)	72,9±15,0 72,0 (49,0; 96,0)	<0,001	<0,001
<b>NPD-Werte (Berlin)</b>						
<b>Basal PD (mV)</b>	-14,5±7,8 -14,7 (-29,6; -2,8)	-47,2±15,6 -48,5 (-76,2; -16,1)	-48,9±15,2 -50,2 (-76,2; -16,1)	-42,2±16,3 -36,2 (-72,3; -21,9)	<0,001	0,270
<b>ΔPD Amilorid (mV)</b>	7,5±5,3 7,4 (1,0; 18,6)	30,7±13,0 31,4 (6,1; 57,6)	30,7±13,4 31,9 (6,1; 57,6)	30,8±12,3 29,3 (14,7; 51,2)	<0,001	0,979
<b>ΔPD Chloridfrei/Iso (mV)</b>	-14,7±7,5 -11,2 (-28,7; -6,9)	-5,8±8,9 -4,1 (-34,9; 9,1)	-5,5±9,5 -3,7 (-34,9; 9,0)	-6,8±7,1 -4,7 (-20,8; -0,9)	0,002	0,694
<b>Wilschanski Score</b>	0,2±0,1 0,1 (0,0; 0,4)	0,9±0,2 0,9 (0,5; 1,5)	0,9±0,2 0,9 (0,5; 1,5)	0,8±0,2 0,9 (0,5; 1,0)	<0,001	0,553
<b>Sermet Score</b>	1,2±0,7 1,1 (0,5; 2,8)	-1,0±0,9 -0,9 (-2,6; 1,2)	-1,0±0,9 -0,9 (-2,6; 1,2)	-0,8±0,8 -1,0 (-1,9; 0,7)	<0,001	0,531
<b>ICM-Werte (Berlin)</b>						
<b>Rt basal (Ω/cm<sup>2</sup>)</b>	20,7±3,8 20,5 (14,3; 27,5)	20,6±4,7 21,3 (12,2; 29,5)	20,5±4,9 21,2 (12,2; 29,5)	20,8±4,3 21,3 (12,9; 25,9)	0,929	0,872
<b>ΔI<sub>sc</sub> Carbachol pre Washout (μA/cm<sup>2</sup>)</b>	22,1±10,4 19,5 (8,3; 45,4)	-4,3±4,0 -4,0 (-16,2; 1,8)	-5,1±4,0 -4,5 (-16,2; 0,7)	-1,7±3,2 -1,0 (-7,7; 1,8)	<0,001	0,024
<b>ΔI<sub>sc</sub> Amiloride (μA/cm<sup>2</sup>)</b>	-2,5±2,7 -2,0 (-10,4; 0,6)	-4,5±6,3 -2,8 (-36,1; 3,4)	-4,7±7,0 -2,8 (-36,1; 3,4)	-3,7±4,0 -2,5 (-12,2; 0,4)	0,272	0,881
<b>ΔI<sub>sc</sub> Forskolin/IBMX (μA/cm<sup>2</sup>)</b>	24,7±14,3 21,2 (7,1; 55,5)	0,3±6,0 -0,6 (-10,5; 15,7)	-1,2±4,9 -1,5 (-10,5; 12,2)	4,6±7,2 6,8 (-6,5; 15,7)	<0,001	0,010
<b>ΔI<sub>sc</sub> Carbachol (μA/cm<sup>2</sup>)</b>	27,9±17,6 22,6 (5,4; 73,2)	0,1±5,0 -0,3 (-10,0; 10,4)	-0,2±4,4 -0,5 (-10,0; 10,4)	0,8±6,7 3,1 (-8,5; 8,2)	<0,001	0,614
<b>ΔI<sub>sc</sub> Histamin (μA/cm<sup>2</sup>)</b>	36,6±36,2 21,1 (4,6; 122,7)	1,6±3,0 1,3 (-7,2; 11,7)	1,7±3,2 1,2 (-7,2; 11,7)	1,3±2,4 1,8 (-1,9; 5,0)	<0,001	0,726
<b>ΔI<sub>sc</sub> Forskolin/IBMX + Carbachol + Histamin (μA/cm<sup>2</sup>)</b>	89,2±59,5 64,2 (36,7; 228,0)	2,9±11,4 -0,1 (-19,4; 34,4)	1,3±10,5 -0,3 (-19,4; 34,4)	7,8±13,2 9,8 (-15,2; 28,9)	<0,001	0,135
<b>Genotypisierung</b>		dF508/dF508; dF508/3849+10kbC-T; dF508/G551D; dF508/R347P; dF508/R553X; 3849+10kbC-T/R668C; dF508/2789+5G>A; dF508/R1162X; dF508/W1282X; L732X/L732X; R347P/1078 del T; R553X/A455E	dF508/dF508; dF508/G551D; dF508/R1162X; dF508/R347P; dF508/R553X; dF508/W1282X; L732X/L732X	dF508/2789+5G>A; dF508/3849+10kbC-T; 3849+10kbC-T/R668C; R347P/1078 del T; R553X/A455E	<0,001	<0,001

**Tab. 4: Basic Characteristics sowie NPD- und ICM-Referenzwerte.**

Mittelwerte±Standardabweichungen sowie Mediane mit Minimum und Maximum unter Angabe der Signifikanz bezüglich der Gleichheit der Verteilungen in den Untergruppen CF und Non-CF bzw. PI-CF und PS-CF.

Legende: Wilschanski Score (162): Exponent des Verhältnisses Chloridfrei+Iso/Amilorid ( $e^{\text{Chloridfrei+Iso/Amilorid}}$ ); Sermet Score (169):  $-0,11*(\Delta\text{PD Chloridfrei+Iso}) - 0,05*(\Delta\text{PD Amilorid})$ .

### 3.1.2. Rolle des Alters bei der Klassifikation CF versus Non-CF und PI-CF versus PS-CF

Auf Grund der univariat signifikanten Altersunterschiede zwischen CF und Kontrollen (siehe 3.1.1.), sollte der Einfluss des Alters auf die Klassifikation (multivariat) weiter überprüft werden. Dazu verwendeten wir die logistische Regression von Firth. Die logistische Regression von Firth ist zu einem Standardansatz für die Analyse binärer Ergebnisse (z.B. CF vs. Non-CF oder PI-CF vs. PS-CF) mit kleinen Stichproben geworden. Wir untersuchen zunächst den Zusammenhang zwischen dem Alter und den einzelnen Biomarkern (ST, NPD- und ICM-Parameter) bezüglich der Gruppen CF und Non-CF. Das Alter war hierbei grösstenteils nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), mit Ausnahme des Alters im Zusammenhang mit dem NPD-Parameter  $\Delta PD$  Chloridfrei/Iso ( $p = 0,02$ ). Die moderaten Altersschwankungen zwischen den Gruppen hatten in unserer Studie auf die Klassifikation in CF und Non-CF im Wesentlichen keinen signifikanten Einfluss (vgl. Tab. 5.1).

Des Weiteren untersuchten wir die Rolle des Alters bei der Klassifikation zwischen PI-CF und PS-CF (die univariat schon nicht signifikant war) ebenfalls multivariat mit der logistischen Regression von Firth: das Alter war bezüglich der Einteilung in die Gruppen PI-CF und PS-CF im Gegensatz zu den CFTR-Biomarker ebenfalls nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Die einzige Ausnahme stellte hier der ICM-Parameter  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX dar, der mit  $p = 0,044$  gerade signifikant war. Das bedeutet, dass auch diese Klassifikation ganz überwiegend unabhängig von den leichten Altersunterschieden unserer Probanden war (vgl. Tab. 5.2).

Es konnte gezeigt werden, dass die vorliegenden Altersunterschiede (siehe 3.1.1.) zwischen den Gruppen im Wesentlichen keinen Einfluss auf die Klassifikation hatten, da das Alter neben den Biomarkern keine zusätzlichen Informationen zu den Gruppendifferenzierungen lieferte.

Firth logistic regression: CF vs. Non-CF	Biomarker	Signifikanz	Koeffizient	Std Fehler	95% Konfidenzintervall		Odds Ratio
					Untere Grenze	Obere Grenze	
Alter	Chloridgehalt im Schweiß (mmol/l)	0,969	0,00	0,05	-0,15	0,18	1,00
	Basal PD (mV)	0,881	-0,01	0,04	-0,09	0,06	0,99
	$\Delta$ PD Chloridfrei/Iso (mV)	0,020	-0,06	0,03	-0,12	-0,01	0,94
	Wilschanski Score	0,967	0,00	0,06	-0,24	0,12	1,00
	Sermet Score	0,465	-0,03	0,04	-0,11	0,04	0,97
	$\Delta I_{sc}$ Carbachol pre Washout ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	0,761	0,76	0,09	-0,47	0,27	2,14
	$\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	0,113	-0,09	0,06	-0,29	0,02	0,91
	$\Delta I_{sc}$ Carbachol ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	0,682	-0,03	0,07	-0,21	0,12	0,97
	$\Delta I_{sc}$ Histamin ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	0,937	0,00	0,04	-0,11	0,10	1,00
	$\Delta I_{sc}$ Forsk/IBMX+ CCH+Hista ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	0,845	0,02	0,06	-0,25	0,18	1,02

**Tab. 5.1: Die Rolle des Alters bei der Klassifikation von CF vs. Non-CF.**

Logistische Regression von Firth: Die Rolle des Alters (Signifikanz, Standardfehler und 95% Konfidenzintervall) bei der Klassifikation von Patienten in CF und Non-CF (abhängige Variable: CF vs. Non-CF; unabhängige Variable: Alter + Biomarker).

Firth logistic regression: PI-CF vs. PS-CF	Biomarker	Signifikanz	Koeffizient	Std Fehler	95% Konfidenzintervall		Odds Ratio
					Untere Grenze	Obere Grenze	
Alter	Chloridgehalt im Schweiß (mmol/l)	0,060	0,09	0,06	0,00	0,22	1,10
	Basal PD (mV)	0,123	0,06	0,04	-0,02	0,14	1,06
	$\Delta$ PD Chloridfrei/Iso (mV)	0,122	0,06	0,04	-0,02	0,15	1,06
	Wilschanski Score	0,144	0,06	0,04	-0,02	0,14	1,06
	Sermet Score	0,138	0,06	0,04	-0,02	0,14	1,06
	$\Delta I_{sc}$ Carbachol pre Washout ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	0,155	0,06	0,05	-0,02	0,16	1,06
	$\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	0,044	0,09	0,05	0,00	0,19	1,09
	$\Delta I_{sc}$ Carbachol ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	0,062	0,08	0,04	0,00	0,17	1,08
	$\Delta I_{sc}$ Histamin ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	0,089	0,07	0,04	-0,01	0,15	1,07
	$\Delta I_{sc}$ Forsk/IBMX+CCH+Hista ( $\mu$ A/cm <sup>2</sup> )	0,117	0,06	0,04	-0,02	0,15	1,06

**Tab. 5.2: Alter und CFTR-Biomarker bei der Klassifikation PI-CF vs. PS-CF.**

Logistische Regression von Firth: Die Rolle des Alters (Signifikanz, Standardfehler und 95% Konfidenzintervall) bei der Klassifikation von Patienten in PI-CS und PS-CF (abhängige Variable: PI-CF vs. PS-CF; unabhängige Variable: Alter + Biomarker).

### 3.1.3. Korrelationen von ST, NPD und ICM

Um einen Überblick über die Zusammenhänge der verschiedenen CFTR-Biomarker zu bekommen, wurden Korrelationen nach Spearman mit zweiseitiger Signifikanz der einzelnen Parameter berechnet sowie zweidimensionale und dreidimensionale Surface-Plots erstellt.

#### 3.1.3.1. Korrelationen nach Spearman

Die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman berechnet den **linearen Zusammenhang** jeweils zweier Parameter der drei CFTR-Biomarker. Der Korrelationskoeffizient  $r$  ist ein Mass für die Effektstärke. Die Werte eines Korrelationskoeffizienten  $r$  liegen zwischen -1 und 1. Ein Korrelationskoeffizient im Bereich zwischen 0,5 und 0,8 bzw. -0,5 und -0,8 entspricht einem moderaten positiven oder inversen Effekt. Werte über (unter) 0,8 (-0,8) weisen auf eine starke lineare Korrelation hin.

Die Korrelationen sind in Tabelle 6 aufgeführt. Der Chloridgehalt im Schweiß, der NPD - Wilschanski Score, der NPD - Sermet Score, der ICM - Derichs Score und ICM -  $\Delta I_{sc}$  Histamin korrelierten jeweils hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) mit allen übrigen Parametern. Die Effektstärken sind im Allgemeinen moderat bzw. schwach. Nur der NPD - Wilschanski Score korrelierte stark mit dem NPD Sermet Score bzw. mit NPD  $\Delta PD$  0Cl/Iso (Tabelle 6).

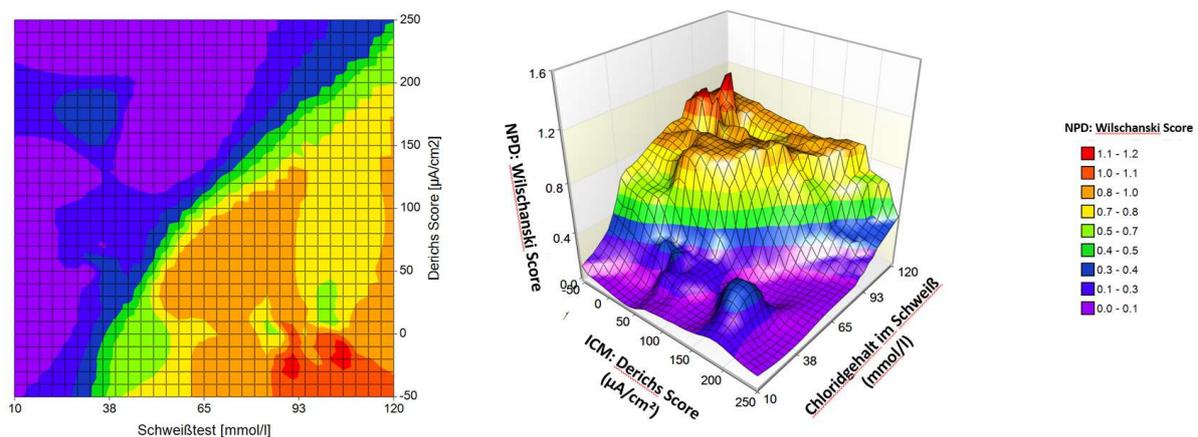
		ST	NPD PD basal	NPD $\Delta$ PD 0Cl/Iso	NPD Wilschanski Score	NPD Sermet Score	ICM $\Delta$ I <sub>sc</sub> Forsk/IBMX	ICM $\Delta$ I <sub>sc</sub> CCH	ICM $\Delta$ I <sub>sc</sub> Hista	ICM Derichs Score	ICM $\Delta$ I <sub>sc</sub> CCH pre Wash
Schweißchlorid Konzentration	Korrelation	1	-0,54	0,53	0,64	-0,60	-0,72	-0,70	-0,64	-0,76	-0,71
	Signifikanz		<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
NPD - PD basal	Korrelation	-0,54	1	-0,24	-0,60	-0,71	0,68	0,53	0,60	0,60	0,67
	Signifikanz	<0,001		0,1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
NPD - $\Delta$ PD Chloridfrei/Iso	Korrelation	0,53	-0,24	1	0,84	-0,78	-0,42	-0,45	-0,51	-0,51	-0,46
	Signifikanz	0,001	0,1		<0,001	<0,001	0,003	0,001	<0,001	<0,001	0,001
NPD - Wilschanski Score	Korrelation	0,64	-0,60	0,84	1	-0,90	-0,58	-0,60	-0,60	-0,65	-0,66
	Signifikanz	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
NPD - Sermet	Korrelation	-0,60	-0,71	-0,78	-0,90	1	0,63	0,59	0,65	0,64	0,67
	Signifikanz	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ICM - $\Delta$ I <sub>sc</sub> Forskolin/IBMX	Korrelation	-0,72	0,68	-0,42	-0,58	0,63	1	0,67	0,70	0,88	0,73
	Signifikanz	<0,001	<0,001	0,003	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ICM - $\Delta$ I <sub>sc</sub> Carbachol	Korrelation	-0,70	0,53	-0,45	-0,60	0,59	0,67	1	0,70	0,90	0,83
	Signifikanz	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001	<0,001
ICM - $\Delta$ I <sub>sc</sub> Histamin	Korrelation	-0,64	0,60	-0,51	-0,60	0,65	0,70	0,70	1	0,78	0,69
	Signifikanz	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001	<0,001
ICM - Derichs Score	Korrelation	-0,76	0,60	-0,51	-0,65	0,64	0,88	0,90	0,78	1	0,83
	Signifikanz	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001
ICM - $\Delta$ I <sub>sc</sub> Carbachol pre Washout	Korrelation	-0,71	0,67	-0,46	-0,66	0,67	0,73	0,83	0,69	0,83	1
	Signifikanz	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

**Tab. 6: Korrelationen von ST, NPD- und ICM-Parametern.**

Korrelationen nach Spearman. Korrelationen > 0,70 sind in der Tabelle blau markiert.

### 3.1.3.2. Zwei- und dreidimensionale Darstellung der Zusammenhänge von ST, Wilschanski Score (NPD) und Derichs Score (ICM)

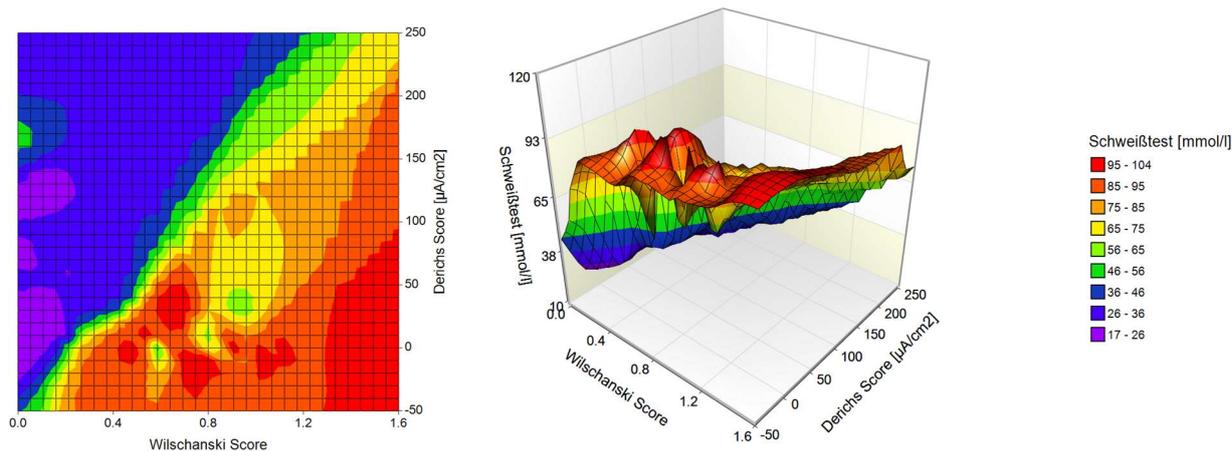
Wie wir in Abschnitt 3.1.3.1 gesehen haben, besteht im Allgemeinen nur ein moderater linearer Zusammenhang zwischen den Parametern. Die folgenden Berechnungen zeigen am Beispiel des funktionalen Zusammenhangs der Parameter der kombinierten CFTR-Funktion Wilschanski Score (NPD), Derichs Score (ICM) und ST, dass die Zusammenhänge zwischen diesen Parametern wesentlich komplexer sind. Zur Visualisierung der Zusammenhänge verwendeten wir „Heat Maps“ und „3-D Surface Plots“ (Abb. 11.1-11.3). Aus den Werten von jeweils 2 Parametern  $x$ ,  $y$  wird der Wert  $z$  des dritten Parameters als Funktionswert  $f(x, y) = z$  angegeben. Die Höhe des Wertes  $z$  wird ähnlich wie bei Landkarten farblich kodiert. Anhand dieser Graphiken sieht man sofort, dass die Zusammenhänge zwischen den Parametern nicht linear sein können. Damit erklären diese Heat Maps bzw. 3-D Surface Plots auch unsere Ergebnisse zu den Korrelationen nach Spearman (Abschnitt 3.1.3.1).



**Abb. 11.1: NPD - Wilschanski Score in Abhängigkeit vom ST (in mmol/l) und vom ICM - Derichs Score (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ).**

Darstellung als 2-D Heat Map (links) und 3-D Surface Plot (rechts).

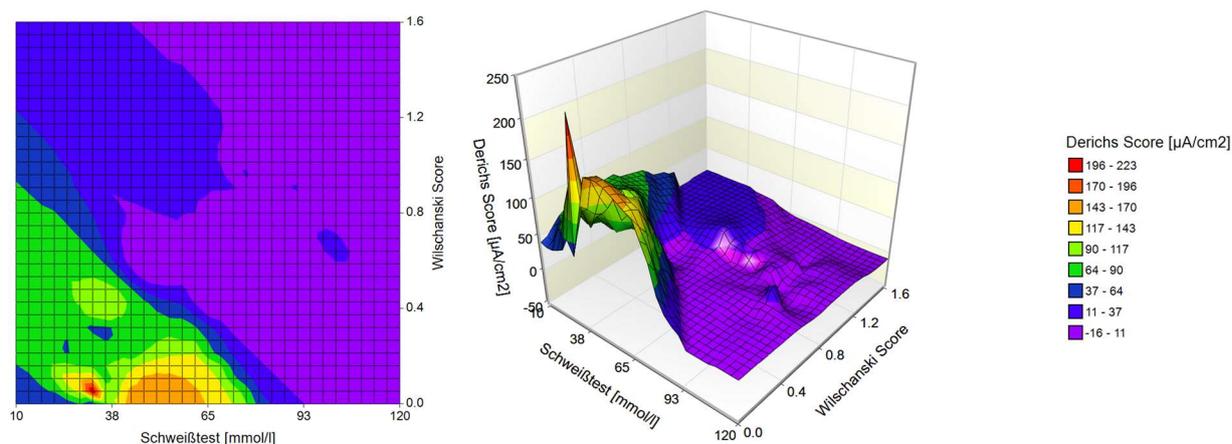
Aus dieser Heat Map bzw. diesem 3-D Surface Plot lassen sich einige interessante Ergebnisse ableiten. Ist z.B. der Chloridgehalt im Schweiß niedrig ( $< 35 \text{ mmol/l}$ ), dann ist der Wilschanski Score immer kleiner als 0,5 unabhängig vom Wert des Derichs Scores. Hohe Werte für den Wilschanski Score ( $> 0,7$ ) erhalten wir z.B., wenn der  $\text{ST} > 60 \text{ mmol/l}$  und der Derichs Score  $< 100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ist.



**Abb. 11.2: ST (in mmol/l) in Abhängigkeit vom NPD - Wilschanski Score und vom ICM - Derichs Score (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ).**

Darstellung als 2-D Heat Map (links) und 3-D Surface Plot (rechts).

In dieser Heat Map sehen wir z.B., dass bei hohem Wilschanski Score ( $> 1,2$ ) der ST ebenfalls hoch ist, unabhängig von den Werten des Derichs Scores.



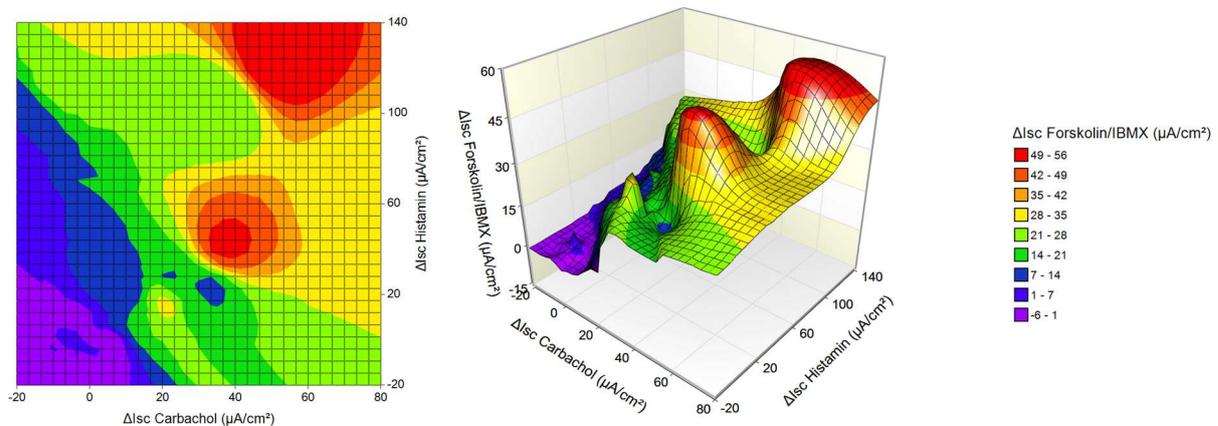
**Abb. 11.3: ICM - Derichs Score (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) in Abhängigkeit vom ST (in mmol/l) und vom NPD - Wilschanski Score.**

Darstellung als 2-D Heat Map (links) und 3-D Surface Plot (rechts).

Diese Heat Map liefert uns weitere interessante Aussagen: ist z.B. der Schweißtest hoch ( $> 80$  mmol/l), dann ist der Derichs Score niedrig, unabhängig vom Wert des Wilschanski Scores. Wenn umgekehrt der Wilschanski Score hoch ist ( $> 0,9$ ), dann ist der Derichs Score niedrig, unabhängig vom Schweißtest.

### 3.1.3.3. Zwei- und dreidimensionale Darstellung der Zusammenhänge der ICM-Antworten $\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX, $\Delta I_{sc}$ Carbachol und $\Delta I_{sc}$ Histamin

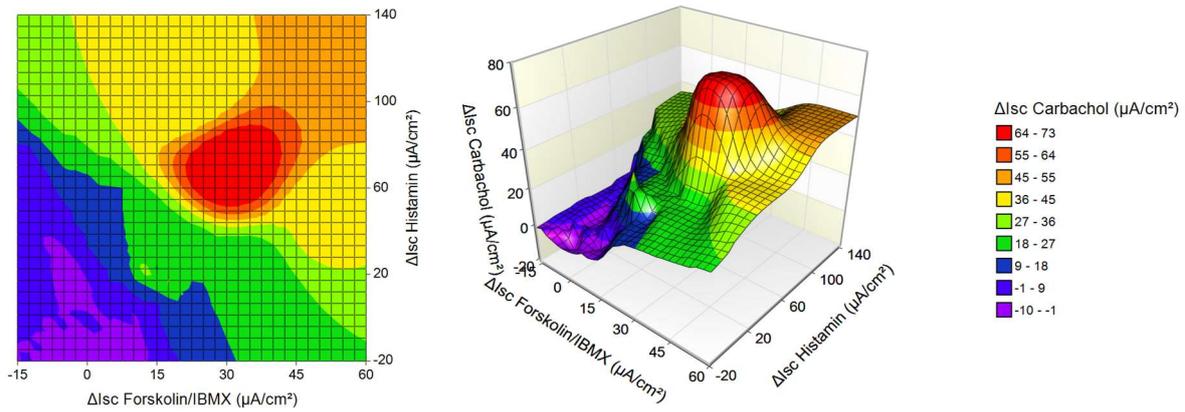
Als weiteres Beispiel der funktionalen Zusammenhänge zwischen den Parametern untersuchten wir die drei ICM-Parameter  $\Delta I_{sc}$  Forsk/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  CCH und  $\Delta I_{sc}$  Hista (Abb. 12.1-12.3). In Analogie zu den Ergebnissen in 3.1.3.2. zeigte sich wiederum, dass die Zusammenhänge zwischen diesen drei Parametern komplex sind. Wenn zum Beispiel der Wert eines Parameters hoch ist, dann sind die beiden anderen Parameter nicht unbedingt ebenfalls erhöht und umgekehrt.



**Abb. 12.1:**  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX ( $\mu A/cm^2$ ) in Abhängigkeit von  $\Delta I_{sc}$  Carbachol ( $\mu A/cm^2$ ) und  $\Delta I_{sc}$  Histamin ( $\mu A/cm^2$ ).

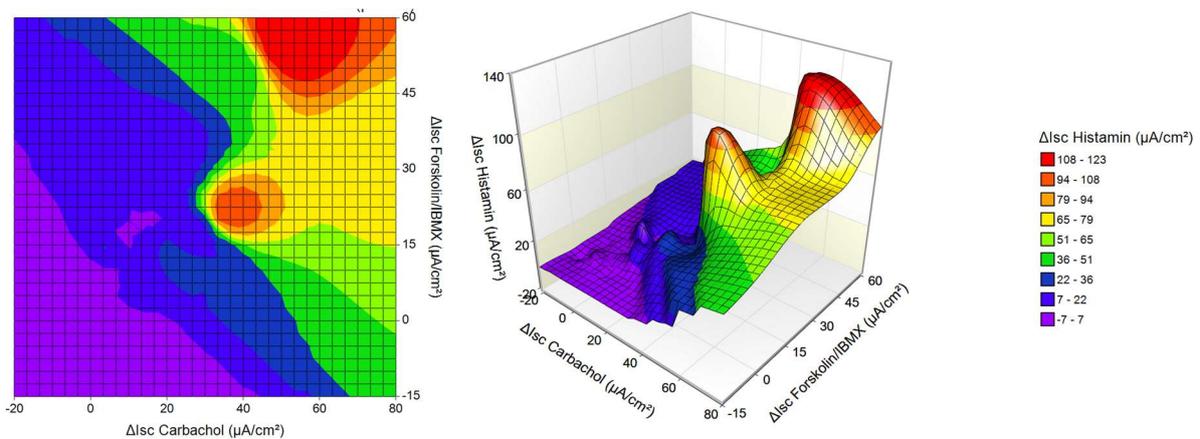
Darstellung als 2-D Heat Map (links) und 3-D Surface Plot (rechts).

Bei niedrigen Carbachol- und Histamin-Werten sind die Forskolin/IBMX-Antworten ebenfalls gering. Bei hohen Carbachol-Werten ( $> 40 \mu A/cm^2$ ) sind die Forskolin/IBMX-Antworten mittel bis hoch unabhängig von Histamin.



**Abb. 12.2:**  $\Delta I_{sc}$  Carbachol ( $\mu A/cm^2$ ) in Abhängigkeit von  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX ( $\mu A/cm^2$ ) und  $\Delta I_{sc}$  Histamin ( $\mu A/cm^2$ ).  
Darstellung als 2-D Heat Map (links) und 3-D Surface Plot (rechts).

Bei niedrigen Forskolin/IBMX- und Histamin-Werten ist die Carbachol-Antwort auch gering. Bei Forskolin-Werten  $> 30 \mu A/cm^2$  ist die Carbachol-Antwort abhängig von der Höhe von Histamin.



**Abb. 12.3:**  $\Delta I_{sc}$  Histamin ( $\mu A/cm^2$ ) in Abhängigkeit von  $\Delta I_{sc}$  Carbachol ( $\mu A/cm^2$ ) und  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX ( $\mu A/cm^2$ ).  
Darstellung als 2-D Heat Map (links) und 3-D Surface Plot (rechts).

Bei niedrigen Carbachol-Werten sind die Werte für Histamin unabhängig von Forskolin/IBMX auch niedrig. Bei hohen Carbachol-Antworten ist die Histamin-Antwort dagegen abhängig von den Forskolin/IBMX-Werten: wenn Forskolin/IBMX hoch ist, so ist Histamin auch hoch und umgekehrt.

### 3.1.4. Die Klassifikationsgenauigkeit der CFTR-Biomarker für CF versus Non-CF: Berechnung optimaler Cutoff-Werte

Zur Diskriminierung zwischen CF und Non-CF wurden zunächst für alle wichtigen Parameter der CFTR-Biomarker die Receiver-Operating-Characteristics (ROC) Kurven berechnet. Die Klassifikationsgenauigkeit wird durch die Area under the curve (AUC) bestimmt. AUC-Werte zwischen 0,8 und 0,9 liefern eine sehr gute Klassifikationsgenauigkeit. Zwischen 0,9 und 1 ist die Klassifikationsgenauigkeit exzellent (siehe Methodenteil 2.6.). Durch Genanalysen waren die Patienten vorab in die Gruppen PI-CF und PS-CF eingeteilt. Die AUC-Werte waren für alle Parameter exzellent ( $AUC > 0,95$ ) bis auf den NPD-Parameter  $\Delta PD$  Chloridfrei/Iso, der mit einem AUC-Wert von 0,84 sehr gut klassifizierte.

Mit der C-Statistik (AUC/ROC) und mit einem weiteren statistischen Verfahren (CART) wurden darüber hinaus Cutoff-Werte für die verschiedenen Parameter bestimmt. Es zeigten sich je nach verwendetem Verfahren leichte Abweichungen bei den Cutoff-Werten (Tab. 7). Bei unserer Patientengruppe trennten der ST nach den ROC-Analysen mit einem Cutoff-Wert, der NPD - Wilschanski Score, der ICM - Derichs Score und der ICM-Parameter  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100% zwischen CF und gesunden Kontrollen ( $AUC=1$ ).

Cutoff-Werte CF vs Non-CF	AUC	Signifikanz	95% Konfidenzintervall		Cutpoint (ROC)	Cutpoint (CART)	Cutpoint (published)
			Untergrenze	Obergrenze			
Schweißchloridkonzentration (mmol/l)	1,00	<0,001	1,00	1,00	46,5	47,8	60
NPD - PD basal (mV)	0,97	<0,001	0,93	1,00	-29,6	-21,2	
NPD - $\Delta PD$ Chloridfrei/Iso (mV)	0,84	<0,001	0,72	0,95	-7,4	-7,4	
NPD - Wilschanski Score	1,00	<0,001	1,00	1,00	0,5	0,4	0,7
NPD - Sermet Score	0,98	<0,001	0,88	1,00	0,46	0,32	0,27
ICM - $\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX ( $\mu A/cm^2$ )	0,98	<0,001	0,95	1,00	12,7	12,5	
ICM - $\Delta I_{sc}$ Carbachol ( $\mu A/cm^2$ )	0,99	<0,001	0,96	1,00	9,3	12,8	10
ICM - $\Delta I_{sc}$ Histamin ( $\mu A/cm^2$ )	0,99	<0,001	0,96	1,00	9,1	13,1	
ICM - Derichs Score ( $\mu A/cm^2$ )	1,00	<0,001	1,00	1,00	36,7	35,6	34,4
ICM - $\Delta I_{sc}$ Carbachol pre Washout ( $\mu A/cm^2$ )	1,00	<0,001	1,00	1,00	8,3	5	

**Tab. 7: Klassifikation in CF und Kontrollen mit ST, NPD und ICM.**

Area under the curve (AUC) von CFTR-Biomarkern mit Signifikanz, 95% Konfidenzintervall und Cutoff-Werten.

Zur Berechnung optimaler Cutoff-Werte am Beispiel der Chloridkonzentration im Schweiß zeigt Tabelle 8 für verschiedene Cutoff-Werte die zugehörige Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit. Der optimale Cutoff-Wert ist der Wert, für den die Genauigkeit maximal ist. Dieser Wert hat die höchste Sensitivität und Spezifität.

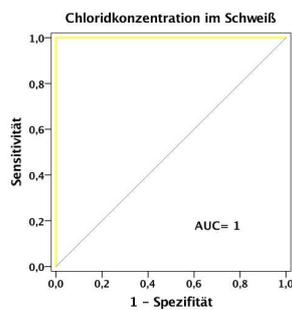
Cutoff-Wert	TP	FP	FN	TN	TPR	TNR	PPV	Genauigkeit	TPR + TNR
	A	B	C	D	(Sens.)	(Spez.)			
≤ 25,5	5	0	9	37	0,36	1,00	1,00	0,82	1,36
≤ 32,0	7	0	7	37	0,50	1,00	1,00	0,86	1,50
≤ 33,0	9	0	5	37	0,64	1,00	1,00	0,90	1,64
≤ 34,5	12	0	2	37	0,86	1,00	1,00	0,96	1,86
≤ 36,0	13	0	1	37	0,93	1,00	1,00	0,98	1,93
≤ 46,5	14	0	0	37	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00
≤ 49,0	14	1	0	36	1,00	0,97	0,93	0,98	1,97
≤ 60,0	14	2	0	35	1,00	0,95	0,88	0,96	1,95
≤ 62,0	14	3	0	34	1,00	0,92	0,82	0,94	1,92
≤ 67,5	14	4	0	33	1,00	0,89	0,78	0,92	1,89
≤ 70,0	14	6	0	31	1,00	0,84	0,70	0,88	1,84
≤ 72,0	14	7	0	30	1,00	0,81	0,67	0,86	1,81
≤ 73,5	14	8	0	29	1,00	0,78	0,64	0,84	1,78
≤ 79,0	14	9	0	28	1,00	0,76	0,61	0,82	1,76

**Tab. 8: Chloridkonzentration im Schweiß - Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit in Abhängigkeit verschiedener Cutoff-Werte.**

Legende: A (TP): Anzahl der richtig Positiven (CF). B (FP): Anzahl der falsch Positiven (als CF klassifiziert aber gesund). C (FN): Anzahl der falsch Negativen (als gesund klassifiziert aber CF). D (TN): Anzahl der richtig Negativen (Gesunde). TPR: Rate der richtig Positiven oder die Sensitivität =  $A / (A + C)$ . TNR: Rate der richtig Negativen oder die Spezifität =  $D / (B + D)$ . PPV: positiver prädiktiver Wert oder die Präzision =  $A / (A + B)$ . Genauigkeit: Anteil richtig klassifizierter Patienten =  $(A + D) / (A + B + C + D)$ . TPR + TNR: Summe aus Sensitivität und Spezifität.

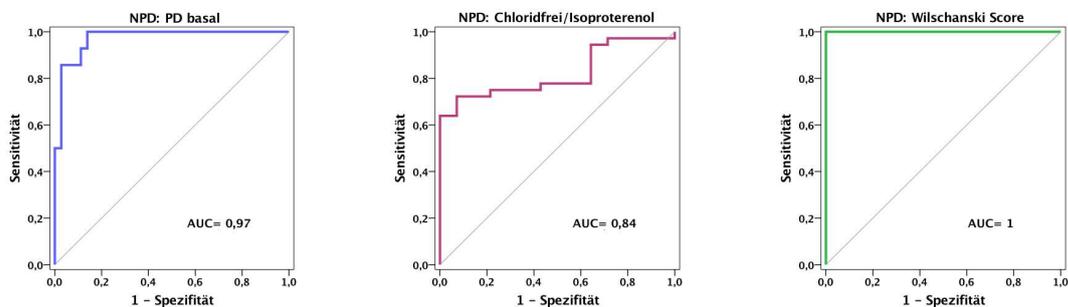
Bei den folgenden Receiver-Operation-Curve Analysen (Abb. 13.1-13.3) beschreibt die Sensitivität den Anteil der richtig positiv erkannten Patienten an allen Patienten mit CF, die

Spezifität den Anteil der richtig erkannten gesunden Kontrollen an allen Gesunden. 1-Spezifität ist der Anteil der falsch positiven Patienten d.h. der Patienten, die der Test als CF-Patienten charakterisiert, obwohl sie nicht CF sind. Für jeden Wert des Schweißtests als Cutoff-Wert erhält man ein Wertepaar (Sensitivität, 1-Spezifität). Die ROC-Kurve wird durch diese Wertepaare für alle möglichen Cutoff-Werte innerhalb des Messbereiches aufgetragen.



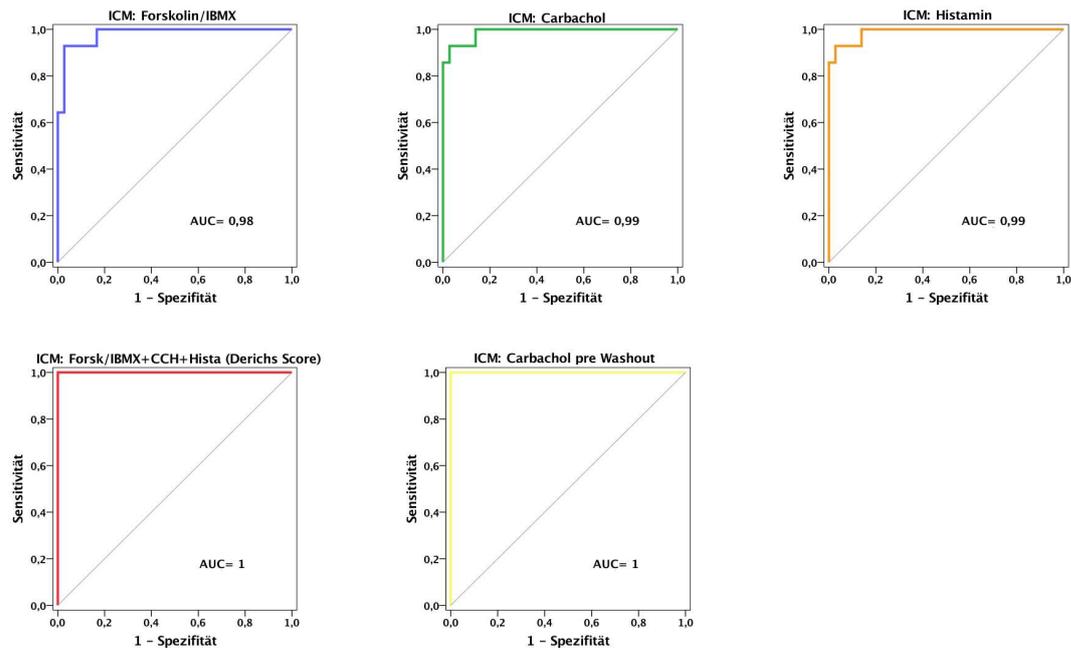
**Abb. 13.1: ROC-Analyse der Chloridkonzentration im Schweiß.**

Receiver-Operating-Characteristic Kurve des Schweißtests (gelb) zur Klassifikation zwischen CF und Non-CF. In diesem Fall ist die Area under the curve (AUC) 1, d.h. Sensitivität und Spezifität sind 100% oder alle CF-Patienten und alle Kontrollen wurden durch den Schweißtest richtig klassifiziert.



**Abb. 13.2: ROC-Analysen der NPD-Parameter.**

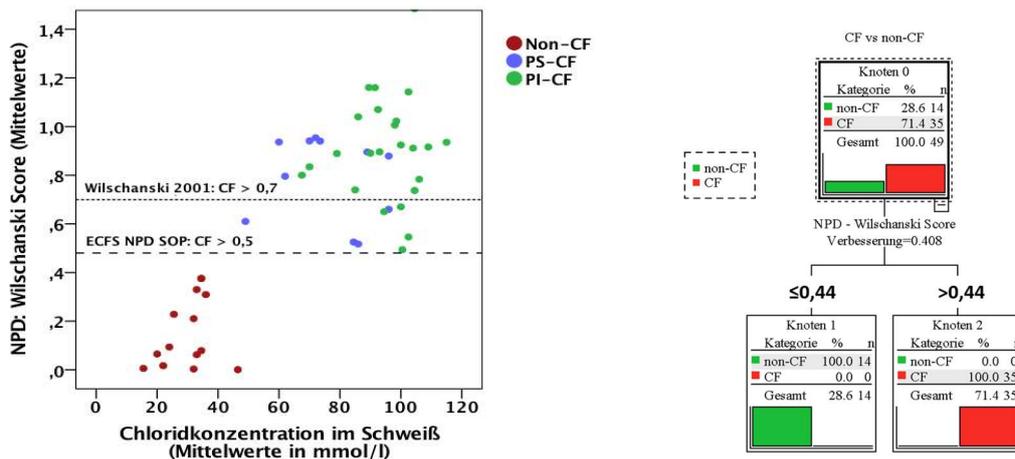
Receiver-Operating-Characteristic Kurven von PD basal (blau),  $\Delta$ PD Chloridfrei/Isoproterenol (pink) und Wilschanski Score (grün).



**Abb 13.3: ROC-Analysen der ICM-Parameter.**

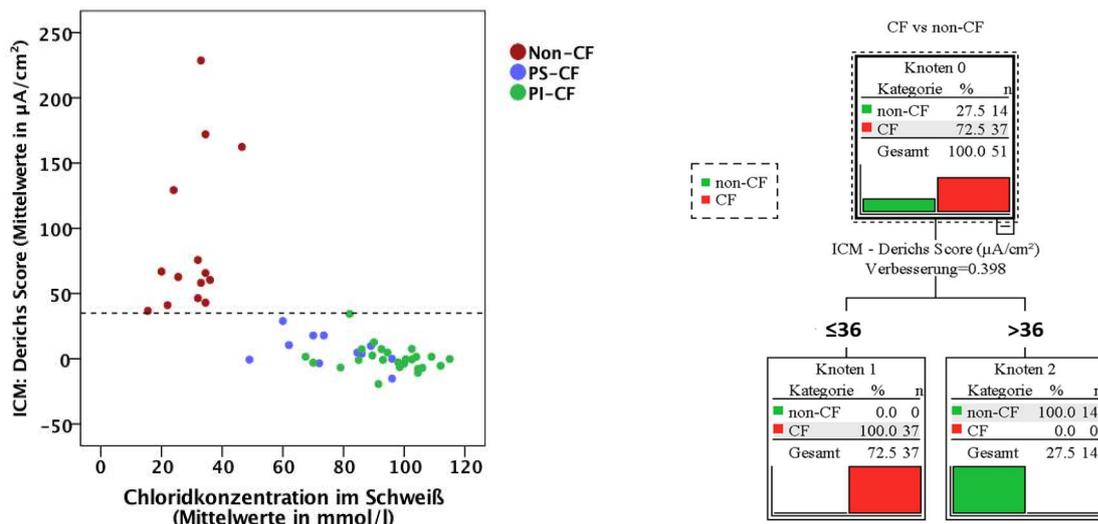
Receiver-Operating-Characteristic Kurven von  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX (blau),  $\Delta I_{sc}$  Carbachol (grün),  $\Delta I_{sc}$  Histamin (orange), Derichs Score ( $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin: rot) und  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout (gelb). Die Area under the curve (AUC) war bei allen  $> 0,95$ .

Im Folgenden sind ausgewählte Cutoff-Werte graphisch dargestellt und Entscheidungsbäume unter Anwendung des statistischen Verfahrens CART aufgeführt (Abb. 14.1-14.3).



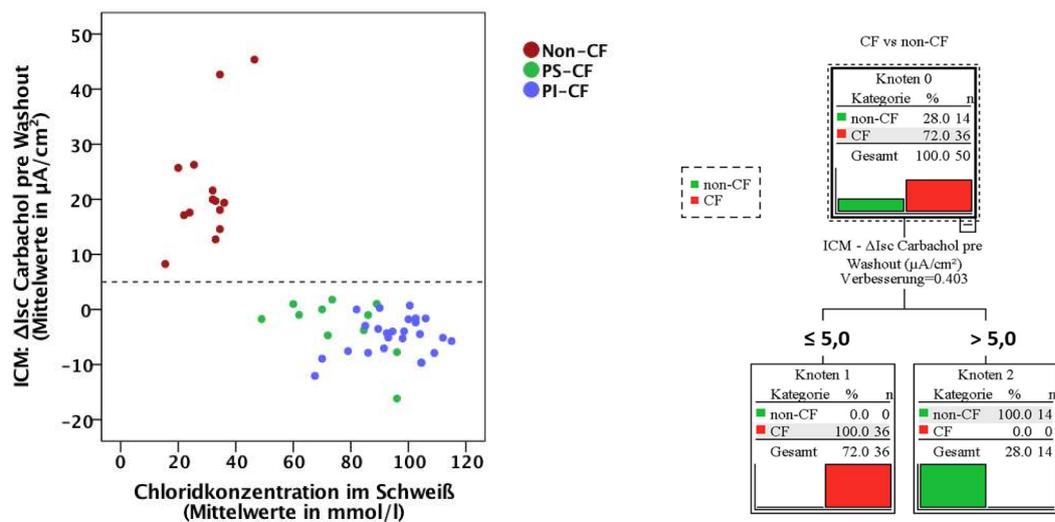
**Abb. 14.1: Klassifikation in CF und Non-CF mit NPD - Wilschanski Score.**

A) Mittelwerte für Wilschanski Score und Chloridkonzentration im Schweiß (in mmol/l) für die Gruppen PI-CF, PS-CF und Non-CF. B) Entscheidungsbaum (CART) für den Wilschanski Score. Legende: fein gestrichelte Linie: Alter Cutoff-Wert des Wilschanski Index aus 2001 bei 0,7 (162); grob gestrichelte Linie: neuer Cutoff-Wert des Wilschanski Scores unter Anwendung des ECFS NPD SOPs: CF  $> 0,5$  (174).



**Abb. 14.2: Klassifikation in CF und Non-CF mit ICM - Derichs Score.**

A) Derichs Score (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) und Chloridkonzentration im Schweiß (in mmol/l) für die Gruppen PI-CF, PS-CF und Non-CF. B) Entscheidungsbaum (CART) für den Derichs Score. Legende: gestrichelte Linie: Cutoff-Wert des Derichs Scores: CF  $< 34,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .



**Abb. 14.3: Klassifikation in CF und Non-CF mit ICM-Parameter Carbachol pre Washout.**

A) Carbachol pre Washout (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) und Chloridkonzentration im Schweiß (in mmol/l) für die Gruppen PI-CF, PS-CF und Non-CF. B) Entscheidungsbaum (CART) für Carbachol pre Washout.

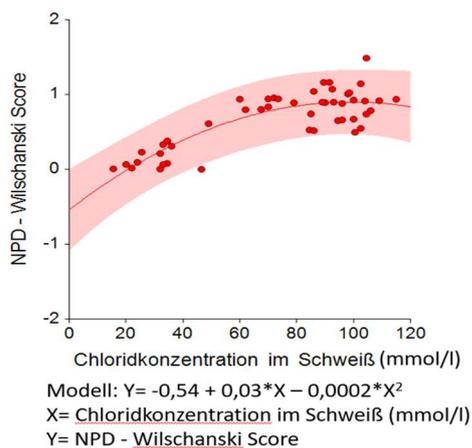
Legende: gestrichelte Linie: Cutoff-Werte von Carbachol pre Washout zwischen CF und Non-CF, CF  $< 5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

### Zusammenfassung Klassifikation CF versus Non-CF

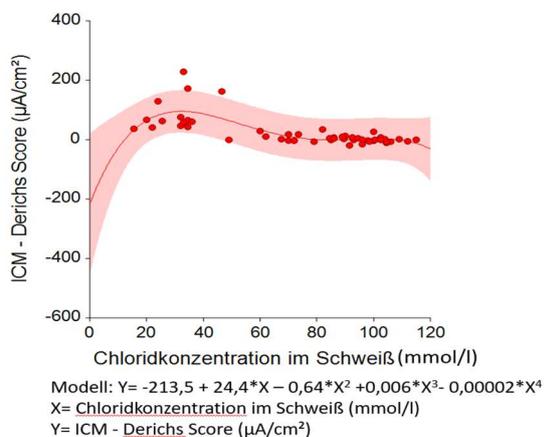
Alle untersuchten CFTR Biomarker bis auf den NPD-Marker  $\Delta\text{PD}$  Chloridfrei/Iso sind hervorragend geeignet, zwischen CF und Non-CF zu unterscheiden.

### 3.1.5. Funktionaler Zusammenhang zwischen verschiedenen Biomarkern

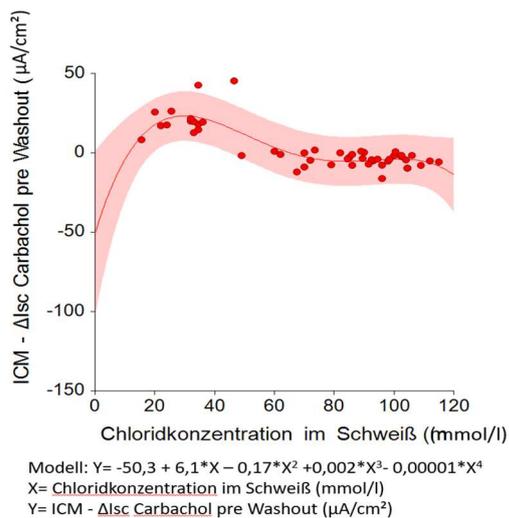
Da die Biomarker mit  $AUC > 0,9$  eine exzellente Klassifikation zwischen CF und Non-CF liefern, stellt sich die Frage, ob es darüber hinaus einen direkten funktionalen Zusammenhang zwischen diesen Markern gibt. D.h. lassen sich die Biomarker aus jedem beliebigen als Referenz vorgegebenen Marker ableiten? Im Folgenden wurde exemplarisch an ST, Wilschanski Score, Derichs Score und Carbachol pre Washout der funktionale Zusammenhang untersucht (Abb. 15.1-15.4): alle angegebenen Biomarker können aus dem ST durch ein Polynom vom Grade  $\leq 4$  berechnet werden. Die entsprechenden Funktionen sind mit 95% Konfidenzintervall angegeben. Der Informationsgehalt von jedem dieser drei Parameter lässt sich also jeweils auch aus den beiden anderen ableiten. Die Zusammenhänge zwischen den Parametern über Polynome vom Grade  $\leq 4$  veranschaulichen, dass es sich hierbei um nicht-lineare, sondern um komplexe Zusammenhänge handelt.



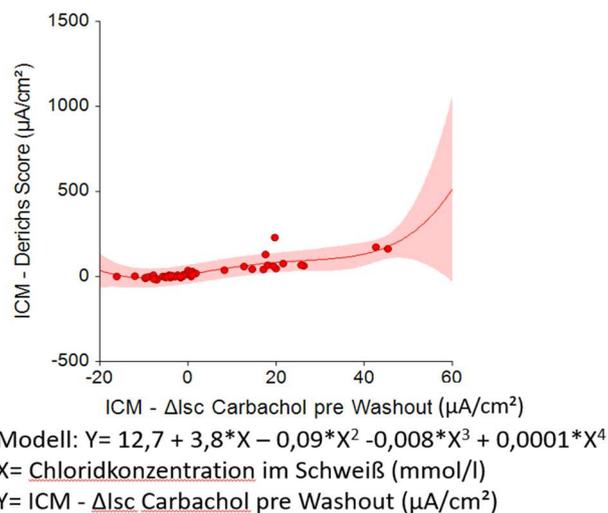
**Abb. 15.1: Berechnung des Wilschanski Scores aus dem Schweißtest.**



**Abb. 15.2: Berechnung des Derichs Scores aus dem Schweißtest.**



**Abb. 15.3: Berechnung von  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout aus dem Schweißtest.**



**Abb. 15.4: Berechnung des Derichs Scores aus  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout.**

### 3.1.6. Multivariate Analyse

Unter Einbezug aller NPD- und ICM-Parameter neben dem ST wurden zusätzlich verschiedene multivariate Modelle berechnet, obwohl bereits univariat die meisten der hier behandelten Biomarker eine 100%-ige Klassifikationsgenauigkeit hatten. In Abhängigkeit der Verfahren erhielten wir Modelle mit unterschiedlichen Biomarkern als Eingangsvariable. Diese Modelle lieferten ebenfalls 100%-ige Klassifikationsgenauigkeiten. Die Anwendung der Modelle ist also vergleichbar mit den Einzelparametern bezüglich der Klassifikationsgenauigkeit, aber mit zusätzlichem Aufwand verbunden.

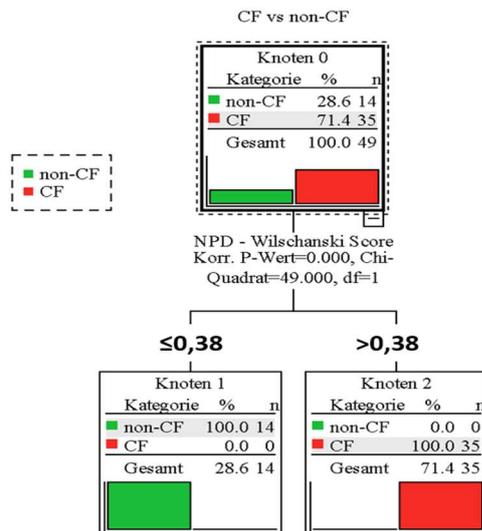
- **Logistische Regression**

Ein logistisches Regressionsmodell  $L_{sc}$  enthält als Eingangsvariable den Chloridgehalt im Schweiß (ST) und ICM -  $\Delta I_{sc}$  Carbachol (CCH) mit einer Klassifikationsgenauigkeit von 100%. Alle anderen Biomarker fallen aus dem Modell heraus. Als Regressionsgleichung ( $L_{sc}$ ) erhalten wir:

Regressionsgleichung  $L_{sc} = -58,31 + 1,46 * ST - 1,50 * CCH$  (Signifikanz  $p < 0,001$ ).

- **Exhaustive CHAID (Chi-squared Automatic Interaction Detector)**

Das Entscheidungsbaumverfahren exhaustive CHAID liefert als wichtigsten Parameter den Wilschanski Score. Da dieser bereits CF vs. Non-CF zu 100% richtig klassifiziert, verzweigt der Baum in keine weiteren Biomarker.



**Abb. 16.1: Entscheidungsbaum exhaustive CHAID unter Einschluss aller Biomarker.**

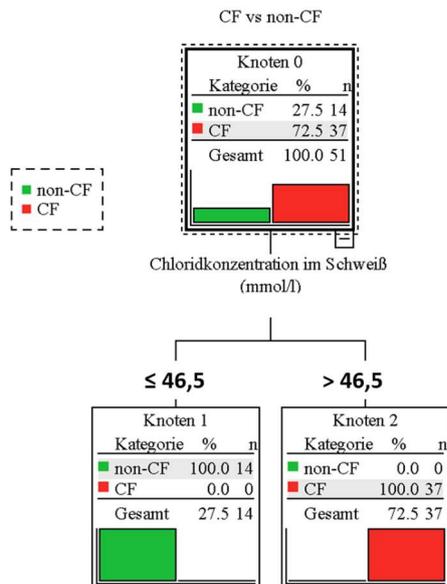
Der Cutoff-Wert für Non-CF vs. CF des Wilschanski Scores beträgt 0,38.

Die Trennung in CF und Non-CF durch den Cutoff-Wert des Wilschanski Scores (NPD) von 0,38 ist hochsignifikant ( $p < 0,001$  mit Bonferroni-Korrektur).

- **Entscheidungsbaumverfahren C5.0**

Der Algorithmus C5.0 misst die Wichtigkeit von Parametern für eine Zielgröße über die Minimierung der Entropie.

C5.0 liefert die Chloridkonzentration im Schweiß als wichtigsten Parameter mit dem Cutoff-Wert 46,5 mmol/l. Da die Chloridkonzentration im Schweiß bereits CF und Non-CF zu 100% richtig klassifiziert, wird der Entscheidungsbaum nicht weiter differenziert.



**Abb. 16.2: Entscheidungsbaum C5.0 unter Einschluss aller Biomarker.**  
Der Cutoff-Wert für Non-CF vs. CF des Schweißtests beträgt 46,5 mmol/l.

- **Anmerkung zum Derichs Score**

Als nächstes untersuchten wir, ob bei unserem Datensatz der Derichs Score als Summe der ICM-Parameter  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  Carbachol und  $\Delta I_{sc}$  Histamin nicht bereits durch einen der Summanden beschrieben werden kann. Obwohl univariat die Einzelparameter  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  Carbachol und  $\Delta I_{sc}$  Histamin ebenso wie der Derichs Score CF vs. Non-CF exzellent klassifizierten, lieferten die multivariaten Verfahren CART, exhaustive CHAID und C5.0 unter Einbeziehung der Summe und der Einzelparameter den Derichs Score als wichtigsten Parameter. Da der Derichs Score bei unserem Datensatz zu 100% richtig klassifizierte, gibt es keine weiteren Verzweigungen der entsprechenden Klassifikationsbäume.

Nimmt man dagegen die logistische Regression, dann fallen der Derichs Score und  $\Delta I_{sc}$  Carbachol heraus. Als Regressionsgleichung erhalten wir:

Regressionsgleichung  $L_{sc} = 268,8 - 11,3 * \text{Forsk} - 10,0 * \text{Hista}$  (Signifikanz  $p < 0,001$ ).

## 3.2. Klassifikationsgenauigkeit für PI-CF versus PS-CF auf der Basis der CFTR-Biomarker ST, NPD und ICM (Studiendaten aus Berlin)

### 3.2.1. Berechnung bestmöglicher Cutoff-Werte

Die CFTR-Biomarker NPD und ICM konnten zwar exzellent zwischen gesunden Kontrollen und CF unterscheiden, jedoch waren sie bei unserer Patientenkohorte weniger gut dazu geeignet, um zwischen den beiden Gruppen innerhalb der CF-Patienten zu unterscheiden.

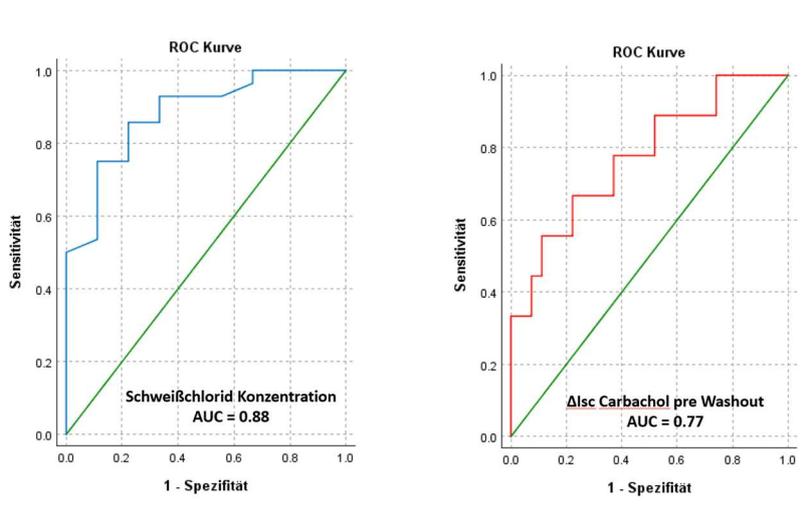
Die AUC der Biomarker PD basal,  $\Delta$ PD Chloridfrei/Iso, Wilschanski Score, Sermet Score,  $\Delta I_{sc}$  Carbachol,  $\Delta I_{sc}$  Histamin und der Derichs Score unterschieden sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) von  $AUC = 0,5$  (Würfeln). Dies entspricht der Fläche der Diagonalen in den ROC-Abbildungen. Nur die Marker ST,  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX und  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout waren signifikant besser ( $p < 0,05$ ) (vgl. Tab. 9).

Die AUC des STs war sehr gut mit 0,88 ( $p < 0,001$ ). Der Cutoff zwischen PS-CF und PI-CF (Ergebnis der Receiver Operating Curves Analyse) lag für den ST bei 89,3 mmol/l (ROC). Die ICM-Parameter  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout hatten mit 0,77 ( $p = 0,003$ ) und  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX mit 0,73 ( $p = 0,049$ ) gute AUC-Werte.

	AUC	Signifikanz	95% Konfidenzintervall		Cutpoint (ROC)	Cutpoint (CART / exhausted Chaid)
			Untergrenze	Obergrenze		
Schweißchlorid Konzentration (mmol/l)	0,88	<0,001	0,76	1,00	89,3	89,0
NPD - PD basal (mV)	0,64	0,223	0,41	0,87	-41,8	-43,0
NPD - $\Delta$ PD Chloridfrei/Iso (mV)	0,58	0,454	0,38	0,78	-0,8	-0,8
NPD - Wilschanski Score	0,53	0,777	0,32	0,74	1,0	1,0
NPD - Sermet Score	0,56	0,570	0,35	0,77	-2,0	-2,0
ICM - $\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX ( $\mu A/cm^2$ )	0,73	0,049	0,50	0,96	5,6	5,6
ICM - $\Delta I_{sc}$ Carbachol ( $\mu A/cm^2$ )	0,56	0,663	0,29	0,83	4,4	4,4
ICM - $\Delta I_{sc}$ Histamin ( $\mu A/cm^2$ )	0,53	0,826	0,29	0,77	-0,4	-0,4
ICM - Derichs Score ( $\mu A/cm^2$ )	0,68	0,126	0,45	0,91	8,7	8,7
ICM - $\Delta I_{sc}$ Carbachol pre Washout ( $\mu A/cm^2$ )	0,77	0,003	0,59	0,96	-1,0	0,7

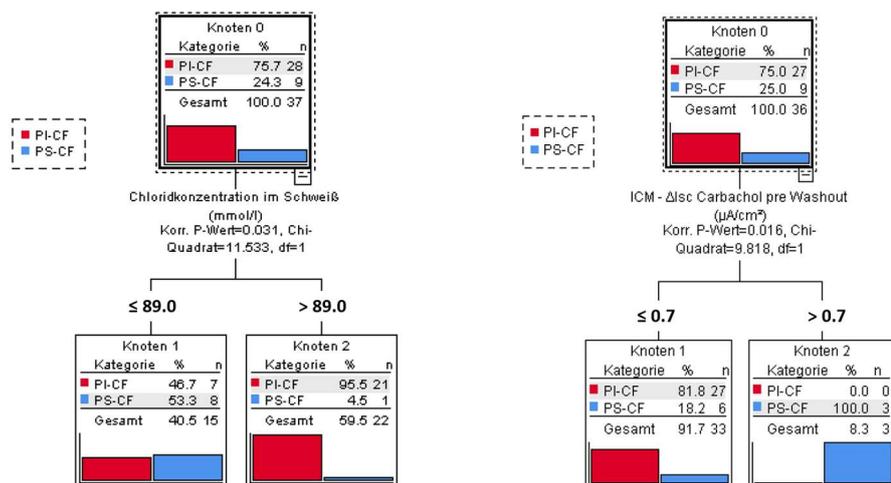
**Tab. 9: Klassifikation in PI-CF und PS-CF mit ST, NPD und ICM.**

Area under the curve (AUC) der CFTR-Biomarker mit Signifikanz, 95% Konfidenzintervall und Cutoff-Werten. Zur Berechnung der Cutoff-Werte wurden verschiedene Verfahren verwendet: ROC und Entscheidungsbäume (CART/ exhaustive CHAID).



**Abb. 17.1: ROC-Kurven-Analysen zur Klassifikation in PI-CF und PS-CF.**

Receiver-Operating-Characteristic(ROC)-Kurven der Schweißchlorid-Konzentration (blau) und  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout (rot) jeweils unter Angabe der Area under the curve (AUC).



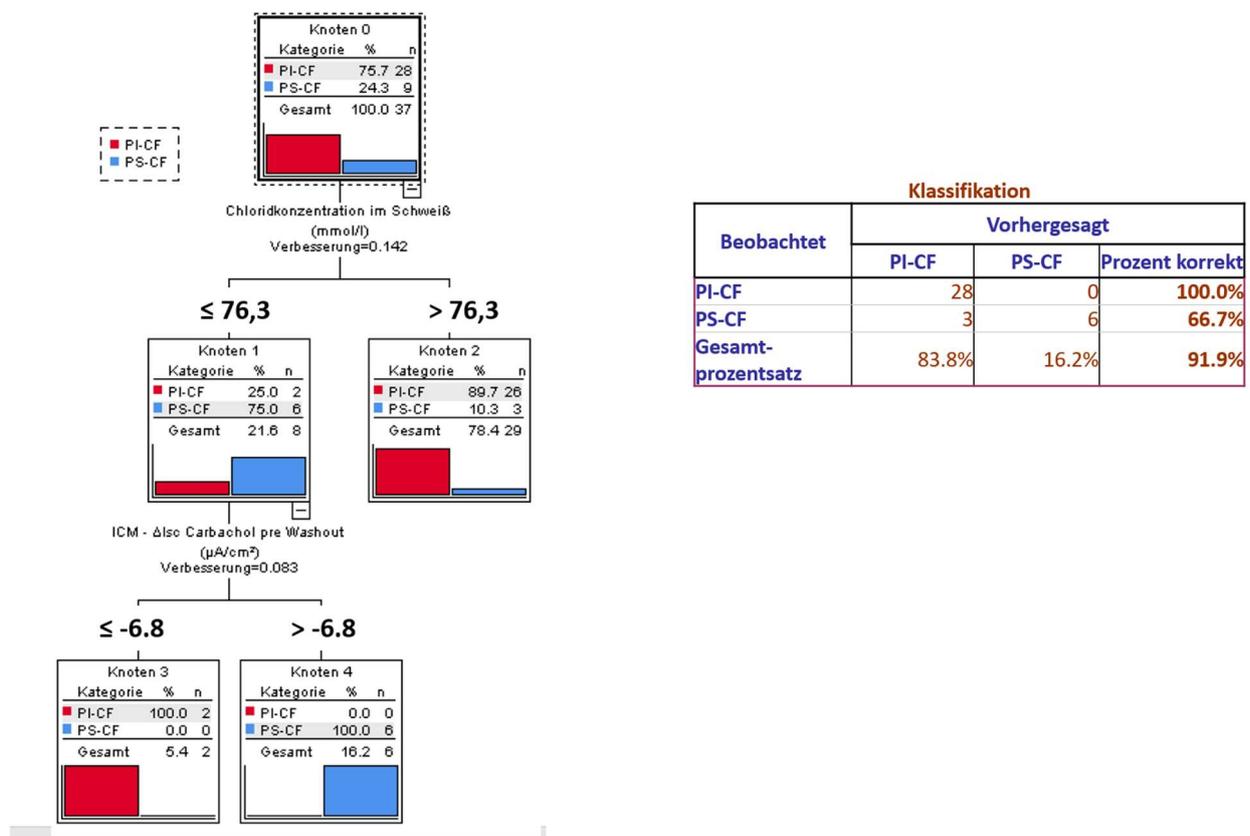
**Abb. 17.2: Entscheidungsbaum (exhaustive CHAID) zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF.** Cutoff-Werte für die Schweißchlorid-Konzentration (in mmol/l) und  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout (in  $\mu A/cm^2$ ).

Der Entscheidungsbaum für die Schweißchlorid-Konzentration zeigt, dass bei Werten über 89 mmol/l 95,5% der CF-Patienten PI-CF sind.

### 3.2.2. Multivariate Analyse

Als Ergebnis des vorangegangenen Abschnitts ist der ST zunächst formal das beste Verfahren zur Klassifikation von PI-CF versus PS-CF. Als nächstes stellt sich die Frage, ob die Klassifikationsgenauigkeit des STs durch die Hinzunahme weiterer CFTR-Biomarker verbessert werden kann. Hierzu berechneten wir folgende Modelle unter Einbeziehung aller Biomarker: CART-Modell, logistisches Regressionsmodell sowie ein Multilayer Perceptron Netz (MLP-Netz) (siehe Methodenteil 2.6.4.).

- CART**



**Abb. 18: Entscheidungsbaum (CART) zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF unter Einbeziehung aller Biomarker.**

Unter Einbeziehung aller Biomarker liefert CART einen Entscheidungsbaum, der nur noch die Parameter ST und  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout mit einer Klassifikationsgenauigkeit von 91,9% enthält. Die Klassifikationsgenauigkeit für PI-CF beträgt 100,0%, für PS-CF 66,7%.

- **Logistische Regression**

In einer logistischen Regression (Methode forward stepwise (likelihood)) mit allen Biomarkern zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF enthält die Regressionsgleichung die Chloridkonzentration im Schweiß ( $p=0,015$ ) und mit Borderline Signifikanz den ICM-Parameter  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout ( $0,056$ ) (Regressionsgleichung  $L_{sc} = -12,10 + 0,14 \cdot \text{Chloridkonzentration im Schweiß} - 0,33 \cdot \Delta I_{sc} \text{ Carbachol pre Washout}$ ). Alle anderen Biomarker sind nicht in dem Modell enthalten. Die Klassifikationsgenauigkeit beträgt 91,2%. Die Klassifikationsgenauigkeit ist für PI-CF 100% und für PS-CF 66,7% (vgl. Tab. 10).

Klassifikation			
Beobachtet	Vorhergesagt		
	PS-CF	PI-CF	Prozent korrekt
PI-CF	0	25	100%
PS-CF	6	3	66.7%
Gesamtprozensatz			91.2%

**Tab. 10: Klassifikationsgenauigkeit eines logistischen Regressionsmodells zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF.**

Regressionsgleichung  $L_{sc} = -12,10 + 0,14 \cdot \text{Chloridkonzentration im Schweiß} - 0,33 \cdot \Delta I_{sc} \text{ Carbachol pre Washout (ICM)}$ .

Mit den beiden Verfahren logistische Regression und CART auf der Basis aller Biomarker konnten wir mit 91,2% bzw. 91,9% eine gute aber keine eindeutige Klassifikation zwischen PI-CF und PS-CF erreichen. Die Klassifikationsgenauigkeit der beiden Verfahren unterscheidet sich nur um 0,7%. Damit stellt sich natürlich sofort die Frage, ob es ein für die Klassifikation besser geeignetes Verfahren gibt oder mit anderen Worten: gibt es eine Funktionsapproximation zwischen den Biomarkern als Eingangsparameter und den zwei Gruppen PI-CF und PS-CF als Ausgabegröße, die hochgenau die beiden Gruppen unterscheiden kann? Hierzu verwendeten wir im Folgenden zur Funktionsapproximation ein Multilayer Perceptron Netzwerk (MLP-Netz).

- **Multilayer Perceptron Netzwerk (MLP-Netz)**

Im Folgenden verwenden wir ein Multilayer Perceptron Netzwerk mit ein bzw. zwei Hidden Layers. MLP-Netze gehören zur Klasse der „Neuronalen Netze“ (siehe Kapitel 2.6.4.).

Im ersten Schritt nehmen wir die Ergebnisse aus dem vorhergehenden Abschnitt und verwenden die Chloridkonzentration im Schweiß und den ICM-Parameter  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout als Eingabe. Die Klassifikationsgenauigkeit beträgt 97,2% (Tab. 11.1).

<b>Klassifikation</b>			
<b>Beobachtet</b>	<b>Vorhergesagt</b>		
	<b>PI-CF</b>	<b>PS-CF</b>	<b>Prozent korrekt</b>
<b>PI-CF</b>	27	0	<b>100.0%</b>
<b>PS-CF</b>	1	8	<b>97.2%</b>
<b>Gesamt- prozentsatz</b>	77.8%	22.2%	<b>97.2%</b>

**Tab. 11.1: Klassifikationsgenauigkeit eines Mulilayer Perceptron Netzes mit Chloridkonzentration im Schweiß und  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout (ICM) zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF.**

Die Area under the Curve (AUC) beträgt 0,984. Die normalisierte Wichtigkeit der beiden Parameter ist für die Chloridkonzentration im Schweiß 100% und für  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout (ICM) 93,3%.

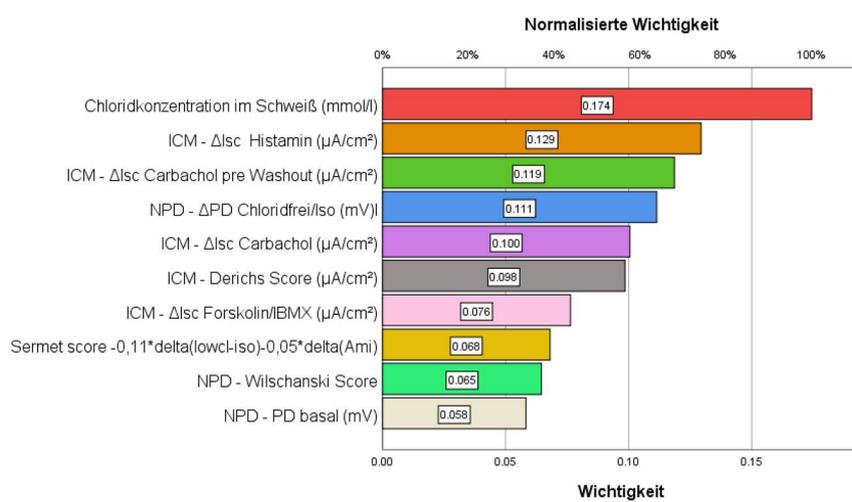
Ein MLP-Netz bereits mit einem Hidden Layer und allen Biomarkern liefert mit dem vorliegenden Datensatz eine Gesamtklassifikationsgenauigkeit von 100% (Tab. 11.2). Die Area under the curve (AUC) beträgt für die unterliegende Funktion 1,0. Damit lässt sich mit MLPs eindeutig zwischen PI-CF und PS-CF trennen.

<b>Klassifikation</b>			
<b>Beobachtet</b>	<b>Vorhergesagt</b>		
	<b>PI-CF</b>	<b>PS-CF</b>	<b>Prozent korrekt</b>
<b>PI-CF</b>	25	0	<b>100.0%</b>
<b>PS-CF</b>	0	9	<b>100.0%</b>
<b>Gesamt- prozentsatz</b>	73.5%	26.5%	<b>100.0%</b>

**Tab. 11.2: Klassifikationsgenauigkeit eines Mulilayer Perceptron Netzes mit allen Biomarkern zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF.**

Die (normalisierte) Wichtigkeit der einzelnen Biomarker in diesem Mulilayer Perceptron Netz kann der folgenden Abbildung 19 entnommen werden. Der wichtigste Parameter ist der ST, gefolgt von  $\Delta I_{sc}$  Histamin (ICM) und  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout (ICM).

An dieser Fragestellung zeigt sich sehr gut, welchen Einfluss die Wahl der mathematischen Modelle auf die Genauigkeit der Ergebnisse hat.



**Abb. 19: Normalisierte Wichtigkeit der einzelnen Biomarker in einem Multilayer Perceptron Netz zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF.**

### 3.3. Selbstorganisierende Karten zur Klassifikation der Probanden in natürliche Gruppen auf Basis eines Ähnlichkeitsmaßes

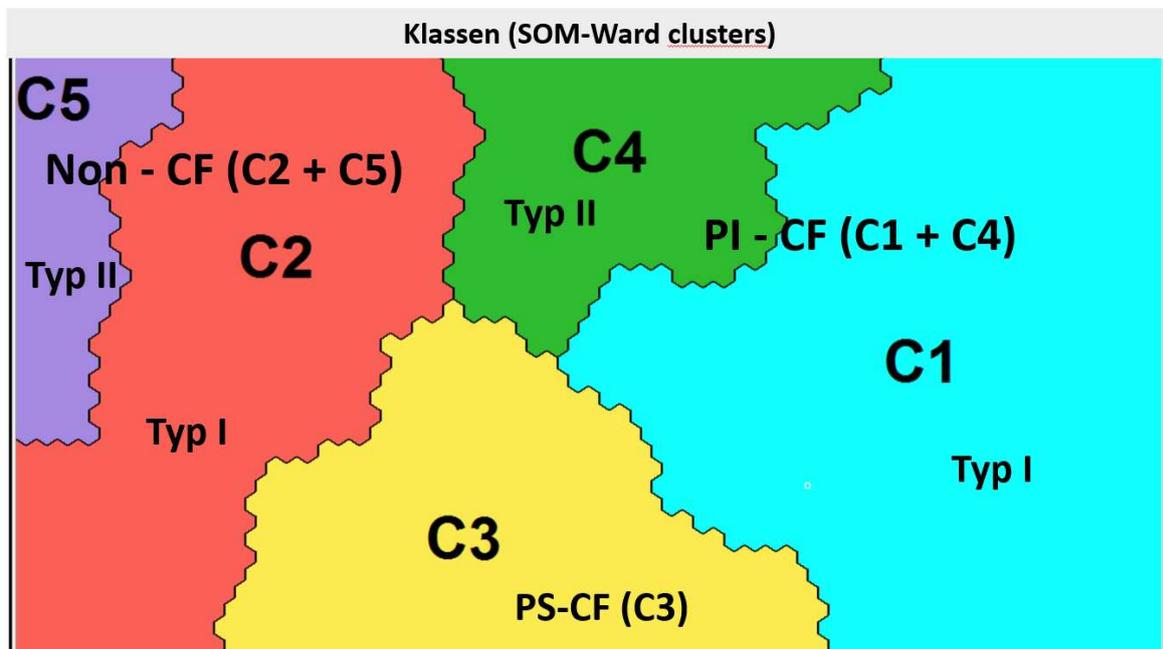
Im Folgenden verwendeten wir selbstorganisierende Karten (selforganizing maps: SOMs) zur Modellbildung. SOMs werden in der Medizin verwendet zur Diagnostik und zur Vorhersage des Ansprechens von Therapien oder zur Unterteilung der Patienten in homogene Klassen (Cluster) bezüglich aller eingehenden Biomarker. Patienten in der gleichen Klasse sind ähnlich und in verschiedenen Klassen unähnlich. In der Praxis hat sich in vielen Fällen herausgestellt, dass auch die klinischen Verläufe von Patienten in der gleichen Klasse jeweils ähnlich sind (ähnliche Patienten verhalten sich auch ähnlich). Zusätzlich werden SOMs zur Visualisierung komplexer Zusammenhänge und zur Datenexploration verwendet.

Formal sind SOMs spezielle Typen von künstlichen neuronalen Netzen mit einem autonomen Lernverfahren mit dem Ziel einer topologieerhaltenden (=nachbarschaftserhaltenden) Darstellung der Patientendaten und der Erkennung von (bisher unbekannt) Zusammenhängen (Mustern). Die hier verwendeten SOMs sind die Kohonen-Netze nach Teuvo Kohonen. Der Lernalgorithmus erzeugt Klassifikatoren, nach denen die Patienten autonom in optimale Klassen eingeteilt werden.

Wichtig zur Interpretation der SOMs ist zu erwähnen, dass jeder Punkt in einer SOM-Karte einen Patienten repräsentiert. Ein Patient ist in den verschiedenen SOM-Karten jeweils an der gleichen Stelle. Die Farbkodierung in den SOM-Karten gibt den betreffenden Wert eines Biomarkers für die Patienten wieder.

Mit Hilfe der SOM-Karten konnten die Patientendaten auf der Basis aller Biomarker (einschließlich des STs) in fünf Cluster eingeteilt werden (Abb. 20). Die Cluster C1, C3 und C4 enthalten ausschließlich CF-Patienten, C1 und C4 nur PI-CF, C3 nur PS-CF während die Klassen C2 und C5 nur Non-CF Patienten enthalten.

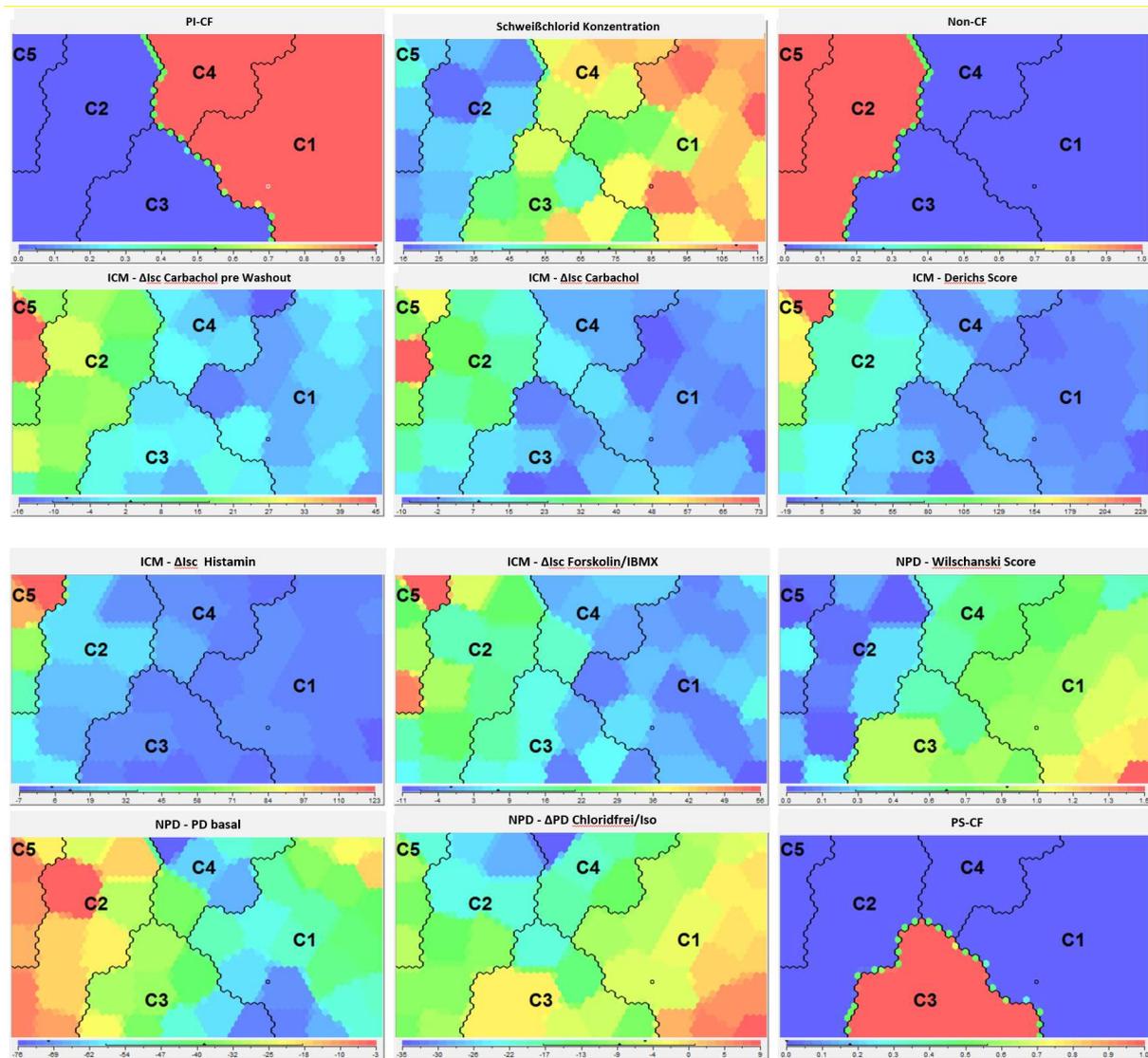
Die Patienten in Klasse C1 werden im Folgenden als PI-CF Patienten vom Typ I und die in Klasse C4 als PI-CF Patienten vom Typ II bezeichnet. Die Cluster Profile von C1 und C4 unterscheiden sich bezüglich der Werte der Biomarker (niedrig/hoch) voneinander (siehe Abb. 22.2). Die Patienten in Klasse C2 werden als Non-CF-Patienten vom Typ I und die in Klasse C5 als Non-CF-Patienten vom Typ II bezeichnet. Sie unterscheiden sich ebenfalls in ihren Cluster Profilen bezüglich der Höhe der Werte der Biomarker voneinander (siehe Abb. 22.1).



**Abb. 20: Zweidimensionale SOM-Karte mit den Clustern C1-C5.**

PI-CF-Typ I (C1, blau); PI-CF-Typ II (C4, grün); PS-CF (C3, gelb), Non-CF Typ I (C2, rot); Non-CF Typ II (C5, violett).

Als nächstes untersuchten wir die SOMs mit der Clustereinteilung bezüglich der verschiedenen Biomarker.



**Abb. 21: SOM-Karten für die Chloridkonzentration im Schweiß sowie NPD- und ICM-Parameter für die Gruppen Non-CF Typ I und II (Cluster C2 und C5), PI-CF Typ I und II (Cluster C1 und C4) und PS-CF (Cluster C3).**

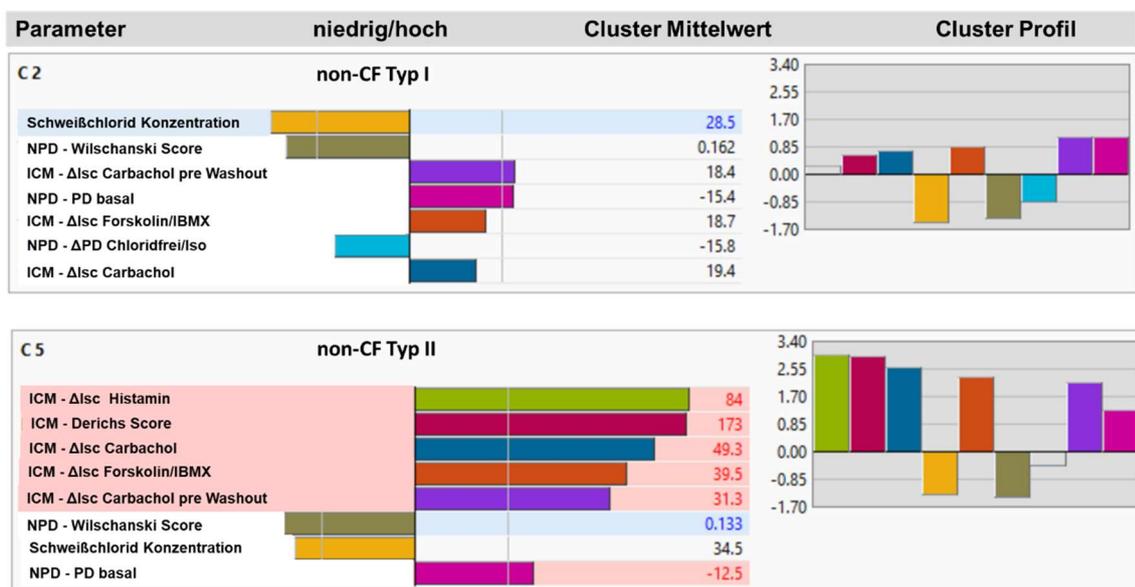
Für die Chloridkonzentration im Schweiß wurden Mittelwerte aus rechtem und linkem Arm, für NPD-Parameter (PD basal,  $\Delta$ PD Chloridfrei/Isoproterenol, Wilschanski Score) Mittelwerte aus rechtem und linkem Nasenloch und für ICM-Parameter ( $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  Carbachol,  $\Delta I_{sc}$  Histamin, Derichs Score sowie  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout) Mittelwerte aus ICM-Messungen an 2-8 Rektumsaugbiopsien verwendet.

Legende: ST: Schweißtest, NPD: Nasale Potentialdifferenzmessung, ICM: Intestinale Kurzschlussstrommessung, PD: Potentialdifferenz,  $\Delta$ PD Änderung der Potentialdifferenz,  $\Delta I_{sc}$  Änderung des Kurzschlussstroms, CF: Patienten mit Zystischer Fibrose, Non-CF: gesunde Kontrollen, PI-CF: pankreasinsuffiziente CF-Patienten, PS-CF: pankreasuffiziente CF-Patienten.

Die SOM-Karte für die Cluster (Abb. 20) zeigt, dass sich die Gruppen Non-CF, PS-CF und PI-CF multivariat eindeutig klassifizieren lassen. Die PI-CF Patienten unterteilen sich in zwei signifikant unterschiedliche Cluster, ebenfalls die Non-CF Probanden. Diese Klassen sind bisher nicht bekannt gewesen.

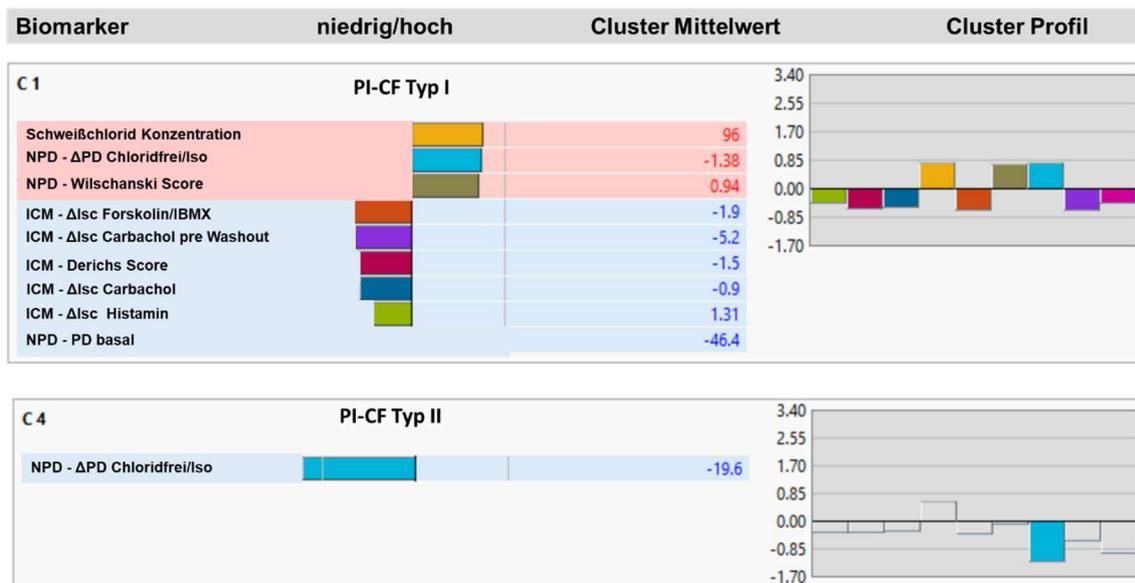
Vergleicht man weiter die SOM-Karten der einzelnen Biomarker (Abb. 21), so sieht man sofort, dass sich die Biomarker univariat sehr gut zur Unterscheidung zwischen Non-CF (Cluster C2 und C5) und CF (Cluster C1, C3 und C4) eignen (siehe z.B. Schweißchlorid Konzentration oder NPD Wilschanski Score), jedoch nicht sehr gut zur Unterscheidung zwischen PI-CF und PS-CF. Dies ist nur multivariat möglich.

Die nächsten Abbildungen zeigen die Cluster Profile (Abb. 22.1-22.2). Für jedes Cluster werden als Effektgrößen Glass'  $\Delta$  berechnet. Diese Effektgröße berechnet sich für einen Biomarker als Differenz des Mittelwertes für das Cluster und dem Mittelwert für alle Probanden normalisiert nach (dividiert durch) die Standardabweichung des Mittelwertes für alle Probanden. Für Cluster C3 erhielten wir für keinen Biomarker eine signifikante Differenz zwischen den betreffenden Mittelwerten. Daher wurde das Profil für dieses Cluster nicht abgebildet.



**Abb. 22.1: Cluster Profile für die Non-CF Typen I und II (C2, C5).**

Clusterbeschreibung: Biomarker sind niedrig/hoch gegenüber dem Cluster Mittelwert (linke Spalte); Cluster Mittelwert (mittlere Spalte); Glass'  $\Delta$  Effektgrößen: Normalisierte Abweichungen der Mittelwerte der Biomarker für die Non-CF Cluster C2 und C5 gegenüber den Mittelwerten aller Patienten (Cluster Profil, rechte Spalte).



**Abb. 22.2: Cluster Profile für die PI-CF Typen I und II (C1, C4).**

Clusterbeschreibung: Biomarker sind niedrig/hoch gegenüber dem Cluster Mittelwert (linke Spalte); Cluster Mittelwert (mittlere Spalte); Glass'  $\Delta$  Effektgrößen: Normalisierte Abweichungen der Mittelwerte der Biomarker für die PI-CF Cluster C1 und C4 gegenüber den Mittelwerten aller Patienten (Cluster Profil rechte Spalte).

Als nächstes charakterisierten wir die fünf Cluster durch ein Regelsystem mit dem C5.0 Klassifikationsalgorithmus. Die fünf Klassen konnten bereits auf der Basis von vier Biomarkern und sechs Regeln sowie einer Default-Regel mit einer Klassifikationsgenauigkeit von 94,1% richtig beschrieben werden. Die Probanden in den Clustern C2, C4 und C5 wurden durch das folgende Regelsystem zu 100% richtig klassifiziert. Zwei Patienten in dem Cluster C3 sowie ein Patient im Cluster C1 wurden dagegen fälschlich klassifiziert (Tab. 12).

### Regeln zur Klassifikation der fünf SOM-Cluster

**Regel 1:** Chloridkonzentration im Schweiß  $> 46,5$  mmol/l

→ Klasse C1

**Regel 2:** Chloridkonzentration im Schweiß  $\leq 46,5$  mmol/l,

ICM - Derichs Score  $\leq 75,7$   $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

→ Klasse C2

**Regel 3:** Chloridkonzentration im Schweiß  $> 46,5$  mmol/l,

NPD -  $\Delta$ PD Chloridfrei/Iso  $> -9,7$  mV, ICM -  $\Delta$ Isc Forskolin/IBMX  $> 4,75$   $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

→ Klasse C3

**Regel 4:** Chloridkonzentration im Schweiß  $> 46,5$  mmol/l,

Chloridkonzentration im Schweiß  $\leq 84,5$  mmol/l, NPD -  $\Delta$ PD Chloridfrei/Iso  $\leq -9,7$  mV

→ Klasse C3

**Regel 5:** Chloridkonzentration im Schweiß > 84,5 mmol/l,

NPD - ΔPD Chloridfrei/Iso ≤ -9,7 mV

→ Klasse C4

**Regel 6:** ICM - Derichs Score > 75,7 μA/cm<sup>2</sup>

→ Klasse C5

**Default-Regel:** Greift keine der Regeln 1-6

→ Klasse C1

(C1)	(C2)	(C3)	(C4)	(C5)	<-klassifiziert als
21		1			(C1): Cluster C1
	10				(C2): Cluster C2
1		8			(C3): Cluster C3
		1	5		(C4): Cluster C4
				4	(C5): Cluster C5

**Tab. 12: Klassifikationsgenauigkeit für das Regelsystem mit 6 Regeln und 1 Default Regel.**

Regelsystem ermittelt durch Anwendung des C5.0 Klassifikationsalgorithmus; Fehlerrate n=3 (5,9%) in den CF-Clustern (C1, C3, C4).

### Zusammenfassung der SOM-Ergebnisse

- Die Patienten mit PI-CF oder PS-CF können multivariat mit dem ST sowie den ICM- und NPD-Biomarkern eindeutig klassifiziert werden.
- Die fünf Cluster PI-CF Typ I (C1), PI-CF Typ II (C4), PS-CF (C3), Non-CF Typ I (C2) und Non-CF Typ II (C5) zeigen signifikant unterschiedliche Profile für die Biomarker.
- Die Cluster C1-C5 lassen sich mit einer Genauigkeit von 94% bereits aus sechs Regeln und einer Default-Regel auf der Basis der Marker Chloridkonzentration im Schweiß, ICM - Derichs Score ( $\Delta I_{sc}$  Forsk+CCH+Hista), ICM -  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX und NPD - ΔPD Chloridfrei/Iso beschreiben.
- Nimmt man exemplarisch einen einzelnen Biomarker wie z.B. den Derichs Score, so zeigt die SOM-Karte für den Derichs Score, warum dieser Score hochsignifikant zwischen CF und Non-CF klassifizieren kann, aber bei der Klassifikation zwischen PI-CF und PS-CF versagen muss.

### **3.4 Externe Validierung der Berliner ICM-Referenzwerte**

Neben der üblichen Qualitätsbewertung von klinischen Studien, die primär Aspekte der internen Validität betrifft (es gibt zahlreiche Publikationen zu dieser Thematik), ist die externe Validierung ein weiteres Gütekriterium [247]. Die externe Validierung untersucht die Übertragbarkeit der Ergebnisse einer Studie auf andere Kliniken, d.h. in die Praxis. Im Unterschied zu dem sehr intensiv bearbeiteten Thema interne Validierung gibt es bei der Frage der externen Validität bisher keine systematische Bearbeitung, keine Checklisten und keine allgemeinen Standards zur Bewertung [247].

Im folgenden Abschnitt wurde eine externe Validierung des standardisierten ECFS-Protokolls für ICM an zwei weiteren europäischen Zentren mit insgesamt 57 Probanden durchgeführt. Die Ergebnisse wurden auf Äquivalenz bzw. Gleichheit mit den ICM-Messungen der 51 Berliner Probanden überprüft.

#### **3.4.1. Externe Validierung**

An den zwei weiteren europäischen Zentren erfolgte die Durchführung der ICM-Messungen unter Anwendung des ECFS ICM SOPs unter den selben standardisierten Bedingungen.

Von insgesamt 644 erfüllten 541 Rektumsaugbiopsien die Qualitätskriterien und fanden Eingang in die Auswertung (84%). Am Berliner Zentrum (Zentrum 1) wurden je 3-8 Biopsien pro Proband untersucht, am Zentrum 2 jeweils 3-6 und am Zentrum 3 jeweils 2-4 Proben pro Testperson. Die charakteristischen Basisdaten sind in Tabelle 13 zu finden.

Das mittlere/mediane Alter unterschied sich signifikant zwischen Kontrollen und CF-Patienten in beiden Zentren. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede bei der Geschlechterverteilung. Der basale Gewebewiderstand der Biopsien unterschied sich signifikant ( $p=0,008$ ) zwischen den CF-Patienten und Kontrollen bei Zentrum 3, aber nicht signifikant ( $p=0,013$ ) bei Zentrum 2. Hochsignifikante ( $p<0,001$ ) Unterschiede zwischen Kontrollen und CF konnten für alle ICM-Antworten auf die verwendeten Substanzen sowohl im Zentrum 2 als auch im Zentrum 3 ermittelt werden. Für  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout fehlten 17 Werte im Zentrum 3, darunter sämtliche Werte für die Kontrollpatienten. Die wenigen anderen fehlenden Werte bei den ICM-Parametern wurden durch das Missing-Value-Verfahren Expectation Maximization berechnet und in die weiteren Analysen miteinbezogen. Insgesamt wurden 268 ICM-Werte von 57 Patienten erfasst.

### ICM-Referenzwerte von Zentrum 2 und Zentrum 3

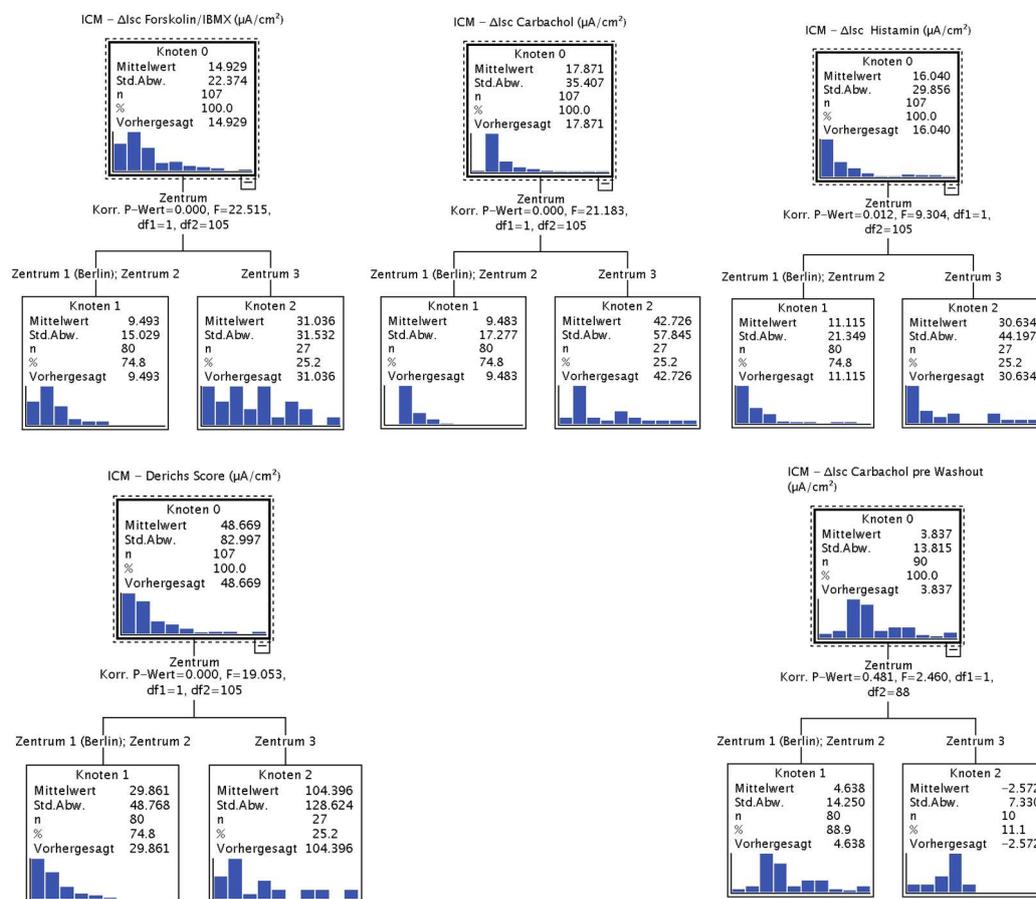
	Zentrum 2			Zentrum 3		
	Kontrollen	CF	Signifikanz	Kontrollen	CF	Signifikanz
	(n=13; 43,3%)	(n=17; 56,7%)	Kontrollen vs CF	(n=11; 40,7%)	(n=16; 59,3%)	Kontrollen vs CF
<b>Alter (Jahre)</b>	29,2±8,8 25 (22; 50)	22,1±6,8 20,0 (13; 38)	0,008	27,6±15,0 21,0 (19; 64)	15,3±12,9 18,0 (0; 39)	0,013
<b>Geschlecht</b>	Frauen Männer	7 (53,8%) 10 (58,8%)	0,491	7 (63,6%) 4 (36,4%)	7 (43,8%) 9 (56,3%)	0,31
<b>ICM</b>						
<b>R<sub>i</sub> basal (Ω/cm<sup>2</sup>)</b>	31,9±7,2 32,5 (18,6; 44,1)	34,1±8,2 32,6 (24,7; 54,0)	0,967	34,6±7,6 34,9 (17,3; 43,7)	23,5±8,6 23,0 (11,2; 37,5)	0,006
<b>ΔI<sub>sc</sub> Carbachol pre Washout (μA/cm<sup>2</sup>)</b>	21,2±11,9 18,5 (8,4; 45,6)	-3,7±6,1 -2,3 (-22,6; 1,8)	<0,001	Werte für Kontrollen fehlen	-2,6±7,3 -0,03 (-16,4; 7,5)	
<b>ΔI<sub>sc</sub> Forskolin/IBMX (μA/cm<sup>2</sup>)</b>	26,6±15,1 22,7 (8,7; 53,6)	3,3±5,5 1,6 (-4,8; 14,9)	<0,001	59,0±24,9 64,2 (19,4; 109,3)	11,8±18,6 11,5 (-13,3; 50,5)	<0,001
<b>ΔI<sub>sc</sub> Carbachol (μA/cm<sup>2</sup>)</b>	29,0±12,7 28,9 (8,7; 52,0)	-1,9±3,6 -1,8 (-7,1; 4,4)	<0,001	100,3±47,5 99,3 (42,0; 195,1)	3,2±14,2 5,5 (-33,2; 31,4)	<0,001
<b>ΔI<sub>sc</sub> Histamin (μA/cm<sup>2</sup>)</b>	23,8±13,0 22,2 (5,7; 56,9)	0,5±3,3 -0,8 (-3,8; 8,2)	<0,001	72,7±40,8 84,5 (12,7; 145,1)	1,7±9,0 -0,6 (-11,5; 21,7)	<0,001
<b>Derichs Score (μA/cm<sup>2</sup>)</b>	79,4±33,6 67,0 (39,6; 141)	1,9±9,0 -0,3 (-12,6; 19,0)	<0,001	232,0±105,0 231,9 (112,7; 413,7)	16,9±34,4 11,7 (-41,6; 103,5)	<0,001
<b>Genotypisierung</b>		dF508/1248+1G>A (1) dF508/3849+10kbC>T (2) dF508/dele 14a,15,16,17a,17b (1) dF508/dF508 (6) dF508/G542X (1) dF508/G551D (2) dF508/N1303k (1) dF508/R334W (1) dF508/R347P (2)			3849+10KWC/DR347H (1) dF508/1717>1GA (2) dF508/2183AA-G (1) dF508/3272-26A>G (1) dF508del/A455E (3) dF508/dF508 (8)	

**Tab. 13: Basic Characteristics und ICM-Referenzwerte der Zentren 2 und 3.**

Basale Daten der multizentrischen ICM-Studie für die ICM-Parameter ΔI<sub>sc</sub> Carbachol pre Washout, ΔI<sub>sc</sub> Forskolin/IBMX, ΔI<sub>sc</sub> Carbachol, ΔI<sub>sc</sub> Histamin und Derichs Score in μA/cm<sup>2</sup> ermittelt aus 268 ICM-Messungen von 57 Probanden aus 2 europäischen Zentren. Angabe der Werte als Mittelwerte±Standardabweichungen, sowie Mediane (Minimum; Maximum). Für die Berechnung der Signifikanz bei den metrischen Parametern wurde der Mann-Whitney-U-Test und bei dem diskreten Parameter Geschlecht der Chi-Quadrat Test verwendet.

### 3.4.2. Vergleich der ICM-Werte in den verschiedenen Zentren

Im Folgenden wurden die ICM-Werte aller Probanden der drei Zentren verglichen. Zwischen Zentrum 1 und Zentrum 2 wurden unter Anwendung des Klassifikationsverfahrens „exhaustive CHAID“ beim Vergleich der Mittelwerte keine signifikanten Unterschiede festgestellt ( $p > 0,05$ ). Die ICM-Messwerte der CFTR-Funktion lagen auf dem selben Messniveau. Zentrum 3 unterschied sich bezüglich der ICM-Antworten dagegen hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu Zentrum 1 und 2. Die  $I_{sc}$ -Werte betragen bei diesem Zentrum das Dreifache oder mehr der ICM-Antworten der beiden anderen Zentren. So ist der Mittelwert für den Derichs Score 29,9  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  für Zentrum 1 und 2, aber 104,4  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  für Zentrum 3 (Abb. 23.1).

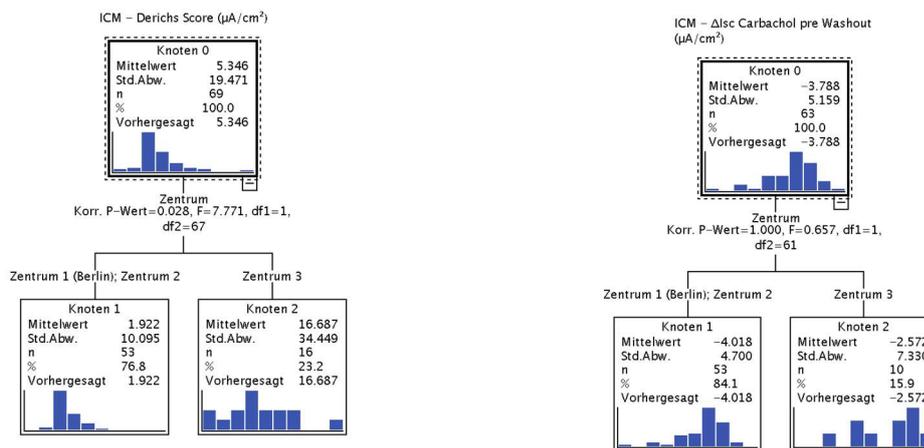


**Abb. 23.1: Vergleich der ICM-Antworten aller Probanden der drei Zentren.**

Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) aller Probanden (CF und Non-CF) für die ICM-Parameter  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  Carbachol,  $\Delta I_{sc}$  Histamin, Derichs Score sowie  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout: Zentrum 1+2+3 (oben), Zentrum 1+2 (links) und Zentrum 3 (rechts).

Da die Werte für den Parameter  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout bei den Kontrollen im Zentrum 3 fehlen, verglichen wir zusätzlich die Werte aller CF-Patienten in den drei Zentren (Abb. 23.2).

Hier erhält man qualitativ die gleichen Ergebnisse: es gab wieder keine signifikanten Unterschiede zwischen Zentrum 1 und 2, aber deutliche Unterschiede zu Zentrum 3, die wiederum aufgrund der kleinen Fallzahlen (n=10) im Zentrum 3 nicht signifikant waren. Das gleiche Ergebnis gilt auch für den Derichs Score (Abb. 23.2). Hier war der Unterschied aber wieder signifikant ( $p=0,028$ ).



**Abb. 23.2: Vergleich der ICM-Antworten aller CF-Patienten der drei Zentren.**

Mittelwerte (MW) & Standardabweichungen (SD) aller CF-Patienten (PI- & PS-CF) der ICM-Parameter Derichs Score und  $\Delta\text{Isc Carbachol pre Washout}$  (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Oben: Zentrum 1+2+3.

Die multizentrischen ICM-Ergebnisse zeigen, dass die Mittelwerte der ICM-Parameter zwischen den Zentren 1 und 2 nicht signifikant verschieden sind, aber signifikant verschieden sind im Vergleich zu Zentrum 3.

Als nächstes untersuchten wir, ob der Unterschied der Mittelwerte zwischen den Zentren 1 bzw. 2 und Zentrum 3 gross genug ist, um ihn als bedeutend zu kennzeichnen. Zur Beurteilung der Bedeutsamkeit dieser Unterschiede müssen wir die Effektstärken berechnen. Es gibt bekanntlich verschiedene Arten, die Effektstärke zu messen. Da sich die Gruppen (Zentrum 1 und 2 vs. Zentrum 3) hinsichtlich ihrer Größe stark unterscheiden, verwenden wir Cohens d mit einem Korrekturfaktor, da sonst die Effektstärken durch die Größenunterschiede verzerrt werden können. Diese korrigierte Effektstärke wird in der Literatur ebenfalls mit Cohens d bezeichnet. Hedges' Effektstärke g berücksichtigt ebenfalls Größenunterschiede zwischen den Vergleichsgruppen.

ICM Parameter	Basisdaten						Differenz der Rohdaten				Standardisierte Effektgröße						
	Zentrum 3			Zentrum 1 und 2			Standardabweichung gepoolte	p-Wert für die Differenz der Std	mittlere Differenz	p-Wert für mittlere Differenz (2-seitiger)	Konfidenzintervall der Differenz		Effektgröße	Bias korrigiert (Hedges)	Standardisierter Fehler der Effektgrößenabschätzung	Konfidenzintervall der Effektgröße	
	mean	n	SD	mean	n	SD					unten	oben				unten	oben
$\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX	31,0	27	31,5	9,5	80	15,0	20,37	0,00	21,50	0,00	12,51	30,5	1,06	<b>1,05</b>	0,23	0,59	1,51
$\Delta I_{sc}$ Carbachol	42,7	27	57,8	9,5	80	17,3	32,44	0,00	33,20	0,00	18,88	47,5	1,02	<b>1,02</b>	0,23	0,56	1,47
$\Delta I_{sc}$ Histamin	30,6	27	44,2	11,1	80	21,3	28,72	0,00	19,50	0,00	6,82	32,2	0,68	<b>0,67</b>	0,23	0,23	1,12
Derichs Score	104,4	27	128,6	29,9	80	48,8	76,73	0,00	74,50	0,00	40,64	108,4	0,97	<b>0,96</b>	0,23	0,51	1,42

**Tab. 14: Basisdaten, Differenz der Rohdaten und standardisierte Effektgrößen der ICM-Parameter für die Zentren 1 und 2 sowie für Zentrum 3.**

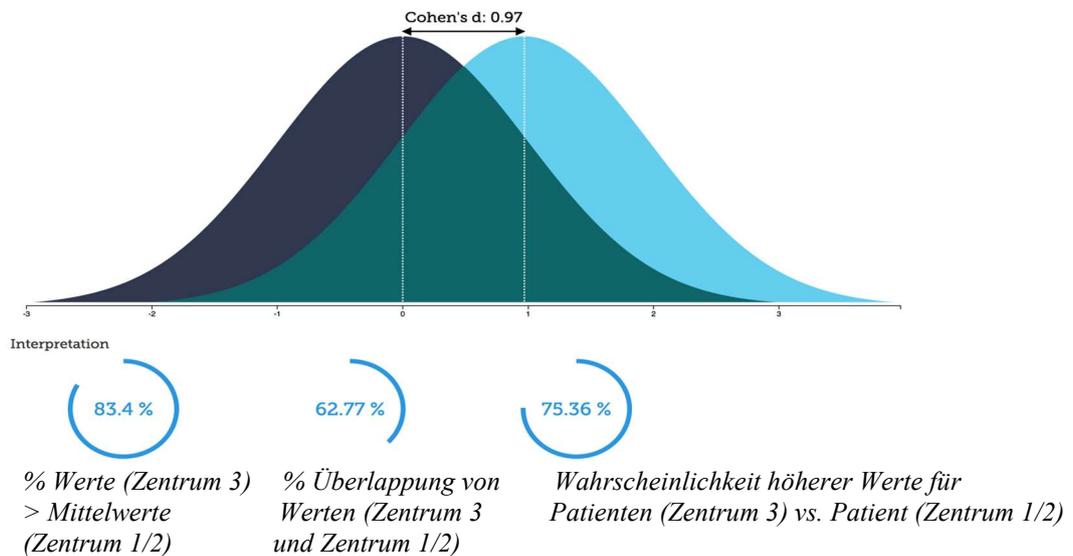
Cohens Effektgrößen sind für die ICM-Parameter  $> 0,5$  (Minimum 0,68; Maximum 1,06), d.h. der Unterschied der Mittelwerte ist nicht nur signifikant, sondern auch bedeutend. Die nach Hedges Bias korrigierten Werte für die Effektstärke unterscheiden sich nur minimal von Cohens Effektgrößen (Tab. 14). Aus Cohens  $d$  können mit Hilfe der „kumulativen Verteilungsfunktion der Standardnormalverteilung“ ( $\Phi$ ) das Maß für die Nichtüberlappung ( $\Phi(d)$ ), die Größe der Überlappung ( $2 \Phi(-|d|/2)$ ) und die Wahrscheinlichkeit der Überlegenheit ( $\Phi(d/\sqrt{2})$ ) berechnet werden (siehe Abb. 24 am Beispiel des Derichs Scores).

Die Effektgröße  $d$  für  $\Delta I_{sc}$  Histamin ist 0,68. 75% der Werte aus Zentrum 3 liegen über dem Mittelwert der Zentren 1 und 2 (Maß für Nichtüberlappung). 73% dieser beiden Gruppen überlappen (Größe der Überlappung) und es besteht eine 68%-ige Wahrscheinlichkeit für einen beliebigen Probanden aus Zentrum 3, einen höheren Wert für  $\Delta I_{sc}$  Histamin zu haben als ein beliebiger per Zufall ausgewählter Proband in Zentrum 1 oder 2 (Wahrscheinlichkeit der Überlegenheit).

Cohens  $d$  für  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX hat mit 1,06 den höchsten Wert. 86% der Werte aus Zentrum 3 liegen dann über dem Mittelwert der Zentren 1 und 2 (Maß für Nichtüberlappung). 59% dieser beiden Gruppen überlappen (Größe der Überlappung) und es besteht eine 78%-ige Wahrscheinlichkeit für einen beliebigen Probanden aus Zentrum 3, einen höheren Wert für  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX zu haben als ein beliebiger per Zufall ausgewählter Proband in Zentrum 1 oder 2 (Wahrscheinlichkeit der Überlegenheit).

Cohens Effektgröße  $d$  für den Derichs Score beträgt 0,97. 83% der Werte aus Zentrum 3 liegen damit über dem Mittelwert der Zentren 1 und 2 (Maß für Nichtüberlappung). 63% dieser beiden Gruppen überlappen (Größe der Überlappung) und es besteht eine 75%-ige Wahrscheinlichkeit für einen beliebigen Probanden aus Zentrum 3, einen höheren Wert für den Derichs Score zu

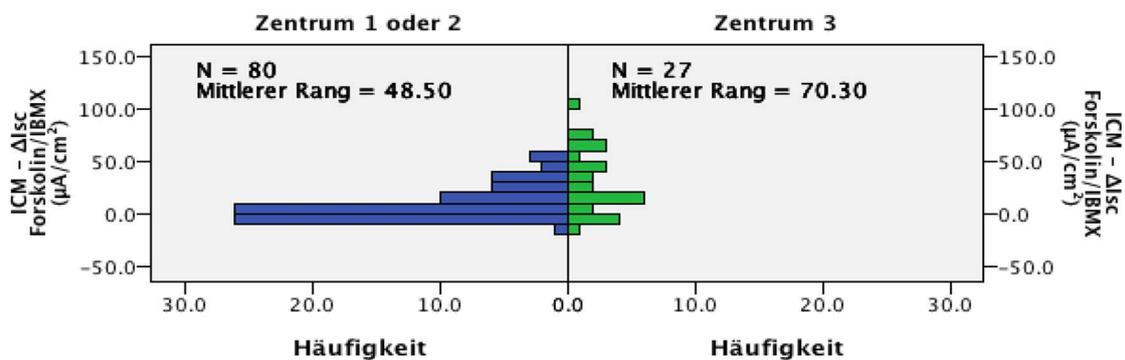
haben als ein beliebiger per Zufall ausgewählter Proband in Zentrum 1 oder 2 (Wahrscheinlichkeit der Überlegenheit) (Abb. 24).



**Abb. 24: Interpretation von Cohens d am Beispiel des Derichs Scores.**

83% der Werte aus Zentrum 3 liegen über den Mittelwerten aus Zentrum 1 und 2 (Maß für Nichtüberlappung); 63% dieser beiden Gruppen überlappen (Größe der Überlappung); es besteht eine 75%-ige Wahrscheinlichkeit für einen beliebigen Probanden aus Zentrum 3, einen höheren Wert für den Derichs Score zu haben als ein beliebiger per Zufall ausgewählter Proband in Zentrum 1 oder 2 (Wahrscheinlichkeit der Überlegenheit).

Als nächstes verglichen wir die Verteilungen zwischen den Zentren 1 und 2 mit den Verteilungen der ICM-Parameter in Zentrum 3 (Mann-Whitney U-Test für unabhängige Stichproben).



**Abb. 25.1: Verteilung von  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX in den Zentren 1 oder 2 und Zentrum 3.**

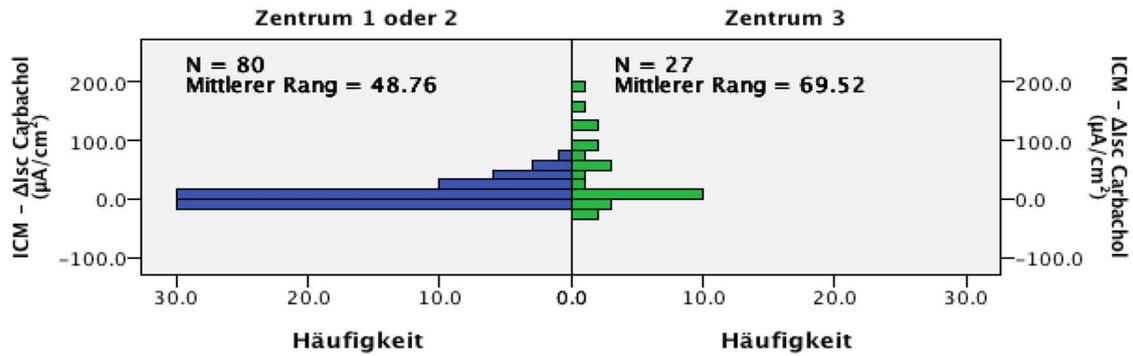


Abb. 25.2: Verteilung von  $\Delta I_{sc}$  Carbachol in den Zentren 1 oder 2 und Zentrum 3.

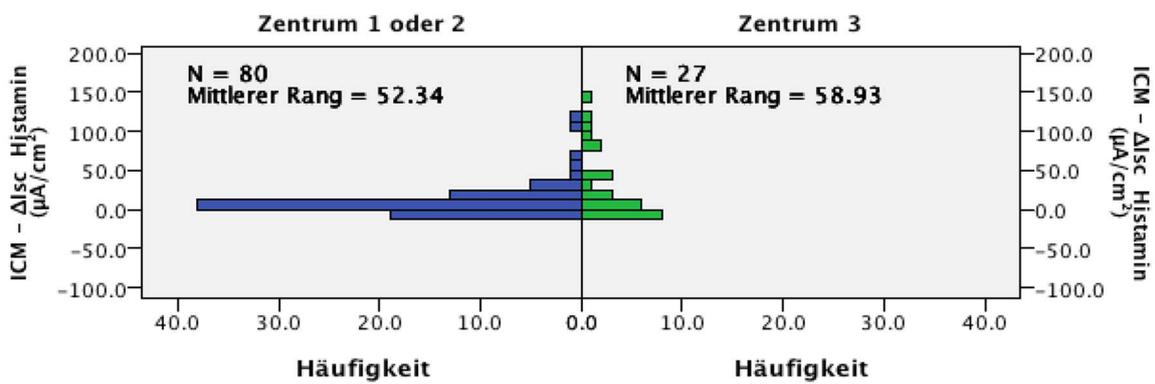


Abb. 25.3: Verteilung von  $\Delta I_{sc}$  Histamin in den Zentren 1 oder 2 und Zentrum 3.

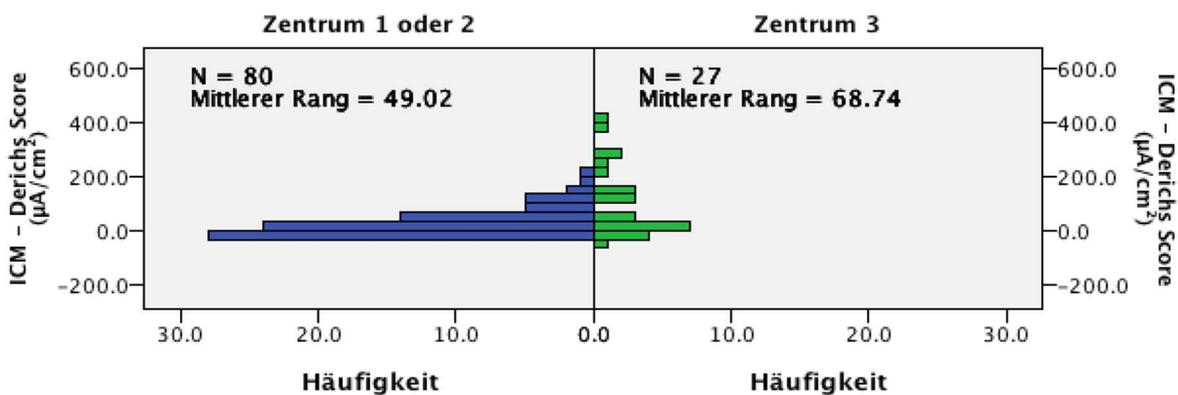


Abb. 25.4: Verteilung des Derichs Scores in den Zentren 1 oder 2 und Zentrum 3.

Die Verteilungen von  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  Carbachol und Derichs Score sind signifikant ( $p < 0,004$ ) verschieden in den beiden Vergleichsgruppen. Nur für  $\Delta I_{sc}$  Histamin konnten wir die Nullhypothese  $H_0 =$  „die Verteilungen von  $\Delta I_{sc}$  Histamin sind in den Zentren 1/2 und Zentrum 3 identisch“ nicht widerlegen ( $p = 0,340$ ). Das gleiche Ergebnis für  $\Delta I_{sc}$  Histamin erhalten wir auch

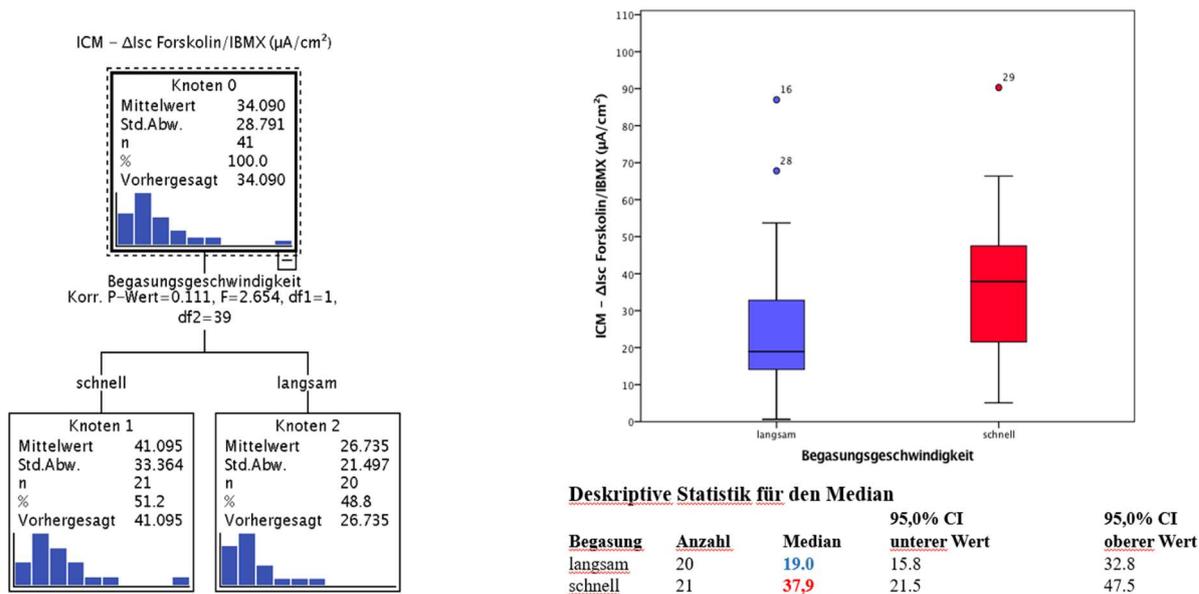
bei der Wahl anderer nichtparametrischer Tests wie z.B. des Median-Tests oder des Kolmogorov-Smirnov Tests.

### **3.4.3. Ursache des systematischen Messfehlers: Effekt der Begasungsgeschwindigkeit auf die Höhe der ICM-Antworten**

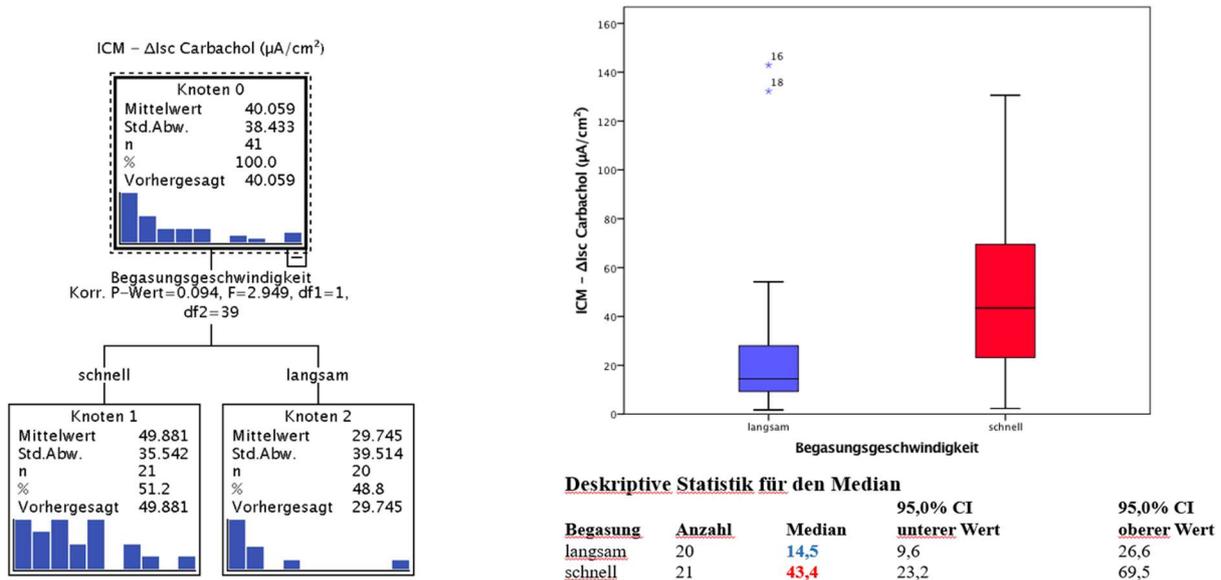
Die Abweichungen der Werte der ICM-Parameter in Zentrum 3 gegenüber den Werten in den Zentren 1 und 2 weisen auf einen systematischen Messfehler bei Zentrum 3 hin. Hierfür spricht, dass wir einen in der Tendenz stets zu hohen Messwert haben. Generell erzeugen systematische Abweichungen eine Verschiebung nach einer Seite, d.h. sie bewirken stets einen zu hohen oder stets zu niedrigen Messwert.

Vermeiden kann man eine systematische Abweichung nur bei bekannter Ursache. Um eine Ursache für die systematische Abweichung bei Zentrum 3 zu finden, untersuchten wir unser Vorgehen bei der multizentrischen ICM-Validierung auf mögliche Fehlerquellen. Auf der Basis des ECFS ICM SOPs war die Durchführung der ICM schon sehr stark standardisiert. Bei der Reevaluation fiel lediglich eine langsamere Begasung der Biopsien in den Ussing Kammern bei Zentrum 1 und 2 einerseits und andererseits eine schnellere Begasung der Biopsien bei Zentrum 3 auf. Um diese Unterschiede zu objektivieren, wurde der Zusammenhang zwischen der Gasflussrate und der Höhe des Kurzschlussstroms im Folgenden noch weiter untersucht.

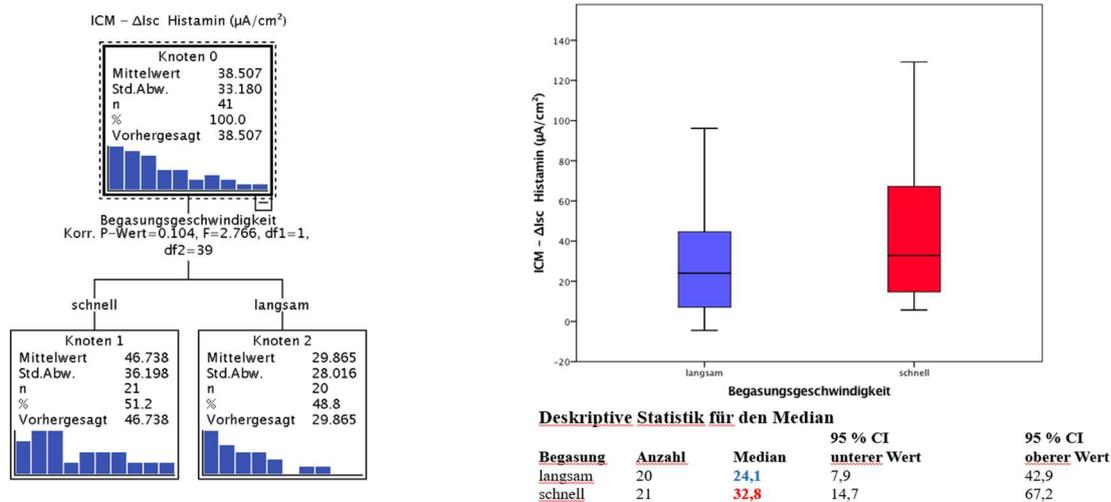
Um die Hypothese zu überprüfen, dass eine schnellere Gasflussrate zu höheren ICM-Antworten führen könnte, wurden 21 Biopsien mit schneller und 20 Biopsien mit langsamer Begasung evaluiert. Die Mittelwerte und Mediane sind bei schneller Begasung deutlich höher als bei langsamer Begasung. Diese Ergebnisse sind aber nicht signifikant, da die Power hierfür nicht ausreicht. Um für sämtliche  $I_{sc}$ -Werte Signifikanz bei einer Power von 80% und einem Signifikanzniveau von 5% zu erhalten, sind für die beiden Gruppen jeweils 62 Proben notwendig. Wenden wir dagegen den nicht-parametrischen Median-Test für unabhängige Gruppen an, so erhalten wir für den Derichs Score ( $p=0,042$ ) sowie für  $\Delta I_{sc}$  Carbachol ( $p=0,008$ ) jeweils einen signifikanten Unterschied der Mediane zwischen schneller und langsamer Begasung. Trotz der noch unzureichenden Fallzahlen in beiden Gruppen kann davon ausgegangen werden, dass die höheren Werte der ICM-Parameter im Zentrum 3 primär von der schnelleren Begasung herrühren, da alle anderen Messschritte aufgrund der Standardisierung gleich waren.



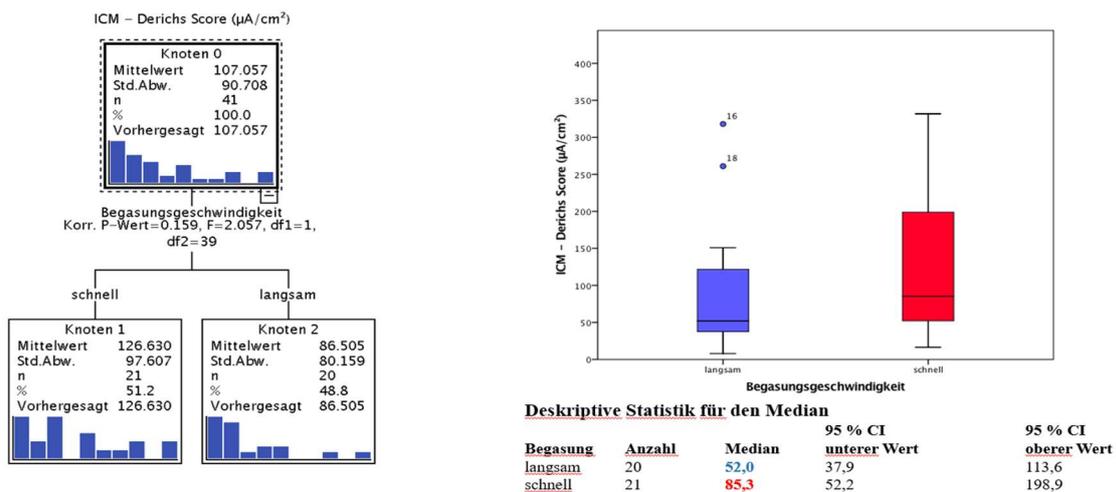
**Abb. 26.1:**  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX - Vergleich der Mittelwerte bei langsamer und schneller Begasung. Exhaustive CHAID (links), sowie Boxplots und die deskriptive Statistik für den Median (rechts).



**Abb. 26.2:**  $\Delta I_{sc}$  Carbachol - Vergleich der Mittelwerte bei langsamer und schneller Begasung. Exhaustive CHAID (links), sowie Boxplots und die deskriptive Statistik für den Median (rechts).



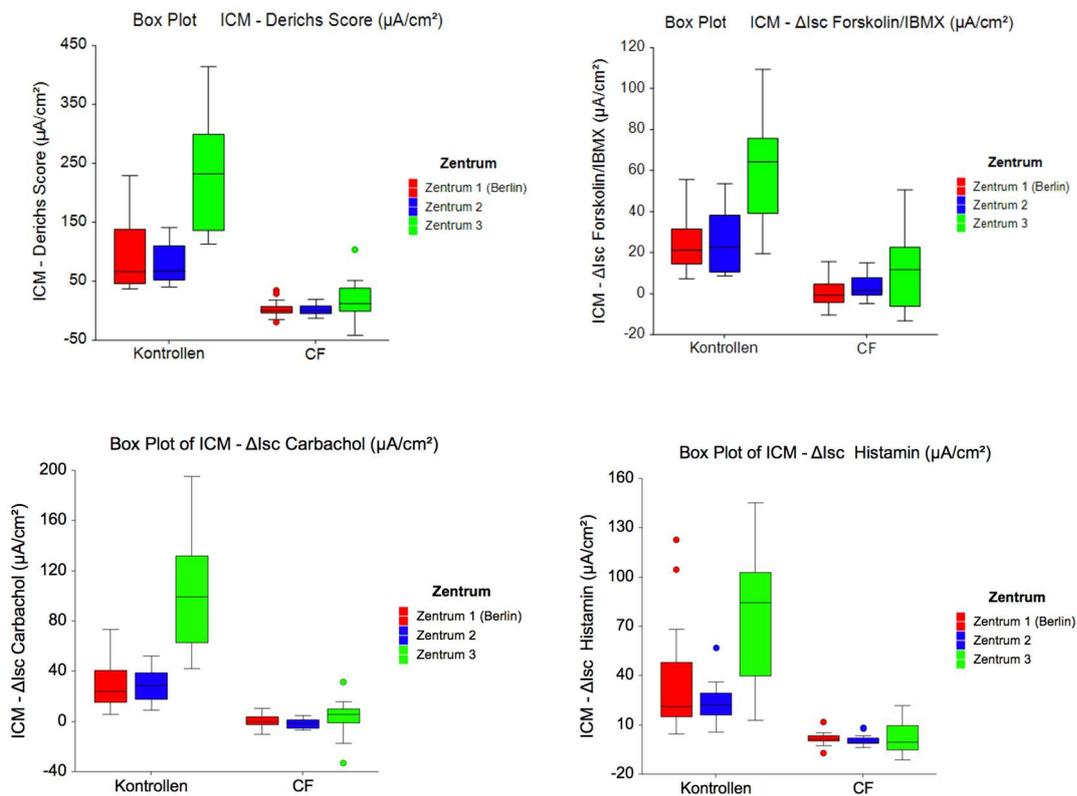
**Abb. 26.3:**  $\Delta I_{sc}$  Histamin - Vergleich der Mittelwerte bei langsamer und schneller Begasung. Exhaustive CHAID (links), sowie Boxplots und die deskriptive Statistik für den Median (rechts).



**Abb. 26.4:** Derichs Score - Vergleich der Mittelwerte bei langsamer und schneller Begasung. Exhaustive CHAID (links), sowie Boxplots und die deskriptive Statistik für den Median (rechts).

### 3.4.4. Klassifikation zwischen Kontrollen und CF bei schneller Begasung

In diesem Abschnitt stellen wir zuerst die Ergebnisse als Boxplots für  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  Carbachol,  $\Delta I_{sc}$  Histamin und Derichs Score dar. Da sich die Boxplots der ICM-Parameter auch für Zentrum 3 nicht oder nur minimal überschneiden, kann auch im Zentrum 3 zwischen CF und Kontrollen hochsignifikant unterschieden werden (Abb. 27).



**Abb. 27: Boxplots der Zentren 1-3 für Kontrollen und CF-Patienten.**

ICM-Parameter:  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  Carbachol,  $\Delta I_{sc}$  Histamin und Derichs Score.

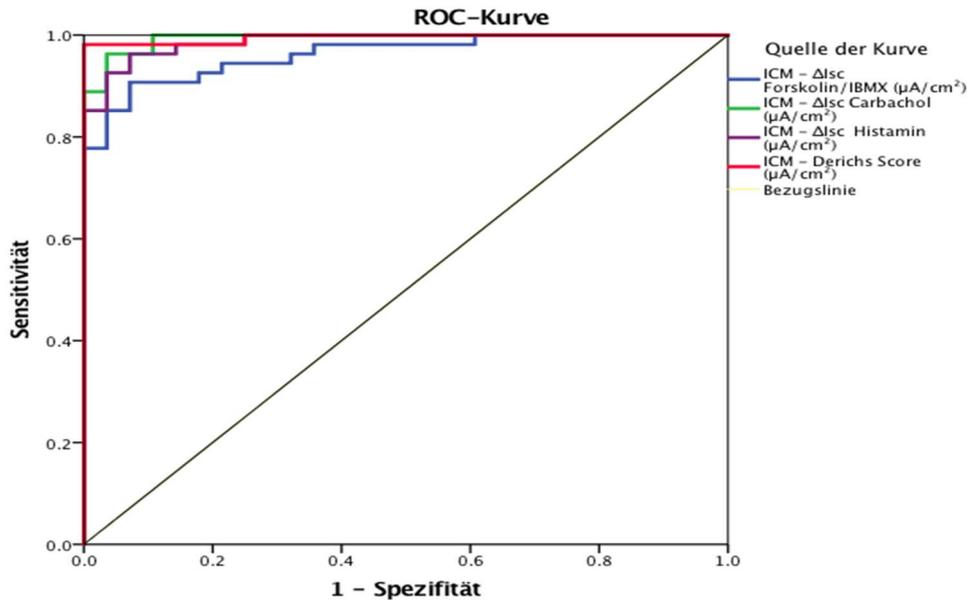
Dieses „visuelle“ Ergebnis wird im nächsten Abschnitt durch ROC-Analysen (Tab. 15, Abb. 28) sowie Entscheidungsbaumverfahren (Abb. 29.1-29.3) bestätigt. Da wir bereits oben gezeigt haben, dass wir keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen zwischen Zentrum 1 und 2 haben, werden wir diese Analysen hier nicht weiter ausführen.

ICM-Parameter	Fläche (AUC)	Standardfehler (a)	Asymptotische Signifikanz (b)	Asymptotisches 95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
$\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX ( $\mu A/cm^2$ )	0,94	0,04	<0,001	0,85	1
$\Delta I_{sc}$ Carbachol ( $\mu A/cm^2$ )	1,00	0,00	<0,001	1	1
$\Delta I_{sc}$ Histamin ( $\mu A/cm^2$ )	0,99	0,02	<0,001	0,96	1
Derichs Score ( $\mu A/cm^2$ )	1,00	0,00	<0,001	1	1

**Tab. 15: Zentrum 3 (schnelle Begasung) – Kontrollen vs. CF mit ICM-Parametern.**

ROC-Analysen mit AUC (Area under the curve), Standardfehler, asymptotische Signifikanz und 95% Konfidenzintervall für die ICM-Parameter.

Legende: a Unter der nichtparametrischen Annahme, b Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0.5.



**Abb. 28: Zentrum 3 - ROC-Kurven für Kontrollen vs. CF mit ICM-Parametern.**

ICM-Parameter:  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  Carbachol,  $\Delta I_{sc}$  Histamin und Derichs Score. Alle AUC-Werte  $> 0,9$ .

Da im Zentrum 3 die AUC-Werte für alle oben angegebenen ICM-Parameter  $> 0,9$  sind (Tab. 15), erhielten wir ebenso wie in unserem Referenzzentrum 1 (Berlin) wieder eine exzellente Unterscheidung zwischen CF und Kontrollen. Da die ICM-Werte in Zentrum 3 aufgrund der schnelleren Begasung höher waren als in den Zentren 1 und 2, müssen die betreffenden Cutoff-Werte auch höher sein.

Die entsprechenden Cutoff-Werte für langsame (Zentrum 1 und 2) und schnelle Begasung (Zentrum 3) entnehmen wir der folgenden Tabelle 16.

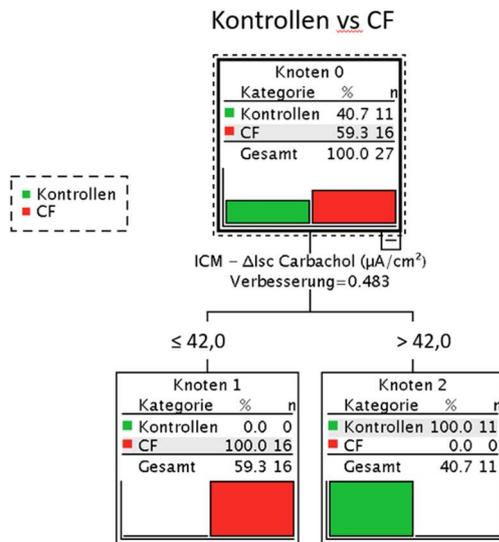
Cutoff-Werte zur Klassifikation Kontrollen vs. CF	langsame Begasung			schnelle Begasung
	Zentrum 1	Zentrum 2	Zentrum 1+2	Zentrum 3
ICM - $\Delta I_{sc}$ Forskolin/IBMX ( $\mu A/cm^2$ )	12,7	8,7	9,1	36,0
ICM - $\Delta I_{sc}$ Carbachol ( $\mu A/cm^2$ )	9,3	8,7	8,7	42,0
ICM - $\Delta I_{sc}$ Histamin ( $\mu A/cm^2$ )	9,1	10,1	9,1	34,0
ICM - Derichs Score ( $\mu A/cm^2$ )	36,7	39,6	36,7	112,0

**Tab. 16: Cutoff-Werte zur Klassifikation von Kontrollen vs. CF in Abhängigkeit von der Begasung.**

Langsame Begasung: Zentrum 1+2; schnelle Begasung: Zentrum 3.

Als nächstes untersuchten wir für Zentrum 3 die Klassifikationsgenauigkeit der nach der ROC-Auswertung drei „besten“ ICM-Parameter  $\Delta I_{sc}$  Carbachol,  $\Delta I_{sc}$  Derichs Score und  $\Delta I_{sc}$  Histamin (AUC=1 bzw. 0,99) mit den Cutoff-Werten für schnelle Begasung, die wir aus den ROC-Kurven erhalten haben unter Anwendung des Entscheidungsbaumverfahrens CART (Abb. 29.1-29.3).

### Klassifikationsgenauigkeit von $\Delta I_{sc}$ Carbachol

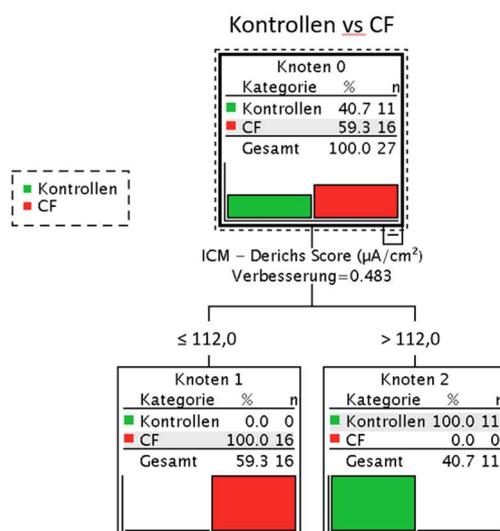


Beobachtet	Vorhergesagt		Prozent korrekt
	Kontrollen	CF	
Kontrollen	11	0	100.0%
CF	0	16	100.0%
Gesamtprozensatz	40.7%	59.3%	100.0%

Methode: CART; abhängige Variable: Kontrollen vs. CF

**Abb. 29.1: Zentrum 3 (schnelle Begasung) - Klassifikationsgenauigkeit von  $\Delta I_{sc}$  Carbachol.** Entscheidungsbaumverfahren CART mit Cutoff-Wert von  $42 \mu A/cm^2$  (aus ROC-Analysen).

### Klassifikationsgenauigkeit des Derichs Scores

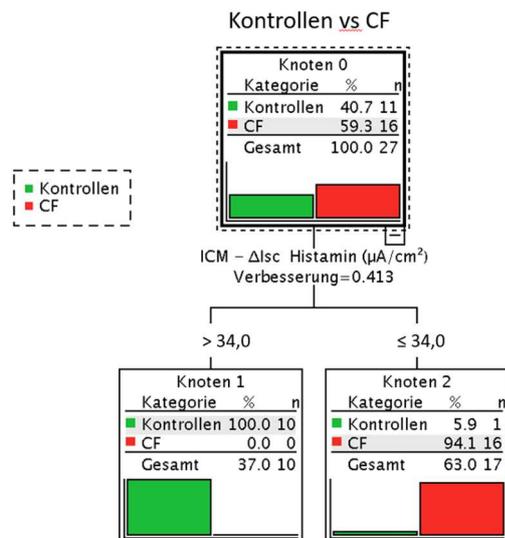


Beobachtet	Vorhergesagt		Prozent korrekt
	Kontrollen	CF	
Kontrollen	10	1	90,90%
CF	0	16	100.0%
Gesamtprozensatz	37,0%	63,0%	96,3%

Methode: CART; abhängige Variable: Kontrollen vs. CF

**Abb. 29.2: Zentrum 3 (schnelle Begasung) - Klassifikationsgenauigkeit des Derichs Scores.** Entscheidungsbaumverfahren CART mit Cutoff-Wert von  $112 \mu A/cm^2$  (aus ROC-Analysen).

## Klassifikationsgenauigkeit von $\Delta I_{sc}$ Histamin



Beobachtet	Vorhergesagt		Prozent korrekt
	Kontrollen	CF	
Kontrollen	10	1	90,90%
CF	0	16	100.0%
Gesamtprozentsatz	37,0%	63,0%	96,3%

Methode: CART; abhängige Variable: Kontrollen vs. CF

**Abb. 29.3: Zentrum 3 (schnelle Begasung) - Klassifikationsgenauigkeit von  $\Delta I_{sc}$  Histamin.**

Entscheidungsbaumverfahren CART mit Cutoff-Wert von  $34 \mu A/cm^2$  (aus den ROC-Analysen berechnet).

Für  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX erhielten wir für AUC einen Wert von 0,94 mit einem 95%-igen Konfidenzintervall von 0,85-1,0 (5). Für den entsprechenden Cutoff-Wert von  $36 \mu A/cm^2$  ergibt sich hieraus eine Klassifikationsgenauigkeit von 88,9% (Kontrollen 90,9%; CF 87,5%). Drei Patienten wurden bei  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX falsch klassifiziert (eine Kontrolle als CF und zwei CF als Kontrollen).

## Zusammenfassung zur Gasflussgeschwindigkeit

Es gab bei Patienten mit schneller Begasung deutlich erhöhte Werte für die ICM-Parameter gegenüber Patienten mit langsamer Begasung. Hieraus resultieren höhere Cutoff-Werte. Mit den entsprechend angepassten Cutoff-Werten erhält man auch bei schneller Begasung wieder eine hervorragende Klassifikationsgenauigkeit.

Für  $\Delta I_{sc}$  Carbachol und den Derichs Score lag die Klassifikationsgenauigkeit bei 100%, für  $\Delta I_{sc}$  Histamin bei 96,3% und für  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX bei 88,9%.

## **3.5. Evaluation des Effekts von Ivacaftor bei vier Patienten mit der G551D-Mutation**

### **3.5.1 Ermittlung der organspezifischen CFTR-Funktion im Behandlungsverlauf**

Neben der Ermittlung des Potentials von ST, NPD und ICM als diagnostische Biomarker wurden die CFTR-Biomarker bei der Behandlung von vier CF-Patienten mit der G551D-Mutation als prädiktive Biomarker eingesetzt und die CFTR-Funktion organspezifisch verglichen. Da es sich hierbei um Einzelfallanalysen handelt, ist dies nicht der Schwerpunkt dieser Dissertation sondern stellt einen Ausblick dar für die zukünftige Anwendung der Biomarker in der Therapie mit CFTR-Modulatoren. Der Effekt des ersten zugelassenen CFTR-Potentiators Ivacaftor wurde mittels wiederholter CFTR-Analyse in den drei Organen bestimmt. Die Ansprechbarkeit auf die Behandlung mit Ivacaftor wurde anhand der ermittelten unizentrischen Referenz- und zugehörigen Cutoff-Werte beurteilt. Im Behandlungsverlauf zeigten sich in Abhängigkeit vom verwendeten CFTR-Biomarker Unterschiede bei der Verbesserung der CFTR-Funktion, was auf organspezifische Differenzen der Ansprechbarkeit auf die Potentiatorbehandlung hinweist.

Alle Patienten bestätigten, die verschriebene Standarddosis eingehalten zu haben. ST und NPD konnten vor der Ivacaftor-Behandlung, sowie nach ein und zwei Wochen bei allen vier Patienten erhoben werden (CFTR<sub>0-2</sub>, kurzfristig). Nach 3-9 Monaten (CFTR<sub>3</sub>, mittelfristig) konnten die beiden Biomarker bei drei Probanden, nach mehr als einem Jahr bei zwei G551D-Trägern (CFTR<sub>4</sub>, langfristig) angewendet werden. ICM wurde zu den Zeitpunkten CFTR<sub>0-2</sub> bei drei Patienten sowie mittel- und langfristig (CFTR<sub>3</sub> und CFTR<sub>4</sub>) bei einem Patienten ermittelt.

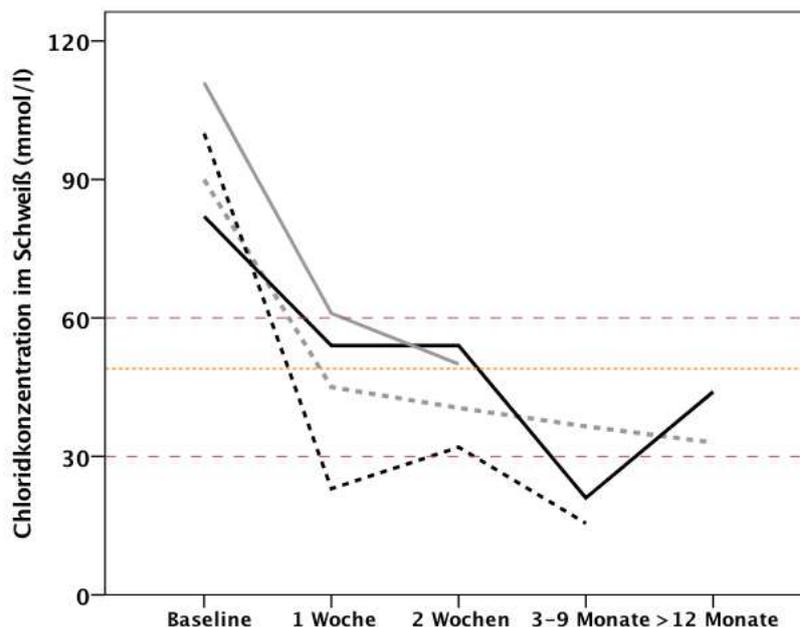
Vor der Behandlung zeigten alle vier Patienten ST-Ergebnisse im typischen CF-Bereich. Nach einer Woche Ivacaftor-Therapie hatte sich der Chloridgehalt im Schweiß bei allen Patienten auf Werte unterhalb oder direkt am bekannten diagnostischen Cut-Off von 60 mmol/l verbessert (45, 54, 23 und 61 mmol/l). Im Verlauf sanken die ST-Messwerte weiter bis zu unserem unizentrisch ermittelten Cutoff-Wert von 46,5 mmol/l oder darunter. Die Chloridkonzentration im Schweiß blieb nach 3-9 Monaten und nach mehr als 12 Monaten weiter im Normbereich (Abb. 30).

Bei der NPD variierten die Baseline-Werte der vier Patienten abhängig davon, ob die basale PD,  $\Delta$ PD Chloridfrei/Iso oder der Wilschanski Score betrachtet wurde. Bei drei von vier Patienten wies  $\Delta$ PD Chloridfrei/Iso schon vor der Behandlung auf eine deutliche CFTR-Restfunktion hin (Abb. 31.2). Nach einer Woche Ivacaftor-Therapie verbesserte sich die mit den drei NPD-Parametern erfasste CFTR-Funktion bei drei von vier Patienten noch weiter. Diese Verbesserung war allerdings nach zwei Wochen abhängig vom untersuchten NPD-Parameter zum Teil wieder rückläufig - dennoch blieb die CFTR-Funktion im Allgemeinen über den Ausgangswerten. Auch

der mittel- und langfristige Ivacaftor-Effekt bei der NPD war abhängig vom untersuchten Parameter: die basale PD blieb zum Zeitpunkt CFTR<sub>3</sub> und CFTR<sub>4</sub> gegenüber dem Ausgangswert angehoben und relativ stabil (Abb. 31.1).  $\Delta$ PD Chloridfrei/Iso (Abb. 31.2) und Wilschanski Score (Abb. 31.3) indizierten nach 3-9 Monaten bei zwei von drei Patienten einen anhaltenden Rückgang der CFTR-Funktionsverbesserung, nach über 12 Monaten konnte bei einem Patienten ein deutlicher Anstieg verzeichnet werden.

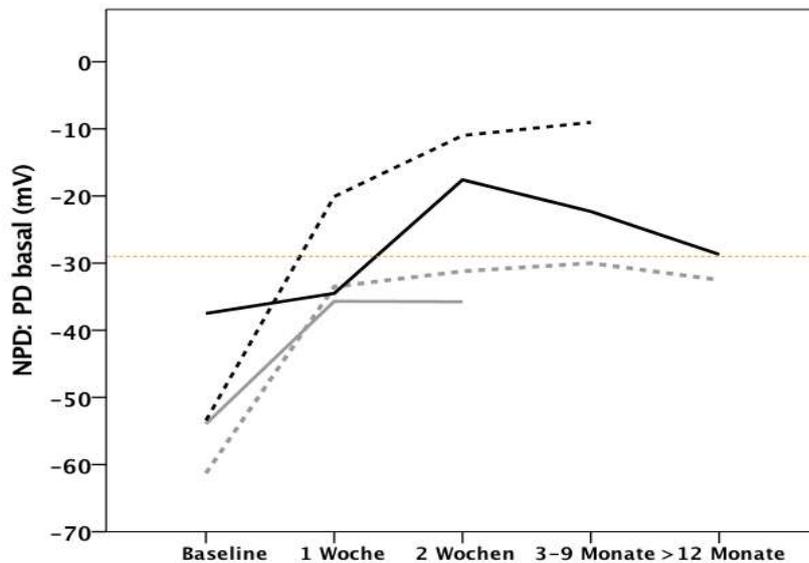
Bei der ICM lagen zwei von drei Patienten zum Zeitpunkt CFTR<sub>0</sub> im typischen CF-Bereich. Eine deutliche Verbesserung der CFTR-Funktion wurde nach einer Woche Behandlung mit Ivacaftor bei allen drei Patienten mittels  $\Delta I_{sc}$  Forsk/IBMX als Marker der cAMP-vermittelten Chloridsekretion (Abb. 32.1) und Derichs Score (Abb. 32.2) zur Darstellung der kombinierten CFTR-Funktion ermittelt. Zwei Wochen nach Therapiebeginn nahm der Effekt wieder etwas ab, die Werte blieben aber klar im Bereich von Non-CF. Die mittel- und langfristige Ivacaftor-Einnahme wurde in der ICM des untersuchten Patienten durch eine normalisierte, kontinuierlich leicht zunehmende CFTR-Funktion widerspiegelt.

In den folgenden Abbildungen 30 bis 32 bedeutet „Baseline“ direkt vor Behandlungsbeginn mit Ivacaftor.



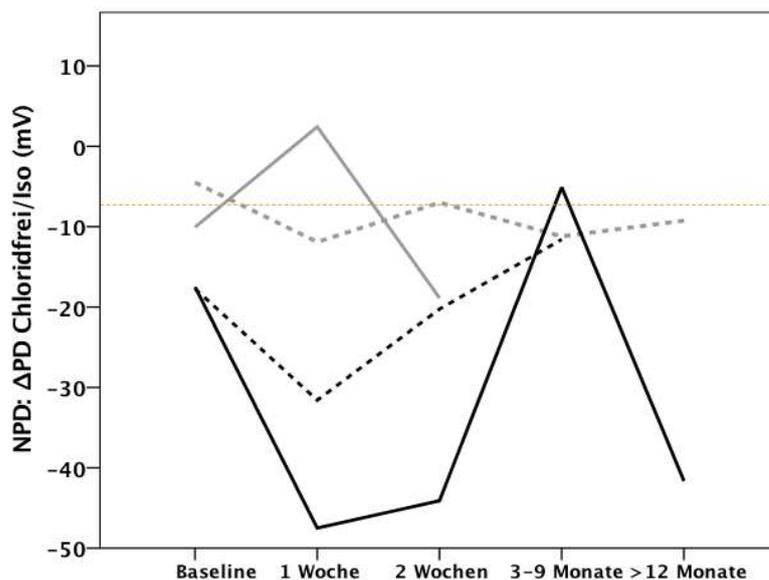
**Abb. 30: Die Chloridkonzentrationen im Schweiß (in mmol/l) im Behandlungsverlauf (Ivacaftor).**

Chloridkonzentrationen im Schweiß (Mittelwerte aus rechtem und linkem Arm) von 4 Patienten mit der G551D-Mutation (verschiedene Linien) zu 5 verschiedenen Messzeitpunkten der Ivacaftorbehandlung; rote gestrichelte Linien: bekannter diagnostischer Überlappungsbereich des Schweißtests zwischen 30 und 59 mmol/l; orange gepunktete Linie: Cutoff-Wert zwischen CF und Non-CF ermittelt aus Berliner Referenzwerten (CF > 46,5 mmol/l).



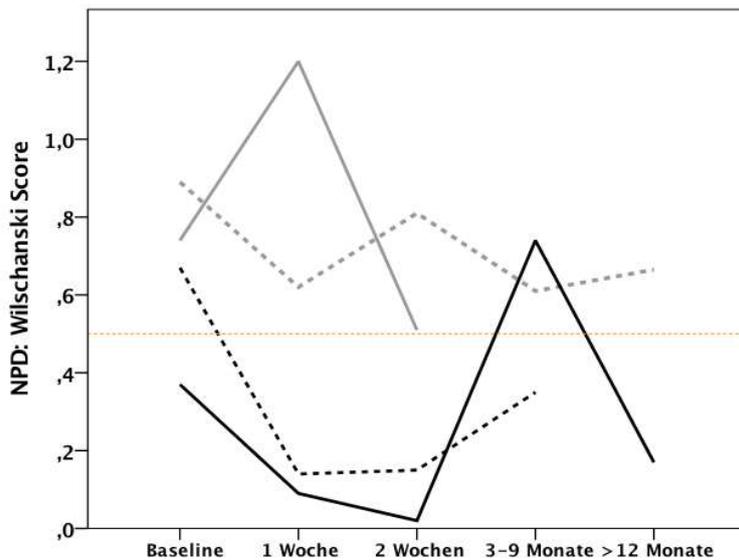
**Abb. 31.1: NPD - PD basal (in mV) im Behandlungsverlauf (Ivacaftor).**

Basale Potentialdifferenz (jeweils Mittelwerte aus rechtem und linkem Nasenloch) von 4 Patienten mit der G551D-Mutation (verschiedene Linien) zu 5 verschiedenen Messzeitpunkten der Ivacaftorbehandlung; orange gepunktete Linie: Cutoff-Wert zwischen CF und Non-CF ermittelt aus Berliner Referenzwerten (CF < -29,6 mV). PD basal: basale Potentialdifferenz.



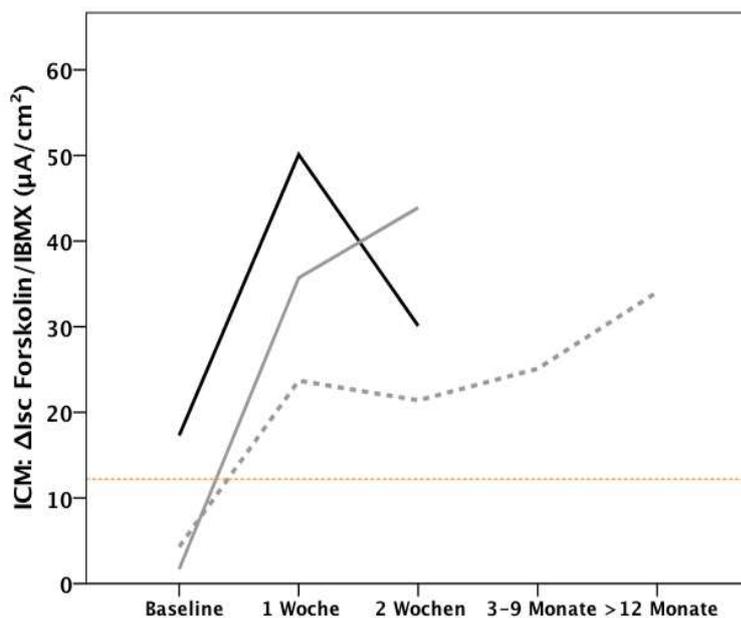
**Abb. 31.2: NPD - ΔPD Chloridfrei/Iso (in mV) im Behandlungsverlauf (Ivacaftor).**

NPD-Antwort auf Chloridfrei/Isoproterenol (Mittelwerte aus rechtem und linkem Nasenloch) von 4 Patienten mit der G551D-Mutation (verschiedene Linien) zu 5 verschiedenen Messzeitpunkten der Ivacaftorbehandlung. Orange gepunktete Linie: Cutoff-Wert zwischen CF und Non-CF ermittelt aus Berliner Referenzwerten (CF > -7,4 mV). ΔPD: Änderung der Potentialdifferenz.



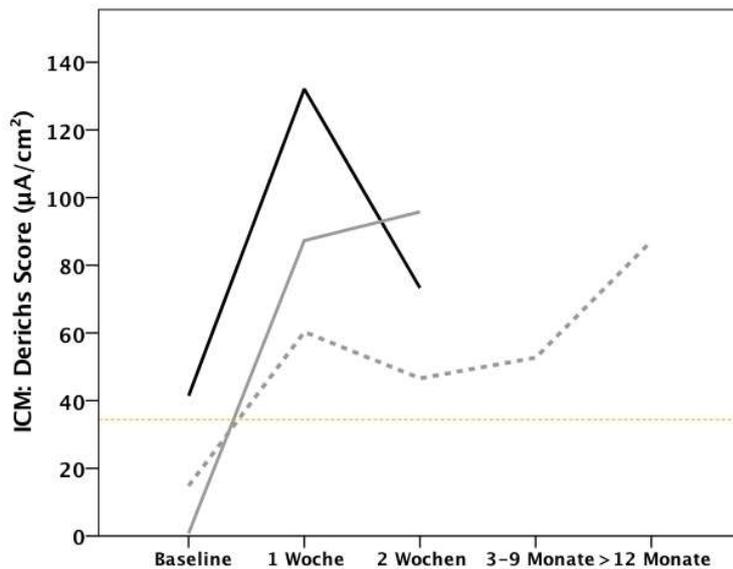
**Abb. 31.3: NPD - Wilschanski Score im Behandlungsverlauf (Ivacaftor).**

Wilschanski Score (jeweils Mittelwerte aus rechtem und linkem Nasenloch) von 4 Patienten mit der G551D-Mutation (schwarze, graue, schwarz gestrichelte und grau gestrichelte Linien) zu 5 verschiedenen Messzeitpunkten der Ivacaftorbehandlung (Baseline = direkt vor Behandlungsbeginn); orange gepunktete Linie: Cutoff-Wert zwischen CF und Non-CF (AUC) ermittelt aus Berliner Referenzwerten (CF > 0,5). Wilschanski Score: Exponent aus dem Verhältnis Chloridfrei+Iso und Amilorid ( $e^{\Delta PD \text{ Chloridfrei+Iso} / \Delta PD \text{ Amilorid}}$ ) (162).



**Abb. 32.1: ICM –  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX (in  $\mu A/cm^2$ ) im Behandlungsverlauf (Ivacaftor).**

ICM-Anwort auf Forskolin/IBMX (jeweils Mittelwerte aus 4-8 Biopsien) von 3 Patienten mit der G551D-Mutation (schwarze, graue und grau gestrichelte Linie) zu 5 verschiedenen Messzeitpunkten der Ivacaftorbehandlung. Orange gepunktete Linie: Cutoff-Wert zwischen CF und Non-CF ermittelt aus Berliner Referenzwerten (CF < 12,7  $\mu A/cm^2$ ).  $\Delta I_{sc}$ : Änderung des Kurzschlussstroms; IBMX: 3-Isobutyl-1-Methylxanthin.



**Abb. 32.2: ICM - Derichs Score (in  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) im Behandlungsverlauf (Ivacaftor).**

Summe aus den ICM-Anworten  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  Carbachol und  $\Delta I_{sc}$  Histamin (jeweils Mittelwerte aus 4-8 Biopsien) von 3 Patienten mit der G551D-Mutation (schwarze, graue und grau gestrichelte Linie) zu 5 verschiedenen Messzeitpunkten der Ivacaftorbehandlung. Orange gepunktete Linie: Cutoff-Wert zwischen CF und Non-CF ermittelt aus Berliner Referenzwerten (CF < 36,7  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ).

### 3.5.2. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Ivacaftor

Um die Pharmakokinetik von Ivacaftor darzustellen, wurde der Wirkverlauf des CFTR-Potentiators nach der morgendlichen Einnahme bei drei der G551D-Patienten ermittelt und parallel dazu die CFTR-Funktion mit den drei Biomarkern untersucht. Dabei zeigten sich organspezifische Unterschiede.

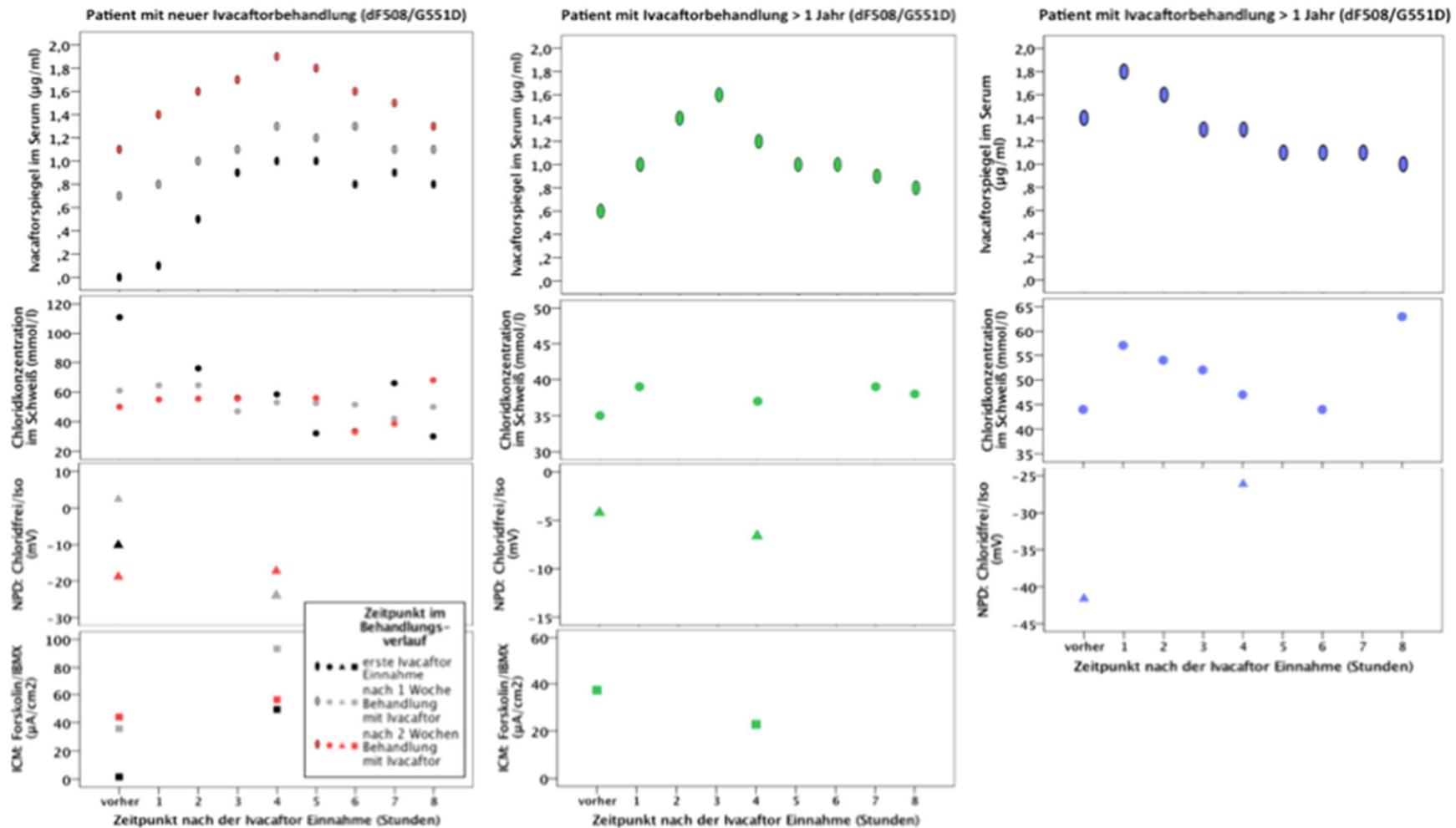
Ein G551D-Mutationsträger begann die Behandlung mit dem Potentiator komplett neu. Hier wurde die Pharmakokinetik bei kurzfristiger Behandlung mit Ivacaftor und deren Entwicklung nach ein und zwei Wochen evaluiert. Bei den anderen beiden Patienten wurde die Pharmakokinetik bei langfristiger Behandlung mit dem CFTR-Potentiator ermittelt, da die Therapie mit Ivacaftor schon mehr als ein Jahr durchgeführt wurde.

Zunächst wurden die Medikamentenspiegel im Serum vor der Einnahme von Ivacaftor sowie stündlich (1 bis 8 Stunden) danach bestimmt. Beim erstmalig behandelten Patienten erreichten die Ivacaftorspiegel vier Stunden nach der Einnahme ihren Peak bei den drei Messzeitpunkten CFTR<sub>0-2</sub> (Abb. 33, links/schwarze, graue und rote Markierungen). Bei der langfristigen Einnahme erreichten die Medikamentenspiegel nach der morgendlichen Dosis schneller ihr Maximum – nach einer Stunde (Abb. 33, rechts/blau) beziehungsweise nach drei Stunden (Abb. 33, Mitte/grün).

Die Chloridkonzentration im Schweiß wurde zeitgleich zu den Ivacaftor-Medikamentenspiegeln stündlich bestimmt. Bei dem Patienten mit der neuen Ivacaftor-Therapie (Abb. 33, links) sank der ST vom typischen CF-Bereich im Verlauf (1 bis 8 Stunden nach Einnahme) auf normale Werte ab (CFTR<sub>0</sub>, Abb. 33, links/ *schwarz*) und hielt sich bei CFTR<sub>1</sub> (Abb. 33, links/ *grau*) und CFTR<sub>2</sub> (Abb. 33, links/ *rot*) auf diesem Niveau. Die beiden anderen Patienten, die zum Zeitpunkt CFTR<sub>4</sub> untersucht wurden, zeigten vor der Routineverabreichung und bis acht Stunden danach weiterhin normalisierte ST-Werte < 60 mmol/l mit leichter individueller Variabilität (Abb. 33, Mitte/ *grün* und rechts/ *blau*).

NPD und ICM wurden wegen der Dauer der einzelnen Untersuchungen lediglich an zwei Zeitpunkten zur Beurteilung der Pharmakokinetik durchgeführt: vor der Ivacaftoreinnahme und vier Stunden danach. Die NPD-Parameter verhielten sich bei den drei kurz- und langfristig evaluierten G551D-Trägern vor der Einnahme und nach vier Stunden inkonsistent (Abb. 33). ICM dagegen indizierte bei der erstmaligen Behandlung mit Ivacaftor eine Verbesserung der CFTR-Funktion auf das Normalniveau von gesunden Kontrollen (CFTR<sub>0</sub>, Abb. 33, links/ *schwarz*). In den beiden Folgewochen blieben die ICM-Werte im Non-CF-Bereich mit jeweils mehr CFTR-Aktivität vier Stunden nach der morgendlichen Einnahme als davor (CFTR<sub>1/2</sub>, Abb. 33, links/ *grau und rot*). Lediglich bei der Ivacaftor-Dauertherapie (CFTR<sub>4</sub>) verschlechterte sich die mit ICM ermittelte CFTR-Aktivität nach der Routineeinnahme im Vergleich zu vorher etwas, blieb allerdings innerhalb des Non-CF-Bereichs (Abb. 33, Mitte/ *grün*).

Diese Ergebnisse weisen auf wichtige organspezifische Unterschiede der Ansprechbarkeit auf eine in vivo Behandlung mit CFTR-Modulatoren hin.



**Abb. 33: Pharmakokinetik von Ivacaftor.**

Erfassung des Ivacaftorspiegels im Serum bei drei G551D-Trägern vor der Einnahme und stündlich danach. Parallel dazu stündliche CFTR-Funktionsanalyse mit ST (Chloridgehalt im Schweiß in mmol/l), NPD- ( $\Delta$ PD Chloridfrei/Isoproterenol in mV) und ICM-Messung ( $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX in  $\mu A/cm^2$ ) vor der Einnahme und 4 Stunden danach.

Links: Patient mit neuer Ivacaftorbehandlung im Behandlungsverlauf (schwarz: erste Einnahme; grau: nach 1 Woche; rot: nach 2 Wochen).

Mitte: Patient mit Ivacaftorbehandlung seit mehr als 12 Monaten (grün).

Rechts: Patient mit Ivacaftorbehandlung seit mehr als 12 Monaten (blau), keine ICM vorliegend.

## 4. Diskussion

Durch die kürzliche Einführung des Neugeborenen Screenings werden die Zahlen asymptomatischer CF-Patienten steigen, bei denen ST-Werte im Grenzbereich sind oder CFTR-Genmutationen unbekannter klinischer Relevanz. Untersucher vor neue diagnostische Herausforderungen stellen (214). Eine frühzeitige Diagnosestellung in spezialisierten Zentren ist für den zeitnahen Therapiebeginn wichtig, der das Ausmaß der Organzerstörung sowie die Lebensqualität und -erwartung maßgeblich beeinflussen kann (14,215). CFTR Bioassays wie NPD und ICM können bei unklaren Fällen zur Unterscheidung von Kontrollen und CF-Patienten mit milden Verläufen herangezogen werden, wobei sich bei Neugeborenen insbesondere die ICM eignet. Referenz- und Cutoff-Werte für standardisierte Protokolle sind zur weiteren Etablierung der Biomarker in diagnostischen Algorithmen erforderlich. Zur Effektevaluation von CFTR-Modulatoren sollten die CFTR-Biomarker weiter validiert und ihre Eignung als prädiktive Biomarker überprüft werden.

Beim Berliner Vergleich der CFTR-Funktion in drei Organen waren der ST, sowie zwei NPD- und die untersuchten ICM-Parameter exzellent geeignet, um zwischen gesunden Kontrollen und CF-Patienten zu differenzieren. Es wurden eindeutige Cutpoints zwischen CF und Non-CF ermittelt. Zwischen PI-CF und PS-CF konnten die CFTR-Biomarker weniger gut differenzieren. Univariat eignete sich der ST am besten, mit neuronalen Netzen konnte multivariat auch eindeutig zwischen PI-CF und PS-CF unterschieden werden. Die SOMs zeigten, dass gesunde Kontrollen und PI-CF Patienten in jeweils zwei bisher unbekannte Subtypen mit noch unklarer Relevanz eingeteilt werden konnten.

Die Berliner ICM-Referenzwerte wurden erstmals extern durch ICM-Messungen an zwei weiteren europäischen Zentren validiert, die ebenfalls das ECFS SOP verwendeten. Im Zuge dieser Validierung wurden bei einem der drei Zentren signifikant höhere ICM-Antworten gemessen während sich zwischen den anderen beiden Zentren keine signifikanten Unterschiede zeigten. Nach einer Reevaluation konnten die quantitativ höheren Werte von Zentrum 3 auf eine höhere Gasflussgeschwindigkeit in den Ussingkammern zurückgeführt werden. Die externe Validierung unterstützt die Eignung von ICM für multizentrische Settings.

Bei der Evaluation des Behandlungseffekts und der Pharmakokinetik von Ivacaftor bei vier Patienten mit der G551D-Mutation zeigten sich organspezifische Unterschiede, wobei die Erfassung der CFTR-Funktion mit ST und ICM konsistenter war als mit der NPD-Messung.

## **4.1. Neue ECFS-Referenzwerte zur Klassifikation in Kontrollen und CF**

Ein Ziel dieser Studie war, unizentrisch Referenzwerte für NPD und ICM unter erstmaliger Anwendung der aktuellen ECFS SOPs zu bestimmen sowie diagnostische Cutoffs zur Unterscheidung zwischen Non-CF und CF zu finden. Die CFTR-Funktion in der Schweißdrüse, dem Atemwegs- und Darmepithel wurde erstmals gleichzeitig ermittelt und miteinander verglichen. ST, NPD und ICM zeigten exzellente diagnostische Verlässlichkeit um zwischen Kontrollen und CF zu unterscheiden. Bei der univariaten Analyse der einzelnen Parameter der CFTR-Biomarker lieferten der Chloridgehalt im Schweiß, der Wilschanski Score (NPD), der Derichs Score (ICM) und CCH pre Washout (ICM) die besten Cutoff-Werte zur Differenzierung zwischen CF und Non-CF.

### **4.1.1. Vorzüge und Grenzen des Schweißtests**

Für unsere Patientenkohorte präsentierte sich der Chloridgehalt im Schweiß als exzellenter Biomarker zur Diskriminierung zwischen CF und Non-CF mit einer AUC von 1 und lieferte einen perfekten Cutoff zwischen CF und Non-CF bei 46,5 mmol/l. In der Vergangenheit wurde der diagnostische ST-Cutoff von 60 mmol/l zur Differenzierung zwischen typischen CF-Patienten und Gesunden etabliert (39), wobei ein diagnostischer Graubereich zwischen 30 und 59 mmol/l bei ca. 5% der Patienten mit atypischer CF ermittelt wurde (160,167). In unserer Studie wies nur ein CF-Patient einen ST-Wert unter 59mmol/l auf – somit stehen unsere Daten nicht im Widerspruch zum bekannten ST-Cutoff für CF von 60mmol/l. Bei vielen gesunden Probanden wurden allerdings Werte zwischen 30 und 46,5 mmol/l erhoben und bestätigen damit auch den diagnostischen Überlappungsbereich (zwischen 30 und 59 mmol/l). Über eine obere Grenze des STs für Gesunde bei 40 mmol/l (statt bei 30 mmol/l) wurde interessanterweise in früheren Leitlinien schon diskutiert (95). Der hier ermittelte ST-Cutoff-Wert von 46,5 mmol/l könnte in weiteren Studien an atypischen Patienten mit milden CF-Verläufen oder Patienten mit CFTR-RD weiter überprüft werden.

Der Schweißtest ist nach wie vor die diagnostische Methode der ersten Wahl, da er sich durch seine altersunabhängige Durchführbarkeit, flächendeckende Verfügbarkeit, Noninvasivität, Verlässlichkeit und nicht zuletzt Kosteneffizienz auszeichnet (39,95,97,102,103). Ein Vorteil des STs ist die Überprüfung der CFTR-Funktion in einem Organ, welches von Inflammation und Infektionen nicht betroffen ist. Dennoch spiegelt er auch die Funktion des epithelialen Natriumkanal ENaC wider, da sowohl die Natrium- als auch die Chloridabsorption vom Schweißtest untrennbar voneinander erfasst werden (51). Trotz seiner sehr hohen Sensitivität

und Spezifität (97) kann es durch methodisch-technische Fehler und Abweichungen von standardisierten Techniken zu falsch-positiven oder falsch-negativen Befunden kommen (20,53). Auch bei Babys mit einem positiven Neugeborenencreening, bei denen die Diagnose durch den ST bestätigt werden muss (96,216), kann es bei der Durchführung des STs zu falschen Ergebnissen durch Abweichungen von existierenden Guidelines (217) kommen.

Zur Bestimmung der Chloridkonzentration im Schweiß ist die Gewinnung einer bestimmten Schweißmenge erforderlich, was sich besonders bei Neugeborenen mitunter schwierig gestaltet. Zur Bestimmung der Chloridleitfähigkeit wird dagegen weniger Schweiß benötigt. Diese Methode galt bis dato als ungenauer, da mit dem Nanoduct System die Summe aller Ionenströme erfasst wird. In kürzlich erschienenen Studien wurde allerdings unter Anwendung beider Verfahren auf gleiche Ergebnisse hingewiesen, wobei die Leitfähigkeit leichter zu erheben war (218,219). Die Variabilität des Schweißtests bezieht sich vor allem auf unterschiedliche CFTR-Mutationen (220). Es kann aber auch vorkommen, dass wiederholte Messungen bei einem Patienten durch leichte Abweichungen zu verschiedenen Messzeitpunkten besonders bei Betroffenen mit Werten im diagnostischen Graubereich zu unterschiedlicher diagnostischer Einordnung führen (152,153). Das unterstreicht die Wichtigkeit anderer Verfahren zur Erfassung der CFTR-Aktivität.

#### **4.1.2. Vor- und Nachteile der nasalen Potentialdifferenzmessung (NPD)**

Unsere Daten unterstützen neben dem Schweißtest auch die Eignung von NPD zur Diagnosestellung. Mit dem Wilschanski NPD Score konnte in unserer Studie mit einer Sensitivität und Spezifität von 100% zwischen Non-CF und CF unterschieden werden. Im Gegensatz zum Cutoff-Wert von Wilschanski et al. 2001 ( $CF > 0,7$ ) wurde in unserer Studie unter Anwendung des ECFS NPD SOPs allerdings ein modifizierter Cutoff-Wert von  $> 0,5$  für CF-Patienten ermittelt. Diese Ergebnisse unterstreichen die diagnostische Wertigkeit des Wilschanski Index, der sowohl die Transporteigenschaften von  $Na^+$  als auch von  $Cl^-$  berücksichtigt (162).

Wenngleich bei der CFTR-Funktion der Überlappungsbereich zwischen CF-Patienten und Kontrollen in der Vergangenheit bei NPD häufig größer war als bei ICM (160,162,168,206,221), so war NPD doch hilfreich zur Diagnosefindung. Wie oben erwähnt, wurden dann zusammengesetzte NPD-Scores aus der Natrium- und Chlorid-Antwort zur Differenzierung zwischen CF und Kontrollen herangezogen (162,169). Weitere aktuelle Studien unterstützen, dass NPD geeignet ist, um die Diagnose CF zu bestätigen oder auszuschließen (222,223). Die diagnostische Abgrenzung zwischen CFTR-RD und CF einerseits sowie Non-CF andererseits

war mittels NPD zwar erleichtert, allerdings dennoch nicht in allen Fällen eindeutig möglich (110).

Ein Vorteil der NPD ist, dass mit ihr die CFTR-Funktion des Epithels im oberen Respirationstrakt erfasst wird. Dadurch lassen sich am ehesten Rückschlüsse auf das Ausmaß der Lungenerstörung ziehen. NPD ist allerdings zeitaufwändig und nur eingeschränkt im klinischen Alltag verfügbar, da sie technisch herausfordernd ist und damit nur Zentren und Fachpersonal mit der nötigen Expertise vorbehalten bleibt. NPD erfordert eine gute Compliance der Patienten und ist für Kinder im Vorschulalter schlecht geeignet, da die etwa 30-minütige Messung in jedem Nasenloch stilles Sitzen erfordert. Nur wenige Zentren haben mit einem veränderten Kurz-Protokoll Messungen bei kleinen Kindern durchgeführt (224–226). Mögliche Vorschädigungen des Gewebes durch Rhinitis oder anatomische Veränderungen können zu einem veränderten basalen PD mit falsch-positiven Befunden im Sinne einer CF führen und müssen im Vorfeld ausgeschlossen werden. Ein weiterer Nachteil ist die intra-individuelle Variabilität bei den Patienten von Untersuchung zu Untersuchung (154,160,227). Messfaktoren wie z.B. eine veränderte Positionierung oder Fixierung des Katheters, Änderungen beim Offset der Elektroden oder der Stabilität des Messniveaus können zu einer Variabilität der NPD-Messung führen. Durch NPD-Messungen in beiden Nasenlöchern (177) und Verwendung eines Katheters mit größerer Messoberfläche (155) kann die Variabilität eingegrenzt werden. Zur Reproduzierbarkeit (227) und langfristigen Validität der NPD (228) gibt es einzelne Daten. Die Reproduzierbarkeit steigt, wenn NPD am gleichen Standort in einem CF-Zentrum durchgeführt wird (97,106). NPD-Tracings werden von verschiedenen Experten zwar generell übereinstimmend ausgewertet, dennoch ist die Übereinstimmung dann geringer, wenn es zu unterschiedlichen Messergebnissen in beiden Nasenlöchern kommt (107). Trotz erster Standardisierungsversuche fehlen weiterhin valide multizentrische Referenzwerte für NPD, an denen derzeit von einer ECFS-Forschergruppe gearbeitet wird.

#### **4.1.3. Möglichkeiten der intestinalen Kurzschlussstrommessung (ICM)**

ICM ist wie NPD besonders dann diagnostisch geeignet, wenn der ST im Intermediarbereich liegt, nur eine CF-verursachende CFTR-Mutation nachgewiesen werden konnte oder CFTR-Varianten unklarer klinischer Signifikanz ermittelt wurden (108,229,230). ICM eignet sich wie auch der ST und NPD eindeutig zur Differenzierung zwischen Gesunden und CF-Patienten. Die diagnostische Verlässlichkeit war bei den Parametern  $\Delta I_{sc}$  Forsk/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  CCH,  $\Delta I_{sc}$  Hista,  $\Delta I_{sc}$  CCH pre Washout sowie Derichs Score exzellent. Die ICM-Amiloridantwort wurde auf

Grund von früher ermittelten Überschneidungen zwischen Kontrollen und CF (108,185,229) in unserer Studie im Gegensatz zur NPD-Amiloridantwort nicht zur Unterscheidung herangezogen. Der früher ermittelte Cutoff-Wert von Derichs et al.  $\Delta I_{sc}$  Forsk/IBMX+CCH+Hista als Abbild der kumulativen cAMP- und cholinerg-vermittelten Chloridantwort betrug  $34,4 \mu A/cm^2$  und wies eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100% auf (108). Unsere unizentrischen Ergebnisse bestätigten den Cutoff-Wert des Derichs Scores (hier je nach verwendetem statistischen Verfahren um  $36 \mu A/cm^2$ ) mit gleicher Sensitivität und Spezifität. Die Summe aus  $\Delta I_{sc}$  Forsk/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  CCH und  $\Delta I_{sc}$  Hista als Derichs Score (108) wies damit eine sehr gute Klassifikationsgenauigkeit auf. Der Test auf Gleichheit der ICM-Parameter ergab, dass keine Unterschiede zwischen  $\Delta I_{sc}$  Forsk/IBMX,  $\Delta I_{sc}$  CCH,  $\Delta I_{sc}$  Hista, Derichs Score sowie  $\Delta I_{sc}$  CCH pre Washout bestehen. Somit ist der Derichs Score zur Differenzierung zwischen CF und Non-CF statistisch also nicht besser geeignet als die ebenfalls exzellenten Einzelparameter. An dieser Stelle sei noch angemerkt, dass Derichs et al. von einem Cutpoint zwischen Kontrollen und PS-CF gesprochen hatten (108). Allerdings können Patienten mit Werten unterhalb des Cutoffs nicht nur pankreassuffizient sondern auch pankreasinsuffizient sein. In unserer vorliegenden Studie wurde darum zunächst zwischen gesunden Kontrollen und CF und im zweiten Schritt zwischen PI-CF und PS-CF diskriminiert. Dabei zeigte sich wie auch bei Derichs et al 2010 und weiteren (108,183,230), dass mit ICM alleine nicht eindeutig zwischen pankreassuffizienten und pankreasinsuffizienten CF-Patienten unterschieden werden kann (mehr dazu unter Kap. 4.2.).

Cohen-Cyberknoh et al. etablierten inzwischen ebenfalls unizentrische Referenzwerte in einer israelischen Kohorte auf der Basis des ECFS ICM SOPs (229), wobei sich deren Werte von unseren und den Referenzwerten von Derichs et al. 2010 unterschieden. Dennoch bestätigten die israelischen Daten die Zuverlässigkeit von ICM und ihren hohen prädiktiven Wert zur Diagnosestellung bei Patienten aller Altersklassen mit unklaren Standardtests und/oder seltenen CFTR-Mutationen unbekannter klinischer Bedeutung. Den Abweichungen könnten entweder unterschiedliche Studienpopulationen zu Grunde liegen oder Lücken bei der Standardisierung der ECFS-Protokolle. So zeigten sich bei der externen Validierung der Berliner ICM-Ergebnisse ebenfalls quantitative, wenn auch nicht qualitative Unterschiede der ICM-Antworten bei einem Zentrum. Nach einer Reevaluation konnten die höheren ICM-Werte auf eine schnellere Begabung der Biopsien in den Ussingkammern zurückgeführt werden (mehr dazu siehe Kapitel 4.3.). Diese Ergebnisse unterstreichen die Sensibilität des Messverfahrens und die Wichtigkeit der präzisen Standardisierung der SOPs für multizentrische Studien.

Bei Patienten mit fraglicher CFTR-RD war die diagnostische Einordnung mit ICM zwar spezifischer als mit NPD, aber dennoch nicht in allen Fällen eindeutig möglich (110). Die

Eignung der rektalen CFTR-vermittelten Chloridsekretion zur Klassifizierung in CF und Non-CF zeigte sich auch in anderen Studien, wenn sich auch die verwendeten ICM-Protokolle teilweise unterschieden (183,185,230): mit ICM wird meistens entweder nach dem Rotterdam-Protokoll der Kurzschlussstrom des transepithelialen Ionenflusses bei geschlossenem Kreislauf in rezirkulierenden Ussing-Kammern ermittelt (164) oder nach dem Freiburg-Protokoll die Spannung im offenen Kreislauf (165,183). Bisher eigneten sich beide Protokolle sowohl zur CF-Diagnosestellung als auch zur präklinischen Effektmessung von CFTR-modulierenden Substanzen (183,198–200). Standardmäßig wird allerdings momentan in Europa und Nordamerika (185,229,230) das modifizierte Rotterdamprotokoll verwendet (108,184), welches auch Grundlage unserer Erhebungen war. Die Vor- und Nachteile der beiden ICM-Methoden werden bei De Boeck et al 2011 detailliert erläutert (182). Die ICM-Ergebnisse waren darüber hinaus unabhängig von der Art der Biopsieentnahme mittels Vakuumsaugtechnik oder Forzepszange (185).

Der bisher zur Diagnosestellung wenig untersuchte Parameter  $\Delta I_{sc}$  CCH pre Washout wurde zunächst zur Überprüfung der Biopsie auf korrekte Orientierung in der Ussing-Kammer im überarbeiteten Rotterdam-Protokoll etabliert (184). Auch  $\Delta I_{sc}$  CCH wies bei der Unterscheidung zwischen Kontrollen und CF einen eindeutigen Cutpoint auf. Die Eignung von  $\Delta I_{sc}$  CCH pre Washout zur Einschätzung der CFTR-Restfunktion wurde kürzlich bestätigt (110). Der Vorteil dieses Parameters ist, dass die cholinerg-vermittelte CFTR-Aktivität ohne cAMP-abhängige Kostimulation durch Forskolin/IBMX ermittelt werden kann. CCH pre Washout könnte dadurch ergänzende Informationen zu den bisher verwendeten Parametern liefern. Dabei bewirkt der Kalziumaktivator Carbachol eine Öffnung der apikalen CFTR-Kanäle über die elektrische Triebkraft basolateraler Kaliumkanäle. Die Antwort auf CCH oder Hista ist also ein Zusammenwirken aus der Chloridsekretion - die sich bei Non-CF als positiver Gipfel des  $I_{sc}$  zeigt - und Kaliumströmen - die bei CF als negative Gipfel des  $I_{sc}$  erkennbar sind. Da es bisher keine Möglichkeit zur Kaliumblockade gibt, ist eine alleinige Untersuchung der CFTR-Chloridkanäle nicht möglich (182). Bei wenig CFTR-Restfunktion könnte eine geringe Chloridsekretion der CCH- oder Hista-Antwort möglicherweise also durch den gegenläufigen Kaliumeffekt verdeckt werden (108).

ICM bietet gegenüber NPD gewisse Vorteile: die Messung kann auch bei kleinen Kindern und Säuglingen gut durchgeführt werden, ist kurz und schmerzlos und wird von den Patienten generell gut toleriert (97,182,183). Bei dieser Methode werden äußere Störeinflüsse durch die ex vivo Bedingungen im Labor auf ein geringeres Maß als bei der in vivo NPD-Messung reduziert. Die Erfassung des intestinalen Kurzschlussstroms erfolgt am rektalen Gewebe, welches CFTR

stark expremiert, aber vom Erkrankungsprogress überwiegend unbetroffen bleibt (208). So können durch Organzerstörung bedingte Messfehler minimiert werden, aber Rückschlüsse auf den klinischen Status des Lungengewebes könnten schwieriger sein. Ein weiterer Vorteil der ICM ist, dass (neue) CFTR-Modulatoren an humanem Gewebe ex vivo getestet werden können, also ohne Risiko für den Patienten. Die Wirkung der Substanzen zeigt sich hier sehr schnell auf Grund des hohen Zellumsatzes im Rektum (208). Unklar ist allerdings noch, ob ein schnell wirkender Potentiator in der Ussing Kammer unbeabsichtigt wieder ausgewaschen werden könnte. Bei Einnahme eines CFTR-Potentiators in vivo könnte dessen Effekt dann bei der Evaluation mit ICM ex vivo unterschätzt werden (182).

Mit ICM konnten einerseits geringe Mengen funktionellen CFTRs entdeckt werden, welche mit anderen Methoden der Messung entgangen wären (182). Andererseits wurde unter Anwendung des Rotterdam-Protokolls berichtet, dass milde CFTR-Mutationen mit einer Expression des CFTR-Proteins von mehr als 20% (also mit Restfunktion und einem CFTR-Verlust von weniger als 80%) der Entdeckung durch ICM entgehen könnten. In diesen Fällen sollte die CFTR-Leitfähigkeit für den Chloridtransport nicht mehr limitierend sein: die ICM-Antworten sollten zur Anzahl von CFTR in der apikalen Kolonozytenmembran nur dann proportional sein, wenn wenig Kanäle vorhanden wären. Dadurch könnte es zu falsch-negativen Messungen kommen (164).

Für Patienten mit Blutungsneigung ist die ICM ungeeignet, da es nach der Biospieentnahme gelegentlich zu einer kurzzeitigen oberflächlichen rektalen Schleimhautblutung kommen kann (184,185). Das Verfahren bleibt wie NPD ebenfalls nur wenigen Zentren mit der nötigen Expertise vorbehalten und erfordert einen hohen Zeitaufwand.

#### **4.1.4. Vergleich von ST, NPD und ICM zur Klassifikation in CF und Non-CF**

Derichs Score, ST und Wilschanski Score konnten jeweils über eine komplexe Funktion auseinander berechnet werden. Dies liefert eine Begründung, warum diese Biomarker eine ähnliche Klassifikationsgenauigkeit haben. In einem multiplen linearen Regressionsmodell zur Klassifikation zwischen Kontrollen und CF in dem auch die NPD- und ICM-Parameter mit eingeschlossen wurden, war der ST der einzige signifikante Biomarker.

Eine aktuelle Studie von Wilschanski et al ergab, dass die elektrophysiologische Messung der CFTR-Aktivität mit NPD und ICM linear korreliert und die diskriminative Validität der beiden Biomarker zwischen normaler und beeinträchtigter CFTR Funktion vergleichbar ist (231). In unseren Daten wurde zwar kein linearer Zusammenhang zwischen NPD und ICM ermittelt,

dennoch waren der ST wie auch NPD und ICM zur Klassifikation zwischen CF und Non-CF gleich gut geeignet. Bei Wilschanski et al. 2016 wurden im Gegensatz zu unserer Studie nur Kontrollen und PI-CF Patienten, allerdings keine PS-CF Patienten eingeschlossen.

In einer anderen aktuellen Untersuchung von Bagheri-Hanson et al. 2014 war die ICM der NPD-Messung im Gegensatz zu den vorliegenden Daten überlegen. Auch hier wurden respiratorisches und intestinales Epithel bezüglich ihrer Diskriminationsfähigkeit zwischen Non-CF und CF-Patienten verglichen, wobei der Einschluss von Rauchern in der Kontrollgruppe deren Ergebnisse möglicherweise beeinflusst haben könnte (230). Generell unterscheidet sich die rektale Erfassung der Chloridsekretion von der Messung am respiratorischen Epithel dadurch, dass im intestinalen Epithel bisher, abgesehen von einer kleinen Gruppe homozygoter  $\Delta F508$ -Patienten (168,215), keine alternativen kalziumabhängigen Chloridkanäle nachgewiesen werden konnten. Die Daten von Bagheri-Hanson unterstützen andere Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass mit ICM die CFTR-Funktion spezifischer erfasst werden kann als mit NPD (182,230) (110).

Einige Arbeitsgruppen hatten Kombinationen von Parametern insbesondere in der Diagnostik von Patienten mit milden Phänotypen oder nur einem betroffenen Organ verwendet (232). Solche Marker könnten die organabhängig variierende Manifestation der CFTR-Dysfunktion mit berücksichtigen (222). Da in der Berliner Studie alle Parameter der CFTR-Biomarker einzeln schon exzellent zwischen CF und Kontrollen unterscheiden konnten, erschien es nicht notwendig, einen zusammengesetzten Marker aus den verschiedenen diagnostischen Bioassays zu entwickeln.

## **4.2. Klassifikation von PI-CF und PS-CF**

Die Klassifikation in pankreassuffiziente und pankreasinsuffiziente CF-Patienten mit den CFTR-Biomarkern wurde bisher noch nicht schwerpunktmäßig untersucht. Im klinischen Alltag finden die CFTR-Biomarker bisher bei dieser Unterscheidung nur wenig Anwendung, da die Einteilung auch mit der Pankreaselastase im Stuhl (wenig aufwendig) möglich ist. Da Messungen der Pankreaselastase allerdings nicht immer ganz zuverlässig sind und das Potential der CFTR-Biomarker in der CF-Diagnostik noch teilweise unklar ist, erschien auch deren Eignung zur Differenzierung zwischen PS-CF und PI-CF untersuchenswert.

Der Schweißtest war univariat der beste Parameter, um zwischen PI-CF und PS-CF zu differenzieren ( $p < 0,01$ ). Mit den ICM-Parametern  $\Delta I_{sc}$  Forskolin/IBMX und  $\Delta I_{sc}$  Carbachol pre Washout war eine Klassifikation zwischen den beiden CF-Gruppen ebenfalls möglich, wobei

keiner der Biomarker eine eindeutige Unterscheidung erlaubte. Bei allen anderen Parametern waren die Unterschiede nicht signifikant ( $p < 0,05$ ). Andere Arbeitsgruppen hatten gezeigt, dass weder mit NPD noch mit ICM zwischen pankreassuffizienten und pankreasinsuffizienten CF-Patienten unterschieden werden kann (108,183,230).

Multivariat konnte unter Anwendung eines fortgeschrittenen statistischen Verfahrens (Multilayer Perceptron Netz) dann eindeutig zwischen PI-CF und PS-CF unterschieden werden. Selbstorganisierenden Kohonenkarten (SOM) bestätigten, dass eine Differenzierung zwischen PS-CF und PI-CF mit den Biomarkern zu 100% möglich ist, da pankreassuffiziente und pankreasinsuffiziente Patienten in jeweils verschiedenen SOM-Klassen liegen. Die Probanden in einer Klasse sind bzgl. der CFTR-Biomarker maximal ähnlich zueinander und maximal verschieden von den Probanden in anderen Klassen (siehe Abb. 20). Das zu den komplexen SOMs ermittelte, vereinfachte Regelsystem zur Klassifikation von PI-CF und PS-CF könnte in herausfordernden diagnostischen Fällen möglicherweise angewendet werden. Die SOM-Klassen zeigten darüber hinaus, dass es zwei Typen von gesunden Kontrollen sowie zwei Typen von PI-CF Patienten mit jeweils unterschiedlichen Profilen gibt. Deren Relevanz sollte noch weiter untersucht werden, da diese Klassen bisher unbekannt waren. Für die CF-Typen könnten die Cluster auch im Hinblick auf die (personalisierte) Therapie z.B. mit CFTR-Modulatoren von Interesse sein.

### **4.3. Externe ICM-Validierung**

Darüber hinaus wurde ICM nach ECFS-Richtlinien erstmals multizentrisch durchgeführt und eine externe Überprüfung der unizentrischen ICM-Referenzwerte aus Berlin durch zwei weitere europäische Zentren zur weiteren Validierung des ECFS ICM SOPs vorgenommen.

Die Differenzierung zwischen Kontrollen und CF war mit den ICM-Werten der beiden anderen Zentren ebenso exzellent möglich wie mit den Berliner Vergleichswerten. Dabei waren alle untersuchten ICM-Parameter bei den drei Zentren äquivalent zur Diskriminierung geeignet. Auch wenn davon ausgegangen werden muss, dass das einfache Aufsummieren der drei ICM-Parameter nicht die beste aller möglichen Kombinationen zur Differenzierung darstellt, so wurde auf Grund der sehr guten diskriminativen Eigenschaften des Derichs Scores wie auch der Einzelparameter an dieser Stelle auf die Berechnung eines neuen, noch präziseren diagnostischen ICM-Markers verzichtet. Der in Berlin mit ROC ermittelte Cutoff-Wert für den Derichs Score von  $36,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  wurde durch Zentrum 2 mit  $39,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  untermauert und die Ergebnisse von Derichs et al. 2010 für die Summe aus  $\Delta I_{\text{sc}}$  Forsk/IBMX,  $\Delta I_{\text{sc}}$  CCH und  $\Delta I_{\text{sc}}$  Hista bestätigt (108).

Zentrum 3 lieferte quantitativ höhere  $I_{sc}$ -Werte, worauf nach dem nächsten Absatz noch intensiver eingegangen wird.

Auch in einer multizentrischen ICM-Studie von Clancy et al hatte sich gezeigt, dass alle CFTR-abhängigen Parameter die gleiche Sensitivität zur Klassifikation in CF und gesunde Kontrollen hatten (185). Die Referenzwerte von Clancy et al. 2013 unterschieden sich allerdings von unseren bezüglich der absoluten  $I_{sc}$ -Werte. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass von dieser Forschungsgruppe ein anderes ICM-Protokoll verwendet worden war, welches nicht von einer Institution wie der europäischen CF-Gesellschaft (ECFS) entwickelt worden war.

Auch bei unserer Studie unterschieden sich die ICM-Werte von Zentrum 3 trotz quantitativer Vergleichbarkeit in der Höhe der  $I_{sc}$ -Werte von Zentrum 1 und 2. Zwischen Berlin und Zentrum 2 waren die ICM-Antworten vergleichbar. Weitere Untersuchungen erbrachten, dass bei der sehr stark standardisierten Durchführung die Gassflussgeschwindigkeit in den Ussingkammern nicht berücksichtigt worden war. Durch eine schnellere Begasung der Biopsien in den Ussing Kammern bei Zentrum 3 war es so zu höheren ICM-Antworten gekommen. Eine Vereinheitlichung der Gassflussrate im SOP wäre hier nötig und könnte zum Beispiel durch ein Video mit definierter Begasungsgeschwindigkeit erreicht werden.

Quantitative Unterschiede wurden allerdings nicht nur bei unserer externen ICM-Validierung festgestellt. Cohen-Cymerknoh et al ermittelten 2013 im Vergleich zu den vorliegenden ICM-Ergebnissen niedrigere Werte. In deren Studie wurde ICM, wenn auch nicht unter multizentrischen Bedingungen, nach dem alten Rotterdam-Protokoll durchgeführt, welches dem in unserer Studie verwendeten ECFS ICM SOP sehr ähnlich ist. Ob diese quantitativen Unterschiede auch auf die Gasflussgeschwindigkeit zurückzuführen sind, wurde in dieser Studie nicht untersucht. Es wäre interessant herauszufinden, ob es noch weitere Gründe für das unterschiedliche Ausmaß der ICM-Antworten verschiedener Zentren gibt und ob neben Unterschieden zwischen den Protokollen z.B. auch die Heterogenität der Studienpopulationen und Forschungslabore zu gewissen Differenzen geführt haben könnte.

An den vorliegenden Ergebnissen zeigt sich, dass die multizentrische Standardisierung von ICM herausfordernd aber äußerst sinnvoll und zur Diagnosesicherung und Weiterentwicklung der Evaluation von CFTR-Modulatoreffekten unerlässlich ist.

#### **4.4. Organspezifischer Effekt von Ivacaftor bei vier G551D-Patienten als Ausblick für den Einsatz von ST, NPD und ICM in zukünftigen CFTR-Modulator-Studien**

Ergänzend wurden bei vier CF-Patienten mit der genetischen Mutation G551D die personalisierten Effekte des ersten zugelassenen CFTR-Potentiators Ivacaftor unter Anwendung der diagnostischen Referenzwerte von ST, NPD und ICM kurz-, mittel- und langfristig evaluiert. Diese Untersuchungen waren Einzelfallanalysen und sind von daher eher als Ausblick für zukünftige klinische Studien zu CFTR-Modulatoren hinsichtlich der Anwendung von ST, NPD und ICM als prädiktive Biomarker zu verstehen (248).

Während mit dem ST und der ICM unter der Ivacaftorbehandlung sowohl kurz- bis langfristig als auch bei der Untersuchung der Pharmakokinetik von Ivacaftor im Wesentlichen eine Normalisierung der CFTR-Funktion auffiel, so waren die Effekte von Ivacaftor mit NPD nur kurzfristig nachweisbar. Diese Unterschiede bei der Verbesserung der CFTR-Funktion deuten auf organspezifische Differenzen bei der Ansprechbarkeit auf eine in vivo Behandlung mit dem CFTR-Potentiator hin, wovon schon länger ausgegangen wird (108).

In einer neuen Untersuchung von Mesbahi et al. zum Effekt von Ivacaftor bei einzelnen Patienten mit verschiedenen Genmutationen wurden ebenfalls Unterschiede zwischen den verschiedenen Endorganen festgestellt (235). Auch in einer kürzlich erschienen Veröffentlichung von Graeber et al zeigten sich Differenzen bei der Verbesserung der CFTR-Funktion zwischen NPD und ICM während einer Behandlung mit dem CFTR-Korrektor Lumacaftor in Kombination mit Ivacaftor. Dabei wurde keine Korrelation mit den klinischen Parametern FEV<sub>1</sub> und BMI festgestellt (234). Auf Grund der festgestellten Organspezifität ist die Erhebung aller CFTR-Biomarker nicht nur zur diagnostischen Interpretation sondern auch bei der Effektevaluation von CFTR-Modulatoren in Langzeitstudien wichtig (222). Die variablen Antworten verschiedener Gewebe auf pharmakologische CFTR-Modulation könnten möglicherweise auf unterschiedliche Penetranz der CFTR-Dysfunktion oder verschiedener Pathophysiologie und Bioverfügbarkeit zurückzuführen sein (231,234).

Neu ist in diesem Zusammenhang neben dem Organvergleich auch der Einsatz von ICM. In der Vergangenheit wurden in Studien nur ST und NPD als klinische Endpunkte zur pharmakologischen CFTR-Modulation eingesetzt und lieferten widersprüchliche Ergebnisse zu deren Eignung, wobei auch hier der ST in vielen Fällen besser abschnitt als NPD (19,128,132,133,138–142,191,193,194). Im Gegensatz dazu wurde ICM bisher hauptsächlich in präklinischen Studien zur Effektevaluation eingesetzt, die Änderungen der CFTR-Funktion unter

pharmakologischer Modulation nachweisen konnten (198–200), bis kürzlich in einer kleinen klinischen Studie mit ICM erstmals die CFTR-Aktivierung während einer Therapie mit Ivacaftor bei Patienten mit der G551D Mutation gezeigt werden konnte (157). Diese Untersuchungen deuten ebenfalls darauf hin, dass ICM als neuer Bioassay zur Quantifizierung der verbesserten CFTR-Aktivität geeignet sein könnte.

Das geringere Ansprechen der NPD auf die Ivacaftor-Behandlung wirft Fragen bezüglich der Eignung des Nasenepithels zur Effektmessung auf. Unterschiede zwischen NPD und ICM könnten unter anderem auf eine stärkere Schädigung des Atemwegsepithels im Vergleich zur sich schnell erneuernden Darmschleimhaut zurückzuführen sein (208). NPD könnte im Gegensatz zu ICM durch Nasenpolypen und kleine chirurgische Eingriffe, Infektionen (235), geringere CFTR-Expression (236,237) und erhöhte parazelluläre Permeabilität (238) beeinflusst werden. In der Vergangenheit wurden auch große Unterschiede bei der CFTR-Expression im respiratorischen und intestinalen Gewebe bei  $\Delta F508$ -Homozygoten gefunden (239,240). Eine mögliche Erklärung dafür könnte der fehlende alternative Chloridtransport im Rektum sein mit CFTR als einzigem Anionenkanal (171,208,212). Andere Forscher wiederum beschrieben identische CFTR-Expressionen in Nase und Darm (241). Da die genauere Erforschung dieser Mechanismen nicht Gegenstand unserer Studie war, wäre dies gegebenenfalls für weitere Untersuchungen von Interesse.

Für  $\Delta F508$ -Patienten sind inzwischen die beiden Kombinationen aus CFTR-Potentiator und CFTR-Korrektor, Lumacaftor+Ivacaftor (Orkambi) und Tezacaftor+Ivacaftor (Symkevi), zugelassen (249-253). Deren Verbesserungen der Lungenfunktion sind allerdings hinter den Erwartungen zurück geblieben und es wird weiter an anderen Kombinationen und Medikamenten geforscht. Die Dreifachkombination von Elexacaftor+Tezacaftor+Ivacaftor (Trikafta) erscheint dagegen deutlich vielversprechender. Sie wurde im Oktober 2019 von der US-Zulassungsbehörde FDA zugelassen und auch die europäische Zulassungsbehörde hat im Juni 2020 eine Zulassungsempfehlung abgegeben (254,255).

Mit Ausnahme der Studie von Graeber et al (234) wurden NPD und ICM bisher nicht zur Effektevaluation für diese Potentiator-Korrektor-Kombinationen hinzugezogen.

#### **4.5. Vorteile und Limitationen dieser Studie**

Um mit aktuellen ECFS SOPs einheitliche Referenz- und Cutoff-Werte für unser Zentrum zu etablieren, wurde in unserer Studie eine angemessene Anzahl von gesunden Kontrollen und PI-

CF aber auch von PS-CF Patienten mit verschiedenen Mutationen zur Repräsentation einer größeren Bandbreite an CFTR-Restfunktion eingeschlossen. Um die CFTR-Bioassays gut miteinander zu vergleichen, erfolgte erstmalig die Erhebung aller drei Biomarker am gleichen Tag. Darüber hinaus wurde das ECFS ICM SOP erstmals multizentrisch validiert, als Grundlage für die weitere Anwendung von ICM in der Diagnostik und in klinischen Studien zur Evaluation von CFTR-modulierenden Substanzen.

Die weitverbreitete Verfügbarkeit neuer computergestützter Methoden und Werkzeuge zur Datenanalyse und prädiktiven Modellierung erfordert, die jeweils am besten geeigneten Methoden zur Beantwortung komplexer, klinischer Fragestellungen auszuwählen. Insbesondere die Sammlung von Methoden, die als "Data-Mining" bekannt sind, bietet in Ergänzung zur klassischen Statistik methodische und praktische Lösungen für die Analyse komplexer medizinischer Daten und die Konstruktion von Vorhersagemodellen (242,243). Die hier verwendeten Kohonennetze erlauben eine Klassifikation der Probanden in „natürliche“ Gruppen (sog. SOM-Klassen) auf Basis eines Ähnlichkeitsmaßes. Da ähnliche Patienten häufig einen ähnlichen Verlauf zeigen, könnten diese Klassen bei personalisierten Therapieansätzen hilfreich sein. Mit den SOMs konnten PI-CF versus PS-CF Patienten sogar eindeutig klassifiziert und bisher unbekannte Subtypen von gesunden Kontrollen und PI-CF Patienten abgebildet werden. Die Relevanz dieser Subtypen ist bisher unklar und könnte noch weiter untersucht werden.

Die mit den verschiedenen Biomarkern gemessenen Effekte des Potentiators Ivacaftor sollten als individuelle Resultate betrachtet werden, da hier nur wenige G551D-Patienten unter erstmaliger Ivacaftorbehandlung verfolgt werden konnten. Messungen an deutlich größeren Patientenzahlen werden allerdings in der Realität durch die geringe Verbreitung der CFTR-Mutation erschwert. Darüber hinaus ist über das Verhältnis von Respondern und Non-Respondern bisher wenig bekannt. Der mittel- und langfristige Rückgang der CFTR-Wiederherstellung fiel bei unseren Einzeluntersuchungen besonders bei NPD auf und weist auf die Notwendigkeit von Langzeitstudien zu pharmakologischer Modulation mit verschiedenen Biomarkern bei einer größeren Patientenzahl hin.

Ein Vergleich der Biomarker mit klinischen Surrogatparametern (wie FEV<sub>1</sub>) wurde in unserer Studie nicht durchgeführt. Die Frage nach dem Potential der einzelnen CFTR-Biomarker zur Vorhersage prognostisch günstiger klinischer Veränderungen während einer Therapie mit Ivacaftor oder anderen CFTR-Modulatoren ist noch nicht abschließend geklärt. Die kombinierte CFTR-Funktionsanalyse zusammen mit der Untersuchung klinischer Endpunkte unter Anwendung von Data-Mining Verfahren könnte hierzu wichtige Informationen beisteuern (158).

Sowohl ST als auch NPD und ICM sind nur indirekte quantitative Messverfahren. Um die individuellen Grenzen der Erfassung der CFTR-Aktivität mit den drei Biomarkern zu überwinden, könnte die organabhängige Messung der CFTR-Funktion möglicherweise durch die Bestimmung der CFTR-Expression ergänzt werden (172,242–244). Durch die Korrelation von CFTR-Expression und CFTR-Funktionsanalyse mit dem klinischen Status der Patienten könnte das zu erreichende Niveau an CFTR-Aktivität ermittelt werden, welches tatsächlich zu signifikanter klinischer Verbesserung bei den CF-Patienten beitragen würde. Sousa et al. antworteten auf die Frage nach einem Schwellenwerte für eine mildere CF-Erkrankung, dass mindestens 10% normaler (mittels ICM festgestellter CFTR-Funktion) und mindestens 5% normaler CFTR-Transkription für eine bessere Prognose im Sinne eines atypischen Verlaufs sowie etwa 30% normaler ICM CFTR-Funktion zur Vermeidung von CF-Symptomen nötig wären (172,183,244–246). Bei der Effektmessung mittels ST und NPD wurde festgestellt, dass mit Ivacaftor etwa 35-40% der normalen CFTR-Aktivität erreicht werden können (247).

#### **4.6. Schlussfolgerung**

Für den diagnostischen Goldstandard ST ergab sich in unserer Studie ein Cutoff-Wert bei 46,5 mmol/l. Diese Ergebnisse waren aber generell auch mit dem bisherigen Cutoff für CF von 60 mmol/l und dem Intermediärbereich zwischen 30 und 59 mmol/l vereinbar. Bei der Differenzierung von Kontrollen und CF-Patienten gab es zwischen den CFTR-Biomarkern ST, NPD und ICM keine Unterschiede - sie eigneten sich alle exzellent mit eindeutigen Cutoff-Werten. Die eindeutige Klassifikation von PI-CF und PS-CF war nur unter Anwendung komplexer neuronaler Netze mit einer Kombination von mehreren CFTR-Biomarkern möglich. Selbstorganisierende Karten lieferten zwei Subtypen von Non-CF und PI-CF, deren Rolle (auch für die Therapie) noch weiter untersucht werden sollte. Von Interesse für weitere Studien wäre auch die Anwendung der ermittelten Referenz- und Cutoff-Werte der CFTR-Biomarker bei Patienten mit fraglicher CF oder monosymptomatischen Phänotypen (108), wie in der Dissertationsschrift von Klosinski 2017 (110). Cutoff-Werte sollten trotz aller Attraktivität als relative Hilfsmittel und nicht als absolute Richtwerte betrachtet werden, da sie die kontinuierlichen Prozesse der Biologie nur bedingt abbilden können. Bei diagnostischen Schwierigkeiten wie z.B. grenzwertigen Schweißchloridkonzentrationen können NPD- und ICM-Parameter alternativ bestimmt und zur Klassifikation herangezogen werden.

Die erste externe ICM-Validierung trägt zur weiteren Standardisierung und sukzessiven Etablierung des CFTR-Biomarkers ICM in Diagnostik und Therapie besonders in

multizentrischen Studiensettings bei. Die multizentrische Anwendbarkeit von NPD sollte ebenfalls überprüft werden, was Ziel einer derzeit laufenden multizentrischen ECFS-NPD-Studie ist.

Das Maß der CFTR-Dysfunktion scheint in der Schweißdrüse, den Atemwegen und dem Rektum zu variieren, was die Bedeutung der kombinierten CFTR-Funktionsanalyse hervorhebt. Es besteht weiterer Forschungsbedarf zur organspezifischen Verbesserung der CFTR-Funktion mit CFTR-Modulatoren bei größeren Patientengruppen in multizentrischen Langzeitstudien mit einer gut durchdachten Kombination von klinischen Surrogatparametern und Biomarkern. Data-Mining Verfahren wie die verwendeten selbstorganisierenden Kohonenkarten bieten neue Möglichkeiten zur Evaluation des Outcomes von Patienten. Bei der Interpretation von pharmakologischen Effekten wären definierte organspezifische Mindest-CFTR-Aktivitätsniveaus hilfreich, bei denen es durch CFTR-Modulation auch wirklich zu einer signifikanten klinischen Verbesserung kommen würde. Auch die Korrelation der CFTR-Expression mit der CFTR-Funktionsanalyse könnte dabei von Interesse sein. Im Zeitalter personalisierter Medizin könnte besonders ICM schon präklinisch Informationen über die individuelle Ansprechbarkeit auf CFTR-modulierende Substanzen liefern. Neben unseren Daten liegen zur (multizentrischen) Reliabilität und Reproduzierbarkeit der ICM erste Ergebnisse vor (156,185).

## **5. Zusammenfassung**

Der angeborenen Stoffwechselerkrankung Mukoviszidose (CF) liegen Mutationen im CFTR-Gen zu Grunde. Diese führen zu Defekten im CFTR-Protein, welches dadurch in seiner hauptsächlichsten Funktion als Chloridkanal beeinträchtigt wird. Es kommt zu einem stark verdickten Schleim, der die Ausführungsgänge der sekretorischen Drüsen verstopft und zu einer fortschreitenden Multiorganerkrankung mit vordergründiger Zerstörung des Lungengewebes führt. Inzwischen sind knapp 2000 verschiedene Genmutationen bekannt, deren klinische Relevanz aber längst nicht in allen Fällen geklärt ist. Bei solchen genetischen Varianten mit unklaren klinischen Auswirkungen oder bei ausbleibendem Nachweis von zwei CF-verursachenden Genmutationen sowie auch bei Werten des diagnostischen Goldstandards (Schweißtest) im Überlappungsbereich kann die Diagnosestellung herausfordernd sein. Mit dem in vivo Biomarker NPD zur Erfassung der Potentialdifferenz am respiratorischen Epithel und dem ex vivo Biomarker ICM zur Messung des Kurzschlussstroms an Rektumsaugbiopsien können dann Informationen über die individuelle CFTR-Funktion gewonnen werden. Darüber

hinaus wird über die Eignung der CFTR-Biomarker zur Evaluation der Behandlungseffekte von CFTR-Modulatoren diskutiert.

Primäres Ziel dieser Studie war, die CFTR-Biomarker ST, NPD und ICM zur Klassifikation von CF/Non-CF einerseits und PI-CF/PS-CF andererseits miteinander zu vergleichen sowie mit aktuellen SOPs der European Cystic Fibrosis Society (ECFS) unizentrische Referenz- und Cutoff-Werte zu erheben. Von weiterem Interesse war die erstmalige multizentrische Validierung der Berliner ICM-Daten durch zwei weitere europäische Zentren unter Anwendung der ECFS Protokolle. Darüber hinaus sollte bei vier Patienten mit der G551D-Genmutation der Behandlungseffekt von Ivacaftor mit den CFTR-Biomarkern exemplarisch überprüft werden.

Bei 51 Berliner Studienteilnehmern (28 PI-CF, 9 PS-CF und 14 gesunde Kontrollen) wurden ST, NPD und ICM zum ersten Mal am selben Tag gemäß der standardisierten SOPs durchgeführt. Zur externen Validierung von ICM wurden zusätzlich ICM-Messungen von weiteren 57 Probanden zweier anderer europäischer Zentren eingeschlossen. Data-Mining Verfahren wie die selbstorganisierenden Kohonen-Karten lieferten die SOM-Klassen.

Mit ST, sowie NPD- und ICM-Parametern konnte jeweils exzellent mit einer Sensitivität und Spezifität von 98% bis 100% zwischen Kontrollen und CF unterschieden werden. Für die Klassifikation von PI-CF und PS-CF waren die Biomarker univariat dagegen insgesamt weniger gut geeignet. Der beste Einzelparameter war der ST. Unter Anwendung fortgeschrittener statistischer Modelle (z.B. SOMs) war eine eindeutige Differenzierung zwischen PI-CF und PS-CF mit den Biomarkern möglich. Das dazu ermittelte, vereinfachte Regelsystem könnte in der Diagnostik in unklaren Fällen angewendet werden. Darüber hinaus lieferten die SOMs zwei verschiedene, bisher unbekannt Subtypen von gesunden Kontrollen sowie zwei Subtypen von PI-CF Patienten. Die ICM-Werte der beiden anderen Zentren waren ebenfalls exzellent zur Unterscheidung zwischen Kontrollen und CF geeignet. Die externe Validierung von ICM nach ECFS-Richtlinien zeigte die Notwendigkeit der Vereinheitlichung der Gasflussgeschwindigkeit in Ussingkammern und stärkte darüber hinaus die Rolle von ICM für Diagnostik und Therapieentwicklung.

Sowohl ST als auch NPD und ICM sind exzellente sowie robuste diagnostische Biomarker. In herausfordernden diagnostischen Fällen können die untersuchten Einzelparameter zur Klassifikation von CF versus Non-CF alternativ verwendet werden. Unter Anwendung komplexer Modelle sind die CFTR-Biomarker gemeinsam ebenfalls zur Klassifikation von PI-CF versus PS-CF geeignet. Bei Patienten mit besonders milden Genmutationen und monosymptomatischen Krankheitsverläufen sollte die diagnostische Relevanz der Biomarker nochmal untersucht werden. Darüber hinaus könnte auch die Relevanz der mit den SOMs neu

ermittelten PI-CF- und Non-CF-Subtypen (bei CF besonders in Bezug auf mögliche Therapieansätze) weiter evaluiert werden. Um die Biomarker in der Medikamentenentwicklung noch stärker zu berücksichtigen, sollten weiterhin Lücken bei der Reproduzierbarkeit, Ansprechbarkeit und Validität geschlossen werden. Für NPD wird deshalb im Rahmen einer derzeit laufenden ECFS-Studie an deren multizentrischer Validierung gearbeitet. Die Reproduzierbarkeit von ICM wird aktuell in unserer Arbeitsgruppe überprüft (156). Als Ausblick zum Einsatz von ST, NPD und ICM als prädiktive CFTR-Biomarker zeigten sich bei Einzelpatienten organspezifische Unterschiede bei der Effektevaluation von Ivacaftor. Die kombinierte Anwendung aller drei Biomarker erscheint sinnvoll, wobei besonders ICM (zusätzlich zum bisherigen präklinischen Einsatz) neben dem ST als Endpunkt in klinischen Studien eingesetzt werden könnte. Ein entscheidender Vorteil von ICM gegenüber der NPD liegt in der Anwendbarkeit des ex vivo Biomarkers auch bei kleinen Kindern und Neugeborenen. Langzeitstudien mit größeren Patientenzahlen zu CFTR-modulierenden Substanzen mit kombinierter CFTR-Funktionsanalyse parallel zur Erhebung des klinischen Status mit bewährten Surrogatparametern wären erstrebenswert.

Insgesamt erweitert diese Arbeit bisherige Erkenntnisse zur Rolle der CFTR-Biomarker ST, NPD und ICM auch durch den Einsatz maschineller Lernverfahren neben dem Standardrepertoire der Statistik.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Farrell PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros.* 2008;7(5):450–3.
2. World Health Organisation (WHO) - Genomic resource center. Cystic Fibrosis: Genes and human disease (zitiert am 25.08.2017). URL: <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index2.html#CF>
3. Lungeninformationsdienst des Helmholtz Zentrums München. Mukoviszidose: Verbreitung (zitiert am 25.08.2017). URL: <https://www.lungeninformationsdienst.de/krankheiten/mukoviszidose/verbreitung/index.html>
4. CFF Patient Registry: Annual Data Report 2015 (zitiert am 25.08.2017). URL: <https://www.cff.org/Our-Research/CF-Patient-Registry/2015-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>
5. Genetic and Rare Diseases Information Center (GARD). National Center for Advancing Translational Sciences. National Institutes of Health. U.S. Department of Health & Human Services (zitiert am 25.08.2017). URL: <https://rarediseases.info.nih.gov/>
6. Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002;19(6):575–606.
7. European Cystic Fibrosis Society Patient Registry. Annual Data Report 2014 (zitiert am 25.08.2017). URL: [https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-files/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR\\_Annual%20Report%202014\\_Nov2016.pdf](https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-files/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Annual%20Report%202014_Nov2016.pdf)
8. World Health Organisation (WHO) - Human Genetics Programme. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Report of a joint meeting in 2002 in Geneva, Italy (zitiert am 25.08.2017). URL: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68702/1/WHO\\_HGN\\_CF\\_WG\\_04.02.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68702/1/WHO_HGN_CF_WG_04.02.pdf)
9. Goss CH, Ratjen F. Update in cystic fibrosis 2012. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(9):915–9.
10. Riordan JR. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu Rev Physiol.* 1993;55(1):609–30.
11. Di Sant'Agnes PA, Darling RC, Perera GA, Ethel Shea. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics.* 1953;12(5):549–63.
12. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature.* 1983;301(5899):421–2.
13. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. A clinical and pathologic study. *Am J Dis Child.* 1938;56:344–99.
14. Cohen-Cymbberknoh M, Shoseyov D, Kerem E. Managing cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(11):1463–71.
15. Elborn JS, Shale DJ, Britton JR. Cystic fibrosis: current survival and population estimates to the year 2000. *Thorax.* 1991;46(12):881–5.
16. Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur Respir J.* 2007;29(3):522–6.
17. Mukoviszidose e.V. - Grundlagen der Mukoviszidose (zitiert am 25.08.2017). URL: <https://muko.info/mukoviszidose/ueber-mukoviszidose/grundlagen/was-ist-mukoviszidose.html>
18. McPhail GL, Clancy JP. Ivacaftor: the first therapy acting on the primary cause of cystic fibrosis. *Drugs Today Barc Spain* 1998. 2013;49(4):253–60.
19. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, others. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med.* 2011;365(18):1663–72.

20. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet Lond Engl*. 2009;373(9678):1891–904.
21. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066–73.
22. Mukoviszidose e.V. - Vererbung der Mukoviszidose (zitiert am 25.08.2017). URL: <https://muko.info/mukoviszidose/ueber-mukoviszidose/grundlagen/vererbung.html>
23. Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law HY, Farrall M, Cooke HJ, Eiberg H, Williamson R. Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature*. 1985;318(6044):384–5.
24. Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science*. 1985;230(4729):1054–7.
25. Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*. 1999;79(1):23–45.
26. Stuhmann-Spangenberg M, Aulehla-Scholz C, Dworniczak B, Reiss J. Leitlinie zur Molekulargenetischen Diagnostik der Cystischen Fibrose. *Med Genet*. 2009;21(2):268–75.
27. Quinton PM. Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet*. 2008;372(9636):415–7.
28. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Abou Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, Karp PH, Wohlford-Lenane CL, Haagsman HP, van Eijk M, Bánfi B, Horswill AR, Stoltz DA, McCray PB, Welsh MJ, Zabner J. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature*. 2012;487(7405):109–13.
29. Rowe S, Miller S, Sorscher E. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;352(19):1992–2001.
30. Tümmler B. Genetik der CF. In: Ballmann M, Smaczny C, Ammon M (Hrsg). *CF Manual*. Uni-Med. Bremen; 2008:22–4.
31. Hwang T-C, Kirk KL. The CFTR ion channel: gating, regulation, and anion permeation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(1):a009498.
32. Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*. 2006;440(7083):477–83.
33. Kirk KL, Wang W. A unified view of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gating: combining the allosterism of a ligand-gated channel with the enzymatic activity of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J Biol Chem*. 2011;286(15):12813–9.
34. Mornon JP, Lehn P, Callebaut I. Molecular models of the open and closed states of the whole human CFTR protein. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(21):3469–86.
35. Derichs N. Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev*. 2013;22(127):58–65.
36. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*. 1991;66(5):1027–36.
37. Rogan MP, Stoltz DA, Hornick DB. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest*. 2011;139(6):1480–90.
38. Clinical and Functional Translation of CFTR - CFTR2 (zitiert am 28.08.2017). URL: <https://www.cftr2.org/>
39. De Boeck K. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. 2006;61(7):627–35.

40. Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn JS. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.* 2008;7(3):179–96.
41. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respir Int Rev Thorac Dis.* 2000;67(2):117–33.
42. Worldwide survey of the delta F508 mutation - report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium. *Am J Hum Genet.* 1990;47(2):354–9.
43. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet.* 2003;67(5):471–85.
44. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 1993;73(7):1251–4.
45. Schwarz C, Staab D. Zystische Fibrose und ihre Komplikationen. *Internist.* 2015;56(3):263–74.
46. Bompadre SG, Sohma Y, Li M, Hwang T-C. G551D and G1349D, two CF-associated mutations in the signature sequences of CFTR, exhibit distinct gating defects. *J Gen Physiol.* 2007;129(4):285–98.
47. Brodlie M, Haq IJ, Roberts K, Elborn JS. Targeted therapies to improve CFTR function in cystic fibrosis. *Genome Med.* 2015;7:101.
48. Clancy JP, Jain M. Personalized Medicine in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(7):593–7.
49. Fajac I, Wainwright CE. New treatments targeting the basic defects in cystic fibrosis. *Presse Med.* 2017;46(6):e165-75.
50. Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. *Pharmacol Ther.* 2015;145:19–34.
51. Rowe SM, Accurso F, Clancy JP. Detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity in early-phase clinical trials. *Proc Am Thorac Soc.* 2007;4(4):387–98.
52. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, Sermet I, Schwarz M, Tzetis M, Wilschanski M, others. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros.* 2011;10:86–102.
53. Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev Aust Assoc Clin Biochem.* 2005;26(4):135–53.
54. Flume PA, Liou TG, Borowitz DS, Li H, Yen K, Ordoñez CL, Geller DE, Group V 08-770-104 S, others. Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Chest.* 2012;142(3):718–24.
55. Hebestreit H, Hebestreit A. Zystische Fibrose. In: Speer CP, Gahr M (Hrsg). *Pädiatrie.* 4. Auflage. Springer; 2013: 499–505.
56. Mall MA, Galiotta LJV. Targeting ion channels in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2015;14(5):561–70.
57. Goralski JL, Boucher RC, Button B. Osmolytes and ion transport modulators: new strategies for airway surface rehydration. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(3):294–9.
58. Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med.* 2007;58(1):157–70.
59. Mall MA, Hartl D. CFTR: cystic fibrosis and beyond. *Eur Respir J.* 2014;44(4):1042–54.

60. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*. 1995;269(5225):847–50.
61. Donaldson SH, Boucher RC. Sodium channels and cystic fibrosis. *Chest*. 2007;132(5):1631–6.
62. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell*. 1998;95(7):1005–15.
63. Tarran R, Grubb BR, Parsons D, Picher M, Hirsh AJ, Davis CW, Boucher RC. The CF salt controversy: in vivo observations and therapeutic approaches. *Mol Cell*. 2001;8(1):149–58.
64. Tarran R, Grubb BR, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC. The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *J Gen Physiol*. 2001;118(2):223–36.
65. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J*. 2004;23(1):146–58.
66. Derichs N, Jin B-J, Song Y, Finkbeiner WE, Verkman AS. Hyperviscous airway periciliary and mucous liquid layers in cystic fibrosis measured by confocal fluorescence photobleaching. *FASEB J*. 2011;25(7):2325–32.
67. Waters V, Stanojevic S, Atenafu EG, Lu A, Yau Y, Tullis E, Ratjen F. Effect of pulmonary exacerbations on long-term lung function decline in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2012;40(1):61–6.
68. Zabner J, Smith JJ, Karp PH, Widdicombe JH, Welsh MJ. Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Mol Cell*. 1998;2(3):397–403.
69. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*. 1996;85(2):229–36.
70. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human  $\beta$ -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*. 1997;88(4):553–560.
71. Krouse ME. Is cystic fibrosis lung disease caused by abnormal ion composition or abnormal volume? *J Gen Physiol*. 2001;118(2):219–22.
72. Guggino WB. Cystic fibrosis and the salt controversy. *Cell*. 1999;96(5):607–10.
73. Guggino WB. Cystic fibrosis salt/fluid controversy: in the thick of it. *Nat Med*. 2001;7(8):888–9.
74. Knowles MR, Robinson JM, Wood RE, Pue CA, Mentz WM, Wager GC, Gatzky JT, Boucher RC. Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *J Clin Invest*. 1997;100(10):2588–95.
75. Jayaraman S, Song Y, Vetrivel L, Shankar L, Verkman AS. Noninvasive in vivo fluorescence measurement of airway-surface liquid depth, salt concentration, and pH. *J Clin Invest*. 2001;107(3):317–24.
76. Hull J, Skinner W, Robertson C, Phelan P. Elemental Content of Airway Surface Liquid from Infants with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1):10–4.
77. Grubb BR, Chadburn JL, Boucher RC. In vivo microdialysis for determination of nasal liquid ion composition. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282(6):1423–31.
78. Wine JJ. The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest*. 1999;103(3):309–12.
79. Boucher RC. Molecular insights into the physiology of the ‘thin film’ of airway surface liquid. *J Physiol*. 1999;516(3):631–8.
80. Quinton PM. Cystic Fibrosis: Lessons from the Sweat Gland. *Physiology*. 2007;22(3):212–25.

81. Schwarz C. Arzneimitteltherapie der zystischen Fibrose (Mukoviszidose). *Arzneimitteltherapie*. 2013;31:80-8.
82. Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL. Pseudomonas acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med*. 2003;9(6):492-7.
83. Dasenbrook EC, Merlo CA, Diener-West M, Lechtzin N, Boyle MP. Persistent methicillin-resistant Staphylococcus aureus and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(8):814-21.
84. Goss CH, Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Rubenfeld GD, Ramsey BW. Association between Stenotrophomonas maltophilia and lung function in cystic fibrosis. *Thorax*. 2004;59(11):955-9.
85. Jones AM, Dodd ME, Govan JRW, Barcus V, Doherty CJ, Morris J, Webb AK. Burkholderia cenocepacia and Burkholderia multivorans: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax*. 2004;59(11):948-51.
86. Levy I, Grisar-Soen G, Lerner-Geva L, Kerem E, Blau H, Bentur L, Aviram M, Rivlin J, Picard E, Lavy A, Yahav Y, Rahav G. Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(3):378-84.
87. Konstan MW, Berger M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol*. 1997;24(2):137-42.
88. Ratjen F, Hartog C, Paul K, Wermelt J, Braun J. Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha. *Thorax*. 2002;57(11):930-4.
89. Muntau A. Zystische Fibrose (Mukoviszidose, CF). In: Muntau AC (Hrsg). *Intensivkurs Pädiatrie*. 6. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2011:306-11.
90. Borowitz D, Gelfond D. Intestinal complications of cystic fibrosis: *Curr Opin Pulm Med*. 2013;19(6):676-80.
91. Jarzabek K, Zbucka M, Pepiński W, Szamatowicz J, Domitrz J, Janica J, Wołczyński S, Szamatowicz M. Cystic fibrosis as a cause of infertility. *Reprod Biol*. 2004;4(2):119-29.
92. Chan HC, Ruan YC, He Q, Chen MH, Chen H, Xu WM, Chen WY, Xie C, Zhang XH, Zhou Z. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in reproductive health and disease. *J Physiol*. 2009;587(10):2187-95.
93. Lau EMT, Moriarty C, Ogle R, Bye PT. Pregnancy and cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2010;11(2):90-4.
94. Mayell SJ, Munck A, Craig JV, Sermet I, Brownlee KG, Schwarz MJ, Castellani C, Southern KW. A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2009;8(1):71-8.
95. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, LeGrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: cystic fibrosis foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008;153(2):4-14.
96. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, Howenstine M, McColley SA, Rock M, Rosenfeld M, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Marshall BC, Sosnay PR. Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr*. 2017;181(S):4-15.e1.
97. Nährlich L, Stuhmann-Spangenberg M, Barben J, Bargon J, Blankenstein O, Bremer W, Brunsmann F, Buchholz T, Ellemunter H, Fusch C, Gembruch U, Hammermann J, Jacobeit J, Jung A, Keim V, Loff S, Mayr S, Pfeiffer-Auler S, Rossi R, Sitter H, Stern M, Straßburg C, Derichs N. [S2-Konsensus-Leitlinie: Diagnose der Mukoviszidose

- (AWMF 026-023) unter Federführung der Gesellschaft für Pädiatrischen Pneumologie. 2013 (zitiert am 13.10.2017). URL: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/026-023IS\\_2k\\_Diagnose\\_der\\_Mukoviszidose\\_2013-07.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/026-023IS_2k_Diagnose_der_Mukoviszidose_2013-07.pdf)
98. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, des Georges M, Ferec C, Macek M, Pignatti P-F, Scheffer H, Schwartz M, Witt M, Schwarz M, Girodon E. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders - updated European recommendations. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(1):51–65.
  99. Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Neufassung der Richtlinien über die Früherkennung von Krankheiten bei Kindern bis zur Vollendung des 6. Lebensjahres (Kinder-Richtlinien). 2015 (zitiert am 29.08.2017). URL: [https://www.g-ba.de/downloads/39-261-2287/2015-06-18\\_2015-08-20\\_2016-05-19\\_2016-07-07\\_Kinder-RL\\_Neustrukturierung\\_Neufassung\\_konsolidiert\\_BAnz.pdf](https://www.g-ba.de/downloads/39-261-2287/2015-06-18_2015-08-20_2016-05-19_2016-07-07_Kinder-RL_Neustrukturierung_Neufassung_konsolidiert_BAnz.pdf)
  100. Sommerburg O, Stahl M, Hammermann J, Okun JG, Kulozik A, Hoffmann G, Mall M. Newborn screening on cystic fibrosis in Germany: comparison of the new screening protocol with an alternative protocol. *Klin Padiatr.* 2017;229(2):59–66.
  101. Farrell PM, White TB, Howenstine MS, Munck A, Parad RB, Rosenfeld M, Sommerburg O, Accurso FJ, Davies JC, Rock MJ, Sanders DB, Wilschanski M, Sermet-Gaudelus I, Blau H, Gartner S, McColley SA. Diagnosis of cystic fibrosis in screened populations. *J Pediatr.* 2017;181S:33–44.e2.
  102. Green A, Kirk J, Guidelines Development Group. Guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem.* 2007;44(1):25–34.
  103. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Sweat testing: Sample Collection and Quantitative Chloride Analysis; Approved Guideline - Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA. 2009 (zitiert am 29.08.2017). URL: [https://clsi.org/media/1362/c34a3\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1362/c34a3_sample.pdf)
  104. Cystic Fibrosis Mutation Database (zitiert am 14.09.2017). URL: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>
  105. Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, Sharma N, Ramalho AS, Amaral MD, Dorfman R, Zielenski J, Masica DL, Karchin R, Millen L, Thomas PJ, Patrinos GP, Corey M, Lewis MH, Rommens JM, Castellani C, Penland CM, Cutting GR. Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Nat Genet.* 2013;45(10):1160–7.
  106. Sands D. Transepithelial nasal potential difference (NPD) measurements in cystic fibrosis (CF). *Med Wieku Rozw.* 2013;17(1):13–7.
  107. Naehrlich L, Ballmann M, Davies J, Derichs N, Gonska T, Hjelte L, van Konigsbruggen-Rietschel S, Leal T, Melotti P, Middleton P, Tümmler B, Vermeulen F, Wilschanski M. Nasal potential difference measurements in diagnosis of cystic fibrosis: an international survey. *J Cyst Fibros.* 2014;13(1):24–8.
  108. Derichs N, Sanz J, Von Kanel T, Stolpe C, Zapf A, Tümmler B, Gallati S, Ballmann M. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax.* 2010;65(7):594–9.
  109. Derichs N, Pinders-Kessler L, Bronsveld I, Scheinert S, Rückes-Nilges C, de Jonge HR, Naehrlich L. Multicenter European standardization and reference values for intestinal current measurement in rectal biopsies. *Pediatr Pulmonol.* 2013;48(S36):300.
  110. Klosinski M. Nasale Potentialdifferenz und Intestinale Kurzschlussstrommessung zur diagnostischen Klassifizierung von Patienten mit fraglicher Mukoviszidose oder CFTR-assoziiierter Erkrankung. Berlin: Medizinische Fakultät der Freien Universität Berlin (Charité). 2017 (zitiert am 23.03.2018). URL: [http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS\\_thesis\\_000000105093111](http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000105093111).

111. Jones AP, Wallis C. Dornase alfa for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(3):CD001127.
112. Elkins MR, Robinson M, Rose BR, Harbour C, Moriarty CP, Marks GB, Belousova EG, Xuan W, Bye PTP, National Hypertonic Saline in Cystic Fibrosis (NHSCF) Study Group. A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2006;354(3):229–40.
113. Button B, Cai L-H, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, Boucher RC, Rubinstein M. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science*. 2012;337(6097):937–41.
114. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, Rosenstein BJ, Smith AL, Wohl ME. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med*. 1994;331(10):637–42.
115. Bilton D, Robinson P, Cooper P, Gallagher CG, Kolbe J, Fox H, Jaques A, Charlton B, CF301 Study Investigators. Inhaled dry powder mannitol in cystic fibrosis: an efficacy and safety study. *Eur Respir J*. 2011;38(5):1071–80.
116. Müller F, Bend J, Rietschel E, Abele-Horn M, Ballmann M, Bargon J, Baumann I, Bremer W, Bruns R, Brunsmann F, Fischer R; Geidel C, Hebestreit H, Hirche TO, Hogardt M, Huttegger I, Illing S, Koitschev A, Kohlhäufel M, Mahlberg R; Mainz JG, Möller A, Pfeiffer-Auler S, Puderbach M, Riedler J, Schulte-Hubbert B, Schwarz C, Sedlacek L, Sitter H, Smaczny C, Staab, Tümmler B, Vonberg RP, Wagner TOF, Zerlik J. S3-Leitlinie „Lungenerkrankung bei Mukoviszidose“, Modul 1: Diagnostik und Therapie nach dem ersten Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* (AWMF 026/022). 2013 (zitiert am 25.08.2017). URL: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/026-022l\\_S3\\_Lungenerkrankung\\_bei\\_Mukoviszidose\\_Modul\\_1\\_2013-06\\_01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/026-022l_S3_Lungenerkrankung_bei_Mukoviszidose_Modul_1_2013-06_01.pdf)
117. Taccetti G, Bianchini E, Cariani L, Buzzetti R, Costantini D, Trevisan F, Zavataro L, Campana S, Italian Group for *P aeruginosa* Eradication in Cystic Fibrosis. Early antibiotic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* eradication in patients with cystic fibrosis: a randomised multicentre study comparing two different protocols. *Thorax*. 2012;67(10):853–9.
118. Mayer-Hamblett N, Ratjen F. Acute antibiotic use in cystic fibrosis clinical trials: does it affect our assessment of clinical efficacy? *Lancet Respir Med*. 2013;1(2):98–9.
119. Halfhide C, Evans HJ, Couriel J. Inhaled bronchodilators for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;(4):CD003428.
120. Liou TG, Adler FR, Cox DR, Cahill BC. Lung transplantation and survival in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2007;357(21):2143–52.
121. Griesenbach U, Pytel KM, Alton EFWF. Cystic fibrosis gene therapy in the UK and elsewhere. *Hum Gene Ther*. 2015;26(5):266–75.
122. Habib A-RR, Manji J, Wilcox PG, Javer AR, Buxton JA, Quon BS. A systematic review of factors associated with health-related quality of life in adolescents and adults with cystic fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(3):420–8.
123. Verkman AS, Galiotta LJV. Chloride channels as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(2):153–71.
124. Fajac I, Sermet-Gaudelus I. Cystic fibrosis: new treatments targeting the CFTR protein. *Rev Mal Respir*. 2013;30(4):255–61.
125. Bertoni E, Colomb-Lippa D. Pulmonology: CFTR modulators for cystic fibrosis. *JAAPA* 2013;26(2):59–60.
126. Pettit RS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modifying medications: the future of cystic fibrosis treatment. *Ann Pharmacother*. 2012;46(7–8):1065–75.

127. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PDJ, Burton B, Cao D, Neuberger T, Turnbull A, Singh A, Joubran J, Hazlewood A, Zhou J, McCartney J, Arumugam V, Decker C, Yang J, Young C, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu P. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(44):18825–30.
128. Davies JC, Wainwright CE, Canny GJ, Chilvers MA, Howenstine MS, Munck A, Mainz JG, Rodriguez S, Li H, Yen K, Ordoñez CL, Ahrens R. Efficacy and Safety of Ivacaftor in Patients Aged 6 to 11 Years with Cystic Fibrosis with a G551D Mutation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(11):1219–25.
129. Hebestreit H, Sauer-Heilborn A, Fischer R, Käding M, Mainz JG. Effects of ivacaftor on severely ill patients with cystic fibrosis carrying a G551D mutation. *J Cyst Fibros*. 2013;12(6):599–603.
130. Barry PJ, Plant BJ, Nair A, Bicknell S, Simmonds NJ, Bell NJ, Shafi NT, Daniels T, Shelmerdine S, Felton I, Gunaratnam C, Jones AM, Horsley AR. Effects of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who carry the G551D mutation and have severe lung disease. *Chest*. 2014;146(1):152–8.
131. Yu H, Burton B, Huang C-J, Worley J, Cao D, Johnson JP, Urrutia A, Joubran J, Seepersaud S, Sussky K, Hoffman BJ, Van Goor F. Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *J Cyst Fibros*. 2012;11(3):237–45.
132. De Boeck K, Munck A, Walker S, Faro A, Hiatt P, Gilmartin G, Higgins M. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *J Cyst Fibros*. 2014;13(6):674–80.
133. Moss RB, Flume PA, Elborn JS, Cooke J, Rowe SM, McColley SA, Rubenstein RC, Higgins M, others. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have an Arg117His-CFTR mutation: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2015;3(7):524–33.
134. Clancy JP, Bebok Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, Lyrene R, Sorscher EJ, Bedwell DM. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(7):1683–92.
135. Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, Kerem B, Kerem E. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med*. 2003;349(15):1433–41.
136. Sermet-Gaudelus I, Renouil M, Fajac A, Bidou L, Parbaille B, Pierrot S, Davy N, Bismuth E, Reinert P, Lenoir G, Lesure JF, Rousset JP, Edelman A. In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Med*. 2007;5:5.
137. Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, Cohen M, Nissim-Rafinia M, Blau H, Rivlin J, Aviram M, Elfring GL, Northcutt VJ, Miller LL, Kerem B, Wilschanski M. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *The Lancet*. 2008;372(9640):719–27.
138. Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, Roussel D, Fritsch J, Hanssens L, Hirawat S, Miller NL, Constantine S, Reha A, Ajayi T, Elfring GL, Miller LL. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(10):1262–72.
139. Wilschanski M, Miller LL, Shoseyov D, Blau H, Rivlin J, Aviram M, Cohen M, Armoni S, Yaakov Y, Pugatsch T, Pugatch T, Cohen-Cymerknoh M, Miller NL, Reha A,

- Northcutt VJ, Hirawat S, Donnelly K, Elfring GL, Ajayi T, Kerem E. Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2011;38(1):59–69.
140. Kerem E, Konstan MW, De Boeck K, Accurso FJ, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, Elborn JS, Melotti P, Bronsveld I, Fajac I, Malfroot A, Rosenbluth DB, Walker PA, McColley SA, Knoop C, Quattrucci S, Rietschel E, Zeitlin PL, Barth J, Elfring GL, Welch EM, Branstrom A, Spiegel RJ, Peltz SW, Ajayi T, Rowe SM. Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. 2014;2(7):539–47.
141. Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, Aitken ML, Amin RS, Ashlock MA, Ballmann M, Boyle MP, Bronsveld I, Campbell PW, De Boeck K, Donaldson SH, Dorkin HL, Dunitz JM, Durie PR, Jain M, Leonard A, McCoy KS, Moss RB, Pilewski JM, Rosenbluth DB, Rubenstein RC, Schechter MS, Botfield M, Ordoñez CL, Spencer-Green GT, Vernillet L, Wisseh S, Yen K, Konstan MW. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax*. 2012;67(1):12–8.
142. Boyle MP, Bell SC, Konstan MW, McColley SA, Rowe SM, Rietschel E, Huang X, Waltz D, Patel NR, Rodman D, VX09-809-102. A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2014;2(7):527–38.
143. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, Davies JC, De Boeck K, Flume PA, Konstan MW, McColley SA, McCoy K, McKone EF, Munck A, Ratjen F, Rowe SM, Waltz D, Boyle MP. Lumacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*. 2015;373(3):220–31.
144. Orkambi. Lumacaftor/Ivacaftor. European Medicines Agency (EMA). 2015 (zitiert am 30.08.2017). URL: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Summary\\_of\\_opinion\\_-\\_Initial\\_authorisation/human/003954/WC500194120.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/003954/WC500194120.pdf)
145. Milla CE, Ratjen F, Marigowda G, Liu F, Waltz D, Rosenfeld M. Lumacaftor/Ivacaftor in patients aged 6–11 years with cystic fibrosis and homozygous for F508del-CFTR. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;195(7):912–20.
146. ClinicalTrials.gov (zitiert am 30.08.2017). URL: <https://clinicaltrials.gov/>
147. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89–95.
148. De Gruttola VG, Clax P, DeMets DL, Downing GJ, Ellenberg SS, Friedman L, Gail MH, Prentice R, Wittes J, Zeger SL. Considerations in the evaluation of surrogate endpoints in clinical trials: summary of a National Institutes of Health workshop. *Control Clin Trials*. 2001;22(5):485–502.
149. Mayer-Hamblett N, Ramsey BW, Kronmal RA. Advancing Outcome Measures for the New Era of Drug Development in Cystic Fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(4):370–7.
150. Rosenfeld M. An overview of endpoints for cystic fibrosis clinical trials: one size does not fit all. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(4):299–301.
151. Ramsey BW. Outcome measures for development of new therapies in cystic fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(4):367–9.
152. Vermeulen F, Le Camus C, Davies JC, Bilton D, Milenković D, De Boeck K. Variability of sweat chloride concentration in subjects with cystic fibrosis and G551D mutations. *J Cyst Fibros*. 2017;16(1):36–40.

153. Vermeulen F, Lebecque P, De Boeck K, Leal T. Biological variability of the sweat chloride in diagnostic sweat tests: A retrospective analysis. *J Cyst Fibros.* 2017;16(1):30–5.
154. De Boeck K, Kent L, Davies J, Derichs N, Amaral M, Rowe SM, Middleton P, de Jonge H, Bronsveld I, Wilschanski M, Melotti P, Danner-Boucher I, Boerner S, Fajac I, Southern K, de Nooijer RA, Bot A, de Rijke Y, de Wachter E, Leal T, Vermeulen F, Hug MJ, Rault G, Nguyen-Khoa T, Barreto C, Proesmans M, Sermet-Gaudelus I, on behalf of the European Cystic Fibrosis Society Clinical Trial Network Standardisation Committee. CFTR biomarkers: time for promotion to surrogate end-point. *Eur Respir J.* 2013;41(1):203–16.
155. Vermeulen F, Proesmans M, Boon M, De Boeck K. Improved repeatability of nasal potential difference with a larger surface catheter. *J Cyst Fibros.* 2015;14(3):317–23.
156. Scheinert S, Pinders-Kessel L, Klosinski M, Derichs N. Reliability of intestinal current measurement as CFTR biomarker and responsiveness to oral ivacaftor treatment. *J Cyst Fibros.* 2013;12(S1):62.
157. Graeber SY, Hug MJ, Sommerburg O, Hirtz S, Hentschel J, Heinzmann A, Dopfer C, Schulz A, Mainz JG, Tümmler B, Mall MA. Intestinal Current Measurements Detect Activation of Mutant CFTR in Patients with Cystic Fibrosis with the G551D Mutation Treated with Ivacaftor. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192(10):1252–5.
158. Muhlebach MS, Clancy J, Heltshe SL, Ziady A, Kelley T, Accurso F, Pilewski J, Mayer-Hamblett N, Joseloff E, Sagel SD. Biomarkers for cystic fibrosis drug development. *J Cyst Fibros.* 2016;15(6):714–23.
159. Fleming TR. Surrogate endpoints and FDA’s accelerated approval process. *Health Aff (Millwood).* 2005;24(1):67–78.
160. De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse Médicale.* 2017;46(6):e97–108.
161. Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1981;305(25):1489–95.
162. Wilschanski M, Famini H, Strauss-Liviatan N, Rivlin J, Blau H, Bibi H, Bentur L, Yahav Y, Springer H, Kramer MR, Klar A, Ilani A, Kerem B, Kerem E. Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2001;17(6):1208–15.
163. Veeze HJ, Sinaasappel M, Bijman J, Bouquet J, de Jonge HR. Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology.* 1991;101(2):398–403.
164. De Jonge HR, Ballmann M, Veeze H, Bronsveld I, Stanke F, Tümmler B, Sinaasappel M. Ex vivo CF diagnosis by intestinal current measurements (ICM) in small aperture, circulating Ussing chambers. *J Cyst Fibros.* 2004;3:159–63.
165. Mall M, Hirtz S, Gonska T, Kunzelmann K. Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2004;3 Suppl 2:165–9.
166. Hug MJ, Derichs N, Bronsveld I, Clancy JP. Measurement of Ion Transport Function in Rectal Biopsies. *Methods Mol Biol.* 2011;741:87-107.
167. Goubau C, Wilschanski M, Skalicka V, Lebecque P, Southern KW, Sermet I, Munck A, Derichs N, Middleton PG, Hjelte L, Padoan R, Vasar M, De Boeck K. Phenotypic characterisation of patients with intermediate sweat chloride values: towards validation of the European diagnostic algorithm for cystic fibrosis. *Thorax.* 2009;64(8):683–91.
168. Wilschanski M, Dupuis A, Ellis L, Jarvi K, Zielenski J, Tullis E, Martin S, Corey M, Tsui L-C, Durie P. Mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator gene and in vivo transepithelial potentials. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(7):787–94.

169. Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Sands D, Stremmler N, Vavrova V, Deneuville E, Reix P, Bui S, Huet F, Lebourgeois M, Munck A, Iron A, Skalicka V, Bienvenu T, Roussel D, Lenoir G, Bellon G, Sarles J, Macek M, Roussey M, Fajac I, Edelman A. Clinical phenotype and genotype of children with borderline sweat test and abnormal nasal epithelial chloride transport. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(7):929–36.
170. Veeze HJ, Halley DJ, Bijman J, de Jongste JC, de Jonge HR, Sinaasappel M. Determinants of mild clinical symptoms in cystic fibrosis patients. Residual chloride secretion measured in rectal biopsies in relation to the genotype. *J Clin Invest.* 1994;93(2):461–6.
171. Bronsveld I, Mekus F, Bijman J, Ballmann M, Greipel J, Hundrieser J, Halley DJJ, Laabs U, Busche R, De Jonge HR, Tümmler B, Veeze HJ. Residual chloride secretion in intestinal tissue of  $\Delta F508$  homozygous twins and siblings with cystic fibrosis. *Gastroenterology.* 2000;119(1):32–40.
172. Hirtz S, Gonska T, Seydewitz HH, Thomas J, Greiner P, Kuehr J, Brandis M, Eichler I, Rocha H, Lopes A, Barreto C, Ramalho A, Amaral MD, Kunzelmann K, Mall M. CFTR Cl<sup>-</sup> channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology.* 2004;127(4):1085–95.
173. Derichs N, Mekus F, Bronsveld I, Bijman J, Veeze HJ, von der Hardt H, Tümmler B, Ballmann M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-mediated residual chloride secretion does not protect against early chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in  $F508del$  homozygous cystic fibrosis patients. *Pediatr Res.* 2004;55(1):69–75.
174. European Cystic Fibrosis Society (ECFS), Diagnostic Network Working Group, Clinical Trials Network. Nasal potential difference (NPD) measurement for diagnosis and clinical trials in cystic fibrosis – standard operating procedure. Version 1.2, 2011; Version 1.3, 2012 und Version 1.8, 2014.
175. Standaert TA, Boitano L, Emerson J, Milgram LJH, Konstan MW, Hunter J, Berclaz P-Y, Brass L, Zeitlin PL, Hammond K, Davies Z, Foy C, Noone PG, Knowles MR. Standardized procedure for measurement of nasal potential difference: An outcome measure in multicenter cystic fibrosis clinical trials. *Pediatr Pulmonol.* 2004;37(5):385–92.
176. Solomon GM, Konstan MW, Wilschanski M, Billings J, Sermet-Gaudelus I, Accurso F, Vermeulen F, Levin E, Hathorne H, Reeves G, Sabbatini G, Hill A, Mayer-Hamblett N, Ashlock M, Clancy JP, Rowe SM. An international randomized multicenter comparison of nasal potential difference techniques. *Chest.* 2010;138(4):919–28.
177. Rowe SM, Liu B, Hill A, Hathorne H, Cohen M, Beamer JR, Accurso FJ, Dong Q, Ordoñez CL, Stone AJ, Olson ER, Clancy JP, VX06-770-101 Study Group. Optimizing nasal potential difference analysis for CFTR modulator development: assessment of ivacaftor in CF subjects with the G551D-CFTR mutation. *PLoS One.* 2013;8(7):e66955.
178. Boyle MP, Diener-West M, Milgram L, Knowles M, Foy C, Zeitlin P, Standaert T, Cystic Fibrosis Therapeutics Development Network Nasal PD Study Group. A multicenter study of the effect of solution temperature on nasal potential difference measurements. *Chest.* 2003;124(2):482–9.
179. Vermeulen F, Proesmans M, Feyaerts N, De Boeck K. Nasal potential measurements on the nasal floor and under the inferior turbinate: does it matter? *Pediatr Pulmonol.* 2011;46(2):145–52.
180. Delmarco A, Pradal U, Cabrini G, Bonizzato A, Mastella G. Nasal potential difference in cystic fibrosis patients presenting borderline sweat test. *Eur Respir J.* 1997;10(5):1145–9.

181. Wilson DC, Ellis L, Zielenski J, Corey M, Ip WF, Tsui LC, Tullis E, Knowles MR, Durie PR. Uncertainty in the diagnosis of cystic fibrosis: possible role of in vivo nasal potential difference measurements. *J Pediatr*. 1998;132(4):596–9.
182. De Boeck K, Derichs N, Fajac I, de Jonge HR, Bronsveld I, Sermet I, Vermeulen F, Sheppard DN, Cuppens H, Hug M, others. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros*. 2011;10:53–66.
183. Sousa M, Servidoni MF, Vinagre AM, Ramalho AS, Bonadia LC, Felício V, Ribeiro MA, Uliyakina I, Marson FA, Kmit A, Cardoso SR, Ribeiro JD, Bertuzzo CS, Sousa L, Kunzelmann K, Ribeiro AF, Amaral MD. Measurements of CFTR-mediated Cl<sup>-</sup> secretion in human rectal biopsies constitute a robust biomarker for cystic fibrosis diagnosis and prognosis. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e47708.
184. European Cystic Fibrosis Society (ECFS), Diagnostic Network Working Group, Clinical Trials Network. Ion transport in rectal biopsies for diagnosis and clinical trials in cystic fibrosis (intestinal current measurement, ICM) – standard operating procedure. Version 2.7, 2011.
185. Clancy JP, Szczesniak RD, Ashlock MA, Ernst SE, Fan L, Hornick DB, Karp PH, Khan U, Lymp J, Ostmann AJ, Rezayat A, Starner TD, Sugandha SP, Sun H, Quinney N, Donaldson SH, Rowe SM, Gabriel SE. Multicenter intestinal current measurements in rectal biopsies from CF and non-CF subjects to monitor CFTR function. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e73905.
186. Pedemonte N. Small-molecule correctors of defective F508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest*. 2005;115(9):2564–71.
187. Van Goor F. Rescue of F508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(6):1117–30.
188. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon Y-C, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrack P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*. 2007;447(7140):87–91.
189. House HH, Middleton PG. Impact of different chloride and glucose solutions on nasal potential difference. *Pediatr Pulmonol*. 2009;44(7):645–8.
190. Bronsveld I, Vermeulen F, Sands D, Leal T, Leonard A, Melotti P, Yaakov Y, de Nooijer R, De Boeck K, Sermet I, Wilschanski M, Middleton PG, European Cystic Fibrosis Society – Diagnostic Network Working Group. Influence of perfusate temperature on nasal potential difference. *Eur Respir J*. 2013;42(2):389–93.
191. Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, Sagel SD, Hornick DB, Konstan MW, Donaldson SH, others. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N Engl J Med*. 2010;363(21):1991–2003.
192. Clancy JP, Rowe SM, Bebok Z, Aitken ML, Gibson R, Zeitlin P, Berclaz P, Moss R, Knowles MR, Oster RA, Mayer-Hamblett N, Ramsey B. No detectable improvements in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by nasal aminoglycosides in patients with cystic fibrosis with stop mutations. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37(1):57–66.
193. Rowe SM, Heltshe SL, Gonska T, Donaldson SH, Borowitz D, Gelfond D, Sagel SD, Khan U, Mayer-Hamblett N, Van Daltsen JM, Joseloff E, Ramsey BW. Clinical mechanism of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator ivacaftor in G551D-mediated cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(2):175–84.

194. Davies JC, Cunningham S, Harris WT, Lapey A, Regelman WE, Sawicki GS, Southern KW, Robertson S, Green Y, Cooke J, Rosenfeld M. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2–5 years with cystic fibrosis and a CFTR gating mutation (KIWI): an open-label, single-arm study. *Lancet Respir Med.* 2016;4(2):107–15.
195. Durmowicz AG, Witzmann KA, Rosebraugh CJ, Chowdhury BA. Change in Sweat Chloride as a Clinical End Point in Cystic Fibrosis Clinical Trials. *Chest.* 2013;143(1):14–8.
196. Fidler MC, Beusmans J, Panorchan P, Van Goor F. Correlation of sweat chloride and percent predicted FEV1 in cystic fibrosis patients treated with ivacaftor. *J Cyst Fibros.* 2017;16(1):41–4.
197. Seliger VI, Rodman D, Van Goor F, Schmelz A, Mueller P. The predictive potential of the sweat chloride test in cystic fibrosis patients with the G551D mutation. *J Cyst Fibros.* 2013;12(6):706–13.
198. Derichs N, Tran D, Namkung W, Finkbeiner WE, Kurth MJ, Nielson DW, Verkman AS. Correction of F508del-CFTR in human airway epithelia and ex vivo rectal biopsies by s-cis-locked bithiazole corrector-29. *J Cyst Fibros.* 2011;10(S1):64.
199. Derichs N, Knoll J, Hyde R, Pedemonte N, Galiotta LV, Ballmann M. Preclinical evaluation of CFTR modulators in ex vivo human rectal tissue. *Pediatr Pulmonol.* 2009;44:292.
200. Roth EK, Hirtz S, Duerr J, Wenning D, Eichler I, Seydewitz HH, Amaral MD, Mall MA. The K<sup>+</sup> channel opener 1-EBIO potentiates residual function of mutant CFTR in rectal biopsies from cystic fibrosis patients. *PLoS One.* 2011;6(8):e24445.
201. Becq F, Mall MA, Sheppard DN, Conese M, Zegarra-Moran O. Pharmacological therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside. *J Cyst Fibros.* 2011;10:129–45.
202. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics.* 1959;23(3):545–9.
203. Parad RB, Comeau AM. Diagnostic dilemmas resulting from the immunoreactive trypsinogen/DNA cystic fibrosis newborn screening algorithm. *J Pediatr.* 2005;147(3):78–82.
204. Munck A, Mayell SJ, Winters V, Shawcross A, Derichs N, Parad R, Barben J, Southern KW. Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis (CFSPID): A new designation and management recommendations for infants with an inconclusive diagnosis following newborn screening. *J Cyst Fibros.* 2015;14(6):706–13.
205. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature.* 1994;367(6462):463–7.
206. Knowles MR, Paradiso AM, Boucher RC. In vivo nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther.* 1995 Apr;6(4):445–55.
207. Mason SJ, Paradiso AM, Boucher RC. Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Br J Pharmacol.* 1991 Jul;103(3):1649–56.
208. Greger R. Role of CFTR in the colon. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:467–91.
209. Mall M, Bleich M, Schürlein M, Kühr J, Seydewitz HH, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K. Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP. *Am J Physiol.* 1998;275(6):1274–81.
210. Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev.* 2002;82(1):245–89.

211. Mall M, Kreda SM, Mengos A, Jensen TJ, Hirtz S, Seydewitz HH, Yankaskas J, Kunzelmann K, Riordan JR, Boucher RC. The DeltaF508 mutation results in loss of CFTR function and mature protein in native human colon. *Gastroenterology*. 2004;126(1):32–41.
212. 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. Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of  $\Delta F508$  homozygous twins and siblings. *J Clin Invest*. 2001;108(11):1705–15.
213. Kohonen T, Schroeder MR, Huang TS (Hrsg). *Self-Organizing Maps*. 3. Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin; 2001.
214. Narzi L, Ferraguti G, Stamato A, Narzi F, Valentini SB, Lelli A, Delaroche I, Lucarelli M, Strom R, Quattrucci S. Does cystic fibrosis neonatal screening detect atypical CF forms? Extended genetic characterization and 4-year clinical follow-up. *Clin Genet*. 2007;72(1):39–46.
215. Farrell PM. The meaning of ‘early’ diagnosis in a new era of cystic fibrosis care. *Pediatrics*. 2007;119(1):156–7.
216. Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Dankert Roelse J, Duff A, Farrell M, Mehta A, Munck A, Pollitt R, Sermet-Gaudelus I, Wilcken B, Ballmann M, Corbetta C, de Monestrol I, Farrell P, Feilcke M, Férec C, Gartner S, Gaskin K, Hammermann J, Kashirskaya N, Loeber G, Macek M, Mehta G, Reiman A, Rizzotti P, Sammon A, Sands D, Smyth A, Sommerburg O, Torresani T, Travert G, Vernooij A, Elborn S. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros*. 2009;8(3):153–73.
217. LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ, Cystic Fibrosis Foundation. Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. *J Pediatr*. 2007;151(1):85–9.
218. Domingos MT, Magdalena NIR, Cat MNL, Watanabe AM, Rosário Filho NA. Sweat conductivity and coulometric quantitative test in neonatal cystic fibrosis screening. *J Pediatr (Rio J)*. 2015;91(6):590–5.
219. Vernooij-van Langen A, Dompeling E, Yntema J-B, Arets B, Tiddens H, Loeber G, Dankert-Roelse J. Clinical evaluation of the Nanoduct sweat test system in the diagnosis of cystic fibrosis after newborn screening. *Eur J Pediatr*. 2015;174(8):1025–34.
220. Collaco JM, Blackman SM, Raraigh KS, Corvol H, Rommens JM, Pace RG, Boelle P-Y, McGready J, Sosnay PR, Strug LJ, Knowles MR, Cutting GR. Sources of variation in sweat chloride measurements in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(11):1375–82.
221. Middleton PG, House HH. Measurement of airway ion transport assists the diagnosis of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2010;45(8):789–95.
222. Ooi CY, Dupuis A, Ellis L, Jarvi K, Martin S, Ray PN, Steele L, Kortan P, Gonska T, Dorfman R, Solomon M, Zielenski J, Corey M, Tullis E, Durie P. Does extensive genotyping and nasal potential difference testing clarify the diagnosis of cystic fibrosis among patients with single-organ manifestations of cystic fibrosis? *Thorax*. 2014;69(3):254–60.
223. Tridello G, Menin L, Pintani E, Bergamini G, Assael BM, Melotti P. Nasal potential difference outcomes support diagnostic decisions in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2016;15(5):579–82.
224. Southern KW, Noone PG, Bosworth DG, Legrys VA, Knowles MR, Barker PM. A modified technique for measurement of nasal transepithelial potential difference in infants. *J Pediatr*. 2001;139(3):353–8.

225. Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Huet F, Aboutaam R, Bui S, Deneuville E, Guillot M, Vrielynck S, Lenoir G, Edelman A. Nasal potential difference in cystic fibrosis diagnosis of very young children. *J Pediatr*. 2007;150(3):e34-35.
226. Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Roussel D, Deneuville E, Bui S, Huet F, Guillot M, Aboutaam R, Renouil M, Munck A, des Georges M, Iron A, Thauvin-Robinet C, Fajac I, Lenoir G, Roussey M, Edelman A. Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal sweat test following newborn screening for cystic fibrosis. *Thorax*. 2010;65(6):539-44.
227. Yaakov Y, Kerem E, Yahav Y, Rivlin J, Blau H, Bentur L, Aviram M, Picard E, Bdoalah-Abram T, Wilschanski M. Reproducibility of nasal potential difference measurements in cystic fibrosis. *Chest*. 2007;132(4):1219-26.
228. Jaron R, Yaakov Y, Rivlin J, Blau H, Bentur L, Yahav Y, Kerem E, Bibi H, Picard E, Wilschanski M. Nasal potential difference in non-classic cystic fibrosis-long term follow up. *Pediatr Pulmonol*. 2008;43(6):545-9.
229. Cohen-Cymerknoh M, Yaakov Y, Shoseyov D, Shteyer E, Schachar E, Rivlin J, Bentur L, Picard E, Aviram M, Israeli E, Kerem E, Wilschanski M. Evaluation of the intestinal current measurement method as a diagnostic test for cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2013;48(3):229-35.
230. Bagheri-Hanson A, Nedwed S, Rueckes-Nilges C, Naehrlich L. Intestinal current measurement versus nasal potential difference measurements for diagnosis of cystic fibrosis: a case-control study. *BMC Pulm Med*. 2014;14(1):156.
231. Wilschanski M, Yaakov Y, Omari I, Zaman M, Martin CR, Cohen-Cymerknoh M, Shoseyov D, Kerem E, Dasilva D, Sheth S, Uluer A, O'Sullivan BP, Freedman S. Comparison of nasal potential difference and intestinal current measurements as surrogate markers for CFTR function: *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;63(5):e92-7.
232. Ooi CY, Dupuis A, Gonska T, Ellis L, Ni A, Jarvi K, Martin S, Ray P, Steele L, Kortan P, Dorfman R, Solomon M, Zielenski J, Corey M, Tullis E, Durie P. Does integration of various ion channel measurements improve diagnostic performance in cystic fibrosis? *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(4):562-70.
233. van Barneveld A, Stanke F, Tamm S, Siebert B, Brandes G, Derichs N, Ballmann M, Junge S, Tümmler B. Functional analysis of F508del CFTR in native human colon. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2010;1802(11):1062-9.
234. Graeber SY, Dopfer C, Naehrlich L, Gyulumyan L, Scheuermann H, Hirtz S, Wege S, Mairbäurl H, Dorda M, Hyde R, Bagheri-Hanson A, Rueckes-Nilges C, Fischer S, Mall MA, Tümmler B. Effects of lumacaftor/ivacaftor therapy on CFTR function in Phe508del homozygous patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(11):1433-42.
235. Mesbahi M, Shteinberg M, Wilschanski M, Hatton A, Nguyen-Khoa T, Friedman H, Cohen M, Escabasse V, Le Bourgeois M, Lucidi V, Sermet-Gaudelus I, Bassinet L, Livnat G. Changes of CFTR functional measurements and clinical improvements in cystic fibrosis patients with non p.Gly551Asp gating mutations treated with ivacaftor. *J Cyst Fibros*. 2017;16(1):45-8.
236. Chilvers MA, McKean M, Rutman A, Myint BS, Silverman M, O'Callaghan C. The effects of coronavirus on human nasal ciliated respiratory epithelium. *Eur Respir J*. 2001;18(6):965-70.
237. Amaral MD. Processing of CFTR: traversing the cellular maze--how much CFTR needs to go through to avoid cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol*. 2005;39(6):479-91.
238. Doucet L, Mendes F, Montier T, Delépine P, Penque D, Férec C, Amaral MD. Applicability of different antibodies for the immunohistochemical localization of CFTR

- in respiratory and intestinal tissues of human and murine origin. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 2003;51(9):1191–9.
239. Yeo N-K, Jang YJ. Rhinovirus infection-induced alteration of tight junction and adherens junction components in human nasal epithelial cells. *The Laryngoscope.* 2010;120(2):346–52.
240. Van Meegen MA, Terheggen-Lagro SWJ, Koymans KJ, van der Ent CK, Beekman JM. Apical CFTR expression in human nasal epithelium correlates with lung disease in cystic fibrosis. *PLoS One.* 2013;8(3):e57617.
241. Kälin N, Claass A, Sommer M, Puchelle E, Tümmler B. DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 1999;103(10):1379–89.
242. Malmgren H, Borga M, Niklasson L (Hrsg). *Artificial Neural Networks in Medicine and Biology. Proceedings of the ANNIMAB-1 Conference, Goteborg, Sweden, 13–16 May 2000.* Springer-Verlag London; Limited 2000.
243. Bellazzia R, Zupan B: Predictive data mining in clinical medicine: Current issues and guidelines. *Int J Med Inform.* 2008;77(2): 81-97.
244. Amaral MD, Pacheco P, Beck S, Farinha CM, Penque D, Nogueira P, Barreto C, Lopes B, Casals T, Dapena J, Gartner S, Vásquez C, Pérez-Frías J, Olveira C, Cabanas R, Estivill X, Tzetis M, Kanavakis E, Doudounakis S, Dörk T, Tümmler B, Girodon-Boulandet E, Cazeneuve C, Goossens M, Blayau M, Verlingue C, Vieira I, Féréc C, Claustres M, des Georges M, Clavel C, Birembaut P, Hubert D, Bienvenu T, Adoun M, Chomel JC, De Boeck K, Cuppens H, Lavinha J. Cystic fibrosis patients with the 3272-26A>G splicing mutation have milder disease than F508del homozygotes: a large European study. *J Med Genet.* 2001;38(11):777–83.
245. Beck S, Penque D, Garcia S, Gomes A, Farinha C, Mata L, Gulbenkian S, Gil-Ferreira K, Duarte A, Pacheco P, Barreto C, Lopes B, Cavaco J, Lavinha J, Amaral MD. Cystic fibrosis patients with the 3272-26A>G mutation have mild disease, leaky alternative mRNA splicing, and CFTR protein at the cell membrane. *Hum Mutat.* 1999;14(2):133–44.
246. Ramalho AS, Beck S, Meyer M, Penque D, Cutting GR, Amaral MD. Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27(5):619–27.
247. Accurso FJ, Van Goor F, Zha J, Stone AJ, Dong Q, Ordonez CL, Rowe SM, Clancy JP, Konstan MW, Hoch HE, Heltshe SL, Ramsey BW, Campbell PW, Ashlock MA. Sweat chloride as a biomarker of CFTR activity: Proof of concept and ivacaftor clinical trial data. *J Cyst Fibros.* 2014;13(2):139–47.
248. Pinders-Kessler L, Scheinert S, Hug M, Norek A, Sad I, Kleinschmidt M, Staab D, Derichs N. Organ-specific CFTR function and kinetics of new ivacaftor treatment. 28th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, 9th -11th October 2014, Atlanta, USA (Abstract) (ziertiert am 28.03.2019). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ppul.23108>
249. Rowe SM, McColley SA, Rietschel E, Li X, Bell SC, Konstan MW, Marigowda G, Waltz D, Boyle MP; VX09-809-102 Study Group. Lumacaftor/Ivacaftor Treatment of Patients with Cystic Fibrosis Heterozygous for F508del-CFTR. *Ann Am Thorac Soc.* 2017;14(2):213-19.
250. Konstan MW, McKone EF, Moss RB, Marigowda G, Tian S, Waltz D, Huang X, Lubarsky B, Rubin J, Millar SJ, Pasta DJ, Mayer-Hamblett N, Goss CH, Morgan W, Sawicki GS. Assessment of safety and efficacy of long-term treatment with combination lumacaftor and ivacaftor therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for the

- F508del-CFTR mutation (PROGRESS): a phase 3, extension study. *Lancet Respir Med.* 2017;5(2):107-18.
- 251 Ratjen F, Hug C, Marigowda G, Tian S, Huang X, Stanojevic S, Milla CE, Robinson PD, Waltz D, Davies JC, VX14-809-109 investigator group. Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6-11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med.* 2017;5(7):557-67.
- 252 McNamara JJ, McColley SA, Marigowda G, Liu F, Tian S, Owen CA, Stiles D, Li C, Waltz D, Wang LT, Sawicki GS. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lumacaftor and ivacaftor combination therapy in children aged 2-5 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: an open-label phase 3 study. *Lancet Respir Med.* 2019;7(4):325-335.
- 253 Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, van der Ent CK, Moeller A, Simard C, Wang LT, Ingenito EP, McKee C, Lu Y, Lekstrom-Himes J, Elborn JS. Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med.* 2017;377(21):2013-23.
- 254 Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, Lands LC, McKone EF, Polineni D, Ramsey BW, Taylor-Cousar JL, Tullis E, Vermeulen F, Marigowda G, McKee CM, Moskowitz SM, Nair N, Savage J, Simard C, Tian S, Waltz D, Xuan F, Rowe SM, Jain R; VX17-445-102 Study Group. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med.* 2019;381(19):1809-19.
- 255 Heijerman HGM, McKone EF, Downey DG, Van Braeckel E, Rowe SM, Tullis E, Mall MA, Welter JJ, Ramsey BW, McKee CM, Marigowda G, Moskowitz SM, Waltz D, Sosnay PR, Simard C, Ahluwalia N, Xuan F, Zhang Y, Taylor-Cousar JL, McCoy KS; VX17-445-103 Trial Group. Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;394(10212):1940-8.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lea Pinders-Keßler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „CFTR-Funktionsanalyse zur Diagnosestellung und kausalen Therapie bei Zystischer Fibrose - ein Vergleich von Biomarkern“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Anteilerklärung an erfolgten Publikationen**

Lea Pinders-Keßler hatte folgenden Anteil an den aufgeführten veröffentlichten Kongress-Abstracts, die im Rahmen dieser Dissertation entstanden sind:

1. Pinders-Kessler L, Scheinert S, Klosinski M, Staab D, Derichs N. Organ-specific CFTR dysfunction: Comparison of biomarkers for CF diagnosis and CFTR modulator effects. J Cyst Fibros 2013;12:S21. 36. European Cystic Fibrosis Conference, 12.-15. Juni 2013, Lissabon (Abstract).

Beitrag: Verfassung und Einreichung des Abstracts, Datenerhebung und -auswertung: Durchführung und statistische Auswertung von Schweißtest, NPD und ICM von 11/2011 - 02/2013.

2. Derichs N, Pinders-Kessler L, Bronsveld I, Scheinert S, Rückes-Nilges C, de Jonge H, Nährlich L. Multicenter European Standardization and reference values for intestinal current measurement in rectal biopsies. Pediatric Pulmonology 2013;48(S36):300. 27. Annual North American Cystic Fibrosis Conference, 17.-19. Oktober 2013, Salt Lake City, USA (Abstract).

Beitrag: Datenerhebung und -auswertung: Durchführung und statistische Auswertung von ICM von 11/2011 - 09/2013

3. Pinders-Kessler L, Scheinert S, Hug M, Norek A, Sad I, Kleinschmidt M, Staab D, Derichs N. Organ-specific CFTR function and kinetics of new ivacaftor treatment. Pediatric Pulmonology 2014;49:248. 28th Annual North American Cystic Fibrosis Conference, 9. -11. Oktober 2014, Atlanta, USA (Abstract).

Beitrag: Verfassung des Abstracts, Datenerhebung und -auswertung: Durchführung und statistische Auswertung von Schweißtest, NPD und ICM von 11/2011 - 09/2014.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

## **Curriculum vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

# Publikationsliste

## 1. Übersichtsarbeit in Peer-Review-Zeitschrift

Kessler CS, Pinders L, Michalsen A, Cramer H. Ayurvedic interventions for osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int.* 2015;35(2):211-32.

## 2. Veröffentlichte Kongress-Abstracts

Pinders-Kessler L, Scheinert S, Klosinski M, Staab D, Derichs N. Organ-specific CFTR dysfunction: Comparison of biomarkers for CF diagnosis and CFTR modulator effects. *J Cyst Fibros* 2013;12:S21. 36. European Cystic Fibrosis Conference, 12.-15. Juni 2013, Lissabon (Abstract).

Scheinert S, Pinders-Kessler L, Klosinski M, Staab D, Derichs N. Ex vivo effect of CFTR modulators VX770, VX809 and PTC124 on CFTR-mediated chloride secretion in rectal biopsies from CF patients. *J Cyst Fibros* 2013;12(S1):S14. 36. European Cystic Fibrosis Conference, 12.-15. Juni 2013, Lissabon (Abstract).

Scheinert S, Pinders-Kessler L, Klosinski M, Derichs N. Reliability of intestinal current measurement as CFTR biomarker and responsiveness to oral ivacaftor treatment. *J Cyst Fibros* 2013;12(S1):S62. 36. European Cystic Fibrosis Conference, 12.-15. Juni 2013, Lissabon (Abstract).

Derichs N, Pinders-Kessler L, Bronsveld I, Scheinert S, Rückes-Nilges C, de Jonge H, Nährlich L. Multicenter European Standardization and reference values for intestinal current measurement in rectal biopsies. *Pediatric Pulmonology* 2013;48(S36):300. 27. Annual North American Cystic Fibrosis Conference, 17.-19. Oktober 2013, Salt Lake City, USA (Abstract).

Pinders-Kessler L, Scheinert S, Hug M, Norek A, Sad I, Kleinschmidt M, Staab D, Derichs N. Organ-specific CFTR function and kinetics of new ivacaftor treatment. *Pediatric Pulmonology* 2014;49:248. 28. Annual North American Cystic Fibrosis Conference, 9. -11. Oktober 2014, Atlanta, USA (Abstract).

## Danksagung

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt zunächst meiner Doktormutter, Frau PD Dr. Doris Staab, für Ihr offenes Ohr, Ihre gute Erreichbarkeit und für hilfreiche Rückmeldungen. Meinem ursprünglichen Betreuer Herrn Dr. Nico Derichs danke ich für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und für seine Hilfe bei der Durchführung der Messungen. Für die gegenseitige Unterstützung und tolle Zusammenarbeit möchte ich meinen Mitdoktoranden aus unserer Arbeitsgruppe, Sheila Scheinert und Michael Klosinski vielmals danken. Dem Team der Mukoviszidoseambulanz danke ich ebenfalls für die Zusammenarbeit sowie allen Probanden, besonders den CF-Patienten, für ihre Untersuchungsbereitschaft und Mitarbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich darüber hinaus auch bei Prof. Manfred Wischnewsky, der mir bei der statistischen Auswertung immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und mir darüber hinaus moralischen Beistand geboten hat und damit maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein Dank geht auch an alle Freunde, die sich in der Trainingsphase als Testpersonen zur Verfügung gestellt oder mich anderweitig bei der Promotion unterstützt haben. Zu guter Letzt möchte ich natürlich auch meiner Familie, insbesondere meinem Mann Christian und unseren Kindern für all ihre Geduld und Unterstützung aus tiefstem Herzen danken.