

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie  
Sektion Mukoviszidose – Christiane Herzog Zentrum – CFTR Biomarker Zentrum  
Campus Virchow-Klinikum  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

### **Nasale Potentialdifferenz und Intestinale Kurzschlussstrommessung zur diagnostischen Klassifizierung von Patienten mit fraglicher Mukoviszidose oder CFTR-assoziiertes Erkrankung**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Friedhelm Klosinski

aus Tübingen

Datum der Promotion: 08.12.2017

Für die Patientinnen und Patienten der Mukoviszidose-Ambulanz.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract Deutsch</b>	3
<b>Abstract Englisch</b>	4
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	5
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	6
<b>Tabellenverzeichnis</b>	7
<b>1 Einleitung</b>	8
1.1 Definition der CF und CFTR-RD	8
1.2 Geschichte der CF und CFTR-RD	8
1.3 Epidemiologie der CF und CFTR-RD	10
1.4 Genetik und Pathophysiologie der CF und CFTR-RD	12
1.5 Klinik der CF und CFTR-RD	17
1.6 Diagnostik der CF und CFTR-RD	20
1.6.1 Diagnostische Verfahren	20
1.6.2 Diagnosekriterien	21
1.7 Therapie der CF und CFTR-RD	25
<b>2 Zielsetzung</b>	28
<b>3 Material und Methoden</b>	29
3.1 Patientenkohorte	29
3.2 Schweißtest	33
3.2.1 Methode	33
3.2.2 Material und Durchführung	34
3.3 Molekulargenetik	34
3.4 Nasale Potentialdifferenz (NPD)	36
3.4.1 Methode	36
3.4.2 Material und Durchführung	37
3.5 Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM)	45
3.5.1 Methode	45
3.5.2 Material und Durchführung	46
3.6 Referenzwerte und diagnostische Interpretation	57
3.7 Qualitätskriterien und Auswertungsmethoden	58
<b>4 Ergebnisse</b>	59
4.1 Schweißtest	59
4.2 Molekulargenetik	61
4.3 Nasale Potentialdifferenz (NPD)	62
4.4 Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM)	69
4.5 Diagnostische Interpretation	82
<b>5 Diskussion</b>	87
5.1 Schweißtest	87
5.2 Molekulargenetik	87
5.3 Nasale Potentialdifferenz (NPD)	88
5.4 Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM)	91
<b>6 Zusammenfassung</b>	96
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	98
<b>8 Eidesstattliche Versicherung</b>	108
<b>9 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen</b>	109
<b>10 Publikationsliste</b>	110
<b>11 Lebenslauf</b>	111
<b>12 Danksagung</b>	112

## Abstract Deutsch

Die zystische Fibrose (CF) beruht auf einem genetisch bedingten Defekt des CFTR-Chloridkanals mit der Produktion von hochviskösem Mukus und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung sowie exokriner Pankreasinsuffizienz als vordergründigen Krankheitsbildern. Zudem sind klinisch mild verlaufende CFTR-assoziierte Erkrankungen (CFTR-RD) bekannt.

Der Schweißtest als diagnostischer Goldstandard weist in manchen Fällen Intermediärwerte auf, welche keine Diagnosesicherung zulassen. Außerdem können bestimmte Mutationen im CFTR-Gen nicht immer nachgewiesen werden. Unter diesen Umständen stehen die Messung der nasalen Potentialdifferenz (NPD) am respiratorischen Epithel der Nasenschleimhaut in vivo und die intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM) an Rektummukosabiopsien ex vivo zur erweiterten CFTR-Funktionsanalyse zur Verfügung.

Zur Diagnosefindung erfolgten von 2011 bis 2013 Schweißtest, NPD und ICM gemäß Standardprotokoll sowie eine bedarfsgerechte CFTR-Mutationsanalyse bei 29 konsekutiven ambulanten Patienten im Alter von 1 bis 63 Jahren mit fraglicher CF oder CFTR-RD. Ein Augenmerk galt der Fragestellung, inwiefern NPD und ICM eine diagnostische Abgrenzung zwischen CFTR-RD und CF beziehungsweise Non-CF ermöglichten. Für die diagnostische Auswertung von NPD und ICM wurden die Mittelwerte der NPD-Parameter Sermet-Score und Wilschanski-Index sowie der ICM-Parameter Delta Isc Carbachol pre Washout und Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) berechnet. Die diagnostische Interpretation dieser Mittelwerte orientierte sich an Referenzwerten, die derzeit multizentrisch validiert werden.

Zwei heterozygoten Trägern der CFTR-Mutation R1162L wurden mittels ICM unterschiedliche Diagnosen zugewiesen, was Anlass zu einer klinischen Neubewertung dieser Mutation gab. Unter den Trägern des 5T-Polymorphismus bestätigte sich die erhöhte Penetranz der 12TG- und 13TG-Varianten im Vergleich zur 11TG-Variante. Die NPD-Parameter Delta PD (OCl+Iso), Sermet-Score und Wilschanski-Index korrelierten statistisch signifikant mit dem Schweißtest. Der ICM-Parameter Delta Isc Carbachol pre Washout korrelierte hochsignifikant mit dem ICM-Parameter Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) und stellte somit seine Eignung als prädiktiver diagnostischer ICM-Parameter unter Beweis. Hohe interindividuelle Unterschiede bezüglich der CFTR-Restfunktion bei CFTR-RD erschwerten deren diagnostische Abgrenzung von einer CF beziehungsweise einer Non-CF ausschließlich mittels NPD oder ICM. Jedoch konnte die individuelle CFTR-Restfunktion bei CFTR-RD insbesondere mittels ICM präzise bestimmt werden. NPD und ICM trugen in aller Regel maßgebend zur Diagnosefindung bei, wobei die ICM ihre höhere CFTR-Spezifität untermauerte.

## Abstract English

Cystic fibrosis (CF) is based on a genetically caused defect of the CFTR-chloride channel with production of highly viscous mucus and chronic obstructive lung disease as well as exocrine pancreatic insufficiency as predominant clinical pictures. Besides there are known clinically mild proceeding CFTR-related disorders (CFTR-RD).

In some cases the sweattest, being the diagnostic goldstandard, shows intermediate values, which do not allow the confirmation of a clear diagnosis. Furthermore some mutations of the CFTR gene cannot always be detected. Under these circumstances the measurement of the nasal potential difference (NPD) upon the respiratory epithelia of the nasal mucosa in vivo and intestinal current measurement (ICM) as a short current measurement of biopsies from the rectal mucosa ex vivo can be executed.

From 2011 until 2013 sweattest, NPD and ICM were performed according to a standard protocol and CFTR-mutation analysis was induced as required on 29 consecutive out-patients in the age of 1 to 63 years with questionable CF or CFTR-RD with the objective to assign a clear diagnosis to each patient. Moreover attention was turned to the question to what extend NPD and ICM were able to demarcate CFTR-RD diagnostically from CF or non-CF respectively. For diagnostic analysis of NPD and ICM mean values were calculated for the NPD-parameters Sermet-Score and Wilschanski-Index as well as the ICM-parameters Delta Isc Carbachol pre Washout and Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin). These mean values' diagnostic interpretation was based on reference values, which are currently being validated multicentrely.

Two heterozygous carriers of the CFTR-mutation R1162L were given different diagnoses by means of ICM, which gave reason for a clinical reevaluation of this CFTR-mutation. Among the carriers of the 5T-polymorphism the increased penetrance of its variants 12TG and 13TG compared to its 11TG-variant was confirmed. The NPD-parameters Delta PD (OCl+Iso), Sermet-Score and Wilschanski-Index correlated statistically significantly with the sweattest. The ICM-parameter Delta Isc Carbachol pre Washout correlated highly significantly with the ICM-parameter Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) and therefore fleshed out its suitability as a predictive diagnostic ICM-parameter. High interindividual differences concerning residual CFTR-function in CFTR-RD impeded its diagnostic demarcation from CF and non-CF exclusively by means of NPD or ICM. However individual residual CFTR-function in CFTR-RD could be determined precisely especially by means of ICM. Predominantly NPD and ICM contributed decisively to the determination of the diagnoses in question, in which ICM fortified its higher CFTR-specificity.

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amil	Amilorid
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBAVD	kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens
CCH	Carbamoylcholinchlorid, Carbachol
CF	cystic fibrosis, zystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CFTR-Kanal	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Kanal
CFTR-RD	CFTR-related disorder, CFTR-assozierte Erkrankung
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure
DNA	Deoxyribonucleid acid, Desoxyribonukleinsäure
FEV <sub>1</sub>	Einsekundenkapazität
Forsk	Forskolin
Hista	Histamin
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
ICM	intestinal current measurement, intestinale Kurzschlussstrommessung
Isc	transepithelialer Kurzschlussstrom
Iso	Isoproterenol
i.v.	intravenös
K <sup>+</sup>	Kalium
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KPI	Potassium Phosphate inorganic, anorganisches Kaliumphosphat
MG	Molekulargewicht
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mosm	Milliosmol
mRNA	messenger-ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
Na <sup>+</sup>	Natrium
Non-CF	non-cystic fibrosis, nicht-zystische Fibrose
NPD	nasale Potentialdifferenz
OC1	chloridfreie Lösung
PD	Potentialdifferenz
p.i.	per inhalationem
PI-CF	zystische Fibrose mit exokriner Pankreasinsuffizienz
p.o.	per os
Pr.-Nr.	Produktnummer
PS-CF	zystische Fibrose mit exokriner Pankreassuffizienz
R <sub>t</sub>	Gewebewiderstand
SOP	standard operating procedure, Standardprotokoll
Tab.	Tabelle
μA	Mikroampère
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
Z.n.	Zustand nach

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Die Produktion von CFTR – vom Gen zum Chloridkanal.	12
Abb. 1.2	Vereinfachtes Schema der Transportmechanismen einer Zelle des respiratorischen Epithels bei Non-CF.	16
Abb. 1.3	Vereinfachtes Schema der Transportmechanismen einer Zelle des respiratorischen Epithels bei CF.	16
Abb. 1.4	Schematische Darstellung des respiratorischen Epithels bei Non-CF.	16
Abb. 1.5	Schematische Darstellung des respiratorischen Epithels bei CF.	16
Abb. 1.6	Algorithmus für die Diagnose einer CF, beginnend mit dem Schweißtest.	23
Abb. 1.7	Umfassender diagnostischer Algorithmus für eine CF und CFTR-RD.	24
Abb. 3.1	Auszug aus dem klinischen Spektrum der Patientenkohorte.	31
Abb. 3.2	NPD: schematischer Aufbau.	40
Abb. 3.3	NPD: Messkurve bei normaler Chloridleitfähigkeit (rechtes Nasenloch).	42
Abb. 3.4	NPD: Messkurve bei fehlender Chloridleitfähigkeit (rechtes Nasenloch).	43
Abb. 3.5	NPD: Messkurve bei residualer Chloridleitfähigkeit (linkes Nasenloch).	44
Abb. 3.6	ICM: Aufbau.	48
Abb. 3.7	ICM: Material und Biopsie.	49
Abb. 3.8	ICM: Messkurve bei normaler CFTR-Funktion (4 Biopsien).	54
Abb. 3.9	ICM: Messkurve bei fehlender CFTR-Funktion (4 Biopsien).	55
Abb. 3.10	ICM: Messkurve bei CFTR-Restfunktion (4 Biopsien).	56
Abb. 4.1	Schweißtest – Schweißchlorid: Einzel- und Mittelwerte.	59
Abb. 4.2	NPD – PD basal: Einzel- und Mittelwerte.	63
Abb. 4.3	NPD – Delta PD Amilorid: Einzel- und Mittelwerte.	63
Abb. 4.4	NPD – Delta PD (OCI+Iso): Einzel- und Mittelwerte.	64
Abb. 4.5	NPD – Delta PD ATP: Einzel- und Mittelwerte.	64
Abb. 4.6	NPD – Sermet-Score: Einzel- und Mittelwerte.	65
Abb. 4.7	NPD – Wilschanski-Index: Einzel- und Mittelwerte.	65
Abb. 4.8	NPD – Korrelation der Mittelwerte von PD basal und des Schweißchlorids.	66
Abb. 4.9	NPD – Korrelation der Mittelwerte von Delta PD Amilorid und des Schweißchlorids.	66
Abb. 4.10	NPD – Korrelation der Mittelwerte von Delta PD (OCI+Iso) und des Schweißchlorids.	67
Abb. 4.11	NPD – Korrelation der Mittelwerte des Sermet-Scores und des Schweißchlorids.	67
Abb. 4.12	NPD – Korrelation der Mittelwerte des Wilschanski-Index und des Schweißchlorids.	68
Abb. 4.13	ICM – PD basal: Einzel- und Mittelwerte.	70
Abb. 4.14	ICM – RT basal: Einzel- und Mittelwerte.	70
Abb. 4.15	ICM – Delta Isc Carbachol pre Washout: Einzel- und Mittelwerte.	71
Abb. 4.16	ICM – Delta Isc Amilorid: Einzel- und Mittelwerte.	71
Abb. 4.17	ICM – Delta Isc Forskolin/IBMX: Einzel- und Mittelwerte.	72
Abb. 4.18	ICM – Delta Isc Genistein: Einzel- und Mittelwerte.	72
Abb. 4.19	ICM – Delta Isc Carbachol: Einzel- und Mittelwerte.	73
Abb. 4.20	ICM – Delta Isc Histamin: Einzel- und Mittelwerte.	73
Abb. 4.21	ICM – RT final: Einzel- und Mittelwerte.	74
Abb. 4.22	ICM – Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin): Einzel- und Mittelwerte.	74
Abb. 4.23	ICM – Korrelation der Mittelwerte von PD basal und des Schweißchlorids.	75

Abb. 4.24	ICM – Korrelation der Mittelwerte von RT basal und des Schweißchlorids.	75
Abb. 4.25	ICM – Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc Carbachol pre Washout und des Schweißchlorids.	76
Abb. 4.26	ICM – Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc Amilorid und des Schweißchlorids.	77
Abb. 4.27	ICM – Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc Forskolin/IBMX und des Schweißchlorids.	77
Abb. 4.28	ICM – Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc Genistein und des Schweißchlorids.	78
Abb. 4.29	ICM – Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc Carbachol und des Schweißchlorids.	78
Abb. 4.30	ICM – Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc Histamin und des Schweißchlorids.	79
Abb. 4.31	ICM – Korrelation der Mittelwerte von RT final und des Schweißchlorids.	79
Abb. 4.32	ICM – Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc (Forskolin/IBMX+ Carbachol+Histamin) und des Schweißchlorids.	80
Abb. 4.33	ICM: Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc (Forskolin/IBMX+ Carbachol+Histamin) und Delta Isc Carbachol pre Washout.	81
Abb. 4.34	NPD: Sermet-Score und Diagnosen.	85
Abb. 4.35	NPD: Wilschanski-Index und Diagnosen.	85
Abb. 4.36	ICM: Delta Isc Carbachol pre Washout und Diagnosen.	86
Abb. 4.37	ICM: Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) und Diagnosen.	86

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	CFTR-Mutationsklassen.	14
Tab. 3.1	Patientenkohorte – Vorbefunde.	32
Tab. 3.2	Ursachen falsch positiver Schweißteste.	33
Tab. 3.3	Ursachen falsch negativer Schweißteste.	34
Tab. 3.4	Schweißtestmaterial.	34
Tab. 3.5	Datenaufzeichnung.	37
Tab. 3.6	Elektroden.	37
Tab. 3.7	Hautbrücke (Referenzbrücke).	37
Tab. 3.8	Nasenbrücke (Messbrücke).	38
Tab. 3.9	Perfusionsmaterial.	38
Tab. 3.10	Zusatzmaterial.	38
Tab. 3.11	Substanzen zur Herstellung der Lösungen.	38
Tab. 3.12	Lösungen.	39
Tab. 3.13	Datenaufzeichnung.	46
Tab. 3.14	Rektumbiopsien (Entnahme, Transport und Präparierung).	46
Tab. 3.15	Ussingkammern.	46
Tab. 3.16	Substanzen.	47
Tab. 3.17	Substanzen zur Herstellung des Meylerpuffers.	48
Tab. 4.1	Patientenkohorte – Gesamtbefunde und diagnostische Interpretation.	84

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition der CF und CFTR-RD

Die Mukoviszidose oder zystische Fibrose (engl. *cystic fibrosis*, *CF*) ist die häufigste angeborene autosomal-rezessive Stoffwechselerkrankung der westlichen Welt mit ernster Prognose (CFFPR 2012, Tobias et al. 2011, WHO 2004). Ein Defekt im CFTR-Gen führt zu einer herabgesetzten Chloridpermeabilität des sekretorischen Epithels aller exokrinen Drüsen und verändert dadurch deren Sekretzusammensetzung. Der wasserarme, meist hochvisköse Mukus verstopft die Ausführungsgänge der Drüsen und verursacht Entzündung bis hin zur zystisch-fibrotischen Umwandlung der betroffenen Organe. Im Vordergrund des klinischen Krankheitsbildes stehen chronische obstruktive Lungenerkrankung und exokrine Pankreasinsuffizienz (Dockter und Lindemann 2004, Muntau 2011).

Die CFTR-assoziierte Erkrankung (engl. *CFTR-related disorder*, *CFTR-RD*) ist definiert als isolierte klinische Diagnose in Form von disseminierten Bronchiektasen oder einer chronischen Pankreatitis oder einer obstruktiven Azoospermie sowie dem Nachweis von 1-2 für CFTR-RD beschriebene CFTR-Mutationen und/oder einer CFTR-Dysfunktion außerhalb des CF-typischen Bereichs. Die Diagnosekriterien für eine CF sind hierbei nicht erfüllt. Eine CFTR-RD zeigt im Vergleich zu einer CF in aller Regel mildere klinische Bilder und Verläufe (Bombieri et al. 2011, Nährlich et al. 2013).

## 1.2 Geschichte der CF und CFTR-RD

Mutationsfrequenzanalysen lassen darauf schließen, dass es ab ca. 53000 v. Chr. zu ersten Spontanmutationen im CFTR-Gen in Ostafrika, Vorderasien und Südwesteuropa kam. Völkerwanderungen und Eroberungszüge führten zur Verbreitung des Gendefekts in Europa und dessen Ausweitung auf den gesamten Globus im Zuge der Kolonisation (Gallati 2001). Von geringer Lebenserwartung „salzig schmeckender Kinder“ berichten Überlieferungen aus dem 17. Jahrhundert (Dockter und Lindemann 2004, Wood et al. 1976, Quinton 1999).

Im Jahre 1905 beschrieb der österreichische Arzt Karl Landsteiner erstmalig den Mekoniumileus (Landsteiner 1905). Die klinische Erstbeschreibung der CF erfolgte 1936 durch den Schweizer Pädiater Guido Fanconi als „Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose mit Bronchiektasen“ (Fanconi et al. 1936). 1938 grenzte die Amerikanerin Dorothy Hansine Andersen die Erkrankung schließlich eindeutig von der Zöliakie ab und definierte die „zystische Fibrose des Pankreas“ als ein eigenständiges Krankheitsbild (Andersen 1938). Der

amerikanische Pathologe Sidney Farber erkannte 1944, dass es sich bei der CF um eine systemische Erkrankung handelt, der eine Störung der exokrinen Drüsen mit Produktion von verdicktem Mukus zugrunde liegt. Er führte den Begriff Mukoviszidose (lat. *mucus* „Schleim“ und *viscidus* „zäh, klebrig“) ein (Farber 1944).

Den Grundstein für die Entwicklung des Schweißtests legte Paul di Sant'Agnese im Jahre 1953. Während einer Hitzewelle in New York City beschrieb er den erhöhten Natriumchloridgehalt im Schweiß von CF-Patienten und machte dadurch homozygote Krankheitsträger erfassbar (Di Sant'Agnese et al. 1953). Auf dieser Erkenntnis aufbauend entwickelten Gibson und Cooke 1959 den Schweißtest mittels Pilocarpin-induzierter Iontophorese, der noch heute Goldstandard der CF-Diagnostik ist (Gibson und Cooke 1959, Nährlich et al. 2013).

Mit Beginn der 80er-Jahre des 20. Jahrhunderts bewirkten neue symptomatische Therapien wie autogene Drainage, wirksamere Antibiotika gegen *Pseudomonas aeruginosa*, säurefestes mikrodisperses Pankreatin und hochkalorische Ernährung eine deutlich höhere Lebenserwartung der Erkrankten (Dockter und Lindemann 2004).

Einen Meilenstein in der Geschichte der CFTR-Funktionsdiagnostik stellt die Messung der nasalen Potentialdifferenz (NPD) dar, die 1981 zum ersten Mal durchgeführt wurde. Knowles et al. konnten nachweisen, dass das respiratorische Epithel homozygoter CF-Patienten eine erhöhte Potentialdifferenz im Vergleich zu gesunden Kontrollen aufweist, wozu auch eine gesteigerte Natriumreabsorption in die Zelle beiträgt (Knowles et al. 1981). Dadurch wurde offenbar, dass sich die ursächliche Pathogenese der CF vorwiegend am apikalen Epithel abspielt, was ab den 90er-Jahren des 20. Jahrhunderts die Entwicklung der intestinalen Kurzschlussstrommessung (ICM) ermöglichte, die heute eine wichtige Rolle in der CFTR-Funktionsdiagnostik und der CF-Forschung einnimmt (De Jonge et al. 2004, Derichs et al. 2009, Derichs et al. 2010, Hug et al. 2011, Mall et al. 2000, Mall et al. 2004, Veeze et al. 1991, Veeze et al. 1994).

1983 beschrieb Paul Quinton die Hauptursache der veränderten Schweißzusammensetzung und somit den Basisdefekt der CF im Allgemeinen: die intrazelluläre Chloridabsorptions-beziehungsweise -sekretionsstörung (Quinton 1983).

Im Jahre 1985 entdeckte die Gruppe um Tsui, Wainwright und White das CFTR-Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (Tsui et al. 1985, Wainwright et al. 1985, White et al. 1985). 1989 schließlich gelangen Riordan, Tsui, Collins et al. die Sequenzierung und genaue Lokalisation des CFTR-Gens auf der Position 7q31.2 (Riordan et al. 1989), was den Weg für die heutige molekulargenetische Diagnostik bereitete (Rowe et al. 2005, Voter und Ren 2008).

Diese Fortschritte in der elektrophysiologischen und molekulargenetischen CFTR-Diagnostik ermöglichten in zunehmendem Maße auch den Nachweis milderer CF-Formen oder einer CFTR-RD (Elborn et al. 1991, FitzSimmons 1993, WHO 2004, Bombieri et al. 2011).

Um die Jahrtausendwende erkannte man den Einfluss sogenannter modulierender, nicht auf dem CFTR-Genlocus befindlicher Gene auf die klinische Ausprägung der CF (Boucher 2004, Davies et al. 2005, Drumm 2001). Mit dem CFTR-Potentiator Ivacaftor ist seit 2012 erstmals eine kausale und personalisierte Therapie für erkrankte Träger der Mutation G551D möglich (Derichs 2013, McPhail und Clancy 2013, Sermet-Gaudelus 2013). Seit November 2015 steht für Patienten ab 12 Jahren mit der homozygoten Mutation F508del ein aus dem CFTR-Korrektor Lumacaftor und dem CFTR-Potentiator Ivacaftor bestehendes Kombinationspräparat zur kausalen Therapie zur Verfügung (EMA 2015, FDA 2015, Wainwright et al. 2015).

### **1.3 Epidemiologie und Populationsgenetik der CF und CFTR-RD**

Die CF gehört zu den seltenen Erkrankungen (engl. *rare diseases* oder *orphan diseases*), welche definiert sind als „lebensbedrohende oder chronische Invalidität nach sich ziehende Leiden“ mit einer absoluten Prävalenz von weniger als 228000 (EU) beziehungsweise 200000 (USA) Patienten (EU-Verordnung 1999, Office of Rare Diseases Research 2014). Aufgrund einer Inzidenz von ca. 1:2500 in der EU und 1:3500 in den USA stellt die CF jedoch die häufigste angeborene autosomal-rezessive Stoffwechselerkrankung der kaukasischen Rasse mit eingeschränkter Lebenserwartung dar (CFFPR 2012, Tobias et al. 2011, WHO 2004). Weltweit sind ungefähr 70000 Menschen bei ausgeglichenem Geschlechterverhältnis betroffen (CFFPR 2012, Lungeninformationsdienst 2012, Muntau 2011).

Effektivere Therapien und ein umfassenderes Krankheitsverständnis haben in den vergangenen 30 Jahren zu einem deutlichen Anstieg der Lebenserwartung und der gesundheitsbezogenen Lebensqualität von CF-Patienten geführt. Lag um 1940 der Überlebensdurchschnitt noch bei circa 6 Monaten (Davis 2006), so kann für heutige Neugeborene mit einer CF eine durchschnittliche Lebenserwartung von ungefähr 45-50 Jahren angegeben werden (Dockter und Lindemann 2004, Muntau 2011), was eine weitere Ausdehnung der Betreuung Betroffener in den Bereich der Erwachsenenmedizin zur Folge hat (Dobbin und Bye 2003). Die Verbesserung diagnostischer Methoden ging nicht nur mit einer deutlichen Senkung des medianen Diagnosealters, sondern auch mit der Erfassung eines höheren Anteils an milden CF-Formen und CFTR-assoziierten Erkrankungen (CFTR-RD) einher. Diese Erweiterung des diagnostischen

Spektrums und die steigende Lebenserwartung erklären den Anstieg der Prävalenz der CF in den letzten Jahrzehnten (Elborn et al. 1991, FitzSimmons 1993, WHO 2004).

In Deutschland waren in 2012 rund 8000 Menschen an CF erkrankt, darunter befanden sich 52,4 % im Erwachsenenalter. Das mediane Diagnosealter betrug 7,2 Monate, das mediane Überleben mindestens 39 Jahre (Qualitätssicherung Mukoviszidose 2012). 5 % der deutschen Gesamtbevölkerung, also ungefähr 4 Millionen Bürger, sind heterozygote Anlageträger und können ein mutiertes Allel vererben. Pro Jahr kommen hierzulande etwa 300-400 erkrankte Kinder zur Welt (Lungeninformationsdienst 2012). In den USA gab es in 2012 knapp 28000 registrierte CF Patienten, wovon 49,1 % mindestens 18 Jahre alt waren. Die Diagnose wurde im medianen Alter von 4 Monaten gestellt und der Median der Überlebenschancen lag bei 41,1 Jahren (CFFPR 2012).

Gegenwärtig sind über 2000 CFTR-Mutationen bekannt, wovon über 100 als CF-verursachend gelten (Bonadia 2014, CFTR2 2014). F508del ist die mit Abstand häufigste Mutation mit einer allelischen Frequenz von ca. 90 % weltweit (CF analysis consortium 1990, Derichs 2013). Nur 4 weitere Mutationen weisen bei einem 1-3%igen weltweiten Vorkommen eine Frequenz von > 0,1 % auf: G542X, G551D, N1303K und W1282X (Clancy und Gain 2012, Derichs 2013, Rogan et al. 2011). Mutationen der Klassen 4 und 5 oder Sequenzvariationen führen bei ungefähr 2 % aller Erkrankten zu CFTR-RD mit milden klinischen Verläufen (Paranjape und Zeitlin 2008, WHO 2004). Ein Beispiel ist der Polymorphismus IVS8-5T, der in circa 10 % der Gesamtbevölkerung auftritt und in Abhängigkeit seiner genetischen Varianten unter anderem CFTR-RD verursachen kann (Gromann et al. 2004).

Die Häufigkeit und das Mutationsspektrum der CF weisen geographische und ethnische Unterschiede auf. So ist die Inzidenz des Gendefekts in der schwarzen Bevölkerung mit circa 1:20000 und in der asiatischen mit über 1:100000 deutlich geringer als in der kaukasischen Rasse (Dockter et al. 2012). In Irland tritt die CF weltweit am häufigsten auf, die Inzidenz beträgt dort 1:1353 (Farrell et al. 2007). Die Mutation F508del hat ihre größte Verbreitung in Nordamerika und in Mittel- und Nordeuropa, G542X und N1303K hingegen im mediterranen Raum und W1282X im Mittleren Osten (Bobadilla et al. 2002, CFFPR 2012, ECFSPR 2010, WHO 2004). In manchen Populationen spiegelt das Vorkommen bestimmter Mutationen auch deren ethnischen Ursprung wider. Beispielhaft hierfür ist die im internationalen Vergleich überdurchschnittlich hohe Prävalenz der keltischen Mutation G551D in der Bretagne sowie im Vereinigten Königreich Großbritannien und Nordirland (Bobadilla et al. 2002, ECFSPR 2010, Scotet et al. 2003, WHO 2004).

## 1.4 Genetik und Pathophysiologie der CF und CFTR-RD

Die CF wird monogen autosomal-rezessiv vererbt. Sind beide Partner eines Paares mit Kinderwunsch compound-heterozygote Anlageträger, so beträgt die Wahrscheinlichkeit eines an CF erkrankten Kindes 25 %. Das Risiko für den Nachwuchs, ebenfalls compound-heterozygoter Genträger zu sein, liegt bei 50 % und die Wahrscheinlichkeit, kein mutiertes Allel zu tragen, bei 25 % (Tümmler und Lindemann 2004).

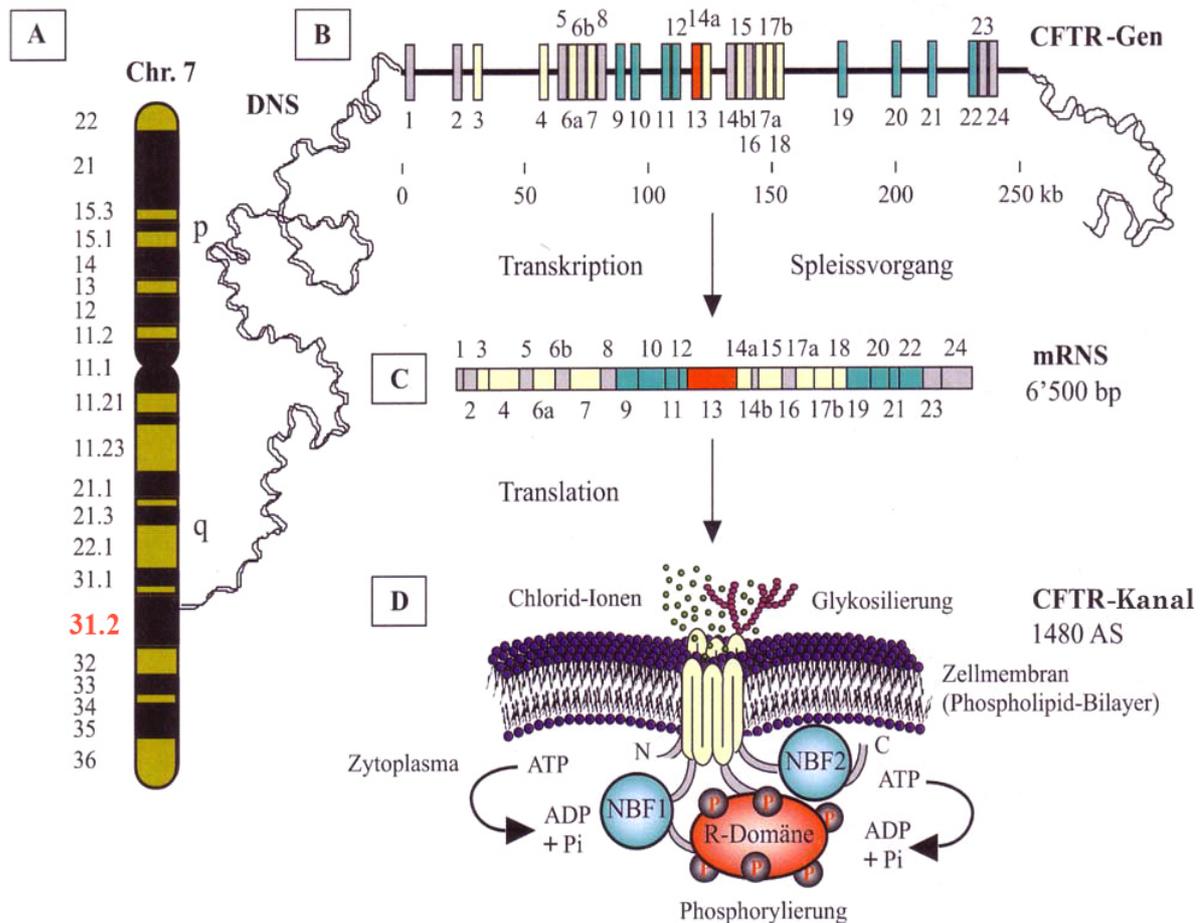


Abb. 1.1: Die Produktion von CFTR – vom Gen zum Chloridkanal (modifiziert nach Gallati 2001).

**Legende:** Abschnitt A: Chr.: Chromosom; Zahlen 22-36, z.B. 31.2: Haupt- und Unterbanden; p: kurzer Arm; q: langer Arm. Abschnitt B: DNS: Desoxyribonukleinsäure; Zahlen 1-24: Exons; Zahlen 0-250: Länge in Kilobasen; kb: Kilobasen. Abschnitt C: Zahlen 1-24: Exons; mRNS: Messenger-Ribonukleinsäure; bp: Basenpaare. Abschnitt D: AS: Aminosäuren; Phospholipid-Bilayer: Phospholipid-Doppelschicht; N: Amino-Terminus; C: Carboxy-Terminus; ATP: Adenosintri-phosphat; ADP: Adenosindiphosphat; Pi: Phosphatidylinositol; NBF: nukleotidbindende Falte; R-Domäne: regulatorische Domäne; P: Phosphat.

Das CFTR-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 7 auf der Position 7q31.2 lokalisiert. Es umfasst 2300 Kilobasenpaare und enthält 27 Exons, die in eine 6,5 Kilobasen lange mRNA transkribiert werden. Die Exons sind mit den Nummern 1 bis 24 versehen, da die Beschreibung der Exons 6b, 14b und 17b erst nachträglich erfolgte. Translationsprodukt ist ein Protein, das aus 1480 Aminosäuren besteht und vorwiegend als cAMP-regulierter membranständiger Chloridkanal am apikalen Epithel aller sekretorischen Drüsen fungiert (Leitlinie zur Molekulargenetischen Diagnostik der CF 2009), siehe Abbildung 1.1.

Das CFTR-Protein gehört zur Gruppe der ABC-Transporter (*engl.: ATP-binding cassette, ABC*), die ATP binden und aktiv am Ionentransport durch die Zellmembran beteiligt sind (Gallati 2001), und weist 5 Domänen auf: eine regulatorische Domäne (RD), 2 transmembranbindende Domänen (TMD1, TMD2) und 2 nukleotidbindende Falten (NBF1, NBF2), siehe Abbildung 1.1. Die TMD bilden die Kanalpore. Zur Öffnung des CFTR-Kanals wird die RD von einer cAMP-abhängigen Proteinkinase A phosphoryliert und ATP an die NBF gebunden. Die dadurch ausgelöste Dimerisierung der NBF im Verhältnis 1:1 ermöglicht die Öffnung der Kanalpore. Sie schließt sich wieder, indem die NBF unter ATP-Verbrauch dissoziieren. Dieser Öffnungs- und Schließvorgang wird in seiner Gesamtheit auch als Gating bezeichnet (Derichs 2013, Kirk und Wang 2011).

Der CFTR-Kanal dient hauptsächlich der Chloridsekretion, in den Schweißdrüsen jedoch der Chloridabsorption. Dem CFTR-Protein werden zahlreiche weitere Funktionen zugeschrieben, wie beispielsweise der Transport von Bikarbonat und Glutathion, die Regulation des extrazellulären pH-Wertes, der extrazellulären Flüssigkeitsschicht, des ENaC-Kanals und alternativer Chloridkanäle (Hebestreit und Hebestreit 2013, Pezzulo et al. 2012, Rowe et al. 2005, Tümmler 2008).

Die CF ist durch Mutationen im CFTR-Gen bedingt (Riordan et al. 1989). Allerdings führen nicht alle CFTR-Mutationen stets zu der Erkrankung. Als CF-verursachend gelten CFTR-Mutationen bei deutlicher CFTR-Synthese- und/oder -Funktionsstörung, Deletionen einzelner oder mehrerer Exons, vorzeitigem Einfügen eines Stopp-Kodons (Insertionen, Deletionen oder Nonsense-Mutationen) oder wenn an intronischen Spleißstellen eines der invarianten Nukleotide GT/AG betroffen ist. In ungefähr 50 % der Erkrankungsfälle beruht der Gendefekt auf einer Missense-Mutation, so auch bei der Mutation F508del. Hier fehlt aufgrund einer Deletion von 3 Basenpaaren im Exon 10 die Kodierung für Phenylalanin an Position 508. (Nährlich et al. 2013, Stuhmann-Spangenberg et al. 2009, Tümmler 2008).

Eine typische für CFTR-RD beschriebene CFTR-Mutation ist R117H, die häufig bei CFTR-RD-Patienten mit obstruktiver Azoospermie vorliegt (Nährlich et al. 2013, Yu et al. 2012). Der

Polymorphismus IVS8-5T führt durch eine herabgesetzte Splice-Effektivität zwischen Intron 8 und Exon 9 zu einer verminderten Menge an intakter mRNA und somit zu einer Reduktion an funktionsfähigem CFTR-Protein. In Abhängigkeit der Länge eines vorgeschalteten repetitiven DNA-Abschnitts, des sogenannten TG-Repeats, kann das 5T-Allel klinisch folgenlos bleiben oder milde Formen einer CF beziehungsweise eine CFTR-RD verursachen. 12 oder 13 TG-Repeats gehen dabei mit einer wesentlich höheren Penetranz als 11 TG-Repeats einher (Groman et al. 2004, Nährlich et al. 2013).

Die Mutationen können in 6 verschiedene Klassen unterteilt werden (siehe Tab. 1.1), wobei der CFTR-vermittelte Chloridtransport mit steigender Zahl der Klasse zunimmt. Genveränderungen der Klassen I, II, V und VI führen zu einer geringeren Menge an funktionsfähigem, an die Zellmembran gelangendem CFTR-Protein. Mutationen der Klassen III und IV hingegen verringern die Funktionsfähigkeit des bereits an der Zelloberfläche befindlichen Chloridkanals (Derichs 2013). Die höchste Korrelation zwischen Phänotyp und Genotyp besteht bezüglich exokriner Pankreasfunktion und Mutationstyp. Schwere Mutationsformen der Klassen I-III verursachen eine exokrine Pankreasinsuffizienz (PI-CF), Patienten mit milderer Gendefekten der übrigen Mutationsklassen hingegen sind exokrin pankreassuffizient (PS-CF) (Rowntree und Harris 2003, Zielinski 2000). Auch der CFTR-Aktivitätsgrad korreliert mit der klinischen Manifestation. Unter der Annahme einer CFTR-Aktivität von 100 % bei Gesunden und 50 % bei compound-heterozygoten Mutationsträgern, tritt eine PI-CF bei einer durchschnittlichen CFTR-Restfunktion von < 1 % auf. Eine Chloridkanalfunktion von circa 1-10 % im Mittelwert äußert sich in einer PS-CF. Ab einer durchschnittlichen CFTR-Aktivität von ungefähr 15-20 % ist die Chloridkonzentration im Schweiß < 60 mmol/l, es kann jedoch eine kongenitale bilaterale Aplasie des Vas deferens (CBAVD) mit 2 CFTR-Mutationen vorliegen. Der Mittelwert der CFTR-Restfunktion bei CFTR-RD rangiert im Bereich zwischen 15 und 50 % (Derichs 2013, Mishra et al. 2005, Rowe et al. 2007).

Tab. 1.1: *CFTR-Mutationsklassen* (modifiziert nach Hebestreit und Hebestreit 2013, Tümmler 2008).

<i>Klasse</i>	<i>Defekt</i>	<i>Beispiele</i>
I	Keine oder gestörte CFTR-Proteinsynthese	G542X, W1282X, R553X
II	Fehlerhafte CFTR-Proteinverarbeitung	F508del, N1303K, A455E
III	Gestörte Regulation des CFTR-Kanals	G551D, G551S, R792G
IV	Eingeschränkte Ionenleitfähigkeit des CFTR-Kanals	R117H, R347P, R334W
V	Reduzierte Synthese intakten CFTR-Proteins	3849+10kbC->T, 3272-26A->G, 5T
VI	Vermehrter Abbau des CFTR-Kanals	Q1412X

Die Elektrophysiologie der CF sei im Folgenden am Beispiel der Atemwege erläutert. An der apikalen Membran des respiratorischen Epithels werden Chloridionen beim Gesunden vorwiegend auf zwei Wegen aus der Zelle transportiert: zum einen über den CFTR-Kanal, dessen  $\beta$ -adrenerge Stimulation mithilfe der cAMP-abhängigen Proteinkinase A erfolgt. Zum anderen über einen alternativen Chloridkanal (CaCC), der kalziumvermittelt von einer Proteinkinase C aktiviert wird und durch den CFTR-Kanal mitreguliert wird. Basolateral gelangt das Chlorid über den Na-K-2Cl-Cotransporter nach intrazellulär. Natrium wird apikal über den epithelialen Natriumkanal (ENaC) in die Zelle absorbiert und basolateral von der Natrium-Kalium-ATPase im Austausch gegen Kalium nach extrazellulär geschleust. Der passive Wassernachstrom in den periziliären Raum erhält die Periziliarschicht, die den Zilien den Abtransport des Sekrets nach oral, die sogenannte mukoziliäre Clearance, ermöglicht (Hebestreit und Hebestreit 2013, Rowe et al. 2005, Tümmeler und Lindemann 2004), siehe Abbildungen 1.2 und 1.4.

Bei CF-Patienten ist die CFTR-vermittelte Chloridsekretion unterbunden oder eingeschränkt. Gleichzeitig liegt aufgrund fehlender Inhibition durch den CFTR-Kanal eine Hyperaktivität des ENaC vor, Natrium wird also vermehrt nach intrazellulär absorbiert. Der verminderte extrazelluläre Gehalt an Natriumchlorid senkt den passiven Nachstrom von Wasser. Dadurch verschmälert sich die Periziliarschicht und die mukoziliäre Clearance kommt zum Erliegen. Der wasserarme, hochvisköse Mukus akkumuliert und bietet einen Nährboden für Keime, die nicht mehr effektiv beseitigt werden können (Hebestreit und Hebestreit 2013, Tümmeler und Lindemann 2004), siehe Abbildungen 1.3 und 1.5.

In den Ausführungsgängen der Schweißdrüsen weicht die Physiologie von diesem Prinzip ab. Beim Gesunden werden Natrium- und Chloridionen aus dem duktalem Lumen reabsorbiert, um aus dem im sekretorischen Drüsenteil hergestellten isotonen Sekret hypotonen Schweiß zu produzieren. Da Natriumchlorid beim CF-Patienten nur unzureichend rückresorbiert werden kann, verbleibt es vermehrt intraduktal und bedingt die erhöhte Salz- beziehungsweise Chloridkonzentration im Schweißtest (Quinton 2007, Rowe et al. 2005).

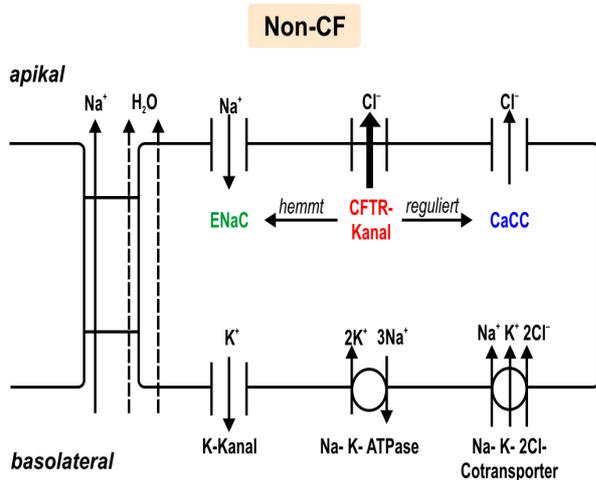


Abb. 1.2: Vereinfachtes Schema der Transportmechanismen einer Zelle des respiratorischen Epithels bei Non-CF.

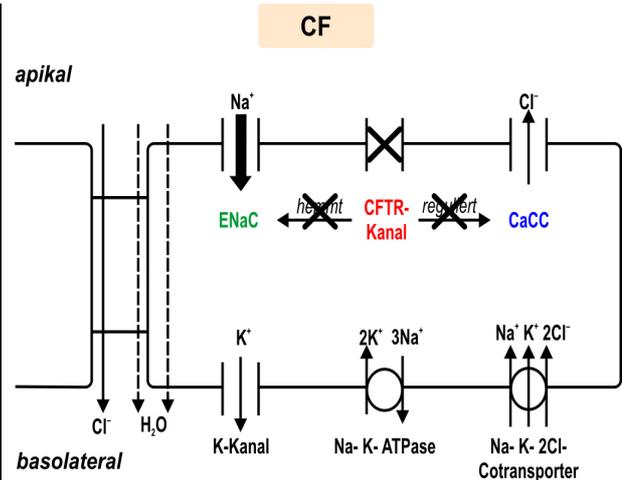


Abb. 1.3: Vereinfachtes Schema der Transportmechanismen einer Zelle des respiratorischen Epithels bei CF.

Legende: Na<sup>+</sup>: Natrium; H<sub>2</sub>O: Wasser; Cl<sup>-</sup>: Chlorid; ENaC: epithelialer Natriumkanal; CFTR-Kanal: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Kanal; CaCC: kalziumabhängiger Chloridkanal; K<sup>+</sup>: Kalium; K-Kanal: Kaliumkanal; Na-K-ATPase: Natrium-Kalium-ATPase; Na-K-2Cl-Cotransporter: Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporter

(modifiziert nach Hebestreit und Hebestreit 2013).

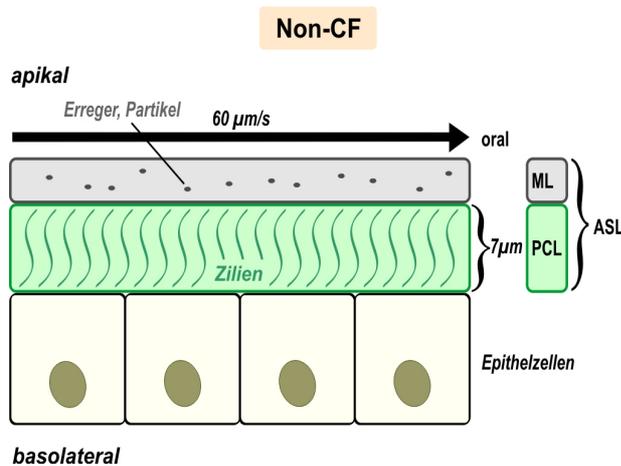


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des respiratorischen Epithels bei Non-CF.

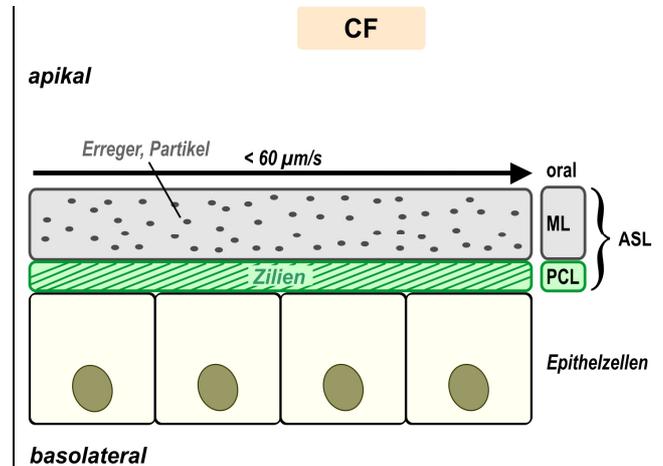


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des respiratorischen Epithels bei CF.

Legende: ML: Mukusschicht; PCL: Periziliarschicht; ASL: Atemwegsflüssigkeit

(modifiziert nach Mall und Boucher 2006).

## 1.5 Klinik der CF und CFTR-RD

Die klinischen Ausprägungsformen der CF sind sehr heterogen und komplex (Gallati 2001). Dazu tragen die Mikroheterogenität des CFTR-Gens, exogene Einflüsse wie Infektionsverläufe, Ernährung, Therapie und das soziale Umfeld des Patienten (O'Sullivan und Freedman 2009) sowie die Wirkung modifizierender Gene (Boucher 2004, Davies et al. 2005, Drumm 2001) bei. Die klinischen Ausprägungsgrade einer CF und CFTR-RD erstrecken sich über ein breites Spektrum, welches mit dem Aktivitätsgrad der CFTR-Funktion korreliert. So liegt bei einer PI-CF eine geringere CFTR-Restfunktion als bei einer PS-CF vor, welche wiederum eine geringere CFTR-Restfunktion als eine CFTR-RD aufweist. Dieser Zusammenhang erklärt die vergleichsweise milden klinischen Bilder und Verläufe einer CFTR-RD, die häufig erst im Jugend- oder Erwachsenenalter diagnostiziert wird (Bombieri et al. 2011, Nährlich et al. 2013). Außerdem korreliert der CFTR-Genotyp in Form der Mutationsklassen sowohl mit der exokrinen Pankreasfunktion als auch mit dem Schweißtest, siehe auch Kapitel 1.4, Seite 13 (Derichs 2013, Bombieri et al. 2011, Nährlich et al. 2013, Rowe et al. 2007, Rowntree und Harris 2003, Zielinski 2000).

Unbehandelt kann die Krankheit bereits im Vorschulalter zum Tode führen. Die Leitsymptome sind Maldigestion und rezidivierende bronchopulmonale Infekte. Betroffene Organsysteme sind Schweißdrüsen, Respirationstrakt, Pankreas, Darm, Leber und Gallenwege sowie Reproduktionstrakt. Außerdem können Beeinträchtigungen des Skelettsystems wie Skoliosen und Kyphosen oder CF-assoziierte Arthropathien vor allem der großen Gelenke auftreten. Eine primäre Beteiligung von Knochen und Muskulatur ist Gegenstand gegenwärtiger Diskussion. Nicht zuletzt stellt die Krankheit Betroffene und deren Angehörige vor erhebliche psychische Herausforderungen (Bartig 2008, Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013, Muntau 2011).

Die Schweißdrüsen produzieren bei circa 98 % der Betroffenen einen stark salzhaltigen Schweiß. Bei Fieber, Hitze und Sport kann es zum Salzverlustsyndrom mit hypochlorämischer Alkalose ohne Erbrechen kommen. Die wenigen CF-Fälle mit normalem Schweißtest sind in aller Regel pankreassuffizient und zeigen mildere klinische Verläufe (Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013, Nährlich et al. 2013).

In den oberen Atemwegen begünstigen Sekretretention und chronische Entzündung das Auftreten von chronischen Sinusitiden, Nasennebenhöhlen- und Nasenpolypen bei Ödem und Hyperplasie der Nasenschleimhäute (Muntau 2011).

Hauptgrund für die Morbidität bei CF ist die bronchopulmonale Beteiligung, deren Ausmaß die Lebenserwartung wesentlich bestimmt (Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013). Für mehr als 90 % der Patienten stellt eine respiratorische Insuffizienz die Todesursache dar (Grosse et al. 2004). Prognostisch ungünstig wirkt sich die dauerhafte Besiedlung der Atemwege mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*-Komplex und *Stenotrophomonas maltophilia* aus. Dies gilt ebenso für Patienten mit einer Einsekundenkapazität ( $FEV_1$ ) < 30 % des Sollwertes, wozu auch Mangelernährung und ein sekundärer Diabetes mellitus beitragen. (Kulich et al. 2003, Wilmott 2007).

Sekretverhalt aufgrund eingeschränkter mukoziliärer Clearance und Inflammationsprozesse im Respirationstrakt führen bereits ab dem ersten Lebensjahr zu bronchialer Obstruktion mit produktivem Husten. Diese schlägt sich spirometrisch in einer reduzierten  $FEV_1$  nieder und resultiert langfristig in einem Lungenemphysem. Chronisch rezidivierende Bronchopneumonien oder Kolonisationen der Atemwege entstehen häufig durch bakterielle Erreger wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptokokkus pneumoniae* und den *Burkholderia cepacia*-Komplex, aber auch durch Mykosen mit *Aspergillus fumigatus* oder *Candida albicans*. Über 10 % der CF-Patienten sind von einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose (ABPA) betroffen (Hebestreit und Hebestreit 2013, Muntau 2011).

Die chronischen Infektionen stoßen einen Circulus vitiosus an, indem sie die schon bestehende bronchiale Inflammation des respiratorischen Epithels verstärken und somit eine Erhöhung der Sekretproduktion bewirken, was weitere Infekte begünstigt. Bei der vollständigen Verlegung von Bronchien mit Mukus („mucoid impaction“) bilden sich Obstruktionsatelektasen. Außerdem kommt es entzündungs- und infektionsbedingt zur progredienten Zerstörung der Bronchialwände mit der Gefahr eines Bronchialkollapses und der Destruktion des peribronchialen Bindegewebes. Dadurch wird die sekundäre Entwicklung von weiteren Atelektasen, Lungenzysten und Lungenabszessen, emphysematösen Lungenabschnitten sowie Bronchiektasen begünstigt. Letztere erschweren die Sekretförderung und erhöhen dadurch zusätzlich die Infektanfälligkeit. Die chronisch rezidivierenden Bronchopneumonien zerstören also in fortschreitendem Ausmaß das Bronchialepithel und die Alveolen, was eine respiratorische Insuffizienz zur Folge hat. Langfristig entwickelt sich eine pulmonale Hypertonie mit Rechtsherzhypertrophie und Rechtsherzinsuffizienz. Als Zeichen der chronischen Hypoxie imponieren Trommelschlegelfinger und Uhrglasnägel (Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013, Muntau 2011).

Bei einer PS-CF und CFTR-RD kann es zu rezidivierenden Pankreatitiden kommen (Bombieri et al. 2011, Hebestreit und Hebestreit 2013). In 90-95 % der CF-Fälle liegt jedoch eine PI-CF mit erniedrigten Elastasekonzentrationen im Stuhl vor (Davis et al. 1996, Derichs 2013, Dockter et al.

2012, Flume et al. 2012). Da das pankreatische Sekret zu zähflüssig ist und aufgrund einer gestörten Bikarbonatsekretion ein zu saures Milieu für Verdauungsenzyme wie die Lipase darstellt, können Fette und die fettlöslichen Vitamine A, D, E und K nicht ausreichend enzymatisch abgebaut und resorbiert werden. Von Geburt an zeigt sich eine Maldigestion mit folgender Gedeihstörung und Vitaminmangel sowie Kleinwuchs und verzögerter Pubertätsentwicklung als Spätkomplikationen. Die Verlegung der pankreatischen Ausführungsgänge mit präobstruktiver Dilatation führt zur Ausbildung von Zysten und die Autodigestion zum fibrotischen Umbau des Gewebes. Ablagerungen und die fortschreitende Fibrosierung können meist erst bei jugendlichen oder erwachsenen Erkrankten die Langerhans-Inseln verdrängen und zu einer eingeschränkten Insulinsekretion führen. Diese hat im Zusammenspiel mit einer inflammationsassoziierten peripheren Insulinresistenz eine pathologische Glukosetoleranz zur Folge, die langfristig in eine Mischform aus Diabetes mellitus Typ 1 und 2 mündet. (Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013, Muntau 2011).

Hauptursache für einen in 10-15 % der Fälle auftretenden lebensbedrohlichen Mekoniumileus ist die exokrine Pankreasinsuffizienz. Jenseits der Neugeborenenperiode zeigt das distale intestinale Obstruktionssyndrom (DIOS) ein dem Mekoniumileus ähnliches klinisches Bild. Die Koprostase kann durch Nahrungsumstellung und zu geringe Flüssigkeitsaufnahme bedingt sein. Zähle Stuhlmassen sind auch der Grund für einen Rektumprolaps, der im Kindesalter fast ausschließlich CF-assoziiert ist. Weitere mögliche gastrointestinale Manifestationen sind Invagination, Volvulus, Eiweißverlustsyndrom und gastroösophagealer Reflux (Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013, Muntau 2011, Wilmott 2007).

Im hepatobiliären System bewirkt der behinderte Abfluss der eingedickten Gallenflüssigkeit eine langsam fortschreitende Cholestase. Sie kann sich bereits postnatal in Form eines Ikterus prolongatus äußern und vereinzelt die Entstehung einer Cholelithiasis mit folgenden rezidivierenden Cholezystitiden und Cholangitiden fördern. Durch fettige Degeneration der Leber entsteht eine Hepatomegalie. Langfristig lässt die zunehmende Cholestase die Leber fibrosieren und es kommt zu einer fokalen biliären Leberzirrhose mit Splenomegalie und portaler Hypertension, die im weiteren Verlauf die Gefahr von Ösophagusvarizen birgt. (Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013, Muntau 2011).

Ungefähr 97 % der Männer mit CF sind unfruchtbar aufgrund einer kongenitalen bilateralen Aplasie des Vas deferens (CBAVD) mit resultierender obstruktiver Azoospermie. Als Ursache einer möglichen eingeschränkten Fruchtbarkeit betroffener Frauen wird ein verdicktes zervikales Sekret angenommen (Chan et al. 2009). Die Mehrheit der Patientinnen kann jedoch schwanger werden, da deren Fertilität nur leicht beeinträchtigt ist (Lau et al. 2010).

## 1.6 Diagnostik der CF und CFTR-RD

### 1.6.1 Diagnostische Verfahren

Neben einem beim Feten festgestellten echogenen Darm als möglichem Hinweis auf einen Mekoniumileus sind der erneute Kinderwunsch eines heterozygoten Paares mit einem bereits an CF erkrankten Kind oder der Kinderwunsch von Geschwistern dieser Eltern Indikationen für eine genetische Pränataldiagnostik aus Chorionzottenmaterial, welches in der Regel ab der 11. abgeschlossenen Schwangerschaftswoche gewonnen werden kann. Auch bei phänotypisch gesunden Anlageträgern unter den Geschwistern des CF-Kranken oder bei Paaren mit einem CF-kranken Partner ist eine pränatale Diagnostik angezeigt. Ist der Mutationsgenotyp des Indexpatienten bekannt, so kann die Diagnose durch direkte Genotypbestimmung an fetaler DNA gestellt werden (Hebestreit und Hebestreit 2013, Stuhmann-Spangenberg et al. 2009, Tümmler und Lindemann 2004).

In aller Regel führt der Weg zur Diagnose einer klassischen CF jedoch über den klinischen Verdacht. Ebenso kann eine positive Familienanamnese des Patienten im Sinne von Geschwistern mit CF zur Diagnostik beitragen. In Deutschland wurde zum 1. Juli 2016 ein flächendeckendes Neugeborenen-Screening auf CF eingeführt. Hierbei werden aus dem Kapillarblut des Kindes die Konzentrationen der pankreatischen Eiweiße immunreaktives Trypsinogen (IRT) und Pankreatitis-assoziiertes Protein (PAP) bestimmt, welche bei CF erhöht sind. Im Verdachtsmoment schließt sich eine molekulargenetische Untersuchung an. Bei einem auffälligen Screening sollte zeitnah ein Schweißtest in einem CF-Zentrum veranlasst werden, um die Verdachtsdiagnose zu bestätigen oder auszuschließen (Ballmann 2008, Dockter et al. 2012, GBA 2015, Hebestreit und Hebestreit 2013).

Der Schweißtest als diagnostischer Goldstandard ist die Methode der ersten Wahl bei klinischem Verdacht auf CF. Durch Pilocarpin-induzierte Iontophorese an beiden Unterarmen wird die  $\beta$ -adrenerge Schweißproduktion lokal angeregt und daraufhin Schweiß über jeweils 30 Minuten gesammelt. Schweißchloridmittelwerte  $< 30$  mmol/l gelten als unauffällig, können eine CF jedoch nicht mit letzter Sicherheit ausschließen. Mittlere Chloridkonzentrationen von 30-59 mmol/l sind kontrollbedürftig und Mittelwerte  $\geq 60$  mmol/l hinweisend auf eine CF. Im Rahmen von Screeninguntersuchungen wird bisweilen die Leitfähigkeit des Schweißes in Form eines NaCl-Äquivalents bestimmt. Hierbei sind Leitfähigkeitswerte  $< 50$  mmol/l als unauffällig anzusehen. Werte  $\geq 50$  mmol/l gelten als hinweisend auf eine CF und sollten durch Schweißchloridmessungen bestätigt werden, da nur diese zur Diagnosesicherung einer CF zulässig sind (Hebestreit und Hebestreit 2013, Nährlich et al. 2013, Steward et al. 1995).

Bei der klinischen Verdachtsdiagnose CF steht die molekulargenetische Mutationsanalyse nach dem Schweißtest an zweiter Stelle im diagnostischen Prozess. Bleibt ein Erst-Screening auf die häufigsten Mutationen unauffällig, so besteht die Möglichkeit einer Sequenzierung des gesamten CFTR-Gens und weiterer genetischer Untersuchungen (Dockter et al. 2012, Nährlich et al. 2013). Zur klinischen Beurteilung des genetischen Befundes stehen die Mutationsdatenbanken CFTR1 und CFTR2 zur Verfügung. Letztere weist der klinischen Relevanz jeder bekannten CFTR-Mutation oder -Sequenzvariante die Kategorie „CF-verursachend“, „unterschiedliche klinische Folgen“ oder „nicht CF-verursachend“ zu (CFTR1 2014 und CFTR2 2014).

NPD und ICM stehen für die elektrophysiologische CFTR-Funktionsanalyse bei diagnostisch unklaren Fällen zur Verfügung. Bei der NPD wird die Änderung der elektrischen Potentialdifferenz zwischen der Zelloberfläche am respiratorischen Epithel der Nasenschleimhaut und dem interstitiellen Hautgewebe am Unterarm in vivo gemessen. Dies geschieht mittels Gabe von Substanzen, die unter anderem den CFTR-Chloridkanal stimulieren. Für die ICM erfolgt zunächst die Entnahme von Rektumschleimhautproben des Patienten. Die In-vitro-Applikation bestimmter Substanzen auf die Biopsate bewirkt ebenfalls eine Inhibierung oder Aktivierung von Ionenkanälen wie zum Beispiel des CFTR-Kanals. Die dabei aufgezeichnete Änderung des Kurzschlussstroms gibt ebenso wie die Änderung der Spannungsdifferenz bei der NPD Aufschluss über die CFTR-Funktion (Hebestreit und Hebestreit 2013).

### **1.6.2 Diagnosekriterien**

Um die Diagnose CF sichern zu können, ist die Erfüllung mindestens je eines Kriteriums aus den beiden folgenden Bereichen erforderlich (Bombieri et al. 2011, De Boeck et al. 2006, Nährlich et al. 2013), siehe auch Abbildung 1.6:

1. - mindestens ein klinischer Hinweis auf eine CF <sub>(1)</sub> und/oder
  - positive Familienanamnese im Sinne von Geschwistern mit CF und/oder
  - positives Neugeborenencreening.
2. - zwei CF-verursachende CFTR-Mutationen und/oder
  - CFTR-Dysfunktion im CF-typischen Bereich:
    - Schweißchloridwert von  $\geq 60$  mmol/l bei mindestens zwei unabhängigen Messungen (an unterschiedlichen Tagen) und/oder
    - NPD und/oder ICM im CF-typischen Bereich (mit oder ohne CFTR-Restfunktion).

(1) Chronische sinopulmonale Erkrankungen:

- chronischer Husten (> 3 Monate) und/oder Sputumproduktion und/oder pfeifendes Atemgeräusch und/oder Trommelschlegelfinger.
- persistierende pathologische Bildgebungsbefunde: Bronchiektasen, Atelektasen, Infiltrate, Überblähung.
- persistierender Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* / *Staphylococcus aureus* / *Haemophilus influenzae* / *Burkholderia cepacia*-Komplex in den Atemwegsekreten.
- bilaterale, chronische Rhinosinusitis mit/ohne Nasenpolypen mit häufigen Exazerbationen im Kindes- und Jugendalter.

Gastrointestinale Erkrankungen:

- Pankreas: exokrine Pankreasinsuffizienz bei Kindern, akut rezidivierende und/oder chronische Pankreatitis.
- Intestinum: pränatal echogener Darm (Ultraschall), Mekoniumileus, Mekoniumpfropfsyndrom, Rektumprolaps, DIOS.
- Leber: chronische Lebererkrankung, insbesondere bei klinischem/histologischem Nachweis einer fokal biliären/multilobulären Zirrhose und/oder portaler Hypertension, Cholelithiasis ohne hämatologische Erkrankung, verlängerter Neugeborenenikterus.
- Ernährungsstatus: Dystrophie, Hypoproteinämie und Ödeme, Komplikationen bedingt durch einen Mangel an fettlöslichen Vitaminen und/oder Zink.

Salzverlustsyndrom: hypochlorämische Alkalose ohne Erbrechen bei Kindern.

Genitale Erkrankung: obstruktive Azoospermie.

Zur Diagnosesicherung einer CFTR-RD dürfen die Diagnosekriterien für eine CF nicht erfüllt sein und es haben genau ein Kriterium aus dem ersten und mindestens eines aus dem zweiten Bereich zu gelten (Bombieri et al. 2011, Nährlich et al. 2013), siehe auch Abbildung 1.6:

1. (Isolierte) klinische Diagnose:

- disseminierte Bronchiektasen oder
- chronische Pankreatitis oder
- obstruktive Azoospermie (früher: CBAVD).

2. - Nachweis von ein bis zwei CFTR-Mutationen (davon höchstens eine

CF-verursachende und mindestens eine für CFTR-RD beschriebene) und/oder

- Nachweis einer CFTR-Dysfunktion außerhalb des CF-typischen Bereichs:

- Schweißchloridwerte von 30-59 mmol/l bei mindestens zwei unabhängigen Messungen (an unterschiedlichen Tagen) und/oder
- NPD und/oder ICM außerhalb des CF-typischen Bereichs (mit CFTR-Restfunktion)

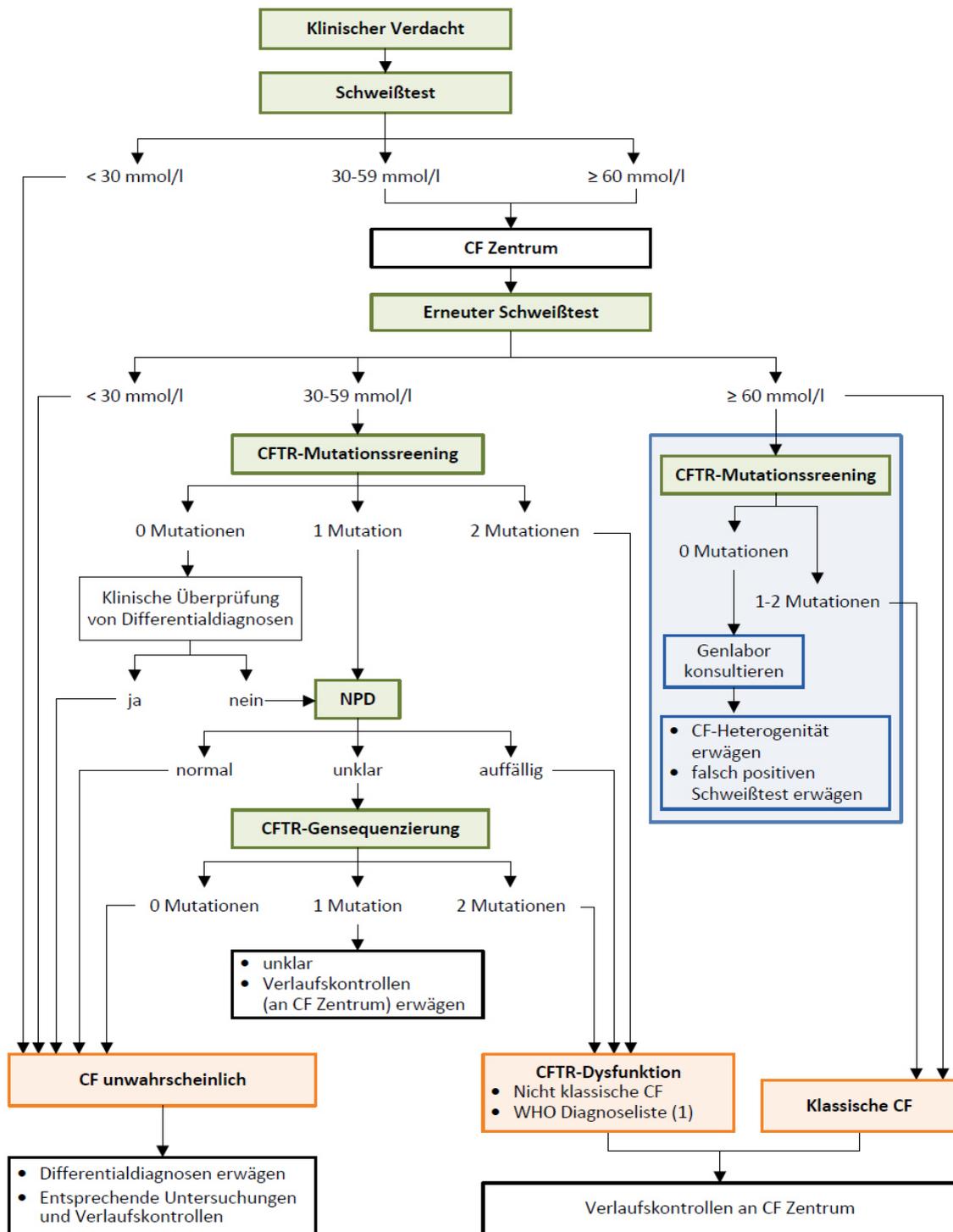


Abb. 1.6: Algorithmus für die Diagnose einer CF, beginnend mit dem Schweißtest.

**Legende:** CFTR-Mutationscreening: Erst-Screening auf die häufigsten CFTR-Mutationen; WHO Diagnoseliste (1): WHO Diagnoseliste für monoorganische mit CFTR-Mutationen assoziierte Krankheitsbilder (WHO 2001): Isolierte obstruktive Azoospermie\*, chronische Pankreatitis\*, ABPA\*, disseminierte Bronchiektasen\*, diffuse Panbronchiolitis\*, sklerosierende Cholangitis\*, neonatale Hypertrypsinogenämie (\*: mindestens 1 CFTR-Mutation identifiziert) (modifiziert nach De Boeck et al. 2006).

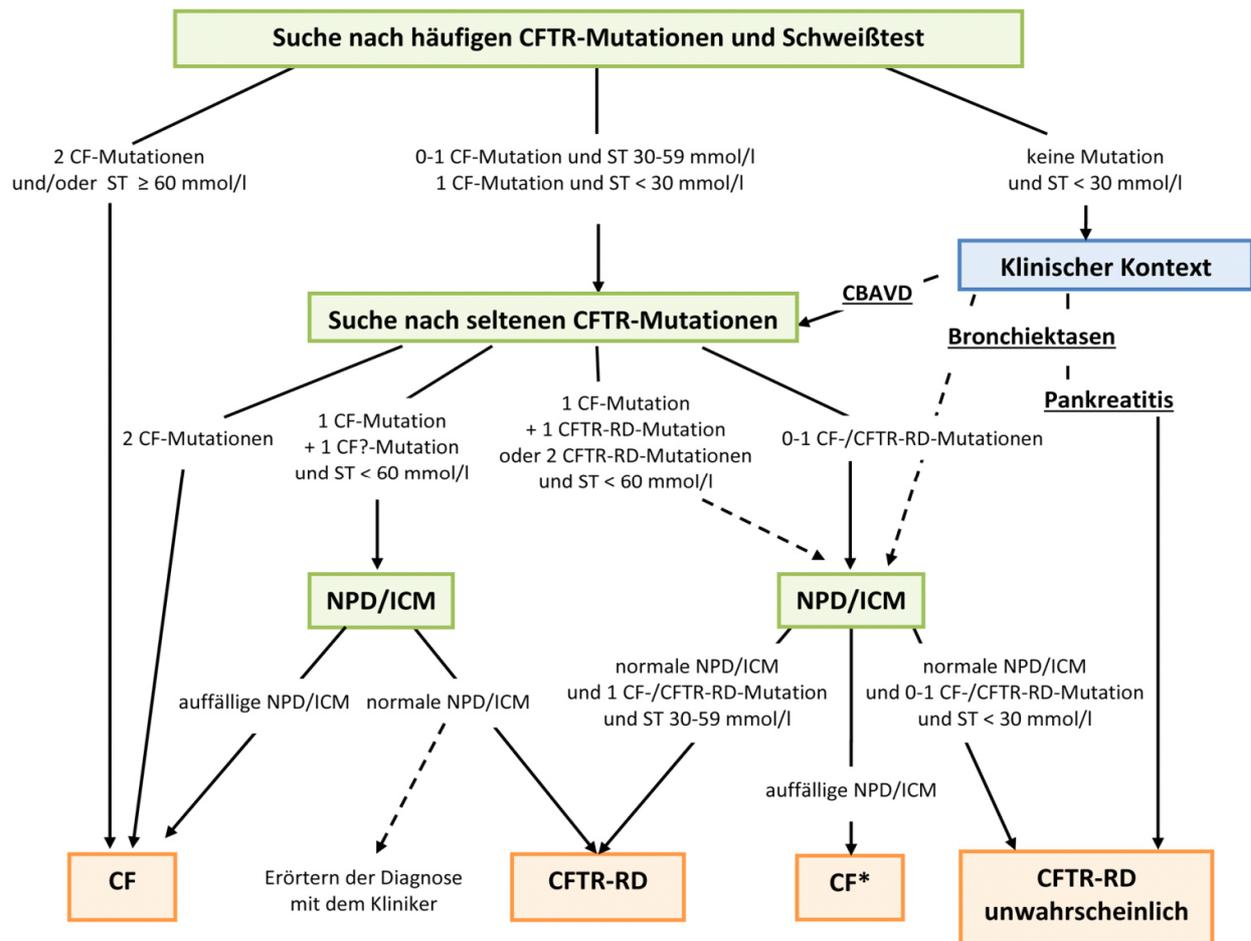


Abb. 1.7: Umfassender diagnostischer Algorithmus für eine CF und CFTR-RD.

Legende: ST: Schweißtest (wiederholt; falsch positive Befunde sollten in einem spezialisierten Zentrum ausgeschlossen/bestätigt werden); CF?-Mutation: Mutation mit ungesicherter oder unsicherer klinischer Bedeutung; CF\*: Diagnose CF zu stellen oder zu erwägen (modifiziert nach Bombieri et al. 2011).

Anmerkung: Die CBAVD als ein Diagnosekriterium für eine CFTR-RD wurde durch die obstruktive Azoospermie ersetzt (Nährlich et al. 2013).

Der Algorithmus nach De Boeck et al. 2006 verwendet den Begriff CFTR-Dysfunktion als Entität, bei der die Diagnosekriterien für eine CF nicht erfüllt sind, jedoch intermediäre Schweißchloridwerte und/oder eine auffällige NPD und/oder 2 CFTR-Mutationen vorliegen (siehe Abb. 1.6). In dem Algorithmus nach Bombieri et al. 2011 wird die Entität CFTR-RD benutzt. Außerdem findet die ICM Berücksichtigung und die Anzahl der monorganischen, mit CFTR-Mutationen assoziierten Krankheitsbilder ist auf 3 reduziert (siehe Abb. 1.7). Die Diagnose CFTR-Dysfunktion basierte in der hier untersuchten Patientenkohorte nicht auf den ursprünglichen Diagnosekriterien von De Boeck et al. 2006, sondern wurde in Anlehnung an beide genannten Algorithmen definiert als CFTR-Dysfunktion, bei der die Diagnosekriterien weder für eine CF noch für eine CFTR-RD erfüllt waren.

## 1.7 Therapie der CF und CFTR-RD

Die drei Hauptsäulen der CF-Therapie sind Medikamente, Physiotherapie und Sport sowie Ernährungstherapie mit hochkalorischer Kost (Schwarz 2013). Versorgung und Betreuung der Patienten und ihrer Angehörigen sollten interdisziplinär und in spezialisierten CF-Zentren erfolgen. In 3-monatigen Abständen findet eine Optimierung des Therapieregimes mit Ernährungsanpassung, Kontrolle der Lungenfunktion und Erfassung des Erregerspektrums aus Sputumproben oder Rachenabstrich statt. Der klinische Verlauf einer CFTR-RD sollte unter Beteiligung eines CF-Zentrums langfristig und mindestens einmal jährlich beobachtet werden (Bombieri et al. 2011, Hebestreit und Hebestreit 2013, Nährlich et al. 2013).

Nasenpolypen werden endoskopisch entfernt. Bei der operativen Therapie chronischer Sinusitiden treten hohe Rezidivraten auf. Deshalb sollten sie zunächst mit Inhalationen und Rotlicht behandelt werden (Dockter et al. 2012).

Die wichtigsten Ziele der pulmonalen Therapie sind ausreichende Sekretmobilisation, Erhaltung der Lungenfunktion und Eindämmung von Infektion und Inflammation (Hebestreit und Hebestreit 2013, Müller 2008, Muntau 2011). Zur Verbesserung der mukoziliären Clearance findet die Inhalation hypertoner NaCl-Lösung (meist in 6-7%iger Konzentration) Anwendung, bei der aus osmotischen Gründen mehr Wasser in die Atemwege gelangt und die Sekrete hydriert. Demselben Prinzip folgt das Inhalieren von speziell aufbereitetem Mannitol-Pulver. Auch die DNA-Spaltung zerstörter Leukozyten im Respirationstrakt mittels inhaliertes rhDNase reduziert die Viskosität des Mukus. Des Weiteren ist die Einnahme von Acetylcystein möglich. Atemwegserweiternde  $\beta$ -Sympathomimetika wie Salbutamol wirken der bronchialen Obstruktion entgegen und mobilisieren das Sekret. Regelmäßiger Ausdauersport verhilft ebenfalls zur Reinigung der Atemwege. Physiotherapeutisch kommen Klopf- und Lagerungsdrainage vor allem im Säuglings- und Kleinkindalter, Atemtechniken wie die autogene Drainage und Vibrationsgeräte zur Sekretförderung sowie bronchodilatatorisch wirkende PEP-Masken zum Einsatz (Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013, Muntau 2011, Wilmott 2007).

Bei der Verwendung antiinflammatorischer Medikamente müssen Nutzen und mögliche Nebenwirkungen gegeneinander abgewogen werden. So gehört das nichtsteroidale Antirheumatikum Ibuprofen aufgrund seiner unerwünschten Nebenwirkungen nicht zur Standardtherapie der CF, kann jedoch unter langfristiger und hochdosierter Gabe die Lungenfunktion bei moderater pulmonaler Beteiligung verbessern. Langfristig verabreichte systemische Steroide verzögern das Fortschreiten der Lungenerkrankung, weisen aber auch ein breites Spektrum an Nebenwirkungen auf. Ein evidenz-basierter Nachweis der therapeutischen

Wirkung inhalativer Steroide ist bisher nicht gelungen (Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013, Muntau 2011).

Die antibiotische Behandlung der Lungenerkrankung bei CF sollte sich gezielt nach Erregernachweis und Antibiogramm richten und erfordert meist höhere Dosierungen sowie eine längere Behandlungsdauer als üblich. Außerdem ist sie bereits bei einer symptomlosen Kolonisation der Atemwege indiziert. Bei frühzeitiger oraler Therapie ist eine Eradikation des Erregers oft möglich. Eine chronische Keimbesiedlung hingegen verlangt nach einer dauerhaften inhalativen Antibiotikatherapie mit hohen lokalen Wirkspiegeln, um die mögliche Symptomatik zu mildern und das Risiko einer akuten Exazerbation gering zu halten. Bei mangelndem Ansprechen sind oft zusätzliche intermittierende intravenöse Antibiotikagaben geboten. Die chronische Kolonisation oder Infektion mit *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* oder atypischen Mykobakterien beschleunigt den Verlust der Lungenfunktion. Eine allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) macht die systemische ausschleichende Gabe von Prednisolon über 3 Wochen und Itraconazol für 6-12 Monate in Kombination mit inhalativen Steroiden erforderlich (Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013, Muntau 2011).

Bei fortgeschrittener Lungenerkrankung ist eine Sauerstoffgabe gegebenenfalls auch mittels Gesichtsmaske möglich. Als Ultima ratio steht die bilaterale Lungentransplantation zur Verfügung (Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013, Muntau 2011).

Therapieziele bei Maldigestion aufgrund exokriner Pankreasinsuffizienz sind altersgerechtes Wachstum und Gedeihen und eine zeitgerechte Pubertätsentwicklung. Die Verdauungsstörung bedingt einen deutlich erhöhten Energie- und Substratbedarf, der sich nach dem altersphysiologischen Gedeihen des Kindes richtet. Es sollte auf eine hochkalorische und fettreiche Kost mit bis zu 40%igem Anteil an Fettkalorien und regelmäßige Zwischenmahlzeiten geachtet werden. Da Muttermilch leicht verdauliche Lipide und Proteine sowie Lipase enthält, profitieren auch Neugeborene und Säuglinge mit einer CF vom Stillen. Je nach Gedeihen kann Beikost relativ früh bereits im 4. Lebensmonat zusätzlich verabreicht werden. Die Pankreasenzyme werden nach ihrem Lipasegehalt dosiert. In manchen Fällen müssen die Patienten zusätzlich Protonenpumpeninhibitoren einnehmen, da die mangelhafte pankreatische Bikarbonatsekretion ein für die Enzymfreisetzung notwendiges alkalisches Milieu im Dünndarm nicht immer gewährleistet. Außerdem sind fettlösliche Vitamine zu ersetzen. Bei einer Glukoseintoleranz muss die Ernährung entsprechend angepasst und bei einem Diabetes mellitus Insulin unter Beibehaltung einer hochkalorischen Kost substituiert werden (Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013, Muntau 2011).

Einen nicht perforierten Mekoniumilievus kann man in 50 % der Fälle mit einem Kolon-Kontrasteinlauf lösen. Anderenfalls oder bei Perforation ist eine chirurgische Intervention indiziert. Operative Maßnahmen sind bei einem distalen intestinalen Obstruktionssyndrom (DIOS) möglichst zu vermeiden. Die Therapie beinhaltet die erhöhte Pankreasenzymzufuhr, die orale Einnahme von Laxanzien und Mukolytika sowie die Verabreichung von Klysmen. Bei einem Rektumprolaps erfolgen ebenfalls eine Enzymsubstitution sowie eine manuelle Reposition. (Dockter et al. 2012, Muntau 2011).

Cholangitiden und obstruktive Cholestasen werden bei ausbleibenden Cholezystitiden und Koliken symptomatisch mit Ursodesoxycholsäure zur Steigerung der Cholerese therapiert. Bei einer Hepatopathie sind fettlösliche Vitamine parenteral zu substituieren. In seltenen Fällen ist eine Lebertransplantation indiziert (Dockter et al. 2012, Hebestreit und Hebestreit 2013, Muntau 2011).

Seit 2012 steht der CFTR-Potentiator Ivacaftor für Patienten mit der Klasse-III-Mutation G551D als kausale Therapie der CF zur Verfügung. Das oral einzunehmende Medikament erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit des CFTR-Kanals. In einer Vergleichsstudie von 2015 wurden Ivacaftor-behandelte homozygote Patienten mit der Mutation G551D über 3 Jahre beobachtet und mit homozygoten Trägern der Mutation F508del als Kontrollgruppe verglichen. In der Kontrollgruppe reduzierte sich die FEV<sub>1</sub> jährlich um 1,72 %, wohingegen die FEV<sub>1</sub> in der Gruppe der Ivacaftor-Patienten nach einem Jahr nur um 0,91 % gesunken war. Außerdem wiesen die Ivacaftor-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe einen verbesserten Ernährungszustand auf (Sawicki et al. 2015).

Seit November 2015 ist ein kausales Kombinationspräparat für homozygote Träger der Klasse-II-Mutation F508del ab einem Alter von 12 Jahren in Europa zugelassen (EMA 2015, FDA 2015, Wainwright et al. 2015). Die enthaltenen Wirkstoffe der Tablette sind der CFTR-Korrektor Lumacaftor zur Erhöhung der Menge an verfügbaren CFTR-Kanälen und der CFTR-Potentiator Ivacaftor zur Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit der CFTR-Kanäle. In einer doppelblinden, placebokontrollierten Phase-3-Studie erhöhte Lumacaftor/Ivacaftor bei CF-Patienten ab 12 Jahren mit der homozygot vorliegenden Mutation F508del die vorhergesagte FEV<sub>1</sub> um bis zu 6,7 % und senkte die Rate pulmonaler Exazerbationen um bis zu 39 % (Wainwright et al. 2015).

Nicht zuletzt spielt die sozialpädagogische und psychologische Betreuung von CF-Patienten und deren Angehörigen eine wichtige Rolle, um Betroffenen eine soziale und berufliche Integration sowie eine möglichst hohe gesundheitsbezogene Lebensqualität zu ermöglichen (Dockter et al. 2012).

## 2 Zielsetzung

Der Schweißtest ist der Goldstandard der CF-Diagnostik, weist jedoch einen diagnostisch nicht hinreichend wegweisenden Kontrollbereich auf. Ebenso gelingt in manchen Fällen trotz klinischen Verdachts auf CF oder CFTR-RD kein molekulargenetischer Nachweis von CF-verursachenden oder für CFTR-RD beschriebenen CFTR-Mutationen (Gibson und Cooke 1959, Nährlich et al. 2013, Sermet-Gaudelus et al. 2010). Unter Patienten mit monosymptomatischen Krankheitsbildern wie der häufig erst im Erwachsenenalter diagnostizierten idiopathischen Bronchiektasie (Lonni et al. 2015) könnte sich ein Anteil von Fällen mit bisher unerkannter CFTR-RD befinden, was auch in der Patientenkohorte der vorliegenden Arbeit häufig Anlass für eine weiterführende CFTR-Diagnostik gab (siehe Kap. 3, Abb. 3.1).

In den letzten Jahrzehnten sind NPD und ICM als Methoden zur erweiterten CFTR-Funktionsdiagnostik entwickelt worden (De Jonge et al. 2004, Derichs et al. 2010, Hug et al. 2011, Knowles et al. 1981, Mall et al. 2004, Sermet-Gaudelus et al. 2010, Veeze et al. 1991, Veeze et al. 1994, Wilschanski et al. 2001). Die Standardisierung dieser Methoden und die Ermittlung unizentrisch validierter Referenzwerte in jüngster Zeit (Derichs et al. 2010, Sermet-Gaudelus et al. 2010, Wilschanski et al. 2001) haben zur zunehmenden Berücksichtigung von NPD und ICM in gegenwärtigen diagnostischen Algorithmen für CF und CFTR-RD geführt (Bombieri et al. 2011, Nährlich et al. 2013). Zur einheitlichen Durchführung von NPD und ICM wurde von der European Cystic Fibrosis Society (ECFS) in den letzten Jahren jeweils ein internationales und multizentrisch standardisiertes Protokoll entwickelt (ECFS NPD SOP 2012, ECFS ICM SOP 2011). Entsprechende zentrumsunabhängige Referenzwerte werden zurzeit im Rahmen der European Cystic Fibrosis Society Diagnostic Network Working Group (ECFS DNWG) erarbeitet (Nährlich et al. 2013).

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, darzulegen, inwiefern NPD und ICM unter Anwendung der genannten, neu erarbeiteten Standardprotokolle zur diagnostischen Klassifizierung einer Patientenkohorte mit fraglicher CF oder CFTR-RD entscheidend beitragen konnten. Ein besonderes Augenmerk galt hierbei der Fragestellung, in welchem Maß NPD und ICM eine Abgrenzung der Diagnose CFTR-RD zu den Diagnosen CF beziehungsweise Non-CF ermöglichen. Als Grundlage für die diagnostische Interpretation wurden die Referenzwerte herangezogen, welche gemäß den genannten Standardprotokollen in einer unizentrischen Studie an Probanden mit bereits bekannten Diagnosen (Non-CF, PS-CF und PI-CF) ermittelt wurden und Eingang in die derzeit stattfindene multizentrische Validierung finden (Derichs et al. 2010, Nährlich et al. 2013, Pinders-Kessler et al. 2013).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Patientenkohorte

Im Zeitraum von Oktober 2011 bis Dezember 2013 (27 Monate) wurden 29 konsekutive ambulante Patienten im Alter von 1 bis 63 Jahren mit fraglicher CF oder CFTR-RD untersucht. Das mittlere Alter der Kohorte betrug 23,3 Jahre, das mediane Alter 17 Jahre. 41,4 % der Patienten (n = 12) waren weiblich und 58,6 % (n = 17) männlich.

Gemeinsames Merkmal der Kohorte waren unvollständige beziehungsweise nicht eindeutige Vorbefunde bezüglich Klinik, Schweißtest und/oder Molekulargenetik, welche die Diagnosen CF oder CFTR-RD weder hinreichend bestätigen noch ausschließen konnten. Deshalb wurden alle Patienten jeweils innerhalb eines Tages neben einem erneuten Schweißtest und unter Berücksichtigung der in den anschließenden Kapiteln aufgeführten Ausschlusskriterien und Kontraindikationen (siehe Kap.3.2.1, Kap. 3.4.1 und Kap. 3.5.1) einer NPD und/oder ICM als nächstem Schritt im diagnostischen Prozess zugeführt. Hierbei erfolgte der Schweißtest an beiden Unterarmen, die NPD an beiden Nasenlöchern und die ICM an 8 (n = 2) oder 4 (n = 26) Biopsien der Rektummukosa. Die diagnostische Interpretation von NPD und ICM orientierte sich an den in Kapitel 2 und Kapitel 3.6 genannten Referenzwerten. Außerdem wurde bei Bedarf eine molekulargenetische CFTR-Mutationsanalyse veranlasst (siehe Kap. 3.3), deren Umfang sich nach der im Vorfeld stattgehabten molekulargenetischen Diagnostik richtete.

Im Vordergrund des klinischen Bildes standen sinopulmonale Erkrankungen wie Polyposis nasi (et sinuum) in 27,6 % (n = 8: ID 9, 14, 15, 17, 22-24, 26), (Rhino-)Sinusitis in 31,0 % (n = 9: ID 9, 14, 15, 17, 22-26), Bronchitis in 24,1 % (n = 7: ID 1, 4, 13, 18, 22, 28, 29), (Broncho-)Pneumonie in 48,3 % (n = 14: ID 5-9, 11, 14-16, 18-20, 26, 27) und Bronchiektasen in 51,7 % der Fälle (n = 15: ID 1, 4, 6, 9, 11, 14-16, 19, 22-26, 28). In 10,3 % der Fälle (n = 3: ID 6, 11, 16) wurde *Pseudomonas aeruginosa* in den Atemwegssekreten nachgewiesen. Spirometrisch zeigte sich in 17,2 % der Fälle (n = 5: ID 4, 14, 16, 23, 25) eine reduzierte FEV<sub>1</sub>. Unter den gastrointestinalen Erkrankungen imponierte bei 13,8 % der Patienten (n = 4: ID 4, 6, 10, 14) eine exokrine Pankreasinsuffizienz, welche in 2 Fällen (ID 10, 12) einer Enzymsubstitution bedurfte. Pankreatitiden lagen in 10,3 % der Fälle (n = 3: ID 4, 10, 22) vor. 3,4 % der Fälle (n = 1: ID 21) wiesen eine obstruktive Azoospermie auf (siehe Abb. 3.2 und Tab. 3.1).

Die im Vorfeld durchgeführte Standarddiagnostik (Schweißtest und/oder Molekulargenetik) erfolgte in unterschiedlichem Ausmaß, wobei das Mutationsspektrum in 48,3 % der Fälle (n = 14: ID 2-5, 7, 8, 10, 13, 21, 24-27, 29) milde Mutationen der Klassen III-V aufwies. Es zeigten sich die folgenden Ausgangsbefunde (siehe Tab. 3.1):

17,2 % der Fälle (n = 5) wiesen einen unauffälligen Schweißtestbefund mit Chloridwerten von < 30 mmol/l auf. In dieser Gruppe lagen in 3 Fällen vollständige genetische Befunde vor, darunter ein Fall ohne Mutationsnachweis (ID 18), ein Fall mit einer Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen (ID 27) und ein Fall mit einer CF-verursachenden Mutation (ID 7). Bei 2 Patienten war die stattgehabte Gendiagnostik unvollständig und erbrachte jeweils keinen Nachweis CF-verursachender Mutationen (ID 6, 23).

51,7 % der Fälle (n = 15) zeigten Schweißchloridkonzentrationen im Kontrollbereich von 30-59 mmol/l. Hierunter erfolgte in 10 Fällen eine komplette Mutationsanalyse, wobei in 4 Fällen keine CF-verursachende Mutation (ID 5, 11, 15, 20), in 3 Fällen eine Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen (ID 3, 4, 13) und in jeweils einem Fall eine CF-verursachende Mutation (ID 8), eine CF-verursachende Mutation und eine Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen (ID 29) sowie eine nicht in CFTR1 und CFTR2 beschriebene Mutation (ID 9) nachgewiesen wurden. Bei 5 Patienten erfolgte keine vollständige Gendiagnostik, wobei in 3 Fällen kein Mutationsnachweis (ID 14, 19, 28), in einem Fall der Nachweis von 2 Mutationen mit unterschiedlichen klinischen Folgen (ID 26) und in einem Fall der Nachweis einer CF-verursachenden Mutation und einer Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen (ID 10) erbracht wurde.

13,8 % der Patienten (n = 4) wiesen auffällige Chloridwerte von  $\geq 60$  mmol/l auf. Unter ihnen befanden sich 2 Fälle mit vollständigen genetischen Befunden, einmal in Form von 2 Mutationen mit unterschiedlichen klinischen Folgen (ID 25) und einmal in Form einer CF-verursachenden Mutation (ID 2). Bei der unvollständig durchgeführte Gendiagnostik der 2 weiteren Patienten, konnten in einem Fall keine (ID 16) und im anderen Fall eine CF-verursachende Mutation (ID 12) nachgewiesen werden.

Weitere 13,8 % der Patientenkohorte (n = 4) wurden einer Messung der NaCl-Leitfähigkeit unterzogen, wobei in allen Fällen auffällige Werte von  $\geq 50$  mmol NaCl-Äquivalent pro Liter Schweiß vorlagen. Bei der kompletten Gendiagnostik von 2 dieser Patienten wurde in einem Fall kein (ID 17) und im anderen Fall ein (ID 22) Nachweis einer CF-verursachenden Mutation erbracht. In den 2 übrigen Fällen wurde die Mutationsanalyse unvollständig durchgeführt. In einem Fall konnte keine Mutation (ID 1) und im anderen Fall eine CF-verursachende Mutation und eine Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen (ID 24) detektiert werden.

Bei 3,4 % der Patienten (n = 1) erfolgte kein Schweißtest. In diesem Fall lagen nach unvollständig erfolgter Gendiagnostik eine CF-verursachende Mutation und eine Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen vor (ID 21).

## Klinisches Spektrum

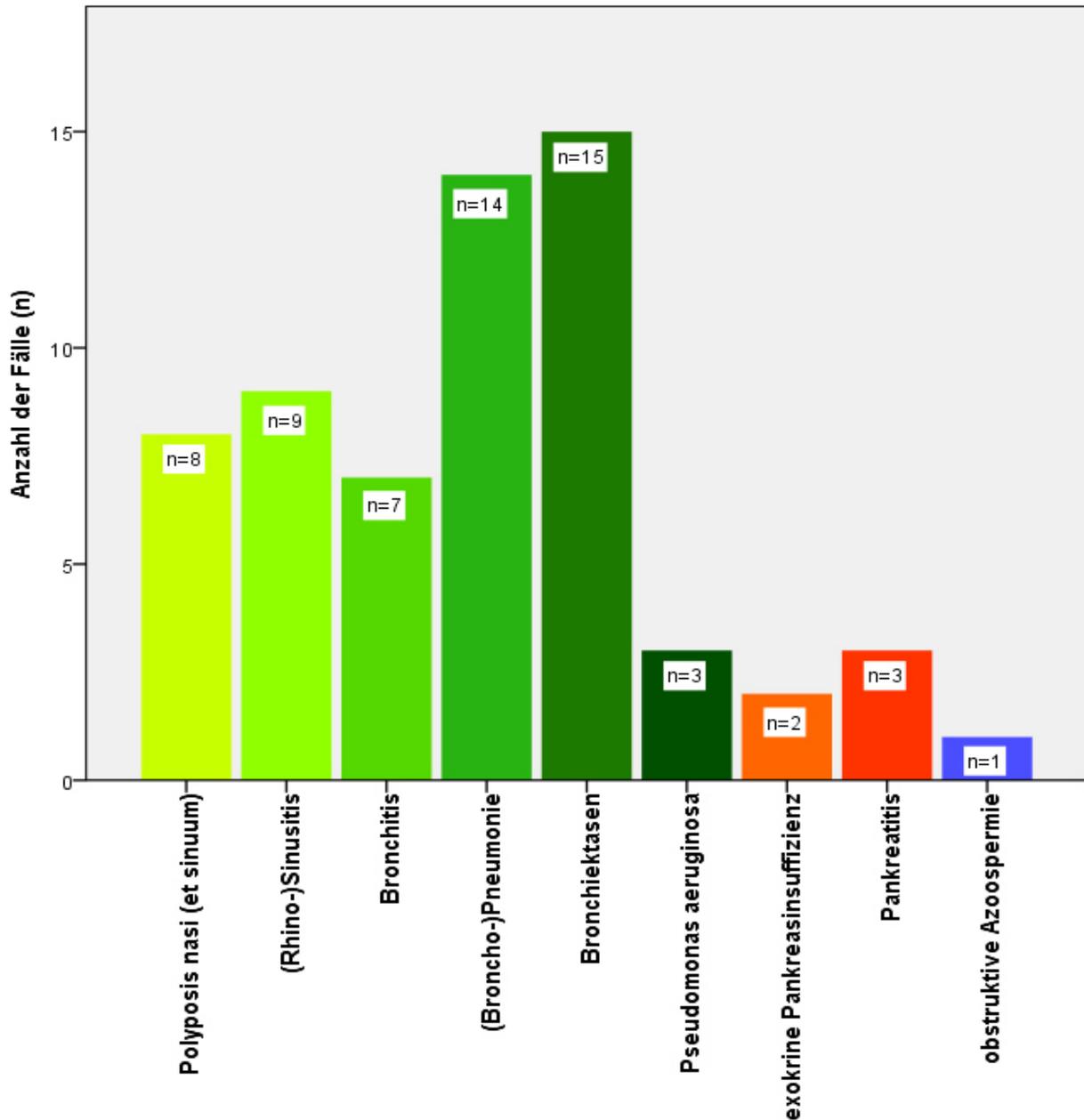


Abb.3.1: Auszug aus dem klinischen Spektrum der Patientenkohorte.

Legende: Polyposis nasi (et sinuum): Z.n. Polyposis nasi (et sinuum); (Rhino-)Sinusitis: Z.n./chron. (Rhino-)Sinusitis; Bronchitis: Z.n./chron. (rez.) Bronchitis; (Broncho-)Pneumonie: Z.n./chron. (rez.) (Broncho-)Pneumonie; Bronchiektasen: radiologischer Nachweis von Bronchiektasen; Pseudomonas aeruginosa: mikrobiologischer Nachweis von Pseudomonas aeruginosa in den Atemwegssekreten; exokrine Pankreasinsuffizienz: substitutionsbedürftige exokrine Pankreasinsuffizienz (Elastasekonzentration im Stuhl < 100 µg/g); Pankreatitis: Z.n./chron./akut rez. Pankreatitis; obstruktive Azoospermie: früher: CBAVD.

Anmerkung: Mehrfachnennungen sind möglich.

Tab. 3.1: *Patientenkohorte – Vorbefunde.*

<u>Fall</u>	<u>G</u>	<u>Alter</u> <u>[Jahre]</u>	<u>Ethnische</u> <u>Herkunft</u>	<u>BMI</u> <u>[kg/m<sup>2</sup>]</u>	<u>BMI-</u> <u>Perz.</u>	<u>ST (Cl<sup>-</sup>)</u> <u>(NaCl)</u> <u>[mmol/l]</u>	<u>Genotyp [klinische Relevanz</u> <u>gemäß CFTR1 u. CFTR2 2014]</u>	<u>Gendiagnostik</u>	<u>Nasen-</u> <u>OP</u>	<u>Polypo-</u> <u>sis nasi</u>	<u>(Rhino-)</u> <u>Sinusitis</u>	<u>Bron-</u> <u>chitis</u>	<u>(Broncho-)</u> <u>Pneumonie</u>	<u>Bronchi-</u> <u>ektasen</u>	<u>PSA</u>	<u>FEV<sub>1</sub>↓</u>	<u>Gedeih-</u> <u>störung</u>	<u>PI</u>	<u>Pankre-</u> <u>atitis</u>	<u>Obstr.</u> <u>Azoo.</u>
1	w	52	BRD	22,4		120	-/-	Scr	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
2	w	11	BRD		11	79	3849+10kbC>T/R668C [1/3]	Scr/Seq	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	m	33	BRD	22,0		39	5T(11TG)-7T(11TG)/M470V [2/3]	Scr/Seq/MPLA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4	m	17	BRD		38	35	R74W/V855I [2/3]	Scr/Seq	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
5	m	5	BRD		83	36	M470V/- [3]	Scr/Seq/MPLA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6	m	10	Türkei		40	20	-/-	Seq	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
7	m	7	Italien		54	7	W1282X/R1162L [1/3]	Scr/Seq/MPLA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
8	m	3	Polen		88	39	F508del/R1162L [1/3]	Seq	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
9	m	5	Irland		75	44	1625_1639del/1716G>A [0/3]	Seq/MLPA	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
10	m	51	BRD	20,1		39	F508del/5T-9T [1/2]	Seq	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
11	m	27	BRD	21,5		32	-/-	Scr/Seq/MPLA	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
12	w	2	Libyen		71	117	CFTR dele2,3/- [1]	Scr/Seq	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
13	w	5	BRD		20	44	5T(11TG)/- [2]	Scr/Seq/MPLA	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
14	m	25	BRD	24,9		53	-/-	Scr	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
15	m	50	BRD	20,3		45	-/-	Seq/MLPA	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
16	w	5	BRD		33	62	-/-	Scr	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
17	m	16	BRD		29	102	4374+13A>G/- [3]	Scr/Seq/MPLA	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	w	4	BRD		77	27	-/-	Scr/Seq/MPLA	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
19	w	54	BRD	15,6		40	-/-	Scr	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
20	w	13	BRD		17	45	-/-	Scr/Seq/MPLA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
21	m	34	Türkei	21,8			621+3A>G/5T-7T [1/2]	Seq/MLPA	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
22	m	26	BRD	21,9		78	1717-1G>A/- [1]	Seq/MLPA/Prom	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
23	w	50	BRD	20,9		< 15	3601-65C>A/M470V [3/3]	Seq	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
24	w	21	BRD	22,4		95	F508del/5T-9T [1/2]	Scr	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
25	m	25	BRD	31,0		64	5T(12TG)/N1303I [2/2]	Scr/Seq/MPLA	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
26	w	63	BRD	23,7		55	5T(12TG)/5T(12TG) [2/2]	Scr/TG	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
27	m	1	BRD		89	< 15	F1052V/- [2]	Scr/Seq/MPLA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
28	w	56	BRD	22,3		38	-/-	Scr	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
29	m	4	Türkei		19	37	D110H/5T(11TG) [1/2]	Scr/Seq/MPLA	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Legende: G: Geschlecht, w: weiblich, m: männlich; BMI [kg/m<sup>2</sup>]: Body-Mass-Index [Körpermasse in Kilogramm/(Körpergröße in Metern)<sup>2</sup>] (ab 18 Jahren); BMI-Perz.: Body-Mass-Index-Perzentile nach Kromeyer-Hauschild et al. 2001 (bis 18 Jahre); ST (Cl<sup>-</sup>) [mmol/l]: Schweißtest als Mittelwert des Schweißchlorids [Millimol/Liter], ST (NaCl) [mmol/l]: Schweißtest als Mittelwert der NaCl-Leitfähigkeit [Millimol/Liter], leeres Feld (ID 22): Schweißtest nicht erfolgt; Genotyp: -/-: kein Mutationsnachweis, [klinische Relevanz gemäß CFTR1 2014 u. CFTR2 2014]: 0: nicht beschrieben, 1: CF-verursachend, 2: unterschiedliche klinische Folgen, 3: nicht CF-verursachend; Gendiagnostik: Scr: Screening, Seq: Sequenzierung, MLPA: multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation, Prom: Mutationsanalyse der CFTR-Promotor-Region; Nasen-OP bis obstr. Azoo.: -: nein, +: ja, leeres Feld: Befund nicht erhoben; Nasen-OP: Z.n. Nasen-Operation; Polyposis nasi: Z.n. Polyposis nasi (et sinuum); (Rhino-) Sinusitis: Z.n./chron. (Rhino-)Sinusitis; Bronchitis: Z.n./chron. (rez.) Bronchitis; (Broncho-)Pneumonie: Z.n./chron. (rez.) (Broncho-) Pneumonie; Bronchiektasen: radiologischer Nachweis von Bronchiektasen; PSA: mikrobiologischer Nachweis von Pseudomonas aeruginosa in den Atemwegssekreten; FEV<sub>1</sub>↓: reduzierte relative FEV<sub>1</sub> (< 70 % des vorhergesagten Sollwerts); PI: exokrine Pankreasinsuffizienz (Elastasekonzentration im Stuhl < 200 µg/g); Pankreatitis: Z.n./chron./akut rez. Pankreatitis; Obstr. Azoo.: obstruktive Azoospermie.

## 3.2 Schweißtest

### 3.2.1 Methode

Beruhend auf den Erkenntnissen von Gibson und Cooke (Gibson und Cooke 1959) dient der Schweißtest der quantitativen oder qualitativen Schweißanalyse bezüglich Chlorid- oder Natriumionenkonzentration, Osmolarität oder Leitfähigkeit. Unter diesen Varianten des Tests ist die Bestimmung der Chloridkonzentration die einzig zulässige Methode zur Diagnosesicherung einer CF. Als Goldstandard der CF-Diagnostik stellt der Schweißtest die Methode der ersten Wahl bei klinischem Verdacht auf CF dar (Nährlich et al. 2013).

Vorraussetzungen für die Auswertbarkeit sind ein Lebensalter von mindestens 2 Tagen (3. Lebenstag), idealerweise 2 Wochen (14. Lebenstag), ein Körpergewicht von  $> 3000$  g und ein postmenstruales Alter  $\geq 36$ . Schwangerschaftswoche des Neugeborenen. Außerdem sollte der Patient gut hydriert sein und keine Ödeme oder Ekzeme an den zu untersuchenden Hautbezirken aufweisen. Die beidseitige Durchführung des Tests erhöht die Anzahl auswertbarer Proben und die Praktikabilität (Nährlich et al. 2013).

Der Schweißtest zeichnet sich durch seine hohe Verfügbarkeit, altersunabhängige Durchführbarkeit und Kosteneffizienz sowie eine Sensitivität von 96,5 % und eine Spezifität von 99 % aus. Allerdings weist er einen diagnostischen Kontrollbereich auf, welcher keine Diagnosesicherung zulässt (CLSI Guideline 2009, De Boeck et al. 2006, Farrell et al. 2008, Green und Kirk 2007, Nährlich et al. 2013). Überdies kann es zu falsch-positiven oder falsch-negativen Befunde kommen, deren Ursachen in den beiden folgenden Tabellen aufgeführt sind.

Tab. 3.2: Ursachen falsch positiver Schweißteste

(modifiziert nach Ballmann 2008, LeGrys 1996, Rasmussen et al. 2012).

- Malnutrition (z.B. Anorexia nervosa, Protein-Mangelernährung)
- Dehydratation
- psychosozialer Minderwuchs
- atopische Dermatitis
- autonome Dysfunktion, ektodermale Dysplasie
- Speicherkrankheiten (Familiäre Cholestase-Fucosidose, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Defizit, Glykogenose Typ 1, Mauriac Syndrom Mucopolysaccharidose Typ 1)
- unbehandelte Nebenniereninsuffizienz
- Pseudohypoaldosteronismus
- unbehandelte Hypothyreose
- Diabetes insipidus renalis, Nephrose
- Langzeit-PGE1-Infusion
- Hypogammaglobulinämie
- Klinefelter Syndrom
- Nikotin-Abusus
- methodisch-technische Fehler

Tab. 3.3: *Ursachen falsch negativer Schweißteste* (modifiziert nach LeGrys 1996).

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ödeme</li> <li>• methodisch-technische Fehler (z.B. ungenügende Schweißmenge)</li> </ul>
---

### 3.2.2 Material und Durchführung

Der Schweißtest wurde als Pilocarpin-Iontophorese <sup>(1)</sup> mittels Macroduct-System hintereinander an beiden Unterarmen der Patienten gemäß der Leitlinie des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) von 2009 (3. Auflage) durchgeführt. Ausführlichere Erläuterungen zu den einzelnen Arbeitsschritten können dort eingesehen werden. Die laborchemische Schweißanalyse zur Ermittlung der Chloridkonzentration erfolgte durch das Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Biochemie der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Folgendes Material wurde benötigt:

Tab. 3.4: *Schweißtestmaterial.*

<i>Material</i>	<i>Anbieter</i>
Macroduct Iontophoresegerät, Model 3700-SYS, REF 72102598	Wescor
Elektrodensatz, REF 320566	Wescor
Elektrodenbefestigungsbänder (2x), REF RP-044 (rot), REF RP-045 (schwarz)	Wescor
Macroduct Klettbänder (2x): klein (L.: 14 cm), REF SS-128; mittel (L.: 18 cm), REF SS-129; groß (L.: 25 cm), REF SS-130; extra groß (L.: 39 cm), REF SS-131	Wescor
Macroduct Schweißsammler (2x), REF SS-124	Wescor
Kleine verschließbare Behälter (2x), REF SS-107	Wescor
Pilogelscheiben (2x), REF SS-023	Wescor
Schweiß-Dispenser, REF RP-065	Wescor
Schneidzange, REF RP-066	Wescor
Aqua ad iniectabilia (10 ml)	Braun
Softasept N Hautdesinfektionsmittel mit 74,1%-igem Ethanolanteil (250 ml) oder ein Äquivalent	Braun

(1) Pilocarpin ist ein direktes Parasympathomimetikum zur lokalen Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Schweißsekretion (Gibson und Cooke 1959).

### 3.3 Molekulargenetik

Bei der klinischen Verdachtsdiagnose CF steht die molekulargenetische Mutationsanalyse nach dem Schweißtest an zweiter Stelle im Diagnoseprozess. Es empfiehlt sich eine der Fragestellung angepasste Stufendiagnostik, welche auch die ethnische Herkunft des Patienten berücksichtigt, da Mutationsspektrum und -verteilung ethnische Unterschiede aufweisen. (Nährlich et al. 2013, Stuhmann-Spangenberg et al. 2009).

Nicht alle CFTR-Mutationen sind immer krankheitsverursachend für eine CF. Ebenso ist der sichere Ausschluss einer CF mithilfe der heutigen molekulargenetischen Methoden nicht möglich, da gewisse CFTR-Mutationen (z.B. intronische Spleißmutationen) bisher nicht nachweisbar sind. Die Mutationsdetektionsraten bei Verdacht auf CFTR-RD sind wesentlich geringer als bei Verdacht auf CF, da es sich bei CFTR-RD oft um multifaktorielle Erkrankungen handelt, denen nicht immer krankheitsverursachende, sondern vielmehr für die Krankheit disponierende CFTR-Mutationen zugrunde liegen (Castellani et al. 2009, Dequeker et al. 2009, Nährlich et al. 2013, Stuhmann-Spangenberg et al. 2009).

Die molekulargenetische Diagnostik erfolgte, sofern nicht bereits im Vorfeld außer Haus, durch das Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Im Folgenden werden die in der untersuchten Patientenkohorte durchgeführten Methoden erläutert:

Zunächst wurde, in aller Regel mittels Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (Multiplex-PCR) in Kombination mit einem Oligonukleotid-Ligation-Assay (OLA), gezielt auf das Vorhandensein der über 30 häufigsten Mutationen (Häufigkeit > 1 %) untersucht. Dieses Erst-Screening ermöglicht die molekulargenetische Sicherung der Diagnose bei etwa 81 % der CF-Patienten deutscher Herkunft (Nährlich et al. 2013).

Bei Nachweis keiner oder nur einer CFTR-Mutation wurde eine Komplettuntersuchung des CFTR-Gens veranlasst, die sich aus Sequenzierung und multiplexer ligationsabhängiger Sondenamplifikation (MLPA) zusammensetzte. Die direkte Sequenzierung der gesamten kodierenden DNA-Abschnitte, also aller Exons, einschließlich der flankierenden Exon-Intron-Übergänge, basiert auf der PCR genomischer DNA und weist die höchste Sensitivität unter den angewandten molekulargenetischen Methoden auf. Allerdings erlaubt sie keinen Nachweis größerer exonübergreifender Deletionen oder Insertionen. Zur möglichen Identifizierung dieser größeren intragenischen Rearrangements, die in etwa 1-3 % aller CF-Allele vorkommen, wurde die MLPA hinzugezogen, die als eine Variante der Multiplex-PCR der gezielten Vermehrung mehrerer DNA-Sequenzen dient. Sequenzierung und MLPA sind mit einem erhöhten Zeit- und Kostenaufwand verbunden und nicht überall verfügbar, führen jedoch bei 98 % der CF-Patienten zum Nachweis zweier CFTR-Mutationen (Nährlich et al. 2013, Schouten et al. 2002, Stuhmann-Spangenberg et al. 2009).

## **3.4 Nasale Potentialdifferenz (NPD)**

### **3.4.1 Methode**

Die NPD fußt auf den Erkenntnissen von Knowles et al. (Knowles et al. 1981) und erlaubt stellvertretend für das respiratorische Epithel in seiner Gesamtheit die elektrophysiologische Messung der Ionensekretionsfunktion, so auch der CFTR-Chloridkanalfunktion, an der Nasenschleimhaut in vivo. An beiden Nasenlöchern nacheinander erfolgt eine Aufzeichnung der in vivo Potentialdifferenz zwischen einem Katheter im unteren Nasengang und einer kutanen Referenzelektrode in Ruhe und nach Superfusion von Lösungen, die Natrium- und Chloridkanäle am apikalen respiratorischen Epithel beeinflussen. Die Methode kommt unter anderem bei Schweißchloridwerten von 30-59 mmol/l und einem ausbleibenden Nachweis von 2 CF-verursachenden CFTR-Mutationen zum Einsatz, um eine Unterscheidung zwischen den Diagnosen „CF“ und „CF unwahrscheinlich“ vorzunehmen. Aufgrund ihrer Reproduzierbarkeit bei unizentrischer beziehungsweise standardisierter Durchführung findet die NDP auch in der CF-Forschung im Rahmen klinischer Studien Anwendung, beispielsweise zur Untersuchung der Wirksamkeit neuer Therapieansätze (ECFS NPD SOP 2012, Jaron et al. 2008, Nährlich et al. 2013, Yaakov et al. 2007).

Die eingeschränkte Verfügbarkeit und der verhältnismäßig hohe Zeitaufwand der Methode stellen eine Herausforderung für den klinischen Alltag dar. Für Kinder im Alter von unter 6 Jahren ist die NPD nicht geeignet, da sie ein jeweils circa 30-minütiges Stillsitzen des Patienten erfordert. Veränderungen der nasalen Mukosa (z.B. Inflammation bei Rhinitis oder Läsionen bei Z.n. Nasen-OP), Nasenpolypen der unteren Nasenmuscheln, anatomische Besonderheiten der Nasenhöhle (z.B. Septumdeviation oder Z.n. Nasen-OP) und Nikotin-Abusus können falsch-positive Befunde im Sinne einer vermeintlichen oder nicht CF-bedingten Beeinträchtigung der CFTR-Chloridkanalfunktion bedingen und müssen im Vorfeld der Untersuchung anamnestisch und rhinoskopisch ausgeschlossen beziehungsweise dokumentiert werden (ECFS NPD SOP 2012, Nährlich et al. 2013, Rasmussen et al. 2014, Sands 2013).

Mithilfe einer NPD-Messung ist eine sichere Differenzierung zwischen CF ohne CFTR-Restfunktion und Non-CF möglich. Bei CF mit CFTR-Restfunktion, CFTR-RD und Non-CF kann es jedoch zu überlappenden NPD-Antworten kommen, was eine eindeutige diagnostische Einordnung erschwert (Nährlich et al. 2013).

### 3.4.2 Material und Durchführung

Die NPD wurde gemäß dem internationalen und multizentrisch standardisierten Protokoll der European Cystic Fibrosis Society (ECFS NPD SOP 2012) durchgeführt. Folgendes Material wurde verwendet:

Tab. 3.5: *Datenaufzeichnung.*

<i>Material</i>	<i>Anbieter</i>
Voltmeter ML866 PowerLab 4/30, 4-kanalig	AD Instruments
Vorverstärker BMA-200 AC/DC Portable Preamplifier 08-03000	AD Instruments
Elektrodenanschlussbox ISO-Z Isolated Head-Stage for BMA-200, 10-02020	AD Instruments
Adapter 2/4 (2x) zur Verbindung Kalomelektroden -> Headstage (DM: 2 mm), Best.-Nr. 444-999 (schwarz), Best.-Nr. 444-983 (rot)	Multi Contact
Langzeit-EKG-Elektrode mit Adapterleitung zur Erdung an der Headstage (L.: 180 cm), 1-polig	Asmuth
LabChart Software (Version 7.2, Oktober 2010), inbegriffen in PowerLab 4/30	AD Instruments
Laptop: Pentium Prozessor	Dell

Tab. 3.6: *Elektroden.*

<i>Material</i>	<i>Anbieter</i>
Kalomelreferenzelektroden (2x), REF 401, 11069 A07 (schwarz), 11069 A08 (rot)	Radiometer Analytical
EKG-Elektroden (DM: 30 mm), REF F 301	Asmuth
mit KCL gefüllte Erlenmeyerkolben (2x) (100 ml) für die Kalomelektroden	Schott Duran

Tab. 3.7: *Hautbrücke (Referenzbrücke).*

<i>Material</i>	<i>Anbieter</i>
Butterfly-Kanüle Valu-Set, 23G x 0,75" x 12" (0,6 x 19 x 305 mm), REF 387435	Becton Dickinson
Einmalspritze (0,01-1 ml) Omnifix-F Tuberkulin, 27G x 3/4" (0,4 x 20 mm), REF 9202145F	Braun
Einmalspritze (5 ml) Injekt, REF 4606051V	Braun
Transferpipette (1 ml), REF 86.1180	Sarstedt
Difco Noble Agar (100 g), REF 214220	Becton Dickinson
Cutisoft Vlieskompressen (5 x 5 cm), REF 45844-00 oder ein Äquivalent	BSN medical
Durapore Chirurgisches Rollenpflaster (2,5 cm x 9,1 m), Pr.-Nr.: 1530-1	3M
Leukoplast S hautfarbenes Fixierrollenpflaster (1,25 cm x 9,2 m), Pr.-Nr.: 4761900	BSN medical
Softasept N Hautdesinfektionsmittel (250 ml) mit 74,1%-igem Ethanolanteil oder ein Äquivalent	Braun

Tab. 3.8: Nasenbrücke (Messbrücke).

Material	Anbieter
Doppellumiger Nasenkatheter zur Messung der Potentialdifferenz (DM: 2,5 mm, L.: 80 cm), REF I0202US	Marquat Genie Biomedical
Einmalspritze (0,01-1 ml) Omnifix-F Tuberkulin, 27 G x 3/4" (0,4 x 20 mm), REF 9202145F	Braun
Einmalspritze (5 ml) Injekt, REF 4606051V	Braun
Transferpipette (1 ml), REF 86.1180	Sarstedt
Difco Noble Agar (100 g), REF 214220	Becton Dickinson

Tab. 3.9: Perfusionsmaterial.

Material	Anbieter
Infusionspumpen (5x), 1000LB01537 Iss 2	Alaris GH
Original Perfusor-Spritze (50 ml)	Braun
Original Perfusor-Leitung (L.: 150 cm), REF 8722960,	Braun
5-fach Hahnbank codiert mit Linie (L.: 180 cm), REF ST-08	Smiths Medical
Combifix Adapter m/m, REF 5206642	Braun
Kombi-Stopfen, REF 8501512	Fresenius Kabi

Tab. 3.10: Zusatzmaterial.

Material	Anbieter
Otoskop mini 3000 F.O. mit Batterie zur Inspektion des Nasenepithels, C/S: 0239541, LF: 98920622	Heine

Tab. 3.11: Substanzen zur Herstellung der Lösungen.

Substanz	Summenformel	MG	Anbieter
Adenosin 5'-Triphosphat (5 g), REF 10127523001 (1)	$C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3 \times 3H_2O$	605	Roche
Amilorid HCl (5 g), Pr.-Nr.: A7410 (2)	$C_6H_8ClN_7O \times HCl$	266	Sigma-Aldrich
Kalziumchlorid Dihydrat (250 g), Pr.-Nr.: 21100	$CaCl_2 \times 2H_2O$	147	Sigma-Aldrich
Kalziumglukonat (100 g), Pr.-Nr.: C8231	$C_{11}H_{22}CaO_{14}$	430	Sigma-Aldrich
Isoproterenol HCl (1 g), Pr.-Nr.: I6504 (3)	$C_{17}H_{17}NO_3 \times HCl$	248	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid Hexahydrat (1 kg), Pr.-Nr.: 63065	$MgCl_2 \times 6H_2O$	203	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat Heptahydrat (500 g), Pr.-Nr.: 63140	$MgSO_4 \times 7H_2O$	246	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (5 kg), Pr.-Nr.: P4504	KCl	75	Sigma-Aldrich
Kaliumglukonat, wasserfrei (100 g), Pr.-Nr.: P1847	$C_6H_{11}KO_7$	234	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat, wasserfrei (500 g), Pr.-Nr.: 04248	$K_2HPO_4$	174	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat, wasserfrei (500 g), Pr.-Nr.: 60220	$KH_2PO_4$	136	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (500 g), Pr.-Nr.: 71379	NaCl	58	Sigma-Aldrich
Natriumglukonat (1 kg), Pr.-Nr.: G9005	$C_6H_{11}NaO_7$	218	Sigma-Aldrich

Tab. 3.12: *Lösungen.*

<i>Lösung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Buchstabe</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Ringerlösung	Ringers	A	8,58 g/l NaCl in A. dest. + Salz-Stamm-Lsg + KPI-Stamm-Lsg.
Ringerlösung + Amilorid	Amil	B	0,1 mM Amilorid HCl in Lösung A
Chloridfreie Lösung + Amilorid	OCl	C	0,1 mM Amilorid HCl in OCL-Stammlösung
Chloridfreie Lösung + Amilorid + Isoproterenol	Iso	D	0,01 mM Isoproterenol HCl in Lösung C
Chloridfreie Lösung + Amilorid + Isoproterenol + ATP	ATP	E	0,1 mM ATP in Lösung D

- (1) Das Nukleotid Adenosin 5'-Triphosphat fungiert intrazellulär u.a. als Cosubstrat von Kinasen, so auch der kalzium-abhängigen Proteinkinase C, welche alternative Chloridkanäle stimuliert (Zsemberg et al. 2004).
- (2) Amilorid ist ein kaliumsparendes Diuretikum, welches den ENaC hemmt (Burrows et al. 2014).
- (3) Isoproterenol ist ein synthetisches racemisches Noradrenalin-Derivat, das mittels Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration den CFTR-Kanal aktiviert (Grubb et al. 1993).

#### Prinzip der NPD:

Die Untersuchung wurde, beginnend mit der rechten Seite, nacheinander an beiden Nasenlöchern durchgeführt. Die Messung der elektrischen Potentialdifferenz (PD) erfolgte zwischen einem an der Mukosa der unteren Nasenmuschel des Patienten anliegenden Messkatheter und einer intrakutan am Unterarm angebrachten Referenznadel. Dabei erfasste eine mit der Nasensonde verbundene Elektrode das apikal entstehende und eine mit der Referenznadel verbundene Elektrode das interstitiell auftretende Potential, welches auf zellulärer Ebene der basolateralen elektrischen Spannung entspricht. Nasenkatheter und Referenznadel wurden mit einem in Ringerlösung verflüssigten 3%igem Agar gefüllt und mit Kalomelektroden an einen hochohmigen Verstärker angeschlossen. Ein stabiler Wert der elektrischen Spannungsdifferenz wurde als basale PD definiert. Während der Messung wurde die Nasenmuschel durch ein zusätzliches im Nasenkatheter angebrachtes Lumen mindestens je 3 Minuten lang mit Lösungen gespült (siehe Abb. 3.5): 1. Ringerlösung (Lösung A) zur Bildung einer stabilen basalen PD; 2. Amiloridlösung (Lösung B) zur Inhibition der ENaC-vermittelten Natriumabsorption; 3. Chloridfreie Lösung (Lösung C) zur Messung der basalen, osmotisch induzierten Chloridpermeabilität; 4. Isoproterenollösung (Lösung D) zur Ermittlung der cAMP-abhängigen CFTR-Leitfähigkeit; 5. ATP-Lösung (Lösung E) zur Messung der Chloridsekretion mittels alternativer, kalzium-abhängiger Chloridkanäle. Delta PD ATP diente hierbei als Qualitätskontrolle der Messung. 6. Ringerlösung (Lösung A) zum Ausspülen des Katheters.

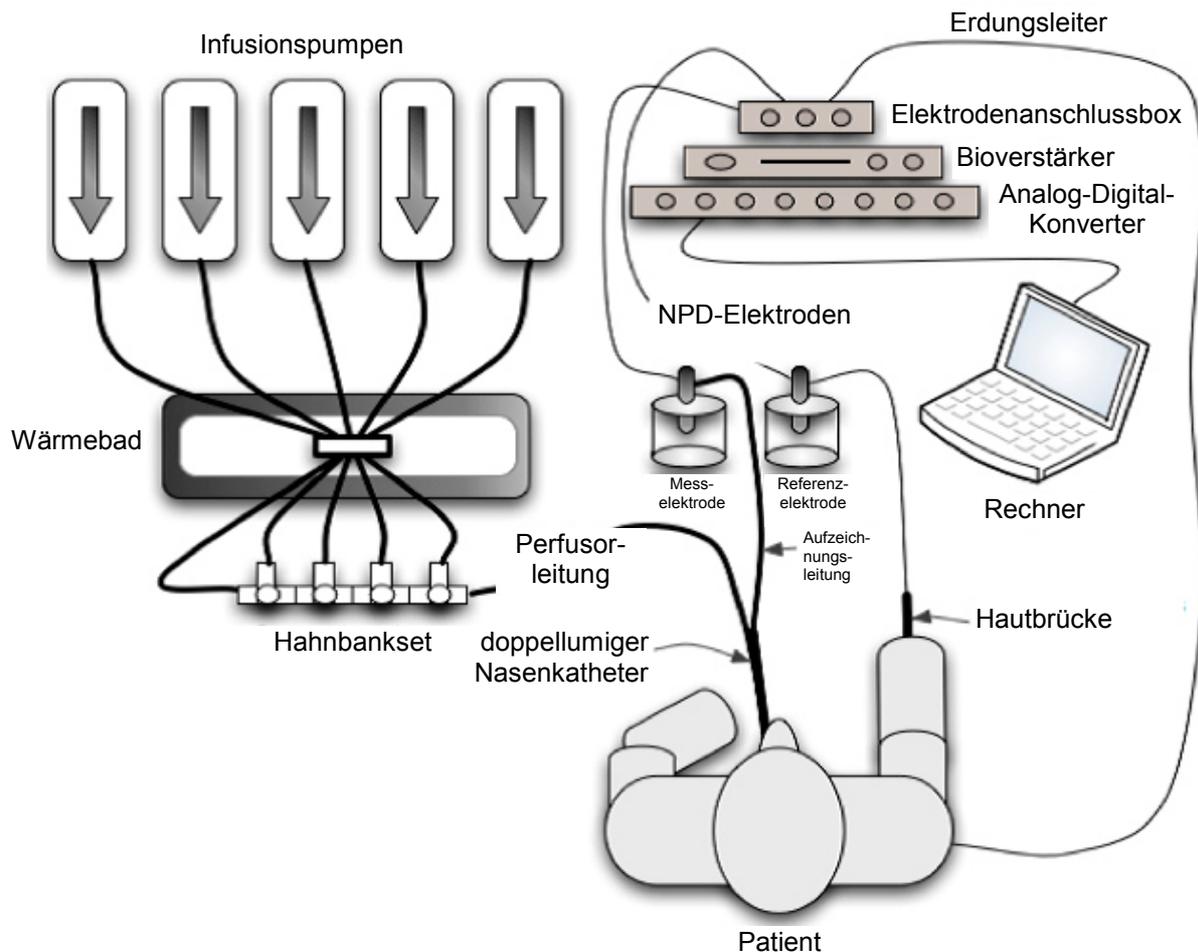


Abb. 3.2: NPD: schematischer Aufbau (modifiziert nach ECFS NPD SOP, Version 1.8; Mai 2014).

#### Vorbereitungen und Beginn der Messung:

1. Anamnese und beidseitige anteriore Rhinoskopie am Patienten unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.4.1 genannten Ausschlusskriterien.
2. Überprüfung der bleibenden Regelabweichung (closed loop offset): Platzierung des der Nadelspitze entgegengesetzten, agargefüllten Endes der Hautbrücke in den KCL-Behälter mit der Kalomelreferenzelektrode. Platzierung der Nadelspitze der Hautbrücke in den Behälter mit Ringerlösung (Lösung A). Platzierung des der Nase des Patienten entgegengesetzten, agargefüllten Endes des Nasenkatheters in den KCl-Behälter mit der Kalomelmesselektrode. Platzierung der Spitze des Nasenkatheters in den Behälter mit Ringerlösung (Lösung A), um den Regelkreis zu schließen. Der PD-Wert des closed loop offset sollte  $\pm 2,5$  mV betragen. Bei zu hoher bleibender Regelabweichung sind alle Anschlüsse, Aufbau, Geräte, mögliche Luftblasen in den Perfusorleitungen und die Agarbrücken jeweils einzeln zu überprüfen.
3. Desinfektion der Punktionsstelle für die Referenznadel am rechten Unterarm des Patienten.

4. Intrakutane Punktion am rechten Unterarm des Patienten mit agargefüllter Butterfly-Nadel und Fixierung der Nadel mit chirurgischem Rollenpflaster.
5. Überprüfung des Regelkreises mittels Messung der PD am Finger: Der Patient hält die Öffnung des langsam (30 ml/h) mit Lösung A durchspülten Nasenkatheters zwischen den Spitzen von Daumen und Zeigefinger. Die PD muss dabei einen Wert im Bereich zwischen -35 mV und -75 mV annehmen. Abweichende Werte können u.a. durch eine Fehllage der Referenznadel oder einen defekten Agar der Referenzbrücke bedingt sein.
6. Beginn der Spülung mit Lösung A (300 ml/h).
7. Beginn der Messung im rechten Nasenloch.
8. Einführen des Nasenkatheters in die untere Nasenmuschel, wobei die Öffnung der agargefüllten Seite der Katheterspitze von nun an stets der Mukosa des lateralen Nasenbodens anliegt.
9. Fortfahrendes, circa 6 cm tiefes Einführen des Nasenkatheters in die untere Nasenmuschel.
10. Langsames Zurückziehen des Katheters unter Beobachtung der Änderung des PD-Wertes und Ermittlung der Lokalisation, die den negativsten PD-Wert aufweist (basale PD).
11. Anhalten des Katheters sobald die PD wieder positivere Werte annimmt und kurze Rückführung zur zuvor ermittelten Lokalisation mit dem negativsten PD-Wert (basale PD).
12. Fixierung des Katheters an der obig erwähnten Lokalisation mittels Anbringung von Fixierungspflaster an Nasenkatheter und Nasenrücken des Patienten.
13. Leichte Neigung des Patientenkopfes nach kaudal, um ein Heraustropfen der Spülung aus dem Nasenloch zu gewährleisten.
14. Bitte an den Patienten, sich während der folgenden Messung nicht zu bewegen, nicht zu sprechen und durch den Mund zu atmen, um eine störfaktorarme Aufzeichnung zu ermöglichen.

#### Durchführung der Messung:

Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 300 ml/h. Vor jedem Wechsel zur Spülung mit der jeweils nächsten Lösung sollte die Aufzeichnungskurve mindestens 30 Sekunden lang einen stabilen Verlauf bei einer maximalen Abweichung von  $\pm 1$  mV aufweisen.

1. Spülung mit Lösung A, mindestens 1 Minute.
2. Wechsel zu Lösung B, Spülung mindestens 3 Minuten.
3. Wechsel zu Lösung C, Spülung mindestens 3 Minuten.
4. Wechsel zu Lösung D, Spülung mindestens 3 Minuten.
5. Wechsel zu Lösung E bis ein negativer Höchstwert erreicht worden ist.

6. Wechsel zu Lösung A zur Ausspülung der zuvor applizierten Lösungen aus dem Katheter, mindestens 30 Sekunden.
7. Änderung der Perfusionsgeschwindigkeit von Lösung A auf 30 ml/h und Überprüfung des Regelkreises mittels Messung der PD am Finger (siehe „Vorbereitungen und Beginn der Messung“ Schritt 5.).
8. Spülstop, Auswaschen der Perfusionsleitungen in umgekehrter Reihenfolge (Lösung E -> D -> C -> B-> A) und Nachfüllen der Infusionspumpen.
9. Fortführung der Messung am linken Nasenloch und Wiederholung der Schritte 1.-8..
10. Überprüfung der bleibenden Regelabweichung (closed loop offset) (siehe „Vorbereitungen und Beginn der Messung“ Schritt 1.).

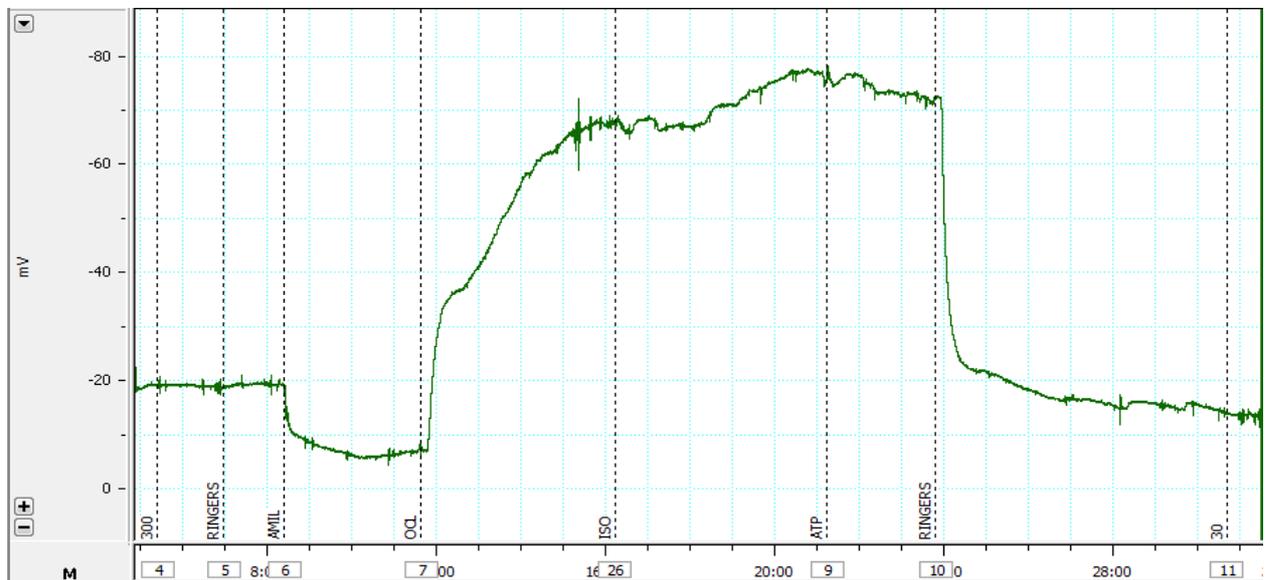


Abb. 3.3: NPD: Messkurve bei normaler Chloridleitfähigkeit (rechtes Nasenloch)  
(aus der Patientenkohorte).

Legende: x-Achse: gerahmte Zahlen: Nummerierung der LabChart-Kommentare, ungerahmte Zahlen: Zeit in Minuten (ein Strich entspricht einer Minute); y-Achse (mV): Potentialdifferenz in Millivolt; 300: 300 ml/h (Perfusionsgeschwindigkeit); Ringers: Ringerlösung; Amil: Amiloridlösung; OCl: Chloridfreie Lösung; Iso: Isoproterenollösung; ATP: ATP-Lösung; 30: 30 ml/h (Perfusionsgeschwindigkeit).

Anmerkungen: Aufgrund normaler ENaC-Aktivität weist die basale PD bei einer Non-CF typischerweise einen positiveren Wert (hier: - 19 mV) als bei einer CF auf. Durch die ENaC-Inhibition mittels Amiloridlösung kommt es zu einem vergleichsweise moderaten Absinken der Kurve (Delta PD Amilorid, hier: 11 mV). Die osmotisch induzierte (Delta PD OCl, hier: - 60 mV), CFTR-abhängige (Delta PD Iso, hier: - 10 mV) und kalziumabhängige Chloridsekretion mittels alternativer CaCC (Delta PD ATP, hier: - 1 mV) spiegelt sich jeweils im Anstieg der Kurve wider. Delta PD (OCl+Iso) (hier: - 70 mV) ist hierbei Ausdruck der gesamten CFTR-abhängige Chloridsekretion (Knowles et al. 1981, Wilschanski et al. 2001).

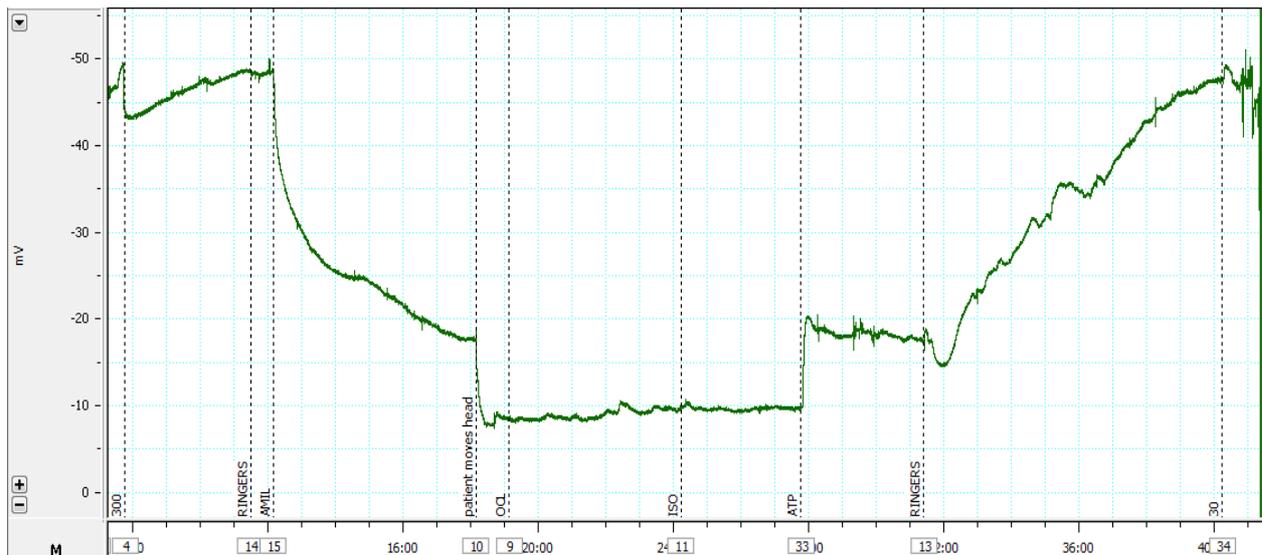


Abb. 3.4: NPD: Messkurve bei fehlender Chloridleitfähigkeit (rechtes Nasenloch)

(aus der Patientenkohorte).

Legende: x-Achse: gerahmte Zahlen: Nummerierung der LabChart-Kommentare, ungerahmte Zahlen: Zeit in Minuten (ein Strich entspricht einer Minute); y-Achse (mV): Potentialdifferenz in Millivolt; 300: 300 ml/h (Perfusionsgeschwindigkeit); Ringers: Ringerlösung; Amil: Amiloridlösung; patient moves head: Patient bewegt den Kopf; OCl: Chloridfreie Lösung; Iso: Isoproterenollösung; ATP: ATP-Lösung; 30: 30 ml/h (Perfusionsgeschwindigkeit).

Anmerkungen: Charakteristisch für eine CF ohne Chloridleitfähigkeit sind der durch eine ENaC-Hyperaktivität bedingte hochnegative basale PD-Wert (hier: - 49 mV), ein daraus resultierendes hohes Delta PD Amilorid (hier: 40 mV) und ein sehr niedriges Delta PD (OCl+Iso) (hier: - 3 mV) als Ausdruck fehlender CFTR-abhängiger Chloridsekretion (Knowles et al. 1981, Wilschanski et al. 2001). Der langfristige Anstieg der Kurve unter letztmaliger Gabe von Ringerlösung bis zum Wiedererreichen des basalen PD-Wertes spiegelt das Ausspülen der zuvor applizierten Lösungen aus dem Nasenkatheter wider.

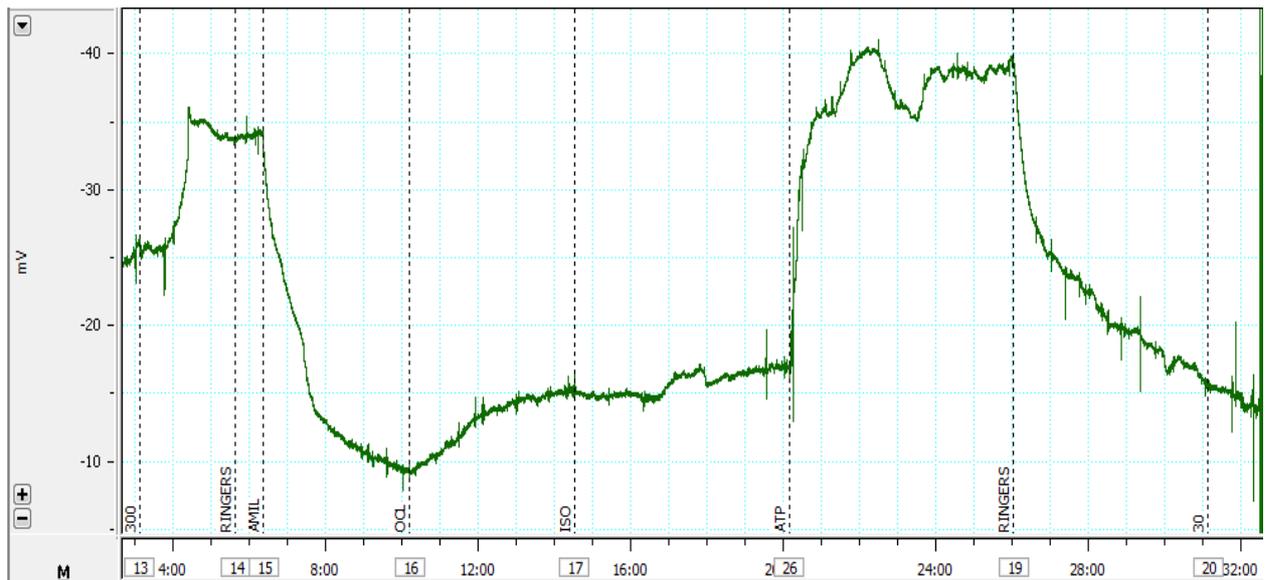


Abb. 3.5: NPD: Messkurve bei residualer Chloridleitfähigkeit (linkes Nasenloch)

(aus der Patientenkohorte).

Legende: x-Achse: gerahmte Zahlen: Nummerierung der LabChart-Kommentare, ungerahmte Zahlen: Zeit in Minuten (ein Strich entspricht einer Minute); y-Achse (mV): Potentialdifferenz in Millivolt; 300: 300 ml/h (Perfusionsgeschwindigkeit); Ringers: Ringerlösung; Amil: Amiloridlösung; OCl: Chloridfreie Lösung; Iso: Isoproterenollösung; ATP: ATP-Lösung; 30: 30 ml/h (Perfusionsgeschwindigkeit).

Anmerkungen: Bei einer CF oder CFTR-RD mit residualer Chloridleitfähigkeit nimmt der basale PD-Wert kennzeichnenderweise meist Werte im Zwischenbereich derer bei einer Non-CF mit normaler und einer CF ohne Chloridleitfähigkeit an (hier: - 34 mV). Auch Delta PD Amilorid (hier: 25 mV) fällt zwar höher als bei einer Non-CF, so doch moderater als bei einer CF ohne Chloridleitfähigkeit aus. Ebenso ist Delta PD (OCl+Iso) (hier: - 8 mV) im Gegensatz zu einer CF ohne Chloridpermeabilität erhöht, im Vergleich zu einer Non-CF jedoch vermindert (Wilschanski et al. 2001).

## **3.5 Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM)**

### **3.5.1 Methode**

Die ICM wurde in den letzten 25 Jahren kontinuierlich weiterentwickelt (De Jonge et al. 2004, Derichs et al. 2009, Derichs et al. 2010, Hug et al. 2011, Mall et al. 2004, Veeze et al. 1991) und dient der ex vivo Messung des transepithelialen Kurzschlussstroms an Rektumbiopsaten in rezirkulierenden Ussingkammern nach pharmakologischer Stimulation der CFTR-Chloridkanalfunktion. Als wichtige Ergänzung zur NPD findet die ICM unter anderem bei Schweißchloridwerten im Kontrollbereich und fehlendem molekulargenetischem Mutationsnachweis Anwendung, um eine Differenzierung zwischen den Diagnosen „CF“ und „CF unwahrscheinlich“ zu ermöglichen (Nährlich et al. 2013). Dank ihrer hohen Reproduzierbarkeit bei unizentrischer beziehungsweise standardisierter Durchführung ist die Methode darüber hinaus besonders gut zur präklinischen Testung von CFTR-Modulatoren sowie zur ex vivo Untersuchung deren Wirksamkeit im Rahmen klinischer Studien geeignet (Derichs et al. 2009, Derichs 2013).

Wie die NPD ist auch die ICM mit einem verhältnismäßig hohen Zeitaufwand verbunden und nur in spezialisierten Zentren verfügbar. Die ex vivo Laborbedingungen der Messung reduzieren exogene Störfaktoreinflüsse auf ein Mindestmaß und tragen dadurch zur hohen Validität der Methode bei. Aufgrund ihrer altersunabhängigen Durchführbarkeit stellt sie bei Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern eine sinnvolle Alternative zur NPD dar (ECFS ICM SOP 2011, Nährlich et al. 2013).

Im Vorfeld der Messung ist die Einnahme antiallergischer Medikamente zu erfragen, da diese die zelluläre Reaktion der Schleimhautproben auf die Gabe von Histamin während der ICM beeinträchtigen können. Außerdem müssen Hämorrhoiden und Blutgerinnungsstörungen vor der Biopsieentnahme als Kontraindikationen ausgeschlossen werden. Nach Gewinnung der Gewebeproben besteht das Risiko kurzzeitiger oberflächlicher Blutungen der Rektumschleimhaut (ECFS ICM SOP 2011, Nährlich et al. 2013).

Die ICM weist eine statistisch signifikante Korrelation zwischen CFTR-Genotyp und Phänotyp (Hirtz et al. 2004) sowie, unter Anwendung des Standardprotokolls ECFS ICM SOP, eine bisherige diagnostische Sensitivität und Spezifität von 100 % auf, was sie zur diagnostischen Methode mit der höchsten Diskriminationsfähigkeit zwischen einer CF mit CFTR-Restfunktion (PS-CF) und einer Non-CF macht. (De Boeck et al. 2011, Derichs et al. 2010, Nährlich et al. 2013).

### 3.5.2 Material und Durchführung

Die ICM wurde gemäß dem internationalen und multizentrisch standardisierten Protokoll der European Cystic Fibrosis Society (ECFS ICM SOP 2011) durchgeführt. Folgendes Material wurde benötigt:

Tab. 3.13: *Datenaufzeichnung.*

<i>Material</i>	<i>Anbieter</i>
PowerLab 8/30, LabChart Software (Version 7.2, Oktober 2010)	AD Instruments
Rechner, Software: Windows XP (2003)	LG

Tab. 3.14: *Rektumbiopsien (Entnahme, Transport und Präparierung).*

<i>Material/Substanz</i>	<i>Anbieter</i>
Rektumsaugbiopsiezange SBT-100, 100-010-01	Trewavis Surgical
Transportpuffer Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) (500 ml), steril filtriert, Pr.-Nr.: BE17-512F	Lonza
Indomethacin (25 g), Pr.-Nr.: I8280 <sup>(1)</sup>	Sigma-Aldrich
Röhren (25x) (50 ml, 114 x 28 mm, PP), REF 62.547.245	Sarstedt
Eiseimer, Pr.-Nr.: Z220531-1EA oder ein Äquivalent	Sigma-Aldrich
Präparierpinzette, Pr.-Nr.: RS-5155 oder ein Äquivalent	Roboz
Stereomikroskop Stemi 2000, Pr.-Nr.: 495102-9804	Zeiss
Kaltlichtquelle CL 6000 LED, Pr.-Nr.: 435700-9101-000	Zeiss

Tab. 3.15: *Ussingkammern.*

<i>Material/Substanz</i>	<i>Anbieter</i>
EasyMount Low Volume Ussingkammersystem, Pr.-Nr.: EM-LVSY8-8, : - inkl. Fundament, Temperatur-Anschlussstück für 8-Kammersystem - inkl. Low Volume EasyMount Diffusionskammer (8x), Arbeitsvolumen: 2 ml/Kammerseite, Pr.-Nr.: P2400 - inkl. Ag/AgCl-Elektrodenset für EasyMount-Kammersystem (8x), (inkl. gesinterte Ag/AgCl-Pelletelektroden (4x) zur Messung der Spannung; inkl. Ag-Drahtelektroden (4x) zur Messung der Stromstärke; inkl. Elektrodenspitzen (16x), Pr.-Nr.: P2020-S	Physiological Instruments, San Diego, USA
Slider für Saugbiopsien (8x), Öffnungsdurchmesser: 1,5 mm (Fläche: 0,018 cm <sup>2</sup> ), Pr.-Nr.: P2047C Slider für kleine Saugbiopsien (8x), Öffnungsdurchmesser: 1,2 mm (Fläche: 0,011 cm <sup>2</sup> ), Pr.-Nr.: P2407B	Physiological Instruments, San Diego, USA
Reserveelektrodenspitzen (100x) für die Ag/AgCl-Elektroden, Pr.-Nr.: P2023	Physiological Instruments, San Diego, USA
Noble Agar (250 g) für die Elektrodenspitzen, Pr.-Nr.: A5431	Sigma-Aldrich
Nadel mit weicher Spitze (20x), 15 G x 3", zum Austauschen der Lösungen in den EasyMount-Kammern, Pr.-Nr.: FN15	Physiological Instruments, San Diego, USA
Mehrkanalige Spannungs- und Stromklemme, Pr.-Nr.: VCC MC8, : - inkl. Klemmmodul, Pr.-Nr.: MC601 - inkl. Eingangsmodul, Pr.-Nr.: DM MC6	Physiological Instruments, San Diego, USA
Zirkulierendes, temperaturkontrolliertes Wasserbad	Julabo
Carbogengas (50 l) (95% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> )	Linde

Tab. 3.16: *Substanzen*.

<i>Substanz</i>	<i>Summenformel</i>	<i>MG</i>	<i>Anbieter</i>
Amilorid HCl (5 g), Pr.-Nr.: A7410 <sup>(2)</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>7</sub> O x HCl	266	Sigma-Aldrich
Forskolin (50 mg), Pr.-Nr.: F6886 <sup>(3)</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	410	Sigma-Aldrich
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) (1 g), Pr.-Nr.: I5879 <sup>(4)</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	222	Sigma-Aldrich
Genistein (100 mg), Pr.-Nr.: G6649 <sup>(5)</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270	Sigma-Aldrich
Carbamoylcholinchlorid (Carbachol, CCH) (10 g), Pr.-Nr.: C4382 <sup>(6)</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	183	Sigma-Aldrich
4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure (DIDS) (1 g), Pr.-Nr.: D3514 <sup>(7)</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub>	499	Sigma-Aldrich
Histamindihydrochlorid (Histamin) (10 g), Pr.-Nr.: H7250 <sup>(8)</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> x 2HCl	184	Sigma-Aldrich

- (1) Das NSAR Indomethacin unterbindet die endogene cAMP-Produktion durch Hemmung der Prostaglandinsynthese infolge nichtselektiver Inhibition der Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1 und COX-2) (Nalamachu und Wortmann 2014).
- (2) Amilorid ist ein kaliumsparendes Diuretikum, welches den ENaC hemmt (Burrows et al. 2014).
- (3) Forskolin ist ein Diterpen, welches mittels direkter Stimulation der Adenylatcyclase die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht und somit den CFTR-Kanal aktiviert (Kavitha et al. 2010).
- (4) IBMX ist eine heterocyclische Verbindung aus der Gruppe der Xanthinderivate, welche die cAMP-abhängige Phosphodiesterase hemmt (Kalderon et al. 1980).
- (5) Das Phytoöstrogen Genistein ist ein Isoflavonoid und wirkt dosisabhängig unter anderem als Potentiator am CFTR-Kanal (Moran und Zegarra-Moran 2005).
- (6) Das Parasympathomimetikum CCH ist ein Acetylcholinanalogon, welches die CFTR-Aktivität cholinerg kostimuliert (Billet et al. 2013).
- (7) DIDS ist eine Schwefelsäure, die Anionenaustauscher hemmt, so auch alternative kalziumabhängige Chloridkanäle (Jessen et al. 1986).
- (8) Das biogene Amin Histamin ist ein Hormon und Neurotransmitter und stimuliert alternative, kalziumabhängige Chloridkanäle (Chough et al. 1993).

Tab. 3.17: Substanzen zur Herstellung des Meylerpuffers.

Substanz	Summenformel	Konzentration	MG	Anbieter
Aqua destillata (30 l) als Stammlösung, Pr.-Nr.: 3478.3	H <sub>2</sub> O		18	Roth
Hepes (250 g), Pr.-Nr.: H3375	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	10 mM	238	Sigma-Aldrich
Dinatriumphosphat, wasserfrei (500 g), Pr.-Nr.: S9763	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 mM	142	Sigma-Aldrich
Natriumphosphat, wasserfrei (500 g), Pr.-Nr.: S8282	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 mM	120	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid Hexahydrat (1 kg), Pr.-Nr.: M9272	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1 mM	203	Sigma-Aldrich
Kalziumchlorid Dihydrat (1 kg), Pr.-Nr.: C3881	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,3 mM	147	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (5 kg), Pr.-Nr.: P4504	KCl	4,7 mM	75	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (1 kg), Pr.-Nr.: 71381	NaCl	128 mM	58	Sigma-Aldrich
Natriumbicarbonat	NaHCO <sub>3</sub>	20,2 mM	84	Sigma-Aldrich
D-Glukose (1 kg), Pr.-Nr.: G7528	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10 mM	180	Sigma-Aldrich
Indomethacin (25 g), Pr.-Nr.: I8280 (1)	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>4</sub>	0,01 mM	358	Sigma-Aldrich

Anmerkungen: Die Osmolarität des Meylerpuffers betrug 300 mosm/l, der pH-Wert 7,4. D-Glukose und Indomethacin stellten keine ursprünglichen Bestandteile, sondern zusätzliche Substanzen zur Anreicherung des Puffers dar.

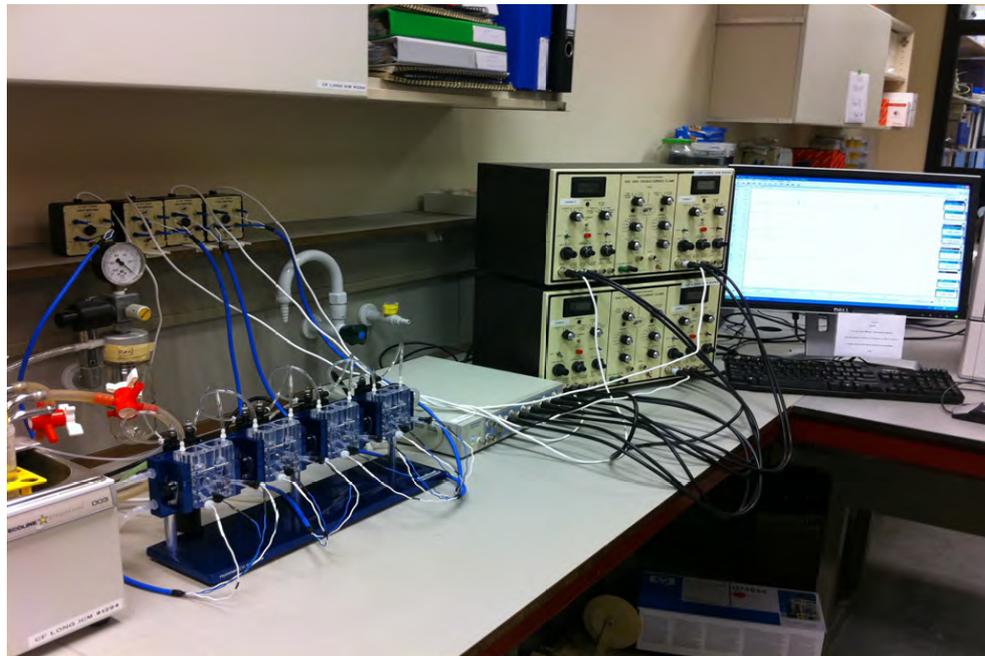


Abb. 3.6: ICM: Aufbau (aus: ECFS ICM SOP; Version 2.7; Oktober 2011).

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

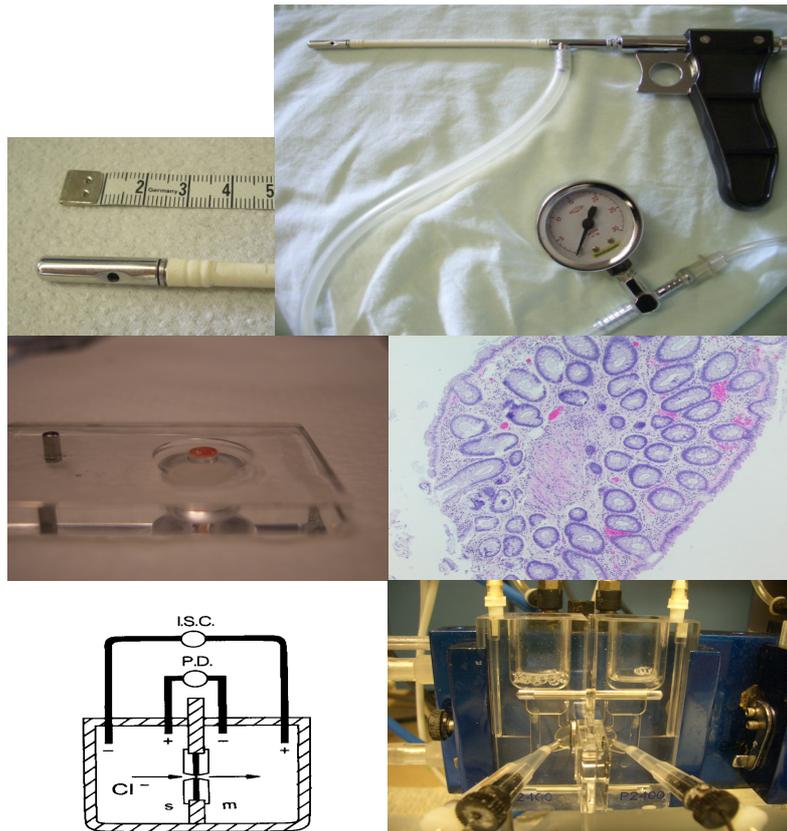


Abb. 3.7: ICM: Material und Biopsie

(mit freundlicher Genehmigung der Charité -Universitätsmedizin Berlin; Skizze aus: Veeze 1995).

Legende: links unten: I.S.C.: Intestinaler Kurzschlussstrom; P.D.: Potentialdifferenz; -: negative Ladung; +: positive Ladung; Cl<sup>-</sup>: Chloridionen; s: serosaler Kammerabschnitt; m: mukosaler Kammerabschnitt. links oben: Biopsiezangenspitze mit Öffnung zum Ansaugen der Biopsie; rechts oben: Biopsiezange mit Saugleitung und Druckanzeige; Mitte links: Slider mit Rektumbiopsie; Mitte rechts: Rektummukosabiopsie in mikroskopischer Vergrößerung; links unten: schematische Darstellung einer Ussingkammer; rechts unten: Ussingkammer.

#### Prinzip der ICM:

Pro Patient wurden 4-8 oberflächliche Saugbiopsien (und eine Reservebiopsie) mit einem Durchmesser von jeweils ca. 2-3 mm an der rektalen Mukosa entnommen. Lagerung und Transport der Gewebeproben erfolgten in eisgekühlter Pufferlösung, welche zuvor mit Indomethacin zur Inhibition der endogenen cAMP-vermittelten Chloridsekretion versehen worden war. Anschließend wurden die Biopsien in die Ussingkammern gesetzt und mit Meylerpuffer inkubiert, welcher zuvor mit Glukose und Indomethacin angereichert worden war. Um physiologische Bedingungen zu simulieren, fand die Inkubation bei 37 °C und unter stetiger Begasung mit 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> statt. Es wurden der transepitheliale Kurzschlussstrom (I<sub>sc</sub>)

als direkter Marker des Ionentransports entlang des Epithels und basale Gewebeeigenschaften wie die basale Potentialdifferenz der jeweiligen Biopsie (basal PD) und deren basaler Widerstand (basal Rt) aufgezeichnet. Des Weiteren wurde die Änderung des Kurzschlussstroms  $I_{sc}$  unter schrittweiser Hinzugabe folgender Substanzen auf die mukosale (M) und/oder serosale (S) Seite jeder Biopsie gemessen: 1. Amilorid zur Inhibition der ENaC-vermittelten Natriumabsorption; 2. Forskolin und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) zur Messung der cAMP-abhängigen CFTR-Leitfähigkeit; 3. Genistein zur Verstärkung der CFTR-Restfunktion; 4. Carbachol (CCH) zur Kostimulation der CFTR-vermittelten Chloridleitfähigkeit mittels cholinerg Koaktivierung; 5. 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic-Säure (DIDS) zur Inhibition alternativer, kalziumabhängiger Chloridkanäle; 6. Histamin zur Ermittlung der cholinerg vermittelten kalziumabhängigen, DIDS-insensiblen Chloridsekretion.

#### Vorbereitungen der Messung: I) Aufbau der Ussingkammern:

1. Einschalten des Wasserbads, Temperatureinstellung auf 42-45 °C, um den Meylerpuffer in den Ussingkammern auf 37 °C zu erwärmen. Die Rückseiten der Ussingkammern müssen in engem Kontakt mit den erwärmten blauen Metallhaltern sein.
2. Anschluss der Carbogasleitungen an das Kammersystem und Aufdrehen des Gashahns.
3. Einfügen der leeren Slider (in den für die jeweiligen Biopsien vorgesehenen Größen) und feste Fixierung der Kammer.
4. Anschließen der Strom- (weiß; seitliche Kammeröffnungen) und Spannungselektroden (schwarz; mittige Kammeröffnungen) an die Kammern. Überprüfung der Abwesenheit von Luftblasen im 3-molaren KCl-Agar und der 3-molaren KCl-Lösung in den Plastikspitzen der Elektroden. Bei Bedarf diagonales Zuschneiden der Plastikspitzen mittels Skalpell.
5. Hinzufügen des vorgewärmten Meylerpuffers (einschließlich D-Glukose und Indomethacin) in die Kammerabschnitte (2ml/Kammerseite) und Entfernen jeglicher festsitzender Luftblasen. Feinjustierung aller Gashähne, um einen langsamen und gleichmäßigen Gasfluss zu gewährleisten.

#### II) Einrichten der Datenaufzeichnung und Systemoffset:

1. Einschalten der Spannungsklemmen und Vorverstärker.
2. Einschalten von Rechner und PowerLab und Öffnen der LabChart Software.
3. Öffnen der ECFS ICM SOP Dateivorlage für 8 Kanäle zur Datenerfassung von Stromstärke (2 Dezimalstellen) und Spannung (1 Dezimalstelle) in jeder der 4 Kammern. Einstellung der

Aufzeichnungsrate auf 10/Sek., Kalibrierung von Stromstärke- und Spannungsausgang. Registrierung der Stromstärke (raw  $I_{sc}$  output) in  $\mu A$ .

4. Während der Equilibrierung des Ussingkammersystems ohne Biopsien ist auf einen stabilen offenen PD-Wert (open PD) zu achten (maximal  $\pm 0,5$  mV; anderenfalls Überprüfung der Spannungselektroden/-spitzen). Kalibrierung der bleibenden Eingangsregelabweichung (input offset) auf 0 mV. Kompensation des systemischen Strömungswiderstands durch Gabe eines Stromimpulses von 15  $\mu A$  mithilfe des Schalters zur Einstellung des Strömungswiderstands und bei der Anzeige 0 beginnendes Aufdrehen des Strömungswiderstandsdrehschalters (mit der Folge abnehmender mV-Werte auf der digitalen Anzeige). Zur Vermeidung einer Überkompensation im Laufe der Messung sollte der Strömungswiderstandsdrehschalter in der Equilibrierungsphase bis zur digitalen Anzeige von 1,0 mV aufgedreht werden.
5. Systemequilibrierung und zwischenzeitliche Biopsieentnahme.

### III) Biopsieentnahme:

1. Schmerzlose und sedierungsfreie Entnahme von 4 oberflächlichen Saugbiopsien (und einer Reservebiopsie) der rektalen Mukosa (DM: 2-3 mm, Lokalisation: circa 5 cm distal des Analrands) am Patienten mittels Rektumsaugbiopsiezange (Saugdruck: 5 mmHg/16 kPa) unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.5.1 genannten Ausschlusskriterien.
2. Lagerung und Transport der Biopsien in eisgekühlter Transportpufferlösung (DPBS einschließlich Indomethacin [10  $\mu M$ ] zur Inhibition der endogenen cAMP-vermittelten Chloridsekretion).

### Visualisierung, Präparierung und Einspannen der Gewebeproben:

1. Bei Bedarf: Wiederholung und Optimierung von PD Offset/Kompensation des Strömungswiderstands kurz vor dem Einspannen der Biopsien (Aufdrehen des Strömungswiderstandsdrehschalters bis zur digitalen Anzeige von 0,0 mV).
2. Ansaugen des Kammerpuffers (2 ml/Kammerseite) in die mit FN-15-Nadeln bestückten Spritzen.
3. Vorsichtiges Herausnehmen einer Biopsie aus dem Transportpuffer und Platzierung der Gewebeprobe auf einem Objektträger mittels Pinzette. Identifizierung der mukosalen und serosalen Biopsieoberflächen unter dem Mikroskop. Behutsames Entfernen von Mukus durch leichtes Bewegen der Gewebeprobe auf einem Papiertuch. Platzierung der Biopsie über der Öffnungsfläche der hinteren Sliderhälfte („bottom“) mit Aufsicht auf die mukosale

Oberfläche. Die Biopsie darf dabei nicht gefaltet sein und muss die Öffnungsfläche des Sliders vollständig bedecken. Aufsetzen der vorderen Sliderhälfte („top“) auf die mukosale Biopsieoberfläche und Einspannen des Sliders in die Kammer bei linksseitiger Ausrichtung der mukosalen Biopsieoberfläche (Sliderseite „top“).

4. Langsames Wiederauffüllen beider Kammerseiten mit dem zuvor angesaugten Meylerpuffer. Gegebenenfalls Entfernung jeglicher vor den Elektroden oder in der Nähe des Gewebes befindlicher Luftblasen.
5. Wiederholung der Schritte 1.-4. mit den 3 verbliebenen Biopsien.

#### Equilibrierung der Biopsien und basale Parameter:

1. Vermerk der verwendeten Slidergröße je Biopsie in Form eines Kommentars in der LabChart-Datei („Bx 1/2/3/4, P2407C/P2407B“).
2. 5-minütige Equilibrierung.
3. Dokumentation des basalen Gewebewiderstands bei offenem Stromkreis (open circuit  $V_t$ ) vor Abklemmen der Spannung (voltage clamp) (LabChart-Kommentar: „Basal PD“). Der Wert liegt typischerweise im Bereich zwischen - 0,3 und - 1,5 mV.
4. Dokumentation des basalen Gewebewiderstands ( $R_t$ , Ohm/cm<sup>2</sup>): Gabe eines kurzen Stromimpulses von 15  $\mu$ A. Dabei wird die entsprechende Spannungsänderung  $V_t$  in mV registriert und später mithilfe des Ohm'schen Gesetzes der Widerstand  $R_t$  berechnet (LabChart-Kommentar: „Basal  $R_t$ “). Biopsien mit einem  $R_t < 10$  Ohm/cm<sup>2</sup> (z.B. aufgrund eines Lecks wegen zu geringer Biopsiegröße oder aufgrund zu geringer Gewebequalität der Biopsie) erlauben keine auswertbare ICM-Messung.
5. Beginn der Aufzeichnung des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) im Spannungsklemmenmodus (voltage clamp mode, 0 mV), Registrierung der Rohdaten in  $\mu$ A. Die standardisierte Dauer der nun folgenden Equilibrierungsphase unter Kurzschlussstrombedingungen und Wirkung von Indomethacin beträgt 40 Minuten und minimiert die Effekte einer endogenen Vorstimulation des Gewebes. Die Auswertung der Messung setzt die aufgezeichnete Stromstärke in Bezug zur Größe der Gewebefläche, an der der Kurzschlussstrom registriert wurde ( $\mu$ A/cm<sup>2</sup>). Die Öffnungsflächen der Slider sind 0,018 cm<sup>2</sup> (P2407C) und 0,011 cm<sup>2</sup> (P2407B), daraus ergeben sich die Gleichungen 1  $\mu$ A = 56,5  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> (P2407C) und 1  $\mu$ A = 88,5  $\mu$ A/cm<sup>2</sup> (P2407B).
6. Dokumentation des basalen Kurzschlussstroms des Gewebes (basal  $I_{sc}$  [pre-amiloride]) nach 40 Minuten (LabChart-Kommentar: „Basal  $I_{sc}$ “). Der Wert liegt typischerweise im Bereich von 10-50  $\mu$ A/cm<sup>2</sup>.

### Durchführung der Messung:

Die angegebenen Konzentrationen stellen die Konzentrationen in den Kammerabschnitten dar.

Die Anleitung bezieht sich auf eine Biopsie, die einzelnen Schritte der Messung sind jeweils an allen 4 Biopsien zügig hintereinander durchzuführen.

1. 40-minütige Equilibrierungsphase im Spannungsklemmenmodus (voltage clamp mode) nach dem Einspannen des mit der Biopsie versehenen Sliders in die Kammer. Nach 5-minütiger Equilibrierungsphase Gabe von 2  $\mu\text{l}$  Carbachol in den serosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „CCH 100  $\mu\text{M}$  S“). Falls diese Probestimulation nach 5 Minuten keine Änderung des Kurzschlussstroms  $I_{\text{sc}}$  im Sinne einer eindeutigen Antwort hervorruft, sollte die Biopsie durch eine Reservebiopsie ersetzt werden. 3-maliger Austausch des vorgewärmten Meylerpuffers (einschließlich 10  $\mu\text{l}$  M Indomethacin) in 10-minütigen Abständen (Zeitpunkte: 10, 20, 30 Min.) zur Gewährleistung optimaler geweblicher Voraussetzungen (LabChart-Kommentare: „Washout I, II, III“).
2. Nach 40 Minuten im Spannungsklemmenmodus (voltage clamp mode) Vermerk des basalen  $I_{\text{sc}}$  der Biopsien (pre-amiloride) (LabChart-Kommentar: „Basal  $I_{\text{sc}}$ “) und Gabe von 2  $\mu\text{l}$  Amilorid in den mukosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „Amil 100  $\mu\text{M}$  M“).
3. Nach Stabilisierung von  $I_{\text{sc}}$  (mindestens 5 Minuten) Gabe von je 2  $\mu\text{l}$  Forskolin und je 2  $\mu\text{l}$  IBMX in den mukosalen und den serosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „Forsk/IBMX 10/100  $\mu\text{M}$  M+S“).
4. Nach Stabilisierung von  $I_{\text{sc}}$  (mindestens 10 Minuten) Gabe von je 0,2  $\mu\text{l}$  Genistein in den mukosalen und serosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „Geni 10  $\mu\text{M}$  M+S“).
5. Nach Stabilisierung von  $I_{\text{sc}}$  (mindestens 5 Minuten) Gabe von 2  $\mu\text{l}$  Carbachol in den serosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „CCH 100  $\mu\text{M}$  M“).
6. Nach Stabilisierung von  $I_{\text{sc}}$  (mindestens 10 Minuten) Gabe von 4  $\mu\text{l}$  DIDS in den mukosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „DIDS 200  $\mu\text{M}$  M“).
7. Nach Stabilisierung von  $I_{\text{sc}}$  (mindestens 10 Minuten) Gabe von 10  $\mu\text{l}$  Histamin in den serosalen Kammerabschnitt (LabChart-Kommentar: „Hista 500  $\mu\text{M}$  S“).
8. Nach Stabilisierung von  $I_{\text{sc}}$  (mindestens 10 Minuten) ist die Messung beendet.
9. Rückkehr in den offenen Stromkreismodus (open circuit mode) und Vermerk der finalen transepithelialen Spannung (PD in mV) (LabChart-Kommentar: „PD end“).
10. Dokumentation des finalen Gewebewiderstands ( $R_t$ ,  $\text{Ohm}/\text{cm}^2$ ): Gabe eines kurzen Stromimpulses (desselben Ausmaßes wie zu Beginn der Messung). Registrierung der entsprechenden Spannungsänderung ( $V_t$  in mV) und spätere Berechnung des Widerstands  $R_t$  mithilfe des Ohm'schen Gesetzes (LabChart-Kommentar: „ $R_t$  end“).

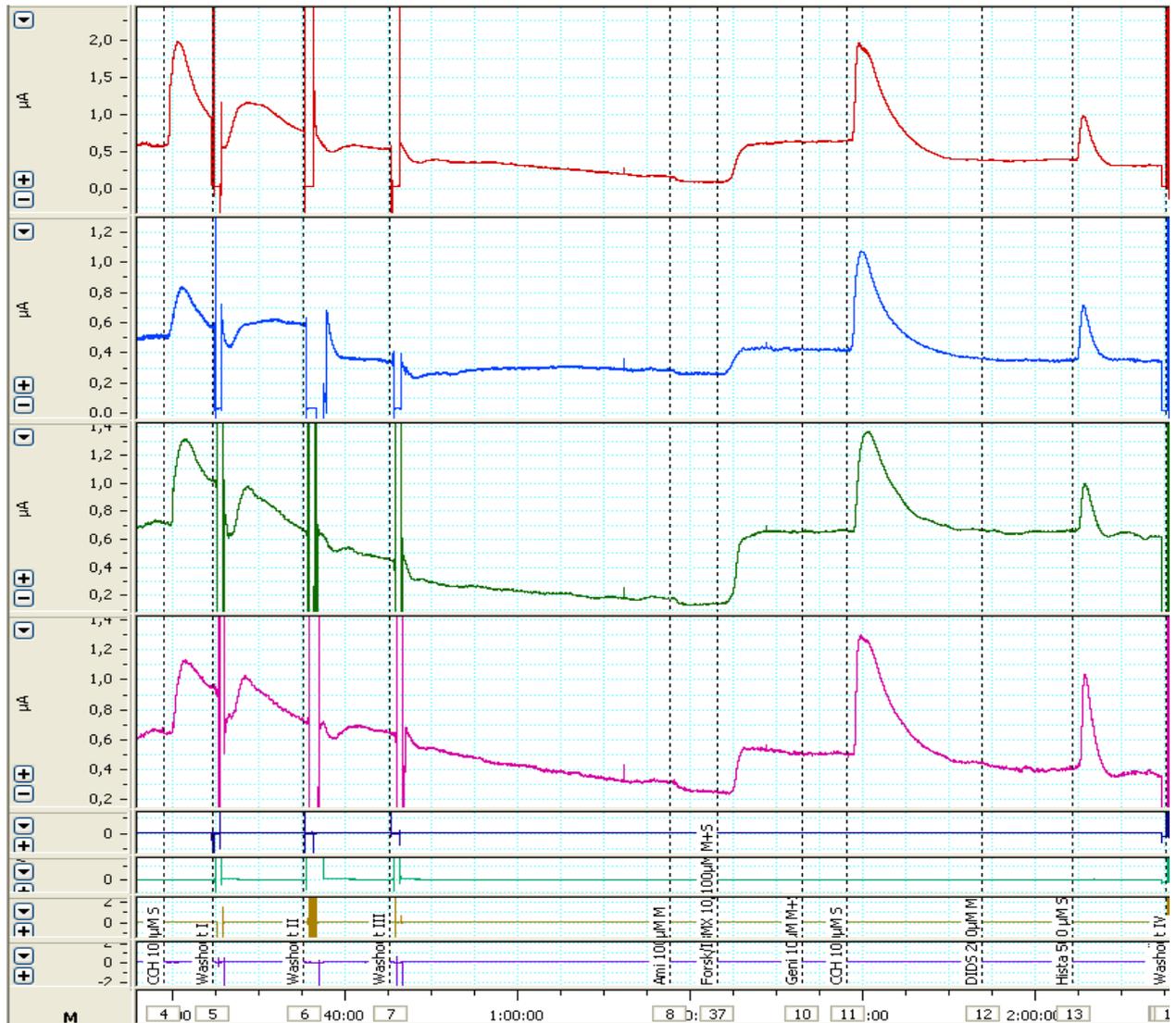


Abb. 3.8: ICM: Messkurve bei normaler CFTR-Funktion (4 Biopsien) (aus der Patientenkohorte).

Legende: x-Achse: gerahmte Zahlen: Nummerierung der LabChart-Kommentare, ungerahmte Zahlen: Zeit in Stunden und Minuten (ein Strich entspricht 5 Minuten); y-Achse ( $\mu\text{A}$ ): Stromstärke in Mikroampère; CCH: Carbachol;  $\mu\text{M}$ : mikromolar; S: serosaler Kammerabschnitt; Washout: Pufferaustausch; Ami: Amilorid; M: mukosaler Kammerabschnitt; Forsk: Forskolin; IBMX: 3-Isobutyl-1-Methylxanthin; Geni: Genistein; DIDS: 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure; Hista: Histamin.

Anmerkungen: Kennzeichen für eine normale CFTR-Funktion bei einer Non-CF sind hohe Mittelwerte von Delta Isc Forskolin/IBMX (hier:  $21,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), Delta Isc Carbachol (hier:  $48,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) und Delta Isc Histamin (hier:  $26,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) mit stark ausgeprägten Anstiegen im Kurvenverlauf. Die Registrierung der apikalen Kaliumsekretion wird in aller Regel durch den regelrechten Chloridausstrom überdeckt (De Boeck et al. 2011, Derichs et al. 2010, Mall et al. 2000).

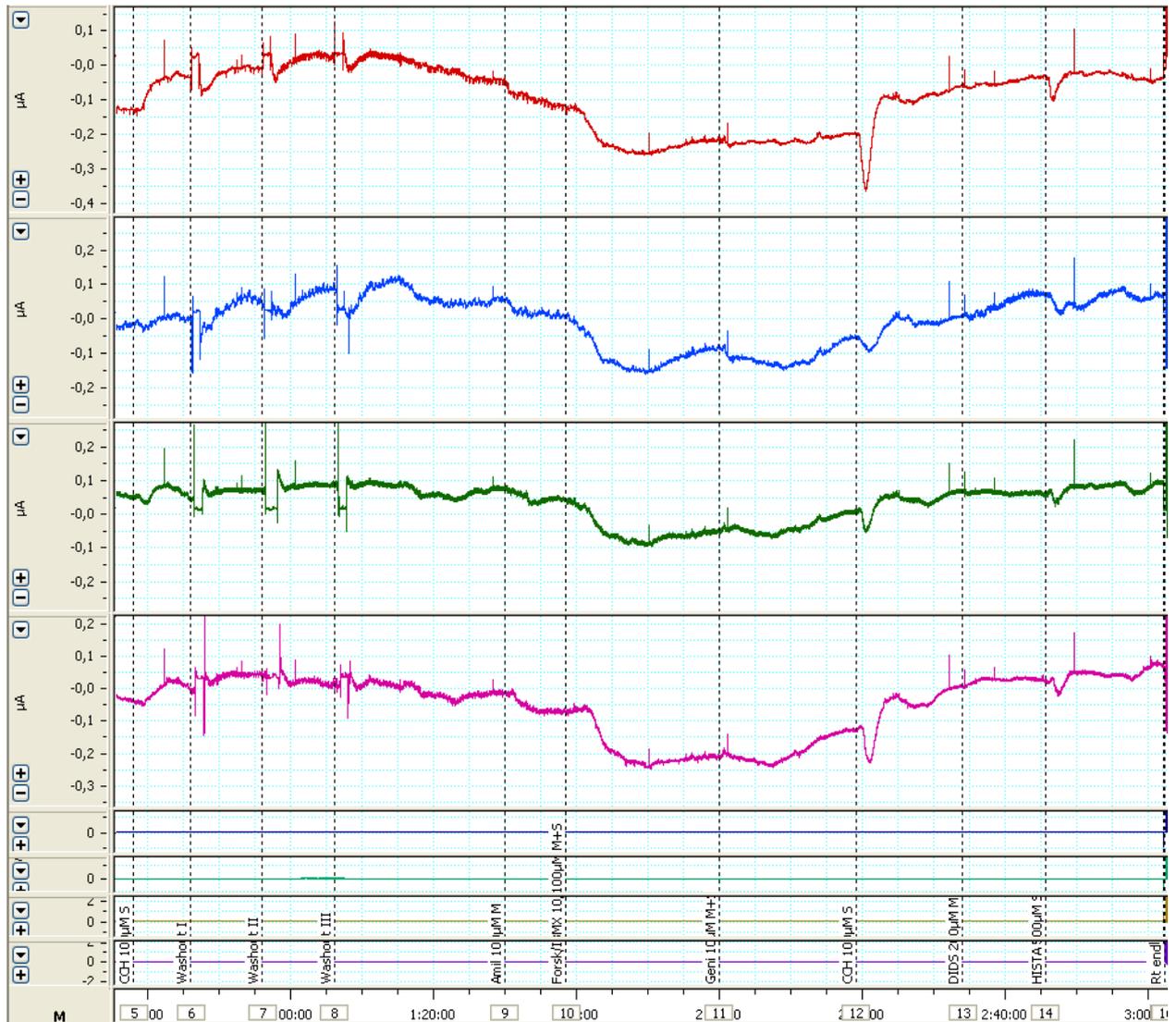


Abb. 3.9: ICM: Messkurve bei fehlender CFTR-Funktion (4 Biopsien) (aus der Patientenkohorte).

**Legende:** x-Achse: gerahmte Zahlen: Nummerierung der LabChart-Kommentare, ungerahmte Zahlen: Zeit in Stunden und Minuten (ein Strich entspricht 5 Minuten); y-Achse ( $\mu\text{A}$ ): Stromstärke in Mikroampère; CCH: Carbachol;  $\mu\text{M}$ : mikromolar; S: serosaler Kammerabschnitt; Washout: Pufferaustausch; Ami: Amilorid; M: mukosaler Kammerabschnitt; Forsk: Forskolin; IBMX: 3-Isobutyl-1-Methylxanthin; Geni: Genistein; DIDS: 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure; Hista: Histamin; Rt end: elektrischer Widerstand bei Messende.

**Anmerkungen:** Charakteristisch für eine fehlende CFTR-Funktion bei einer PI-CF ist der unveränderte oder kurzfristig beziehungsweise langfristig absinkende Kurvenverlauf nach versuchter Aktivierung cAMP-abhängiger CFTR-Kanäle (Delta Isc Forskolin/IBMX, Mittelwert hier:  $0,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), cholinerg Kostimulation der CFTR-vermittelten Chloridleitfähigkeit (Delta Isc Carbachol, Mittelwert hier:  $0,4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) und Stimulation der kalziumabhängigen, DIDS-insensiblen Chloridsekretion (Delta Isc Histamin, Mittelwert hier:  $-1,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ). Aufgrund ausbleibenden oder sehr geringen Chloridausstroms kann die Messung der Kaliumsekretion apikaler Kaliumkanäle unmaskiert bleiben und somit das mögliche Absinken der Kurve bedingen (De Boeck et al. 2011, Derichs et al. 2010, Mall et al. 2000).

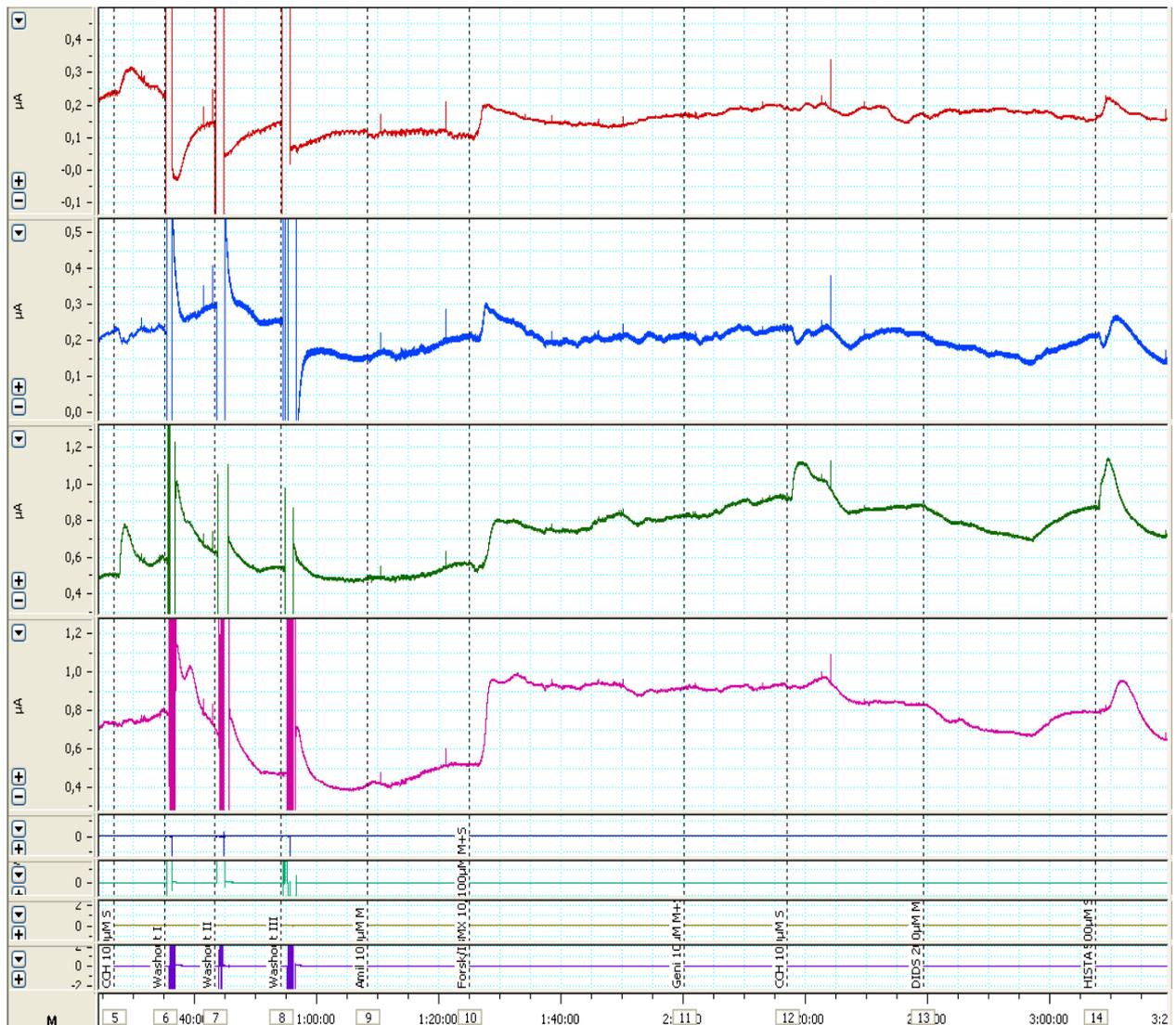


Abb. 3.10: ICM: Messkurve bei CFTR-Restfunktion (4 Biopsien) (aus der Patientenkohorte).

**Legende:** x-Achse: gerahmte Zahlen: Nummerierung der LabChart-Kommentare, ungerahmte Zahlen: Zeit in Stunden und Minuten (ein Strich entspricht 5 Minuten); y-Achse ( $\mu\text{A}$ ): Stromstärke in Mikroampère; CCH: Carbachol;  $\mu\text{M}$ : mikromolar; S: serosaler Kammerabschnitt; Washout: Pufferaustausch; Ami: Amilorid; M: mukosaler Kammerabschnitt; Forsk: Forskolin; IBMX: 3-Isobutyl-1-Methylxanthin; Geni: Genistein; DIDS: 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedischwefelsäure; Hista: Histamin.

**Anmerkungen:** Bei einer PS-CF oder CFTR-RD mit vorhandener CFTR-Restfunktion kommt es unter Gabe von Forskolin/IBMX, Carbachol und Histamin typischerweise jeweils zu einem moderaten Kurvenanstieg. Die Mittelwerte von Delta Isc Forskolin/IBMX (hier:  $12,3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), Delta Isc Carbachol (hier:  $3,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) und Delta Isc Histamin (hier:  $7,2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) liegen jeweils im Intermediärbereich der Werte bei fehlender (PI-CF) und normaler (Non-CF) CFTR-Funktion. Auch hier kann der teilweise gemessene apikale Kaliumausstrom eine vorübergehend oder dauerhaft absinkenden Kurvenverlauf verursachen, da der Chloridausstrom die Messung der Kaliumsekretion nicht vollständig maskiert (De Boeck et al. 2011, Derichs et al. 2010, Mall et al. 2000).

### 3.6 Referenzwerte und diagnostische Interpretation

Schweißchloridmittelwerte  $< 30$  mmol/l machen eine CF unwahrscheinlich, schließen sie aber nicht mit letzter Sicherheit aus (Nährlich et al. 2013, Steward et al. 1995). Schweißchloridkonzentrationen zwischen 30 und 59 mmol/l liegen im Kontrollbereich und erfordern eine weiterführende diagnostische Abklärung. Chloridwerte  $\geq 60$  mmol/l sind mit der Diagnose einer CF vereinbar (Nährlich et al. 2013).

Wichtige diagnostische Parameter der NPD sind die basale PD, Delta PD Amilorid und Delta PD (OCl+Iso), siehe Kapitel 3.4.2. Geeignete Parameter zur Unterscheidung zwischen den Diagnosen „CF“ und „CF unwahrscheinlich“ sind der Wilschanski-Index ( $e^{\text{Delta PD (OCl+Iso)} / \text{Delta PD Amilorid}}$ ) und der Sermet-Score ( $- 0,11 \times \text{Delta PD (OCl+Iso)} - 0,05 \times \text{Delta PD Amilorid}$ ). Der bisherige Cut-Off-Wert des Wilschanski-Index liegt bei 0,7, wobei Werte  $> 0,7$  hinweisend auf eine CF sind (Wilschanski et al. 2001). Der Sermet-Score weist einen Cut-Off-Wert von 0,27 auf, der bei einer CF  $< 0,27$  ist (Sermet-Gaudelus et al. 2010). Zur einheitlichen Durchführung der NPD wurde von der European Cystic Fibrosis Society (ECFS) in den letzten Jahren ein internationales und multizentrisch standardisiertes Protokoll entwickelt (ECFS NPD SOP 2012). Zentrumsunabhängige Referenzwerte werden zurzeit im Rahmen der European Cystic Fibrosis Society Diagnostic Network Working Group (ECFS DNWG) erarbeitet (Nährlich et al. 2013). Hierbei zeichnet sich für den Wilschanski-Index ein neuer Cut-Off-Wert von 0,5 ab (Pinders-Kessler et al. 2013), der auch in der vorliegenden Arbeit zur diagnostischen Interpretation herangezogen wurde.

Der diagnostisch diskriminationsfähigste Parameter der ICM ist Delta Isc (Forskolin/IBMX+ Carbachol+Histamin) mit einem Cut-off-Wert von  $35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , wobei Werte  $< 35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  charakteristisch für eine CF sind (Derichs et al. 2010). Als prädiktiver diagnostischer ICM-Parameter dient Delta Isc Carbachol pre Washout mit einem Cut-off-Wert von  $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , wobei Werte  $< 10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  hinweisend auf eine CF sind. Auch für die ICM werden derzeit zentrumsunabhängige Referenzwerte von der ECFS DNWG gemäß einem internationalen multizentrischen Standardprotokoll (ECFS ICM SOP 2011) erarbeitet (Nährlich et al. 2013). Diesbezüglich deutet sich für beide genannten Parameter eine Bestätigung der jeweiligen Cut-off-Werte an (Derichs et al. 2010, Pinders-Kessler et al. 2013), die auch für die hier untersuchte Patientenkohorte zur diagnostischen Interpretation verwendet wurden.

### 3.7 Qualitätskriterien und Auswertungsmethoden

Die für eine korrekte Auswertung des Schweißtests erforderliche Mindestschweißmenge nach jeweils 30-minütiger Sammelzeit beträgt für das verwendete Macroduct-System 15 µl pro Unterarm, was 3 blaugefärbten Umdrehungen je Schweißsammler entspricht. Nach Veranlassung einer laborchemischen Analyse der gewonnenen Schweißproben auf Chloridkonzentration mittels manueller oder coulometrischer Titration wurde zur diagnostischen Beurteilung des Schweißtests der Mittelwert beider Schweißchloridwerte berechnet (CLSI 2009).

Die Qualitätskriterien für eine auswertbare NPD-Messung sind neben dem Ausschluss der in Kapitel 3.4.1 (S. 37) genannten Faktoren eine der Spülung mit Amiloridlösung direkt vorausgehende stabile basale PD für mindestens 30 Sekunden mit einer maximalen Abweichung von  $\pm 1$  mV sowie eine eindeutige Amiloridantwort im Sinne einer abnehmenden Negativität der Potentialdifferenz. Des Weiteren muss, insbesondere bei ausbleibenden Antworten nach Gabe von chloridfreier Lösung und Isoproterenollösung, eine eindeutige ATP-Antwort im Sinne einer zunehmenden Negativität der Potentialdifferenz vorliegen. Zur diagnostischen Interpretation der jeweiligen Parameter wurden die Mittelwerte der Antworten aus beiden Nasenlöchern berechnet (ECFS NPD SOP 2012).

Für die ICM sind neben dem Ausschluss der in Kapitel 3.5.1 (S. 46) genannten Kontraindikationen die für eine Auswertbarkeit einer Biopsiemessung notwendigen Qualitätskriterien ein basaler Gewebewiderstand ( $RT_{\text{basal}} \geq 10 \text{ Ohm/cm}^2$ ), keine kontinuierliche Zu- oder Abnahme des basalen Kurzschlussstroms (drift) vor der Gabe von Amilorid sowie eine eindeutige Antwort auf die Gabe von mindestens einer Substanz. Für die diagnostische Beurteilung der jeweiligen Parameter wurden die Mittelwerte der Antworten aus den Messungen der 4-8 Biopsien ermittelt (ECFS ICM SOP 2011).

Zur Berechnung von Korrelationen wurden der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) und der p-Wert (p) als Beschreibung der Überschreitungswahrscheinlichkeit ermittelt, wobei für r Werte von  $\pm 0,5$  bis  $\pm 1,0$  und für p Werte  $< 0,02$  als signifikant definiert wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Schweißtest

100 % der Patienten (n = 29) erhielten einen bilateralen Schweißtest. Von insgesamt 58 einzelnen Schweißtests waren 72,4 % (n = 42) auswertbar. In 55,2 % der Fälle (n = 16: ID 1-3, 5, 7, 9, 10, 15, 17-22, 24, 25) konnten jeweils beide Schweißproben ausgewertet werden. Aufgrund zu geringer gesammelter Schweißmengen oder labortechnischer Fehler waren in 34,5 % (n = 10: ID 6, 8, 11, 13, 16, 23, 26-29) nur jeweils eine und in 10,3 % der Fälle (n = 3: ID 4, 12, 14) jeweils keine Schweißprobe auswertbar. Für die diagnostische Beurteilung der letzteren Gruppe wurden die jeweiligen Mittelwerte der bilateralen Schweißtestergebnisse aus den entsprechenden Vorbefunden (siehe Tab. 3.1) verwendet.

Abbildung 4.1 zeigt die Einzel- und Mittelwerte des Schweißchlorids aller Patienten der Kohorte (n = 29). Zusätzlich sind die Gruppen-Mittelwerte der Studie von Pinders-Kessler et al. 2013 bei bekannten Diagnosegruppen (Kontrollen, PS-CF und PI-CF) aufgeführt.

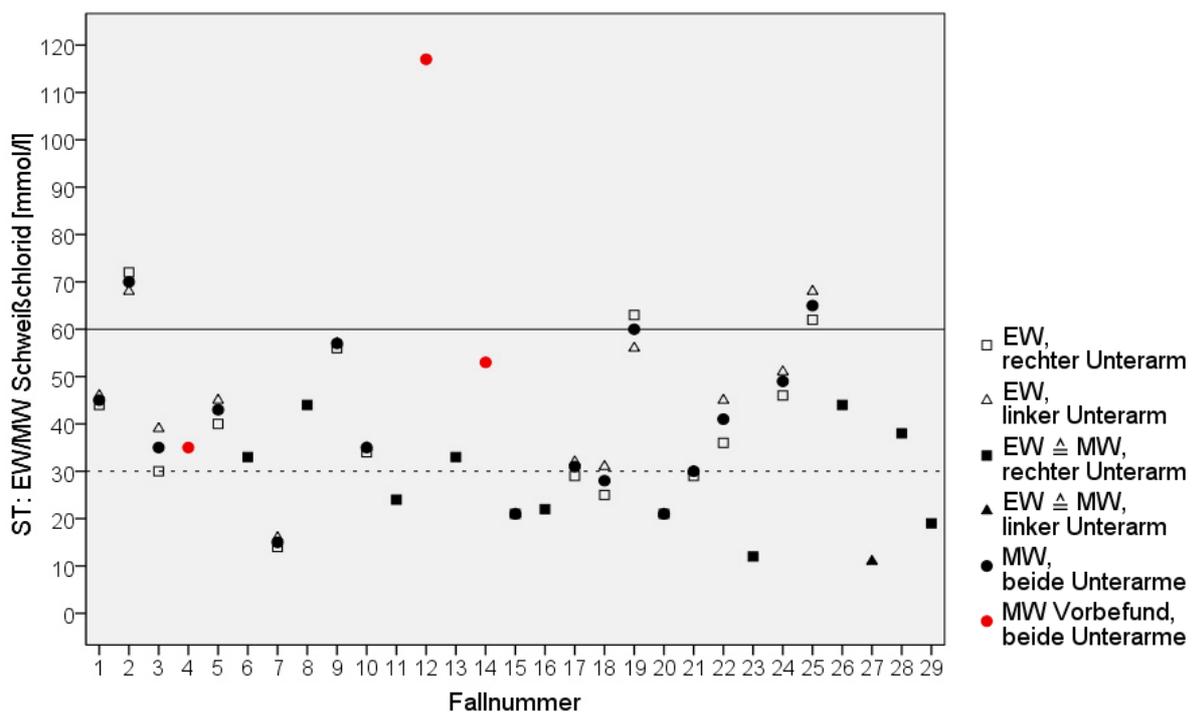


Abb. 4.1: Schweißtest – Schweißchlorid: Einzel- und Mittelwerte.

Legende: y-Achse: ST: Schweißtest, EW: Einzelwerte, MW: Mittelwerte, mmol/l: Millimol pro Liter; durchgehende Linie: oberer Cut-off-Wert für Schweißchloridmittelwerte ( $\geq 60$  mmol/l: hinweisend auf eine CF); unterbrochene Linie: unterer Cut-off-Wert für Schweißchloridmittelwerte ( $< 30$  mmol/l: CF unwahrscheinlich).

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14): 30,21 mmol/l, PS-CF (n = 11): 76,18 mmol/l, PI-CF (n = 26): 95,29 mmol/l.

Im Vergleich der Schweißtestergebnisse mit den Schweißtestvorbefunden ergab sich folgendes Bild (siehe Tab. 4.1): Bei 13,8 % der Patienten (n = 4: ID 7, 18, 23, 27) wiesen jeweils beide Befunde normwertige Ergebnisse (Schweißchloridmittelwert < 30 mmol/l) auf. Aufgrund der Aktenvermerke der Schweißtestvorbefunde von ID 23 und ID 27 („< 15 mmol“, siehe Tab. 3.1 und Tab. 4.1) – wurde für diese Patienten jeweils ein Schweißchloridmittelwert von 14 mmol/l angenommen. In 17,2 % der Fälle (n = 5: ID 11, 15, 16, 20, 29) lag der Mittelwert des Schweißchlorids der Vorbefunde im Kontrollbereich (30-59 mmol/l) und des erneuten Schweißtests im Normbereich (< 30 mmol/l).

Werte im Kontrollbereich sowohl in den Vorbefunden als auch in den erneuten Tests zeigten sich bei 27,6 % der Patienten (n = 8: ID 3, 5, 8, 9, 10, 13, 26, 28). 3,4 % der Fälle (n = 1: ID 6) wiesen einen Vorbefund im Normbereich bei einem Wert im Kontrollbereich im erneuten Test auf. Werte im Kontrollbereich im erneuten Test bei Vorbefunden mit auffälligen Werten der NaCl-Leitfähigkeit von > 50 mmol/l lagen in 13,8 % der Fälle (n = 4: ID 1, 17, 22, 24) vor.

6,9 % der Patienten (n = 2: ID 2, 25) zeigten Werte im CF-Bereich ( $\geq 60$  mmol/l) sowohl im Vorbefund als auch im erneuten Test, wohingegen in 3,4 % der Fälle (n = 1: ID 19) der Wert des Vorbefunds im Kontrollbereich und des erneuten Schweißtests im CF-typischen Bereich lag.

In 3,4 % der Fälle (n = 1: ID 21) lag kein Vorbefund und ein aktueller Schweißtest im Kontrollbereich (30 mmol/l) vor, wohingegen 6,9 % der Fälle (n = 2: ID 4, 14) Vorbefunde mit Werten im Kontrollbereich ohne auswertbare Ergebnisse des erneuten Tests aufwiesen. Bei weiteren 3,4 % der Patienten (n = 1: ID 12) zeigte sich im Vorbefund ein Wert im CF-typischen Bereich und der erneute Schweißtest war nicht auswertbar.

## 4.2 Molekulargenetik

Die molekulargenetischen Befunde stimmten bei 86,2 % der Patienten (n = 25) mit den Vorbefunden überein. Hierunter waren in 17 Fällen (ID 2-5, 7-9, 11, 13, 15, 17, 18, 20, 22, 25, 27, 29) bereits die genetischen Vorbefunde im Sinne einer komplett stattgehabten Gendiagnostik und/oder dem Nachweis zweier krankheitsverursachender CFTR-Mutationen vollständig. Bei den restlichen 8 Fällen dieser Gruppe (ID 1, 6, 12, 14, 15, 19, 23, 26) wurde die im Vorfeld stattgehabte Gendiagnostik komplettiert, woraus sich jedoch keine Änderungen der genetischen Befunde ergaben (siehe Tab. 3.1 und Tab. 4.1).

Bei 13,8 % der Patienten der Kohorte (n = 4) wurde die Gendiagnostik ebenfalls vervollständigt, was in 3 Fällen (ID 10, 21, 24) die Beschreibung des TG-Status des jeweiligen 5T-Polymorphismus ermöglichte und in einem Fall (ID 28) den Nachweis einer nicht CF-verursachenden Sequenzvariante erbrachte (siehe Tab. 3.1 und Tab. 4.1).

In 31,0 % der Fälle (n = 9: ID 1, 6, 11, 14-16, 18-20) konnten keine Mutationen oder Sequenzvarianten beziehungsweise Polymorphismen nachgewiesen werden.

Der Nachweis einer Mutation oder einer Sequenzvariante beziehungsweise eines Polymorphismus auf nur einem Allel konnte bei 24,1 % der Patienten (n = 7) erbracht werden. Hierunter gelang in 3 Fällen (ID 5, 17, 28) der Nachweis einer nicht CF-verursachenden Sequenzvariante, in 2 Fällen eines 5T-Polymorphismus (ID 13) beziehungsweise einer Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen (ID 27) und bei 2 weiteren Patienten einer CF-verursachenden Mutation (ID 12, 22).

Zwei Mutationen und/oder Polymorphismen beziehungsweise Sequenzvarianten wurden in 44,8 % der Fälle (n = 13) nachgewiesen. Hierunter lagen in einem Fall 2 nicht CF-verursachende Sequenzvarianten (ID 23) sowie in 2 Fällen ein 5T-Polymorphismus und eine nicht CF-verursachende Sequenzvariante (ID 3) beziehungsweise eine Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen und eine nicht CF-verursachende Sequenzvariante (ID 4) vor. Des Weiteren erfolgte in dieser Gruppe bei 3 Patienten (ID 2, 7, 8) der Nachweis einer CF-verursachenden Mutation in Kombination mit einer nicht CF-verursachenden Sequenzvariante und in 3 Fällen der Nachweis von 2 5T-Polymorphismen (ID 26) beziehungsweise einem 5T-Polymorphismus und einer Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen (ID 21, 25). Bei 3 Patienten (ID 10, 24, 29) konnten eine CF-verursachende Mutation und ein 5T-Polymorphismus detektiert werden. In einem Fall (ID 9) war eine in den CFTR-Mutationsdatenbanken CFTR1 und CFTR2 zum Untersuchungszeitpunkt nicht beschriebene Mutation in Kombination mit einer Sequenzvariante nachweisbar.

### 4.3 Nasale Potentialdifferenz (NPD)

Bei 69,0 % der Patienten (n = 20) wurde eine beidseitige NPD durchgeführt. Von insgesamt 40 möglichen Einzelmessungen waren 70 % (n = 28) auswertbar. In 60,0 % der Fälle (n = 12: ID 4, 6, 10, 11, 15, 17, 20-22, 24, 26, 28) waren Auswertungen jeweils beider Messungen möglich. Aufgrund technischer Probleme wiesen 20 % der untersuchten Fälle (n = 4: ID 2-3, 25) auswertbare Daten nur jeweils einer Messung auf. Bei 20 % der untersuchten Patienten (n = 4) wurden die geforderten Qualitätskriterien aufgrund mangelnder Mitarbeit seitens der Patientin (ID 13), Inflammation der nasalen Mukosa (ID 14, 19) und Zustand nach rezidivierender Polyposis nasi (ID 23) bei keiner der Messungen erfüllt.

Die folgenden Abbildungen stellen die relevanten Messdaten aller auswertbaren NPD-Messungen der Patientenkohorte (n = 16) dar, wobei die Reihenfolge der abgebildeten Parameter dem zeitlichen Ablauf der Messung entspricht (PD basal, Delta PD Amilorid, Delta PD (OCI+Iso), Delta PD ATP, Sermet-Score, Wilschanski-Index).

Für die jeweiligen Parameter werden zunächst Schaubilder aller erhobenen Einzel- und Mittelwerte gezeigt (Abb. 4.2 bis Abb. 4.7). Außerdem sind für jeden Parameter die Gruppen-Mittelwerte der Studie von Pinders-Kessler et al. 2013 bei bereits bekannten Diagnosegruppen (Kontrollen, PS-CF und PI-CF) aufgeführt.

Im Folgenden sind Korrelationen der Mittelwerte von Schweißtest und des entsprechenden NPD-Parameters dargestellt, wobei jeweils der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) und der p-Wert (p) angegeben sind (Abb. 4.8 bis Abb. 4.12). Da Delta PD ATP lediglich als Qualitätskontrolle der NPD-Messung dient (siehe Kap. 3.7), ist die Korrelation dieses NPD-Parameters mit dem Schweißtest nicht aufgeführt.

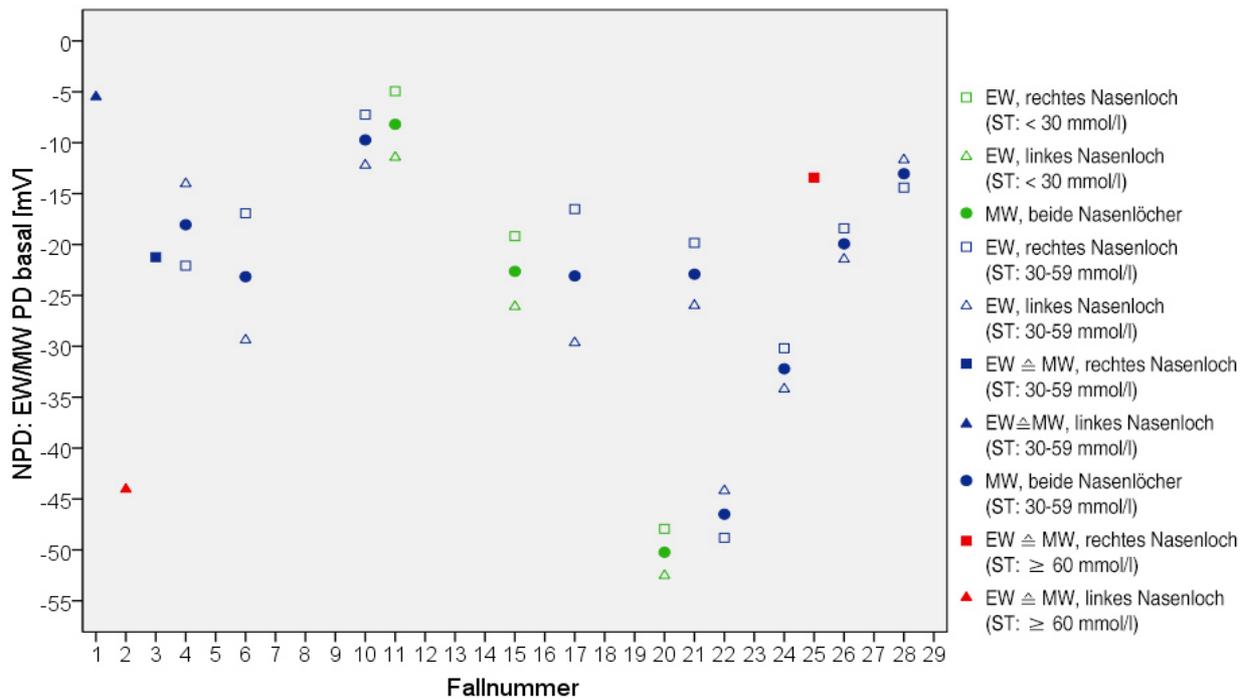


Abb. 4.2: NPD – PD basal: Einzel- und Mittelwerte.

Legende: EW: Einzelwerte, MW: Mittelwerte, PD basal: basale Potentialdifferenz, mV: Millivolt; Legende: ST: Schweißtest als Mittelwert des Schweißchlorids.

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14): - 14,55 mV, PS-CF (n = 11): - 45,95 mV, PI-CF (n = 26): - 47,82 mV.

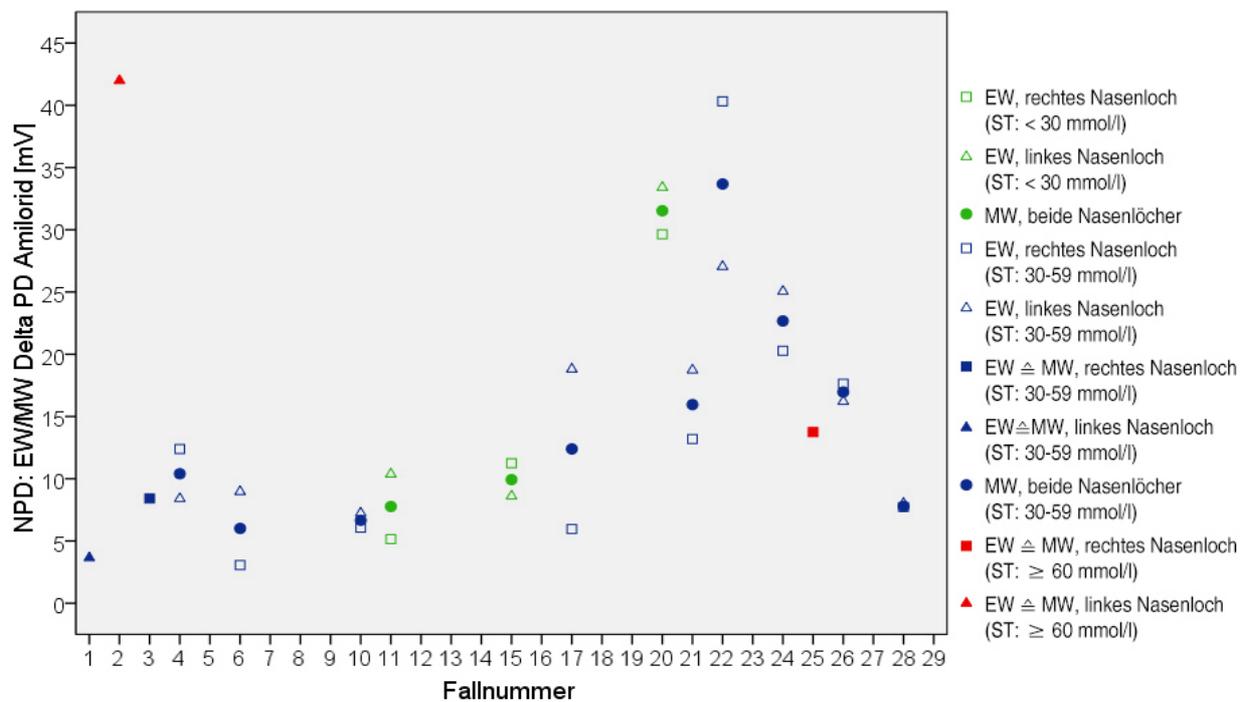


Abb. 4.3: NPD – Delta PD Amilorid: Einzel- und Mittelwerte.

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14): 7,55 mV, PS-CF (n = 11): 33,25 mV, PI-CF (n = 26): 29,62 mV.

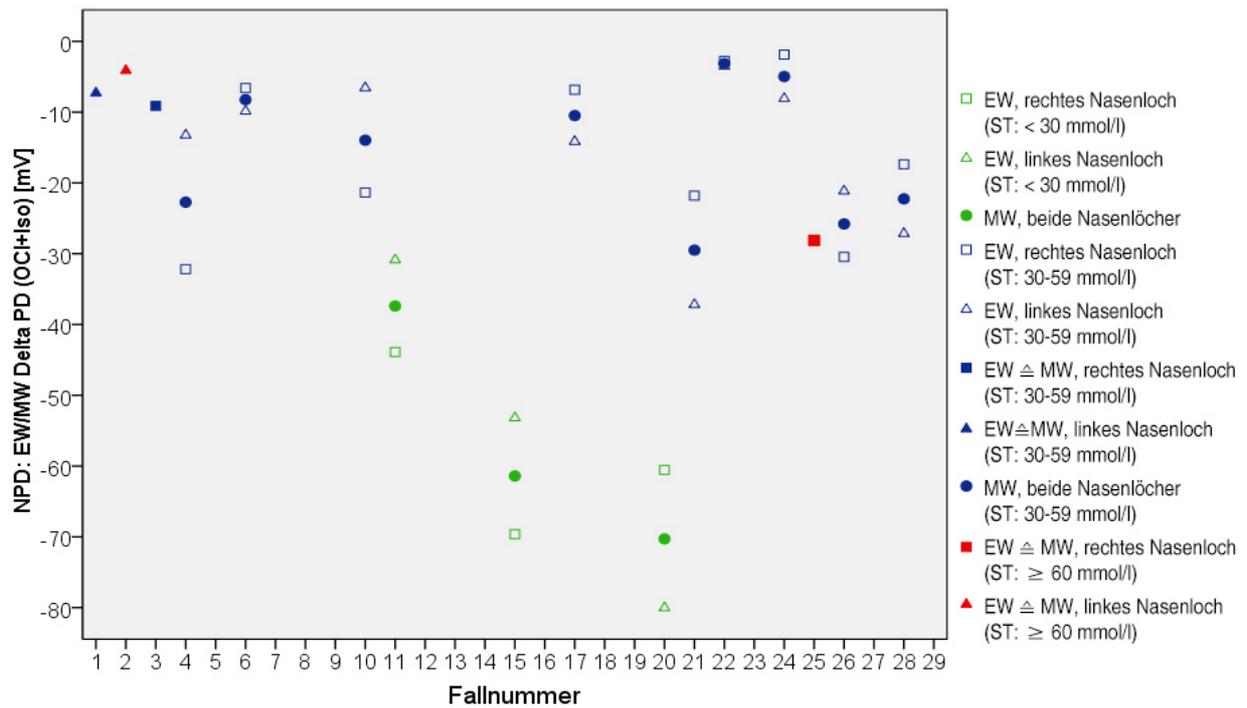


Abb. 4.4: NPD – Delta PD (OCI+Iso): Einzel- und Mittelwerte.

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14): - 14,71 mV, PS-CF (n = 11): - 10,07 mV, PI-CF (n = 26): - 3,87 mV.

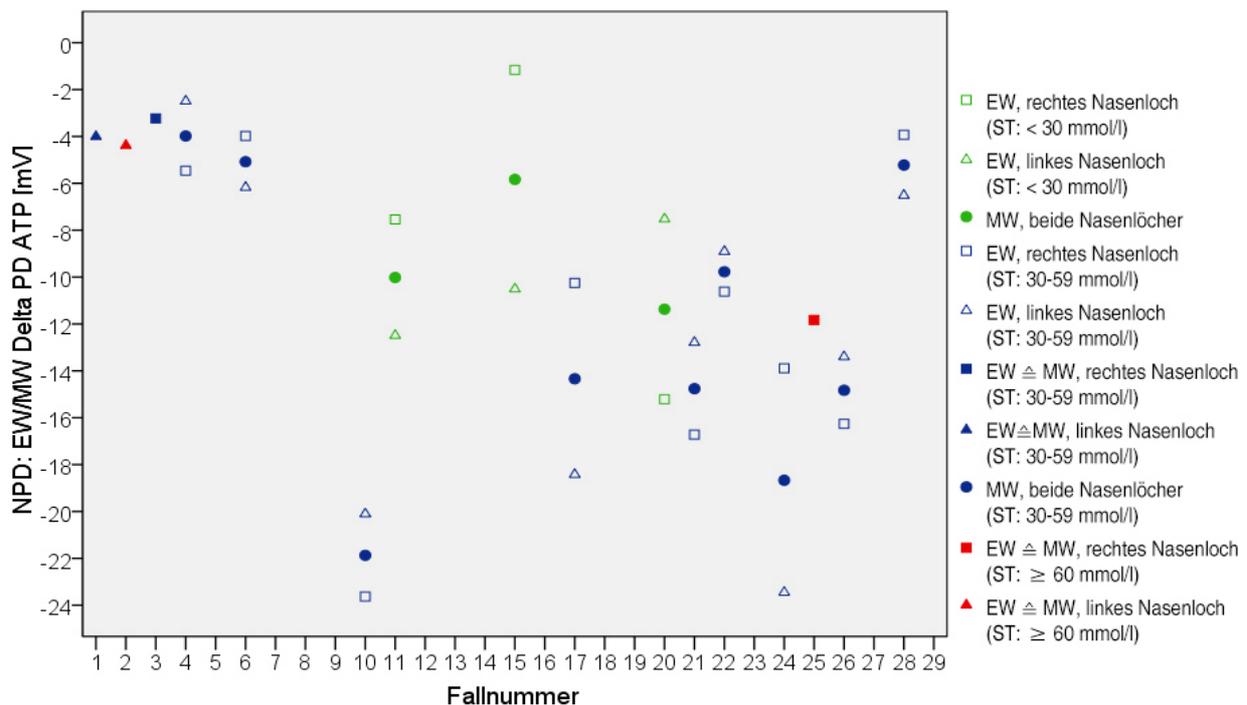


Abb. 4.5: NPD – Delta PD ATP: Einzel- und Mittelwerte.

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14): - 8,73 mV, PS-CF (n = 11): - 23,93 mV, PI-CF (n = 26): - 18,46 mV.

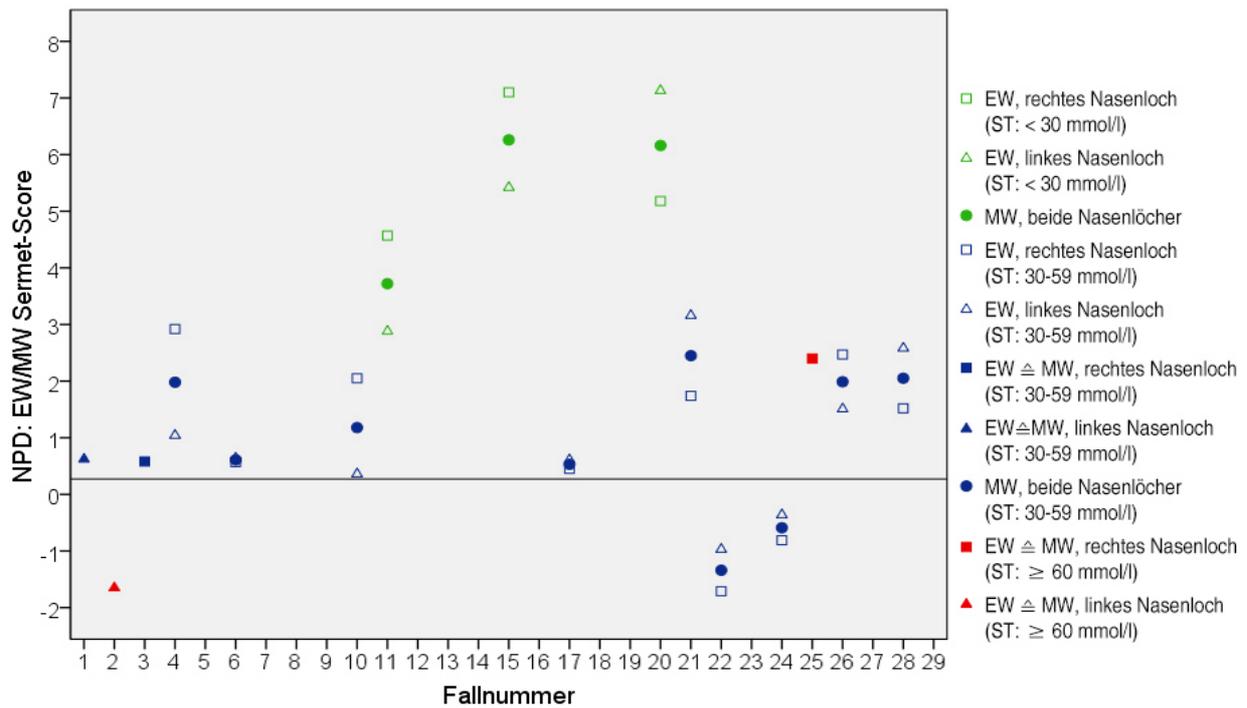


Abb. 4.6: NPDP – Sermet-Score: Einzel- und Mittelwerte.

Legende: horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte des Sermet-Scores nach Pinders-Kessler et al. 2013 (< 0,27: hinweisend auf eine CF).

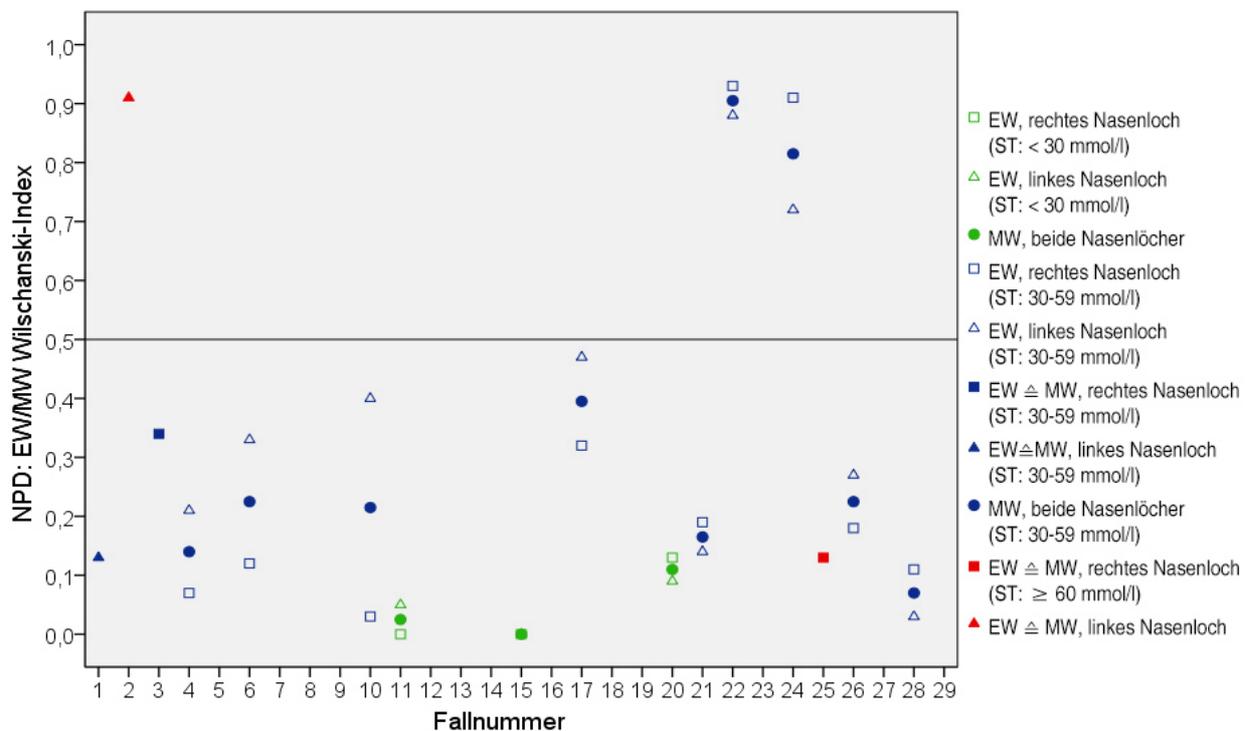


Abb. 4.7: NPDP – Wilschanski-Index: Einzel- und Mittelwerte.

Legende: horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte des Wilschanski-Indexes nach Pinders-Kessler et al. 2013 (> 0,5: hinweisend auf eine CF).

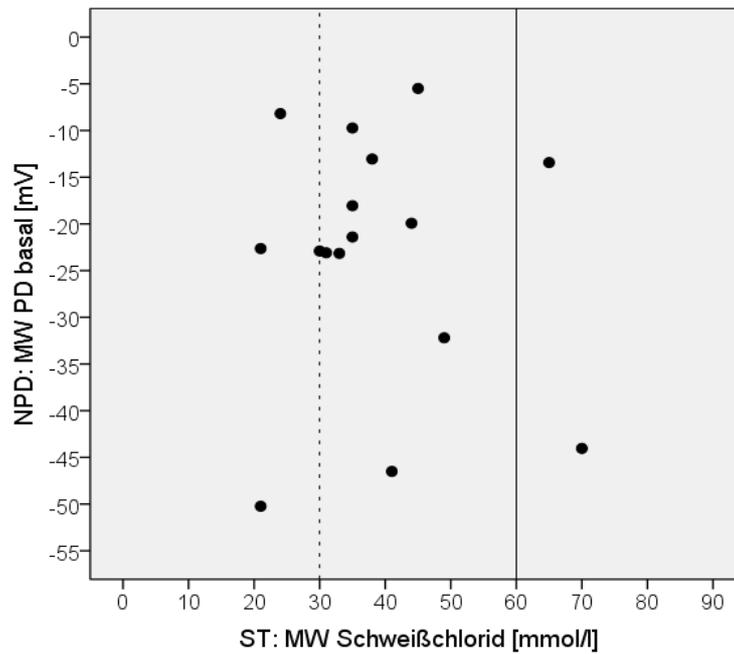


Abb. 4.8: NPD: Korrelation der Mittelwerte von PD basal und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1).

Anmerkung: Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation ( $r = 0,078$ ;  $p = 0,773$ ).

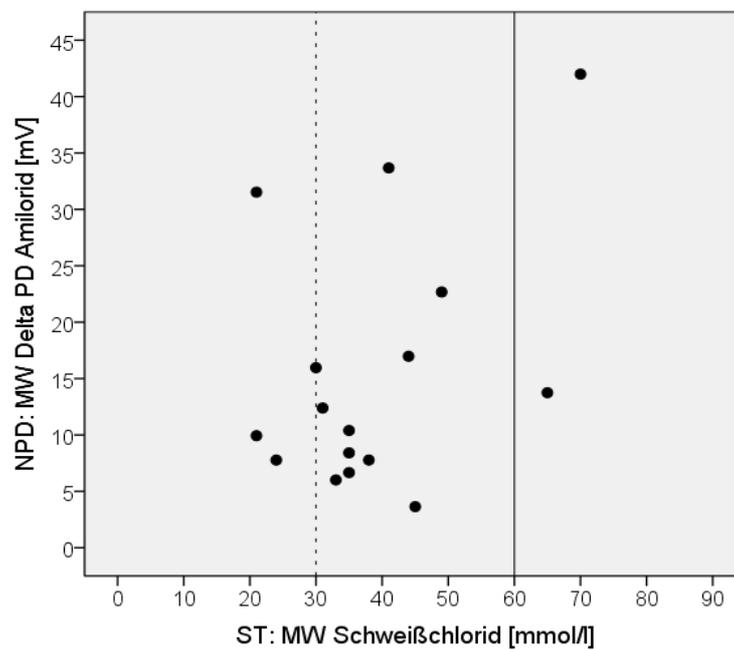


Abb. 4.9: NPD: Korrelation der Mittelwerte von Delta PD Amilorid und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1).

Anmerkung: Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation ( $r = 0,249$ ;  $p = 0,351$ ).

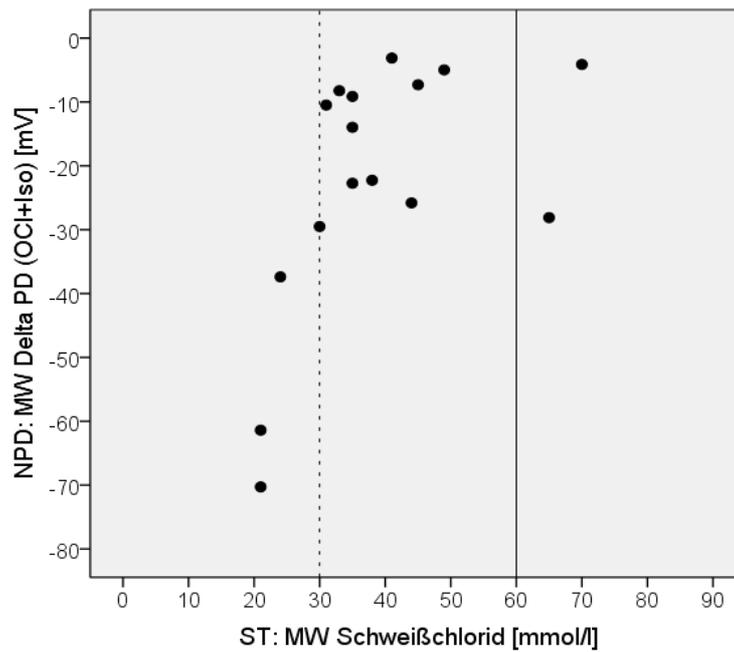


Abb. 4.10: NPD: Korrelation der Mittelwerte von Delta PD (OCI+Iso) und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1).

Anmerkung: Es besteht eine positive Korrelation von hoher Signifikanz ( $r = 0,648$ ;  $p = 0,007$ ).

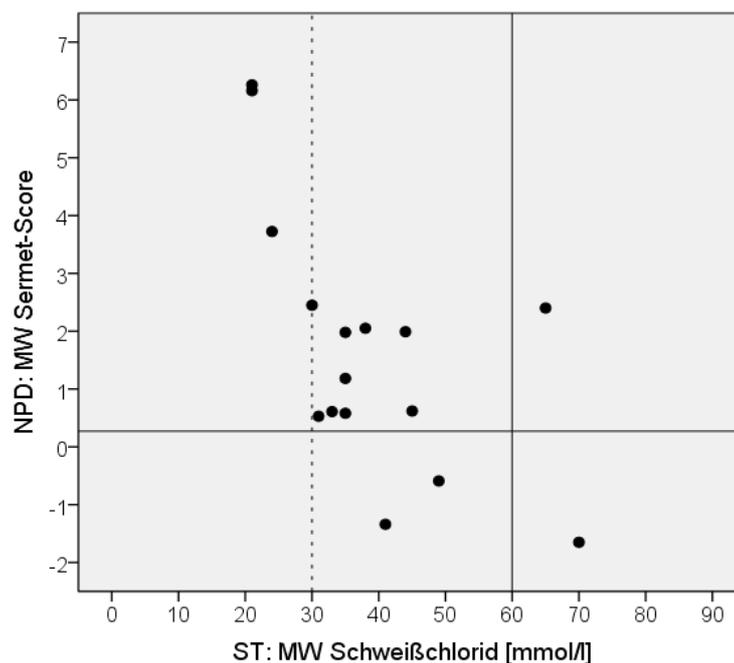


Abb. 4.11: NPD: Korrelation der Mittelwerte des Sermet-Scores und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1), horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte des Sermet-Scores nach Pinders-Kessler et al. 2013 ( $< 0,27$ : hinweisend auf eine CF).

Anmerkung: Es besteht eine signifikante negative Korrelation ( $r = - 0,598$ ;  $p = 0,014$ ).

Unter den 16 auswertbaren NPD-Messungen wiesen 81,3 % der Fälle (n = 13) Mittelwerte des Sermet-Scores über dem Cut-off-Wert von 0,27 auf. Hierunter lagen in 3 Fällen (ID 11, 15, 20) Schweißtestergebnisse im Normbereich, in 9 Fällen (ID 1, 3, 4, 6, 10, 17, 21, 26, 28) im Kontrollbereich und in einem Fall im CF-typischen Bereich (ID 25) vor. Bei 18,8 % der auswertbaren Messungen (n = 3) waren die Mittelwerte des Sermet-Scores unter dem Cut-off-Wert von 0,27 (hinweisend auf eine CF). Hierbei wiesen 2 Fälle (ID 22, 24) Schweißtestergebnisse im Kontrollbereich und ein Fall (ID 2) im CF-typischen Bereich auf (siehe auch Abb. 4.6 und Tab. 4.1).

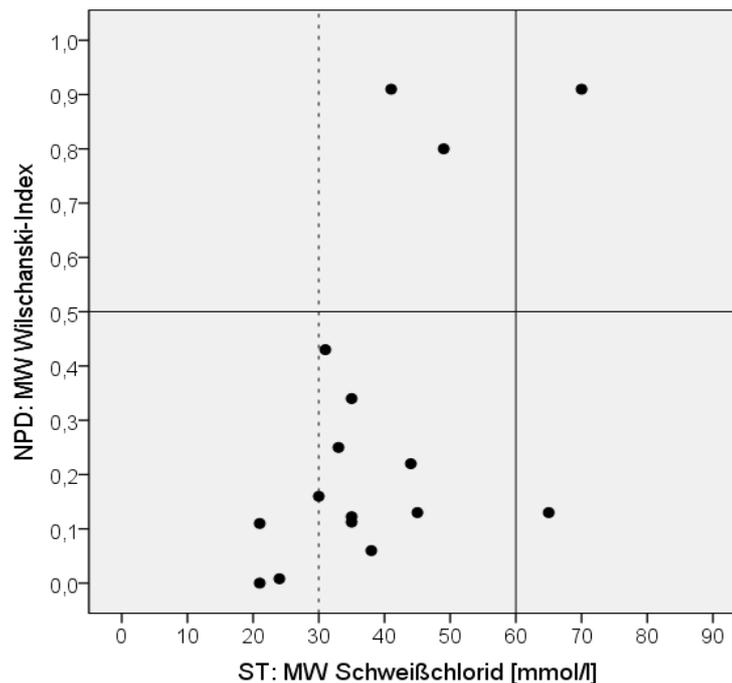


Abb. 4.12: NPD: Korrelation der Mittelwerte des Wilschanski-Index und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1), horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte des Wilschanski-Indexes nach Pinders-Kessler et al. 2013 (> 0,5: hinweisend auf eine CF).

Anmerkung: Es besteht eine signifikante positive Korrelation ( $r = 0,541$ ;  $p = 0,030$ ).

Die Mittelwerte des Wilschanski-Index lagen in 81,3 % der Fälle (n = 13) unterhalb des Cut-off-Wertes von 0,5. Hierunter zeigten sich bei 3 Patienten (ID 11, 15, 20) Schweißtestergebnisse im Normbereich, in 9 Fällen (ID 1, 3, 4, 6, 10, 17, 21, 26, 28) im Kontrollbereich und in einem Fall (ID 25) im CF-typischen Bereich. Bei 18,7 % der auswertbaren Messungen (n = 3) waren die Mittelwerte des Wilschanski-Index über dem Cut-off-Wert von 0,5 (hinweisend auf eine CF). Hierbei wiesen 3 Fälle (ID 17, 22, 24) mittlere Schweißchloridwerte im Kontrollbereich und ein Fall (ID 2) im CF-typischen Bereich auf (siehe auch Abb. 4.7 und Tab. 4.1).

#### 4.4 Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM)

Eine ICM erfolgte bei 97 % der Patienten (n = 28). Von insgesamt 120 entnommenen Gewebeproben waren 67,5 % (n = 81) auswertbar. In 7,1 % der Fälle (n = 2: ID 2, 3) wurden jeweils 8 Biopsien zur Messung herangezogen, wobei jeweils die Messungen von 7 Biopsien (ID 2) und von 5 Biopsien (ID 3) die geforderten Qualitätskriterien (siehe Kap. 3.7) erfüllten. Bei 92,9 % der Patienten (n = 26: ID 4-29) erfolgte die ICM an jeweils 4 Biopsien. Hierunter waren bei 15,4 % (n = 4: ID, 5, 8, 12, 28) die Messungen von 4 Biopsien, bei 50,0 % (n = 13: ID 6, 9, 13-18, 20-22, 24, 29) von 3 Biopsien, bei 23,1 % (n = 6: ID 7, 11, 19, 23, 26, 27) von 2 Biopsien, bei 7,7 % (n = 2: ID 10, 25) von einer Biopsie und bei 3,8 % der Patienten (n = 1: ID 4) von keiner Biopsie auswertbar. Der Grund für die fehlerhaften Messdaten in letzterem Fall (ID 4) waren Temperaturschwankungen der Pufferlösung in den Ussingkammern.

Die folgenden Abbildungen stellen die relevanten Messdaten aller auswertbaren ICM-Messungen der Patientenkohorte (n = 27) dar. Die Reihenfolge der abgebildeten Parameter richtet sich dabei nach dem zeitlichen Ablauf der Messung (PD basal, RT basal, Delta Isc Carbachol pre Washout, Delta Isc Amilorid, Delta Isc Forskolin/IBMX, Delta Isc Genistein, Delta Isc Carbachol, Delta Isc Histamin, RT final, Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin)), wobei der Parameter Delta Isc DIDS nicht aufgeführt ist, da dessen Auswertung keine diagnostische Relevanz hat (siehe Kap. 3.7).

Das Prinzip der Datendarstellung folgt dem aus Kapitel 4.3. Es wird für den jeweiligen Parameter zunächst ein Schaubild aller erhobenen Einzel- und Mittelwerte abgebildet (Abb. 4.13 bis Abb. 4.22). Des Weiteren sind für jeden Parameter die Gruppen-Mittelwerte der Studie von Pinders-Kessler et al. 2013 bei bereits bekannten Diagnosegruppen (Kontrollen, PS-CF und PI-CF) aufgeführt.

Im Folgenden sind Korrelationen der Mittelwerte von Schweißtest und des entsprechenden ICM-Parameters dargestellt, wobei jeweils der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) und der p-Wert (p) angegeben sind (Abb. 4.23 bis Abb. 4.33). Die Abbildung 4.33 am Ende des Kapitels zeigt die Korrelation der Mittelwerte des prädiagnostischen diagnostischen ICM-Parameters Delta Isc Carbachol pre Washout mit den Mittelwerten des diagnostischen ICM-Parameters Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin).

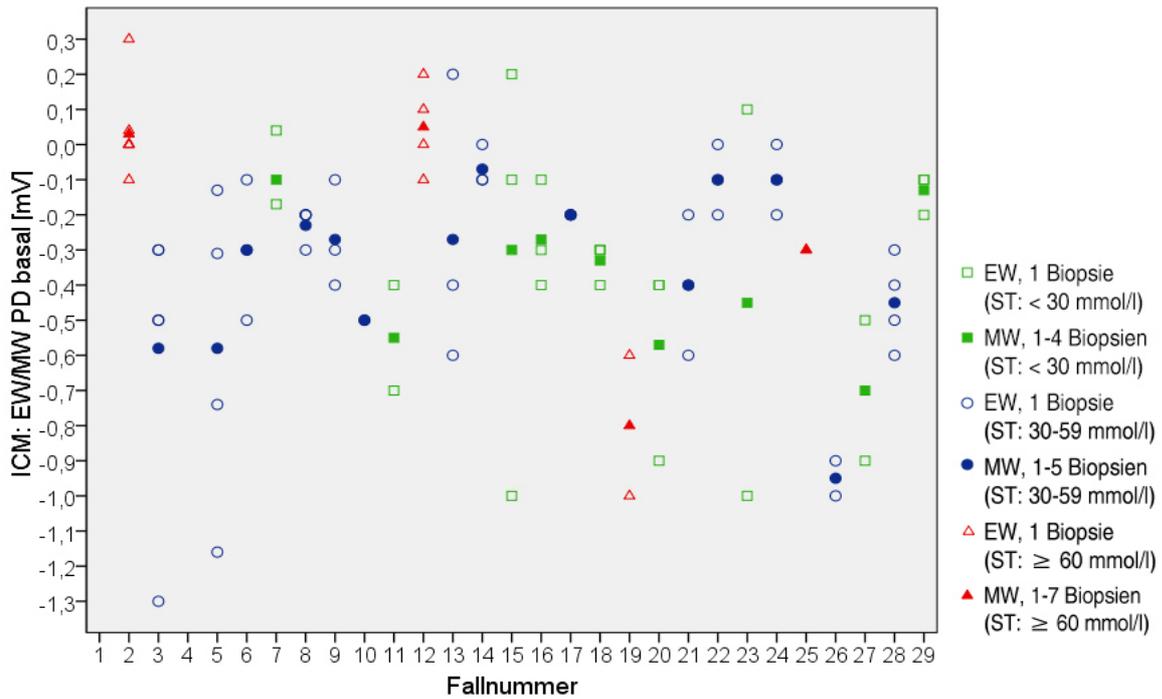


Abb. 4.13: ICM – PD basal: Einzel- und Mittelwerte.

Legende: EW: Einzelwerte, MW: Mittelwerte, PD basal: basale Potentialdifferenz, mV: Millivolt; Legende: ST: Schweißtest als Mittelwert des Schweißchlorids.

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14): - 0,4 mV, PS-CF (n = 11): - 0,1 mV, PI-CF (n = 26): 0,0 mV.

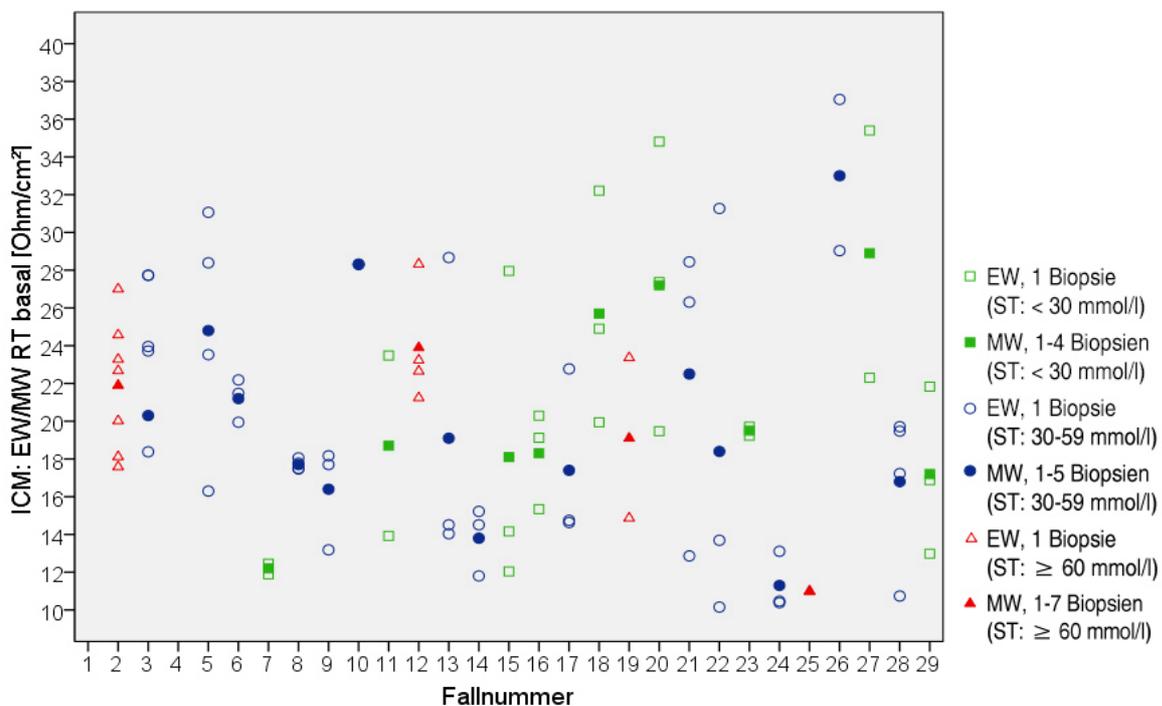


Abb. 4.14: ICM – RT basal: Einzel- und Mittelwerte.

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14): 20,7 Ohm/cm<sup>2</sup>, PS-CF (n = 11): 20,9 Ohm/cm<sup>2</sup>, PI-CF (n = 26): 20,4 Ohm/cm<sup>2</sup>.

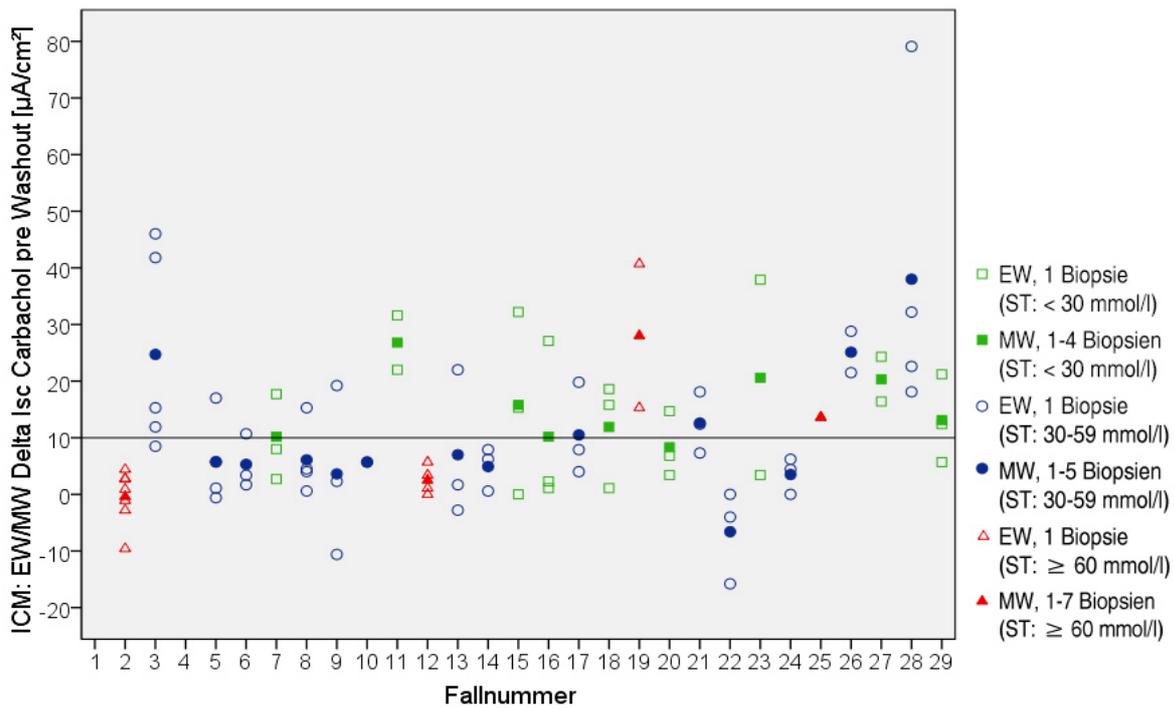


Abb. 4.15: ICM – Delta Isc Carbachol pre Washout: Einzel- und Mittelwerte.

Legende: horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte von Delta Isc Carbachol pre Washout nach Pinders-Kessler et al. 2013 ( $< 10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ : hinweisend auf eine CF).

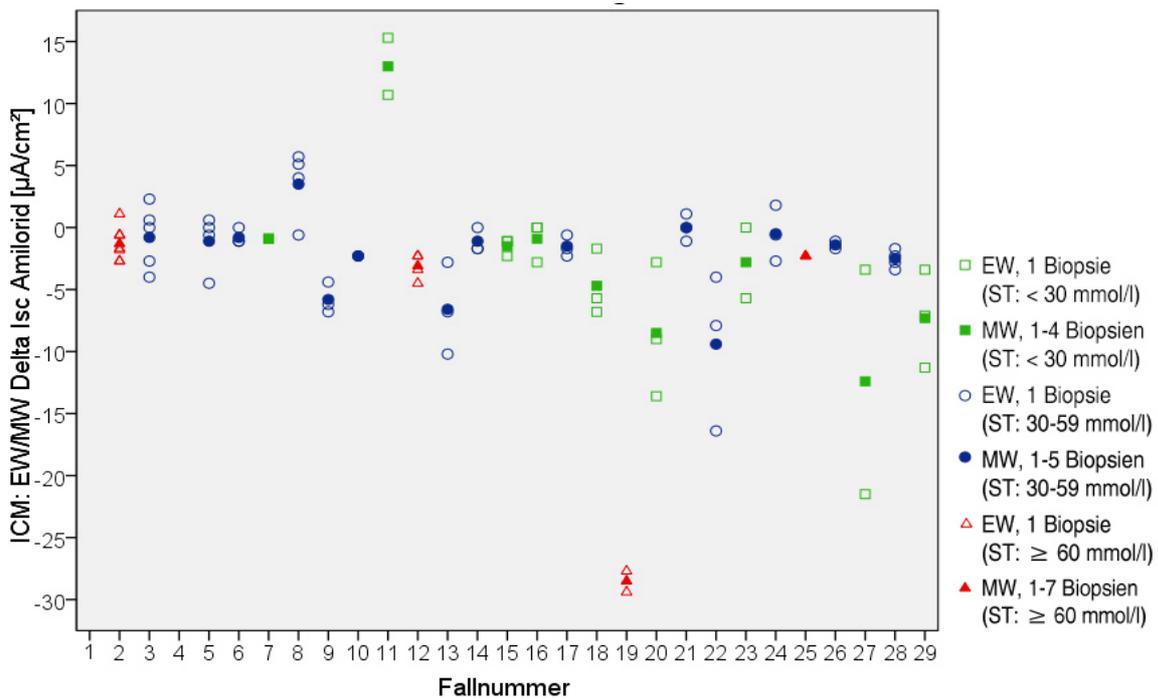


Abb. 4.16: ICM – Delta Isc Amilorid: Einzel- und Mittelwerte.

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14):  $- 2,5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , PS-CF (n = 11):  $- 3,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , PI-CF (n = 26):  $- 4,8 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

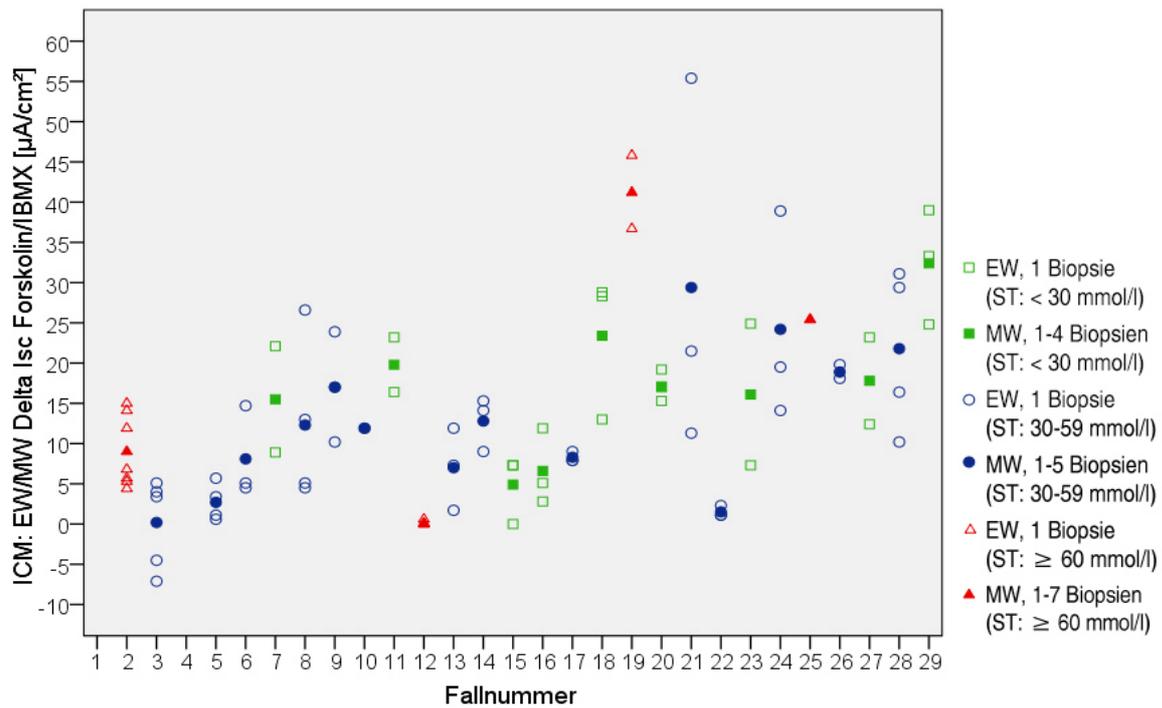


Abb. 4.17: ICM – Delta Isc Forskolin/IBMX: Einzel- und Mittelwerte.

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14): 24,7  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , PS-CF (n = 11): 3,8  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , PI-CF (n = 26): -1,3  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

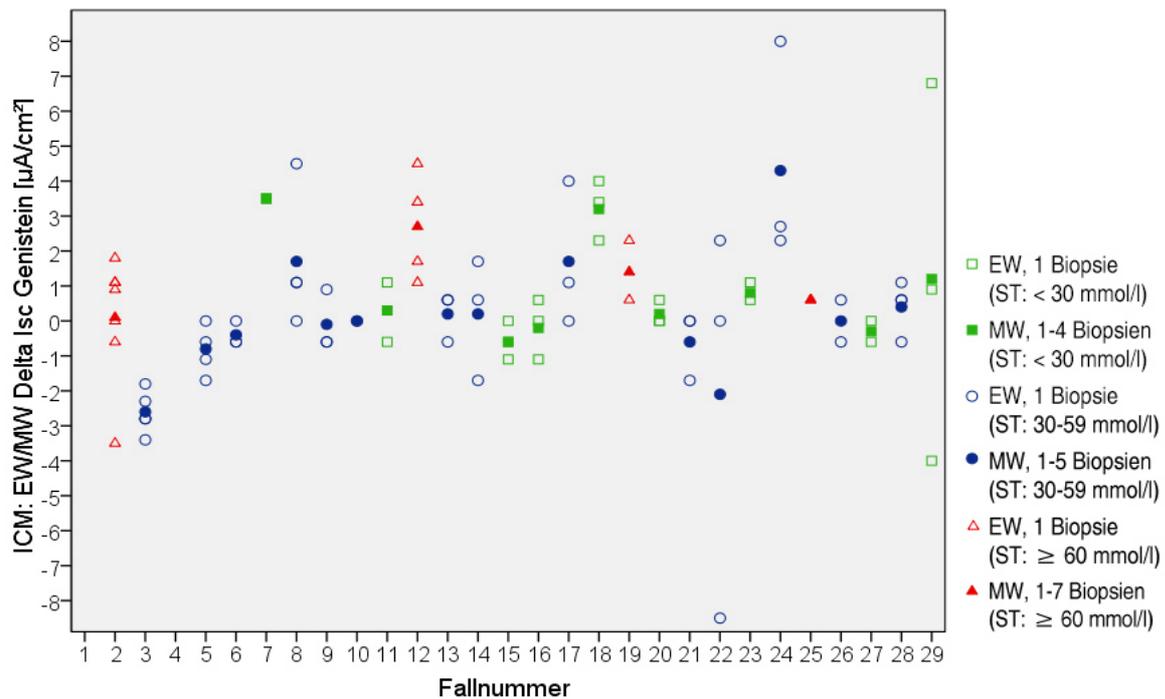


Abb. 4.18: ICM – Delta Isc Genistein: Einzel- und Mittelwerte.

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14): 1,2  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , PS-CF (n = 11): 0,7  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , PI-CF (n = 26): 1,0  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

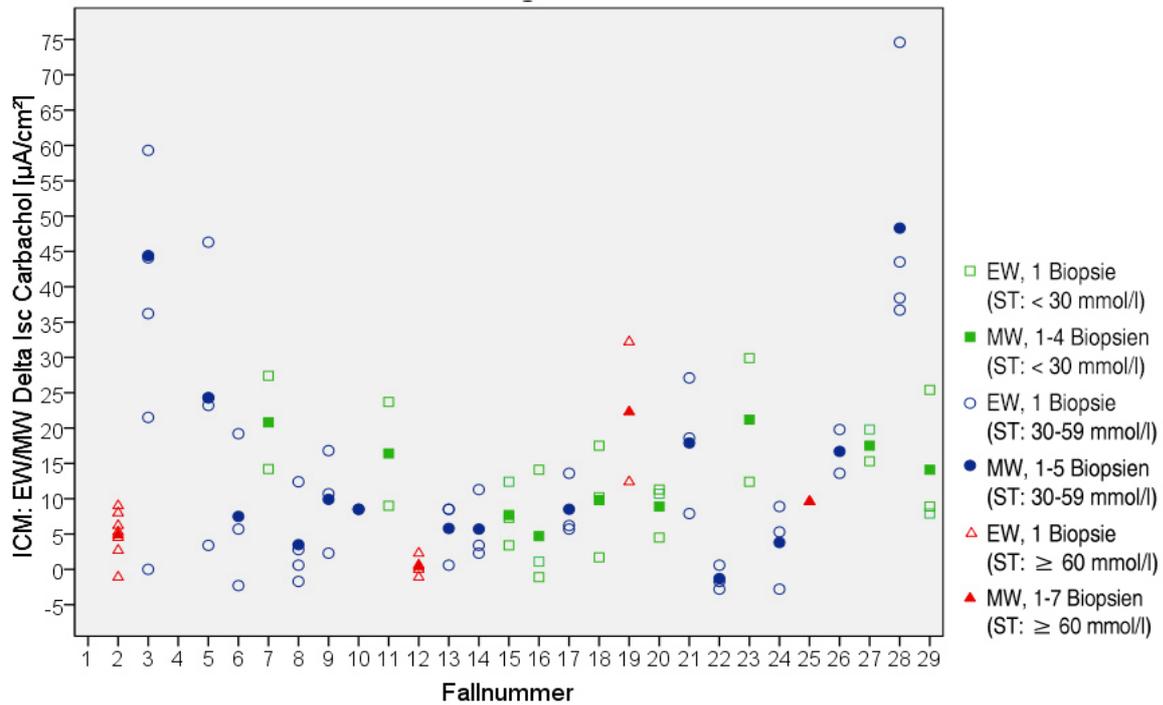


Abb. 4.19: ICM – Delta Isc Carbachol: Einzel- und Mittelwerte.

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14): 27,0  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , PS-CF (n = 11): 0,9  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , PI-CF (n = 26): - 0,3  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

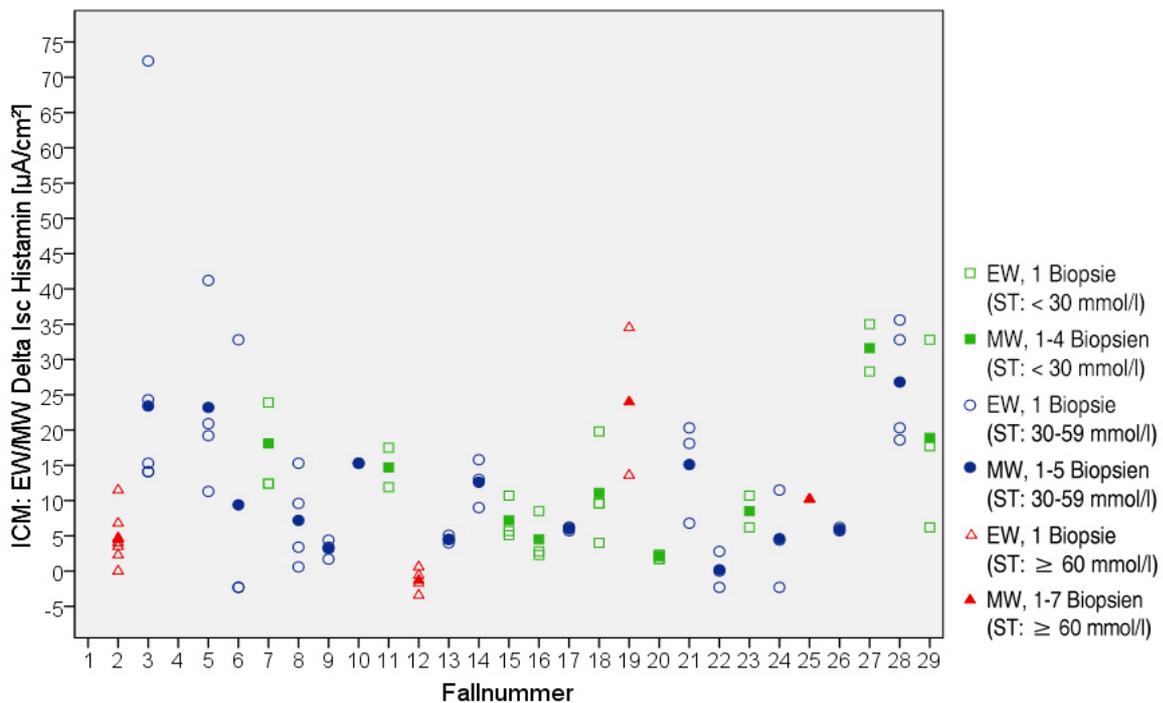


Abb. 4.20: ICM – Delta Isc Histamin: Einzel- und Mittelwerte.

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14): 36,6  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , PS-CF (n = 11): 1,1  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , PI-CF (n = 26): 1,8  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

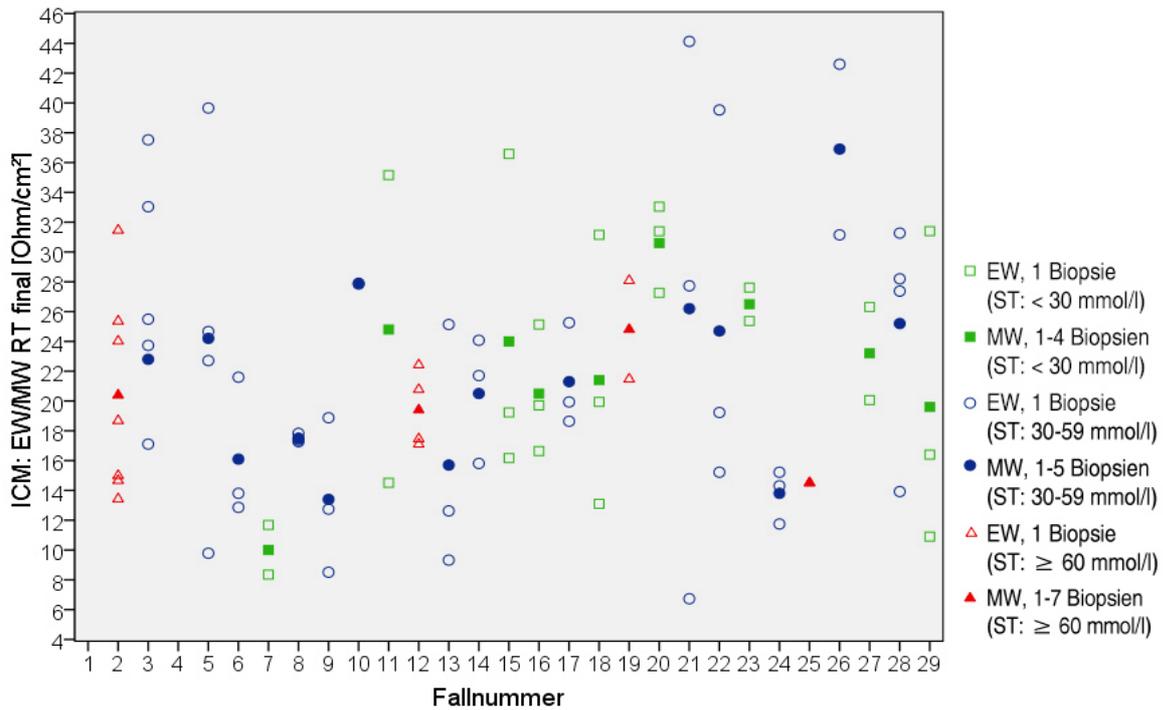


Abb. 4.21: ICM – RT final: Einzel- und Mittelwerte.

Anmerkungen: Gruppen-Mittelwerte nach Pinders-Kessler et al. 2013:

Kontrollen (n = 14): 19,3 Ohm/cm<sup>2</sup>, PS-CF (n = 11): 21,8 Ohm/cm<sup>2</sup>, PI-CF (n = 26): 18,6 Ohm/cm<sup>2</sup>.

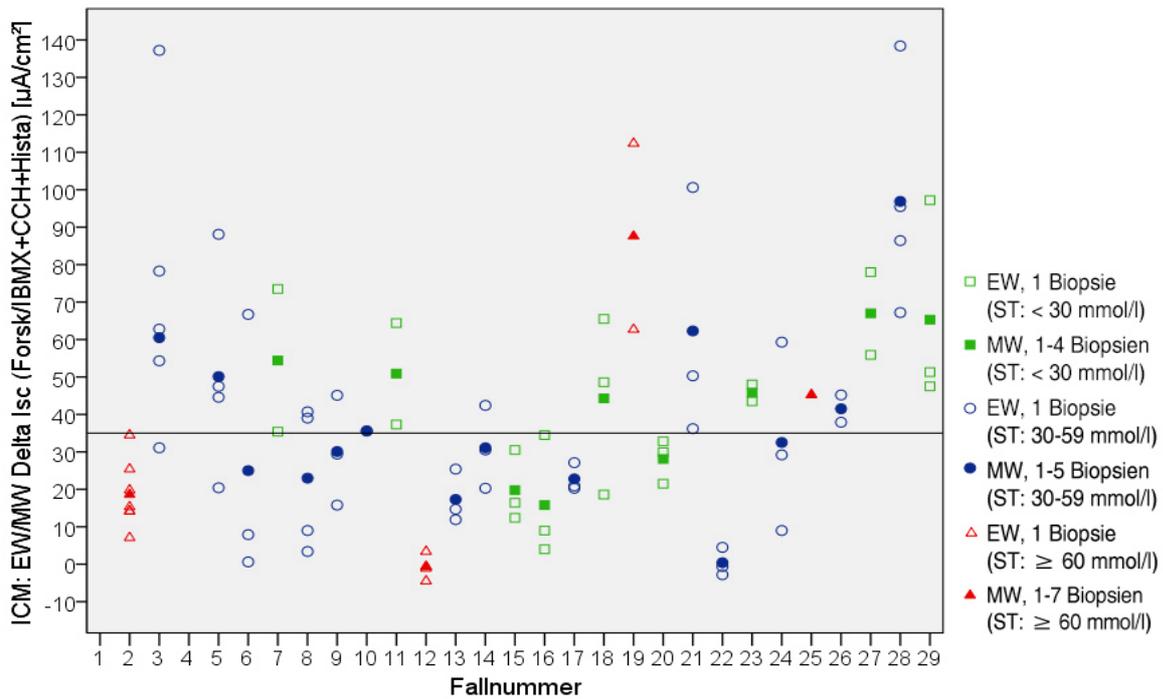


Abb. 4.22: ICM – Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin): Einzel- und Mittelwerte.

Legende: horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte von Delta Isc (Forsk/IBMX+CCH+Hista) nach Pinders-Kessler et al. 2013 (< 35 µA/cm<sup>2</sup>: hinweisend auf eine CF).

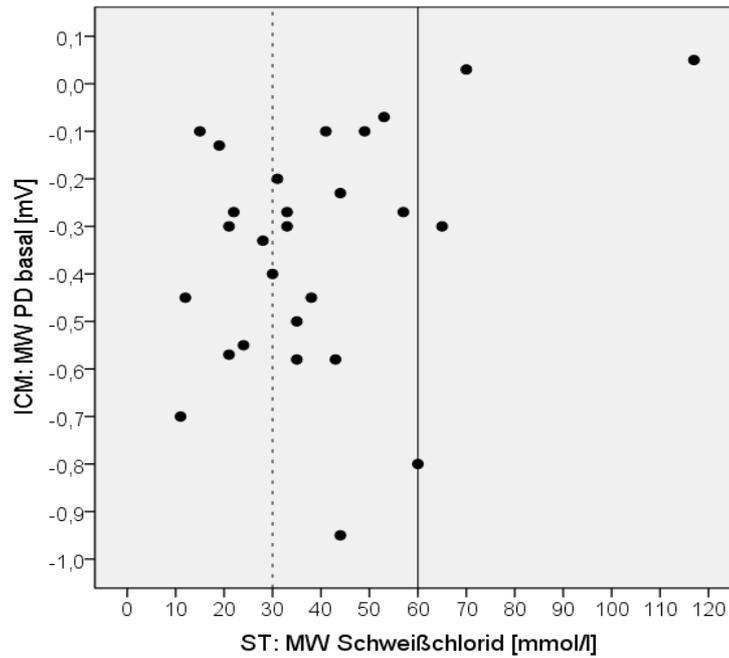


Abb. 4.23: ICM: Korrelation der Mittelwerte von PD basal und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1).

Anmerkung: Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation ( $r = 0,324$ ;  $p = 0,100$ ).

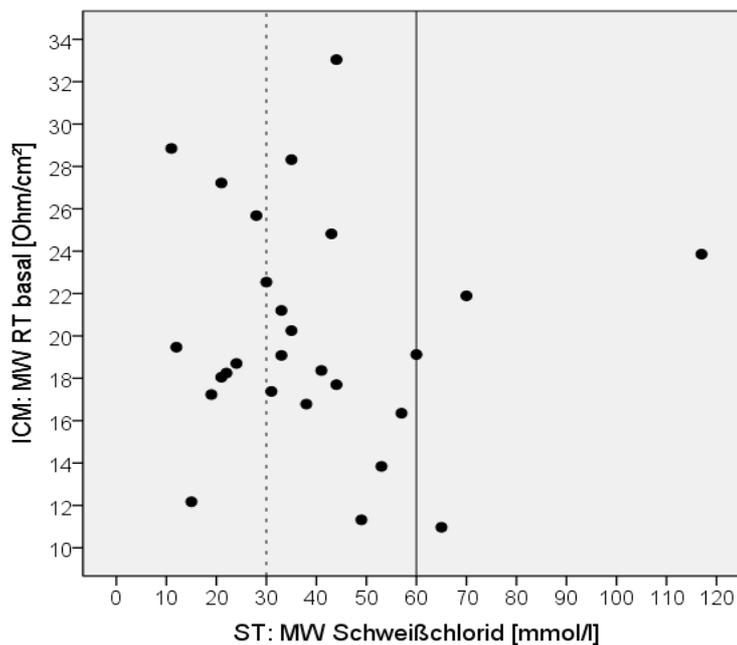


Abb. 4.24: ICM: Korrelation der Mittelwerte von RT basal und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1).

Anmerkung: Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation ( $r = -0,144$ ;  $p = 0,473$ ).

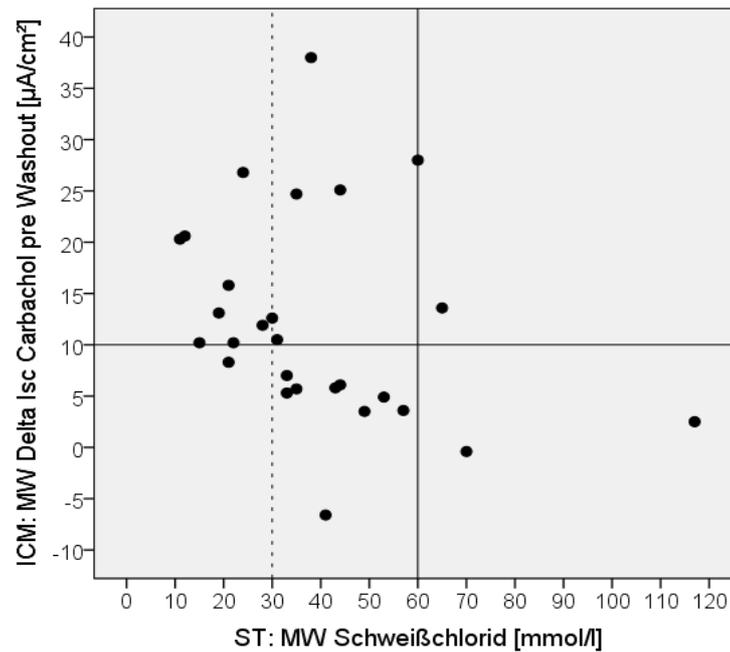


Abb. 4.25: ICM: Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc Carbachol pre Washout und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1), horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte von Delta Isc Carbachol pre Washout nach Pinders-Kessler et al. 2013 ( $< 10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ : hinweisend auf eine CF).

Anmerkung: Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation ( $r = -0,399$ ,  $p = 0,039$ ).

Unter den 27 auswertbaren ICM-Messungen wiesen 55,6 % der Fälle ( $n = 15$ ) Mittelwerte von Delta Isc Carbachol pre Washout über dem Cut-off-Wert von  $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf. Hierunter lagen bei 8 dieser Patienten (ID 7, 11, 15, 16, 18, 23, 27, 29) Schweißtestergebnisse im Normbereich, in 5 Fällen (ID 3, 15, 17, 26, 28) im Kontrollbereich und in 2 Fällen (ID 19, 25) im CF-typischen Bereich vor. Bei 44,4 % der auswertbaren Messungen ( $n = 12$ ) waren die Mittelwerte von Delta Isc Carbachol pre Washout unter dem Cut-off-Wert von  $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (hinweisend auf eine CF). Hierunter lagen in einem Fall (ID 20) Schweißtestergebnisse im Normbereich, in 9 Fällen (ID 5, 6, 8, 9, 10, 13, 14, 22, 24) im Kontrollbereich und in 2 Fällen (ID 2, 12) im CF-typischen Bereich vor (siehe auch Abb. 4.15 und Tab. 4.1).

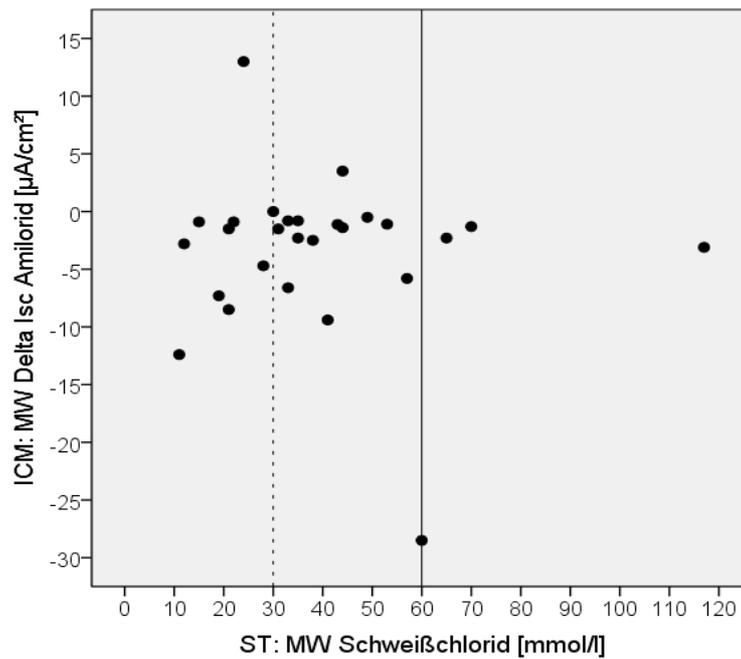


Abb. 4.26: ICM: Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc Amilorid und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1).

Anmerkung: Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation ( $r = 0,057$ ;  $p = 0,779$ ).

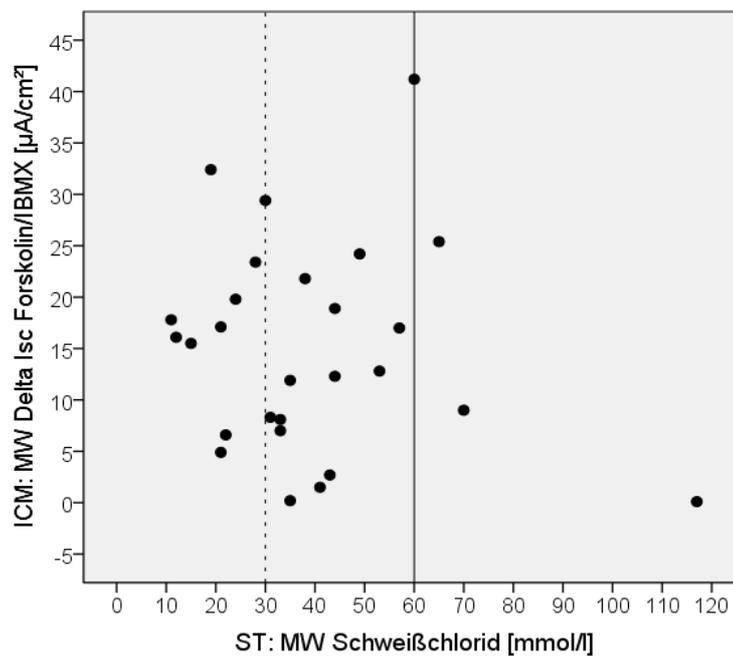


Abb. 4.27: ICM: Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc Forskolin/IBMX und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1).

Anmerkung: Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation ( $r = -0,071$ ;  $p = 0,724$ ).

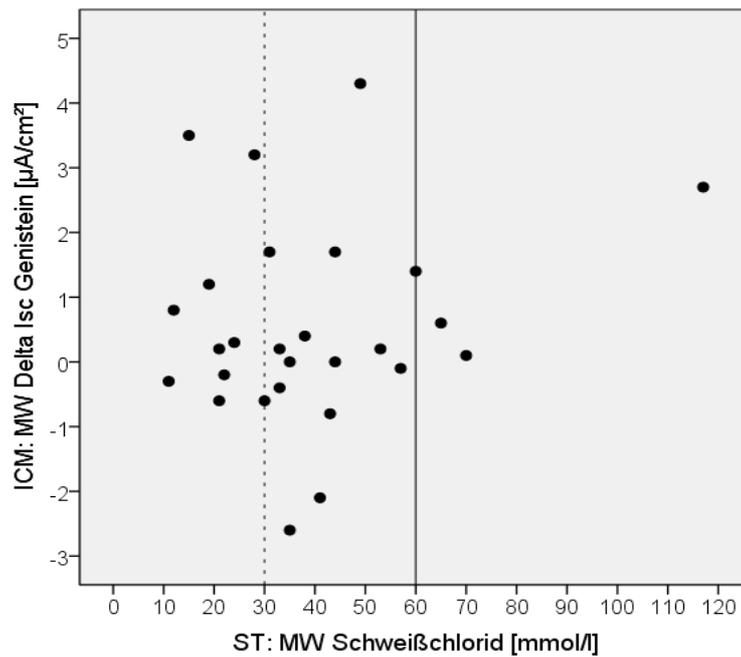


Abb. 4.28: ICM: Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc Genistein und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1).

Anmerkung: Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation ( $r = 0,080$ ;  $p = 0,692$ ).

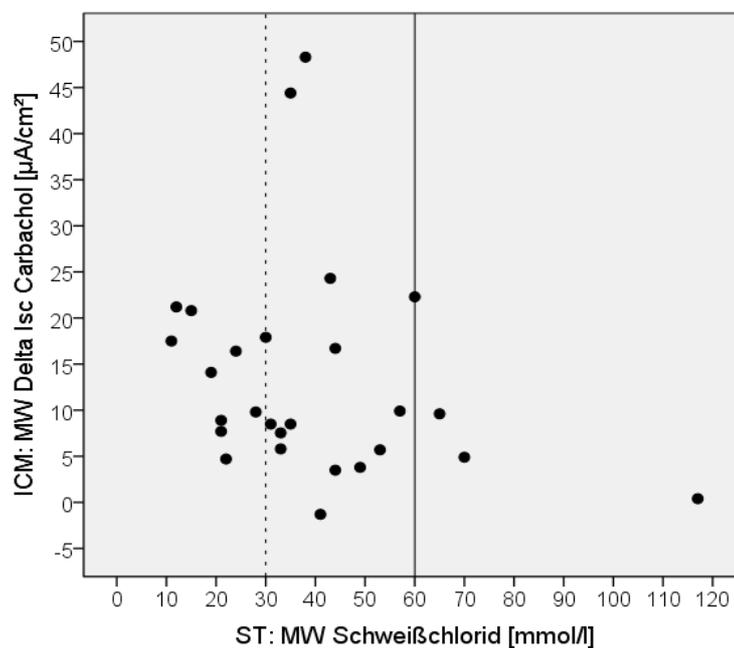


Abb. 4.29: ICM: Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc Carbachol und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1).

Anmerkung: Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation ( $r = -0,299$ ;  $p = 0,130$ ).

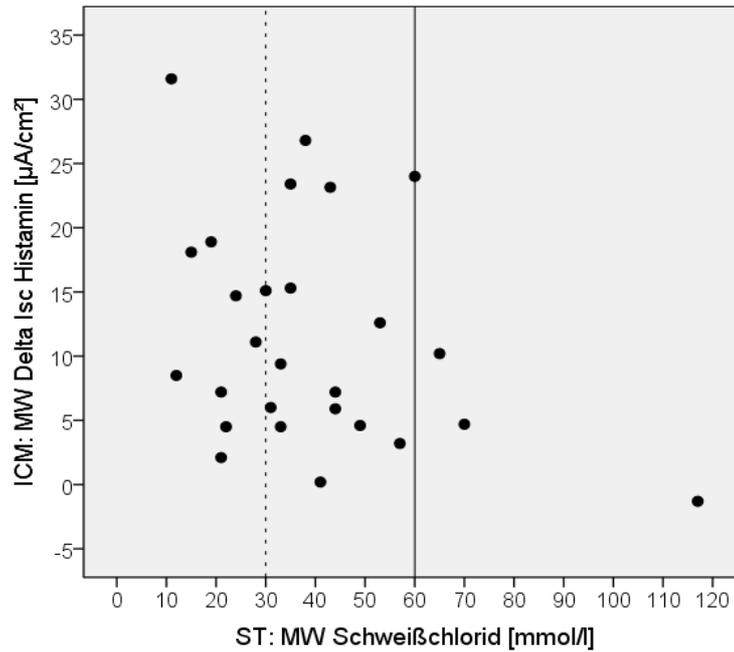


Abb. 4.30: ICM: Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc Histamin und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1).

Anmerkung: Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation ( $r = -0,253$ ;  $p = 0,204$ ).

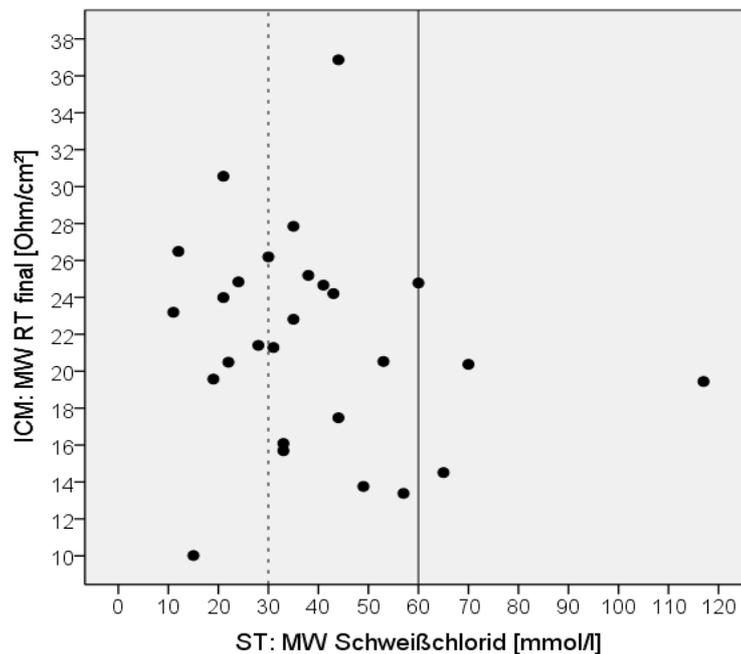


Abb. 4.31: ICM: Korrelation der Mittelwerte von RT final und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1).

Anmerkung: Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation ( $r = -0,244$ ;  $p = 0,219$ ).

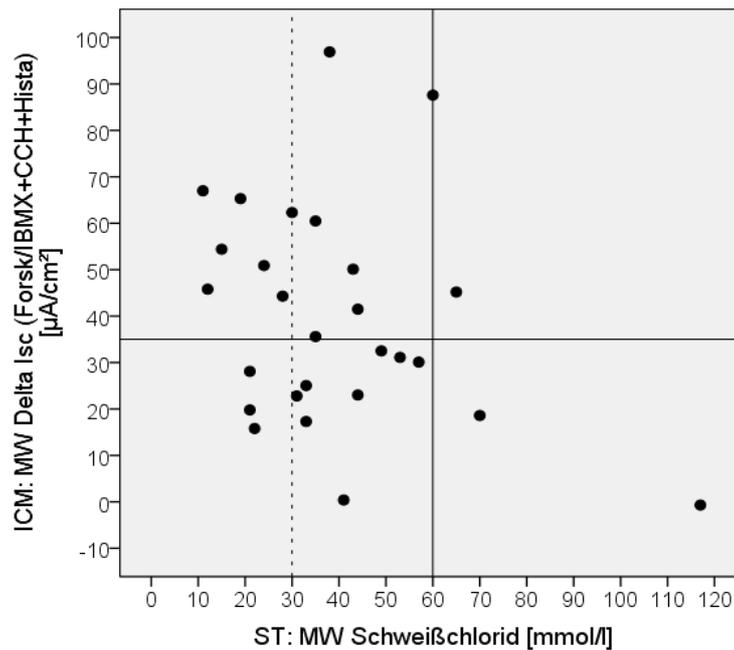


Abb. 4.32: ICM: Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) und des Schweißchlorids.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1), horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte von Delta Isc (Forsk/IBMX+CCH+Hista) nach Pinders-Kessler et al. 2013 ( $< 35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ : hinweisend auf eine CF).

Anmerkung: Es besteht keine statistisch signifikante Korrelation ( $r = -0,245$ ;  $p = 0,202$ ).

Unter den 27 auswertbaren ICM-Messungen wiesen 51,9 % der Fälle ( $n = 14$ ) Mittelwerte von Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) über dem Cut-off-Wert von  $35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf. Hierunter lagen bei 6 dieser Patienten (ID 7, 11, 18, 23, 27, 29) Schweißtestergebnisse im Normbereich, in weiteren 6 Fällen (ID 3, 5, 10, 21, 26, 28) im Kontrollbereich und in 2 Fällen (ID 19, 25) im CF-typischen Bereich vor. Bei 48,1 % der auswertbaren Messungen ( $n = 13$ ) waren die Mittelwerte von Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) unter dem Cut-off-Wert von  $35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  (hinweisend auf eine CF). Hierbei wiesen 3 Fälle (ID 15, 16, 20) Schweißtestergebnisse im Normbereich, 8 Fälle (ID 6, 8, 9, 13, 14, 17, 22, 24) im Kontrollbereich und 2 Fälle (ID 2, 12) im CF-typischen Bereich auf (siehe auch Abb. 4.22 und Tab. 4.1).

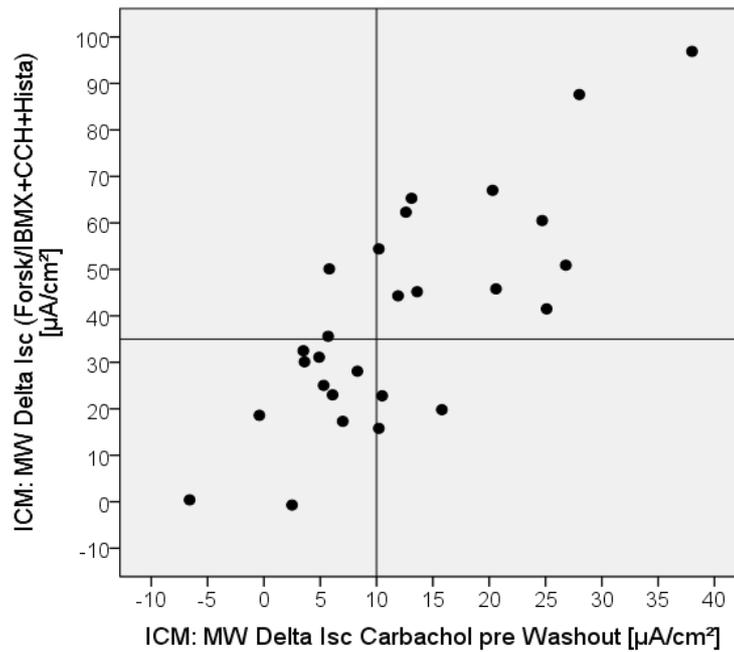


Abb. 4.33: ICM: Korrelation der Mittelwerte von Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) und Delta Isc Carbachol pre Washout.

Legende: vertikale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte von Delta Isc Carbachol pre Washout nach Pinders-Kessler et al. 2013 ( $< 10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ : hinweisend auf eine CF), horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte von Delta Isc (Forsk/IBMX+CCH+Hista) nach Pinders-Kessler et al. 2013 ( $< 35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ : hinweisend auf eine CF).

Anmerkung: Es besteht eine positive Korrelation von hoher Signifikanz ( $r = 0,693$ ;  $p = 0,000$ ).

## 4.5 Diagnostische Interpretation

Aufgrund diagnostisch nicht hinreichend wegweisender Vorbefunde (milde Klinik und/oder intermediäre Schweißtests und/oder unvollständige Gendiagnostik beziehungsweise fehlender Mutationsnachweis) wurde die Patientenkohorte einer weiterführenden diagnostischen Stratifizierung mittels eventueller Komplettierung der Gendiagnostik, erneutem Schweißtest sowie NPD und/oder ICM gemäß den multizentrisch validierten Standardprotokollen ECFS NPD SOP 2012 und ECFS ICM SOP 2011 unterzogen. Abschließend wurde jedem Patienten unter Berücksichtigung aller stattgehabten Diagnostik eine Diagnose zugewiesen (siehe Tab. 4.1). Die diagnostische Interpretation der NPD- und ICM-Parameter richtete sich hierbei nach unizentrisch ermittelten Referenzwerten (Derichs et al. 2010, Pinders-Kessler et al. 2013), welche Eingang in eine derzeitige multizentrische Validierung finden (siehe Kap. 3.6).

48,3 % aller Patienten (n = 14) erhielten die Diagnose Non-CF. Hierunter wiesen 6 Fälle (ID 7, 11, 18, 20, 23, 27) jeweils einen normwertigen Schweißtest, keinen oder nur einen Nachweis einer CF-verursachenden Mutation beziehungsweise einer Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen sowie eine unauffällige NPD und/oder ICM auf, wobei in einem dieser Fälle (ID 20) eine auffällige ICM bei normaler NPD vorlag. Bei einem Patienten (ID 29) zeigte sich ein normaler Schweißtest, eine CF-verursachende Mutation und eine Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen sowie eine normale ICM. Bei weiteren 5 Patienten (ID 1, 3, 5, 6, 17, 28) zeigten sich Schweißtests im Kontrollbereich, kein oder nur ein Nachweis einer CF-verursachenden Mutation beziehungsweise einer Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen sowie eine unauffällige NPD und/oder ICM, wobei in einem dieser Fälle eine auffällige ICM und ein normale NPD bei pulmonaler und gastrointestinaler Klinik aufgrund eines Immundefekts (ID 6) und in einem weiteren Fall eine auffällige ICM und einer normale NPD bei Verdacht auf Nahrungsmittelallergie mit vorwiegend gastrointestinaler Klinik (ID 17) vorlagen. Bei einem Patienten (ID 28) zeigte sich ein Schweißtest im Kontrollbereich, eine CF-verursachende Mutation und eine Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen sowie eine normale NPD und ICM (siehe Tab. 4.1).

3,4 % der Patienten (n = 1: ID 13) erhielten die Diagnose CFTR-Dysfunktion, da weder die Diagnosekriterien für ein CF noch für eine CFTR-RD erfüllt wurden, jedoch bei sinopulmonaler Klinik ein Schweißtest im Kontrollbereich, eine Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen und eine auffällige ICM vorlagen (siehe Tab. 3.1 und Tab. 4.1).

20,7 % der Patienten (n = 6) wurde die Diagnose CFTR-RD zugewiesen, wobei in 5 Fällen (ID 4, 14, 15, 19, 26) Bronchiektasen und in einem Fall (ID 10) eine chronische Pankreatitis das

klinische Bild prägten. In einem Fall (ID 15) zeigten sich ein normaler Schweißtest, kein Mutationsnachweis, eine normale NPD und eine auffällige ICM. Vier Patienten wiesen einen Schweißtest im Kontrollbereich auf, wobei in 3 dieser Fälle (ID 4, 10, 26) der Nachweis von 1-2 CF-verursachenden Mutationen oder 1-2 Mutationen mit unterschiedlichen klinischen Folgen erbracht wurde und eine normale NPD und/oder ICM vorlag und in einem Fall (ID 14) kein Mutationsnachweis und eine auffällige ICM vorlagen. Bei einer Patientin (ID 19) lagen ein Schweißtest im CF-typischen Bereich, kein Mutationsnachweis und eine normale ICM vor (siehe Tab. 3.1 und Tab. 4.1).

42,1 % der Fälle (n = 7) wurde die Diagnose PS-CF zugeordnet. Hierunter wies ein Patient (ID 16) einen Schweißtest im Normbereich bei einem Schweißtestvorbefund im CF-typischen Bereich, keinen Mutationsnachweis, jedoch eine auffällige ICM bei CF-typischer sinopulmonaler Erkrankung auf. Bei 4 Patienten (ID 8, 9, 22, 24) zeigten sich neben CF-typischer Klinik Schweißtestergebnisse im Kontrollbereich, der Nachweis von 1-2 CF-verursachenden Mutationen oder 1-2 Mutationen mit unterschiedlichen klinischen Folgen sowie eine auffällige NPD und/oder ICM, wobei in einem Fall (ID 9) eine Mutation nachgewiesen wurde, die zum Untersuchungszeitpunkt nicht in den Mutationsdatenbanken CFTR1 und CFTR2 beschrieben war, jedoch als CF-verursachend eingeordnet wurde. Bei 2 Patienten zeigten sich neben CF-typischen klinischem Bild Schweißtests im CF-typischen Bereich und der Nachweis von 1-2 CF-verursachenden Mutationen oder 1-2 Mutationen mit unterschiedlichen klinischen Folgen, wobei in einem dieser Fälle (ID 2) eine auffällige NPD und ICM und im anderen Fall (ID 25) eine unauffällige NPD und ICM vorlagen (siehe Tab. 3.1 und Tab. 4.1).

3,4 % der Patienten (n = 1: ID 12) erhielten die Diagnose PI-CF bei typischem klinischen Bild einer PI-CF, Schweißtest im CF-typischen Bereich, dem Nachweis einer CF-verursachenden Mutation und einer auffälligen ICM (siehe Tab. 3.1 und Tab. 4.1).

Bei 100 % der auswertbaren NPD-Messungen (n = 16) führte die Anwendung der diagnostischen Referenzwerte für den Sermet-Score und den Wilschanski-Index pro Patient jeweils zur gleichen diagnostischen Interpretation. Bezüglich der ICM-Parameter Delta CCH pre Washout und Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) zeigte sich die diagnostische Beurteilung in 81,5 % (n = 22: ID 2, 3, 6-9, 11-14, 18-29) der auswertbaren Messungen (n = 27) identisch und in 18,5 % der Fälle (n = 5: ID 5, 10, 15-17) unterschiedlich (siehe Tab. 4.1).

Die sich der folgenden Tabelle anschließenden Abbildungen setzen die den jeweiligen Patienten zugewiesenen Diagnosen in Bezug zu den diagnostischen Referenzwerten und erhobenen Messdaten von Schweißtest und NPD (Abb. 4.34 und Abb. 4.35) sowie Schweißtest und ICM (Abb. 4.36 und 4.37).

Tab. 4.1: Patientenkohorte – Gesamtbefunde und diagnostische Interpretation.

Fall	G	Alter [Jahre]	Ethnische Herkunft	CFTR-Genotyp [klinische Relevanz gemäß CFTR1 2014 u. CFTR2 2014]	Genetische CFTR-Diagnostik	ST ext.: Cl <sup>-</sup> NaCl [mmol/l]	ST: Cl <sup>-</sup> [mmol/l]	NPD: Wilschanski- Index (CF: > 0,5)	NPD: Sermet- Score (CF: < 0,27)	ICM: Delta Isc CCH p. W. [µA/cm <sup>2</sup> ] (CF: < 10)	ICM: Delta Isc (F/I+CCH+ Hista) [µA/cm <sup>2</sup> ] (CF: < 35)	Diagnose
27	m	1	BRD	F1052V/- [2]	Scr/Seq/MLPA	< 15	11			20,3 Non-CF	67,0 Non-CF	Non-CF
23	w	50	BRD	3601-65C>A/M470V [3/3]	Seq/MLPA	< 15	12	n.a.	n.a.	20,6 Non-CF	45,8 Non-CF	Non-CF
7	m	7	Italien	W1282X/R1162L [1/3]	Scr/Seq/MLPA	7	15			10,2 Non-CF	54,4 Non-CF	Non-CF
29	m	4	Türkei	D110H/5T(11TG) [1/2]	Scr/Seq/MLPA	37	19			13,1 Non-CF	65,3 Non-CF	Non-CF
20	w	13	BRD	-/-	Scr/Seq/MLPA	45	21	0,11 Non-CF	6,16 Non-CF	8,3 CF	28,1 CF	Non-CF
11	m	27	BRD	-/-	Scr/Seq/MLPA	32	24	0,03 Non-CF	3,72 Non-CF	26,8 Non-CF	50,9 Non-CF	Non-CF
18	w	4	BRD	-/-	Scr/Seq/MLPA	27	28			11,9 Non-CF	44,3 Non-CF	Non-CF
21	m	34	Türkei	621+3A>G/5T(12TG)-7T(12TG) [2/2]	Scr/Seq/MLPA		30	0,17 Non-CF	2,45 Non-CF	12,6 Non-CF	62,3 Non-CF	Non-CF
17	m	16	BRD	4374+13A>G/- [3]	Scr/Seq/MLPA	102	31	0,40 Non-CF	0,53 Non-CF	10,5 Non-CF	22,8 CF	Non-CF
6	m	10	Türkei	-/-	Seq/MLPA	20	33	0,23 Non-CF	0,61 Non-CF	5,3 CF	25,0 CF	Non-CF
3	m	33	BRD	5T(11TG)-7T(11TG)/M470V [2/3]	Scr/Seq/MLPA	39	35	0,34 Non-CF	0,58 Non-CF	24,7 Non-CF	60,5 Non-CF	Non-CF
28	w	56	BRD	1716G>A/- [3]	Scr/Seq/MLPA	38	38	0,07 Non-CF	2,05 Non-CF	38,0 Non-CF	96,9 Non-CF	Non-CF
5	m	5	BRD	M470V/- [3]	Scr/Seq/MLPA	36	43			5,8 CF	50,1 Non-CF	Non-CF
1	w	52	BRD	-/-	Scr/Seq/MLPA	120	45	0,13 Non-CF	0,62 Non-CF			Non-CF
13	w	5	BRD	5T(11TG)/- [2]	Scr/Seq/MLPA	44	33	n.a.	n.a.	7,0 CF	17,3 CF	CFTR-Dys.
15	m	50	BRD	-/-	Seq/MLPA	45	21	0,00 Non-CF	6,26 Non-CF	15,8 Non-CF	19,8 CF	CFTR-RD
10	m	51	BRD	F508del/5T(11TG)-9T(10TG) [1/2]	Scr/Seq/MLPA	39	35	0,22 Non-CF	1,18 Non-CF	5,7 CF	35,6 Non-CF	CFTR-RD
4	m	17	BRD	R74W/V855I [2/3]	Scr/Seq	35	n.a.	0,14 Non-CF	1,98 Non-CF	n.a.	n.a.	CFTR-RD
26	w	63	BRD	5T(12TG)/5T(12TG) [2/2]	Scr/Seq/MLPA	55	44	0,23 Non-CF	1,99 Non-CF	25,1 Non-CF	41,5 Non-CF	CFTR-RD
14	m	25	BRD	-/-	Scr/Seq/MLPA	53	n.a.	n.a.	n.a.	4,9 CF	31,1 CF	CFTR-RD
19	w	54	BRD	-/-	Scr/Seq/MLPA	40	60	n.a.	n.a.	28,0 Non-CF	87,6 Non-CF	CFTR-RD
16	m	5	BRD	-/-	Scr/Seq/MLPA	62	22			10,2 Non-CF	15,8 CF	PS-CF
22	m	26	BRD	1717-1G>A/- [1]	Seq/MLPA/Prom	78	41	0,91 CF	-1,34 CF	-6,6 CF	0,4 CF	PS-CF
8	m	3	Polen	F508del/R1162L [1/3]	Seq	39	44			6,1 CF	23,0 CF	PS-CF
24	w	21	BRD	F508del/5T(13TG)-9T(10TG) [1/2]	Scr/Seq/MLPA	95	49	0,82 CF	-0,59 CF	3,5 CF	32,5 CF	PS-CF
9	m	5	Irland	1625_1639del/1716G>A [0/3]	Seq/MLPA	44	57			3,6 CF	30,1 CF	PS-CF
25	m	25	BRD	5T(12TG)/N1303I [2/2]	Scr/Seq/MLPA	64	65	0,13 Non-CF	2,40 Non-CF	13,6 Non-CF	45,2 Non-CF	PS-CF
2	w	11	BRD	3849+10kbC>T/R668C [1/3]	Scr/Seq	79	70	0,91 CF	-1,65 CF	-0,4 CF	18,6 CF	PS-CF
12	w	2	Libyen	CFTR dele2,3/- [1]	Scr/Seq/MLPA	117	n.a.			2,5 CF	-0,7 CF	PI-CF

**Legende:** G: Geschlecht, m: männlich, w: weiblich; CFTR-Genotyp: -/- : kein Mutationsnachweis, [klinische Relevanz gemäß CFTR1 2014 u. CFTR2 2014]: 0: nicht beschrieben, 1: CF-verursachend, 2: unterschiedliche klinische Folgen, 3: nicht CF-verursachend; Scr: Screening, Seq: Sequenzierung, MLPA: multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation, Prom: Mutationsanalyse der CFTR-Promotor-Region; ST ext.: Cl<sup>-</sup>, NaCl: Externer Schweißtestvorbefund als Schweißchloridmittelwert oder Mittelwert der NaCl-Leitfähigkeit [mmol/l]; NPD: Wilschanski-Index: e<sup>Delta PD Amilorid/Delta PD (OCI+Iso)</sup>, **hinweisend auf CF: > 0,5**; NPD: Sermet-Score: - 0,11 x Delta PD Amilorid - 0,05 x Delta PD (OCI+Iso), **hinweisend auf CF: < 0,27**; ICM: Delta Isc CCH p.W.: Delta Isc Carbachol pre Washout [µA/cm<sup>2</sup>]: **hinweisend auf CF: < 10**; ICM: Delta Isc (F/I+CCH+Hista): Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) [µA/cm<sup>2</sup>], **hinweisend auf CF: < 35**; Non-CF: Nicht-CF, CFTR-Dys.: CFTR-Dysfunktion, CFTR-RD: CFTR-related disorder, PS-CF: pankreassuffiziente CF, PI-CF: pankreasinsuffiziente CF; n.a.: Messung nicht auswertbar; leeres Feld: Messung nicht erfolgt.

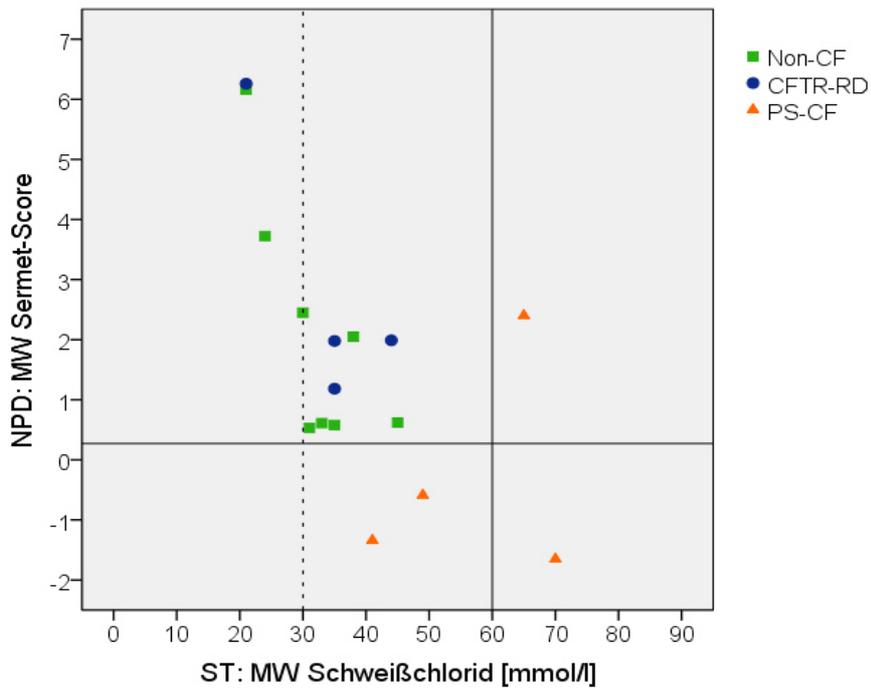


Abb. 4.34: NPD: Sermet-Score und Diagnosen.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1), horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte des Sermet-Scores nach Pinders-Kessler et al. 2013 (< 0,27: hinweisend auf eine CF).

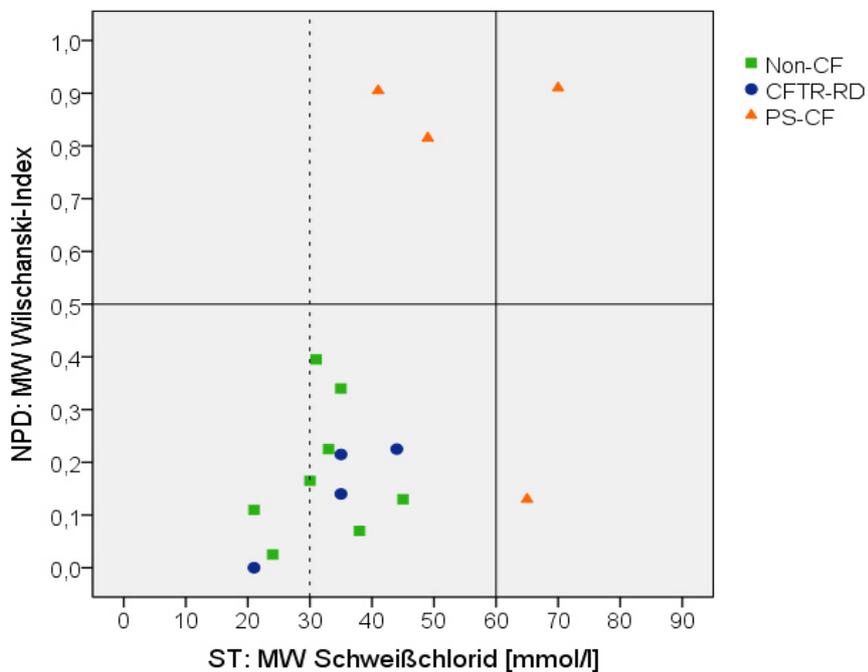


Abb. 4.35: NPD: Wilschanski-Index und Diagnosen.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1), horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte des Wilschanski-Indexes nach Pinders-Kessler et al. 2013 (> 0,5: hinweisend auf eine CF).

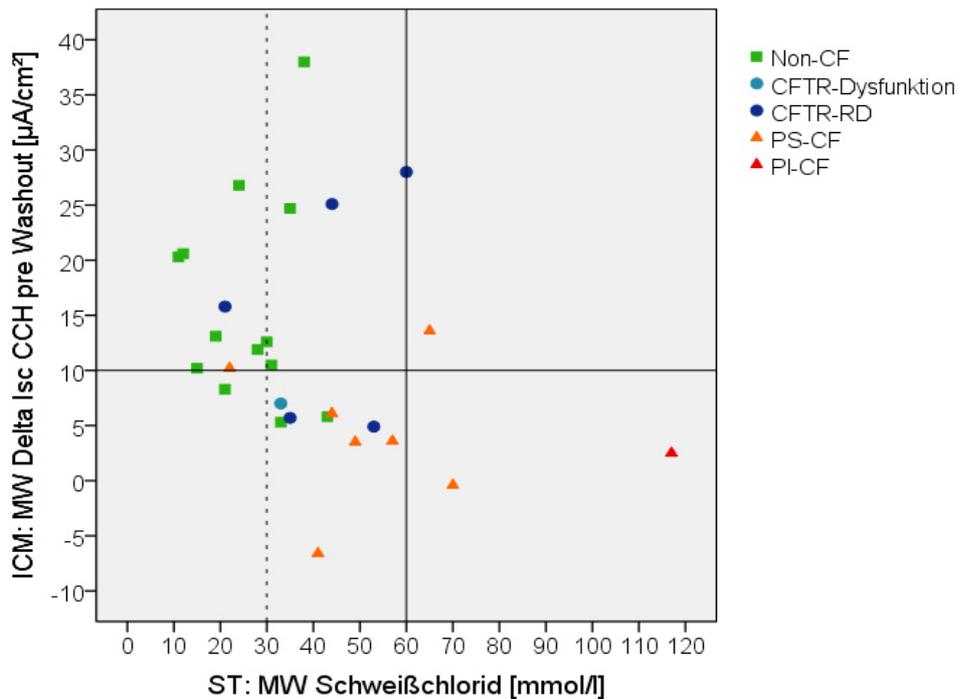


Abb. 4.36: ICM: Delta Isc Carbachol pre Washout und Diagnosen.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1), horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte von Delta Isc Carbachol pre Washout nach Pinders-Kessler et al. 2013 ( $< 10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ : hinweisend auf eine CF).

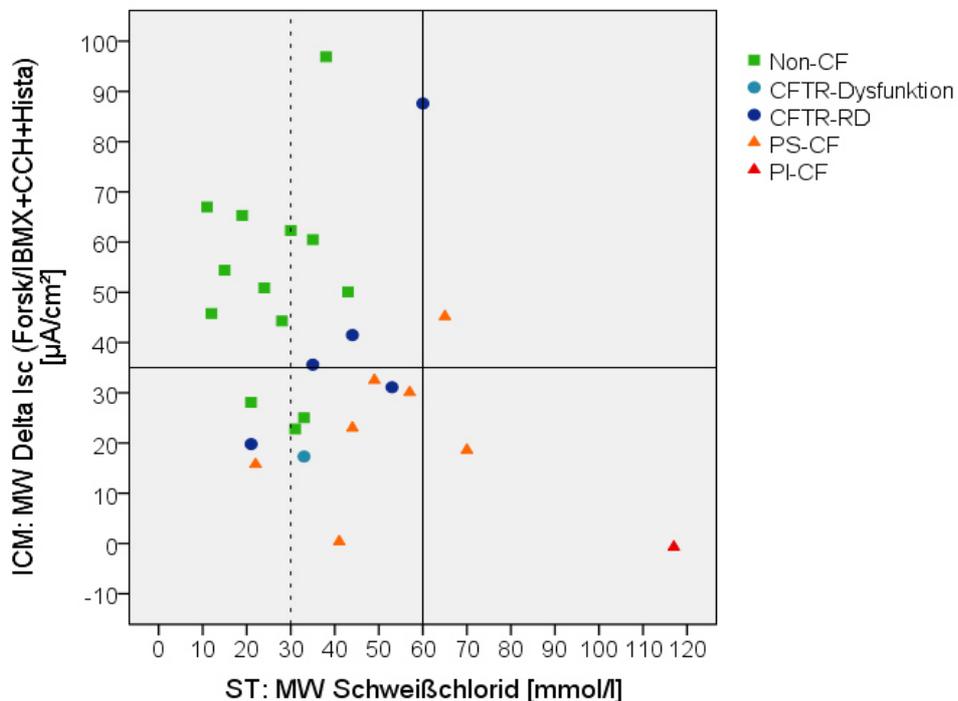


Abb. 4.37: ICM: Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) und Diagnosen.

Legende: vertikale Linien: Cut-off-Werte für Schweißchloridmittelwerte (siehe Legende Abb. 4.1), horizontale Linie: Cut-off-Wert für Mittelwerte von Delta Isc (Forsk/IBMX+CCH+Hista) nach Pinders-Kessler et al. 2013 ( $< 35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ : hinweisend auf eine CF).

## 5 Diskussion

### 5.1 Schweißtest

In der untersuchten Patientenkohorte lagen in 48,3 % der Fälle (n = 14) Schweißtestvorbefund und erneuter Schweißtestbefund jeweils im gleichen Bereich, also wiederholt unauffällig (Schweißchloridmittelwert < 30 mmol/l), kontrollbedürftig (Schweißchloridmittelwert 30-59 mmol/l) oder hinweisend auf eine CF (Schweißchloridmittelwert  $\geq$  60 mmol/l). Bei den übrigen 51,3 % der Patienten (n = 15) zeigten sich in 6 Fällen jeweils ein normaler und ein kontrollbedürftiger, in 5 Fällen jeweils ein kontrollbedürftiger und ein CF-typischer und in 4 Fällen jeweils nur ein auswertbarer Schweißtestbefund (siehe Kap. 4.5, Tab. 4.1).

### 5.2 Molekulargenetik

Zwei Patienten der Kohorte wiesen einen Genotyp mit der Mutation R1162L auf. In einem Fall lag die Mutation heterozygot mit der Klasse-II-Mutation W1282X auf dem zweiten Allel (ID 7) und in einem weiteren Fall heterozygot in Kombination mit der Klasse-II-Mutation F508del vor (ID 8). Die Mutation R1162L wurde in der CFTR-Mutationsdatenbank CFTR2 zum Untersuchungszeitpunkt als nicht CF-verursachend beschrieben, führte jedoch bei den zwei Patienten der Kohorte zu unterschiedlichen ICM-Befunden und daraus folgenden Diagnosen. Bei dem Patienten mit dem Genotyp W1282X/R1162L (ID 7) lag neben einem unauffälligen Schweißchloridwert von 15 mmol/l und rezidivierenden Bronchopneumonien eine ICM mit einem Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) deutlich über dem Cut-off-Wert von 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (54,4  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), was zur Stellung der Diagnose Non-CF führte. Der Patient mit dem Genotyp F508del/R1162L (ID 8) wies bei einem Schweißchloridwert im Graubereich von 44 mmol/l und rezidivierenden Bronchopneumonien eine ICM mit einem Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) deutlich unter dem Cut-off-Wert von 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (23,0  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) auf, woraufhin ihm die Diagnose PS-CF zugewiesen wurde (siehe Kap. 4.5, Tab. 4.1). Diese Fallbeispiele gaben Anlass zu der Empfehlung, die Mutation R1162L in der entsprechenden Mutationsdatenbank zukünftig als eine Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen zu charakterisieren.

Ein weiterer bemerkenswerter Genotyp zeigte sich in Form der heterozygot vorliegenden CFTR-Mutation 1625\_1639del, welche zum Untersuchungszeitpunkt in keiner der CFTR-Mutationsdatenbanken CFTR1 und CFTR2 aufgeführt wurde. Der entsprechende Patient (ID 9), bei dem überdies die nicht CF-verursachende CFTR-Sequenzvariante 1716G>A vorlag, wies neben

einem intermediären Schweißchloridwert von 57 mmol/l und einer sinopulmonalen Klinik ein Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) knapp unter dem Cut-off-Wert von 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (30,0  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) auf und erhielt die Diagnose PS-CF (siehe Kap. 4.5, Tab. 4.1). Die Mutation wurde folglich in diesem Fall als CF-verursachend eingeordnet.

Bei Betrachtung der Diagnosen aller Patienten mit dem 5T-Polymorphismus zeigte sich folgendes Bild: In der Patientengruppe mit der Variante 5T(11TG) (n = 4) wurde in 2 Fällen die Diagnose Non-CF (ID 3, 29), in einem Fall die Diagnose CFTR-Dysfunktion (ID 13) und in einem Fall die Diagnose CFTR-RD (ID 10) gestellt. Der Gruppe der Fälle mit der Variante 5T(12TG) (n = 3) wurde jeweils einmal die Diagnose Non-CF (ID 21), CFTR-RD (ID 26) und PS-CF (ID 25) zugeordnet. Bei einer Patientin lag die Variante 5T(13TG) (ID 24) vor. Sie erhielt die Diagnose PS-CF (siehe Kap. 4.5, Tab. 4.1). Die Tendenz dieser Daten ist mit der empirischen Beobachtung vereinbar, dass 12 oder 13 TG-Repeats im Gegensatz zu 11 TG-Repeats zu einer höheren Penetranz einer milden CF oder einer CFTR-RD führen (siehe Kap. 1.4) (Groman et al. 2004, Nährlich et al. 2013).

### **5.3 Nasale Potentialdifferenz (NPD)**

Bei Betrachtung der NPD-Daten fiel auf, dass Delta PD (OCl+Iso) als Abbild der gesamten CFTR-Funktion sowie die mit Referenzwerten versehenen diagnostischen Parameter Sermet-Score und Wilschanski-Index jeweils statistisch signifikant mit den Schweißtestergebnissen korrelierten. Die höchste Korrelation zwischen Schweißtest und NPD bestand bei dem Parameter Delta PD (OCl+Iso) (siehe Kap. 4.3, Abb. 4.10), gefolgt von Sermet-Score (siehe Kap. 4.3, Abb. 4.11) und Wilschanski-Index (siehe Kap. 4.3, Abb. 4.12). Hierbei wiesen alle 3 genannten Parameter eine etwas höhere Korrelation der Bestwerte mit dem Schweißtestergebnissen (für Delta PD (OCl+Iso):  $r = 0,692$  und  $p = 0,003$ ; für den Sermet-Score:  $r = -0,689$  und  $p = 0,003$ ; für den Wilschanski-Index:  $r = 0,579$  und  $p = 0,019$ ) im Vergleich zur Korrelation der Mittelwerte mit den Schweißtestergebnissen (für Delta PD (OCl+Iso):  $r = 0,648$  und  $p = 0,007$ , siehe Kap. 4.3, Abb. 4.10; für den Sermet-Score:  $r = -0,598$  und  $p = 0,014$ , siehe Kap. 4.3, Abb. 4.11; für den Wilschanski-Index:  $r = 0,541$  und  $p = 0,030$ , siehe Kap. 4.3, Abb. 4.12) auf. Die höhere Korrelation der Bestwerte dieser NPD-Parameter mit dem Goldstandard Schweißtest spiegelt die von Keenan et al. vertretene Auffassung wider, wonach die Heranziehung des Mittelwertes anstatt des Bestwertes zur diagnostischen Beurteilung der NPD die Gefahr einer Unterschätzung der individuellen CFTR-Funktion in sich birgt (Keenan et al. 2015). Zieht man jedoch in der vorliegenden Patientenkohorte zur diagnostischen Interpretation vergleichend

jeweils die Best- und Mittelwerte heran, so ergibt sich für 100 % der untersuchten Patienten jeweils keine Diskrepanz bezüglich der abschließend zugewiesenen Diagnose. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb gemäß dem Standardprotokoll ECFS NPD SOP 2012 ausschließlich die Mittelwerte aller NPD-Parameter zur diagnostischen Beurteilung herangezogen und zeigten sich diesbezüglich als aussagekräftig und gut geeignet. Die hohe Korrelation der diagnostisch relevanten Parameter von NPD und Schweißtest im Allgemeinen erscheint nachvollziehbar in Erwägung der Tatsache, dass beide Methoden diagnostische Graubereiche aufweisen (Nährlich et al. 2013).

Die NPD erwies sich als robuste diagnostische Methode zum Ausschluss oder zur Bestätigung einer fraglichen CF. Unter den Patienten, bei denen eine auswertbare NPD erfolgte (n = 16), erhielten 8 die Diagnose Non-CF und jeweils 4 die Diagnose CFTR-RD oder PS-CF (siehe Kap.4.5, Abb. 4.34, 4.35 und Tab. 4.1).

100 % der Patienten, welche einer NPD unterzogen wurden und denen die Diagnose Non-CF gestellt wurde (n = 8), wiesen einen Sermet-Score über dem Cut-off-Wert von 0,27 auf, was als hinweisend auf eine Non-CF gilt. Der mittlere Sermet-Score in dieser Gruppe betrug 2,09. Auch alle Patienten mit der Diagnose CFTR-RD, bei denen ein NPD durchgeführt wurde (n = 4), wiesen einen Sermet-Score über dem Cut-off-Wert von 0,27 auf. Der Sermet-Score lag in dieser Gruppe im Mittel bei 2,85 und somit über dem Mittelwert der Gruppe der Patienten mit einer Non-CF. 75 % der Fälle mit einer PS-CF, bei denen eine NPD erfolgte (n = 3), zeigten einen auf eine CF hinweisenden Sermet-Score unter dem Cut-off-Wert von 0,27. Ein Patient mit der Diagnose PS-CF (ID 25) wies mit einem Wert von 2,40 einen Score im CF-untypischen Bereich auf. Es lag ein Genotyp mit einem Polymorphismus und einer milden Mutation mit jeweils unterschiedlichen klinischen Folgen vor (5T(12TG)/N1303I), die in diesem Fall mit einer hohen CFTR-Restfunktion einhergingen (CFTR1 2014 und CFTR2 2014). Der mittlere Sermet-Score der Gruppe der Patienten mit einer PS-CF lag mit - 0,30 im CF-typischen Bereich (siehe Kap.4.4, Abb. 4.34 und Tab. 4.1).

Bezüglich des Wilschanski-Index zeigten sich ebenfalls bei 100 % der Patienten mit einer Non-CF (n = 8) unauffällige Werte unter dem Cut-off-Wert von 0,5. Der Mittelwert des Wilschanski-Index in der Gruppe der Patienten mit einer Non-CF lag bei 0,18 und somit im unauffälligen Bereich. Bei allen Patienten mit einer CFTR-RD (n = 4) lag der Wilschanski-Index ebenfalls unter dem Cut-off-Wert von 0,5. Der Mittelwert betrug in dieser Gruppe 0,15 und war somit niedriger als der Mittelwert in der Gruppe der Patienten mit einer Non-CF. Unter den Fällen mit einer PS-CF (n = 4) war der Wilschanski-Index in 75 % (n = 3) > 0,5 und somit hinweisend auf eine CF. In einem Fall (ID 25) lag, vergleichbar dem entsprechend unauffälligen Sermet-Score

von 2,40, ein CF-untypischer Wilschanski-Index von  $< 0,5$  bei der Diagnose PS-CF vor, was bei einem Genotyp mit dem Polymorphismus 5T(12TG) und der milden Mutation N1303I auf eine ausgeprägte CFTR-Residualfunktion schließen lässt (CFTR1 2014 und CFTR2 2014). Der mittlere Wilschanski-Index in der Gruppe der Patienten mit einer PS-CF betrug 0,69 und lag somit im CF-typischen Bereich (siehe Kap. 4.5, Abb. 4.35 und Tab. 4.1).

In Anlehnung an die in Kapitel 2 angeführte Fragestellung, inwiefern sich mittels NPD die Diagnose CFTR-RD von den Diagnosen Non-CF und CF abgrenzen lässt, zeigte sich folgendes Bild: Die NPD-Daten der Patienten mit einer CFTR-RD ( $n = 4$ ) waren verhältnismäßig heterogen und somit nicht eindeutig von den Daten der Patienten mit anderen Diagnosen abgrenzbar. Die Werte des Sermet-Scores bewegten sich im Bereich zwischen 1,18 und 6,26 (siehe Kap. 4.5, Abb. 4.34 und Tab. 4.1) und der Wilschanski-Index rangierte zwischen 0,00 und 0,23 (siehe Kap. 4.5, Abb. 4.35 und Tab. 4.1). Entgegen der Erwartung, die gemessene CFTR-Funktion sei bei einer CFTR-RD niedriger als bei einer Non-CF und höher als bei einer CF (Wilschanski et al. 2001), war die CFTR-Funktion der Patienten mit einer CFTR-RD im Mittel zwar höher als die der Patienten mit einer CF, aber auch höher als die der Patienten mit einer Non-CF. Allerdings unterstützt die Heterogenität der NPD-Daten aus der Gruppe der Patienten mit einer CFTR-RD die in der Fachliteratur beschriebene Beobachtung, dass sich der Mittelwert der CFTR-Funktion bei CFTR-RD in einem breiten Bereich von 15-50 % bewegt (Derichs 2013, Mishra et al. 2005, Rowe et al. 2007) und es bei CF mit CFTR-Restfunktion, CFTR-RD und Non-CF zu überlappenden NPD-Antworten kommen kann (Nährlich et al. 2013). Eine mögliche Erklärung dieser Antwortüberlagerungen liefern am respiratorischen Epithel befindliche, alternative kalziumabhängige Chloridkanäle (CaCC), welche die CFTR-bedingte Einschränkung der Chloridpermeabilität teilweise kompensieren können, siehe auch Kapitel 1.4 (De Boeck et al. 2011, Hebestreit und Hebestreit 2013, Mall und Boucher 2006).

Die in die multizentrische Validierung der NPD-Referenzwerte eingehenden Cut-off-Werte von 0,27 für den Sermet-Score und 0,5 für den Wilschanski-Index erwiesen sich als diagnostisch aussagekräftig und trugen somit wesentlich zur Einschätzung der CFTR-Funktion und Diagnosefindung bei fraglicher CF oder CFTR-RD bei (ECFS NPD SOP 2012, Pinders-Kessler et al. 2013). Die in einem Fall (ID 25) aufgetretene Abweichung zwischen diagnostischer Beurteilung mittels NPD und abschließend zugeordneter Diagnose kann auch durch organspezifische Unterschiede der CFTR-Funktion erklärt werden (Derichs et al. 2010).

## 5.4 Intestinale Kurzschlussstrommessung (ICM)

Im Vergleich zur Korrelation zwischen Schweißtest und NPD lag zwischen Schweißtest und ICM ein geringerer statistischer Zusammenhang vor (siehe Kap. 4.4, Abb. 4.32). Dies erscheint folgerichtig in Anbetracht der Tatsache, dass die ICM unter Anwendung des Standardprotokolls ECFS ICM SOP im Gegensatz zu Schweißtest und NPD bisher keinen diagnostischen Kontrollbereich beziehungsweise keine überschneidenden Antworten, sondern einen klaren diagnostischen Cut-off-Wert aufweist (Derichs et al. 2010).

Bemerkenswert war die hohe statistische Signifikanz der Korrelation zwischen den ICM-Parametern Delta Isc Carbachol pre Washout und Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol +Histamin) (siehe Kap. 4.4, Abb. 4.33). Diese hochsignifikante Korrelation bestätigt Delta Isc Carbachol pre Washout als geeigneten prädiktiver ICM-Parameter zur Einschätzung der CFTR-Funktion, insbesondere bei Patienten mit CFTR-Restfunktion (De Boeck et al. 2011, Derichs et al. 2010).

Die ICM bewies ihre hohe Aussagekraft als diagnostischer Biomarker bei fraglicher CF und zur Beurteilung der CFTR-Funktion bei fraglicher CFTR-RD. Unter den Patienten, bei denen eine auswertbare ICM vorlag ( $n = 27$ ), wurden in 13 Fällen die Diagnose Non-CF, in einem Fall die Diagnose CFTR-Dysfunktion, in 5 Fällen die Diagnose CFTR-RD, in 7 Fällen die Diagnose PS-CF und in einem Fall die Diagnose PI-CF gestellt. Die Zuweisung der Diagnose CFTR-Dysfunktion (ID 13) erfolgte, da die ICM eine deutliche Einschränkung der CFTR-Funktion aufzeigte, welche mit dem pulmonalen klinischen Bild, einem Schweißtest im Graubereich und dem Nachweis eines Polymorphismus mit unterschiedlichen klinischen Folgen (5T(11TG)) vereinbar war (CFTR1 2014 und CFTR2 2014). Jedoch wurden die für eine CF oder eine CFTR-RD erforderlichen Diagnosekriterien nicht erfüllt (siehe Kap. 4.5, Abb. 4.36 und Tab. 4.1).

In 76,9 % der Fälle, bei denen eine ICM durchgeführt und denen die Diagnose Non-CF zugewiesen wurde ( $n = 10$ ), zeigten sich für Delta Isc Carbachol pre Washout erwartungsgemäß Werte über dem Cut-off-Wert von  $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . 23,1 % der Patienten mit der Diagnose Non-CF ( $n = 3$ ) wiesen ein Delta Isc Carbachol pre Washout  $< 10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf. Der Mittelwert für Delta Isc Carbachol pre Washout lag in der Diagnosegruppe Non-CF ( $n = 13$ ) mit  $16,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  erwartungsgemäß über dem Cut-off-Wert von  $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

75 % der Patienten mit der Diagnose CF ( $n = 6$ ) zeigten für Delta Isc Carbachol pre Washout auffällige Werte unter dem Cut-off-Wert von  $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ . In 25 % der Fälle mit einer CF ( $n = 2$ ) lagen für Delta Isc Carbachol pre Washout Werte  $> 10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  vor. Der Mittelwert für Delta Isc Carbachol pre Washout betrug in der Diagnosegruppe CF ( $n = 8$ )  $4,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  und befand sich

somit erwartungsgemäß unterhalb des Cut-off-Werts von 10  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

60 % der Fälle mit einer CFTR-RD (n = 3) zeigten für Delta Isc Carbachol pre Washout Werte > 10  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , 40 % der Patienten (n = 2) Werte < 10  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Der Mittelwert von Delta Isc Carbachol pre Washout in dieser Diagnosegruppe (n = 5) lag bei 15,9  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  und somit über dem Cut-off-Wert von 10  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  und erwartungsgemäß im Intermediärbereich im Vergleich mit den Mittelwerten der Diagnosegruppen Non-CF (16,0  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) und CF (4,1  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) (siehe Kap. 4.5, Abb. 4.36 und Tab. 4.1).

76,9 % der Fälle, bei denen eine ICM erfolgte und die die Diagnose Non-CF erhielten (n = 10), wiesen ein unauffälliges Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) über dem Cut-off-Wert von 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf. In 23,1 % der Fälle mit der Diagnose Non-CF (n = 3) lagen für Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) Werte < 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  vor. Die Patienten dieser Gruppe erhielten trotz auffälliger ICM die Diagnose Non-CF, da unter Berücksichtigung von klinischem Bild und stattgehabter Diagnostik die Diagnosekriterien für eine CF oder CFTR-RD nicht erfüllt wurden. Der Mittelwert für Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) betrug in der Diagnosegruppe Non-CF (n = 13) 51,8  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  und lag somit erwartungsgemäß über dem Cut-off Wert von 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (siehe Kap. 4.5, Abb. 4.36 und Tab. 4.1).

87,5 % der Patienten (n = 7) mit einer CF wiesen für Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) Werte < 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf, was als hinweisend auf eine CF gilt. In einem Fall (ID 26) war der Wert für Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) trotz der Diagnose CF > 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Dieser Umstand ist durch einen milden Genotyp mit dem Polymorphismus 5T(12TG) und der milden Mutation N1303I erklärbar, welcher in diesem Fall eine hohe CFTR-Restfunktion ermöglicht (CFTR1 2014 und CFTR2 2014). Diesbezüglich ist bekannt, dass, unter der Annahme einer CFTR-Funktion von 100 % bei einer Non-CF, bereits ab einer CFTR-Restfunktion von etwa 20 % bei einer CF oder CFTR-RD ein normaler transepithelialer Chloridtransport möglich und somit auch mittels ICM nicht immer von einer Normalfunktion des CFTR-Kanals abgrenzbar ist (De Boeck et al. 2011). Der Mittelwert für Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) lag in der Diagnosegruppe CF bei 20,61  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  und somit im CF-typischen Bereich < 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (siehe Kap. 4.5, Abb. 4.36 und Tab. 4.1)

60 % der Fälle mit einer CFTR-RD (n = 3) zeigten für Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) Werte > 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , 40 % der Patienten (n = 2) Werte < 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Der Mittelwert von Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) in dieser Diagnosegruppe (n = 5) lag bei 43,12  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  und somit über dem Cut-off-Wert von 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  und erwartungsgemäß im Intermediärbereich im Vergleich mit den Mittelwerten der Diagnosegruppen Non-CF (51,8  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) und CF (20,61  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) (siehe Kap. 4.5, Abb. 4.36 und Tab. 4.1).

Somit lieferte auch die ICM zwar ebenfalls heterogene Messdaten in der Gruppe der Patienten mit einer CFTR-RD, allerdings war die diagnostische Abgrenzung von CFTR-RD zu Non-CF und CF, wenn auch erschwert, so doch besser möglich als mittels der entsprechenden NPD-Daten. Ein Erklärungsansatz hierfür ist die Tatsache, dass mit Ausnahme einer kleinen Gruppe von CF-Patienten mit dem homozygoten Genotyp F508del bisher kein Nachweis alternativer kalziumabhängiger Chloridkanäle (CaCC) im Rektum bei Gesunden oder CF-Patienten erbracht werden konnte. Dieser Umstand kann die hohe diagnostische Diskriminationsfähigkeit der ICM miterklären, da die Messung des Chloridstroms bei einer ICM somit ein spezifischeres Abbild der CFTR-Funktion als bei einer NPD-Messung darstellt (De Boeck et al. 2011).

Delta Isc Carbachol pre Washout und Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) bestätigten sich als robuste prädiktiv-diagnostische beziehungsweise diagnostische ICM-Parameter und trugen in aller Regel maßgeblich zur Diagnosefindung bei. In Einzelfällen (ID 6, 17, 20, 21; n = 4) unterschieden sich die diagnostische Interpretation der ICM und die abschließend gestellte Diagnose. Einen Erklärungsansatz für diesen Umstand liefern organspezifische Unterschiede der CFTR-Funktion (Derichs et al. 2010), was die Wichtigkeit der Erhebung aller CFTR-Biomarker zur diagnostischen Interpretation unterstreicht.

Eine zusätzliche Bedeutung für die hohe CFTR-Spezifität der ICM hat das neu erarbeitete, multizentrisch validierte Standardprotokoll (Derichs et al. 2010, ECFS ICM SOP 2011). In der jüngsten Entwicklung der ICM sind zwei verschiedene Messverfahren unter Berücksichtigung des sogenannten Freiburg-Protokolls einerseits (Mall et al. 2004) und des sogenannten Rotterdam-Protokolls andererseits (De Jonge et al. 2004) angewendet worden. Das überarbeitete Rotterdam-Protokoll (Derichs et al. 2010) diente hierbei als Grundlage für das international standardisierte Protokoll (ECFS ICM SOP 2011) und die multizentrisch validierten Referenzwerte (Pinders-Kessler et al. 2013).

Nach dem Freiburg-Protokoll kommen eine Forcepszange zur Biopsieentnahme sowie perfundierte Ussingkammern ohne Begasung zum Einsatz. Die Messung erfolgt bei offenem Stromkreislauf („open circuit“) unter Aufzeichnung der transepithelialen Spannung ( $V_{te}$ ) und des transepithelialen Widerstands ( $R_{te}$ ). Ein weiterer wesentlicher Unterschied zum Rotterdam-Protokoll ist die Reihenfolge der Substanzengabe: 1. Carbachol unter Anwesenheit von Amilorid; 2. Forskolin/IBMX unter Anwesenheit von Amilorid und Indomethacin; 3. Carbachol unter Anwesenheit von Amilorid, Indomethacin und Forskolin/IBMX. Die Stimulation des CFTR-Kanals erfolgt also auf cholinergem (Carbachol) sowie  $\beta$ -adrenergem cAMP-vermitteltem (Forskolin/IBMX) Weg, wobei im ersten Schritt der cAMP-vermittelten CFTR-Aktivierung durch Forskolin/IBMX eine cholinerge CFTR-Stimulation durch Carbachol vorausgeht. Des

Weiteren wird auf die Gabe von DIDS verzichtet (Mall et al. 2004). Ein durch den offenen Stromkreislauf bedingter Nachteil des Messverfahrens ist der parazelluläre Ionenfluss, welcher zu unerwünschten Änderungen der transepithelialen Spannung ( $V_{te}$ ) führen kann (De Boeck et al. 2011).

Diesen Störfaktor vermeidet das Rotterdam-Protokoll durch einen Kurzschlussstromkreislauf ( $I_{sc}$ ) mittels Spannungsklemme („voltage clamp“), welche die transepitheliale Spannung während der Messung konstant auf 0 Millivolt hält und somit den parazellulären Ionenfluss unterbindet. Folglich ist die Aufzeichnung des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) geringeren Spontanschwankungen unterworfen. Weitere Unterschiede im Vergleich zum Freiburg-Protokoll stellen die Biopsieentnahme mittels Vakuumsaugtechnik und die Verwendung rezirkulierender Ussingkammern unter konstanter Begasung mit 95 %  $O_2$  und 5%  $CO_2$  dar. Die folgende Substanzengabe gemäß dem ursprünglichen Rotterdam-Protokoll erfolgt unter ständiger Anwesenheit von Indomethacin zur Inhibition endogener cAMP-Produktion und damit verbundener Spontanaktivität des CFTR-Kanals: 1. Amilorid; 2. Carbachol; 3. DIDS; 4. Histamin; 5. Forskolin/cAMP. Der cAMP-vermittelten  $\beta$ -adrenergen CFTR-Aktivierung durch Forskolin/cAMP geht also auch in diesem Protokoll eine cholinerge CFTR-Stimulation durch Carbachol und Histamin voraus. Allerdings erfolgt eine zusätzliche Gabe von DIDS und Histamin (De Jonge et al. 2004).

In der überarbeiteten Version des Rotterdam-Protokolls wurde die Reihenfolge der Substanzengabe, welche ebenfalls unter ständiger Anwesenheit von Indomethacin durchgeführt wird, folgendermaßen verändert: 1. Amilorid; 2. Forskolin/IBMX; 3. Genistein; 4. Carbachol; 5. DIDS; 6. Histamin (siehe Kap. 3.5.2, S. 51). Es erfolgt also im Unterschied zur ursprünglichen Version des Protokolls die zusätzliche Gabe des CFTR-Potentiators Genistein. Überdies wird der CFTR-Kanal zunächst  $\beta$ -adrenerg (Forskolin/IBMX) und im weiteren Verlauf der Messung cholinerg (Carbachol und Histamin) stimuliert (Derichs et al. 2010, ECFS ICM SOP 2011). Die der Gabe von Carbachol und Histamin vorausgehende Zusetzung von Forskolin/IBMX trägt hierbei der Erkenntnis Rechnung, dass eine maximale cholinerge CFTR-Aktivität (Carbachol und Histamin) cAMP-vermittelter Kostimulation (Forskolin/IBMX) bedarf (Mall et al. 1998).

Um einen möglichen Informationsverlust bezüglich der ausschließlich cholinerg vermittelten CFTR-Aktivität zu vermeiden, wurde im überarbeiteten Rotterdam-Protokoll die Gabe von Carbachol pre Washout vor Beginn der eigentlichen Messung eingeführt. Die Applikation von Carbachol pre Washout in den Kammerabschnitt mit der serosalen Biopsieoberfläche erfüllt hierbei mehrere Funktionen. Zum einen bestätigt ein vorhandenes Delta  $I_{sc}$  Carbachol pre

Washout eine normale Reaktivität des Biopsiegewebes und gibt gleichzeitig Aufschluss über die korrekte Positionierung der Biopsie im Slider: Wurde, wie erforderlich, die serosale Seite der Biopsie stimuliert, so zeigt sich bei einer Non-CF normalerweise ein positives Delta Isc Carbachol pre Washout. Eine Stimulation der mukosalen Biopsieoberfläche hingegen würde bei einer Non-CF in aller Regel zu einem negativen Delta Isc Carbachol pre Washout führen. Darüber hinaus liefert Delta Isc Carbachol pre Washout Information über die ausschließlich cholinerg vermittelte CFTR-Aktivität. Der hierbei zugrunde liegende elektrophysiologische Mechanismus ist die Öffnung basolateraler Kaliumkanäle mittels Carbachol. Die dadurch nach extrazellulär gelangten positiv geladenen Kaliumionen bewirken eine Erhöhung des elektrochemischen Gradienten an der apikalen Membran und eine daraus folgende Öffnung des apikal lokalisierten CFTR-Kanals. Überdies verweist die hohe Korrelation von Delta Isc Carbachol pre Washout mit Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) (siehe Kap. 4.4, Abb. 4.33) auf eine gute Eignung von Delta Isc Carbachol pre Washout als prädiktiver diagnostischer ICM-Parameter, insbesondere zur Einschätzung der CFTR-Restfunktion (De Boeck et al. 2011, Derichs et al. 2010, ECFS ICM SOP 2011).

Der sich an die Gabe von Carbachol pre Washout anschließende 3-malige Pufferaustausch (Washout) sowie einer verlängerte Equilibrierungszeit vor der Washoutphase erhöhen die Forskolin-Antworten um das bis zu 5-Fache und die Carbachol-Antworten um das bis zu 1,5-Fache im Vergleich zum ursprünglichen Rotterdam-Protokoll und tragen somit wesentlich zu einer höheren CFTR-Spezifität der ICM bei (De Boeck et al. 2011, Derichs et al. 2010, ECFS ICM SOP 2011).

In der Studie von Derichs et al. 2010 wurden Rektummukosabiopsien von Patienten mit den bekannten Diagnosen Non-CF, PS-CF und PI-CF einer gemäß dem überarbeiteten Rotterdam-Protokoll durchgeführten ICM unterzogen. Hierbei konnte für den ICM-Marker Delta Isc (cAMP/Forskolin+Carbachol+Histamin) als einem Abbild der kumulativen Chloridantworten erstmals ein klarer Cut-off-Wert von  $34 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % ermittelt werden, der eine eindeutige diagnostische Diskrimination zwischen einer PS-CF und einer Non-CF ermöglichte (Derichs et al. 2010). Die derzeitig stattfindende multizentrischen Validierung der diagnostischen ICM-Referenzwerte weist für Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) auf einen nahezu unveränderten Cut-off-Wert von  $35 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  hin (siehe Kap. 3.6) auf und bestätigt somit die hohe CFTR-Spezifität und die hohe diagnostische Diskriminationsfähigkeit einer nach multizentrisch standardisierten Richtlinien durchgeführten ICM (ECFS ICM SOP 2011, Pinders-Kessler et al. 2013).

## 6 Zusammenfassung

Die angeborene autosomal-rezessive Stoffwechselerkrankung zystische Fibrose (CF) führt aufgrund eines genetisch bedingten Defekts des CFTR-Chloridkanals zur Produktion eines hochviskösen Mukus in allen sekretorischen Drüsen mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung und exokriner Pankreasinsuffizienz als vordergründigen Krankheitsbildern (Dockter und Lindemann 2004, Muntau 2011). Außerdem sind klinisch mild verlaufende, sogenannte CFTR-assoziierte Erkrankungen (CFTR-RD) bekannt, welche die Diagnosekriterien für eine CF nicht erfüllen (Bombieri et al. 2011, Nährlich et al. 2013). Mögliche Intermediärwerte des Schweißtests als diagnostischer Goldstandard und/oder ein ausbleibender Mutationsnachweis erlauben keine Diagnosesicherung einer CF. In diesen Fällen einer fraglichen CF oder CFTR-RD kommen die NPD als Messung der elektrischen Potentialdifferenz am respiratorischen Epithel der Nasenschleimhaut *in vivo* und die ICM als Messung des Kurzschlussstroms an Rektummukosabiopsien *ex vivo* zur CFTR-Funktionsanalyse mittels Gabe CFTR-stimulierender und anderer Substanzen zum Einsatz (Nährlich et al. 2013).

Von Oktober 2011 bis Dezember 2013 wurden 29 konsekutive ambulante Patienten im Alter von 1 bis 63 Jahren mit fraglicher CF oder CFTR-RD bei vorwiegend sinopulmonaler Klinik, intermediären Schweißtestergebnissen und milden Genotypen einer weiterführenden diagnostischen Stratifizierung in Form eines erneuten Schweißtests, einer gemäß multizentrisch standardisiertem Protokoll durchgeführten NPD (ECFS NPD SOP 2012) und/oder ICM (ECFS ICM SOP 2011) sowie gegebenenfalls einer Komplettierung der molekulargenetischen CFTR-Mutationsanalyse unterzogen, mit der Zielsetzung, alle Patienten einer eindeutigen Diagnose zuzuführen und der Fragestellung, inwiefern NPD und ICM eine Abgrenzung der Diagnose CFTR-RD von den Diagnosen CF und Non-CF möglich machten. Zur diagnostischen Beurteilung wurden hierfür die gemäß genannter Protokolle in einer unizentrischen Studie an Probanden mit bereits bekannten Diagnosen (Non-CF, PS-CF und PI-CF) ermittelten Referenzwerte verwendet, welche Eingang in eine derzeit stattfindene multizentrische Validierung finden. Für die NPD-Parameter Sermet-Score mit einem Cut-off-Wert von 0,27 sowie Wilschanski-Index mit einem Cut-off-Wert von 0,5 wurden die Mittelwerte der Messungen beider Nasenlöcher und für die ICM-Parameter Delta Isc Carbachol pre Washout mit einem Cut-off-Wert von 10  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  sowie Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) mit einem Cut-off-Wert von 35  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  die Mittelwerte der Messungen aller 4-8 Biopsien herangezogen (Derichs et al. 2010, Pinders-Kessler et al. 2013).

In der untersuchten Patientenkohorte lagen in knapp der Hälfte der Fälle ( $n = 14$ ) die

Schweißtestergebnisse im gleichen diagnostischen Bereich wie die Schweißtestvorbefunde.

Die mittels ICM diskriminierten Diagnosen PS-CF und Non-CF zweier Patienten mit den Genotypen F508del/R1162L und W1282X/R1162L gaben Anlass zu der Empfehlung, die CFTR-Mutation R1162L zukünftig nicht mehr als nicht CF-verursachend sondern als CFTR-Mutation mit unterschiedlichen klinischen Folgen zu charakterisieren. Ein Patient mit der zum Untersuchungszeitpunkt in keiner CFTR-Mutationsdatenbank aufgeführten CFTR-Mutation 1625\_1639del erhielt die Diagnose PS-CF. Überdies bestätigte sich die erhöhte Penetranz des 5T-Polymorphismus in Form der 12TG- und 13TG-Varianten im Vergleich zu dessen 11TG-Variante (CFTR1 2014, CFTR2 2014, Groman et al. 2004, Nährlich et al. 2013).

Die NPD-Parameter Delta PD (OCI+Iso), Sermet-Score und Wilschanski-Index korrelierten statistisch signifikant mit dem Schweißtest.

Die ICM-Parameter Delta Isc (Forskolin/IBMX+Carbachol+Histamin) und Delta Isc Carbachol pre Washout korrelierten statistisch hochsignifikant untereinander, was die Eignung von Delta Isc Carbachol pre Washout als prädiktivem diagnostischem Parameter, insbesondere zur Einschätzung der CFTR-Restfunktion, hervorhebt (De Boeck et al. 2011, Derichs et al. 2010).

Die hohe Korrelation zwischen Schweißtest und NPD kann durch das Vorhandensein eines diagnostischen Graubereichs bei beiden Methoden erklärt werden, wohingegen die geringere Korrelation zwischen Schweißtest und ICM auf deren höhere diagnostische Diskriminationsfähigkeit verweist (Derichs et al. 2010, Nährlich et al. 2013).

Eine diagnostische Abgrenzung zwischen CFTR-RD und CF beziehungsweise Non-CF war mittels NPD und ICM nicht in allen Fällen eindeutig möglich. Dabei spiegelten die heterogenen Daten bei CFTR-RD die allgemeine Datenlage wider, wonach die mittlere CFTR-Funktion bei CFTR-RD in einem breiten Bereich von 15-50% rangiert (Derichs 2013, Mishra et al. 2005, Rowe et al. 2007), deren individuelle Ausprägung allerdings insbesondere mittels ICM auch im untersuchten Patientenkollektiv präzise ermittelt werden konnte.

NPD und ICM trugen in aller Regel entscheidend zur Diagnosefindung bei, wobei die ICM ihre höhere CFTR-Spezifität untermauerte. In Einzelfällen (n = 4) stimmte die diagnostische Interpretation von NPD und/oder ICM nicht mit der abschließend zugewiesenen Diagnose überein. Als eine Begründung hierfür können intraindividuelle organspezifische Unterschiede bezüglich der CFTR-Funktion beziehungsweise CFTR-Dysfunktion angeführt werden (Derichs et al. 2010), was die Wichtigkeit der Erhebung aller CFTR-Biomarker zur diagnostischen Interpretation unterstreicht. Nach der Gesamtschau aller stattgehabten Diagnostik wurden in 14 Fällen eine Non-CF, in einem Fall eine CFTR-Dysfunktion, in 6 Fällen eine CFTR-RD, in 7 Fällen eine PS-CF und in einem Fall eine PI-CF diagnostiziert.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: clinical and pathological study. *Am J Dis Child* 1938;56:344-99.
2. Ballmann M. Diagnostik inklusive Screening. In: Ballmann M, Smaczny C (Hrsg). *CF-Manual*. Bremen, London, Boston: UNI-MED 2008 (2.Aufl);Kap.2:19.
3. Bartig HJ. Psychologische Aspekte der CF. In: Ballmann M, Smaczny C (Hrsg). *CF-Manual*. Bremen, London, Boston: UNI-MED 2008 (2.Aufl);Kap.37:130-4.
4. Billet A, Luo Y, Balghi H, Hanrahan JW. Role of tyrosine phosphorylation in the muscarinic activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem* 2013;288(30):21815-23.
5. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations - correlation with incidence data and application to screening. *Human Mutat* 2002;19(6):575-606.
6. Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, Sermet I, Schwarz M, Tzetis M, Wilschanski M, Bareil C, Bilton D, Castellani C, Cuppens H, Cutting GR, Drevínek P, Farrell P, Elborn JS, Jarvi K, Kerem B, Kerem E, Knowles M, Macek M Jr, Munck A, Radojkovic D, Seia M, Sheppard DN, Southern KW, Stuhmann M, Tullis E, Zielenski J, Pignatti PF, Ferec C. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011;10 Suppl 2:86-102.
7. Bonadia LC, De Lima Marson FA, Ribeiro JD, Paschoal IA, Pereira MC, Ribeiro AF, Bertuzzo CS. CFTR genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease. *Gene* 2014;540(2):183-90.
8. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 2004;23(1):146-58.
9. Burrows EF, Souther KW, Noone PG. Sodium channel blockers for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;4:CD005087.
10. Carlén B, Stenram U. Primary ciliary dyskinesia: a review. *Ultrastruct Pathol* 2005;29(3-4):217-20.
11. Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Dankert Roelse J, Duff A, Farrell M, Mehta A, Munck A, Pollitt R, Sermet-Gausdelus 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 Jr, 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.
12. Chan HC, Ruan YC, He Q, Chen MH, Chen H, Xu WM, Chen WY, Zhang XH, Zhou Z. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in reproductive health and disease. *J Physiol* 2009;587(10):2187-95.

13. Clancy JP, Gain M. Personalized medicine in cystic fibrosis: dawning of a new era. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:593-7.
14. Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). <http://www.cftr2.org>. Datum der letzten Aktualisierung: 08.08.2016. Datum des letzten Zugangs: 12.02.2017.
15. CLSI. Sweat Testing: Sample Collection and Quantitative Chloride Analysis. Approved Guideline – Third Edition. CLSI document C34-A3. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009
16. Chough SP, Goldenring JR, Hurst RD, Ballantyne GH, Modlin IM. Calcium modulation of the effects of serotonin, carbachol and histamine on rabbit ileal ion transport. *Yale J Biol Med* 1993;66(6):525-40.
17. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. 2012 Annual Data Report. Bethesda, Maryland. ©2013 Cystic Fibrosis Foundation.
18. Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). <http://www.genet.sickkids.on.ca/app>. Datum der letzten Aktualisierung: 25.04.2011. Datum des letzten Zugangs: 12.02.2017.
19. Davies JC, Griesenbach U, Alton E. Modifier genes in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2005;39(5):383-91.
20. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(5):475-82.
21. De Boeck K, Derichs N, Fajac I, de Jonge HR, Bronsveld I, Sermet I, Vermeulen F, Sheppard DN, Cuppens H, Hug M, Melotti P, Middleton PG, Wilschanski M. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros* 2011;10(2):53-66.
22. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M; Diagnostik Working Group. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 2006;61(7):627-35.
23. De Jonge HJ, 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 Suppl 2:159-63.
24. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, des Georges M, Ferec C, Macek M, Pignatti PF, 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.
25. Derichs N, Jin BJ, Song Y, Finkbeiner WE, Verkman AS. Hyperviscous airway periciliary and mucus liquid layers in cystic fibrosis measured by confocal fluorescence photobleaching. *FASEB J* 2011;25(7):2325-32.

26. Derichs N, Knoll J, Hyde R, Pedemonte N, Galietta DJV, Ballmann M. Preclinical evaluation of CFTR-modulators in ex vivo human rectal tissue. *Pediatr Pulmonol* 2009;44:292.
27. Derichs N, Sanz J, Von Kanel T, Stolpe C, 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.
28. Derichs N. Targeting a genetic defect: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. *Eur Respir Rev* 2013;22(127):58-65.
29. Di Sant'Agnes PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition in sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 1953;12(5):549-63.
30. Dobbin CJ, Bye PT. Adults with cystic fibrosis – meeting the challenge! *Intern Med J* 2003;33(12):593-7.
31. Dockter G, Grasemann H, Ratjen F. Mukoviszidose. In: Gortner L, Meyer S, Sitzmann FC (Hrsg). *Duale Reihe. Pädiatrie*. Stuttgart: Thieme 2012 (4.Aufl);12.4.1:314-20.
32. Dockter G, Lindemann H. Einleitung und Grundlagen. In: Lindemann H, Tümmler B, Dockter G (Hrsg): *Mukoviszidose – Zystische Fibrose*. Stuttgart: Thieme 2004 (4.Aufl);Kap.1:1-2.
33. Dockter G, Lindemann H. Prognose. In: Lindemann H, Tümmler B, Dockter G (Hrsg): *Mukoviszidose – Zystische Fibrose*. Stuttgart: Thieme 2004 (4. Aufl);Kap.4:26-34.
34. Drumm ML. Modifier genes and variation in cystic fibrosis. *Respir Res* 2001;2(3):125-8.
35. Elborn JS, Shale DJ, Britton JR. Cystic fibrosis: current survival and population estimated to the year 2000. *Thorax* 1991;46(12):881-5.
36. 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; October 2011.
37. 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. Versions 1.2; September 2011, 1.3; May 2012 and 1.8; May 2014.
38. European Cystic Fibrosis Society Patient Registry. 2010 Annual Data Report, Version 01.2014. Karup, Denmark.
39. European Medicines Agency (EMA). [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu) Datum des letzten Zugangs: 17.08.2015.

40. Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das Coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasen. *Wien Med Wochenschr* 1936;86:753-56.
41. Farber S. Pancreatic function and disease in early life. V. Pathologic changes associated with pancreatic insufficiency in early life. *Arch Pathol* 1944;37:238-50.
42. Farrell P, Joffe S, Foley L, Canny GJ, Mayne P, Rosenberg M. Diagnosis of cystic fibrosis in the Republic of Ireland: epidemiology and costs. *Ir Med J* 2007;100(8): 557-60.
43. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW 3rd; Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 2008;153(2):4-14.
44. FitzSimmons SC. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J Pediatr* 1993;122(1): 1-9.
45. Gallati S. Evolution der CF-Allele. In: Reinhardt D, Götz M, Kraemer R, Schöni MH (Hrsg). *Cystische Fibrose*. Berlin, Tokio: Springer 2001:15-9.
46. Gallati S. Genetik. In: Reinhardt D, Götz M, Kraemer R, Schöni MH (Hrsg). *Cystische Fibrose*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 2001:3-17
47. Gemeinsamer Bundesausschuss. Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung des Beschlusses zur Neufassung der Richtlinie über die Früherkennung von Krankheiten bei Kindern bis zur Vollendung des 6. Lebensjahres (Kinder-Richtlinie): Screening auf Mukoviszidose (Zystische Fibrose). [https://www.g-ba.de/downloads/39-261-2316/2015-08-20\\_Kinder-RL\\_Mukoviszidose\\_Aenderung-Neufassung.pdf](https://www.g-ba.de/downloads/39-261-2316/2015-08-20_Kinder-RL_Mukoviszidose_Aenderung-Neufassung.pdf)
48. 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.
49. Green A, Kirk J. Guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem* 2007;44:25-34.
50. Groman JD, Hefferon TW, Casals T, Bassas L, Estivill X, Des Georges M, Guittard C, Koudova M, Fallin MD, Nemeth K, Fekete G, Kadasi L, Friedman K, Schwarz M, Bombieri C, Pignatti PF, Kanavakis E, Tzetis M, Schwartz M, Novelli G, D'Apice MR, Sobczynska-Tomaszewska A, Bal J, Stuhmann M, Macek M Jr, Claustres M, Cutting GR. Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am J Hum Genet* 2004;74:176-9.
51. Grosse SD, Boyle CA, Botkin JR, Comeau AM, Kharrazi M, Rosenfeld M, Wilfond BS; CDC. Newborn screening for cystic fibrosis: evaluation of benefits and risks and recommendations for state newborn screening programs. *MMWR Recomm Rep* 2004;53(RR-13):1-36.

52. Grubb B, Lazarowski E, Knowles M, Boucher R. Isobutylmethylxanthine fails to stimulate chloride secretion in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8(4):454-60.
53. Hebestreit H, Hebestreit A. Zystische Fibrose. In: Speer CP, Gahr M (Hrsg). *Pädiatrie*. Berlin, Heidelberg: Springer 2013 (4.Aufl);Kap.22:499-505.
54. Hirtz S, Gonska T, Seydewitz HH, Thomas J, Greiner P, Kuehr J, Brandis M, Eichler I, Rocha H, Lopes AI, Barreto C, Ramalho A, Amaral MD, Kunzelmann K, Mall M. CFTR Cl-channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 2004;127(4):1085-95.
55. Hug MJ, Derichs N, Bronsveld I, Clancy JP. Measurement of ion transport function in rectal biopsies. *Methods Mol Biol* 2011;741:87-107.
56. 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.
57. Jessen F, Sjøholm, Hoffmann EK. Identification of the anion exchange protein of ehrlich cells: A kinetic analysis of the inhibitory effects of 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene-disulfonic acid (DIDS) and labeling of membrane proteins with <sup>3</sup>H-DIDS. *J Membr Biol* 1986;92(3):195-205.
58. Kalderon AE, Dobbs JW, Greenberg ML. Localization of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase (cAMP-PDEase) activity in isolated bovine thyroid plasma membranes. *Histochemistry* 1980;65(3):277-89.
59. Kavitha C, Rajamani K, Vadivel E. *Coleus forskohlii*: A comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. *J Med Plants Res* 2010;4(4):278-85.
60. Keenan K, Avolio J, Rueckes-Nilges C, Tullis E, Gonska T, Naehrlich L. Nasal potential difference: Best or average result for CFTR function as diagnostic criteria for cystic fibrosis? *J Cyst Fibros* 2015;14(3):310-6.
61. Kirk KL, Wang W. A unified view of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gating: combining the allostereism of a ligand-gated channel with the enzymatic activity of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J Biol Chem* 2011;286(15):12813-9.
62. Knowles MR, Gatsy J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1981;305(25):1489-95.
63. Knowles MR, Stutts MJ, Yankaskas JR, Gatzky JT, Boucher RC Jr. Abnormal respiratory epithelial ion transport in cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 1986;7(2):285-97.
64. Kreienbaum Wissenschaftliche Messsysteme e.K.. Bedienungsanleitung. Wescor Macroduct Modell 3700-SYS. Iontophorese- und Schweißsammelsystem. CE 0086. Stand: Oktober 2003, Rev. 0-0311-01.

65. Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, Geller F, Geiß HC, Hesse V, von Hippel A, Jaeger V, Johnsen D, Korte W, Menner K, Müller G, Müller JM, Niemann-Pilatus A, Renner T, Schaefer F, Wittchen HU, Zabransky S, Zellner K, Ziegler A, Hebebrand J. Perzentile für den Body-mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschr Kinderheilkd* 2001;149(8):807-18.
66. Landsteiner K. Darmverschluss durch eingedicktes Mekonium, Pankreatitis. *Centralbl. f. allg. Pathol. u. path. Anat.* 1905(16):903.
67. Lau EM, Moriarty C, Ogle R, Bye PT. Pregnancy and cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2010;11(2):90-4.
68. LeGrys VA. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. *J Pediatr* 1996;129(6):892-7.
69. Lonni S, Chalmers JD, Joeminne PC, McDonnell MJ, Dimakou K, De Soyza A, Polverino E, Van de Kerkhove C, Rutherford R, Davison J, Rosales E, Pesci A, Restrepo MI, Torres A, Aliberti S. Etiology of Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis in Adults and Its Correlation to Disease Severity. *Ann Am Thorac Soc* 2015;12(12):1764-70.
70. Lungeninformationsdienst. Helmholtz Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt. [www.lungeninformationsdienst.de/krankheiten/mukoviszidose/verbreitung/index.html](http://www.lungeninformationsdienst.de/krankheiten/mukoviszidose/verbreitung/index.html) Datum der letzten Aktualisierung: 30.03.2016. Datum des letzten Zugangs: 02.11.2014.
71. 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):G1274-81.
72. Mall M, Boucher RC. Pathogenesis of Pulmonary Disease in Cystic Fibrosis. In: Bush A, Alton EFW, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A (eds): *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. Prog Respir Res. Basel: Karger 2006;34:116-21.
73. 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.
74. Mall M, Wissner A, Seydewitz HH, Kuehr J, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K. Defective cholinergic Cl(-) secretion and detection of K(+) secretion in rectal biopsies from cystic fibrosis patients. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278(4):617-24.
75. McPhail GL, Clancy JP. Ivacaftor: the first therapy acting on the primary cause of cystic fibrosis. *Drugs Today (Barc)* 2013;49(4):253-60.
76. Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev* 2005;26(4):135-53.
77. Moran O., Zegarra-Moran O. A quantitative description of the activation and inhibition of CFTR by potentiators: Genistein. *FEBS Lett* 2005;579(18):3979-83.

78. Müller C. Orale sekretolytische Therapie. In: Ballmann M, Smaczny C (Hrsg). CF-Manual. Bremen, London, Boston: UNI-MED 2008 (2.Aufl); Kap.43:169.
79. Müller M (Hrsg). Respirationstrakt. Mukoviszidose. In: Pädiatrie für Studium und Praxis. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste 2013/2014:243-5.
80. Müller M (Hrsg). Verdauungstrakt. Zöliakie. In: Pädiatrie für Studium und Praxis. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste 2013/2014:263-4.
81. Muntau AC. Zystische Fibrose (Mukoviszidose, CF). In: Muntau AC. Intensivkurs Pädiatrie. München: Elsevier 2011 (6.Aufl);Kap.13.3.9:306-11.
82. 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 Pädiatrische Pneumologie. Stand: 06/2013.
83. Nalamachu S, Wortmann R. Role of indomethacin in acute pain and inflammation management: a review of literature. Postgrad Med 2014;126(4):92-7.
84. Office of Rare Diseases Research, National Institutes of Health. 2014. [www.rarediseases.info.nih.gov](http://www.rarediseases.info.nih.gov) Datum des letzten Zugangs: 02.11.2014.
85. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. Lancet 2009;373(9678):1891-904.
86. Paranjape SM, Zeitlin PL. Atypical cystic fibrosis and CFTR-related diseases. Clin Rev Allergy Immunol 2008;35(3):116-23.
87. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Abou Aleiwa MH, Ramachandran S, Moniger TO, Karp PH, Wohlford-Lenane CL, Haagsmann HP, van Eijk M, Bánfi B, Horswill AR, Stoltz DA, McCray Jr PB, Welsh MJ, Zabner J. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. Nature 2012;487(7405):109-13.
88. 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;12:21 (Abstract).
89. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. Nature 1983;301(5899):421-2.
90. Quinton PM. Cystic fibrosis: lessons from the sweat gland. Physiology (Bethesda) 2007;22:212-25.
91. Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. Physiol Rev 1999;79 Suppl 1:3-22.
92. Rasmussen JE, Sheridan JT, Polk W, Davies CM, Tarran R. Cigarette smoke-induced Ca<sup>2+</sup> release leads to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) dysfunction. J Biol Chem 2014;289(11):7671-81.

93. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003;361(9358):681-9.
94. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245(4922):1066-73.
95. Rogan MP, Stoltz DA, Hornick DB. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest* 2011;139:1480-90.
96. 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.
97. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005;352(19):1992-2001.
98. Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet* 2003;67:471-85.
99. Sands D. Transepithelial nasal potential difference (NPD) measurements in cystic fibrosis (CF). *Med Wieku Rozwoj* 2013;17(1):13-7.
100. Sawicki GS, McKone EF, Pasta DJ, Millar SJ, Wagener JS, Johnson CA, Konstan MW. Sustained Benefit from ivacaftor demonstrated by combining clinical trial and cystic fibrosis patient registry data. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192(7):836-42.
101. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30(12):e57.
102. Schwarz C. Arzneimitteltherapie der zystischen Fibrose (Mukoviszidose). *Arzneimitteltherapie* 2013;31(4):80-8.
103. Scotet V, Barton DE, Watson JB, Audrézet MP, McDevitt T, McQuaid S, Shortt C, De Braekeleer M, Férec C, Le Maréchal C. Comparison of the CFTR mutation spectrum in three cohorts of patients of Celtic origin from Brittany (France) and Ireland. *Hum Mutat* 2003;22(1):105.
104. Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Sands D, Stremmler N, Vavrova V, Deneuille 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.
105. Sermet-Gaudelus I. Ivacaftor treatment in patients with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *Eur Respir Rev* 2013;22(127):65-71.

106. Steward B, Zabner J, Shuber AP, Welsh MJ, McCray PB Jr. Normal sweat chloride values do not exclude the diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(3 Pt 1):899-903.
107. Stuhmann-Spangenberg M, Aulehla-Scholz C, Dworniczak B, Reiss J. Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (GfH) und Berufsverband Deutscher Humangenetiker e.V. (BVDH). Leitlinie zur Molekulargenetischen Diagnostik der Cystischen Fibrose. *Medgen* 2009;21:268-275.
108. Tobias ES, Connor M, Ferguson-Smith M. *Essential Medical Genetics*. John Wiley & Sons 2011:312.
109. Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, Zsiga M, Markiewicz D, Akoto G, Brown V, Helms C, Granvins T, Parker C, Rediker K, Donis-Keller H. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 1985;230(4729):1054-7.
110. Tümmler B. Genetik der CF. In: Ballmann M, Smaczny C (Hrsg). *CF-Manual*. Bremen, London, Boston: UNI-MED 2008 (2.Aufl):22-4.
111. Tümmler B, Lindemann H. Genetik, Molekularbiologie und allgemeine Pathophysiologie. In: Lindemann H, Tümmler B, Dockter G (Hrsg): *Mukoviszidose – Zystische Fibrose*. Stuttgart: Thieme 2004 (4.Aufl);Kap.2:3-13.
112. U.S. Food and Drug Administration (FDA). [www.fda.gov](http://www.fda.gov) Datum des letzten Zugangs: 17.08.2015.
113. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 2002;1:13-29.
114. 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.
115. Veeze HJ. Pathophysiological aspects of cystic fibrosis: genotypes, phenotypes and Intestinal Current Measurements. Thesis Rotterdam 1995;Chap.31:78.
116. 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;191(2):398-403.
117. Verordnung (EG) Nr. 141/2000 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 16. Dezember 1999 über Arzneimittel für seltene Leiden, ABI. 2000 Amtsblatt NR. L018: 1-5;Art3Abs1a).
118. Voter KZ, Ren CL. Diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;35(3):100-6.

119. Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Lae HJ, Farrall M, Cooke HJ, Eiberg H, Williamson R. Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature* 1985;318(6044):384-5.
120. 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, McKoy K, McKone EF, Munck A, Ratjen F, Rowe SM, Waltz D, Boyle MP; TRAFFIC Study Group; TRANSPORT Study Group. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 2015;373(3):220-31.
121. White R, Woodward S, Leppert M, O'Connell P, Nakamura Y, Hoff M, Herbst J, Lalouel JM, Dean M, Vande Woude G. A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature* 1985;318(6044):382-4.
122. Wilmott R. Zystische Fibrose (Mukoviszidose). In: Polin RS, Ditmar MF (Hrsg). *Fragen und Antworten. Pädiatrie. "Pediatric Secrets"* [Deutschsprachige Ausgabe: Heigele T, Trück J (Hrsg)]. Bern: Huber 2007;Kap.5.:203-5.
123. 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.
124. Wood RE, Boat TF, Doershuk CF. Cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1976;113(6):833-78.
125. World Health Organization. Classification of cystic fibrosis and related disorders. Report of a joint working group of WHO/ICF(M)A/ECFS/ECFTN, 2001. (Reprinted in *J Cyst Fibros* 2002;1:5-8).
126. World Health Organization. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Report of joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS. WHO/HGN/CF/WG/04.02. Geneva, WHO/HGN/CF/WG, 2004.
127. Worldwide survey of the F508del mutation – report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium. *Am J Hum Genet* 1990;47:354-9.
128. Yaakov Y, Kerem E, Yahav Y, Rivlin J, Blau H, Bentur L, Aviram M, Picard E, Bdolah-Abram T, Wilschanski M. Reproducibility of nasal potential difference measurements in cystic fibrosis. *Chest* 2007;132(4):1219-26.
129. Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z. CFTR mutations in men with congenital absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2012;27(1):25-35.
130. Zielinski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67:117-33.
131. Zsemberg A, Fortenberry JA, Liang L, Bebok Z, Tucker TA, Boyce AT, Braunstein GM, Welty E, Bell PD, Sorscher EJ, Clancy JP, Schwiebert EM. Extracellular zinc and ATP restore chloride secretion across cystic fibrosis airway epithelia by triggering calcium entry. *J Biol Chem* 2004;279(11):10720-9.

## 8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Michael Klosinski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nasale Potentialdifferenz und Intestinale Kurzschlussstrommessung zur diagnostischen Klassifizierung von Patienten mit fraglicher Mukoviszidose oder CFTR-assoziiertes Erkrankung“ 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 (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

## 9 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Michael Klosinski hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen und Arbeiten:

1. Abstract und Vortrag: Klosinski M, Pinders-Kessler L, Scheinert S, Staab D, Derichs N. Nasal potential difference and intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis or CFTR-related disorder. European Cystic Fibrosis Society Diagnostic Network Working Group (ECFS DNWG), 13<sup>th</sup> Annual Meeting, 11<sup>th</sup>-13<sup>th</sup> February 2016, London (Abstract und Vortrag).

Beitrag im Einzelnen: Verfassung und Einreichung des Abstracts, Vortrag und Diskussion im Rahmen des ECFS DNWG Meetings, Auszeichnung mit dem Young Investigator Award der European Cystic Fibrosis Society.

2. Abstract: 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; 12:21 (Abstract).

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung an der Datenerhebung und Datenauswertung: Durchführung und Auswertung von Schweißtest, NPD und ICM von 10/2012 - 12/2013. (Zeitaufwand pro Patient: 1. Tag: Schweißtest, NPD und ICM, 2. Tag: ICM nach nächtlicher Inkubation der Biopsien mit diversen CFTR-Modulatoren)

3. 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. 36<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 12<sup>th</sup>-15<sup>th</sup> June 2013, Lisbon (Abstract).

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung an der Datenerhebung und Datenauswertung: Durchführung und Auswertung von Schweißtest, NPD und ICM von 10/2012 - 12/2013. (Zeitaufwand pro Patient: 1. Tag: Schweißtest, NPD und ICM, 2. Tag: ICM nach nächtlicher Inkubation der Biopsien mit diversen CFTR-Modulatoren)

4. Poster: Scheinert S, Pinders-Kessler L, Klosinski M, Derichs N. Reliability of intestinal current measurement as CFTR biomarker and responsiveness to oral ivacaftor treatment. CFTR Biomarker Centre & Translational CF Research Group. Pediatric Pulmonology and Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany 2013 (Poster).

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung an der Datenerhebung und Datenauswertung: Durchführung und Auswertung von NPD und ICM von 10/2012 - 12/2013. (Zeitaufwand pro Patient: 1. Tag: Schweißtest, NPD und ICM vor Therapiebeginn mit Ivacaftor 2. Tag: Schweißtest, NPD und ICM eine Woche nach erstmaliger oraler Therapie mit Ivacaftor 3. Tag: Schweißtest, NPD und ICM 2 Wochen nach erstmaliger oraler Therapie mit Ivacaftor)

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

## 10 Publikationsliste

1. Klosinski M, Pinders-Kessler L, Scheinert S, Staab D, Derichs N. Nasal potential difference and intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis or CFTR-related disorder. European Cystic Fibrosis Society Diagnostic Network Working Group (ECFS DNWG), 13<sup>th</sup> Annual Meeting, 11<sup>th</sup> - 13<sup>th</sup> February 2016, London (Abstract und Vortrag).
2. 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;12:21 (Abstract).
3. Scheinert S, Pinders-Kessler L, Klosinski M, Staab D, Derichs N. Ex vivo effect of CFTR modulators VX770, VX809 and PTC 124 on CFTR-mediated chloride secretion in rectal biopsies from CF patients. 36<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, 12<sup>th</sup> - 15<sup>th</sup> June 2013, Lisbon (Abstract).
4. Scheinert S, Pinders-Kessler L, Klosinski M, Derichs N. Reliability of intestinal current measurement as CFTR biomarker and responsiveness to oral ivacaftor treatment. CFTR Biomarker Centre & Translational CF Research Group. Pediatric Pulmonology and Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany 2013 (Poster).

## **11 Lebenslauf**

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

Datum

Unterschrift

## **12 Danksagung**

Meinem Betreuer Herrn Dr. Nico Derichs danke ich für die Bereitstellung des Promotionsthemas und die Betreuung der Arbeit sowie meiner Doktormutter Frau PD Dr. Doris Staab für Ihre Betreuung und hilfreichen Ratschläge. Besonderer Dank gebührt auch den beiden Doktorandinnen unserer Arbeitsgruppe, Sheila Sheinert und Lea Pinders-Kessler, für ihre geduldige Einarbeitung und wertvollen Hilfestellungen.

Sascha Arndt und Frau Christa Weiss danke ich für ihre Bereitschaft, sich als Probanden für die Übung der NPD-Messung zur Verfügung gestellt zu haben. Großer Dank gebührt nicht zuletzt Frau Regina Ebenhoch für ihre intensive grafische Beratung und Herrn Karaman für seine Beratung bezüglich der statistischen Auswertung.

Meiner Familie möchte ich für all ihre Unterstützung danken. Ich danke Magdalena Kohler und Nathalie Knierim für die Freundschaft.